

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**STANOVENÍ VYBRANÝCH BIOMARKERŮ
NEFROTOXICITY V MOČI A V PLAZMĚ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Aneta Pražáková

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí své diplomové práce RNDr. Janě Maixnerové, Ph.D. za její ochotu, trpělivost, vstřícnost, cenné rady, připomínky a za pomoc při měření i následném zpracování dat. Dále bych ráda poděkovala rodině, přátelům a kolegům, kteří mě podporovali během celého studia, až k úspěšnému dokončení této práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Aneta Pražáková

Školitel: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Název diplomové práce: Stanovení vybraných biomarkerů nefrotoxicity v moči a v plazmě

Objev a vývoj nových biomarkerů, které mohou být použity pro diagnostiku poškození ledvin dříve a přesněji, je nezbytný pro účinnou prevenci nefrotoxicity vyvolané léky. Mechanismy nefrotoxicity vyvolané léky, zahrnují změny glomerulární hemodynamiky, toxicity tubulárních buněk, zánětu, krystalické nefropatie atd. Detekce v počátečním stadiu poškození pomocí citlivých a specifických biomarkerů patří mezi jednu z nejdůležitějších strategií v léčbě akutního poškození ledvin a selhání ledvin. Ačkoli některé tyto biomarkery nevykazují specifickou a senzitivitu, bylo nedávno stanoveny několik slibných kandidátů na biomarkery pro hodnocení nefrotoxicity, např. vybrané KIM-1, cystatin C a NGAL. Výhody těchto biomarkerů ve srovnání s tradičně používanými biomarkery jsou: vyšší citlivost, specifita, již zmíněná včasná diagnóza a neinvazivnost (možnost stanovení hladin biomarkerů z krve nebo moči).

Cílem této diplomové práce bylo zjistit hladinu vybraných biomarkerů KIM 1, cystatin C a NGAL v moči a plazmě potkanů. Vyhodnocení bylo provedeno analytickou metodou ELISA. Tato metoda byla zavedena a optimalizována v našich laboratorních podmínkách. Naše výsledky ukázaly pozitivní korelaci rostoucí hladiny vybraných biomarkerů a rostoucího poškození ledvin, tj. vyšších koncentrací gentamicinu aplikovaných na krysy. Zvýšené hladiny biomarkerů v moči a plazmě jsme pozorovali i při nízkých nefrotoxických dávkách gentamicinu. Na druhé straně byly tyto biomarkery detekovány při minimálních koncentracích u kontrolních potkanů se zdravými ledvinami.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Aneta Pražáková

Supervisor: RNDr. Jana Maixnerová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Determination of selected biomarkers of nephrotoxicity in urine and Plasma

The discovery and development of novel biomarkers, that can be used for diagnosis of kidney damage earlier and more accurately, are needed for the effective prediction of drug-induced nephrotoxicity. Mechanisms of drug-induced nephrotoxicity include changes in glomerular hemodynamics, tubular cell cytotoxicity, inflammation, crystalline nephropathy, etc. Detection at initial stage of damage using sensitive and specific biomarkers belongs between one of the most important strategies in the treatment of acute kidney injury and renal failure. Although some these biomarkers do not show specificity and sensitivity, several promising biomarker candidates have been established recently to evaluate nephrotoxicity, e.g. selected KIM-1, cystatin C and NGAL. The advantages of these biomarkers compared to traditionally used biomarkers are higher sensitivity, specificity, just mentioned early diagnosis and non-invasiveness (the possibility of determination levels of the biomarkers from blood or urine).

The aim of this diploma thesis was to determine level of selected biomarkers KIM-1, cystatin C and NGAL in rat urine and plasma. The evaluation was performed using analytical ELISA method. This method has been introduced and optimized in our laboratory conditions. Our results showed positive correlation of increasing level of selected biomarkers and increasing kidney damage, i.e. higher concentrations of gentamicin applied to rats. We observed elevated urinary and plasma levels of mentioned biomarkers even at low nephrotoxic doses of gentamicin. On the other hand, these biomarkers were detected at minimal concentrations in control rats with healthy kidneys.

OBSAH

1.	SEZNAM ZKRATEK	8
2.	ÚVOD.....	9
3.	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	LEDVINY	10
3.2	NEFROTOXICITA.....	10
3.2.1	AKUTNÍ POŠKOZENÍ LEDVIN	12
3.2.2	CHRONICKÉ ONEMOCNĚNÍ LEDVIN	13
3.3	BIOMARKERY	14
3.3.1	CYSTATIN C	16
3.3.2	KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1).....	18
3.3.3	NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin)	19
3.4	GENTAMICIN	20
3.5	TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY IN VITRO – SENDVIČOVÁ ELISA.....	22
4.	CÍL PRÁCE.....	25
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
5.1.	MATERIÁL	26
5.1.1.	Použité přístroje a zařízení.....	26
5.1.2.	Laboratorní pomůcky.....	26
5.1.3.	Použité kity	26
5.1.4.	Použité chemikálie	26
5.2.	METODIKA	27
5.2.1.	Příprava moči nebo plazmy	27
5.2.2.	Příprava roztoků.....	27
5.2.3.	KIM-1	28
5.2.4.	Cystatin C	29
5.2.5.	NGAL	31
5.2.6.	Postup ELISY	32
5.2.7.	Hodnocení experimentálních dat	33
6.	VÝSLEDKY.....	35
6.1.	Stanovení standardní křivky pro KIM-1	35
6.2.	Stanovení KIM-1.....	36
6.3.	Stanovení standardní křivky pro cystatin C	38
6.4.	Stanovení cystatinu C.....	39

6.5.	Stanovení standardní křivky pro NGAL	41
6.6.	Stanovení NGAL.....	42
7.	DISKUZE	46
8.	ZÁVĚR.....	49
9.	LITERATURA.....	50

1. SEZNAM ZKRATEK

ACEi	inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu
Ag	antigeny
AKI	Acute Kidney Injury (akutní poškození ledvin)
ALP	alkalická fosfatáza
BUN	močovinový dusík v krvi
cysC	cystatin C
CKD	Chronic Kidney Disease (chronické poškození ledvin)
DTPA	diethyltriaminopentaoctová kyselina
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESKD	onemocnění ledvin v konečném stádiu
FGF-23	fibroblastový růstový faktor 23
GF	glomerulární filtrace
GFR	rychlost glomerulární filtrace
GM	gentamicin
HRP	křenová fosfatáza
KIM-1	Kidney Injury Molecule-1 (molekula poškození ledvin-1)
MDD	vícenásobné denní dávkování
NGAL	neutrofilní s gelatinázou asociovaný lipokalin
NSAID	nesteroidní protizánětlivá léčiva
P1, P2, P3	potkan č.1, č. 2, č. 3
PBS	fosfátový pufr
RF	rizikové faktory
SCr	sérový kreatinin
TMB substrát	chromogenní substrát určený pro detekci enzymové aktivity v metodě ELISA (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)

2. ÚVOD

Akutní poškození ledvin (AKI) a akutní selhání ledvin představují závažný problém současné medicíny. Jejich úspěšná léčba je úzce spojena s včasnou diagnostikou již v počátečním stadiu vývoje poškození. Poranění ledvin začíná indukci biologických a molekulárních změn, které se nakonec vyvinou do poškození buněk, což umožňuje měřit širokou škálu molekul, např. biomarkery. Měření funkce ledvin se běžně provádí pomocí koncentrace kreatininu v séru (SCr), hladiny močovinnového dusíku v krvi (BUN) a analýzy moči. Hromadí se důkazy však ukázaly, že tyto biomarkery jsou pro detekci onemocnění ledvin v raných stádiích nedostačující. Výzkum v oblasti biomarkerů výrazně vzrostl a každý rok se zavádějí nové potenciální markery (Wasung et al. 2015).

Objev a vývoj nových biomarkerů, které mohou dříve a přesněji diagnostikovat poškození ledvin, je nezbytný pro vývoj nových léčiv, účinnou prevenci nefrotoxicity vyvolanou léky, dále pro včasnou diagnózu, vyšší citlivost a specifitu oproti tradičním biomarkerům (Kim a Moon 2012). Kromě toho může včasná detekce poškození ledvin vést k dřívější nefrologické konzultaci a optimálnějšímu dávkování léčiv (např. antibiotik) (Edelstein Ch. L. 2008).

Při vývoji léčiv je velmi žádoucí minimalizovat nefrotoxicitu především kvůli zdraví, ale i z důvodu ekonomické stránky. Proto jsou také potřeba snadno kvantifikovatelné a citlivé biomarkery, které by případnou nefrotoxicitu zachytily již při počátcích vývoje léčiv. V dnešní době jsou testy dostupné pro detekci toxicity a časného ischemického poškození ledvin, buď invazivní a obtížně kvantifikovatelné nebo neinvazivní, nespecifické a necitlivé. Bylo zjištěno, že pro studie na zvířatech i pro použití u lidí, kde včasná detekce poškození ledvin ovlivní terapii a potenciálně nemocnost a úmrtnost, jsou zapotřebí lepší biomarkery pro poškození ledvin (Vaidya et al. 2006).

To je i důvodem, proč jsme si vybrali pro naši diplomovou práci stanovení nových biomarkerů, (Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1), cystatin C (cysC) a Neutrofilní s gelatinázou asociovaný lipokalin (NGAL)), které jsou citlivé pro dřívější a přesnější diagnostiku nefrotoxicity oproti tradičním biomarkerům. Jako vzorek ke stanovení těchto biomarkerů byla zvolena především potkaní moč kvůli jejímu neinvazivnímu způsobu získávání a jako zdroj nefrotoxicity jsme zvolili aminoglykosidové antibiotikum gentamicin (GM).

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 LEDVINY

Ledviny jsou nezbytným orgánem při plnění několika důležitých funkcí v organismu, a to včetně udržování homeostázy a regulace extracelulárního prostředí, jako je detoxikace a vylučování toxických metabolitů a léčiv. To je důvod, proč je ledvina považována za jeden z hlavních cílových orgánů pro exogenní toxické látky (Kim a Moon 2012). Ledviny mají tedy důležitou roli při eliminaci potenciálně toxických xenobiotik včetně léčiv, toxinů i endogenních metabolitů. Renální eliminace léčiv zahrnuje glomerulární filtraci (GF), tubulární sekreci a tubulární reabsorpci (Inui et al. 2000). V klinické praxi je rychlost glomerulární filtrace (GFR), kromě její užitečnosti pro výzkum a veřejné zdraví, rozhodující pro diagnostiku, léčbu, dávkování léků a prognózu. GFR je objem tekutiny filtrované z glomerulárních kapilár do Bowmanova váčku za jednotku času. Hodnoty GFR jsou spojeny s věkem, pohlavím a povrchem těla. S věkem GFR klesá (Lopez-Giacoman et al. 2015). Ledviny jsou metabolicky vysoce aktivní a vyžadují vysoký obsah kyslíku (Webster et al. 2017). Vzhledem k relativně vysokému průtoku krve a schopnosti extrahovat a koncentrovat ve vodě rozpustné toxické molekuly jsou ledviny náchylné k poškození, vyvolanému léky (Randjelović et al. 2017).

3.2 NEFROTOXICITA

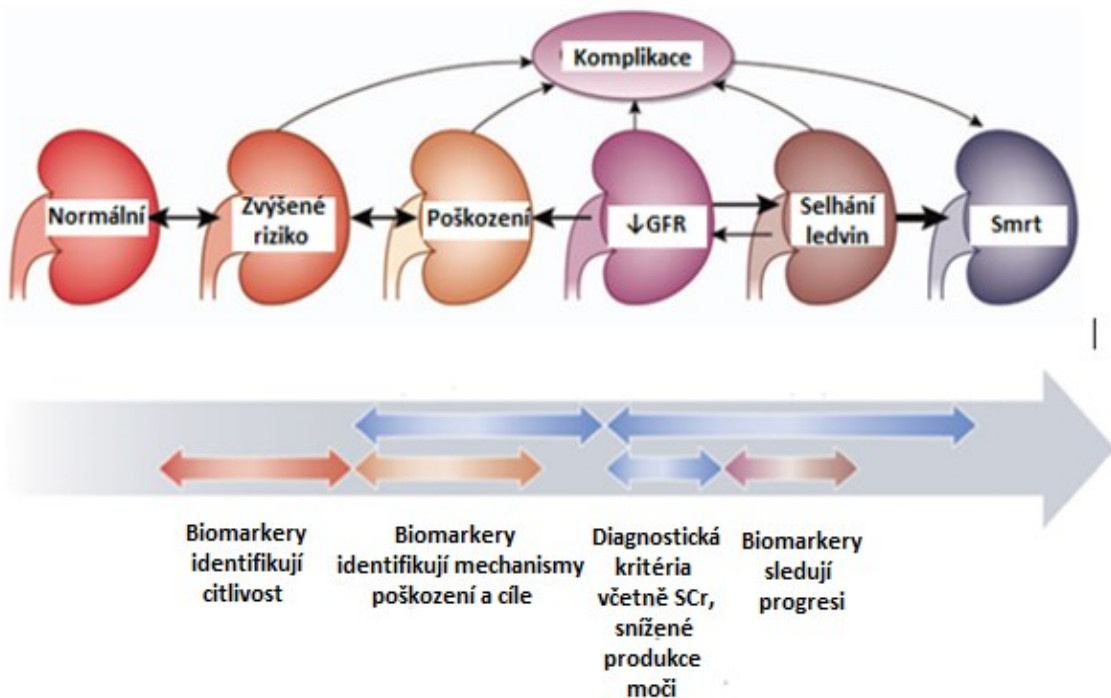
Nefrotoxicita neboli selhání funkce ledvin či renální insuficience se vyskytuje při nedostatečném plnění detoxikačních a vylučovacích ledvinných funkcí, a to kvůli exogenním nebo endogenním toxickým látkám, škodlivým pro ledviny (Kim a Moon 2012). Ledviny nejsou schopny vylučovat dusíkaté katabolity, vodu a elektrolyty. Hromadící odpadní látky mohou škodit nejen ledvinám, ale i ostatním orgánům (Teplan V., 2006).

Nefrotoxicita vyvolaná léčivem je jedním z nejčastějších nežádoucích účinků, pozorovaných při dlouhodobých farmakoterapiích, a je úzce spojena s akutním poškozením ledvin (AKI) a s chronickým onemocněním ledvin (CKD) (Campos et al. 2018).

