

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

TOXICITA AMINOFENOLICKÝCH LÉČIV
DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Monika Brožová
VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.
KONZULTANT: Mgr. Jiří Handl

2020

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

TOXICITY OF AMINOPHENOLIC DRUGS
THESIS

AUTHOR THESIS: Bc. Monika Brožová
SUPERVISOR: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.
CONSULTANT: Mgr. Jiří Handl

2020

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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5. 5. 2020

Monika Brožová

Poděkování:

Tímto bych chtěla především poděkovat vedoucímu mé diplomové práce panu doc. RNDr. Tomáši Roušarovi Ph.D., dále panu Mgr. Jiřímu Handlovi, panu Mgr. Janu Čapkovi a paní laborantce Bc. Ivaně Fousové za odborné vedení, konzultace, vstřícný přístup a cenné rady, které mi při zpracování diplomové práce věnovali. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu, vstřícnost a zázemí, které mi během studia poskytla.

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Monika Brožová**
Osobní číslo: **C18481**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Téma práce: **Toxicita aminofenolických léčiv**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

V teoretické části zpracujte rešerši týkající se aminofenolických léčiv, a to jak používaných v současnosti, tak i v minulosti. Stejně tak popište projevy toxicity typické pro dané typy tkání. V detailu se zaměřte především na fenacetin, acetaminofen a aminofenol.

Experimentální část:

Cílem práce je charakterizovat buněčné poškození způsobené minimálně jednou aminofenolickou látkou pomocí rutinních biochemických testů. Experimentální část se bude skládat z: základní práce s buňkami – testování toxicity – příprava vzorků pro analýzu.

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

Seznam doporučené literatury:

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

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Jiří Handl**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá studiem cytotoxického působení derivátů odvozených od aminofenolu – paracetamolu, *p*-aminofenolu.

Pro testování toxického působení derivátů byla použita lidská ledvinná buněčná linie HK-2. Toxické působení látek na buněčnou viabilitu bylo posuzováno v závislosti na jejich koncentracích a době inkubace. Změna životaschopnosti buněk po expozici toxinů byla hodnocena testem WST-1. Hladina intracelulárního glutathionu byla stanovena pomocí fluorescenční sondy monochlorobimanu s fluorometrickou detekcí. Stav aktinových vláken a buněčných jader byl sledován pomocí fluorescenčně značeného faloidinu a sondy Hoechst za použití fluorescenční mikroskopie.

Buňky HK-2 byly inkubovány po dobu 4 a 24 hodin s toxiny o různé koncentraci. Z výsledků WST-1 testu vyplývá, že toxicita látek stoupá s rostoucí koncentrací a dobou inkubace. Bylo zjištěno, že snížení počtu životaschopných buněk předchází snížení koncentrace glutathionu. Z celkových výsledků vyplývá, že obě látky jsou pro HK-2 buněčnou linii toxické.

Klíčová slova

Aminofenol, cytotoxicita, glutathion, nefrotoxicita, paracetamol, viabilita.

ABSTRACT

The thesis deals with the study of the cytotoxic effect of aminophenol derivatives - paracetamol, *p*-aminophenol.

The human renal cell line HK-2 was used to test the toxic effects of the derivatives. The toxic effects of substances on cell viability were assessed in relation to their concentrations and incubation time. The change in cell viability after toxin exposure was assessed by the WST-1 test. The level of intracellular glutathione was determined using a fluorescent probe, i.e. monochlorobimane, with fluorometric detection. Actin filaments and cell nuclei were visualized by phalloidin and Hoechst probes, respectively, using fluorescence microscopy.

HK-2 cells were incubated for 4 and 24 hours with toxins of various concentrations. The results of the WST-1 test show that the toxicity of the substances enhanced with increasing concentration and incubation time. In addition, we found that a reduction of the number of viable cells precedes reduction of glutathione concentration. The overall results show that both substances are toxic in the HK-2 cell line.

Keywords

Aminophenol, cytotoxicity, glutathione, nephrotoxicity, paracetamol, viability.

Seznam použitých zkratek:

5-ASA	Kyselina 5-aminosalicylová
ALT	Alaninaminotransferáza
APAP	Paracetamol
AST	Aspartátaminotransferáza
ATRA	Kyselina all-trans retionová
BHT	Butylovaný hydroxytoluen
CYP450	Cytochrom P450
ER	Endoplazmatické retikulum
GSH	Glutathion
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney 293</i>
HK-2	<i>Human Kidney 2</i>
LDH	Láktátdehydrogenáza
LLC-PK1	<i>Lilly Laboratories Cell-Porcine Kidney 1</i>
MCB	Monochlorobimany
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>
NAC	N-acetylcystein
NAD	Nikotinamidadeninukleotid
NADPH	Nikotinamidadeninukleotidfosfát
NAPQI	N-acetyl- <i>p</i> -benzochinonimin
NRK-52E	<i>Normal Rat Kidney-52E</i>
PAP	<i>p</i> -aminofenol
PBS	Fosfátový pufr
ROS	Reaktivní formy kyslíku

Obsah:

1	ÚVOD.....	- 12 -
2	TEORETICKÁ ČÁST	- 13 -
2.1	Buněčné linie	- 13 -
2.2	Renální buněčné linie.....	- 16 -
2.2.1	Normal Rat Kidney-52E (NRK-52E)	- 16 -
2.2.2	Madin Darby Canine Kidney (MDCK).....	- 17 -
2.2.3	Lilly Laboratories Cell-Porcine Kidney 1 (LLC-PK1)	- 17 -
2.2.4	Human Embryonic Kidney 293 (HEK293)	- 18 -
2.2.5	Human Kidney 2 (HK-2)	- 19 -
2.3	Deriváty odvozené od <i>p</i> -aminofenolu.....	- 20 -
2.3.1	<i>p</i> -aminofenol.....	- 20 -
2.3.2	Mesalazin	- 21 -
2.3.2.1	Metabolismus.....	- 22 -
2.3.2.2	Toxicita	- 23 -
2.3.3	Fenacetin.....	- 23 -
2.3.3.1	Metabolismus.....	- 24 -
2.3.3.2	Toxicita	- 25 -
2.3.4	Paracetamol	- 26 -
2.3.4.1	Metabolismus.....	- 27 -
2.3.4.2	Orgánová toxicita	- 30 -
2.3.4.3	Klinické projevy toxicity	- 31 -
2.3.4.4	Léčba předávkování.....	- 32 -
3	CÍLE PRÁCE.....	- 35 -
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 36 -
4.1	Pomůcky a přístroje	- 36 -
4.2	Seznam použitých chemikálií.....	- 36 -

4.3	Kultivace buněčné linie HK-2	- 37 -
4.4	Příprava roztoků.....	- 38 -
4.5	Testování cytotoxicity APAP a PAP	- 39 -
4.5.1	Test WST-1	- 39 -
4.5.2	Fluorometrické stanovení hladiny glutathionu	- 40 -
4.5.3	Fluorescenční mikroskopie.....	- 41 -
5	VÝSLEDKY	- 42 -
5.1	Optimalizace buněčné denzity	- 42 -
5.2	Stanovení buněčné viability a koncentrace glutathionu	- 43 -
5.2.1	Stanovení cytotoxicity – 4 hod	- 43 -
5.2.2	Stanovení cytotoxicity – 24 hod	- 45 -
5.3	Mikroskopická analýza buněk	- 47 -
6	DISKUZE	- 50 -
7	ZÁVĚR.....	- 54 -
8	LITERATURA.....	- 55 -
9	PŘÍLOHY – data ke grafům	- 64 -

1 ÚVOD

Při vývoji nových léčiv se klade velký důraz na optimalizaci léčebných přínosů a minimalizaci možných nežádoucích účinků. V posledních letech dochází k čím dál častějšímu užívání antipyretických a analgetických přípravků, což zapříčinilo především užívání analgetik bez lékařského předpisu. Vhodnost tohoto volného prodeje je předmětem mnoha diskuzí zejména s ohledem na značná zdravotní rizika při nevhodném užití léku, včetně projevů intoxikace a nežádoucích účinků, kterými jsou hlavně nefrotoxicita a hepatotoxicita, přičemž hepatotoxicita patří mezi hlavní příčiny morbidity a mortality zapříčiněné užíváním léčiv na celém světě a zároveň je také jedním z nejčastějších důvodů pro stažení léků z trhu.

Při testování toxicity léčiv *in vitro* se používají buněčné linie. Stanovení toxicity a určení biologické aktivity patří k základním testům při testování nových léčiv. K posuzování cytotoxicity je v současné době k dispozici široká škála *in vitro* testů. Může se hodnotit množství komponent uvolněných z buňky s následným měřením enzymatické aktivity, nebo např. může být měřena intracelulární enzymatická aktivita, kterou buňka ztrácí při porušení membrány. Další možností je detekce vybraných parametrů metabolické aktivity (WST-1test), nebo testy detekující apoptózu, které jsou založené na kaspázové aktivitě.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Buněčné linie

Buněčné linie jsou nesmrtelné buněčné kultury, které se množí ve vhodných médiích za určitých podmínek. Často se využívají při výzkumu místo primárních buněk, neboť mají velmi podobné, nebo dokonce stejné morfologické a funkční vlastnosti jako buňky primární. Poskytují čistou populaci buněk, což představuje velkou výhodu, protože poskytují konzistentní vzorek a reprodukovatelné výsledky. Dále poskytují víceméně neomezený přísun materiálu a nemusí se zde řešit etické problémy spojené s používáním a následným poškozením, případně zničením lidských nebo živočišných tkání.

Naopak nevýhodu můžeme spatřovat ve složení kultivačních médií, která nemají identické složení jako vnitřní prostředí organismu. U buněk může tím pádem docházet ke změnám morfologie, exprese genů, nebo citlivosti na různé podněty. Kultivační zařízení pro buněčné linie jsou velmi nákladná a zároveň i jednorázový sterilní spotřební materiál zvyšuje finanční náročnost celé metodiky.

Buněčné linie způsobily revoluci ve vědeckém výzkumu a využívají se při výrobě vakcín, při testování toxicity a metabolismu léčiv, produkci protilátek, studiu genových funkcí, tvorbě umělých tkání a syntéze biologických sloučenin. Díky neustálému vývoji a inovacím v oblasti moderní buněčné biologie a medicíny je využívání těchto technologií stále univerzálnější (Kaur, 2012).

Zdrojem buněk pro založení nové linie bývá laboratorní zvíře nebo člověk. Takto vytvořené kultury se nazývají primární. Použité buňky mohou být izolované z normální nebo z nádorové tkáně. Linie normálních buněk mají omezenou životnost, dochází ke stárnutí kultury, kdy se mění jejich vlastnosti a přestávají se dělit. Naopak nádorové buňky se lépe množí, snáze se kultivují a nepodléhají procesu stárnutí. Buněčné linie se mohou ale také získat od jiných laboratoří nebo ze sbírek. Mezi nejznámější sbírky patří European Collection of Cell Cultures (ECCC) a American Type Cell Collection (ATCC).

Životaschopnost, neboli viabilita buněk se vyjadřuje jako procento živých buněk z celé kultivované populace. Aby se udržovala životaschopnost a proliferace buněk v systému *in vitro*, musí být zajištěny vhodné kultivační podmínky, jako jsou teplota, složení plynů a média a charakter kultivační

nádoby. Kvalita kultivačního média a technika přípravy linií jsou velmi důležité aspekty při pěstování buněčných linií a celá práce vyžaduje čistotu a přesnost.

Buňky se kultivují v inkubátorech, které zajišťují optimální podmínky pro růst. Kultivační teplota je většinou 37 °C, relativní vlhkost v inkubátorech se pohybuje okolo 90 % a atmosféra je obohacena o zvýšené množství CO₂ (5 %). Základním a nezbytným vybavením buněčné laboratoře je laminární box, který umožňuje sterilní práci v prostředí s filtrovaným vzduchem. Kromě inkubátoru a laminárního boxu musí být laboratoře vybaveny obvyklými laboratorními pomůckami a přístroji, jako je mikroskop, vodní lázeň, centrifuga, chladnička a mraznička, atd.

Média pro kultivaci bývají upravena tak, aby co nejvíce napodobovala extracelulární prostředí *in vivo*, a aby obsahovala množství živin a látky potřebné pro život a růst buněčných kultur. Mezi takovéto látky patří vitamíny, bílkoviny, glukóza, růstové faktory, peptidy, inzulín apod. Existují média bezsérová nebo klasická se sérem. Do bezsérových médií se přidávají všechny potřebné látky, aby vzniklo komplexnější médium, jehož vývoj je podstatně delší a dražší. U médií se sérem se tedy přidává sérum, které dodá buňkám řadu biologicky významných látek. Nejčastěji se používá fetální bovinní sérum. Výměna médií se většinou provádí 2-3x týdně.

Většina takto pěstovaných buněk jsou buňky adherentní, které rostou přisedlé na povrchu kultivační nádoby. Povrchy bývají upraveny potahem polypeptidů složených z aminokyselin s polárním postranním řetězcem. Některé buňky se naopak kultivují v suspenzi. Jedná se tedy o buňky suspenzní a jsou to především krevní buňky. Adheze těchto buněk by mohla způsobit transformaci do jiného buněčného typu (*Chisti, 2000*).

Buňky se množí exponenciálně do té doby, než se dostanou do stacionární fáze a jejich růst se začne zpomalovat. Při práci s buněčnými liniemi se usiluje o udržení buněk v exponenciální fázi a těsně před dosažením fáze stacionární se buňky pasážují. Jedná se o subkultivaci, kdy se část buněk přesadí do nové kultivační nádoby a vhodně se naředí čerstvým médiem, aby se mohly dále množit. Buňky se v kultivačních nádobách navzájem ovlivňují. Pokud je v kultuře buněk málo, množí se pomaleji kvůli nedostatečné koncentraci růstových faktorů a může dokonce dojít až k apoptóze. Naopak při vysokých koncentracích se mohou buňky navzájem dotýkat a vytvořit

tak souvislou vrstvu. V tomto případě nejsou buňky dostatečně zásobovány živinami a postupně umírají (Davis, 2002).

Buněčné linie je nutné kontrolovat, aby se prokázala případná kontaminace či změna vlastností buněk. Ověřování (autentizace) buněčných kultur se provádí např. při vytvoření nové buněčné linie, před zmrazením, nebo také při nestandardním chování buněk. Nejčastěji bývá založeno na analýze zastoupení izoform vybraných enzymů. Mezi další metody patří cytogenetická analýza – stanovení karyotypu chromozomů, DNA analýza, aj.

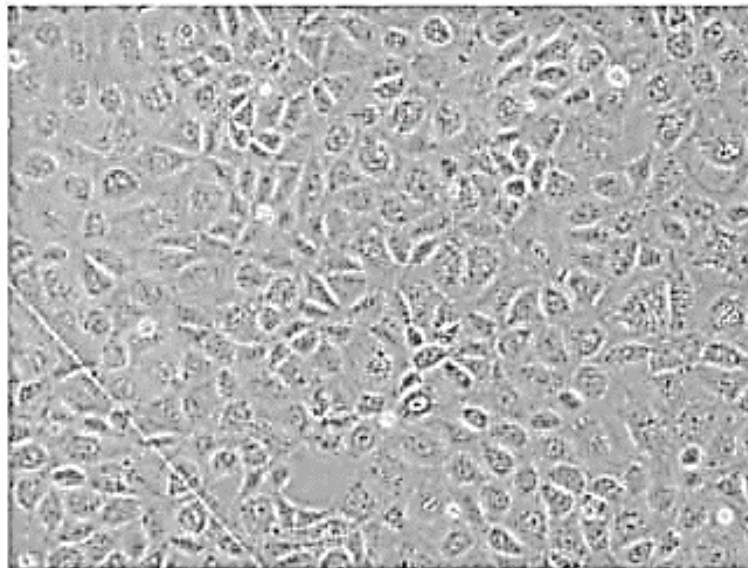
Buněčné kultury je možné zmrazit a uschovat a vytvořit tak zálohu pro případ, že dojde ke kontaminaci nebo zničení kultivované linie. Využívá se hlubokomrazicích boxů s teplotou kolem $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, v nichž je možné buňky přechovávat zmražené několik měsíců až let. Pro uchování linií po delší dobu se využívají Dewarovy nádoby s kapalným dusíkem, kde teplota dosahuje až $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aby při zamrazování nedošlo k poškození buněk krystaly vody, přidává se do kultivačního média vhodné kryoprotektivum, nejčastěji dimethylsulfoxid. Celý proces zmražení musí postupovat pomalu, aby se dosáhlo nejlepších výsledků, doporučuje se ochlazování o $1\text{--}3\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu. Na druhou stranu rozmrazení takto uchovávaných buněk musí probíhat co nejrychleji – nejlépe do 2 minut. Zmražení i rozmražení jsou postupy spojené s manipulacemi, při kterých může dojít ke kontaminaci. Jedním z hlavních problémů spojeným s buněčnými liniemi je kontaminace jinými buněčnými liniemi a mykoplazmaty.

2.2 Renální buněčné linie

Pro objasnění mechanismu nefrotoxicity byly vyvinuty různé metody *in vitro*. V současné době se při tomto testování nejvíce využívá několik buněčných linií živočišného (kryší, psí, prasečí) nebo lidského původu. Kromě původu se tyto linie liší i v lokalizaci, jedná-li se o proximální/distální tubuly, nebo jiné části nefronu (Vrbová, 2016).

