

## ZAKLJUČNO POROČILO

*o rezultatih internega raziskovalnega projekta UKC Maribor  
za obdobje od 19. 9. 2018 do 18. 9. 2021*

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta:	IRP-2018/01-07	
Naslov projekta:	RAZVOJ IN TESTIRANJE CELIČNIH LINIJ Z NAMENOM PROUČEVANJA NEFROTOKSIČNOSTI NA MODELU <i>IN VITRO</i> NEFRONA	
Vodja projekta:	prof. dr. Sebastjan BEVC, dr. med.	
Trajanje projekta (leta, od-do):	3 leta	19. 9. 2018 – 18. 9. 2021
Velikost projekta	<input checked="" type="radio"/> mali (10.000,00 EUR)	<input type="radio"/> veliki (50.000,00 EUR)

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

#### 1. Poročilo o realizaciji predloženega programa raziskovalnega projekta - opis raziskave (izhodišča, predstavitev problema, metode dela), ugotovljeni rezultati in uporaba (*največ do 3 strani*)

Prevalenca bolnikov s končno ledvično odpovedjo (KLO) je leta 2014 v Evropi znašala 490.743 bolnikov (924 na milijon prebivalcev), od katerih se jih je 57% zdravilo s hemodializo, 5% s peritonealno dializo, 37% jih je imelo presajeno ledvico. Bolniki s KLO predstavljajo le vrh ledene gore bolnikov s kronično ledvično boleznijo (KLB), katere prevalenco v razvitem svetu ocenjujejo na okoli 10%. Zaradi naraščanja prevalenca KLB in bolnikov s KLO stroka intenzivno raziskuje razvoj umetne ledvice, ki bi izboljšala zdravljenje bolnikov s KLB.

Izgradnja *in vitro* modelov ledvice iz človeških celic omogoča proučevanje zgodnjih stopenj ledvične bolezni v nadzorovanem, laboratorijskem okolju. Za izdelavo so potrebne ustrezne celične linije, ki jih lahko uporabimo na dva načina. Lahko se uporabijo posamezni celični tipi, ki se jih prisili v izgradnjo ustrezne celične arhitekture podobni *in vivo* ali pa se uporabi izrezane dele organov, ki že vsebujejo ustrezno celično arhitekturo. Ledvične celice se najpogosteje osamijo iz nasprotnega pola rakasto spremenjene ledvice po nefrektomiji, lahko pa se pridobijo tudi z uporabo ledvične biopsije bolnikov brez rakasto spremenjene ledvice.

V raziskavah so že poročali o izolaciji nekaterih ledvičnih celic – najpogosteje proksimalnih tubulnih celicah, redkeje o mezangijskih celicah, podocitih in ledvičnih progenitornih celicah odraslih. Njihove protokole za izolacijo je potrebno prilagoditi, da bi zagotovili večji izkoristek samih postopkov in daljšo obstojnost celic. Le tako bo mogoče slednje uporabiti za izgradnjo funkcionalnih *in vitro* modelov ledvic.

Navkljub obstoju nekaterih *in vitro* modelov nefrona, so slednji bodisi preveč preprosti, da bi omogočali napredno funkcionalno testiranje v odnosu s specifičnimi boleznimi, bodisi temeljijo na imortaliziranih celicah, ki v popolnosti ne odražajo nativnega fenotipa izoliranih celic človeškega nefrona.

Cilj našega projekta je bil dosežen, saj smo iz tkivnih vzorcev ledvične biopsije nerakastega bolnika večkrat uspešno izolirati celice, ki bodo osnova izdelave celične linije.

Po uspešni pridobitvi materialnih in nematerialnih sredstev za nadaljevanje projekta smo v postopku karakterizacije izoliranih celic (barvanja za dokaz pristnosti identifikacijskih markerjev za PTEC in podocyte (N-cadherin, SGLT2, MRP4, P-PG, MATE-1, OAT3, AAA4, nefrin, NPHS2 + sekundarna PT)).

Cilj našega projekta je bil iz tkivnih vzorcev ledvične biopsije nerakastih bolnikov izolirati celice in izdelati celične linije. Želeli smo izdelati kvaliteten protokol za izolacijo ledvičnih celičnih linij, pridobiti celične linije in narediti komparativno analizo naše linije s standardnimi linijami, ki so komercialno že delno dostopne.

Samo raziskavo smo zastavili večnivojsko, pri čemer bo vsak nivo predstavljal nadgrajeno stopnjo kompleksnosti pripravljenih *in vitro* modelov:

1. Izolacija in karakterizacija izoliranih celic iz človeškega nevrona (STANJE: izolacija je bila uspešno izvedena na več biopsijskih vzorcih, s čemer smo vzpostavili protokol izolacije in gojenja. Karakterizacija je v teku.
2. Preverjanje primernosti izoliranih celic kot model za vrednotenje ledvičnega izločanja različnih zdravilnih učinkovin, ki se izločajo z aktivnim procesom tubularne sekrecije (P-PG, OAT, OCT transporterji) (STANJE: Ob zaključeni karakterizaciji bo sledila realizacija 2. točke/nivoja raziskave).
3. Izgradnja funkcionalnega *in vitro* ledvičnega modela (iz vsaj dveh tipov celic) (STANJE: predvideno po realizaciji 2. točke/nivoja raziskave).