Toxické látky mohou poškodit různé typy buněk v ledvinách. Nejstudovanějším účinkem je nekróza tubulárních epiteliálních buněk (Randjelović et al. 2017). Mechanismy nefrotoxicity vyvolané léky zahrnují změny glomerulární hemodynamiky, toxicitu tubulárních buněk, zánět, krystalickou nefropatii a trombotickou mikroangiopatii (Kim a Moon 2012).

Pro posouzení nefrotoxicity byly identifikovány biomarkery jako rychlý ukazatel poškození ledvin (Kim a Moon 2012). Renální dysfunkci a poškození lze diagnostikovat např. pomocí měření tradičních biomarkerů jako je např. BUN, koncentrace SCr, GFR, analýzy v moči, glykosurie či proteinurie (Vaidya et al. 2006). Toto hodnocení nefrotoxicity je však možné pouze tehdy, je-li poškozena většina funkce ledvin (Kim a Moon 2012).

Renální poškození lze rozdělit na prerenální, renální a postrenální a také podle časového hlediska na AKI a CKD. Stádia renálního poškození či selhání a potenciální využití biomarkerů pro AKI je zobrazeno na obr. 1.



Obr. 1 Stadia renálního poškození a selhání a využití biomarkerů pro akutní poškození ledvin.

Modifikováno dle: Murray et al. (2014)

3.2.1 AKUTNÍ POŠKOZENÍ LEDVIN

Akutní poškození ledvin (AKI) se často vyznačuje náhlým zhoršením či ztrátou renálních funkcí, které jsou primárně detekovány měřením nárůstu tradičních biomarkerů (Sinha et al. 2015). AKI je tedy charakterizováno sníženou GFR, zvýšením hladiny SCr a BUN a snížením produkce moči (oligurie). Dále je následkem řady onemocnění, které mohou akutně poškodit funkce ledvin (Farrar Ashley 2018). AKI je klasifikován podle stadia a příčiny, obvykle se vyskytuje při léčbě akutních nebo chronických onemocnění (Soares et al. 2017).

Nejběžnějšími typy AKI jsou prerenální a intrarenální. Prerenální typ se vyskytuje nejčastěji a je způsoben sníženou perfuzí ledvin nebo krevním oběhem. Intrarenální typ ischemií a postrenální typ je vyvolán obstrukcí. Příčiny AKI jsou založeny na struktuře poškození ledvin (tubuly, glomeruly, intersticiem a intrarenální krevní cévy), tedy se vyznačuje vaskulárními a tubulárními změnami (Farrar et al. 2018). Toxicita léčiva je běžná kvůli změně farmakokinetice a farmakodynamice (Levey et al. 2017). Nejčastěji uváděnými nefrotoxickými léky jsou antibiotika aminoglykosidového charakteru (GM, tobramycin), následované analgetiky, nesteroidní protizánětlivá léčiva (NSAID), chemoterapeutiky, kontrastními prostředky apod. (Vaidya et al. 2008). Mezi další příčiny AKI patří infekce, vaskulitida, chirurgický zákrok, neoplázie a blokáda močových cest ledvinovými kameny (Yerramilli et al. 2016).

AKI obvykle nemá žádné příznaky, dokud ledviny nezačnou selhávat. Akutní poškození ledvin souvisí s retencí kreatininu, močoviny a dalších metabolických odpadních produktů, které se normálně vylučují ledvinami (Levey et al. 2017), to může způsobit život ohrožující komplikace, poněvadž se v těle hromadí tekutina a odpad. Proto je životně důležité jeho včasné odhalení a včasný zásah k nápravě reverzibilních příčin, nalezení a jeho léčba (Farrar Ashley 2018).

AKI se běžně vyskytuje u kriticky nemocných pacientů a má významný dopad na úmrtnost, progresivní chronické onemocnění ledvin a kardiovaskulární onemocnění (Teo et al. 2017). Považuje se za nezávislý rizikový faktor (RF) pro dlouhodobou úmrtnost a pro budoucí vývoj CKD (Wasung et al. 2015). Byly objeveny a validovány různé nové AKI biomarkery za účelem zlepšení včasné detekce, diferenciací a stratifikace do rizikových skupin progresivního renálního poklesu a potřeby renální substituční terapie nebo smrti (Teo et al. 2017).

3.2.2 CHRONICKÉ ONEMOCNĚNÍ LEDVIN

Chronické onemocnění ledvin (CKD) je definováno jako přítomnost funkční nebo strukturální abnormality v ledvinách přetrvávající déle než 3 měsíce. To zahrnuje např. snížení GFR $< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$, albuminurii (albumin v moči 30 mg za 24 h), známky poškození ledvin (např. hematurii nebo strukturální abnormality) nebo renální tubulární poruchy či transplantaci ledvin apod (Chen et al. 2019). CKD je tiché onemocnění, které může zůstat až do pokročilého stádia asymptomatické (Yerramilli et al. 2016).

CKD vzniká z mnoha heterogenních chorobných cest, které nevratně mění funkci a strukturu ledvin v průběhu měsíců nebo let (Webster et al. 2017). Konečným běžným patologickým projevem mnoha CKD je renální fibróza (Webster et al. 2017). Patologické abnormality poškození ledvin se prokazují biopsií, zobrazením, změnami sedimentu v moči nebo proteinurií (Lopez-Giacoman et al. 2015). Patofyziologie CKD je složitá a zahrnuje progresi několika procesů. V některých případech se jedná o základní primární onemocnění ledvin. Komorbidita, neboli současný výskyt více nemocí u jednoho pacienta, je přítomna prakticky u všech pacientů s CKD, proto jediný biomarker nestačí k jeho určení (Wasung et al. 2015). Mezi komorbidity patří např. hypertenze, diabetes, autoimunitní onemocnění nebo chronické infekce (Chen et al. 2019).

Diagnóza se běžně provádí na základě náhodných nálezů ze screeningových testů nebo když se příznaky zhoršují. Nejlepší dostupný indikátor celkové funkce ledvin je GFR, který se měří buď pomocí exogenních markerů (např. DTPA (diethyltriaminopentaoctová kyselina), iohexol) nebo se odhaduje pomocí rovnic (Webster et al. 2017).

Optimální léčba CKD zahrnuje snížení kardiovaskulárního rizika, léčbu albuminurie, vyhýbání se potenciálním nefrotoxinům a úpravu dávkování léků. Včasná detekce a léčba lékaři je potřebná, protože progresivní CKD je spojena s nepříznivými klinickými výsledky, a to včetně onemocnění ledvin v konečném stadiu (ESKD), kardiovaskulárních chorob a zvýšené úmrtnosti (Chen et al. 2019). CKD je také jedním z nejdůležitějších prediktorů zranitelnosti vůči AKI po vystavení RF jako jsou nefrotoxická léčiva nebo velké operace (Yerramilli et al. 2016).

CKD se obvykle vyvíjí po mnoho let s dlouhým latentním obdobím, kdy je onemocnění klinicky tiché, a proto jsou diagnóza, hodnocení a léčba založeny hlavně na biomarkerech, které posuzují funkci ledvin (Lopez-Giacoman et al. 2015). Monitorování

renálních funkcí u CKD vyžaduje biomarkery, které poskytují rychlá, neinvazivní a specifická měření, která dobře korelují s patologií tkáně ledvin. Včasná identifikace pacientů s CKD je důležitá pro včasné zásahy a snížení progresu selhání ledvin nebo kardiovaskulárních příhod (Wasung et al. 2015).

3.3 BIOMARKERY

Biomarker je definován jako parametr strukturální, biochemické, fyziologické nebo genetické změny, který poukazuje na přítomnost, závažnost nebo průběh nemoci (Wasung et al. 2015). Lze ho považovat za indikátor fyziologického nebo nezdravého procesu, který má diagnostickou anebo prognostickou užitečnost se schopností přesného a reprodukovatelného měření (Yerramilli et al. 2016). Biomarkery se označují za biomolekuly ukazující vztah mezi exogenními toxickými látkami a nemocemi a slouží pro hodnocení nefrotoxicity (Kim a Moon 2012).

Tradiční standardní markery, jako je BUN, SCr či proteinurie, mají nízkou citlivost a specificitu, a proto bývá časování diagnózy a léčby zpožděno (Kim a Moon 2012). Biomarkery nejsou vždy specifické pro příslušný orgán, poněvadž některé proteinové markery jsou vylučovány více tkáněmi. Jako příklad lze uvést NGAL, klastrovou messengerovou RNA nebo alkalickou fosfatázu (ALP) (Yerramilli et al. 2016).

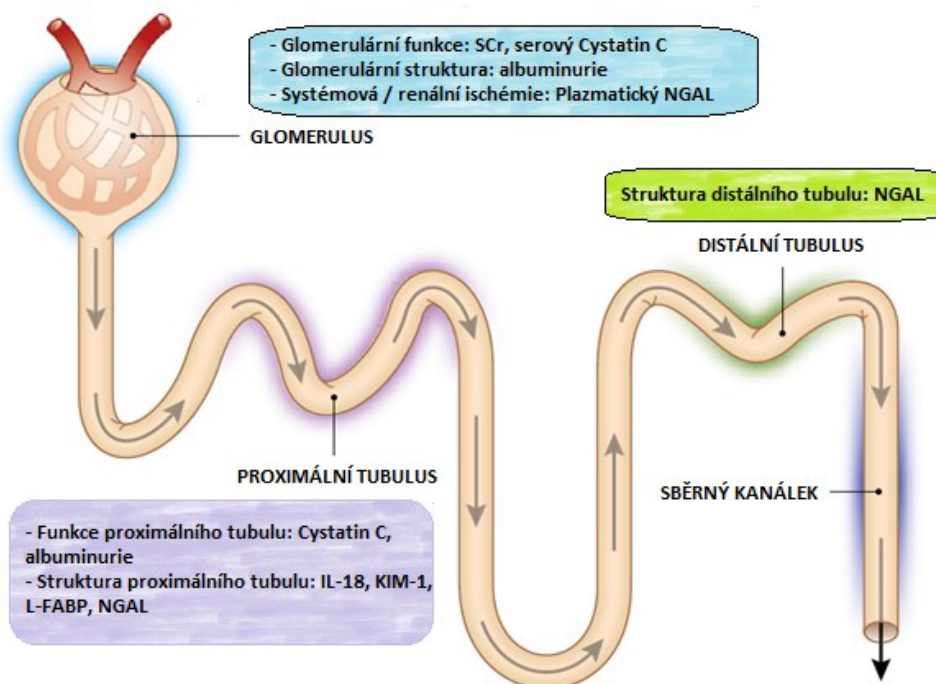
AKI a CKD jsou nemoci, které výrazně zvyšují morbiditu a úmrtnost. Obě tyto nemoci mají snížený počet nefronů, vaskulární nedostatečnost a narušen buněčný cyklus. Z tohoto důvodu jsou biomarkery (NGAL, KIM-1 a cysC) přítomny u obou nemocí. AKI a CKD mohou tedy navzájem společně koexistovat a proto je nepravděpodobné, že by jediný biomarker stačil k včasné detekci poškození ledvin (Wasung et al. 2015). Ke zvýšení diagnostické přesnosti lze zkombinovat funkční biomarkery a markery poškození (Teo et al. 2017).

Existuje řada slibných nových biomarkerů, které pomohou lépe stanovit výsledky a progresi AKI a CKD (Tummalapalli et al. 2016). Zejména KIM-1 a NGAL jsou považovány za vhodné biomarkery v moči a plazmě pro včasnou predikci AKI. NGAL, cysC a fibroblastový růstový faktor 23 (FGF-23) jsou slibné biomarkery pro detekci

CKD. Kombinace dvou biomarkerů např. cysC a SCr funguje lépe, zejména v situacích, kdy je třeba potvrdit CKD (Wasung et al. 2015).

CysC a NGAL jsou nejcitlivějšími markery včasné detekce poškození ledvin při proximálním tubulárním poškození, ale subchronické nebo chronické poškození se nejlépe projevuje u KIM-1. Ačkoli se NGAL jeví jako specifitější marker pro tubulární poškození ve srovnání s cysC, tato myšlenka byla zpochybněna zjištěním, že NGAL se také zvyšuje v modelu glomerulárního poškození. To by mohlo odrážet generalizované (glomerulární a tubulární) poškození nebo by to mohlo znamenat, že biomarker není specifický pro místo poškození (Van Meer et al. 2014).

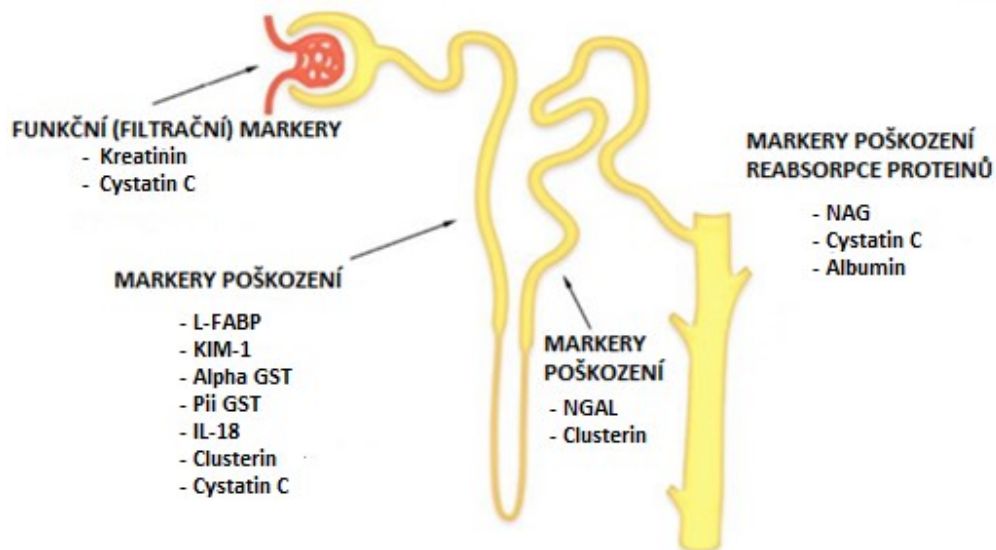
KIM-1, cysC a NGAL mají výhodu v možnosti stanovení svých hladin z krve nebo moči v důsledku expozice např. nefrotoxických látek. Zejména moč je považována za atraktivní a účinný vzorek, protože je neinvazivní a snadno získatelná (Kim a Moon 2012). Tyto a další biomarkery rozdělené podle jejich anatomického místa působení lze vidět na obr. 2.



