

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Judita Pallová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Hepatotoxicita těžkých kovů
Bakalářská práce

2023

Judita Pallová

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Hepatotoxicity Of Heavy Metals
Bachelor Thesis

2023

Judita Pallová

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Judita Pallová**
Osobní číslo: **C20384**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Hepatotoxicita těžkých kovů**
Téma práce anglicky: **Hepatotoxicity Of Heavy Metals**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Bakalářskou práci na téma hepatotoxicita těžkých kovů zpracujte na základě literární rešerše. V úvodní části práce definujte skupinu těžkých kovů a zaměřte se na charakterizaci jejich hepatotoxického působení.
2. V hlavní části bakalářské práce se věnujte popisu a shrnutí mechanismů hepatotoxicity těžkých kovů s důrazem na toxicitu kadmia. Jedním z hlavních cílů práce by mělo být uvedení výčtu buněčných kultur, které jsou pro studium hepatotoxicity využívány v rámci *in vitro* testování. Zaměřte se zejména na nejčastěji využívané buněčné kultury a ty podrobněji charakterizujte. Na závěr shrňte aktuální studie, které se hepatotoxicitou těžkých kovů *in vitro* zabývají.
3. Pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce čerpejte z odborných článků publikovaných v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Jiří Handl, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Lenka Tichá**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Hepatotoxicity těžkých kovů jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne 14. 6. 2023

Judita Pallová

PODĚKOVÁNÍ

V této části bych ráda poděkovala vedoucímu bakalářské práce RNDr. Jiřímu Handlovi, Ph.D. a konzultantce bakalářské práce Mgr. Lence Tiché za jejich ochotu, trpělivost a cenné rady, které mi napomohly tuto práci dokončit. Také bych chtěla poděkovat svojí rodině a blízkým za podporu během studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce pojednává o hepatotoxicitě těžkých kovů. V první části práce je charakterizována *in vitro* buněčná kultivace. Na tuto část volně navazuje kapitola, ve které jsou charakterizovány buněčné kultury pro *in vitro* testování hepatotoxicity lidského i zvířecího původu. Nejpoužívanější buněčnou linií je HepG2, která je odvozená z buněk lidského hepatomu. Dále jsou zde charakterizovány primární lidské hepatocyty a lidské jaterní buněčné linie HepaRG a Huh-7. V práci je uveden i výčet zvířecích jaterních buněčných kultur. V hlavní části práce jsou definovány a charakterizovány těžké kovy a jejich působení na lidský organizmus. V další kapitole jsou podrobně popsány mechanismy hepatotoxicity těžkých kovů se zaměřením na kadmium. Kadmium narušuje mitochondriální funkce, indukuje autofagii, apoptózu, ferroptózu a zánět. Kadmium významně ovlivňuje homeostázu lipidů v játrech.

KLÍČOVÁ SLOVA

Játra, Hepatotoxicita, Buněčná kultivace, Těžké kovy, Kadmium

TITLE

Hepatotoxicity Of Heavy Metals

ANNOTATION

This bachelor thesis discusses the hepatotoxicity of heavy metals. *In vitro* cell culture is characterized in the first part of the thesis. This part freely links the chapter in which cell cultures for *in vitro* testing of hepatotoxicity of human and animal origin are characterized. The most common cell line derived from human hepatoma cells is HepG2. Primary human hepatocytes and the human liver cell lines HepaRG and Huh-7 are further described. This thesis also includes a list of animal liver cell cultures. The main part of the thesis is devoted to definition and characterization of heavy metals. In the next chapter, the mechanisms of hepatotoxicity of heavy metals are described in detail, focusing on cadmium. Cadmium disrupts mitochondrial functions, induces autophagy, apoptosis, ferroptosis and inflammation. Cadmium significantly affects lipid homeostasis in the liver.

KEYWORDS

Liver, Hepatotoxicity, Cell Culture, Heavy Metals, Cadmium

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
ÚVOD.....	13
1 JÁTRA.....	14
2 KULTIVACE BUNĚK <i>IN VITRO</i>	17
2.1 2D kultivace	19
2.2 3D kultivace	19
2.2.1 Scaffoldy	20
2.2.2 Sféroidy.....	20
2.2.3 Organoidy	21
3 TESTOVÁNÍ HEPATOTOXICITY <i>IN VITRO</i>	22
3.1 Primární lidské hepatocyty.....	23
3.1.1 Izolace primárních lidských hepatocytů	24
3.1.2 Kultivace primárních lidských hepatocytů	25
3.2 Zvířecí jaterní buněčné kultury	25
3.3 Lidské jaterní buněčné linie	26
3.3.1 HepG2.....	26
3.3.2 HepaRG	27
3.3.3 Huh-7	29
4 TĚŽKÉ KOVY	31
4.1 Vstup těžkých kovů do organismu.....	34
4.2 Transport těžkých kovů.....	34
4.2.1 Metalothioneiny	34
4.2.2 Albumin	35
5 HEPATOTOXICITA KADMIA	37
5.1 Transport kadmia do buněk.....	37
5.2 Akumulace kadmia.....	37
5.3 Mitochondriální působení kadmia.....	38
5.3.1 Narušení oxidativní fosforylace.....	38

5.3.2	Indukce oxidačního stresu	39
5.3.2.1	Peroxidace lipidů	39
5.3.2.2	Narušení funkce endoplazmatického retikula	40
5.4	Apoptóza	41
5.5	Ferroptóza	43
5.6	Autofagie.....	43
5.7	Zánětlivá odpověď	44
5.8	Vliv kadmia na homeostázu lipidů.....	45
ZÁVĚR		47
POUŽITÁ LITERATURA		48

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obr. 1: Mikroskopická struktura jater.....	15
Obr. 2: Imunocytochemické barvení HepaRG.	29
Obr. 3: Mechanizmy hepatotoxicity těžkých kovů.	33
Obr. 4: Terciární struktura metalothioneinu	36
Obr. 5: Apoptóza indukovaná kadmíem	41

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ADP	adenosindifosfát
ALB	albumin
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
Apo	apolipoprotein
ASK1	kináza regulující signál apoptózy 1
AST	aspartátaminotransferáza
Atf6	aktivační transkripční faktor 6
BAX	protein X přidružený Bcl-2
Bcl-2	B-buněčný lymfom 2
CAT	kataláza
CEBP	proteiny vázající zesilovač transkripce CCAAT
CPS	karbamoylfosfátsyntetáza
CYP	cytochrom P450
CytC	cytochrom C
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimethylsulfoxid
DMT-1	transportér dvojmocného železa 1
EMEM	<i>Eagle's Minimal Essential Medium</i>
FBS	fetální hovězí sérum
GGT	γ -glutamyltransferáza
GPX	glutathionperoxidáza
Grp78	regulační protein 78
GS	glutaminsyntetáza
GSH	glutathion
GST	glutathion-S-transferáza
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HMGR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reduktáza
Ho-1	hemoxygenáza 1
IL	interleukin

LDH	laktátdehydrogenáza
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LPL	lipoproteinová lipáza
MCP1	mononukleární chemoatraktant 1
MeHg	methylerť
MT	metalothionein
mtDNA	mitochondriální DNA
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MTTP	mikrozomální transportní protein triglyceridů
NADPH	redukována forma nikotinamidadeninukleotidfosfátu
NRF-2	nukleární transkripční faktor 2
p53	protein 53
PBS	fosfátový pufr
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PKB	proteinkináza B
PKC α	proteinkináza C α
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPMI-1640	<i>Rooswell Park Memorial Institute -1640</i>
SOD	superoxiddismutáza
SULT	sulfotransferáza
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
TG	triglyceridy
UGT	UDP-glukuronyltransferáza
UPR	<i>unfolded protein response</i>
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě
ZIP	zinek importující proteiny

ÚVOD

Pro *in vitro* testování hepatotoxicity jsou kromě laboratorních zvířat často využívány buněčné kultury. Jaterní buněčné kultury mohou být získávány izolací primárních buněk nebo se jedná o buněčné linie nádorových buněk. Buněčné kultury mohou být lidského nebo zvířecího původu. I když je získávání zvířecích buněčných linií doprovázeno etickými problémy, jsou významnou součástí rutinního testování toxicity. V porovnání se zvířecími buněčnými kulturami lidské kultury lépe odrážejí *in vivo* chování toxických látek v organismu. Jednotlivé lidské buněčné kultury se navzájem liší svými vlastnostmi a méně či více odrážejí fyziologické funkce jater *in vivo*. Správný výběr vhodné buněčné kultury je důležitým faktorem pro zamýšlené testování.

Dodržení správných kultivačních podmínek je kritické pro přežívání a zachování funkcí buněčných kultur. Rostoucím trendem posledních let jsou trojrozměrné buněčné modely, které lépe odrážejí *in vivo* funkce buněk. Tyto buněčné modely by mohly v budoucnosti nahradit současně rutinně využívané dvourozměrné buněčné modely.

Těžké kovy jsou běžnými polutanty životního prostředí. I když je řada z nich pro lidský organismus toxická, jsou nadále hojně průmyslově využívány. Těžké kovy vnikají do organismu nejčastěji inhalační cestou nebo přes gastrointestinální trakt. Z příslušných orgánů jsou těžké kovy transportovány krví po celém organismu a ovlivňují celou řadu orgánů. Toxické poškození orgánů se projevuje narušením fyziologických funkcí a strukturálními změnami.

Játra představují jeden z nejdůležitějších orgánů a podílejí se na řadě funkcí. Syntetizují se zde proteiny, probíhá zde převážná část metabolismu a významně se podílejí na detoxikaci organismu. Dlouhý biologický poločas těžkých kovů způsobuje akumulaci v játrech, ale také v nervové soustavě, ledvinách, kostech a dalších orgánech. Prvními příznaky jaterního poškození jsou zvýšené hodnoty jaterních enzymů. Hlavní mechanismus hepatotoxicity těžkých kovů je oxidační stres, který může v krajních případech iniciovat apoptózu nebo karcinogenezi.

1 JÁTRA

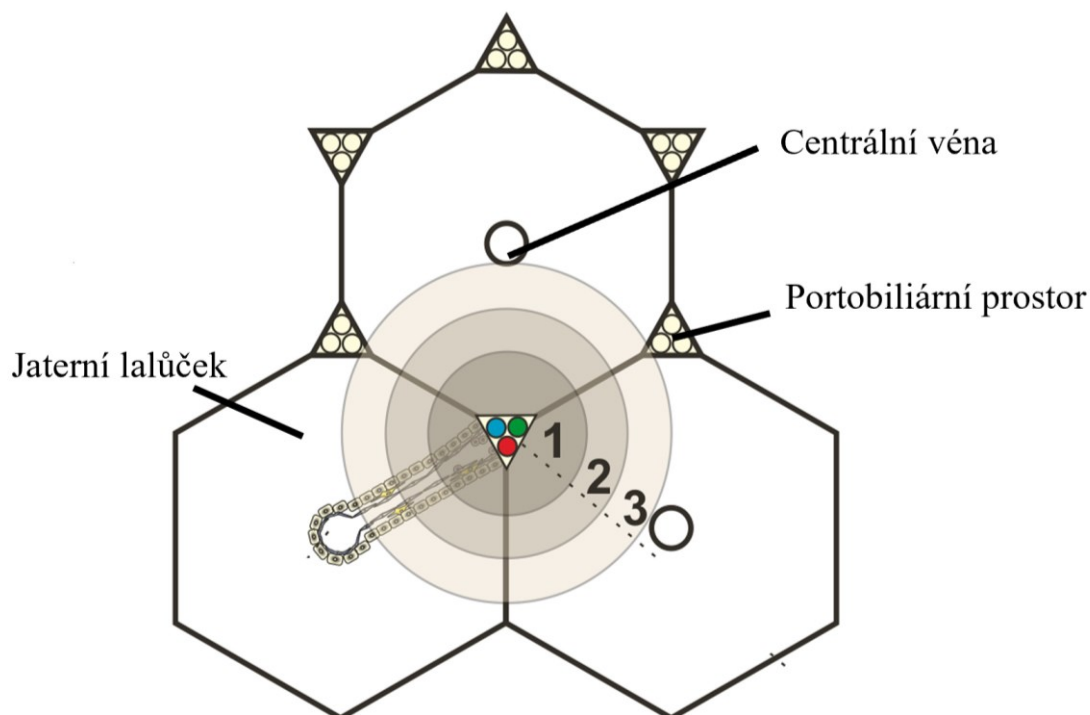
Játra patří mezi největší žlázo­vý orgán v lidském organizmu a u dospělého jedince váží přibližně 1500 g, což představuje 2,5 % celkové tělesné hmotnosti. Nachází se v pravé části dutiny břišní pod bránicí a směřují do levé části dutiny břišní. Jejich povrch je potažen vazivovým Glissonovým pouz­drem (Juza a Pauli, 2014).

Buňky v játrech lze rozdělit do dvou hlavních skupin. První skupinou jsou buňky parenchymatické, patří sem především hepatocyty, které tvoří asi 65 % všech jaterních buněk. Zbýlých 35 % představují buňky neparenchymatické odlišného původu: Kupfferovy buňky diferencované z monocytů, endoteliální buňky a Itovy buňky mezenchymálního původu (Pfeiffer et al., 2015).

Hepatocyty jsou uspořádány do plátů, které jsou oddělené jednotlivými sinusoidami. Zastávají exokrinní i endokrinní funkci. Podílejí se na syntéze a skladování látek a filtraci krve přiváděné z portální vény. Syntetizují trombopoetin, erytropoetin, interleukin 8 (IL-8), při reakci na zánět syntetizují C-reaktivní protein nebo sérový amyloid A (Ramadori et al., 2008). Dalším typem buněk jsou Kupfferovy buňky, což jsou specializované makrofágy, které uvolňují cytokiny a mají imunologické a fagocytující funkce. Itovy buňky jsou aktivovány po poškození jaterní tkáně, kterou následně regenerují. Je v nich skladován vitamín A. Dalším typem buněk jsou cholangiocyty, které tvoří epiteliální výstelku interlobulárního žlučového­du, transportují žluč a sekretují hydrogenuhličitan sodný, který udržuje stálé pH (Juza a Pauli, 2014).

Nejmenší strukturální jednotkou jater z histologického hlediska je jaterní lalůček (Obr. 1). Je šestiúhelníkového tvaru a uprostřed se nachází portální vena. Při vrcholech šestiúhelníku se nachází portobiliární prostor, který propojuje tři sousední jaterní lalůčky. V portobiliárním prostoru je umístěna interlobulární žíla, interlobulární tepna a interlobulární žlučovod, proto může být portobiliární prostor nazýván také jaterní triádou (Kietzmann, 2017). Základní funkční jednotkou jater je jaterní acinus. Hepatocyty z protékající krve odjímají kyslík, živiny a hormony a v jaterním acinu vzniká gradient těchto látek. Jaterní acinus lze rozdělit do odlišných zón. Periportální zóna je umístěna nejbliž­e portální véně a je nejvíce zásobena živinami a kyslíkem. Na ni nasedá zóna přechodná a poslední je zóna periacinární, ze které je krev odváděna do centrální vény. Hepatocyty umístěné v různých zónách jsou heterogenní ve svých metabolických funkcích (Hijmans et al., 2014). Hepatocyty periportální zóny se podílejí na metabolismu glykogenu, využití aminokyselin a detoxikaci amoniaku.

Metabolismus xenobiotik je převážně zprostředkován hepatocyty přechodné zóny. Biotransformační reakce, syntéza glutaminu a glykolýza jsou typické pro hepatocyty periacinární zóny (Ma et al., 2020).



Obr. 1: Mikroskopická struktura jater. 1 – periportální zóna, 2 – přechodná zóna, 3 – periacinární zóna (upraveno dle Kietzmann, 2017).

Laboratorní vyšetření játerních markerů je důležitou součástí určení diagnózy a monitorování játerního poškození. Játerní testy lze rozdělit do tří skupin. První skupinou je indikace funkcí jater, při které jsou prováděny koagulační testy, je stanovován sérový bilirubin a celkový protein. Druhou skupinou jsou markery játerního poškození, které zahrnují stanovení sérových hladin alaninaminotransferázy (ALT), aspartátaminotransferázy (AST), alkalické fosfatázy (ALP), γ -glutamyltransferázy (GGT) a laktátdehydrogenázy (LDH). V některých případech je stanovována sérová hladina glutamátdehydrogenázy. Poslední skupinou jsou markery virové hepatitidy (McGill, 2016).

ALT a AST jsou nejvíce interpretovanými játerními markery (McGill, 2016). Oba tyto markery jsou poměrně senzitivní, ale nejsou specifické pro cílové orgány. Zvýšení jejich aktivity není vždy zapříčiněno játerním poškozením, jejich nárůst lze zaznamenat i při poškození svalů nebo pankreatitidě. V cytozolu hepatocytů je obsaženo velké množství ALT, což z ní dělá více specifický játerní marker než AST, která se nachází kromě jater

v kosterním svalstvu a srdci. GGT, LDH a ALP také nejsou specifické pouze pro jaterní poškození. Sérový bilirubin je specifický jaterní marker, ale jeho nevýhodou je nízká citlivost, jelikož k vysokému nárůstu dochází až když játra ztratí přibližně 50 % své vylučovací kapacity (Schnackenberg et al., 2012).

2 KULTIVACE BUNĚK *IN VITRO*

Kultivační média obsahují důležité látky, které vytvářejí podmínky nezbytné pro růst a dobrou funkci buněk. Obsahují např. pufrы, glukózu, aminokyseliny, antibiotika, anorganické soli nebo vitamíny. Poměr a složení média se liší dle podmínek potřebných pro kultivaci (Selenius et al., 2019). Používaná média lze rozdělit dle složení na přírodní a umělá. Mezi přírodní média patří plazma, sérum, různé tkáňové extrakty (např. z jater, kostní dřeně nebo nádorů) nebo krevní sraženiny. Jejich nevýhodou je proměnlivé složení. Umělá média jsou vyráběna z anorganických a organických komponent, jejich složení je odlišné v závislosti na požadovaných vlastnostech, tj. prodloužená životnost, neomezený růst a další konkrétní vlastnosti (Arora, 2013).