2.2.1 Normal Rat Kidney-52E (NRK-52E)

NRK-52E je nejčastěji používanou kryší ledvinnou buněčnou linií. Buňky vykazují téměř shodné vlastnosti s buňkami proximálního tubulu. Některé odchylky byly zjištěny na základě diferenciaci těchto buněk na fibroblasty. Tyto problémy byly však vyřešeny přidáním D-valinu a L-ornithinu do kultivačního média. Jedná se tedy o buňky s typickou strukturou epitelálních buněk, které syntetizují řadu enzymů specifických pro ledviny – alkalická fosfatáza, gama-glutamyltranspeptidáza, beta-lyáza, N-acetyl-beta-glukosaminooxidáza, laktát-dehydrogenáza, N-acyláza.



Obr. 1: Morfologie buněčné linie NRK-52E (Deng, 2016)

V současné době byla tato buněčná linie použita v případech akutního poškození ledvin i při testování mechanismu toxicity a využívá se jako vhodný model pro studium účinků různých xenobiotik, kovů a pro sledování regenerace buněk po nefrotoxickém poškození (Barron, 1990, Lash, 2002).

2.2.2 Madin Darby Canine Kidney (MDCK)

Buněčná linie MDCK byla odvozena z ledvin dospělé feny kokršpaněla v roce 1958. MDCK buňky vykazují podobné vlastnosti jako buňky distálního tubulu. Vytvářejí jednovrstvou polarizovanou buňku s kartáčovým lemem a těsnými spoji. Obsahují řadu mitochondrií, polyribosomů a Golgiho aparát.

Funkce těchto buněk je regulována specifickými mechanismy distálního tubulu. Specifické hormony pro proximální tubulus jako je parathormon a kalcitonin nemají na MDCK buňky žádný vliv. Kultivační média pro MDCK musí obsahovat řasu hormonů (inzulín, glukagon, hydrokortison), růstové faktory a další sloučeniny (prostaglandin E₂, transferin). MDCK buňky byly využívány, při testech na ledvinných buňkách *in vitro* až 10x častěji než NRK-52E a to především při studiu virových infekcí a cytopatologických účinků (Kreisberg, 1988, Rindler, 1979).

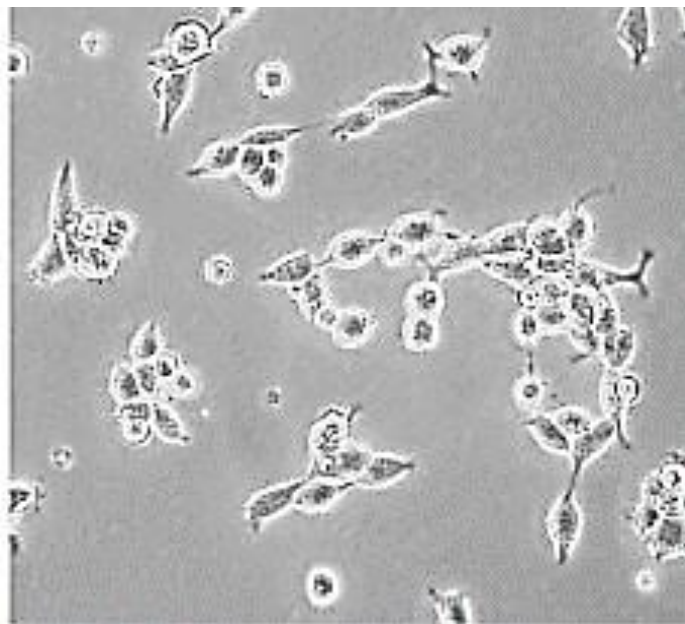
2.2.3 Lilly Laboratories Cell-Porcine Kidney 1 (LLC-PK1)

LLC-PK1 proximální tubulární buňky izolované z prasečích buněk jsou buňky s jedinečnou morfologií, včetně tvorby agregátů a tvorby 3D-sféroidů s vrstvou polarizovaných buněk na povrchu. Buňky produkují řadu enzymů specifických pro proximální tubuly (alkalická fosfatáza, gama-glutamyltranspeptidáza), membránové transportéry (Na/K-ATPáza, transportéry aminokyselin, apod.). Ale i přesto, že je tato linie uváděna jako proximální, ne všechny charakteristiky jsou shodné s proximálními tubuly, jako jsou např. přítomnost a syntéza receptorů vazopresinu anebo tvar a lokalizace mitochondrií v buňce.

Tato buněčná linie je vhodná pro studium fyziologie, membránového transportu biochemické studie díky svému 3D růstu a struktuře a i pro testování nefrotoxicity *in vitro* (Toutain, 1992).

2.2.4 Human Embryonic Kidney 293 (HEK293)

HEK293 je jedna ze dvou nejčastěji používaných buněčných linií lidského původu. Poprvé byla vykultivována v roce 1970 Frankem Grahamem v Nizozemí. Jedná se o druhou linii vytvořenou transdukcí viru. Byla vytvořena z ledvinných buněk potracených embryí transfekcí adenovirem. Označení 293 je pouze symbolické, kdy právě z 293. transformační pokus tato linie vzešla (Graham, 1973). Buněčná linie má morfologii epitelu ledvin, ale nevykazuje podobný růst. Buňky produkují cytoskeletální vlákna (vimentin, keratin 8, neurofilamenta) a neurogranin, který je specifický pro nervovou tkáň. Postupem času bylo prokázáno, že tato buněčná linie a několik dalších, které jsou generované transformací adenovirem lidských ledvinných buněk, mají spoustu vlastností nezralých neuronů a dají se tak pokládat za linie odvozené z neurálních ledvinných buněk.

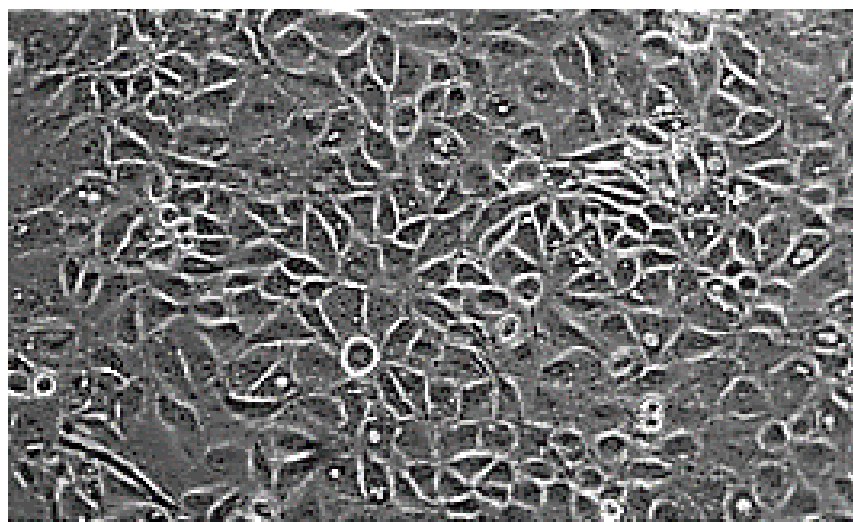


Obr.2: Morfologie buněčné linie HEK293 (Valerius, 2002)

Tato linie je velmi snadno transfektovaná, a proto se využívá většinou v pokusech, kdy není samotné chování buňky hlavním předmětem zájmu. Může se tedy využívat při studii účinků léků na sodíkové kanály, testování indukovaného systému RNA interference nebo při výzkumu interakce mezi dvěma proteiny (Fredj, 2006; Amar, 2006). Postupem času se začaly vyvíjet i další varianty původní linie HEK293, aby se dosáhlo rychlejšího růstu, snazší kultivace a vyšší úrovně transfekce, např. HEK293S, HEK293 (Tom, 2007).

2.2.5 Human Kidney 2 (HK-2)

Za účelem provádět experimenty s nefrotoxicitou na lidských buňkách byla nedávno vytvořena buněčná linie HK-2. Buňky HK-2 byly připraveny z proximálních tubulů lidských ledvinných buněk, které byly transfekovány transdukci lidského papilloma viru 16 (HPV-16). Buňky tedy mají stejné morfologické a biochemické vlastnosti jako proximální tubuly a proto se začaly používat právě jako standardní model při testování nefrotoxicity *in vitro* (Ryan, 1994).



Obr. 3: Morfologie buněčné linie HK-2 (Tian 2007)

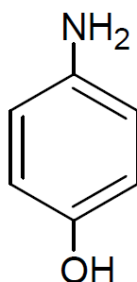
HK-2 buňky rostou v jedné vrstvě s těsnými spoji a *mikrovilli* na apikální membráně. Kromě řady organických aniontových transportérů se jejich membrána skládá z P-glykoproteinu, nespecifického membránového transportérů xenobiotik a jejich metabolitů. Obsahují enzymy, které jsou typické pro proximální tubuly – alkalickou fosfatázu, gama-glutamyltranspeptidázu, leucinaminopeptidázu a kyselou fosfatázu. Buňky dále také produkují vimentin, cytokeratin a integriny. Tyto buňky mají schopnost transportu glukózy závislým na Na⁺-transportu a mastných kyselin. Dalším důkazem jejich původu v proximálním tubulu je, že reagují na parathormon a zároveň nereagují na vazopresin (Shipp, 1989; Wang, 2006).

Nejnovější buněčná linie HK-2 se zatím uplatnila pouze v omezeném množství experimentů zaměřených především na nefrotoxicitu, avšak její využití stále roste. Vytváří se další studie, které by prokázaly její vhodnost pro experimenty zejména ve výzkumu metabolismu léčiv (Kwon, 2015)

2.3 Deriváty odvozené od *p*-aminofenolu

2.3.1 *p*-aminofenol

p-aminofenol (PAP) (Obr. 4) je důležitou sloučeninou, která se může vyskytovat v různých průmyslových odvětvích, např. v ropném, gumárenském, lékařském nebo fotografickém. Je také dobře známý jako nebezpečná látka znečišťující životní prostředí. Synteticky lze *p*-aminofenol vyrábět mnoha způsoby včetně přesmyku fenyhydroxylaminu v roztoku kyseliny sírové.



Obr. 4: Strukturální vzorec *p*-aminofenolu

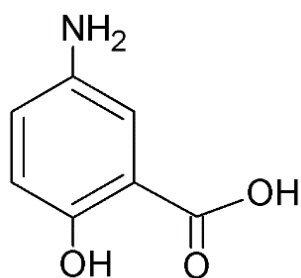
PAP je velmi škodlivou látkou pro lidský organismus, zejména kvůli své struktuře podobné anilinu a fenolu. Působí toxicky na oči, kůži i dýchací systém a zvyšuje tělesnou teplotu a má dlouhý biologický poločas rozpadu. Vykazuje biochemická i environmentální nebezpečí a je tedy velmi důležité sledovat stopové množství PAP v průmyslových odpadních vodách. PAP je také přímým meziproduktem při syntéze paracetamolu (*Benavente, 2018; Khan, 2006; Xu, 2005*). Tato sloučenina je také meziproduktem rozkladu paracetamolu a jeho analogů v lidském těle a během skladování těchto léčivých přípravků. Je známo, že paracetamol může ve vodném roztoku podléhat hydrolyze za vzniku *p*-aminofenol, který je sám o sobě náchylný k rozkladu na chinonimin. Má sklon vytvářet oxidační produkty, které způsobují charakteristické růžové zbarvení roztoků (*Filik, 2008*).

PAP způsobuje nefrotoxicitu různými biochemickými mechanismy, které nebyly doposud zcela objasněny. V jedné studii byla cytotoxicita PAP oslabena tím, že byly do inkubačního média zahrnuty antioxidanty, jako je askorbát a glutathion, což naznačuje, že oxidace je důležitou součástí toxického působení PAP. Prochází neenzymatickou oxidací za vzniku četných vedlejších produktů, včetně benzochinoniminu a *p*-aminofenoxylového radikálu.

Tyto reaktivní meziprodukty mohou být odpovědné za mitochondriální poškození (Foreman, 2008).

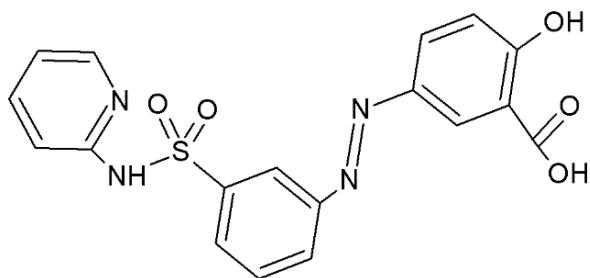
2.3.2 Mesalazin

Mesalazin (Obr. 5) je celosvětově běžně užívané, pacienty dobře snášené protizánětlivé léčivo, které má mnoho antioxidačních účinků a zpomaluje střevní záněty. Používá se k léčbě zánětlivého onemocnění střev, včetně mírně až středně závažné ulcerózní kolitidy a také se využívá pro udržení remise při Crohnově chorobě (Ham, 2013).



Obr. 5: Strukturální vzorec mesalazinu

Mesalazin byl identifikován v roce 1977 jako protizánětlivá aktivní složka léčiva sulfasalazin, které bylo již ve 40. letech využíváno k léčbě ulcerózní kolitidy. Sulfasalazin (Obr. 6) je složen z mesalazinu, který je přes diazo- vazbu navázán na neaktivní složku sulfapyridin. Tato vazba umožňuje bakteriální azoreduktázou v tenkém a tlustém střevě uvolňování kyseliny 5-aminosalicylové (5-ASA). Sulfapyridin je odpovědný za nežádoucí účinky a přecitlivělé reakce spojené s užíváním sulfalazinu. Nejčastěji se jednalo o hematologické vedlejší účinky jako je např. aplastická nebo hemolytická anémie (Ek, 2017; Ham, 2013).



Obr. 6: Strukturální vzorec sulfasalazinu

Zmírnění vedlejších účinků mesalazinu umožnilo jeho užívání v mnohem vyšších dávkách, než byly terapeutické dávky u sulfasalazinu. A zároveň zavedení tohoto léčiva usnadnilo léčbu zánětlivých onemocnění střev bez nežádoucích účinků, které způsoboval sulfasalazin (*Patel 2009*).

Existuje mnoho perorálních forem mesalazinu, které se liší uvolňovacími vlastnostmi. Přípravky obsahující mesalazin jsou např. Asacol, Asacol HD, PENTASA, Lialsa, Apriso nebo také Delizicol. Nejvíce užívaným při léčbě onemocnění střev je Asacol a byl volen jako první linie léčby ulcerózní kolitidy (*Nassan, 2016; Suzuki, 2016*). Kvůli změnám pH v trávicím traktu mají tablety mesalazinu enterosolventní potah a rozpouštějí se tak podle stanovené prahové hodnoty pH. Nedochází tak k uvolňování léky v oblastech s kyselým pH v okolí žaludku, ale až v tlustém střevě, kde je pH neutrální a uvolňování nejpomalejší (*Ogata 2017; Tenjarla, 2015*).

2.3.2.1 Metabolismus

Mechanismus účinku mesalazinu nebyl zatím stále zcela objasněn, ale některé studie naznačují, že může způsobovat změny v adhezi a perzistenci střevních bakterií, což zmírňuje zatížení mukózními bakteriemi (*Dahl, 2016*). Mesalazin blokuje interleukin-1 a TNF- α a inhibuje aktivitu cyklooxygenázy, což následně inhibuje syntézu prostaglandinu E2 ve střevech (*Smeets, 2016*). Dále vychytává reaktivní formy kyslíku, aktivuje PPAR- γ , inhibuje tvorbu leukotrienů a blokuje aktivaci nukleárního faktoru kappa B.

Při orálním užití se mesalazin částečně oxiduje v žaludku a zhruba 30 % se absorbuje v tenkém střevě. V játrech následně dochází k acylaci na N-acetyl-5-ASA a nakonec se volná 5-ASA a N-acetyl-5-ASA vylučuje močí, nebo stolicí. Velká část 5-ASA je přenesena do krevního řečiště, kde je transportována k místům účinku (*Ogata 2017; Tenjarla, 2015*).

2.3.2.2 Toxicita

Ačkoliv je mesalazin velmi bezpečný užívaný a pacienti dobře snášený lék, může v některých případech způsobovat až komplexní poškození orgánů, především jater, ledvin, pankreatu, srdce a kůže. Je popsáno také několik případů, kdy u pacientů užívajících mesalazin došlo k nežádoucím plicním projevům, kdy byla spuštěna alergická reakce, které mohla způsobit rozsáhlá plicní poškození (*Actis, 2009*).

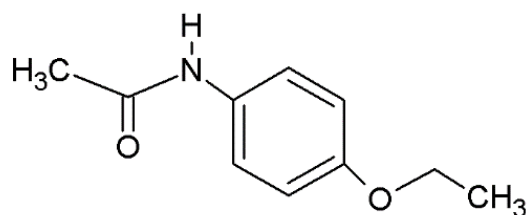
Mezi velmi vzácné avšak závažné nežádoucí působení mesalazinu patří akutní pankreatitida a chronická nefrotoxicita. U pacientů se zánětlivým onemocněním střev se incidence nefrotoxicity odhaduje na 1:100. Aby bylo možné při projevu těchto komplikací co nejdříve zasáhnout a lék vysadit, doporučuje se pravidelné monitorování funkce ledvin pacienta především během prvního roku léčby.

