

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

**Imortalizované buněčné linie v testování cytotoxicity *in vitro***

Tereza Vacková

Bakalářská práce

2020

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

**Immortalized cell lines in *in vitro* cytotoxicity testing**

Tereza Vacková

Bachelor thesis

2020

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

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tereza Vacková**  
Osobní číslo: **C17230**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Imortalizované buněčné linie v testování cytotoxicity *in vitro***  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši na téma imortalizované buněčné linie v testování cytotoxicity *in vitro*. Úvodní část textu bakalářské práce zaměřte zejména na vysvětlení procesu imortalizace.
- 2) V hlavní části práce se zaměřte na popis jednotlivých způsobů buněčné imortalizace a pokuste se je podrobněji charakterizovat z pohledu buněčných změn, které tento proces doprovázejí. Dále uveďte příklady imortalizovaných buněčných linií a pokuste se shrnout jejich význam ve výzkumu využívajícím *in vitro* buněčné modely.
- 3) Jako zdroj informací pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce využijte odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jiří Handl**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Jana Báčová**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

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

V Pardubicích dne 28. února 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 5.6. 2020

Tereza Vacková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce Mgr. Jiřímu Handlovi za podnětné rady, trpělivost, odbornou pomoc, věcné připomínky, ochotu při osobních konzultacích a věnovaný čas při vypracování práce.

## **ANOTACE**

Cílem bakalářské práce bylo představit jednotlivé způsoby buněčné imortalizace a popsat základní vlastnosti imortalizovaných buněčných linií. V první kapitole je shrnuta základní charakteristika buněčných linií a jejich rozdělení. Následující kapitola již pojednává o vlastnostech imortalizovaných buněčných liniích. Důraz je kladen především na popis jednotlivých mechanismů uměle provedené imortalizace pomocí fyzikálních, chemických a biologických činitelů. Důkladně jsou zmíněny především biologické způsoby imortalizace, kam spadá imortalizace pomocí různých typů virů. Další části bakalářské práce poté tvoří popis vybraných imortalizovaných buněčných linií využitelných pro testování cytotoxicity *in vitro*. Tato část je zaměřena především na popis uměle imortalizovaných buněčných linií, avšak v závěru práce jsou zmíněny i linie imortalizované spontánně vlivem nádorového bujení. U každé buněčné linie jsou definovány její základní vlastnosti, využití a popřípadě shrnuty i výhody a nevýhody.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

buněčné linie, imortalizace, telomeráza, senescence, SV40, cytotoxicita, karcinogen

## **ANNOTATION**

The aim of the bachelor thesis is to introduce particular methods of cell immortalization and to describe the basic properties of the mentioned cell lines. The first chapter contains the basic characteristics of the cell lines and their division. The following chapter deals with immortalized cell lines and their properties. The main part of this chapter describes the mechanisms of artificial immortalization using physical, chemical and biological factors. The biological methods of immortalization, which include immortalization using various types of viruses, are thoroughly mentioned. Other parts of the bachelor thesis include description of immortalized cell lines usable for *in vitro* cytotoxicity testing in individual organs. This part is mainly focused on the description of artificially immortalized cell lines, but there are also mentioned cell lines that have been immortalized spontaneously by tumor growth. For each cell line its basic properties, advantages and disadvantages are defined.

## **KEYWORDS**

Cell lines, Immortalization, Telomerase, Senescence, SV40, Cytotoxicity, Carcinogen

# OBSAH

Úvod .....	13
1 Buněčné linie .....	14
1.1 Diploidní buněčné linie .....	14
1.2 Nestabilizované buněčné linie.....	15
2 Imortalizace buněčných linií .....	16
2.1 Senescence a krize.....	16
2.2 Fyzikální způsoby imortalizace buněk.....	17
2.3 Chemické způsoby imortalizace buněk.....	18
2.4 Biologické způsoby imortalizace buněk .....	19
2.4.1 SV40 .....	19
2.4.2 HPV .....	21
2.4.3 EBV .....	22
2.4.4 Adenoviry .....	24
2.5 Využití imortalizovaných buněčných linií .....	24
3 Uměle imortalizované buněčné linie .....	26
3.1 Buněčné linie pro testování nefrotoxicity .....	26
3.1.1 HK-2 .....	27
3.1.1.1 Testování toxicity léčiv .....	27
3.1.1.2 HK-2 při léčbě diabetické nefropatie .....	28
3.1.2 HEK-293 .....	29
3.2 Buněčné linie pro testování neurotoxicity.....	30
3.2.1 hBMECs.....	32
3.2.2 hCMEC/D3 .....	32
3.3 Buněčné linie pro testování plicní toxicity.....	34
3.3.1 HBEC3-KT .....	34
3.3.2 Alveolární buňky typu 2 .....	35
3.4 Buněčné linie pro testování hepatotoxicity .....	36
3.4.1 THLE-2.....	37

3.4.2	cBAL111.....	37
4	Spontánně imortalizované buněčné linie.....	39
4.1	Caki-1 – nefrotoxicita .....	39
4.2	SH-SY5Y – neurotoxicita .....	40
4.3	A549 – plicní toxicita.....	41
4.4	HepG2 – hepatotoxicita.....	41
4.5	Buněčná linie Jurkat.....	42
	Závěr .....	44
	Seznam použité literatury .....	45

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADH	antidiuretický hormon
AMBRA1 <sup>ActA</sup>	aktivační molekula v autofagii regulované proteinem Beclin-1
APAP	acetaminophen
ATCC	americká kolekce typových kultur
ATP	adenosintrifosfát
AT1	lidské alveolární buňky typu 1
AT2	lidské alveolární buňky typu 2
A549	buněčná linie odvozená z karcinomu plic
BaP	benzoapyren
BAX	bcl-2 asociovaný X protein
Bcl-2	lymfom B-buněk 2
cBAL111	lidská fetální jaterní buněčná linie
Caki-1	buněčná linie odvozená z karcinomu ledvin
CDK	cyklin dependentní kináza
CFTR	regulátor transmembránové vodivosti cystické fibrózy
CYP2E1	cytochrom P2E1
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EBNA	jaderný antigen viru Epstein-Barrové
EBV	virus Epstein-Barrové
ECACC	evropská kolekce zvířecích buněčných kultur
E1A	adenovirový časný gen
HBEC3-KT	lidské bronchiální endoteliální buňky
hBMEC	lidské mozkové mikrovaskulární endoteliální buňky
hCMEC/D3	lidské cerebrální mikrovaskulární endoteliální buňky
HEK-CFTR	lidský regulátor transmembránové vodivosti embryonálních buněk ledvin
HEK-293	lidská buněčná linie odvozená z embryonálních ledvinových buněk
HeLa	buněčná linie cervikálního adenokarcinomu
HEL-299	lidská buněčná embryonální linie plic
HepG2	lidská buněčná linie hepatocelulárního karcinomu
(HIF)-1 $\alpha$	faktor indukující hypoxii
HK-2	lidská buněčná linie odvozená z embryonálních ledvinových buněk

HPV	lidský papilomavirus
HR-HPV	lidský vysoce rizikový papilomavirus
hTERT	lidská telomeráza reverzní transkriptáza
IL-1 $\beta$	interleukin, leukocytární pyrogen
IMR-90	lidská buněčná linie z tkáně plic
LD	laktátdehydrogenáza
LMP	latentní membránový protein
MCT1	monokarboxylátový transportér
MDR1	transportér mnohočetné lékové rezistence
MET	metamfetamin
MitoQ	mitochondriálně směřovaný koenzym Q
MNU	N-methyl-N-nitrosurea
MRC-5	lidská buněčná linie z tkáně plic
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NLRP3	protein obsahující leucin a pyrinové domény 3
Notch1	lidský onkogen lymfoidních malignit
NOXA (PMAIP1)	phorbol-12-myristát-13-acetát-indukovaný protein 1
NOX2	prototyp NADPH oxidázy
PDX-1	pankreatický a dvanáctníkový homeobox 1
pRB	retinoblastomový protein
p16	protein 16
p53	protein 53
P450	mikrozomální cytochrom 450
PUMA	p53 upregulační modulátor apoptózy
RASSF1A	protein obsahující ras asociační doménu
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
SH-SY5Y	lidská buněčná linie odvozená od buněk neuroblastomu
SV40	onkogenní DNA opičí virus ( <i>Simian virus 40</i> )
THLE-2	buněčná linie pro testování hepatotoxicity
TRX	thioredoxin
TXNIP	thioredoxin-interagující protein
VHL	von Hippel-Lindau gen
WI-38	lidská buněčná linie z tkáně plic

## ÚVOD

Buněčné linie jsou trvalé buněčné kultury, které mají schopnost se stát nesmrtelnými. Běžné diploidní buněčné linie mají životaschopnost omezenou a postupem času zanikají. Počet dělení takovéto buněčné linie souvisí s tzv. Hayflickovým limitem. Při překonání Hayflickova limitu a dalších bariér, jako je senescence a krize se buňka stává nesmrtelnou neboli imortalizovanou.

Imortalizace buněk je možná dvěma způsoby, uměle a spontánně. Za umělou imortalizaci je považována imortalizace zásahem člověka. Jedná se o znesmrtelnění fyzikálními, chemickými nebo biologickými vlivy. Fyzikální způsob zahrnuje působení ionizujícího nebo ultrafialového záření a chemický způsob obvykle působení karcinogenů. V případě biologické imortalizace buněk se jedná o buněčnou transformaci způsobenou vnesením genů virového původu do buňky. Takovými viry jsou například SV40, HPV, EBV nebo adenoviry.

Spontánní imortalizace je naopak znesmrtelnění bez zásahu člověka. Dochází ke genomové nestabilitě, aktivaci telomerázy a tumor supresorových genů a následnému rakovinnému bujení. Tím buňky rychle a nekonečně proliferují.

Imortalizované buněčné linie slouží především k medicínským a farmaceutickým výzkumům, testování léčiv a léčby různých nemocí *in vitro*, jako je diabetes nebo Parkinsonova a Alzheimerova choroba. Hlavní nevýhodu představuje skutečnost, že tyto buňky mnohdy nedokáží detailně popsat stavy probíhající *in vivo* a nelze je považovat za fyziologické.

# 1 BUNĚČNÉ LINIE

Buněčné linie jsou trvale zavedené buněčné kultury, které mají schopnost neustálé proliferace za vhodných kultivačních podmínek ve vhodném kultivačním médiu. Od buněčných kultur se buněčné linie liší tím, že se stávají nesmrtelnými (Brenner et al., 2002). Kromě dostatečného množství živin je pro jejich udržení třeba zajistit další vhodné kultivační podmínky. Buněčné linie převzaly důležitou roli ve studiu fyziologických, patofyziologických a diferenciačních procesů. Díky jejich rozmanitému původu lze tyto procesy studovat se specifickým zaměřením na vybrané orgány (Davis, 2002). Zároveň umožňují v kontrolovaném prostředí zkoumat postupné strukturní změny buněk, včetně změn genetických (Brenner et al., 2002).

V současné době je známo více než 6000 buněčných linií, z nichž má asi 5000 lidský původ a zbylé pocházejí od zvířat, přičemž se jedná asi o 200 živočišných druhů. Buněčné linie nejsou odvozeny jen od fyziologických tkání, ale jejich původ je i z nádorově pozměněných tkání. Téměř všechny do dnešní doby vytvořené buněčné linie jsou uschovány v buněčných bankách, ve kterých jsou přechovávány zamrazené v tekutém dusíku po mnoho let. Příkladem je evropská buněčná banka *European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC) nebo americká buněčná banka *American Type Culture Collection* (ATCC), ve které je uchováno téměř 5000 buněčných linií (Šebek, 2018).

## 1.1 Diploidní buněčné linie

Z počátku se buňky této linie intenzivně množí, postupně však rychlost proliferace buněk klesá, až nakonec linie zanikne. Počet pasáží diploidní buněčné linie závisí na více faktorech. Hlavním faktorem je druh živočicha, ze kterého buňky pochází, důležitý vliv má ale i stáří organismu, ze kterého byla tkáň pro kultivaci odebrána. Čím starší živočich, tím dosáhne menšího počtu pasáží diploidní buněčné linie, což souvisí s tzv. Hayflickovým limitem (Davis, 2002). Tento limit především vypovídá o proliferačních schopnostech buňky. Experimentálně byl u všech typů zvířecích buněk stanoven tak, že bylo zjištěno největší množství mitóz, které daný druh buňky prodělal při podmínkách *in vitro* (Šebek, 2018). Bylo dokázáno, že množství buněčných cyklů, tudíž i Hayflickův limit souvisí s délkou telomer (Davis, 2002).

Chromozomální telomery jsou vysoce specializované struktury na koncích chromozomů, které obsahují opakující se sekvence DNA (Hayflick a Moorhead, 1961). Jsou nezbytné pro stabilizaci chromozomů a pro ochranu DNA. Základem telomer jsou tandemové repetice (TTAGGG)<sub>n</sub>, spojené prostřednictvím proteinů, které tvoří ochranný komplex

(Dolcetti et al., 2014). Telomery se zkracují s každým novým buněčným dělením kvůli neschopnosti konvenčních DNA polymeráz replikovat konce chromozomů (Liu et al., 2006). Zkracování probíhá až do doby, kdy jsou zkráceny na kritickou délku, což již neumožní další dělení a způsobí chromozomální nestabilitu. Většina buněk má Hayflickův limit okolo 40 až 60 dělení (Hayflick a Moorhead, 1961). Po dosažení Hayflickova limitu buňky obvykle podstupují replikační stárnutí a apoptózu (Dolcetti et al., 2014).

## 1.2 Nestabilizované buněčné linie

Hlavním důvodem, proč tyto linie nedosahují takového uplatnění jako immortalizované buněčné linie, je jejich omezená doba životaschopnosti. Ke všemu jsou oproti immortalizovaným buněčným liniím citlivější na negativní vlivy okolního prostředí. Jejich největší výhodou spočívá v tom, že jsou geneticky a fenotypově rovnocennější s původními buňkami odebranými z organismu. Pokud je tedy na kulturách třeba co nejpřesněji namodelovat situaci panující *in vivo*, tak je upřednostňována práce právě s nestabilizovanými liniemi. Další důležitou pozitivní vlastností nestabilizovaných buněčných linií je schopnost zastavit svůj další růst. Jakmile buňky v kultuře dorostou do celistvé vrstvy a navzájem se začnou dotýkat, potlačí svou proliferační aktivitu. Tento jev je znám pod označením kontaktní inhibice. Principem kontaktní inhibice je zastavení proliferace *in vitro* rostoucích buněk v okamžiku, jakmile se dostanou do vzájemného kontaktu. V laboratoři jsou nejčastějším zástupcem dočasných linií ty buněčné linie, které vycházejí z tkáně lidských plic. Příkladem jsou buňky HEL-299, IMR-90, MRC-5 či WI-38 (Šebek, 2018).

