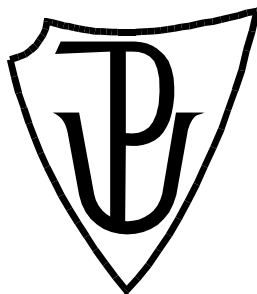


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Optimalizace *in vitro* modelu cholinergních neuronů
odvozených z glioblastomové linie U-87MG: skopolaminem
indukovaná degenerace a testování neuroprotektivní aktivity**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kristýna Šomodiová
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Gabriel Gonzalez, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2023

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Kristýna Šomodiová
Název práce	Optimalizace <i>in vitro</i> modelu cholinergních neuronů odvozených z glioblastomové linie U-87MG: skopolaminem indukovaná degenerace a testování neuroprotektivní aktivity
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Gabriel Gonzalez, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Celá řada neurodegenerativních chorob, jako je Parkinsonova a Alzheimerova choroba, zahrnuje poškození cholinergních neuronů. Studium těchto onemocnění je vázáno na zvířecí a buněčné modely. *In vitro* modely disponují celou řadou výhod, ovšem v případě cholinergních neuronů jsou založeny téměř výhradně na primárních kulturách, které s sebou přinášejí řadu omezení. Tato práce má za cíl optimalizovat *in vitro* model cholinergních neuronů odvozených od glioblastomové linie U-87MG, optimalizovat na tomto modelu skopolaminem indukovanou toxicitu a testovat neuroprotektivitu vybraných látek. Vše v porovnání s již zavedeným modelem cholinergních neuronů, buněčnou linií SH-SY5Y diferenciovanou pomocí all-*trans* kyseliny retinové. K diferenciaci linie U-87MG na cholinergní fenotyp slouží butyrát sodný.

Experimentální část práce se zabývá validací diferenciaci na cholinergní fenotyp pomocí: snímání změn morfologie buněk (před a po diferenciaci), Western blot analýzy a imunofluorescenčního barvení vybraných proteinů (muskarinové receptory, neurofilament-M, synaptický vezikulární protein a další) ve spojení s fluorescenční a konfokální mikroskopií. Následně byla provedena optimalizace kultivace, násady a diferenciaci buněk, včetně koncentrace použitého diferenciacního činidla. Dále se práce zabývá optimalizací *in vitro* modelu skopolaminem indukované degenerace, v rámci níž byla testována vhodná koncentrace skopolaminu, na kterou navázalo testování neuroprotektivní látek z řad modulátorů cholinergního systému jako např. inhibitor cholinesteráz galantamin, donepezil či rivastigmin. Klíčovým aspektem bylo určení mechanismu buněčné smrti indukované skopolaminem obou linií pomocí činidel stanovujících buněčnou smrt, apoptózu a autofagii.

Klíčová slova	Cholinergní neurony, U-87MG, skopolamin, butyrát sodný, diferenciaci, autofagie
Počet stran	92
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Kristýna Šomodiová
Title of thesis	Optimization of a <i>in vitro</i> model of cholinergic neurons derived from the glioblastoma cell line U-87MG: scopolamine-induced degeneration and testing of neuroprotective activity
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Gabriel Gonzalez, Ph.D.
The year of presentation	2023

Abstract

A number of neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's disease involve damage of cholinergic neurons. The study of these diseases is committed to animal and cellular models. *In vitro* models have a number of advantages, but in the case of cholinergic neurons, they are based almost exclusively on primary culture which bring several limitations. This work aims to optimize an *in vitro* model of cholinergic neurons derived from the glioblastoma line U-87MG, to optimize scopolamine-induced toxicity on this model and to test the neuroprotection of selected substances. Everything will be compared to an already established model of cholinergic neurons, the SH-SY5Y cell line differentiated with all-*trans* retinoic acid. Sodium butyrate is used to differentiate the U-87MG line into a cholinergic phenotype.

The experiment part of the thesis deals with the validation of differentiation into cholinergic phenotype using: sensing changes in cell morphology (before and after differentiation), Western blot analysis and immunofluorescence staining of selected proteins (muscarinic receptors, neurofilament-M, synaptophysin and others) in conjunction with fluorescent and confocal microscopy. Subsequently, we carried out the optimization of cultivation, seeding and differentiation of cells, including the concentration of the used differentiation agent used. Furthermore, the work deals with the optimization of the *in vitro* model of scopolamine-induced degeneration in which the appropriate concentration of scopolamine was tested. This was followed by the testing of neuroprotective substances from the range of modulators of the cholinergic system, such as the cholinesterase inhibitor galantamine, donepezil or rivastigmine. A crucial aspect was to determine the mechanism of scopolamine-induced cell death of both cell lines using agents determining cell death, apoptosis and autophagy assays.