Řada studií poukázala na to, že pacienti užívající tento lék mají větší riziko k projevu nefrotoxicity, ale zároveň i jejich onemocnění samotné je odpovědné za možné poškození ledvin. Běžně se jako nežádoucí vedlejší účinky při užívání mesalazinu může objevit kašel, dušnost, bolest na hrudníku, únava a horečka. Obvykle se začínají projevovat 1-6 měsíců od počátku léčby a ve většině případů nejsou nijak závažné (*Yeo, 2017; Magalhães-Costa, 2015; Ferrusquía, 2015*).

2.3.3 Fenacetin

Fenacetin (N-(4-ethoxyfenyl)acetamid, acetofenitidin) (Obr. 7) byl již od 1887 dlouhodobě využíván ve zdravotnictví a ve veterinární medicíně jako analgetikum a antipyretikum. Fenacetin byl oblíbený kvůli svému dlouhotrvajícímu účinku. Ve srovnání s paracetamolem má však mnohem slabší antipyretické účinky. Vědcům trvalo téměř 50 let, než zjistili, že paracetamol je hlavním metabolitem fenacetinu, což umožňuje jeho analgetické působení (*Waddington, 2015*).

Přípravky obsahující fenacetin, nejčastěji v kombinaci s kofeinem a aspirinem, byly uváděny na trh především ve formě tablet a kapslí, které obsahovaly 150–300 mg fenacetinu. Doporučené dávkování bylo 300 mg 4–6x denně a celková dávka nesměla překročit 2 g za den (*IARC, 1977; IARC 1980*).

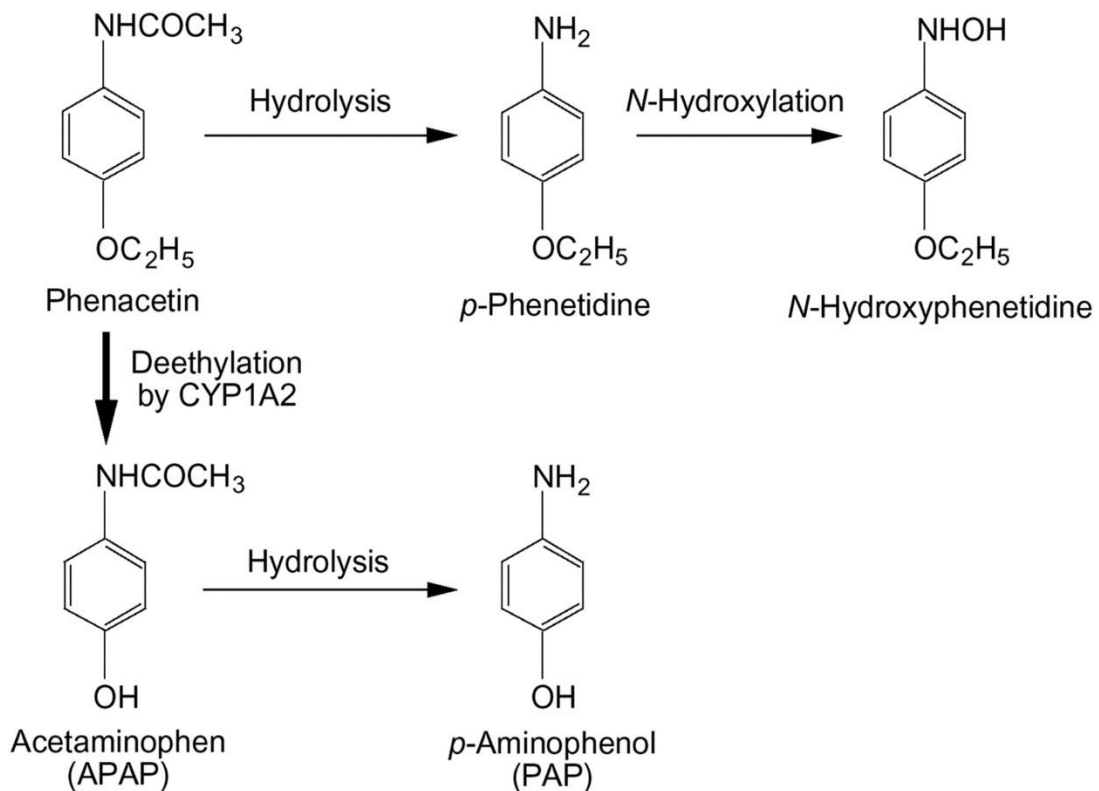


Obr. 7: Strukturální vzorec fenacetinu

Koncem 70. let 20. století se však zjistilo, že u mnoha pacientů, kteří tento lék užívali, způsoboval renální selhání, byl prokázán jako typický karcinogen a ledvinový toxin a musel být z trhu stažen (IARC, 1980). Bylo popsáno mnoho případů nádorů močové trubice, močového měchýře, renální pánvičky a ledvin u pacientů, kteří fenacetin užívali. Fenacetin byl následně nahrazen svým metabolitem paracetamolem (IARC, 1987).

2.3.3.1 Metabolismus

Metabolismus fenacetinu zahrnuje 4 různé sloučeniny – paracetamol, fenacetin-3,4-epoxid, *N*-hydroxyfenacetin a 2-hydroxyfenetidin (Obr. 8). Nejprve se fenacetin metabolizuje prostřednictvím *O*-deethylace na CYP1A2 na paracetamol, ale i na *p*-fenetidin a to prostřednictvím deacetylace. *p*-fenetidin je následně metabolizován na *N*-hydroxyfenetidin, který je považován za hlavní příčinu renálního selhání. Problémem je i vzniklý paracetamol, který je biotransformován na *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI) a působí hepatotoxicky. Všechny tyto metabolity jsou převážně vylučovány močí (Watanabe, 2010).



Obr. 8: Metabolismus fenacetinu (Watanabe, 2010)

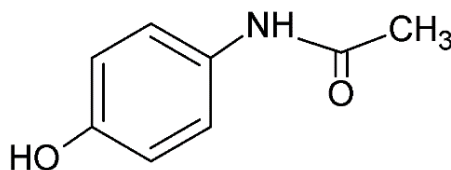
2.3.3.2 Toxicita

Mnoho studií prokázalo, že toxicita fenacetinu souvisí s jeho metabolismem. Pro objasnění příčin ledvinného selhání je důležitá identifikace enzymů hydrolyzy fenacetinu. Za jeho nefrotoxické působení je pravděpodobně odpovědný jeho hydrolyzovaný metabolit *p*-fenetidín (Watanabe, 2010). Jak již bylo zmíněno, fenacetin je prokázaným karcinogenem. Bylo popsáno mnoho případů pacientů, kteří užívali vysoké dávky léků obsahující fenacetin, a u nichž došlo k nádorovému bujení v oblasti ledvin, renální pánvičky, močového měchýře a močové trubice (IRAC, 1987).

2.3.4 Paracetamol

Paracetamol (*N*-acetyl-*p*-aminofenol, APAP) (Obr. 9), nebo také jiným názvem acetaminofen, je silné, velmi často využívané analgetikum a antipyretikum s minimálními protizánětlivými účinky. Různé údaje však naznačují, že je méně účinný než jiná nesteroidní protizánětlivá léčiva (Koletic, 2019).

Již koncem 19. století byly objeveny dva deriváty anilinu s analgetickými a antipyretickými vlastnostmi. Jednalo se o fenacetin a acetanilid. V roce 1957 dostalo léčivo název „paracetamol“ a začalo být častěji využíváno jako bezpečnější alternativa k nefrotoxickému a karcinogennímu fenacetinu (Hayward, 2015). Hepatotoxické působení APAP bylo poprvé zaznamenáno v roce 1966 Davidsonem a Easthamem, kdy došlo k předávkování dvou pacientů, kteří následně zemřeli na fulminantní nekrózu jater. Od té doby se začalo provádět mnoho studií, které by prokázaly toxicitu tohoto léčiva (Mund, 2015).



Obr. 9: Strukturní vzorec paracetamolu

Přesný účinek paracetamolu dosud není zcela znám, ale předpokládá se, že je zprostředkován přes centrální nervový systém, kde dochází k inhibici syntézy prostaglandinů. Paracetamol se obvykle užívá při léčbě menších bolestí, při virových a bakteriálních infekcích, bolestí hlavy a zubů, nebo při menstruačních bolestech. Při terapeutických dávkách se považuje za vysoce bezpečné léčivo. APAP je užíván v mnoha formách – kapky, tablety, rektální čípky, intravenózní roztoky, apod. V přípravcích se používá většinou v kombinaci s jinými látkami, jako jsou opioidy a difenylhydramin.

K dostání je v lékárnách bez lékařského předpisu. Vzhledem k jeho široké a snadné dostupnosti v různých léčivých přípravcích dochází často k úmyslnému i neúmyslnému předávkování, které může způsobit vážné poškození jater i jejich akutní selhání. Intoxikace paracetamolem je druhou

nejčastější příčinou akutního selhání jater a následně případné transplantace na světě.

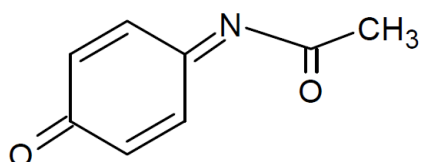
Ačkoliv má APAP vysoký bezpečnostní profil, při chybném a nadměrném dávkování může, jak již bylo řečeno, působit hepatotoxicky a nefrotoxicky. Jako doporučená denní dávka pro dospělého jedince se uvádí 650–1000 mg obvykle po 4–6 hodinách, ale nesmí být překročena dávka 4 g za den a toxická dávka se projevuje v rozmezí 7,5–10 g za den. U dětí se dávkování vztahuje na jejich tělesnou hmotnost a činí 15 mg/kg každých 6 hodin až do 60 mg/kg za den. APAP bývá dětem podáván perorálně, rektálně (především u malých dětí) nebo intravenózně s doporučeným dávkováním 10–15 mg/kg po 6 hodinách a zároveň nesmí denní dávka překročit 60 mg/kg. Jako toxická je u dětí považována dávka nad 140 mg/kg za den. Avšak i dlouhodobé dávkování 60–140 mg/kg za den může být pro děti rizikové. Navíc u mladších dětí může hrozit ireverzibilní selhání jater i při podávání léčiva v terapeutických dávkách (Olosová, 2007; Schmidt, 2013; Sarganas, 2015).

2.3.4.1 Metabolismus

APAP se vstřebává z gastrointestinálního traktu a následuje adsorpce v duodenu. Může dojít k časové prodlevě vstřebání, pokud pacient ve stejnou dobu, co požije léčivo, konzumuje potravu, nebo se zpožděné vstřebávání děje také u novorozenců nebo u pacientů s chronickou jaterní chorobou (Yoon, 2016).

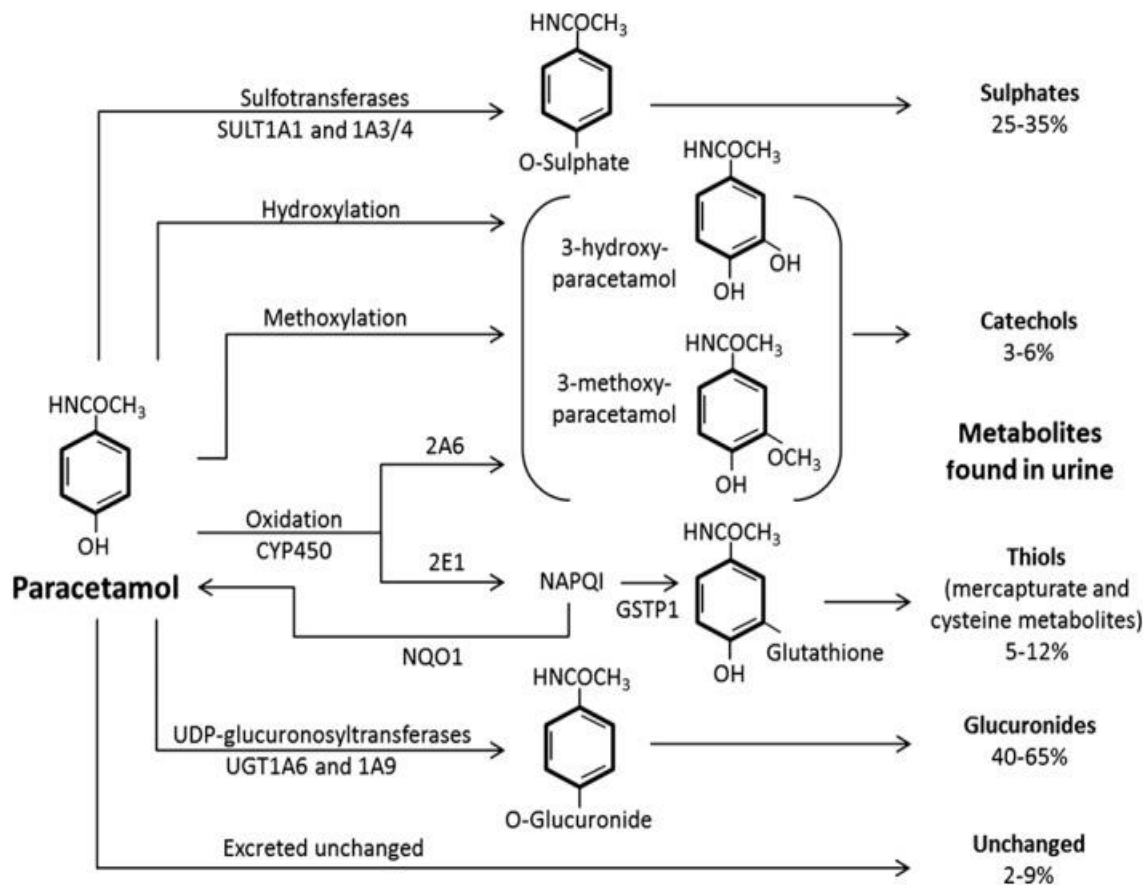
Metabolismus paracetamolu se odehrává v játrech třemi různými cestami (Obr. 11). Při užití paracetamolu v terapeutické dávce se uplatňují hlavně první dvě cesty, a to konjugace se sulfátem a konjugace s glukuronátem a pouze 10 % paracetamolu je metabolizováno třetí cestou, tedy enzymatickou. Pokud dojde k předávkování, první dvě cesty jsou nasyceny a APAP se metabolizuje především třetí cestou. Tato cesta je klíčovým mechanismem hepatotoxického působení. Jedná se o transformaci enzymatickým systémem CYP2E1 a CYP1A2 cytochromu P450 (CYP450). Touto cestou se z paracetamolu generuje tzv. *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI), který je odpovědný za jeho toxicitu (Mund, 2015; Mühl, 2016; Yoshioka, 2017)

Vzniklý NAPQI (Obr. 10) se ihned konjuguje s redukovaným glutathionem (GSH) a vznikají tak netoxické cysteinové a merkapturátové sloučeniny, které jsou z těla vylučovány močí. Méně než 5 % acetaminofenu je vyloučeno beze změny (Yoon, 2016; McCee, 2018).



Obr. 10: Strukturální vzorec NAPQI

Glutathion je jedním z nejdůležitějších antioxidantů a zabraňuje vzniku oxidačního stresu. Při intoxikaci dochází k vyčerpání jeho zásob, a proto nedokáže přeměňovat NAPQI na neškodný metabolit. Volný NAPQI se tedy začne kovalentně ireverzibilně vázat na proteiny hepatocytů a činí tak buňky zranitelnější vůči působení oxidačního stresu. Toto vše vede k několika změnám, např. dochází ke změnám v metabolismu citrátového cyklu, v metabolismu mastných kyselin, k poklesu generace ATP, což má za následek nekrózu buněk, a následně dochází k hepatocelulárnímu poškození a až k samotnému selhání jater (Mund, 2015; Gündüz, 2015; Mühl, 2016; Schnackenberg, 2017). NAPQI také indukuje produkci reaktivních forem kyslíku v játrech, ale i v ledvinách, což způsobuje dysfunkci, změnu permeability mitochondriálních pórů, poškození DNA a buněčnou smrt a to vše může vést k akutnímu selhání ledvin (Fadda, 2019).



Obr. 11: Metabolismus paracetamolu (Hayward, 2015)

APAP je v pediatrii nejčastěji užívaným lékem při léčbě bolesti a horečky. U dětí, stejně jako u dospělých, je APAP metabolizován hlavně v játrech třemi cestami: glukuronidací, sulfatací a oxidací. Účinek každé z cest se však liší podle věku dítěte. Sulfatace je považována za hlavní cestu u malých dětí a nevykazuje známky nasycení po intravenózním podání paracetamolu do 20 mg/kg dětem mladším 32 týdnů. Avšak opakované dávky paracetamolu novorozencům by mohly posunout metabolismus směrem k oxidaci prostřednictvím CYP450 a tvorbě hepatotoxicky působícímu NAPQI. Účinky glukuronidační cesty se uplatňují u dětí do 12 let. U starších dětí a dospělých se jedná již i o oxidační cestu prostřednictvím cytochromu P450, kdy také vzniká NAPQI (Haslund-Krog, 2019). Metabolismus paracetamolu závisí také na velikosti jater a funkci jaterních enzymů. Játra dětí jsou v poměru k jejich hmotnosti mnohem větší než játra dospělých. Dále mají rychlejší metabolismus, a tudíž mohou kvůli větším zásobám glutathionu APAP účinněji metabolizovat (Olasová, 2007).

