

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

**ANALÝZA NEFROTOXICKÉHO PŮSOBENÍ LÁTEK *IN VITRO***

**Disertační práce**

**AUTOR PRÁCE:** Mgr. Jiří Handl

**ŠKOLITEL:** doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

**2020**

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

**NEPHROTOXICITY TESTING *IN VITRO***

**Doctoral Thesis**

**AUTHOR:** Mgr. Jiří Handl

**SUPERVISOR:** doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

**2020**

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen 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 30. 6. 2020

Mgr. Jiří Handl

## **Poděkování**

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval především vedoucímu své disertační práce doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za odbornou pomoc při zpracovávání tématu disertační práce, za vstřícnost při konzultacích a zejména pak za široké možnosti, kterých jsem při tvorbě disertační práce mohl využít. Zároveň bych velmi rád poděkoval svým kolegům za možnost konzultovat s nimi dílčí výsledky a sdílet jak úspěšné, tak méně úspěšné okamžiky spojené s tvorbou této práce. Hlavní dík patří v tomto směru zejména Mgr. Janu Čapkovi, Ph.D. za jeho ochotu a vstřícnost. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině, která mě během studia podporovala a o kterou jsem se mohl opřít vždy, když jsem to potřeboval.

## **ANOTACE**

Tato disertační práce pojednává o charakterizaci nefrotoxického působení látek *in vitro* u immortalizovaných lidských proximálních tubulárních buněk HK-2. V úvodní části jsou shrnuta základní pravidla a podmínky pro dlouhodobou kultivaci buněčných linií. Dále jsou podrobně charakterizovány buňky HK-2 a jejich význam v testování nefrotoxického působení. V práci jsou také zmíněny způsoby monitorování a analýzy toxického působení látek se zaměřením na stanovení buněčné viability a míry oxidačního stresu. Ve výsledkové části disertační práce jsou uvedeny výsledky získané při testování nefrotoxického působení  $\text{CdCl}_2$  u HK-2 buněk. V závěrečné části práce jsou pak naměřené výsledky shrnuty a diskutovány.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Nefrotoxicita, *in vitro* kultivace, HK-2 buněčná linie, buněčná viabilita, kadmium.

## **ANNOTATION**

This doctoral thesis deals with *in vitro* testing of nephrotoxic effects of substances in immortalized human proximal tubular cells HK-2. The introduction summarizes the basic rules and conditions for long-term cultivation of cell lines. Furthermore, HK-2 cells and their importance in nephrotoxicity testing are characterized in detail. The thesis also mentions methods for monitoring toxic effects of substances with focus on measuring cell viability and oxidative stress. The outcomes of the thesis are characterizing nephrotoxic effects of CdCl<sub>2</sub> in HK-2 cells. The results part describes obtained findings and the discussion follows.

## **KEYWORDS**

Nephrotoxicity, *In vitro* cultivation, HK-2 cell line, Cell viability, Cadmium.

# OBSAH

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ÚVOD.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>1 TEORETICKÁ ČÁST .....</b>                                       | <b>13</b> |
| 1.1 <i>In vitro</i> kultivace buněk .....                            | 13        |
| 1.2 Studium cytotoxicity <i>in vitro</i> .....                       | 14        |
| 1.2.1 Konečné buněčné kultury .....                                  | 16        |
| 1.2.2 Kontinuální buněčné linie.....                                 | 17        |
| 1.3 Testování nefrotoxicity <i>in vitro</i> .....                    | 22        |
| 1.3.1 Buněčná linie LLC-PK <sub>1</sub> .....                        | 24        |
| 1.3.2 Buněčná linie HEK 293.....                                     | 26        |
| 1.3.3 Buněčná linie HK-2 .....                                       | 27        |
| 1.3.3.1 Studium nefrotoxicity nanomateriálů .....                    | 29        |
| 1.3.3.2 Nefrotoxicita kadmia.....                                    | 31        |
| 1.4 Hodnocení funkčního stavu buněk.....                             | 34        |
| 1.4.1 Testování buněčné viability .....                              | 34        |
| 1.4.1.1 Testování membránové integrity .....                         | 35        |
| 1.4.1.2 Detekce aktivity buněčného metabolismu .....                 | 36        |
| 1.4.1.3 Tvorba ATP .....   | 41        |
| 1.4.2 Stanovení koncentrace glutathionu.....                         | 42        |
| 1.4.3 Kondenzace jaderného chromatinu .....                          | 42        |
| 1.4.4 Produkce reaktivních forem kyslíku .....                       | 43        |
| 1.4.5 Vizualizace buněčných struktur fluorescenční mikroskopií ..... | 44        |
| <b>2 CÍLE PRÁCE .....</b>  | <b>46</b> |
| <b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>                                    | <b>47</b> |
| 3.1 Seznam použitých chemikálií.....                                 | 47        |
| 3.2 Příprava roztoků.....  | 48        |
| 3.3 Přístroje a laboratorní vybavení .....                           | 49        |
| 3.4 Kultivace HK-2 buněk .....                                       | 51        |
| 3.5 Optimalizace druhu kultivačního média .....                      | 51        |
| 3.6 Testování vlivu kultivace HK-2 buněk na míru toxicity .....      | 52        |
| 3.7 Studium nefrotoxicity CdCl <sub>2</sub> .....                    | 53        |
| 3.8 Bioanalytické testy a metody.....                                | 54        |
| 3.8.1 Analýza krátkých tandemových repetič.....                      | 54        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.8.2 „Doubling time“ a střední velikost buněk.....                            | 54         |
| 3.8.3 Flurescenční mikroskopie – barvení aktinu a mitochondrií .....           | 55         |
| 3.8.4 Stanovení viability buněk – WST-1 test .....                             | 55         |
| 3.8.5 Stanovení glutathionu .....  | 56         |
| 3.8.6 Stanovení produkce ROS .....   | 56         |
| 3.8.7 Apoptotické markery – DNA fragmentace a aktivita kaspáz .....            | 56         |
| 3.8.8 Western Blot analýza proteinů .....                                      | 57         |
| 3.9 Statistická analýza naměřených dat.....                                    | 58         |
| <b>4 VÝSLEDKY.....</b>   | <b>59</b>  |
| 4.1 Optimalizace kultivace HK-2 buněk .....                                    | 59         |
| 4.2 Stabilita HK-2 buněk v průběhu pasážování .....                            | 64         |
| 4.2.1 Analýza krátkých tandemových repetic.....                                | 65         |
| 4.2.2 „Doubling time“ a střední velikost buněk.....                            | 65         |
| 4.2.3 Stabilita citlivosti HK-2 buněk k působení toxinů .....                  | 67         |
| 4.3 Studium nefrotoxicity CdCl <sub>2</sub> <i>in vitro</i> .....              | 71         |
| 4.3.1 Toxicita CdCl <sub>2</sub> – dehydrogenázová aktivita .....              | 71         |
| 4.3.2 Toxicita CdCl <sub>2</sub> – koncentrace glutathionu a produkce ROS..... | 73         |
| 4.3.3 Toxicita CdCl <sub>2</sub> – mikroskopie.....                            | 75         |
| 4.3.4 Toxicita CdCl <sub>2</sub> – markery apoptózy.....                       | 76         |
| <b>5 DISKUSE .....</b>   | <b>79</b>  |
| <b>6 ZÁVĚR.....</b>  | <b>88</b>  |
| <b>7 POUŽITÁ LITERATURA .....</b>  | <b>89</b>  |
| <b>8 PŘÍLOHY .....</b>   | <b>105</b> |
| 8.1 Originální data k výsledkové části.....                                    | 105        |
| 8.2 Seznam publikovaných prací .....   | 111        |



## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

|                    |   |           |
|--------------------|---|-----------|
| <b>Obrázek 1:</b>  | Vztah mezi hlavními typy <i>in vitro</i> modelů.                          | (str. 15) |
| <b>Obrázek 2:</b>  | Lidská neuroblastomová linie SH-SY5Y.                                     | (str. 18) |
| <b>Obrázek 3:</b>  | Růst buněčné linie HepG2.   | (str. 19) |
| <b>Obrázek 4:</b>  | Růst buněčné linie A549.  | (str. 20) |
| <b>Obrázek 5:</b>  | Růst buněčné linie LLC-PK1.   | (str. 25) |
| <b>Obrázek 6:</b>  | Růst a morfologie buněčné linie HEK 293.                                  | (str. 27) |
| <b>Obrázek 7:</b>  | Imortalizované lidské ledvinné proximální tubulární buňky HK-2.           | (str. 28) |
| <b>Obrázek 8:</b>  | Příklad barvení trypanovou modří.   | (str. 36) |
| <b>Obrázek 9:</b>  | Struktura kationického tetrazoliového kruhu.                              | (str. 37) |
| <b>Obrázek 10:</b> | Redukce tetrazoliové soli MTT na fialový formazanový produkt              | (str. 38) |
| <b>Obrázek 11:</b> | Struktury sulfonovaných tetrazoliových solí a jejich produkty             | (str. 40) |
| <b>Obrázek 12:</b> | Stanovení ATP: reakční schéma.  | (str. 41) |
| <b>Obrázek 13:</b> | Optimalizace kultivačního média pro buňky HK-2.                           | (str. 59) |
| <b>Obrázek 14:</b> | Kultivace HK-2 buněk v DMEM/F12 médiu.                                    | (str. 60) |
| <b>Obrázek 15:</b> | Kultivace HK-2 buněk v DMEM/F12 médiu bez pyruvátu.                       | (str. 61) |
| <b>Obrázek 16:</b> | Kultivace HK-2 buněk v keratinocytovém SFM médiu.                         | (str. 62) |
| <b>Obrázek 17:</b> | HK-2 buňky v průběhu střednědobého pasážování.                            | (str. 66) |
| <b>Obrázek 18:</b> | HK-2 buňky exponované CdCl <sub>2</sub> (25, 100 a 200 μM); 6 hod.        | (str. 75) |
| <b>Obrázek 19:</b> | HK-2 buňky exponované CdCl <sub>2</sub> (25, 100 a 200 μM); 24 hod.       | (str. 76) |
| <b>Obrázek 20:</b> | Aktivita p-JNK a NFκB u HK-2 buněk inkubaci s CdCl <sub>2</sub> .         | (str. 78) |
|                    |   |           |
| <b>Graf 1:</b>     | Vliv typu média na dehydrogenázovou aktivitu buněk (WST-1 test).          | (str. 63) |
| <b>Graf 2:</b>     | Vliv typu média na koncentraci glutathionu (MCB metoda).                  | (str. 64) |
| <b>Graf 3:</b>     | Vliv pasážování na toxicitu látek (6 hod; WST-1 test).                    | (str. 68) |
| <b>Graf 4:</b>     | Vliv pasážování na toxicitu látek (6 hod; stanovení GSH).                 | (str. 68) |
| <b>Graf 5:</b>     | Vliv pasážování na toxicitu látek (24 hod; WST-1 test).                   | (str. 70) |
| <b>Graf 6:</b>     | Vliv pasážování na toxicitu látek (24 hod; stanovení GSH).                | (str. 70) |
| <b>Graf 7:</b>     | Vliv CdCl <sub>2</sub> na dehydrogenázovou aktivitu (6 hod; WST-1 test).  | (str. 71) |
| <b>Graf 8:</b>     | Vliv CdCl <sub>2</sub> na dehydrogenázovou aktivitu (24 hod; WST-1 test). | (str. 72) |
| <b>Graf 9:</b>     | Aktivita kaspáz 3 a 7 u HK-2 buněk ovlivněných CdCl <sub>2</sub> .        | (str. 77) |
|                    |   |           |
| <b>Tabulka 1:</b>  | Přehled vybraných renálních buněčných linií                               | (str. 24) |
| <b>Tabulka 2:</b>  | Průměrná velikost a čas populačního zdvojnásobení HK-2 buněk              | (str. 65) |
| <b>Tabulka 3:</b>  | Dehydrogenázová aktivita HK-2 buněk.                                      | (str. 73) |
| <b>Tabulka 4:</b>  | Oxidační metabolismus HK-2 buněk.   | (str. 74) |

## SEZNAM ZKRATEK

|                         |   |
|-------------------------|---|
| A549                    | alveolární epitelální buňky lidského adenokarcinomu                         |
| AIF                     | apoptotický indukční faktor   |
| APAP                    | acetaminofen  |
| ATCC                    | americká kolekce typových kultur  |
| ATP                     | adenosintrifosfát   |
| BPE                     | hovězí pituitární extrakt   |
| BSA                     | hovězí sérový albumin   |
| CFU                     | kolonie formující jednotky  |
| CisPt                   | cisplatina  |
| CM-H <sub>2</sub> DCFDA | 5,6-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát                  |
| DAPI                    | 4',6-diamidin-2-fenylindol  |
| DCFH                    | 2,7-dichlorodihydrofluorescein  |
| DMEM/F-12               | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12 (1:1)</i>                        |
| DMSO                    | dimethylsulfoxid  |
| DPBS                    | fosfátový pufr podle Dulbecca   |
| DT                      | čas populačního zdvojnásobení   |
| DV                      | deionizovaná voda   |
| EGF                     | epidermální růstový faktor  |
| FBS                     | fetální bovinní sérum   |
| FITC                    | fluorescein-5-isothiokyanát   |
| FCCP                    | karbonyl kyanid- <i>p</i> -trifluoromethoxyfenylhydrazon                    |
| GSH                     | glutathion  |
| HepG2                   | lidská jaterní nádorová buněčná linie                                       |
| HK-2                    | lidské ledvinné proximální tubulární buňky                                  |
| HL-60                   | leukemické buňky  |
| HPV                     | lidské papilomaviry   |
| HRP                     | křenová peroxidáza  |
| HRPTEC                  | primární ledvinné buňky   |
| ITS                     | insulin/transferin/seleničitan sodný  |
| JC-1                    | 5,5',6,6'-tetrachlóro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolylkarbocyanin<br>jodid |
| JNK                     | jun N-koncová kináza  |

|                              |  |
|------------------------------|--|
| KIM-1                        | molekula poškození ledvin 1  |
| LLC-PK1                      | prasečí proximální tubulární buňky   |
| MCB                          | monochlorobiman  |
| MTS                          | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium |
| MTT                          | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid                               |
| NAA                          | neesenciální aminokyseliny   |
| NAD(P)H; NAD+                | nikotinamidadenindinukleotid   |
| NF                           | neurofilamenta   |
| NGAL                         | neutrofilní s gelatinázou asociovaný lipokalin   |
| O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> | superoxidový radikál   |
| PI                           | propidium jodid  |
| PMS                          | 1-methoxy-5-methyl-phenazinium methyl sulfát   |
| P/S                          | penicilin/streptomycin   |
| PYR                          | pyruvát sodný  |
| ROS                          | reaktivní formy kyslíku  |
| SFM                          | médium bez séra  |
| SH-SY5Y                      | lidská neuroblastomová buněčná linie   |
| STR                          | krátké tandemové repetice  |
| SV40                         | polyomavirus – opičí virus 40  |
| t-BHP                        | <i>tert</i> -butylhydroperoxid   |
| UBE2D                        | ubiquitin-konjugující enzym E2D  |
| WST-1                        | 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate           |
| XTT                          | (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid                   |

## ÚVOD

Toxicita látek se na buněčné úrovni může projevit různými způsoby. Jedná se například o morfologické a funkční změny, poškození buněčných organel, inhibici biochemických drah, či mechanismů s nimi spojených. Pro charakterizaci toxického působení testovaných látek jsou s výhodou využívány *in vitro* buněčné modely. Při práci s buněčnými liniemi je třeba dodržet i obecná doporučení týkající se optimálních podmínek. V průběhu kultivace je nutné sledovat buněčné vlastnosti a základní charakteristiky, aby nedocházelo například vlivem nevhodného pasážování k morfologickým nebo funkčním změnám buněčných linií. Pravidelné mikroskopické zhodnocení buněčné morfologie a sledování parametrů, jako je čas populačního zdvojnásobení nebo stabilita průměrné buněčné velikosti, jsou základem k udržení nezměněné buněčné linie.

Mezi hlavní cílové orgány toxického působení látek patří zejména ledviny, játra, plíce a mozek. U většiny těžkých kovů je často zmiňován jejich nefrotoxický účinek, a jinak tomu není ani v případě námi studovaného kadmia. Jeho nefrotoxické účinky u imortalizovaných lidských epiteliálních proximálních tubulárních buněk ledvin jsou doprovázeny poměrně zajímavým, dosud nepopsaným, fenoménem indukce přechodného zvýšení dehydrogenázové aktivity, resp. buněčné viability. Potvrzení a studium tohoto fenoménu je po optimalizaci kultivačních podmínek a ověření kultivační a růstové stability buněčné linie HK-2 jedním z hlavních cílů této disertační práce.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 *In vitro* kultivace buněk

Kultivace buněčných linií přináší řadu aspektů, na které je třeba při práci s nimi dbát. Buňky mohou během kultivace prodělávat genotypový či fenotypový posun, přičemž, pokud toto není při kultivaci průběžně sledováno a případně včas zachyceno, může docházet ke zkreslení výsledků testování. Velmi důležitým kontrolním bodem reprodukovatelnosti a důvěryhodnosti dosažených výsledků je také správná identifikace buněčné linie a potvrzení, že buněčná linie nebyla mikrobiologicky kontaminována (Roberts et al., 2018). Právě kontaminace jakéhokoliv původu včetně kros-kontaminace jinou buněčnou linií představuje asi největší riziko pro provoz buněčné laboratoře a pro spolehlivost naměřených dat.

Živinami silně obohacená kultivační média jsou přímo ideálním prostředím pro růst mikroorganismů. Mezi nejčastější kontaminanty v buněčné laboratoři patří mykoplasmata, plísně a kvasinky. Buněčné linie a vlastní kultivační média však mohou být kontaminovány i bakteriemi. Kultivace buněk v naprosto sterilním prostředí buněčné laboratoře a dodržování striktních hygienických pravidel a standardizovaných postupů práce dokáže riziko kontaminace minimalizovat. Pro snížení pravděpodobnosti kontaminace buněčné kultury jsou do kultivačních médií zpravidla přidávána antibiotika. Například penicilin nebo streptomycin pomáhají předcházet infekci buněčné kultury a z tohoto důvodu tedy patří mezi nejčastější preventivní antibakteriální suplementy kultivačních médií (Coecke et al., 2005). Jedním z hlavních předpokladů úspěšné kultivace je požadavek oddělené laboratoře, která by měla být vybavena speciálním příslušenstvím pro práci s buňkami (Coecke et al., 2005; Freshney, 2005). Jedná se zejména o biohazard box, CO<sub>2</sub> inkubátor, mikroskop a analyzátor počtu buněk. Vlastní kultivace buněk je pak spojena s potřebou speciálních kultivačních nádob.

Buňky jsou v *in vitro* podmínkách zpravidla kultivovány v základním živném médiu, které je u jednotlivých buněčných linií doplněno o dané suplementy, jako je fetální bovinní sérum, vitamíny, aminokyseliny či indikátory změny pH. Kultivační médium by mělo co nejvíce připomínat přirozené vnitřní prostředí dané tkáně, krve či krevní plasmy. Je velmi důležité, aby buňky nebyly v důsledku nevyhovujících podmínek transformovány, případně diferencovány v jiné buněčné typy. Navíc

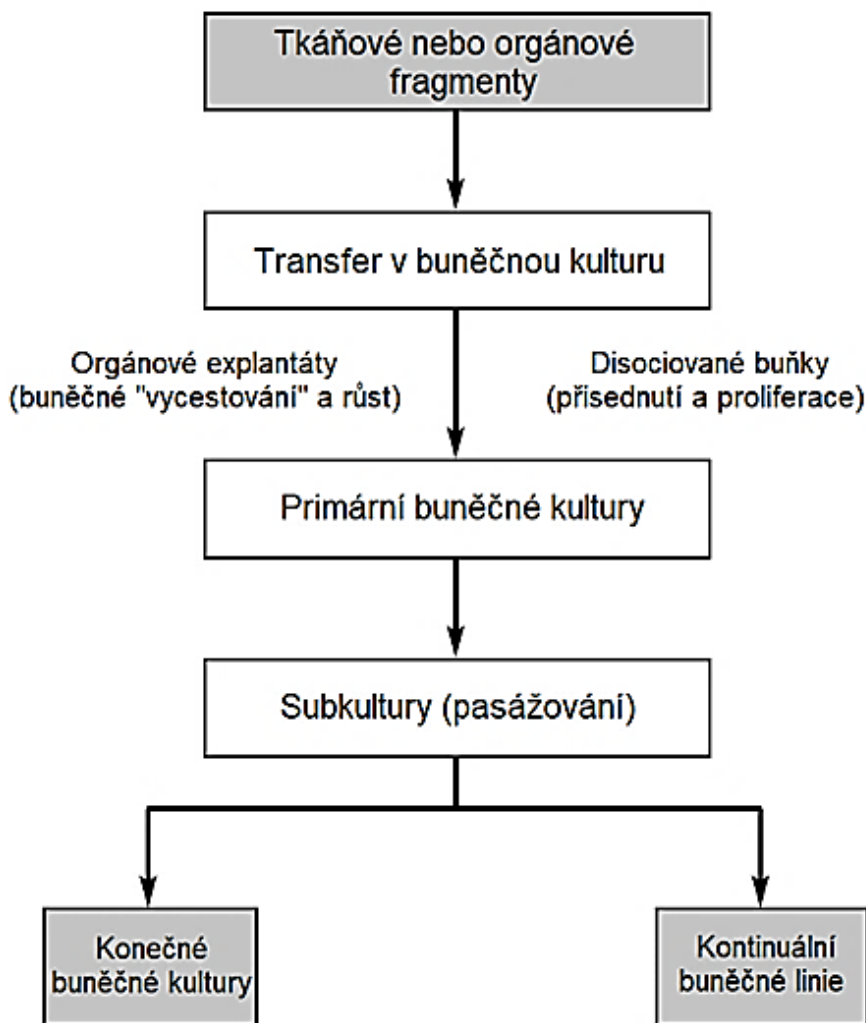
by nemělo vůbec docházet k tomu, že by buňky měnily své základní morfologické charakteristiky, nebo dokonce své funkční vlastnosti. Optimální koncentrace organických živin, koncentrace anorganických solí, pH, teplota a koncentrace CO<sub>2</sub> jsou pro správnou kultivaci buněk zcela zásadní také (Freshney, 2005).

## 1.2 Studium cytotoxicity *in vitro*

Pravděpodobně nejvalidnější preklinické výsledky týkající se testování účinnosti, aplikovatelnosti, nebo toxicity léčiv přinášejí studie prováděné *in vivo* (Palumbo and Pellegrini, 2017). Základní mechanismy a principy působení potenciálně toxických látek však lze detailněji popsat většinou až pomocí dobře definovaných *in vitro* studií (Schmidt et al., 1998). Buňky jako studijní model mají široké uplatnění ve spoustě výzkumných oblastí včetně screeningového testování cytotoxicity celé řady látek (Riss et al., 2018; Tong et al., 2017; Xia et al., 2013).

Je známo, že se buňky v průběhu pasážování mohou měnit, což může negativně ovlivnit reprodukovatelnost výsledků *in vitro* experimentů (Hughes et al., 2007; Vasilevsky et al., 2013). Důvodů, proč dochází ať už k morfologickým, či funkčním změnám kultivovaných buněk, je celá řada. Je-li do nové kultivační nádoby nasazen příliš nízký počet buněk, může dojít k jejich energetickému vyčerpání. Ve snaze dosáhnout svého optimálního počtu v kultivační nádobě buňky zrychlí svůj metabolismus a rychlost svého množení. Poté jsou zpravidla nuceny svůj růst zpomalit, či úplně zastavit a následně mohou dokonce vstoupit i do stavu senescence. Mezi buněčné modely využitelné pro experimentální výzkum patří buněčné kultury izolované přímo z tkání nebo buněčné linie, které jsou schopny neomezeného růstu. Buněčné linie mohou být izolovány z nádorové tkáně, nebo mohou být připraveny imortalizací buněčných kultur. Vzhledem k riziku narušení buněčné stability některých buněčných linií je třeba sledovat stáří buněčné linie a s tím spojenou délku její kontinuální kultivace. Vhodným parametrem pro sledování stáří buněčné linie je například číslo pasáže (Hughes et al., 2007; Kwist et al., 2015). Pasážování buněčné linie je proces, při kterém dochází k převedení části buněčné populace do nové kultivační nádoby (Clynes, 1998). Přenesena je často pouze určitá část původně kultivovaných buněk a děj je tedy spojen s redukcí počtu buněk. K zaznamenání tohoto kultivačního kroku lze využít označení pasáže, přičemž po provedení zmíněné redukce počtu buněk se číslo pasáže o jednotku zvyšuje.

Jednotlivé přístupy hodnocení negativního působení látek se mohou vzájemně lišit v závislosti na zvoleném buněčném modelu. Z hlediska délky životnosti buněk využívaných v experimentálních studiích rozlišujeme dvě základní kategorie buněčných modelů. První kategorií jsou konečné buněčné kultury. Druhou kategorií pak tvoří kontinuální buněčné linie, které se od konečných buněčných kultur liší možností dlouhodobého kontinuálního pasážování (Obr. 1).



**Obrázek 1: Vztah mezi hlavními typy *in vitro* modelů**  
upraveno dle (Coecke et al., 2005).

Obě kategorie buněčných modelů mají společný základ, kterým jsou tkáňové nebo orgánové fragmenty. Vlastní postupy buněčné izolace se mohou do značné míry lišit jak z hlediska provedení izolace, tak z hlediska použitých činidel a buněčných médií. Jednou z variant, jak může příprava primární buněčné linie probíhat je nasazení

tkáňových fragmentů do kultivační nádoby s kultivačním médiem. V průběhu několika dní pak dojde při použití vhodných selektivních médií k postupnému „vycestování“ vybraných typů buněk, případně k přisednutí disociovaných buněk a vznikají tak primární buněčné kultury (Coecke et al., 2005). Ty jsou základem pro obě kategorie buněčných modelů.

Zcela samostatnou buněčnou kategorií jsou kultury kmenových buněk, jejichž nespornou výhodou je nejen možnost kontinuální kultivace, ale zejména pak možnost produkce různých typů diferencovaných buněk. Kmenové buňky však vyžadují zcela speciální péči. Pro jejich kultivaci, manipulaci s nimi a uchování existují podrobné postupy, které je nutné důsledně dodržovat (Coecke et al., 2005).

### 1.2.1 Konečné buněčné kultury

Buněčné kultury izolované z lidské tkáně jsou velice často různorodé a skládají se z několika různých buněčných typů. Po izolaci zpravidla většina buněk umírá a zachované zůstávají pouze některé buněčné typy, které mají schopnost opakovaně se dělit *in vitro* (Crane, 1999). Zachování určitého typu buněk lze ovlivnit volbou kultivačních podmínek, jako je zejména výběr kultivačního média, jež může na některé buňky působit selektivně a jen vybraný typ buněk podpořit v růstu (Coecke et al., 2005). Takto získané či vyselektované buněčné kmeny si obvykle zachovávají vlastnosti původní tkáně, ze které byly izolovány (Crane, 1999). Jejich životaschopnost je však omezena a *in vitro* lze kultivovat pouze po krátkou dobu. Následně u nich dochází k zástavě replikační schopnosti a vstupu do stavu senescence. Ve stavu senescence zůstávají buňky životaschopné, a dokonce si mohou po nějakou dobu udržet i svou funkční aktivitu. Životaschopnost konečných buněčných kultur nepřekračuje Hayflickův limit, tedy jejich existence se pohybuje maximálně okolo padesáti buněčných generací (Hayflick, 1965). Konečné buněčné kultury bývají dobře charakterizované a zároveň poměrně stabilní. S přibývajícím počtem pasáží a stárnutím buněčné kultury dochází k funkčnímu zpomalení a postupné změně charakteristických vlastností. Jejich užití je tedy časově omezené a nikdy by nemělo dojít k překročení doporučeného experimentálně ověřeného počtu populačních zdvojnásobení. To je důležité z toho důvodu, aby byla zachována validita prováděných experimentů.

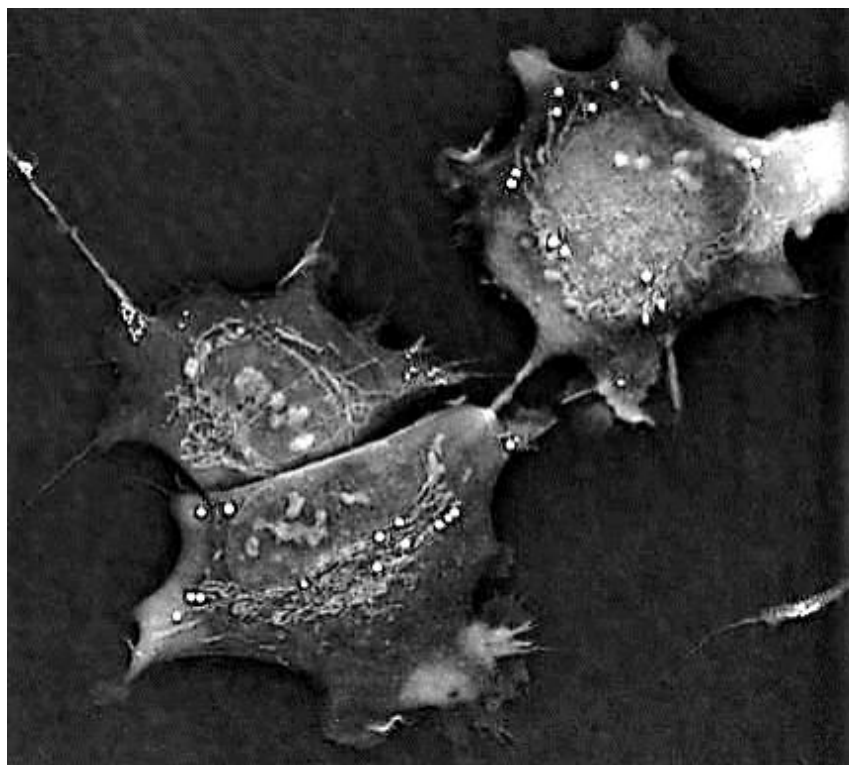


### 1.2.2 Kontinuální buněčné linie

Výsledky experimentů využívajících buněčné kultury mají velkou vypovídací hodnotu, avšak mají jednu obrovskou nevýhodu. Tou je omezená buněčná životnost. Právě dlouhodobá možnost kultivace buněk je jedním z nejčastějších požadavků moderního výzkumu založeném na *in vitro* testování. Z tohoto důvodu je nutné často přistoupit k využití jiných buněčných modelů, jako jsou například kontinuální buněčné linie. Kromě toho, že kontinuální buněčné linie vykazují schopnost být subkultivovány zdánlivě po neomezeně dlouhou dobu, tak se u nich zároveň neprojevují známky senescence. I když bylo prokázáno, že kontinuální buněčné linie jsou při dlouhodobém pasážování poměrně stabilní, vlivem variabilních kultivačních podmínek může dojít k částečné změně jejich vlastností. Jednotlivé kontinuální buněčné linie se od sebe značně liší. Existují i takové buněčné linie, které jsou přirozeně heterogenní směsí více fenotypů. Takovým příkladem jsou leukemické buňky HL-60 (Coecke et al., 2005). Jiné buněčné linie mohou být snadno diferenciovatelné například vlivem kyseliny retinové, dimethylsulfoxidu, či jiných látek s potenciálními diferenciačními účinky (Lim et al., 2013). Zde je příkladem buněčná linie SH-SY5Y (Obr. 2). I přes tato některá úskalí je uplatnění kontinuálních buněčných linií pro *in vitro* testování v současné době velmi časté.

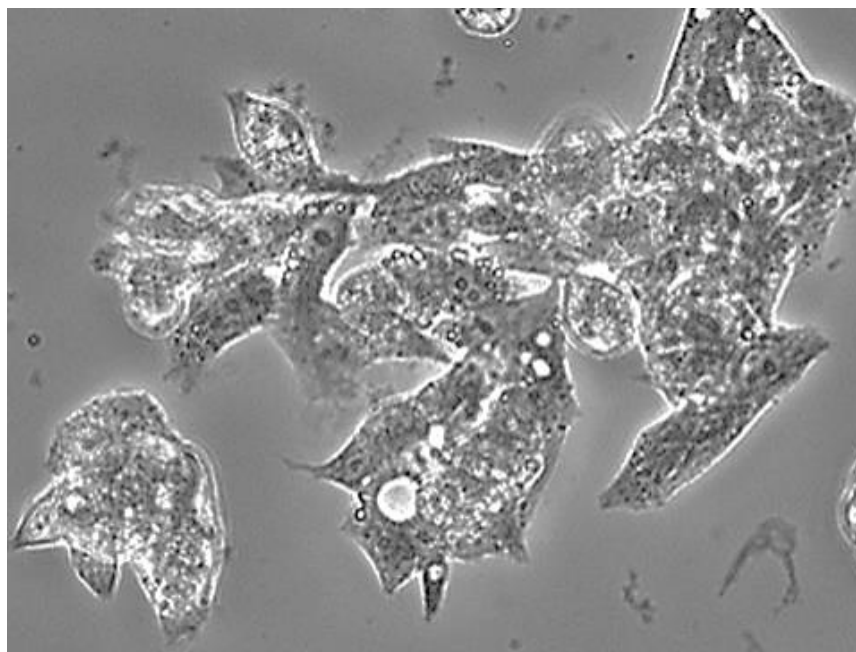
Ač nejsou kontinuální buněčné linie vždy nejvhodnějším buněčným modelem pro ověřování skutečného působení látek v lidském organismu, tak i přesto jsou někdy upřednostňovány. To, zda volit konečnou buněčnou kulturu, nebo kontinuální buněčnou linii, vždy závisí na tom, co je předmětem zájmu při testování. V rámci kontinuálních buněčných linií lze zároveň vybírat ze dvou základních kategorií, kterými jsou nádorové buněčné linie nebo uměle immortalizované buněčné linie. Využití kontinuálních nádorových buněčných linií k *in vitro* experimentům je velice časté, ale je třeba mít na paměti, že nádorově změněné buňky již nemusí být pro charakterizaci principiálních efektů některých látek zcela optimální. Existují však i výzkumy, kde je testování na vybrané nádorové linii žádoucí nebo nezbytné. Jedná se například o studium nádorové citlivosti na vybraný typ léčiva (Zeng et al., 2018). Pro studium a pochopení mechanismu působení toxických látek jsou však zase vhodnější primární buněčné kultury či uměle immortalizované buněčné linie.

Prostřednictvím nádorových buněčných linií lze díky jejich poměrně snadné dostupnosti pokrýt toxické působení látek prakticky u kteréhokoliv orgánu lidského těla. Nejčastějším předmětem zájmu při užití nádorových buněčných linií pro testování cytotoxického působení *in vitro* jsou játra, ledviny, plíce, mozek a popřípadě krevní buňky. Od každé z těchto tkání již byly odvozeny buněčné linie, které jsou díky svému původu schopny posloužit nejen při studiu efektivity účinku protinádorových léčiv, ale zároveň také jako screeningové modely při charakterizaci toxických účinků celé řady látek. Příkladem často využívané nádorové buněčné linie pro studium nefrotoxicity je buněčná linie Caki-1. Jedná se o lidskou nádorovou buněčnou linii izolovanou z buněčného karcinomu ledvin. Buňky Caki-1 jsou adherentní a vykazují rysy charakteristické pro epiteliální buňky proximálních tubulů ledvin (Glube and Langguth, 2008). Pro studium léčiv s protinádorovými účinky v souvislosti s nervovou soustavou je často využívána buněčná linie lidského neuroblastomu SH-SY5Y (Coelho et al., 2019). Její snímek z holografického mikroskopu je uveden na obrázku 2. Buňky SH-SY5Y jsou zejména využívány jako buněčný model při studiu Alzheimerovy choroby či nanomateriálů (Gurunathan and Kim, 2017; Song et al., 2015; Zhang et al., 2019).



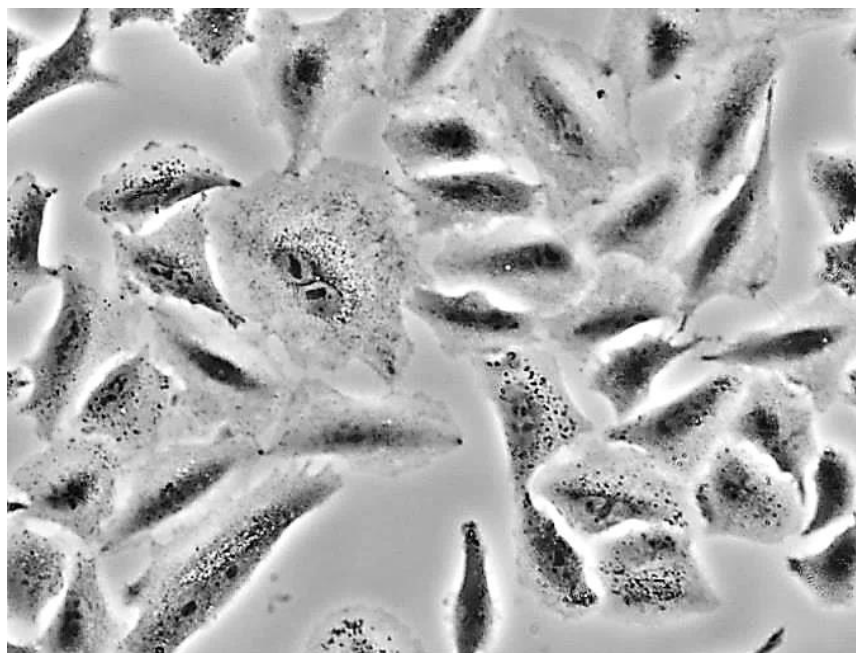
**Obrázek 2: Lidská neuroblastomová linie SH-SY5Y – holografická mikroskopie - 3D Cell Explorer; 10. pasáž.**

Podobně je tomu také u další buněčné linie HepG2 (Obr.3), jež je odvozena od buněk lidského hepatocelulárního karcinomu. HepG2 buňky lze zároveň označit za jednu z nejfrekventovaněji užívaných nádorových buněčných linií pro testování hepatotoxicity (Ramirez et al., 2017).



**Obrázek 3: Růst buněčné linie HepG2 – 12. pasáž, 200× fázový kontrast.**

Nejčastěji využívanou lidskou nádorovou buněčnou linií odvozenou od plicní tkáně je pak buněčná linie A549. Konkrétně se jedná o buněčnou linii lidského adenokarcinomu plicního epitelu II. typu (Obr. 4). Její využití je spojeno zejména se studiem metabolismu léčiv, dále s ověřováním efektivity látek s potenciálním protinádorovým účinkem a se studiem cytotoxických efektů vybraných sloučenin včetně nanomateriálů (Aslan et al., 2020; Foster et al., 1988; Samuel et al., 2020; Sangwan et al., 2020).



**Obrázek 4: Růst buněčné linie A549 – 9. pasáž, 200× fázový kontrast.**

Jako ideální buněčný model se jeví ten, který kombinuje neomezenou buněčnou životaschopnost se zachováním vlastností původní tkáně, ke které dané buňky náleží. Buněčným modelem, který ve vyšší či nižší míře splňuje kombinaci těchto dvou charakteristik, jsou uměle immortalizované buněčné linie. Obliba využití immortalizovaných buněčných linií pro *in vitro* testování v posledních letech narůstá, a to i díky tomu, že se postupně stávají komerčně dostupnějšími. Díky tomu, že jsou izolovány z tkání zdravých jedinců, nejsou tedy pozměněny jejich charakteristické vlastnosti. Znesmrtelnění izolovaných buněk pak lze provést celou řadou genetických zásahů.

Immortalizace buňky může být spontánní (Boukamp et al., 1988; Soule et al., 1990), nebo kontrolovaná, a to například prostřednictvím transfekce genetické informace virovým vektorem do buněk (Delgado et al., 2004; Ryan et al., 1994). Díky tomuto genetickému zásahu získáme buněčnou linii, která vychází z buněk původní tkáně, ale navíc získala schopnost neomezené životaschopnosti.

Během buněčného dělení dochází u fyziologicky fungujících somatických buněk ke zkracování telomer, díky tomu je zajištěna omezená buněčná životaschopnost. Jako telomery jsou označeny konce lineárních chromozomů obsahující opakující se sekvence DNA. Lidské chromozomy mají na svých koncích více než tisíc kopií hexanukleotidu TTAGGG s jednovláknovým přesahem. Ten vzniká v důsledku

neschopnosti DNA replikačního aparátu kopírovat několik posledních bazí zaostávajícího řetězce. Díky tomu dochází ke zkracování telomer. Proces imortalizace je spojen s aktivací dějů kompenzujících toto zkracování telomer. Zásadní podíl na udržování délky telomer má enzym telomeráza (Colgin and Reddel, 1999).

Důležitým aspektem přípravy imortalizované buněčné linie je proces vlastního „znesmrtelnění“. Ten může probíhat spontánně, nebo může být indukován prostřednictvím celé řady mutagenů. Spontánní imortalizace je definována jako schopnost diploidních buněk překonat senescenci, tedy proces ztráty schopnosti buněčného dělení související se stárnutím buněčné kultury, a to bez přidání exogenního činidla (Shay et al., 1991). Existují i jiné alternativní definice spontánní imortalizace, všechny se však shodují na tom, že jde o proces, při kterém buňka překoná proces stárnutí a získává schopnost neomezeného růstu bez přičinění jakéhokoliv exogenního agens. Mechanismus spontánní imortalizace není pro lidské buňky typický a spíše se s ním můžeme setkat například u buněk drobných hlodavců (Crane, 1999). Druhým základním způsobem buněčné imortalizace je imortalizace zprostředkovaná nějakým exogenním působením. Dle typu exogenního činidla můžeme rozlišit imortalizaci chemickou, fyzikální či imortalizaci biologickou zprostředkovanou prostřednictvím virů či onkogenů.

Chemická imortalizace buněk probíhá tak, že jsou buňky po určitou dobu vystaveny látce, která je schopna narušit vnitřní fyziologické buněčné procesy a zapříčinit tak buněčné znesmrtelnění. Pro tento způsob imortalizace lze využít karcinogenně působící látky. Fyzikální imortalizace využívá zejména působení ultrafialového záření nebo záření rentgenového.

Nejfrekventovanějším způsobem imortalizace buněčných kultur je imortalizace biologická. Zcela běžně jsou za tímto účelem využívány DNA nádorové viry, kam patří například lidské papilomaviry (HPV), adenoviry, nebo asi nejčastěji užívaný polyomavirus SV40. Dále jsou do skupiny činitelů biologické imortalizace řazeny onkogeny nebo antiproliferativní tumor-supresorové geny. Zmíněné HPV jsou malé nádorové DNA viry, které indukují epiteliální proliferaci a velice často způsobují benigní léze. Mohou se však podílet i na vzniku kožních maligních nádorů nebo nádorů děložního čípku. SV40 se přirozeně podílí na infekcích opičích buněk. U lidských a hlodavčích buněk vede infekce SV40 k náhodné interakci virové DNA do hostitelského genomu. Díky tomu dochází k expresi virových proteinů a mění se tak

fenotyp infikovaných buněk. Rizikovým faktorem při immortalizaci zprostředkované SV40 je potenciální možnost změny buněčných vlastností včetně ovlivnění buněčné morfologie. Z tohoto důvodu je třeba dbát zvýšené opatrnosti a sledovat případné buněčné změny (Shay et al., 1991).

### 1.3 Testování nefrotoxicity *in vitro*

Ledviny představují díky své mnohočetné funkci v lidském organismu jeden z hlavních cílových orgánů působení řady látek. Společně s játry patří ledviny mezi nejčastěji zasažené orgány z důvodu toxického působení látek (Linhartová et al., 2016; Wang et al., 2007). Vliv na jejich fyziologickou funkci může být cílený, ale většinou se jedná spíše o sekundární působení s nežádoucími negativními důsledky. Díky poměrně velkému zásobení krví bývá nežádoucí efekt některých léčiv na ledvinách značně patrný.

Funkčními jednotkami ledvin jsou nefrony. Základním prvkem nefronu je ledvinné tělísko tvořené Bowmanovým pouzdrem, v němž se nachází klubíčko drobných kapilár označované jako glomerulus. Na Bowmanovo pouzdro následně navazuje systém ledvinných tubulů v pořadí proximální tubulus, Henleova klička, distální tubulus a sběrací kanálek. Hlavní funkcí ledvinného tělíska je filtrace krve (Rhodin, 1958). Rychlost glomerulární filtrace se v průběhu života mění. V dospělosti, a pro průměrného člověka s povrchem těla 1,73 m<sup>2</sup> se její hodnota pohybuje okolo 140 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, což odpovídá přibližně 2 ml/s. Hodnota se následně každých deset let snižuje asi o 8 ml/min. Změna rychlosti renální funkce ve smyslu jejího zrychlení často souvisí s hypertenzí, aterosklerotickým onemocněním, obezitou, kouřením, případně s expozicí vybraným těžkým kovům, jako je například olovo (Weinstein and Anderson, 2010). V důsledku vedou všechny tyto rizikové faktory k postupnému poškození funkce ledvin, neboť zrychlení glomerulární filtrace koreluje se snížením všech fyziologických ledvinných funkcí (Silva, 2005; Weinstein and Anderson, 2010). V souvislosti se stárnutím lidských ledvin lze pozorovat celou řadu změn, jako je například snížení jejich hmotnosti a s tím spojenou ztrátu ledvinné hmoty a ztenčení renálního kortikálního parenchymu. Dále pokles počtu fyziologických intaktních glomerulů, či nárůst počtu sklerotických glomerulů. Z pohledu patologických změn tubulů patří mezi zásadní změny zhoršení schopnosti vylučování NaCl spojené s abnormální rovnováhou sodíku, neschopnost

maximálního zředění nebo zakoncentrování moči, poruchy transportní tubulární kapacity, neschopnost udržení optimálního pH moči a mnoho dalších. Neschopnost udržení optimálního pH moči je často spojena s jejím nadměrným okyselením, které může vést až k metabolické acidóze (Silva, 2005).

Ledviny tedy představují velmi citlivý systém lidského organismu a studium jejich patologických změn, získaných poruch či abnormalit představuje v současnosti velmi zajímavý cíl celé řady odborníků zejména z oblastí nefrologie, diabetologie či toxikologie. Současně s tím roste zájem o testování, studium a popis mechanismu nefrotoxického účinku celé řady nově připravených chemických látek. Asi největší nárůst zájmu je v současnosti zaznamenáván v oblasti testování nefrotoxického působení nových léčiv, těžkých kovů z životního prostředí, či nanomateriálů (Pujalté et al., 2011; Wilmes et al., 2011).

Společně se zájmem o testování nefrotoxického působení roste i tlak na volbu vhodných experimentálních modelů. Za základní model pro ověřování potenciální toxicity látek lze označit uspořádání *in vitro*. V současné době již existuje celá řada takovýchto buněčných modelů. Pro studium nefrotoxického působení *in vitro* lze využít poměrně širokou škálu buněčných linií, které jsou jak lidského, tak živočišného původu. Jednotlivé buněčné linie se navzájem liší nejen svým původem, ale také lokalizací v tkáni, ze které pochází. I když bylo dosud pro vývoj optimální buněčné linie provedeno mnoho studií a experimentů, ani nyní není možné jednoznačně říci, že některá z používaných buněčných linií je s ohledem na nejrůznější parametry ideální. Každá z vybraných buněčných linií má své výhody a nevýhody a pro jejich využití tedy existují jistá omezení. Přehled základních nejčastěji využívaných renálních buněčných linií včetně jejich původu je uveden v tabulce 1.

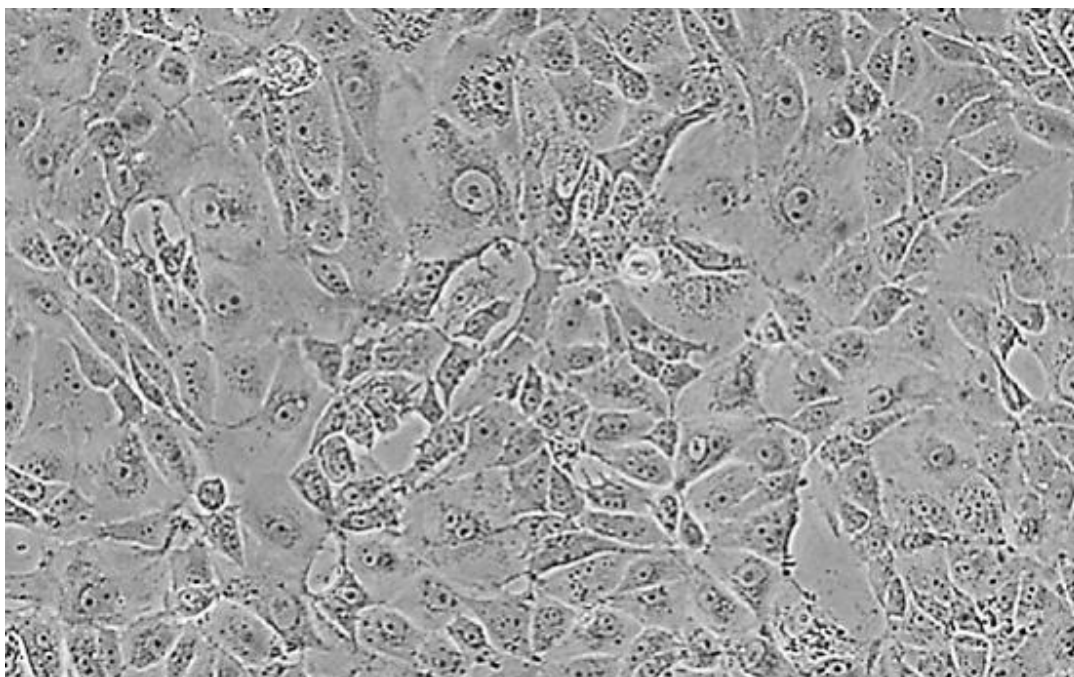
**Tabulka 1:** Přehled vybraných renálních buněčných linií – upraveno dle (Vrbová et al., 2016).

| Buněčná linie       | Původ  | Zdroj                       |
|---------------------|--|-----------------------------|
| LLC-PK <sub>1</sub> | prase Hampshire<br>( <i>Sus scrofa</i> )           | (Hull et al., 1976)         |
| HEK 293             | člověk ( <i>Homo sapiens</i> )                     | (Graham et al., 1977)       |
| HK-2                | člověk ( <i>Homo sapiens</i> )                     | (Ryan et al., 1994)         |
| MDCK                | pes ( <i>Canis familiaris</i> )                    | (Gaush et al., 1966)        |
| JTC-12              | opice ( <i>Macaca fascicularis</i> )               | (Takuwa and Ogata, 1985)    |
| NRK-52              | krysa ( <i>Rattus species</i> )                    | (De Larco and Todaro, 1978) |
| OK                  | vačice ( <i>Didelphis marsupialis virginiana</i> ) | (Koyama et al., 1978)       |

### 1.3.1 Buněčná linie LLC-PK<sub>1</sub>

Renální proximální tubulární buněčná linie LLC-PK<sub>1</sub> (*Lilly Laboratories Cell-Porcine Kidney*) představuje stabilní živočišný buněčný kmen izolovaný z prasečích ledvin. Morfologické vlastnosti buněk LLC-PK<sub>1</sub> jsou blízké vlastnostem epiteliálních ledvinných buněk prasat (Obr. 5). V rámci ověření stability buněčné linie byl nově vzniklý kmen LLC-PK<sub>1</sub> podroben dlouhodobé opakované kultivaci, přičemž si v rámci pasážování zachoval své původní charakteristické vlastnosti a nedošlo ani k jeho kontaminaci. Zároveň při testech na imunosuprimovaných laboratorních zvířatech nebyla prokázána maligní transformace LLC-PK<sub>1</sub> buněk. Naopak byla zaznamenána schopnost LLC-PK<sub>1</sub> buněk tvořit trojrozměrné struktury a agregáty (Hull et al., 1976). Právě tyto závěry postupně vedly k tomu, že se z LLC-PK<sub>1</sub> stal často používaný zvířecí buněčný model vhodným pro studium nefrotoxického působení látek (Gunness et al., 2010).