## 2 IMORTALIZACE BUNĚČNÝCH LINIÍ

Imortalizované buněčné linie jsou transformované buňky s pozměněnými vlastnostmi, které vznikají, pokud buněčná linie překoná „stádium krize“ a neuhyne (Lanosa a Colombo, 2008). Často vykazují pozitivní testy malignity. Také mají neomezený růstový potenciál a stávají se „nesmrtelnými“, což znamená, že je možno je prakticky neomezeně dlouho pěstovat *in vitro* (Davis, 2002). Tyto buňky zpravidla ztrácejí schopnost kontaktní inhibice. Kontaktní inhibice je velmi využívaná v situacích, kdy je třeba potlačit nekontrolovatelnou proliferaci buněk a zajistit programovaný vývoj buněčných linií (Lanosa a Colombo, 2008). Patrné také bývají nižší nároky inhibovaných buněk na přítomnost růstových faktorů v kultivačním médiu (Davis, 2002).

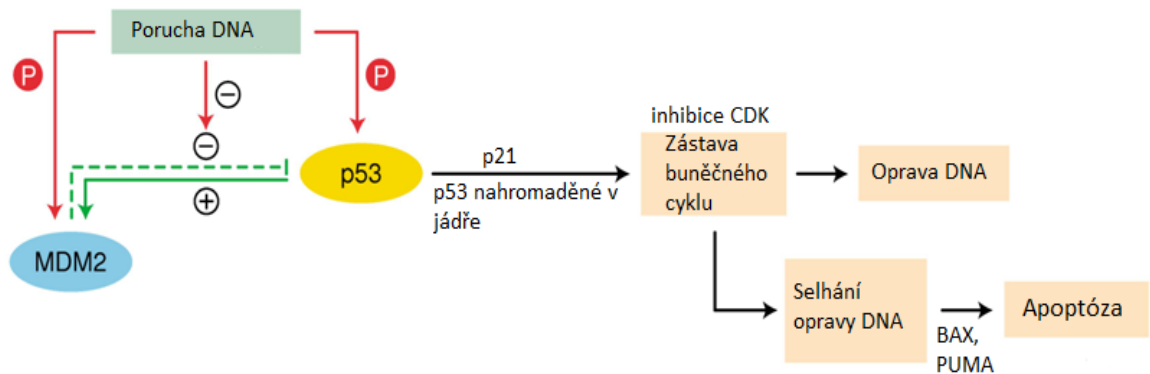
Imortalizované buněčné linie jsou obecně získávány z mnohobuněčných organismů. Jejich rychlý růst je zajištěn vlivem mutace, díky čemuž se zároveň vyhýbají buněčnému stárnutí. Mutace vyžadované pro nesmrtelnost buněk vznikají buď spontánně, nebo uměle. Uměle imortalizované buněčné linie se používají výhradně pro experimentální účely (PR Newswire Association LLC, 2016). Za spontánní imortalizaci považujeme především znesmrtelnění na základě nádorového zvratu, naopak uměle je imortalizace prováděna nejčastěji biologickými způsoby prostřednictvím virů. Méně často jsou v umělé imortalizaci využívány fyzikálně-chemické postupy (Pollard a Walker, 1997). Spontánní buněčná imortalizace je považována za velmi komplexní děj, kdy mezi imortalizovanou a fyziologickou zdravou buňkou stojí několik proliferačních bariér, které musí buňka překonat, aby získala neomezený proliferační potenciál (Park, 1995).

### 2.1 Senescence a krize

Před více než 50 lety došlo k významnému zjištění. Leonard Hayflick prokázal, že každá lidská buněčná populace je i v optimálních podmínkách *in vitro* schopna prodělat pouze omezený počet dělení. Tento maximální počet buněčných dělení byl označen jako tzv. Hayflickův limit (Hayflick, 1965). Po jeho dosažení buněčné dělení neodvratně končí procesem senescence neboli buněčným stárnutím. Buňky v této fázi zůstávají živé, ale jejich buněčný cyklus se nevratně zablokuje v G1 fázi (Duncan a Reddel, 1997).

Nedávné studie naznačují, že fázi senescence lze vyvolat i nezávisle na úrovni dělení buněčné populace a délce telomer. Toto předčasné stárnutí je většinou způsobeno aktivitou proteinu p53 (Duncan et al., 2000). Protein p53 je hlavním tumor supresorovým genem, jehož základní funkcí je reakce na poškození genomu, proto buňky s poškozeným DNA tento gen stabilizují procesem fosforylace (Chipuk a Green, 2006). Stabilizovaný p53 se hromadí v jádře

a váže se na gen p21, který inhibuje aktivitu různých cyklin-dependentních kináz (CDK). Tím dochází k zastavení buněčného cyklu a reparaci DNA (Duncan et al., 2000). Pokud k opravě DNA nedojde, dochází k expresi proapoptických genů (např. PUMA, BAX, NOXA), které vedou k apoptóze (Chipuk a Green, 2006), (Obr. 1). Imortalizace buňky je v tomto případě závislá na zastavení produkce proteinu p53 a na překonání senescenční bariéry (Duncan et al., 2000).



Obr. 1: **Aktivita proteinu p53 v buněčných procesech** (Upraveno dle Theobald a Offringa, 2003)

Vzhledem ke snížené proliferaci populací somatických buněk v kulturách dochází ke spontánnímu poklesu jejich růstu. Stárnutí buněk nakonec končí ve stavu tzv. replikativního stárnutí, což je stav, kdy jsou buňky v životaschopném, ale klidném stavu. Takovéto buňky vykazují specifické vlastnosti a reakce na vnitřní i vnější podněty. Typické jsou pro ně zvýšené hladiny inhibitorů buněčného cyklu, pozměněné lysozomy, genová exprese či mitochondriální poškození (Carnero et al., 2015).

## 2.2 Fyzikální způsoby imortalizace buněk

Imortalizace buněk fyzikálními způsoby je založena na působení ionizujícího nebo ultrafialového záření na buněčné linie takovou intenzitou, aby byl pozměněn genetický materiál jádra. Využívají se velmi nízké intenzity záření z důvodu zachování proliferativního potenciálu buněk. Hodnoty záření se pohybují v rozmezí 0,5-15 Gy u gama záření a okolo 8 J/m<sup>2</sup> za minutu u UV záření (Šebek, 2018). Vzácným případem je imortalizace buněk mléčné žlázy ionizujícím zářením o intenzitě 30 Gy, kdy dochází k naprosté ztrátě proteinu p53 (Carnero et al., 2015).

### 2.3 Chemické způsoby immortalizace buněk

Působení chemických látek (Tab.1) má rovněž vliv na genetickou výbavu buněčných linií (Šebek, 2018). Immortalizace pomocí chemických látek se týká z pravidla zvířecích buněk, například hlodavčích. Prozatím neexistují žádné důkazy úplné immortalizace primárních lidských buněk pomocí karcinogenů. Tato skutečnost je dána přítomností silných antiproliferativních bariér, které se vyskytují především u endoteliálních mikrovaskulárních lidských mozkových buněk hBMECs. Existují však důkazy o zvýšení tumorigenicity immortalizovaných lidských keratinocytů, infikovaných viry HPV, které byly vystaveny dlouhodobému působení benzoapyrenu (BaP) (Carnero et al., 2015).

Mechanismus působení BaP spočívá v jejím přidání do kultivačního média společně s kokarcinogenem, který spolupracuje s karcinogenem a podporuje jeho účinek. Vhodným kokarcinogenem je například krotový olej či azbest (Gazdar et al., 2002). BaP je aktivován pomocí metabolizujících enzymů, jako je cytochrom P450, který poskytuje meziprodukty, které jsou chemicky reaktivnější než výchozí sloučenina (Russo et al., 2002). Vyšší frekvenci immortalizace než BaP má chlorid nikelnatý. Tato chemikálie indukuje inaktivaci dráhy proteinu p16 methylací tumor supresorového promotoru a zastavením exprese tohoto genu. Přestože je chlorid nikelnatý silnějším immortalizačním činidlem hlodavčích buněk než BaP, u lidských buněk hBMECs vykazuje nižší frekvenci immortalizace. Silně mutagenní je také N-methyl-N-nitrosurea (MNU). Testováním bylo prokázáno, že MNU má silné transformační účinky na křeččí dermální buňky díky inaktivaci p53 a p16. Dále byla objevena celá řada přírodních chemických sloučenin, jako například allicin a kurkumin, které inhibují aktivitu telomerázy (Carnero et al., 2015).

Vliv na lidské buňky má také platinový komplex dimethylsulfátu. Studie ukázaly, že tento komplex má vysokou cytotoxickou aktivitu a je schopen indukovat buněčnou smrt v buňkách lidského karcinomu HeLa nebo v lidských neuroblastomových buňkách SH-SY5Y. Zajímavé je, že tento komplex má také vysokou cytotoxicitu v ledvinových buňkách Caki-1, i přesto, že jsou tyto buňky přirozeně rezistentní na platinu (Antonaci et al., 2019). Nevýhodou syntetických chemických sloučenin je jejich velký vliv na změnu fenotypu, který se oproti původní buňce značně liší (Russo et al., 2002).

Tab. 1: Chemické látky používané k imortalizaci buněk (Šebek, 2018)

Chemická látka	Koncentrace [μmol/l]	Doba působení [hod]
Aristolochová kyselina	50	24-48
<b>Benzoapyren</b>	<b>0,1-10</b>	<b>6-24</b>
Benzo [a] pyrene-diol-epoxid	0,2-0,8	2-16
Dimethylsulfát	200-1000	12-48
<b>Chlorid nikelnatý</b>	<b>5-500</b>	<b>12-48</b>
<b>N-methyl-N-nitrosurea</b>	<b>500-5000</b>	<b>několik týdnů</b>
N-nitrosodimethylamin	15	12-48

## 2.4 Biologické způsoby imortalizace buněk

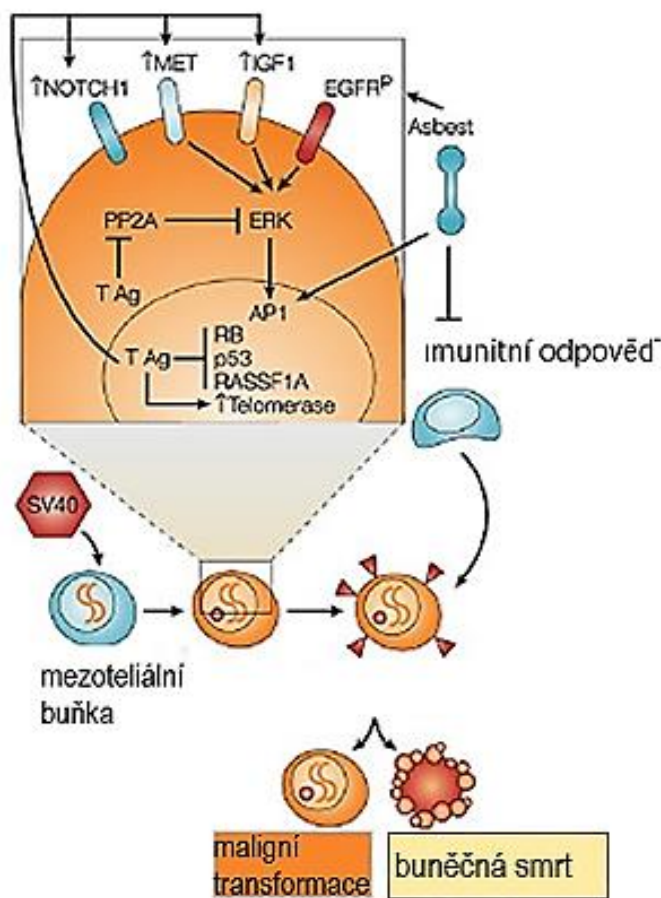
Biologické postupy patří mezi nejvyužívanější transformační způsoby v dnešní době. Dochází při nich ke změně genetického materiálu inzercí genů nazývanou jako buněčná transformace. Za nejúčinnější jsou považovány geny virového původu, které jsou přirozenou součástí onkogenních virů a způsobují nádorové transformace. Na buňku mohou také například působit kokarcinogeny, jako azbest a SV40-T antigen (Šebek, 2018).

### 2.4.1 SV40

Opičí virus SV40 byl poprvé objeven roku 1960 v opičích buňkách ledvin, které byly použity k výrobě vakcíny proti dětské obrně. Jedná se o dvouvláknový DNA virus, který zahrnuje strukturální a funkční proteiny, obsahující velký T a malý t antigen. Oba tyto antigeny jsou nezbytné pro virový životní cyklus. Velký T antigen SV40 je multifunkční regulační protein, který kóduje aminokyseliny a má vlastnosti dvouřetězcové DNA (Anand et al., 2012).