Keywords	Cholinergic neurons, U-87MG, scopolamine, sodium butyrate, differentiation, autophagy
Number of pages	92
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Gabriela Gonzaleze, Ph.D. za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 5. 5. 2023

.....

Bc. Kristýna Šomodiová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli panu Mgr. Gabrielovi Gonzalezovi, Ph.D. za vloženou důvěru, předané znalosti, čas, podporu v kritických fázích práce a zejména za možnost rozvíjet se. Dále Mgr. Marii Kvasnicové, Ph.D. za veškeré konzultace a cenné rady. Nemohu opomenout poděkovat vždy ochotné Bc. Dítě Jordové za pomoc, stejně jako Mgr. Miroslavu Kvasnicovi, Ph.D. za možnost konzultací.

Tato diplomová práce byla vypracována s podporou Grantové agentury České republiky (GA20-15621S. a 23-05389S.), projektu ENOCH (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868) a Interní grantové agentury Univerzity Palackého (projekt IGA_PrF_2023_012).

OBSAH

Seznam zkratk	8
1 Úvod	11
2 Současný stav řešené problematiky	12
2.1 Onemocnění spojená s poškozením cholinergních neuronů	12
2.2 Buněčné modely pro studium cholinergních neuronů	14
2.3 Buněčná linie SH-SY5Y	17
2.4 Buněčná linie U-87	20
2.5 Skopolamin	21
3 Experimentální část	28
3.1 Materiál	28
3.1.1 Chemikálie a roztoky	28
3.1.2 Biologický materiál	30
3.1.3 Použité protilátky	31
3.2 Použité přístroje a zařízení	32
3.3 Použité programy – Software	33
3.4 Kultivace a diferenciacie buněk	33
3.5 Validace diferenciacie na cholinergní fenotyp	34
3.5.1 Kultivace buněk pro western blot a jejich sklizení	34
3.5.2 Lyzace buněk pro western blot analýzu	35
3.5.3 Polyakrylamidová elektroforéza a western blot	35
3.5.4 Imunodetekce proteinů	36
3.5.5 Imunofluorescenční detekce proteinů	37
3.5.5.1 Fixace formaldehydem	37
3.5.5.2 Fixace methanol-aceton (1:1)	38
3.6 Optimalizace modelu – ošetření buněk skopolaminem	39
3.6.1 Propidium jodid	39
3.6.2 YO-PRO TM 1 jodid	39
3.6.3 Test pro buněčnou proliferaci a viabilitu WST-1	40
3.6.4 Měření oxidativního stresu pomocí dihydroethidia (DHE)	40
3.6.5 Stanovení buněčné smrti pomocí laktátdehydrogenázy (LDH)	40
3.7 Nalezení mechanismu buněčné smrti indukované skopolaminem	40

3.7.1	Měření autofagie	41
3.7.2	Měření aktivity kaspázy 3/7	41
3.7.3	Pozorování autofagozomů.....	41
3.8	Testování protektivní aktivity kandidátních sloučenin a stanovení cytotoxicity	41
3.8.1	Stanovení cytotoxicity.....	42
3.8.2	Mitochondriální superoxidový indikátor MitoSox.....	42
3.8.3	Měření mitochondriálního membránového potenciálu pomocí JC-10.....	42
4	Výsledky a diskuse	43
4.1	Validace diferenciaci na cholinergní fenotyp.....	43
4.1.1	Pozorování změn morfologie	43
4.1.2	Western blot analýza	45
4.1.3	Imunofluorescenční analýza.....	47
4.2	Optimalizace modelu skopolaminem indukované toxicity na modelu cholinergních neuronů.....	54
4.2.1	Optimalizace násady	54
4.2.2	Optimalizace koncentrace diferenciačního činidla	57
4.2.3	Optimalizace koncentrace použitého toxinu	58
4.3	Nalezení mechanismu buněčné smrti indukované skopolaminem.....	62
4.4	Testování neuroprotektivní aktivity a cytotoxicity	72
4.4.1	Stanovení cytotoxicity.....	72
4.4.2	Testování neuroprotektivní aktivity	73
5	Závěr.....	84
	Seznam použité literatury.....	86