Obr. 2 Biomarkery akutního poškození ledvin rozdělené podle jejich anatomického místa působení.

Modifikováno dle: Koyner a Parikh (2013)

Biomarkery nalezené v krvi jsou považovány za glomerulární a jsou rozděleny jako biomarkery funkčního, strukturálního nebo ischemického poškození ledvin. Močové biomarkery jsou mapovány podél nefronu a stratifikovány jako biomarkery funkčního nebo strukturálního renálního tubulárního poškození (obr. 2 nebo obr. 3).

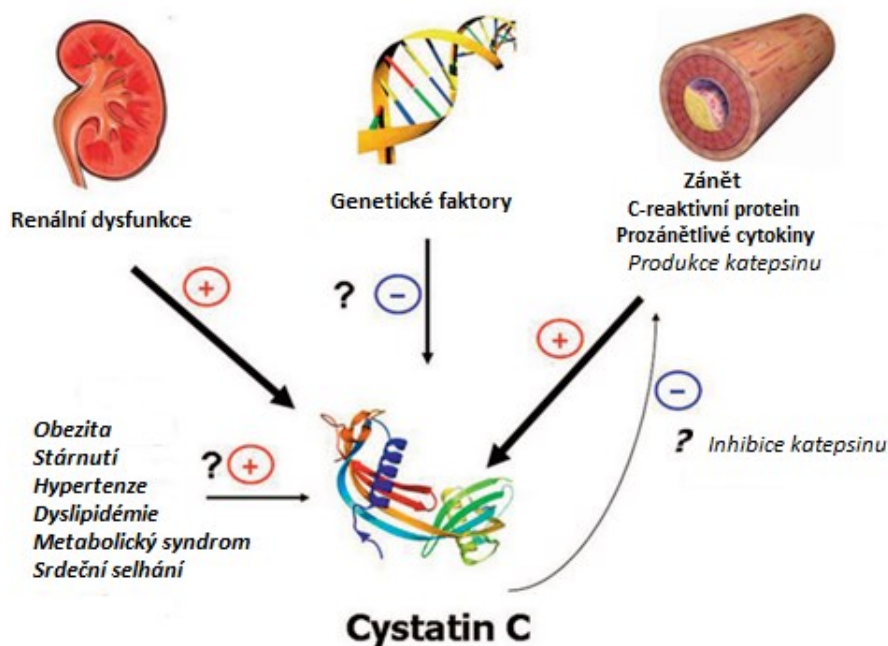


Obr. 3 Biomarkery akutního poškození ledvin.

Modifikováno dle: Malyszko et al. (2015)

3.3.1 CYSTATIN C

Cystatin C (cysC) je inhibitor cysteinových proteáz (Tummalapalli et al. 2016), je to nízkomolekulární protein o velikosti 13 kDa, který je složen ze 122 aminokyselin (obr. 4). Tento protein se volně filtruje glomerulem a téměř úplně reabsorbuje v proximálním tubulu. Na rozdíl od SCr se cysC nevylučuje ledvinovými tubuly. Tato kombinace vlastností znamená, že hladiny cysC v séru jsou stanoveny téměř výhradně GF (Teo et al. 2017). CysC je tedy volně filtrován, reabsorbován a zcela metabolizován v tubulárních buňkách (Lopez-Giacoman et al. 2015). Po filtraci glomerulem se cysC zcela katabolizuje, tedy odráží skutečný GFR v krvi, a proto ho lze použít ke sledování obecné funkce ledvin (Van Meer et al. 2014).



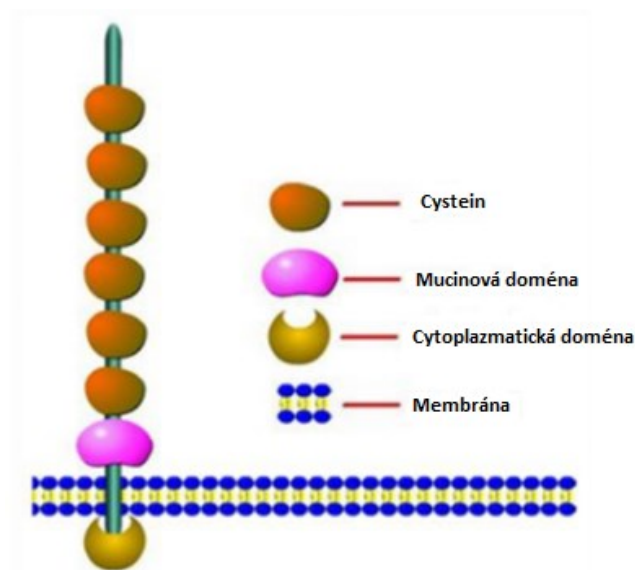
Obr. 4 Struktura cystatinu C a mechanismy spojující dysfunkci ledvin, zánět, aterogenezi a kardiovaskulární příhody.

Modifikováno dle: Taglieri et al. (2009)

CysC je užitečný pro detekci AKI a je lepším markerem GFR než SCr. Po poškození funkce ledvin hladiny cysC rychle stoupají. CysC může být ovlivněn C-reaktivním proteinem, což naznačuje, že je markerem zánětu (Edelstein Ch. L. 2008). Hladiny markeru však mohou být zvýšené u pacientů s rakovinou, dysfunkcí štítné žlázy, HIV, užíváním kortikoidů a jinými stavy (obr. 4) (Tummalapalli et al. 2016). CysC se považuje za lepší marker včasné renální dysfunkce a spolehlivější marker renální funkce (Wasung et al. 2015). Hladiny cysC v moči umožňují detekci tubulární funkce, poškození tubulů brání reabsorpci cysC, což vede ke zvýšeným hladinám v moči (Huang et al. 2014). Organová specificita cysC je však nízká. Pro rozlišení mezi tubulárním a glomerulárním poškozením se doporučují jiné biomarkery nebo je vhodné použít cysC v kombinaci s konkrétnějšími markery, aby se lokalizoval původ pozorovaného účinku (Van Meer et al. 2014).

3.3.2 KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1)

KIM-1 je transmembránový glykoprotein typu I (obr. 5), který obsahuje extracelulární mucin a Ig domény (Binnenmars et al. 2017), je to epitelový fagocytární receptor, který je výrazně up-regulován v proximálním tubulu v různých formách AKI a CKD (Ferenbach et al. 2016). Bazální exprese KIM-1 je v normální ledvině nízká. Po jejím poškození je však up-regulován ve výše zmíněných buňkách (Binnenmars et al. 2017). Močový KIM-1 je signifikantně zvýšen po léčbě známými nefrotoxickými léčivy jako jsou aminoglykosidová antibiotika nebo cisplatina. Pokud jsou ledviny vystaveny toxickým látkám nebo se poškodí ischemií či reperfuzí, lze KIM-1 použít jako citlivější biomarker než tradiční nefrotoxické biomarkery. KIM-1 umožňuje včasnou detekci poškození proximálního tubulu, rozlišení mezi glomerulárním a tubulárním poškozením a posouzení reverzibilitnosti a regenerace. KIM-1 lze také použít k detekci subchronického a chronického poškození ledvin (Van Meer et al. 2014; Edelstein Ch. L. 2008).



Obr. 5 Molekulární struktura KIM-1.

Převzato z: Anonym (2014)

Expresa KIM-1 koreluje s proximálním tubulárním poškozením, renální tubulární regenerací a imunitní odpovědí nefrotoxických látek (Kim a Moon 2012). Po poranění se ektodoména (extracelulární doména KIM-1) vylučuje z proximálních tubulárních

epiteliálních ledvin do moči a hladina exprese KIM-1 se v moči zvyšuje (Huang et al. 2014).

KIM-1 byl schválen jako močový biomarker pro sledování preklinické nefrotoxicity vyvolané léky u potkanů (Sabbisetti et al. 2013). Existuje několik vlastností, které naznačují, že KIM-1 je ideální jako biomarker poškození ledvin. Ve zdravé ledvině je nezjistitelný, ale může se zde vyskytovat v nízkých hladinách. Převážně je exprimován na apikální membráně epitelových buněk proximálního tubulu po ischemickém nebo toxickém poškození a zde přetrvává v epiteliálních buňkách až do zotavení (Teo et al. 2017). Dále to je neinvazivní, rychlý, citlivý, specifický a reprodukovatelný biomarker sloužící pro včasnou detekci (Edelstein Ch. L. 2008). Časným biomarkerem pro proximální tubulární poškození je proto, že je exprimován v moči během prvních 12 hodin tohoto poškození (Lopez-Giacoman et al. 2015).

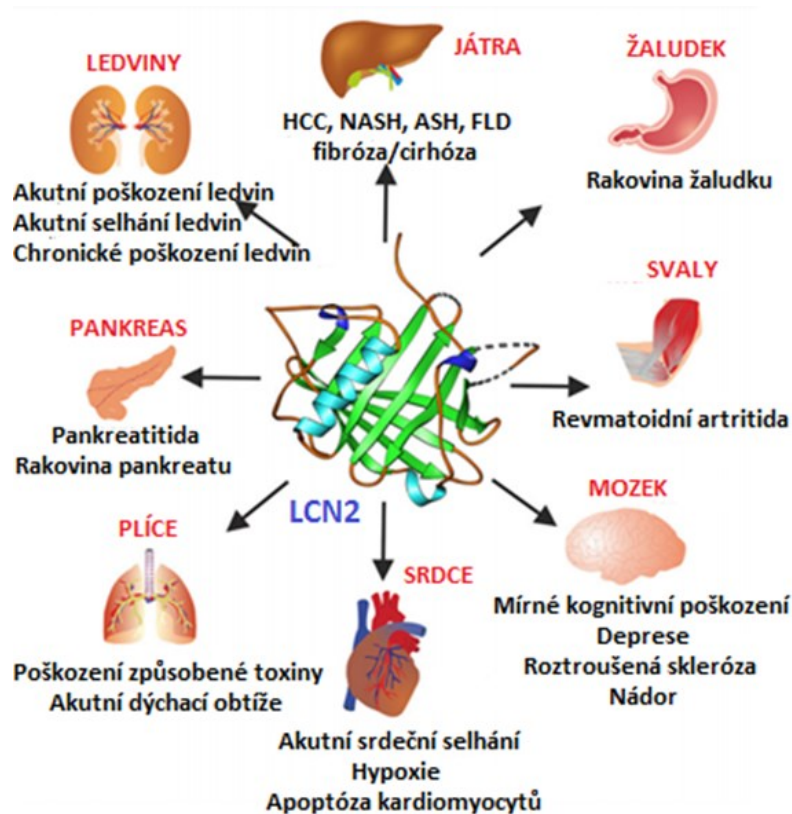
3.3.3 NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin)

NGAL neboli lipokalin spojený s neutrofilní gelatinázou je také známý jako siderocalin nebo lipocalin 2 a patří do nadrodiny lipokalinů (Teo et al. 2017). Tyto lipokaliny jsou zapojené do regulace imunitních odpovědí, transportu železa, modulace růstu a metabolismu buněk (Huang et al. 2014). NGAL je znám jako citlivý biomarker pro včasnou diagnostiku AKI, protože jeho exprese je zvýšena v buňkách proximálního tubulu nefrotoxicitou nebo ischemií vyvolanou léčivem (Kim a Moon 2012).

NGAL je všudypřítomný protein nesoucí železo, vysoce exprimován v renálním tubulárním epitelu a uvolňován po poškození ledvin (Tummalapalli et al. 2016). Jeho primární funkce není jasná, ale pravděpodobně souvisí s její schopností vázat extracelulární železo (Yerramilli et al. 2016). NGAL je nejvíce regulovaným a nejrozšířenějším biomarkerem ve studiích časného AKI.

NGAL je malý sekretovaný polypeptid, který je rezistentní na proteázu, a proto může být snadno detekován v moči (Edelstein Ch. L. 2008). NGAL je exprimován a vylučován imunitními buňkami, hepatocyty, adipocyty, epiteliálními buňkami a renálními tubulárními buňkami v různých patologických stavech např. v buňkách dělohy, prostaty, slinných žláz, plic, průdušnice, ledvin atd. (obr. 6) (Yerramilli et al. 2016). Lidská NGAL existuje ve třech různých formách: monomer 25 kDa, homodimer 45 kDa

a heterodimer 135 kDa. Po AKI je NGAL v moči převážně monomerní, zatímco dimerní forma je častější při infekci močových cest a heterodimerní forma je specifická pro neutrofilů (Teo et al. 2017).



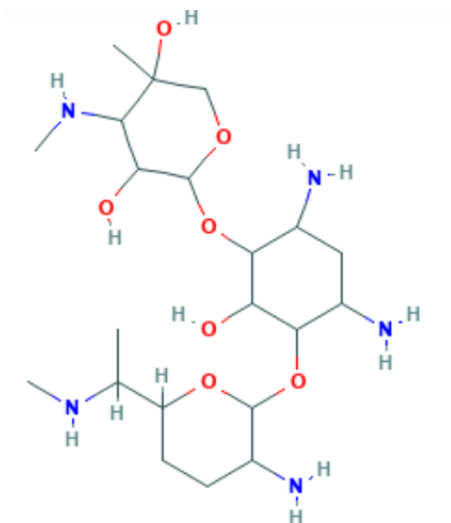
Obr. 6 Patofyziologické nebo maligní stavy, při kterých se hladiny NGAL zvyšují (HCC = hepatocelulární karcinom, NASH = Nealkoholická steatóza jater, ASH = Alkoholická steatóza jater, FLD = fatty liver disease, LCN2 = lipocalin 2/NGAL).