**Obrázek 5: Růst buněčné linie LLC-PK<sub>1</sub>** – upraveno dle (Negrette-Guzmán et al., 2013)

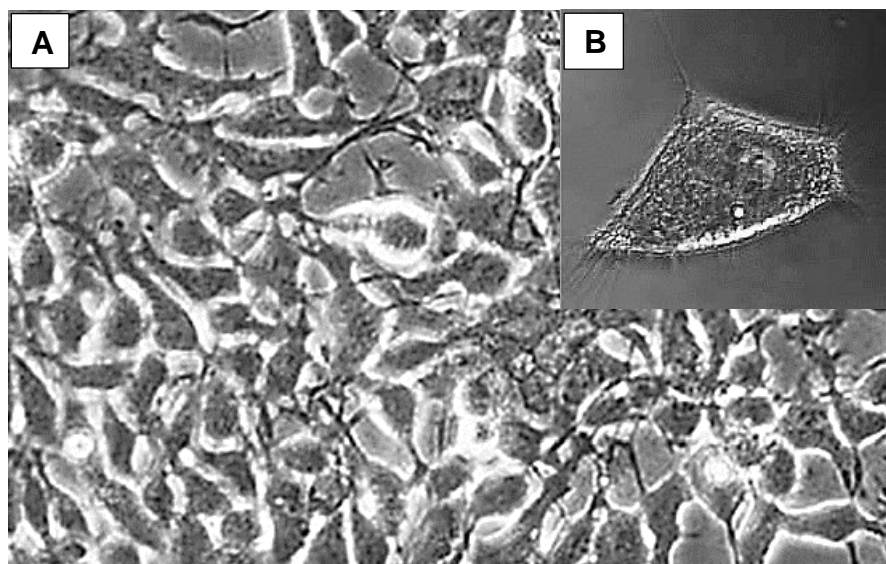
Ačkoli je buněčná linie LLC-PK<sub>1</sub> považována za proximální tubulární buněčnou linii, některé její vlastnosti pro proximální tubulární buňky nejsou typické. Díky své schopnosti 3D-růstu jsou však velmi výhodným modelem například pro studium membránového transportu (Vrbová et al., 2016). Své uplatnění nacházejí LLC-PK<sub>1</sub> buňky i v rámci studia oxidačního poškození ledvin. Příkladem takového využití je studie, která byla zaměřena na studium mechanismu poškození ledvinných buněk prostřednictvím H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Salahudeen, 1995). I v současné době je buněčná linie LLC-PK<sub>1</sub> stále využívána pro studium nefrotoxického působení. Kromě potenciálních protektivních účinků vybraných látek u ledvinných buněk poškozených cisplatinou (Lee et al., 2020), byly LLC-PK<sub>1</sub> buňky využity v poslední době i v dalších studiích. Konkrétně byl studován například transport, citlivost a intracelulární akumulace léků s protinádorovými účinky (Lian et al., 2020), nebo možnosti regulace autozomálně dominantní polycystické choroby ledvin (Perez et al., 2020).

Význam buněčné linie LLC-PK<sub>1</sub> je však v současné době trochu zastíněn, neboť jakožto zvířecí buněčný model není schopna jednoznačně pokrýt veškeré lidské farmakokinetické a farmakodynamické aspekty působení léčiv. Porovnáme-li LLC-PK<sub>1</sub> buněčnou linie a buněčnou linii HK-2, zjistíme, že HK-2 buňky představují vhodnější

buněčný pro toxikologické studie *in vitro* včetně studia léky indukované nefrotoxicity u lidí (Gunness et al., 2010).

### 1.3.2 Buněčná linie HEK 293

Buněčná linie HEK 293 (Obr. 6A, 6B) byla připravena z primární kultury lidských embryonálních ledvinných buněk, a to jejich transformací lidským adenovirem. Ačkoliv jsou HEK buňky epitelového původu, mají velice účinný biochemický aparát a lze je využít pro studium celé řady dějů, například v oblasti elektrofyzologie pro studium izolovaných receptorových kanálů (Thomas and Smart, 2005). Poměrně zásadním problémem při využívání buněčné linie HEK 293, jakožto spolehlivého *in vitro* buněčného modelu pro studium nefrotoxického působení látek, je to, že buňky HEK 293 vykazují také vlastnosti nervové tkáně. Při ověřování původu buněčné linie bylo zjištěno, že HEK 293 exprimují neurofilamentové podjednotky (NF). Konkrétně se jedná o podjednotky NF-L, NF-M, NF-H a internexin, které jsou obvykle typické spíše pro neurony. Několika nezávislými testy transformace buněčné linie HEK byl tento nálezní NF podjednotek potvrzen, avšak vždy se jednalo o buňky transformované prostřednictvím adenoviru (Shaw et al., 2002). HEK buňky byly následně podrobeny transformaci prostřednictvím SV 40, tedy stejným způsobem, jakým je transformována buněčná linie HK-2 (Ryan et al., 1994). Z výsledků následné analýzy vyplynulo, že HEK buňky transformované prostřednictvím SV40 neexprimovaly NF. Tento závěr byl zcela zásadní pro další využívání buněčné linie HEK 293 a to ve smyslu negativního pohlížení na dosavadní výsledky studií, které HEK 293 buňky považovaly za buňky blízké buňkám ledvinným. Díky tomu, že mají buňky HEK 293 velice blízký vztah k neurální tkáni, není jejich využití pro studium nefrotoxického působení látek ideální (Shaw et al., 2002). V roce 1987 byla buněčná linie HEK 293 transformována prostřednictvím viru Epstein-Barrové a byla odvozena buněčná linie HEK 293T, která postupně původní HEK 293 buňky v experimentech nahrazuje. Vznik buněčné linie HEK 293T je pravděpodobně jedním z činitelů, který stojí za tím, že jsou HEK buňky stále využívány. Některé současné studie jako například Achilli et al. (2018) se dokonce zaměřují na charakterizaci rozdílů mezi HEK 293 buňkami a primárními ledvinnými buňkami odebranými z lidských ledvin. Zásadní rozdíly byly zaznamenány zejména v expresi celé řady proteinů zapojených do vývoje a fyziologických funkcí ledvin (Achilli et al., 2018).



**Obrázek 6: Růst a morfologie buněčné linie HEK 293** – A) Kultivované buňky HEK 293 – upraveno dle (Xie et al., 2014), B) Typický pyramidový tvar netransfekované buňky HEK 293 – upraveno dle (Thomas and Smart, 2005).

### 1.3.3 Buněčná linie HK-2

Immortalizované lidské proximální tubulární buňky HK-2 (Obr. 7A, 7B) jsou buněčnou linií, kterou lze využít pro studium a testování nefrotoxického působení celé řady látek. HK-2 buňky jsou epitelálními buňkami proximálních tubulů a poprvé byly podrobně popsány v publikaci Ryan et al. v roce 1994. Jejich izolace byla provedena z ledvin zdravého dospělého člověka, přičemž následně byly tyto buňky immortalizovány transdukci lidským papillomavirem HPV 16 (Ryan et al., 1994). Buněčná linie HK-2 je adherentní buněčnou linií, což značí, že buňky rostou přisedlé na dně kultivační nádoby. Od podkladu se buňky uvolňují pouze v okamžiku, kdy se dělí. Významnou výhodou HK-2 buněk je to, že exprimují normální fenotypové znaky charakteristické pro proximální tubulární tkáň lidských ledvin a zachovávají si tak funkční vlastnosti původní tkáně, ze které byly izolovány (Gunness et al., 2010).



**Obrázek 7: Imortalizované lidské ledvinné proximální tubulární buňky HK-2**  
A) holografická mikroskopie - 3D Cell Explorer; 6. pasáž; B) 200× fázový kontrast, 6. pasáž.

HK-2 buňky jsou využívány například jako buněčný model pro studium apoptózy. Ta byla například v publikaci Sohn et al., 2013 indukována u HK-2 buněk prostřednictvím cisplatinu. Účinek cisplatinu byl zkoumán z pohledu změn proteinových hladin. Studovány byly hladiny molekuly poškození ledvin (KIM-1), clusterinu, calbindinu, tkáňového inhibitoru metaloproteinázy (TIMP-1), cystatinu C (CysC) nebo například neutrofilního s gelatinázou asociovaného lipocalinu (NGAL), jakožto potvrzeného markeru nefrotoxicity (Hauschke et al., 2017). Hladiny proteinů

KIM-1, calbindinu a TIMP-1 byly u HK-2 buněk ovlivněných cisplatinou signifikantně zvýšeny, zatímco CysC, NGAL a clusterin nebyly působením cisplatinou signifikantně ovlivněny. Z výsledků zmíněné studie vyplývá, že pro studium nefrotoxického působení na HK-2 buněčnou linii *in vitro* je vhodné jako biomarkery nefrotoxicity využívat zejména KIM-1, calbindin a TIMP-1 (Sohn et al., 2013).

HK-2 buňky lze kultivovat v kultivačním médiu DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) doplněném o L-glutamin, 10 % fetálního hovězího séra (FBS), streptomycin a penicilin (Pujalté et al., 2011). Pro kultivaci HK-2 buněk lze však využít i médium KSF „*Keratinocyte Serum Free Medium*“ obohacené o hovězí hypofyzární extrakt, lidský rekombinantní epidermální růstový faktor, penicilin a streptomycin (Fang et al., 2014). Jako méně vhodné pro kultivaci HK-2 buněk se jeví médium RPMI s 10 % FBS, penicilinem a streptomycinem (Wilson et al., 2005). Vysoké množství séra bohatého na bílkoviny se ukázalo být ne zcela výhodné pro některé účely. Zásadní problém představuje FBS například zejména pro studie zaměřené na testování nefrotoxického působení nanomateriálů. Zde může docházet vlivem FBS k aglomeraci nanomateriálů do větších klastrů. Tento problém je možné pozorovat jak při použití kultivačního média RPMI, tak při použití KSF média a celé řady dalších. Jedna z teorií se přiklání k tomu, že při interakci séra s nanomateriály se nanomateriály stanou pro buňku více biologicky dostupné, a tedy buňky kultivované v médiu s vyšším obsahem séra jsou jejich cytotoxickým působením více zasaženy (Kermanizadeh et al., 2013).

### **1.3.3.1 Studium nefrotoxicity nanomateriálů**

Buněčná linie HK-2 je často zmiňovanou ledvinnou buněčnou linií pro testování nefrotoxického působení nanomateriálů. Její role v experimentech zaměřených na studium a charakterizaci nefrotoxicity je zcela zásadní a zejména ve studiu toxicity nanočástic představuje jeden z nejrozšířenějších buněčných modelů. Nanočástice a obecně nanomateriály mají obrovský potenciál uplatnění, a to nejen ve strojírenství a elektronice, ale také například v medicíně. Vedle celé řady výhod, které vývoj nanomateriálů všeobecně přinesl, jde ruku v ruce i jejich negativní stránka, a tou je potenciální škodlivý účinek na lidské zdraví. Jako jeden z hlavních činitelů toxického působení nanomateriálů je označována tvorba ROS a s nimi spojená indukce oxidačního stresu (Kermanizadeh et al., 2013; Piao et al., 2011). Negativní působení

nanočástic je v první řadě spojeno s jejich vdechováním, což je v přímé souvislosti s jejich velikostí. Primárním cílovým orgánem toxicity nanočástic jsou tedy plíce (Pujalté et al., 2011).

Sekundárním cílem toxického působení nanočástic jsou právě ledviny, které hrají důležitou roli v odstraňování nanomateriálů z organismu. Proximální tubulární buňky HK-2 byly jako hlavní buněčný model použity pro celou řadu studií. Příkladem jejich využití je studie Pujalté et al. (2011) zaměřená na posouzení negativního působení průmyslově běžně používaných nanočástic  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$  a  $\text{CdS}$ . V této studii byl studován jejich vliv na životaschopnost buněk HK-2 a IP15 za použití většího počtu základních testů buněčné viability: neutrální červeň (NR), MTT a WST-1 (Pujalté et al., 2011). Studie L'Azou et al., 2008, využila taktéž buňky HK-2 a IP15 (L'Azou et al., 2008) pro studium toxicity totožných nanočástic. Cytotoxické působení nanočástic na HK-2 buněčnou linii bylo spojeno se změnami morfologie ovlivněných buněk a zároveň docházelo i ke ztrátě schopnosti adheze ke kultivační nádobě (Pujalté et al., 2011). Studie Kermanizadeh et al. (2013) zároveň přináší zprávu o tom, že vysoce toxicky na HK-2 buňky působí také nanočástice obsahující Ag. Velmi zajímavé jsou také výsledky testování cytotoxicity „Multi walled carbon nanotubes“ (MWCNT). Ty se ukázaly být pro HK-2 buňky relativně netoxické (Kermanizadeh et al., 2013). Cytotoxické působení MWCNT bylo v řadě publikací studováno na jiných buněčných liniích, a to z pohledu plicní toxicity u buněk A549 (Visalli et al., 2015), z pohledu hepatotoxického (Ahmad et al., 2012) nebo z pohledu neurotoxického (Eldridge et al., 2017).

To, že je buněčná linie HK-2 jedním z často používaných buněčných modelů pro testování nanotoxicity, potvrzují i další studie. V jedné z nich byly na HK-2 buňkách testovány ultramalé nanočástice  $\text{Gd}_2\text{O}_3$  pokryté hydrofobní kyselinou olejovou. Ledviny totiž hrají klíčovou úlohu při odstranění gadoliniových kontrastních činidel z organismu. Na modelu HK-2 buněk bylo prokázáno, že tyto nově nasyntetizované  $\text{Gd}_2\text{O}_3$ -PVP nanočástice vykazují pouze zanedbatelné cytotoxické působení (Fang et al., 2014). Cytotoxicita  $\text{SiO}_2$  nanočástic rozdílných velikostí byla sledována na buněčných liniích HK-2 a LLC-PK<sub>1</sub>. Z výsledků vyplývá, že toxicita je přímo závislá na době inkubace a na velikosti částic. Menší nanočástice působí více cytotoxicky (Passagne et al., 2012).

### 1.3.3.2 Nefrotoxicita kadmia

Lidské ledviny jsou vystaveny působení celé řady škodlivých látek, které negativně ovlivňují jejich funkci a vykazují vyšší, či nižší míru toxicity. Mezi látky s vysokou mírou toxicity můžeme zařadit těžké kovy jako je rtuť, olovo nebo kadmium. Právě nefrotoxické působení těžkých kovů je vedle nefrotoxického působení nanomateriálů jednou z nejfrekventovanějších oblastí, kde se s *in vitro* testováním na HK-2 buňkách setkáváme.

Těžkým kovem, který je hlavním předmětem zájmu ve většině studií zabývajících se nefrotoxicitou těžkých kovů, je kadmium. Kadmium (Cd) je prakticky všudypřítomné a jeho toxicita je patrná již při nízkých koncentracích (Tobwala et al., 2014). Už mikromolární koncentrace kadmia dokáží indukovat zvýšenou produkci reaktivních kyslíkatých forem a působit tak toxicky (Thévenod and Friedmann, 1999). V různě velkých množstvích nacházíme Cd ve vodě, v půdě i v ovzduší (Li et al., 2016; Wester et al., 1992). Cd může mít v organismu jak akutní, tak chronické toxické účinky. Toxický účinek kadmia je nejběžněji nalézán v ledvinných, jaterních či neurálních buňkách (Fongsupa et al., 2015). Negativně však Cd působí i na kosti, imunitní systém a krevní systém (Fongsupa et al., 2015; Klaassen et al., 2009; Li et al., 2016).

Na buněčné úrovni existuje celá řada mechanismů, kterými je toxicita kadmia zprostředkována. Dojde-li v buňce ke ztrátě rovnováhy mezi produkcí oxidantů a mezi obrannými antioxidačními mechanismy, dochází k ději, který je označován jako oxidační stres. V procesu cytotoxického a zejména neurotoxického působení těžkých kovů, včetně kadmia, hraje indukce oxidačního stresu klíčovou roli (Tobwala et al., 2014). Experimentální důkazy naznačují, že kadmium už při nízkých koncentracích indukuje genetické mutace prostřednictvím oxidačního poškození DNA a také snižuje genetickou stabilitu inhibicí oprav endogenních a exogenních lézí DNA. Toto vše dohromady má za následek zvýšení pravděpodobnosti vzniku nádorového bujení (Filipič, 2012). Jedním z konkrétních účinků kadmia je jeho negativní působení na epigenetický přenos buněčné informace mezi jednotlivými generacemi buněk. Jako epigenetické změny jsou označovány chemické modifikace DNA nebo histonů, které mění strukturu chromatinu bez změny DNA nukleotidové sekvence. Tyto dědičné epigenetické změny zahrnují metylaci DNA či posttranslační modifikace. Cd je schopno indukovat epigenetické změny jak v rostlinných, tak živočišných buňkách.

Dostupné výsledky studií (Wang et al., 2012) naznačují zapojení epigenetických změn do karcinogenních účinků doprovázejících toxicitu kadmia.

Bylo prokázáno, že kadmium je schopno indukovat produkci  $H_2O_2$  v buňkách HK-2 a zejména při chronické expozici vyvolávat renální toxicitu (Wilmes et al., 2011). Kadmium je také schopno prostřednictvím ROS poškozovat buněčné transportní proteiny (Thévenod and Friedmann, 1999). Při zvýšené produkci ROS dochází u kadmii exponovaných buněk k degradaci  $Na^+/K^+$  - ATPázy proteasomálními a endolysosomálními cestami. Imunofluorescenčním značením  $Na^+/K^+$  - ATPázy bylo dle publikace Thévenod a Friedmann (1999) prokázáno, že v plazmatické membráně buněk exponovaných kadmii došlo ke snížení exprese určitých proteinů. K závěru, že oxidační stres lze považovat za hlavní mechanismus buněčného poškození kadmii, se přiklání i studie (Kim and Sharma, 2006), která zároveň vyzdvihuje příspěvek aktivace kaspázy 3 k tvorbě ROS.

Důležitým faktorem toxicity Cd je stav glutathionu (*GSH*). *GSH* díky své antioxidační schopnosti hraje významnou roli ve snížení toxického působení Cd (Zahir et al., 1999). Cd je schopno významně snížit intracelulární hladiny glutathionu (López et al., 2006). Experimentální modulace buněčných hladin glutathionu byla zkoumána v souvislosti s rolí glutathionu v toxicitě kadmia a dosažené výsledky ukázaly, že intracelulární *GSH* působí v ochraně proti akutní toxicitě Cd jako první obranná linie do doby, než dojde k indukci syntézy metalothioneinu (Singhal et al., 1987). Volné kadmium ve formě iontu je pro buňky silně toxické a jeho vazbou do komplexu s metalothioneinem se jeho toxicita výrazně snižuje (Prozialeck and Edwards, 2012).

Při intoxikaci organismu kadmii probíhá jeho transport buď endocytózou komplexů  $Cd^{2+}$  a transportních proteinů, jako je albumin či právě metalothionein, nebo může být transport zprostředkován membránovými transportéry. Ty však zprostředkují přenos pouze Cd, které je koordinačně kovalentní vazbou spojeno v komplex s nízkomolekulárními biomolekulami obsahujícími thiolovou skupinu (glutathion, cystein). Kadmium ještě může pro vstup do buněk využít membránové kanálky dvojmocných iontů, jako jsou  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  či  $Fe^{2+}$  a vázat se na jejich místa, a to díky schopnosti označované jako „iontové mimikry“ (Bridges and Zalups, 2005).

Kadmium dokáže také indukovat expresi a aktivaci pro-apoptotických proteinů, včetně kaspáz. Testování na myším modelu potvrdilo zapojení vnější i vnitřní



apoptotické cesty se zvýšenou expresí proteinů spojovaných s apoptózou, včetně kaspáz 3, 8 a 9, u apoptózy indukované prostřednictvím Cd. Nefrotoxicitu vyvolanou kadmiem lze ovlivnit prostřednictvím chemokinů TGF $\beta$ 1. Tento chemokin inhibuje apoptózu proximálních tubulárních buněk a mohl by tedy být součástí strategie blokování nefrotoxicity indukované kadmiem (Huang et al., 2017b). Současně je Cd schopno regulovat genovou expresi ubikvitin-konjugujícího enzymu E2D (*UBE2D*, *ubiquitin-conjugating enzyme E2D*). Navíc existuje vztah mezi indukcí apoptózy závislou na UBE2D a p53 (Lee et al., 2015). Kadmiem může tedy indukovat buněčnou smrt přes mechanismus apoptózy, ale také prostřednictvím mechanismu nekrózy. Ta je spojena s peroxidací lipidů, která je kadmiem nepřímo indukována přes působení ROS (López et al., 2006).

Studie Shrestha et al. (2017) zaměřená na porovnání buněčných linií využitelných pro testování nefrotoxicity odhalila, že akutní expozice Cd má za následek apoptotickou smrt HK-2 buněk (Shrestha et al., 2017). Právě využití HK-2 buněk jako buněčného modelu pro studium nefrotoxického působení kadmia je v odborné literatuře poměrně hojné. Podle další studie (Ge et al., 2017) je významným prvkem v mechanismu toxicity kadmia zejména konexin 43. Ten zprostředkovává změny fosforylace proteinů v HK-2 buňkách během chronické expozice kadmiu (Ge et al., 2017). Studie Fongsupa et al. (2017) ukázala, že CdCl<sub>2</sub> stimuluje expresi fosforylace c-jun N-koncové kinázy (*JNK*). Indukce fosforylace JNK byla stimulována po produkci ROS. Apoptotickou buněčnou smrt HK-2 buněk zprostředkovanou kadmiem tedy lze snížit prostřednictvím inhibice tvorby ROS a inhibice JNK aktivace (Fongsupa et al., 2015).

Pro posouzení cytotoxického působení kadmia u buněčné linie HK-2 lze uplatnit zejména testy založené na detekci změny fluorescence s využitím intracelulárních fluorescenčních sond. Hlavním doplňujícím testem, který byl po testování buněčné viability využit, byl test měření hladiny intracelulárního antioxidantu glutathionu. Dále byl u buněk inkubovaných s kadmiem posuzován stav kondenzace jaderného chromatinu, hodnocena produkce ROS a posuzována aktivita kaspáz.

## 1.4 Hodnocení funkčního stavu buněk

Existuje celá řada postupů, které využívají pro sledování cytotoxického působení látek *in vitro* modely. Mezi základní, v praxi používané testy pro studium působení toxických látek patří biochemické testy, enzymové analýzy, testy vazeb buněčných receptorů, imunoanalytické testy a další přístupy. Buněčná viabilita představuje hlavní parametr, který je při sledování působení potenciálně toxických látek na buňky posuzován. Toxické látky často působí prostřednictvím indukce oxidačního stresu, díky čemuž dochází ke změnám hladin antioxidačních látek. Z tohoto důvodu je jedním ze studovaných parametrů míry oxidačního stresu koncentrace intracelulárního antioxidantu glutathionu. Zároveň lze oxidační stres posuzovat i prostřednictvím produkce reaktivních forem kyslíku. Dalším sledovaným parametrem mohou být změny buněčného jádra. Prostřednictvím fluorescenčních sond lze posoudit míru kondenzace jaderného chromatinu, ale zároveň také například aktivitu mitochondrií.

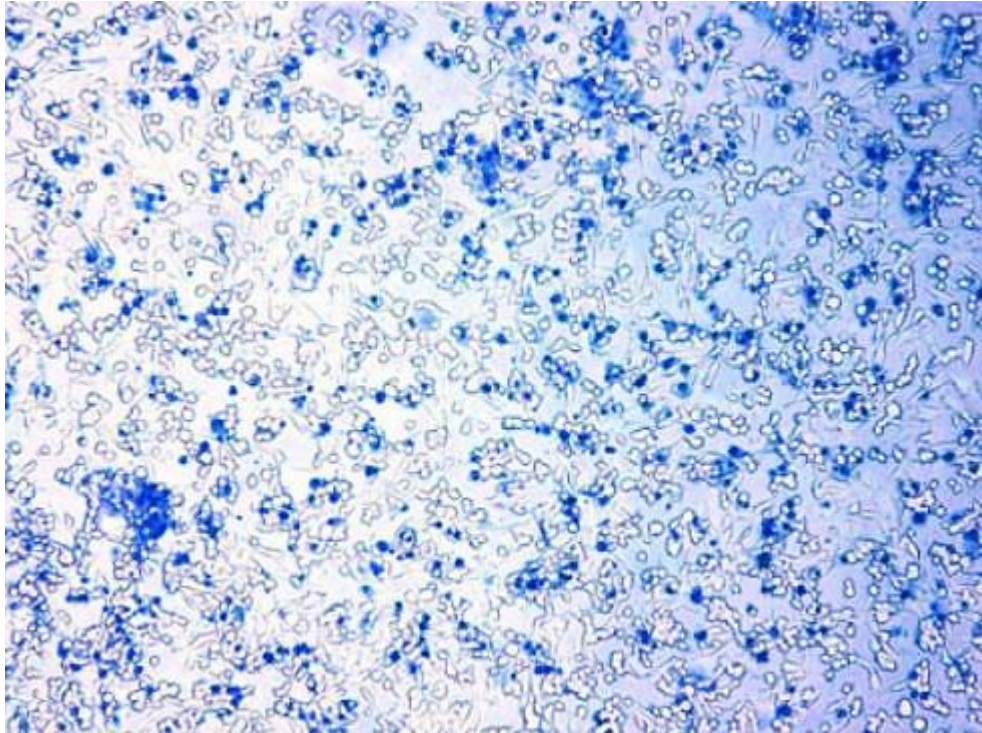
### 1.4.1 Testování buněčné viability

Znalost přesného množství viabilních buněk je nezbytná nejen pro optimální buněčnou kultivaci, ale i pro *in vitro* prováděné experimenty. Počet životaschopných buněk je třeba určit na začátku prováděného experimentu, kdy jsou buňky o zvolené denzitě nasazovány do kultivačních nádob, ale zároveň i na konci experimentu, kdy je nutné zhodnotit například jaký počet životaschopných buněk po inkubaci s toxickou látkou zůstal (Riss et al., 2018). Stanovení buněčné viability je tedy jedním ze základních sledovaných parametrů při *in vitro* testování účinků potenciálně toxických látek na buněčných liniích. Jejeho sledování je však využíváno nejen pro studium případných cytotoxických účinků látek, ale také například při hledání optimálních kultivačních podmínek, nebo při kontrole míry vlivu zamrazení. Pro hodnocení buněčné viability lze využít celou řadu analytických testů. Ty jsou většinou charakterizovány jako analytické postupy definované konkrétní sadou vybraných činidel. Prostřednictvím těchto činidel je následně generován detekovatelný signál, na základě něhož je možné studovaný biologický proces kvantifikovat (Riss et al., 2018).

Metody pro určení buněčné viability lze rozdělit do čtyř základních kategorií. Do první kategorie patří metody, které jsou založeny na předpokladu zachované membránové a funkční integrity živých buněk. Druhá kategorie je spojena s testováním funkčnosti buněčného metabolismu. Třetí kategorií nebo spíše metodou je testování buněčné schopnosti tvořit ATP. Tato metoda je někdy také řazena do kategorie druhé k metodám spojeným s testováním funkčního buněčného metabolismu. Čtvrtá kategorie je pak založena na předpokladu, že každá živá buňka je schopná se množit. Základem pro využití tohoto posledního zmíněného čtvrtého předpokladu pro stanovení buněčné viability je optimalizace množství nasazených buněk. Pokud tedy buňky dostatečně naředíme a kultivujeme-li je ve vhodném kultivačním médiu, tak každá živá buňka je schopna dát vzniknout jedné kolonii buněk. Tento princip je označován jako metoda CFU (*Colony Forming Units*) a její využití je spojeno zejména s počítáním bakteriálních kolonií a s kultivací kmenových buněk (Nakahata and Ogawa, 1982).

#### **1.4.1.1 Testování membránové integrity**

Možností první volby při testování viability jsou testy zachovalé membránové integrity. Viabilitu lze v jejich případě posuzovat pomocí kolorimetrických a fluorimetrických testů. Kolorimetrické stanovení buněčné viability lze provádět pomocí methylenové nebo trypanové modři, například v podobě testu „*Trypan Blue Exclusion Assay*“ (Fridman et al., 2007). Fluorimetrické testy pak využívají propidium jodid pro jeho schopnost vazby na DNA. Základním předpokladem tohoto typu testů je to, že použité barvivo proniká pouze do buněk, které mají porušenou plasmatickou membránu (Obr. 8). Vzhledem k toxicitě používaných barviv existuje možnost jistého zkreslení stanovované viability. V případě, že by byly tyto látky inkubovány delší dobu s buňkami, řádově desítky minut, došlo by postupně k odumření všech pozorovaných buněk. Tomu však lze částečně předcházet rychlým zhodnocením obarveného preparátu. Pro zhodnocení viability a počítání živých (neobarvených) a mrtvých (obarvených) buněk lze pro tento typ metod využít Bürkerovu komůrku, nebo modernější přístup spojený s obrazovou analýzou.



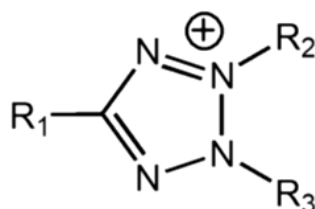
**Obrázek 8: Barvení trypanovou modří u buněčná linie lidského melanomu**  
Mrtvé buňky s porušenou plasmatickou membránou jsou obarveny modře, živé buňky jsou bezbarvé – upraveno dle (Fridman et al., 2007).

#### **1.4.1.2 Detekce aktivity buněčného metabolismu**

Velmi rozšířenými testy pro sledování buněčné viability jsou testy založené na posouzení funkčnosti buněčného metabolismu. Předpoklad těchto testů je takový, že živé buňky mají plně zachovalý buněčný metabolismus a jsou tak schopny známým způsobem metabolizovat vybrané látky. Všechny testy buněčného metabolismu vyžadují inkubaci buněk s vybraným činidlem, přičemž populace životaschopných buněk je schopna převést substrát, jenž je hlavní složkou přidávaného činidla, na barevný nebo fluorescenční produkt. Takto vzniklý produkt je následně možné detekovat měřením absorbance, fluorescence či luminiscence. Množství vzniklého produktu je zpravidla úměrné množství přítomných životaschopných buněk. Umírající buňky naopak velmi rychle ztrácí schopnost přeměny substrátu na produkt (Riss et al., 2018).

Mezi zástupce této skupiny testů patří testy založené na tetrazoliových solích, testy proteázové nebo jiné enzymatické aktivity životaschopných buněk. Pravděpodobně nejčastějším příkladem látek, které lze pro testování funkčního buněčného metabolismu využít, jsou tetrazoliové soli (Riss et al., 2018). Existuje

poměrně široké spektrum testů lišících se v typu použité tetrazoliové soli a zároveň také částečně i v postupu provedení daného testu. Základním principem testů je redukce bezbarvých tetrazoliových solí na barevné formazanové produkty. Ty byly popsány již před více než sto lety, ale ve své době neměly významnějšího využití. V 80. letech 20. století byl pak postupně odhalen jejich potenciál fungovat jako sondy pro určení buněčné životaschopnosti, nebo spíše jako indikátory buněčné metabolické aktivity (Stockert et al., 2018). Základní struktura kationického tetrazoliového kruhu je zobrazena na obrázku 9. Chemická struktura jednotlivých typů tetrazoliových solí se do značné míry liší. Vedle monotetrazoliových solí existují také soli ditetrazoliové, avšak jejich vlastnosti se liší. Pro studium buněčné životaschopnosti lze využít pouze soli monotetrazoliové. Ditetrazoliové soli jsou naopak poměrně hojně uplatňovány v histochemických aplikacích (Horobin, 1982).

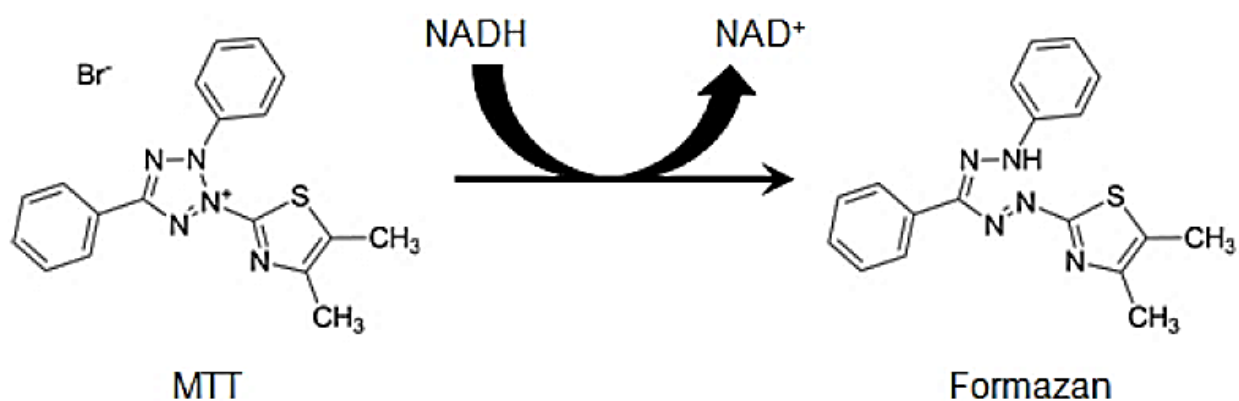


**Obrázek 9: Struktura kationického tetrazoliového kruhu** – Redukovaný formazanový produkt s aromatickými kruhy  $R_1$ ,  $R_2$  a  $R_3$  – (Stockert et al., 2018).

Testů buněčné viability, které metabolickou přeměnu tetrazoliových solí na barevné formazanové produkty využívají, je celá řada. Mezi nejčastěji používané sloučeniny patří: MTT, MTS, XTT a WST-1. Názvy jednotlivých testů se následně odvíjejí dle použitého typu tetrazoliové soli. Na základě povrchového náboje tetrazoliové soli rozlišujeme dvě hlavní kategorie těchto testů. První kategorie zahrnuje test MTT, ve kterém tetrazoliová sůl nese kladný náboj a snadno proniká do životaschopných eukaryotických buněk. Druhou kategorií jsou testy MTS, XTT a WST-1, které jsou záporně nabitě a díky tomu nepronikají snadno přes buněčnou membránu. Testy MTS, XTT a WST-1 se obvykle používají s přechodným akceptorem elektronů, který může přenášet elektrony z cytoplazmy nebo plazmatické membrány, a usnadní tak redukci tetrazoliové soli na barevný formazanový produkt.

Jedním z nejčastěji používaných testů pro určení buněčné viability, buněčné proliferace a také buněčné citlivosti na posouzení cytotoxicity v *in vitro* systémech je

test MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid). Zároveň se jedná o první spolehlivý test využívající vlastnosti tetrazoliových solí pro homogenní zhodnocení buněčné životaschopnosti v 96jamkové mikrotitrační destičce (Riss et al., 2018). Výhodou MTT testu je jeho malá časová náročnost a možnost poloautomatického uspořádání. Lipofilní charakter a přítomnost kladného náboje na povrchu tetrazoliové soli jsou rozhodujícími parametry pro snadnou absorpci živými buňkami. Zejména lipofilní charakter tetrazoliové soli jí zajišťuje snadnou prostupnost cytoplasmatickou membránou buněk. Principem stanovení buněčné viability prostřednictvím MTT testu je taková, že viabilní buňky jsou schopny zejména prostřednictvím svých dehydrogenáz redukovat původně žlutou tetrazoliovou sůl MTT na fialovomodrý formazanový produkt (Obr. 10). Vzniklý formazanový produkt je nerozpustný a jeho množství lze následně po odstranění kultivačního média stanovit extrakcí minerálním olejem nebo dimethylsulfoxidem DMSO a následným kolorimetrickým stanovením. Mitochondriální dehydrogenázy byly původně považovány za činitele redukce MTT tetrazoliové soli. V současné době je však za hlavního činitele redukce MTT považován koenzym NAD(P)H a glykolytické enzymy endoplasmatického retikula. Redukce MTT by tedy měla být považována spíše za míru rychlosti produkce NAD<sup>+</sup> (Stockert et al., 2018).



**Obrázek 10: Redukce tetrazoliové soli MTT na formazanový produkt** (Riss et al., 2018).

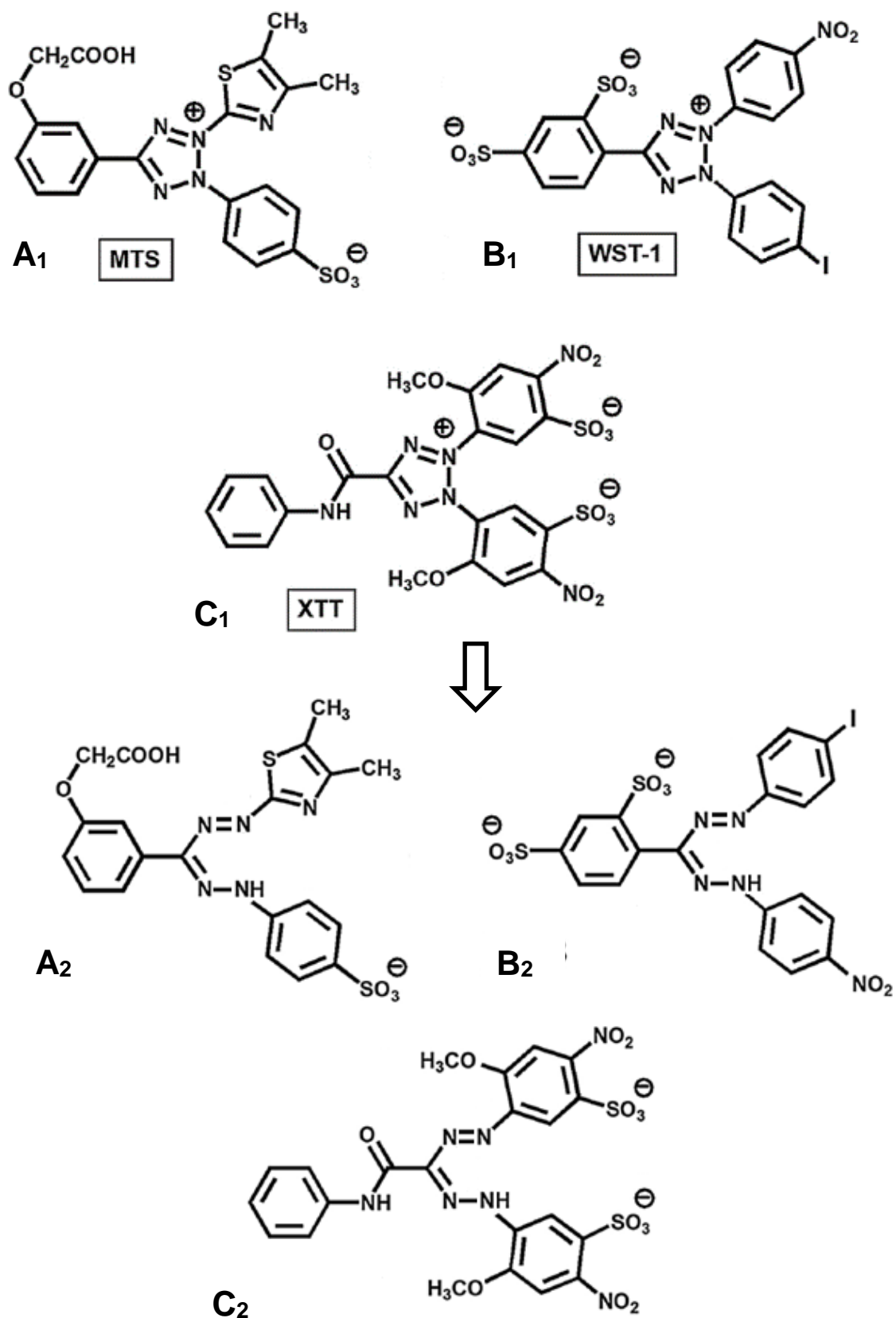
Vlastní MTT substrát je před analýzou připravován čerstvý a následně je k buněčným kulturám přidáván obvykle v konečné koncentraci 0,2-0,5 mg/ml při inkubaci trvající 1-4 hod. Změna zbarvení zprostředkovaná přírůstkem fialově zbarveného formazanového produktu je zpravidla zaznamenávána měřením změn absorbance při vlnové délce absorpčního maxima (570 nm) pomocí spektrofotometru.

Počet životaschopných buněk by měl být přímo úměrný množství vznikajícího formazanu (Riss et al., 2018).

Velmi významnou roli ve stanovení buněčné viability hrají sulfonované tetrazoliové soli MTS, WST-1 a XTT (Obr. 11A<sub>1</sub>, 11B<sub>1</sub> a 11C<sub>1</sub>). Tuto skupinu tetrazoliových solí lze označit jako sekundární generaci tetrazoliových solí. Jejich buněčný příjem je do značné míry omezen jejich hydrofilním charakterem a z tohoto důvodu se obvykle používají s přechodným akceptorem elektronů (Stockert et al., 2018; Yin et al., 2013).

Princip fungování sulfonované tetrazoliové soli WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) jako markeru buněčné viability je založen na odlišném redukčním mechanismu, než je tomu například u MTT testu. WST-1 test měří konkrétně aktivitu intra- a extramitochondriálních dehydrogenáz. Předpokládá se, že WST-1 se na rozdíl od MTT díky svému amfifilnímu charakteru hromadí v cytoplazmatické membráně. Pro zajištění redukce mimo vnitřní prostředí buňky jsou u sulfonovaných tetrazoliových solí využívány přechodné akceptory elektronů, jako je 1-methoxy-5-methyl-phenazinium methyl sulfát (PMS) nebo menadion, které pomáhají přenášet elektrony. Velikou výhodou WST-1 tetrazoliové soli je, že po její redukci dochází ke vzniku sulfonovaného formazanového produktu (Obr. 11B<sub>2</sub>), který je rozpustný, a netvoří se tedy žádné extracelulární krystaly formazanu (Stockert et al., 2018).

XTT tetrazoliová sůl (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid) je ve vodném prostředí dobře rozpustná taktéž (Knight, 2006). V živých buňkách je redukována na oranžový formazanový produkt (Obr. 11C<sub>2</sub>). Enzymem, který se na této redukci pravděpodobně podílí, je sukcinát-tetrazoliumreduktáza. XTT test stejně tak jako test WST-1 jsou pro stanovení buněčné viability výhodné i z toho důvodu, že při jejich použití není třeba vzniklý formazanový produkt rozpouštět ve speciálním rozpouštědle (Roehm et al., 1991). Na rozdíl od MTT testu je u XTT a WST-1 testů formazanový produkt ve vodě přirozeně rozpustný (Wang et al., 2011). Posledním testem využívajícím sulfonovanou tetrazoliovou sůl je MTS test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Produktem MTS testu je opět ve vodě rozpustný formazanový produkt (Obr. 11A<sub>2</sub>), jehož intenzita je kvantifikována měřením absorpance při 490 nm (Patel et al., 2005).

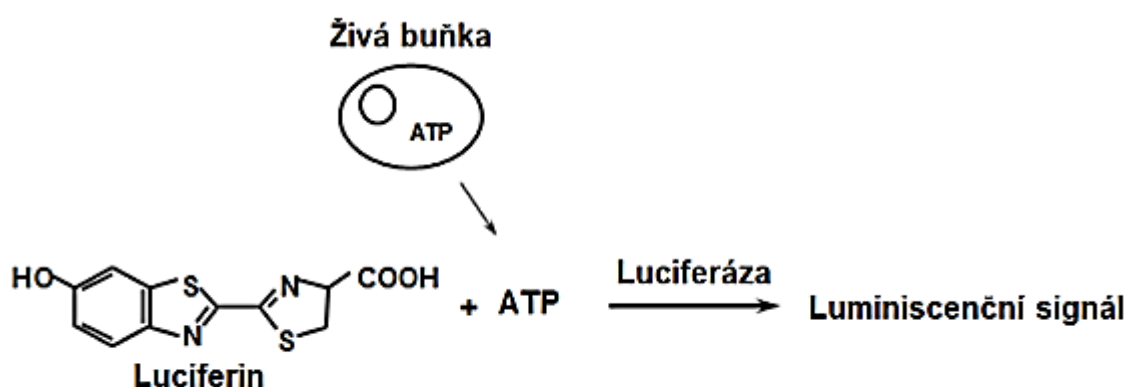


Obrázek 11: Struktury sulfonovaných tetrazoliových solí A<sub>1</sub>) MTS; B<sub>1</sub>) WST-1; C<sub>1</sub>) XTT a formazanové produkty těchto tetrazoliových solí odvozené od: A<sub>2</sub>) MTS; B<sub>2</sub>) WST-1; C<sub>2</sub>) XTT 1 – upraveno dle (Stockert et al., 2018).



### 1.4.1.3 Tvorba ATP

Pro zjištění počtu životaschopných buněk lze využít i měření hladiny adenosintrifosfátu (ATP). Hladina ATP byla přijata jako velice validní ukazatel buněčné viability z toho důvodu, že pokud dojde ke ztrátě integrity buněčné cytoplasmatické membrány, tak buňka prakticky okamžitě ztrácí schopnost syntetizovat ATP (Riss and Moravec, 2004). Zbývající ATP v cytoplasmě je zároveň rychle vyčerpáno endogenními ATPázami. Nejčastěji používaným způsobem je stanovení ATP prostřednictvím luciferázy. Detekční činidlo musí obsahovat roztok detergentu pro buněčnou lyzi a inhibitory ATPázy pro stabilizaci stanovovaného ATP uvolňovaného z lyzovaných buněk. Zároveň musí obsahovat luciferin, jako substrát, a stabilní formu luciferázy, která v reakci funguje jako katalyzátor. Výsledkem reakce je vznik fotonů. Reakční schéma pro stanovení ATP je uvedeno na obrázku 12. ATP test je označován za nejrychlejší, nejcitlivější a k artefaktům nejméně náchylný test buněčné životaschopnosti (Riss et al., 2018). Luminiscenční signál, který při dané reakci měříme, se stabilizuje do 10 min od okamžiku přidání reakčního činidla a jeho stabilita je v řádu několika hodin. Významnou výhodou oproti testům založeným na tetrazoliových solích je to, že není třeba čekat na vznik barevné sloučeniny. Zároveň je test velice citlivý a typicky lze signál zaznamenat už při testování velmi malého množství buněk v jedné jamce mikrotitrační destičky (Riss et al., 2018).



Obrázek 12: Stanovení ATP: reakční schéma – upraveno dle (Riss et al., 2018).

### 1.4.2 Stanovení koncentrace glutathionu

Pro měření hladiny hlavního intracelulárního antioxidantu, glutathionu, lze využít celou řadu analytických metod. Patří mezi ně metody chromatografické, elektrochemické, spektrofotometrické a také hmotnostní spektrometrie. V literatuře se setkáváme s využitím kapalinové chromatografie, a to zejména díky její vysoké specifitě a citlivosti, která samozřejmě souvisí s typem použitého detektoru (Garcia et al., 2008). Lze využít i metody bioluminiscenční, plynovou chromatografii nebo kapilární elektroforézu. Nejčastějším způsobem měření hladiny glutathionu je však spektrofotometrická metoda (Tipple and Rogers, 2012). Do popředí se v posledních letech dostává využití fluorimetrických testů. Výhodou je jejich vysoká citlivost a specifita spojená s časovou nenáročností. Nejčastěji používanou fluorescenční sondou pro stanovení hladiny glutathionu je *o*-ftalaldehyd, který s glutathionem reaguje za vzniku vysoce fluorescenčního produktu. Mezi další fluorescenční sondy patří tzv. bimány. Do bimánových sloučenin lze zařadit monochlorobimán (MCB) a monobromobimány (Čapek et al., 2017). Jejich výhoda spočívá především v tom, že na rozdíl od *o*-ftalaldehydu jsou bimány schopny proniknout do buňky přes cytoplasmatickou membránu a reagovat tak přímo s buněčnými thioley. *o*-ftalaldehyd není schopen do buněk jednoduše vstupovat a vlastní postup stanovení glutathionu je nutné doplnit o lyzační krok. Následné stanovení hladiny glutathionu je prováděno z lyzátu, do kterého se z lyzovaných buněk glutathion uvolnil (Roušar et al., 2012).

### 1.4.3 Kondenzace jaderného chromatinu

Změny na úrovni buněčného jádra představují jeden z důležitých parametrů o vlivu studovaných látek na testované buněčné linie. Pro studium jaderných změn lze využít celou řadu fluorescenčních testů. Mezi nejčastěji využívaná fluorescenční barviva řadíme propidium jodid (PI), ethidium bromid, případně fluorescenční sondu DAPI, nebo některou ze tří sond Hoechst (33258, 33342, 34580).

Fluorescenční test využívající propidium jodid je založen na schopnosti PI pronikat pouze přes narušené buněčné membrány mrtvých nebo umírajících buněk. Interkalační komplexy tvořené dvouvláknovou DNA a PI pak způsobí amplifikaci fluorescence, kterou u mrtvých a umírajících buněk následně pozorujeme. Z principu fluorescenčního testu využívajícího PI vyplývá, že ho lze s výhodou využít

pro stanovení buněčné viability (Dengler et al., 1995; Riccardi and Nicoletti, 2006). Na podobném principu pracuje i test využívající jako fluorescenční sondu ethidium bromid.