Seznam zkratek

6-OHDA	6-hydroxydopamin
AA	akrylamid
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
Akt	proteinkináza B
ALS	amyotrofická laterální skleróza
APS	peroxodisíran amonný
ASCL1	<i>z angl. Achaete-Scute Family BHLH transcription Factor 1</i>
ATP	adenosintrifosfát
ATRA	<i>all-trans</i> kyselina retinová
BACE1	<i>z angl. beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1</i>
Bax	protein X asociovaný s lymfomem B-buněk
Bcl-2	lymfom B-buněk 2 (<i>B-cell lymphoma</i>)
BDNF	<i>z angl. Brain-derived neurotrophic factor</i>
BChE	butyryl-cholinesteráza
Bis AA	<i>N,N'</i> -methylenbisakrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
CNS	centrální nervová soustava
COX-2	cyklooxygenáza 2
CHRNE	<i>z angl. Cholinergic Receptor Nicotinic Epsilon Subunit</i>
CREB	<i>z angl. cAMP response element-binding protein</i>
DA	dopamin
DAT	dopaminový transportér
DHE	dihydroethidium
DMEM/F12	<i>z angl. Dulbecco's modified Eagle's Medium and Ham's F12 Nutrient Mixture</i>
DMSO	dimethylsulfoxid
DON	donepezin
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová

EGTA	kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraoctová
ERK	extracelulárním signálem regulovaná kináza
FBS	fetální bovinní sérum
GABA	gama-aminomáselná kyselina
GAL	galantamin
GDNF	z angl. <i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GFAP	z angl. <i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GSK3 β	z angl. <i>Glycogen synthase kinase-3β</i>
HBSS	Hankův vyvážený solný roztok
HD	Huntingtonova choroba
HSP27	z angl. <i>Heat shock protein 27</i>
ChAT	cholinacetyltransferáza
IL-6	interleukin 6
IL-1 β	interleukin 1 β
iNOS	inducibilní NO syntáza
JNK	c-Jun N-terminální kináza
LDH	laktátdehydrogenáza
mAChR	muskarinový acetylcholinový receptor
MAP	z angl. <i>Microtubule-associated protein</i>
MPP+	1-methyl-4-phenyl-pyridinový ion
MPTP	1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NA	noradrenalin
NaB	butyrát sodný
nAChR	nikotinový acetylcholinový receptor
NAD(P)H	nikotinadenindinukleotid fosfát
NEC-1	necrostatin-1
NeuN	z angl. <i>Neuronal nuclei</i>
<i>NEUROD1</i>	z angl. <i>Neuronal differentiation 1</i>
<i>NEUROD6</i>	z angl. <i>Neuronal differentiation 6</i>
NF-M	neurofilament-M
NF- κ B	jaderný faktor T lymfocytů κ B
NGF	z angl. <i>Neuronal growth factor</i>
NMDA	N-methyl-D-asparagová kyselina

<i>NQO1</i>	gen pro NAD(P)H chinon dehydrogenázu 1
NSE	neuron-specifická enoláza
Nurr1	z angl. <i>Nuclear receptor related 1 protein</i>
OS	oxidativní stres
PARP	poly (ADP-ribóza)polymeráza
PBS	fosfátový pufr
PD	Parkinsonova choroba
PI	propidium jodid
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluorid
PS	penicillin-streptomycin
Ptx3	z angl. <i>Pentraxin-related protein</i>
<i>PTEN</i>	z angl. <i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
RAM	z angl. <i>rabbit-anti mouse</i>
RAR	z angl. <i>Retionic acid receptor</i>
RIPA	z angl. <i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RIV	rivastigmin
ROS	reaktivní formy kyslíku
RXR	z angl. <i>Retionid X receptor</i>
SCOP	skopolamin
SDS-PAGE	sodium-dodecylsulfát polyakrylamidová elektroforéza
SWAR	z angl. <i>swine-anti rabbit</i>
SYP	synaptofyzin
TAK1	z angl. <i>Transforming growth factor β-activated kinase 1</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
TH	tyrosinhydroxyláza
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TRIS	tris (hydroxymethyl) aminomethan
TuJ1	β -III tubulin