Běžně používanými kultivačními médii jsou *Eagle's Minimal Essential Medium* (EMEM), *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), *Rooswell Park Memorial Institute -1640* (RPMI-1640) a *Ham's F12 medium*. Nejrozšířenějším umělým kultivačním médiem je EMEM, které obsahuje anorganické soli, neesenciální aminokyseliny, L-glutamin, pyruvát sodný a uhličitan sodný. Použití EMEM pro širší okruh buněk lze rozšířit modifikací složení. Nejznámější modifikací EMEM je DMEM (Philippeos et al., 2012). DMEM v porovnání s EMEM obsahuje až dvakrát vyšší koncentraci aminokyselin, koncentrace vitamínů je čtyřikrát vyšší. Často je do média přidáváno fetální hovězí sérum (FBS). RPMI-1640 obsahuje nízké koncentrace vápníku a hořčíku a vysoké koncentrace fosfátů. Je hojně využíváno pro kultivaci suspenzních buněčných kultur, jako jsou leukocyty nebo lymfocyty (Yao a Asayama, 2016). *Ham's F12 medium* je kompletně syntetické. Sérové bílkoviny jsou nahrazeny kyselinou linolovou a putrescinem. Toto médium bylo vyvinuto pro bezsérovou kultivaci buněk vaječníků čínského křečka a lze jej využít i pro kultivaci dalších savčích buněk (Arora, 2013). Pro kultivaci adherentních buněčných kultur jsou nejčastěji využívány EMEM, DMEM nebo *Ham's F12 medium* (Yao a Asayama, 2016).

Významnou složkou kultivačních médií je FBS, což je sérum hovězího původu, které obsahuje řadu významných látek, jako jsou hormony, proteiny, vitamíny, anorganické soli, mastné kyseliny nebo sacharidy. Ačkoliv je FBS pro své složení často používáno, doprovází jej řada omezení. Může obsahovat nepříznivé endotoxiny, mikroorganismy nebo protilátky, které mohou ovlivnit kultivované buňky. I zvyšující se cena FBS v posledních letech je značnou nevýhodou (Chelladurai et al, 2021).

Kultivace buněk vyžaduje zabezpečení a udržení základních fyzikálních podmínek potřebných pro jejich růst. Inkubátor zabezpečuje stabilní teplotu 37 °C, která je fyziologická pro lidský organizmus, a vzduch obsahující 5 % CO₂ s relativní vlhkostí 95 % (Philippeos et al., 2012). CO₂ se podílí na udržování konstantního pH kultivačního média pomocí pufrčního systému CO₂/HCO₃⁻, ve kterém je udržována rovnováha mezi vzdušným CO₂ a HCO₃⁻ v kultivačním médiu. Tento pufrční systém je levný a pro buňky netoxický (Butler, 2003).

Pro sledování pH je do kultivačního média přidáván acidobazický indikátor fenolová červeň. Tento indikátor má žluté zbarvení při pH 6,4 nebo nižším, a přechází v červené zbarvení při pH 8,2 nebo vyšším. Při optimálním pH 7,4 je kultivační médium v přítomnosti fenolové červeni zbarveno jasně červeně (Morgan et al., 2019). Změnu pH kultivačního média lze tedy jednoduše odhalit změnou zbarvení indikátoru. Díky tomu nejsou buňky dlouhodobě vystaveny nevhodnému kultivačnímu prostředí.

Při práci s buněčnými kulturami je velmi důležité pracovat tak, aby bylo zabráněno jakékoliv kontaminaci. Hlavním zdrojem kontaminace je laboratorní personál, prostředí a kultivační médium. Chemickými kontaminanty mohou být nečistoty v kultivačním médiu, endotoxiny, detergenty nebo dezinfekční prostředky. Mezi vážné biologické kontaminanty patří bakterie, viry, plísňe, kvasinky a parazité. Jelikož tyto organizmy rostou velmi rychle, je důležité jejich případnou přítomnost v kultivačním médiu odhalit co nejdříve (Stacey, 2011). Mohou způsobovat změny ve fenotypu nebo genotypu kultivované buněčné kultury, svými metabolity ovlivňovat pH kultivačního média, vyčerpávat důležité živiny pro růst kultivovaných buněk nebo produkovat toxické látky, které mohou způsobit smrt kultivovaných buněk (Segeritz a Vallier, 2017). Mikrobiální kontaminaci lze předcházet přidáním antibiotik do kultivačního média. I když se jedná o velmi jednoduchý způsob, jak potlačit infekci, je rutinní dlouhodobé použití antibiotik upozadřováno, jelikož může vést ke vzniku rezistentních mikroorganismů. Antibiotika mohou také ovlivňovat biochemické procesy probíhající v buňkách. Proto je základem prevence kontaminace aseptická práce a v případě kontaminace buněčné kultury je upřednostňována její likvidace (Langdon, 2004).

2.1 2D kultivace

Buňky kultivované v jedné vrstvě, které jsou přichycené k rovnému povrchu plastové nádoby, jsou tradičním modelem kultivace v 2D uspořádání. Výhodami 2D kultivace jsou nízké náklady. Naopak velkou nevýhodou je ztráta mezibuněčného kontaktu a kontaktu buněk s mezibuněčnou hmotou. Následkem jsou změny v buněčné morfologii, které ovlivňují funkce buněk a mohou vést ke ztrátě specifického fenotypu buněk. Adherované buňky, které postrádají kontakt s mezibuněčnou hmotou, ztrácejí polaritu a jsou citlivější k apoptóze (Kapałczyńska et al., 2018). V tomto uspořádání mají buňky neomezený přístup ke kyslíku, živinám, metabolitům a signálním sloučeninám. *In vivo* je dostupnost těchto látek omezená díky přirozené struktuře tkáně, kde buňky obléhá extracelulární matrix (Pampaloni et al., 2007). Pro řadu nevýhod 2D kultivace jsou hledány nové strategie, které lépe vystihují *in vivo* podmínky. Příkladem jsou kultivační systémy v 3D uspořádání (Kapałczyńska et al., 2018).

2.2 3D kultivace

Kultivace v 3D uspořádání umožňuje provádět studie v prostředí lépe napodobujícím *in vivo* podmínky za použití *in vitro* modelu, který zastiňuje klasickou kultivaci v 2D uspořádání, pokusy na zvířatech a klinické studie prováděné na lidech. Velkou výhodou je možnost upravovat okolní buněčné prostředí bez nutnosti úpravy samotných buněk. Buňky vykazují lepší vlastnosti, jelikož jsou při 3D kultivaci zohledněny jak mezibuněčné interakce, tak interakce buněk s mezibuněčnou hmotou (Mohandas et al., 2023).

Podle způsobu přípravy lze 3D modely rozdělit na scaffoldové modely, kde buňky interagují se substrátem, a modely suspenzních kultur. Suspenzní kultury lze docílit zabráněním adherence na povrchy za vzniku buněčných agregátů či sféroidů nebo kultivací v koncentrovaném médiu či v gelových substancích (Fontoura et al., 2020). Při použití agarózy jsou nejprve buňky smíchány s agarózou a kultivačním médiem. Takto připravená suspenze je nalita na destičku a po ztuhnutí je přidána druhá vrstva jednotlivých buněk v kultivačním médiu. Tento způsob je ale velmi zdlouhavý a buňky jsou z agaru těžko extrahovatelné. V druhém případě jsou buňky kultivovány v matrigelu, což je hydrogel obsahující celou řadu proteinů. Buňky kultivované v matrigelu vytvářejí struktury připomínající tkáň a lze je obnovit pro další účely. Nevýhodou matrigelu je, že obsahuje endogenní složky, které ovlivňují tvorbu 3D struktur (Kapałczyńska et al., 2018).

2.2.1 Scaffoldy

Scaffoldy neboli extracelulární matrice, jsou vysoce porézní materiály, které podporují buněčný růst, organizaci a diferenciaci. Buňkám kultivovaným na scaffoldech je umožněno migrovat mezi vlákny materiálu a přichycovat se na ně. Nevýhodou je, že se buňky po přichycení zplošťují, a získávají adherentní vlastnosti (Lee et al., 2008). Přírodními materiály používanými pro tvorbu scaffoldů jsou hedvábí, kolagen, želatina, fibrinogen, kyselina hyaluronová nebo alginát. Výhodou těchto materiálů je jejich biodegradabilita a snadná dostupnost. Jsou bioaktivní, což znamená, že jsou schopné s buňkami interagovat. Mezi syntetické používané materiály patří polyethylenglykol, polymethylmethakrylát, polystyren, polymer kyseliny glykolové a kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové. Tyto materiály jsou inertní a dlouhodobě skladovatelné, také usnadňují obnovu poškozené tkáně a lze přizpůsobit jejich poréznost. Mimo to jsou vysoce mechanicky odolné (Dhaliwal, 2012). Všechny tyto materiály jsou používány ve formě hydrogelů. Buňky mohou být nanесeny na povrch vrstvy ztuhlého hydrogelu nebo mohou být smíchány s kapalným hydrogelem a následně přeneseny na destičku, kde jsou během tuhnutí přichyceny k povrchu, který je již pokryt vrstvou hydrogelu (Hoarau-Véchet et al., 2018).

2.2.2 Sféroidy

Sféroidy jsou jednoduché modely, kde buňky produkují extracelulární matrix, ve které přetrvávají, a jsou schopné interagovat s dalšími buňkami. Nejstarším způsobem vytváření sféroidů je metoda visící kapky. Po převrácení destičky s buněčnou suspenzí buňky samovolně agregují na spodní části kapky (Fennema et al., 2013). Alternativou je použití rotačních baněk a bioreaktorů. V rotačních baňkách je obsah promícháván míchadlem, zatímco u bioreaktoru je otáčena celá kultivační nádoba. Suspenze buněk je vložena do kultivační nádoby a jejich suspenzní stav je zachován třepáním nebo zvýšením viskozity kultivačního média přidáním karboxymethylcelulózy (Hoarau-Véchet et al., 2018).

Dalším způsobem je použití destiček, které zabraňují adhezenci buněk k povrchu a zvyšují mezibuněčné interakce. Prvním typem jsou ploché destičky, které jsou pokryté agarózou nebo polymerem 2-hydroxyethylmethakrylátem. Dále mohou být použity destičky s různě tvarovaným dnem do písmene U nebo V nebo je jejich povrch pokryt různými mikrovzory (Koledova, 2017). Výhodami kultivace na destičkách zabraňujících adhezii jsou jednoduché uspořádání, snadná a rychlá kultivace a jednoduchá extrakce buněk z média pro další experimentální použití. 3D struktury jsou zřetelné po třech dnech kultivace. Některé buněčné

linie vyžadují speciálně upravené destičky potažené specifickými materiály, kterými může být polystyren nebo hydrogel (Kapałczyńska et al., 2018).

Moderním přístupem pro získávání sféroidů je magnetická levitace. Buňky jsou krátce kultivovány s magnetickými nanočásticemi, následuje aplikace vnějšího magnetického pole, které podporuje agregaci buněk a vznik sféroidů. Takto vzniklé sféroidy lze dále užívat bez potřeby magnetického pole. Nevýhodou je možná nepříznivá interakce magnetických nanočástic a buněk, která může vést ke změně funkcí a mezibuněčné komunikace (Belfiore et al., 2021).

2.2.3 Organoidy

Organoidy jsou speciálním typem 3D modelu. Jedná se o multiceulární *in vitro* útvary, které odrážejí *in vivo* uspořádání. Organoidy jsou tvořeny z kmenových buněk přibližně tak, jak by to probíhalo *in vivo*. Čím vyšší je potenciál kmenové buňky, tím komplexnější je vzniklý organoid (De Souza, 2018). Ze všech dostupných buněčných modelů vykazují organoidy molekulární a fyziologické podobnosti nejvíce podobné požadované tkáni. Organoidy z pluripotentních buněk mají omezený růst, vzniká u nich nekrotické jádro a svým vývojem jsou podobné fetální tkáni. Když buňky dosáhnou uspořádání organoidu, nelze jejich funkce a chování kontrolovat (Rauth et al., 2021).

3 TESTOVÁNÍ HEPATOTOXICITY *IN VITRO*

Buněčné kultury jsou důležitou součástí studia fyziologických a patofyziologických procesů, diferenciací buněk, metabolických procesů nebo cytotoxicity. Jedná se o systémy, kde jsou buňky kultivovány *in vitro* v kultivačních mediích za specifických podmínek, které mohou být měněny dle potřeb sledovaného procesu. Buňky mohou být získávány přímo z tkání enzymatickými a mechanickými postupy nebo z buněčných linií, které byly již předem připraveny. Buněčné procesy lze studovat i u tkání skládajících se z více typů buněk, u kterých by to *in vivo* bylo velmi složité až nemožné (Ulrich a Pour, 2013).

Buněčné kultury v laboratořích lze rozdělit do tří hlavních skupin: primární buněčné kultury, buněčné linie a kmenové buňky. Primární buněčné kultury jsou izolovány přímo z požadovaných orgánů nebo z tkání. Tkáně a orgány jsou tvořeny více typy buněk, proto i primární buněčné kultury mohou obsahovat heterogenní populaci buněk (Segeritz a Vallier, 2017). Izolaci zvoleného typu buněk lze provést použitím vhodného selektivního média obsahujícího látky, které podpoří růst pouze požadovaného typu primárních buněk. Z primárních buněčných kultur mohou být odvozeny buněčné kmeny, které vznikají provedením jejich minimálně jedné subkultivace. Zachovávají si svůj chromozomální karyotyp v závislosti na tkáni nebo orgánu, ze kterého byly primární buňky izolovány. Mají omezenou životaschopnost (Hayflick a Moorhead, 1961). Buněčné linie vznikají subkultivací a imortalizací z primárních kultur nebo jsou izolovány z nádorových buněk. Jejich významnou vlastností je, že se mohou opakovaně dělit a mají neomezenou životnost (Segeritz a Vallier, 2017). Po určitém počtu dělení buňky běžně přechází do fáze tzv. senescence. V této fázi se buňky již dále nedělí, buněčný cyklus těchto buněk je nevratně zablokovaný v G1 fázi, ale ještě nedochází k jejich smrti. U buněčných linií je důležité, aby k fázi senescence nedocházelo (Hahn, 2002). K imortalizaci buněk může dojít spontánně, jako je tomu u nádorových buněk, dále aktivací enzymu telomerázy, která je schopná prodlužovat telomery na chromozomech, nebo může být imortalizace iniciována genovou manipulací viry. Hlavním účinkem virové imortalizace je inaktivace proteinů, které regulují buněčný cyklus, mezi ně patří proteiny p53, p16, p14, p21 a retinoblastomový protein (Bardet et al., 2023). Poslední skupinou jsou kmenové buňky, které mají schopnost sebeobnovy a diferenciací v různé specializované buňky. Tato schopnost je ovlivněna jejich původem. Pluripotentní kmenové buňky jsou získávány z embrya nebo indukci pluripotence v somatických buňkách. Druhým typem jsou buňky mezenchymální, které jsou izolovány např. z kostní dřeně či tukové tkáně (McKee a Chaudhry, 2017).

Buněčné kultury lze rozdělit podle charakteristického růstu do dvou základních skupin na adherentní a suspenzní. Adherentní buněčné kultury jsou při kultivaci přichyceny k podkladu v jedné vrstvě, zatímco suspenzní buněčné kultury jsou volně rozptýleny v kultivačním médiu (Baghirzade, 2021). Adherentní kultury musí být před pasážováním rozvolněny enzymaticky nebo mechanicky a jejich růst je omezen povrchem kultivační nádoby, kdy se v případě zaplnění povrchu již dále nedělí (Pamcham et al., 2023). Tento jev se nazývá kontaktní inhibice a je typický pro fyziologické buňky. Rakovinné buňky nepodléhají kontaktní inhibici, rostou nekontrolovatelně a přerůstají se (Mendonsa et al., 2018).

Pasážování suspenzních kultur je snazší, jelikož nevyžadují žádné z enzymatických ani mechanických technik rozvolňování. Růst je v tomto případě omezen počtem buněk v kultivačním médiu (Pamcham et al., 2023). Mezi nejčastěji využívané buněčné linie pro *in vitro* testování hepatotoxicity patří buněčné linie získané z hepatocelulárního karcinomu. Jedná se například o buněčné linie HepG2, HuH7, HepaRG nebo Hep3B. Tyto buněčné linie nahrazují primární kultury hepatocytů (Donato et al., 2013).

3.1 Primární lidské hepatocyty

Primární hepatocyty nejlépe odrážejí skutečné metabolické procesy v játrech. Je s nimi ale spřaženo mnoho nevýhod. Nevýhodami jsou nepravidelná dostupnost a fenotypová nestabilita, která negativně ovlivňuje reprodukovatelnost výsledků vzhledem k rozdílným dárčům primárních kultur. Velkou nevýhodou těchto buněk je jejich omezená životaschopnost, nízká schopnost proliferace a rychlá ztráta specifických funkcí. Pro řadu nevýhod je jejich použití v rutinním provozu upozaďováno a nahrazováno jinými buněčnými modely (Donato et al., 2013; Zeilinger et al., 2016).

Důležitým markerem pro hodnocení jaterních buněčných modelů jsou cytochromy P450 (CYP). CYP enzymy jsou integrální hemoproteiny nacházející se v mitochondriální membráně nebo v endoplazmatickém retikulu (Korobkova, 2015). Jsou to enzymy, které v lidském organismu umožňují metabolizovat řadu látek, jako jsou léčiva, průmyslové chemikálie, látky znečišťující životní prostředí nebo pesticidy. Významně se uplatňují při první fázi oxidativní biotransformace xenobiotik (Schneider a Clark, 2013). V lidském organismu jsou CYP zodpovědné za 80 % oxidačních procesů a přibližně za 50 % všech eliminačních procesů, ve kterých vystupují jeden nebo více enzymů z rodiny CYP1 až CYP3. Přibližně z 95 % se na metabolismu zprostředkovaném CYP podílejí CYP1A2, CYP2C9,

CYP2C19, CYP2D6 a CYP3A4. Kromě jater, kde jsou zastoupeny nejvíce, je nalézáme také v ledvinách, placentě, gastrointestinálním traktu, plicích, srdci nebo mozku (Zhao et al., 2021).