2.3.4.2 Orgánová toxicita

Akutní otrava paracetamolem je ve světě nejčastější příčinou poškození jater, které může mít až fatální následky, pokud není včas rozpoznáno. 48 % z případů akutního selhání jater ve světě způsobuje hepatotoxicita paracetamolu a více než polovina těchto pacientů musí následně podstoupit transplantaci jater (*Schnackernberg, 2017; Yoon 2016*).

Předávkování paracetamolem ve Spojeném Království každoročně vede k příjmu 100 000 pacientů na pohotovostním oddělení, 50 000 akutních hospitalizací a z toho přibližně 150 úmrtí. Úmrtí nebo akutní selhání jater u pacientů, kdy je léčba zahájena do 8 hodin od předávkování, jsou mimořádně vzácná, díky snadné dostupnosti vysoce účinného antidota (*Pettie, 2019*).

Hepatotoxicita může souviset s nadměrnou jednorázovou dávkou u dříve zdravého pacienta, ale také i s nižší nebo terapeutickou dávkou u pacientů, kteří mají vyšší náchylnost k rozvoji akutního poškození jater po užití paracetamolu (*Castanares-Zapatero, 2018*). Mezi rizikové faktory pro rozvoj hepatotoxicity patří chronické užívání alkoholu, chronická podvýživa, pokročilý věk, genetické faktory a také interakce s léky, které indukují jaterní cytochrom P450 (*Piotrowska, 2019*). U většiny případů, kdy dochází k selhání jater, dávka paracetamolu překračuje 150 mg/kg, avšak existují výjimky, kdy i nižší dávky způsobily akutní poškození nebo dokonce selhání jater. Vysoké riziko úmrtí nastává při dávce nad 25 g (*Schmitt, 2005; Yoon, 2016*).

Zhruba polovina předávkování paracetamolem je záměrná, především u mladších lidí ve věku okolo 21 let. Vystává otázka, zda by tito pacienti měli mít stejnou možnost transplantace jako ostatní neúmyslně intoxikovaní pacienti hlavně z důvodu omezeného množství dárcovských orgánů (*Yoon, 2016*).

Méně častá je u předávkování paracetamolem i nefrotoxicita. K nefrotoxickému působení může dojít tehdy, pokud je funkce ledvin poškozena různými exogenními nebo endogenními látkami a nedochází tak k dostatečně detoxikaci a vylučování škodlivin. Vyšší riziko pro rozvoj nefrotoxicity může způsobit i společné užití nesteroidních protizánětlivých léčiv. Nefrotoxicita vyvolaná léčivý je velkým problémem, protože používání nefrotoxicky působících léčiv je v klinické praxi v podstatě nevyhnutelné (*Chinnappan, 2019*).

Může dojít k renálnímu tubulárnímu poškození, zejména proximálního tubulu, akutnímu selhání ledvin a následně až k smrti. Poškození ledvin se vyskytuje u 2–10 % pacientů a nejčastěji současně v případech s těžkou hepatotoxicitou vyvolanou paracetamolem. Zatímco vysvětlení hepatotoxického působení je dobře známo, příčiny renální toxicity jsou méně jasné. Možné důvody zahrnují místní vznik NAPQI nebo jiných toxických metabolitů z paracetamolu prostřednictvím enzymů CYP450, nebo cyklooxygenázy (*Chinnappan, 2019; McCrae, 2018; Saleem, 2019*). Důsledek paracetamolem vyvolané nefrotoxicity v nepřítomnosti souběžného selhání jater není většinou vážný. Pouze 1 % pacientů potřebuje dočasnou dialýzu a většině pacientů se vrací základní renální funkce do 1 měsíce. Důležitým ukazatelem renální toxicity je zvýšení koncentrace močoviny a kreatininu v séru (*Kandemir, 2017*).

2.3.4.3 Klinické projevy toxicity

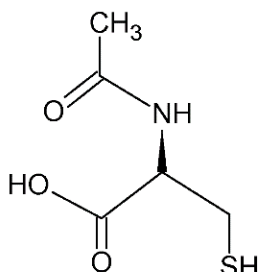
Jsou popsány 4 fáze intoxikace paracetamolem. V první fázi, většinou do 24 hodin od předávkování, se začínají vyskytovat nespecifické symptomy jako např. nechutenství, nevolnost, zvracení a malátnost, proto je rozpoznání hepatotoxicity často velmi obtížné. Hodnoty jaterních enzymů alaninaminotransferáza (ALT) a aspartátaminotransferáza (AST) v krvi bývají normální, pouze u vyššího předávkování může být po 8–12 hodinách zaznamenáno zvýšení (*Yoon, 2016; Schanckenberg, 2017*).

Po 24–48 hodinách, nastupuje druhá fáze, kdy začínají počáteční obtíže ustupovat, ale začíná se projevovat bolest v pravém podžebří. U těžších případů se může objevit i koagulopatie a žloutenka. Jaterní enzymy bývají zvýšeny a můžeme zjistit i zvýšené hladiny bilirubinu a také prodloužení protrombinového času.

Během následujících 72–96 hodin se u pacientů znovu objevují počáteční potíže. V této fázi dochází k maximálnímu poškození jater, abnormálně se snižují parametry jejich funkce. Může docházet i k víceorgánovému selhání a je zde nejvyšší riziko úmrtí. Důsledky míry předávkování se projevují po dobu 4–14 dní. U pacientů může dojít k postupné regeneraci jater a k obnově jejich funkce, anebo může také dojít k jejich úplnému selhání (*Yoon, 2016*).

2.3.4.4 Léčba předávkování

Neprodleně po předávkování bývá aplikováno aktivní uhlí. U závažnějších případů intoxikace je nezbytné okamžité podání antidota. V současnosti se jako antidotum nejvíce používá *N*-acetylcystein (NAC) (Obr. 12). NAC snižuje pravděpodobnost progresu poškození jater.

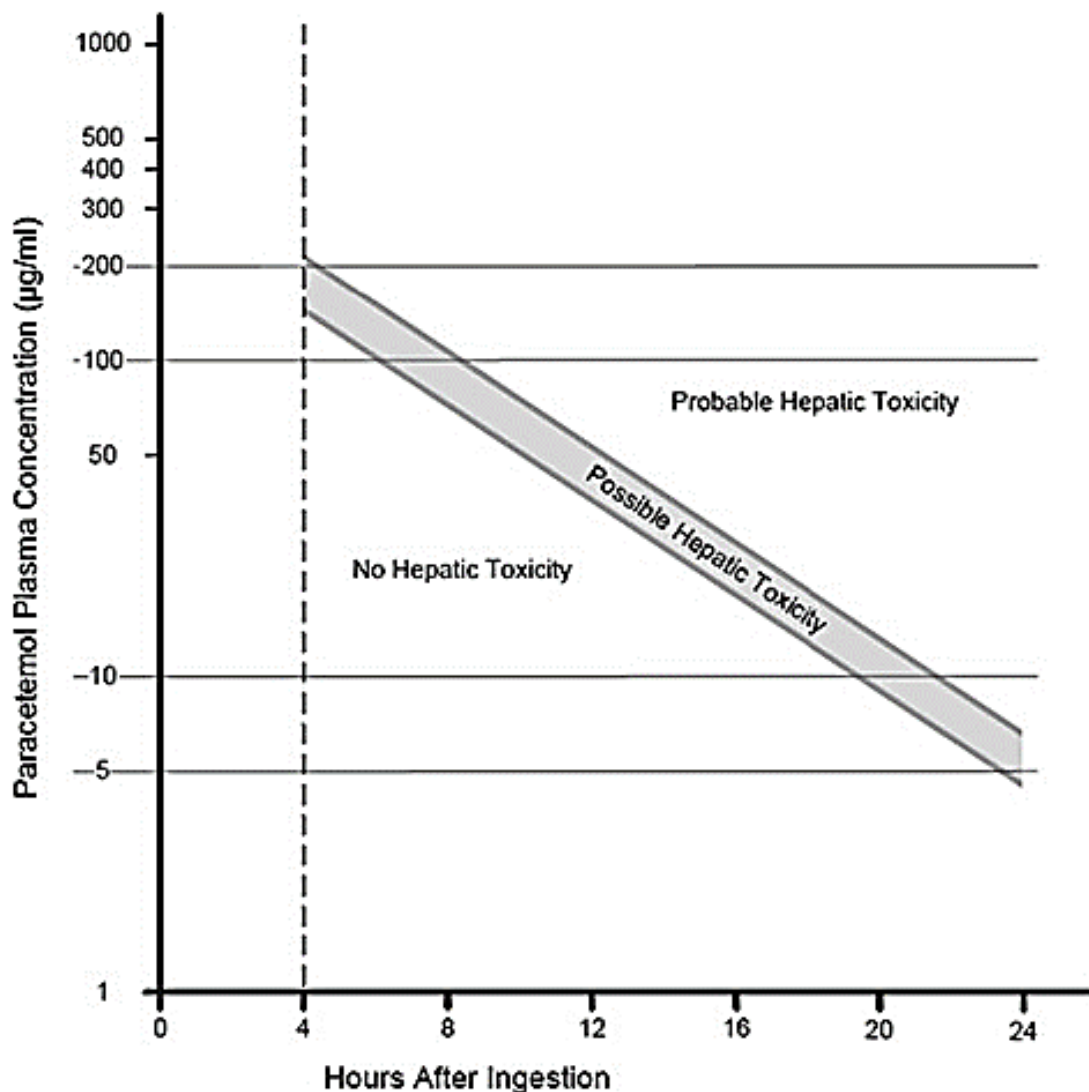


Obr. 12: Strukturální vzorec *N*-acetylcysteinu

NAC je prekurzorem aminokyseliny L-cysteinu, který je součástí antioxidantu glutathionu, a tím doplňuje po předávkování jeho vyčerpané zásoby, čímž chrání hepatocyty před toxickým působením NAPQI. Kromě tohoto nepřímého antioxidačního účinku vykazuje NAC také přímé antioxidační vlastnosti prostřednictvím interakce své volné thiolové skupiny s elektrofilními skupinami reaktivních forem kyslíku (ROS). (Saleem, 2018).

Toto antidotum je téměř 100% účinné, pokud je podáno během 8-10 hodin od první dávky paracetamolu. Proto je velmi důležité, aby byli tito pacienti neprodleně identifikováni a náležitě léčeni. Často však bývá podání NAC zahájeno příliš pozdě, protože klinické příznaky selhání jater vyvolaného paracetamolem se často neprokazují, dokud není dosaženo vrcholu poškození jater.

Ačkoliv je NAC nejúčinnější látkou při léčbě předávkování, existuje mnoho možných nepříznivých vedlejších účinků, jako je zvracení, vyrážka až anafylaktický šok. Rozhodnutí, zda podat NAC, se posuzuje podle nomogramu dle Rumacka–Matthewa (Obr. 13). Jedná se o závislost koncentrace paracetamolu v krvi po 4 hodinách od užití na hepatocelulárním poškození.



Obr. 13: Nomogram dle Rumack – Matthewa (Mund, 2015)

Pro zlepšení léčby předávkování paracetamolem pomocí terapie NAC jsou zapotřebí určité biomarkery. Zvýšení hladiny ALT poukazují na to, že došlo k jaternímu poškození a je tak nejrozšířenějším biomarkerem stanovovaným z krve pacienta. AST je dalším biomarkerem, který se hromadí v krvi v důsledku poškození jater, ale jeho vyšší hodnoty mohou být spojeny i s jinými patologickými stavy, např. srdečním poškozením. Zvýšený celkový bilirubin v séru ukazuje na podstatnou ztrátu funkční kapacity hepatocytů (Mason, 2018).

Bohužel v současné době neexistuje žádné specifické antidotum pro paracetamolem indukovanou nefrotoxicitu (Fadda, 2019). Byla publikována řada studií, která prokazují nefroprotektivní účinek léčivých rostlin při paracetamolem indukované nefrotoxicitě. Nefroprotektivní látky mají

schopnost minimalizovat nefrotoxické účinky. Jednou z těchto léčivých rostlin je *Eurycoma longifolia*, což je malý strom pocházející z Asie, běžně známý jako Tongkat ali nebo Long Jack a jeho kořeny se často nazývají „malajský ženšen“. Užívá se k léčbě malárie, vředů, mužské sexuální dysfunkce a v tradiční medicíně se předepisuje na léčbu horečky a otoků. Bylo popsáno, že *Eurycoma longifolia* má antioxidační vlastnosti kvůli vysoké koncentraci superoxidodismutázy (Chinnappan, 2019).

V další studii bylo popsáno, že propolis významně snížil poškození ledvin způsobené předávkováním paracetamolem. Výsledky ukázaly, že současné podávání propolisu spolu s paracetamolem významně zmírnilo nepříznivý účinek paracetamolu na funkci jater a ledvin (Menyiy, 2018).

Důležitou roli antioxidantů v biologických systémech hrají i flavonoidy. Flavonoidy jsou fenolické sloučeniny přítomné v různých druzích ovoce a zeleniny, které mají antioxidační, antibakteriální, protirakovinné, antimutagenní a protizánětlivé vlastnosti. Jedním z přírodních flavonoidů je chrysin (5,7-dihydroxyflavon), který se nachází v mnoha rostlinných extraktech, včetně květu mučenky a právě i včelího propolisu a medu. Je schopný eliminovat volné radikály. Uvádí se, že chrysin chrání játra před chemoterapeutiky a jinými hepatoxickými činidly (Kandemir, 2017).

3 CÍLE PRÁCE

- 1) Charakterizovat poškození HK-2 buněk způsobené deriváty odvozenými od aminofenolu.
- 2) Porovnat toxicitu *p*-aminofenolu a acetaminofenu u HK-2 buněk.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Pomůcky a přístroje

- Automatický pipetor Accujet-Pro (BrandTech Scientific, Německo)
- Beckman Coulter Counter (Beckman Coulter, USA)
- Centrifuga Labofuge 400 (HERAEUS Instruments, Německo)
- Inkubátor Memmert (IndiaMART, Indie)
- Invertovaný mikroskop Primo Vert (Carl Zeiss, USA)
- Kultivační misky, lahve a další plastové pomůcky pro kultivaci buněčných linií (TPP, Švýcarsko)
- Laminární box Airstream (ESCO, USA)
- Lednice, mrazák (Liebherr, Německo)
- Mikrotitrační destičky 96 jamkové (Nunc, Dánsko)
- Pipety Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Spektrofotometr a spektrofluorometr Tecan Spark (Tecan, Rakousko)
- Vodní lázeň Precision GP 0,5 (Thermo Scientific, USA)

Software

- Tecan SparkControl
- Microsoft Office – Word, Excel (Microsoft, USA)

4.2 Seznam použitých chemikálií

- *Cell proliferation reagent* WST-1 (Roche, Německo)
- Fluorescenční sonda monochlorobiman, MCB (Mr = 226,66; Sigma Aldrich, USA)
- Paracetamol, APAP (Mr = 151,163; Sigma Aldrich, USA)
- *p*-aminofenol, PAP (Mr = 109,13; Sigma Aldrich, USA)
- Triton (Mr = 674 Sigma Aldrich, USA)
- Formaldehyd (Mr = 30,03 Sigma Aldrich, USA)
- Faloidin (Mr = 788,875 Sigma Aldrich, USA)

4.3 Kultivace buněčné linie HK-2

- Renální buněčná linie HK-2 (ATCC, USA)

Pro kultivaci buněk HK-2 byly použity tyto chemikálie:

- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham*, DMEM/F12 (Sigma Aldrich, USA)
- Fetální bovinní sérum, FBS (*Fetal Bovine Serum*) (GIMCO, USA)
- Pyruvát sodný, PYR (GIBCO, USA)
- Penicilin/Streptomycin, P/S (GIBCO, USA)
- Trypsin (GIBCO, USA)
- Epidermální růstový faktor, EGF (GIBCO, USA)
- Insulin-Transferin-Selenium, ITS (GIBCO, USA)
- Fosfátový pufr (pH = 7,4), 10× koncentrovaný, PBS (GIBCO, USA)
- Kompletní kultivační médium: DMEM/F12 doplněné o 10 % fetálního bovinního séra, pyruvát, penicilin a streptomycin
- Kultivační médium bez fenolové červeně: DMEM/F12 doplněné o 10 % fetálního bovinního séra, pyruvát, penicilin a streptomycin
- Inaktivační médium: kultivační médium DMEM/F12 doplněné o 20 % fetálního bovinního séra

Buněčná linie HK-2 byla kultivována ve výše uvedeném kompletním kultivačním médiu obohaceném o EGF a ITS při teplotě 37 °C a 5 % CO₂. Zároveň každé 3–4 dny docházelo k výměně média. Buňky dosahovaly ideální míry konfluence 70–80 % po 5–7 dnech, kdy byla prováděna pasáž buněk po trypsinizaci. Výsledné množství buněk bylo spočítáno pomocí přístroje Beckman Coulter Counter. Princip stanovení počtu buněk závisí na jejich schopnosti vést elektrický proud. Pokud buňka elektrický proud vede, generuje se tím elektrický pulz, který je zaznamenán. Počet pulzů tedy odpovídá počtu buněk v suspenzi.