Modifikováno dle: Asimakopoulou et al. (2016)

3.4 GENTAMICIN

Gentamicin (GM) je širokospektré baktericidní aminoglykosidové antibiotikum (obr. 7). Obvykle se používá proti středně závažným až těžkým aerobním gramnegativním infekcím a některým aerobním grampozitivním organismům. GM působí vazbou na bakteriální ribosomy a inhibuje syntézu proteinů stejně jako jiné aminoglykosidy. Aminoglykosidy se často kombinují s penicilinem nebo cefalosporinem, tedy s betalaktámovými antibiotiky, k léčbě závažných infekcí E. coli, Staphylococcus

aureus, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Pseudomonas aeruginosa atd. GM se nejčastěji používá proti septikémii, bakteriální endokarditidě, peritonitidě, meningitidě, pánevnímu zánětlivému onemocnění a zápalu plic. Mezi běžné nežádoucí účinky GM patří závratě, bolesti hlavy, zmatenost, nevolnost a kožní vyrážka. Důležité nežádoucí účinky, související s dávkou GM, zahrnují ototoxicitu a nefrotoxicitu, které jsou sdíleny všemi aminoglykosidy. Tyto škodlivé účinky se mohou objevit i v nízkých dávkách a mohou přetrvávat dlouho po přerušení podávání léků (Blunston et al. 2015). GM způsobuje cytotoxicitu v buňkách, kde se hromadí, tedy v ledvinách jsou to obvykle epitelové buňky proximálních tubulů, zatímco buňky distálních tubulů a sběrných kanálků jsou cytotoxickými účinky významně méně ovlivněny (Randjelović et al. 2017). Vychytávání aminoglykosidů hepatocyty v játrech je omezeno a tato antibiotika se vylučují hlavně močí. Vysoké koncentrace GM se vyskytují především v renálních tubulárních buňkách a vlasových buňkách vnitřního ucha. A proto je pravděpodobnější, že tato léčiva způsobí spíše nefrotoxicitu nebo ototoxicitu než hepatotoxicitu.



Obr. 7 Chemická struktura gentamicinu.

Převzato z: Anonym (2019)

GM snižuje hladinu GF, jakož i tubulární reabsorpci (Randjelović et al. 2017). GM je aktivně transportován přes proximální tubulární membránu (je saturovatelný), hromadí se v lysozomech a způsobuje nefrotoxicitu prostřednictvím apoptózy a nekrózy tubulárních buněk (Plajer et. al 2015).

Zvýšená akumulace GM v proximálním tubulu a následná nefrotoxicita indukovaná tímto léčivem souvisí s expresí transportní molekuly pro proteiny a kationty tzv. megalin-kubilinový komplex. Existují tedy dva hlavní faktory poškození ledvin vyvolané GM: jeho akumulace v proximálních tubulárních buňkách a interakce s buněčnými membránami a organelami (Randjelović et al. 2017).

Mezi RF pro nefrotoxicitu vyvolanou GM patří stáří, dysfunkce jater, selhání ledvin, sepse, dlouhá terapie GM, MDD (vícenásobné denní dávkování) a vysoké minimální koncentrace GM. Výskyt nefrotoxicity vyvolané GM je obtížné přesně stanovit, protože existuje nejméně 10 definic nefrotoxicity vyvolané léky (Plajer et. al 2015). Mezi další predispozice patří např. používání diuretik, vystavení radiografickému kontrastu, vyčerpání cirkulujícího objemu a použití jiných nefrotoxicích látek (léky včetně inhibitorů angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEi), NSAID, amfotericinu nebo cisplatinu) (Hayward et al. 2018).

3.5 TESTOVÁNÍ CYTOTOXICITY IN VITRO – SENDVIČOVÁ ELISA

ELISA neboli enzymaticky vázaný imunosorbentový test (enzyme-linked immuno sorbent assay) je analytická metoda, která je založena na specifické reakci antigen-protilátka (Bovornvirakit et al. 2013). Využitím této reakce, ELISA umožňuje vysoce citlivou a selektivní kvantitativní nebo kvalitativní analýzu antigenů (Ag), včetně proteinů, peptidů, nukleových kyselin, hormonů, herbicidů a rostlinných sekundárních metabolitů. K detekci těchto molekul je Ag nebo protilátka značena pomocí enzymů, proto se ELISA nazývá tzv. enzymatickým imunotestem (Sakamoto et al. 2018). Existují různé typy ELISY (obr. 8).

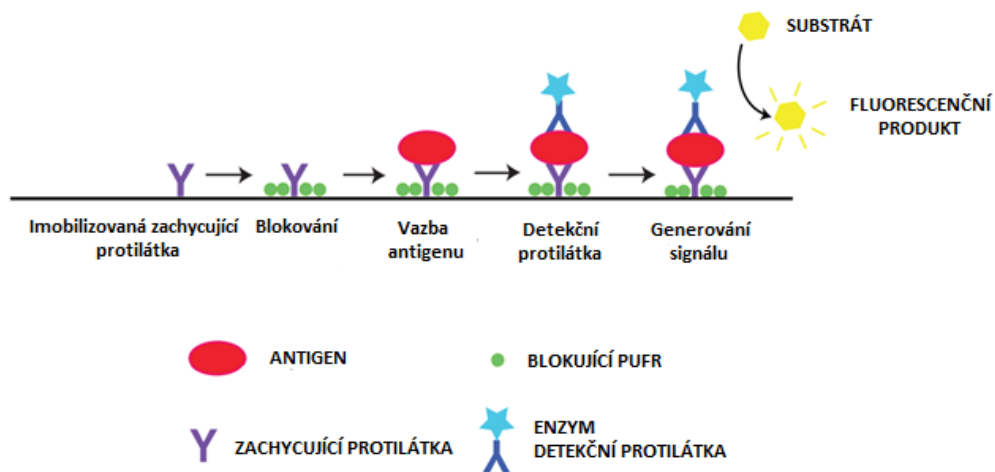
	PŘÍMÁ ELISA	KOMPETITIVNÍ ELISA	NEPŘÍMÁ ELISA	NEPŘÍMÁ KOMPETITIVNÍ ELISA	SENDVIČOVÁ ELISA
VÝHODA	Jednoduché, protože se používá pouze jedna protilátka		Vyšší citlivost a univerzálnost než přímé metody díky použití PAb, který rozpoznává různé epitopy primární protilátky		Vysoká specifická 2 protilátek, které mají odlišné epitopy
NEVÝHODA	Značení protilátky je nezbytné pro každou ELISU, což může vést k deaktivaci protilátky		Nespecifický signál je indukován zkříženou reaktivitou sekundární protilátky		Příprava dvou různých protilátek je pracná a nákladná
CÍL	Makromolekuly	Makromolekuly (Hapten)	Makromolekuly	Makromolekuly (Hapten)	Obecně makromolekuly
SIGNÁL (jako zvýšení cílového antigenu)	Zvýšení	Snížení	Zvýšení	Snížení	Zvýšení

Obr. 8 Charakteristiky různých typů ELISA (PAb = polyklonální protilátka).

Modifikováno dle: Sakamoto et al. (2018)

Tento test slouží k detekci a ke kvantifikaci různých Ag, v našem případě močových Ag odvozených z ledvin využívajících protilátky specifické pro Ag lokalizovaných v buňkách ledvin (Falkenberg et al. 2009). ELISA slouží pro objevování a ověřování nových biomarkerů, které se mohou pro svoji citlivost a specifickou využít k včasné detekci onemocnění.

Sendvičová ELISA je založena na detekci hybridizačních dějů mezi dvěma protilátkami (zachycení a detekce) a cílovými proteiny. ELISA tedy používá zachycující protilátku a konjugovanou detekční protilátku. Zachycující protilátka na mikrotitrační destičce (pevná fáze) se používají k imobilizaci proteinu (tekutá fáze) a detekční protilátka jsou rozpoznávány enzymaticky vázanými sekundárními protilátkami (Osmekhina et al. 2010). Ag ve vzorku se tedy nechá reagovat s imobilizovanou zachycující protilátkou a poté se tento komplex tzv. „sendvičuje“ se specifickou protilátkou detekovanou enzymem, který slouží pro vývoj zbarvení (obr. 9).



Obr. 9 Schematický pracovní postup zobrazující sekvenční molekulární vazebné kroky sendvičové ELISA.

Modifikováno dle: Thaitrong et al. (2013)

Enzymy jako např. ALP či křenová fosfatáza (HRP) katalyzují chemickou přeměnu substrátu na jinak zbarvený produkt generováním detekovatelného signálu. Vývoj barvy pomocí chromogenního substrátu odpovídá přítomnosti Ag. Čím více Ag, tím vyšší signál. Tyto reakce enzym-substrát jsou obvykle dokončeny během 30 – 60 minut a reakce (postupná změna barvy) se zastaví přidáním vhodného roztoku, pro individuální reakce např. hydroxidu sodného, kyseliny chlorovodíkové, kyseliny sírové, uhličitanu sodného a azidu sodného. Nakonec jsou barevné nebo fluorescenční produkty detekovány pomocí čtečky mikrotitračních destiček při vlnové délce 450 nm (Sakamoto et al. 2018).

4. CÍL PRÁCE

- Zavést a optimalizovat metodu ELISA v našich laboratorních podmínkách.
- Stanovení koncentrace biomarkerů KIM-1, cysC a NGAL s využitím na pracovišti nově optimalizované metody ELISA v potkaní moči a plazmě.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. MATERIÁL

5.1.1. Použité přístroje a zařízení

Centrifuga Z 326 K (HERMLE Labortechnik GmbH, Německo)

Laboratorní třepačka KS-15 Control, Buhler, s inkubačním nástavcem TH 15 (Johanna Otto GmbH, Německo)

Destičkový analyzátor (TECAN, Infinite M200, Švýcarsko)

5.1.2. Laboratorní pomůcky

96jamkové mikrotitrační destičky, číré (TPP, Švýcarsko)

Automatické pipety Eppendorf Research® plus 5 – 50 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl (Eppendorf, Německo)

Špičky Eppendorf 0,1 – 20 µl, 20 – 200 µl (Eppendorf, Německo)

Mikrozkumavky Eppendorf 0,5; 1,5; 2 ml (Eppendorf, Německo)

Rukavice latexové, nesterilní (VWR, USA)

5.1.3. Použité kity

Rat Cystatin C Rat ELISA® Kit (abcam, UK)

Rat KIM-1 ELISA® Kit (abcam, UK)

Rat Lipocalin-2 ELISA®Kit(NGAL) (abcam, UK)

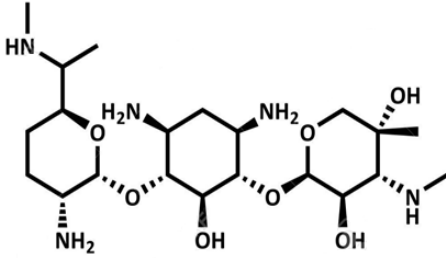
5.1.4. Použité chemikálie

Deionizovaná voda

Chemikálie na fosfátový pufr (PBS) NaCl, KCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, pH = 7,4 byly získány od firmy PENTA (Česká republika)

Testované látky Gentamicin (Sigma-Aldrich, USA) (tab. 1)

Tab. 1 Chemický název a strukturní vzorec testované látky Gentamicin

Testovaná látka	Strukturní vzorec	Chemický název
Gentamicin		2-[4,6-diamino-3-[3-amino-6-[1-(methylamino)ethyl]oxan-2-yl]oxy-2-hydroxycyklohexyl]oxy-5-methyl-4-(methylamino)oxan-3,5-diol

5.2. METODIKA

5.2.1. Příprava moči nebo plazmy

Vzorky moči a plazmy byly získány z dospělého samce laboratorního potkana. V pokusu byli 3 samci, kteří byli chováni za konvenčních podmínek 12 h/12 h (světlo/tma) a při 22 °C. Po dobu 7 dní jim byl každý den aplikován GM o dávce 100 mg/kg. Vzorky moči se odebíraly 1., 3., 5. a 7. den aplikace GM, kdy byli potkani umístěni do metabolických klecí. Plazma byla získána poslední 7. den aplikace GM. Odebraná potkaní moč byla zcentrifugována při laboratorní teplotě, po dobu 10 min, při 2 000 otáčkách za minutu a alikvóty (250 µl) byly uloženy do mrazáku při teplotě - 20 °C. Odebraná krev byla zcentrifugována při teplotě 5 °C, po dobu 10 min, při 5 000 ot/min a tím se oddělily erytrocyty od plazmy. Získaná plazma byla uložena v alikvótech (250 µl) v mrazáku. Takhle již připravené vzorky (moči a plazmy) jsem získala pro svou práci a s nimi jsem pracovala.

5.2.2. Příprava roztoků

Před použitím bylo potřeba nechat všechna činidla na přípravu roztoků ohřát na pokojovou teplotu (18–25 °C). Objemy roztoků byly určeny podle počtu použitých jamek. Vše se připravovalo v duplikátech.

Příprava fosfátového pufru

V tab. 2 jsou uvedeny všechny chemikálie potřebné pro PBS pufr včetně jejich koncentrací. Po navážení jednotlivých složek na analytických vahách byl doplněn objem destilované vody na odpovídající množství. Po rozpuštění chemikálií jsme změřili a upravili pH fosfátového roztoku (pomocí NaOH) na hodnotu 7,4.

Tab. 2 Příprava fosfátového pufru

Sloučenina	Molární hmotnost [g/mol]	Koncentrace v pufru [M]
NaCl	58,44	0,137
KCl	77,55	0,0027
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	358,14	0,01
NaH ₂ PO ₄ .2 H ₂ O	156,01	0,01

5.2.3. KIM-1

Příprava 1x Wash Buffer PT

PBS byl použit k promývání jamek. Pro přípravu promývacího pufru byl použit Wash Buffer PT 10X a deionizovaná voda. Pro přípravu celkového objemu 40 ml 1X Wash Buffer PT se smíchalo 4 ml Wash Buffer PT 10X a 36 ml deionizované vody. Při přípravě bylo vhodné se vyhnout pění.

Příprava Antibody Cocktail

Pro celkový objem 2 000 µl protilátkového koktejlu bylo použito 200 µl Rat KIM-1 Capture Antibody 10X, 200 µl Rat KIM-1 Detector Antibody 10X a 1 600 µl Antibody Diluent 5BR.