Ve studii autorů Klieber et al. z roku 2010 byly změřeny a porovnány aktivity CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP3A4 u čerstvě izolovaných lidských hepatocytů. Velmi rozdílné aktivity způsobené rozdílnými dárci byly zaznamenány u CYP1A2, CYP2D6 a CYP3A4. Rozdílnost aktivity CYP1A2 je pravděpodobně spojená s pozměněnou genovou expresí, jelikož se aktivita tohoto enzymu u každého jedince liší v závislosti na přijímané stravě nebo může být ovlivněna environmentálními faktory či kouřením. Aktivita CYP2C9 byla v porovnání s výše zmíněnými CYP o jeden řád nižší (Klieber et al., 2010). V další studii autorů Anthérieu et al. z roku 2010 byly porovnány exprese genů jaterních markerů v odlišně starých kulturách primárních lidských hepatocytů, které byly kultivovány jeden a tři dny. Transkripce genů pro enzymy CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4 a UDP-glukuronosyltransferáza (UGT) 1A1 byla snížena a po třech dnech byla zvýšena. Exprese genů CYP1A2, CYP2B6, CYP2E1 byla kontinuálně a rapidně snižována. Enzymy CYP1A1, CYP2A6, CYP2C19, CYP2D6 a glutathion-S-transferáza byly relativně stabilní (Anthérieu et al., 2010).

Primární lidské hepatocyty kultivované ve 3D uspořádání vykazují vyšší aktivity CYP enzymů, vyšší expresi CYP mRNA a lepší indukovatelnost produkce CYP enzymů v porovnání s 2D kulturami. V současné době jsou vyvíjeny a zkoumány 3D kultury hepatocytů, které by nahradily nedostačující 2D kultury, jejichž nevýhodami jsou různá exprese CYP aktivity, rozdílná indukovatelnost a ztráta diferenciací v čase (Berger et al., 2016).

3.1.1 Izolace primárních lidských hepatocytů

Důležitým krokem při získávání primárních buněk je jejich izolace. Primární lidské hepatocyty mohou být izolovány buď z celých jater nebo z části jaterní tkáně pomocí techniky dvoukrokové kolagenázové perfúze, která byla poprvé demonstrována v roce 1969 při izolaci hepatocytů z krysích jater (Berry a Friend, 1969). Od té doby byla tato metoda značně modifikována a vylepšena, dnes patří mezi nejpoužívanější enzymatické metody izolace hepatocytů (Chen et al., 2022).

Po odběru jaterní tkáně je vzorek ihned umístěn do ledového DMEM. Důležitým krokem je promytí pomocí fosfátového pufru (PBS, pH 7,2), kdy je odstraněna přebytečná krev. Také jsou vybrány dvě vhodné cévy, do kterých jsou následně zavedeny kanyly pro další perfúzi

pufrů. Vybrány jsou ty cévy, které prokrvují co nejrozsáhlejší část jaterní tkáně, a zároveň musí být zavedené kanyly ideálně umístěny co nejdále od sebe. Po zavedení kanyl jsou ostatní cévy zašity, aby se zamezilo úniku pufrů z tkáně. Následně je tkáň perfúzována 20 minut pufrům bez vápenatých iontů a kolagenázy. Dalším krokem je perfúze pufrům s obsahem CaCl_2 a kolagenázy IV. Tkáň je na 30 minut přenesena do nádoby s pufrům obsahujícím 1% hovězí sérový albumin a poté je rozřezána na menší části. Fragmenty jaterní tkáně jsou přefiltrovány. Následuje centrifugace při nízké rychlosti. Po odstranění supernatantu je peleta buněk promyta pufrům a resuspendována v *Hank's Buffered Saline Solution* s 5% FBS. Buňky jsou kultivovány při 37 °C v inkubátoru s vysokou vlhkostí a 5% CO_2 (Figueiredo et al., 2021; Bhogal et al., 2011).

3.1.2 Kultivace primárních lidských hepatocytů

Dlouhodobá kultivace primárních hepatocytů není vhodná, jelikož tyto buňky rychle ztrácí svoji životaschopnost a funkčnost. Bylo prokázáno, že životaschopnost buněk izolovaných z tkání dospělých pacientů se pohybuje mezi dvěma až třemi měsíci, zatímco buňky izolované z tkání mladých pacientů jsou schopné přežít více než tři měsíce (Su et al., 2019). Běžně jsou primární hepatocyty kultivovány na jedné vrstvě kolagenového gelu. U kultivačního média je rozhodující obsah séra. Pro krátkodobé kultivace se volí kultivační média bez obsahu séra. Příkladem média pro krátkodobou kultivaci je médium s názvem *Williams' medium E*, ve kterém lze buňky kultivovat až 10 dní. Komerčně dostupné médium *Hepatocyte Culture Medium* je určeno přímo pro kultivaci hepatocytů a vytváří nejpříznivější podmínky pro kultivaci. Dlouhodobé kultivace trvající až několik týdnů vyžadují médium s obsahem séra (Shulman a Nahmias, 2012).

3.2 Zvířecí jaterní buněčné kultury

Zvířecí buněčné kultury jsou takové kultury, které pocházejí ze zvířecích tkání a orgánů, a představují důležitou součást při každodenních jednoduchých i pokročilých výzkumech. Lze na nich studovat rozsáhlejší mechanismy onemocnění nebo cytotoxicity a poznatky získané z těchto studií lze následně aplikovat na lidské buněčné kultury. Práci se zvířecími kulturami doprovází spousta etických problémů. Podléhá také přísným restrikcím, které upravují podmínky při zacházení se zvířaty tak, aby zvíře trpělo co nejméně bolestí a nepohodlím při usmrcení nebo operování. Mezi zvířecí buněčné linie běžně využívané pro výzkum hepatotoxicity patří buněčná linie Hepa-1c1c7 odvozená od buněčné linie pocházející z karcinomu jater myši a buněčné linie FaO a H4IIE, které pocházejí z krysího jaterního karcinomu (Donato et al., 2013). Pro výzkum lze využívat i zvířecí hepatocyty, které jsou

získávány z celé jaterní tkáně obdobným způsobem jako lidské hepatocyty, tedy enzymatickou nebo mechanickou izolací. Zdrojem jaterní tkáně jsou malí živočichové. Využívány jsou jak ryby, obojživelníci a ptáci, tak i savci. Ze savců jsou pro výzkum nejčastěji využíváni křečci, králíci, psi, primáti či přežvýkavci. Parenchymální buňky jsou získávány z větších savců pomocí klínové biopsie (Guillouzo, 1998).

Dalšími dostupnými buněčnými modely jsou immortalizované buněčné linie primárních Itových buněk, které byly izolovány z krysí nebo myší jaterní tkáně. Tyto buňky jsou důležitým *in vitro* modelem pro získávání poznatků o fibrotických procesech (Herrmann et al., 2007). V současné době je k dispozici kolem třiceti buněčných linií Itových buněk. Svě využití nacházejí při vyšetřování syntézy extracelulární matrix, metabolismu retinolu, buněčné toxicity, proliferace, adheze a migrace buněk (Nanda et al., 2022). Immortalizované linie Itových buněk mohou být získány z primárních Itových buněk různými procesy, např. vystavením UV záření nebo opičímu viru SV40. Dále potom úpravou exprese telomeráz, přímou izolací z hepatokarcinomu nebo samovolnou immortalizací během kultivace. Příkladem myších immortalizovaných Itových buněk jsou linie GRX, SV68, A640-IS, M1-4HSC a A7. Zástupci krysích immortalizovaných Itových buněk jsou HSC-T6, NFSC, PAV-1, BSC nebo MFBY2 (Herrmann et al., 2007).

3.3 Lidské jaterní buněčné linie

3.3.1 HepG2

Nejpoužívanější buněčnou linií odvozenou od lidského hepatomu je buněčná linie HepG2. Tyto buňky pocházejí ze tkáně odebrané při biopsii diferencovaného hepatocelulárního karcinomu patnáctiletého chlapce. Výhodou HepG2 buněk je schopnost napodobovat funkci hepatocytů v organizmu, a to syntetizovat a vylučovat plazmatické bílkoviny, dále metabolizovat a transportovat cholesterol, triglyceridy (TG) a lipoproteiny. V neposlední řadě je také výhodou HepG2 buněk jejich schopnost syntetizovat žlučové kyseliny a glykogen (Donato et al., 2014). Dalšími výhodami je vysoká míra proliferace, neomezená dostupnost buněk, jednoduchá manipulace s buňkami, relativně nízké náklady na kultivaci a stabilní fenotyp (Donato et al., 2013). Oproti kulturám primárních hepatocytů vykazují HepG2 buňky nízkou aktivitu enzymů CYP (Guo et al., 2011).

Fenotyp HepG2 je v porovnání s primárními hepatocyty velmi omezený a proteiny kodované jejich genomem jsou srovnatelné s proteiny lidských fetálních hepatocytů, které jsou ale odlišné od hepatocytů dospělého jedince. Přednostně exprimují CYP1A1 před CYP1A2 a vykazují vyšší expresi CYP3A7 v porovnání s CYP3A4 a CYP3A5 (Stanley a Wolf, 2022).

HepG2 jsou oblíbeným a rozšířeným modelem při metabolických studiích léčiv a toxikologických studiích, ale pro jejich nízkou aktivitu CYP3A4 a dosud neúspěšnou indukci tohoto enzymu nejsou využívány při studiích predikujících vzájemné interakce léčiv (Gerets et al., 2012).

Aktivita enzymů druhé fáze biotransformace u HepG2 je celkově nižší v porovnání s primárními hepatocyty. Aktivita UGT je přibližně padesátkrát nižší a celková aktivita glutathion-S-transferázy (GST) přibližně čtyřikrát nižší. U HepG2 pozorujeme snížené hodnoty transkriptů UGT, sulfotransferázy (SULT), GST a N-acyltransferázy v porovnání s primárními hepatocyty. Vzhledem ke snížené aktivitě těchto enzymů jsou HepG2 odolné vůči některým známým cytotoxickým sloučeninám, u kterých je jejich cytotoxicita prokázána na primárních hepatocytech (Westerink a Schoonen, 2007).

Buňky HepG2 kultivované ve 3D strukturách jsou schopny exprimovat širší škálu biomolekul a svými vlastnostmi se blíží více hepatocytům než při 2D kultivaci. 3D kultivované HepG2 po 28 dnech nabývají ztracených jaterních funkcí. Jsou schopny ukládat glykogen, transportovat žlučové soli v nově vytvořených žlučových kanálcích a produkovat více albuminu (ALB). Také se zvyšuje aktivita řady enzymů první a druhé fáze biotransformace (CYP1A2, CYP2E1, CYP2C9, UGT a SULT). Při dlouhodobé kultivaci mají buňky HepG2 metabolickou aktivitu zvýšenou nezávisle na způsobu kultivace (Luckert et al., 2016). Výhodou kultivace HepG2 ve 3D uspořádání je zvýšená strukturální integrita a životaschopnost v důsledku lepšího napodobení *in vivo* podmínek (Kaur et al., 2018).

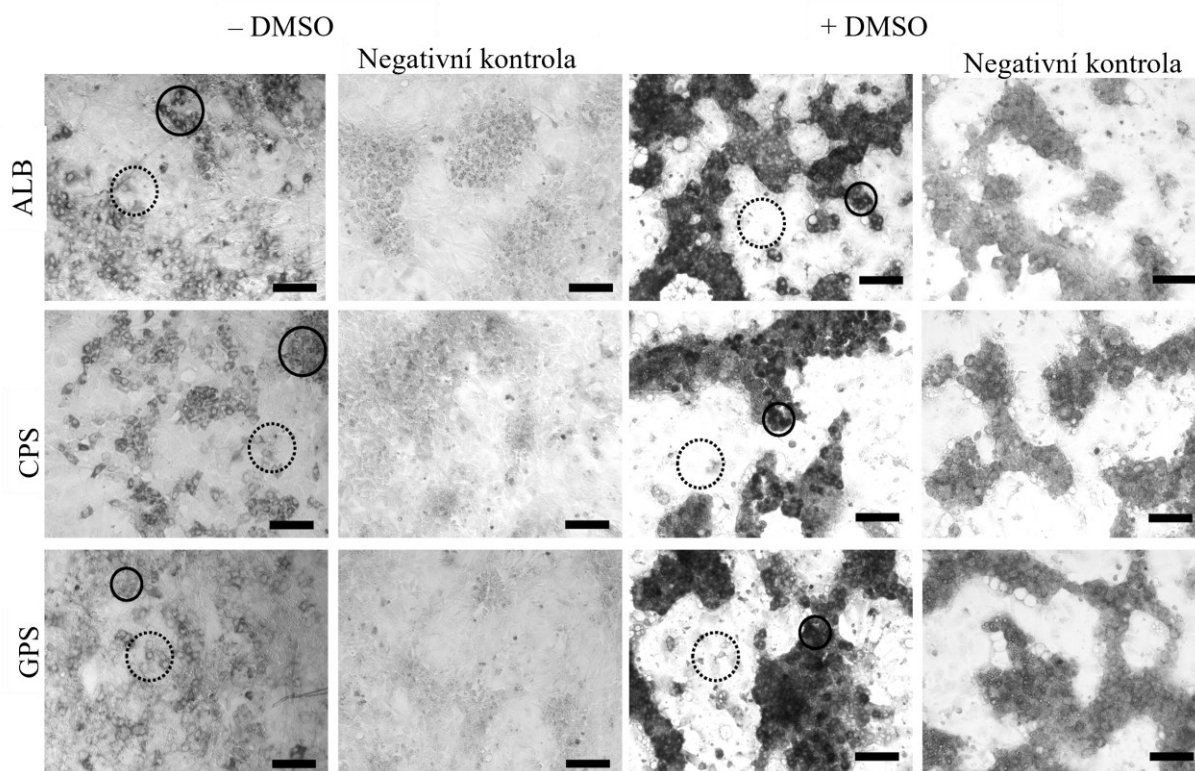
3.3.2 HepaRG

HepaRG jsou buňky, které byly izolovány z tumoru jater od pacientky s chronickou cirhózou způsobenou infekcí virem hepatitidy C (Gripon et al., 2002). V dnešní době představují možnou alternativu primárních hepatocytů, protože si při kultivaci zachovávají celou řadu specifických funkcí. V porovnání s primárními hepatocyty je kultivace HepaRG buněk méně finančně nákladná. Na rozdíl od HepG2 si diferencované HepaRG zachovávají vysokou aktivitu enzymů z rodiny CYP, tato aktivita je srovnatelná s aktivitou primárních hepatocytů (Marion et al., 2010). HepaRG buňky mají charakter bipotentního progenitoru, což znamená, že jsou schopny se diferencovat v buňky podobné hepatocytům a buňkám žlučového kanálku. Pokud jsou tyto hepatocyty vyselektovány a kultivovány při vysoké denzitě, zachovávají si svůj diferencovaný stav a aktivně proliferují. Při nízké denzitě transdiferencují v hepatocytární a žlučové linie (Cerec et al., 2007). V raných kulturách vykazují charakter epiteliálních buněk schopných diferenciaci, kterou lze indukovat aplikací dimethylsulfoxidu

(DMSO), kdy vznikají hepatocyty obklopené buňkami žlučových cest. Takto diferencované hepatocyty vykazují vysokou aktivitu CYP, která je u nediferencovaných buněk nízká až nedetekovatelná (Marion et al., 2010).

Buňky HepaRG jsou schopny exprimovat 81 až 92 % genů aktivních v lidských hepatocytech. Je ovšem důležité mít na paměti, že tyto buňky také exprimují geny odkazující na jejich původ a transformovaný stav. Mohou tedy vykazovat chromozomální abnormality a jejich aktivita je ovlivněna přítomnými diferencovanými buňkami žlučového kanálku (Rogue et al., 2012). Bazální hladiny CYP jsou závislé na několika parametrech, jako jsou kultivační podmínky, přítomnost DMSO, výběr substrátu, koncentrace a doba expozice látky indukující CYP (Aninat et al., 2006). Ve studii Anthérieu et al. bylo zjištěno, že exprese a aktivita některých genů se velmi mění v přítomnosti DMSO. Buňky HepaRG vykazují v přítomnosti DMSO v porovnání s primárními hepatocyty výrazně sníženou aktivitu CYP1A2, CYP2C8, CYP2D6, CYP2E1. Aktivita CYP1A1, CYP2A6 a CYP2B6 se pohybuje v rozmezí 30 až 50 % a enzymy CYP2C9, CYP2C19, GST a UGT vykazují zvýšenou aktivitu (Anthérieu et al., 2010). Ve studii Aninat et al. vykazovaly buňky HepaRG vystavené DMSO také vysoké aktivity CYP1A2 a CYP2B6. V této studii autoři zaznamenali navíc zvýšení aktivity CYP3A4 v porovnání s HepaRG kultivovanými bez DMSO (Aninat et al., 2006).

Ve studii autorů Hoekstra et al. byly v přítomnosti DMSO zaznamenány o 56 % nižší hladiny celkové bílkoviny a zvýšené hladiny uvolněných markerů AST a LDH v porovnání s hladinami v primárních lidských hepatocytech. Buněčné kultury bez DMSO lépe eliminují amoniak, a proto je u nich zvýšena produkce močoviny. Také zde byly stanoveny zvýšené hodnoty ALB, karbamoylfosfátsyntetázy (CPS) a glutaminsyntetázy (GS), které lze vysvětlit rozdílným uspořádáním buněk v kultuře bez DMSO a s DMSO. Obě tyto kultury obsahují shluky kubických granulárních buněk obklopených shluky velkých plochých buněk (Obr. 2). Při kultivaci DMSO snižuje expresi ALB, CPS a GS v plochých buňkách, zatímco granulární buňky dále exprimují ALB, CPS a GS. Kultury bez DMSO exprimují ALB, CPS a GS v kubických i v obklopujících shlucích plochých buněk (Hoekstra et al., 2011).