Následně byla suspenze buněk naředěna kompletním kultivačním médiem podle potřeby pro experiment a touto suspenzí o koncentraci 25 tisíc buněk

na jamku byly nasazovány 96jamkové mikrotitrační destičky. Všechny experimenty byly provedeny na 7.-13. pasáži buněk.

4.4 Příprava roztoků

Fosfátový pufr (PBS)

Pro přípravu fosfátového pufru bylo smícháno 90 ml deionizované vody s 10 ml PBS. Takto připravený pufr byl uchováván v lednici při teplotě 4 °C, kdy doba skladování nepřekročila dobu 14 dnů.

Inaktivační médium

Inaktivační médium bylo připraveno smícháním 80 ml DMEM/F12 s 20 ml fetálního bovinního séra. Takto připravené inaktivační médium bylo uchováváno v lednici při teplotě 4 °C a doba skladování nepřekročila dobu 14 dnů.

Pracovní roztok paracetamolu (APAP)

Navážením vypočteného množství paracetamolu a následným smícháním s kultivačním médiem byl připraven 10 mM zásobní roztok, z kterého byl dále připraven 1 mM roztok k ovlivnění buněk. Pracovní roztoky byly připravovány vždy v den ovlivňování a ředěny v médiu.

Pracovní roztok *p*-aminofenolu (PAP)

Navážením vypočteného množství *p*-aminofenolu a smícháním s kultivačním médiem byl připraven 10 mM zásobní roztok, z kterého byly za pomoci ředění dále připravené roztoky o příslušných koncentracích k ovlivnění buněk – 0,001 mM; 0,01mM; 0,1 mM; 0,5 mM a 1 mM. Pracovní roztoky byly vždy připravovány v den ovlivňování.

Pracovní roztok pro fluorometrické stanovení glutathionu

Pro buňky HK-2 byl vždy připravován čerstvý pracovní roztok smícháním 1220 μ l PBS s 30 μ l zásobního roztoku monochlorobimanů.

Pracovního roztoku Hoechst 33258

Pracovní roztok byl připraven smícháním 10 μ l roztoku Hoechst s 200 μ l PBS.

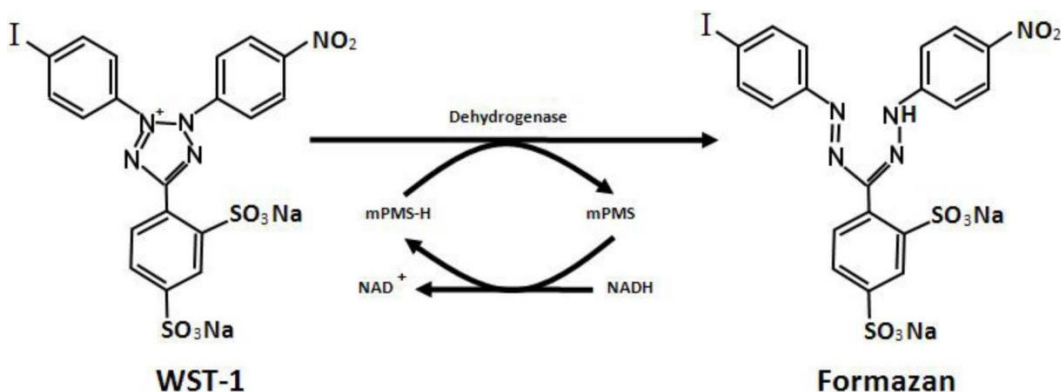
4.5 Testování cytotoxicity APAP a PAP

K testování cytotoxicity na buněčné linii HK-2 byly vybrány 2 deriváty odvozené od aminofenolu – APAP a PAP. Míra toxicity těchto látek byla sledována pomocí testu WST-1, kdy byla hodnocena viabilita buněk a pomocí fluorometrické detekce MCB, která měřila hladinu intracelulárního glutathionu.

Oba tyto testy byly prováděné v 96jamkových destičkách, ve kterých bylo na jednu jamku nasazováno 25 tisíc buněk. Neboť se jedná o adherentní buněčnou linii, po nasazení následovala 24 hodinová inkubace, aby buňky před ovlivněním toxiny dostatečně přisedly k povrchu mikrotitrační destičky. Po inkubaci se odpipetovalo kulturační médium a přidaly se příslušně naředěné toxiny v médiu bez fenolové červeně (APAP – 10 mM a 1 mM, PAP – 1 mM; 5 mM; 0,1 mM; 0,01 mM a 0,001 mM) o objemu 100 μ l/jamku. Samotné médium bylo přidáno vždy ke kontrolním buňkám. Ovlivněné buňky byly inkubovány po dobu 4 a 24 hodin.

4.5.1 Test WST-1

Test WST-1 slouží k hodnocení viability a proliferace buněk a také se využívá jako ukazatel cytotoxického působení látek. Principem testu je štěpení růžové stabilní tetrazoliové soli WST-1 na žlutý rozpustný formazan komplexním buněčným mechanismem (Obr. 14). Tato reakce je závislá na produkci NAD(P)H v životaschopných buňkách, kdy je množství formazanového barviva přímo úměrné počtu metabolicky aktivních buněk. Spektrofotometricky je zde měřená absorbance při 440 nm.



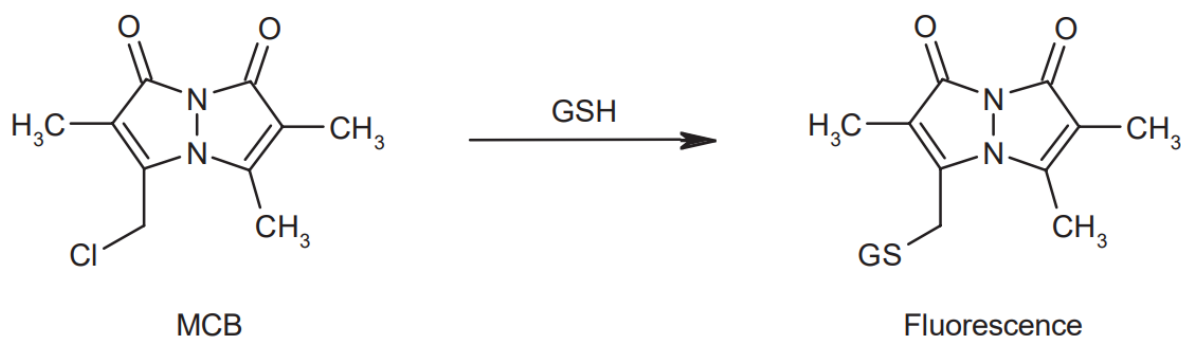
Obr. 14: Mechanismus redukce WST-1 na formazan (Yin, 2013)

U buněčné linie HK-2 byl test prováděn v 96jamkových destičkách, kam byl přidáván reagent WST-1. Pokud byl tento test prováděn samostatně bylo přidáno 10 μl /jamku reagentu a pokud byl prováděn bezprostředně po testu s MCB bylo přidáno 12 μl /jamku. Následně byla proměřena absorbance při 440 nm na spektrofotometru Tecan Spark. Změna absorbance byla vztažena ke kontrolním buňkám, kde byla rovna 100 %. Měření bylo prováděno v časových intervalech 2–24 hodin.

4.5.2 Fluorometrické stanovení hladiny glutathionu

Při tomto testu se využívají fluorescenční sondy monochlorobimany (MCB), které po průniku buněčnou membránou a navázání na glutathion fluoreskují (Obr. 15).

U buněčné linie HK-2 byl test také prováděn v 96jamkových destičkách, kam byl přidán reagent MCB v objemu 20 μl /jamku a následně byla měřena fluorescence pomocí spektrofotometru Tecan Spark (EX/EM = 394/490 nm). Změny fluorescence byly vztaženy ke kontrolním buňkám, které činily 100 %. Měření bylo prováděno v časových intervalech 2-24 hodin.



Obr. 15: Konjugace monochlorobimanu (MCB) a glutathionu (GSH) (Jeffrey, 2009)

4.5.3 Fluorescenční mikroskopie

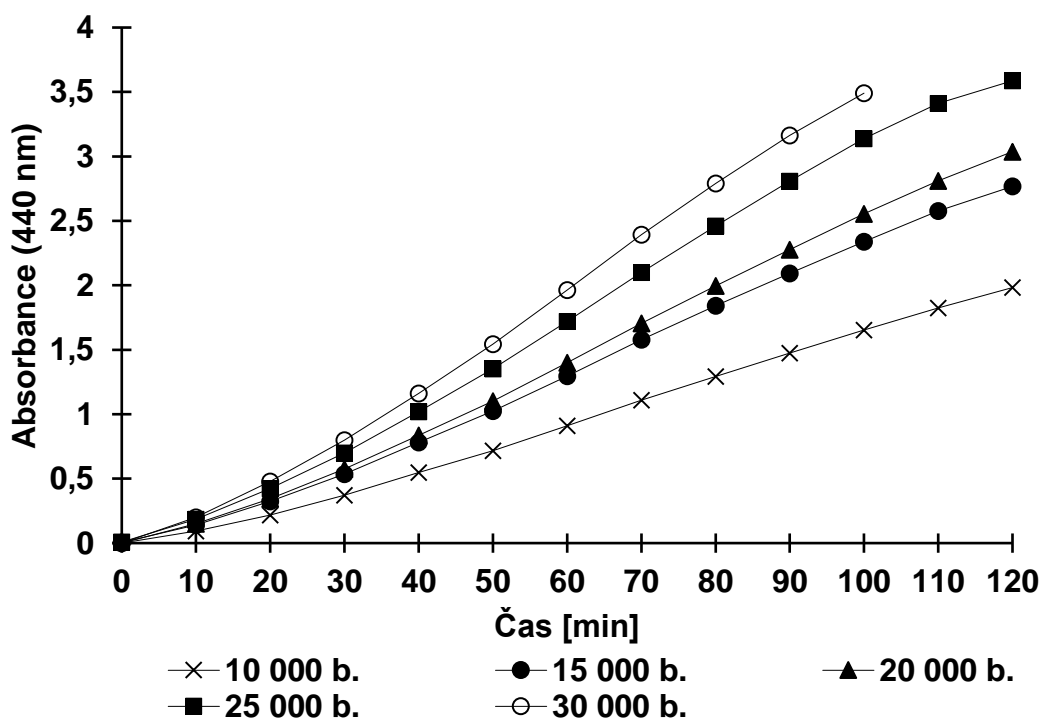
Buňky HK-2 byly inkubovány v cytospinu po dobu 24 hodin s toxiny APAP (10 mM) a PAP (0,01 mM). Po uplynutí inkubační doby bylo od buněk odtaženo médium a jamky byly promyty promývacím roztokem PBS. Následně byly buňky fixovány ve tmě 5 minut pomocí formaldehydu. Po 5 minutách došlo k odtažení formaldehydu a bylo přidáno 200 μ l roztoku Tritonu a následovala inkubace ve tmě. Přidáno bylo 200 μ l roztoku faloidinu a buňky byly inkubovány ve tmě. Poté následovalo barvení sodnou Hoechst 33258 po 5 minut. Poté byly buňky naposledy promyty a byly pozorovány pod invertovaným fluorescenčním mikroskopem.

5 VÝSLEDKY

5.1 Optimalizace buněčné denzity

Před začátkem modelových experimentů byla definována nejvhodnější denzita HK-2 buněk pro nasazení do mikrotitrační destičky. Do 96jamkové destičky byly nasazeny suspenze buněk v rozmezí 5-45 tis. buněk/jamku/100 μ l média. Po 24hodinové inkubaci byl do každé jamky k buňkám přidán WST-1 reagent o objemu 10 μ l. Následně byla kineticky měřená absorbance pomocí spektrofotometru Tecan Spark při vlnové délce 440 nm po dobu 2 hodin.

Graf 1 znázorňuje změny absorbance měřené při 440 nm v závislosti na čase. Z grafu je patrná lineární závislost do hodiny po přidání reagentu prakticky u všech testovaných denzit. U 10-20 tis. buněk byla naměřena absorbance v rozmezí 0,9-1,4. U denzity 25 tis. dosahovala absorbance hodnoty 1,72 a u 30 tis. buněk absorbance rovna 1,96. Pro testování cytotoxicity vybraných toxinů byla tedy jako nejvhodnější zvolena denzita buněk 25 tis. na jamku v 96jamkové mikrotitrační destičce z důvodu šetření buněčného materiálu, a také proto, že tato denzita představovala optimální množství pro růst buněk pozorovaný pod mikroskopem.



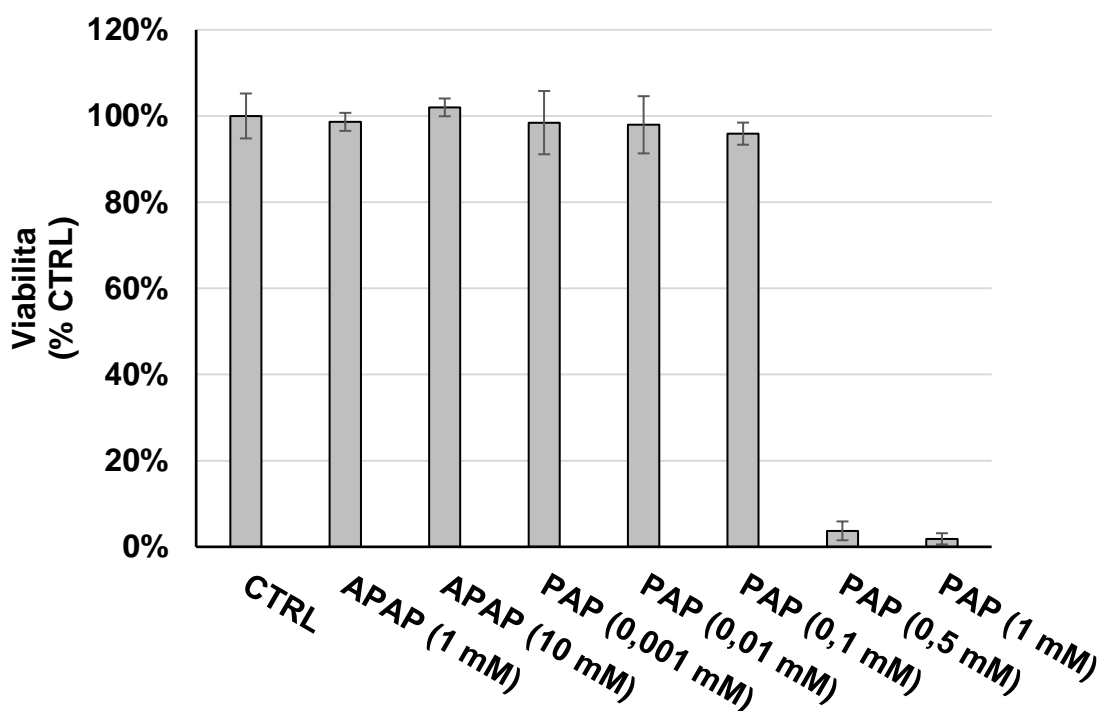
Graf 1: Optimalizace denzity buněk. HK-2 buňky – 10–30 tis. buněk/jamku. Test WST-1 (440 nm); 0–2 hod.; n=2.

5.2 Stanovení buněčné viability a koncentrace glutathionu

Prostřednictvím testu WST-1 byla stanovena buněčná viabilita a pomocí fluorometrického stanovení byla detekována koncentrace GSH u buněčné linie HK-2 ovlivněné toxiny acetaminofenem (APAP 1 mM; 10 mM) a *p*-aminofenolem (PAP 0,001 mM; 0,01 mM; 0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM). HK-2 buňky byly inkubovány s uvedenými toxiny po dobu 4 a 24 hodin.

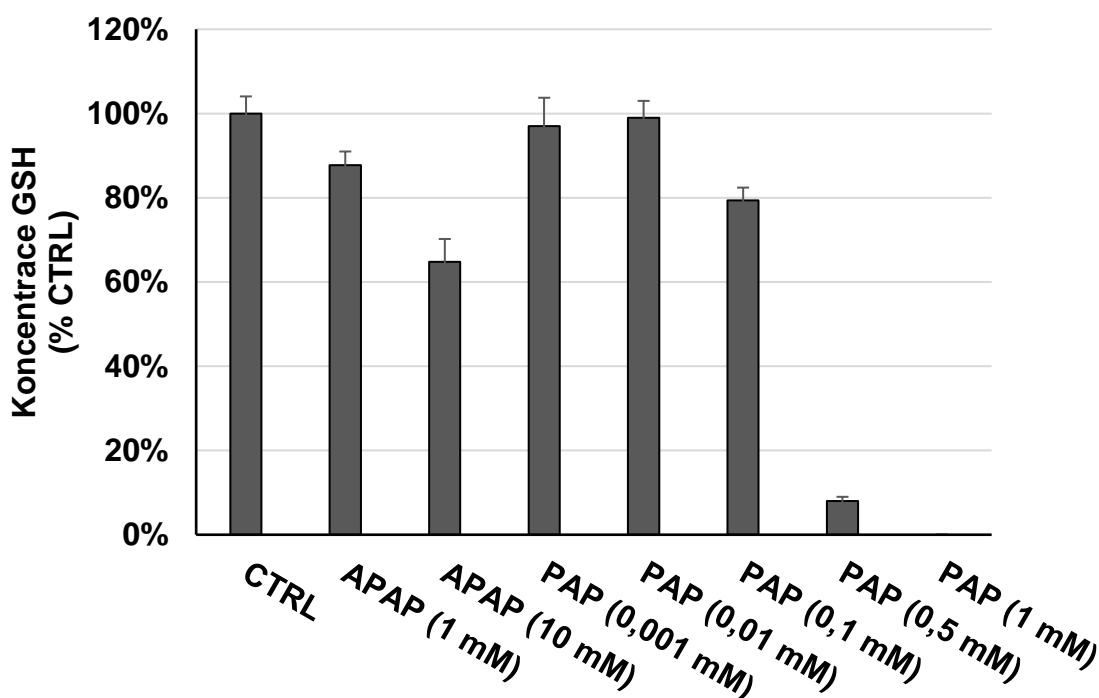
5.2.1 Stanovení cytotoxicity – 4 hod

V grafu 2 můžeme vidět působení zvolených koncentrací obou testovaných toxinů na renální buněčnou linii HK-2 po inkubaci 4 hodiny. Z grafu jsou patrné zejména výrazné toxické účinky PAP v koncentracích 0,5 mM a 1 mM, kdy buněčná viabilita byla snížena až do téměř nulových hodnot. Zajímavý je markantní rozdíl ve snížení viability u toxinu PAP mezi koncentracemi 0,1 mM a 0,5 mM, kdy u 0,5 mM PAP, došlo k poklesu na hodnotu $4 \pm 2\%$, zatímco u koncentrace 0,1 mM žádné velké změny ve viabilitě buněk nebyly zaznamenány. U ostatních koncentrací PAP i APAP buněčná viabilita po 4 hodinách zůstala blízka 100 %.