Pro určení míry DNA fragmentace jsou využívány spíše fluorescenční sondy DAPI a Hoechst. DAPI je lipofilní sondou (4',6-diamidino-2-fenylindol), která se specificky váže na DNA úseky obsahující více A-T párů. Po jejím navázání dochází ke vzniku fluorescenčního komplexu, který lze detekovat při 460 nm (Eriksson et al., 1993). Fluorescenční sonda Hoechst 33258 (2-[2-(4-hydroxyfenyl)-6-benzimidazolyl]-6-(1-methyl-4-piperazyl)-benzimidazol) patří do skupiny fluorescenčních interkalačních barviv a je schopna označit DNA pomocí silné vazby do A-T bohatých oblastí malého žlábků dvouvláknové DNA (Martin et al., 2005). Díky schopnosti této vazby lze následně DNA pozorovat jako modře zbarvené oblasti a detekovat tak DNA fragmentaci sledovaných buněk. Excitační maximum fluorescenční sondy Hoechst 33258 je při 352 nm. Hoechst 33258 je využíván i pro fluorimetrické stanovení koncentrace DNA, a to z toho důvodu, že fluorimetrické stanovení je citlivější než spektrofotometrické. Hoechst 33258 je zároveň schopen označit pouze DNA, jejíž velikost je větší než 1 kb. Na menší fragmenty DNA se sonda neváže tak účinně (Green and Sambrook, 2017). Velkou výhodou všech tří typů sondy Hoechst je jejich schopnost přirozeného průchodu do buněk. Sonda DAPI je schopna DNA označit pouze v případě, že buňky mají poškozenou cytoplasmatickou membránu, např. i z důvodu předchozí fixace.

#### 1.4.4 Produkce reaktivních forem kyslíku

Reaktivní formy kyslíku (ROS) patří také mezi významné signální molekuly a v případě, že dochází k jejich nadměrné tvorbě, či přímo k hromadění v buňkách, tak jejich působení vede k oxidačnímu stresu. Ten je jedním z předních negativních faktorů způsobujících buněčné poškození (Joshi and Bakowska, 2011). Pro stanovení produkce reaktivních forem kyslíku lze využít celou řadu fluorescenčních sond. Patří mezi ně například sonda MitoSox, jež je selektivní pro detekci  $O_2^{\bullet-}$ . Pro detekci  $O_2^{\bullet-}$  lze využít i sondu 2-(2-pyridil)-benzothiazolin. Dalším zástupcem této skupiny fluorescenčních sond je 2,7-dichlorodihydrofluorescein (DCFH), který je specifickým indikátorem přítomnosti  $H_2O_2$ . Pro detekci produkce ROS je také využívána sonda 5,6-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetát (CM- $H_2DCFDA$ ). Tu lze využít

pro kteroukoliv buněčnou linii. Nevýhodou je nespecifita konkrétního typu tvořených ROS. Její využití je díky tomu omezeno pouze pro stanovení obecné hladiny oxidantů v buňkách. Sonda CM-H<sub>2</sub>DCFDA funguje stejným způsobem jako sonda DCFH, kdy po jejím prostupu do buněk dochází k její deacetylaci pomocí intracelulárních esteráz. Následně působením ROS vzniká fluorescenční produkt, který emituje záření při 527 nm s excitací při 492 nm (Oparka *et al.*, 2016). Pro stanovení produkce ROS lze využít i nefluorescenční molekulu Amplex Red (*N*-Acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazin), která je oxidována pomocí H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v přítomnosti křenové peroxidázy (HRP) na vysoce fluorescenční produkt (Towne *et al.*, 2004).

#### **1.4.5 Vizualizace buněčných struktur fluorescenční mikroskopií**

Vizualizace buněčných struktur pomocí fluorescenčních sond je při studiu buněčné morfologie a v rámci hodnocení funkčního stavu buněčných linií často využívanou metodou. Kromě vizualizace kondenzace jaderného chromatinu například prostřednictvím sondy Hoechst je vhodné využít i vizualizace aktinových vláken nebo mitochondrií. Za účelem vizualizace aktinových vláken je využívána přirozená schopnost toxinu faloidinu vázat se specificky na aktinová vlákna buněk. Díky přítomnosti fluorescenční značky na faloidinu, která zajistí vlastní vizualizaci jednotlivých aktinových vláken ve fluorescenčním mikroskopu můžeme takto aktinová vlákna pozorovat. Vizualizace aktinových vláken slouží pro zhodnocení rozvinutí buněčného cytoskeletu a nepřímo tak vypovídá o funkčním stavu sledované buněčné linie. Informace o morfologických změnách buněčných struktur slouží pro doplnění komplexních informací a pro posouzení cytotoxického působení látek (Melak *et al.*, 2017).

Další fluorescenční metodou detekující stav mitochondriální aktivity je využití fluorescenční sondy JC-1. Mitochondriální membránový potenciál hraje zcela zásadní roli v udržení fyziologické funkce respiračního řetězce a díky tomu i ve vzniku ATP. Ztráta mitochondriálního membránového potenciálu vede u buněk k postupnému vyčerpání veškeré energie a následně k jejich zániku (Joshi and Bakowska, 2011). Sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylkarbocyanin jodid) je schopna díky svým lipofilním a kationickým vlastnostem pronikat přes buněčné membrány do mitochondrií. U buněk s vysokým mitochondriálním membránovým potenciálem tvoří sonda JC-1 agregáty, které emitují fluorescenční záření o vlnové

délce 595 nm. Mají-li buňky narušený, čili snížený mitochondriální membránový potenciál, sonda JC-1 zůstává v monomerní formě emitující fluorescenční záření o vlnové délce 535 nm (Smiley et al., 1991). Díky rozdílné emisi fluorescenčního záření lze následně spolehlivě posoudit a zhodnotit, v jakém stavu jsou buněčné mitochondrie.

## **2 CÍLE PRÁCE**

- 1) Zavést a optimalizovat kultivaci lidských proximálních tubulárních buněk HK-2 za různých kultivačních podmínek.
- 2) Charakterizovat kultivační a růstovou stabilitu HK-2 buněk za optimálních podmínek během střednědobého pasážování.
- 3) Charakterizovat nefrotoxické působení kadmia u HK-2 buněčné linie pomocí bioanalytických a biochemických metod.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Seznam použitých chemikálií

**5,5',6,6'-tetrachlor-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolykARBOKYANIN jodid, JC-1**

(C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>4</sub>N<sub>4</sub>; Mr = 652,2; Enzo, ČR)

**5,6-chlormethyl-2',7'-dichlordihydrofluorescein diacetát, CM-H<sub>2</sub>DCFDA**

(C<sub>27</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>8</sub>; Mr = 577,8; Molecular Probes, USA)

**Acetaminofen, APAP** (C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>; Mr = 151,16; Sigma Aldrich, USA)

**Anti-ACTIVE<sup>®</sup> JNK** (anti-54 kDa JNK2; králík; Promega, USA)

**Anti-β-aktin** (králík; Sigma-Aldrich, USA)

**Anti-NFκB p65 monoklonální protilátka** (myš; Invitrogen, USA)

**Apo-ONE<sup>®</sup> kit** (Promega, USA)

**CisPlatina, CisPt** (Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; Mr = 300,01; Sigma Aldrich, USA)

**Clarity<sup>™</sup> Western ECL substrát** (Bio-Rad, USA)

**Deionizovaná voda, DV** (G <0,1 μS)

**Dimethylsulfoxid, DMSO** (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO; Mr = 78,13; Sigma Aldrich, USA)

**Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12 (1:1)**

(s/bez fenolové červeně), DMEM/F-12 (Sigma Aldrich, USA)

**Ethanol, EtOH** (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH; Mr = 46,07; Merck KGaA, SRN)

**Faloidin-FITC** (C<sub>58</sub>H<sub>63</sub>N<sub>10</sub>O<sub>14</sub>S<sub>4</sub>; Mr = 1252,44; Sigma Aldrich, USA)

**FCCP** (CF<sub>3</sub>OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NHN=C(CN)<sub>2</sub>; Mr = 254,17; Sigma Aldrich, USA)

**Fetální bovinní sérum, FBS** (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

**Fosfátový pufr podle Dulbecca, DPBS** (Molecular Probes, USA)

**HEPES pufr** (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

**Hoechst 33258** (C<sub>25</sub>H<sub>37</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>; Mr = 623,96; Sigma Aldrich, USA)

**Hovězí sérový albumin, BSA** (Sigma Aldrich, USA)

**Hovězí pituitární extrakt, BPE** (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

**Chlorid kademnatý** (CdCl<sub>2</sub>; Mr = 183,32; Sigma Aldrich, USA)

**Chlorid sodný** (NaCl; Mr = 58,44; Sigma Aldrich, USA)

**Insulin/transferin/seleničitan sodný, ITS** (Sigma Aldrich, USA)

**Keratinocyte Serum Free Medium, keratinocytové SFM** (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

**Monochlorobiman, MCB** (C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Mr = 226,7; Sigma Aldrich, USA)

**Neesenciální aminokyseliny**, NAA (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)  
**Penicilin/streptomycin**, P/S (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)  
**Pyruvát sodný**, PYR (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)  
**Rekombinantní epidermální růstový faktor**, EGF (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)  
**Sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou** (kozí; Sigma-Aldrich, USA; anti-myš; Invitrogen, USA)  
**tert-butylhydroperoxid**, t-BHP ( $C_4H_{10}O_2$ ; Mr = 90,12; Sigma Aldrich, USA)  
**Trypsin-EDTA solution** (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)  
**WST-1** (Roche, Německo)

### 3.2 Příprava roztoků

Pracovní roztok DPBS – koncentrovaný roztok DPBS jsme ředili v poměru 1:9, např. bylo pipetováno 10 ml pufru DPBS do 90 ml deionizované vody.

Zásobní roztok JC-1 ( $c = 2 \text{ mg/ml}$ ) – zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním sondy JC-1 v DMSO, roztok byl následně uchován po 50  $\mu\text{l}$  v mrazáku při  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Pracovní roztok JC-1 ( $c = 20 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ) – alikvot 50  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku JC-1 jsme pipetovali do 4950  $\mu\text{l}$  pufru DPBS.

Pracovní roztok formaldehydu (3,7%) – 200  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku formaldehydu (37 %) jsme pipetovali do 1800  $\mu\text{l}$  pufru DPBS.

Pracovní roztok tritonu X-100 (0,1%) – 2  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku tritonu X-100 (100 %) jsme pipetovali do 1998  $\mu\text{l}$  pufru DPBS.

Zásobní roztok faloidinu-FITC ( $c = 80 \text{ } \mu\text{M}$ ) – zásobní roztok jsme připravili rozpuštěním faloidinu-FITC v DMSO, roztok byl následně uchován v mrazáku při  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Pracovní roztok faloidinu-FITC ( $c = 1 \text{ } \mu\text{M}$ ) – 20  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku faloidinu-FITC jsme pipetovali do 1580  $\mu\text{l}$  pufru DPBS.



Zásobní roztok CM-H<sub>2</sub>DCFDA (c = 400 μM) – pipetovali jsme 86,5 μl DMSO do mikrozkušavky k 50 μg sloučeniny.

Pracovní roztok CM-H<sub>2</sub>DCFDA (c = 2 μM) – pipetovali jsme 20 μl zásobního roztoku CM-H<sub>2</sub>DCFDA do 3980 μl pufru DPBS.

Zásobní roztok Hoechst 33258 (c = 40 μg/ml) – do 960 μl H<sub>2</sub>O jsme napipetovali 40 μl Hoechst 33258 (c = 1 mg/ml).

Pracovní roztok APAP (c = 10 mM) – navážka 0,0045 g APAP byla rozpuštěna ve 3 ml kompletního kultivačního média.

Pracovní roztok MCB (c = 240 μM) – alikvot 30 μl zásobního roztoku MCB jsme pipetovali do 1,220 ml pufru DPBS.

Zásobní roztok CdCl<sub>2</sub> (c = 20 mM) – 0,0183 g CdCl<sub>2</sub> jsme rozpustili v 5 ml deionizované vody. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok CisPt (c = 1 mM) – 0,0015 g CisPt jsme rozpustili v 5 ml deionizované vody. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok t-BHP (c = 100 mM) – 18,1 μl t-BHP (5,5 M) jsme přidali do 1 ml deionizované vody. Roztok jsme skladovali v lednici při 4 °C.

### **3.3 Přístroje a laboratorní vybavení**

#### **přístroje:**

Analytické váhy ARJ 120-4M (Kern, SRN)

Automatické pipety Finnpipette (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

Biohazard box SafeFAST Elite (Faster, Itálie)

CASY model TT (Roche, SRN)

ChemiDoc™ MP systému (Bio-Rad, USA)

CO<sub>2</sub> inkubátor (PHCbi, Japonsko)

Destičkový spektrofotometr a spektrofluorimetr Infinite M200 (Tecan, Rakousko)

Destičkový spektrofotometr a spektrofluorimetr Spark (Tecan, Rakousko)  
Lednice s mrazákem -20 °C (Liebherr, ČR)  
Mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonsko)  
Mikroskop 3D Cell Explorer (Swiss Biotech, Švýcarsko)  
Mrazicí box pro hloubkové mrazení (PHCbi, Japonsko)  
Multisizer 4e Coulter Cell Analyzer (Beckman Coulter, USA)  
Odstředivka 35 R (Hettich, SRN)  
Odstředivka Mikro 20 R (Hettich, SRN)  
pH-metr pH 720 (InoLab, SRN)  
Termostatovaná míchačka (Biosan, Lotyšsko)  
Třepačky, vortexy (Reax top Heidolph, SRN, IKA Švédsko)  
Vodní lázeň s termostatem a ultrazvukem (Bandelin Sonorex, SRN)

**pomůcky:**

Centrifugační zkušavky, objem 15 ml (SPL/BioTech, Korea)  
Kultivační lahve NUNC T75 s filtrem (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)  
Magnetická míchadla (Heidolph & Big Squit Star, SRN)  
Mikroskopická skla (osmikomorová) pro mikroskopii (SPL/BioTech, Korea)  
Mikrotitrační destičky 96jamkové, 6jamkové (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)  
Mikrozkušavky, objem 1,5; 2,5 a 5 ml (Eppendorf, SRN)  
PVDF membrány (Bio-Rad, USA)

**software:**

ACD/ChemSketch 12 (Advanced Chemistry Development software, Kanada)  
EndNote X4 (Thomson Reuters, USA)  
i-control 1.6 (Tecan, Rakousko)  
Microsoft Office (Microsoft, USA)  
Nikon NIS-Elements (Nikon, Japonsko)  
OriginPro 9 (OriginLab, USA)

**buněčná linie:**

*Human Kidney 2, HK-2 (ATCC, USA)*

### 3.4 Kultivace HK-2 buněk

Do kultivačních lahví bylo nejprve napipetováno vyhřáté kompletní kultivační médium a následně byl přidán vypočtený objem buněčné suspenze. Výsledný objem buněčné suspenze a kultivačního média v kultivační lahvi činil vždy 10 ml. Optimální množství nasazovaných HK-2 buněk na jednu lahev s kultivační plochou 75 cm<sup>2</sup> bylo 4.10<sup>5</sup> buněk. Nasazené buňky byly následně kultivovány v CO<sub>2</sub> inkubátoru při 37 °C a koncentraci 5 % CO<sub>2</sub>. Každých 48 nebo 72 hod bylo od buněk odtaženo původní kultivační médium, které bylo vyměněno za čerstvé. K pasážování buněk docházelo vždy až v okamžiku, kdy se buněčná konfluence v kultivační nádobě pohybovala v rozmezí od 65 % do 75 %. Denzita buněk získaných pasážováním dané kultivační lahve byla počítána s pomocí analyzátoru částic Multisizer 4e Coulter Cell Analyzer (Beckman Coulter, USA). Buňky HK-2 byly následně pro potřeby experimentů nasazeny na 96jamkové mikrotitrační destičky, a to v denzitě 2,5.10<sup>4</sup> buněk/100 µl/jamku. Takto byly buňky ponechány 24 hod v CO<sub>2</sub> inkubátoru, aby došlo k jejich úplné adhezi a rozvinutí cytoskeletu. Po přisednutí byly buňky exponovány kultivačnímu médiu obsahujícímu testované sloučeniny, přičemž čas jejich inkubace závisel na typu prováděného experimentu.

### 3.5 Optimalizace druhu kultivačního média

První experimenty byly zaměřeny na hodnocení stability odezvy HK-2 buněk ve třech typech kultivačních médií (DMEM/F12 s pyruvátem, DMEM/F12 bez pyruvátu a keratinocytové SFM) při koinkubaci se zvolenými modelovými toxiny. Stabilita odezvy byla studována prostřednictvím WST-1 testu dehydrogenázové aktivity (Roche, Německo) a MCB metody (Čapek et al., 2017) pro stanovení hladiny glutathionu. Testováno bylo pět modelových toxinů, u některých z nich byl studován efekt více koncentrací. Modelovými toxiny byly 1 mM a 10 mM acetaminofen (APAP), 100 µM CdCl<sub>2</sub>, 40 µM FCCP, 100 µM CisPt a 50 µM t-BHP. Buňky byly testovány v rozmezí 7.–10. pasáže, přičemž pro každý experiment se buňky nacházely ve všech typech zvoleného média ve stejné pasáži. V případě obou zvolených testů byly buňky inkubovány s modelovými toxiny po dobu 24 hod.

Zároveň byly buňky podrobeny i mikroskopické analýze s využitím fluorescenčních sond. Pro mikroskopickou analýzu byly buňky kultivovány

na osmikomorových mikroskopických sklech (SPL/BioTech, Korea) v denzitě  $2,5 \cdot 10^4$  buněk/200  $\mu$ l/komoru postupně se všemi třemi typy studovaných kultivačních médií. Zvolená buněčná denzita odpovídala po 24hodinovém přisednutí buněk konfluenci 65–75 %. Mikroskopická analýza byla prováděna prostřednictvím mikroskopu Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonsko). Fluorescenční sondy sloužily k vizualizaci buněčného jádra (Hoechst 33258), aktinových vláken (faloidin-FITC) a ke zhodnocení aktivity mitochondrií (JC-1) neovlivněných kontrolních HK-2 buněk.

#### ***Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 Ham (1:1)***

Jako základové médium pro kultivaci HK-2 buněk bylo zvoleno DMEM/F-12 s/bez fenolové červeně. DMEM/F12 bylo navíc obohaceno o 5 % fetálního hovězího séra (v/v), pyruvát (1 mM), inzulin (10  $\mu$ g/ml), transferin (5,5  $\mu$ g/ml), seleničitan sodný (5 ng/ml), penicilin (50  $\mu$ g/ml), streptomycin (50  $\mu$ g/ml) a epidermální růstový faktor (5 ng/ml). Obohacené kultivační médium bylo připravováno vždy čerstvé, přičemž maximální doba jeho uchování byla 7 dní. Suplementy byly do média přidávány při jeho přípravě. Výjimkou byl pouze inzulin, transferin a EGF, které byly přidávány v průběhu pasážování přímo do kultivačních lahví.

#### ***Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 Ham (1:1) bez pyruvátu***

Druhé kultivační médium svým složením odpovídalo obohacenému médiu DMEM/F-12, jediným odlišným parametrem byla absence pyruvátu.

#### ***Keratinocyte Serum Free Medium***

Keratinocytové SFM medium bylo pro kultivaci HK-2 buněk obohaceno o hovězí hypofyzární extrakt (BPE) v konečné koncentraci 0,05 mg/ml a epidermální růstový faktor (EGF) v konečné koncentraci 5 ng/ml. Obohacené kultivační médium bylo připravováno vždy čerstvé a suplementy byly do média přidávány těsně před buněčnou kultivací.

### **3.6 Testování vlivu kultivace HK-2 buněk na míru toxicity**

Buněčná kultivace byla prováděna v kultivačním médiu DMEM/F12 s/bez fenolové červeně. Všechny experimenty byly prováděny v rozmezí 3.–15. pasáže vždy až po 24 hod přisednutí HK-2 buněk na dno 96jamkové mikrotitrační destičky

ve 100  $\mu$ l buněčného média. Pro potvrzení buněčného původu a ověření stability buněčné linie HK-2 v průběhu střednědobé kultivace byla provedena analýza krátkých tandemových repetitiv, byla sledována změna doby potřebné k populačnímu zdvojnásobení a také střední velikost HK-2 buněk. Stav HK-2 buněk po poškození modelovými látkami v průběhu střednědobé kultivace byl posuzován stanovením dehydrogenázové aktivity (WST-1 test) a hladiny intracelulárního glutathionu (MCB metoda). Modelovými toxiny byly acetaminofen (10 mM), cisplatina (100  $\mu$ M), *tert*-butylhydroperoxid (50  $\mu$ M), a CdCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M). Buněčná viabilita i koncentrace glutathionu byly stanoveny po uplynutí 6 hod a 24 hod inkubace HK-2 buněk s modelovými toxiny.

### 3.7 Studium nefrotoxicity CdCl<sub>2</sub>

HK-2 buněčná linie byla využita k testování nefrotoxického působení CdCl<sub>2</sub>. Buněčná kultivace byla prováděna v kultivačním médiu DMEM/F12 s/bez fenolové červeně. Všechny experimenty byly prováděny v rozmezí 4.–11. pasáže. Ovlivnění vybranými koncentracemi CdCl<sub>2</sub> následovalo vždy až po 24 hod přisednutí HK-2 buněk na dno 96jamkové mikrotitrační destičky ve 100  $\mu$ l buněčného média.

Dehydrogenázová aktivita a koncentrace intracelulárního glutathionu byla u buněk HK-2 ovlivněných CdCl<sub>2</sub> stanovena WST-1 testem, resp. MCB metodou. Dehydrogenázová aktivita byla testována pro rozsah koncentrací CdCl<sub>2</sub> (0,1–1000  $\mu$ M) při dobách inkubace buněk s CdCl<sub>2</sub> 2-48 hod.

Dalším testem pro posouzení vlivu CdCl<sub>2</sub> na HK-2 buňky bylo stanovení produkce ROS fluorescenční sondou CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Buňky HK-2 byly inkubovány s CdCl<sub>2</sub> o koncentracích 0, 5, 25, 100 a 200  $\mu$ M po dobu 2, 6, 10 a 24 hod. Za těchto podmínek byla testována i DNA fragmentace, aktivita kaspáz a pomocí Western blotu analyzována fosforylovaná JNK a protein NF $\kappa$ B.

Výsledky testování nefrotoxického působení CdCl<sub>2</sub> na HK-2 buňky byly doplněny o mikroskopickou analýzu s využitím fluorescenčních sond. Buňky byly kultivovány na osmikomorových mikroskopických sklech (SPL/BioTech, Korea) v denzitě 2,5.10<sup>4</sup> buněk/200  $\mu$ l/komoru. Mikroskopická analýza byla prováděna prostřednictvím mikroskopu Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonsko). Fluorescenční sondy sloužily k vizualizaci buněčného jádra (Hoechst 33258) a aktinových vláken (faloidin-FITC) HK-2 buněk kontrolních a ovlivněných 25 a 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> po dobu 6 a 24 hod.

## 3.8 Bioanalytické testy a metody

### 3.8.1 Analýza krátkých tandemových repetic

Prvním krokem analýzy krátkých tandemových repetic (STR) pro autentizaci buněčných linií byla izolace genomové DNA buněk kultivovaných *in vitro*. Toto bylo provedeno pomocí soupravy pro izolaci DNA z tkání (Generi Biotech a.s., Česká republika). Analýza STR úseků byla provedena v Generi Biotech, a.s. Pro autentizaci HK-2 buněčné linie bylo analyzováno sedmnáct vybraných autosomálních polymorfismů (CSF1PO, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, FGA, Penta v, TPO, PPO v, PPO) a amelogenin. Autosomální polymorfismy a amelogenin byly následně amplifikovány v multiplexní PCR a separovány kapilární elektroforézou. Autentizace HK-2 buněčné linie byla následně dokončena porovnáním se zavedenými databázemi STR úseků.

### 3.8.2 „Doubling time“ a střední velikost buněk

Doba potřebná k populačnímu zdvojnásobení označovaná jako generační doba, nebo anglickým pojmem „Doubling time“ (DT), je důležitým parametrem buněčného růstu. DT je odvozen od počtu buněk a času, který uplynul od nasazení buněk do kultivační nádoby, až do okamžiku jejich následného pasážování a nasazení do nových kultivačních nádob. Způsob výpočtu DT je vyjádřen následující rovnicí.

$$DT = \frac{t * \log 2}{(\log Nt - \log N0)}$$

Pro výpočet DT bylo třeba zaznamenat čas  $t$ , který uplynul od doby nasazení HK-2 buněk, až po okamžik jejich „trypsinizace“, tedy okamžik enzymatického uvolnění buněk ze dna kultivační nádoby, kdy použitým enzymem je právě trypsin. Dále bylo pro výpočet doby populačního zdvojnásobení nutné znát  $Nt$ , což je celkový počet viabilních HK-2 buněk po „trypsinizaci“ a  $N0$ , což je původní počet do kultivační nádoby nasazených HK-2 buněk.

V průběhu kultivace HK-2 buněk byla při každém pasážování sledována průměrná velikost kultivovaných buněk. Pro stanovení střední velikosti buněk byl využit multikanálový systém CASY model TT (Roche, Německo). Hodnocení střední velikosti

buněk bylo prováděno při každém počítání kultivovaných buněk před jejich nasazením na novou kultivační nádobu.

### **3.8.3 Fluorescenční mikroskopie – barvení aktinu a mitochondrií**

Aktinová vlákna HK-2 buněk byla vizualizována prostřednictvím fluorescenčně značeného faloidinu (faloidin-FITC). HK-2 buňky byly nasazeny na mikroskopická skla v denzitě  $2,5 \cdot 10^4$  buněk/komoru. Buňky byly před fixací promyty 200  $\mu$ l pracovního roztoku DPBS (pH 7,4, 37 °C). Fixace byla provedena pomocí 3,7% formaldehydu tak, že do každé komory bylo přidáno 200  $\mu$ l pracovního roztoku formaldehydu (5 min, 37 °C). Následně byl roztok formaldehydu odpipetován a k buňkám bylo přidáno 200  $\mu$ l pracovního roztoku tritonu X-100 (15 min, 37 °C). Buňky byly poté promyty pomocí DPBS (pH 7,4, 37 °C) a do každé komory bylo přidáno 200  $\mu$ l pracovního roztoku fluorescenčně značeného faloidinu ( $c = 1 \mu\text{M}$ , 40 min, 37 °C). Poté byly buňky opět promyty pomocí DPBS (pH 7,4, 37 °C). Pro mikroskopickou analýzu byl využit mikroskop Nikon Eclipse 80i s fluorescenčním filtrem FITC. Fluorescence navázaného faloidinu-FITC byla na snímcích z fluorescenčního mikroskopu patrná jako zelené zbarvení aktinových vláken ( $\lambda_{\text{EX/EM}} = 485/518 \text{ nm}$ ).

Detekce mitochondriálního membránového potenciálu sloužila pro posouzení funkčního stavu mitochondrií u testovaných HK-2 buněk a byla prováděna s využitím intracelulární sondy JC-1. Pracovní roztok JC-1 sondy byl před analýzou připraven v DPBS pufru (pH 7). Ke kultivovaným HK-2 buňkám byl do každé komory mikroskopického skla napipetován pracovní roztok JC-1. Výsledná koncentrace sondy JC-1 byla 10  $\mu\text{g/ml}$ . Buňky HK-2 byly inkubovány s JC-1 sondou 20 min a po uplynutí inkubačního intervalu byly promyty pomocí DPBS (pH 7; 37 °C). Pro detekci byl použit mikroskop Nikon Eclipse 80i s použitím fluorescenčního filtru GFP/TRITC. Fluorescence JC-1 byla na snímcích z fluorescenčního mikroskopu patrná jako červené ( $\lambda_{\text{EX/EM}} = 485/595 \text{ nm}$ ) nebo zelené zbarvení ( $\lambda_{\text{EX/EM}} = 485/535 \text{ nm}$ ).

### **3.8.4 Stanovení viability buněk – WST-1 test**

Pro studium a testování dehydrogenázové aktivity, resp. buněčné viability byl využit WST-1 test. Ke kultivovaným již přisedlým HK-2 buňkám v denzitě  $2,5 \cdot 10^4$  buněk/100  $\mu$ l/jamku bylo po uplynutí inkubace s modelovými toxiny přidáno 10  $\mu$ l činidla WST-1. Následně byla na přístroji Tecan Infinite M200 (Tecan, Rakousko)

spektrofotometricky změřena absorbance v čase 0 a 60 min při vlnové délce 440 nm. Buněčná viabilita byla vyjádřena jako procenta intra- a extramitochondriální dehydrogenázové aktivity vztažená k aktivitě kontrolních buněk (= 100 %). Buněčnou viabilitu lze zároveň vyjádřit v absolutních hodnotách absorbance.

### **3.8.5 Stanovení glutathionu**

Pro posouzení intracelulární hladiny glutathionu byla využita optimalizovaná metoda využívající monochlorobiman. Buňky byly v rámci experimentů inkubovány v 96jamkových mikrotitračních destičkách v denzitě  $2,5 \cdot 10^4$  buněk/100  $\mu$ l/jamku. Po uplynutí inkubačních intervalů buněk s modelovými toxiny bylo do mikrotitračních destiček k buňkám napipetováno 20  $\mu$ l sondy MCB ( $c = 40 \mu$ M). Fluorescence ( $\lambda_{\text{EX/EM}} = 394/490$  nm) byla měřena na analyzátoru Tecan Infinite M200 při 37 °C. Intracelulární koncentrace glutathionu byla následně vyjádřena v procentech vztažených ke kontrolním buňkám (kontrolní buňky = 100 %).

### **3.8.6 Stanovení produkce ROS**

Pro zjištění produkce ROS byla využita fluorescenční intracelulární sonda CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Thermo, USA). Buňky byly v rámci experimentů inkubovány v 96jamkových mikrotitračních destičkách v denzitě  $2,5 \cdot 10^4$  buněk/100  $\mu$ l/jamku. Pracovní roztok fluorescenční sondy byl připraven v DPBS pufru (pH 7). Po inkubaci HK-2 buněk s toxiny byl k buňkám přidán čerstvě připravený pracovní roztok CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Buňky byly následně promyty fyziologickým roztokem s fosfátovým puftrem a bylo zahájeno měření fluorescence. Fluorescence ( $\lambda_{\text{EX/EM}} = 485/535$  nm) byla detekována za použití analyzátoru Tecan Infinite M200. Hladina ROS byla následně vyjádřena v procentech vztažených ke kontrolním buňkám (kontrolní buňky = 100 %).

### **3.8.7 Apoptotické markery – DNA fragmentace a aktivita kaspáz**

Pro hodnocení kondenzace jaderného chromatinu a fragmentace DNA v HK-2 buňkách byla využita fluorescenční sonda Hoechst 33258. Po uplynutí doby inkubace s toxiny bylo k buňkám napipetováno 10  $\mu$ l sondy Hoechst 33258. Buňky byly následně se sondou 20 min inkubovány. Fluorescence byla měřena s využitím



spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 při 37 °C ( $\lambda_{\text{Ex/EM}} = 352/461$  nm). Výsledná hodnota fluorescence byla vztažena ke kontrolním buňkám (kontrolní buňky = 100 %).

Pro mikroskopické hodnocení kondenzace jaderného chromatinu a vizualizaci fragmentované DNA v HK-2 buňkách byla opět využita fluorescenční sonda Hoechst 33258. HK-2 buňky byly nasazeny na mikroskopická skla v denzitě  $2,5 \cdot 10^4$  buněk. Po přisednutí buněk (24 hod) byla k buňkám přidána fluorescenční sondy Hoechst 33258 s výslednou koncentrací 2  $\mu\text{g/ml}$ . Pro detekci byl použit mikroskop Nikon Eclipse 80i s použitím fluorescenčního filtru DAPI. Fluorescence sondy Hoechst 33258 byla na snímcích z fluorescenčního mikroskopu patrná jako modré zbarvení jaderného chromatinu ( $\lambda_{\text{Ex/EM}} = 352/461$  nm).

Pro měření aktivity kaspáz bylo využito komerčně dostupného kitu Apo-ONE<sup>®</sup> pro stanovení efektorových kaspáz 3 a 7 (Promega, USA). Apo-ONE<sup>®</sup> kit funguje jako homogenním pufr, který rychle a efektivně permeabilizuje kultivované buňky a zároveň podporuje enzymatickou aktivitu kaspáz 3 a 7, přičemž rhodamin 110 funguje v kitu jako profluorescenční substrát. V první fázi stanovení aktivity kaspáz byl připraven pracovní roztok smícháním přiloženého substrátu a pufru v poměru 1:100. Následně bylo 100  $\mu\text{l}$  takto připraveného pracovního roztoku přidáno k HK-2 buňkám nasazeným v 96jamkové mikrotitrační destičce v denzitě  $2,5 \cdot 10^4$  buněk/100  $\mu\text{l}$ /jamku. Fluorescence byla měřena 18 hod kineticky s využitím spektrofluorimetru Tecan Infinite M200 při 37 °C ( $\lambda_{\text{Ex/EM}} = 499/521$  nm). Aktivita kaspáz 3 a 7 byla následně vyjádřena v procentech vztažených ke kontrolním buňkám (kontrolní buňky = 100 %).

### **3.8.8 Western Blot analýza proteinů**

Western Blot analýza byla využita pro detekci koncentrace proteinů fosforylované JNK (pJNK) a NF $\kappa$ B. HK-2 buňky nasazené v 6jamkové mikrotitrační destičce v množství  $1,5 \cdot 10^6$  buněk/jamku byly promyty PBS pufrém a následně lyzovány prostřednictvím RIPA lyzačního pufru s inhibitory proteáz a fosfatáz (30 minut; 4 °C), poté následovala centrifugace (16.000g; 20 min; 4 °C) a odsátí supernatantu, který byl nanesen na SDS-PAGE. Proteiny byly přeneseny na PVDF membránu (Bio-Rad, USA). Po blotování v TBST pufru (20 mM TRIS; 150 mM NaCl; 0,1% Tween-20; pH 7,5) obsahujícím 5 % hovězího sérového albuminu byly vzorky inkubovány s Anti-ACTIVE<sup>®</sup> JNK (anti-54 kDa JNK2; králík; Promega, USA), Anti-NF $\kappa$ B p65 monoklonálními protilátkami (myš; Invitrogen, USA) a také s Anti- $\beta$ -

aktinem (králík; Sigma-Aldrich, USA) podle pokynů výrobce. Membrána byla následně inkubována se sekundárními protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou (koza; Sigma-Aldrich, USA; koza anti-myš; Invitrogen, USA). Proteiny byly vizualizovány prostřednictvím Clarity™ Western ECL substrátu (Bio-Rad, USA) a ChemiDoc™ MP systému (Bio-Rad, USA).

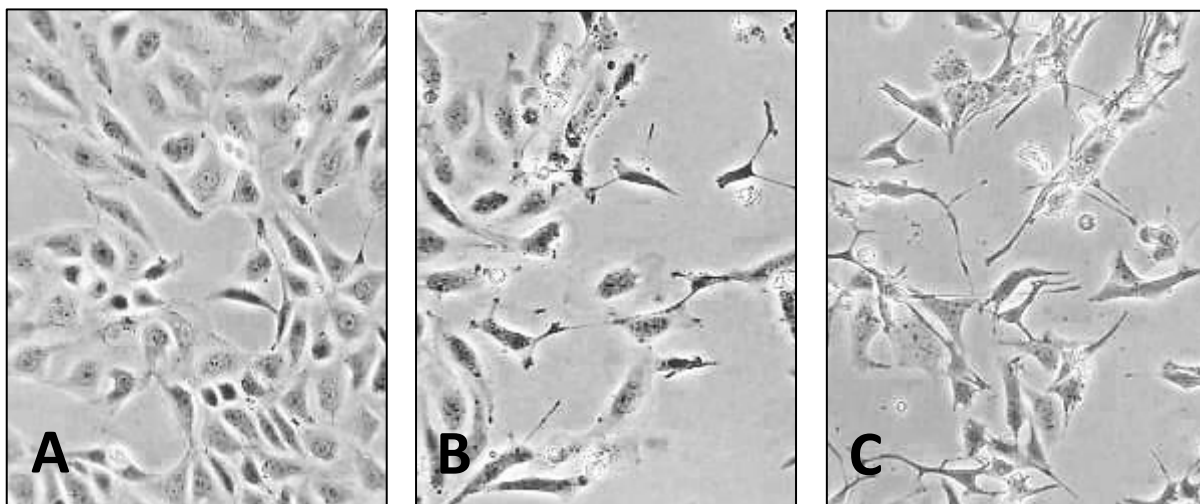
### **3.9 Statistická analýza naměřených dat**

Veškeré experimenty byly alespoň třikrát nezávisle opakovány. Všechny studované parametry byly měřeny minimálně v duplikátu, avšak většina parametrů byla měřena v tripletu až kvadrupletu. Pokusy týkající se zhodnocení střednědobé kultivace HK-2 buněk byly prováděny kontinuálně v průběhu osmi měsíců. Pokusy týkající se studia a charakterizace toxického působení CdCl<sub>2</sub> na buněčnou linii HK-2 probíhaly v rozmezí dalších osmi měsíců. Výsledky jsou vyjadřovány jako průměr ± SD. Výsledky byly podrobeny statistické analýze, při zvolené hladině významnosti  $p = 0,05$ . Výsledky testů WST-1 a MCB pro posouzení vlivu buněčného pasážování na míru toxického působení vybraných látek byly analyzovány dvourozměrnou analýzou rozptylu (dvourozměrná ANOVA; faktor A = číslo pasáže; faktor B = toxin) s následnou Bonferroniho korekcí (OriginPro 9.0.0, USA). Pro statistickou analýzu výsledků ze studia toxického působení CdCl<sub>2</sub> byla použita jednorozměrná analýza rozptylu (jednorozměrná ANOVA) s následným Bonferroniho post-testem (OriginPro 9.0.0, USA).

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Optimalizace kultivace HK-2 buněk

HK-2 buňky jsou běžně kultivovány zejména ve dvou typech kultivačních médií, a to v DMEM/F12 a keratinocytovém SFM, proto jsme se rozhodli otestovat, které z nich je pro HK-2 kultivaci vhodnější. HK-2 buňky byly v počtu  $4 \cdot 10^5$  nasazeny v 10 ml kultivačního média do tří kultivačních nádob. Všechny nasazené buňky pocházely z 8. pasáže a měly stejné kultivační podmínky. Rozdílné bylo pouze kultivační médium, jež bylo třech typů: DMEM/F12 médium s 5 % FBS s pyruvátem, DMEM/F12 s 5 % FBS bez pyruvátu a keratinocytové SFM (= *Serum Free*) médium. Jak je z obrázku 13 patrné, tak růst buněk po 24 hod od nasazení se jevil být v jednotlivých typech kultivačních médií poměrně odlišný. Zatímco v keratinocytovém SFM médiu doporučeném ATCC a v médiu DMEM/F12 bez pyruvátu měly buňky spíše protáhlý tvar, tak v médiu DMEM/F12 s pyruvátem byly HK-2 buňky spíše oválnější a lépe přisedlé ke dnu kultivační nádoby. Zároveň byla v DMEM/F12 médiu s pyruvátem buněčná cytoplasma díky většímu přisednutí HK-2 buněk více rozprostřena a buňky tedy působily robustněji.

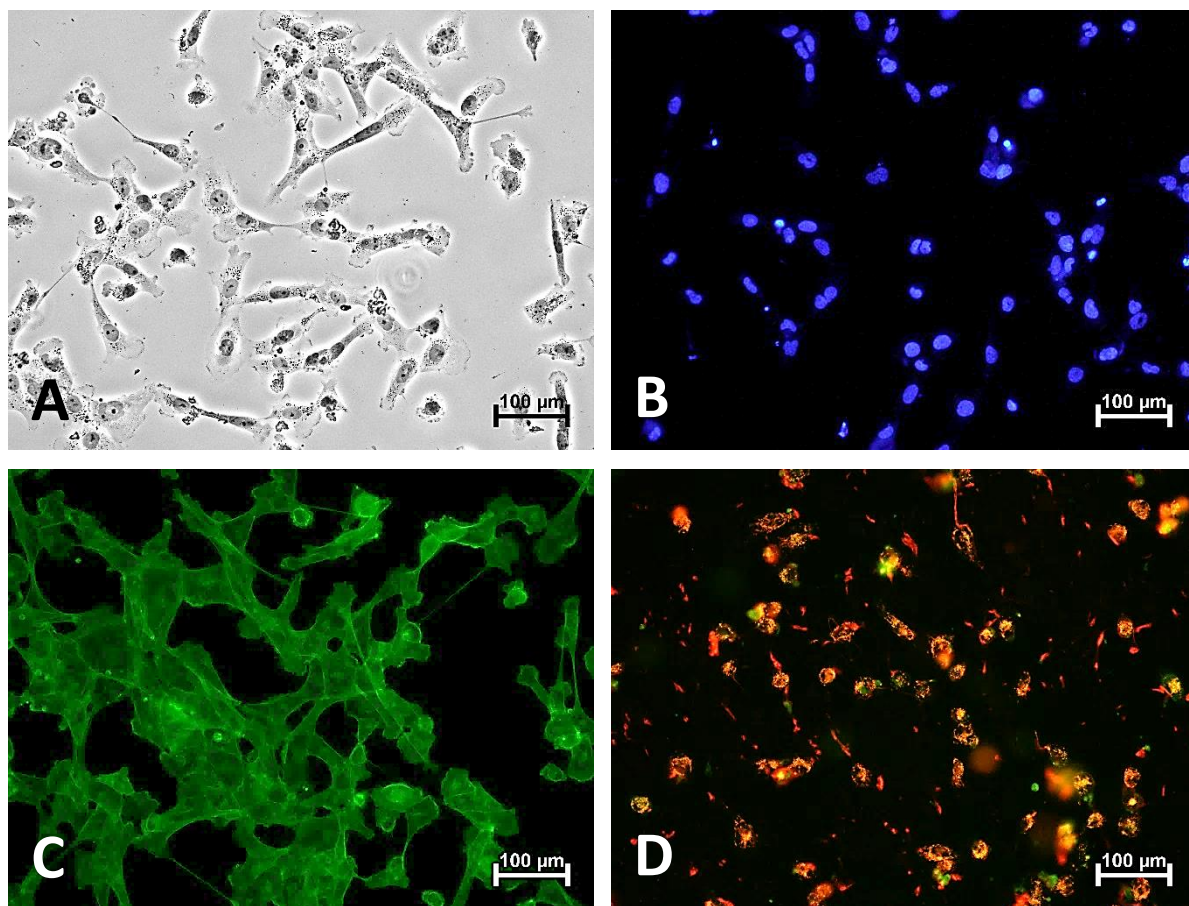


**Obrázek 13: Optimalizace kultivačních médií.** HK-2 buňky (8. pasáž). **A**, DMEM/F12 s pyruvátem; **B**, DMEM/F12 bez pyruvátu; **C**, keratinocytové SFM (fázový kontrast, 120 $\times$ ).

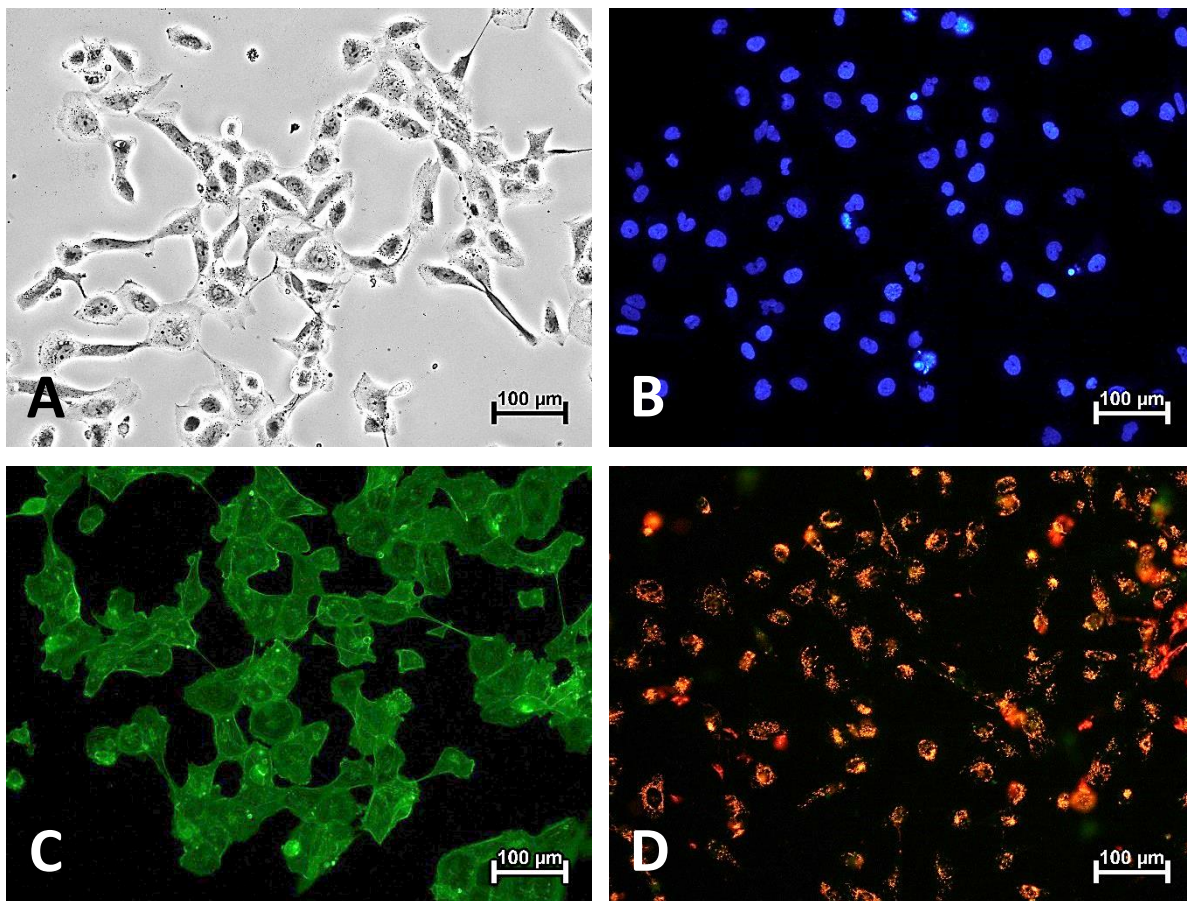
Po týdenní kultivaci bylo provedeno pasážování a na analyzátoru byl spočítán celkový počet buněk v jedné kultivační nádobě. Ve všech třech typech kultivačního média byl počet vykultivovaných buněk podobný, tj.  $2,3 \pm 0,2 \cdot 10^6$  buněk/75 cm<sup>2</sup>/10 ml

média. Na základě rutinní kultivace lze tedy říci, že ač byl buněčný vzhled v jednotlivých typech kultivačních médií značně odlišný, nelze tvrdit, že by některé z médií působilo významně negativně na dobu populačního zdvojnásobení, která činila  $56 \pm 2$  hod u všech tří kultivačních médií.

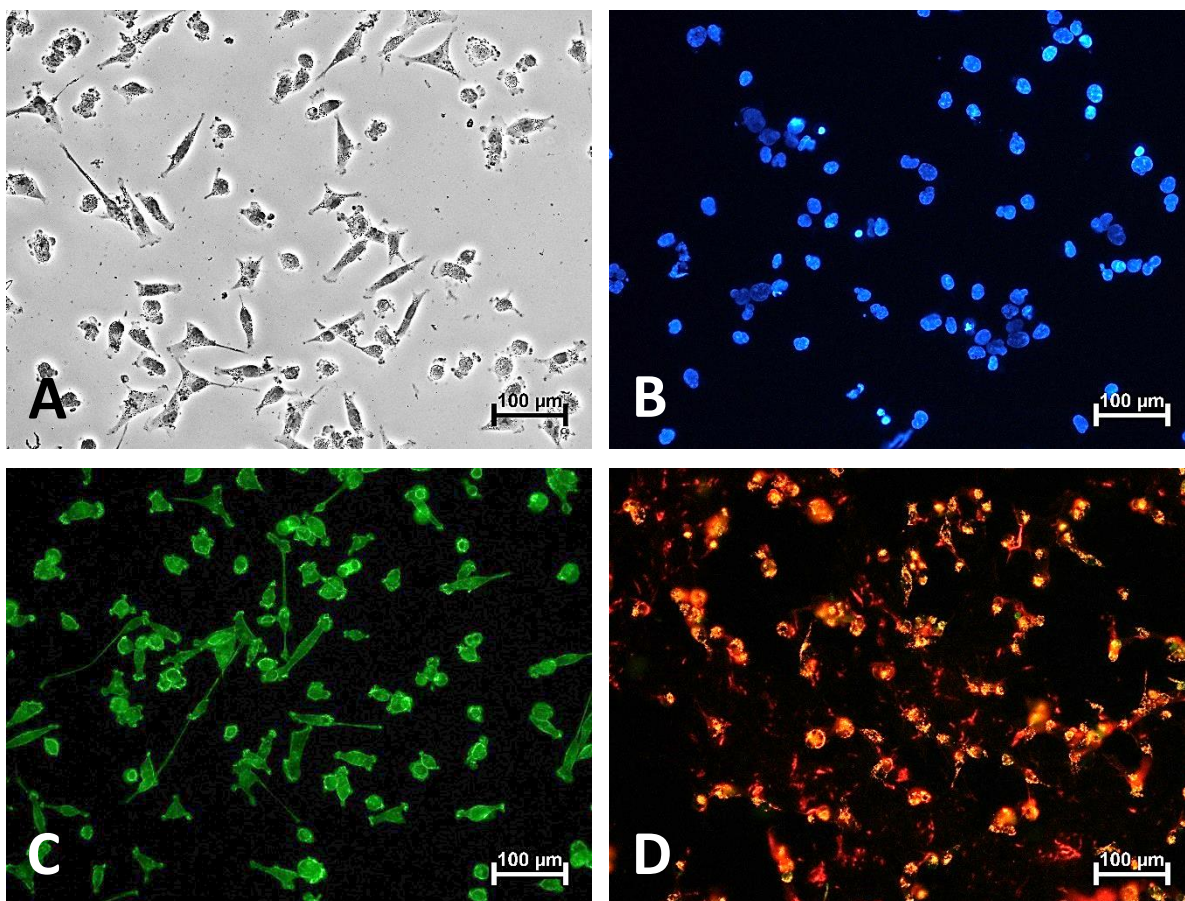
Dalším krokem bylo podrobnější ověření stavu buněk z pohledu jejich morfologie. S využitím fluorescenčních sond bylo u buněk u každého typu kultivačního média obarveno jádro (Hoechst 33258), struktura a rozptřeni aktinových vláken (faloidin-FITC) a mitochondriální membránový potenciál (JC-1). Výsledky fluorescenčního značení jednotlivých buněčných organel jsou shrnuty na sadě obrázků 14, 15 a 16.



**Obrázek 14:** Kultivace HK-2 buněk v DMEM/F12 médiu s pyruvátem (7.–10. pasáž). **A**, fázový kontrast, 200×; **B**, Hoechst 33258 (modrá) - buněčné jádro, 200×; **C**, faloidin-FITC (zelená) - aktin, 200×; **D**, JC-1 (červená/zelená) - mitochondrie, 200×.