Naředění vzorků

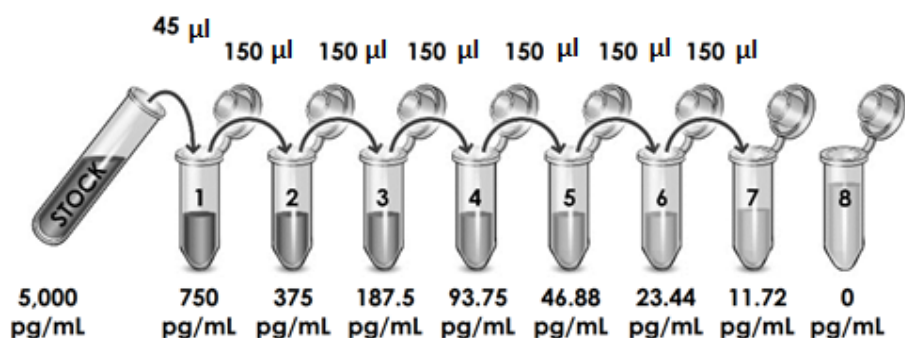
Nezředěné vzorky moči byly skladovány při teplotě - 20 °C. Po vyjmutí vzorků moči z mrazáku a rozmrazení na pokojovou teplotu byly vzorky důkladně a jemně promíchány a poté zcentrifugovány po dobu 5 minut při 1 000 otáčkách. Po centrifugaci

byly odebrány supernatanty a zředěny do zkumavek v duplikátech. Byly naředěny pomocí Sample Diluent NS. Rozsah procentuálního ředění byl 1,56–25 %. Při prvním měření bylo použito 25% (4násobné) ředění, při druhém měření 80násobné ředění a 160násobné ředění na různý počet jamek.

Příprava standardů

Výroba standardu pro KIM-1 (Stock standard Solution)

Do vialky Rat KIM-1 Lyophilized Recombinant Protein přidal 1 ml z vialky Sample Diluent NS a nechal se důkladně a jemně promíchat při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Ředění probíhalo podle obr. 10. Ependorfky byly označeny čísly 1–8. Do zkumavky č. 1 bylo přidáno 255 μ l Sample Diluent NS a 45 μ l připraveného standardu (Stock standard Solution). Dále se do zkumavek s čísly 2–8 přidalo 150 μ l Sample Diluent NS. Ependorfka č. 8 neobsahovala žádný protein, pouze Sample Diluent NS – tzv. blank control neboli slepý pokus.



Obr. 10 Příprava standardů pro KIM-1.

5.2.4. Cystatin C

Příprava 1x Wash Buffer PT

Pro přípravu celkového objemu 38 ml 1X Wash Buffer PT se smíchalo 3,8 ml Wash Buffer PT 10X a 34,2 ml deionizované vody.

Příprava 10X Capture Antibody

Do vialky Rat Cystatin C Capture Antibody (lyophilized) se přidalo 660 μ l Sample Diluent NS a jemně se promíchalo na orbitální třepačce po dobu 20 minut.

Příprava Antibody Cocktail

Pro celkový objem 2 000 μ l protilátkového koktejlu se použilo 200 μ l předem připravené vialky 10x Capture Antibody, 200 μ l 10X Rat Cystatin C Detector Antibody a 1 600 μ l Antibody Diluent CP.

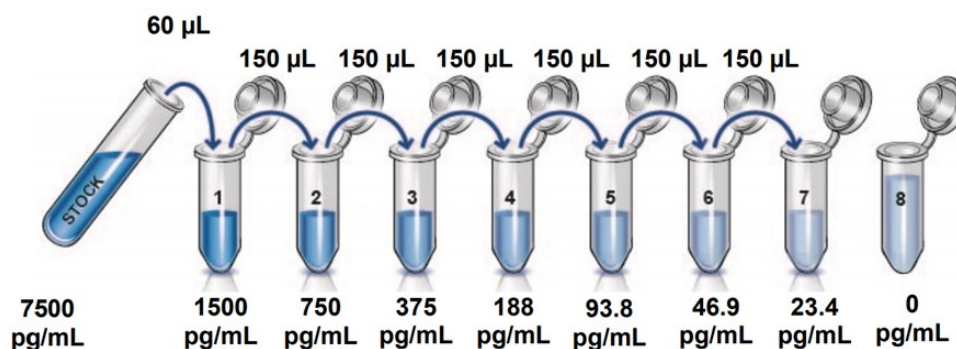
Naředění vzorků plazmy

Postup je stejný jako u biomarkeru KIM-1. Rozsah procentuálního ředění byl 0,006–0,4 %. Při prvním měření bylo použito 0,05% (2 000násobné) ředění na 10 jamek a 0,2% (500násobné) ředění na dalších 10 jamek. Při druhém měření byly vzorky plazmy zředěny 5 000x a 10 000x. K dispozici byly 2 vzorky plazmy (potkan č.1 a č.3), a to z důvodů úmrtí potkana č. 2. Po přepočtu při 0,05% ředění bylo použito 0,15 μ l vzorku a 299,85 μ l Sample Diluent Buffer.

Příprava standardů

Výroba standardu pro cysC (Stock standard Solution)

U vzorků plazmy se do vialky s názvem Rat Cystatin C Recombinant Lyophilized Protein přidalo 500 μ l z vialky Sample Diluent NS a nechalo se důkladně a jemně promíchat při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Ředění probíhalo podle obr. 11. Ependorfy byly označeny čísly 1–8. Do zkumavky č. 1 se přidalo 240 μ l Sample Diluent NS a 60 μ l připraveného standardu (Stock standard Solution). Dále byl postup přípravy standardů stejný jako u biomarkeru KIM-1.



Obr. 11 Příprava standardů pro cystatin C.

5.2.5. NGAL

1X Biotinylated anti-rat Lipocalin-2 (roztok A)

Biotinylated anti-rat Lipocalin-2 antibody (protilátka) byla naředěna v poměru 1 : 100 s Antibody Diluent Buffer. Pro přípravu celkového objemu 4 000 µl se tedy smíchalo 40 µl protilátky a 3 960 µl ředidla protilátek.

1X Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (roztok B)

Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) byl naředěn v poměru 1 : 100 s ABC Diluent Buffer. Pro přípravu celkového objemu 4 000 µl se tedy smíchalo 40 µl ABC a 3 960 µl ředidla ABC.

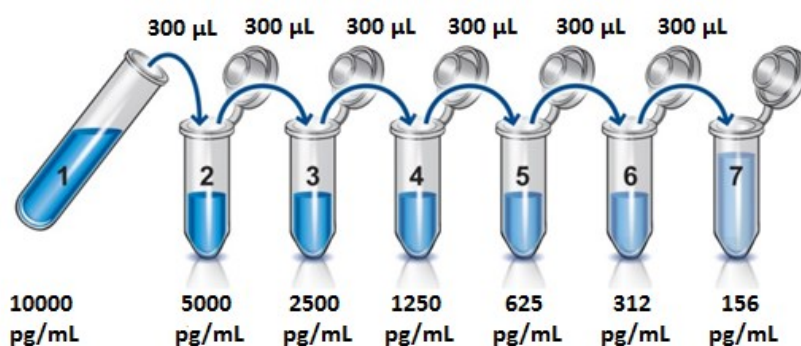
Naředění vzorků moči

Postup je stejný jako u biomarkeru KIM-1. Bylo použito 2% (50násobné) ředění na 22 jamek. K dispozici bylo tedy celkem 11 vzorků moči. Ředilo se pomocí Sample Diluent Buffer.

Příprava standardů

Výroba standardu pro NGAL

U vzorků moči do vialky Lyophilized recombinant rat Lipocalin-2 standard se přidal 1 ml z vialky s názvem Sample Diluent Buffer a nechal se důkladně a jemně promíchat při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Ředění probíhalo podle obr. 12. Ependorfky byly označeny čísla 2–8. Do každé z těchto zkumavek se přidalo 300 μL Sample Diluent Buffer. V ependorfce č. 8 opět nebyl žádný protein, pouze 300 μL Sample Diluent Buffer.



Obr. 12 Příprava standardů pro NGAL.

5.2.6. Postup ELISY

Před použitím bylo potřeba vyjmout kity a vzorky z mrazáku nebo z lednice a nechat ohřát na pokojovou teplotu. Po ohřátí na pokojovou teplotu byly podle pokynů připraveny a naředěny reagenty, vzorky a standardy potřebné na den experimentu. Především ze statistických důvodů se vzorky, standardy a všechny předpřipravené reagenty testovaly minimálně v duplikátech. Pro každý provedený test byly použity 2 jamky jako blank. Samotný postup ELISY pro dané biomarkery je shrnut v následujících odstavcích.

KIM-1 a cystatin C

U těchto biomarkerů byl postup testování shodný. Do předem připravených a označených jamek bylo přidáno 50 μL standardů, 50 μL vzorků a následovalo přidání 50 μL směsi protilátek. Mikrodestička byla poté uzavřena těsnicí fólií a inkubována 1 h

při pokojové teplotě na třepačce nastavené na 400 otáček za minutu. Po inkubaci byla každá jamka 3x promyta předem připraveným pufrem (1x Wash Buffer PT), aby se odstranil nenavázaný materiál, tedy nenavázané proteiny séra a konjugát HRP. Nejen při přípravě pufru, ale i při jeho pipetování, bylo důležité vyvarovat se vzniku bublin. Následně bylo do každé jamky napipetováno 100 μ l TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) substrátu. Mikrodestička se opět utěsnila fólií a byla inkubována po dobu 10 minut. Během inkubace byla chemická přeměna tohoto substrátu katalyzována HRP. Po inkubaci bylo do každé jamky přidáno 100 μ l Stop Solution. Obsah mikrodestičky byl promíchán na třepačce po dobu 1 minuty. Signál se generoval úměrně množství vázaného analytu a jeho intenzita byla detekována spektrofotometricky na destičkovém analyzátoru TECAN při vlnové délce 450 nm.

NGAL

U tohoto biomarkeru byl průběh experimentu v určitých krocích odlišný. Do příslušných označených jamek bylo přidáno 100 μ l standardů a 100 μ l vzorků. Mikrodestička byla poté uzavřena těsnicí fólií a inkubována po dobu 90 minut při 37 °C. Po inkubaci byl všechen obsah jamek vyklepán a vysušen. Poté byl do jamek napipetován roztok 1X Biotinylated anti-rat Lipocalin-2 (roztok A) a celá mikrodestička byla opět inkubována při 37 °C po dobu 60 minut. Následně byly jamky 3x promyty 300 μ l pufru. Po vysušení mikrodestičky bylo napipetováno 100 μ l roztok 1X Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (roztoku B) a poté byla opět inkubace po dobu 30 minut při 37 °C. Po inkubaci následovalo další promytí pufrem, tentokrát 5x. Po promytí a vysušení se do jamek přidalo 90 μ l TMB substrátu následováno inkubací po dobu 20–25 minut při 37 °C. Modré odstíny byly pozorovány v jamkách se 4 nejkoncentrovanějšími standardními roztoky NGAL, ostatní jamky neměly žádné zřetelné zbarvení. Poté byl do každé jamky přidán TMB Stop Solution. Poté proběhla detekce spektrofotometricky na destičkovém analyzátoru TECAN při vlnové délce 450 nm.

5.2.7. Hodnocení experimentálních dat

Po spektrofotometrické detekci na destičkovém analyzátoru TECAN byly získány hodnoty absorbancí, které byly zpracovány v programu Microsoft Excel 2018. Hodnoty absorbance duplikátů buněk stejného vzorku byly zprůměrovány. Byla vypočítána

průměrná hodnota absorbance pro slepý pokus (blank) standardů, která byla odečtena od všech ostatních hodnot absorbancí. Vynesením této průměrné hodnoty absorbance pro blank pro každou koncentraci standardů (osa y) proti cílové koncentraci proteinu (osa x) standardů byla vytvořena standardní křivka. Byla stanovena koncentrace cílového proteinu ve vzorku interpolováním hodnot absorbance slepého pokusu odečtených od standardní křivky. Výsledná hodnota byla vynásobena příslušným faktorem ředění vzorku k získání koncentrace cílového proteinu ve vzorku. Pro každý provedený test musela být vytvořena nová standardní křivka. Ředění vzorků se provádí v ředidle vzorku NS. Vzorky, které produkovaly signály vyšší, než signály nejvyššího standardu byly dále zředěny, znovu analyzovány a poté vynásobeny koncentrací zjištěnou příslušným ředicím faktorem.

6. VÝSLEDKY

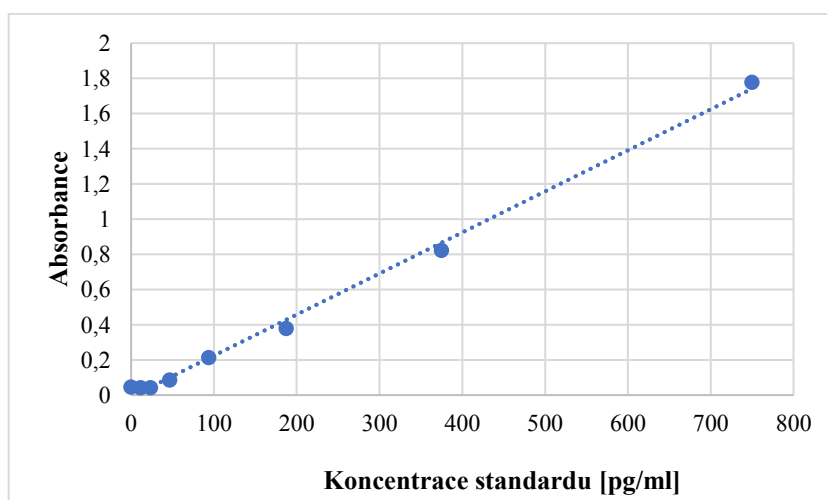
6.1. Stanovení standardní křivky pro KIM-1

Ke stanovení biomarkeru KIM-1 jsme nejprve museli stanovit standardní křivku, kde byly použity standardy o koncentraci (0; 11,72; 23,44; 46,88; 93,75; 187,5; 375; 750) obsažené v kitu. Ke spektrofotometrické detekci jsme použili destičkový analyzátor TECAN při vlnové délce 450 nm. Z naměřených hodnot absorbancí (tab. 3) jsme získali standardní křivku, potřebnou k výpočtu koncentrace biomarkeru KIM-1.

Tab. 3 Koncentrace standardů pro KIM-1 a jejich absorbance

Koncentrace standardů [pg/ml]	Hodnota absorbance
0	0,094
11,72	0,089
23,44	0,009
46,88	0,133
93,75	0,261
187,5	0,426
375	0,864
750	1,825

Na obr. 13 jsou na ose x vynesené cílové koncentrace proteinu standardů KIM-1 a na ose y jsou vynesené průměrné hodnoty absorbancí standardů po odečtení zprůměrované absorbance blanku standardu.