Graf 2: Změny v buněčné viabilitě po působení acetaminofenu (APAP) a *p*-aminofenolu (PAP). HK-2 buňky, 4 hod. Test WST-1 (440 nm); kontrola (CTRL) = 100 %; průměr ± SD; n=5. (příloha I)

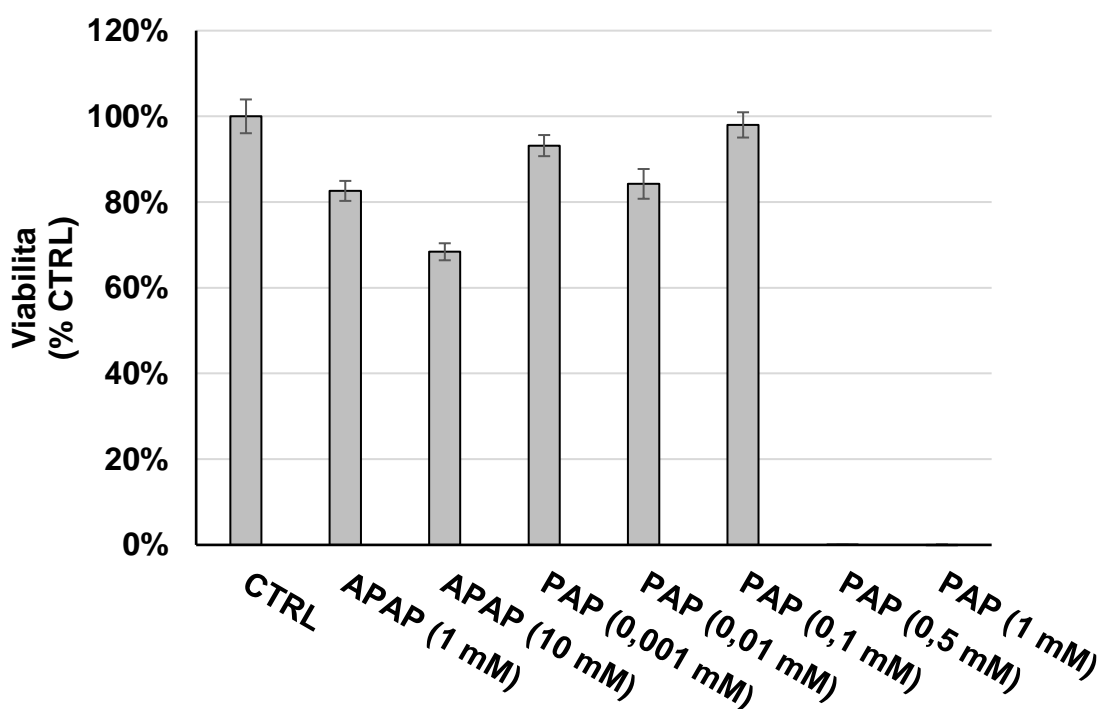
Jak je z grafu 3 patrné, po 4 hodinách inkubace s toxiny došlo ke snížení koncentrace GSH téměř u všech testovaných koncentrací kromě PAP (0,01 mM a 0,001 mM), kde jsou hodnoty stále skoro 100 %. Při porovnání s grafem 2 vidíme, že u většiny koncentrací mírné snížení koncentrace GSH předchází poklesu viability. U buněk ovlivněných 10 mM APAP, pozorujeme snížení koncentrace GSH až na 65 ± 5 %. Stejně jako na grafu 2 i zde vidíme, že nejvíce toxicky působil na buňky toxin PAP v koncentracích 0,5 mM a 1 mM. 0,5 mM PAP způsobil po 4hodinové inkubaci snížení koncentrace GSH o 90 % a u 1 mM PAP došlo dokonce až k absolutnímu vyčerpání GSH.



Graf 3: Změny v koncentraci glutathionu (GSH) po působení acetaminofenu (APAP) a *p*-aminofenolu (PAP). HK-2 buňky, 4 hod. (EX/EM = 394/490 nm); kontrola (CTRL) = 100 %; průměr \pm SD; n=5. (příloha II)

5.2.2 Stanovení cytotoxicity – 24 hod

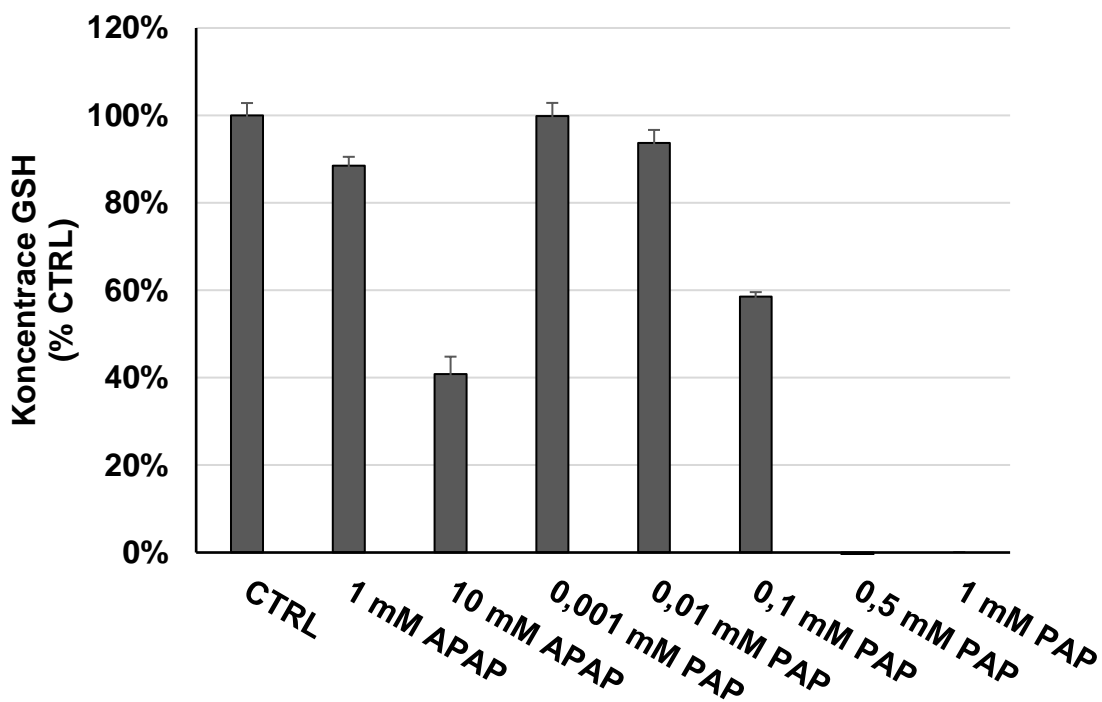
Po 24hodinové inkubaci došlo k poklesu počtu životaschopných buněk u všech koncentrací obou toxinů, což nám ukazuje graf 4. U obou koncentrací APAP došlo ke znatelnému snížení viability, u koncentrace 1 mM zhruba o 20 % a u 10 mM téměř o 40 %. Po této inkubaci buňky ovlivněné 0,5 mM a 1 mM PAP vykazují již v obou případech nulovou životaschopnost. Ostatní použité koncentrace PAP (0,001 mM; 0,01 mM a 0,1 mM) působily na buňky po 24 hodinách mnohem méně toxicky, a došlo tak pouze k mírnému snížení viability. V porovnání s grafem 2 je zřejmé, že toxicita derivátů se s časem zvyšuje.



Graf 4: Změny v buněčné viabilitě po působení acetaminofenu (APAP) a *p*-aminofenolu (PAP). HK-2 buňky, 24 hod. Test WST-1 (440 nm); kontrola (CTRL) = 100 %; průměr ± SD; n=5. (příloha III)

Změny v koncentraci GSH po 24hodinové inkubaci zobrazuje graf 5. Úbytek GSH je patrný opět u 10 mM APAP, zatímco u 1 mM APAP zůstává koncentrace GSH stejná jako po 4hodinové inkubaci, ale ani u jedné z koncentrací APAP nedošlo k úplnému vyčerpání GSH. U buněk ovlivněných 1 mM a 0,5 mM PAP došlo po 24 hodinách již k úplné depleci GSH.

Koncentrace 0,1 mM PAP způsobila po tomto časovém intervalu pokles GSH pod 60 %, ale u dalších koncentrací PAP vidíme pouze mírné snížení množství GSH. Z grafů 4 a 5 můžeme také vyčíst, že 1 mM APAP a 0,01 mM PAP působily po 24 hodinách na HK-2 buňky téměř stejně toxicky. I zde je ve srovnání s grafem 3 patrné, že látky působily po 24 hodinách více toxicky než po inkubaci 4 hodiny.

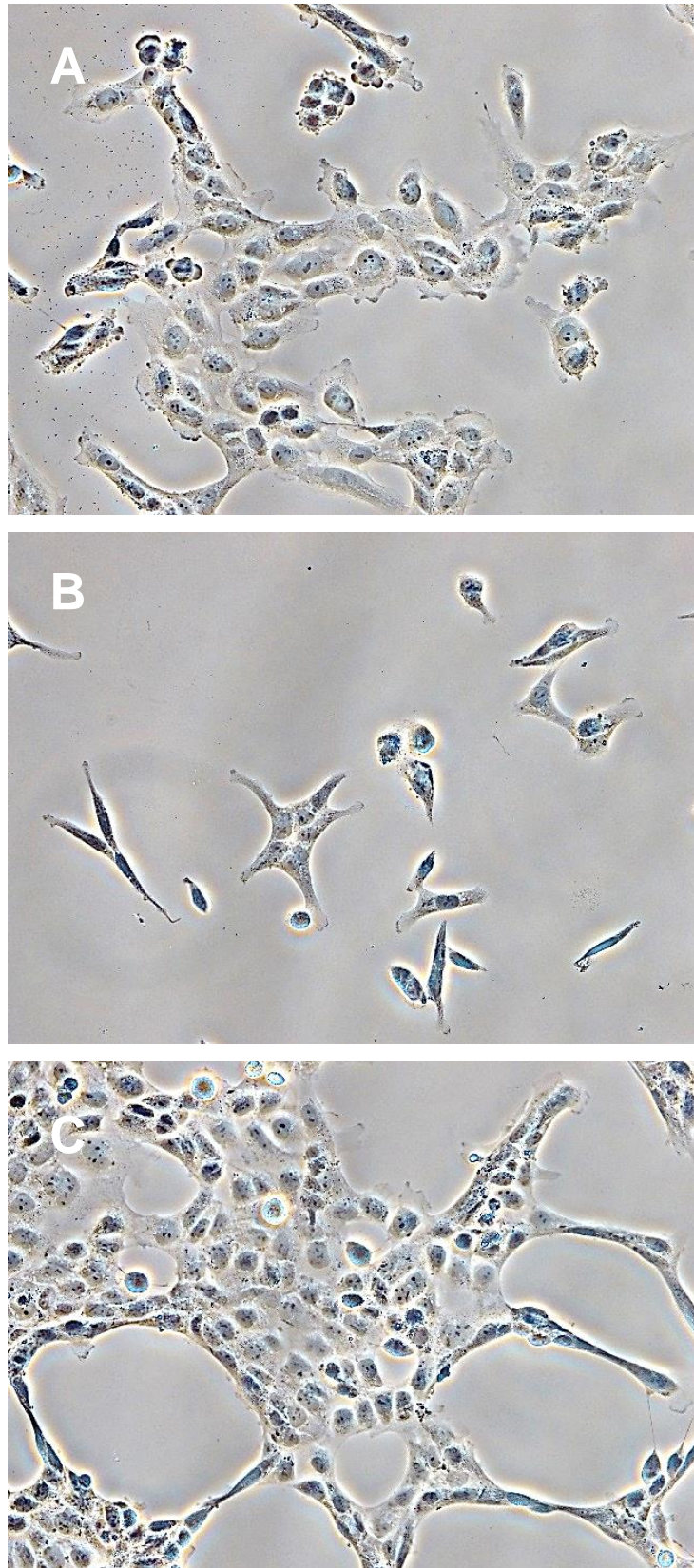


Graf 5: Změny v koncentraci glutathionu (GSH) po působení acetaminofenu (APAP) a *p*-aminofenolu (PAP). HK-2 buňky, 24 hod. (EX/EM = 394/490 nm); kontrola (CTRL) = 100 %; průměr ± SD; n=5. (příloha IV)

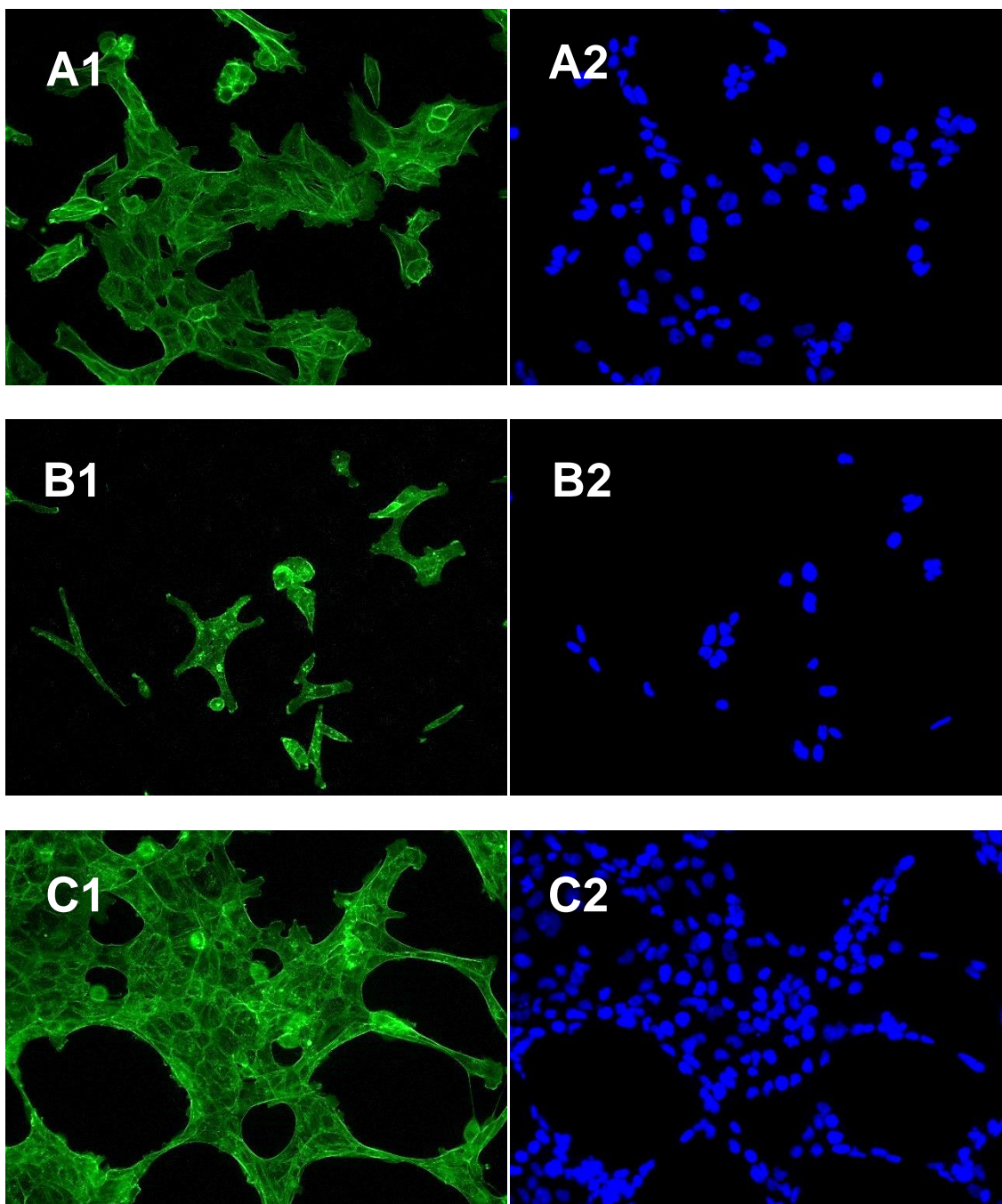
5.3 Mikroskopická analýza buněk

Buňky HK-2 byly na základě předchozích, výše uvedených experimentů inkubovány v cytospinu po dobu 24 hodin s toxiny APAP (10 mM) a PAP (0,01 mM).