Raziskava je trenutno v fazi zaključka prvega nivoja in realizacije drugega nivoja.

## 2. Ocena stopnje realizacije in zastavljenih raziskovalnih ciljev (*obkrožite*)

DA       NE

Če je odgovor NE, napišite kratko utemeljitev


COVID 19 pandemija je vplivala na izvedbo zastavljenih ciljev projekta. Ob relativnem izboljšanju pogojev za nadaljnje raziskovanje je raziskava trenutno v polnem teku, v fazi zaključka prvega nivoja in realizacije drugega nivoja.

**3. Pridobitev za UKC Maribor - doktorska disertacija, članek, prispevek na znanstveni konferenci/simpoziju ali kongresu, patent, uvedba novih dejavnosti, smernic in metod ali izboljšanje že obstoječih itd. (največ do 1 stran)**

<p>Doktorska disertacija, magistrska naloga, raziskovalna naloga, specialistična naloga:                  V projektu nadalje sodeluje asist. Tadej Petreski, dr. med., specializant interne medicine, podiplomski študent MF UM, ki je septembra 2021 na UM oddal predlog teme doktorske disertacije z naslovom: <b>Izolacija in priprava celičnih linij ledvic z namenom razvoja novih <i>in vitro</i> modelov nefrotoksičnosti.</b></p>
<p>Objavljeni članki:                  MIHEVC, Matic, PETRESKI, Tadej, MAVER, Uroš, BEVC, Sebastjan. <b>Renal proximal tubular epithelial cells : review of isolation, characterization, and culturing techniques.</b> <i>Molecular biology reports.</i> Dec. 2020, vol. 47, issue 12, str. 9865-9882, ilustr. ISSN 1573-4978.  <a href="https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-020-05977-4">https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-020-05977-4</a>, <a href="https://doi.org/10.1007/s11033-020-05977-4">https://doi.org/10.1007/s11033-020-05977-4</a>, DOI: <a href="https://doi.org/10.1007/s11033-020-05977-4">10.1007/s11033-020-05977-4</a>. [COBISS.SI-ID <a href="https://doi.org/10.1007/s11033-020-05977-4">37514499</a>]                  financer: ARRS, Programi, P3-0036, SI, Bio-psiho-socialni model kvalitete življenja; ARRS, Projekti, L4-1843, SI, Inovativni afinitetni sistem za ločevanje populacij krvnih celic; Univerzitetni klinični center Maribor, Projekti, IRP 2018/01</p>
<p>Nove metode, smernice, dejavnosti:                  V prvi vrsti gre za inovativen način v smeri razumevanja delovanja nefrona in njegove uporabe v laboratorijskem okolju. Na eni strani se nadejamo, da bomo z izolacijo tovrstnih modelov pridobili osnovne modele za vrednotenje aktivne tubularne sekrecije, ki je eno izmed pogostih mest za nastanek farmakokinetičnih interakcij med zdravili. Po drugi strani pa lahko ob uspešni izolaciji različnih tipov celic utemeljeno pričakujemo nove funkcionalne modele, ki bodo omogočili študij številnih bolezni ledvic v <i>in vitro</i> okolju. To bo omogočalo tako naše poglobljeno razumevanje nastanka patoloških sprememb, na drugi pa bo omogočalo tudi razvoj novih terapevtskih pristopov za zdravljenje le-teh. Kot zadnje (ob pogledu naprej), pa se nam z uspešno izolacijo obeta tudi možnost izgradnje kompleksnejših bolezenskih modelov, ki bodo zgrajeni iz ledvičnih in žilnih celic, s čimer bomo lahko preiskovali tudi kompleksnejše bolezni oz. patologije.</p>
<p>Prispevki (konference, srečanja, kongresi, simpoziji):                  Sprejetje prispevka na z naslovom: <b>Development of functional in vitro kidney models from biopsy specimens</b>, avtorjev tadej Petreski, Uroš Maver, Sebastjan Bevc na konferenci »7th International Polysaccharide Conference 2021«, Nantes, France.  <a href="https://symposium.inrae.fr/epnoe2021/content/download/5654/62880/version/4/file/BOOK_EPNOE_final.pdf">https://symposium.inrae.fr/epnoe2021/content/download/5654/62880/version/4/file/BOOK_EPNOE_final.pdf</a></p>

**4. Sumaričen prikaz ciljev projekta (obvezno izpolnite!)**

	Doktorat, magisterij, raziskovalna ali specialistična naloga	Objavljeni članki	Nove metode, smernice, dejavnosti	Prenos znanja (konference, srečanja, kongresi, simpoziji)
(DA/NE)	da (v teku)	da	da	da
Število	1	1	1	1

Datum: 13.10.2021	Podpis vodje projekta: Sebastjan Bevc 
----------------------	--

Izpolni Oddelek za znanstveno-raziskovalno delo

REALIZACIJA PROJEKTA

- CILJI IZPOLNjeni V CELOTI  
 CILJI DELNO IZPOLNjeni  
 CILJI NISO IZPOLNjeni

Porabljena sredstva (v EUR):

10.709,16  
Predvidena vrednost: 14.500 EUR

Pregledal in ocenil predstojnik OZRD:

Podpis: \_\_\_\_\_

Datum: 25.3.22