Obr. 2: Imunocytochemické barvení buněk HepaRG. Přerušovanými kruhy zvýrazněny shluky plochých buněk, nepřerušovanými kruhy zvýrazněny shluky kubických buněk (upraveno dle Hoekstra et al., 2011).

Jelikož si HepaRG zachovávají své specifické funkce po dobu několika týdnů, lze je využívat k metabolickým i cytotoxickým studiím dlouhodobého a opakovaného charakteru pro simulaci chronické expozice. Aplikací hepatotoxických látek lze v HepaRG buňkách indukovat steatózu, fosfolipidózu nebo cholestázu (Anthérieu et al., 2012). Nejčastější příčinou hepatotoxicity je tvorba reakčních metabolitů v závislosti na CYP enzymech nebo vznik aduktů s jaterními proteiny, které mohou potenciálně spouštět imunitní odpověď. Mezi další mechanismy je zahrnuto narušení mitochondriálních funkcí a inhibice metabolismu xenobiotik (Lee, 2003).

3.3.3 Huh-7

Huh-7 buněčná linie byla izolována v roce 1982 z hepatocelulárního karcinomu sedmapadesátiletého japonského muže nakaženého hepatitidou C. V porovnání s HepaRG je jejich kultivace finančně méně nákladná. Své využití nachází při studiích molekulárních mechanismů regulace jaterních genů, účinnosti a hepatotoxicity léčiv a dále při výzkumu patogenese infekce virem hepatitidy. Při kultivaci si zachovávají aktivitu řady

metabolizujících enzymů a buňky jsou proto schopné produkovat plazmatické proteiny jako je ALB, prealbumin, α_1 -antitrypsin, ceruloplazmin, nebo fibrinogen (Choi et al., 2009). V porovnání s primárními hepatocyty vykazují Huh-7 nižší aktivity CYP enzymů. Aktivita CYP2D6 v této studii nebyla zaznamenána vůbec. Naopak v porovnání s HepG2 vykazují vyšší aktivity CYP enzymů. Při testování hepatotoxicity se svými vlastnosti velmi podobají primárním hepatocytům (Lin et al., 2011).

4 TĚŽKÉ KOVY

Mezi těžké kovy jsou řazeny ty chemické prvky, které vykazují kovové vlastnosti. Mezi těžké kovy jsou zařazeny přechodné kovy, metaloidy, lantanoidy a aktinoidy. Existuje několik definic, které charakterizují těžké kovy podle jejich hustoty, atomového čísla, toxicity nebo chemických vlastností. Dle první definice jsou za těžké kovy jsou považovány chemické prvky, které se v periodické soustavě nachází mezi Cu a Hg včetně. Těžký kov lze také definovat tak, že mezi ně řadíme kovy, jejichž hustota je vyšší než 3 g/cm^3 (Abdullahi et al., 2021; Inobeme et al., 2022).

Těžké kovy lze rozdělit na stopové prvky důležité pro lidský organizmus a těžké kovy toxické již v nízkých koncentracích. Stopovými prvky důležitými pro lidský organizmus jsou Cu, Fe, Mn a Zn. Tyto těžké kovy zabezpečují řadu biologických funkcí a v nízkých koncentracích jsou pro lidský organizmus nezbytné, ale ve vyšších koncentracích jsou potenciálně toxické. Cd, Cr, Co, Pb, Hg, Ni a V jsou pro lidský organizmus toxické i v nízkých koncentracích (Ajijaz et al., 2022).

Arsen disponuje kovovými i nekovovými vlastnostmi, proto je zařazován mezi metaloidy. V přírodě se As vyskytuje v oxidačních stavech +III a +V. V životním prostředí se nachází jak přirozeně, tak vlivem činnosti člověka. V minulosti byl obsažen v kosmetice nebo pesticidech. Byl dokonce využíván k léčbě akutní promyelocytární leukémie. As vstupuje do organismu převážně orálně. Chronická expozice As má za následek karcinomy plic, jater, kůže, ledvin a je spojována s respiračními onemocněními, neurotoxicitou, nefrotoxicitou, diabetem a chorobami kardiovaskulárního systému (Hu et al., 2020). V organismu je As nejvíce akumulován v játrech, kde primárně indukuje oxidační stres (Renu et al., 2021).

Všeobecně známým toxickým těžkým kovem je Cr a jeho sloučeniny. Jeho toxicita postihuje řadu orgánů včetně jater. Nejtoxičtější formou Cr a prokázaným karcinogenem jsou sloučeniny obsahující Cr v oxidačním stavu +VI. Přirozeně se Cr vyskytuje v rostlinách a v půdě. Cr je všudypřítomný kontaminant životního prostředí, je obsažen v automobilových emisích a cigaretovém kouři. Pracovníci ve stavebnictví, koželužství, kovozpracujícím, textilním a dřevozpracujícím průmyslu jsou nejvíce exponováni Cr inhalací. Pro širší populaci je kritičtější vstupem Cr do organismu požití vody znečištěné průmyslovým odpadem (Pavesi a Moreira, 2020).

Rtuť je vysoce toxický těžký kov. Hg se nachází v elementárním stavu a vytváří anorganické i organické sloučeniny. Tyto tři formy Hg se liší vstupem do organismu a jsou odlišné i svojí

toxicitou. Anorganické sloučeniny Hg vstupují do organismu primárně orální cestou a v omezeném množství absorpcí kůží. Po vstupu anorganického Hg do organismu jsou citlivým orgánem ledviny, konkrétně proximální tubuly, a dlouhodobá expozice narušuje funkce ledvin, které následuje polyurie, proteinurie, hematurie a anurie. Elementární Hg se ochotně odpařuje a vstupuje do organismu inhalací. Z plic jsou páry elementárního Hg absorbovány krví a transportovány po celém organismu, ukládá se v nervové soustavě, mozku a ledvinách (Palathoti et al., 2022). Nejrozšířenější organickou sloučeninou přirozeně se vyskytující ve vodním prostředí je methylrtuť (MeHg). Vysoký příjem ryb je kritický pro expozici MeHg, která postihuje především nervový systém (Farina a Aschner, 2019).

Nejvýznamnějším těžkým kovem nacházejícím se v životním prostředí je olovo. I přes dokázané toxické vlastnosti Pb, je stále hojně průmyslově využíván a akumulován, jelikož je biologicky nerozložitelný. V průmyslu je využíván, i když již ve výrazně menší míře, při výrobě pohonných hmot, baterií, nátěrových hmot nebo pigmentů. Pb je vysoce toxický kov a po expozici postihuje každý orgán. Nejčastěji bývá expozice Pb spojována s neurotoxicitou a krevními onemocněními. U mužů dlouhodobá expozice Pb snižuje plodnost. Vysoká dávka Pb u těhotných může mít za následek potraty, a to i opakované (Wani et al., 2015).

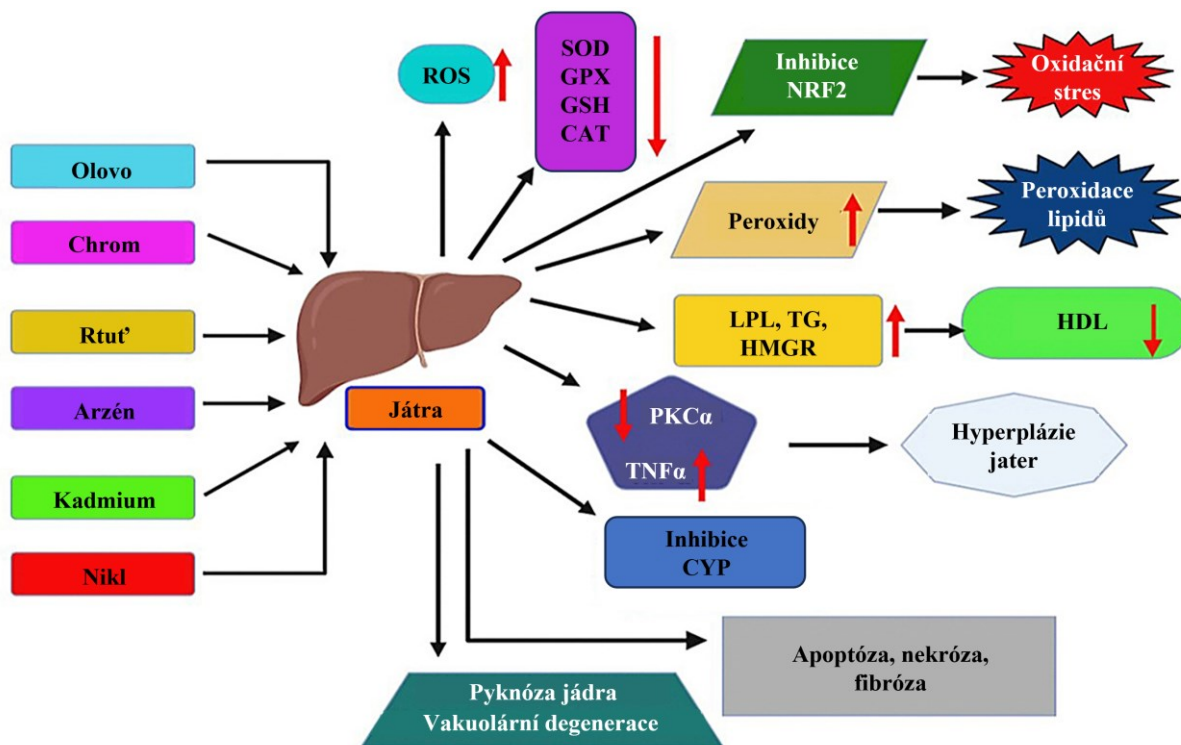
Kadmium se v periodické tabulce prvků nachází společně se zinkem a rtuťí ve dvanácté skupině. Svými chemickými vlastnosti připomíná více zinek než rtuť. V přírodě lze Cd nacházet v oxidačním stavu 0, +I a +II, přičemž nejstabilnější formou za běžných podmínek je Cd^{2+} . Tyto ionty jsou schopné v organismu nahrazovat kationy vápenaté a sodné, jelikož mají tyto tři zmíněné ionty velmi podobný poloměr (Peana et al., 2023). Kadmium má poměrně dlouhý poločas rozpadu, a to 10 až 30 let. Denně je vyloučeno 0,005 až 0,01 % z celkového množství Cd v organismu. Díky nízké exkreci je Cd v organismu zadržováno, což může negativně ovlivňovat zdravotní stav (Peng et al., 2023).

Cd v lidském organismu nezastává žádné fyziologické ani biochemické funkce, není tedy esenciální. Hlavními vstupními cestami do lidského organismu jsou potrava, voda a vzduch. Cd má široké průmyslové využití. Společně s niklem je důležitou součástí baterií, využívá se jako barevný pigment a je běžnou znečišťující látkou fosfátových hnojiv. Snadno přechází z půdy do rostlin a po požití části rostliny člověkem vstupuje do organismu orální cestou (de Carvalho Machado et al., 2023). Ve formě aerosolu je do ovzduší uvolňován spalováním fosilních paliv a odpadů nebo těžbou a zpracováním tohoto kovu. Dalším zdrojem Cd je

cigaretový kouř. Kuřáci mají až pětkrát vyšší koncentrace Cd v krvi. Jelikož je Cd zařazeno mezi karcinogenní prvky, je zvýšená inhalace Cd spojována se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny plic. Kůží je absorbováno zanedbatelné množství Cd a proniká pouze do pokožky. Prostup do dalších vrstev kůže je limitován nízkou rozpustností Cd v rohové vrstvě pokožky (Peana et al., 2023).

Průměrná denní dávka Cd u dospělých se pohybuje v rozmezí 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti u nekuřáků ve venkovských oblastech a až 190 $\mu\text{g}/\text{den}/\text{kg}$ u kuřáků v městských oblastech. Požití 3 až 5 mg Cd může vyvolat pocit na zvracení. Po požití dávky 10 až 326 mg Cd následují typické projevy intoxikace, objevuje se zvracení, průjem, svalové křeče. Fatální následky mají dávky 350 mg Cd a vyšší. Takováto koncentrace způsobuje šok, akutní selhání ledvin a smrt (Awadh et al., 2023).

Těžké kovy poškozují buňky především oxidačním stresem. Kromě oxidačního stresu se těžké kovy podílejí na hepatotoxicitě řadou mechanismů (Obr. 3). Všechny toxiny, které jsou vstřebány v tenkém střevě, jsou v první řadě transportovány do jater. Nejvíce akumulovaným těžkým kovem v játrech je Pb, po něm následuje Cd, Ni a Cr (Renu et al., 2021).



Obr. 3: Mechanizmy hepatotoxicity těžkých kovů. CAT – kataláza, CYP – cytochrom P450, GPX – glutathionperoxidáza, GSH – glutathion, HDL – lipoprotein o vysoké hustotě, HMGR – 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductáza, LPL – lipoproteinová lipáza, NRF-2 – nukleární transkripční faktor 2, PKC α – proteinkináza C α , ROS – reaktivní formy kyslíku, SOD – superoxidodismutáza, TG – triglyceridy, TNF α – tumor nekrotizující faktor α (upraveno dle Renu et al., 2021).

4.1 Vstup těžkých kovů do organismu

Těžké kovy vstupují do organismů inhalací, orální cestou nebo kůží. Primárním vstupem Cd do organismu je inhalace. V plicní tkáni se fyziologicky nachází nízké koncentrace metalothioneinů (MT). Po vdechnutí Cd indukuje vznik MT, které Cd ihned váží. Přibližně 7 až 40 % vdechnutého Cd je vstřebáno do krevního řečiště, kde se váže s proteiny a je transportováno do dalších tkání. Nejrozpuštěnější formou v krvi jsou nanočástice Cd, zdrojem je např. cigaretový kouř. Z gastrointestinálního traktu je do krevního řečiště absorbováno 5 až 10 % Cd (Nordberg a Nordberg, 2022).

Cd je absorbováno převážně enterocyty duodena a primárního jejunu, kde je přes epiteliální buněčnou membránu transportováno transmembránovými proteiny, příkladem je transportér dvojmocného železa 1 (DMT-1), dále může procházet pasivně Ca^{2+} kanály nebo je transportováno v komplexu s aminokyselinami či peptidy obsahující thiolové skupiny (Sabolić et al., 2010). Množství absorbovaného Cd je přímo úměrné množství Cd. I když je gastrointestinálním traktem absorbována malá část Cd, při zvýšené dávce roste produkce MT v enterocytech a v cytozolu je přes 90 % Cd vázáno do komplexu s MT. Zvýšená absorpce Cd nesouvisí s MT, ale se sníženým příjmem Fe. Dochází ke zvýšení exprese DMT-1, který kromě Fe zvýší i transport Cd do buněk (Klaassen et al., 2009).

4.2 Transport těžkých kovů

4.2.1 Metalothioneiny

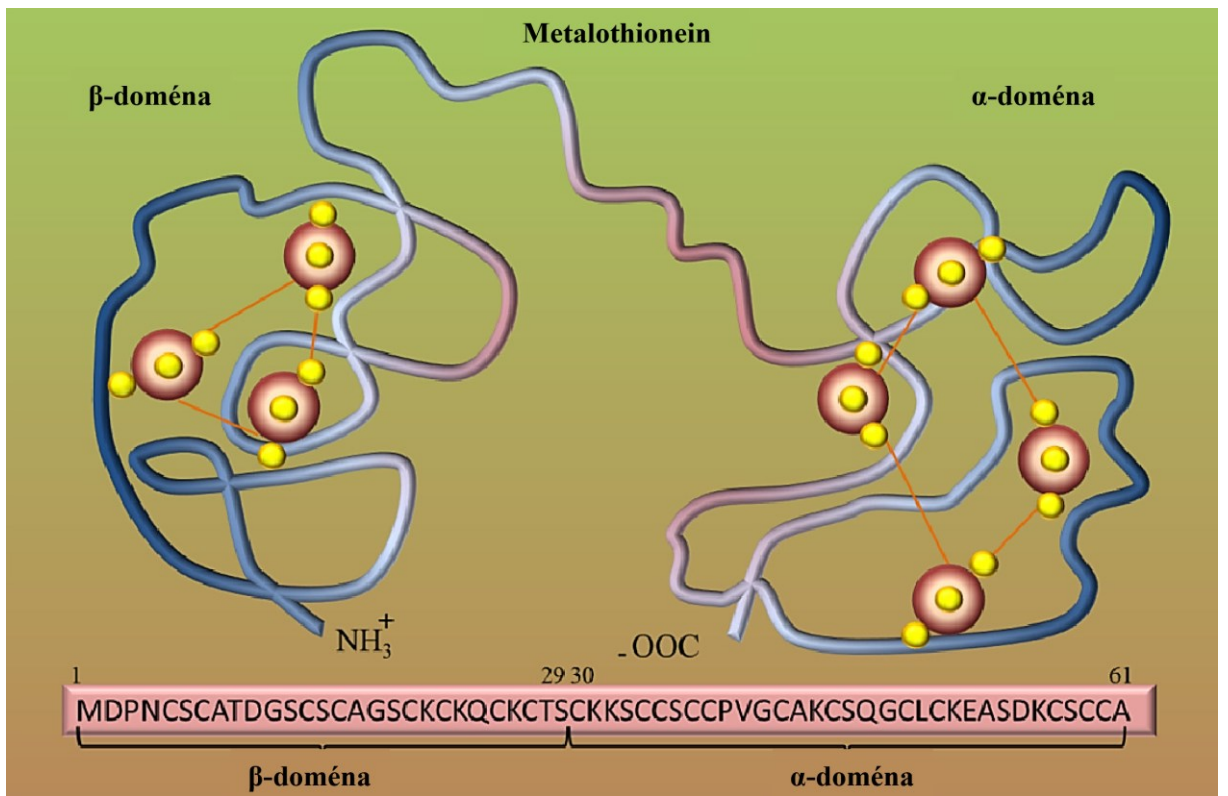
Metalothioneiny jsou proteiny vyznačující se nízkou molekulovou hmotností. Mohou obsahovat 24 až 308 aminokyselin, z nichž převažující je cystein v zastoupení 15 až 35 %. Thiolové skupiny cysteinu vytvářejí shluky, díky kterým jsou MT schopné kovalentně vázat těžké kovy. Obsah aromatických aminokyselin je nízký, v některých případech MT neobsahují žádné aromatické aminokyseliny. MT se uplatňují v řadě procesů. Udržují homeostázu kovů, podílejí se na buněčném cyklu a regulují oxidační stres (Ziller a Fraissinet-Tachet, 2018). Mají své funkce i při imunitní odpovědi. Možnost vázat těžké kovy s MT upravuje jejich genotoxicitu a karcinogenitu. Těžké kovy, které nejsou vázány MT, jsou toxičtější než těžké kovy schopné vázat se s MT. Komplexy těžkých kovů s MT jsou zadržovány v tkáních (Nordberg a Nordberg, 2022). MT ovlivňují zadržování Cd ve tkáních. Nejnáchylnějšími orgány k zadržování Cd jsou ledviny a játra, kde jsou MT nejvíce exprimovány (Klaassen et al., 2009).