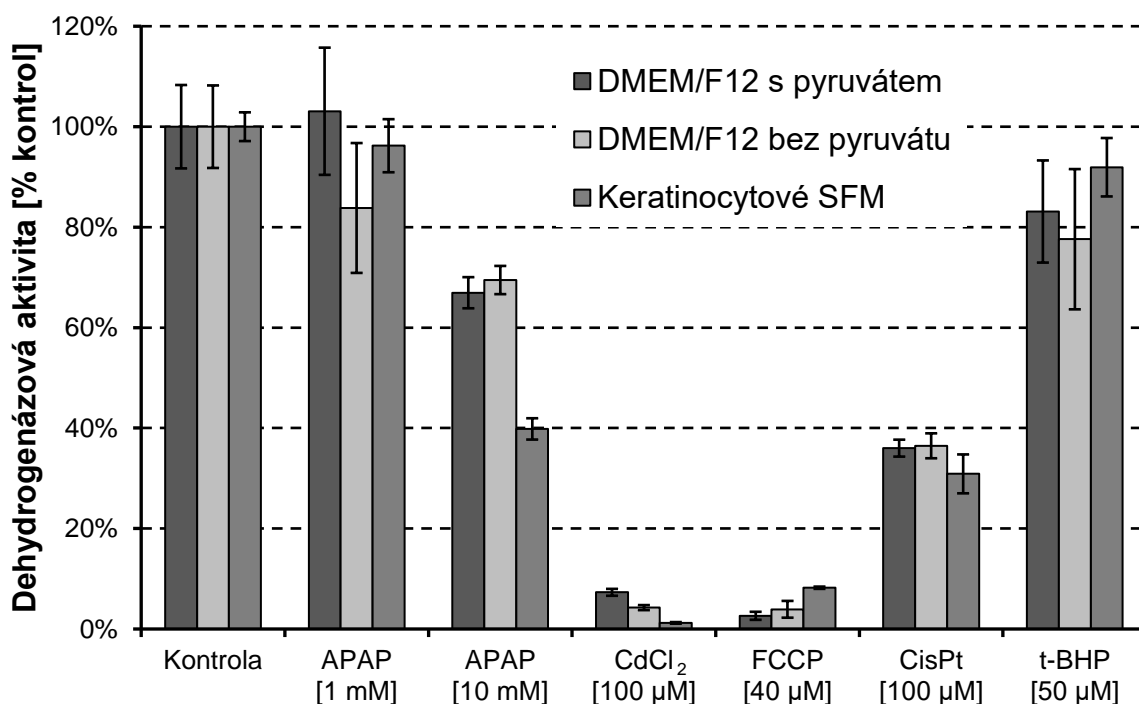
**Obrázek 15: Kultivace HK-2 buněk v DMEM/F12 médiu bez pyruvátu (7.–10. pasáž).**  
**A**, fázový kontrast, 200×; **B**, Hoechst 33258 (modrá) - buněčné jádro, 200×; **C**, faloidin-FITC (zelená) - aktin, 200×; **D**, JC-1 (červená/zelená) - mitochondrie, 200×.



**Obrázek 16: Kultivace HK-2 buněk v keratinocytovém SFM médiu (7.–10. pasáž).** **A**, fázový kontrast, 200×; **B**, Hoechst 33258 (modrá) - buněčné jádro, 200×; **C**, faloidin-FITC (zelená) - aktin, 200×; **D**, JC-1 (červená/zelená) - mitochondrie, 200×.

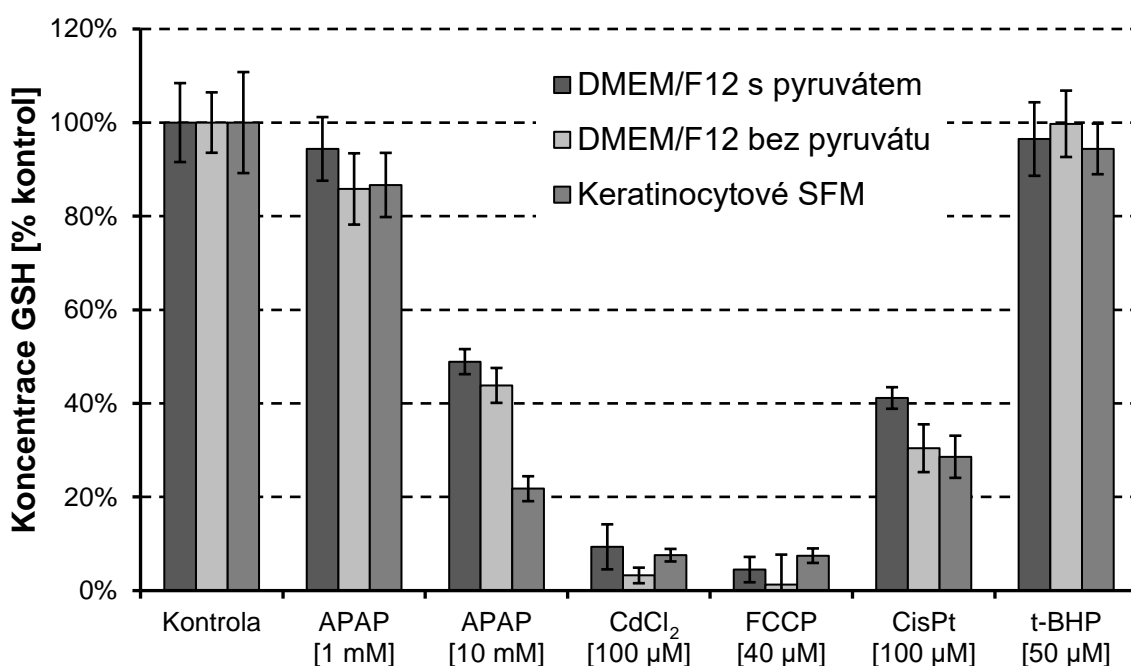
Z výsledků mikroskopické analýzy je patrné, že růst buněk ve všech třech typech kultivačních médií je podobný. Na obrázcích 14A, 15A a 16A jsou opět znatelné drobnější rozdíly ve tvaru kultivovaných kontrolních buněk. Nález tvarových změn byl patrný zejména u buněk inkubovaných v keratinocytovém SFM médiu. Rozdílné rozvinutí buněčného cytoskeletu je patrné díky zviditelnění aktinových vláken na obrázcích 14C, 15C a 16C. Modré konzistentní obarvení jader na obrázcích 14B, 15B a 16B nenasvědčuje tomu, že by kultivační média působila jakékoliv morfologické změny na úrovni buněčného jádra. Důležitým parametrem byl také stav mitochondrií zprostředkovaný detekcí mitochondriálního membránového potenciálu (obr. 14D, 15D a 16D). Červené zbarvení patrné na obrázcích 14D, 15D a 16D vypovídalo o fyziologickém stavu mitochondrií všech kultivovaných buněk.

Posledním studovaným parametrem v rámci volby vhodného kultivačního média pro HK-2 buňky bylo testování stability buněčné reakce při koinkubaci s vybranými modelovými toxiny. Nefrotoxické působení toxinů bylo po dobu 24 hod detekováno v největší míře u 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  a 40  $\mu\text{M}$  FCCP, kdy viabilita v obou případech poklesla až téměř na nulovou hodnotu, a to pro všechna studovaná média stejně (Graf 1). Pokles dehydrogenázové aktivity na hodnotu blízko 30 % aktivity kontrolních buněk byl zaznamenán u 100  $\mu\text{M}$  CisPt ve všech typech studovaných médií, a také u 10 mM koncentrace APAP v případě keratinocytového SFM média. U zbylých dvou kultivačních médií byla hodnota buněčné viability u 10 mM APAP blízka 60 % dehydrogenázové aktivity ve srovnání s kontrolními buňkami. Při inkubaci HK-2 buněk s 50  $\mu\text{M}$  t-BHP a s 1 mM APAP byly opět poklesy buněčné viability u všech tří studovaných kultivačních médií srovnatelné. Na základě provedeného experimentu lze říci, že odezva HK-2 buněk kultivovaných ve třech různých typech kultivačních médií k poškození danými látkami byla stabilní a nebyla ovlivněna typem kultivačního média. Primární data jsou součástí přílohy 1.



**Graf 1: Vliv typu média na dehydrogenázovou aktivitu buněk (WST-1 test).** HK-2 buňky byly v rozmezí 7.–10. pasáže kultivovány ve třech typech kultivačních médií (DMEM/F-12 s pyruvátém, DMEM/F12 bez pyruvátu a keratinocytové SFM). Inkubace s toxiny (24 hod): acetaminofen (APAP);  $\text{CdCl}_2$ ; FCCP; cisplatina (CisPt); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP). Průměr  $\pm$  SD (n = 6–8; 2 nezávislé experimenty). Primární data - příloha 1.

Analogické výsledky k výše zmíněným výsledkům buněčné viability poskytla i metoda pro stanovení koncentrace glutathionu (Graf 2). Primární data jsou uvedena v příloze 2. Hladina intracelulárního glutathionu byla ovlivněna působením modelových toxinů nezávisle na zvoleném typu kultivačního média. Pro kultivaci HK-2 buněk lze využít všechny tři typy testovaných kultivačních médií. Nejvýhodnějším se na základě provedených experimentů však jeví být médium DMEM/F12 s 5 % FBS a pyruvát, a proto bylo zvoleno jako kultivační médium v dalších experimentech.



**Graf 2: Vliv typu média na koncentraci glutathionu (MCB metoda).** HK-2 buňky byly v rozmezí 7.–10. pasáže kultivovány ve třech typech kultivačních médií (DMEM/F-12, DMEM/F12 bez pyruvátu a keratinocytové SFM). Inkubace s toxiny (24 hod): acetaminofen (APAP); CdCl<sub>2</sub>; FCCP; cisplatina (CisPt); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP). Průměr ± SD (n = 6–8; 2 nezávislé experimenty). Primární data - příloha 2.

## 4.2 Stabilita HK-2 buněk v průběhu pasážování

V rámci ověření stability funkčního stavu HK-2 buněk v průběhu střednědobého pasážování byly buňky kultivovány v rozmezí 3.–15. pasáže po dobu 13 týdnů v médiu DMEM/F12 obohaceném o 5 % FBS, pyruvát a dále o inzulín, transferin, seleničitan sodný, penicilin, streptomycin a epidermální růstový faktor.



#### 4.2.1 Analýza krátkých tandemových repetit

Prvním krokem před vlastním testováním funkční stability HK-2 buněk bylo potvrzení jejich původu. K tomu byla využita analýza krátkých tandemových repetit STR u 3., 8. a 15. pasáže buněk. Pro autentizaci buněčné linie bylo využito sedmnáct vybraných autosomálních polymorfismů. Z výsledku analýzy provedené firmou Geneti Biotech s.r.o. vyplývá, že shoda byla nalezena u všech testovaných alel. Lze tedy říci, že STR analýza prokázala 100% shodu námi kultivovaných buněk HK-2 s referenčním standardem, a to ve všech testovaných pasážích. Zároveň také potvrdila, že u HK-2 buněk nedocházelo se zvyšujícím se číslem pasáže k žádnému posunu v STR sekvencích. Dle doporučení Mezinárodního výboru pro ověřování buněčných linií (ICLAC) lze považovat linii za autentickou už v okamžiku, kdy je míra její shody s referenčním standardem vyšší než 80 % (ICLAC, 2014), což bylo v našem případě jednoznačně splněno.

#### 4.2.2 „Doubling time“ a střední velikost buněk

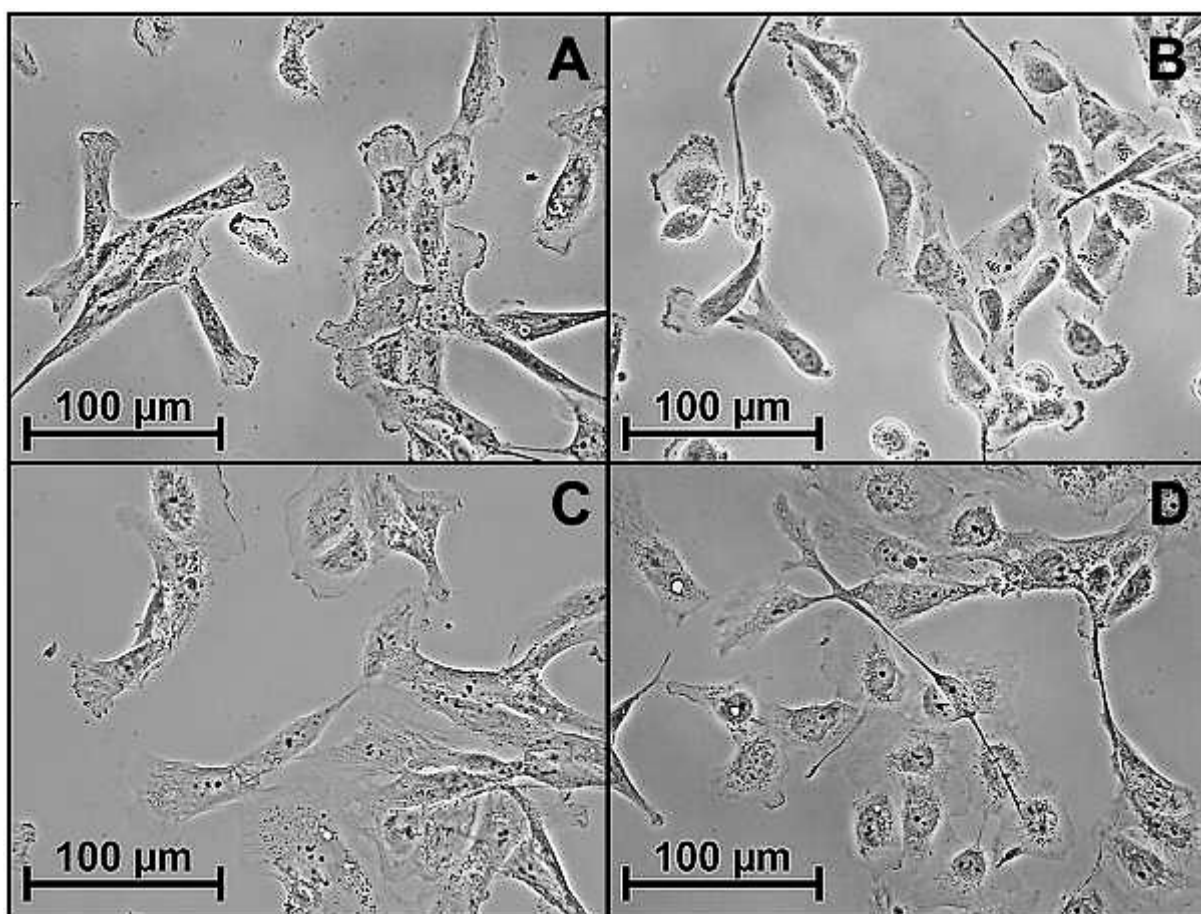
Získaná data pro kultivační charakteristiky buněk HK-2 během pasážování, jako je průměrný čas populačního zdvojnásobení (DT) a průměrná buněčná velikost, jsou shrnuta v tabulce 2.

**Tabulka 2:** Průměrná velikost a čas populačního zdvojnásobení HK-2 buněk vyjádřené jako průměry pro 3.–15. pasáž (SD < 1 %).

| Buněčná linie HK-2 |                                     |                                     |
|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Číslo pasáže       | Průměrná velikost [ $\mu\text{m}$ ] | Čas populačního zdvojnásobení [hod] |
| 3                  | 18,0                                | 57,0                                |
| 4                  | 18,4                                | 51,4                                |
| 5                  | 18,4                                | 52,2                                |
| 6                  | 18,4                                | 61,7                                |
| 7                  | 18,2                                | 51,1                                |
| 8                  | 18,3                                | 60,3                                |
| 9                  | 18,1                                | 53,6                                |
| 10                 | 18,5                                | 56,2                                |
| 11                 | 18,6                                | 54,5                                |
| 12                 | 18,2                                | 51,6                                |
| 13                 | 18,2                                | 50,2                                |
| 14                 | 17,7                                | 47,3                                |
| 15                 | 17,4                                | 51,2                                |

Průměrné hodnoty velikosti živých buněk HK-2 se nacházely v rozmezí 17,4 až 18,6  $\mu\text{m}$ . Střední hodnota velikosti HK-2 buněk vypočtená ze všech pasáží byla 18,2  $\mu\text{m}$ . Mezi průměrnou hodnotou velikosti buněk a číslem pasáže nebyl nalezen žádný významný vztah. Doba populačního zdvojnásobení byla vyjádřena jako průměr časů populačního zdvojnásobení v každé pasáži. Hodnoty DT se pohybovaly v rozmezí 47,3 až 61,7 hod (Tabulka 2). Průměrná hodnota DT napříč pasážemi byla 53,7 hod a ani v případě DT nebyl nalezen žádný významný vztah či změna vzhledem k číslu buněčné pasáže.

Kromě výsledků DT a měření střední velikosti buněk bylo pomocí mikroskopie s fázovým kontrastem potvrzeno, že HK-2 buňky mají v průběhu pasážování podobnou morfologii a velikost. Toto je zaznamenáno na obrázku 17, kde jsou zachyceny HK-2 buňky ve 3., 7., 12. a 15. pasáži.

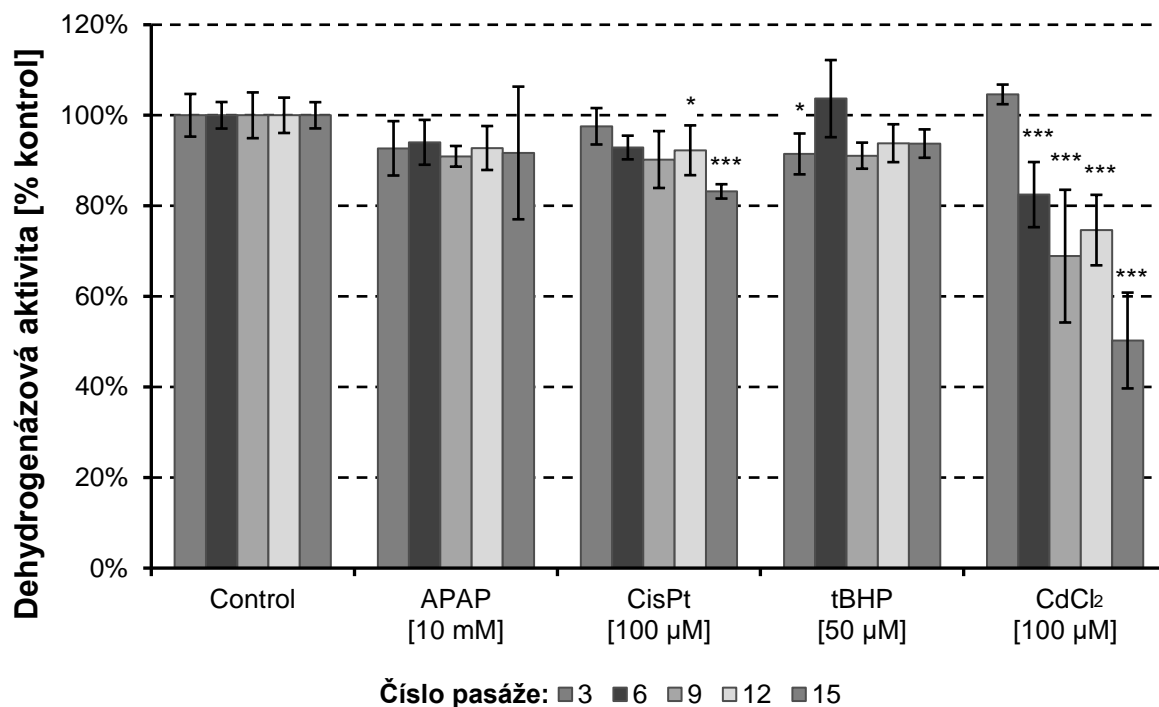


**Obrázek 17: HK-2 buňky v průběhu střednědobého pasážování.** Kultivace HK-2 buněk v rozmezí 3.–15. pasáže (A, pasáž 3; B, pasáž 7; C, pasáž 12; D, pasáž 15; fázový kontrast, 200 $\times$ ).

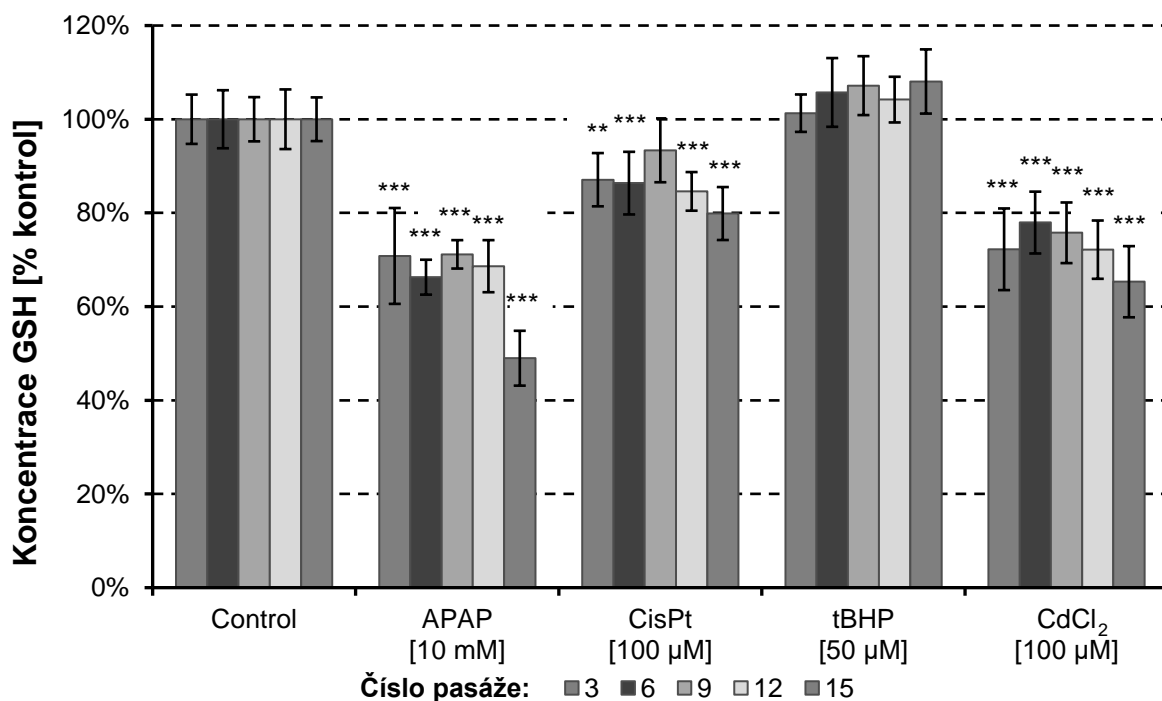
### 4.2.3 Stabilita citlivosti HK-2 buněk k působení toxinů

Pro zhodnocení vlivu střednědobé kultivace HK-2 buněk na úroveň citlivosti vůči toxickému působení látek byl použit WST-1 test dehydrogenázové aktivity a metoda MCB pro stanovení intracelulární koncentrace glutathionu. Buňky byly inkubovány s toxickými sloučeninami v každé z 3.–15. pasáže vždy po dobu 6 a 24 hod. Výsledky měření dehydrogenázové aktivity a intracelulární koncentrace glutathionu v HK-2 buňkách byly vztaženy jak ke kontrolním buňkám (Grafy 3, 4, 5 a 6), tak byly i vyjádřeny v absolutních hodnotách (Přílohy 4, 6, 8 a 10). V grafech 3, 4, 5 a 6 byly vyjádřeny pouze vybrané pasáže (3, 6, 9, 12 a 15) u nich byla provedena vedle dvourozměrné ANOVY i jednorozměrná ANOVA analýza pro posouzení změny buněčné odezvy těchto pasáží v průběhu působení vybraných toxinů. Kompletní primární data pro rozmezí pasáží 3.–15. jsou uvedena v přílohách 3, 5, 7 a 9, jako % kontrol a v přílohách 4, 6, 8 a 10 jako absolutní hodnoty.

WST-1 testem nebyl v rámci odpovídajících pasáží (3.–15. pasáž) po 6 hod inkubace s většinou toxinů zaznamenán žádný významný rozdíl dehydrogenázové aktivity ve srovnání s kontrolními buňkami (Graf 3). Pouze u HK-2 buněk ovlivněných 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  bylo nalezeno od 6. do 15. pasáže významné snížení buněčné viability (Graf 3). U buněk inkubovaných s APAP, CisPt a 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  však bylo ve srovnání s kontrolními buňkami odpovídajícího čísla pasáže po 6 hod nalezeno snížení hladiny glutathionu (Graf 4).



**Graf 3: Vliv pasážování na toxicitu látek - WST-1 test (6 hod).** HK-2 buňky byly v rozmezí 3.–15. pasáže kultivovány v DMEM/F12 médiu s toxiny: acetaminofen (APAP; 10 mM); cisplatina (CisPt; 100 µM); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP; 50 µM); CdCl<sub>2</sub> (100 µM). Průměr ± SD (n = 8–12; 3 nezávislé experimenty). \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (vs. kontrola daného časového intervalu). Primární data - příloha 3.

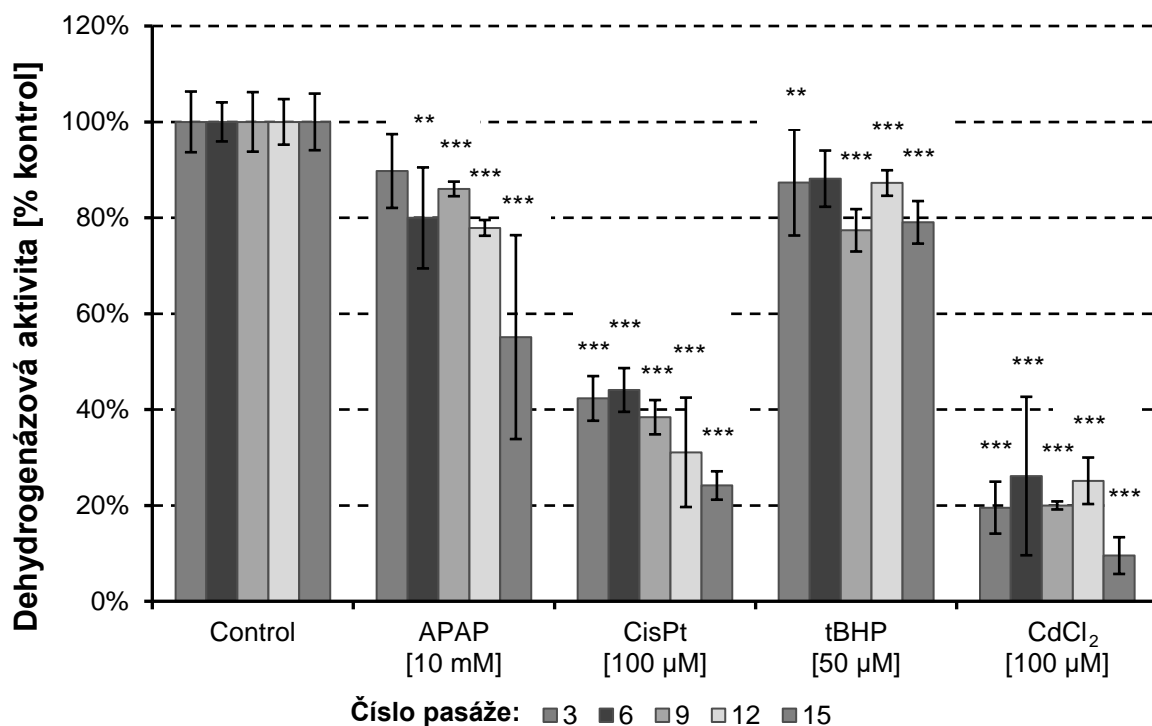


**Graf 4: Vliv pasážování na toxicitu látek - stanovení GSH (6 hod).** HK-2 buňky byly v rozmezí 3.–15. pasáže kultivovány v DMEM/F12 médiu s toxiny: acetaminofen (APAP; 10 mM); cisplatina (CisPt; 100 µM); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP; 50 µM); CdCl<sub>2</sub>; 100 µM). Průměr ± SD (n = 8–12; 3 nezávislé experimenty). \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (vs. kontrola daného časového intervalu). Primární data - příloha 5.

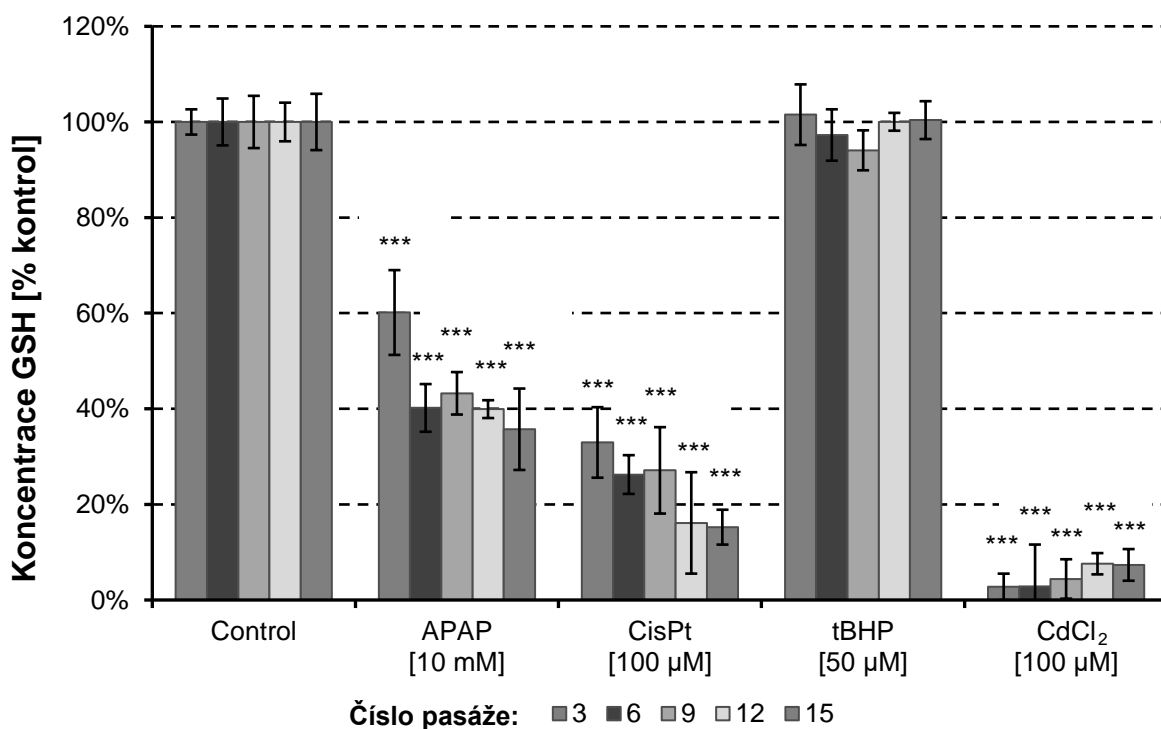
Pro vyhodnocení vlivu čísla pasáže na pozorovanou míru toxického působení po 6 hod inkubace byla využita dvourozměrná ANOVA, přičemž faktor A představoval typ toxinu a faktor B číslo pasáže. Na základě statistického vyhodnocení bylo zjištěno, že citlivost buněčné linie HK-2 k působení modelových toxinů u provedených biochemických testů nebyla napříč pasážemi totožná, a tedy číslo pasáže mělo již po 6 hod inkubace signifikantní vliv na míru toxického poškození buněk, a to u testu WST-1 ( $p < 0,001$ ) i stanovení glutathionu ( $p < 0,001$ ).

Významnější projevy toxických účinků použitých sloučenin byly zaznamenány po 24 hod inkubace. Pomocí WST-1 testu jsme detekovali významné snížení dehydrogenázové aktivity HK-2 buněk inkubovaných se 100  $\mu\text{M}$  CisPt a 100  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> (Grafy 5). K poškození buněk došlo i v případě APAP. Nejsilnější toxické působení z hlediska deplece glutathionu bylo zaznamenáno po 24 hod inkubace se 100  $\mu\text{M}$  CisPt, 100  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> a APAP (Grafy 6). Po inkubaci HK-2 buněk s 50  $\mu\text{M}$  t-BHP nebylo nalezeno žádné buněčné poškození. Na základě získaných výsledků lze také říci, že projevy toxicity byly patrnější na změnách hladin GSH než na změnách dehydrogenázové aktivity. Po závěrečném statistickém zhodnocení zaměřeném na hledání vlivu čísla pasáže na pozorovanou úroveň toxicity prostřednictvím dvourozměrné ANOVY byl opět nalezen statisticky významný efekt jak u stanovení glutathionu MCB ( $p < 0,001$ ), tak u testu WST-1 ( $p < 0,001$ ).

V rámci analýzy absolutních hodnot získaných dat (příloha 4, 6, 8 a 10) byly navíc porovnány hladiny glutathionové a dehydrogenázové aktivity napříč pasážemi u kontrolních HK-2 buněk. Zejména po 6 hod inkubace byly nalezeny výkyvy v pozdějších pasážích (14. a 15. pasáž) ve srovnání s ostatními pasážemi. Na základě naměřených výsledků jsme dospěli k závěru, že hladiny glutathionu a dehydrogenázová aktivita u HK-2 buněk se v rozmezí od 3.–15. pasáže mění a u vyšších testovaných pasáží přestávají mít HK-2 buňky stabilní odezvu na působení studovaných toxinů (příloha 4, 6, 8 a 10).



**Graf 5: Vliv pasážování na toxicitu látek - WST-1 test (24 hod).** HK-2 buňky byly v rozmezí 3.–15. pasáže kultivovány v DMEM/F12 médiu s toxiny: acetaminofen (APAP; 10 mM); cisplatina (CisPt; 100 µM); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP; 50 µM); CdCl<sub>2</sub> (100 µM). Průměr ± SD (n = 8–12; 3 nezávislé experimenty). \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ . Primární data - příloha 7.

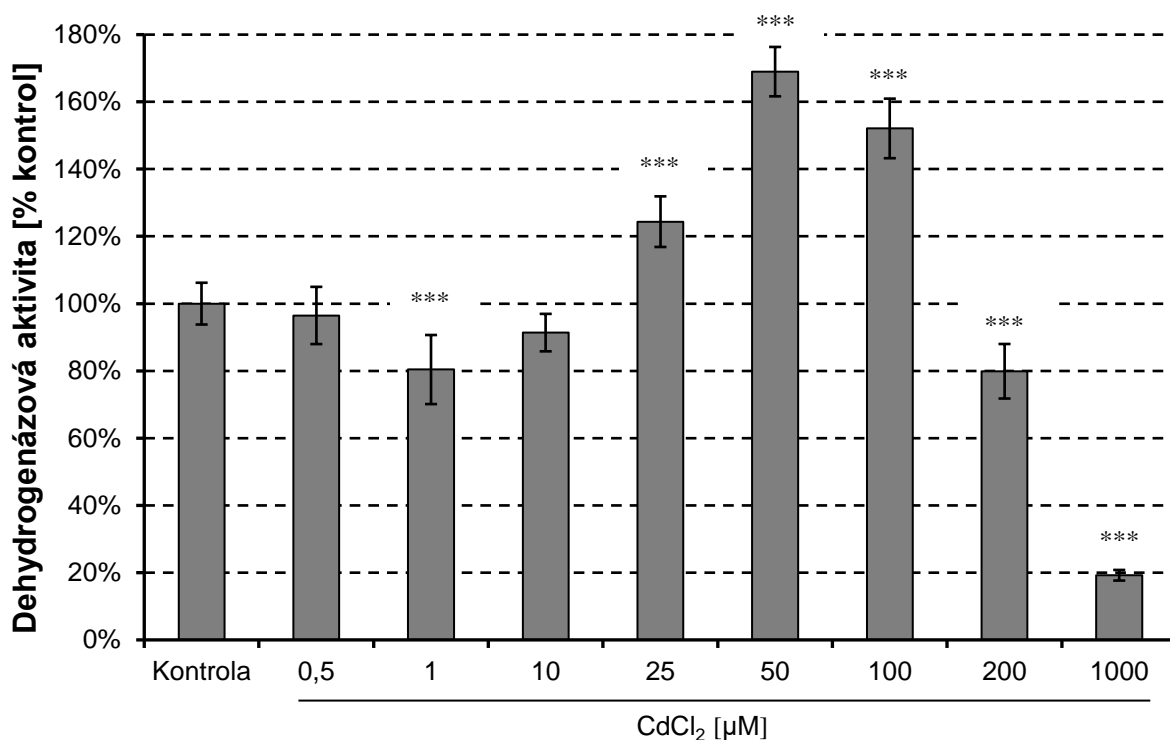


**Graf 6: Vliv pasážování na toxicitu látek - stanovení GSH (24 hod).** HK-2 buňky byly v rozmezí 3.–15. pasáže kultivovány v DMEM/F12 médiu s toxiny: acetaminofen (APAP; 10 mM); cisplatina (CisPt; 100 µM); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP; 50 µM); CdCl<sub>2</sub>; 100 µM). Průměr ± SD (n = 8–12; 3 nezávislé experimenty). \*\*\*,  $p < 0,001$ . Primární data - příloha 9.

### 4.3 Studium nefrotoxicity CdCl<sub>2</sub> *in vitro*

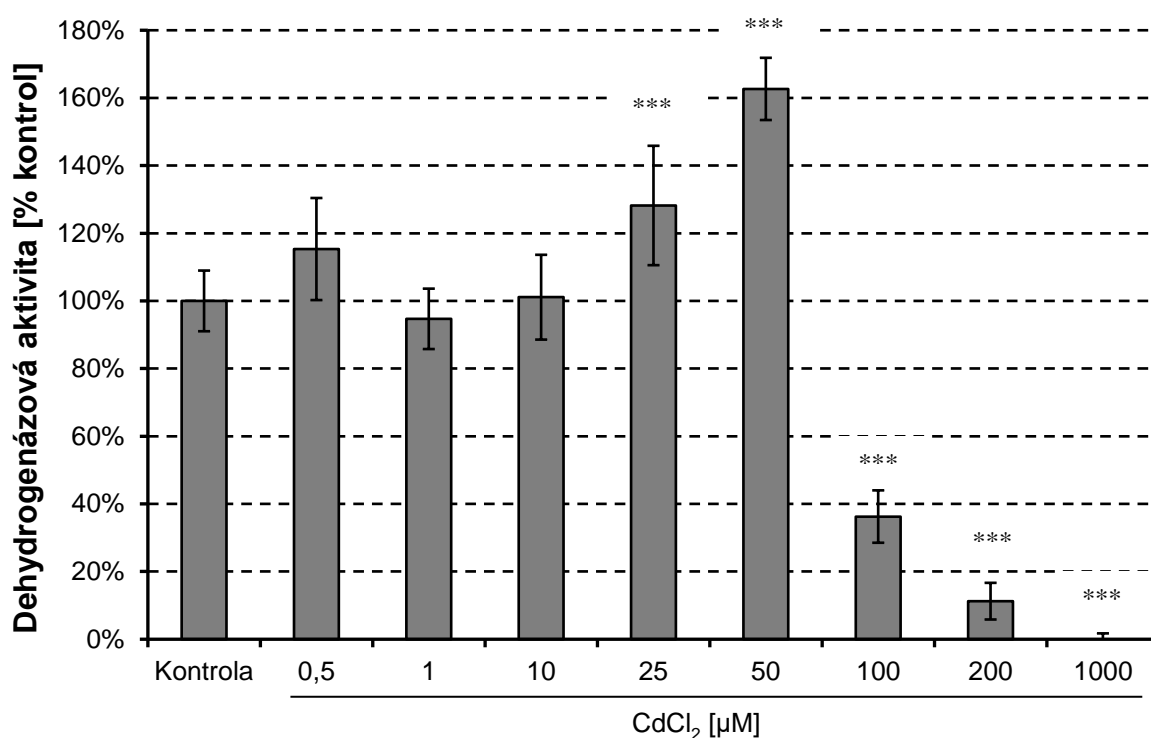
#### 4.3.1 Toxicita CdCl<sub>2</sub> – dehydrogenázová aktivita

Na základě výsledků studie (Hauschke et al., 2017) a výsledků experimentů souvisejících s testováním stability HK-2 buněk byla další část práce zaměřena na charakterizaci toxického účinku CdCl<sub>2</sub> u HK-2 buněk. Aktivita intracelulárních dehydrogenáz byla nejprve testována pro širší rozsah koncentrací CdCl<sub>2</sub> (0,1 μM–1 mM) při dobách inkubace HK-2 buněk s CdCl<sub>2</sub> 6 a 24 hod. Po 6 hod byla u buněk inkubovaných s 200 a 1000 μM CdCl<sub>2</sub> zaznamenána statisticky významná redukce dehydrogenázové aktivity na 80 ± 8% ( $p < 0,001$ ) a 19 ± 2% ( $p < 0,001$ ), ve srovnání s kontrolními buňkami (= 100 %) (Handl et al., 2019). Oproti tomuto nálezu bylo překvapivě nalezeno statisticky významné zvýšení buněčné viability u buněk inkubovaných s 25 μM (124 ± 8%;  $p < 0,001$ ), 50 μM (169 ± 7%;  $p < 0,001$ ) a 100 μM CdCl<sub>2</sub> (152 ± 9%;  $p < 0,001$ ) ve srovnání s kontrolními buňkami (Graf 7).



**Graf 7: Vliv CdCl<sub>2</sub> na dehydrogenázovou aktivitu (6 hod; WST-1 test).** HK-2 buňky byly v rozmezí 4.–11. pasáže kultivovány v DMEM/F12 médiu. Inkubace s CdCl<sub>2</sub> 0–1000 μM (6 hod). Průměr ± SD (n = 6–10; 3 nezávislé experimenty; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). Primární data - příloha 11.

Po 24 hod došlo k statisticky významnému poklesu životaschopnosti buněk ovlivněných 100, 200, a 1000  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  ( $p < 0,001$ ; Graf 8). Životaschopnost buněk HK-2 inkubovaných s 25  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  byla naopak signifikantně zvýšena ( $p < 0,001$ ) ve srovnání s kontrolními buňkami. Na základě těchto výsledků bylo překvapivě prokázáno, že za daných podmínek HK-2 buňky vykazují nárůst intracelulární dehydrogenázové aktivity po ovlivnění  $\text{CdCl}_2$  na rozdíl od očekávaného snížení intracelulární dehydrogenázové aktivity (Handl et al., 2019).



**Graf 8: Vliv  $\text{CdCl}_2$  na dehydrogenázovou aktivitu (24 hod; WST-1 test).** HK-2 buňky byly v rozmezí 4.–11. pasáže kultivovány v DMEM/F12 médiu. Inkubace s  $\text{CdCl}_2$  0–1000  $\mu\text{M}$  (24 hod). Průměr  $\pm$  SD ( $n = 6$ –10; 3 nezávislé experimenty; \*\*\*,  $p < 0,001$ ). Primární data - příloha 12.

Pro další testování a charakterizaci změn dehydrogenázové aktivity HK-2 buněk byly testovány koncentrace 5, 25, 100 a 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  po inkubaci 2-48 hod. Nejprve byla znovu testována intracelulární dehydrogenázová aktivita s využitím WST-1 testu (Tabulka 3). S výjimkou 5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  bylo nalezeno statisticky významné zvýšení intracelulární dehydrogenázové aktivity u všech testovaných koncentrací  $\text{CdCl}_2$  nepřímo úměrně době inkubace. V případě buněk ovlivněných 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  bylo zvýšení intracelulární dehydrogenázové aktivity detekováno již a pouze 2 hod



od počátku inkubace s CdCl<sub>2</sub>. Všechny delší časové intervaly inkubace HK-2 buněk s 200 μM CdCl<sub>2</sub> způsobily snížení dehydrogenázové aktivity buněk. U buněk ovlivněných 100 μM CdCl<sub>2</sub> bylo signifikantní zvýšení intracelulární dehydrogenázové aktivity nalezeno po 2, 6 a 10 hod od ovlivnění buněk. Statisticky významné snížení dehydrogenázové aktivity pak bylo nalezeno u buněk inkubovaných se 100 μM CdCl<sub>2</sub> po dobu 24 hod. Buňky inkubované s 25 μM CdCl<sub>2</sub> také vykazovaly známky zvýšené dehydrogenázové aktivity, avšak v pozdějších časových intervalech až po 6, 10 a 24 hod inkubace s CdCl<sub>2</sub> (Handl et al., 2019).

**Tabulka 3: Dehydrogenázová aktivita HK-2 buněk (WST-1 test; 2-48 hod inkubace s 0–200 μM CdCl<sub>2</sub>).** Šedá políčka indikují nález zvýšené dehydrogenázové aktivity. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD (kontrola = 100 %; n = 6–10; 3 nezávislé experimenty). \*,  $p < 0,05$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (vs. kontrola daného časového intervalu).

| Čas<br>(hod) | CdCl <sub>2</sub> [μM] |              |                |                |              |
|--------------|------------------------|--------------|----------------|----------------|--------------|
|              | 0                      | 5            | 25             | 100            | 200          |
| 2            | 100 ± 7 %              | 79 ± 7 % *** | 96 ± 7 %       | 138 ± 10 % *** | 114 ± 4 % *  |
| 6            | 100 ± 6 %              | 80 ± 9 % *** | 124 ± 8 % ***  | 152 ± 9 % ***  | 80 ± 8 % *** |
| 10           | 100 ± 5 %              | 101 ± 5 %    | 139 ± 6 % ***  | 173 ± 7 % ***  | 80 ± 5 % *** |
| 24           | 100 ± 9 %              | 92 ± 6 %     | 128 ± 18 % *** | 36 ± 8 % ***   | 11 ± 5 % *** |
| 48           | 100 ± 10 %             | 102 ± 4 %    | 101 ± 3 %      | 2 ± 0 % ***    | 0 % ***      |

#### 4.3.2 Toxicita CdCl<sub>2</sub> – koncentrace glutathionu a produkce ROS

Zvýšení dehydrogenázové aktivity by mohlo být zapříčiněno v souvislosti se změnami oxidačního metabolismu buněk, proto byla studována hladina GSH a produkce ROS. Z naměřených výsledků uvedených v tabulce 3 je patrné, že produkce ROS souvisí s nálezem zvýšení aktivity dehydrogenáz. Významné zvýšení produkce ROS bylo nalezeno v buňkách inkubovaných 2 a 6 hod s 200 μM CdCl<sub>2</sub>. Po 6 a 24 hod byla zvýšená produkce ROS zaznamenána také u buněk ovlivněných

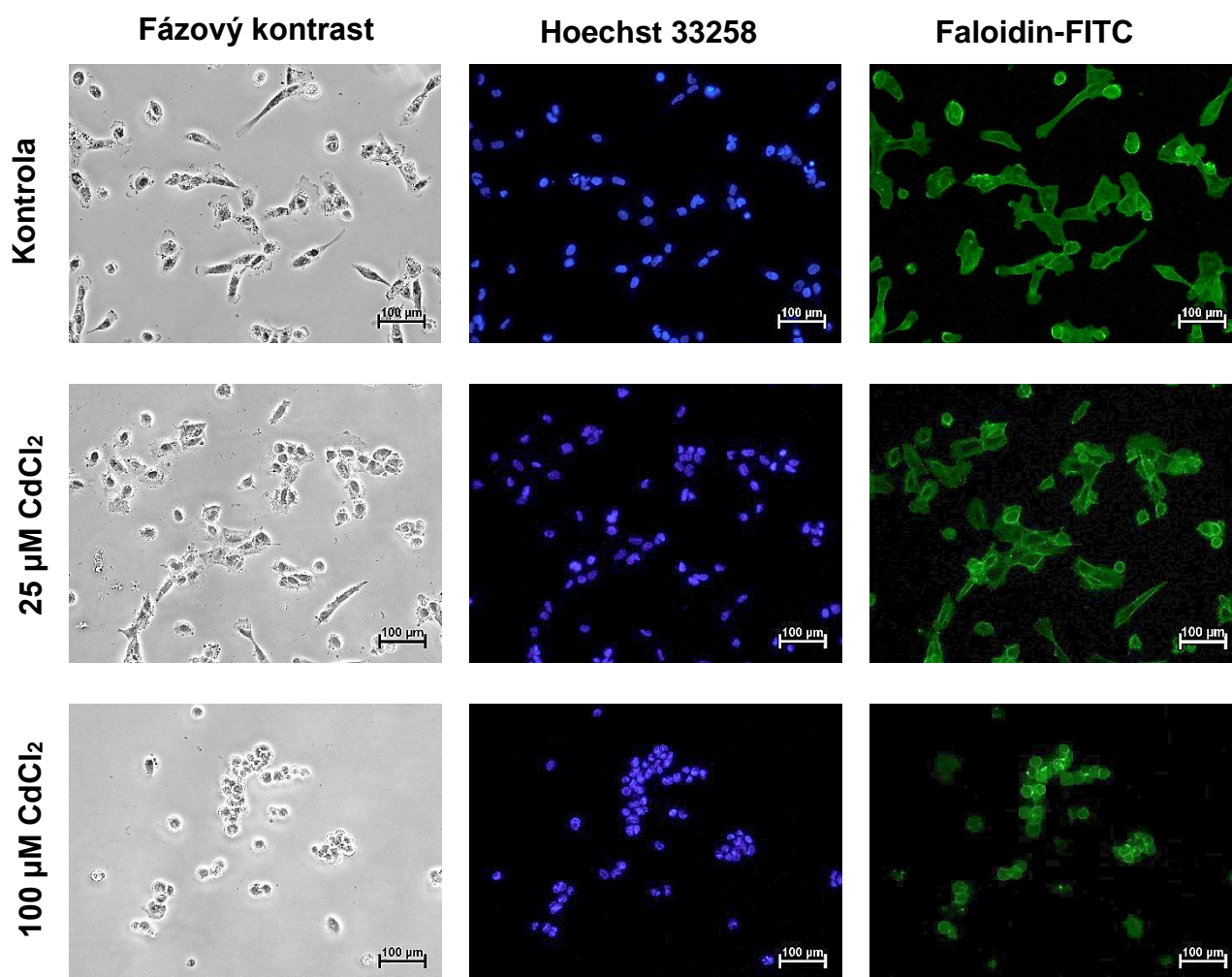
25 a 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  (Tabulka 4). Z pohledu intracelulární hladiny GSH byl detekován signifikantní pokles u buněk ovlivněných 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  v rámci všech testovaných časových intervalů inkubace HK-2 buněk s  $\text{CdCl}_2$ . Podobné výsledky byly nalezeny i u buněk ovlivněných 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . Jediným rozdílem bylo, že snížení intracelulárního GSH nebylo po 2 hod inkubace buněk s  $\text{CdCl}_2$  tak velké, aby byl rozdíl vůči kontrolním buňkám statisticky významný. U HK-2 buněk ovlivněných 5 a 25  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  nebyly nalezeny signifikantní změny hladiny GSH ani v jednom z testovaných časů inkubace s  $\text{CdCl}_2$  (Handl et al., 2019).