Výsledky 24hodinové inkubace buněk HK-2 s toxiny APAP (10 mM) a PAP (0,01 mM) zobrazují obrázky 16-18. Buňky inkubované s toxiny jsme porovnávali vždy s kontrolními neovlivněnými buňkami. Inkubace s APAP (10 mM) na buňky působila toxicky (Obr. 16B, 17B1, 17B2). Je znatelný výrazný úbytek buněk, což potvrzují i fotografie, na kterých pozorujeme aktinová vlákna zvýrazněná fluorescenčně značeným faliodinem a buněčná jádra zvýrazněná pomocí sondy Hoechst 33258. Naproti tomu buňky ovlivněné 0,01 mM PAP (Obr. 16C, 17C1, 17C2) nevykazovaly žádné výrazné cytotoxické poškození, obarvená aktinová vlákna i jádra byla srovnatelná s kontrolními buňkami.



Obr. 16: Fotografie buněk HK-2 při testování cytotoxicity (doba inkubace 24 hodin). A: kontrolní buňky, B: APAP (10 mM), C: PAP (0,01 mM). Invertovaný mikroskop, fázový kontrast, zvětšení 200x.



Obr. 17: A1-C1 – Fotografie aktinových vláken buněk HK-2 při testování cytotoxicity (doba inkubace 24 hodin). A1: kontrolní buňky, B1: APAP (10 mM), C1: PAP (0,01 mM). Invertovaný mikroskop, faloidin, zvětšení 200x.

A2-C2 – Fotografie jader buněk HK-2 při testování cytotoxicity (doba inkubace 24 hodin). A2: kontrolní buňky, B2: APAP (10 mM), C2: PAP (0,01 mM). Invertovaný mikroskop, Hoechst 33258, zvětšení 200x.

6 DISKUZE

V rámci této diplomové práce bylo testováno cytotoxické působení derivátů odvozených od aminofenolu *in vitro* na buněčné linii HK-2. Pro posouzení nefrotoxického působení byly využívány spektrometrické a fluorimetrické metody, kterými byly stanovovány koncentrace GSH a viabilita buněk.

Nejprve byla optimalizována nejvhodnější denzita HK-2 buněk na jamku pro kultivaci v 96jamkové mikrotitrační destičce. Následně byly provedeny modelové experimenty, na jejichž základě byly vybrány již konkrétní koncentrace daných toxinů. Použitá suspenze pro vlastní experimenty byla vždy připravena z 25 tis. buněk/jamku/100 μ l média, což je dle našich výsledků optimální počet. Naopak v jiných studiích byly pro experimenty s HK-2 buněčnou linií využívány spíše nižší hodnoty denzit, nejčastěji mezi 3-15 tis. buňkami (Wei, 2019; Han, 2019; Hou, 2020).

Prvním testovaným toxinem byl acetaminofen. V posledních letech bylo provedeno mnoho studií, které prokazovaly poměrně časté nežádoucí hepatotoxické působení paracetamolu. Jedná se především o studie provádějící výzkum *in vivo* na myších a potkanech (Jeong, 2019; Wang, 2019; Zhang, 2020), nebo *in vitro* s využitím například jaterní lidské buněčné linie HepG2 (Piel, 2020; Aritomi, 2014), nebo také HepRG (Towala, 2014). Avšak nebylo publikováno mnoho prací, které by se zabývaly nefrotoxitou, méně častým ale stejně závažným nežádoucím vedlejším účinkem léčiva paracetamolu. Autoři zabývající se touto problematikou použili pro experiment na posouzení nefrotoxicity na HK-2 buněčné linii APAP (1-10 mM) a prováděli následné inkubace po dobu 1-48 hodin. Životaschopnost buněk detekovali pomocí testů WST-1 a laktátdehydrogenázy (LDH). Poškození buněk monitorovali produkcí ROS a hladin GSH. Již po 1 hodině působení toxinu pozorovali mírné poškození buněk na základě zvýšené produkce ROS a snížené viability. Po 24 hodinách výsledky již poukázaly na výrazné poškození buněk. Autoři prokázali, že toxicita APAP stoupá s rostoucí koncentrací a zároveň došli k závěru, že buňky HK-2 jsou citlivé na působení APAP, které ale nemusí být spojeno s vyčerpáním GSH jako je tomu u hepatocytů (Vrbová, 2016).

Tyto výsledky dobře korespondují s naší prací, v které jsme použili koncentrace APAP 1 mM a 10 mM. Již po 4hodinové expozici toxinu bylo viditelné snížení koncentrace GSH, u 10 mM APAP až téměř na 60 % a u 1 mM na necelých 90 % hodnot kontrolních. Naopak k poklesu buněčné viability nedošlo ani u jedné z testovaných koncentrací APAP. Po 24 hodinách inkubace klesla koncentrace GSH u buněk ovlivněných 10 mM APAP o dalších 20 %, ale nedošlo k úplnému vyčerpání jako je tomu právě u hepatotoxického působení, a snížil se zároveň také i stav životaschopnosti buněk. U 1 mM APAP byly oba pozorované parametry mírně sníženy, dosahovaly hodnot cca 80-85 % hodnot kontrolních.

Druhým z testovaných toxinů byl *p*-aminofenol. Cytotoxickým působením této látky se již zabývá více výzkumných prací, než je tomu u nefrotoxického působení APAP. Například ve studii z roku 2008 testovali autoři také cytotoxické působení 0,5 mM PAP avšak na zvířecí buněčné linii LLC-PK1, kdy naměřili ztrátu buněčné životaschopnosti po 4 hodinách inkubace s tímto toxinem o 60 % a zároveň již po 2 hodinách došlo ke generaci ROS na hladinu přibližně 200x větší než kontrolní neošetřené buňky. Tato studie prokázala, že PAP-indukovaná ztráta životaschopnosti korelovala s tvorbou reaktivních forem kyslíku, tj. např. H₂O₂ (Foreman, 2008).

Pro náš experiment jsme u tohoto toxinu zvolili také koncentraci 0,5 mM a dále do experimentů přidali koncentrace 0,001 mM; 0,01 mM; 0,1 mM; 1 mM PAP. Při koncentracích 1 mM a 0,5 mM došlo již po 4hodinové inkubaci k úplnému vymizení GSH a buňky vykazovaly téměř nulovou viabilitu. V porovnání s předešlou studií, PAP působil na HK-2 buňky mnohem více toxicky po 4 hodinách inkubace, nežli na buňky LLC-PK1. V naší práci byla po 4 hodinách inkubace s PAP (0,5 mM) detekována pouze 4% životaschopnost buněk. Naopak u zbývajících koncentrací (0,001 mM; 0,01 mM; 0,1 mM) nebyly zaznamenány výraznější změny v koncentraci GSH nebo viability oproti kontrolním buňkám. Po 24 hodinách inkubace došlo u koncentrací 0,5 mM a 1 mM PAP k úplnému vyčerpání GSH a nebyly detekovány již žádná aktivita životaschopnosti buněk. 0,1 mM PAP zapříčinil snížení koncentrace GSH zhruba o 40 %. U zbývajících dvou nejnižších koncentrací žádný výraznější pokles zaznamenán nebyl.

Další studie ostatních autorů zkoumala vnímavost LLC-PK1 buněk k cytotoxicitě indukované PAP v souvislosti se schopností antioxidantů askorbátu, GSH, butylovaného hydroxytoluenu (BHT), NADH nebo NADPH bránit této toxicitě. Při preinkubačních experimentech byly buňky inkubovány po dobu 1 hodiny s askorbátem, GSH nebo NADPH. Antioxidanty byly následně odstraněny a buňky byly vystaveny účinku 0,1 mM PAP po dobu 4 hodin. Životaschopnost byla stanovena 24 hodin po expozici PAP. Tato koncentrace PAP způsobila téměř 50% ztrátu životaschopnosti, což opět poukazuje na větší míru toxicity pro HK-2 buňky prokázanou v naší práci. Současná inkubace s askorbátem, GSH a NADPH zmírnila ztrátu životaschopnosti vyvolané PAP. Na rozdíl od toho byl NADH při prevenci proti toxickému působení PAP neúčinný. Samotný BHT způsobil významnou ztrátu životaschopnosti buněk a při prevenci cytotoxicity PAP byl také neúčinný. Neschopnost NADH zabránit PAP-indukované cytotoxicitě je spojena s rychlou degradací NADH ve vodném roztoku. Preinkubace buněk s askorbátem nebo GSH byla spojena s oslabením cytotoxicity vyvolané PAP. Tyto výsledky naznačují, že PAP je cytotoxický pro LLC-PK1 buňky. Část cytotoxicity PAP je způsobena neenzymatickou oxidací, která se vyskytuje v inkubačním médiu, a část je způsobena enzymatickou nebo neenzymatickou oxidací, ke které dochází přímo v buňkách (*Hallman, 2000*).

Na rozdíl od našich experimentů, kdy bylo cytotoxické působení látek detekováno pomocí buněčné viability WST-1 testem a koncentrace GSH prostřednictvím fluorescenčního stanovení, se v další studii zaměřili na uvolňování LDH v buňkách LLC-PK1 po inkubaci s PAP nebo menadionem. Pozorovali snížení životaschopnosti pomocí fluorescence Alamarské modři. Vědci však nebyli schopni detekovat aktivitu LDH v médiu, ačkoli určili, že intracelulární aktivita LDH byla po inkubaci s PAP snížena. Neboť jsou tyto výsledky odlišné od výsledků jiných laboratoří, bylo nabídnuto několik vysvětlení. V této studii nebyl použit protein, kdy se běžně používá hovězí sérový albumin nebo fetální bovinní sérum. Pro měření aktivity LDH byl použit komerční test a je možné, že menadion a PAP interferovaly s jednou nebo více složkami testu. Bylo zjištěno, že několik běžných toxických látek interaguje s LDH v inkubačním médiu. Na rozdíl od toho se zdá, že LDH v buňkách

je chráněna před inaktivací, pravděpodobně četnými dalšími reaktivními činidly v buněčné cytoplazmě (*Kendig, 2006*).

Jiná vědecká studie pomocí renálních epiteliálních buněk LLC-PK1 prokázala selektivní cytoprotekci kyseliny all-trans retinové (ATRA) vůči chemikáliím, které indukují onkotickou/nekrotickou buněčnou smrt epiteliálních buněk ledvin, mezi kterými byl testován i PAP. U tohoto toxinu byly detekovány jen mírné účinky cytoprotekce. Závěrem této práce vědci uvedli, že porozumění mechanismu cytoprotekce zprostředkované ATRA může poskytnout informace, které pomohou při vývoji nových terapeutických zásahů při stavech, jako je poškození ledvin indukované chemickými látkami, renální ischemie, reperfuční poškození nebo hypoxie (*Sapiro, 2017*).

Další studie z roku 2007 testovala hypotézu společné cytoprotekce po iniciování stresu endoplazmatického retikula (ER) pro buněčné linie ledvin – LLC-PK1, NRK-52E, HEK293, MDCK. Jako induktory stresu byly použity tunicamycin, thapsigargin a oxidovaný dithiothreitol, které vedly ke zvýšení exprese proteinů GRP78 a GRP94 v závislosti na dávce. Velikosti indukce stresu byla závislá na použitém induktoru a na buněčné linii. Oxidovaný dithiothreitol byl účinný při snižování toxicity u všech buněčných linií. U tunicamycinu a thapsigarginu byla ochrana variabilní. Toxicita léčiv (cisplatina, gentamicin, glyoxylát, cyklosporin A, PAP) byla významně snížena v buňkách předem inkubovaných s tunicamycinem nebo oxidovaným dithiothreitem. Výsledky této práce poukazují na to, že podněcování stresu ER nabízí cytoprotekci proti klinicky relevantním nefrotoxinům v ledvinných buněčných liniích z více druhů, avšak mezi buněčnými liniemi byly patrné rozdíly, a to vše podporuje zkoumanou hypotézu, že ER se podílí na nefrotoxicitě indukované léky (*Peyrou, 2007*).

7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo charakterizovat buněčné poškození způsobené deriváty odvozenými od aminofenolu, konkrétně paracetamolem a *p*-aminofenolem, na lidské renální buněčné linii HK-2. Podle literatury bylo u obou toxinů předpokládáno cytotoxické působení na ledvinné buňky, což se nám podařilo provedenými experimenty potvrdit.

Z výsledků vyplývá, že paracetamol (1 mM; 10 mM) působil na buňky výrazně toxicky, avšak ani po 24 hodinách inkubace nedošlo k vyčerpání glutathionu jako se tomu děje při hepatotoxickém působení toho léčiva.

Překvapujícím zjištěním bylo toxické působení *p*-aminofenolu (0,5 mM a 1 mM), kdy byly již po 4hodinové inkubaci naměřeny téměř nulové hodnoty koncentrace glutathionu i buněčné viability. Naopak další nižší koncentrace *p*-aminofenolu (0,001 mM; 0,01 mM a 0,1 mM) neměly na buňky žádný zásadní vliv a docházelo jen k mírnému poklesu obou detekovaných hodnot.

8 LITERATURA

1. **Actis GC, Pellicano R, Rizzetto M, et al.** Individually administered or co-prescribed thiopurines and mesalamines for inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2009;15(12):1420-1426.
2. **Akindele A., Oludadebo G., Amagon K., et al.** Protective effect of carvedilol alone and coadministered with diltiazem and prednisolone on doxorubicin and 5-fluorouracil-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Pharmacology Research Perspectives*. 2018;6(1):e00381.
3. **Allegaert K, Mian P, Lapillonne A, van den Anker JN.** Maternal paracetamol intake and fetal ductus arteriosus constriction or closure: a case series analysis. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2019; 85(1):245-251.
4. **Amar L., Desclaux M., Faucon-Biguët N., et al.** Control of small inhibitory RNA levels and RNA interference by doxycycline induced activation of a minimal RNA polymerase III promoter. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(5):e37.
5. **Aritomi K, Ishitsuka Y, Tomishima Y, et al.** Evaluation of three-dimensional cultured HepG2 cells in a nano culture plate system: an in vitro human model of acetaminophen hepatotoxicity. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2014;124(2):218-29.
6. **Benavente R, Lopez-Tejedor D, Perez-Rizquez C, Palomo JM.** Ultra-Fast Degradation of *p*-Aminophenol by a Nanostructured Iron Catalyst. *Molecules*. 2018;23(9):2166.
7. **Castanares-Zapatero D, Dinant V, Ruggiano I, et al.** Pattern of Paracetamol Poisoning: Influence on Outcome and Complications. *Toxics*. 2018;6(4):58.
8. **Dahl J-U, Gray MJ, Bazopoulou D, et al.** The anti-inflammatory drug mesalamine targets bacterial polyphosphate accumulation. *Nature Microbiology*. 2017;2:16267.
9. **Deng, Shi & Jin, Tao & Zhang, et al.** Mechanism of tacrolimus-induced chronic renal fibrosis following transplantation is regulated by ox-LDL and its receptor, LOX-1. *Molecular Medicine Reports*. 2016;14: 5735.

10. **Ek S, Rosenberg S.** Mesalazine as a cause of fetal anemia and hydrops fetalis. *A case report. Medicine (Baltimore).* 2017;96 (50):e9277.
11. **El Menyiy N, Al-Waili N, El Ghouzi A, et al.** Evaluation of antiproteinuric and hepato-renal protective activities of propolis in paracetamol toxicity in rats. *Nutrition Research and Practice.* 2018;12(6):535-540.
12. **Fadda L, Ali HM, Aldrees GA, Alquraishi NM.** Nano ubiquinone: Promising candidate for treatment of renal toxicity induced by over dose of paracetamol. *Toxicology Reports.* 2019;6:712-717.
13. **Fernander-Martinez A. B, Benito Martinez S, Lucio Cazana F.J.** Intercellular prostaglandin E2 mediates cisplatin-induced proximal tubular cell death. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2016;293-302.
14. **Ferrusquía J, Pérez-Martínez I, Gómez de la Torre R, et al.** Gastroenterology case report of mesalazine-induced cardiopulmonary hypersensitivity. *World Journal of Gastroenterology.* 2015;21(13):4069-4077.
15. **Foreman BD, Tarloff JB.** Contribution of reactive oxygen species to para-aminophenol toxicity in LLC-PK1 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2008;230(2):144–149.
16. **Fredj, S., Sampson, K. J., et al.** Molecular basis of ranolazine block of LQT-3 mutant sodium channels: evidence for site of action. *British Journal of Pharmacology.* 2006;148(1):16 -24.
17. **Fu ZD, Selwyn FP, Cui JY, Klaassen CD.** RNA Sequencing Quantification of Xenobiotic-Processing Genes in Various Sections of the Intestine in Comparison to the Liver of Male Mice. *Drug Metabolism and Disposition.* 2016;44(6):842- 856.
18. **González-Ponce HA, Rincón-Sánchez AR, Jaramillo-Juárez F, Moshage H.** *Nutrients.* 2018;24(2):117.
19. **Graham, F. L., Van der Eb.** A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* 1973;52:456-467.
20. **Gündüz E, Dursun R, Zengin Y, et al.** Lycium barbarum extract provides effective protection against paracetamol-induced acute hepatotoxicity in rats. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine.* 2015;8 (5):7898-7905.