Rozdílnou vazebnou afinitu těžkých kovů s MT lze sestupně zapsat v pořadí Cd, Pb, Cu, Hg, Zn, Ag, Ni a Co. I když se pořadí jednotlivých těžkých kovů může ve studiích lišit, důležitým faktem je, že Cd má jednu z nejvyšších vazebných afinit s MT. Stabilita Cd s MT je až tisíckrát vyšší než stabilita Zn s MT. Tyto kovy se mohou z komplexů spontánně uvolňovat při kyselém pH, přičemž Cd je z komplexu Cd-MT uvolňováno pomaleji než Zn z komplexu Zn-MT (Sabolić et al., 2010).

Lidské MT lze rozdělit do čtyř izoform. MT-1 a MT-2 jsou přítomny v řadě tkání, převážně v játrech a ledvinách, MT-3 je charakteristický pro neurony a mužské pohlavní orgány, MT-4 nalézáme v kůži nebo v horních částech gastrointestinálního traktu. MT hrají důležitou roli v udržování homeostázy vazbou Zn^{2+} iontů, které se vážou především na MT-2. Například Cu^{2+} ionty mají vyšší afinitu k MT-3 (Merlos Rodrigo et al., 2020). Navázáním těžkého kovu na MT je formována terciární struktura. Dvojmocné kovy jsou vázány čtyřmi molekulami cysteinu, zatímco jednomocné kovy jsou vázány dvěma nebo třemi molekulami cysteinu. Terciární struktura savčích MT s navázaným kovem je tvořena dvěma globulárními doménami – α -doménou a β -doménou (Obr. 4). Ty jsou spojeny krátkým řetězcem tří aminokyselin, který je rozhodující pro navázání těžkých kovů (Ziller a Fraissinet-Tachet, 2018). N-konec peptidového řetězce je tvořen β -doménou, která je schopná vázat tři dvojmocné kovy. C-konec je tvořen α -doménou, která je schopná vázat čtyři dvojmocné kovy (Ruttkay-Nedecky et al., 2013).

4.2.2 Albumin

Hlavním krevním transportním proteinem pro těžké kovy je albumin. Přibližně 90 % Cd je v krvi transportováno pomocí ALB a α_2 -makroglobulinu. Lidský ALB je transportní protein tvořený jedním řetězcem, který se skládá z 585 molekul aminokyselin. Ve své struktuře obsahuje 17 tyrozinových zbytků a jedinou molekulu tryptofanu. Pozitivně nabitý Cd je vázán pomocí elektrostatických sil negativně nabitými molekulami asparaginu a glutaminu (Liu et al., 2014).



Obr. 4: Terciární struktura metalothioneinu (upraveno podle Ruttkay-Nedecky et al., 2013).

5 HEPATOTOXICITA KADMIA

Pojmem hepatotoxicita se rozumí dysfunkce jater nebo poškození jater. Hepatotoxiny jsou látky exogenního původu, které poškozují hepatocyty, buňky žlučových cest nebo vaskulaturu jater. Mezi hepatotoxiny lze řadit látky, které působí přímo toxicky, vznikající reaktivní toxické metabolity nebo látky způsobující imunitní odpověď. Rozsah hepatotoxické odpovědi je závislý na koncentraci hepatotoxinu, rozdílné expresi jaterních enzymů a koncentračním gradientu napříč jaterním acinem (Sharma et al., 2014).

Ve studii autorů Skipper et al. byla sledována cytotoxicita CdCl_2 na buňkách HepG2. Životaschopnost HepG2 postupně klesala se zvyšující se koncentrací CdCl_2 . Dávka, která usmrtila 50 % buněk za 48 hodin byla stanovena na 3,6 $\mu\text{g/ml}$. HepG2 vystavené cytotoxickým účinkům CdCl_2 vykazovaly znatelné snížení viability v porovnání s HepG2 kultivovanými bez CdCl_2 (Skipper et al., 2016).

V několika studiích bylo prokázáno, že chronická expozice Cd zvyšuje sérové hladiny ALT, AST, ALP, GGT, LDH a bilirubinu. Závěrem těchto studií je, že Cd negativně ovlivňuje jaterní funkce a má hepatotoxické účinky (Renugadevi a Prabu, 2010; Hong et al., 2021).

5.1 Transport kadmia do buněk

Vzhledem k velké podobnosti Cd a Zn, může Cd ke vstupu do buněk využívat transportéry z rodiny zinek importujících proteinů (ZIP), které zabudovávají Zn do buněk. Kromě těchto kovů ZIP transportují Fe nebo Mn. Cd je pravděpodobně transportováno pomocí ZIP8 a ZIP14 (Himeno et al., 2009). Po vstupu do buňky se Cd ochotně váže k organelovým proteinům, které jsou bohaté na thiolové skupiny. Cd se může vázat na proteiny jádra, mitochondrií, endoplazmatického retikula nebo cytoskeletu. Inaktivace i jen několika důležitých proteinů může mít za následek četné subcelulární dysfunkce. Tubulin, protein tvořící cytoskelet, ve své struktuře obsahuje několik zbytků cysteinu, na které se Cd váže a narušuje uspořádání cytoskeletu (Diep et al., 2005).

5.2 Akumulace kadmia

Při akutní expozici Cd jsou náchylnějším orgánem k akumulaci játra než ledviny. Ve studii autorů Andjelkovic et al. byly porovnány hladiny Cd v krvi, játrech a ledvinách krysy po jednorázové aplikaci CdCl_2 . Krysy exponované CdCl_2 vykazovaly znatelně vyšší hodnoty Cd ve všech sledovaných tkáních. Hladiny Cd v játrech a krvi byly znatelně vyšší než hodnoty Cd v ledvinách (Andjelkovic et al., 2019). Vstup Cd do hepatocytů je vázán se

vznikajícími MT. Komplex Cd-MT je uvolňován zpět do krevního oběhu (Klaassen et al., 2009). Cd s MT vytváří malý komplex, který je krví transportován do ledvin, kde je glomeruly z krve přefiltrován a následně proximálními tubuly reabsorbován. Zde může docházet k hromadění Cd v kůře ledvin (Åkesson et al., 2014).

Mezi první obranné mechanismy před toxickými účinky Cd je vazba s glutathionem (GSH). GSH je tripeptid obsahující sekvenci aminokyselin glutamin, cystein a glycin. GSH se vyskytuje v řadě savčích buněk a má chelatační vlastnosti. Přednostně GSH chrání buňky před oxidačním stresem, xenobiotiky a těžkými kovy. Kromě redukované formy se GSH vyskytuje i v oxidované formě jako glutathion disulfid (Delalande et al., 2010).

5.3 Mitochondriální působení kadmia

Mitochondrie jsou důležitou organelou všech eukaryotických buněk. Jejich struktura je tvořena vnější membránou, mezimembránovým prostorem, vnitřní membránou a matrix. V buňce mitochondrie slouží k tvorbě energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP) potřebného pro veškeré metabolické procesy. Hrají důležitou roli v respiračním řetězci, oxidační fosforylaci, udržují energetickou homeostázu, podílejí se na syntéze aminokyselin nebo lipidů. Účastní se také proliferace buněk a programované buněčné smrti (Cannino et al., 2009).

5.3.1 Narušení oxidační fosforylace

V mitochondriích Cd narušuje respirační odpověď na adenosindifosfát (ADP) a dochází k inhibici oxidační fosforylace. Cd indukuje otevírání membránových pórů a zvyšuje permeabilitu vnější mitochondriální membrány pro K^+ a H^+ ionty (Belyaeva et al., 2003). Za fyziologických podmínek je vnější mitochondriální membrána propustná pro molekuly menší než 1,5 kDa. Zvýšení její propustnosti mohou způsobit ROS, apoptotické podněty a zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Náhlá změna propustnosti vnější membrány vede k její depolarizaci, inhibuje se buněčné dýchání a syntéza ATP. Ca^{2+} ionty jsou odváděny do extracelulárního prostředí. Také se zvyšuje osmotický tlak vně mitochondrie, což má za následek bobtnání této organely (Branca et al., 2020). Cd je také pravděpodobně zapojeno do Fentonovy reakce, při které vznikají volné radikály. I když samo o sobě Cd není katalyzátorem této reakce, může z proteinů vytěšňovat atomy Fe, které mohou Fentonovu reakci katalyzovat, a v důsledku toho vznikají volné radikály (Liu et al., 2009).

Ve studii autorů Adiele et al. byla zkoumána inhibice enzymových komplexů dýchacího řetězce působením Cd. Použitým materiálem byly mitochondrie izolované z jater pstruha

duhového. Bylo prokázáno, že Cd inhibuje komplexy I, II a III v závislosti na koncentraci. Komplex IV Cd není inhibován. Rozdíly v inhibici jsou pravděpodobně zapříčiněny přítomností Fe-S proteinů v komplexech I, II a III (Adiele et al., 2012).

5.3.2 Indukce oxidačního stresu

Cd^{2+} není samo o sobě schopné přímo vytvářet volné radikály, ale po expozici buněk Cd se zvyšuje produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) (Genchi et al., 2020). ROS jsou redukované nebo excitované formy kyslíku. Vznikají jako odpadní látky při aerobním metabolismu a jsou nezbytnými signalizačními molekulami. Jejich stálé hodnoty jsou důležité pro zachování homeostázy. Příliš vysoké koncentrace ROS jsou cytotoxické, naopak nízké koncentrace ROS působí cytostaticky (Mittler, 2017). Cd zvyšuje produkci především superoxidového a hydroxylového radikálu. Také zvyšuje produkci peroxidu vodíku, který sám o sobě není radikálem, ale mohou z něj radikály vznikat. Tyto ROS indukují v buňce oxidační stres, který je za fyziologických podmínek regulován řadou enzymů, GSH, vitamínem C nebo vitamínem E. Oxidační stres poškozuje důležité biologické molekuly, jako jsou proteiny, DNA, lipidy nebo membránové fosfolipidy (Genchi et al., 2020).

Cd může vytvářet ROS pomocí nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) oxidázy. Vzniká superoxidový radikál, který reaguje se superoxid dismutázou (SOD). SOD je důležitý antioxidační enzym, který přeměňuje superoxidový radikál na méně toxický peroxid vodíku. Peroxid vodíku je za přítomnosti katalázy nebo GSH přeměněn na vodu. Při vyčerpání kapacity ochranných antioxidačních enzymů je peroxid vodíku akumulován a vzniká hydroxylový radikál (Souza-Arroyo et al., 2022).

5.3.2.1 Peroxidace lipidů

Ve studii autorů Skipper et al. byly buňky buněčné linie HepG2 kultivovány 48 hod s CdCl_2 a následně byla sledována peroxidace lipidů. Peroxidace lipidů je oxidativní proces, při kterém jsou nenasycené fosfolipidy a glykolipidy poškozovány kyslíkovými radikály, především hydroxylovým radikálem, a vznikají lipidové radikály. Po inkubaci buněk s CdCl_2 byly naměřeny znatelně vyšší hodnoty lipidových radikálů (Skipper et al., 2016). Reakcí ROS s lipidy obsahujícími nenasycené mastné kyseliny vznikají lipoperoxidy, které mohou podléhat další oxidaci za vzniku lipohydroperoxidů. Produkty peroxidace lipidů přímo ovlivňují fyziologické funkce a strukturu plazmatické membrány. Narušují lipidovou dvojvrstvu, zvyšuje se lipofilita uvnitř membrány, což vede k depolarizaci plazmatické membrány. Lipidové radikály jsou chemicky reaktivní a mohou vytvářet adukty s DNA,

lipidy nebo proteiny. Narušují funkce těchto molekul, může následovat porucha buněčné signalizace a metabolických procesů, které vedou k buněčné dysfunkci a apoptóze (Gęgotek a Skrzydlewska et al., 2019).

5.3.2.2 Narušení funkce endoplazmatického retikula

Oxidační stres vyvolaný Cd v buňce může narušovat funkce endoplazmatického retikula. Endoplazmatické retikulum je buněčná organela, která má řadu biologických funkcí, podílí se na proteosyntéze, jsou zde syntetizovány lipidy a steroidy a udržuje homeostázu Ca^{2+} . Chaperony, řada enzymů, Ca^{2+} transportéry a kanály udržují funkce endoplazmatického retikula ve fyziologickém stavu. Pokud jsou tyto funkce ovlivněny vnitřním nebo vnějším patologickým podnětem, může být v endoplazmatickém retikulu vyvolán stres (Ajoalabady et al., 2022). Proteiny vstupují z cytozolu do endoplazmatického retikula v nesbaleném stavu, následně jsou pomocí chaperonů zabaleny do příslušného prostorového uspořádání. Akumulací nesbalených a nesprávně sbalených proteinů v endoplazmatickém retikulu vede k aktivaci ochranného mechanismu unfolded protein response (UPR), který udržuje optimální produkci bílkovin (Hetz et al., 2020).

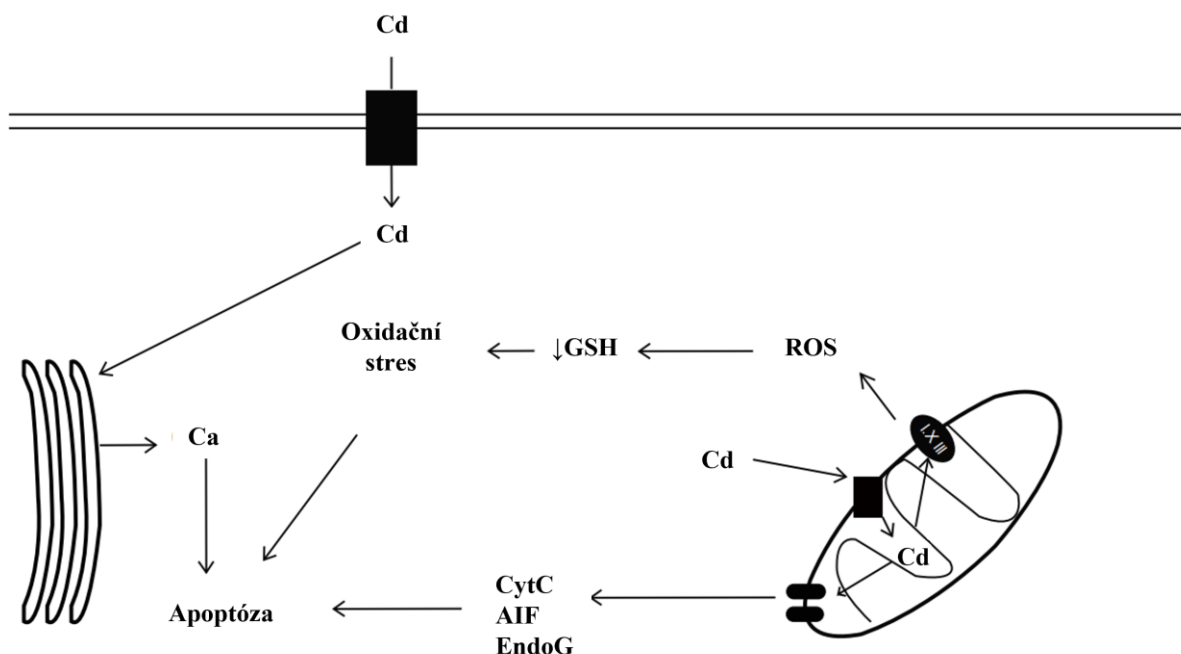
Ve studii autorů Jin et al. bylo prokázáno, že dlouhodobá expozice myši malému množství Cd vede k akumulaci Cd v játrech. Dochází k indukci oxidačního stresu, zvýšení hladin antioxidantních enzymů a zvýšené transkripci genů pro katalázu (CAT), glutathionperoxidázu (GPX), hemoxygenázu 1 (Ho-1), regulační protein 78 (Grp78), aktivační transkripční faktor 6 (Atf6) a proapoptický gen pro protein vázající zesilovač transkripce CCAAT (CEBP). Zvýšené hladiny CAT, GPX a Ho-1 byly významně zvýšeny v játrech myši, kterým byly podávány vyšší dávky Cd. Aktivita těchto enzymů je v organismu zvyšována v odpovědi na oxidační stres indukovaný Cd (Jin et al., 2014). Markerem stresu endoplazmatického retikula jsou Grp78 a Atf6. Na buněčné homeostáze a udržování funkcí endoplazmatického retikula mimo skládání proteinů se podílí Atf6. Při zvyšování hladin Grp78 dochází ke zvyšování UPR (Wu et al., 2021). CEBP je jedna z hlavních molekul zodpovědná za apoptózu indukovanou stresem endoplazmatického retikula (Jin et al., 2014).