**Tabulka 4: Oxidační metabolismus HK-2 buněk (stanovení ROS a GSH; 2–24 hod inkubace s 0–200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ ).** Hladiny ROS byly hodnoceny pomocí chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetátové sondy. Hladiny GSH byly měřeny prostřednictvím metody MCB. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr  $\pm$  SD (kontrola = 100 %; n = 6–10). \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  (vs. kontrola daného časového intervalu).

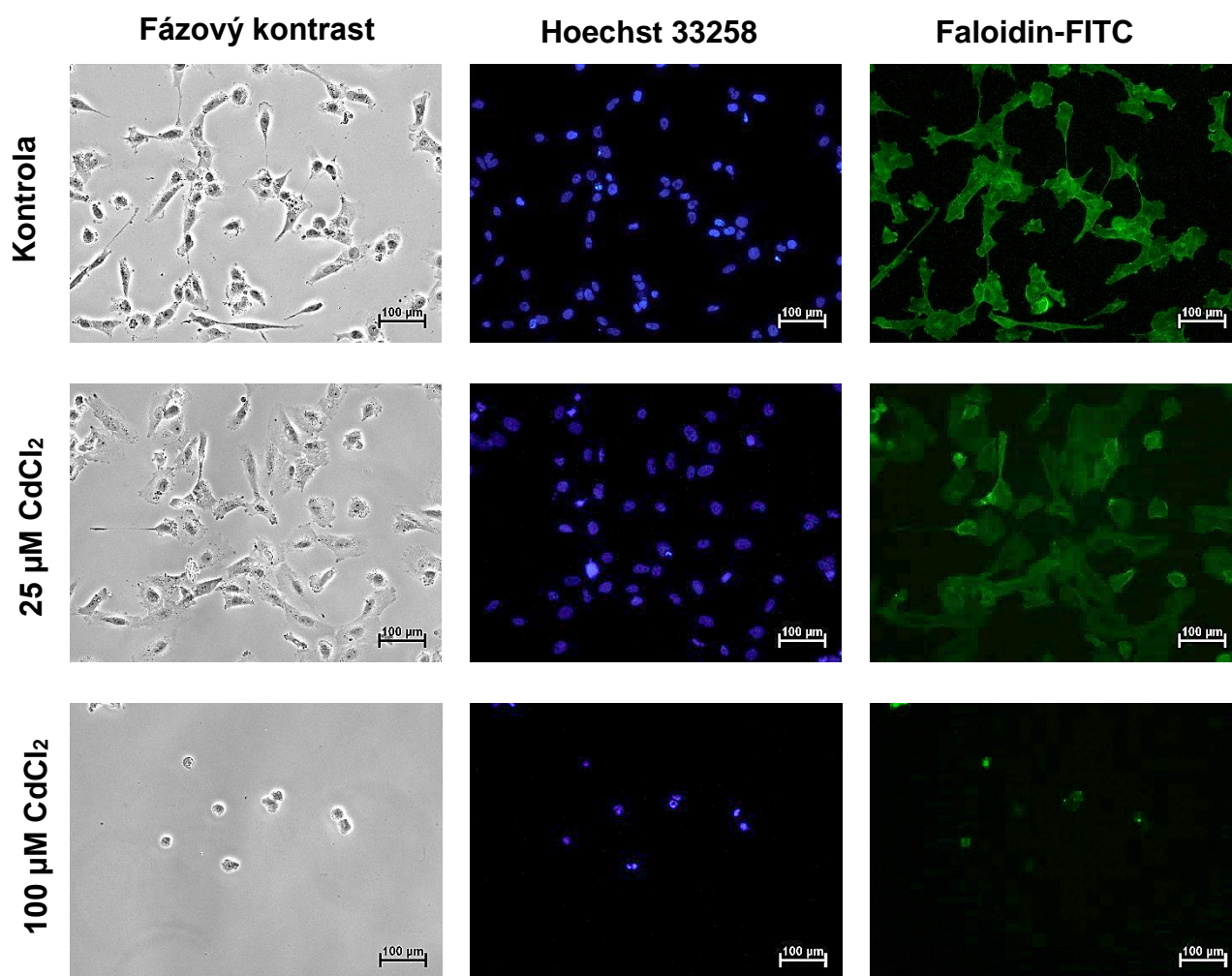
| Čas (hod) | $\text{CdCl}_2$ [ $\mu\text{M}$ ] | ROS                | GSH              |
|-----------|-----------------------------------|--------------------|------------------|
| 2         | 0                                 | 100 $\pm$ 13 %     | 100 $\pm$ 5 %    |
|           | 5                                 | 60 $\pm$ 6 % ***   | 102 $\pm$ 4 %    |
|           | 25                                | 57 $\pm$ 9 % ***   | 99 $\pm$ 3 %     |
|           | 100                               | 49 $\pm$ 12 % ***  | 93 $\pm$ 1 %     |
|           | 200                               | 148 $\pm$ 13 % *** | 87 $\pm$ 4 % *** |
| 6         | 0                                 | 100 $\pm$ 14 %     | 100 $\pm$ 4 %    |
|           | 5                                 | 90 $\pm$ 9 %       | 97 $\pm$ 4 %     |
|           | 25                                | 69 $\pm$ 5 % **    | 97 $\pm$ 3 %     |
|           | 100                               | 189 $\pm$ 14 % *** | 79 $\pm$ 3 % *** |
|           | 200                               | 311 $\pm$ 21 % *** | 59 $\pm$ 3 % *** |
| 10        | 0                                 | N/A                | 100 $\pm$ 4 %    |
|           | 5                                 | N/A                | 99 $\pm$ 3 %     |
|           | 25                                | N/A                | 105 $\pm$ 2 %    |
|           | 100                               | N/A                | 59 $\pm$ 3 % *** |
|           | 200                               | N/A                | 39 $\pm$ 2 % *** |
| 24        | 0                                 | 100 $\pm$ 14 %     | 100 $\pm$ 3 %    |
|           | 5                                 | 86 $\pm$ 5 %       | 102 $\pm$ 4 %    |
|           | 25                                | 204 $\pm$ 23 % *** | 102 $\pm$ 4 %    |
|           | 100                               | 78 $\pm$ 12 %      | 7 $\pm$ 1 % ***  |
|           | 200                               | 88 $\pm$ 15 %      | 5 $\pm$ 1 % ***  |

### 4.3.3 Toxicita CdCl<sub>2</sub> – mikroskopie

Pro posouzení morfologických změn HK-2 buněk ovlivněných 0-100 μM CdCl<sub>2</sub> byly využity fluorescenční sondy. Doba inkubace HK-2 buněk s CdCl<sub>2</sub> byla 6 a 24 hod. U buněk byl studován stav kondenzace jaderného chromatinu (Hoechst 33258) a struktura a rozptřeni aktinových vláken (faloidin-FITC). Výsledky fluorescenčního značení buněčných organel jsou shrnuty na obrázcích 18 a 19. Již po 6hodinové inkubaci HK-2 buněk se 100 μM CdCl<sub>2</sub> jsou patrné změny tvaru buněk pomocí vizualizace buněčného cytoskeletu, množství HK-2 buněk je nižší, jsou méně přisedlé a jejich tvar je spíše kulovitý. V ještě větší míře jsou tyto změny pozorovatelné po 24 hod inkubaci HK-2 buněk se 100 μM CdCl<sub>2</sub>. Koncentrace CdCl<sub>2</sub> 25 μM na HK-2 buňky nepůsobila v tak velké míře, jako 100 μM CdCl<sub>2</sub>. Přesto po 24 hod lze i u těchto buněk pozorovat morfologické změny v souvislosti s působením CdCl<sub>2</sub>.



Obrázek 18: HK-2 buňky inkubované s CdCl<sub>2</sub> (25, 100 a 200 μM); 6 hod (6. pasáž). Fázový kontrast, 200×; Hoechst 33258 (modrá) - buněčné jádro, 200×; faloidin-FITC (zelená) - aktin, 200×.

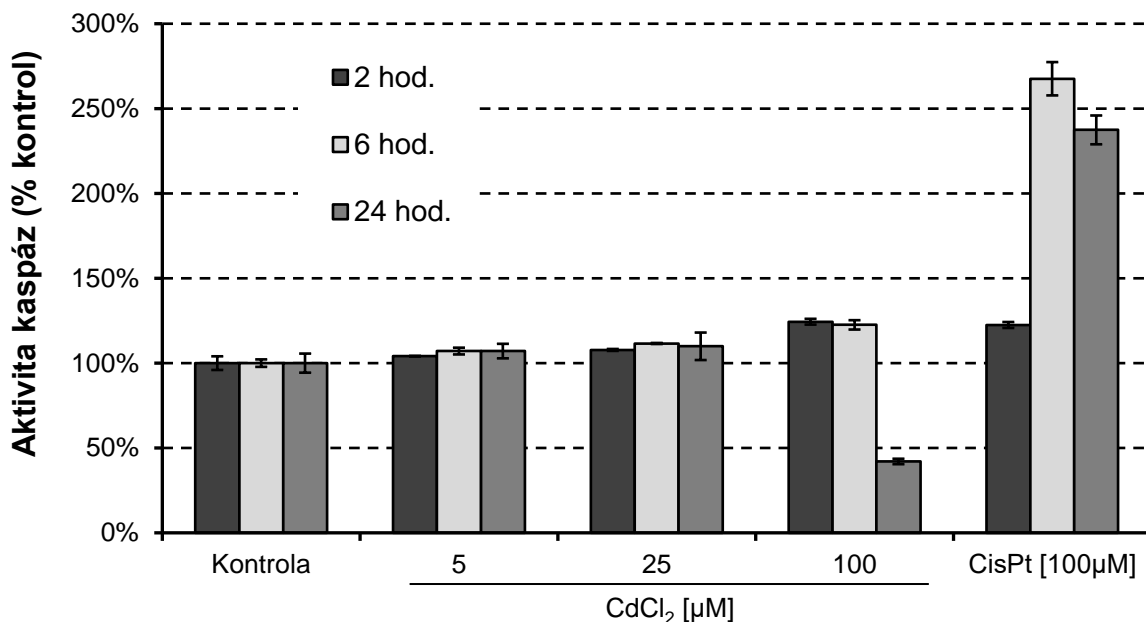


**Obrázek 19: HK-2 buňky inkubované s CdCl<sub>2</sub> (25, 100 a 200 μM); 24 hod (6. pasáž).** Fázový kontrast, 200×; Hoechst 33258 (modrá) - buněčné jádro, 200×; faloidin-FITC (zelená) - aktin, 200×.

#### 4.3.4 Toxicita CdCl<sub>2</sub> – markery apoptózy

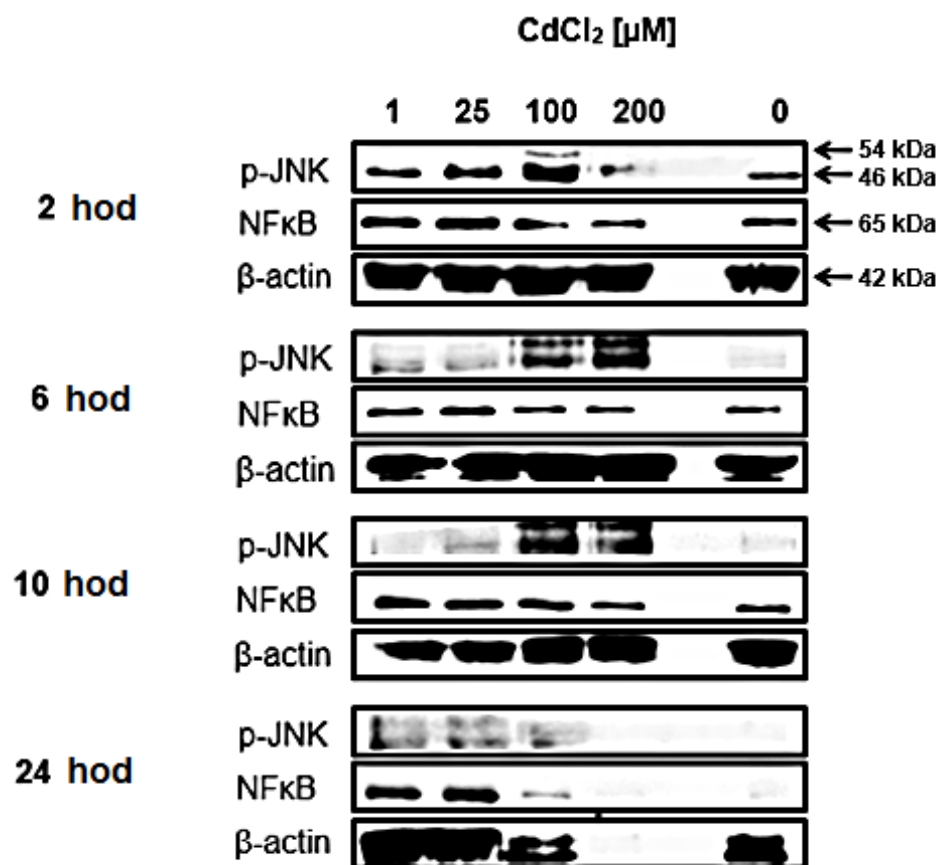
Změny v buněčném jádře vyjádřené hodnocením kondenzace jaderné DNA, měřením aktivity kaspáz a hodnocením aktivace p-JNK a NFκB, představovaly další studovanou oblast v rámci zkoumání toxického působení kadmia. Prostřednictvím intracelulární sondy Hoechst 33258 byl nalezen zvýšený fluorescenční signál kondenzované DNA u buněk ovlivněných 200 μM CdCl<sub>2</sub> po 10 a 24 hod inkubace. Po 24 hod byla detekována zvýšená kondenzace jaderného chromatinu i u buněk inkubovaných se 100 μM CdCl<sub>2</sub>. Další významné nálezy z pohledu zvýšené kondenzace jaderného chromatinu již zaznamenány nebyly. Aktivita efektorových kaspáz byla sledována ve třech časových intervalech doby inkubace HK-2 buněk se třemi vybranými koncentracemi CdCl<sub>2</sub> (5, 25 a 100 μM).

Jako pozitivní kontrola byla využita 100  $\mu\text{M}$  cisplatina. Právě u CisPt došlo k nejvyššímu zvýšení aktivity efektorových kaspáz 3 a 7, a to po 6 hod o 150 % (Graf 9).



**Graf 9: Aktivita kaspáz 3 a 7 u HK-2 buněk inkubovaných s CdCl<sub>2</sub> po 2, 6 a 24 hod.** Aktivita kaspáz 3 a 7 byla měřena u HK-2 buněk po inkubaci s 5-100  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> a 100  $\mu\text{M}$  CisPt. Průměr  $\pm$  SD (n = 3). Primární data - příloha 13.

JNK aktivace byla detekována prostřednictvím Western blot. Zvýšené hladiny proteinu p-JNK byly detekovány po 2, 6 a 10 hod u buněk ovlivněných 100 a 200  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>. Po 24 hod byla aktivace p-JNK detekována u všech testovaných koncentrací CdCl<sub>2</sub> s výjimkou buněk vystavených účinku 200  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> (Obr. 20). Kromě sledování aktivace p-JNK bylo testování zaměřeno i na detekci aktivace NF $\kappa$ B. Zjištěné výsledky však neprokázaly žádné signifikantní změny týkající se aktivace NF $\kappa$ B u HK-2 buněk ovlivněných CdCl<sub>2</sub>.



Obrázek 20: Proteinová exprese p-JNK a NFκB u HK-2 buněk inkubovaných s 0–200 μM CdCl<sub>2</sub> (2-24 hod).

## 5 DISKUSE

Jedním z nejčastějších cílů z pohledu toxického působení látek jsou ledviny. Studium nefrotoxicity je z hlediska testování *in vitro* klíčovým tématem i pro tuto disertační práci. Imortalizované lidské proximální tubulární buňky HK-2 představují díky svým vlastnostem vhodný buněčný model pro testování nefrotoxického působení látek a také pro studium mechanismů spojených s poškozením ledvin. Jedním z hlavních důvodů, proč jsou HK-2 buňky jako *in vitro* model s oblibou využívány, je to, že si zachovávají funkční vlastnosti původní tkáně, ze které byly izolovány (Gunness et al., 2010). Právě použití HK-2 buněk se od roku 1994, kdy byly poprvé popsány ve studii Ryan *et al.* 1994, značně rozšířilo. Lze je využít pro výzkum zaměřený na celou řadu oblastí. Mezi nejfrekventovanější z nich patří studium buněčné smrti (Ge et al., 2017; Yang et al., 2019b), obecné cytotoxicity (Peng et al., 2018; Qiu et al., 2018), toxicity léčiv (Gunness et al., 2010), nanomateriálů (Pujalté et al., 2011) a také nefrotoxicity těžkých kovů (Handl et al., 2019; Shrestha et al., 2017; Wilmes et al., 2011). Mimo to jsou HK-2 buňky využívány i v souvislosti se studiem rozsáhlejších poruch, jako jsou nefropatické změny doprovázející *diabetes mellitus* (Bernardo-Bermejo et al., 2019; Wang et al., 2019) či při výzkumech zaměřených na komplexní onemocnění ledvin (Zhao et al., 2019). Tyto výše zmíněné příklady společně poukazují na to, že význam HK-2 buněk ve srovnání s jinými ledvinnými buněčnými liniemi postupně narůstá.

Fenotyp proximálních tubulárních buněk je dle původní studie Ryan *et al.* 1994, v HK-2 buňkách zachován, existují však i studie, které s tímto tvrzením nesouhlasí. Jedním takovým příkladem je studie Huang *et al.* 2015 srovnávající HK-2 buňky s primárními ledvinnými buňkami HRPTEC. Tato studie ve svých závěrech poskytla důkaz, že HRPTEC buňky produkují ve srovnání s HK-2 buňkami relevantnější hladiny molekul KIM-1 a NGAL (Huang et al., 2015). Ačkoliv byla tvrzení tohoto článku například studií Hauschke *et al.* 2017 spíše vyvrácena, přetrvávají jisté obavy týkající se funkční kapacity HK-2 buněk pro testování nefrotoxických účinků látek. Další studií, jejíž závěry jsou pro HK-2 buňky spíše negativní, je studie Jenkinson *et al.* 2012. Z výsledků v této studii publikovaných vyplývá, že HK-2 buňky mají ve srovnání s primárními lidskými ledvinnými buňkami sníženou expresi některých membránových transportérů (Jenkinson et al., 2012). Navzdory všem nalezeným

omezením je však na HK-2 buněčnou linii stále pohlíženo jako na stabilní immortalizovanou buněčnou linii, aniž by její stabilita byla dále ověřována. Přestože užití buněčné linie HK-2 jako modelu pro testování nefrotoxicity je poměrně časté, je překvapivé, že zatím nebyl výše zmíněný předpoklad stability HK-2 buněk dostatečně ověřen.

V literatuře dosud nebylo jednoznačně definováno ani to, zda jsou HK-2 buňky citlivé na změny kultivačních podmínek. Z tohoto důvodu bylo v rámci našich cílů velice důležité zvolit, ověřit a striktně dodržovat podmínky jejich kultivace, aby nedošlo ke změně jejich původních vlastností, které jakožto immortalizované epiteliální proximální tubulární buňky přirozeně mají. Základním předpokladem pro dlouhodobé udržení stability jakékoliv buněčné linie jsou vhodné kultivační podmínky. Parametry týkající se teploty uchovávání, optimálního množství CO<sub>2</sub>, či kultivačních povrchů se u jednotlivých typů buněčných linií příliš nemění. Existují však i takové kultivační parametry, které se dle konkrétního vybraného buněčného typu významně liší. Jedním z takových parametrů a zároveň jedním ze základních předpokladů pro udržení stabilní netransformované buněčné linie se stabilními fenotypovými projevy je volba kultivačního média. I v případě našeho testování stability buněčné linie HK-2 bylo v první řadě nutné zvolit optimální kultivační médium, které by HK-2 buňkám svým složením vyhovovalo a neovlivňovalo negativně jejich funkční a morfologické charakteristiky.

Keratinocytové SFM médium pro kultivaci buněčné linie HK-2 bylo mezi testovanými zvoleno dle doporučení ATCC (*American Type Culture Collection*). Dle výrobce (Gibco, Thermo Fisher Scientific s.r.o., USA) je keratinocytové SFM médium optimalizováno zejména pro růst lidských keratinocytů, lze ho však využít i pro kultivaci dalších typů epiteliálních buněk, a to bez nutnosti využití „*feeder layer*“, tedy podpůrné vrstvy buněk (Gibco, 2014). Pro kultivaci HK-2 buněk je doporučováno obohatit výchozí kultivační keratinocytové SFM médium o BPE a EGF. V této podobě bylo keratinocytové SFM médium využito i v několika publikacích (Handa, 2001; Sohn et al., 2013). V rámci našeho optimalizačního kroku bylo jako alternativní základové médium zvoleno DMEM/F-12 s/bez fenolové červeně. Jeho využití pro kultivaci HK-2 buněk je poměrně rozšířené (Arbillaga et al., 2006; Du et al., 2010; Gao et al., 2013; Huang et al., 2015; Jenkinson et al., 2012) a v souvislosti s HK-2 buňkami převyšuje četnost využití keratinocytového SFM média. Na základě námi prostudovaných



publikací lze říci, že poměr využití SFM vs. DMEM/F12 je asi 1:5. DMEM/F12 bylo v našem případě navíc obohaceno o vybrané suplementy. Jedním z nich byl i pyruvát, který sloužil jako jedna z živin pro kultivované HK-2 buňky. Jeho prospěšnost pro jakékoliv kultivované buněčné linie je však předmětem diskusí (Babich et al., 2009). Z tohoto důvodu bylo jako další porovnávané médium v rámci našich experimentů zvoleno DMEM/F-12 bez pyruvátu, jehož přítomnost v médiu byla jediným rozdílným parametrem oproti již zmíněnému DMEM/F12 médiu. V souvislosti s kultivací HK-2 buněk bylo v literatuře sporadicky zmíněno také médium RPMI (Ge et al., 2017), to však mezi námi porovnávaná média zařazeno nebylo. Z celkových výsledků našeho sledování morfologických změn bylo patrné, že všechna testovaná kultivační média jsou využitelná pro kultivaci HK-2 buněk. Vzhledem k našim závěrům hodnocení buněčné morfologie však bylo jako nejvhodnější kultivační médium zvoleno DMEM/F12 doplněné o suplementy včetně pyruvátu. Zvolené DMEM/F12 s pyruvátem je v souladu s většinou publikovaných prací, které pro *in vitro* testování buněčnou linií HK-2 využívají (Arbillaga et al., 2006; Du et al., 2010; Gao et al., 2013; Han et al., 2020; Hu et al., 2020; Huang et al., 2015; Jenkinson et al., 2012).

Zaměříme-li se na problematiku změn stability buněčných linií při základní buněčné kultivaci, zjistíme, že existuje jen málo studií charakterizujících tyto změny. Jejich výsledky a závěry jsou navíc do značné míry nepřesvědčivé (Sambuy et al., 2005; Wenger et al., 2004; Yu et al., 1997). Převážná většina těchto studií je zaměřena na hledání buněčných změn v souvislosti s nádorovými nebo primárními buněčnými liniemi, nikoliv však v souvislosti s transfekovanými, nebo jinak immortalizovanými liniemi. Velmi důležité z pohledu správné interpretace výsledků studií prováděných na buněčných liniích se jeví být sledování vlivu pasážování na konkrétní výsledky studií (Ben-David et al., 2018). V současné době je patrné, že tyto informace o vlivu buněčné pasáže na konkrétní výsledky chybí, stejně tak jako informace o dlouhodobé stabilitě buněčných linií. Dle posledních informací databáze PubMed je v současné době pravidelně ročně publikováno okolo dvou set studií, které používají HK-2 buňky pro testování *in vitro* a tento trend se v čase zvyšuje. Celá řada autorů však, i v nově publikovaných vědeckých pracích, opomíjí uvádět rozmezí pasáží HK-2 buněk, které ve svých studiích využili (Amaral et al., 2017; Campos et al., 2018; Lee et al., 2019a; Medina-Navarro et al., 2019; Nho et al., 2018; Song et al., 2018; Yang et al., 2019b; Yeh et al., 2019). Většina z autorů, kteří číslo pasáže ve svých pracích uvedli,

pracuje v rozmezí <5 pasáží (Devocelle et al., 2019; Gao et al., 2017; Handl et al., 2019; Huang et al., 2017a; Lu et al., 2018), <20 pasáží (Devocelle et al., 2019; Han et al., 2018; Huang et al., 2017b; Lee et al., 2019b; Lu et al., 2018; Vrbová et al., 2016; Wang et al., 2006) nebo dokonce ve větším rozmezí (Chang and Singh, 2019). Z celé řady publikovaných prací se pouze jedna okrajově zabývala i možným vlivem čísla pasáže na výsledky spojené s kultivací HK-2 buněk (Lu et al., 2018).

Vzhledem k nedostatku informací charakterizujících pravděpodobné funkční změny HK-2 buněk jsme se po vytipování vhodného kultivačního média zaměřili na kontinuální kultivaci HK-2 buněk po dobu tří měsíců a ověření funkční stability. Během této doby bylo studováno, zda u HK-2 buněk nedochází ke změnám jejich vlastností, zda se nemění stabilita jejich odpovědi na působení modelových toxinů, a zda nedochází ke změnám z pohledu buněčné morfologie. Toto bylo studováno a porovnáváno v rozmezí od 3. do 15. buněčné pasáže. Rozsah testovaných pasáží byl zvolen v závislosti na literatuře, dle které jsou pro testování nefrotoxického působení látek na HK-2 buňkách nejčastěji využívány buněčné kultury nepřesahující stáří 18. pasáže (Devocelle et al., 2019; Gao et al., 2017; Han et al., 2018; Huang et al., 2017a; Huang et al., 2017b; Lee et al., 2019b; Lu et al., 2018; Vrbová et al., 2016).

Pro potvrzení autentizace buněčné linie HK-2 a vyloučení její křížové kontaminace byla provedena analýza STR, a to opakovaně ve 3., 8. a 15. pasáží. Analýza STR potvrdila 100% shodu testovaných pasáží s referenční buněčnou linií HK-2. Dále byl pro určení stability buněčné linie použit „*Doubling Time*“, který vypovídá o stabilitě proliferačního potenciálu (Kwist et al., 2015; Shay and Wright, 2000). Z naměřených výsledků vyplývá, že zvyšující se číslo pasáže u buněčné linie HK-2 nemá na DT významný vliv, což podporuje předpokládanou stabilitu použitých HK-2 buněk. Stanovená hodnota DT byla blízka 54 hod.

Vliv střednědobé kultivace HK-2 buněk na citlivost vůči působení nefrotoxických sloučenin ve všech zvolených pasážích byl pro hodnocení stability buněk HK-2 zcela zásadní. K vyvolání toxicity jsme použili čtyři vybrané látky lišící se mechanismy jejich toxického působení. Jako induktor oxidačního stresu byl zvolen *tert*-butylhydroperoxid. Dále byla testována dvě léčiva, a to acetaminofen a cisplatina, a pro indukci buněčného poškození těžkými kovy byl zvolen CdCl<sub>2</sub>. Testované koncentrace sloučenin byly vybrány dle předchozích toxikologických studií týkajících se CisPt (Genc et al., 2014; Huang et al., 2015; Kim et al., 2014), kadmia (Fujiki et al., 2013;

Kim et al., 2014), acetaminofenu (Wu et al., 2009) a t-BHP (Hauschke et al., 2017). Po 6 a 24 hod inkubace HK-2 buněk s toxiny byla zjištěna významná úroveň toxicity v buňkách HK-2 vystavených účinku APAP, CisPt a 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub>. Poškození buněk vyjádřené snížením buněčné viability a vyčerpáním glutathionu bylo plně srovnatelné s výsledky u koncentrací toxinů uvedenými v jiných studiích s APAP (Ruan et al., 2019; Zhang et al., 2007), CisPt (Oh et al., 2017; Yang et al., 2019a) a CdCl<sub>2</sub> (Fujiki et al., 2019; Ge et al., 2018; Chou et al., 2019; Kim et al., 2014). Následné vyhodnocení pomocí dvourozměrné analýzy rozptylu odhalilo, že citlivost buněk HK-2 se v průběhu času s rostoucím číslem pasáže změnila. Výsledky tedy prokázaly, že buněčná linie HK-2 nemá zcela stabilní citlivost na působení toxinů během pasážování trvajících po dobu 13 týdnů. Na základě prezentovaných výsledků jsme dospěli k závěru, že u výsledků experimentů získaných s využitím pasážování buněčné linie HK-2 by měl být brán v úvahu počet pasáží během experimentů.

HK-2 buňky byly dále využity jako buněčný model pro studium toxicity CdCl<sub>2</sub>. Kadmium jakožto jeden ze zástupců těžkých kovů působí silně toxicky na organismus (Tobwala et al., 2014). Nejčastějším cílovým orgánem spojovaným s toxickým působením kadmia jsou ledviny (Komoike et al., 2011; Madden et al., 2002; Thévenod and Friedmann, 1999). Zároveň bylo prokázáno, že je kadmium a je schopno indukovat apoptotickou buněčnou smrt (Komoike et al., 2011; Mao et al., 2007; Nakagawa et al., 2007; Shrestha et al., 2017). Toxicita kadmia je běžně testována jak na lidských ledvinných buněčných liniích, (Fujiki et al., 2013; Kim et al., 2014; Simon et al., 2014; Wilmes et al., 2011), tak na ledvinných buněčných liniích jiných živočišných druhů. Příkladem zvířecích buněčných modelů jsou psí buňky MDCK, prasečí LLC-PK1 nebo krysí HTC (Fotakis and Timbrell, 2006; Gennari et al., 2003; Zimmerhackl et al., 1998).

V rámci této disertační práce byly pro sledování cytotoxického působení CdCl<sub>2</sub> použity pouze buňky HK-2. Ačkoliv je toxický účinek CdCl<sub>2</sub> na ledvinné buňky vedoucí k jejich smrti považován za dobře známý, tak v rámci prováděných experimentů byl objeven poměrně zajímavý dosud nepopsaný fenomén. Inkubace HK-2 buněk s CdCl<sub>2</sub> totiž vedla k přechodnému zvýšení dehydrogenázové aktivity buněk, resp. zvýšení buněčné viability. Podobný nálezný byl zaznamenán i v práci Hauschke et al., 2017, kde byl objev zvýšení viability HK-2 buněk po jejich inkubaci s CdCl<sub>2</sub> pouze dílčím výsledkem rozsáhlého testování. Tento fenomén však nebyl v dané práci nijak

vysvětlen. Z tohoto důvodu bylo na tyto dílčí výsledky navázáno s cílem pokusit se ověřit tento nálezn a charakterizovat účinky CdCl<sub>2</sub> detailněji. Zjištěné zvýšení buněčné viability vždy souviselo s dávkou CdCl<sub>2</sub> a dobou inkubace. Nález kadmíem indukovaného zvýšení viability buněk byl v souladu nejen s výsledky zmíněné studie Hauschke et al., 2017, ale zároveň s výsledky jiných autorů, kteří své experimenty prováděli jak na buněčné linii HK-2 (Iwatsuki et al., 2011; Kondo et al., 2012), tak na jiných lidských buněčných liniích (Bonham et al., 2003; Somji et al., 2006), resp. zvířecích buněčných liniích (Fotakis and Timbrell, 2006; Riemschneider et al., 2015). Žádná z těchto studií se však zvýšením viability po inkubaci buněk s CdCl<sub>2</sub> přímo nezabývala a nepřináší ani jeho případné vysvětlení.

V důsledku nálezu fenoménu přechodného zvýšení viability byly podrobněji otestovány změny dehydrogenázové aktivity HK-2 buněk po jejich inkubaci s CdCl<sub>2</sub>. Pro charakterizaci změn viability HK-2 buněk inkubovaných s CdCl<sub>2</sub> po dobu 2–24 hod byly zvoleny koncentrace CdCl<sub>2</sub> 5, 25, 100 a 200 μM. U všech testovaných koncentrací CdCl<sub>2</sub> bylo ve vybraných intervalech pozorováno významné zvýšení viability, resp. dehydrogenázové aktivity buněk s výjimkou 5 μM CdCl<sub>2</sub>. Ukázalo se, že zvýšená viabilita buněk souvisí s délkou inkubace i dávkou CdCl<sub>2</sub>, kdy, čím vyšší koncentrací CdCl<sub>2</sub> byly HK-2 buňky ovlivněny, tím kratší doba inkubace stačila k tomu, aby byl přechodný signifikantní nárůst dehydrogenázové aktivity zaznamenán. Naše výsledky byly podpořeny nálezem zvýšené viability HK-2 buněk ve studii Kondo et al. 2012, kde byl pro sledování změny dehydrogenázové aktivity HK-2 buněk ovlivněných 1–50 μM koncentrací CdCl<sub>2</sub> použit WST-8 test. Prakticky totožné výsledky byly nalezeny i ve studii Iwatsuki et al. 2011, kde bylo signifikantní zvýšení viability pomocí WST-8 testu zjištěno u HK-2 buněk ovlivněných 20 μM CdCl<sub>2</sub> po 4 hod inkubace. Bohužel tyto dvě studie nepoužívaly koncentraci CdCl<sub>2</sub> vyšší než 50 μM. Ve studii Bonham et al. 2003 byla s nárůstem intracelulární dehydrogenázové aktivity spojena 10 μM koncentrace CdCl<sub>2</sub>. Zde však byla toxicita kadmia sledována u zvířecí buněčné linie MDCK (Bonham et al., 2003). Kromě 10 μM CdCl<sub>2</sub> (24 a 48 hod) byl signifikantní nárůst viability měřené dehydrogenázovým testem pozorován i u 5 μM CdCl<sub>2</sub>, avšak až po dlouhodobé inkubaci (48 a 72 hod). V neposlední řadě byla s detekcí zvýšené dehydrogenázové aktivity spojena studie Riemschneider et al. 2015, která testovala cytotoxické působení CdCl<sub>2</sub> na makrofágové buněčné linii RAW 264.7. Zde byl podobně jako v našem případě využit test dehydrogenázové aktivity WST-1

(Riemschneider et al., 2015). Vzestup viability byl ve studii Riemschneider *et al.* 2015 nalezen u nižších koncentrací (10  $\mu\text{M}$ )  $\text{CdCl}_2$  po dlouho trvající inkubaci (24 a 48 hod). Tato data mohou být podpořena i námi dosud nepublikovanými daty, kdy na buněčné linii Jurkat inkubované s  $\text{CdCl}_2$  byl přechodný nárůst buněčné viability měřené pomocí WST-1 testu detekován také.

Pro možné vysvětlení a nalezení důvodu zvýšené viability u HK-2 buněk byla využita sada doplňujících biochemických testů. Protože nalezené zvýšení dehydrogenázové aktivity mohlo souviset se změnami v redoxním metabolismu, byla testována produkce ROS, změny hladin glutathionu a proteinová exprese p-JNK a NF $\kappa$ B. Intracelulární produkce ROS a hladiny GSH sloužily jako markery oxidačního stresu. Z naměřených výsledků jasně vyplývá, že produkce ROS u HK-2 buněk ovlivněných  $\text{CdCl}_2$  značně koreluje s výsledky nalezeného zvýšení viability, resp. dehydrogenázové aktivity buněk měřenými WST-1 testem. Zvýšení dehydrogenázové aktivity je při nejkratší testované inkubační době (tj. 2 hod) patrné nejen u 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , ale také u nejvyšší testované koncentrace 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ . Zároveň po 2 hod inkubace s 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  byla zaznamenána zvýšená produkce ROS. Nárůst dehydrogenázové aktivity u 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  v čase 2 hod tedy předcházel signifikantnímu nárůstu produkce ROS, který byl patrný až po 6 hod. V delších časových intervalech (10 a 24 hod) byl sledován růst viability i u 25  $\mu\text{M}$  koncentrace  $\text{CdCl}_2$ , přičemž hladiny ROS i v tomto případě začínaly signifikantně růst později, a to v čase 24 hod. Opět tedy bylo nejprve zaznamenáno signifikantní zvýšení dehydrogenázové aktivity a až poté zvýšená produkce ROS.

Dalším závěrem z naměřených výsledků je nález statisticky významného vyčerpání intracelulární hladiny GSH, který se objevil vždy až po zvýšení produkce ROS. Nárůst dehydrogenázové aktivity, který předcházel snížení hladiny intracelulárního GSH, byl patrný pouze u dvou nejvyšších koncentrací  $\text{CdCl}_2$ . Signifikantní pokles hladiny GSH nebyl nalezen u 25  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  ani po 24 hod inkubaci. To by mohlo být způsobeno tím, že takto dlouhé působení 25  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  neumožnilo vyčerpání GSH.

V souvislosti s charakterizací toxického působení  $\text{CdCl}_2$  u HK-2 buněk byla provedena western blot analýza, která sloužila pro zjištění hladiny proteinů p-JNK a NF $\kappa$ B. Proteiny p-JNK a NF $\kappa$ B byly zvoleny na základě publikací zabývajících se problematikou toxicity kadmia (Chuang et al., 2000; Kamata et al., 2005; Levinthal

and DeFranco, 2005). Změny v expresi NFκB nebyly vůbec prokázány. Naopak zvýšené hladiny proteinu p-JNK byly detekovány po 6 a 10 hod u 100 a 200 μM CdCl<sub>2</sub> a po 24 hod byla detekována aktivace p-JNK u všech testovaných koncentrací CdCl<sub>2</sub>, s výjimkou 200 μM CdCl<sub>2</sub>, kde byly buňky již značně poškozeny. Nárůst jaderné kondenzace byl nalezen až v pozdějších časových intervalech a nesoúvisel tak přímo s detekovaným zvýšením dehydrogenázové aktivity.

Z námi naměřených výsledků vyplývá, že jasně prokázaná indukce produkce ROS zprostředkovaná působením CdCl<sub>2</sub> se shoduje s výsledky ostatních studií (Wang et al., 2019; Wilmes et al., 2011; Zahir et al., 1999). Toxicita kadmia je zprostředkována celou řadou mechanismů, avšak většina studií se přiklání k tomu, že právě indukce oxidačního stresu představuje zcela zásadní roli v rámci cytotoxického působení kadmia (Kim and Sharma, 2006; Thévenod and Friedmann, 1999; Tobwala et al., 2014; Zahir et al., 1999). Z tohoto důvodu je pro toxicitu CdCl<sub>2</sub> důležitá také antioxidantní obrana, na níž se zcela zásadně podílí GSH (Zahir et al., 1999). Dle studie López et al., 2006 je kadmium schopno významně snížit intracelulární hladiny GSH. To se shoduje s našimi výsledky, kdy hladiny intracelulárního GSH v návaznosti na vzestup ROS signifikantně klesaly. Indukce ROS u lidských renálních proximálních tubulárních buněk doprovázená následnou fosforylací c-jun N-koncové kinázy byla potvrzena ve studii Fongsupa et al., 2015 a odpovídá i našim výsledkům (Fongsupa et al., 2015). Právě p-JNK aktivovaná prostřednictvím ROS dokáže ovlivňovat mitochondriální fyziologii, což může mít vliv na přežití či smrt buněk (Chambers and LoGrasso, 2011).

Z naměřených výsledků vyplývá, že zvýšení dehydrogenázové aktivity a následné zvýšení produkce ROS u ovlivněných buněk následuje napříč testovanými koncentracemi. Kadmium tedy pravděpodobně může ovlivňovat mitochondriální funkci, k čemuž se přiklání i studie (Belyaeva et al., 2011), jež na krysích jaterních mitochondriích poukazuje na to, že těžké kovy dokáží indukovat permeabilizaci mitochondriální membrány. V důsledku poškození mitochondrií pak dochází k uvolnění apoptotického indukčního faktoru (AIF) z jejich mezimembránového prostoru a k aktivaci na kaspázách nezávislé buněčné apoptózy (Mao et al., 2007). Kadmium zároveň indukuje expresi a aktivaci pro-apoptotických proteinů včetně kaspáz (Huang et al., 2017b).

Nízké koncentrace kadmia však mohou mít do jisté míry i mitogenní potenciál a mohou stimulovat buněčnou proliferaci. Tento poměrně zajímavý fenomén souvisí s tím, že kadmium interaguje s MAP kinázami (MAPKs), jako je ERK či p-JNK zapojených mimo jiné do buněčného růstu, diferenciace a apoptózy (Filipič, 2012). Výsledky naznačují, že  $\text{CdCl}_2$  v nízkých dávkách přechodně aktivuje JNK, zatímco vysoké dávky kadmia ji aktivují trvale (Chuang et al., 2000). Tato aktivace JNK je zprostředkována prostřednictvím inhibice MAP-kinázové fosfatázy prostřednictvím vznikajících ROS (Kamata et al., 2005). Jednotlivé izoformy JNK mohou přenášet odlišné signály, které regulují dráhy indukující ochranné mechanismy a buněčnou smrt (Chuang et al., 2000). Dle studie Levinthal a DeFranco, 2005 existuje souvislost mezi oxidační toxicitou a mitogeny aktivovanou ERK proteinkinázou. Ta je zapojena do buněčné proliferace a působí protiapoptoticky (Chuang et al., 2000).

Klíčem k vysvětlení, zvýšené viability, resp. dehydrogenázové aktivity buněk ovlivněných  $\text{CdCl}_2$  by mohla být indukce a působení ROS. Právě ROS jsou ve vysoké míře v buňkách indukovány během cytotoxického působení  $\text{CdCl}_2$  (Wang et al., 2013; Zahir et al., 1999) a dle některých teorií může být působení oxidačního stresu spojeno se změnou životaschopnosti buněk, která může vést i ke zvýšení buněčné viability (Chen et al., 2006). Jiná studie pak spojuje působení jak endogenního, tak exogenního oxidačního stresu s nárůstem mitochondriální hmoty doprovázeným nárůstem mitochondriální mtDNA (Lee et al., 2000). Přesný mechanismus zvýšení buněčné viability indukované  $\text{CdCl}_2$  však ještě vyžaduje další studium.

## 6 ZÁVĚR

V rámci disertační práce byla pro možnosti charakterizace nefrotoxického působení látek *in vitro* zavedena a optimalizována immortalizovaná lidská proximální tubulární buněčná linie HK-2. V první řadě byly optimalizovány podmínky pro kultivaci HK-2 buněk, přičemž byla testována doporučená kultivační média doplněná o vybrané suplementy. Zároveň byla posuzována a hodnocena stabilita této buněčné linie, a to zejména z pohledu růstové a kultivační stability.

Při studiu stability HK-2 buněk byly porovnávány hladiny glutathionu a dehydrogenázová aktivita napříč 3.-15. pasáží kontrolních HK-2 buněk v časových intervalech 6 a 24 hod. Zejména po 6 hod inkubace byly nalezeny výkyvy v pozdějších pasážích (14. a 15. pasáž) ve srovnání s ostatními pasážemi. Na základě naměřených výsledků jsme dospěli k závěru, že hladiny glutathionu a dehydrogenázová aktivita u HK-2 buněk se v rozmezí od 3.–15. pasáže mění a u vyšších testovaných pasáží přestávají mít HK-2 buňky stabilní odezvu na působení studovaných toxinů.

V poslední části práce byly HK-2 buňky využity pro charakterizaci toxického působení  $\text{CdCl}_2$ . Nejprve bylo z pohledu buněčné viability testováno širší rozmezí koncentrací  $\text{CdCl}_2$  ve dvou časových intervalech. Následně byly vybrané koncentrace  $\text{CdCl}_2$  testovány v širším rozmezí časových intervalů pomocí bioanalytických a biochemických metod. Kromě buněčné viability byly detekovány hladiny intracelulárního GSH, byla sledována produkce ROS a jako doplňující byla studována fragmentace jaderné DNA a měření aktivity kaspáz. Na základě naměřených výsledků bylo překvapivě prokázáno, že za daných podmínek HK-2 buňky vykazují nárůst intracelulární dehydrogenázové aktivity po ovlivnění  $\text{CdCl}_2$  na rozdíl od očekávaného snížení intracelulární dehydrogenázové aktivity. Zároveň byl nalezen vztah mezi koncentrací GSH a produkcí ROS, přičemž zvýšení produkce ROS předcházelo snížení koncentrace GSH.



## 7 POUŽITÁ LITERATURA

1. Ahmad, J., Ahamed M., Akhtar M.J., Alrokayan S.A., Siddiqui M.A., Musarrat J., and Al-Khedhairi A.A. Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2012** (259), 160-168.
2. Achilli, C., Ciana A., and Minetti G. Immortalized HEK 293 Kidney Cell Lines as Models of Renal Cells: Friends or Foes? *Journal of Controversies in Biomedical Research*. **2018** (4), 6-9.
3. Amaral, M., Girard M., Álvarez R., Paton A., Paton J., Repetto H., Sacerdoti F., and Ibarra C. Ouabain Protects Human Renal Cells against the Cytotoxic Effects of Shiga Toxin Type 2 and Subtilase Cytotoxin. *Toxins*. **2017** (9), 1-14.
4. Arbillaga, L., Azqueta A., Ezpeleta O., and Cerain A.L.d. Oxidative DNA damage induced by Ochratoxin A in the HK-2 human kidney cell line: evidence of the relationship with cytotoxicity. *Mutagenesis*. **2006** (22), 35-42.
5. Aslan, H.G., Akkoç S., and Kökbudak Z. Anticancer activities of various new metal complexes prepared from a Schiff base on A549 cell line. *Inorganic Chemistry Communications*. **2020** (111), 107645.
6. Babich, H., Liebling E.J., Burger R.F., Zuckerbraun H.L., and Schuck A.G. Choice of DMEM, formulated with or without pyruvate, plays an important role in assessing the in vitro cytotoxicity of oxidants and prooxidant nutraceuticals. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. **2009** (45), 226-233.
7. Belyaeva, E.A., Korotkov S.M., and Saris N.-E. In vitro modulation of heavy metal-induced rat liver mitochondria dysfunction: A comparison of copper and mercury with cadmium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **2011** (25), S63-S73.
8. Ben-David, U., Siranosian B., Ha G., Tang H., Oren Y., Hinohara K., Strathdee C.A., Dempster J., Lyons N.J., Burns R., Nag A., Kugener G., Cimini B., Tsvetkov P., Maruvka Y.E., O'Rourke R., Garrity A., Tubelli A.A., Bandopadhyay P., Tsherniak A., Vazquez F., Wong B., Birger C., Ghandi M., Thorner A.R., Bittker J.A., Meyerson M., Getz G., Beroukhim R., and Golub T.R. Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature*. **2018** (560), 325-330.
9. Bernardo-Bermejo, S., Sánchez-López E., Castro-Puyana M., Benito S., Lucio-Cazaña F.J., and Marina M.L. An untargeted metabolomic strategy based on liquid chromatography-mass spectrometry to study high glucose-induced changes in HK-2 cells. *Journal of Chromatography A*. **2019** (1596), 124-133.
10. Bonham, R.T., Fine M.R., Pollock F.M., and Shelden E.A. Hsp27, Hsp70, and metallothionein in MDCK and LLC-PK1 renal epithelial cells: effects of prolonged exposure to cadmium. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2003** (191), 63-73.

11. Boukamp, P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., and Fusenig N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*. **1988** (106), 761-771.
12. Bridges, C.C., and Zalups R.K. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2005** (204), 274-308.
13. Campos, M.A.A., de Almeida L.A., Grossi M.F., and Tagliati C.A. In vitro evaluation of biomarkers of nephrotoxicity through gene expression using gentamicin. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. **2018** (32), e22189.
14. Clynes, M. 1998. Animal cell culture techniques. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. KG, New York. 618 pp.
15. Coecke, S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.-W., Price A., Schechtman L., Stacey G., and Stokes W. Guidance on Good Cell Culture Practice - A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *Alternatives to Laboratory Animals*. **2005** (33), 261-287.
16. Coelho, B.P., Gaelzer M.M., dos Santos Petry F., Hoppe J.B., Trindade V.M.T., Salbego C.G., and Guma F.T.C.R. Dual Effect of Doxazosin: Anticancer Activity on SH-SY5Y Neuroblastoma Cells and Neuroprotection on an In Vitro Model of Alzheimer's Disease. *Neuroscience*. **2019** (404), 314-325.
17. Colgin, L.M., and Reddel R.R. Telomere Maintenance Mechanisms and Cellular Immortalization. *Oncogenes and Cell Proliferation*. **1999** (9), 97-103.
18. Crane, M.S.J. Mutagenesis and Cell Transformation in Cell Culture. *Methods in Cell Science*. **1999** (21), 245-253.
19. Čapek, J., Hauschke M., Brůčková L., and Roušar T. Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. **2017** (88), 40-45.
20. De Larco, J.E., and Todaro G.J. Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: Epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *Journal of Cellular Physiology*. **1978** (94), 335-342.
21. Delgado, J.-P., Parouchev A., Allain J.-E., Pennarun G., Gauthier L.R., Dutrillaux A.-M., Dutrillaux B., Di Santo J., Capron F., Boussin F.D., and Weber A. Long-term controlled immortalization of a primate hepatic progenitor cell line after Simian virus 40 T-Antigen gene transfer. *Oncogene*. **2004** (24), 541-551.
22. Dengler, W.A., Schulte J., Berger D.P., Merteismann R., and Fiebig H.H. Development of a Propidium Iodide Fluorescence Assay for Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Anti-Cancer Drugs*. **1995** (6), 522-532.

23. Devocelle, A., Lecru L., François H., Desterke C., Gallerne C., Eid P., Estelle O., Azzarone B., and Giron-Michel J. Inhibition of TGF- $\beta$ 1 Signaling by IL-15: A Novel Role for IL-15 in the Control of Renal Epithelial-Mesenchymal Transition: IL-15 Counteracts TGF- $\beta$ 1-Induced EMT in Renal Fibrosis. *International Journal of Cell Biology*. **2019** (2019), 1-15.
24. Du, B., Ma L.-M., Huang M.-B., Zhou H., Huang H.-L., Shao P., Chen Y.-Q., and Qu L.-H. High glucose down-regulates miR-29a to increase collagen IV production in HK-2 cells. *FEBS Letters*. **2010** (584), 811-816.
25. Eldridge, B.N., Xing F., Fahrenholtz C.D., and Singh R.N. Evaluation of multiwalled carbon nanotube cytotoxicity in cultures of human brain microvascular endothelial cells grown on plastic or basement membrane. *Toxicology in Vitro*. **2017** (41), 223-231.
26. Eriksson, S., Kim S.K., Kubista M., and Nordén B. Binding of 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) to AT Regions of DNA: Evidence for an Allosteric Conformational Change. *Biochemistry*. **1993** (32), 2987-2998.
27. Fang, J., Chandrasekharan P., Liu X.-L., Yang Y., Lv Y.-B., Yang C.-T., and Ding J. Manipulating the surface coating of ultra-small Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles for improved T1-weighted MR imaging. *Biomaterials*. **2014** (35), 1636-1642.
28. Filipič, M. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **2012** (733), 69-77.
29. Fongsupa, S., Soodvilai S., Muanprasat C., Chatsudthipong V., and Soodvilai S. Activation of liver X receptors inhibits cadmium-induced apoptosis of human renal proximal tubular cells. *Toxicology Letters*. **2015** (236), 145-153.
30. Foster, K.A., Oster C.G., Mayer M.M., Avery M.L., and Audus K.L. Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. *Experimental Cell Research*. **1988** (243), 359-366.
31. Fotakis, G., and Timbrell J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*. **2006** (160), 171-177.
32. Freshney, R.I. 2005. Culture of animal cells: A manual of basic techniques. John Wiley & Sons. 672 pp.
33. Fridman, G., Shereshevsky A., Jost M.M., Brooks A.D., Fridman A., Gutsol A., Vasilets V., and Friedman G. Floating Electrode Dielectric Barrier Discharge Plasma in Air Promoting Apoptotic Behavior in Melanoma Skin Cancer Cell Lines. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. **2007** (27), 163-176.
34. Fujiki, K., Inamura H., and Matsuoka M. PI3K signaling mediates diverse regulation of ATF4 expression for the survival of HK-2 cells exposed to cadmium. *Archives of Toxicology*. **2013** (88), 403-414.