SV40 blokuje funkci genů p53, dále pRB a protein obsahující ras asociační doménu RASSF1A. Naopak tento SV40 podporuje účinek onkogenů Notch1, MET a telomerázy (Gazdar et al., 2002). Těmito mechanismy je buňka přinucena k posunu v buněčném cyklu do S fáze, dochází k transformaci buněk a jejich nekonečné proliferaci. Infekce pomocí SV40 vede k náhodné integraci virové DNA do genomu hostitele. Virové proteiny poté mění fenotyp

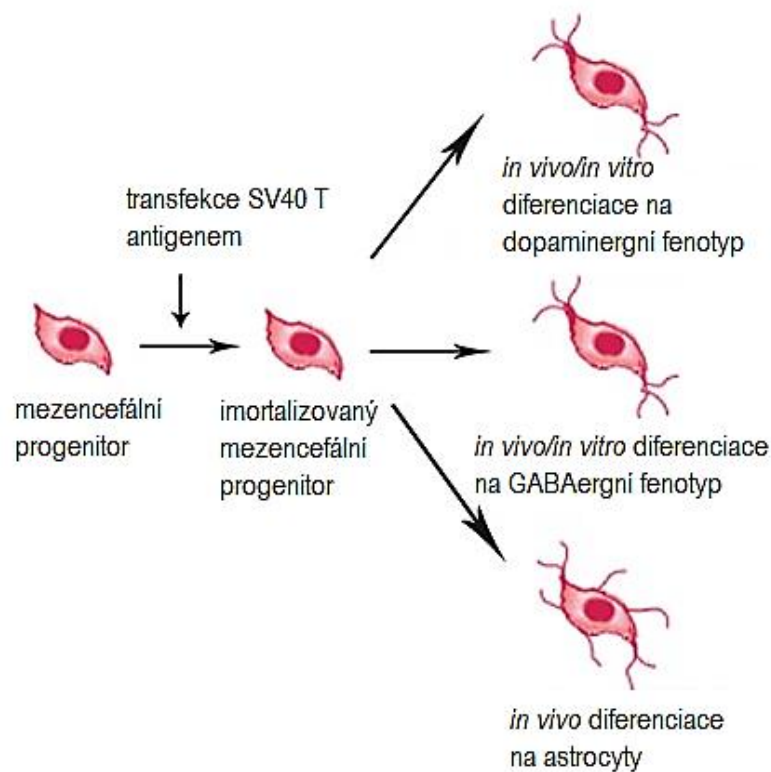
infikované buňky, a především kvůli velkému T antigenu SV40 dochází ke změně morfologie buněk (Shay et al., 1991). Exprese genomu SV40 v buňce tudíž prodlužuje její životnost *in vitro* a může vést až k jejímu znesmrtelnění. Schopnost immortalizovat buňku je tedy především připisována právě velkému T antigenu SV40, který se váže na již zmiňovaný gen pRB a p53. Pro transformaci buněk je ale nutný také malý t antigen. Účinky SV40-T antigenu jsou závislé především na teplotě. Hraniční je teplota 39 °C, při které dochází k inaktivaci tohoto antigenu. Následkem zvýšení teploty nad 39 °C tedy pokračují buňky ve stárnutí (Hubbard a Ozer, 1999), (Obr. 2).



Obr. 2: **Model indukované transformace buněk** (Upraveno dle Gazdar et al., 2002)

Pomocí SV40 byly immortalizovány například lidské mozkové buňky pro testování neurotoxicity hBMECs a hCMEC/D3. Podstatou jejich immortalizace je navázání velkého antigenu T na gen p53, po kterém následuje „stádium krize“ a změna morfologie (Stebbins et al., 2016). Zvláštní skupinu buněčných linií, immortalizovaných pomocí SV40, tvoří mezencefální progenitorové buňky. Tyto buňky se po immortalizaci velkým T antigenem SV40

diferencují *in vivo/in vitro* na dopaminergní, GABAergické nebo astrocytické fenotypy. Každý z fenotypů exprimuje jiné receptory a faktory. Exprese velkého T antigenu v těchto diferenciovaných buňkách závisí na podmíněném vektoru nebo na podmínkách *in vivo* (Anand et al., 2012), (Obr. 3).



Obr. 3: **Imortalizace a diferenciace mezencefálních progenitorů**  
(Upraveno dle Anand et al., 2012)

## 2.4.2 HPV

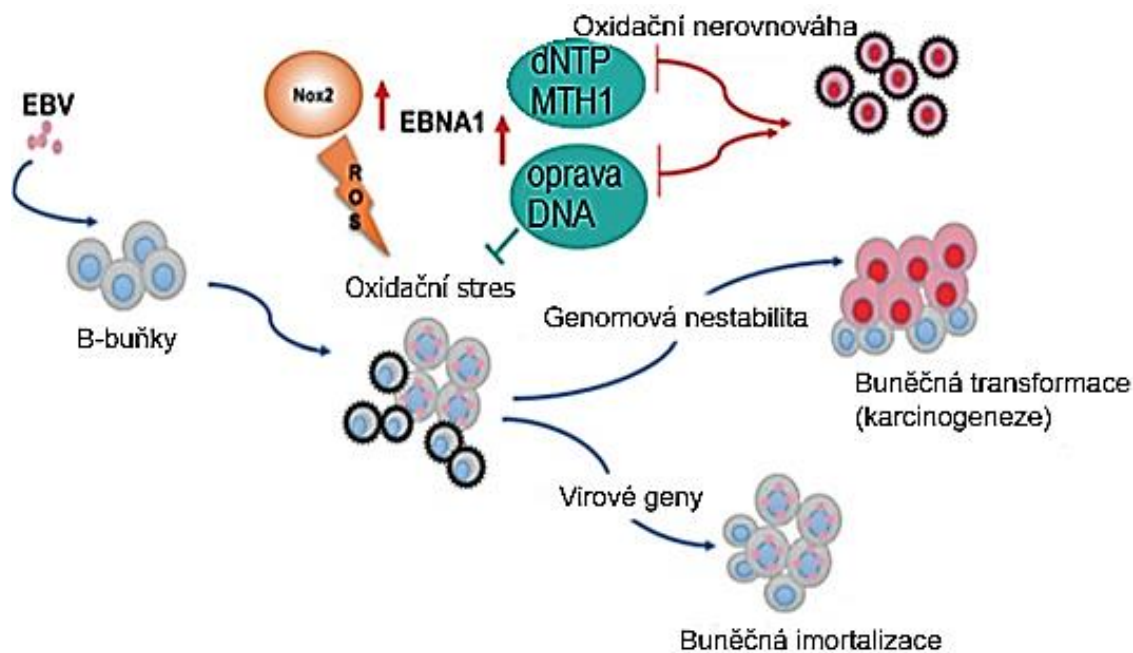
V polovině 60. let bylo zjištěno, že k imortalizaci buňky postačí transfekovat onkogeny určitých virů, například E6 a E7 onkogeny vysoce rizikového lidského papilomaviru HR-HPV (Sugimoto et al., 1999). Lidské papilomaviry jsou malé DNA nádorové viry, které vyvolávají epiteliální proliferaci a způsobují zhoubné i nezhooubné nádory. Transfekce lidských buněk pomocí těchto virů poskytuje vyšší frekvenci imortalizace než u SV40 (Shay et al., 1991). Transfekcí buňky vstupují do „stádia krize“, jejíž příčinou bývá také vážná genomová nestabilita vlivem zkracování telomer. Toto stádium nemá tak fatální následky jako senescence, jelikož ji určitá část buněk může překonat a získat tak schopnost nekonečné proliferace (Wei a Sedivy, 1999). HR-HPV E6 onkoprotein především pomocí stimulace transkripce genu lidské telomerázy reverzní transkriptázy hTERT aktivuje jeho onkogenní enzym. Stimulace tohoto

enzymu může být také zapříčiněna imortalizací lidských cervikálních buněk. Studie ukázaly, že aktivita tohoto enzymu se zvyšuje při rakovině děložního čípku (Morelva a Antonio, 2009).

Pomocí HPV 16 byly například imortalizovány buňky HK-2. Podstatou imortalizace je navázání EBV na regulační proteiny na DNA, což podporuje proliferaci buněk. Růst buněk HK-2 je závislý na růstových faktorech, buňky si zachovávají původní fenotyp, aktivitu enzymů i funkční vlastnosti epitelu proximálního tubulu (Ryan et al., 1994). HR-HPV však nejčastěji indukuje imortalizaci primárních lidských epiteliálních buněk, jako jsou například keratinocyty. Působením těchto papilomavirů dochází k poškození DNA buněk, což vede ke ztrátě kontroly buněčného cyklu, zkracování telomer a k celkové genomické nestabilitě. Bylo prokázáno, že po imortalizaci vyvolané HPV je počet chromozomálních aberací nepřímo úměrný kapacitě virové imortalizace. Z tohoto důvodu HPV se sníženou imortalizační kapacitou *in vitro*, která se projevuje v krizovém období, vyžaduje k usnadnění imortalizace více genetických aberací. Následnou imortalizaci provází aktivace enzymu prodlužujícího telomerázu hTERT (Schütze et al., 2016).

### **2.4.3 EBV**

Další možností k imortalizaci buněk je využití viru Epstein-Barrové (EBV). Tento virus imortalizuje lidské B-lymfocyty a hraje významnou roli při poškození lymfoidních a epiteliálních buněk. Jeho jaderný antigen EBNA-1 indukuje zajištění trvale vysokých hladin reaktivních forem kyslíku (ROS), které jsou stěžejní pro imortalizaci B-lymfocytů a zároveň způsobují oxidační poškození DNA. EBNA-1 hraje klíčovou roli při přetváření buněčného prostředí, jelikož pomocí upregulace NOX2 a zvýšení nitrobuněčného ROS dojde k posunu v redoxním stavu, tudíž změně oxidační rovnováhy, která je vyžadována pro buněčnou imortalizaci i transformaci (Wang et al., 2019), (Obr. 4).



Obr. 4: Mechanismus účinku EBV na B-lymfocyty (Upraveno dle Wang et al., 2019)

Bylo potvrzeno, že EBNA-1 není jediným antigenem ovlivňujícím immortalizaci buněk. Nepostradatelnou roli má také jaderný antigen EBNA-2 a latentní membránový protein LMP-1. Tyto virové proteiny působí kooperativně a vyvolávají různé biologické účinky (Dolcetti et al., 2014). Jsou zodpovědné za vznik dvou malých nekódovaných molekul RNA a virových proteinů. Dále zodpovídají i za maligní transformace pomocí různých signálních drah (Liu et al., 2006). LMP-1 je považován za hlavní onkoprotein, který dokáže aktivovat více buněčných signálních drah. Z hlediska immortalizace je nejpodstatnější jeho zodpovědnost za upregulaci antiapoptotických proteinů bcl-2, čímž dochází k potlačení buněčného stárnutí (Dolcetti et al., 2014). Expresí proteinu LMP-1 dochází k modulaci aktivity telomerázy, tedy enzymu zodpovědného za ochranu telomer před degračnými enzymy. Telomeráza chrání telomery díky své reverzně transkriptázové aktivitě, kdy po každé proliferaci buněk opětovně dosyntetizuje chromozomy dceřiných buněk do původního stavu (Šebek, 2018). Tento enzym je inaktivní v diferencovaných somatických buňkách, aktivovaný je naopak při vývoji nádorových onemocnění nebo v procesu buněčné immortalizace (Liu et al., 2006). S aktivitou telomerázy koreluje gen hTERT, který je aktivován díky LMP-1. Telomeráza funguje na několika biologických úrovních, z nichž je nejvýznamnější úroveň transkripční (Dolcetti et al., 2014). Promotor hTERT zahrnuje vazebná místa pro celou řadu transkripčních regulátorů včetně p53 a receptoru estrogenu. Složitými interakcemi mezi transkripčními regulátory a promotorem hTERT dojde k aktivaci transkripce a tím ke zmiňované aktivaci telomerázy (Liu

et al., 2006). Nadprodukce telomerázy zabraňuje zkracování chromozomů a znemožňuje replikativní stárnutí. Metoda zablokování zkracování telomer je oproti ostatním metodám k buňce velmi šetrná. U buněk dochází pouze k minimálním změnám v karyotypu a klesá jejich snaha tvořit neuspořádaná ložiska nakupených buněk (Šebek, 2018).

#### **2.4.4 Adenoviry**

Lidské adenoviry obvykle infikují terminálně diferencované epiteliální buňky. Toto prostředí nebývá pro adenoviry příliš vhodné, proto časné proteiny E1A přeprogramují intracelulární prostředí infikované buňky a tím usnadňují replikaci viru. Replikace zahrnuje indukci buněčného cyklu a vstup infikovaných buněk do S fáze, aby bylo možné kopírovat virovou DNA (Crisostomo et al., 2017). Během infekce jsou některé izoformy E1A exprimovány dvěma hlavními zbytky proteinů 289 a 243, které vznikají sestřihem. Při infekci z nich vznikají tři druhy mRNA, které kódují 55 aminokyselin typických pro lidský adenovirus 5 (Radko et al., 2015).

Lidský adenovirus 5 je silný regulátor transkripce, který postrádá schopnost se přímo navázat na DNA. K překonání tohoto omezení využívá E1A specifické transkripční faktory navázané na DNA. To má za následek změnu struktury chromatinu vedoucí ke změnám v genové transkripci (Radko et al., 2015). Zásadní roli pro imortalizaci pomocí adenoviru 5 má protein 12S kódovaný pomocí E1A. Tento protein indukuje syntézu buněčné DNA a proliferaci a imortalizaci epiteliálních buněk. C-terminální oblast proteinu 12S indukuje produkci růstového faktoru, který právě stimuluje proliferaci epiteliálních buněk a je zásadní pro zvětšení buněk. Tento mechanismus imortalizace je typický kromě krysích buněk i pro buněčnou linii HEK-293 nebo pro epitelové buňky dýchacích cest. Adenovirové vektory se jeví jako vhodné pro použití v genové terapii u pacientů s cystickou fibrózou (Quinlan et al., 1988).

### **2.5 Využití imortalizovaných buněčných linií**

Imortalizované buněčné linie nacházejí největší využití při medicínských a farmaceutických výzkumech, které se zabývají zejména testováním působení léčiv a dalších terapeutických látek. V tomto ohledu nahrazují primární buněčné kultury. Jejich kultivace je snadnější, jelikož nevyžadují extrakci ze živého zvířete. Zároveň rostou robustněji, rychleji a nepřetržitě (Carter a Shieh, 2015). Největší průlom v medicíně ovšem zaznamenalo možné využití imortalizovaných buněčných linií ve studiích léčby diabetu, Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby. Imortalizované  $\beta$ -buněčné linie, které slouží jako model ve výzkumech léčby diabetu, se tvoří ve dvou krocích. Nejdříve je provedena exprese hTERT

telomerázové podjednotky, následuje fáze diferenciaci, kdy dochází k vyjádření transkripčního faktoru PDX-1 a díky němu diferenciaci p-buněk. Diferenciaci p-buněk vyvolává i tzv. glukagonu podobný peptid-1 (GLP-1), který je nejdůležitějším faktorem při imortalizaci buněčných linií lidského pankreatu (Itkin-Ansari a Levine, 2004).

Hlavní nevýhodu představuje fakt, že tyto buňky nelze považovat za fyziologické buňky daného studovaného orgánu. Imortalizované buňky mají schopnost nekonečné proliferace a exprimují specifické geny, které se nenacházejí v žádných buňkách *in vivo*. Z těchto důvodů je důležité pravidelně ověřovat jejich vlastnosti a nepoužívat buněčné kultury, které již byly vícekrát pasážovány (Carter a Shieh, 2015).