Intracelulární Ca^{2+} je klíčový pro řízení mnoha buněčných procesů. Ionty Ca^{2+} jsou skladovány převážně v endoplazmatickém retikulu. Po expozici Cd je z endoplazmatického retikula uvolňován Ca^{2+} do cytozolu. Lysozomální pH je pravděpodobně regulováno Ca^{2+} . Dlouhodobá expozice buněk HepG2 Cd zvyšuje expresi mikrozomálního transportního proteinu triglyceridů (MTTP), který je klíčovým transportním proteinem v jaterních

a střevních buňkách. Zvýšené hodnoty MTTP vedou ke zvýšení koncentrace intracelulárních TG, které mohou být v játrech akumulovány a v krajním případě mohou způsobovat steatózu jater (Kong et al., 2021).

5.4 Apoptóza

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je charakterizována smrštěním buněk, kondenzací cytoplazmy, jádra a chromatinu. Dále vznikají membránové bleby, rozdělují se proteiny a degraduje DNA. Celá buňka se rozpadne na apoptotická tělíska, která jsou fagocytována. U savců mají mitochondrie kontrolní apoptotickou funkci. Mitochondrie spouští apoptózu různými mechanizmy. Apoptóza může být zahájena zvýšením permeability vnější mitochondriální membrány nebo snížením mitochondriálního membránového potenciálu. Dále může být aktivována produkcí ROS, uvolněním cytochromu C (CytC) nebo proapoptických faktorů (Obr. 5) (Ye et al., 2007). Apoptóza je závažnou patologickou odpovědí jater na Cd a může negativně ovlivnit fyziologické funkce. Kombinace oxidačního stresu a zánětu přispívá k rozšíření jaterní nekrózy a apoptózy, které mohou spouštět patologické procesy v játrech (Wang et al., 2022).



Obr. 5: Apoptóza indukovaná kadmíem. AIF – faktor indukující faktor, CytC – cytochrom C, EndoG – endonukleáza G, GSH – glutathion, ROS – reaktivní formy kyslíku (upraveno dle Souza-Arroyo et al., 2013).

Proteiny z rodiny B-buněčného lymfomu 2 (BCL-2) ochraňují buňky před apoptózou. Do dnešního dne bylo popsáno několik proteinů z této rodiny. Podobným proteinem je protein

X přidružený BCL-2 (BAX), který naopak stimuluje apoptózu v odpovědi na stresový podnět. Za normálních podmínek jsou proapoptické a antiapoptické proteiny v rovnováze a regulují apoptózu. BAX zvyšuje permeabilitu vnější mitochondriální membrány, čímž dojde k uvolnění proteinů z mezimembránového prostoru do cytoplazmy. Uvolnění těchto proteinů je aktivována enzymatická kaskáda kaspáz. I když je kaspázová kaskáda zablokována, poškození mitochondrií a uvolnění proteinů je pro buňku fatální. Zvýšená permeabilizace mitochondrií sama o sobě nezpůsobuje apoptózu, ale může zvyšovat riziko poškození DNA (Edlich et al., 2018).

Ve studii autorů Wang et al. bylo prokázáno, že jedním z hepatotoxických účinků Cd je aktivace apoptózy. Po dlouhodobém podávání Cd myším byly u skupiny exponované Cd naměřeny znatelně zvýšené hodnoty BAX a snížené hodnoty BCL-2 v porovnání s kontrolní skupinou myší, kterým nebylo Cd podáváno (Wang et al., 2022).

Tumor supresorový protein 53 (p53) je transkripční faktor, který je důležitý při buněčné odpovědi na poškození DNA. Cd narušuje strukturu a funkce p53. Po aplikaci Cd je v hepatocytech shromažďován p53 v jádře v odpovědi na poškození DNA. Zvýšené hodnoty p53 naznačují, že jedním z mechanismů hepatotoxicity Cd je apoptóza indukovaná p53 (Martínez-Flores et al., 2013).

Dalším mechanismem apoptózy indukované Cd je zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} a poškození mitochondriální DNA (mtDNA). Mitochondrie udržují Ca^{2+} homeostázu. Pokud je v mitochondrii nadbytek Ca^{2+} , jsou narušeny funkce mitochondrie, což může vést k apoptóze. Poškození mtDNA také narušuje mitochondriální funkce, jsou uvolňovány proteiny tvořící membrány mitochondrií a proapoptické proteiny. Kromě toho může poškození mtDNA indukovat tvorbu ROS. Samotné poškození mtDNA může vyvolávat apoptózu a přispívá k indukci apoptózy vyvolané ROS (Wang et al., 2019).

Cd také zvyšuje hladiny kinázy regulující signál apoptózy 1 (ASK1), která je jednou z proapoptických kináz. Výrazně zvýšené hladiny ASK1 byly zaznamenány v jaterní tkáni krys, kterým bylo podáváno dlouhodobě Cd. Tyto hodnoty ASK1 navrhuje další mechanismus, kterým je indukována apoptóza v játrech. Další apoptickou dráhou účastníci se apoptózy indukované Cd je systém fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K) / proteinkináza B (PKB) / *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (Souza-Arroyo et al., 2022).

PI3K/PKB/mTOR je jedním z hlavních intracelulárních signalizačních systémů a je zapojen v kontrole buněčného růstu a proliferace. Jeho aktivita je ovlivněna dostupností živin,

hormonů a růstových faktorů. PI3K je heterodimer tvořený dvěma podjednotkami, regulační a katalytickou. PKB je serin/threoninová kináza, která ovlivňuje cyklus rakovinných buněk. Analogem PKB je mTOR také patřící do rodiny serin/threoninových kináz. MTOR je tvořen dvěma komplexy, které ovlivňují buněčný metabolismus a růst rakovinných buněk (Paplomata a O'Regan, 2014). Ve studii autorů Xiong et al. bylo dlouhodobě kuřatům podáváno Cd. Změřené zvýšené hodnoty PI3K a PKB a proapoptických proteinů (BAX, Bcl-2, kaspáza 3, kaspáza 9, CytC a p53) naznačují, že regulace signalizační dráhy PI3K/PKB může být klíčová pro apoptózu indukovanou Cd (Xiong et al., 2019).

5.5 Ferroptóza

Ferroptóza je jedním z typů programované buněčné smrti, která byla objevena a popsána v roce 2012. Pro ferroptózu je charakteristická intracelulární akumulace Fe a ROS, inhibice transportního membránového systému cystin/glutamát, nedostatek glutathionu, oxidace NADPH a peroxidace lipidů. Hlavními spouštěči ferroptózy jsou peroxidy lipidů a železa. ROS vznikající Fentonovou reakcí mohou také přispívat k iniciaci ferroptózy. Pro syntézu GSH je potřebný cystein, který je syntetizován redukcí cystinu. Cystin je do buňky transportován výměnou za glutamát pomocí cystin/glutamát transportéru. Inhibicí tohoto transportéru dojde k nedostatečné syntéze GPX, což může mít za následek zvýšenou produkci lipohydroperoxidů (Costa et al., 2023).

Ferroptóza vyvolaná těžkými kovy je zodpovědná za poškození orgánů. V předešlých studiích bylo naznačeno, že nealkoholická steatohepatitida vyvolaná As a poškození mozku vyvolané Cd může mít spojitost s ferroptózou. Ferroptóza a peroxidace lipidů hraje důležitou roli při poškození jater vyvolané Cd a hepatotoxicitě Cd. Stres endoplazmatického retikula také přispívá k iniciaci ferroptózy, autofagie a apoptózy (He et al., 2022).

5.6 Autofagie

Autofagie je katabolický proces důležitý pro buněčné přežívání. Autofagií jsou pomocí lyzozomální degradace odstraňovány intracelulární odpady, poškozené orgány, špatně složené proteiny, nebo invazivní patogeny. Degradované makromolekuly dále v buňce slouží jako zdroj energie. Narušení funkce autofagie je spojeno se stárnutím, imunitní odpovědí, zánětem a tumorigenezí (Niture et al., 2021). Autofagie je složitý proces, kterého se účastní řada genů a probíhá v několika krocích. Prvním krokem je iniciace, následuje formace autofagozomu, dozrání autofagozomu a jeho konečná degradace fúzí s lyzozomem.

Za fyziologických podmínek probíhá autofagie v buňkách na nízké úrovni. Pokud jsou ale buňky stimulovány vnějšími podněty, zvýší se její úroveň. Abnormální autofagii je připisován možný vznik tumorů, neurodegenerativních onemocnění nebo diabetické nefropatie. Významným stimulantem autofagie může být právě Cd (Zou et al., 2020). Při expozici nízkým koncentracím Cd je zvyšována autofagická aktivita. Naproti tomu expozice vysokým koncentracím Cd snižuje lyzozomální pH a zvyšuje lyzozomální degradaci. Vysoké koncentrace Cd inhibují fúzi autofagozomu s lyzozomem, ty jsou v játrech akumulovány, a to zvyšuje hepatotoxicitu Cd (Niture et al., 2021).

5.7 Zánětlivá odpověď

Zánětlivá odpověď je klíčová reakce imunitního systému lidského organismu. Zánět je spouštěn patogeny, cizorodými nebo škodlivými látkami, nekrotickými buňkami nebo je iniciován při opravách tkání. Iniciátory infekčního zánětu jsou viry, bakterie a další mikroorganismy. Dalším typem je neinfekční zánět, který může být vyvolán řadou fyzických podnětů (popálení, omrzliny, fyzické zranění), biologických podnětů (poškozené buňky), psychologických podnětů nebo chemických podnětů (glukóza, mastné kyseliny, alkohol, těžké kovy). Infekční i neinfekční zánět může být spuštěn aktivací imunitních buněk (Hosseini-Khannazer et al., 2019).

Zánětlivá odpověď je také jedním z hepatotoxických účinků Cd. Játra při akutní expozici Cd obsahují velké množství infiltrovaných polymorfonukleárních leukocytů. Kupfferovy buňky jsou považovány za hlavní zdroj produkce a uvolnění prozánětlivých cytokinů. Kromě cytokinů produkují cytotoxické mediátory, které mohou přímo poškozovat hepatocyty, patří sem ROS a oxid dusnatý (Souza-Arroyo et al., 2013). Cd zvyšuje produkci interleukinu 1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF α) a mononukleárního chemoatraktantu 1 (MCP1). MCP1 do místa zánětu přitahuje monocyty, které mohou diferencovat v makrofágy, které dále produkují transformující růstový faktor β a IL-10 (Li et al., 2021).

Zánětlivá odpověď jater na Cd může vést k snížení apoptózy, poškození DNA a snížené kapacitě reparace DNA. Tyto změny mohou vést ke změnám v genové expresi a zvýšení buněčné proliferace. Dalším karcinogenním faktorem je oxidační stres, který podporuje mutagenezi a ovlivňuje buněčný cyklus. Cd může inhibovat reparační systémy DNA, což může vést k nahromadění buněk s poškozenou DNA a karcinogenezi (Genchi et al., 2020).

5.8 Vliv kadmia na homeostázu lipidů

Metabolismus lipidů z velké části probíhá v játrech a zahrnuje lipogenezi, oxidaci mastných kyselin, lipolýzu a syntézu lipoproteinů a jejich export. Zdrojem pro syntézu volných mastných kyselin může být acetyl-CoA. Tato metabolická dráha je stimulována inzulínem. Klíčovým krokem lipogeneze je esterifikace volných mastných kyselin, které jsou v aktivované formě acyl-CoA (Tessari et al., 2009). Oxidace mastných kyselin je úměrná plazmatické koncentraci volných mastných kyselin a odehrává se v několika organelách. V mitochondrii a peroxizomech probíhá β -oxidace, zatímco v endoplazmatickém retikulu probíhá ω -oxidace za katalýzy proteinů CYP.

Mitochondriální β -oxidace se uplatňuje při katabolizmu mastných kyselin, které mají ve své struktuře až dvacet uhlíků, konečným produktem jsou molekuly acetyl-CoA. Velmi dlouhé, rozvětvené nebo toxické mastné kyseliny jsou oxidovány v peroxizomech (Reddy a Sambasiva Rao, 2006). ω -oxidace je metabolická dráha, kde ze středně dlouhých mastných kyselin vznikají dikarboxylové kyseliny. V jaterní tkáni se nachází enzymy CYP4A11, CYP4A22, CYP4F3B. Všechny tyto enzymy řadíme mezi ω -hydroxylázy, ale liší se svojí specifitou. CYP4A11 má široké substrátové rozpětí, hydroxyluje nasycenou kyselinu laurovou, myristovou, palmitovou a nenasycenou kyselinu olejovou a arachidonovou. Vyšší specifitu ke kyselině laurové má CYP4A22, zatímco CYP4F3B má vyšší specifitu ke kyselině arachidonové (Wanders et al., 2010).

Za fyziologických podmínek jsou mastné kyseliny rovnoměrně lipogenezi syntetizovány a β -oxidací degradovány. Klíčovými enzymy při lipogenezi jsou acetyl-CoA karboxyláza a elongáza mastných kyselin, při β -oxidaci jsou klíčovými enzymy acyl-CoA dehydrogenáza a karnitinpalmitoyltransferáza. Ve studii z roku 2019 byly ropuchy čínské exponovány Cd v koncentracích 5 až 500 $\mu\text{g/l}$. V játrech byly naměřeny zvýšené exprese genů kódujících acetyl-CoA karboxylázu a elongázu mastných kyselin, což může vést ke zvýšení lipogeneze. Cd může také potlačovat β -oxidaci mastných kyselin, jelikož potlačuje geny kódující enzymy β -oxidace (Wu et al., 2017).

Bylo prokázáno, že Cd ovlivňuje metabolismus lipidů přímými i nepřímými mechanismy. Ve studii autorů Larregle et al. byla skupině laboratorních potkanů dlouhodobě podávána voda obsahující 15 mg Cd/kg. Po ukončení byly zaznamenány zvýšené hodnoty sérových TG a cholesterolu v porovnání se sérem neexponovaných potkanů. Tato změna byla způsobena sníženou aktivitou LPL, která hydrolyzuje TG. V jaterní tkáni byly zaznamenány snížené

hodnoty TG a cholesterolu v mitochondriích, naopak v cytozolu buněk byly naměřeny zvýšené hladiny TG a v jádře zvýšené hladiny cholesterolu v porovnání s jaterními buňkami neexponovaných potkanů. Zvýšené koncentrace cytozolárních TG jsou připisovány jejich zvýšené syntéze. Volné ionty Cd^{2+} se velmi ochotně váží na molekuly jaderné membrány, čímž mění její vlastnosti a může docházet k zadržování cholesterolu v jádře (Larregle et al., 2008).

Zvýšené koncentrace cholesterolu a TG v séru byly zaznamenány i ve studii autorů Oladipo et al., ve které byla skupině potkanů dlouhodobě podávána voda s 0,01 mg Cd/kg. Tito autoři ovšem připisují zvýšené koncentrace cholesterolu a TG oxidačnímu stresu vyvolanému působením Cd. V důsledku dlouhodobé expozice Cd byla v séru potkanů snížena hladina antioxidačního enzymu GPX a antioxidačního proteinu MT1. Dalším indikátorem oxidačního poškození byla zvýšená sérová koncentrace malondialdehydu, což je jeden z konečných produktů peroxidace lipidů (Oladipo et al., 2017).

Lipidy jsou krví transportovány ve formě lipoproteinů, které jsou tvořeny lipidickou a bílkovinnou částí – apoproteinem. Cd ovlivňuje hladiny apoproteinů v plazmě i v jaterních buňkách. Hlavními lipoproteiny jsou chylomikrony, lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL), lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) a lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL). Cd v játrech a krvi snižuje hladinu apolipoproteinu A1 (ApoA1), který je jedním z transportérů Cd v krvi a je hlavní součástí HDL. ApoA2 a ApoC3 jsou po expozici Cd v játrech sníženy, ale v krvi je jejich koncentrace zvýšena, což může vést ke zvýšení koncentrace lipidů v krvi. Cd zvyšuje syntézu ApoE v játrech, což vede ke zvyšování koncentrace ApoE jak v játrech, tak v krvi. Zvýšené hodnoty ApoE v krvi mohou vést k rozvoji aterosklerózy. Bylo také prokázáno, že Cd snižuje expresi LDL receptorů, které jsou zodpovědné za vychytávání lipidů z krevního řečiště (Hegele et al., 2009; Liu et al., 2020).

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo představit buněčné kultury pro *in vitro* testování hepatotoxicity těžkých kovů a shrnout obecně jejich kultivaci. Aktuálně nejčastěji využívanou metodou kultivace jaterních buněk je dvojrozměrné uspořádání *in vitro*. Možnou náhradou tohoto uspořádání jsou trojrozměrné kultivační modely, kde je lépe zachován mezibuněčný kontakt a buňky jsou obklopeny extracelulární matrix. Nejperspektivnějším trojrozměrným buněčným modelem jsou organoidy, které jsou tvořeny heterogenní populací buněk a extracelulárním matrixem. Organoidy mohou být nejen využívány k laboratornímu testování, ale v budoucnosti by mohly být podkladem pro syntézu kompletních uměle vytvořených orgánů.

Buněčné kultury jsou významným nástrojem pro testování toxicity. Nejvyužívanější jaterní buněčnou linií je HepG2, která byla izolována z buněk hepatomu. Buňky HepG2 mají neomezenou životnost, ale vzhledem k jejich původu neodrážejí *in vivo* podmínky normálních buněk. Alternativou jsou primární lidské hepatocyty, které mají omezenou životaschopnost a zachovávají si většinu svých funkcí.

Těžké kovy jako As, Cd, Hg nebo Pb jsou toxické i v nízkých koncentracích, akumulují se v játrech, kde působí toxicky. Hlavním mechanismem hepatotoxicity těžkých kovů je indukce oxidačního stresu, který narušuje funkce mitochondrií a endoplazmatického retikula, poškozuje DNA a buněčné membrány. Játra na těžké kovy odpovídají i aktivací Kupfferových buněk, které produkují řadu cytokinů působících prozánětlivě. Všechny tyto změny mohou vést až k apoptóze, která je pro buňku fatální.