35. Fujiki, K., Inamura H., Sugaya T., and Matsuoka M. Blockade of ALK4/5 signaling suppresses cadmium- and erastin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells via distinct signaling mechanisms. *Cell Death & Differentiation*. **2019** (26), 2371-2385.
36. Gao, S., Chen T., Choi M.-Y., Liang Y., Xue J., and Wong Y.-S. Cyanidin reverses cisplatin-induced apoptosis in HK-2 proximal tubular cells through inhibition of ROS-mediated DNA damage and modulation of the ERK and AKT pathways. *Cancer Letters*. **2013** (333), 36-46.
37. Gao, Z., Zhu W., Zhang H., Li Z., and Cui T. The influence of fasudil on renal proximal tubular cell epithelial–mesenchymal transition induced by parathormone. *Renal Failure*. **2017** (39), 575-581.
38. Garcia, S.C., Schott K., Charão M., Moro A., Bulcão R., Grotto D., Valentini J., Bohrer D., Cardoso S., and Pomblum V. Quantification of reduced glutathione by HPLC-UV in erythrocytes of hemodialysis patients. *Biomedical Chromatography*. **2008** (22), 460-468.
39. Gaush, C.R., Hard W.L., and Smith T.F. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Experimental Biology and Medicine*. **1966** (122), 931-935.
40. Ge, Z., Diao H., Ji X., Liu Q., Zhang X., and Wu Q. Gap junctional intercellular communication and endoplasmic reticulum stress regulate chronic cadmium exposure induced apoptosis in HK-2 cells. *Toxicology Letters*. **2018** (288), 35-43.
41. Ge, Z., Diao H., Yu M., Ji X., Liu Q., Chang X., and Wu Q. Connexin 43 mediates changes in protein phosphorylation in HK-2 cells during chronic cadmium exposure. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **2017** (53), 184-190.
42. Genc, G., Kilinc V., Bedir A., and Ozkaya O. Effect of creatine and pioglitazone on Hk-2 cell line cisplatin nephrotoxicity. *Renal Failure*. **2014** (36), 1104-1107.
43. Gennari, A., Cortese E., Boveri M., Casado J., and Prieto P. Sensitive endpoints for evaluating cadmium-induced acute toxicity in LLC-PK1 cells. *Toxicology*. **2003** (183), 211-220.
44. Gibco, L.T.C. Keratinocyte-SFM (1X). 3 2014.
45. Glube, N., and Langguth P. Caki-1 Cells as a Model System for the Interaction of Renally Secreted Drugs with OCT3. *Nephron Physiology*. **2008** (108), 18-28.
46. Graham, F.L., Smiley J., Russell W.C., and Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*. **1977** (36), 59-72.
47. Green, M.R., and Sambrook J. Estimating the Concentration of DNA by Fluorometry Using Hoechst 33258. *Cold Spring Harbor Protocols*. **2017** (2017), pdb.prot093567.

48. Gunness, P., Aleksa K., Kosuge K., Ito S., and Koren G. Comparison of the novel HK-2 human renal proximal tubular cell line with the standard LLC-PK1 cell line in studying drug-induced nephrotoxicity. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. **2010** (88), 448-455.
49. Gurunathan, S., and Kim J.-H. Graphene Oxide–Silver Nanoparticles Nanocomposite Stimulates Differentiation in Human Neuroblastoma Cancer Cells (SH-SY5Y). *International Journal of Molecular Sciences*. **2017** (18), 2549.
50. Han, M., Li Y., Wen D., Liu M., Ma Y., and Cong B. NGAL protects against endotoxin-induced renal tubular cell damage by suppressing apoptosis. *BMC Nephrology*. **2018** (19), 1-10.
51. Han, M., Pan Y., Gao M., Zhang J., and Wang F. JNK Signaling Pathway Suppresses LPS-Mediated Apoptosis of HK-2 Cells by Upregulating NGAL. *International Journal of Inflammation*. **2020** (2020), 1-5.
52. Handa, R.K. Characterization and signaling of the AT4 receptor in human proximal tubule epithelial (HK-2) cells. *Journal of the American Society of Nephrology*. **2001** (12), 440-449.
53. Handl, J., Čapek J., Majtnerová P., Petira F., Hauschke M., Roušarová E., and Roušar T. Transient increase in cellular dehydrogenase activity after cadmium treatment precedes enhanced production of reactive oxygen species in human proximal tubular kidney cells. *Physiological Research*. **2019** (68), 481-490.
54. Hauschke, M., Roušarová E., Flídr P., Čapek J., Libra A., and Roušar T. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin production negatively correlates with HK-2 cell impairment: Evaluation of NGAL as a marker of toxicity in HK-2 cells. *Toxicology in Vitro*. **2017** (39), 52-57.
55. Hayflick, L. The Limited in vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental Cell Research*. **1965** (37), 614-636.
56. Horobin, R.W. Selection of Optimum Tetrazolium Salts for use in Histochemistry: the *Histochemical Journal*. **1982** (14), 301-310.
57. Hu, X., Ding C., Ding X., Fan P., Zheng J., Xiang H., Li X., Qiao Y., Xue W., and Li Y. Inhibition of myeloid differentiation protein 2 attenuates renal ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and inflammation via suppressing TLR4/TRAF6/NF-κB pathway. *Life Sciences*. **2020** 117864.
58. Huang, H., Zheng F., Dong X., Wu F., Wu T., and Li H. Allicin inhibits tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation under high glucose conditions in vitro. *Experimental and Therapeutic Medicine*. **2017a** (13), 254-262.
59. Huang, J.X., Kaeslin G., Ranall M.V., Blaskovich M.A., Becker B., Butler M.S., Little M.H., Lash L.H., and Cooper M.A. Evaluation of biomarkers for in vitro prediction of drug-induced nephrotoxicity: comparison of HK-2, immortalized human proximal tubule epithelial, and primary cultures of human proximal tubular cells. *Pharmacology Research & Perspectives*. **2015** (3), 1-14.

60. Huang, M., Su L., Yang L., Zhu L., Liu Z., and Duan R. Effect of exogenous TGF- $\beta$ 1 on the cadmium-induced nephrotoxicity by inhibiting apoptosis of proximal tubular cells through PI3K-AKT-mTOR signaling pathway. *Chemico-Biological Interactions*. **2017b** (269), 25-32.
61. Hughes, P., Marshall D., Reid Y., Parkes H., and Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques*. **2007** (43), 575-584.
62. Hull, R.N., Cherry W.R., and Weaver G.W. The Origin and Characteristics of a Pig Kidney Cell Strain, LLC-PK1. *In Vitro Cellular a Developmental Biology - Plant*. **1976** (12), 670-677.
63. Chambers, J.W., and LoGrasso P.V. Mitochondrial c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Signaling Initiates Physiological Changes Resulting in Amplification of Reactive Oxygen Species Generation. *Journal of Biological Chemistry*. **2011** (286), 16052-16062.
64. Chang, Y.-W., and Singh K.P. Nicotine-induced oxidative stress contributes to EMT and stemness during neoplastic transformation through epigenetic modifications in human kidney epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2019** (374), 65-76.
65. Chen, Q., Thorpe J., Dohmen J.R., Li F., and Keller J.N. Ump1 extends yeast lifespan and enhances viability during oxidative stress: Central role for the proteasome? *Free Radical Biology and Medicine*. **2006** (40), 120-126.
66. Chou, X., Ding F., Zhang X., Ding X., Gao H., and Wu Q. Sirtuin-1 ameliorates cadmium-induced endoplasmic reticulum stress and pyroptosis through XBP-1s deacetylation in human renal tubular epithelial cells. *Archives of Toxicology*. **2019** (93), 965-986.
67. Chuang, S.-M., Wang I.-C., and Yang J.-L. Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium. *Carcinogenesis*. **2000** (21), 1423-1432.
68. ICLAC. Advice to Scientists. *International Cell Line Authentication Committee*. **2014** 1-2.
69. Iwatsuki, M., Inageda K., and Matsuoka M. Cadmium induces phosphorylation and stabilization of c-Fos in HK-2 renal proximal tubular cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2011** (251), 209-216.
70. Jenkinson, S.E., Chung G.W., van Loon E., Bakar N.S., Dalzell A.M., and Brown C.D.A. The limitations of renal epithelial cell line HK-2 as a model of drug transporter expression and function in the proximal tubule. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. **2012** (464), 601-611.
71. Joshi, C.D., and Bakowska C.J. Determination of Mitochondrial Membrane Potential and Reactive Oxygen Species in Live Rat Cortical Neurons. *Journal of Visualized Experiments*. **2011** (51), 1-4.

72. Kamata, H., Honda S.-i., Maeda S., Chang L., Hirata H., and Karin M. Reactive Oxygen Species Promote TNF $\alpha$ -Induced Death and Sustained JNK Activation by Inhibiting MAP Kinase Phosphatases. *Cell*. **2005** (120), 649-661.
73. Kermanizadeh, A., Vranic S., Boland S., Moreau K., Baeza-Squiban A., Gaiser B.K., Andrzejczuk L.A., and Stone V. An in vitro Assessment of Panel of Engineered Nanomaterials Using a Human Renal Cell Line: Cytotoxicity, Pro-inflammatory Response, Oxidative Stress and Genotoxicity. *BMC Nephrology*. **2013** (14), 1-12.
74. Kim, J., and Sharma R.P. Cadmium-induced Apoptosis in Murine Macrophages is Antagonized by Antioxidants and Caspase Inhibitors. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. **2006** (69), 1181-1201.
75. Kim, S.Y., Sohn S.-J., Won A.J., Kim H.S., and Moon A. Identification of noninvasive biomarkers for nephrotoxicity using HK-2 human kidney epithelial cells. *Toxicological Sciences*. **2014** (140), 247-258.
76. Klaassen, C.D., Liu J., and Diwan B.A. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2009** (238), 215-220.
77. Knight, S.A.B. Reduction of 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT) is dependent on CaFRE10 ferric reductase for *Candida albicans* grown in unbuffered media. *Microbiology*. **2006** (152), 2301-2308.
78. Komoike, Y., Inamura H., and Matsuoka M. Effects of salubrinal on cadmium-induced apoptosis in HK-2 human renal proximal tubular cells. *Archives of Toxicology*. **2011** (86), 37-44.
79. Kondo, M., Inamura H., Matsumura K.-i., and Matsuoka M. Cadmium activates extracellular signal-regulated kinase 5 in HK-2 human renal proximal tubular cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2012** (421), 490-493.
80. Koyama, H., Goodpasture C., Miller M.M., Teplitz R.L., and Riggs A.D. Establishment and Characterization of a Cell Line from the American Opossum (*Didelphys Virginiana*). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. **1978** (14), 239-246.
81. Kwist, K., Bridges W.C., and Burg K.J.L. The effect of cell passage number on osteogenic and adipogenic characteristics of D1 cells. *Cytotechnology*. **2015** (68), 1661-1667.
82. L'Azou, B., Jorly J., On D., Sellier E., Moisan F., Fleury-Feith J., Cambar J., Brochard P., and Ohayon-Courtès C. In vitro effects of nanoparticles on renal cells. *Particle and Fibre Toxicology*. **2008** (5), 22.
83. Lee, C.P., Nithiyantham S., Hsu H.T., Yeh K.T., Kuo T.M., and Ko Y.C. ALPK1 regulates streptozotocin induced nephropathy through CCL2 and CCL5 expressions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **2019a** (23), 7699-7708.

84. Lee, D., Kang K.B., Kim H.W., Park J.S., Hwang G.S., Kang K.S., Choi S., Yamabe N., and Kim K.H. Unique Triterpenoid of Jujube Root Protects Cisplatin-induced Damage in Kidney Epithelial LLC-PK1 Cells via Autophagy Regulation. *Nutrients*. **2020** (12), 677.
85. Lee, H.-C., Yin P.-H., Lu C.-Y., Chi C.-W., and Wei Y.-H. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochemical Journal*. **2000** (348), 425-432.
86. Lee, J.-Y., Tokumoto M., Fujiwara Y., and Satoh M. Involvement of ubiquitin-coding genes in cadmium-induced protein ubiquitination in human proximal tubular cells. *The Journal of Toxicological Sciences*. **2015** (40), 901-908.
87. Lee, Y.P., Cho Y., Kim E.J., Lee H., Choi H.Y., Wang H.J., Kang E.S., Kim Y.S., Kim M.S., and Kim B.S. Reduced expression of pyruvate kinase in kidney proximal tubule cells is a potential mechanism of pravastatin altered glucose metabolism. *Scientific Reports*. **2019b** (9), 1-8.
88. Levinthal, D.J., and DeFranco D.B. Reversible Oxidation of ERK-directed Protein Phosphatases Drives Oxidative Toxicity in Neurons. *Journal of Biological Chemistry*. **2005** (280), 5875-5883.
89. Li, M., Pi H., Yang Z., Reiter R.J., Xu S., Chen X., Chen C., Zhang L., Yang M., Li Y., Guo P., Li G., Tu M., Tian L., Xie J., He M., Lu Y., Zhong M., Zhang Y., Yu Z., and Zhou Z. Melatonin antagonizes cadmium-induced neurotoxicity by activating the transcription factor EB-dependent autophagy-lysosome machinery in mouse neuroblastoma cells. *Journal of Pineal Research*. **2016** (61), 353-369.
90. Lian, G., Yuan J., and Gao Y. In vitro Transport Ability of ABCC2 (G1249A) Polymorphic Variant Towards Anticancer Drugs. *Oncotargets and Therapy*. **2020** (13), 1413-1419.
91. Lim, K.-L., Korecka J.A., van Kesteren R.E., Blaas E., Spitzer S.O., Kamstra J.H., Smit A.B., Swaab D.F., Verhaagen J., and Bossers K. Phenotypic Characterization of Retinoic Acid Differentiated SH-SY5Y Cells by Transcriptional Profiling. *PLoS ONE*. **2013** (8), e63862.
92. Linhartová, P., Gazo I., and Sampels S. Combined Incubation of Cadmium, Docosahexaenoic and Eicosapentaenoic Acid Affecting the Oxidative Stress and Antioxidant Response in Human Hepatocytes In Vitro. *Physiological Research*. **2016** (65), 609-616.
93. López, E., Arce C., Oset-Gasque M.J., Cañadas S., and González M.P. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radical Biology and Medicine*. **2006** (40), 940-951.
94. Lu, Y.-T., Ma X.-L., Xu Y.-H., Hu J., Wang F., Qin W.-Y., and Xiong W.-Y. A Fluorescent Glucose Transport Assay for Screening SGLT2 Inhibitors in Endogenous SGLT2-Expressing HK-2 Cells. *Natural Products and Bioprospecting*. **2018** (9), 13-21.



95. Madden, E.F., Akkerman M., and Fowler B.A. A comparison of 60, 70, and 90 kDa stress protein expression in normal rat NRK-52 and human HK-2 kidney cell lines following in vitro exposure to arsenite and cadmium alone or in combination. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. **2002** (16), 24-32.
96. Mao, W.-P., Ye J.-L., Guan Z.-B., Zhao J.-M., Zhang C., Zhang N.-N., Jiang P., and Tian T. Cadmium induces apoptosis in human embryonic kidney (HEK) 293 cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria. *Toxicology in Vitro*. **2007** (21), 343-354.
97. Martin, R.M., Leonhardt H., and Cardoso M.C. DNA labeling in living cells. *Cytometry Part A*. **2005** (67A), 45-52.
98. Medina-Navarro, R., Torres-Ramos Y.D., Guzmán-Grenfell A.M., Díaz-Flores M., León-Reyes G., and Hicks G J.J. Lysosomal dysfunction induced by changes in albumin's tertiary structure: Potential key factor in protein toxicity during diabetic nephropathy. *Life Sciences*. **2019** (230), 197-207.
99. Melak, M., Plessner M., and Grosse R. Correction: Actin Visualization at a Glance. *Journal of Cell Science*. **2017** (130), 525-530.
100. Nakagawa, J., Nishitai G., Inageda K., and Matsuoka M. Phosphorylation of Stats at Ser727 in renal proximal tubular epithelial cells exposed to cadmium. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **2007** (24), 252-259.
101. Nakahata, T., and Ogawa M. Identification in Culture of a Class of Hemopoietic Colony-Forming Units with Extensive Capability to Self-Renew and Generate Multipotential Hemopoietic Colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1982** (79), 3843-3847.
102. Negrette-Guzmán, M., Huerta-Yepez S., Medina-Campos O.N., Zatarain-Barrón Z.L., Hernández-Pando R., Torres I., Tapia E., and Pedraza-Chaverri J. Sulforaphane Attenuates Gentamicin-Induced Nephrotoxicity: Role of Mitochondrial Protection. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **2013** (2013), 1-17.
103. Nho, J.-H., Jung H.-K., Lee M.-J., Jang J.-H., Sim M.-O., Jeong D.-E., Cho H.-W., and Kim J.-C. Beneficial Effects of Cynaroside on Cisplatin-Induced Kidney Injury In Vitro and In Vivo. *Toxicological Research*. **2018** (34), 133-141.
104. Oh, S.-M., Park G., Lee S.H., Seo C.-S., Shin H.-K., and Oh D.-S. Assessing the recovery from prerenal and renal acute kidney injury after treatment with single herbal medicine via activity of the biomarkers HMGB1, NGAL and KIM-1 in kidney proximal tubular cells treated by cisplatin with different doses and exposure times. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **2017** (17), 1-9.
105. Oparka, M., Walczak J., Malinska D., van Oppen L.M.P.E., Szczepanowska J., Koopman W.J.H., and Wieckowski M.R. Quantifying ROS levels using CM-H(2)DCFDA and HyPer. *Methods*. **2016** (109), 3-11.

106. Palumbo, S., and Pellegrini S. Experimental in vivo models of multiple sclerosis: State of the art. *Multiple Sclerosis: Perspectives in treatment and pathogenesis*. **2017** 173-183.
107. Passagne, I., Morille M., Rousset M., Pujalté I., and L'Azou B. Implication of oxidative stress in size-dependent toxicity of silica nanoparticles in kidney cells. *Toxicology*. **2012** (299), 112-124.
108. Patel, M.I., Tuckerman R., and Dong Q. A Pitfall of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) Assay due to Evaporation in wells on the Edge of a 96 well Plate. *Biotechnology Letters*. **2005** (27), 805-808.
109. Peng, W., Luo P., Gui D., Jiang W., Wu H., and Zhang J. Enhanced anticancer effect of fabricated gallic acid/CdS on the rGO nanosheets on human glomerular mesangial (IP15) and epithelial proximal (HK2) kidney cell lines - Cytotoxicity investigations. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **2018** (178), 243-248.
110. Perez, P.L., Scarinci N., Cantiello H.F., and del Rocío Cantero M. Polycystin-2 (TRPP2) Regulates Primary Cilium Length in LLC-PK1 Renal Epithelial Cells. *BioRxiv*. **2020** PrePrint.
111. Piao, M.J., Kang K.A., Lee I.K., Kim H.S., Kim S., Choi J.Y., Choi J., and Hyun J.W. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters*. **2011** (201), 92-100.
112. Prozialeck, W.C., and Edwards J.R. Mechanisms of Cadmium-Induced Proximal Tubule Injury: New Insights with Implications for Biomonitoring and Therapeutic Interventions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **2012** (343), 2-12.
113. Pujalté, I., Passagne I., Brouillaud B., Tréguer M., Durand E., Ohayon-Courtes C., and L'Azou B. Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Particle and Fibre Toxicology*. **2011** (8), 1-16.
114. Qiu, X., Zhou X., Miao Y., and Li B. An in vitro method for nephrotoxicity evaluation using HK-2 human kidney epithelial cells combined with biomarkers of nephrotoxicity. *Toxicology Research*. **2018** (7), 1205-1213.
115. Ramirez, T., Strigun A., Verlohner A., Huener H.-A., Peter E., Herold M., Bordag N., Mellert W., Walk T., Spitzer M., Jiang X., Sperber S., Hofmann T., Hartung T., Kamp H., and van Ravenzwaay B. Prediction of liver toxicity and mode of action using metabolomics in vitro in HepG2 cells. *Archives of Toxicology*. **2017** (92), 893-906.
116. Rhodin, J. Anatomy of Kidney Tubules. *International Review of Cytology*. **1958** (7), 485-534.

117. Riccardi, C., and Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*. **2006** (1), 1458-1461.
118. Riemschneider, S., Herzberg M., and Lehmann J. Subtoxic Doses of Cadmium Modulate Inflammatory Properties of Murine RAW 264.7 Macrophages. *BioMed Research International*. **2015** (2015), 1-8.
119. Riss, T.L., and Moravec R.A. Use of Multiple Assay Endpoints to Investigate the Effects of Incubation Time, Dose of Toxin, and Plating Density in Cell-Based Cytotoxicity Assays. *Assay and Drug Development Technologies*. **2004** (2), 51-62.
120. Riss, T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Duellman S., Benink H.A., Worzella T.J., and Minor L. Assay Guidance Manual - Cell Viability Assays. *Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences Bethesda (MD)*. **2018** 357-388.
121. Roberts, D.D., Taciak B., Białasek M., Braniewska A., Sas Z., Sawicka P., Kiraga Ł., Rygiel T., and Król M. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *Plos One*. **2018** (13), e0198943.
122. Roehm, N.W., Rodgers G.H., Hatfield S.M., and Glasebrook A.L. An Improved Colorimetric Assay for Cell Proliferation and Viability Utilizing the Tetrazolium Salt XTT. *Journal of Immunological Methods*. **1991** (142), 257-265.
123. Roušar, T., Kučera O., Lotková H., and Červinková Z. Assessment of reduced glutathione: Comparison of an optimized fluorometric assay with enzymatic recycling method. *Analytical Biochemistry*. **2012** (423), 236-240.
124. Ruan, H., Wang L., Wang J., Sun H., He X., Li W., and Zhang J. Sika deer antler protein against acetaminophen-induced oxidative stress and apoptosis in HK-2 cells via activating Nrf2/keap1/HO-1 pathway. *Journal of Food Biochemistry*. **2019** (00), e13067.
125. Ryan, M.J., Johnson G., Kirk J., Fuerstenberg S.M., Zager R.A., and Torok-Storb B. HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney International*. **1994** (45), 48-57.
126. Salahudeen, A.K. Role of Lipid Peroxidation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Renal Epithelial (LLC-PK1) Cell Injury. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. **1995** (268), 30-38.
127. Sambuy, Y., De Angelis I., Ranaldi G., Scarino M.L., Stamatii A., and Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*. **2005** (21), 1-26.

128. Samuel, M.S., Jose S., Selvarajan E., Mathimani T., and Pugazhendhi A. Biosynthesized silver nanoparticles using *Bacillus amyloliquefaciens*; Application for cytotoxicity effect on A549 cell line and photocatalytic degradation of p-nitrophenol. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **2020** (202), 111642.
129. Sangwan, R., Saini M., Verma R., Kumar S., Banerjee M., and Jain S. Synthesis of 1,8-dioxooctahydroxanthene derivatives using ionic liquids, quantum chemical studies and anticancer activity. *Journal of Molecular Structure*. **2020** (1208), 127786.
130. Shaw, G., Morse S., Ararat M., and Graham F.L. Preferential Transformation of Human Neuronal Cell by Human Adenoviruses and the Origin of HEK 293 Cells. *FASEB Journal*. **2002** (16), 869-871.
131. Shay, J.W., and Wright W.E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews - Molecular cell biology*. **2000** (1), 72-76.
132. Shay, J.W., Wright W.E., and Werbin H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. **1991** (1072), 1-7.
133. Shrestha, S., Somji S., Sens D.A., Slusser-Nore A., Patel D.H., Savage E., and Garrett S.H. Human renal tubular cells contain CD24/CD133 progenitor cell populations: Implications for tubular regeneration after toxicant induced damage using cadmium as a model. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2017** (331), 116-129.
134. Schmidt, C.M., Peter H., Lang S.R., Ditzinger G., and Merkle H.P. In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **1998** (29), 51-79.
135. Silva, F.G. The Aging Kidney: A Review – Part I. *International Urology and Nephrology*. **2005** (37), 185-205.
136. Simon, B.R., Wilson M.J., and Wickliffe J.K. The RPTEC/TERT1 cell line models key renal cell responses to the environmental toxicants, benzo[a]pyrene and cadmium. *Toxicology Reports*. **2014** (1), 231-242.
137. Singhal, R.K., Anderson M.E., and Meister A. Glutathione, a First Line of Defense Against Cadmium Toxicity. *FASEB Journal*. **1987** 220-223.
138. Smiley, S.T., Reers M., Mottolahartshorn C., Lin M., Chen A., Smith T.W., Steele G.D., and Chen L.B. Intracellular Heterogeneity in Mitochondrial-Membrane Potentials Revealed by a J-Aggregate-Forming Lipophilic Cation Jc-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1991** (88), 3671-3675.
139. Sohn, S.-J., Kim S.Y., Kim H.S., Chun Y.-J., Han S.Y., Kim S.H., and Moon A. In vitro evaluation of biomarkers for cisplatin-induced nephrotoxicity using HK-2 human kidney epithelial cells. *Toxicology Letters*. **2013** (217), 235-242.

140. Somji, S., Garrett S.H., Sens M.A., and Sens D.A. The Unique N-Terminal Sequence of Metallothionein-3 Is Required to Regulate the Choice between Apoptotic or Necrotic Cell Death of Human Proximal Tubule Cells Exposed to Cd<sup>2+</sup>. *Toxicological Sciences*. **2006** (90), 369-376.
141. Song, B., Liu J., Feng X., Wei L., and Shao L. A review on potential neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*. **2015** (10).
142. Song, M.-f., Yang Y., Yi Z.-w., Zhang Z.-q., Shen X.-d., Hu G.-h., and Zhu Y.-f. Sema 3A as a biomarker of the activated mTOR pathway during hexavalent chromium-induced acute kidney injury. *Toxicology Letters*. **2018** (299), 226-235.
143. Soule, H.D., Maloney T.M., Wolman S.R., Peterson W.D., Brenz R., McGrath C.M., Russo J., Pauley R.J., Jones R.F., and Brooks S.C. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Research*. **1990** (50), 6075-6086.
144. Stockert, J.C., Horobin R.W., Colombo L.L., and Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*. **2018** (120), 159-167.
145. Takuwa, Y., and Ogata E. Differentiated properties characteristic of renal proximal epithelium in a cell line derived from a normal monkey kidney (JTC-12). *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. **1985** (21), 445-449.
146. Thévenod, F., and Friedmann J.M. Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induced degradation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. **1999** (13), 1751-1761.
147. Thomas, P., and Smart T.G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. **2005** (51), 187-200.
148. Tipple, T.E., and Rogers L.K. Methods for the Determination of Plasma or Tissue Glutathione Levels. **2012** (889), 315-324.
149. Tobwala, S., Wang H.-J., Carey J., Banks W., and Ercal N. Effects of Lead and Cadmium on Brain Endothelial Cell Survival, Monolayer Permeability, and Crucial Oxidative Stress Markers in an in Vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *Toxics*. **2014** (2), 258-275.
150. Tong, Z.-B., Hogberg H., Kuo D., Sakamuru S., Xia M., Smirnova L., Hartung T., and Gerhold D. Characterization of three human cell line models for high-throughput neuronal cytotoxicity screening. *Journal of Applied Toxicology*. **2017** (37), 167-180.

151. Towne, V., Will M., Oswald B., and Zhao Q.J. Complexities in horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of dihydroxyphenoxazine derivatives: appropriate ranges for pH values and hydrogen peroxide concentrations in quantitative analysis. *Anal Biochem.* **2004** (334), 290-296.
152. Vasilevsky, N.A., Brush M.H., Paddock H., Ponting L., Tripathy S.J., LaRocca G.M., and Haendel M.A. On the reproducibility of science: unique identification of research resources in the biomedical literature. *PeerJ.* **2013** (1), e148.
153. Visalli, G., Bertuccio M.P., Iannazzo D., Piperno A., Pistone A., and Di Pietro A. Toxicological assessment of multi-walled carbon nanotubes on A549 human lung epithelial cells. *Toxicology in Vitro.* **2015** (29), 352-362.
154. Vrbová, M., Roušarová E., Brůčková L., Česla P., and Roušar T. Characterization of acetaminophen toxicity in human kidney HK-2 cells. *Physiological Research.* **2016** (65), 627-635.
155. Wang, B., Li Y., Shao C., Tan Y., and Cai L. Cadmium and Its Epigenetic Effects. *Current Medicinal Chemistry.* **2012** (19), 2611-2620.
156. Wang, Q., Lu Y., Yuan M., Darling I.M., Repasky E.A., and Morris M.E. Characterization of monocarboxylate transport in human kidney HK-2 Cells. *Molecular Pharmaceutics.* **2006** (3), 675-685.
157. Wang, S., Yu H., and Wickliffe J.K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO<sub>2</sub>. *Toxicology in Vitro.* **2011** (25), 2147-2151.
158. Wang, S.S., Chen L., and Xia S.K. Cadmium is Acutely Toxic for Murine Hepatocytes: Effects on Intracellular Free Ca<sup>2+</sup> Homeostasis. *Physiological Research.* **2007** (56), 193-201.
159. Wang, Y., Li Y., Yang Z., Wang Z., Chang J., Zhang T., Chi Y., Han N., and Zhao K. Pyridoxamine treatment of HK-2 human proximal tubular epithelial cells reduces oxidative stress and the inhibition of autophagy induced by high glucose levels. *Medical Science Monitor.* **2019** (25), 1480-1488.
160. Wang, Y., Wu Y., Luo K., Liu Y., Zhou M., Yan S., Shi H., and Cai Y. The protective effects of selenium on cadmium-induced oxidative stress and apoptosis via mitochondria pathway in mice kidney. *Food and Chemical Toxicology.* **2013** (58), 61-67.
161. Weinstein, J.R., and Anderson S. The Aging Kidney: Physiological Changes. *Advances in Chronic Kidney Disease.* **2010** (17), 302-307.
162. Wenger, S.L., Senft J.R., Sargent L.M., Bamezai R., Bairwa N., and Grant S.G. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Bioscience Reports.* **2004** (24).

163. Wester, R.C., Maibach H.I., Sedik L., Melendres J., Dizio S., and Wade M. In Vitro Percutaneous Absorption of Cadmium from Water and Soil into Human Skin. **1992** (19), 1-5.
164. Wilmes, A., Crean D., Aydin S., Pfaller W., Jennings P., and Leonard M.O. Identification and dissection of the Nrf2 mediated oxidative stress pathway in human renal proximal tubule toxicity. *Toxicology in Vitro*. **2011** (25), 613-622.
165. Wilson, C., Foster G.H., and Bitzan M. Silencing of Bak Ameliorates Apoptosis of Human Proximal Tubular Epithelial Cells by Escherichia coli-Derived Shiga Toxin 2. *Infection*. **2005** (33), 362-367.
166. Wu, Y., Connors D., Barber L., Jayachandra S., Hanumegowda U.M., and Adams S.P. Multiplexed assay panel of cytotoxicity in HK-2 cells for detection of renal proximal tubule injury potential of compounds. *Toxicology in Vitro*. **2009** (23), 1170-1178.
167. Xia, T., Hamilton R.F., Bonner J.C., Crandall E.D., Elder A., Fazlollahi F., Girtsman T.A., Kim K., Mitra S., Ntim S.A., Orr G., Tagmount M., Taylor A.J., Telesca D., Tolic A., Vulpe C.D., Walker A.J., Wang X., Witzmann F.A., Wu N., Xie Y., Zink J.I., Nel A., and Holian A. Interlaboratory evaluation of in vitro cytotoxicity and inflammatory responses to engineered nanomaterials: The NIEHS nano GO consortium. *Environmental Health Perspectives*. **2013** (121), 683-690.
168. Xie, Z., Yin R., Gu L., Li M., Jiang C., Cao T., and Zhang X. Gene Expression Profiling Analysis of Bisphenol A-Induced Perturbation in Biological Processes in ER-Negative HEK293 Cells. *PLoS ONE*. **2014** (9), e98635.
169. Yang, A., Liu F., Guan B., Luo Z., Lin J., Fang W., Liu L., and Zuo W. p53 induces miR-199a-3p to suppress mechanistic target of rapamycin activation in cisplatin-induced acute kidney injury. *Journal of Cellular Biochemistry*. **2019a** (120), 17625-17634.
170. Yang, G., Ma H., Wu Y., Zhou B., Zhang C., Chai C., and Cao Z. Activation of TRPC6 channels contributes to (+)-conocarpan-induced apoptotic cell death in HK-2 cells. *Food and Chemical Toxicology*. **2019b** (129), 281-290.
171. Yeh, I.J., Wang T.-Y., Lin J.-C., Lin T.-J., Chang J.-S., Yen M.-C., Liu Y.-H., Wu P.-L., Chen F.-W., Shih Y.-L., and Peng C.-Y. Optimal Regimen of N-Acetylcysteine on Chromium-Induced Renal Cell Damage. *Metabolites*. **2019** (9), 172.
172. Yin, L.-M., Wei Y., Wang Y., Xu Y.-D., and Yang Y.-Q. 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.
173. Yu, H., Cook T.J., and Sinko P.J. Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharmaceutical Research*. **1997** (14), 757-762.

174. Zahir, A.S., Thanhtam T.V., and Khalequz Z. Oxidative Stress as a Mechanism of Chronic Cadmium-Induced Hepatotoxicity and Renal Toxicity and Protection by Antioxidants. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **1999** (154), 256-263.
175. Zeng, Y., Wang X., Wang J., Yi R., Long H., Zhou M., Luo Q., Zhai Z., Song Y., and Qi S. The tumorigenicity of glioblastoma cell line U87MG decreased during serial in vitro passage. *Cellular and Molecular Neurobiology*. **2018** (38), 1245-1252.
176. Zhang, L., Mu X., Fu J., and Zhou Z. In vitro cytotoxicity assay with selected chemicals using human cells to predict target-organ toxicity of liver and kidney. *Toxicology in Vitro*. **2007** (21), 734-740.
177. Zhang, M., Zhang Y.-Q., Wei X.-Z., Lee C., Huo D.-S., Wang H., and Zhao Z.-Y. Differentially expressed long-chain noncoding RNAs in human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y): Alzheimer's disease cell model. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. **2019** (82), 1052-1060.
178. Zhao, Y.-W., Guo D., Li C.-Y., and Ouyang J.-M. Comparison of the adhesion of calcium oxalate monohydrate to HK-2 cells before and after repair using tea polysaccharides. *International Journal of Nanomedicine*. **2019** (14), 4277-4292.
179. Zimmerhackl, L.B., Moom F., Wiegele G., and Brandis M. Cadmium is more toxic to LLC-PK<sub>1</sub> cells than to MDCK cells acting on the cadherin-catenin complex. *American Journal of Physiology*. **1998** 143-153.



## 8 PŘÍLOHY

### 8.1 Originální data k výsledkové části

**Příloha 1: Vliv typu média na dehydrogenázovou aktivitu buněk (WST-1 test; Graf 1).** HK-2 buňky byly v rozmezí 7.–10. pasáže kultivovány ve třech typech kultivačních médií. Inkubace s toxiny (24 hod): acetaminofen (APAP); CdCl<sub>2</sub>; FCCP; cisplatina (CisPt); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP). Průměr ± SD (n = 6–8; 2 nezávislé experimenty).

| Toxiny                     | Dehydrogenázová aktivita (% kontrol) |                       |                    |
|----------------------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------|
|                            | DMEM/F12 s pyruvátem                 | DMEM/F12 bez pyruvátu | Keratinocytové SFM |
| Kontrola                   | 100 ± 8                              | 100 ± 8               | 100 ± 3            |
| APAP [1 mM]                | 103 ± 13                             | 84 ± 13               | 96 ± 5             |
| APAP [10 mM]               | 67 ± 3                               | 69 ± 3                | 40 ± 2             |
| CdCl <sub>2</sub> [100 μM] | 7 ± 1                                | 4 ± 0                 | 1 ± 0              |
| FCCP [40 μM]               | 3 ± 1                                | 4 ± 2                 | 8 ± 0              |
| CisPt [100 μM]             | 36 ± 2                               | 36 ± 2                | 31 ± 4             |
| t-BHP [50 μM]              | 83 ± 10                              | 78 ± 14               | 92 ± 6             |

**Příloha 2: Vliv typu média na koncentraci glutathionu (MCB metoda; Graf 2).** HK-2 buňky byly v rozmezí 7.–10. pasáže kultivovány ve třech typech kultivačních médií. Inkubace s toxiny (24 hod): acetaminofen (APAP); CdCl<sub>2</sub>; FCCP; cisplatina (CisPt); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP). Průměr ± SD (n = 6–8; 2 nezávislé experimenty).

| Toxiny                     | Koncentrace glutathionu (% kontrol) |                       |                    |
|----------------------------|-------------------------------------|-----------------------|--------------------|
|                            | DMEM/F12 s pyruvátem                | DMEM/F12 bez pyruvátu | Keratinocytové SFM |
| Kontrola                   | 100 ± 8                             | 100 ± 6               | 100 ± 11           |
| APAP [1 mM]                | 94 ± 7                              | 86 ± 8                | 87 ± 7             |
| APAP [10 mM]               | 49 ± 3                              | 44 ± 4                | 22 ± 3             |
| CdCl <sub>2</sub> [100 μM] | 9 ± 5                               | 3 ± 2                 | 8 ± 1              |
| FCCP [40 μM]               | 4 ± 3                               | 1 ± 6                 | 7 ± 2              |
| CisPt [100 μM]             | 41 ± 2                              | 30 ± 5                | 29 ± 5             |
| t-BHP [50 μM]              | 96 ± 8                              | 100 ± 7               | 94 ± 5             |

**Příloha 3: Vliv pasážování na toxicitu látek (6 hod; WST-1 test; Graf 3).** HK-2 buňky byly v rozmezí 3.–15. pasáže kultivovány s toxiny: acetaminofen (APAP; 10 mM); cisplatina (CisPt; 100  $\mu$ M); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP; 50  $\mu$ M); CdCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M). Průměr  $\pm$  SD (n = 8–12; 3 nezávislé experimenty).

| Číslo pasáže | Dehydrogenázová aktivita (% kontrol); 6 hod |                 |                        |                       |                                    |
|--------------|---|-----------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
|              | Toxiny                                      |                 |                        |                       |                                    |
|              | Kontrola                                    | APAP<br>[10 mM] | CisPt<br>[100 $\mu$ M] | t-BHP<br>[50 $\mu$ M] | CdCl <sub>2</sub><br>[100 $\mu$ M] |
| 3            | 100 $\pm$ 5                                 | 93 $\pm$ 6      | 98 $\pm$ 4             | 91 $\pm$ 5            | 105 $\pm$ 2                        |
| 4            | 100 $\pm$ 6                                 | 90 $\pm$ 4      | 90 $\pm$ 5             | 97 $\pm$ 6            | 92 $\pm$ 7                         |
| 5            | 100 $\pm$ 6                                 | 88 $\pm$ 4      | 100 $\pm$ 3            | 91 $\pm$ 6            | 100 $\pm$ 11                       |
| 6            | 100 $\pm$ 3                                 | 94 $\pm$ 5      | 93 $\pm$ 3             | 104 $\pm$ 9           | 82 $\pm$ 7                         |
| 7            | 100 $\pm$ 4                                 | 96 $\pm$ 4      | 101 $\pm$ 6            | 92 $\pm$ 5            | 64 $\pm$ 4                         |
| 8            | 100 $\pm$ 5                                 | 99 $\pm$ 5      | 101 $\pm$ 4            | 103 $\pm$ 6           | 84 $\pm$ 3                         |
| 9            | 100 $\pm$ 5                                 | 91 $\pm$ 2      | 90 $\pm$ 6             | 91 $\pm$ 3            | 69 $\pm$ 15                        |
| 10           | 100 $\pm$ 6                                 | 100 $\pm$ 11    | 91 $\pm$ 4             | 88 $\pm$ 6            | 65 $\pm$ 1                         |
| 11           | 100 $\pm$ 4                                 | 94 $\pm$ 7      | 93 $\pm$ 4             | 104 $\pm$ 10          | 69 $\pm$ 7                         |
| 12           | 100 $\pm$ 4                                 | 93 $\pm$ 5      | 92 $\pm$ 6             | 94 $\pm$ 4            | 75 $\pm$ 8                         |
| 13           | 100 $\pm$ 6                                 | 94 $\pm$ 11     | 94 $\pm$ 5             | 95 $\pm$ 3            | 80 $\pm$ 10                        |
| 14           | 100 $\pm$ 4                                 | 90 $\pm$ 6      | 89 $\pm$ 4             | 96 $\pm$ 3            | 71 $\pm$ 15                        |
| 15           | 100 $\pm$ 3                                 | 92 $\pm$ 15     | 83 $\pm$ 2             | 94 $\pm$ 3            | 50 $\pm$ 11                        |

**Příloha 4: Vliv pasážování na toxicitu látek (6 hod; WST-1 test) - absolutní data.** HK-2 buňky byly v rozmezí 3.–15. pasáže kultivovány s toxiny: acetaminofen (APAP; 10 mM); cisplatina (CisPt; 100  $\mu$ M); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP; 50  $\mu$ M); CdCl<sub>2</sub>; 100  $\mu$ M). Průměr  $\pm$  SD (n = 8–12; 3 nezávislé experimenty).

| Číslo pasáže | Dehydrogenázová aktivita (absolutní hodnoty); 6 hod |                 |                        |                       |                                    |
|--------------|---|-----------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
|              | Toxiny  |                 |                        |                       |                                    |
|              | Kontrola  | APAP<br>[10 mM] | CisPt<br>[100 $\mu$ M] | t-BHP<br>[50 $\mu$ M] | CdCl <sub>2</sub><br>[100 $\mu$ M] |
| 3            | 1,05 $\pm$ 0,05                                     | 0,97 $\pm$ 0,05 | 1,03 $\pm$ 0,05        | 0,96 $\pm$ 0,06       | 1,08 $\pm$ 0,02                    |
| 4            | 1,23 $\pm$ 0,11                                     | 1,11 $\pm$ 0,09 | 1,11 $\pm$ 0,08        | 1,20 $\pm$ 0,05       | 1,14 $\pm$ 0,02                    |
| 5            | 1,17 $\pm$ 0,11                                     | 1,02 $\pm$ 0,09 | 1,16 $\pm$ 0,12        | 1,06 $\pm$ 0,04       | 1,15 $\pm$ 0,05                    |
| 6            | 1,14 $\pm$ 0,42                                     | 1,20 $\pm$ 0,04 | 1,19 $\pm$ 0,02        | 1,33 $\pm$ 0,14       | 1,05 $\pm$ 0,07                    |
| 7            | 1,42 $\pm$ 0,08                                     | 1,36 $\pm$ 0,13 | 1,41 $\pm$ 0,09        | 1,31 $\pm$ 0,12       | 0,91 $\pm$ 0,05                    |
| 8            | 1,18 $\pm$ 0,11                                     | 1,17 $\pm$ 0,14 | 1,19 $\pm$ 0,10        | 1,21 $\pm$ 0,06       | 0,98 $\pm$ 0,09                    |
| 9            | 1,39 $\pm$ 0,13                                     | 1,26 $\pm$ 0,13 | 1,25 $\pm$ 0,09        | 1,26 $\pm$ 0,10       | 0,94 $\pm$ 0,12                    |
| 10           | 1,14 $\pm$ 0,07                                     | 1,26 $\pm$ 0,23 | 1,03 $\pm$ 0,03        | 0,99 $\pm$ 0,04       | 0,73 $\pm$ 0,03                    |
| 11           | 1,16 $\pm$ 0,05                                     | 1,09 $\pm$ 0,09 | 1,08 $\pm$ 0,04        | 1,21 $\pm$ 0,12       | 0,8 $\pm$ 0,08                     |
| 12           | 1,17 $\pm$ 0,11                                     | 1,09 $\pm$ 0,13 | 1,08 $\pm$ 0,15        | 1,10 $\pm$ 0,13       | 0,87 $\pm$ 0,04                    |
| 13           | 1,11 $\pm$ 0,06                                     | 1,05 $\pm$ 0,12 | 1,04 $\pm$ 0,05        | 1,06 $\pm$ 0,03       | 0,89 $\pm$ 0,10                    |
| 14           | 0,93 $\pm$ 0,08                                     | 0,83 $\pm$ 0,11 | 0,83 $\pm$ 0,09        | 0,89 $\pm$ 0,07       | 0,67 $\pm$ 0,19                    |
| 15           | 1,13 $\pm$ 0,26                                     | 0,99 $\pm$ 0,32 | 1,03 $\pm$ 0,24        | 1,06 $\pm$ 0,27       | 0,59 $\pm$ 0,02                    |

**Příloha 5: Vliv pasážování na toxicitu látek (6 hod; stanovení GSH; Graf 4).** HK-2 buňky byly v rozmezí 3.–15. pasáže kultivovány v DMEM/F12 médiu s toxiny: acetaminofen (APAP; 10 mM); cisplatina (CisPt; 100  $\mu$ M); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP; 50  $\mu$ M); CdCl<sub>2</sub>; 100  $\mu$ M). Průměr  $\pm$  SD (n = 8–12; 3 nezávislé experimenty).

| Číslo pasáže | Koncentrace glutathionu (% kontrol); 6 hod |                 |                        |                       |                                    |
|--------------|--|-----------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
|              | Toxiny                                     |                 |                        |                       |                                    |
|              | Kontrola                                   | APAP<br>[10 mM] | CisPt<br>[100 $\mu$ M] | t-BHP<br>[50 $\mu$ M] | CdCl <sub>2</sub><br>[100 $\mu$ M] |
| 3            | 100 $\pm$ 5                                | 71 $\pm$ 10     | 87 $\pm$ 6             | 101 $\pm$ 4           | 72 $\pm$ 9                         |
| 4            | 100 $\pm$ 8                                | 62 $\pm$ 6      | 95 $\pm$ 8             | 97 $\pm$ 11           | 68 $\pm$ 5                         |
| 5            | 100 $\pm$ 4                                | 64 $\pm$ 3      | 90 $\pm$ 5             | 101 $\pm$ 4           | 77 $\pm$ 9                         |
| 6            | 100 $\pm$ 6                                | 66 $\pm$ 4      | 86 $\pm$ 7             | 106 $\pm$ 7           | 78 $\pm$ 7                         |
| 7            | 100 $\pm$ 6                                | 60 $\pm$ 7      | 86 $\pm$ 8             | 93 $\pm$ 11           | 72 $\pm$ 5                         |
| 8            | 100 $\pm$ 7                                | 69 $\pm$ 9      | 96 $\pm$ 10            | 101 $\pm$ 13          | 85 $\pm$ 11                        |
| 9            | 100 $\pm$ 5                                | 71 $\pm$ 3      | 93 $\pm$ 7             | 107 $\pm$ 6           | 76 $\pm$ 6                         |
| 10           | 100 $\pm$ 7                                | 60 $\pm$ 21     | 87 $\pm$ 10            | 102 $\pm$ 4           | 70 $\pm$ 13                        |
| 11           | 100 $\pm$ 4                                | 67 $\pm$ 5      | 89 $\pm$ 9             | 101 $\pm$ 6           | 73 $\pm$ 7                         |
| 12           | 100 $\pm$ 6                                | 69 $\pm$ 6      | 85 $\pm$ 4             | 104 $\pm$ 5           | 72 $\pm$ 6                         |
| 13           | 100 $\pm$ 5                                | 65 $\pm$ 5      | 82 $\pm$ 14            | 101 $\pm$ 8           | 78 $\pm$ 7                         |
| 14           | 100 $\pm$ 4                                | 65 $\pm$ 6      | 77 $\pm$ 13            | 104 $\pm$ 7           | 70 $\pm$ 11                        |
| 15           | 100 $\pm$ 5                                | 49 $\pm$ 6      | 80 $\pm$ 6             | 108 $\pm$ 7           | 65 $\pm$ 8                         |

**Příloha 6: Vliv pasážování na toxicitu látek (6 hod; stanovení GSH) - absolutní data.** HK-2 buňky byly v rozmezí 3.–15. pasáže kultivovány v DMEM/F12 médiu s toxiny: acetaminofen (APAP; 10 mM); cisplatina (CisPt; 100  $\mu$ M); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP; 50  $\mu$ M); CdCl<sub>2</sub>; 100  $\mu$ M). Průměr  $\pm$  SD (n = 8–12; 3 nezávislé experimenty).