### 3 UMĚLE IMORTALIZOVANÉ BUNĚČNÉ LINIE

Umělá immortalizace je proces, který zahrnuje ovlivnění buněk biologickými, chemickými či fyzikálními způsoby tak, aby došlo k jejich znesmrtelnění. Fyzikální procesy jsou nejméně využívány, naopak biologické procesy se dnes využívají téměř pro všechny buňky. Metody immortalizace byly navrženy z důvodu nízkého proliferačního potenciálu primárních buněk. Tyto procesy bývají obvykle založeny na transfekci a transdukcii buněk pomocí dobře známých immortalizujících genů. Z biologických způsobů jsou nejčastěji využívány virové onkogeny, jako je velký T antigen SV40 nebo geny E6 a E7 lidského papilomaviru HPV16. Tyto onkogeny způsobují narušení fungování genů p53 nebo pRB. Z chemických vlivů se nejčastěji využívá BaP (Ramboer et al., 2014).

#### 3.1 Buněčné linie pro testování nefrotoxicity

Ledviny hrají speciální roli při filtraci látek z krve a při zachování stálého vnitřního prostředí. Jsou mimořádně citlivé na poškození způsobené nadužíváním léků, a to z důvodu vysoké metabolické aktivity epitelu renálních tubulů. Tubulární poškození může například vyvolat antibiotikum vankomycin (Soo et al., 2018). Pro tubulární reabsorpci je důležitá výroba energie, která je závislá na aerobním metabolismu a oxidační fosforylaci, jejímž vedlejším účinkem je produkce vysokých hladin ROS. Nadbytek ROS je ohrožující pro buněčné složky včetně aminokyselin, jako je methionin, který snadno podléhá oxidaci (Achilli et al., 2018).

Pro testování nefrotoxicity se používají buňky proximálních tubulů ledvin, jelikož jsou cílem nefrotoxického poškození *in vivo* (Jenkinson et al., 2012). Proximální tubuly resorbují glukózu, albumin a celou řadu elektrolytů prostřednictvím transportérů a receptorů, které slouží také k resorpci léků (Soo et al., 2018). Tyto proximální kanálky mají zároveň klíčovou roli při sekreci celé řady metabolitů a xenobiotik z organismu. Sekrece proximálních tubulů je považována za dvoustupňový proces, kdy prvním krokem je absorpce metabolitů nebo xenobiotik přes bazální membránu do buňky a následuje výstup látek přes apikální membránu. To vše je zajištěno transportními proteiny umístěnými na apikální membráně. Doposud prozkoumané mechanismy transportu látek byly charakterizovány na liniích odvozených ze zvířecích tkání. Dále bylo také odvozeno mnoho lidských buněčných linií, ale jen minimum z nich bylo podrobněji charakterizováno. Jednou z lidských buněčných linií jsou například HK-2 buňky (Jenkinson et al., 2012).

### 3.1.1 HK-2

Jedná se o immortalizovanou proximální tubulární epitelovou buněčnou linii odvozenou od ledvinových buněk zdravého dospělého člověka, která je široce využívána jako model nefrotoxicity vyvolané léky. K immortalizaci těchto buněk došlo jejich vystavením rekombinantnímu papilloma viru HPV 16 obsahujícímu E6 a E7 geny (Roušar et al., 2016). Na molekulární úrovni se produkty genů E6 a E7 navazují na regulační proteiny DNA, kdy výsledkem je usnadněná proliferace buněk. Tyto změny nevedou k maligním transformacím hostitelské buňky, jelikož jsou zachovány rysy diferenciací a růst buněk je pod kontrolou regulačních procesů (Ryan et al., 1994). Charakteristikou zmíněných buněk je schopnost exprimovat normální fenotypové vlastnosti proximálních tubulárních buněk lidských ledvin a zároveň si ponechávat základní funkční vlastnosti jako je například pozitivita enzymu alkalická fosfatáza,  $\gamma$ -glutamyltransferáza a také vlastnosti membránových transportérů (Roušar et al., 2016). Dále si HK-2 buňky udržují vlastnosti proximálního tubulárního epitelu, například citlivost adenylátcyklázy na parathormon, ale nikoliv na antidiuretický hormon ADH (Ryan et al., 1994).

Během posledních dvou desetiletí bylo výzkumy prokázáno, že HK-2 buňky reagují na zvýšené množství oxalátu vápenatého. Oxalát vápenatý je konečný metabolický produkt, který je filtrován glomerulem, transportován proximálním tubulem a následně vylučován ledvinami. Interakce oxalátu s ledvinovými buňkami vedou k výraznému potlačení genové exprese (Obr. 4), která je důležitá pro buněčné reakce na zvýšené množství oxalátu. Zároveň inhibitory transkripce a translace inhibují oxalátem vyvolané změny v ledvinových buňkách (Koul et al., 2012).

#### 3.1.1.1 Testování toxicity léčiv

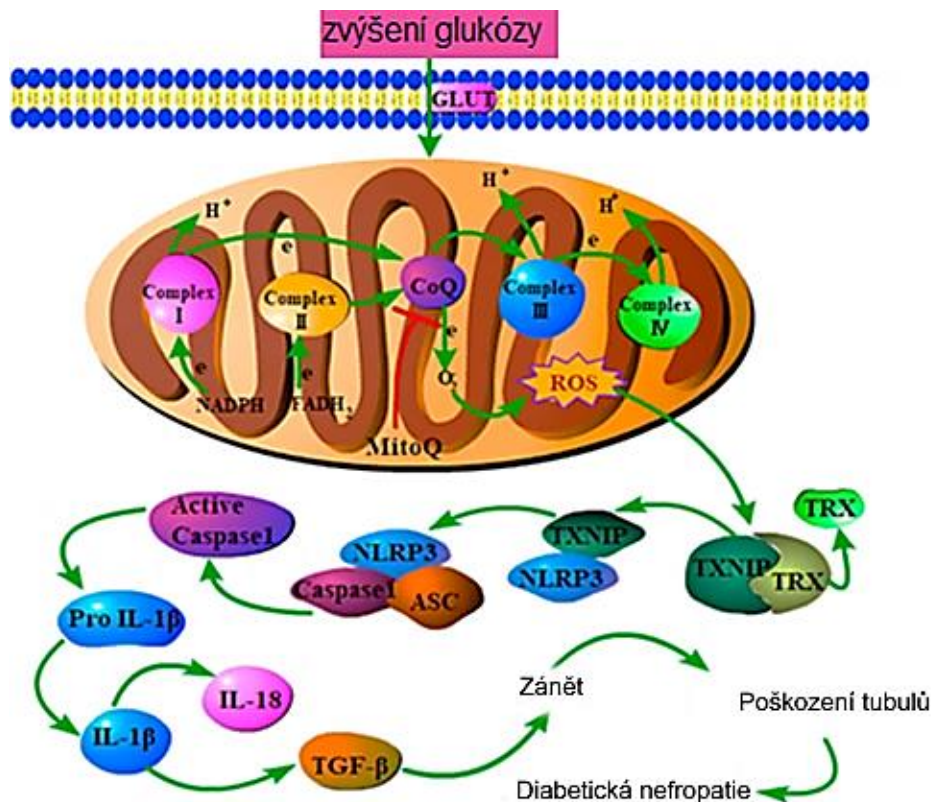
Vliv na fungování ledvin má také acetaminofen neboli paracetamol (APAP). Většina studií se zaměřuje na nefrotoxicitu APAP v *in vivo* podmínkách testováním na zvířatech. Acetaminofen je léčivo, nejčastěji využívané jako analgetikum a antipyretikum, které při překročení terapeutické dávky může mít škodlivý účinek zejména na játra, ale jsou známy i případy, kdy dochází k poškození ledvin, konkrétně proximálních tubulárních buněk (Roušar et al., 2016). Poškození hepatocytů působením APAP souvisí zejména s vyčerpáním glutathionu. U renálních tubulárních buněk byl tento mechanismus prokázán také, ale při porovnání s hepatocyty v menší míře (Bai a Cederbaum, 2004). Hepatotoxicita může v některých případech vyústit až k akutnímu selhání ledvin. Renální nedostatečnost se vyskytuje u 1-2 % pacientů. Nefrotoxicita APAP bez poruch jater je dána více faktory,

mnoho z nich s dosud neznámými mechanismy. Jelikož je APAP lipofilní sloučenina, jeho schopnost difundovat přes membránu podporuje platnost použití buněčné linie HK-2 při studiu nefrotoxicity. Buňky HK-2 ho metabolizují oxidační cestou na arylační meziprodukt přes mikrozomální cytochrom P450. Zároveň dochází k významné produkci ROS, oxidačnímu stresu a vyčerpání glutathionu (Roušar et al., 2016).

Ačkoliv je buněčná expozice nefrotoxinům závislá na hladinách exprese a substrátové specifitě transportérů, překvapivě nebyla exprese transportéru v HK-2 dosud plně charakterizována. Prozatím byla prozkoumána pouze exprese monokarboxylátových transportérů MCT1 a MDR1. Funkční vyjádření transportérů probíhá na základě absorpce za použití radioaktivně značeného prototypového substrátu digoxinu a DL-laktátu. Mnohé studie také charakterizovaly expresi transportéru na mRNA, a tím určily, že buněčná linie HK-2 představuje ideální *in vitro* model pro transport léků a studium nefrotoxicity (Jenkinson et al., 2012). K testování nefrotoxicity *in vitro* začaly být také používány toxické chemikálie jako je cisplatina, polymyxin, cyklosporin A, nebo těžký kov kadmium (Roušar et al., 2016).

### **3.1.1.2 HK-2 při léčbě diabetické nefropatie**

Diabetická nefropatie je nejzávažnější komplikací diabetu a zároveň hlavní příčina konečného onemocnění ledvin, které výrazně zvyšuje riziko úmrtí na diabetes. Mechanismus onemocnění spočívá ve vysoké produkci ROS, které indukují aktivaci apoptózy a způsobují poškození proximálních tubulárních buněk HK-2 za podmínek hyperglykemie. Nadprodukce ROS je spjata se snížením exprese thioredoxinu (TRX), upregulací thioredoxin-interagujícího proteinu (TXNIP) a zánětlivého genu NLRP3. Ošetřením buněk HK-2 pomocí mitochondriálně zaměřenému antioxidantu MitoQ byla prokázána blokáda interakce mezi TXNIP a NLRP3, což vedlo k inhibici aktivace zánětlivého NLRP3 a k syntéze interleukinu IL-1 $\beta$  (Obr. 5). Zároveň došlo k protekci buněk před tubulárním oxidačním poškozením a nadprodukcí ROS. MitoQ chrání mimo jiné i před kardiovaskulárními chorobami či Alzheimerovou chorobou (Han et al., 2018).



Obr. 5: Mechanismus vzniku diabetické nefropatie (Upraveno dle Han et al., 2018)

### 3.1.2 HEK-293

HEK-293 je immortalizovaná buněčná linie odvozená z lidských ledvinných embryonálních buněk, která byla transformována lidským adenovirem typu 5. Kromě známek transformace buňky projevují i známky přítomnosti virově specifického nádorového antigenu. Jedná se o člověkem nejvyužívanější immortalizovanou buněčnou linií v biomedicínských experimentech (Henry et al., 2011). Tato buněčná linie totiž slouží jako model lidských renálních buněk, avšak nepříliš ideální. Její nevýhodu představuje skutečnost, že vykazuje fenotypové a genotypové vlastnosti, které jsou velmi odlišné od lidských renálních buněk, což může nepříznivě ovlivňovat kvalitu experimentálních výsledků (Achilli et al., 2018). Z linie HEK-293 je možno odvodit buněčnou linii 293T, která exprimuje velký T antigen SV40. Tento antigen umožňuje produkci virových vektorů a rekombinantních proteinů, které jsou získávány pro genovou terapii a výrobu vakcín (Henry et al., 2011). Rekombinantní proteiny vznikají transfekcí plazmidu DNA a jejich exprese je závislá především na teplotě média, na vektoru a druhu hostitele. Pokusy ukázaly, že snížení teploty média na 33 °C vede ke zvýšení exprese rekombinantních proteinů, na druhou stranu se snižuje rychlost růstu buněk (Lin et al., 2015). Buňky HEK-293 snadno rostou v suspenzi, čemuž je běžně přizpůsobena i jejich kultivace,

kteřá probíhá bez séra. Tato buněčná linie nachází také využití při výzkumech buněčného metabolismu v kultuře (Henry et al., 2011).

Buněčná linie HEK-293 je vhodná ke genetické manipulaci a tvoří ideální prostředek k nadměrné expresi požadovaných proteinů. Přestože jsou tyto buňky neschopné tvořit odolné monovrstvy, které jsou nepostradatelné ke studiu transepiteliálních iontových transportů, dokáží poskytovat důležité informace při studiu epitelových iontových transportérů, jako je například chloridový transportní kanál na buněčné membráně. Buňky jsou transfekovány regulátory transmembránové vodivosti cystické fibrózy (CFTR), čímž vznikají stabilně transfekované buňky HEK-CFTR. Tyto buňky exprimují endogenní membránový receptor žlučové kyseliny a jejich reakcí na forskolin dochází ke zvýšení transportu chloridu. Z tohoto důvodu se buňky HEK-CFTR používají jako model pro studium signálních drah regulujících sekreci chloridů. Tuto vlastnost netransfekované buňky HEK-293 postrádají (Domingue et al., 2014). Buňky HEK-293 mají také mnoho vlastností nezralých neuronů a vystupují tudíž jako transformované neurální buňky v ledvinových kulturách. Dále exprimují mnoho neuromarkerů typických pro neurofilamenta a neurospecifické metabolické enzymy (Achilli et al., 2018).