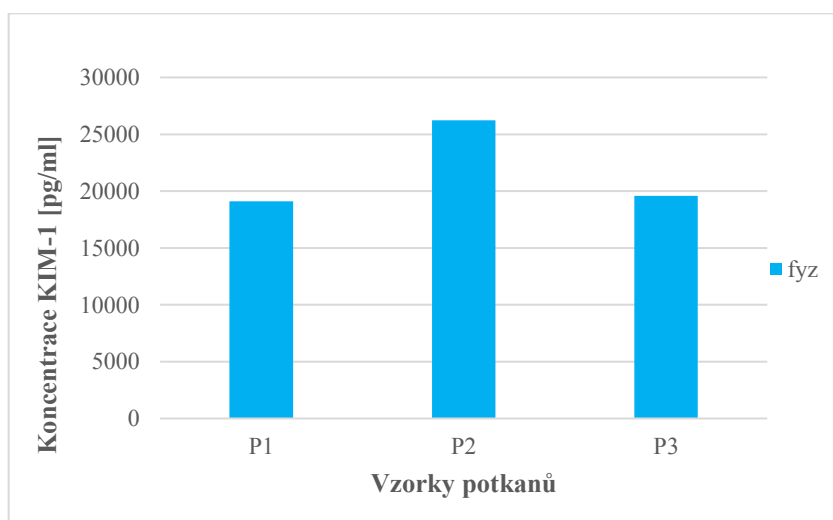
Obr. 13 Stanovení biomarkeru KIM-1: standardní křivka.

6.2. Stanovení KIM-1

Z ředících testů nám vyšlo, že vzorky musí být 160x naředěny, aby byly v rozmezí vzorků standardů. V tab. 4 a na obr. 14 jsou znázorněny fyziologické roztoky moči potkanů (P1–P3) a výsledné koncentrace biomarkeru KIM-1, vyjádřené v pg/ml. Tyto vzorky neobsahovaly GM.

Tab. 4 Vzorky moči 160x zředěné bez aplikace gentamicinu – fyziologické roztoky

Potkan č.	Aplikace fyziologického roztoku	Koncentrace KIM-1 [pg/ml]
P1	1	19 109,57
P2	1	26 240
P3	1	19 575,65



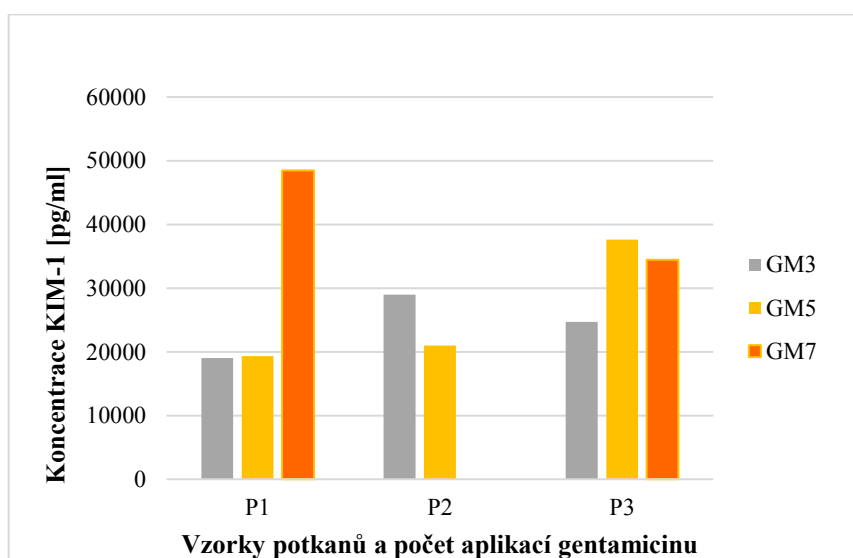
Obr. 14 Stanovení biomarkeru KIM-1: Fyziologické roztoky vzorků moči 160x zředěné (bez aplikace gentamicinu) (P1–P3 = potkani č. 1–3; fyz. = fyziologické roztoky bez gentamicinu).

Na obr. 14 jsou uvedeny výsledky stanovení biomarkeru KIM-1 u potkanů s fyziologickým roztokem. Z grafu vyplývá, že potkan č. 2 (P2), má již na začátku pokusu zvýšenou hladinu KIM-1 oproti potkanovi č. 1 (P1) a potkanovi č. 3 (P3).

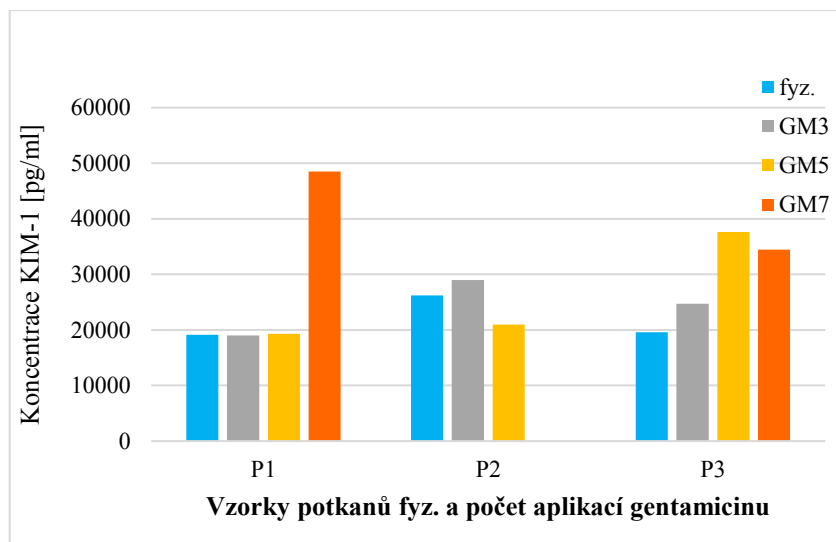
V následující tab. 5 a obr. 15 a 16 bylo zkoumáno stanovení koncentračních hladin KIM-1 v moči potkana za přítomnosti GM. Gentamicin byl potkanům aplikován 3., 5. a 7. den. Vzorky byly zředěny 160x. Se zvyšujícími se koncentracemi přítomného GM došlo ke zvýšení koncentrace KIM-1. Čím větší množství GM byl potkan vystaven, tím ve větší koncentraci byl biomarker KIM-1 vyplavován.

Tab. 5 Vliv gentamicinu na hladiny KIM-1 v moči potkana (ředění 160x)

Potkan č.	Počet aplikací GM	Koncentrace KIM-1 [pg/ml]
P1	3	19 019,13
P2	3	28 963,48
P3	3	24 709,56
P1	5	19 311,3
P2	5	20 987,83
P3	5	37 600
P1	7	48 480
P3	7	34 441,74



Obr. 15 Vzorky moči potkanů s aplikací gentamicinu a výsledné koncentrace KIM-1 (P1–P3 = potkani č. 1–3, GM3–GM7 = 3., 5. a 7. den aplikace gentamicinu).



Obr. 16 Vzorky moči potkanů s aplikací gentamicinu a výsledné koncentrace KIM-1 (P1–P3 = potkani č. 1–3; fyz. = fyziologické roztoky bez gentamicinu; GM3–GM7 = 3., 5. a 7. den aplikace gentamicinu).

Na obr. č. 15 a 16 je znázorněno: u potkana č. 1 je vidět, že ve 3. a 5 den aplikace GM je hladina KIM-1 nevýrazná. Avšak v 7. den aplikace je hladina KIM-1 téměř 3x vyšší, což signalizuje výrazné poškození ledvin. Hladiny KIM-1 u potkana č. 2 kolísaly po podání GM ve 3. a 5. den aplikace, 7. den aplikace koncentrace KIM-1 nemohly být hodnoceny, protože tento potkan uhynul 6. den aplikace GM. U potkana č. 3 hladiny KIM-1 také kolísaly, přesto už od 3. dne aplikace hladina KIM-1 oproti fyz. vzrůstala.

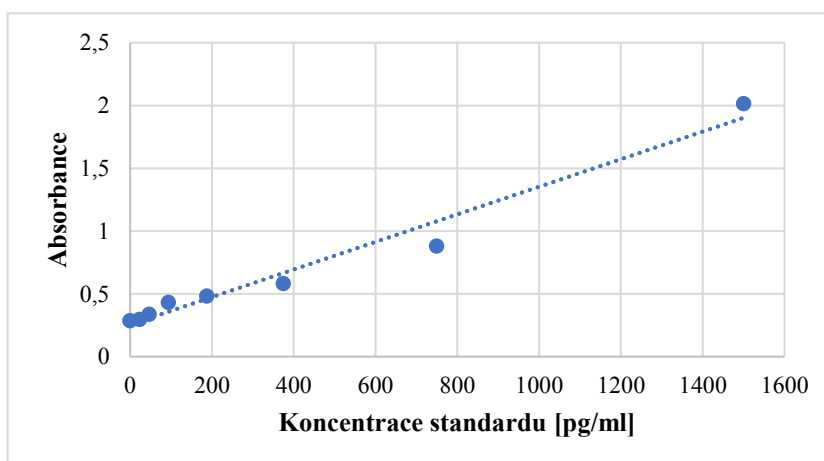
6.3. Stanovení standardní křivky pro cystatin C

Ke stanovení biomarkeru cysC jsme opět nejdříve stanovili standardní křivku (jako u KIM-1), kde byly použity standardní látky o koncentraci (0; 23,4; 46,9; 93,8; 188; 375; 750; 1500) obsažené v kitu. Ke spektrofotometrické detekci jsme použili destičkový analyzátor TECAN při vlnové délce 450 nm. Z naměřených hodnot absorbancí (tab. 6) jsme získali standardní křivku, potřebnou k výpočtu koncentrace biomarkeru cysC.

Tab. 6 Koncentrace standardů pro cystatin C a jejich absorbance

Koncentrace standardů [pg/ml]	Hodnota absorbance
0	0,336
23,4	0,345
46,9	0,386
93,8	0,479
188	0,532
375	0,631
750	0,928
1 500	2,064

Na obr. 17 jsou na ose x vyneseny cílové koncentrace proteinu standardů cysC a na ose y jsou vyneseny průměrné hodnoty absorbancí standardů po odečtení zprůměrované absorbance blanku standardu.



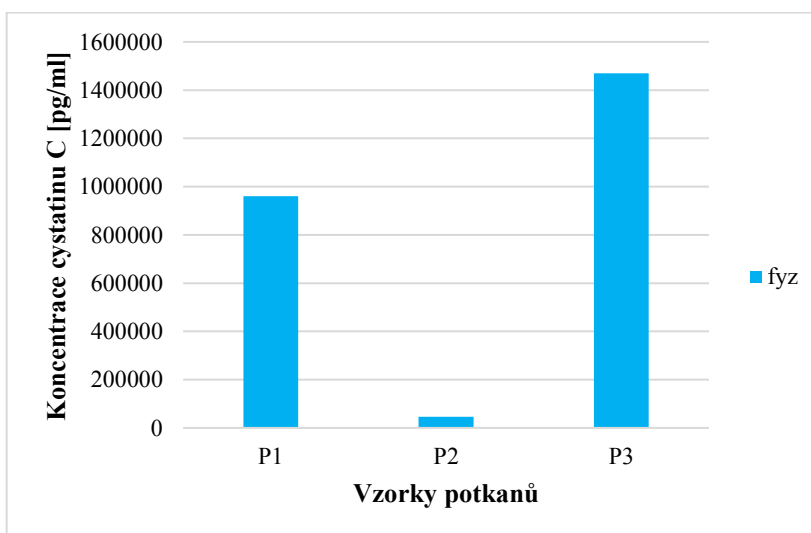
Obr. 17 Stanovení biomarkeru cystatinu C: standardní křivka.

6.4. Stanovení cystatinu C

U stanovení biomarkeru cysC jsme použili vzorek plazmy místo moči. Z ředících testů nám vyšlo, že vzorky plazmy musí být 10 000x naředěny, aby spadaly do rozmezí vzorků standardů. V tab. 7 a na obr. 18 jsou znázorněny fyziologické roztoky plazmy potkanů (P1–P3) a výsledné koncentrace biomarkeru cysC, vyjádřené v pg/ml. Tyto vzorky neobsahovaly GM.

Tab. 7 Vzorky plazmy 10 000x zředěné bez aplikace gentamicinu – fyziologické roztoky

Potkan č.	Aplikace fyziologického roztoku	Koncentrace cystatinu C [pg/ml]
P1	1	959 772,7
P2	1	46 590,9
P3	1	1 470 227

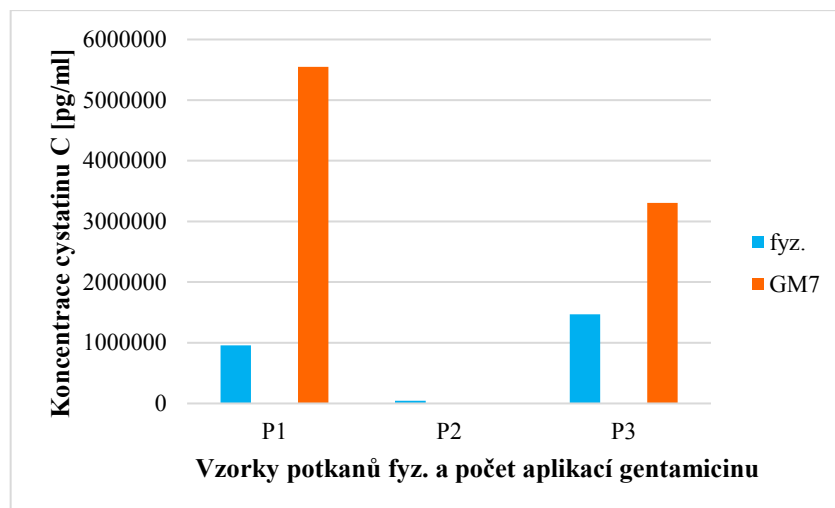


Obr. 18 Stanovení biomarkeru cystatinu C: Fyziologické roztoky (fyz) vzorků plazmy 10 000x zředěné (bez aplikace gentamicinu) (P1–P3 = potkani č. 1–3; fyz. = fyziologické roztoky bez gentamicinu).

V následující tab. 8 a obr. 19 bylo zkoumáno stanovení koncentračních hladin cysC v plazmě potkana za přítomnosti GM. K dispozici byly vzorky s GM, který byl podán 7. den aplikace. Vzorky byly zředěny 10 000x.