| Číslo pasáže | Koncentrace glutathionu (absolutní hodnoty); 6 hod |                 |                        |                       |                                    |
|--------------|--|-----------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
|              | Toxiny   |                 |                        |                       |                                    |
|              | Kontrola   | APAP<br>[10 mM] | CisPt<br>[100 $\mu$ M] | t-BHP<br>[50 $\mu$ M] | CdCl <sub>2</sub><br>[100 $\mu$ M] |
| 3            | 63,6 $\pm$ 3                                       | 45,1 $\pm$ 7    | 55,4 $\pm$ 4           | 64,5 $\pm$ 3          | 46,0 $\pm$ 6                       |
| 4            | 73,9 $\pm$ 7                                       | 46,2 $\pm$ 6    | 70,6 $\pm$ 7           | 71,3 $\pm$ 7          | 50,3 $\pm$ 3                       |
| 5            | 83,2 $\pm$ 6                                       | 53,2 $\pm$ 5    | 75,4 $\pm$ 8           | 84,4 $\pm$ 6          | 64,5 $\pm$ 12                      |
| 6            | 71,6 $\pm$ 7                                       | 47,4 $\pm$ 3    | 61,9 $\pm$ 7           | 75,5 $\pm$ 6          | 55,6 $\pm$ 3                       |
| 7            | 79,2 $\pm$ 5                                       | 47,7 $\pm$ 6    | 68,1 $\pm$ 6           | 73,5 $\pm$ 9          | 57,4 $\pm$ 4                       |
| 8            | 62,7 $\pm$ 7                                       | 43,3 $\pm$ 9    | 60,0 $\pm$ 10          | 63,3 $\pm$ 13         | 53,4 $\pm$ 9                       |
| 9            | 69,2 $\pm$ 4                                       | 49,4 $\pm$ 3    | 64,9 $\pm$ 7           | 74,4 $\pm$ 6          | 52,7 $\pm$ 6                       |
| 10           | 66,5 $\pm$ 7                                       | 36,3 $\pm$ 12   | 57,4 $\pm$ 4           | 67,3 $\pm$ 4          | 45,4 $\pm$ 6                       |
| 11           | 72,9 $\pm$ 8                                       | 49,2 $\pm$ 5    | 66,0 $\pm$ 12          | 74,1 $\pm$ 8          | 54,1 $\pm$ 9                       |
| 12           | 67,9 $\pm$ 4                                       | 46,6 $\pm$ 4    | 57,5 $\pm$ 3           | 70,8 $\pm$ 3          | 49,0 $\pm$ 4                       |
| 13           | 71,6 $\pm$ 5                                       | 46,7 $\pm$ 5    | 58,7 $\pm$ 13          | 72,0 $\pm$ 9          | 55,5 $\pm$ 7                       |
| 14           | 55,6 $\pm$ 3                                       | 36,0 $\pm$ 4    | 42,8 $\pm$ 6           | 57,5 $\pm$ 3          | 38,8 $\pm$ 5                       |
| 15           | 42,5 $\pm$ 3                                       | 20,8 $\pm$ 2    | 34,0 $\pm$ 3           | 45,9 $\pm$ 3          | 27,9 $\pm$ 4                       |

**Příloha 7: Vliv pasážování na toxicitu látek (24 hod; WST-1 test; Graf 5).** HK-2 buňky byly v rozmezí 3.–15. pasáže kultivovány s toxiny: acetaminofen (APAP; 10 mM); cisplatina (CisPt; 100  $\mu$ M); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP; 50  $\mu$ M); CdCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M). Průměr  $\pm$  SD (n = 8–12; 3 nezávislé experimenty).

| Číslo pasáže | Dehydrogenázová aktivita (% kontrol); 24 hod |                 |                        |                       |                                    |
|--------------|--|-----------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
|              | Toxiny                                       |                 |                        |                       |                                    |
|              | Kontrola                                     | APAP<br>[10 mM] | CisPt<br>[100 $\mu$ M] | t-BHP<br>[50 $\mu$ M] | CdCl <sub>2</sub><br>[100 $\mu$ M] |
| 3            | 100 $\pm$ 6                                  | 90 $\pm$ 8      | 42 $\pm$ 5             | 87 $\pm$ 11           | 20 $\pm$ 5                         |
| 4            | 100 $\pm$ 6                                  | 85 $\pm$ 8      | 54 $\pm$ 2             | 86 $\pm$ 3            | 16 $\pm$ 2                         |
| 5            | 100 $\pm$ 6                                  | 80 $\pm$ 8      | 48 $\pm$ 1             | 93 $\pm$ 5            | 19 $\pm$ 6                         |
| 6            | 100 $\pm$ 4                                  | 80 $\pm$ 11     | 44 $\pm$ 5             | 88 $\pm$ 6            | 26 $\pm$ 17                        |
| 7            | 100 $\pm$ 4                                  | 86 $\pm$ 13     | 45 $\pm$ 19            | 84 $\pm$ 3            | 22 $\pm$ 1                         |
| 8            | 100 $\pm$ 4                                  | 96 $\pm$ 4      | 53 $\pm$ 4             | 100 $\pm$ 6           | 30 $\pm$ 6                         |
| 9            | 100 $\pm$ 6                                  | 86 $\pm$ 2      | 38 $\pm$ 4             | 77 $\pm$ 4            | 20 $\pm$ 1                         |
| 10           | 100 $\pm$ 6                                  | 87 $\pm$ 2      | 43 $\pm$ 6             | 94 $\pm$ 2            | 23 $\pm$ 8                         |
| 11           | 100 $\pm$ 5                                  | 80 $\pm$ 7      | 37 $\pm$ 23            | 99 $\pm$ 4            | 23 $\pm$ 1                         |
| 12           | 100 $\pm$ 5                                  | 78 $\pm$ 2      | 31 $\pm$ 11            | 87 $\pm$ 3            | 25 $\pm$ 5                         |
| 13           | 100 $\pm$ 5                                  | 83 $\pm$ 9      | 36 $\pm$ 10            | 90 $\pm$ 4            | 25 $\pm$ 1                         |
| 14           | 100 $\pm$ 5                                  | 58 $\pm$ 24     | 24 $\pm$ 17            | 91 $\pm$ 9            | 16 $\pm$ 9                         |
| 15           | 100 $\pm$ 6                                  | 55 $\pm$ 21     | 24 $\pm$ 3             | 79 $\pm$ 4            | 10 $\pm$ 4                         |

**Příloha 8: Vliv pasážování na toxicitu látek (24 hod; WST-1 test) - absolutní data.** HK-2 buňky byly v rozmezí 3.–15. pasáže kultivovány s toxiny: acetaminofen (APAP; 10 mM); cisplatina (CisPt; 100  $\mu$ M); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP; 50  $\mu$ M); CdCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M). Průměr  $\pm$  SD (n = 8–12; 3 nezávislé experimenty).

| Číslo pasáže | Dehydrogenázová aktivita (absolutní hodnoty); 24 hod |                 |                        |                       |                                    |
|--------------|--|-----------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
|              | Toxiny   |                 |                        |                       |                                    |
|              | Kontrola   | APAP<br>[10 mM] | CisPt<br>[100 $\mu$ M] | t-BHP<br>[50 $\mu$ M] | CdCl <sub>2</sub><br>[100 $\mu$ M] |
| 3            | 0,66 $\pm$ 0,04                                      | 0,59 $\pm$ 0,05 | 0,28 $\pm$ 0,03        | 0,58 $\pm$ 0,08       | 0,13 $\pm$ 0,04                    |
| 4            | 0,76 $\pm$ 0,06                                      | 0,65 $\pm$ 0,09 | 0,51 $\pm$ 0,07        | 0,65 $\pm$ 0,03       | 0,12 $\pm$ 0,01                    |
| 5            | 0,77 $\pm$ 0,06                                      | 0,63 $\pm$ 0,09 | 0,37 $\pm$ 0,02        | 0,72 $\pm$ 0,06       | 0,14 $\pm$ 0,04                    |
| 6            | 0,74 $\pm$ 0,29                                      | 0,67 $\pm$ 0,07 | 0,37 $\pm$ 0,03        | 0,74 $\pm$ 0,03       | 0,22 $\pm$ 0,13                    |
| 7            | 0,94 $\pm$ 0,12                                      | 0,81 $\pm$ 0,03 | 0,42 $\pm$ 0,13        | 0,81 $\pm$ 0,11       | 0,21 $\pm$ 0,03                    |
| 8            | 0,81 $\pm$ 0,05                                      | 0,79 $\pm$ 0,02 | 0,43 $\pm$ 0,02        | 0,82 $\pm$ 0,02       | 0,25 $\pm$ 0,06                    |
| 9            | 1,01 $\pm$ 0,28                                      | 0,87 $\pm$ 0,24 | 0,40 $\pm$ 0,13        | 0,79 $\pm$ 0,25       | 0,20 $\pm$ 0,06                    |
| 10           | 0,88 $\pm$ 0,12                                      | 0,78 $\pm$ 0,27 | 0,38 $\pm$ 0,10        | 0,82 $\pm$ 0,11       | 0,19 $\pm$ 0,05                    |
| 11           | 0,85 $\pm$ 0,07                                      | 0,67 $\pm$ 0,05 | 0,31 $\pm$ 0,19        | 0,83 $\pm$ 0,04       | 0,19 $\pm$ 0,01                    |
| 12           | 0,94 $\pm$ 0,07                                      | 0,74 $\pm$ 0,05 | 0,30 $\pm$ 0,12        | 0,82 $\pm$ 0,05       | 0,24 $\pm$ 0,03                    |
| 13           | 0,81 $\pm$ 0,05                                      | 0,68 $\pm$ 0,04 | 0,29 $\pm$ 0,07        | 0,74 $\pm$ 0,05       | 0,21 $\pm$ 0,01                    |
| 14           | 0,93 $\pm$ 0,21                                      | 0,56 $\pm$ 0,10 | 0,19 $\pm$ 0,11        | 0,81 $\pm$ 0,12       | 0,13 $\pm$ 0,05                    |
| 15           | 1,26 $\pm$ 0,04                                      | 0,72 $\pm$ 0,28 | 0,31 $\pm$ 0,04        | 1,03 $\pm$ 0,06       | 0,12 $\pm$ 0,05                    |

**Příloha 9: Vliv pasážování na toxicitu látek (24 hod; stanovení GSH; Graf 6).** HK-2 buňky byly v rozmezí 3.–15. pasáže kultivovány s toxiny: acetaminofen (APAP; 10 mM); cisplatina (CisPt; 100  $\mu$ M); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP; 50  $\mu$ M); CdCl<sub>2</sub>; 100  $\mu$ M). Průměr  $\pm$  SD (n = 8–12; 3 nezávislé experimenty).

| Číslo pasáže | Koncentrace glutathionu (% kontrol); 24 hod |                 |                        |                       |                                    |
|--------------|---|-----------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
|              | Toxiny                                      |                 |                        |                       |                                    |
|              | Kontrola                                    | APAP<br>[10 mM] | CisPt<br>[100 $\mu$ M] | t-BHP<br>[50 $\mu$ M] | CdCl <sub>2</sub><br>[100 $\mu$ M] |
| 3            | 100 $\pm$ 3                                 | 60 $\pm$ 9      | 33 $\pm$ 7             | 102 $\pm$ 6           | 3 $\pm$ 3                          |
| 4            | 100 $\pm$ 9                                 | 56 $\pm$ 4      | 38 $\pm$ 4             | 99 $\pm$ 4            | 7 $\pm$ 2                          |
| 5            | 100 $\pm$ 4                                 | 41 $\pm$ 8      | 30 $\pm$ 3             | 103 $\pm$ 4           | 0 $\pm$ 2                          |
| 6            | 100 $\pm$ 5                                 | 40 $\pm$ 5      | 26 $\pm$ 4             | 97 $\pm$ 5            | 3 $\pm$ 9                          |
| 7            | 100 $\pm$ 5                                 | 48 $\pm$ 3      | 29 $\pm$ 9             | 91 $\pm$ 4            | 7 $\pm$ 4                          |
| 8            | 100 $\pm$ 6                                 | 52 $\pm$ 6      | 31 $\pm$ 7             | 95 $\pm$ 5            | 8 $\pm$ 3                          |
| 9            | 100 $\pm$ 5                                 | 43 $\pm$ 4      | 27 $\pm$ 9             | 94 $\pm$ 4            | 4 $\pm$ 4                          |
| 10           | 100 $\pm$ 4                                 | 47 $\pm$ 3      | 23 $\pm$ 8             | 101 $\pm$ 3           | 4 $\pm$ 4                          |
| 11           | 100 $\pm$ 5                                 | 42 $\pm$ 5      | 18 $\pm$ 13            | 99 $\pm$ 4            | 7 $\pm$ 3                          |
| 12           | 100 $\pm$ 4                                 | 40 $\pm$ 2      | 16 $\pm$ 11            | 100 $\pm$ 2           | 8 $\pm$ 2                          |
| 13           | 100 $\pm$ 6                                 | 45 $\pm$ 12     | 17 $\pm$ 18            | 102 $\pm$ 4           | 6 $\pm$ 10                         |
| 14           | 100 $\pm$ 5                                 | 35 $\pm$ 9      | 12 $\pm$ 14            | 97 $\pm$ 9            | 4 $\pm$ 2                          |
| 15           | 100 $\pm$ 6                                 | 36 $\pm$ 9      | 15 $\pm$ 4             | 100 $\pm$ 4           | 7 $\pm$ 3                          |

**Příloha 10: Vliv pasážování na toxicitu látek (24 hod; stanovení GSH) - absolutní data.** HK-2 buňky byly v rozmezí 3.–15. pasáže kultivovány s toxiny: acetaminofen (APAP; 10 mM); cisplatina (CisPt; 100  $\mu$ M); *tert*-butylhydroperoxid (t-BHP; 50  $\mu$ M); CdCl<sub>2</sub>; 100  $\mu$ M). Průměr  $\pm$  SD (n = 8–12; 3 nezávislé experimenty).

| Číslo pasáže | Koncentrace glutathionu (absolutní hodnoty); 24 hod |                 |                        |                       |                                    |
|--------------|---|-----------------|------------------------|-----------------------|------------------------------------|
|              | Toxiny  |                 |                        |                       |                                    |
|              | Kontrola  | APAP<br>[10 mM] | CisPt<br>[100 $\mu$ M] | t-BHP<br>[50 $\mu$ M] | CdCl <sub>2</sub><br>[100 $\mu$ M] |
| 3            | 83,7 $\pm$ 5  | 50,7 $\pm$ 10   | 27,3 $\pm$ 5           | 84,9 $\pm$ 5          | 2,4 $\pm$ 2                        |
| 4            | 92,4 $\pm$ 11                                       | 51,6 $\pm$ 7    | 32,5 $\pm$ 3           | 90,9 $\pm$ 5          | 6,8 $\pm$ 2                        |
| 5            | 93,6 $\pm$ 9  | 38,5 $\pm$ 10   | 27,6 $\pm$ 2           | 96,7 $\pm$ 9          | 0,4 $\pm$ 1                        |
| 6            | 88,0 $\pm$ 16                                       | 35,8 $\pm$ 9    | 23,0 $\pm$ 5           | 85,9 $\pm$ 17         | 3,6 $\pm$ 8                        |
| 7            | 98,5 $\pm$ 6  | 47,7 $\pm$ 3    | 28,3 $\pm$ 8           | 89,2 $\pm$ 2          | 6,6 $\pm$ 4                        |
| 8            | 90,4 $\pm$ 16                                       | 45,9 $\pm$ 3    | 27,0 $\pm$ 3           | 86,1 $\pm$ 17         | 7,9 $\pm$ 4                        |
| 9            | 95,4 $\pm$ 9  | 41,4 $\pm$ 7    | 25,3 $\pm$ 7           | 89,7 $\pm$ 9          | 4,4 $\pm$ 4                        |
| 10           | 87,6 $\pm$ 4  | 41,5 $\pm$ 3    | 19,9 $\pm$ 7           | 88,9 $\pm$ 3          | 3,9 $\pm$ 4                        |
| 11           | 85,7 $\pm$ 6  | 36,2 $\pm$ 6    | 15,8 $\pm$ 12          | 85,1 $\pm$ 3          | 5,8 $\pm$ 3                        |
| 12           | 87,8 $\pm$ 4  | 35,1 $\pm$ 2    | 13,9 $\pm$ 9           | 87,8 $\pm$ 3          | 6,7 $\pm$ 2                        |
| 13           | 83,2 $\pm$ 11                                       | 38,8 $\pm$ 15   | 15,2 $\pm$ 16          | 84,6 $\pm$ 10         | 6,0 $\pm$ 9                        |
| 14           | 73,7 $\pm$ 4  | 25,7 $\pm$ 8    | 9,4 $\pm$ 10           | 71,0 $\pm$ 5          | 2,7 $\pm$ 1                        |
| 15           | 79,5 $\pm$ 10                                       | 27,7 $\pm$ 4    | 12,4 $\pm$ 4           | 79,6 $\pm$ 8          | 6,0 $\pm$ 3                        |

**Příloha 11: Vliv CdCl<sub>2</sub> na dehydrogenázovou aktivitu (6 hod; WST-1 test; Graf 7).** HK-2 buňky byly v rozmezí 4.–11. pasáže kultivovány v DMEM/F12 médiu. Inkubace s CdCl<sub>2</sub> 0–1000 μM (6 hod). Průměr ± SD (n = 6–10; 3 nezávislé experimenty).

| CdCl <sub>2</sub> [μM] | Dehydrogenázová aktivita (% kontrol); 6 hod |
|------------------------|---|
| 0                      | 100 ± 6                                     |
| 0,5                    | 96 ± 9                                      |
| 1                      | 80 ± 10                                     |
| 10                     | 91 ± 6                                      |
| 25                     | 124 ± 8                                     |
| 50                     | 169 ± 7                                     |
| 100                    | 152 ± 9                                     |
| 200                    | 80 ± 8                                      |
| 1000                   | 19 ± 2                                      |

**Příloha 12: Vliv CdCl<sub>2</sub> na dehydrogenázovou aktivitu (24 hod; WST-1 test; Graf 8).** HK-2 buňky byly v rozmezí 4.–11. pasáže kultivovány v DMEM/F12 médiu. Inkubace s CdCl<sub>2</sub> 0–1000 μM (24 hod). Průměr ± SD (n = 6–10; 3 nezávislé experimenty).

| CdCl <sub>2</sub> [μM] | Dehydrogenázová aktivita (% kontrol); 24 hod |
|------------------------|--|
| 0                      | 100 ± 9                                      |
| 0,5                    | 115 ± 15                                     |
| 1                      | 95 ± 9                                       |
| 10                     | 101 ± 13                                     |
| 25                     | 128 ± 18                                     |
| 50                     | 163 ± 9                                      |
| 100                    | 36 ± 8                                       |
| 200                    | 11 ± 5                                       |
| 1000                   | 0 ± 2  |

**Příloha 13: Aktivita kaspáz 3 a 7 u HK-2 buněk inkubovaných s CdCl<sub>2</sub> po 2, 6 a 24 hod (Graf 9).** Aktivita kaspáz 3 a 7 byla měřena u HK-2 buněk po inkubaci s 5-100 μM CdCl<sub>2</sub> a 100 μM CisPt. Průměr ± SD (n = 3).

| Čas    | Aktivita kaspáz (% kontrol) |                             |                              |                               |                   |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------|
|        | Toxiny                      |                             |                              |                               |                   |
|        | Kontrola                    | CdCl <sub>2</sub><br>[5 μM] | CdCl <sub>2</sub><br>[25 μM] | CdCl <sub>2</sub><br>[100 μM] | CisPt<br>[100 μM] |
| 2 hod  | 100 ± 4                     | 104 ± 0                     | 108 ± 1                      | 124 ± 2                       | 122 ± 2           |
| 6 hod  | 100 ± 2                     | 107 ± 2                     | 112 ± 0                      | 123 ± 3                       | 268 ± 10          |
| 24 hod | 100 ± 6                     | 107 ± 4                     | 110 ± 8                      | 42 ± 2                        | 237 ± 8           |

## 8.2 Seznam publikovaných prací

### Odborné články tematicky spojené s disertační prací v časopisech s IF

#### Příloha 14:

Handl Jiří, Čapek Jan, Majtnerová Pavlína, Petira Filip, Hauschke Martina, Roušarová Erika, Roušar Tomáš. Transient increase in cellular dehydrogenase activity after cadmium treatment precedes enhanced production of reactive oxygen species in human proximal tubular kidney cells. *Physiological Research*, 2019, 68, pages 481-490. ISSN 0862-8408, doi.org/10.33549/physiolres.934121. **(IF = 1,701)**

#### Příloha 15:

Handl Jiří, Čapek Jan, Majtnerová Pavlína, Báčová Jana, Roušar Tomáš. The effect of repeated passaging on the susceptibility of human proximal tubular HK-2 cells to toxic compounds. *Physiological Research*, 2020, Ref. č. rukopisu 934491. ISSN 0862-8408. **(IF = 1,701)**

Práce vznikla za podpory projektů Posilování mezioborové spolupráce ve výzkumu nanomateriálů a při studiu jejich účinků na živé organismy (CZ.02.1.01/0.0/0.0/17\_048/0007421) a GAČR 19-11867S.

## Transient Increase in Cellular Dehydrogenase Activity After Cadmium Treatment Precedes Enhanced Production of Reactive Oxygen Species in Human Proximal Tubular Kidney Cells

J. HANDL<sup>1</sup>, J. ČAPEK<sup>1</sup>, P. MAJTNEROVÁ<sup>1</sup>, F. PETIRA<sup>1</sup>, M. HAUSCHKE<sup>1</sup>,  
E. ROUŠAROVÁ<sup>1</sup>, T. ROUŠAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice, Czech Republic

Received January 18, 2019

Accepted February 5, 2019

Epub Ahead of Print March 22, 2019

### Summary

Cadmium is a heavy metal causing toxicity especially in kidney cells. The toxicity is linked also with enhanced oxidative stress leading to cell death. On the other hand, our recent experiments have shown that an increase of total intracellular dehydrogenases activity can also occur in kidney cells before declining until cell death. The aim of the present study, therefore, was to evaluate this transient enhancement in cell viability after cadmium treatment. The human kidney HK-2 cell line was treated with CdCl<sub>2</sub> at concentrations 0-200 μM for 2-24 h and intracellular dehydrogenase activity was tested. In addition, we measured reactive oxygen species (ROS) production, glutathione levels, mitochondrial membrane potential, and C-Jun-N-terminal kinase (JNK) activation. We found that significantly increased dehydrogenase activity could occur in cells treated with 25, 100, and 200 μM CdCl<sub>2</sub>. Moreover, the results showed an increase in ROS production linked with JNK activation following the enhancement of dehydrogenase activity. Other tests detected no relationship with the increased in intracellular dehydrogenase activity. Hence, the transient increase in dehydrogenase activity in HK-2 cells preceded the enhancement of ROS production and our finding provides new evidence in cadmium kidney toxicity.

### Key words

Cadmium toxicity □ Kidney injury □ Dehydrogenase activity □  
Oxidative stress □ ROS production

### Corresponding author

T. Roušar, Department of Biological and Biochemical Sciences,  
Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice,

Studentská 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic. Fax: +420  
466 037 068. E-mail: Tomas.Rousar@upce.cz

### Introduction

Cadmium is a widely occurring, highly toxic heavy metal. It can be toxic even at low concentrations (Tobwala *et al.* 2014). The toxic effect of cadmium is most commonly detected in kidney, liver, and neuronal cells (Linhartová *et al.* 2016, Wang *et al.* 2007). In addition, the toxicity can be found in bone and blood cells (Fahim *et al.* 2012, Fongsupa *et al.* 2015, Klaassen *et al.* 2009, Li *et al.* 2016, Madden *et al.* 2002, Zhang *et al.* 2007).

Cadmium (i.e. cadmium ion) causes both acute and chronic toxic effects in the organism. These effects are mostly linked with induction of oxidative stress (Thévenod and Friedmann 1999, Tobwala *et al.* 2014). Therefore, Cd is able significantly to decrease the levels of glutathione (GSH), a major intracellular nonprotein thiol (López *et al.* 2006, Zahir *et al.* 1999). In addition, some reports have indicated that low Cd concentrations induce mutations through DNA oxidative damage and by diminishing the genetic stability of cells (Valverde *et al.* 2001). These events increase the probability of mutations and, consequently, initiation of tumor growth (Filipič 2012).

Recently, a human immortalized proximal tubular cell line (HK-2) has been developed for studying nephrotoxicity *in vitro* (Gunnness *et al.* 2010, Ryan *et al.*



1994). The HK-2 cells also have been used for testing nephrotoxicity of heavy metals, including Cd (Shrestha *et al.* 2017, Wilmes *et al.* 2011). Acute exposure of HK-2 cells to Cd leads to apoptosis of those cells (Mao *et al.* 2007, Shrestha *et al.* 2017), as Cd induces the expression and activation of pro-apoptotic proteins, including caspases (Huang *et al.* 2017). A number of studies have reported that Cd can induce both apoptotic and necrotic cell death (Kondo *et al.* 2012). Necrosis and apoptosis are linked with lipid peroxidation and increased reactive oxygen species (ROS) production induced by Cd (López *et al.* 2006). The reports have proven that higher ROS production induces phosphorylation of C-Jun-N-terminal kinase (JNK) in human renal proximal tubular cells (Fongsupa *et al.* 2015). All these processes can lead to decrease of cell viability and even to cell death.

The goal of the present study is directly linked to the results of our previous study (Hauschke *et al.* 2017), whereby we recently found that Cd treatment, surprisingly, can also lead to temporary increase in the viability of HK-2 cells. Indications of increase in cell viability after Cd treatment can be found also in reports from other authors (Iwatsuki *et al.* 2011, Lee *et al.* 2015, Somji *et al.* 2006), but none of the previous studies had given much attention to this finding. Therefore, the aim of the present study was to examine whether the increase in HK-2 cell viability after Cd exposure is related to Cd concentration and/or duration of Cd treatment, as well as whether the increase of total intracellular dehydrogenases activity (further referred as dehydrogenase activity) can be linked to any other changes in oxidative metabolism.

## Materials and Methods

### Chemicals

Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 (with/without phenol red), insulin, transferrin, and sodium selenite were purchased from Sigma-Aldrich (USA). Fetal bovine serum, pyruvate, penicillin, streptomycin, epidermal growth factor, and all other chemicals, if not otherwise specified, were purchased from Invitrogen-Gibco (USA).

### Cell culture

Human kidney (HK-2) cells, a proximal tubular epithelial cell line derived from normal adult human kidney cells immortalized by transduction with human papillomavirus (HPV 16) DNA fragment (Ryan *et al.*

1994), were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The cells were cultured in keeping with our previous studies (Hauschke *et al.* 2017, Vrbová *et al.* 2016). All the experiments were conducted using the HK-2 cells (passages 4-11). HK-2 cells were seeded into 96-well plates at density of  $3 \times 10^4$  cells/well and exposure medium containing 0-1 mM CdCl<sub>2</sub>. The cells were incubated for specific periods of 2, 6, 10, 24 and 48 h.

### Dehydrogenase activity measurement

Dehydrogenase activity was evaluated by WST-1 test (Roche, Germany). The WST-1 test measures the activity of intra- and extramitochondrial dehydrogenases. At the required time, the WST-1 reagent was added to the cultured cells (1:10 final dilution). The cells were incubated in a gassed atmosphere (5 % CO<sub>2</sub>) for 60 min and the absorbance change (0-1 h) was measured spectrophotometrically at wavelength of 440 nm using a Tecan Infinite M200 plate reader (Tecan, Austria). The dehydrogenase activity was expressed as the percentage intra- and extramitochondrial dehydrogenases activity relative to that in control cells (=100 %).

### Measuring glutathione levels

GSH levels were measured using an optimized bimane assay (Čapek *et al.* 2017). The cells were incubated in cell medium (100 µl) on 96-well plates with CdCl<sub>2</sub> for an appropriate time. After incubation, 20 µl of the bimane solution was added to cells and measurement was started. The final concentration of monochlorobimane in a well was 40 µM. The fluorescence (Ex/Em=394/490 nm) was measured for 20 min using a Tecan Infinite M200 fluorescence reader incubated at 37 °C. The fluorescence was expressed as the slope of change in fluorescence over time. The GSH levels were expressed as the percentage relative to those in control cells (=100 %).

### Measuring ROS production

We used chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H<sub>2</sub>DCFDA; Thermo, USA) as an intracellular probe to detect ROS production. The working solution was prepared fresh at the time of analysis by dilution in Dulbecco's Modified Eagle's Medium. The cells were incubated with CdCl<sub>2</sub> for appropriate periods. After incubation, the CM-H<sub>2</sub>DCFDA working solution was added to cells to be loaded with the

probe for 90 min. The final concentration of CM-H<sub>2</sub>DCFDA in a well was 1  $\mu$ M. The cells were then washed with phosphate buffered saline (PBS) and the fluorescence measurement was started. The fluorescence (Ex/Em=485/535 nm) was measured for 60 min using a Tecan Infinite M200 fluorescence reader. The ROS levels were expressed as the percentage relative to ROS levels in control cells (=100 %).

#### *Detecting mitochondrial membrane potential*

Mitochondrial membrane potential was measured using a JC-1 intracellular probe. The working solution of JC-1 was prepared fresh at the time of analysis by dilution in Dulbecco's phosphate buffer. After Cd treatment, 20  $\mu$ l of the JC-1 solution was added to cells. The final concentration of JC-1 in a well was 10  $\mu$ g/ml. The HK-2 cells were loaded for 20 min and then washed with PBS. The fluorescence (red: Ex/Em=485/595 nm; green: Ex/Em=485/535 nm) was measured using a Tecan Infinite M200 fluorescence reader. The rate of mitochondrial membrane potential was expressed as the red/green ratio.

#### *Measuring nuclear condensation*

We used Hoechst 33258 dye for detecting DNA fragmentation in cells. The working solution of Hoechst 33258 was prepared fresh at the time of analysis. After Cd treatment, 10  $\mu$ l of the Hoechst 33258 solution was added to cells and the fluorometric measurement was started after 20 min of loading. The final concentration of Hoechst 33258 in a well was 2  $\mu$ g/ml. The fluorescence (Ex/Em=352/461 nm) was measured using a Tecan Infinite M200 fluorescence reader. The fluorescence signal was expressed as the percentage relative to fluorescence in control cells (=100 %).

#### *Measuring caspase-3/7 activity*

Caspase-3/7 activation was measured by Apo-ONE<sup>®</sup> Homogeneous Caspase-3/7 Assay (Promega, USA). The working solution of caspase-3/7 was prepared fresh at the time of analysis. The cells were incubated with CdCl<sub>2</sub> and cisplatin (100  $\mu$ M) for appropriate times. Then, 100  $\mu$ l of the caspase-3/7 working solution was added to cells and the fluorescence (Ex/Em=485/530 nm) was measured using a Tecan Infinite M200 fluorescence reader. At 14 h of treatment, the fluorescence was expressed as the percentage relative to the fluorescence in control cells (=100 %).

#### *Detecting protein levels*

The protein levels of JNK and NF $\kappa$ B were detected using western blot analysis. Briefly, HK-2 cells ( $1.5 \times 10^6$ ) were washed in PBS, lysed in RIPA Lysis Buffer (30 min; 4  $^{\circ}$ C), centrifuged (16,000 $\times$  g; 20 min; 4  $^{\circ}$ C), and the supernatant was loaded onto SDS-PAGE. Proteins were transferred onto Immun-Blot PVDF Membrane (Bio-Rad, USA). After blocking in TBST buffer (20 mM TRIS; 150 mM NaCl; 0.1 % Tween-20; pH 7.5) containing 5 % bovine serum albumin, the samples were incubated with Anti-ACTIVE<sup>®</sup> JNK (anti-54 kDa JNK2; Rabbit; Promega), Anti-NF $\kappa$ B p65 monoclonal antibodies (Mouse; Invitrogen) or anti-B-Actin (Rabbit; Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. The membrane was then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Goat; Sigma-Aldrich, Goat anti-mouse; Invitrogen). The proteins were visualized using Clarity<sup>™</sup> Western ECL Substrate (Bio-Rad) and ChemiDoc<sup>™</sup> MP System (Bio-Rad).

#### *Statistics*

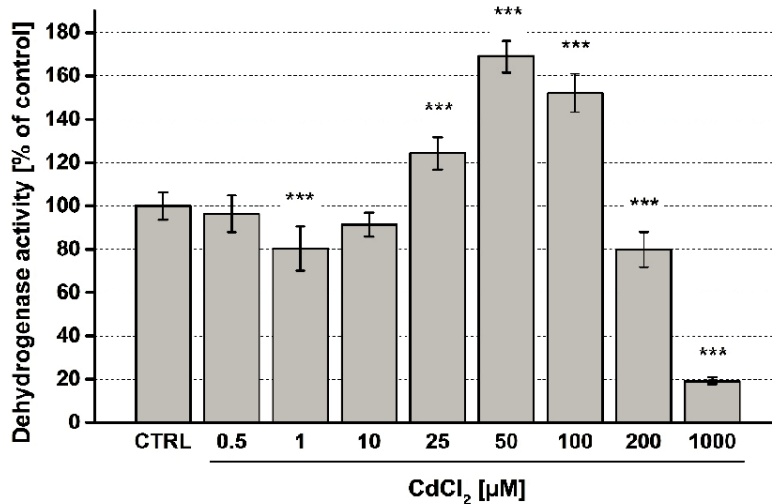
All experiments were repeated at least three times independently. All values were measured at least in duplicate. The results are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical significance was analyzed after normality testing using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni correction (OriginPro 9.0.0, USA). In comparing results with control cells without cadmium treatment, the significance level was set at  $p=0.05$  or lower (\*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ ).

## **Results**

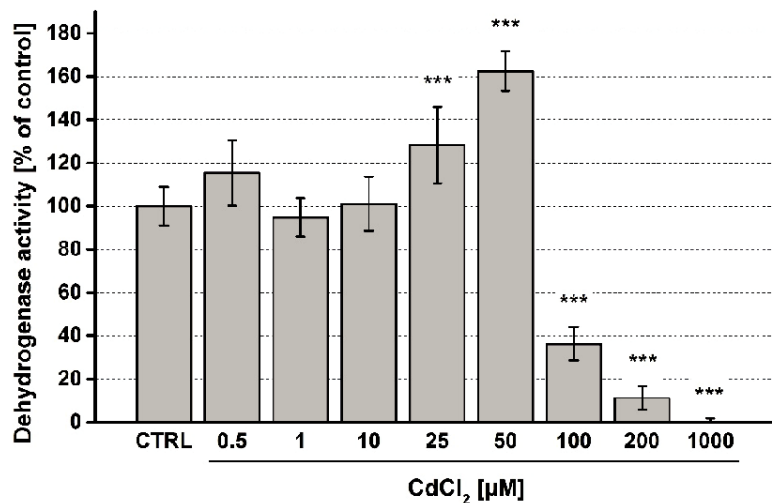
Based on the results reported in our previous study (Hauschke *et al.* 2017), we aimed to characterize the toxic effect of Cd across a broad range of CdCl<sub>2</sub> concentrations. The HK-2 cells were treated with CdCl<sub>2</sub> (0.1  $\mu$ M-1 mM) for 6 and 24 h, and intracellular dehydrogenase activity was measured using the WST-1 test. After 6 h, we detected in cells treated with 200  $\mu$ M and 1 mM CdCl<sub>2</sub> a significant reduction of cellular dehydrogenase activity to  $19 \pm 2$  % ( $p<0.001$ ) and  $80 \pm 8$  % ( $p<0.001$ ), respectively, in comparison with controls (=100 %). On the other hand, significant increase in cell viability was found in cells treated with 25  $\mu$ M ( $124 \pm 8$  %;  $p<0.001$ ), 50  $\mu$ M ( $169 \pm 7$  %;  $p<0.001$ ), and 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> ( $152 \pm 9$  %;  $p<0.001$ ) in comparison to control cells (Fig. 1). After 24 h, the significant decrease

in cell viability was found in cells treated with 100, 200, and 1,000  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  (Fig. 2). The viability of HK-2 cells treated with 25  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  increased significantly to  $128 \pm 18\%$  ( $p < 0.001$ ) and  $163 \pm 9\%$  ( $p < 0.001$ ), respectively, in comparison with controls.

Based on these results, we have proven that, under the given conditions, the HK-2 cells could exhibit enhanced intracellular dehydrogenase activity after  $\text{CdCl}_2$  treatment as opposed to the expected diminished intracellular dehydrogenase activity.



**Fig. 1.** Dehydrogenase activity measurement – HK-2 cells were assayed using the WST-1 test after 6 h of treatment with  $\text{CdCl}_2$  at concentrations 0-1,000  $\mu\text{M}$ . The results are expressed as mean  $\pm$  SD (control=100 %; n=6-10). \*\*\*  $p < 0.001$  (compared to control).



**Fig. 2.** Dehydrogenase activity measurement – HK-2 cells were assayed using the WST-1 test after 24 h of treatment with  $\text{CdCl}_2$  at concentrations 0-1,000  $\mu\text{M}$ . The results are expressed as mean  $\pm$  SD (control=100 %; n=6-10). \*\*\*  $p < 0.001$  (compared to control).

We selected treatments of 5, 25, 100, and 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  for the following characterization of changes in dehydrogenase activity of HK-2 cells incubated with  $\text{CdCl}_2$  for 2, 6, 10, and 24 h. We first tested again intracellular dehydrogenase activity using WST-1 (Table 1). With the exception of the 5  $\mu\text{M}$  treatment, we detected significant increase in intracellular dehydrogenase activity that was dependent on incubation time in all tested  $\text{CdCl}_2$  concentrations. The increased in dehydrogenase activity was strongly related to both

$\text{CdCl}_2$  dose and duration of treatment. In the case of cells treated with 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , a significant increase in intracellular dehydrogenase activity was detected only after 2 h. Longer treatment times with 200  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  caused a decrease in dehydrogenase activity of HK-2 cells. Treatment with 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  caused a significant increase in intracellular dehydrogenase activity after 2, 6, and 10 h but a significant decrease after 24 h. In cells treated with 25  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , increase in intracellular dehydrogenase activity was detected only after treatment

from 6 to 24 h.

Because the increase in dehydrogenase activity detected using the WST-1 test could be related to changes in oxidative metabolism, we assessed mitochondrial membrane potential, GSH levels, and ROS production (Table 2). To assess oxidative stress after CdCl<sub>2</sub> treatment, we measured intracellular ROS production.

We found that ROS production was considerably related to outcomes of increased dehydrogenase activity. The results showed that ROS production was increased significantly in cells treated with 200 μM CdCl<sub>2</sub> after both 2 and 6 h. At 6 and 24 h, ROS production was increased in those cells treated with 100 and 25 μM CdCl<sub>2</sub>, respectively (Table 2).

**Table 1.** Dehydrogenase activity of HK-2 cells.

| Time | CdCl <sub>2</sub> (μM) |             |               |               |             |
|------|------------------------|-------------|---------------|---------------|-------------|
|      | 0                      | 5           | 25            | 100           | 200         |
| 2 h  | 100±7%                 | 79 ± 7 %*** | 96±7%         | 138 ± 10 %*** | 114±4%*     |
| 6 h  | 100±6%                 | 80 ± 9 %*** | 124 ± 8 %***  | 152 ± 9 %***  | 80 ± 8 %*** |
| 10 h | 100±5%                 | 101±5%      | 139 ± 6 %***  | 173 ± 7 %***  | 80 ± 5 %*** |
| 24 h | 100±9%                 | 92±6%       | 128 ± 18 %*** | 36 ± 8 %***   | 11 ± 5 %*** |
| 48 h | 100±10%                | 102±4%      | 101±3%        | 2±0%***       | 0 %***      |

The activity was assayed using the WST-1 test after 2, 6, 10, 24 and 48 h of treatment with CdCl<sub>2</sub> at concentrations 0-200 μM. Gray shading indicates the finding of increased intracellular dehydrogenase activity. The results are expressed as mean ± SD (control=100 %; n=6-10). \* *p*<0.05; \*\*\* *p*<0.001.

**Table 2.** Estimation of oxidative metabolism in HK-2 cells after CdCl<sub>2</sub> treatment (0-200 μM) for 2, 6, 10, and 24 h.

| Time | CdCl <sub>2</sub> (μM) | ROS           | GSH         | MMP (R/G)      | DNA condensation |
|------|------------------------|---------------|-------------|----------------|------------------|
| 2 h  | 0                      | 100 ±13%      | 100±5%      | 2.29 ± 0.11    | 100 ± 11 %       |
|      | 5                      | 60 ± 6 %***   | 102±4%      | 2.17 ± 0.13    | 94±15%           |
|      | 25                     | 57 ± 9 %***   | 99±3%       | 2.45 ± 0.18    | 65± 13 %**       |
|      | 100                    | 49 ± 12 %***  | 93±1%       | 2.07 ± 0.14    | 59± 9 %***       |
|      | 200                    | 148 ± 13 %*** | 87 ± 4 %*** | 1.98 ± 0.11**  | 61 ± 17 %***     |
| 6 h  | 0                      | 100 ±14%      | 100±4%      | 2.16 ± 0.31    | 100 ± 50 %       |
|      | 5                      | 90 ± 9 %      | 97±4%       | 2.45 ± 0.19    | 107 ± 28 %       |
|      | 25                     | 69±5%**       | 97±3%       | 2.02 ± 0.09    | 98 ± 5 %         |
|      | 100                    | 189 ± 14 %*** | 79 ± 3 %*** | 2.41 ± 0.25    | 82±31%           |
|      | 200                    | 311 ± 21 %*** | 59 ± 3 %*** | 2.45 ± 0.25    | 87±44%           |
| 10 h | 0                      | N/A           | 100±4%      | 2.57 ± 0.33    | 100 ± 30 %       |
|      | 5                      | N/A           | 99±3%       | 2.40 ± 0.34    | 69±26%           |
|      | 25                     | N/A           | 105±2%      | 1.94 ± 0.26*   | 70±21%           |
|      | 100                    | N/A           | 59 ± 3 %*** | 2.46 ± 0.17    | 54±17%           |
|      | 200                    | N/A           | 39 ± 2 %*** | 1.49 ± 0.11*** | 563± 26 %***     |
| 24 h | 0                      | 100 ±14%      | 100±3%      | 2.16 ± 0.27    | 100 ± 13 %       |
|      | 5                      | 86 ± 5 %      | 102±4%      | 1.80 ± 0.12    | 74±16%           |
|      | 25                     | 204 ± 23 %*** | 102±4%      | 1.62 ± 0.13**  | 86 ± 8 %         |
|      | 100                    | 78±12%        | 7±1%***     | 0.31 ± 0.07*** | 529± 64 %***     |
|      | 200                    | 88±15%        | 5±1%***     | 0.22 ± 0.03*** | 561± 36 %***     |

Reactive oxygen species (ROS) levels were assessed using chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate probe. Glutathione (GSH) levels were measured using monochlorobimane. The mitochondrial membrane potential (MMP) was measured by fluorometric method using the JC-1 probe and the results were expressed as the red/green (R/G) ratio. Nuclear condensation was measured using Hoechst 33258 probe. The results are expressed as mean ± SD (control=100 %; n=6-10). \* *p*<0.05; \*\* *p*<0.01; \*\*\* *p*<0.001.

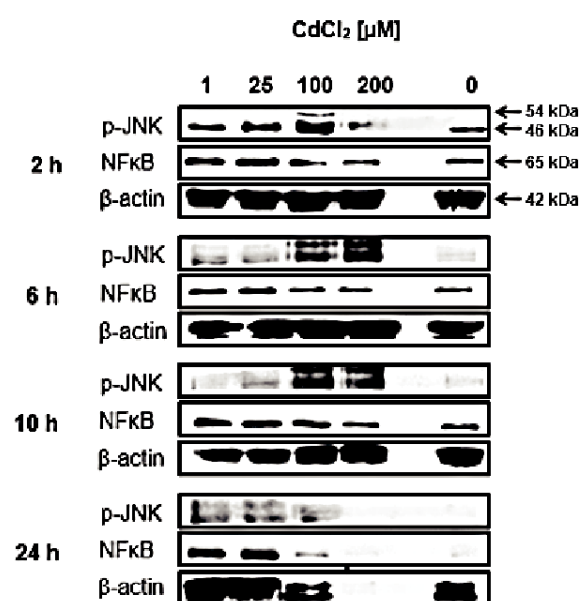
We found no significant change of MMP in relation to the observed increase in intracellular dehydrogenase activity after CdCl<sub>2</sub> treatment. Our experiments showed that MMP was significantly reduced mostly after treatment with CdCl<sub>2</sub> for longer periods. Therefore, the change of MMP in HK-2 cells was rather unrelated to the CdCl<sub>2</sub>-induced increase in intracellular dehydrogenase activity. Significant changes in cellular GSH levels were detected in treatments using 200 μM CdCl<sub>2</sub> for all tested time periods. Similar GSH depletion was detected in cells treated with 100 μM CdCl<sub>2</sub>. No changes of GSH levels were found in treatments using 5 and 25 μM CdCl<sub>2</sub>.

Finally, we examined changes in cell nucleus induced by CdCl<sub>2</sub> using three methods: detecting DNA condensation, measuring caspase activity, and assessing JNK activation. We found significantly increased fluorescence signal of DNA condensation in cells treated with 200 μM CdCl<sub>2</sub> after both 10 and 24 h and in cells treated with 100 μM CdCl<sub>2</sub> after 24 h (Table 2). The examination of caspase activities showed the activity of caspase 3/7 to be non-significantly increased after 200 μM CdCl<sub>2</sub> treatment (data not shown). JNK activation was detected using western blot analysis. Increased protein levels of p-JNK were detected after 2, 6 and 10 h in both the 100 and 200 μM treatments. At 24 h, JNK activation was detected at all tested CdCl<sub>2</sub> concentrations with the exception 200 μM CdCl<sub>2</sub> treated cells (Fig. 3). In addition, we detected NFκB activation in Cd treated HK-2 cells, but the results did not show any changes in the NFκB expression.

## Discussion

The toxicity of Cd has been tested in renal cell lines of human (i.e. HK-2 cells; Fujiki *et al.* 2013, Kim *et al.* 2014, Simon *et al.* 2014, Wilmes *et al.* 2011) and animal origin (i.e. canine MDCK; Zimmerhackl *et al.* 1998), pig LLC-PK1 (Fotakis and Timbrell 2006), rat HTC (Gennari *et al.* 2003). HK-2 cells are immortalized proximal tubular cells (Gunness *et al.* 2010) and presently are regarded as providing the most relevant model for studying Cd toxicity (Fongsupa *et al.* 2015, Fujiki *et al.* 2013, Huang *et al.* 2017, Iwatsuki *et al.* 2011, Komoike *et al.* 2011, Shrestha *et al.* 2017, Somji *et al.* 2006). Therefore, HK-2 cells were used for characterizing Cd cytotoxicity in the study we present here.

Our results have shown that, contrary to expected decrease in cell viability, CdCl<sub>2</sub> can induce



**Fig. 3.** Detection of p-JNK and NFκB in HK-2 cells after CdCl<sub>2</sub> exposure using western blot analysis. Cells were exposed to different concentrations of CdCl<sub>2</sub> (1-200 μM) for 2, 6, 10, and 24 h. β-actin (42 kDa), NFκB (65 kDa), p-JNK (46 kDa, 54 kDa) were determined for each interval and concentration (with comparison to control cells).

a transient increase of cell viability in relation to CdCl<sub>2</sub> dose and incubation time (Hauschke *et al.* 2017). In addition, some outcomes from several studies by other authors also lend support to our findings. Enhanced cell viability after Cd treatment has been reported from studies using both human (Iwatsuki *et al.* 2011, Kondo *et al.* 2012) and animal (Fotakis and Timbrell 2006, Riemschneider *et al.* 2015) kidney cells as well as cells of other tissue origin (Bonham *et al.* 2003, Somji *et al.* 2006). Because those reports provided no information on the finding of increased in intracellular dehydrogenase activity after Cd treatment, we decided to characterize that role of CdCl<sub>2</sub>.

We tested treatment of HK-2 cells with CdCl<sub>2</sub> in a variety of concentrations (5, 25, 100, and 200 μM CdCl<sub>2</sub>) and times (2-24 h). Intracellular dehydrogenase activity was detected using the WST-1 test, which measures the activity of intracellular dehydrogenases. We found that all tested concentrations of CdCl<sub>2</sub> with the exception of 5 μM induced significant transient increase in intracellular dehydrogenase activity in HK-2 cells and that the time of the occurrence of dehydrogenase activity increase was inversely correlated with CdCl<sub>2</sub> concentration. Our results can also be supported by outcomes from two other studies (Iwatsuki *et al.* 2011,

Kondo *et al.* 2012) which tested CdCl<sub>2</sub>-induced changes in HK-2 dehydrogenase activity using the WST-8 test. The induction of increased HK-2 dehydrogenase activity was found in cells treated with 20 µM CdCl<sub>2</sub> for 4 h. Unfortunately, those two studies did not use CdCl<sub>2</sub> at levels higher than 50 µM. Two other studies on cadmium toxicity reported the increased in intracellular dehydrogenase activity after exposure to 10 µM CdCl<sub>2</sub> for 24 and 48 h in an animal MDCK kidney cell line (Bonham *et al.* 2003) and after treatment with 10 µM CdCl<sub>2</sub> for 24 and 48 h in the RAW 264.7 macrophage cell line (Riemschneider *et al.* 2015).

Seeking the implication of the cell viability increase in HK-2 cells, we followed the experiments with additional biochemical tests. Because the increase of intracellular dehydrogenase activity could be related to changes in redox metabolism, we assessed ROS production, GSH levels, MMP, and JNK activation. Intracellular ROS production and GSH levels were measured as markers of oxidative stress. We found that induction of ROS production followed the enhancement of dehydrogenase activity as measured by the WST-1 test in CdCl<sub>2</sub>-treated HK-2 cells. After 2 h, increase in dehydrogenase activity and ROS production were detected in cells treated with 200 µM CdCl<sub>2</sub>. Inasmuch as the 100 µM treatment induced increased dehydrogenase activity after 2 h and 6 h but ROS production was stimulated significantly only after 6 h, we might conclude that increase in intracellular dehydrogenase activity precludes the increase in ROS production. This can be supported by the finding that intracellular dehydrogenase activity of HK-2 cells incubated in 25 µM CdCl<sub>2</sub> increased after 6 and 24 h but ROS production was stimulated significantly until 24 h. Another conclusion from our results is that significant depletion of intracellular GSH levels appeared in all incubation periods only after increase in ROS production. In contrast, after 24 h of treatment of HK-2 cells with 25 µM CdCl<sub>2</sub>, the increase in intracellular dehydrogenase activity and ROS production was not linked with GSH depletion. This might be because such short duration of treatment did not allow the GSH depletion to appear.

To characterize other cellular processes related to increased dehydrogenase activity of HK-2 cells after Cd treatment, we used detection of JNK and NFκB activation. We found no changes in NFκB protein expression. On the other hand, our results showed increased p-JNK levels in cells treated with 100 and

200 µM CdCl<sub>2</sub> after 2, 6 and 10 h. After 24 h, the p-JNK levels were enhanced at all tested CdCl<sub>2</sub> concentrations with the exception of 200 µM in which case the cells likely were dead. The results of other methods (i.e. measurements of MMP, caspase activity, and DNA condensation) provided no relevant findings elucidating any mechanism likely participating in the detected increased intracellular dehydrogenase activity. The significant disappearance of MMP together with increased nuclear condensation were always found at late time periods but never during periods with the detected increased dehydrogenase activity. The detection of caspase 3 activity showed no significant differences for any treatment in comparison to control cells.