### **3.2 Buněčné linie pro testování neurotoxicity**

Kvůli složitosti nervového systému bylo dlouhou dobu obtížné navrhnout testovací buněčnou linii *in vitro*, která by nahradila testovací techniky *in vivo* (Harry et al., 1998). V posledním desetiletí bylo odvozeno několik lidských i zvířecích kultur pro testování neurotoxicity *in vitro*. Vhodné jsou například imortalizované neuroblastomové buněčné linie nebo kmenové buňky. Lidské neuronové kultury *in vitro* mohou pocházet i z nervových progenitorových buněk, které mají schopnost samoobnovy a bývají rozlišeny na buňky neurální a gliové. Díky jejich široké škále použití roste zájem o jejich použitelnost ve farmakologických a toxikologických studiích *in vitro*. Lze konstatovat, že lidské neurální *in vitro* modely odvozené z kmenových buněk mohou rekapitulovat sekvence neurologických procesů od proliferace až po stádium zrání neurálních a gliových buněk. Pokud jsou tyto procesy narušeny chemickou látkou, jsou buňky využívány ke studiím pro vyhodnocení neurotoxicity *in vitro* (Price et al., 2018).

Expozice chemickými látkami může být především pro vyvíjející se mozek velmi toxická, jelikož dochází k propustnosti toxinů přes hematoencefalickou bariéru, která stále není plně vyvinuta a uzavřena (Popova et al., 2017).

Neurotoxické chemikálie, včetně pesticidů, bývají rozdělovány podle jejich biologické aktivity a mechanismu účinku. Například syntetické pyrethroidy se vážou na sodíkem řízené napěťové kanály a pronikají do buněk. Rotenoidy zas inhibují přenos elektronů ze železo-sírných komplexů. Odlišný mechanismus účinku mají také pesticidy neonikotinoidy, které se vážou na acetylcholinové nikotinové receptory a napodobují účinek acetylcholinu otevřením iontových kanálků, což umožňuje vstup  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  do buněk. Dále se chemikálie mohou dělit podle struktury nebo biologické aktivity, tj. schopnosti vyvolávat neurotoxické poškození (Price et al., 2018).

Dalšími látkami způsobujícími neurotoxicitu bývají těžké kovy. Těžké kovy se vyskytují téměř všude kolem nás. Běžný výskyt těžkých kovů, kromě přírodního prostředí, je také v kontaminované vodě či potravinách. Lidé jsou také vystaveni vdechování těžkých kovů na pracovištích. To vše může vést k potenciálním zdravotním rizikům. Ačkoliv mnohé studie ukázaly, že těžké kovy mají neurotoxické účinky, jejich biologické a molekulární mechanismy nebyly stále plně objasněny. Běžným a nejdůležitějším mechanismem cytotoxicity vyvolané těžkými kovy je oxidační stres. Oxidační stres je spojován s nadprodukcí ROS. Hlavními neurotoxickými těžkými kovy jsou rtuť a kadmium. Rtuť se může vyskytovat v elementární formě, ale také ve formě anorganických a organických sloučenin. Každá forma rtuti má jiný mechanismus účinku na buňky. Například methylртуť způsobuje uvolňování laktát dehydrogenázy (LD), aktivaci kaspázy, změnu buněčného cyklu, a právě nadprodukcí ROS (Sudo et al., 2019). Methylртуť je silně neurotoxická látka, která vzniká bakteriální methylací organických látek rtuti ve vodním prostředí. Vyskytuje se především v rybách a mořských plodech, tudíž zvýšená konzumace mořských plodů může vyvolat komplikace. Hromaděním v lidském těle pak může vyvolat poškození centrálního nervového systému (Popova et al., 2017). Dalšími sloučeninami rtuti a kadmia jsou vysoko toxické chloridy těchto kovů, které nemají všechny vlastnosti stejné. Například  $\text{HgCl}_2$  nezpůsobuje aktivaci kaspázy a  $\text{CdCl}_2$  neindukuje uvolnění LD ani aktivaci kaspázy. Pochopení mechanismu účinku jednotlivých těžkých kovů může pomoci vyvinout účinnější léčbu otrav těžkými kovy (Sudo et al., 2019).

Z toxinů je nejčastějším původcem neurotoxických reakcí botulotoxin. Botulotoxin patří do skupiny proteinových neurotoxinů produkovaných anaerobními bakteriemi rodu *Clostridium*. Nejznámějším zástupcem tohoto rodu je *Clostridium botulinum*. Botulotoxin působí tak, že inhibuje sekreci neurotransmiteru acetylcholinu do nervosvalové ploténky, čímž dochází k inhibici přenosu vzruchu. To se projevuje nejdříve ochabnutím očních svalů, dále svalů obličejových a v pokročilé fázi i svalů respiračních, což vede k respiračnímu selhání. Botulotoxin našel využití v medicíně, kdy se používá jako terapeutikum pro léčbu různých

lidských syndromů charakterizovaných hyperfunkcí nervových zakončení (Pirazzini et al., 2017).

### 3.2.1 hBMECs

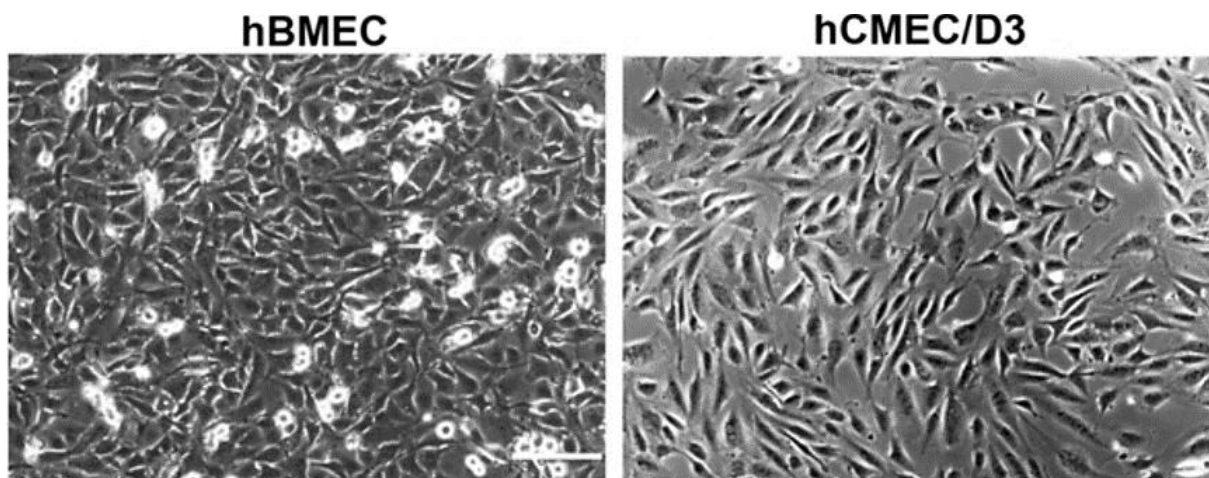
Tyto lidské mozkové mikrovaskulární endoteliální buňky byly získány z indukovaných pluripotentních kmenových buněk diferenciací endoteliálních a nervových progenitorů. Po diferenciaci se tyto nepravidelné endoteliální buňky (Obr. 6) váží na kolagen-fibronektinovou matici, zatímco neurální progenitorové buňky jsou z média odstraněny. Imortalizace probíhá pomocí SV40-T antigenu, který je nejpoužívanějším imortalizačním činidlem. Principem fungování je navázání velkého antigenu T na gen p53, po kterém následuje „stádium krize“. Buňky hBMECs jsou hlavní součástí buněčné části hematoencefalitické bariéry, která chrání parenchymální část mozku před xenobiotiky a neurotoxickými metabolity, které cirkulují v krevním řečišti. Kromě toho mozkové mikrovaskulární endoteliální buňky exprimují proteiny s těsným spojením, transportéry živin a podílí se na udržování homeostázy mozku. BMECs jsou citlivé také na další neurovaskulární buňky, jako jsou astrocyty a pericyty. Výhodou je jejich schopnost odrážet vlastnosti hematoencefalitické bariéry, množit se neomezeně dlouho a zachovávat si své původní vlastnosti i po opakovaném pasážování (Stebbins et al., 2016). Jsou známy dva typy buněk hBMECs a to buňky fetální fBMECs a buňky odvozené z tkáně dospělého člověka aBMECs. Tyto buněčné modely *in vitro* mohou poskytnout pohled do fyziologie hematoencefalitické bariéry, mechanismu průstupu léčiv do mozku a do patologie lidských chorob. Z důvodu nízké dostupnosti aBMECs se k výzkumům začaly používat fBMECs. Dříve mnoho pokusů o kultivaci fetálních mozkových mikrovaskulárních endoteliálních buněk nebylo úspěšných, jelikož nezralá hematoencefalitická bariéra má zcela jiné vlastnosti než ta zralá. Dnes je známo, že při použití optimálního gestačního věku pro izolaci buněk vykazují fBMECs vlastnosti zralých buněk a jsou tedy použitelné jako model *in vitro* (Andrews et al., 2018). Studie využívající hBMECs jsou obvykle nákladnější a náročnější z důvodu složitého izolování z čerstvé tkáně. Tyto nevýhody řeší lidská cerebrální mikrovaskulární endoteliální buněčná linie hCMEC/D3 (Daniels et al., 2015).

### 3.2.2 hCMEC/D3

Buněčná linie lidských cerebrálních mikrovaskulárních endoteliálních buněk hCMEC/D3 byla získána z izolované tkáně z lidského temporálního laloku. Po první pasáži byly tyto buňky imortalizovány pomocí reverzní transkriptázy lidské telomerázy a velkým T antigenem SV40 (Daniels et al., 2015). Buňky mají schopnost tvořit kontaktem inhibovanou monovrstvu prodloužených buněk kolagenového typu I nebo IV (Obr. 6). Tyto monovrstvy

mají omezenou propustnost pro hydrofilní i hydrofobní léky s nízkou molekulovou hmotností. Naopak stresové podmínky a některé extracelulární podněty, jako například prozánětlivé cytokiny, způsobují zvýšenou propustnost monovrstvy hCMEC/D3. Buňky této linie také exprimují funkční transportéry efluxu, které váží ATP (Weksler et al., 2013). Vývoj immortalizované lidské cerebrální mikrovaskulární endoteliální buněčné linie představuje významný pokrok pro *in vitro* modely napodobující fungování hematoencefalitické bariéry (Daniels et al., 2015). Je známo, že mozkový endotel exprimuje celou řadu membránových receptorů a transportérů, které specificky řídí transport živin, včetně inzulínu z krve do mozku. Exprese těchto transportérů bývá testována na buňkách hCMEC/D3 pomocí imunochemické analýzy. Ukazuje se, že tyto buňky exprimují na vysoké úrovni glukózový transportér GLUT-1, který zajišťuje přenos glukózy přes plazmatickou membránu buněk. Jediným kvalitním zdrojem GLUT-1 je membrána erytrocytů (Weksler et al., 2013).

Tato linie si udržuje základní vlastnosti hBMECs jako například udržování těsných spojení či možnost vícenásobného pasážování, což prokazuje, že může být použita jako levnější a spolehlivější model pro studie imunitních migrací *in vitro* (Daniels et al., 2015). Na hCMEC/D3 je testována interakce mezi mozkovým endotelem a imunitním systémem. Tyto buňky reagují na zánětlivé podněty zvýšením paracelulární propustnosti a jsou schopny zvýšit adhezi a migraci leukocytů a monocytů. Monocyty adherují k povrchu aktivovaných hCMEC/D3 a migrují přes monovrstvu. Interakcí mezi lidskými monocyty a buněčnou linií dochází ke vzniku ROS, uvolnění tkáňového aktivátoru plazminogenu a tím ke zvýšení propustnosti monovrstvy. Tento mechanismus fungování hCMEC/D3 může být uplatněn při výzkumu patologie roztroušené sklerózy (Weksler et al., 2013).



Obr. 6: hBMEC a hCMEC/D3 buňky ve fázovém kontrastu (Eigenmann et al., 2013)

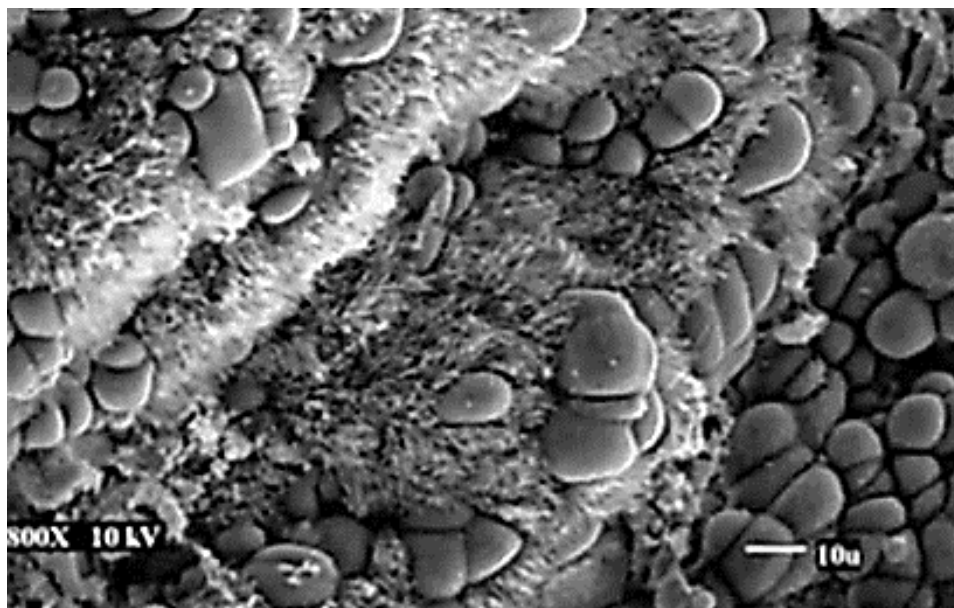
### 3.3 Buněčné linie pro testování plicní toxicity

Plicní epitel je jedním z nejnáchylnějších míst na inhalaci anorganických a organických látek z okolí. Právě tyto částice mohou vyvolat lokální zánět a reakce, které mohou vést i ke kardiovaskulárním potížím (Kemp et al., 2008). Většina studií *in vitro*, které se týkaly lidského respiračního epitelu byly zpomaleny nedostatkem dlouhodobých replikačních kultur bronchiálních epiteliálních buněk. Pokusy o vytvoření těchto linií za použití virových onkoproteinů byly velmi vzácné. V poslední době se využívá k získání a imortalizaci těchto linií kombinace hTERT a SV40-T. Jsou ale i výjimky, které mohou být imortalizovány bez použití hTERT i virových onkoproteinů (Ramirez et al., 2004).