21. **Hallman MA, Tchao R, Tarloff JB.** Vliv antioxidantů na toxicitu vyvolanou para-aminofenolem v buňkách LLC-PK1. *Toxikologie*. 2000;156(1):37-45.
22. **Ham M, Moss AC.** Mesalamine in the treatment and maintenance of remission of ulcerative colitis. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2012;5(2):113-123.
23. **Han J, Guo D, Sun XY, et al.** Comparison of the adhesion and endocytosis of calcium oxalate dihydrate to HK-2 cells before and after repair by *Astragalus* polysaccharide. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2019;20(1):1164-1177.
24. **Haslund-Krog SS, Hertel S, Dalhoff K, et al.** Interventional cohort study of prolonged use (>72 hours) of paracetamol in neonates: protocol of the PARASHUTE study. *BMJ Paediatrics Open*. 2019;3(1):427.
25. **Hayati Filik, Mustafa Hayvalı, Emine Kılıç, et al.** Development of an optical fibre reflectance sensor for *p*-aminophenol detection based on immobilised bis-8-hydroxyquinoline. *Talanta*. 2008;77(1):103-109.
26. **Hayward KL, Powell EE, Irvine KM, Martin JH.** Can paracetamol (acetaminophen) be administered to patients with liver impairment? *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2016;81(2):210-222.
27. **Hoffmann MF, Preissner SC, Nickel J, et al.** The Transformer database: biotransformation of xenobiotics. *Nucleic Acids Research*. 2014;42:1113-1117.
28. **Hong Xu, Chun-Feng Duan, Zhi-Feng Zhang, et al.** Flow injection determination of *p*-aminophenol at trace level using inhibited luminol–dimethylsulfoxide–NaOH–EDTA chemiluminescence. *Water Research*. 2005;39(2):396-402.
29. **Hung KKC, Graham CA, Lo RSL, et al.** Oral paracetamol and/or ibuprofen for treating pain after soft tissue injuries: Single centre double-blind, randomised controlled clinical trial. *PLoS One*. 2018;13(2):e0192043.
30. **Chinnappan SM, George A, Thaggikuppe P, et al.** Nephroprotective Effect of Herbal Extract *Eurycoma longifolia* on Paracetamol-Induced

- Nephrotoxicity in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2019;49:16519.
31. **Chisti, Y.** Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends in Biotechnology*. 2000;18:420 – 432.
 32. **IARC.** Genetic and related effects: An updating of selected IARC monographs from Volumes 1 to 42. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. 1987;6:1-729.
 33. **IARC.** Some miscellaneous pharmaceutical substances. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*. 1977;13:1-255.
 34. **IARC:** Some pharmaceutical drugs. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. 1980;24:1-337.
 35. **Jeffrey P., Lock R., Witherington J.** Highlights of the society for medicines research symposium: approaches to lead generation. *Drugs of the Future*. 2009; 34: 501-508.
 36. **Jeong TB, Kim JH, Kim SH, et al.** Comparison of toxic responses to acetaminophen challenge in ICR mice originating from different sources. *Laboratory Animal Research*. 2019;35:16.
 37. **Jhorawat R, Beniwal P, Malhotra V.** Can Analgesic-abuse Nephropathy is a Fertile Ground for Rare Collecting Duct (Bellini Duct) Renal Cell Carcinoma or Merely a Coincidence? *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;78(1):159-161.
 38. **Kandemir FM, Kucukler S, Eldutar E, et al.** Chrysin Protects Rat Kidney from Paracetamol-Induced Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis, and Autophagy. *A Multi-Biomarker Approach. Scientia Pharmaceutica*. 2017;85(1):4.
 39. **Kaur G, Dufour JM.** Cell lines. Valuable tools or useless artifacts. *Spermatogenesis*. 2012;2(1):1-5.
 40. **Kendig DM, Tarloff JB.** Inactivation of lactate dehydrogenase by several chemicals: implications for in vitro toxicology studies. *Toxicology In Vitro*. 2007;21(1):125-132.
 41. **Klotz L-O, Steinbrenner H.** Cellular adaptation to xenobiotics: Interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. *Redox Biology*. 2017;13:646-654.

42. **Kwon H. K., Shin H. J., Lee J. H., et al.** Etoposide Induces Necrosis Through p53-Mediated Antiapoptosis in Human Kidney Proximal Tubule Cells. *Toxicological Sciences*. 2015;148:204-219.
43. **Magalhães-Costa P, Matos L, Chagas C.** Chronic tubulointerstitial nephritis induced by 5-aminosalicylate in an ulcerative colitis patient: a rare but serious adverse event. *BMJ Case Reports*. 2015;bcr2014207928.
44. **Margan Koletic Z, Dosenovic S, Puljak L.** Efficacy and safety of modified-release paracetamol for acute and chronic pain: a systematic review protocol. *BMJ Open*. 2019;9(10):e0297298.
45. **Mark A. Hallman, Ruy Tchao, Joan B.Tarloff.** Effect of antioxidants on *para*-aminophenol-induced toxicity in LLC-PK₁ cells. *Toxicology*. 2000;156(1): 37-457.
46. **Mason CL, Leedale J, Tasoulis S, et al.** Systems Toxicology Approach to Identifying Paracetamol Overdose. *CPT Pharmacometrics Systems Pharmacology*. 2018;7(6):394-403.
47. **Mathieu Peyrou, Alastair E.Cribb.** Effect of endoplasmic reticulum stress preconditioning on cytotoxicity of clinically relevant nephrotoxins in renal cell lines. *Toxicology in Vitro*. 2007;21(5): 878–886.
48. **McCrae JC, Morrison EE, MacIntyre IM, et al.** Long-term adverse effects of paracetamol - a review. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2018;84(10):2218-2230.
49. **Mühl H.** STAT3, a Key Parameter of Cytokine-Driven Tissue Protection during Sterile Inflammation – the Case of Experimental Acetaminophen (Paracetamol)-Induced Liver Damage. *Frontiers in Immunology*. 2016;7: 163.
50. **Mund ME, Quarcoo D, Gyo C, et al.** Paracetamol as a toxic substance for children: aspects of legislation in selected countries. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology (London, England)*. 2015;10:43.
51. **Nassan FL, Coull BA, Skakkebaek NE, et al.** A crossover–crossback prospective study of dibutyl-phthalate exposure from mesalamine medications and semen quality in men with inflammatory bowel disease. *Environment International*. 2016;95:120-130.

52. **Ogata H, Aoyama N, Mizushima S, et al.** Comparison of mesalazine multimatrix 4.8 g/day once daily with other high doses of mesalazine in active ulcerative colitis: randomized, double-blind study. *Intestinal Research*. 2017;15(3):368-379.
53. **Olosová A, Láryšová I, Zaoral T, Bakhtary A.** Paracetamol u dětí – nejen lék, ale i jed, *Časopis Lékařů Českých*. 2007;146:401-405.
54. **Patel H, Barr A, Jeejeebhoy KN.** Renal effects of long-term treatment with 5-aminosalicylic acid. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 2009;23 (3):170-176.
55. **Pettie JM, Caparrotta TM, Hunter RW, et al.** Safety and Efficacy of the SNAP 12-hour Acetylcysteine Regimen for the Treatment of Paracetamol Overdose. *EClinicalMedicine*. 2019;11:11-17.
56. **Peyrou M, Cribb AE.** Vliv endoplazmatického předzpracování stresu na cytotoxicitu klinicky relevantních nefrotoxinů v buněčných liniích ledvin. *Toxicology In Vitro*. 2007;21(5):878-86.
57. **Piel S, Chamkha I, Dehlin AK, et al.** Cell-permeable succinate prodrugs rescue mitochondrial respiration in cellular models of acute acetaminophen overdose. *PLoS One*. 2020;15(4):e0231173.
58. **Piotrowska N, Klukowska-Rötzler J, Lehmann B, et al.** Presentations Related to Acute Paracetamol Intoxication in an Urban Emergency Department in Switzerland. *Emergency Medicine International*. 2019;3130843.
59. **Sadler NC, Nandhikonda P, Webb-Robertson B-J, et al.** Hepatic Cytochrome P450 Activity, Abundance, and Expression Throughout Human Development. *Drug Metabolism and Disposition*. 2016;44(7): 984-991.
60. **Saleem M, Iftikhar H.** A Rare Case of Acetaminophen Toxicity Leading to Severe Kidney Injury. *Cureus*. 2019;11(6):e5003
61. **Saleem TH, Abo El-Maali N, Hassan MH, et al.** Comparative Protective Effects of N-Acetylcysteine, N-Acetyl Methionine, and N-Acetyl Glucosamine against Paracetamol and Phenacetin Therapeutic Doses-Induced Hepatotoxicity in Rats. *International Journal of Hepatology*. 2018;760437.

62. **Sapiro JM, Monks TJ, Lau SS.** All-*trans*-retinoic acid-mediated cytoprotection in LLC-PK₁ renal epithelial cells is coupled to *p*-ERK activation in a ROS-independent manner. *American Journal of Physiology-Renal Physiol.* 2017;313(6): 1200–1208.
63. **Sarganas G, Buttery AK, Zhuang W, et al.** Prevalence, trends, patterns and association of analgesic use in Germany. *BMC Pharmacology and Toxicology.* 2015;16:28.
64. **Shipp M. A, Vijayaraghavan J., Schmidt E, et al.** Common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) is active neutral endopeptidase 24.11 („enkephalase“): direct evidence by cDNA transfection analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1989;86: 297–301.
65. **Schmidt R, Firment J, Spodník K, et al.** Intoxikácia paracetamolom – kazuistika. *Anesteziologie Intenzivní Medicína.* 2005;16(3):161-165.
66. **Schnackenberg LK, Sun J, Bhattacharyya S, et al.** Metabolomics Analysis of Urine Samples from Children after Acetaminophen Overdose. *Metabolites.* 2017;7(3):46.
67. **Smeets T, van Hunsel F.** Red-Brown Urine Discolouration in Two Patients Taking Mesalamine. *Drug Safety - Case Reports.* 2016;3:6.
68. **Sumera Afzal Khan, Muhammad Hamayun, Safia Ahmed.** Degradation of 4-aminophenol by newly isolated *Pseudomonas* sp. strain ST-4. *Enzyme and Microbial Technology.* 2006;28(2):10-13.
69. **Suzuki Y, Iida M, Ito H, et al.** Efficacy and safety of two pH-dependent-release mesalamine doses in moderately active ulcerative colitis: a multicenter, randomized, double-blind, parallel-group study. *Intestinal Research.* 2016;14(1):50-59.
70. **Tenjarla S.** Dissolution of Commercially Available Mesalamine Formulations at Various pH Levels. *Drugs in R&D.* 2015;15(2):211-215.
71. **Tobwala S, Khayyat A, Fan W, Ercal N.** Comparative evaluation of N-acetylcysteine and N-acetylcysteineamide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in human hepatoma HepaRG cells. *Experimental Biology and Medicine.* 2015;240(2):261-272.
72. **Valerius, M & Patterson, Larry & Feng, Yuxin & Potter, Stanley.** Hoxa 11 is upstream of Integrin 8 expression in the developing kidney.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99: 8090-5.

73. **Vrbová M, Roušarová E, Brůčková L, et al.** Characterization of acetaminophen toxicity in human kidney HK-2 cells. *Physiological Research*. 2016;8;65(4):627-635.
74. **Vrbová Martina, Dastychová Eva, Roušar Tomáš.** Renal cell lines for study of nephrotoxicity in vitro. *Military Medical Science Letters*. 2016;85(2):69-74.
75. **Waddington F, Naunton M, Thomas J.** Paracetamol and analgesic nephropathy: Are you kidneying me?. *International Medical Case Reports Journal*. 2014;8:1-5.
76. **Wang L, Wei W, Xiao Q, Yang H, Ci X.** Ferrerol Ameliorates APAP-induced Hepatotoxicity via Activation of Nrf2 and Autophagy. *International Journal of Biological Sciences*. 2019;15(4):788-799.
77. **Wang Q, Lu Y, Yuan M, et al.** Characterization of monocarboxyleate transport in human kidney HK-2 cells. *Molecular pharmaceuticals*. 2006;3: 675–685.
78. **Watanabe A, Fukami T, Takahashi S, et al.** Arylacetamide Deacetylase Is a Determinant Enzyme for the Difference in Hydrolase Activities of Phenacetin and Acetaminophen. *Drug Metabolism and Disposition* 2010;38 (9):1532-1537.
79. **Wei Z, Cao J, Zhang X, et al.** EPA attenuates epithelial-mesenchymal transition and fibrosis through the TGF- β 1/Smad3/ILK pathway in renal tubular epithelial HK-2 cells by up-regulating miR-541. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2019;12(7):2516-2525.
80. **Ya-Chung Tian, Yung-Chang Chen, Chiz-Tzung Chang, et al.** Epidermal growth factor and transforming growth factor- β 1 enhance HK-2 cell migration through a synergistic increase of matrix metalloproteinase and sustained activation of ERK signaling pathway. *Experimental Cell Research*. 2007;313(11): 2367-23771.
81. **Yeo J, Woo HS, Lee SM, et al.** Drug-induced eosinophilic pneumonia in a patient with Crohn's disease: diagnosis and treatment using fraction of exhaled nitric oxide. *Intestinal Research*. 2017;15(4):529-534.

82. **Yin L.-M., Wei Y., Wang Y., et al.** Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. *International Journal of Medical Sciences*. 2013;10: 68–72.
83. **Yoon E, Babar A, Choudhary M, et al.** Acetaminophen-induced hepatotoxicity: comprehensive update. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2016;4(2):131-142.
84. **Yoshioka H, Usuda H, Fujii H, Nonogaki.** Sasa veitchii extracts suppress acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 2017;22:54.
85. **Zhang J, Zhao L, Hu C, et al.** Fisetin Prevents Acetaminophen-Induced Liver Injury by Promoting Autophagy. *Frontiers Pharmacology*. 2020;11:162.
86. **Zhang X, Zhang T, Liu J, et al.** Functional characterization of a unique cytochrome P450 in *Toxoplasma gondii*. *Oncotarget*. 2017;8 (70):115079-115088.
87. **Zwietering, Jongenburger I., Rombouts, F. M., Van 't Riet K.** Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990;56(6):1875-1881.

9 PŘÍLOHY – data ke grafům

Příloha I (Graf 2): Změny v buněčné viabilitě po působení acetaminofenu (APAP) a *p*-aminofenolu (PAP). HK-2 buňky, 4 hod. Test WST-1 (440 nm); kontrola (CTRL) = 100 %; průměr ± SD; n=5.

Toxin	Koncentrace (mM)	Buněčná viabilita (Průměr ± SD)
Kontrola	0	100 ± 5 %
APAP	1	99 ± 2 %
	10	102 ± 2 %
PAP	0,001	98 ± 7 %
	0,01	98 ± 7 %
	0,1	96 ± 3 %
	0,5	4 ± 2 %
	1	2 ± 1 %

Příloha II (Graf 3): Změny v koncentraci GSH po působení acetaminofenu (APAP) a *p*-aminofenolu (PAP). HK-2 buňky, 4 hod. Test fluorometrické stanovení monochlorobiamnů; kontrola (CTRL) = 100 %; průměr ± SD; n=5.

Toxin	Koncentrace (mM)	Koncentrace GSH (Průměr ± SD)
Kontrola	0	100 ± 4 %
APAP	1	88 ± 3 %
	10	65 ± 5 %
PAP	0,001	97 ± 7 %
	0,01	99 ± 4 %
	0,1	79 ± 3 %
	0,5	8 ± 1 %
	1	0 %

Příloha III (Graf 4): Změny v buněčné viabilitě po působení acetaminofenu (APAP) a *p*-aminofenolu (PAP). HK-2 buňky, 24 hod. Test WST-1 (440 nm); kontrola (CTRL) = 100 %; průměr ± SD; n=5.

Toxin	Koncentrace (mM)	Buněčná viabilita (Průměr ± SD)
Kontrola	0	100 ± 4 %
APAP	1	83 ± 2 %
	10	68 ± 2 %
PAP	0,001	93 ± 2 %
	0,01	84 ± 3 %
	0,1	98 ± 3 %
	0,5	0 %
	1	0 %

Příloha IV (Graf 5): Změny v koncentraci GSH po působení acetaminofenu (APAP) a *p*-aminofenolu (PAP). HK-2 buňky, 24 hod. Test fluorometrické stanovení monochlorobiamnů; kontrola (CTRL) = 100 %; průměr ± SD; n=5.

Toxin	Koncentrace (mM)	Koncentrace GSH (Průměr ± SD)
Kontrola	0	100 ± 3 %
APAP	1	89 ± 2 %
	10	41 ± 4 %
PAP	0,001	100 ± 3 %
	0,01	94 ± 3 %
	0,1	59 ± 1 %
	0,5	0 %
	1	0 %