1 Úvod

Existuje celá řada onemocnění, při nichž jsou zasaženy cholinergní neurony. Mezi takováto onemocnění náleží některé autoimunitní choroby, onemocnění dýchacích cest, epilepsie, ale také neurodegenerativní choroby, jako je Alzheimerova choroba (AD), Parkinsonova choroba (PD) nebo například amyotrofická laterální skleróza (ALS) (Jordan et al., 2008; Schliebs et al., 2011; Udem et al., 2014). Pro pochopení těchto onemocnění, stejně jako pro možnost testování nových léčiv, jsou zapotřebí vhodné modely pro studium. Častým nástrojem ke studiu cholinergních neuronů jsou zvířecí modely, které jsou nejen eticky kontroverzní, ale také mnohdy špatně reflektují lidskou fyziologii a jsou rovněž finančně nákladné. Vysokou finanční zátěží disponují také primární cholinergní neurony. Jejich získávání je dále pracné a jedná se o plně zralé neurony bez schopnosti proliferace (Gordon et al., 2013). Proliferaci si zachovávají primární kmenové buňky, jež je následně možné diferenciovat na zralý fenotyp. I v tomto případě ovšem jde o nákladný proces, který je navíc komplikovaný a diferenciace je nezdědka kdy zdlouhavá (Lopes et al., 2017; Weinert et al., 2015). Oblíbenými buněčnými modely jsou sekundární buněčné linie odvozené z nádorových buněk. Ty si schopnost proliferace zachovávají, jejich získávání není složité a proces diferenciace je mnohdy jednokrokový. V současné době jsou pro studium cholinergních neuronů z řad sekundárních buněčných linií využívány linie SH-SY5Y, NT2 a PC12. Výběr je tedy poměrně omezený a každá má mimo své klady také negativa. Proto jsou zapotřebí další linie, které by se daly využít pro studium cholinergních neuronů. Linie U-87MG byla odvozena od lidského glioblastomu a dle Liu, Xia et al., 2019 je možno tuto linii diferenciovat pomocí butyrátu sodného (NaB) na cholinergní fenotyp.

Linie U-87MG a její diferenciace na cholinergní fenotyp je ústředním motivem této práce, její cíle byly stanoveny následovně. První část obsahuje validaci diferenciace na cholinergní fenotyp pomocí tří metod, a sice pozorování změn morfologie, analýzu Western blot s následnou imunodetekcí vybraných proteinů a imunofluorescenční analýzu vybraných proteinů. Následuje optimalizace modelu, která si kladla za cíl zavedení modelu linie U-87MG diferenciovaných pomocí NaB. Optimalizace se týká násady buněk, diferenciace a výběru vhodné koncentrace toxinu skopolaminu (SCOP), který byl vybrán pro indukci degenerace. V průběhu práce byl přidán další cíl, kterým je zjištění mechanismu buněčné smrti indukované SCOP. Poslední část práce je věnována testování neuroprotektivní aktivity vybraných látek.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Onemocnění spojená s poškozením cholinergních neuronů

Narůstající průměrná délka života, špatná životospráva i snižující se kvalita životního prostředí jsou vše činitele, kteří přispívají k přibývajícím prevalencím neurodegenerativních onemocnění. V mnohých případech je poškození cholinergních neuronů součástí jejich patologie. Při procesu stárnutí dochází k postupné ztrátě cholinergní funkce, která je způsobena dendritickou, synaptickou a axonální degenerací a rovněž snížením trofické podpory. Všechny tyto výše uvedené faktory poté mohou vést k poklesu genové exprese, poruchám intracelulární signalizace a cytoskeletálního transportu a zprostředkovat tak atrofii cholinergních buněk, což ve výsledku vede k funkčnímu poklesu mozku včetně kognitivních poruch (například poruchy paměti nebo učení). K nemocem spojených s kognitivními deficity řadíme PD, progresivní supranukleární obrnu, Korsakoffův syndrom, Downův syndrom nebo také AD (Schliebs et al., 2011). Cholinergní neurony nalezneme napříč celou centrální nervovou soustavou (CNS), nacházejí se zde však tři hlavní centra cholinergních projekcí. Bazální neurony předního mozku poskytují cholinergní projekce do mozkové kůry, centrum mozkového kmene do thalamu a mozečku, a nakonec jsou zde vlákna striata a míchy (de Lacalle et al., 1993; Mesulam et al., 1988; Heckers et al., 1992). Cholinergní neurony hrají klíčovou úlohu v procesech učení a paměti (Niewiadomska et al., 2011; Schliebs et al., 2011). Cholinergním neuronům slouží jako přímý neurotransmitter acetylcholin (ACh) a od jiných typů neuronových buněk se liší tím, že acetyl-CoA využívají nejen k produkci energie, ale také k syntéze ACh (Drachman, Leavitt, 1974). Neurotransmitter ACh hraje zásadní roli ve strukturální a funkční remodelaci kortikálních okruhů navazováním synaptických kontaktů v sítích buněk, které později v dospělosti přispívají ke komplexním kognitivním funkcím (Schliebs et al., 2011). Je ve značné míře distribuován v celé nervové soustavě, kde hraje nezbytnou úlohu ve vývoji mozkové kůry, spánkovém cyklu, řízení krevního průtoku, procesu učení a také paměti (Niewiadomska et al., 2011). Na paměti a kognitivních funkcích se cholinergní neurony spolu s ACh podílí tím, že zvyšují přívod informací do CNS, synapsí a udržování nových informací tam, kde je paměť v mozku zakódována (Drachman, Leavitt, 1974). Cholinergní dráhy mozku se účastní rovněž regulace průtoku krve mozkovou kůrou. Heterogenní muskarinové acetylcholinové receptory (mAChR) byly nalezeny také v kortikálních mikrocévkách, o kterých se vedou diskuse, zda zprostředkovávají dilataci