#### 3.3.1 HBEC3-KT

Lidské bronchiální epiteliální buňky HBEC vykazují vlastnosti multipotentních kmenových buněk plic. Tyto HBEC exprimují markery, které představují několik epiteliálních typů plicních buněk dospělého člověka. Buňky jsou kultivovány ve třech trojrozměrných systémech, kdy jemné změny v prostředí vedou ke schopnosti HBEC rozlišovat se na několik typů centrálních a periferních buněk (Delgado et al., 2011).

K imortalizaci lidských bronchiálních epiteliálních buněk dochází expresí genů hTERT a cyklin dependentní kinázy CDK4. Nadměrnou expresí CDK4 je zabráněno předčasné zástavě růstu obcházením kontrolních bodů buněčného cyklu, zatímco exprese hTERT zastavuje telomerázové stárnutí, což vede ke vzniku znesmrtelněné buněčné linie. HBEC3-KT je jedna z mála linií, která může být imortalizována bez exprese virových onkoproteinů (Ramirez et al., 2004). Buňky této linie si zachovávají normální stabilní fenotyp, což umožňuje analýzu populace normálních epiteliálních buněk. Charakter buněk HBEC3-KT také naznačuje, že se tyto buňky podobají bazálním buňkám *in vitro*. Mají také schopnost se diferenciovat na jiné typy plicních epiteliálních buněk (Delgado et al., 2011). Takto imortalizované buňky mají epiteliální morfologii (Obr. 7), duplicitní části chromozomů 5 a 20 a především neporušenou cestu pro kontrolní bod p53, avšak imortalizace buněk HBEC pomocí HPV E6 a E7 ruší regulaci p53 nezávislou na úrovni exprese telomerázy. Tyto linie poskytly modely, které mohou být geneticky zmanipulovány tak, aby se posunuly směrem k malignitě, což může sloužit jako nový zdroj pro studium molekulární patogeneze rakoviny plic. Studie zahrnují identifikaci molekulárních markerů, které předcházejí nádorovým onemocněním a umožňují jejich včasnou detekci. Všechny typy HBEC jsou také užitečné pro testování nových terapeutických činidel či diagnostiku plicních nemocí (Ramirez et al., 2004).



Obr. 7: HBEC3-KT v elektronovém mikroskopu (Ramirez et al., 2004)

### 3.3.2 Alveolární buňky typu 2

Primární lidské alveolární buňky typu 2 (AT2) byly immortalizovány transdukci katalytickou podjednotkou telomerázového a velkého nádorového T antigenu SV40. Na rozdíl od primárních buněk jsou immortalizované buňky negativní na alkalickou fosfatázu, což značí, že immortalizace vede ke změně fenotypu AT2 na fenotyp buněk AT1. Immortalizace také vede ke zploštění a prodloužení buněčného těla. Naopak primární buňky AT2 jsou sekreční kubické buňky, které syntetizují a uvolňují plicní povrchově aktivní látky k udržení sníženého povrchového napětí. Zachovávají také produkci antioxidantů, chemokinů, cytokinů a dalších molekul, které chrání plíce a zachovávají plicní homeostázu. Tvoří přibližně 5 % alveolárního povrchu, dále se zde vyskytují skvamózní buňky alveolárního typu 1 (AT1) (Kemp et al., 2008). AT2 buňky pocházejí z bipotentního progenitoru a mají schopnost obnovy. Proces sebeobnovy probíhá tak, že se staré buňky AT2 diferenciují na buňky AT1 i na dceřiné buňky AT2, čímž je zachována proliferace buněk. Avšak tuto schopnost má pouze asi 1 % zralých buněk. Buňky tedy mají vlastnosti kmenových buněk a přispívají k alveolární obnově (Desai et al., 2014). Jejich přerušovaná aktivace tudíž vede k vytvoření buněk AT1. Jedná se o tenké epiteliální buňky mající roli ve výměně plynů, které vytváří klonální alveolární ložiska. Ložiska mají rovněž slabou funkci sebeobnovy (Khan et al., 2018). Strukturálním znakem AT2 buněk je vznik multilamelárních tělísek, které obsahují hlavní lipidovou složku plicní povrchově aktivní látky (Cooper et al., 2016). Tyto buňky jsou citlivé na vnější vlivy, jako je cigaretový kouř, viry a částice z prostředí. Selhání nebo poranění buněk AT2 může mít zejména u dospělých fatální následky. Mohou se rozvinout závažné plicní choroby včetně syndromu respirační tísně,

idiopatická plicní fibróza a především rakovina plic, jelikož místem tvorby rakoviny plic jsou alveoly (Desai et al., 2014). Právě kvůli výzkumům patogeneze idiopatické plicní fibrózy se začaly používat primární lidské AT2 buňky místo buněčných linií A549 pro experimenty *in vitro*. Epiteliální buňky lidského plicního adenokarcinomu A549 jsou často využívány pro studium funkce AT2. Přestože vykazují mnoho vlastností jako buňky AT2, neprodukují povrchově aktivní látky a mají odlišný fenotyp (Khan et al., 2018). Buňky AT2 mají významný vliv v přirozených imunitních reakcích plic, jelikož proteiny povrchově aktivních látek mají antimikrobiální účinky a snižují riziko vzniku zánětu způsobené inhalací dráždivých látek. Také napomáhají čistit alveolární tekutinu aktivním transportem sodíku a zachovávat plicní architekturu (Cooper et al., 2016).

### 3.4 Buněčné linie pro testování hepatotoxicity

Játra hrají klíčovou roli v metabolismu glukózy a lipidů, čímž udržují stálé vnitřní prostředí. Regulují hladinu glukózy v krvi glukoneogenezí a glykogenolýzou tak, že dochází k uvolnění glukózy do krevního oběhu (Sefried et al., 2018). Jedinečnou schopností jater je jejich schopnost regenerace v reakci na mnohá poškození. Regenerace jater je především dána vysokou proliferační aktivitou hepatocytů, jejichž buněčný cyklus je regulován složitými mechanismy. Avšak izolované hepatocyty *in vitro* si proliferační schopnost již neuchovávají. Z tohoto důvodu je buněčný růst podpořen jejich imortalizací. Tyto již imortalizované buněčné linie jsou snadno dostupné, mají neomezený růstový potenciál a vysokou reprodukovatelnost. Imortalizované hepatocyty jsou obvykle odvozeny od zdravých primárních hepatocytů pomocí různých imortalizačních strategií (Ramboer et al., 2014). Pro úspěšnou imortalizaci je vyžadována nadměrná exprese genů stimulujících buněčný cyklus. V důsledku nízké proliferační kapacity zralých hepatocytů je pro imortalizaci nezbytná silná stimulace progresu buněčného cyklu. Ve většině *in vitro* imortalizací primárních hepatocytů dochází k využití virových onkogenů SV40 či HPV16 a proteinu lidské telomerázy reverzní transkriptázy hTERT (Deurholt et al., 2009).

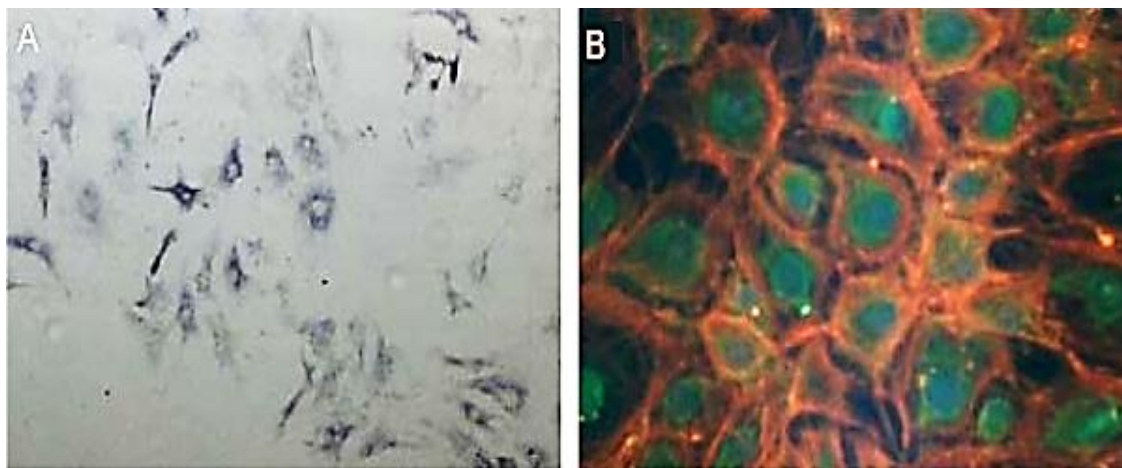
Primární lidské hepatocyty nejvíce napodobují situaci panující *in vivo*, avšak jejich omezená dostupnost a vysoká cena jejich použití limituje. Kromě toho mají nestabilní fenotyp a lze je kultivovat jen po velmi omezený časový úsek. Přesto představují významný nástroj pro výzkumy v oblasti farmaceutické toxikologie *in vitro* (Sefried et al., 2018).

### 3.4.1 THLE-2

Buňky THLE-2 byly získány z lidských hepatocytů dospělého člověka a immortalizovány zavedením velkého T antigenu SV40. Působení SV40 T na primární izolované hepatocyty vedlo ke zvýšené proliferaci buněk, které nevstupují do krize (Pfeifer et al., 1993). Tyto buňky, mající epitelovou morfoloii, slouží k výzkumům účinnosti cytotoxických látek. Další vlastností je jejich citlivost na inzulin. Kultivace těchto buněk v inzulin deficitním médiu vyvolává změnu fenotypu. (Sefried et al., 2018). Na rozdíl od buněčné linie HepG2 se jedná o netumorogenní buňky využívané jako markery diferenciacie hepatocytů. Buňky THLE-2, které ještě neprošly pasážováním dokonce produkují albumin a metabolizují BaP, což je jedna z chemických látek vhodných k immortalizaci buněk. Konečným produktem odbourávání BaP jsou karcinogenní metabolity, které addukují DNA, což indikuje funkční dráhy cytochromu P450. THLE-2 také zadržují další enzymy, které se podílejí na metabolismu chemických karcinogenů, jako je glutathion peroxidáza nebo P450 reduktáza (Pfeifer et al., 1993).

### 3.4.2 cBAL111

Buněčná linie cBAL111 je klonální buněčná linie, která byla odvozena z lidských fetálních jaterních buněk. Tyto klony byly zvěčněny nadměrnou expresí telomerázové reverzní transkriptázy, přičemž immortalizované linie nenesou známky maligní transformace. Klonální původ buněčné linie je nejdůležitější pro zachování stabilního fenotypu během dlouhodobé kultivace. Po immortalizaci vykazuje buněčná linie cBAL111 jaterní funkčnost podobnou rodičovským buňkám před immortalizací. Buňky exprimují markery nezralých hepatocytů, jako je glutathion S-transferáza. Tyto buňky také produkují močovinu, albumin a cytokeratin, naopak vstřebávají galaktózu. Obecně lze usuzovat, že buňky cBAL111 nejsou *in vitro* plně diferenciovány na zralé hepatocyty, tudíž by měly být považovány spíše za progenitorové jaterní buňky, které jsou plně diferenciovány na hepatocyty. Těmito vlastnosti se liší od linie HepG2. Z hlediska využití kombinují jak stabilní jaterní funkce, tak proliferační aktivitu, což je žádoucí pro *in vitro* studie, které závisí na jaterních funkcích. Takovými studiemi jsou například farmakologické nebo toxikologické testy. Zajímavostí je, že na začátku kultivace mají tyto buňky vřetenovitý tvar (A), zatímco po 15 dnech kultivace se jejich tvar změní na kubický (B) (Deurholt et al., 2009), (Obr.8).



Obr. 8: **Změna tvaru buněk cBAL111 během kultivace** (Deurholt et al., 2009)

(Obr. 8A – vřetenovitý tvar buněk; Obr. 8B – kubický tvar buněk)

## 4 SPONTÁNNĚ IMORTALIZOVANÉ BUNĚČNÉ LINIE

Spontánní imortalizace *in vitro* je proces, který vyžaduje například změnu chromozomů nebo genovou nestabilitu. Zároveň se jedná o nezbytný proces pro vývoj a progresi maligních lidských karcinomů. Principem spontánní imortalizace je z velké části aktivace telomerázy. Buňky se poté množí neomezeně dlouho a počet dělení přesahuje Hayflickův limit. Avšak aktivace telomerázy k znesmrtelnění buněk nestačí. Buňka musí také nabýt vlastnosti onkogenu nebo inaktivovat tumor supresorové geny (Duesberg a McCormack, 2013). Rakovinové buněčné linie jsou první možností preklinického screeningu léčiv, který umožňuje rychlou eliminaci neúčinných sloučenin z dalšího klinického testování. Buněčné linie v biomedicinském výzkumu mají své výhody i nevýhody ve srovnání s primárními kulturami. Jejich největší výhodou je neomezená životnost a fakt, že vytvořené rakovinové linie jsou zbaveny vlivů prostředí a odpovědí hostitele. Také si zachovávají jedinečné genetické aberace rodičovského nádoru, ze kterého byly získány a po dlouhodobé kultivaci získávají další specifické znaky (Brodaczewska et al., 2016).

### 4.1 Caki-1 – nefrotoxicita

Caki-1 je linie lidských nádorových buněk, která byla izolována v roce 1971 z buněčného karcinomu ledvin. Buňky vykazují epiteliální morfologii při růstu v adherentních kulturách. Při kultivaci na tzv. transwell filtrech tvoří polarizovanou monovrstvu a vykazují charakteristické rysy epitelu proximálního tubulu. Buňky Caki-1 exprimují tumor supresorový protein von Hippel-Lindau (VHL) a vytvářejí nádory u imunokompromitovaných myší. Zároveň jsou užitečným modelem pro studium rakoviny ledvin (Glube et al., 2007).

Buněčný karcinom ledvinových buněk je nejčastější formou urologického karcinomu, který je charakteristický mutací tumor supresorového proteinu VHL a nadměrnou expresí faktoru indukujícího hypoxii (HIF)-1 $\alpha$ . Aktivovaný (HIF)-1 $\alpha$  způsobuje zvýšenou proliferaci buněk Caki-1, angiogenezi a vznik metastáz. Buněčná proliferace je nedílnou součástí nádorové propagace a progresu a projevuje se právě změnou exprese různých proteinů. Z toho vyplývá, že snížení exprese (HIF)-1 $\alpha$  inhibuje proliferaci, migraci a invazi buněk Caki-1. K potlačení exprese (HIF)-1 $\alpha$  je účinný lék proti diabetu metformin, který indukuje zastavení buněčných fází G0/G1. Ve srovnání s buněčnou linií Caki-2 je linie Caki-1 méně citlivá na jeho působení a nedochází k porušení její životaschopnosti (Pasha et al., 2019).