Studium hepatotoxicity těžkých kovů je stále aktuálním tématem mnoha studií, a i když nám jsou již dostupné poměrně vhodné buněčné modely, tak by nemělo být zapomínáno na to, že tyto buněčné modely neodrážejí dokonale *in vivo* podmínky. Vývoj nových buněčných modelů může být přínosný pro podrobnější studium buněčné odpovědi jater na těžké kovy, které jsou do dnešního dne hojně využívány v různých průmyslových odvětvích, kumulují se v životním prostředí a dlouhodobě působí na organismus. Důkladnější pochopení mechanismů hepatotoxicity těžkých kovů může být přínosné pro prevenci intoxikací těžkými kovy a vývoj léčebných postupů těchto intoxikací.

POUŽITÁ LITERATURA

1. ABDULLAHI A., LAWAL M. A., SALISU A. M. **Heavy metals in contaminated soil: source, accumulation, health risk and remediation process.** Bayero Journal of Pure and Applied Sciences. 2021, 14(1), s. 1–12. ISSN 20066996. doi: 10.4314/bajopas.v14i1.1.
2. ADIELE R. C., STEVENS D., KAMUNDE C. **Differential Inhibition of Electron Transport Chain Enzyme Complexes by Cadmium and Calcium in Isolated Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hepatic Mitochondria.** Toxicological Sciences. 2012, 127(1), s. 110–119. ISSN 10966080. doi: 10.1093/toxsci/kfs091.
3. AJJAZ M. O., KARIM M. R., OMAR N. M. A. et al. **Recent Progress, Challenges, and Opportunities of Membrane Distillation for Heavy Metals Removal.** The Chemical Record. 2022, 22(7). ISSN 15280691. doi: 10.1002/tcr.202100323.
4. AJOOLABADY A., KAPLOWITZ N., LEBEAUPIN C. et al. **Endoplasmic reticulum stress in liver diseases.** Hepatology. 2022, 77(2), s. 619–639. ISSN 15273350. doi: 10.1002/hep.32562.
5. ÅKESSON A., BARREGARD L., BERGDAHL I. A. et al. **Non-Renal Effects and the Risk Assessment of Environmental Cadmium Exposure.** Environmental Health Perspectives. 2014, 122(5), s. 431–438. ISSN 15529924. doi: 10.1289/ehp.1307110.
6. ANDJELKOVIC M., BUHA DJORDJEVIC A., ANTONIJEVIC E. et al. **Toxic Effect of Acute Cadmium and Lead Exposure in Rat Blood, Liver, and Kidney.** International Journal of Environmental Research and Public Health. 2019, 16(2), s. 274. ISSN 16604601. doi: 10.3390/ijerph16020274.
7. ANINAT C., PITON A., GLAISE D. et al. **Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells.** Drug Metabolism and Disposition. 2006, 34(1), s. 75–83. ISSN 1521009X. doi: 10.1124/dmd.105.006759.
8. ANTHÉRIEU S., CHESNÉ C., LI R. et al. **Optimization of the HepaRG cell model for drug metabolism and toxicity studies.** Toxicology in Vitro. 2012, 26(8), s. 1278–1285. ISSN 08872333. doi: 10.1016/j.tiv.2012.05.008.
9. ANTHÉRIEU S., CHESNÉ C., LI R. et al. **Stable Expression, Activity, and Inducibility of Cytochromes P450 in Differentiated HepaRG Cells.** Drug Metabolism and Disposition. 2010, 38(3), s. 516–525. ISSN 00909556. doi: 10.1124/dmd.109.030197.
10. ARORA M. **Cell Culture Media: A Review.** Material and Methods. 2013, 3(175). ISSN 23295139. doi: 10.13070/mm.en.3.175.
11. AWADH S. M., YASEEN Z. M., AL-SUWAIYAN M. S. **The role of environmental trace element toxicants on autism: A medical biogeochemistry perspective.** Ecotoxicology and Environmental Safety. 2023, 251, s. 114561. ISSN 10902414. doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.114561.
12. BAGHIRZADE R. **Adherent versus suspensionbased platforms: what is the near future of viral vector manufacturing?** Cell and Gene Therapy Insights. 2021, 7(11), s.1365–1371. ISSN 20597800. doi: 10.18609/cgti.2021.180.

13. BARDET J. C., CARDENTY C. R., GONZÁLEZ B. L. et al. **Cell immortalization: In Vivo Molecular Bases and In Vitro Techniques for Obtention.** *BioTech.* 2023, 12, s. 1–14. ISSN 26736284. doi: 10.3390/biotech12010014.
14. BELFIORE L., AGHAEI B., LAW A. M. K. et al. **Generation and analysis of 3D cell culture models for drug Discovery.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2021, 163, s. 105876. ISSN 18790720. doi: 10.1016/j.ejps.2021.105876.
15. BELYAEVA E. A., KOROTKOV S. M. **Mechanism of primary Cd²⁺-induced rat liver mitochondria dysfunction: discrete modes of Cd²⁺ action on calcium and thiol-dependent domains.** *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2003, 192(1), s. 56–68. ISSN 26410451. doi: 10.1016/s0041-008x(03)00255-2.
16. BERGER B., DONZELLI M., MASENERI S. **Comparison of Liver Cell Models Using the Basel Phenotyping Cocktail.** *Frontier in Pharmacology.* 2016, 21(7), s. 443. ISSN 16639812. doi: 10.3389/fphar.2016.00443.
17. BERRY M. N., FRIEND D. S. **High.yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study.** *The Journal of Cell Biology.* 1969, 43(3), 506–520. ISSN 00219525. doi: 10.1083/jcb.43.3.506.
18. BHOGAL R. H., HODSON J., BARTLETT D. C. et al. **Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience.** *PLOS One.* 2011, 6(3), s. e18222. ISSN 19326203. doi: 10.1371/journal.pone.0018222.
19. BRANCA J. J. V., PACINI A., GULISANO M. et al. **Cadmium-Induced Cytotoxicity: Effects on Mitochondrial Electron Transport Chain.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2020, 8, s. 604377. ISSN 2296634X. doi: 10.3389/fcell.2020.604377.
20. BUTLER M. **Animal Cell Culture and Technology.** Second Edition. Taylor & Francis, 2003. ISBN 9781859960493.
21. CANNINO G., FERRUGGIA E., LUPARELLO C. et al. **Cadmium and mitochondria.** *Mitochondrion.* 2009, 9(6), s. 377–384. ISSN 15677249. doi: 10.1016/j.mito.2009.08.009.
22. CEREC V., GLAISE D., GARNIER D. et al. **Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor.** *Hepatology.* 2007, 45(4), s. 957–967. ISSN 02709139. doi: 10.1002/hep.21536.
23. COSTA I., BARBOSA D. J., BENFEITO S. et al. **Molecular mechanisms of ferroptosis and their involvement in brain diseases.** *Pharmacology & Therapeutics.* 2023, 244, s. 108373. ISSN 1879016X. doi: 10.1016/j.pharmthera.2023.108373.
24. DE CARVALHO MACHADO C., DINIS-OLIVEIRA R. J. **Clinical and Forensic Signs Resulting from Exposure to Heavy Metals and Other Chemical Elements of the Periodic Table.** *Journal of Clinical Medicine.* 2023, 12(7), s. 2591. ISSN 20770383. doi: 10.3390/jcm12072591.
25. DE SOUZA M. **Organoids.** *Nature Methods.* 2018, 15, s. 23. ISSN 15487105. doi: 10.1038/nmeth.4576.

26. DELALANDE O., DESVAUX H., GODAT E. et al. **Cadmium – glutathione solution structures provide new insights into heavy metal detoxification.** FEBS Journal. 2010, 277(24), s. 5086–5096. ISSN 17424658. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07913.x.
27. DHALIWAL A. **3D Cell Culture: A Review.** Materials and Methods. 2012, 2, s. 162. ISSN 23295139. doi: 10.13070/mm.en.2.162.
28. DIEP P. T. N., DENIZEAU F., JUMARIE C. **Kinetics of the early subcellular distribution of cadmium in rat hepatocytes.** BioMetals. 2005, 18(3), s. 255–267. ISSN 15728773. doi: 10.1007/s10534-005-1538-3.
29. DONATO M. T., JOVER R., GÓMEZ-LECHÓN M. J. **Hepatic Cell Lines for Drug Hepatotoxicity Testing: Limitations and Strategies to Upgrade their Metabolic Competence by Gene Engineering.** Current Drug Metabolism. 2013, 14(9), s. 946–968. ISSN 18755453. doi: 10.2174/1389200211314090002.
30. DONATO M. T., TOLOSA L., GÓMEZ-LECHÓN M. J. **Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells.** Methods in Molecular Biology. 2014, s. 77–93. ISSN 19406037. doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_5.
31. EDLICH F. **BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns.** Biochemical and Biophysical Research Communications. 2018, 500(1), s. 26–34. ISSN 0006291X. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.190.
32. FARINA M., ASCHNER M. **Glutathione antioxidant system and methylmercury-induced neurotoxicity: An intriguing interplay.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects. 2019, 1863(12), s. 129285. ISSN 18728006. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.01.007.
33. FENNEMA E., RIVRON N., ROUWKEMA J. et al. **Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues.** Trends in Biotechnology. 2013, 31(2), s. 108–115. ISSN 18793096. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.12.003.
34. FIGUEIREDO N., MATOS B., DINIZ M. et al. **Marine Fish Primary Hepatocyte Isolation and Culture: New Insights to Enzymatic Dissociation Digestion.** International Journal of Environmental Research and Public Health. 2021, 18(4), s. 1380. ISSN 16604601. doi: 10.3390/ijerph18041380.
35. FONTOURA J. C., VIEZZER C., DOS SANTOS F. G. et al. **Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance.** Materials Science and Engineering: C. 2020, 107, s. 110264. ISSN 18730191. doi: 10.1016/j.msec.2019.110264.
36. GĘGOTEK A., SKRZYDLEWSKA E. **Biological effect of protein modifications by lipid peroxidation products.** Chemistry and Physics of Lipids. 2019, 221, s. 46–52. ISSN 00093084. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2019.03.011.
37. GENCHI G., SINICROPI M. S., LAURIA G. et al. **The Effects of Cadmium Toxicity.** International Journal of Environmental Research and Public Health. 2020, 17(11), s. 3782. ISSN 16604601. doi: 10.3390/ijerph17113782.
38. GERETS H. H. J., TILMANT K., GERIN B. et al. **Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human**

- hepatotoxins.** *Cell Biology and Toxicology*. 2012, 28(2), s. 69–87. ISSN 15736822. doi: 10.1007/s10565-011-9208-4.
39. GRIPON P., RUMIN S., URBAN S. et al. **Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002, 99(24), s. 15655–15660. ISSN 10916490. doi: 10.1073/pnas.232137699.
 40. GUILLOUZO A. **Liver cell models in in vitro toxicology.** *Environmental Health Perspectives*. 1998, 106(2), s. 511–532. ISSN 15529924. doi: 10.1289/ehp.98106511.
 41. GUO L., DIAL S., SHI L. et al. **Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes.** *Drug Metabolism and Disposition*. 2011, 39(3), s. 528–538. ISSN 00909556. doi: 10.1124/dmd.110.035873.
 42. HAHN W. C. **Immortalization and transformation of human cells.** *Molecules and Cells*. 2002, 13(3), s. 351–361. ISSN 02191032. PMID: 12132573.
 43. HAYFLICK L., MOORHEAD P. S. **The serial cultivation of human diploid cell strains.** *Experimental Cell Research*. 1961, 25(3), s. 585–621. ISSN 10902422. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
 44. HE Z., SHEN P., FENG L. et al. **Cadmium induces liver dysfunction and ferroptosis through the endoplasmic stress-ferritinophagy axis.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2022, 245, s. 114123. ISSN 01476513. doi: 10.1016/j.ecoenv.2022.114123.
 45. HEGELE R. A. **Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications.** *Nature Reviews Genetics*. 2009, 10(2), s. 109–121. ISSN 14710064. doi: 10.1038/nrg2481.
 46. HERRMANN J., GRESSNER A. M., WEISKIRCHEN R. **Immortal hepatic stellate cell lines: useful tools to study hepatic stellate cell biology and function?** *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2007, 11(4), s. 704–722. ISSN 15824934. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00060.x.
 47. HETZ C., ZHANG K., KAUFMAN R. J. **Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020, 21(8), s. 421–438. ISSN 17595037. doi: 10.1038/s41580-020-0250-z.
 48. HIJIMANS B. S., GREFFHORST A., OOSTERVEER M. H. et al. **Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: Mechanism and metabolic consequences.** *Biochimie*. 2014, 96, s. 121–129. ISSN 16386183. doi: 10.1016/j.biochi.2013.06.007.
 49. HIMENO S., YANAGIYA T., FUJISHIRO H. **The role of zinc transporters in cadmium and manganese transport in mammalian cells.** *Biochimie*. 2009, 91(10), s. 1218–1222. ISSN 16386183. doi: 10.1016/j.biochi.2009.04.002.
 50. HOARAU-VÉCHOT J., RAFII A., TOUBOUL C. et al. **Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions?** *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, 19(1), s.181. ISSN 14220067. doi: 10.3390/ijms19010181.
 51. HOEKSTRA R., NIBOURG G. A. A., HOEVEN T. V. et al. **The HepaRG cell line is suitable for bioartificial liver application.** *The International Journal of Biochemistry*

- and Cell Biology. 2011, 43(10), s. 1483–1489. ISSN 13572725. doi: 10.1016/j.biocel.2011.06.011.
52. HONG D., MIN J.-Y., MIN K.-B. **Association Between Cadmium Exposure and Liver Function in Adults in the United States: A Cross-sectional Study.** Journal of Preventive Medicine and Public Health. 2021, 54(6), s. 471–480. ISSN 19758375. doi: 10.3961/jpmph.21.435.
 53. HOSSEIN-KHANNAZER N., AZIZI G., ESLAMI S. et al. **The effects of cadmium exposure in the induction of inflammation.** Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2019, 42(1), s. 1–8. ISSN 15322513. doi: 10.1080/08923973.2019.1697284.
 54. HU Y., LI J., LOU B. et al. **The Role of Reactive Oxygen Species in Arsenic Toxicity.** Biomolecules. 2020, 10(2), s. 240. ISSN 20054483. doi: 10.3390/biom10020240.
 55. CHELLADURAI K. S., CHRISTYRAJ J. D. S., RAJAGOPALAN K. et al. **Alternative to FBS in animal cell culture – An overview and future perspective.** Heliyon. 2021, 7(8), s. e07686. ISSN 24058440. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07686.
 56. CHEN B., DOU X., ZHANG D. et al. **Development of an Improved Method for the Isolation and Culture of Newborn Sheep Primary Hepatocytes.** Current Issues in Molecular Biology. 2022, 44(8), s. 3621–3631. ISSN 14673045. doi: 10.3390/cimb44080248.
 57. CHOI S., SAINZ B., CORCORAN P. et al. **Characterization of increased drug metabolism activity in dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated Huh7 hepatoma cells.** Xenobiotica. 2009, 39(3), s. 205–217. ISSN 13665928. doi: 10.1080/00498250802613620.
 58. INOBEME A., MATHEW J. T., ADETUNJI C. O. et al. **Recent advances in nanotechnology for remediation of heavy metals.** Environmental Monitoring and Assessment. 2022, 195(1). ISSN 15732959. doi: 10.1007/s10661-022-10614-7.
 59. JIN Y., ZHANG S., TAO R. et al. **Oral exposure of mice to cadmium (II), chromium (VI) and their mixture induce oxidative and endoplasmic reticulum-stress mediated apoptosis in the livers.** Environmental Toxicology. 2014, 31(6), s. 693–705. ISSN 13826689. doi: 10.1002/tox.22082.
 60. JUZA R. M., PAULI E. M. **Clinical and surgical anatomy of the liver: A review for clinicians.** Clinical Anatomy. 2014, 27(5), s. 764–769. ISSN 10982353. doi: 10.1002/ca.22350.
 61. KAPAŁCZYŃSKA M., KOLENDA T., PRZYBYŁA W. et al. **2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures.** Archives of Medical Science. 2018, 14(4), s. 910–919. ISSN 01884409. doi: 10.5114/aoms.2016.63743.
 62. KAUR P., ROBIN, MEHTA R. G. et al. **Progression of conventional hepatic cell culture models to bioengineered HepG2 cells for evaluation of herbal bioactivities.** Biotechnology Letters. 2018, 40(6), s. 881–893. ISSN 01415492. doi: 10.1007/s10529-018-2547-y.