Our results proved the presence of increased ROS production after CdCl<sub>2</sub> treatment as reported in other studies (Wang *et al.* 2013, Wilmes *et al.* 2011, Zahir *et al.* 1999). Although Cd toxicity is linked with a number of subcellular toxic mechanisms, recent studies have reported that the induction of oxidative stress could play an essential role in Cd-induced toxic effect (Kim and Sharma 2006, Thévenod and Friedmann 1999, Tobwala *et al.* 2014, Zahir *et al.* 1999). According to our findings on GSH depletion after Cd treatment, the antioxidants play an essential role in the protection against Cd toxicity (López *et al.* 2006, Zahir *et al.* 1999). After cellular oxidative stress becomes heightened, activation of JNK kinases occurs (Fongsupa *et al.* 2015) and the subsequent cellular and mitochondrial signaling can lead to apoptotic or necrotic cell death (Chambers and LoGrasso 2011). The toxic effect of CdCl<sub>2</sub> leading to apoptosis or necrosis in kidney cells has been described in other studies (Kondo *et al.* 2012, López *et al.* 2006), but the surprising finding presented here on transient increase in intracellular dehydrogenase activity has not been described in any of those reports. Our results proved

a significant relationship between increased dehydrogenase activity followed by stimulated ROS production after treatment with CdCl<sub>2</sub> across a wide range of concentrations. It follows that Cd is able significantly to influence the function of mitochondria, as these constitute the main cellular sources of dehydrogenase activity and ROS production in cells. This finding could be supported by a recent study reporting an induction of mitochondrial permeability in rat mitochondria (Belyaeva *et al.* 2011). As a consequence of mitochondrial permeabilization, apoptotic-inducing factor (AIF) is released from the intermembrane space of mitochondria to the cytosol and caspase-independent apoptosis can thus be induced (Mao

*et al.* 2007). In addition, AIF induces the expression and activation of other pro-apoptotic proteins, including caspases (Huang *et al.* 2017). A report has also provided evidence that Cd can induce a mitogen potential followed by increased cell proliferation (Templeton and Liu 2010). This phenomenon is brought about by interaction of Cd with mitogen-activated protein kinases (e.g. JNK and ERK), controlling cell growth, differentiation, and apoptosis (Filipič 2012, Levinthal and DeFranco 2005). Low concentrations of Cd can activate JNK transiently, but high doses of Cd induce a permanent JNK activation (Chuang *et al.* 2000). The activation of JNK is caused by increased ROS levels (Kamata *et al.* 2005). These reports could provide some justification for our finding of increased cell dehydrogenase activity, as this may be caused by a change of signaling between mitochondria and cell nucleus that likely is linked with increased ROS production. Another line of reasoning in support of our data on increased intracellular dehydrogenase activity may be related to a direct role of ROS. Some reports have indicated that increased ROS levels during oxidative

stress could induce an increase in intracellular dehydrogenase activity or mitochondrial function (Chen *et al.* 2006, Lee *et al.* 2000). Other reports come up with the statement that cadmium ions affect the role of free radicals and reactive species that are formed during oxidative stress (Ďuračková *et al.* 2010).

In conclusion, we found that CdCl<sub>2</sub> at high concentrations (i.e. 25-200 μM CdCl<sub>2</sub>) are able to induce a transient increase of cell viability in human kidney cells preceding cell death. That change in intracellular dehydrogenase activity is followed by transient increased ROS production leading to GSH depletion and other processes progressing to cell death. A number of questions remain, however, about causation and a possible role for this phenomenon associated with CdCl<sub>2</sub>. Thus, additional work is needed to elucidate this subject further, especially relating to changes in activity of the mitochondrial respiratory chain.

### Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

### References

- BELYAEVA EA, KOROTKOV SM, SARIS NE: In vitro modulation of heavy metal-induced rat liver mitochondria dysfunction: a comparison of copper and mercury with cadmium. *J Trace Elem Med Biol* **25** (Suppl 1): S63-S73, 2011.
- BONHAM RT, FINE MR, POLLOCK FM, SHELDEN EA: Hsp27, Hsp70, and metallothionein in MDCK and LLC-PK1 renal epithelial cells: effects of prolonged exposure to cadmium. *Toxicol Appl Pharmacol* **191**: 63-73, 2003.
- ČAPEK J, HAUSCHKE M, BRŮČKOVÁ L, ROUŠAR T: Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* **88**: 40-45, 2017.
- CHAMBERS JW, LOGRASSO PV: Mitochondrial c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling initiates physiological changes resulting in amplification of reactive oxygen species generation. *J Biol Chem* **286**: 16052-16062, 2011.
- CHEN Q, THORPE J, DOHMEN JR, LI F, KELLER JN: Ump1 extends yeast lifespan and enhances viability during oxidative stress: Central role for the proteasome? *Free Radic Biol Med* **40**: 120-126, 2006.
- CHUANG SM, WANG IC, YANG JL: Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium. *Carcinogenesis* **21**: 1423-1432, 2000.
- ĎURAČKOVÁ Z: Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* **59**: 459-469, 2010.
- FAHIM MA, NEMMAR A, DHANASEKARAN S, SINGH S, SHAFIULLAH M, YASIN J, ZIA S, HASAN MY: Acute cadmium exposure causes systemic and thromboembolic events in mice. *Physiol Res* **61**: 73-80, 2012.
- FILIPÍČ M: Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutat Res* **733**: 69-77, 2012.
- FONGSUPA S, SOODVILAI S, MUANPRASAT C, CHATSUDTHIPONG V, SOODVILAI S: Activation of liver X receptors inhibits cadmium-induced apoptosis of human renal proximal tubular cells. *Toxicol Lett* **236**: 145-153, 2015.
- FOTAKIS G, TIMBRELL JA: In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* **160**: 171-177, 2006.

- FUJIKI K, INAMURA H, MATSUOKA M: PI3K signaling mediates diverse regulation of ATF4 expression for the survival of HK-2 cells exposed to cadmium. *Arch Toxicol* **88**: 403-414, 2013.
- GENNARI A, CORTESE E, BOVERI M, CASADO J, PRIETO P: Sensitive endpoints for evaluating cadmium-induced acute toxicity in LLC-PK1 cells. *Toxicology* **183**: 211-220, 2003.
- GUNNESS P, ALEKSA K, KOSUGE K, ITO S, KOREN G: Comparison of the novel HK-2 human renal proximal tubular cell line with the standard LLC-PK1 cell line in studying drug-induced nephrotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* **88**: 448-455, 2010.
- HAUSCHKE M, ROUŠAROVÁ E, FLÍDR P, ČAPEK J, LIBRA A, ROUŠAR T: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin production negatively correlates with HK-2 cell impairment: Evaluation of NGAL as a marker of toxicity in HK-2 cells. *Toxicol In Vitro* **39**: 52-57, 2017.
- HUANG M, SU L, YANG L, ZHU L, LIU Z, DUAN R: Effect of exogenous TGF- $\beta$ 1 on the cadmium-induced nephrotoxicity by inhibiting apoptosis of proximal tubular cells through PI3K-AKT-mTOR signaling pathway. *Chem Biol Interact* **269**: 25-32, 2017.
- IWATSUKI M, INAGEDA K, MATSUOKA M: Cadmium induces phosphorylation and stabilization of c-Fos in HK-2 renal proximal tubular cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **251**: 209-216, 2011.
- KAMATA H, HONDA S, MAEDA S, CHANG L, HIRATA H, KARIN M: Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* **120**: 649-661, 2005.
- KIM J, SHARMA RP: Cadmium-induced apoptosis in murine macrophages is antagonized by antioxidants and caspase inhibitors. *J Toxicol Environ Health A* **69**: 1181-1201, 2006.
- KIM SY, SOHN SJ, WON AJ, KIM HS, MOON A: Identification of noninvasive biomarkers for nephrotoxicity using HK-2 human kidney epithelial cells. *Toxicol Sci* **140**: 247-258, 2014.
- KLAASSEN CD, LIU J, DIWAN BA: Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **238**: 215-220, 2009.
- KOMOIKE Y, INAMURA H, MATSUOKA M: Effects of salubrinal on cadmium-induced apoptosis in HK-2 human renal proximal tubular cells. *Arch Toxicol* **86**: 37-44, 2011.
- KONDO M, INAMURA H, MATSUMURA K, MATSUOKA M: Cadmium activates extracellular signal-regulated kinase 5 in HK-2 human renal proximal tubular cells. *Biochem Biophys Res Commun* **421**: 490-493, 2012.
- LEE HC, YIN PH, LU CY, CHI CW, WEI YH: Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* **348**: 425-432, 2000.
- LEE JY, TOKUMOTO M, FUJIWARA Y, SATOH M: Involvement of ubiquitin-coding genes in cadmium-induced protein ubiquitination in human proximal tubular cells. *J Toxicol Sci* **40**: 901-908, 2015.
- LEVINTHAL DJ, DEFRANCO DB: Reversible oxidation of ERK-directed protein phosphatases drives oxidative toxicity in neurons. *J Biol Chem* **280**: 5875-5883, 2005.
- LI M, PI H, YANG Z, REITER RJ, XU S, CHEN X, CHEN C, ZHANG L, YANG M, LI Y, GUO P, LI G, TU M, TIAN L, XIE J, HE M, LU Y, ZHONG M, ZHANG Y, YU Z, ZHOU Z: Melatonin antagonizes cadmium-induced neurotoxicity by activating the transcription factor EB-dependent autophagy-lysosome machinery in mouse neuroblastoma cells. *J Pineal Res* **61**: 353-369, 2016.
- LINHARTOVÁ P, GAZO I, SAMPELS S: Combined incubation of cadmium, docosahexaenoic and eicosapentaenoic acid affecting the oxidative stress and antioxidant response in human hepatocytes in vitro. *Physiol Res* **65**: 609-616, 2016.
- LÓPEZ E, ARCE C, OSET-GASQUE MJ, CAÑADAS S, GONZÁLEZ MP: Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture. *Free Radic Biol Med* **40**: 940-951, 2006.
- MADDEN EF, AKKERMAN M, FOWLER BA: A comparison of 60, 70, and 90 kDa stress protein expression in normal rat NRK-52 and human HK-2 kidney cell lines following in vitro exposure to arsenite and cadmium alone or in combination. *J Biochem Mol Toxicol* **16**: 24-32, 2002.
- MAO WP, YE JL, GUAN ZB, ZHAO JM, ZHANG C, ZHANG NN, JIANG P, TIAN T: Cadmium induces apoptosis in human embryonic kidney (HEK) 293 cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria. *Toxicol In Vitro* **21**: 343-354, 2007.



- RIEMSCHEIDER S, HERZBERG M, LEHMANN J: Subtoxic doses of cadmium modulate inflammatory properties of murine RAW 264.7 macrophages. *Biomed Res Int* **2015**: 295303, 2015.
- RYAN MJ, JOHNSON G, KIRK J, FUERSTENBERG SM, ZAGER RA, TOROK-STORB B: HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int* **45**: 48-57, 1994.
- SHRESTHA S, SOMJI S, SENS DA, SLUSSER-NORE A, PATEL DH, SAVAGE E, GARRETT SH: Human renal tubular cells contain CD24/CD133 progenitor cell populations: Implications for tubular regeneration after toxicant induced damage using cadmium as a model. *Toxicol Appl Pharmacol* **331**: 116-129, 2017.
- SIMON BR, WILSON MJ, WICKLIFFE JK: The RPTEC/TERT1 cell line models key renal cell responses to the environmental toxicants, benzo[a]pyrene and cadmium. *Toxicol Rep* **1**: 231-242, 2014.
- SOMJI S, GARRETT SH, SENS MA, SENS DA: The unique N-terminal sequence of metallothionein-3 is required to regulate the choice between apoptotic or necrotic cell death of human proximal tubule cells exposed to Cd+2. *Toxicol Sci* **90**: 369-376, 2006.
- TEMPLETON DM, LIU Y: Multiple roles of cadmium in cell death and survival. *Chem Biol Interact* **188**: 267-275, 2010.
- THÉVENOD F, FRIEDMANN JM: Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induced degradation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *FASEB J* **13**: 1751-1761, 1999.
- TOBWALA S, WANG HJ, CAREY J, BANKS W, ERCAL N: Effects of lead and cadmium on brain endothelial cell survival, monolayer permeability, and crucial oxidative stress markers in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Toxics* **2**: 258-275, 2014.
- VALVERDE M, TREJO C, ROJAS E: Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis* **16**: 265-270, 2001.
- VRBOVÁ M, ROUŠAROVÁ E, BRŮČKOVÁ L, ČESLA P, ROUŠAR T: Characterization of acetaminophen toxicity in human kidney HK-2 cells. *Physiol Res* **65**: 627-635, 2016.
- WANG SS, CHEN L, XIA SK: Cadmium is acutely toxic for murine hepatocytes: effects on intracellular free Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Physiol Res* **56**: 193-201, 2007.
- WANG Y, WU Y, LUO K, LIU Y, ZHOU M, YAN S, SHI H, CAI Y: The protective effects of selenium on cadmium-induced oxidative stress and apoptosis via mitochondria pathway in mice kidney. *Food Chem Toxicol* **58**: 61-67, 2013.
- WILMES A, CREAN D, AYDIN S, PFALLER W, JENNINGS P, LEONARD MO: Identification and dissection of the Nrf2 mediated oxidative stress pathway in human renal proximal tubule toxicity. *Toxicol In Vitro* **25**: 613-622, 2011.
- ZAHIR AS, THANHTAM TV, KHALEQUZ Z: Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicol Appl Pharmacol* **154**: 256-263, 1999.
- ZHANG L, MU X, FU J, ZHOU Z: In vitro cytotoxicity assay with selected chemicals using human cells to predict target-organ toxicity of liver and kidney. *Toxicol In Vitro* **21**: 734-740, 2007.
- ZIMMERHACKL LB, MOOM F, WIEGELE G, BRANDIS M: Cadmium is more toxic to LLC-PK<sub>1</sub> cells than to MDCK cells acting on the cadherin-catenin complex. *Am J Physiol* **275**: F143-F153, 1998.

## The Effect of Repeated Passaging on the Susceptibility of Human Proximal Tubular HK-2 Cells to Toxic Compounds

Jiří HANDL, Jan ČAPEK, Pavlína MAJTNEROVÁ, Jana BÁČOVÁ, Tomáš ROUŠAR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Pardubice, Czech Republic

Received April 27, 2019

Accepted June 9, 2020

Epub Ahead of Print July 16, 2020

### Summary

The human proximal tubular HK-2 cell line is an immortalized cell line commonly used for studying proximal tubular toxicity. Even as their use is presently increasing, there unfortunately are no studies focused on functional changes in HK-2 cells associated with passaging. The aim of the present study, therefore, was to evaluate the functional stability of HK-2 cells during 13 weeks of continuous passaging after 6 and 24 h of treatment with model nephrotoxic compounds (i.e., acetaminophen, cisplatin, CdCl<sub>2</sub>). Short tandem repeat profile, the doubling time, cell diameter, glutathione concentration, and intracellular dehydrogenase activity were measured in HK-2 cells at each tested passage. The results showed that HK-2 cells exhibit stable morphology, cell size, and cell renewal during passaging. Mean doubling time was determined to be 54 h. On the other hand, we observed a significant effect of passaging on the susceptibility of HK-2 cells to toxic compounds. The largest difference in results was found in both cadmium and cisplatin treated cells across passages. We conclude that the outcomes of scientific studies on HK-2 cells can be affected by the number of passages even after medium-term cultivation and passaging for 13 weeks.

### Key words

HK-2 cells • Nephrotoxicity • Cell passaging • *in vitro* culture • Cell lines

### Corresponding author

Tomáš Roušar, Department of Biological and Biochemical Sciences, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, Studentska 573, 532 10 Pardubice, Czech Republic E-mail: Tomas.Rousar@upce.cz

*In vitro* cell models including primary cell cultures and cell lines are used in cytotoxicity screening (Popelová *et al.* 2018, Tong *et al.* 2017, Xia *et al.* 2013). While working with cell lines, it is necessary to follow basic cultivation techniques and elementary principles. Passage number is one of the important factors that informs about the cell line's age and that is essential for evaluating a cell line's growth integrity (Clynes 1998, Freshney 2005, Kwist *et al.* 2015). It is well established that cell phenotype can change during the process of passaging, and this may affect reproducibility of the results from *in vitro* experiments (Hughes *et al.* 2007, Reeves *et al.* 2018, Vasilevsky *et al.* 2013). Most studies assume that the number of passages in a cell line does not affect its phenotype and therefore the passage number is not mentioned. Some results have shown, however, that some non-cancer cell lines exhibit genetic heterogeneity and instability (Ben-David *et al.* 2018).

There are a number of animal and human cell lines that can be used to assess nephrotoxic properties (Kim 2016, Vrbová *et al.* 2016). The human cell lines are HEK293, IP-15, and HK-2 cells (Graham *et al.* 1977, L'Azou *et al.* 2006, Ryan *et al.* 1994, Vošahlíková and Svoboda 2011). The human proximal tubular HK-2 (Human Kidney-2) cell line is an immortalized cell line. The HK-2 cell line was originally prepared by transduction with human papilloma virus 16 (HPV-16) E6/E7 genes (Ryan *et al.* 1994). HK-2 cells grow in a monolayer and are suitable to studying proximal tubular toxicity of a variety of compounds (Racusen *et al.* 1997). The main advantage of HK-2 cells is that they retain the

basic morphological and functional properties of proximal tubular epithelial cells (Ryan *et al.* 1994). Therefore, HK-2 cells have been used in a number of recent studies focused on estimating proximal tubular injury (Du *et al.* 2010, Gao *et al.* 2013, García-Pastor *et al.* 2019, Schmidt *et al.* 2019, Wu *et al.* 2009, Yang *et al.* 2019b, Yang *et al.* 2019c, Zaza *et al.* 2015).

According to the PubMed database, as many as about 200 studies a year are now published that used HK-2 cells for *in vitro* testing, and that frequency is increasing. Based upon the very recent scientific papers, only limited numbers of authors have reported the numbers of HK-2 cell passages they have used in their studies. Most of those have reported using passages in the ranges of  $\leq 5$  passages (Devocelle *et al.* 2019, Gao *et al.* 2017, Handl *et al.* 2019, Huang *et al.* 2017, Lu *et al.* 2018),  $\leq 20$  passages (Devocelle *et al.* 2019, Han *et al.* 2018, Huang *et al.* 2019, Lee *et al.* 2019b, Lu *et al.* 2018, Vrbová *et al.* 2016, Wang *et al.* 2006), or for even longer periods (Chang and Singh 2019, Wang *et al.* 2006). Meanwhile, a large number of presently existing scientific studies on HK-2 cells have not provided any information at all on the passage number (Amaral *et al.* 2017, Campos *et al.* 2018, Lee *et al.* 2019a, Medina-Navarro *et al.* 2019, Nho *et al.* 2018, Song *et al.* 2018, Yang *et al.* 2019b, Yeh *et al.* 2019). Surprisingly, only one study marginally estimated an effect of the number of passages on the results obtained in HK-2 cells (Lu *et al.* 2018) confirming the occurrence of differences in protein expressions between low (6) and high (18) number of passages. Due to the lack of information on probable functional changes in HK-2 cells during continuous passaging, we report here a study on evaluation of functional stability and susceptibility of HK-2 cells to model toxic compounds after 13 weeks of passaging (i.e., in passages 3–15).

Human kidney (HK-2) cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The cells were cultured according to a published protocol (Handl *et al.* 2019, Hauschke *et al.* 2017) in supplemented Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12 = 1:1) with 5 % (v/v) fetal bovine serum, 1 mM pyruvate, 10  $\mu\text{g/ml}$  insulin, 5.5  $\mu\text{g/ml}$  transferrin, 5 ng/ml sodium selenite, 50  $\mu\text{g/ml}$  penicillin, 50  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin, and 5 ng/ml epidermal growth factor. The cells were removed by adding trypsin–EDTA and passaged when they reached 75–85 % confluence. After every 7 days, cells were passaged, counted, and then the optimal amount ( $4 \times 10^5$  cells) was seeded into

10 ml of cultivation medium on a new 75 cm<sup>2</sup> culture vessel. All experiments were conducted using the HK-2 cells between passages 3 and 15. The HK-2 cells were tested for mycoplasma contamination using the MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza). All cells used in the experiments were mycoplasma free.

We analyzed functional parameters of the cells during passaging, i.e. short tandem repeat analysis, cell diameter and doubling time. Short tandem repeat (STR) analysis (i.e., DNA fingerprinting) was used for HK-2 cell line authentication in passages 3, 9, and 15 using a commercial kit (Generi Biotech a.g., Czech Republic). STR analysis was conducted by Generi Biotech, Ltd. (Czech Republic). We used seventeen selected autosomal polymorphisms (CSF1PO, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX, and vWA) and amelogenin to compare the STR profile with established STR databases. Mean diameter of the HK-2 cells was evaluated using the CASY model TT cell counter and analyzer (Roche, Germany). Doubling time (i.e., the time needed to double the cell population) was calculated from the number of seeded cells, number of viable cells, and time elapsed from cell seeding into the culture vessel until their passaging and counting.

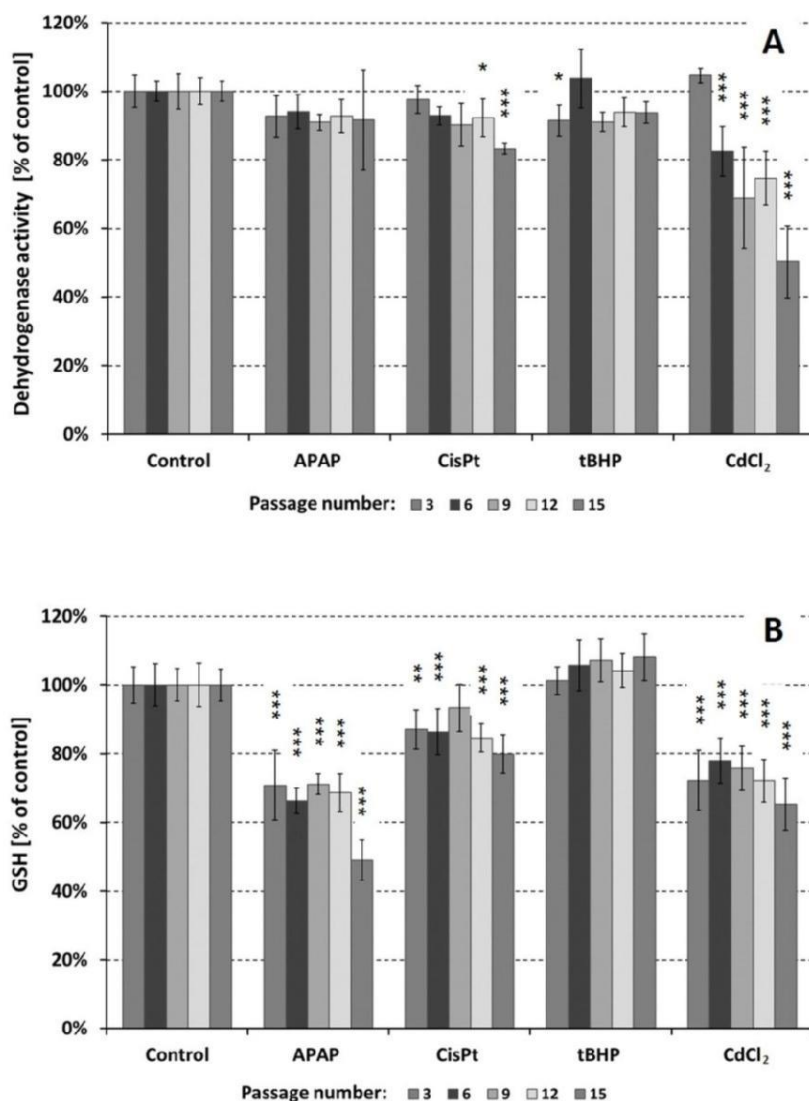
HK-2 cells were seeded into 96-well plates at density  $3 \times 10^4$  cells/well in 100  $\mu\text{l}$  of culture medium. After 24 h, to induce cell impairment, the HK-2 cells were treated with 10 mM acetaminophen, 100  $\mu\text{M}$  cisplatin, 50  $\mu\text{M}$  *tert*-butylhydroperoxide, and 100  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub>. Cells were treated for 6 and 24 h. The WST-1 test to evaluate dehydrogenase activity (Roche, Germany) and glutathione assay were used for characterizing cell damage. After treatment, the WST-1 reagent was added to the cultured cells (1:10 final dilution) (Hauschke *et al.* 2017). The cells were incubated in a gassed atmosphere (5 % CO<sub>2</sub>) for 60 min and the absorbance change (0–1 h) was measured spectrophotometrically at wavelength 440 nm using a Tecan Infinite M200 plate reader (Tecan, Austria) and expressed as the change of absorbance during 1 h and also relative to controls in percentage terms. Glutathione (GSH) levels were measured using an optimized bimane assay (Čapek *et al.* 2017). After 6 or 24 h of incubation, 20  $\mu\text{l}$  of the bimane solution was added to cells and the measurement was started. The fluorescence (Ex/Em = 394/490 nm) was measured for 20 min using a Tecan Infinite M200 fluorescence reader incubated at 37 °C. The fluorescence was expressed as

the slope of change in fluorescence over time. The GSH levels were expressed as percentages relative to those in control cells (=100 %). All experiments were repeated two or three times independently over a course of 8 months. All values were measured at least in quadruplicate during an experiment. The results on cell viability and GSH levels are expressed as means  $\pm$  SD (OriginPro 9.0.0, USA). The effect of number of passages and toxic compounds on the cell impairment was tested using Two-way ANOVA ( $p = 0.05$ , OriginPro 9.0.0, USA).

The STR analysis proved 100 % conformity of HK-2 cells with the reference standard in all tested passages and also confirmed no shift of STR sequences in the HK-2 cells. The diameters of viable HK-2 cells ranged 17.4–18.6  $\mu\text{m}$ . The mean diameter of HK-2 cells calculated across all passages was 18.2  $\mu\text{m}$ . Doubling

time ranged between 47.3 h and 61.7 h. The mean doubling time across all passages was 53.7 h, and we observed no significant relationship between doubling time and cell passage number. The doubling time is in accordance with characteristics for the HK-2 cell line presented by ATCC.

In addition to estimation of the functional parameters in untreated HK-2 cells, we estimated the effect of continuous passaging on the susceptibility of HK-2 cells to model nephrotoxic compounds. To induce the toxicity, we used toxic substances differing in their mechanisms of toxicity, including *tert*-butylhydroperoxide (tBHP) to induce oxidative stress, two drugs, acetaminophen (APAP) and cisplatin (CisPt), and  $\text{CdCl}_2$  as a heavy metal. Tested concentrations of the compounds were chosen according to previous



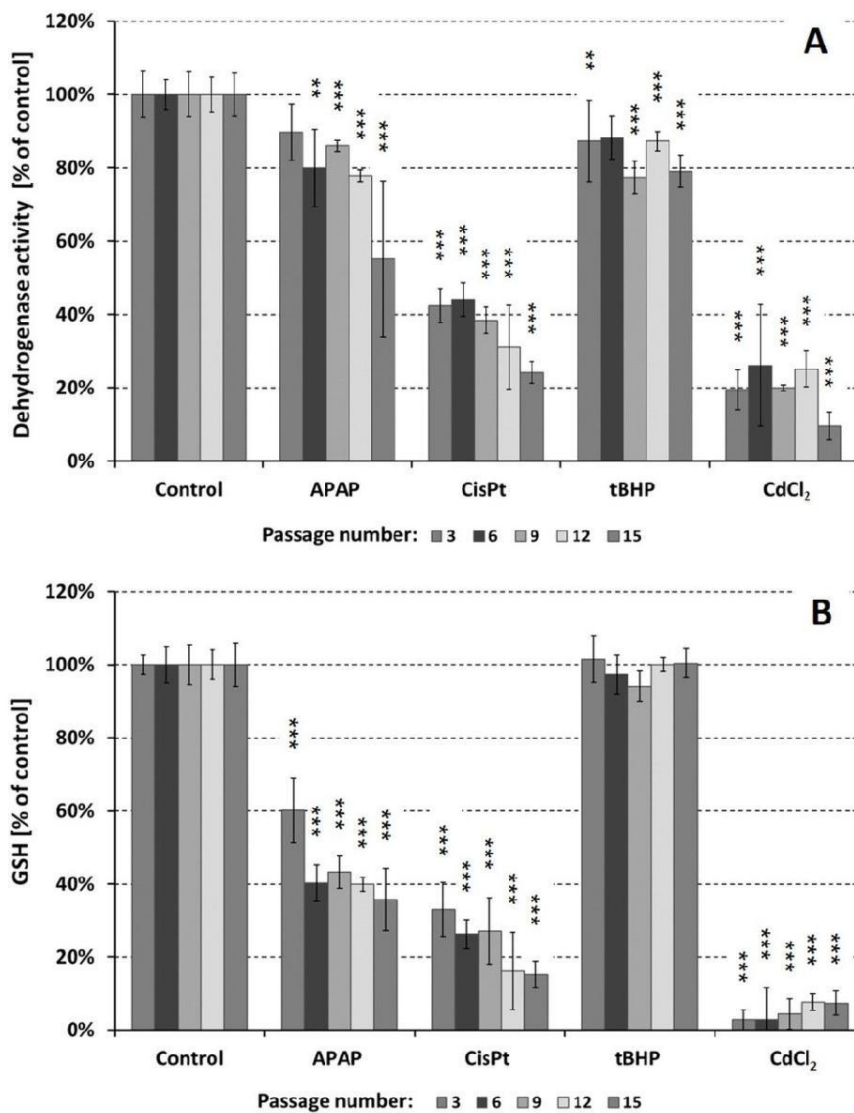
**Fig. 1.** Estimation of cell impairment in HK-2 cells after 6 h of treatment during repeated passaging Acetaminophen (APAP, 10 mM), cisplatin (CisPt, 100  $\mu\text{M}$ ), *tert*-butylhydroperoxide (tBHP, 50  $\mu\text{M}$ ), and  $\text{CdCl}_2$  (Cd, 100  $\mu\text{M}$ ) **A)** Intracellular dehydrogenase activity in HK-2 cells in passages 3–15 was determined using the WST-1 test **B)** Intracellular GSH levels of HK-2 cells in each of passages 3–15 were determined using monochlorobimane assay Results are expressed as means  $\pm$  SD (control = 100 %, n = 8–12, 3 independent experiments) One-way ANOVA with post-hoc test were used for comparison of means with control cells at appropriate number of passages (\*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

toxicological studies relating to cisplatin (Genc *et al.* 2014, Huang *et al.* 2015, Kim *et al.* 2014), cadmium (Fujiki *et al.* 2013, Handl *et al.* 2019, Kim *et al.* 2014), acetaminophen (Wu *et al.* 2009), and tBHP (Hauschke *et al.* 2017).

HK-2 cells in passages 3, 6, 9, 12 and 15 were treated with toxic compounds for 6 and 24 h. Indeed, we determined the significant effect of a number of passages on decrease of dehydrogenase activity and the extent of glutathione depletion according to Two-way ANOVA test after 6 and 24 h. After 6 h of treatment, the intracellular dehydrogenase activity showed significant decrease in comparison with control cells of the corresponding passage number in toxic compounds, especially in Cd treated cells (Fig. 1A). Based on the WST-1 test results, we found also a significant relation of

the number of passage and the extent of decreasing cell viability in HK-2 cells treated with a toxic compound ( $p < 0.001$ ). In addition to the glutathione reduction caused by 10 mM APAP, 100  $\mu$ M CisPt, and 100  $\mu$ M CdCl<sub>2</sub> in comparison with controls of the corresponding passage number, the effect of passaging on the extent of glutathione depletion in toxic compounds was found ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1B).

After 24 h of incubation, deepening of toxic acting of tested compounds was found. In addition, the outcomes of the WST-1 test ( $p < 0.001$ ) and glutathione assay ( $p < 0.001$ ) also showed a significant effect of the number of passage on the estimated level of toxicity. In Fig. 2AB, the increasing cell impairment was especially found in CisPt and APAP treated HK-2 cells.



**Fig. 2.** Estimation of cell impairment in HK-2 cells after 24 h of treatment during repeated passaging. A) Intracellular dehydrogenase activity in HK-2 cells in each of passages 3–15 was determined using the WST-1 test. B) Intracellular GSH levels of HK-2 cells in passages 3–15 were determined using monochlorobimane assay. Results are expressed as means  $\pm$  SD (control = 100%,  $n = 8–12$ , 3 independent experiments). One-way ANOVA with post-hoc test were used for comparison of means with control cells at appropriate number of passages (\*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

According to determined decrease of cell viability and glutathione depletion in HK-2 cells, the extent of cell damage reported in present study is fully comparable with the outcomes and toxin concentrations reported in a number of other studies on APAP (Ruan *et al.* 2019, Zhang *et al.* 2007), CisPt (Oh *et al.* 2017, Yang *et al.* 2019a), and CdCl<sub>2</sub> (Fujiki *et al.* 2019, Ge *et al.* 2018, Chou *et al.* 2019, Kim *et al.* 2014). On the other hand, our findings on significance of the relation of cell damage and number passage is not allowed to discuss with comparable reports on the HK-2 cell line. Some studies focusing on this issue have shown that biological characteristics can be changed not only in stem cell cultures (Kwist *et al.* 2015) but also in transfected cell lines (O'Driscoll *et al.* 2006) and definitely in tumor cell lines (Bušek *et al.* 2008, Jin *et al.* 2017, Roberts *et al.*

2018, Zeng *et al.* 2018) which outcomes can be supported by our study.

In conclusion, we report here that HK-2 cell line did not possess stable susceptibility to model toxic compounds during continuous passaging for 13 weeks. Based on presented results, we conclude that the outcomes of experiments obtained using the HK-2 cell line passaged are supposed to be considered with regard to the number of passages.

### Acknowledgement

The study was supported by the grant of the Czech Science Foundation No 19-11867S

### Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

### References

- AMARAL M, GIRARD M, ÁLVAREZ R, PATON A, PATON J, REPETTO H, SACERDOTI F, IBARRA C: Ouabain protects human renal cells against the cytotoxic effects of shiga toxin type 2 and subtilase cytotoxin. *Toxins* 9: 1-14, 2017. <https://doi.org/10.3390/toxins9070226>
- BEN-DAVID U, SIRANOSIAN B, HA G, TANG H, OREN Y, HINOHARA K, STRATHDEE CA, DEMPSTER J, LYONS NJ, BURNS R, NAG A, KUGENER G, CIMINI B, TSVETKOV P, MARUVKA YE, O'ROURKE R, GARRITY A, TUBELLI AA, BANDOPADHAYAY P, TSHERNIAK A, VAZQUEZ F, WONG B, BIRGER C, GHANDI M, THORNER AR, BITTKER JA, MEYERSON M, GETZ G, BEROUKHIM R, GOLUB TR: Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature* 560: 325-330, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0409-3>
- BUŠEK P, STREMEŇOVÁ J, KŘEPELA E, ŠEDO A: Modulation of substance P signaling by dipeptidyl peptidase-IV enzymatic activity in human glioma cell lines. *Physiol Res* 57: 443-449, 2008.
- CAMPOS MAA, DE ALMEIDA LA, GROSSI MF, TAGLIATI CA: *In vitro* evaluation of biomarkers of nephrotoxicity through gene expression using gentamicin. *J Biochem Mol Toxicol* 32: e22189, 2018. <https://doi.org/10.1002/jbt.22189>
- CLYNES M: Animal cell culture techniques. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co KG, New York 618 pp, 1998. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-80412-0>
- ČAPEK J, HAUSCHKE M, BRŮČKOVÁ L, ROUŠAR T: Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* 88: 40-45, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2017.06.001>
- DEVOCELLE A, LECRU L, FRANÇOIS H, DESTERKE C, GALLERNE C, EID P, ESTELLE O, AZZARONE B, GIRON-MICHEL J: Inhibition of TGF-β1 signaling by IL-15: A novel role for IL-15 in the control of renal epithelial-mesenchymal transition: IL-15 counteracts TGF-β1-induced EMT in renal fibrosis. *Int J Cell Biol* 2019: 1-15, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9151394>
- DU B, MA L-M, HUANG M-B, ZHOU H, HUANG H-L, SHAO P, CHEN Y-Q, QU L-H: High glucose down-regulates miR-29a to increase collagen IV production in HK-2 cells. *FEBS Lett* 584: 811-816, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.053>
- FRESHNEY RI: Culture of animal cells: A manual of basic techniques. John Wiley & Sons 2005, pp 672. <https://doi.org/10.1002/9780471747598>
- FUJIKI K, INAMURA H, MATSUOKA M: PI3K signaling mediates diverse regulation of ATF4 expression for the survival of HK-2 cells exposed to cadmium. *Arch Toxicol* 88: 403-414, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1129-y>

- FUJIKI K, INAMURA H, SUGAYA T, MATSUOKA M: Blockade of ALK4/5 signaling suppresses cadmium- and erastin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells via distinct signaling mechanisms. *Cell Death Differ* 26: 2371-2385, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41418-019-0307-8>
- GAO S, CHEN T, CHOI M-Y, LIANG Y, XUE J, WONG Y-S: Cyanidin reverses cisplatin-induced apoptosis in HK-2 proximal tubular cells through inhibition of ROS-mediated DNA damage and modulation of the ERK and AKT pathways. *Cancer Lett* 333: 36-46, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.12.029>
- GAO Z, ZHU W, ZHANG H, LI Z, CUI T: The influence of fasudil on renal proximal tubular cell epithelial-mesenchymal transition induced by parathormone. *Ren Fail* 39: 575-581, 2017. <https://doi.org/10.1080/0886022X.2017.1349677>
- GARCÍA-PASTOR C, BLÁZQUEZ-SERRA R, BOSH RJ, LUCIO-CAZAÑA FJ, FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ AB: Apoptosis and cell proliferation in proximal tubular cells exposed to apoptotic bodies Novel pathophysiological implications in cisplatin-induced renal injury. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1865: 2504-2515, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.06.008>
- GE Z, DIAO H, JI X, LIU Q, ZHANG X, WU Q: Gap junctional intercellular communication and endoplasmic reticulum stress regulate chronic cadmium exposure induced apoptosis in HK-2 cells. *Toxicol Lett* 288: 35-43, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.02.013>
- GENC G, KILINC V, BEDIR A, OZKAYA O: Effect of creatine and pioglitazone on HK-2 cell line cisplatin nephrotoxicity. *Ren Fail* 36: 1104-1107, 2014. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2014.926755>
- GRAHAM FL, SMILEY J, RUSSELL WC, NAIRN R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-72, 1977. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- HAN M, LI Y, WEN D, LIU M, MA Y, CONG B: NGAL protects against endotoxin-induced renal tubular cell damage by suppressing apoptosis. *BMC Nephrol* 19: 1-10, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12882-018-0977-3>
- HANDL J, ČAPEK J, MAJTNEROVÁ P, PETIRA F, HAUSCHKE M, ROUŠAROVÁ E, ROUŠAR T: Transient increase in cellular dehydrogenase activity after cadmium treatment precedes enhanced production of reactive oxygen species in human proximal tubular kidney cells. *Physiol Res* 68: 481-490, 2019. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934121>
- HAUSCHKE M, ROUŠAROVÁ E, FLÍDR P, ČAPEK J, LIBRA A, ROUŠAR T: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin production negatively correlates with HK-2 cell impairment: Evaluation of NGAL as a marker of toxicity in HK-2 cells. *Toxicol In Vitro* 39: 52-57, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.11.012>
- HUANG F, ZHAO Y, WANG Q, HILLEBRANDS J-L, BORN JVD, JI L, AN T, QIN G: Dapagliflozin attenuates renal tubulointerstitial fibrosis associated with type 1 diabetes by regulating STAT1/TGFβ1 signaling. *Front Endocrinol* 10: 1-13, 2019. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00441>
- HUANG H, ZHENG F, DONG X, WU F, WU T, LI H: Allicin inhibits tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation under high glucose conditions in vitro. *Exp Ther Med* 13: 254-262, 2017. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3913>
- HUANG JX, KAESLIN G, RANALL MV, BLASKOVICH MA, BECKER B, BUTLER MS, LITTLE MH, LASH LH, COOPER MA: Evaluation of biomarkers for in vitro prediction of drug-induced nephrotoxicity: comparison of HK-2, immortalized human proximal tubule epithelial, and primary cultures of human proximal tubular cells. *Pharmacol Res Perspect* 3: 1-14, 2015. <https://doi.org/10.1002/prp2.148>
- HUGHES P, MARSHALL D, REID Y, PARKES H, GELBER C: The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques* 43: 575-584, 2007. <https://doi.org/10.2144/000112598>
- CHANG Y-W, SINGH KP: Nicotine-induced oxidative stress contributes to EMT and stemness during neoplastic transformation through epigenetic modifications in human kidney epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 374: 65-76, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.04.023>
- CHOU X, DING F, ZHANG X, DING X, GAO H, WU Q: Sirtuin-1 ameliorates cadmium-induced endoplasmic reticulum stress and pyroptosis through XBP-1s deacetylation in human renal tubular epithelial cells. *Arch Toxicol* 93: 965-986, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02415-8>
- JIN W, PENINGTON CJ, MCCUE SW, SIMPSON MJ: A computational modelling framework to quantify the effects of passaging cell lines. *Plos One* 12: 1-16, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181941>
- KIM J: Poly(ADP-Ribose) polymerase activation induces high mobility group box 1 release from proximal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Physiol Res* 65: 333-340, 2016. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932948>

- KIM SY, SOHN S-J, WON AJ, KIM HS, MOON A: Identification of noninvasive biomarkers for nephrotoxicity using HK-2 human kidney epithelial cells. *Toxicol Sci* 140: 247-258, 2014. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu096>
- KWIST K, BRIDGES WC, BURG KJL: The effect of cell passage number on osteogenic and adipogenic characteristics of D1 cells. *Cytotechnology* 68: 1661-1667, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9883-8>
- L'AZOU B, DUBUS I, OHAYON-COURTÈS C, CAMBAR J: Human glomerular mesangial IP15 cell line as a suitable model for in vitro cadmium cytotoxicity studies. *Cell Biol Toxicol* 23: 267-278, 2006. <https://doi.org/10.1007/s10565-006-0888-0>
- LEE CP, NITHIYANANTHAM S, HSU HT, YEH KT, KUO TM, KO YC: ALPK1 regulates streptozotocin induced nephropathy through CCL2 and CCL5 expressions. *J Cell Mol Med* 23: 7699-7708, 2019a. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14643>
- LEE YP, CHO Y, KIM EJ, LEE H, CHOI HY, WANG HJ, KANG ES, KIM YS, KIM MS, KIM BS: Reduced expression of pyruvate kinase in kidney proximal tubule cells is a potential mechanism of pravastatin altered glucose metabolism. *Sci Rep* 9: 1-8, 2019b. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39461-2>
- LU Y-T, MA X-L, XU Y-H, HU J, WANG F, QIN W-Y, XIONG W-Y: A fluorescent glucose transport assay for screening SGLT2 inhibitors in endogenous SGLT2-expressing HK-2 cells. *Nat Prod Bioprospect* 9: 13-21, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13659-018-0188-4>
- MEDINA-NAVARRO R, TORRES-RAMOS YD, GUZMÁN-GRENFELL AM, DÍAZ-FLORES M, LEÓN-REYES G, HICKS G JJ: Lysosomal dysfunction induced by changes in albumin's tertiary structure: Potential key factor in protein toxicity during diabetic nephropathy. *Life Sci* 230: 197-207, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.069>
- NHO J-H, JUNG H-K, LEE M-J, JANG J-H, SIM M-O, JEONG D-E, CHO H-W, KIM J-C: Beneficial effects of cynaroside on cisplatin-induced kidney injury in vitro and in vivo. *Toxicol Res* 34: 133-141, 2018. <https://doi.org/10.5487/TR.2018.34.2.133>
- O'DRISCOLL L, GAMMELL P, MCKIERNAN E, RYAN E, JEPPESEN PB, RANI S, CLYNES M: Phenotypic and global gene expression profile changes between low passage and high passage MIN-6 cells. *J Endocrinol* 191: 665-676, 2006. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06894>
- OH S-M, PARK G, LEE SH, SEO C-S, SHIN H-K, OH D-S: Assessing the recovery from prerenal and renal acute kidney injury after treatment with single herbal medicine via activity of the biomarkers HMGB1, NGAL and KIM-1 in kidney proximal tubular cells treated by cisplatin with different doses and exposure times. *BMC Complement Altern Med* 17: 1-9, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2055-y>
- POPELOVÁ A, KÁKONOVÁ A, HRUBÁ L, KUNEŠ J, MALETÍNSKÁ L, ŽELEZNÁ B: Potential neuroprotective and anti-apoptotic properties of a long-lasting stable analog of ghrelin: an in vitro study using SH-SY5Y cells. *Physiol Res* 67: 339-346, 2018. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933761>
- RACUSEN LC, MONTEIL C, SGRIGNOLI A, LUCSKAY M, MAROUILLAT S, RHIM JGS, MORIN J-P: Cell lines with extended in vitro growth potential from human renal proximal tubule: Characterization, response to inducers, and comparison with established cell lines. *J Lab Clin Med* 129: 318-329, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(97\)90180-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(97)90180-3)
- REEVES SR, BARROW KA, WHITE MP, RICH LM, NAUSHAB M, DEBLEY JS: Stability of gene expression by primary bronchial epithelial cells over increasing passage number. *BMC Pulmonar Med* 18: 1-11, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12890-018-0652-2>
- ROBERTS DD, TACIAK B, BIAŁASEK M, BRANIEWSKA A, SAS Z, SAWICKA P, KIRAGA Ł, RYGIEL T, KRÓL M: Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *Plos One* 13: e0198943, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198943>
- RUAN H, WANG L, WANG J, SUN H, HE X, LI W, ZHANG J: Sika deer antler protein against acetaminophen-induced oxidative stress and apoptosis in HK-2 cells via activating Nrf2/keap1/HO-1 pathway. *J Food Biochem* 00: e13067, 2019. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13067>
- RYAN MJ, JOHNSON G, KIRK J, FUERSTENBERG SM, ZAGER RA, TOROK-STORB B: HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int* 45: 48-57, 1994. <https://doi.org/10.1038/ki.1994.6>
- SCHMIDT HHHW, CHO S, YU S-L, KANG J, JEONG BY, LEE HY, PARK CG, YU Y-B, JIN D-C, HWANG W-M, YUN S-R, SONG HS, PARK MH, YOON S-H: NADPH oxidase 4 mediates TGF-β1/Smad signaling pathway induced acute kidney injury in hypoxia. *Plos One* 14: e0219483, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219483>



- SONG M-F, YANG Y, YI Z-W, ZHANG Z-Q, SHEN X-D, HU G-H, ZHU Y-F: Sema 3A as a biomarker of the activated mTOR pathway during hexavalent chromium-induced acute kidney injury. *Toxicol Lett* 299: 226-235, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.09.005>
- TONG Z-B, HOGBERG H, KUO D, SAKAMURU S, XIA M, SMIRNOVA L, HARTUNG T, GERHOLD D: Characterization of three human cell line models for high-throughput neuronal cytotoxicity screening. *J Appl Toxicol* 37: 167-180, 2017. <https://doi.org/10.1002/jat.3334>
- VASILEVSKY NA, BRUSH MH, PADDOCK H, PONTING L, TRIPATHY SJ, LARocca GM, HAENDEL MA: On the reproducibility of science: unique identification of research resources in the biomedical literature. *Peer J* 1: e148, 2013. <https://doi.org/10.7717/peerj.148>
- VOŠAHLÍKOVÁ M, SVOBODA P: The influence of monovalent cations on trimeric G protein Gi1 $\alpha$  activity in HEK293 cells stably expressing DOR-Gi1 $\alpha$  (Cys351-Ile351) fusion protein. *Physiol Res* 60: 541-547, 2011. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932096>
- VRBOVÁ M, ROUŠAROVÁ E, BRŮČKOVÁ L, ČESLA P, ROUŠAR T: Characterization of acetaminophen toxicity in human kidney HK-2 cells. *Physiol Res* 65: 627-635, 2016. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933158>
- WANG Q, LU Y, YUAN M, DARLING IM, REPASKY EA, MORRIS ME: Characterization of monocarboxylate transport in human kidney HK-2. *Cells Mol Pharm* 3: 675-685, 2006. <https://doi.org/10.1021/mp060037b>
- WU Y, CONNORS D, BARBER L, JAYACHANDRA S, HANUMEGOWDA UM, ADAMS SP: Multiplexed assay panel of cytotoxicity in HK-2 cells for detection of renal proximal tubule injury potential of compounds. *Toxicol in Vitro* 23: 1170-1178, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.06.003>
- XIA T, HAMILTON RF, BONNER JC, CRANDALL ED, ELDER A, FAZLOLLAHI F, GIRTSMAN TA, KIM K, MITRA S, NTIM SA, ORR G, TAGMOUNT M, TAYLOR AJ, TELESca D, TOLIC A, VULPE CD, WALKER AJ, WANG X, WITZMANN FA, WU N, XIE Y, ZINK JI, NEL A, HOLIAN A: Interlaboratory evaluation of in vitro cytotoxicity and inflammatory responses to engineered nanomaterials: The NIEHS nano GO consortium. *Environ Health Perspect* 121: 683-690, 2013. <https://doi.org/10.1289/ehp.1306561>
- YANG A, LIU F, GUAN B, LUO Z, LIN J, FANG W, LIU L, ZUO W: p53 induces miR-199a-3p to suppress mechanistic target of rapamycin activation in cisplatin-induced acute kidney injury. *J Cell Biochem* 120: 17625-17634, 2019a. <https://doi.org/10.1002/jcb.29030>
- YANG G, MA H, WU Y, ZHOU B, ZHANG C, CHAI C, CAO Z: Activation of TRPC6 channels contributes to (+)-conocarpan-induced apoptotic cell death in HK-2 cells. *Food Chem Toxicol* 129: 281-290, 2019b. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.061>
- YANG K-J, KIM JH, CHANG YK, PARK CW, KIM SY, HONG YA: Inhibition of xanthine oxidoreductase protects against contrast-induced renal tubular injury by activating adenosine monophosphate-activated protein kinase. *Free Radic Biol Med* 145: 209-220, 2019c. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.027>
- YEH IJ, WANG T-Y, LIN J-C, LIN T-J, CHANG J-S, YEN M-C, LIU Y-H, WU P-L, CHEN F-W, SHIH Y-L, PENG C-Y: Optimal regimen of n-acetylcysteine on chromium-induced renal cell damage. *Metabolites* 9: 172, 2019. <https://doi.org/10.3390/metabo9090172>
- ZAZA G, MASOLA V, GRANATA S, BELLIN G, GASSA DA, ONISTO M, GAMBARO G, LUPO A: Sulodexide alone or in combination with low doses of everolimus inhibits the hypoxia-mediated epithelial to mesenchymal transition in human renal proximal tubular cells. *J Nephrol* 28: 431-440, 2015. <https://doi.org/10.1007/s40620-015-0216-y>
- ZENG Y, WANG X, WANG J, YI R, LONG H, ZHOU M, LUO Q, ZHAI Z, SONG Y, QI S: The tumorigenicity of glioblastoma cell line U87MG decreased during serial in vitro passage. *Cell Mol Neurobiol* 38: 1245-1252, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0592-7>
- ZHANG L, MU X, FU J, ZHOU Z: In vitro cytotoxicity assay with selected chemicals using human cells to predict target-organ toxicity of liver and kidney. *Toxicol In Vitro* 21: 734-740, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.01.013>