## 4.2 SH-SY5Y – neurotoxická

Immortalizovaná buněčná linie SH-SY5Y je nejčastěji využívaná buněčná linie v neurovědě a výzkumu neuroblastomu. Jedná se o subklon buněčné linie SK-N-SH, která byla získána z kostní dřeně čtyřleté dívky s neuroblastomem (Forster et al., 2016). Tato immortalizovaná buněčná linie má významné medicínské využití, konkrétně je využívána při léčbě Parkinsonovy nebo Alzheimerovy choroby. Dále se využívá ke zkoumání patogeneze virových infekcí. Příkladem může být výzkum patogeneze polioviru, což je původce dětské obrny nebo varicella zoster viru, původce pásových oparů či planých neštovic. V oblasti neurobiologie a neurovirologie je výjimečně využíváno i nediferenciovaných linií, ovšem použití diferenciovaných linií v systému *in vitro* poskytuje přesnější výsledky a lépe napodobuje situace panující *in vivo* (Shipley et al., 2016).

Pro studia v oblasti neurovědy nejsou nediferenciované buňky této linie příliš doporučovány, jelikož nesdílí příliš mnoho vlastností se zralými neurony. Nediferenciované buňky této linie rychle proliferují a běžně rostou ve shlučích. Optimální je proto použití diferenciovaných buněk, které po diferenciaci vykazují zvýšenou hladinu ATP. Naopak diferenciací dochází ke snížení mitochondriálního membránového potenciálu a ke snížení exprese genů v důsledku odpovědi na energetický stres (Forster et al., 2016).

Léčba Parkinsonovy choroby za pomoci této linie znamenala velký pokrok. Parkinsonova choroba je chronická neurodegenerativní porucha, která je způsobena poruchou neuronů ve středním mozku, konkrétně v části *substantia nigra*. Klíčovou roli v patogenezi Parkinsonovy choroby hraje oxidační stres, který je vyvolán dopaminem. Nadprodukce ROS způsobuje poškození neuronů a astrocytů. Dále je nemoc charakterizována mitochondriální mutací, kterou podporuje například protein PARKIN. Mutace genu PARKIN způsobuje hromadění poškozených mitochondrií a následnou nigrální degeneraci. Zmutované mitochondrie mohou být odstraněny pomocí mitofagie, která je indukována proteinem AMBRA1<sup>ActA</sup> v buňkách SH-SY5Y. Tento protein také snižuje množství ROS. Indukce mitofagie tudíž také chrání buňky před apoptózou a oxidačním stresem (Rita et al., 2018).

Buněčná linie SH-SY5Y je k výzkumům volena díky svému lidskému původu, neurálním vlastnostem a snadné kultivaci. Dokáže také produkovat jak dopamin, tak noradrenalin, má tedy částečně katecholaminergní vlastnosti. Nicméně i použití této linie má svá omezení, proto v mnoha studiích je využito i dalších paralelních buněčných linií. Těmito liniemi mohou být například PC12, Neuro-a2, anebo dokonce linie, které nemají jednoznačně potvrzený neurální původ, jako je HEK-293 (Xicoy et al., 2017).

### **4.3 A549 – plicní toxicita**

Jedná se o buněčnou linii, která byla v roce 1973 izolována z karcinomu plic. Buňky této linie vykazují při krátkodobé kultivaci známky fenotypu epitelálních buněk AT2, mají rysy spojené s původním nádorem a rychle proliferují. Z těchto důvodů se linie A549 používá ke studiu metabolických a molekulárních vlastností AT2. Při dlouhodobé kultivaci dochází k modulaci genů buněčného dělení, což vede ke vzniku klidné, pomaleji proliferující populace buněk s významnou regulací autofagie, stárnutí a apoptózy. Zároveň se zvyšuje počet up i down-regulačních genů, dochází k vývoji multilamelárních tělísek a ke změně fenotypu. Na rozdíl od AT2 neprodukuje buňky A549 povrchově aktivní látky (Cooper et al., 2016).

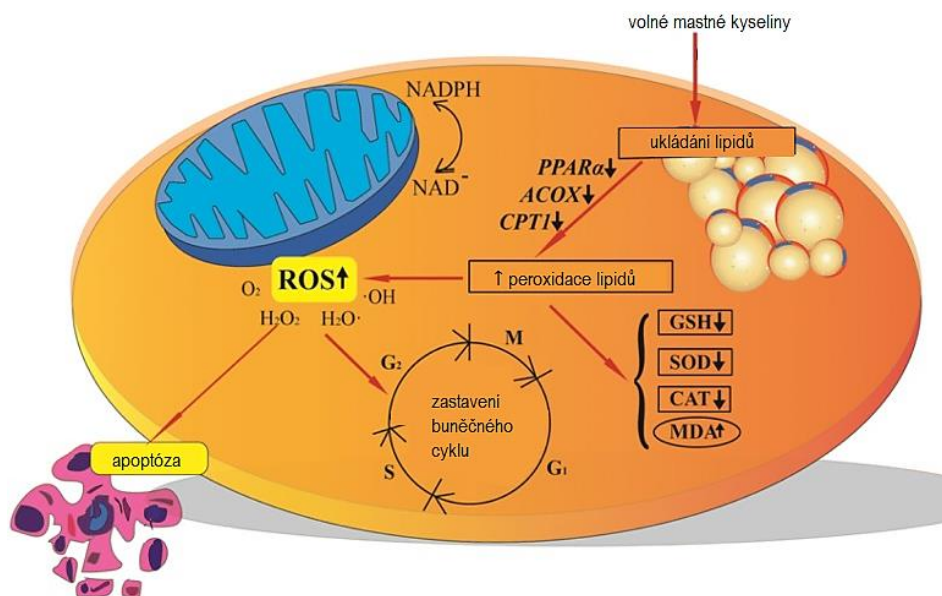
Buněčná linie A549 je využívána ke studiím rakoviny plic více jak 40 let. V současné době je rakovina plic nejčastější příčinou úmrtnosti na rakovinu na světě. Nejčastěji je pacientům diagnostikován plicní adenokarcinom, který dosahuje nejvyššího procenta úmrtnosti. Pochopení patogeneze adenokarcinomu je klíčové pro zlepšení prevence a cílené léčby. Mnohé studie naznačují, že interakce mezi adipocyty tukové tkáně a rakovinou plic je kritická pro růst a invazi nádorových buněk. Proliferace, migrace a invaze buněk A549 je výrazně urychlena až při nadměrném množství adipocytů. Předpokládá se, že zvýšená migrace a invaze buněk A549 je zapříčiněna přenosem energie z adipocytů do buněk, jelikož adipocyty ukládají energii ve formě triacylglycerolů. Zároveň může buněčná linie A549 vyvolat lipolýzu adipocytů. Z tohoto vyplývá, že role adipocytů je klíčová především pro metastazované buňky (Li et al., 2018).

### **4.4 HepG2 – hepatotoxicita**

Buněčná linie HepG2 pochází z lidského hepatocelulárního karcinomu. Jedná se o epitelové buňky, které rostou jako monovrstvy v malých agregátech, z nichž každý obsahuje 55 chromozomových párů. Linie slouží jako základní lidský buněčný model pro testování hepatotoxicity. Důvodem jejího využití je především snadná kultivace a mnoho stejných vlastností s játry. Přesto i tato linie má jisté nedostatky. Hlavní nevýhodu představuje skutečnost, že se ve srovnání s primárními lidskými hepatocyty výrazně liší v hladinách exprese a v aktivitách buněčných transportérů a enzymů (Choi et al., 2017).

Buňky HepG2 jsou citlivé na metabolické změny, oxidační stres a toxické látky. Tyto vlivy způsobují poškození hepatocytů až apoptózu. Studie dokázaly, že nadměrný příjem volných mastných kyselin aktivuje enzymy podporující lipogenezi, což vede k nadměrné produkci intracelulárních lipidů. Tyto lipidy se v buňce hromadí a dochází k jejich zvýšené peroxidaci, nadměrné produkci ROS a ke snížení hladiny enzymů, jako je glutathion. Některé

toxické látky, které mohou vznikat i konzumací nezdravých potravin, například smažených, indukují apoptózu buněk HepG2 a brání přechodu těchto buněk z fáze G0 do fáze G1/G2 buněčného cyklu. Například konzumace palmového oleje může inhibovat proliferaci buněk HepG2, způsobit zvýšenou apoptózu a zastavení buněčného cyklu. Oxidační stres může vést k poškození buněčných makromolekul, jako je DNA, což dále vede k mitochondriální dysfunkci a buněčné apoptóze (Ju et al., 2019), (Obr. 9).



Obr. 9: Průběh poškození buněk HepG2 vlivem volných mastných kyselin

(Upraveno dle Ju et al., 2019)

Vliv na játra, podobně jako na ledviny, má i APAP. Bylo prokázáno, že metabolismus a hepatotoxicita APAP přímo úměrně souvisí s množstvím přijatého ethanolu. Acetaminophen může vyvolat až apoptózu či nekrózu buněk HepG2 nebo PC12 *in vitro* i *in vivo*, čemuž může zabránit enzym CYP2E1. Tento enzym snižuje citlivost buněk HepG2 na hepatotoxické účinky APAP, jelikož způsobuje jeho metabolickou přeměnu. Kromě toho je schopen oxidovat ethanol či udávat informaci o přítomnosti adenoviru, který zvyšuje jeho expresi (Bai a Cederbaum, 2003).

#### 4.5 Buněčná linie Jurkat

Buňky této linie vznikají při akutní T-lymfoblastické leukémii a nekonečně proliferují vlivem zvýšené telomerázové aktivity. Existuje celá řada látek, které dokáží regulovat aktivitu enzymu telomerázy tak, aby došlo k ovlivnění buněčného cyklu a tím i k apoptóze. Takovou látkou je například rapamycin, který je fermentačním produktem *Streptomyces hygroscopicus*.

Rapamycin inhibuje proliferaci buněk, indukuje zástavu G1 fáze a inhibuje aktivitu telomerázy. Díky těmto antileukemickým vlastnostem je jednou z potenciálních látek při léčbě různých typů tohoto onemocnění (Zhao et al., 2008). Jurkatovy buňky také slouží jako *in vitro* model pro studie transdukce signálu T-buněk a cytokinů. Expres těchto receptorů může poskytnout klíčové informace pro výzkum jejich patogeneze. Díky těmto vlastnostem jsou buňky Jurkat využívány ve studiích *in vitro*, které se zabývají virovými onemocněními a infekčními chorobami (Chen a Nong, 2018).

## ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zpracována jako literární rešerše, která pojednává o současných nejčastějších metodách immortalizace buněk a o využívaných buněčných liniích v testování cytotoxicity *in vitro* pro popis fungování celé řady orgánů. Buněčné linie lze immortalizovat fyzikálními, chemickými a biologickými vlivy, přičemž ty biologické jsou nejvyužívanější. Immortalizace pomocí fyzikálních způsobů není dnes již příliš využívána, protože působením ultrafialového nebo ionizujícího záření může dojít k poruše proliferace buněk a k jejich nežádoucímu poškození. Mnohem využívanější je znesmrtelnování buněk vlivem chemických látek, které je však uplatňováno zejména pro zvířecí buněčné linie. Významnou roli v immortalizaci buněk má například benzoapyren. V současnosti však nejdůležitější roli hrají biologické způsoby immortalizace buněk, především pomocí různých typů virů. Výběr vhodného viru je závislý zejména na druhu buněčné linie. Například k immortalizaci lymfoidních a epitelálních buněk je využíván EBV. Obecně nejpoužívanějším a nejdostupnějším je však virus SV40.

Buněčné linie, které byly v práci popsány, byly rozděleny podle způsobu immortalizace a orgánového umístění. Základním, hojně využívaným uměle immortalizovaným modelem pro testování nefrotoxicity jsou buňky HEK-293, které částečně slouží i pro testování neurotoxicity, a buňky HK-2. Pro neurotoxicitu jsou významné především buňky hBMECs a hCMEC/D3, které jsou základní součástí hematoencefalitické bariéry a jejich immortalizace velmi napomáhá ke zjišťování vlastností této bariéry *in vitro*. Pro plicní toxicitu jsou nejvyužívanějšími modely buňky AT2 a HBEC3-KT, a pro testování hepatotoxicity slouží především buňky THLE-2 a cBAL111.