63. KIETZMANN T. **Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited.** *Redox Biology*. 2017, 11, s. 622–630. ISSN 22132317. doi: 10.1016/j.redox.2017.01.012.
64. KLAASSEN C. D., LIU J., DIWAN B. A. **Metallothionein protection of cadmium toxicity.** *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009, 238(3), s. 215–220. ISSN 26410451. doi: 10.1016/j.taap.2009.03.026.
65. KLIEBER S., TORREILLES F., GUILLOU F. et al. **The Use of Human Hepatocytes to Investigate Drug Metabolism and CYP Enzyme Induction.** *Methods in Molecular Biology*. 2010, 640, s. 295–308. ISSN 19406037. doi: 10.1007/978-1-60761-688-7_16.
66. KOLEDOVA Z. **3D Cell Culture: An Introduction.** *Methods in Molecular Biology*. 2017, 1612, s. 1–11. ISSN 19406029. doi: 10.1007/978-1-4939-7021-6_1.
67. KONG A., ZHANG Y., NING B. et al. **Cadmium induces triglyceride levels via microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) accumulation caused by lysosomal deacidification regulated by endoplasmic reticulum (ER) Ca²⁺ homeostasis.** *Chemico-Biological Interactions*. 2021, 348, s. 109649. ISSN 00092797. doi: 10.1016/j.cbi.2021.109649.
68. KOROBKOVA E. A. **Effect of Natural Polyphenols on CYP Metabolism: Implications for Diseases.** *Chemical Research in Toxicology*. 2015, 28(7), s. 1359–1390. ISSN 15205010. doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00121.
69. LANGDON S.P. **Cell Culture Contamination.** *Methods in Molecular Medicine*. 2004, 88, s. 309–317. ISSN 19406037. doi: 10.1385/1-59259-406-9:309.
70. LARREGLE E. V., VARAS S. M., OLIVEROS L. B. et al. **Lipid metabolism in liver of rat exposed to cadmium.** *Food and Chemical Toxicology*. 2008, 46(5), s. 1786–1792. ISSN 02786915. doi: 10.1016/j.fct.2008.01.018.
71. LEE J., CUDDIHY M. J., KOTOV N. A. **Three-dimensional cell culture matrices: state of the art.** *Tissue Engineering. Part B*. 2008, 14(1), s. 61–68. ISSN 19373368. doi: 10.1089/teb.2007.0150.
72. LEE W. M. **Drug-induced hepatotoxicity.** *The New England Journal of Medicine*. 2003, 349(5), s. 474–85. ISSN 15334406. doi: 10.1056/NEJMra021844.
73. LI X., LI H., CAI D. et al. **Chronic oral exposure to cadmium causes liver inflammation by NLRP3 inflammasome activation in pubertal mice.** *Food and Chemical Toxicology*. 2021, 148, s. 111944. ISSN 02786915. doi: 10.1016/j.fct.2020.111944.
74. LIN J., SCHYSCHKA L., MÜHL-BENNINGHAUS R. et al. **Comparative analysis of phase I and II enzyme activities in 5 hepatic cell lines identifies Huh-7 and HCC-T cells with the highest potential to study drug metabolism.** *Archives of Toxicology*. 2011, 86(1), s. 87–95. ISSN 14320738. doi: 10.1007/s00204-011-0733-y.
75. LIU H., WANG Y., REN Z. et al. **Dietary cadmium exposure causes elevation of blood ApoE with triglyceride level in mice.** *BioMetals*. 2020, 33(4-5), s. 241–254. ISSN 15728773. doi: 10.1007/s10534-020-00247-z.

76. LIU J., QU W., KADIISKA M. B. **Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis.** *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009, 238(3), s. 209–214. ISSN 26410451. doi: 10.1016/j.taap.2009.01.029.
77. LIU Y., CHEN M., JIANG L. et al. **New insight into molecular interaction of heavy metal pollutant—cadmium(II) with human serum albumin.** *Environmental Science and Pollution Research*. 2014, 21(11), s. 6994–7005. ISSN 16147499. doi: 10.1007/s11356-014-2610-8.
78. LUCKERT C., SCHULZ C., LEHMANN N. et al. **Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells.** *Archives of Toxicology*. 2016, 91(1), s. 393–406. ISSN 14320738. doi: 10.1007/s00204-016-1677-z.
79. MA R., MARTÍNEZ-RAMÍREZ A. S., BORDERS T. L. et al. **Metabolic and non-metabolic liver zonation is established non-synchronously and requires sinusoidal Wnts.** *eLife*. 2020, 10(9), s. 46206. ISSN 2050084X. doi: 10.7554/eLife.46206.
80. MARION M.-J., HANTZ O., DURANTEL D. **The HepaRG Cell Line: Biological Properties and Relevance as a Tool for Cell Biology, Drug Metabolism, and Virology Studies.** *Methods in Molecular Biology*. 2010, s. 261–272. ISSN 19406037. doi: 10.1007/978-1-60761-688-7_13.
81. MARTÍNEZ-FLORES K., URIBE MARÍN B. C., SOUZA-ARROYO V. et al. **Hepatocytes display a compensatory survival response against cadmium toxicity by a mechanism mediated by EGFR and Src.** *Toxicology in Vitro*. 2013, 27(3), s. 1031–1042. ISSN 08872333. doi: 10.1016/j.tiv.2013.01.017.
82. MCGILL M. R. **The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers.** *EXCLI Journal*. 2016, 15, s. 817–828. ISSN 16112156. doi: 10.17179/EXCLI2016-800.
83. MCKEE C., CHAUDHRY G. R. **Advances and challenges in stem cell culture.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017, 159, s. 62–77. ISSN 09277765. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.051.
84. MENDONSA A. M., NA T.-Y., GUMBINER B. M. **E-cadherin in contact inhibition and cancer.** *Oncogene*. 2018, 37(35), s. 4769–4780. ISSN 14765594. doi: 10.1038/s41388-018-0304-2.
85. MERLOS RODRIGO M. A., JIMENEZ A. M., HADDAD Y. et al. **Metallothionein isoforms as double agents – Their roles in carcinogenesis, cancer progression and chemoresistance.** *Drug Resistance Updates*. 2020, 52, s. 100691. ISSN 15322084. doi: 10.1016/j.drug.2020.100691.
86. MITTLER R. **ROS Are Good.** *Trends in Plant Science*. 2017, 22(1), s. 11–19. ISSN 18784372. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002.
87. MOHANDAS S., GAYATRI V., KUMARAN K. et al. **New Frontiers in Three-Dimensional Culture Platforms to Improve Diabetes Research.** *Pharmaceutics*. 2023, 15(3), s.725. ISSN 03785173. doi: 10.3390/pharmaceutics15030725.
88. MORGAN A., BABU D., REIZ B. et al. **Caution for the routine use of phenol red – It is more than just a pH indicator.** *Chemico-Biological Interactions*. 2019, 310, s. 108739. ISSN 18727786. doi: 10.1016/j.cbi.2019.108739.

89. NANDA I., STEINLEIN C., HAAF T. et al. **Genetic Characterization of Rat Hepatic Stellate Cell Line HSC-T6 for In Vitro Cell Line Authentication.** *Cells*. 2022, 11(11), s. 1783. ISSN 20734409. doi: 10.3390/cells11111783.
90. NITURE S., LIN M., QI Q. et al. **Role of Autophagy in Cadmium-Induced Hepatotoxicity and Liver Diseases.** *Journal of Toxicology*. 2021, 2021, s. 1–14. ISSN 1687805. doi: 10.1155/2021/9564297.
91. NORDBERG M., NORDBERG G. F. **Metallothionein and Cadmium Toxicology – Historical Review and Commentary.** *Biomolecules*. 2022, 12(3), s. 360. ISSN 20054483. doi: 10.3390/biom12030360.
92. OLADIPO O. O., AYO J. O., AMBALI S. F. et al. **Dyslipdemia induced by chronic low dose co-exposure to lead, cadmium and manganese in rats: the role of oxidative stress.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2017, 53, s. 199–205. ISSN 13826689. doi: 10.1016/j.etap.2017.06.017.
93. PALATHOTI S. R., OTITOLAIYE V. O., MAHFUD R. et al. **Impacts of Mercury Exposure on Human Health, Safety and Environment: Literature Review and Bibliometric Analysis (1995 to 2021).** *International Journal of Occupational Safety and Health*. 2022, 12(4), s. 336–352. ISSN 20910878. doi: 10.3126/ijosh.v12i4.43125.
94. PAMPALONI F., REYNAUD E. G., STELZER E. H. **The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007, 8, s. 839–845. ISSN 17595037. doi: 10.1038/nrm2236.
95. PANCHAM P., JINDAL D., SINGH M. **Inoculation and Passaging of Adherent and Suspension Cells.** In: MANI S., SINGH M., KUMAR A. *Animal Cell Culture: Principles and Practise*. Springer, 2023, s. 115-130. ISBN 9783031195856. doi: 10.1007/978-3-031-19485-6.
96. PAPLOMATA E., O'REGAN R. **The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers.** *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2014, 6(4), s. 154–166. ISSN 17588359. doi: 10.1177/1758834014530023.
97. PAVESI T., MOREICA J. C. **Mechanisms and individuality in chromium toxicity in humans.** *Journal of Applied Toxicology*. 2020, 40(9), s. 1183-1197. ISSN 10991263. doi: 10.1002/jat.3965.
98. PEANA M., PELUCELLI A., CHASAPIS C. T. et al. **Biological Effects of Human Exposure to Environmental Cadmium.** *Biomolecules*. 2023, 13(1), 36. ISSN 20054483. doi: 10.3390/biom13010036.
99. PENG X., LI C., ZHAO D. et al. **Associations of micronutrients exposure with cadmium body burden among population: A systematic review.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2023, 256, s. 114878. ISSN 10902414. doi: 10.1016/j.ecoenv.2023.114878.
100. PFEIFFER E., KEGEL V., ZEILINGER K. et al. **Featured Article: Isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells.** *Experimental Biology and Medicine*. 2015, 240(5), s. 645–656. ISSN 15353699. doi: 10.1177/1535370214558025.

101. PHILIPPEOS C., HUGHES R. D., DHAWAN A. et al. **Introduction to cell culture.** *Methods in Molecular Biology*. 2012, 806, s. 1–13. ISSN 19406029. doi: 10.1007/978-1-61779-367-7_1.
102. RAMADORI G., MORICONI F. MALIK I. et al. **Physiology and pathophysiology of liver inflammation, damage and repair.** *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2008, 59(1), s. 107–117. ISSN 08675910. PMID: 18802219.
103. RAUTH S., KARMAKAR S., BATRA S. K. et al. **Recent advances in organoid development and applications in disease modeling.** *Biochimica et Biophysica Acta Reviews on Cancer*. 2021, 1875(2), s. 188527. ISSN 0304419X. doi: 10.1016/j.bbcan.2021.188527.
104. REDDY J. K., SAMBASIVA RAO M. **Lipid Metabolism and Liver Inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation.** *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2006, 290(5), s. 852–858. ISSN 15221547. doi: 10.1152/ajpgi.00521.2005.
105. RENU K., CHAKRABORTY R., MYAKALA H. et al. **Molecular mechanism of heavy metals (Lead, Chromium, Arsenic, Mercury, Nickel and Cadmium) - induced hepatotoxicity – A review.** *Chemosphere*. 2021, 271, s. 129735. ISSN 00456535. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.129735.
106. RENUGADEVI J., PRABU S. M. **Cadmium-induced hepatotoxicity in rats and the protective effect of naringenin.** *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2010, 62(2), s. 171–181. ISSN 09402993. doi: 10.1016/j.etp.2009.03.010.
107. ROGUE A., LAMBERT C., SPIRE C. et al. **Interindividual variability in gene expression profiles in human hepatocytes and comparison with HepaRG cells.** *Drug Metabolism and Disposition*. 2012, 40(1), s. 151–158. ISSN 1521009X. doi: 10.1124/dmd.111.042028.
108. RUTTKAY-NEDECKY B., NEJDL L., GUMULEC J. et al. **The Role of Metallothionein in Oxidative Stress.** *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, 14(3), s. 6044–6066. ISSN 14220067. doi: 10.3390/ijms14036044.
109. SABOLIĆ I., BRELJAK D., ŠKARICA M. et al. **Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs.** *BioMetals*. 2010, 23(5), s. 897–926. ISSN 15728773. doi: 10.1007/s10534-010-9351-z.
110. SEGERITZ C. P., VALLIER L. **Chapter 9 - Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro.** In: JALALI M, SALDANHA F. Y. L., JALALI M. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Elsevier, 2017, s. 151–172. ISBN 9780128030783. doi: 10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6.
111. SELENIUS L. A., LUNDGREN M. W., JAWAD R. et al. **The Cell Culture Medium Affects Growth, Phenotype Expression and the Response to Selenium Cytotoxicity in A549 and HepG2 Cells.** *Antioxidants*. 2019, 8(5). ISSN 20763921. doi: 10.3390/antiox8050130.
112. SHARMA O. P. **Clinical Biochemistry of Hepatotoxicity.** *Journal of Clinical Toxicology*. 2014, 4, s. 1. ISSN 21610495. doi: 10.4172/2161-0495.s4-001.

113. SHULMAN M., NAHMIA Y. **Long-Term Culture and Coculture of Primary Rat and Human Hepatocytes.** *Methods in Molecular Biology.* 2012, s. 287–302. ISSN 19406029. doi: 10.1007/978-1-62703-125-7_17.
114. SCHNACKENBERG L., YANG X., SALMINEN. **Current and emerging biomarkers of hepatotoxicity.** *Current Biomarker Findings.* 2012, s. 43–55. ISSN 22302492. doi: 10.2147/cbf.s27901.
115. SCHNEIDER E., CLARK D. S. **Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors.** *Biosensors and Bioelectronics.* 2013, 39(1), s. 1–13. ISSN 09565663. doi: 10.1016/j.bios.2012.05.043.
116. SKIPPER A., SIMS J., YEDJOU C. et al. **Cadmium Chloride Induces DNA Damage and Apoptosis of Human Liver Carcinoma Cells via Oxidative Stress.** *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2016, 13(1), s. 88. ISSN 16604601. doi: 10.3390/ijerph13010088.
117. SOUZA-ARROYO V., FABIÁN J. J., BUCIO-ORTIZ L. et al. **The mechanism of the cadmium-induced toxicity and cellular response in the liver.** *Toxicology.* 2022, 480, s. 153339. ISSN 09765131. doi: 10.1016/j.tox.2022.153339.
118. SOUZA-ARROYO V., MARTÍNEZ FLORES K., BUCIO ORTIZ L. et al. **Liver and Cadmium Toxicity.** *Journal of Drug Metabolism & Toxicology.* 2013, 3(6). ISSN 21577609. doi: 10.4172/2157-7609.s5-001.
119. STACEY G. N. **Cell Culture Contamination.** *Methods in Molecular Biology.* 2011, 731, s. 79–91. ISSN 19406029. doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_7.
120. STANLEY L. A., WOLF C. R. **Through a glass, darkly? HepaRG and HepG2 cells as models of human phase I drug metabolism.** *Drug Metabolism Reviews.* 2022, 54(1), s. 46–62. ISSN 03602532. doi: 10.1080/03602532.2022.2039688.
121. SU S., DI POTO C., ROY R. et al. **Long-term culture and characterization of patient-derived primary hepatocytes using conditional reprogramming.** *Experimental Biology and Medicine.* 2019, 244(11), s. 857–864. ISSN 15353699. doi: 10.1177/1535370219855398.
122. TESSARI P., CORACINA A., COSMA A. et al. **Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease.** *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* 2009, 19(4), s. 291–302. ISSN 15903729. doi: 10.1016/j.numecd.2008.12.015.
123. ULRICH A. B., POUR P. M. **Cell Lines.** In: MALOY S., HUGHES K. *Brenner's Encyclopedia of Genetics.* Second Edition. Elsevier, 2013, s. 481–482. ISBN 9780123749840.
124. WANDERS R. J. A., KOMEN J., KEMP S. **Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans.** *FEBS Journal.* 2010, 278(2), s. 182–194. ISSN 17424658. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07947.x.
125. WANG J., FANG Z., LI Y. et al. **Ameliorative Effects of Oyster Protein Hydrolysates on Cadmium-Induced Hepatic Injury in Mice.** *Marine Drugs.* 2022, 20(12), s. 758. ISSN 16603397. doi: 10.3390/md20120758.
126. WANG L., ZHENG M., ZHANG S. et al. **Roles of mtDNA damage and disordered Ca²⁺ homeostasis in the joint toxicities of cadmium and BDE209.** *Ecotoxicology*

- and Environmental Safety. 2019, 186, s. 109767. ISSN 01476513. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.109767.
127. WANI A. L., ARA A., USMANI J.A. **Lead toxicity: a review.** *Interdisciplinary Toxicology*. 2015, 8(2), s. 55–64. ISSN 13376853. doi: 10.1515/intox-2015-0009.
128. WESTERINK W. M. A., SCHOONEN W. G. E. J. **Phase II enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells.** *Toxicology in Vitro*. 2007, 21(8), s. 1592–1602. ISSN 08872333. doi: 10.1016/j.tiv.2007.06.017.
129. WU C., ZHANG Y., CHAI L. et al. **Histological changes, lipid metabolism and oxidative stress in the liver of Bufo gargarizans exposed to cadmium concentrations.** *Chemosphere*. 2017, 179, s. 337–346. ISSN 00456535. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.03.131.
130. WU H., ZHENG S., ZHANG J. et al. **Cadmium induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pig pancreas via the increase of Th1 cells.** *Toxicology*. 2021, 457, s. 152790. ISSN 09765131. doi: 10.1016/j.tox.2021.152790.
131. XIONG X., ZHANG Y., XING H. et al. **Ameliorative Effect of Selenomethionine on Cadmium-Induced Hepatocyte Apoptosis via Regulating PI3K/AKT Pathway in Chickens.** *Biological Trace Element Research*. 2019, 195(2), s. 559–568. ISSN 15590720. doi: 10.1007/s12011-019-01858-5.
132. YAO T., ASAYAMA Y. **Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues.** *Reproductive Medicine and Biology*. 2017, 16(2), s. 99–117. ISSN 14455781. doi: 10.1002/rmb2.12024.
133. YE J.-L., MAO W.-P., WU A.-L. et al. **Cadmium-induced apoptosis in human normal liver L-02 cells by acting on mitochondria and regulating Ca²⁺ signals.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2007, 24(1), s. 45–54. ISSN 13826689. doi: 10.1016/j.etap.2007.01.007.
134. ZEILINGER K., FREYER N., DAMM G. et al. **Cell sources for in vitro human liver cell culture models.** *Experimental Biology and Medicine*. 2016, 241(15), s. 1684–1698. ISSN 15353699. doi: 10.1177/1535370216657448.
135. ZHAO M., MA J., LI M. et al. **Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans.** *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(23), s. 12808. ISSN 14220067. doi: 10.3390/ijms222312808.
136. ZILLER A., FRAISSINET-TACHET L. **Metallothionein diversity and distribution in the tree of life: a multifunctional protein.** *Metallomics*. 2018, 10(11), s. 1549–1559. ISSN 17565901. doi: 10.1039/c8mt00165k.
137. ZOU H., SUN J., WU B. et al. **Effects of Cadmium and/or Lead on Autophagy and Liver Injury in Rats.** *Biological Trace Element Research*. 2020, 198(1), s. 206–215. ISSN 15590720. doi: 10.1007/s12011-020-02045-7.