cév závislou na oxidu dusnatém (Schliebs et al., 2011).

Jak již bylo uvedeno, mnoho neurodegenerativních onemocnění zahrnuje ve své patologii poškození cholinergních neuronů. Mezi takováto onemocnění řadíme AD, ALS, PD, progresivní supranukleární obrnu, Jacob-Creutzfeldovu chorobu a další (Jordan et al., 2008; Schliebs et al., 2011). Při patologickém stárnutí, jako je například AD, dochází k rychlému poklesu počtu buněk (Schliebs et al., 2011). U pokročilých stádií AD je zjevná zejména ztráta cholinergní inervace v mozkové kůře, především ve spánkových lalocích. Při AD byla zjištěna ztráta až 55 % kortikálních cholinergních neuronů (Geula et al., 1996). Rovněž byly prokázány poklesy cholinergních markerů jako je cholinacetyltransferáza (ChAT), acetylcholinesteráza (AChE) i ACh (Schliebs et al., 2011). Cholinergní dysfunkce je nepopíratelně multifaktoriální proces, na kterém se ovšem prokazatelně u AD podílí ukládání beta-amyloidu v hipokampu a bazálním cholinergním systému předního mozku. Ukládání beta-amyloidu je jedním z hlavních histopatologických znaků AD. Ve výsledku vede k cholinergní insuficienci a ztrátě synapsí. Akumulace beta-amyloidu funguje defacto jako neurotoxin, který vede k indukci smrti neuronů. Beta-amyloid totiž přímo indukuje k apoptóze skrze zvýšené hladiny intracelulárního vápníku, reaktivní formy kyslíku (ROS) a abnormální nadměrné fosforylace tau (Huh et al., 2014). Jendou ze studovaných hypotéz je, že beta-amyloidní plaky indukují neurodegenerativní změny na cholinergních zakončeních. Není však jasné, zda ztráta a degenerace cholinergních zakončení jsou primární nebo sekundární v souvislosti s patologií beta-amyloidních plaků. Také deformované intracelulární fibrily jsou jedním z charakteristických znaků AD a představují intracelulární inkluze tvořené agregáty hyperfosforylovaného proteinu tau asociovaného s mikrotubuly a mohou se podílet na degradaci cholinergních neuronů (Schliebs et al., 2011).

Cholinergní poškození bylo ve značné míře zaznamenáno také u PD. Jedná se o multisystémové neurodegenerativní onemocnění charakteristické ztrátou dopaminergních neuronů v oblasti *Substantia Nigra* středního mozku a ukládáním Lewyho tělísek v mozkovém kmeni. Neuropatologické studie ukazují, že až 50 % cholinergních neuronů při PD degeneruje (Müller et al., 2013). Vznik Lewyho tělísek je asociován právě v centrech cholinergních neuronů (Pasquini et al., 2021). Cholinergní denervace se poté podílí na mnohých symptomech PD, motorických i nemotorických. Zde můžeme uvést například kognitivní poruchy, deprese, ztráta čichu, poruchy spánku, posturální nestabilitu nebo také poruchy chůze (Müller et al., 2013). Studie ukazují, že

cholinergní dysfunkce má vliv především na poruchy chůze, a to již při raných stádiích tohoto onemocnění. U PD byla rovněž zaznamenána snížená aktivita AChE (Rochester et al., 2012).