Tab.8 Vliv gentamicinu na hladiny cystatinu C v plazmě potkana (ředění 10 000x)

Potkan č.	Počet aplikací GM	Koncentrace cystatinu C [pg/ml]
P1	7	5 551 136
P3	7	3 307 045



Obr. 19 Vzorky plazmy potkanů s aplikací gentamicinu a výsledné koncentrace cystatinu C (P1–P3 = potkani č. 1–3; fyz. = fyziologické roztoky bez gentamicinu; GM7 = 7. den aplikace gentamicinu).

Na obr. 19 jsou znázorněny výsledky stanovení hladiny biomarkerů cysC v potkaní plazmě. Koncentrace cysC po aplikaci GM v 7. den podání mnohonásobně vzrostly oproti fyziologickým roztokům u P1 a P3. Potkan č. 2 (P2) uhynul 6. den aplikace GM, takže jsme nemohli získat plazmu ke stanovení.

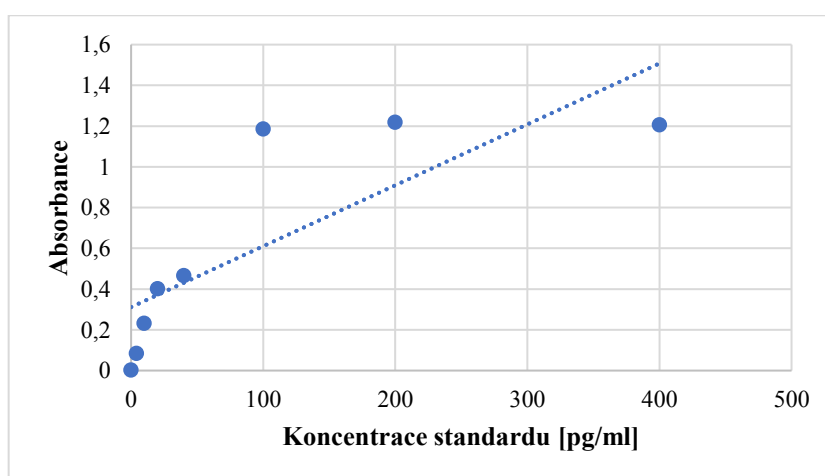
6.5. Stanovení standardní křivky pro NGAL

Ke stanovení biomarkeru NGAL jsme nejprve stanovili standardní křivku, kde byly použity standardní látky o koncentraci (0; 4; 10; 20; 40; 100; 200; 400) obsažené v kitu. Ke spektrofotometrické detekci jsme použili destičkový analyzátor TECAN při vlnové délce 450 nm. Z naměřených hodnot absorbancí (tab. 9) jsme získali standardní křivku, potřebnou k výpočtu koncentrace biomarkeru NGAL.

Tab. 9 Koncentrace standardů a jejich absorbance

Koncentrace standardů [pg/ml]	Hodnota absorbance
0	0,068
4	0,149
10	0,296
20	0,466
40	0,530
100	1,251
200	1,284
400	1,272

Na obr. 20 jsou na ose x vynesené cílové koncentrace proteinu standardů NGAL a na ose y jsou vynesené průměrné hodnoty absorbancí standardů po odečtení zprůměrované absorbance blanku standardu.



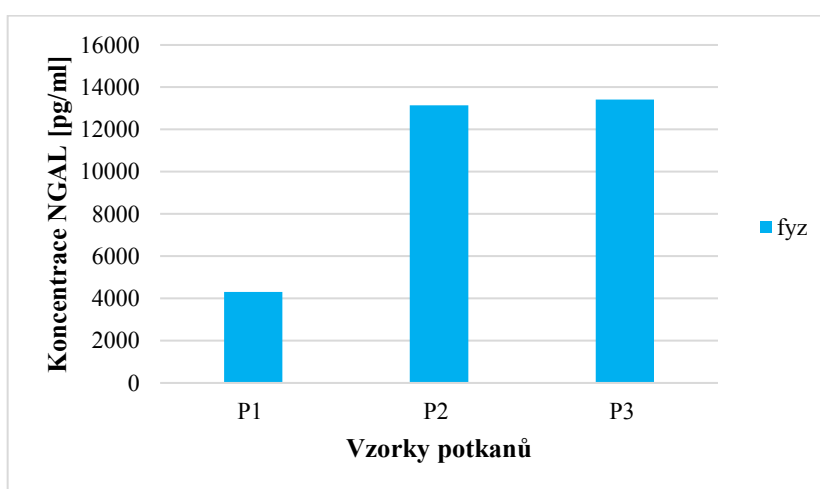
Obr. 20 Stanovení biomarkeru NGAL: standardní křivka.

6.6. Stanovení NGAL

Z ředících testů nám vyšlo, že vzorky musí být 50x naředěny, aby byly v rozmezí vzorků standardů. V tab. 10 a na obr. 21 jsou znázorněny fyziologické roztoky moči potkanů (P1–P3) a výsledné koncentrace biomarkeru NGAL, vyjádřené v pg/ml. Tyto vzorky neobsahovaly GM.

Tab. 10 Vzorky moči 50x zředěné bez aplikace gentamicinu – fyziologické roztoky

Potkan č.	Aplikace fyziologického roztoku	Koncentrace NGAL [pg/ml]
P1	1	4 305
P2	1	13 145
P3	1	13 420,83



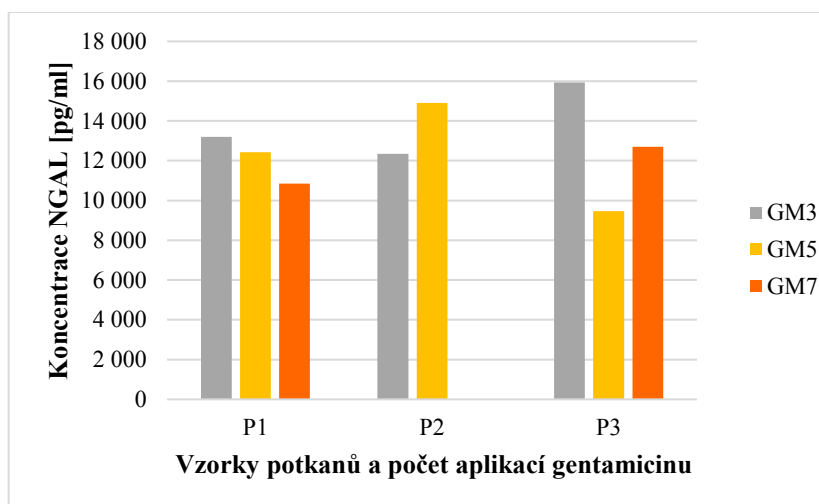
Obr. 21 Stanovení biomarkeru NGAL: Fyziologické roztoky vzorků moči 50x zředěné (bez aplikace gentamicinu) (P1–P3 = potkani č. 1–3; fyz. = fyziologické roztoky bez gentamicinu).

Na Obr. 21 jsou uvedeny výsledky stanovení biomarkeru NGAL u potkanů s fyziologickým roztokem. Z grafu vyplývá, že P2 a P3, má již na začátku pokusu zvýšenou hladinu NGAL oproti potkanovi P1.

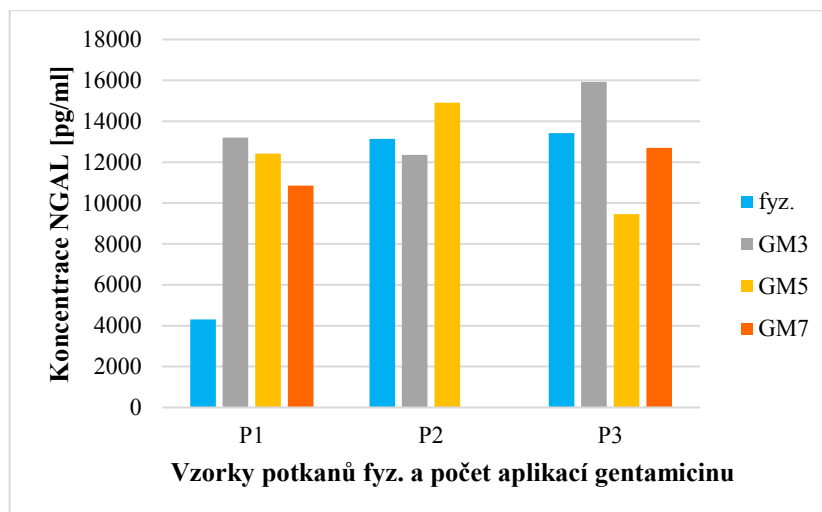
V následující tab. 11 a obr. 22 a 23 bylo zkoumáno stanovení koncentračních hladin NGAL v moči potkana za přítomnosti GM. Gentamicin byl potkanům aplikován 3., 5. a 7. den. Vzorky byly zředěny 50x. Se zvyšujícími se koncentracemi přítomného GM došlo ke zvýšení koncentrace NGAL.

Tab. 11 Vliv gentamicinu na hladiny NGAL v moči potkana (ředění 50x)

Potkan č.	Počet aplikací GM	Koncentrace NGAL [pg/ml]
P1	3	13 195
P2	3	12 349,17
P3	3	15 932,5
P1	5	12 425
P2	5	14 905
P3	5	9 465
P1	7	10 854,17
P3	7	12 698,33



Obr. 22 Vzorky moči potkanů s aplikací gentamicinu a výsledné koncentrace NGAL (P1–P3 = potkani č. 1–3; GM3–GM7 = 3., 5. a 7. den aplikace gentamicinu).



Obr. 23 Vzorky moči potkanů s aplikací gentamicinu a výsledné koncentrace NGAL (P1–P3 = potkani č. 1–3; fyz. = fyziologické roztoky bez gentamicinu; GM3–GM7 = 3., 5. a 7. den aplikace gentamicinu).

Na obr. 22 a 23 je znázorněno: u potkana č. 1 (P1) jsou patrné zvýšené hladiny NGAL po 3. dnu aplikace GM. S vyššími koncentracemi podávaného GM se hladiny NGAL o něco snížily, přesto byly několikrát vyšší než hladina NGAL u fyz. Hladiny NGAL u potkana č. 2 (P2) po aplikaci GM stoupaly, avšak 7. den aplikace GM nemohl být změřen, protože tento potkan uhynul 6. den aplikace. U potkana č. 3 (P3) hladiny NGAL po 3. aplikaci GM byly nejvyšší a po dalších aplikacích GM hladiny NGAL kolísaly.

7. DISKUZE

Nefrotoxicita vyvolaná léčivem je úzce spojena s AKI a s CKD. Obvyklé testy na nefrotoxicitu (SCr nebo BUN) však nemají citlivost a selektivitu potřebnou ke včasnému stanovení nefrotoxicity před závažným vývojem poškození ledvin (Kim a Moon 2012). Několik studií naznačuje, že biomarkery moči založené na tubulárním poranění by mohly být pro včasnou predikci a diagnostiku AKI užitečnější než tradiční markery (Sinha et al. 2015). Ideální marker by měl být neinvazivní, selektivní, vysoce citlivý, místně specifický, reprodukovatelný, stabilní a spolehlivý při hodnocení onemocnění ledvin (Wasung et al. 2015).

Cílem této studie bylo zavést a optimalizovat metodu ELISA v našich laboratorních podmínkách, abychom její pomocí mohli stanovit hladiny biomarkerů KIM-1, cysC a NGAL ve vzorcích potkaní moči a plazmy. Léčivo gentamicin (GM) jsme použili pro jeho známé nefrotoxické účinky. Ve vzorcích moči lze detekovat a kvantifikovat Ag odvozené od distálních a proximálních částí tubulárního systému ledvin, poněvadž uvolňování buněčných složek (enzymů, Ag) je důsledkem primární změny nebo poškození ledvin (Falkenberg et al. 2009). Vylučování Ag, v našem případě proteinů biomarkerů, bylo měřeno v moči a plazmě u zdravých potkanů a potkanů vystavených GM.

U biomarkerů KIM-1 a NGAL byla měřena a stanovena koncentrace v moči a u cysC v plazmě v závislosti na počtu dávek GM. Ke stanovení jednotlivých biomarkerů, tedy pro každý nový test zvlášť, byla nejprve stanovena standardní křivka, tyto křivky byly potřebné k určení hladin biomarkerů. GM byl podáván v dávce 100 mg/kg/den (Aliyat O. Nafiu 2019) po dobu 7 dní 3 potkanům. Vzorky moči se odebíraly 1., 3., 5. a 7. den aplikace GM a vzorky plazmy 7. den aplikace GM.

Byly zkoumány biomarkery KIM-1, cysC a NGAL, jejichž hladiny stoupaly nebo kolísaly se zvyšujícími aplikacemi GM. Kolísání mezi nižšími a vyššími dávkami GM mohly být způsobeny nepřesným pipetováním či odlišnou reakcí nebo regenerací ledvin jednotlivých potkanů na různou dávku GM. Tyto experimenty ukázaly podobné vlastnosti všech 3 biomarkerů. V přítomnosti GM hodnoty koncentrací všech biomarkerů byly zvýšené oproti kontrolám (fyziologický roztok). Ve zdravých ledvinách byly tyto biomarkery vyplavovány minimálně, záleželo na každém potkanovi, s jakými funkcemi ledvin vstupoval do pokusu. U kontrol pro KIM-1 měl P2 znatelně vyšší hladinu markeru

oproti P1 a P3, kteří měli hodnoty podobné. Hladina KIM-1 u P1 po aplikaci GM ve 3. a 5. den aplikace víceméně odpovídá hladině ve fyziologickém roztoku, avšak v 7. den aplikace GM je hodnota KIM-1 téměř trojnásobně vyšší. U P2 hodnoty KIM-1 kolísaly a poslední dávka GM nemohla být stanovena kvůli uhynutí tohoto potkana v 6. den aplikace. U P3 hodnoty KIM-1 také kolísaly, ale už od 3. dne aplikace GM koncentrace KIM-1 vzrůstala. U kontrol pro cysC měl P2 velmi nízkou hladinu markeru oproti P1 a P3. Potkan č. 3 (P3) měl zde nejvyšší hladinu markeru. U P1 a P3 byly hladiny cysC po 7. dni aplikace GM výrazně vyšší oproti fyziologickým roztokům. U P2 nejsou výsledky kvůli jeho uhynutí. A u kontrol biomarkeru NGAL měl P1 velmi nízkou hodnotu oproti P2 a P3, jejichž hodnota byla 3x vyšší. U P2 byly stanoveny opět jen hladiny ze dvou dat po podání GM a to (3. a 5. den aplikace), po 6. aplikaci P2 uhynul. U tohoto potkana byly hladiny ve 3. den aplikace GM mírně nižší a v 5. den aplikace o něco vyšší oproti fyziologickému roztoku. Po aplikaci GM hladiny NGAL různě kolísaly, např. u P1 se koncentrace NGAL snižovaly z důvodu možné regenerace ledvin tohoto potkana. U P3 hodnoty NGAL po 3. aplikaci GM byly nejvyšší a po dalších aplikacích GM hladiny NGAL kolísaly.