Spontánně immortalizované buňky jsou buňky, které byly znesmrtelněny bez zásahu člověka vlivem genomové nestability. Mezi nejčastěji využívané buněčné modely patří Caki-1, SH-SY5Y, A549 a HepG2. Největší výhodou těchto spontánně immortalizovaných linií je fakt, že vznikly přirozeně, jsou zbaveny vlivů prostředí a zachovávají si genetické aberace rodičovského nádoru.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ACHILLI C., CIANA A., MINETTI G.: Immortalized HEK 293 Kidney Cell Lines as Model of Renal Cells: Friends or Foes? *J Controversies Biomed Res.*, 2018, 4(1), 6-9.
2. ANAND A.A.P., SANKAR S.G., VANI V.K. et al.: Immortalization of Neuronal Progenitors Using SV40 Large T Antigen and Differentiation Towards Dopaminergic Neurons. *J Cell Mol Med.*, 2012, 16(11), 2592-2610.
3. ANDREWS A.M., LUTTON E.M., REICHENBACH N., RAZMPOUR R. et al.: Characterization of human fetal brain endothelial cells reveals barrier properties suitable for in vitro modeling of the BBB with syngenic co-cultures. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 2018, 38(5), 888-903.
4. ANTONACI G., COSSA L.G., MUSCELLA A., VETRUGNO C. et al.: [Pt(O,O'-acac)( $\gamma$ -acac)(DMS)] Induces Autophagy in Caki-1 Renal Cancer Cells. *Biomolecules*, 2019, 9(3), 1-14.
5. BAI J., CEDERBAUM A.I.: Adenovirus mediated overexpression of CYP2E1 increases sensitivity of HepG2 cells to acetaminophen induced cytotoxicity. *Mol Cell Biochemistry*, 2004, 262, 165-176.
6. BRENNER S., MILLER J. H., BROUGHTON W.: Encyclopedia of genetics. *Academic Press*, 2002. ISBN 978-0-12-227080-2.
7. BRODACZEWSKA K.K., SZCZYLIK C., FIEDOROWICZ M., PORTA C. et al.: Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Mol Cancer*, 2016, 15(83), 1-15.
8. CARNERO A., KONDOH H., LLEONART M.E., MONDELO CH. et al.: Disruptive chemicals, senescence and immortality. *Carcinogenesis*, 2015, 36(1), 19-37.
9. CARTER M., SHIEH J.: Guide to Research Techniques in Neuroscience. *Academic Press*, 2015, 2, 295-310. ISBN 978-0-12-800511-8.
10. CHEN J.L., NONG G.M.: Advances in Application of Jurkat Cell Model in Research on Infectious Diseases. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2018, 20(3), 236-242.
11. CHIPUK J.E., GREEN D.R.: Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.*, 2006, 13(6), 994-1002.
12. CHOI Y.H., LEE H.S., CHUNG C.K., KANG I.J. et al.: Protective effects of an ethanol extract of *Angelica keiskei* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in HepG2 and HepaRG cells. *Nutr Res Pract.*, 2017, 11(2), 97-104.
13. COOPER J.R., ABDULLATIF M.B., BURNETT E.C., KEMPESELL K.E. et al.: Long Term Culture of the A549 Cancer Cell Line Promotes Multilamellar Body Formation and

- Differentiation Towards an Alveolar Type II Pneumocyte Phenotype. *PLoS ONE*, 2016, 11(10), 1-20.
14. CRISOSTOMO L., SORIANO A.M., FROST J.R., OLANUBI O. et al.: The Influence of E1A C-Terminus on Adenovirus Replicative Cycle. *Viruses*, 2017, 9(12), 1-16.
  15. DAVIS, J. M.: Basic cell culture: a practical approach. *Oxford University Press*, 2002, 2. ISBN 0-19-963853-5.
  16. DANIELS B.P., ORENGO L.C., PASIEKA T.J., COURAUD P.O. et al.: Immortalized human cerebral microvascular endothelial cells maintain the properties of primary cells in an *in vitro* model of immune migration across the blood brain barrier. *J Neurosci Methods.*, 2013, 212(1), 173-179.
  17. DELGADO O., KAISANI A.A., SPINOLA M., XIE X.J. et al.: Multipotent Capacity of Immortalized Human Bronchial Epithelial Cells. *PLoS ONE*, 2011, 6(7), 1-8.
  18. DESAI T.J., BROWNFIELD D.G., KRASNOW M.A.: Alveolar Progenitor and Stem Cells in Lung Development, Renewal and Cancer. *Nature*, 2014, 507, 190-194.
  19. DEURHOLT T., CHHATTA A.A., BLOEMENDAAL L.T., SCHWARTLANDER R. et al.: Novel immortalized human fetal liver cell line, cBAL111, has the potential to differentiate into functional hepatocytes. *BMC Biotechnol.*, 2009, 9(89), 1-15.
  20. DOLCETTI R., GIUNCO S., COL J.D., MASTORCI K. et al.: Epstein-Barr virus and telomerase: from cell immortalization to therapy. *Infect agents cancer*, 2014, 9, 1-7.
  21. DOMINGUE J. C., AO M., SARATHY J., GEORGE A. et al.: HEK-293 cells expressing the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR): a model for studying regulation of Cl<sup>-</sup> transport. *Physiol Rep.*, 2014, 2(9), 1-16.
  22. DUESBERG P., MCCORMACK A.: Immortality of cancers: A consequence of inherent karyotypic variations and selections for autonomy. *Cell Cycle*, 2013, 12(5), 783-802.
  23. DUNCAN E.L., REDDEL R.R.: Genetic changes associated with immortalization. *Biochemistry*, 1997, 11, 1263-1274.
  24. DUNCAN E.L., WADHWA R., KAUL S.C.: Senescence and immortalization of human cells. *Biogerontology*, 2000, 103-121.
  25. EIGENMANN D.E., XUE G., KIM K.S., MOSES A.V. et al.: Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an *in vitro* blood-brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids Barriers CNS*, 2013, 10(33), 1-17.

26. FORSTER J.I., KÖGLSBERGER S., TREFOIS C., BOYD O. et al.: Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability. *J Biomol Screen.*, 2016, 21(5), 496-509.
27. GAZDAR A., BUTEL J.S., CARBONE M.: SV40 and tumours: myth, association or causality? *Nat Rev Cancer*, 2002, 2, 957-964.
28. GLUBE N., GIESSL A., WOLFRUM U., LANGGUTH P.: Caki-1 cells represent an in vitro model system for studying the human proximal tubule epithelium. *Exp Nephrol.*, 2007, 107(2), 47-56.
29. HAN Y., XU X., TANG CH., GAO P. et al.: Reactive oxygen species promote tubular injury in diabetic nephropathy: The role of the mitochondrial ros-txnip-nlrp3 biological axis. *Redox Biol.*, 2018, 16, 32-46.
30. HARRY G.J., BILLINGSLEY M., BRUININK A., CAMPBELL I.L. et al.: In vitro techniques for the assessment of neurotoxicity. *Environ Health Perspect.*, 1998, 106(1), 131-158.
31. HAYFLICK L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.*, 1965, 37, 614-636.
32. HAYFLICK L., MOORHEAD P.S.: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.*, 1961, 25, 585-621.
33. HENRY O., JOLICOEUR M., KAMEN A.: Unraveling the metabolism of HEK-293 cells using lactate isotopomer analysis. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 2011, 34, 263-273.
34. HUBBARD K., OZER H.L.: Mechanism of immortalization. *Age*, 1999, 22, 65-69.
35. ITKIN-ANSARI P., LEVINE F.: Sources of  $\beta$ -Cells for Human Cell-Based Therapies for Diabetes. *Cell Biochem Biophys.*, 2004, 40, 103-112.
36. JENKINSON S.E., CHUNG G.W., BAKAR N.S., DALZELL A.M. et al.: The limitations of renal epithelial cell line HK-2 as a model of drug transporter expression and function in the proximal tubule. *Pflugers Archiv: European J Physiol.*, 2012, 464, 601-611.
37. JU J., ZHENG Z., XU Y.J., CAO P. et al.: Influence of Total Polar Compounds on Lipid Metabolism, Oxidative Stress and Cytotoxicity in HepG2 Cells. *Lipids Health Dis.*, 2019, 18(37), 1-13.
38. KEMP S.J., THORLEY A.J., GORELIK J., SECKL M.J. et al.: Immortalization of Human Alveolar Epithelial Cells to Investigate Nanoparticle Uptake. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 2008, 39(5), 591-597.
39. KHAN P., FYTIANOS K., TAMO L., ROTH M. et al.: Culture of human alveolar epithelial type II cells by sprouting. *Respir Res.*, 2018, 204, 1-7.

40. KOUL S., KHANDRIKA L., MEACHAM R.B., KOUL H.K.: Genome Wide Analysis of Differentially Expressed Genes in HK-2 Cells, a Line of Human Kidney Epithelial Cells in Response to Oxalate. *PLoS ONE*, 2012, 7(9), 1-16.
41. LANOSA X.A, COLOMBO J.A.: Cell Contact-Inhibition Signaling as Part of Wound-Healing Processes in Brain. *Neuron Glia Biology*, 2008, 4(1), 27-34.
42. LI F.F., ZHANG H., LI J.J., CAO Y.N. et al.: Interaction With Adipocytes Induces Lung Adenocarcinoma A549 Cell Migration and Tumor Growth. *Mol Med Rep.*, 2018, 18(2), 1973-1980.
43. LIN CH.Y., HUANG Z., WEN W., WU A. et al.: Enhancing Protein Expression in HEK-293 Cells by Lowering Culture Temperature. *PLoS ONE*, 2015, 10(4), 1-19.
44. LIU J.P., CASSAR L., PINTO A., LI H.: Mechanisms of cell immortalization mediated by EB viral activation of telomerase in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Research*, 2006, 16, 809-817.
45. MORELVA T.D.M., ANTONIO L.B.: Immunohistochemical expression of ubiquitin and telomerase in cervical cancer. *Virchows Arch*, 2009, 455, 235-243.
46. PARK M.: Oncogenes: Genetic abnormalities of cell growth. The metabolic and molecular bases of inherited disease. *McGraw-Hill*, 1995, 7, 589-611.
47. PASHA M., SIVARAMAN S.K., FRANTZ R., AGOUNI A. et al.: Metformin Induces Different Responses in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Caki Cell Lines. *Biomolecules*, 2019, 9(3), 1-19.
48. PFEIFER A.M., COLE K.E., SMOOT D.T., WESTON A. et al.: Simian Virus 40 Large Tumor Antigen-Immortalized Normal Human Liver Epithelial Cells Express Hepatocyte Characteristics and Metabolize Chemical Carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(11), 5123-5127.
49. PIRAZZINI M., ROSSETTO O., ELEOPRA R., MONTECUCCO C.: Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacol Rev.*, 2017, 69(2), 200-235.
50. POLLARD J., WALKER J.M.: Basic cell culture protocols. *Humana Press*, 1997, 1-482.
51. POPOVA D., KARLSSON J., JACOBSSON S.O.P.: Comparison of neurons derived from mouse P19, rat PC12 and human SH-SY5Y cells in the assessment of chemical- and toxin-induced neurotoxicity. *BMC Pharmacol Toxicol.*, 2017, 18(42), 1-11.
52. PRICE A.B., PISTOLLATO F., SACHANA M., BOPP S.K. et al.: Strategies to improve the regulatory assessment of developmental neurotoxicity (DNT) using *in vitro* methods. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 2018, 354, 7-18.

53. PR NEWSWIRE ASSOCIATION LLC: Expansion of Immortalized Cell Line Market by Region, Technology in Upcoming Years 2027: Global: Immortalized Cell Line Market Research Report, by Technology (SV 40 Large T-Antigen, MYST58A, P53 Cell), by Cell Type (Vero Cells, 3T3 HEK 293 Cells, A549 Cells) by Region (Europe, Americas, Asia Pacific and Mea) – Forecast to 2027. 2016, 1-5.
54. QUINLAN M.P., WHYTE P., GRODZICKER T.: Growth Factor Induction by the Adenovirus Type 5 E1A 12S Protein Is Required for Immortalization of Primary Epithelial Cells. *Mol Cell Biol.*, 1988, 8(8), 3191-3203.
55. RADKO S., JUNG R., OLANUBI O., PELKA P.: Effects of Adenovirus Type 5 E1A Isoforms on Viral Replication in Arrested Human Cells. *PLoS ONE*, 2015, 10(10), 1-18.
56. RAMBOER E., DE KOCK J., VANHAECKE T., BERX G. et al.: Strategies for immortalization of primary hepatocytes. *J Hepatol.*, 2014, 61(4), 925-943.
57. RAMIREZ R.D., SHERIDAN S., GIRARD L., SATO M. et al.: Immortalization of Human Bronchial Epithelial Cells in the Absence of Viral Oncoproteins. *CANCER RESEARCH*, 2004, 64, 9027-9034.
58. RITA A.D., D'ACUNZO P., SIMULA L., CAMPELLO S. et al.: AMBRA1-Mediated Mitophagy Counteracts Oxidative Stress and Apoptosis Induced by Neurotoxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12(92), 1-11.
59. ROUŠAR T., VRBOVÁ M., ROUŠAROVÁ E., BRŮČKOVÁ L. et al.: Characterization of Acetaminophen Toxicity in Human Kidney HK-2 Cells. *Physiol Res.*, 2016, 65, 627-635.
60. RUSSO J., TAHIN Q., LAREEF M. H., HU Y. F. et al.: Neoplastic transformation of human breast epithelial cells by estrogens and chemical carcinogens. *Environ Mol Mutagen.*, 2002, 39, 254-263.
61. SCHÜTZE D.M., KRIJGSMAN O., SNIJDERS P.J.F., YISTRA B. et al.: Immortalization Capacity of HPV Types Is Inversely Related to Chromosomal Instability. *Oncotarget*, 2016, 7(25), 1-14.
62. SEFRIED S., HÄRING H.U., WEIGERT C., ECKSTEIN S.S.: Suitability of hepatocyte cell lines HepG2, AML12 and THLE-2 for investigation of insulin signalling and hepatokine gene expression. *Open Biol.*, 2018, 8, 1-11.
63. SHAY J.W., WRIGHT W.E., WERBIN H.: Defining the molecular mechanism of human cell immortalization. *Biochim Biophys.*, 1991, 1072, 1-7.
64. SHIPLEY M.M., MANGOLD C.A., SZPARA M.L.: Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J Vis Exp.*, 2016, 108, 1-11.

65. SOO J.Y.C., JANSEN J., MASEREEUW R., LITTLE M.H.: Advances in predictive in vitro models of drug-induced nephrotoxicity. *Nat Rev Nephrol.*, 2018, 14(6), 378-393.
66. STEBBINS M.J., WILSON H.K., CANFIELD S.G., QUIAN T. et al.: Differentiation and Characterization of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Brain Microvascular Endothelial Cells. *Methods*, 2016, 101, 93-102.
67. SUGIMOTO M., IDE T., GOTO M., FURUICHI Y.: Reconsideration of senescence, immortalization and telomere maintenance of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines. *Mechan Ageing Devel.*, 1999, 107, 51-60.
68. ŠEBEK, J.: Buněčné kultury v medicíně. *Galén*, 2018. ISBN 978-80-7492-380-7.
69. THEOBALD M., OFFRINGA R.: Anti-p53-directed immunotherapy of malignant disease. *Expert Rev Mol Med.*, 2003, 5(11), 1-13.
70. WANG J., NAGY N., MASUCCI M.G.: The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 upregulates the cellular antioxidant defense to enable B-cell growth transformation and immortalization. *Oncogene*, 2019, 39, 603-616.
71. WEI W., SEDIVY J.M.: Differentiation between senescence (M1) and crisis (M2) in human fibroblast cultures. *Exp Cell Res.*, 1999, 253, 519-522.
72. XICOY H., WIERINGA B., MARTENS G.J.M.: The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegen.*, 2017, 12(10), 1-11.
73. ZHAO Y., ZHOU Q., XU Y., LAI X. et al.: Antiproliferative effect of rapamycin on human T-cell leukemia cell line Jurkat by cell cycle arrest and telomerase inhibition. *Acta Pharmacol Sin.*, 2008, 29(4), 481-488.