Tyto experimenty ukázaly, že se stoupajícím poškozením ledvin se zvyšovaly i hladiny KIM-1, cysC a NGAL. Nalezené výsledky jsou v souladu s dříve publikovanými údaji od jiných autorů o citlivosti těchto 3 biomarkerů pro včasnou detekci poškození ledvin.

V jedné studii s dávkováním po dobu dvou týdnů byla zjištěna nefrotoxicita téměř 2x závažnější už po prvním týdnu podávání GM. Toto zjištění je v souladu s hypotézou, že rozdílný rozsah GM indukované renální toxicity podle doby podávání hraje významnou roli v diferenciálním množství úmrtnosti zvířat podle doby podávání. Souhrnné výsledky této studie nicméně také zdůvodňují hypotézu, že cirkadiánní rytmy mohou mít definitivní vliv na nepříznivé účinky aminoglykosidových antibiotik. (Blunston et al. 2015).

Kvantifikace močového KIM-1 je tedy velmi užitečná pro hodnocení poškození ledvin v patofyziologických studiích na zvířatech, pro prediktivní toxikologii a může zlepšit naši schopnost identifikovat účinné terapeutické látky pro poškození ledvin a eliminovat nefrotoxické sloučeniny na počátku procesu vývoje léčiv (Vaidya et al. 2006). Zjišťuje včasné poškození ledvin s podezřením na proximální tubuly, rozlišuje

glomerulární a tubulární poškození a sleduje reverzibilitu nebo regeneraci s podezřením na proximální tubulární lokalizaci (Van Meer et al. 2014).

CysC je cenným biomarkerem funkce ledvin u CKD, progresu onemocnění ledvin a predikce kardiovaskulárních onemocnění (Wasung et al. 2015). Sleduje obecnou funkci ledvin (GFR) a toxicitu s podezřením na neglomerulární filtraci (Van Meer et al. 2014).

NGAL, další dobře prozkoumaný a prominentní proteinový močový biomarker, který jsme testovali v naší práci, může podle studii představovat časný, citlivý, neinvazivní močový biomarker pro ischemické a nefrotoxické poškození ledvin (Edelstein Ch. L. 2008). Také sleduje toxicitu s podezřením na neglomerulární lokalizaci jako cysC (Van Meer et al. 2014). Bylo zjištěno, že interval měření ELISA je mnohem nižší než skutečné koncentrace NGAL pozorované v lidském séru a moči. Výsledkem je, že před analýzou pomocí ELISA je nutný krok ředění, což vede k těžkopádnému kroku přípravy a možným chybám měření (Bovornvirakit et al. 2013).

KIM-1 je upřednostňován, protože existuje více důkazů o jeho výkonnosti ve srovnání s jinými biomarkery. Kromě toho úzká korelace KIM-1 s histopatologií a zjištění, že může být použit také ke sledování reverzibility, naznačuje, že KIM-1 je biomarker volby. NGAL je užitečný, pokud existuje podezření na tubulární zapojení, ale není přítomna jasná představa o tubulární lokalizaci. Pokud je vyžadována obecná funkce ledvin, a proto je nutná míra clearance, je vhodné zahrnout cysC, nejlépe v kombinaci s konkrétnějšími markery k lokalizaci původu pozorovaného účinku (Van Meer et al. 2014).

Kombinace biomarkerů má potenciál poskytnout přesnější výsledky, avšak metodické problémy mohou vést k předpojatosti ve vývoji kombinací biomarkerů. Biomarkery však mohou být potenciálně velmi užitečné, pokud jsou správně vybrány a testovány (Binnenmars et al. 2017). Je také důležité, aby biomarkery nebyly ovlivněny extrarenálními faktory, jako je věk, pohlaví, svalová hmota a stav hydratace (Yerramilli et al. 2016). Kvalifikace biomarkerů bude vyžadovat velké a dobře navržené prospektivní studie srovnávající více biomarkerů ve stejné sadě vzorků moči v prodloužených časových cyklech. Tyto studie umožní stanovit panely biomarkerů, které mohou být specifické pro mechanismus poškození ledvin (Vaidya et al. 2008).

8. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zavést a optimalizovat metodu ELISA v našich laboratorních podmínkách. Následně stanovit hladiny biomarkerů KIM-1, cysC a NGAL v potkaní moči a plazmě po expozici nefrotoxického aminoglykosidového léčiva GM.

- Stanovení hladiny biomarkerů probíhalo za použití metody ELISA pomocí komerčně dostupných kitů. Výsledky provedených experimentů odpovídají publikovaným údajům, což prokazuje použitelnost metody sendvičové ELISA pro tyto 3 biomarkery jako možnost včasné detekce při identifikaci nefrotoxických vedlejších účinků léčiv.
- Tyto 3 biomarkery (Kim-1, cysC a NGAL) byly v nízkých hodnotách vylučovány i u zdravých potkanů a po vystavení GM, byly jejich koncentrace razantně zvýšeny, což potvrzuje jejich citlivost pro včasnou detekci poškození ledvin. Masivní vylučování těchto biomarkerů je známkou masivního poškození ledvinných buněk.

9. LITERATURA

Anonym. Gentamicin. In: *National Center for Biotechnology Information. PubChem Database*. 2019. Dostupné na URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3467>.

Datum přístupu: 26. 3. 2020

Anonym. Kidney injury molecule -1 (KIM-1) - an important indicator of early kidney disease. In: *An Original Design Manufacturer for Assay reagent, Analysis equipment; Contract Research Organisation or Animal experiment. Cloud-Clone Corp*. 2014.

Dostupné na URL: <https://www.cloud-clone.us/topic/201412110419300025.htm>. Datum přístupu: 26. 3. 2020

ASIMAKOPOULOU, A., S. WEISKIRCHEN and R. WEISKIRCHEN. Lipocalin 2 (LCN2) Expression in Hepatic Malfunction and Therapy. *Frontiers in Physiology*, 2016, 7.

BINNENMARS, S. H, RS HIJMANS, G NAVIS a MH DE BORST. Biomarkers of Renal Function: Towards Clinical Actionability. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2017, 102(3), 481-492.

BLUNSTON, M. A., AI YONOVITZ, E. L. WOODAHL and M. H. SMOLENSKY. Gentamicin-induced ototoxicity and nephrotoxicity vary with circadian time of treatment and entail separate mechanisms. *Chronobiology International*, 2015, 32(9), 1223-1232.

BOVORNVIRAKIT, T., Y. AVIHINGSANON, K. TIRANATHANAGUL a K. VIRAVAIIDYA-PASUWAT. A miniaturized immunoassay platform to measure neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) for diagnosis of acute kidney injury. *Biomarkers*, 2013, 18(3), 273-278.

CAMPOS, M. A. A., L. A. DE ALMEIDA, M. F. GROSSI a C. A. TAGLIATI. In vitro evaluation of biomarkers of nephrotoxicity through gene expression using gentamicin. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2018, 32(9).

DEUTSCHMANN, C., D. ROGGENBUCK, P. SCHIERACK and S. RÖDIGER. Autoantibody testing by enzyme-linked immunosorbent assay-a case in which the solid phase decides on success and failure. *Heliyon*, 2020, 6(1).

EDELSTEIN, C. L. Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 2008, 15(3), 222-234.

FALKENBERG, F. W., U. MAI, C. PUPPE, et al. Urinary Kidney-Derived Antigens Determined by Tests Built on Monoclonal Antibodies: New Markers for Kidney Damage. *Uremia Investigation*, 2009, 9(2), 103-110.

FARRAR, A. Acute Kidney Injury. *Nursing Clinics of North America*, 2018, 53(4), 499-510.

FERENBACH, D. A. and J. V. BONVENTRE. Acute kidney injury and chronic kidney disease: From the laboratory to the clinic. *Néphrologie & Thérapeutique*, 2016, 12, S41-S48.

GAIÃO, S. M. and J. A. O. de C. PAIVA. Biomarkers of renal recovery after acute kidney injury. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 2017, 29(3).

HAYWARD, R. S., J. HARDING, R. MOLLOY, L. LAND, K. LONGCROFT-NEAL, D. MOORE and J. D. C. ROSS. Adverse effects of a single dose of gentamicin in adults: a systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2018, 84(2), 223-238.

HUANG, J. X, M. A. BLASKOVICH and M. A. COOPER. Cell- and biomarker-based assays for predicting nephrotoxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2014, 10(12), 1621-1635.

CHEN, T. K., D. H. KNICELY and M. E. GRAMS. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management. *JAMA*, 2019, 322(13).

INUI, KI, S. MASUDA, H. SAITO. Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney International*, 2000, 58(3), 944-958.

KIM, SY and AR MOON. Drug-Induced Nephrotoxicity and Its Biomarkers. *Biomolecules and Therapeutics*, 2012, 20(3), 268-272.

KOYNER, J. L. and C. R. PARIKH. Clinical Utility of Biomarkers of AKI in Cardiac Surgery and Critical Illness. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2013, 8(6), 1034-1042.

LEVEY, A. S. a M. T. JAMES. Acute Kidney Injury. *Annals of Internal Medicine*, 2017, 167(9).

LOPEZ-GIACOMAN, S. Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage. *World Journal of Nephrology*, 2015, 4(1).

- MALYSZKO, J., E. LUKASZYK, I. GLOWINSKA and M. DURLIK. Biomarkers of delayed graft function as a biomarker of acute kidney injury in kidney transplantation. *Scientific Reports*, 2015, 5(1).
- MURRAY, P. T., R. L. MEHTA, A. SHAW, et al. Potential use of biomarkers in acute kidney injury: report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference. *Kidney International*, 2014, 85(3), 513-521.
- NAFIU, A. O., R. O. AKOMOLAFE, Q. K. ALABI, C. O. IDOWU and O. O. ODUJOKO. Effect of fatty acids from ethanol extract of *Moringa oleifera* seeds on kidney function impairment and oxidative stress induced by gentamicin in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, **117**
- OSMEKHINA, E., A. NEUBAUER, K. KLINZING, J. MYLLYHARJU and P. NEUBAUER. Sandwich ELISA for quantitative detection of human collagen prolyl 4-hydroxylase. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9(1).
- PLAJER, S. M., P. K. L. CHIN, J. W. A. VELLA-BRINCAT, P. J. BUFFERY and E. J. BEGG. Gentamicin and Renal Function. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2015, 37(1), 98-103.
- RANDJELOVIĆ P., S. VELJKOVIĆ, N. STOJILJKOVIĆ, D. SOKOLOVIĆ and I. ILIĆ. Gentamicin nephrotoxicity in animals: current knowledge and future perspectives. *EXCLI Journal*, 2017, 16, 388-399.
- SABBISSETTI, V. S., K. ITO, C. WANG, Li YANG, S. C. MEFFERD and J. V. BONVENTRE. Novel Assays for Detection of Urinary KIM-1 in Mouse Models of Kidney Injury. *Toxicological Sciences*, 2013, 131(1), 13-25.
- SAKAMOTO, S., W. PUTALUN, S. VIMOLMANGKANG, W. PHOOLCHAROEN, Y. SHOYAMA, H. TANAKA and S. MORIMOTO. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines*, 2018, 72(1), 32-42.
- SINHA, V., L. M. VENCE and A. K. SALAHUDEEN. Urinary Tubular Protein-Based Biomarkers in the Rodent Model of Cisplatin Nephrotoxicity. *Journal of Investigative Medicine*, 2015, 61(3), 564-568.

- SOARES, D. M., J. F. PESSANHA, A. SHARMA, A. BROCCA and C. RONCO. Delayed Nephrology Consultation and High Mortality on Acute Kidney Injury: A Meta-Analysis. *Blood Purification*, 2017, 43(1-3), 57-67.
- TAGLIERI, N., W. KOENIG and J. C. KASKI. Cystatin C and Cardiovascular Risk. *Clinical Chemistry*, 2009, 55(11), 1932-1943.
- TEO, S. H. and Z. H. ENDRE. Biomarkers in acute kidney injury (AKI). *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 2017, 31(3), 331-344.
- Teplan V. Akutní selhání ledvin. In: Tesař V., Schück O. a kolektiv. *Klinická nefrologie*. 1.vyd. Praha: Grada Publishing, a.s., 2006. Kapitola 13, s. 451–476. ISBN 80-247-0503-6.
- THAITRONG, N., R. CHARLERMROJ, O. HIMANANTO, C. SEEPIBAN, N. KAROONUTHAISIRI and R. C. WILLSON. Implementation of Microfluidic Sandwich ELISA for Superior Detection of Plant Pathogens. *PLoS ONE*, 2013, 8(12).
- TUMMALAPALLI, L., G. N. NADKARNI and S. G. COCA. Biomarkers for predicting outcomes in chronic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2016, 25(6), 480-486.
- VAIDYA, V. S., M. A. FERGUSON and J. V. BONVENTRE. Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2008, 48(1), 463-493.
- VAIDYA, V. S., V. RAMIREZ, T. ICHIMURA, N. A. BOBADILLA and J. V. BONVENTRE. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 2006, 290(2), F517-F529.
- VAN MEER, L., M. MOERLAND, A. F. COHEN and J. BURGGRAAF. Urinary kidney biomarkers for early detection of nephrotoxicity in clinical drug development. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2014, 77(6), 947-957.
- WASUNG, M. E., L. S. CHAWLA a M. MADERO. Biomarkers of renal function, which and when? *Clinica Chimica Acta*, 2015, 438, 350-357.
- WEBSTER, A. C., E. V NAGLER, R. L MORTON a P. MASSON. Chronic Kidney Disease. *The Lancet*, 2017, 389(10075), 1238-1252.

YERRAMILI, M., G. FARACE, J. QUINN a M. YERRAMILI. Kidney Disease and the Nexus of Chronic Kidney Disease and Acute Kidney Injury. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 2016, 46(6), 961-993.