U ALS, fatálního progresivního neurodegenerativního onemocnění motorických neuronů, je cholinergní poškození spojováno s pozdními stádii tohoto onemocnění (Casas et al., 2013).

Bohužel stále platným faktem je, že na tato onemocnění často máme pouze symptomatickou léčbu, která pokrývá pouze potlačení příznaků choroby, nikoliv samotnou léčbu (Jordan et al., 2008). Pro pochopení charakteru těchto onemocnění, stejně jako pro nalezení vhodných léčiv, jsou zapotřebí vhodné modely pro studium, které budou dobře odrážet potřebné patologie a splňovat kritéria pro výzkum.

2.2 Buněčné modely pro studium cholinergních neuronů

Pro správné pochopení fungování nejrůznějších onemocnění, stejně jako pro testování potenciálních léčiv je důležité mít k dispozici vhodné modely. Onemocnění související s cholinergním poškozením jsou často studována na zvířecích modelech, které mnohdy špatně reflektují patogeneze u lidí a zároveň jsou zatížena etickou a finanční problematikou, stejně jako náročnou manipulací. Pouze velice málo modelů *in vitro* poskytuje vhodné cholinergní neurony (Liu, Xia et al., 2019). Získání neuronů je proces dosti komplikovaný a zároveň je jejich kultivace náročná. Zralé neurony totiž nemají schopnost proliferace, a proto je jejich počet omezený a tento způsob testování se tak stává také finančně náročným. Primární buněčné kultury jsou také více zatíženy etickým problémem stran jejich získávání v návaznosti na péči a nakládání se zvířaty a lidskými tkáněmi oproti odvozeným buněčným kulturám. Primární buněčné linie ovšem stále disponují tou výhodou, že lépe odrážejí vlastnosti neuronových buněk, jelikož nemají rakovinný původ a s tím spojené změny v rámci genomu, které se odrážejí v proliferaci, citlivosti na signální molekuly a další rysy charakteristické pro nádorové buňky. Rovněž jako nevýhodu můžeme zmínit obtížnější transfekci primární kultur. Zcela jistě nemůžeme opomenout fakt, že jejich získávání z tkání je obtížné. Tkáně jsou tvořené odlišnými typy buněk, které je při získávání primárních kultur potřeba od sebe odlišit, například pomocí markerů, kterými mohou být kupříkladu specifické protilátky. U neuronálních primárních kultur je zapotřebí od sebe odlišit zejména astrocyty a oligodendrocyty (Gordon et al., 2013).

Tento problém řeší sekundární buněčné linie odvozené z neuronálních nádorů,

kteří si schopnost proliferace zachovávají. Na živném médiu pak tyto buňky mohou být snadno kultivovány s minimální variabilitou mezi jednotlivými pasážemi. Je ovšem třeba mít stále na paměti, že konstantní proliferace zároveň vytváří selekční tlak, který může vést až k upřednostnění populace s genetickou mutací vedoucí k odlišným fyziologickým rysům oproti těm, ze kterých byly odvozeny. Nespornou výhodou na druhou stranu zůstává možnost jejich diferenciaci na více fenotypů pomocí různých diferenciacích činidel (Gordon et al., 2013). Jako příklad zde můžeme uvést diferenciaci buněčné linie SH-SY5Y, která je prováděna za účelem získání neuronových vlastností pomocí *all-trans* kyseliny retinové (ATRA) nebo například pomocí od mozku odvozeného neurotrofického faktoru (BDNF). Podrobněji se touto problematikou zabývají kapitoly níže (Lopes et al., 2017). Proces diferenciaci pro získání charakteristického fenotypu z primární kultury je mnohem sofistikovanější než proces přes proliferující buněčné linie (Liu, Xia et al., 2019). Ve srovnání s primárními buněčnými kulturami, diferenciaci buněčné linie vyžaduje méně času, inkubační podmínky a manipulace jsou snadné a obvykle je zapotřebí jen jeden typ induktoru pro navození diferenciaci. Proces získání primárních kultur je pracný a vzhledem k mnohakrokovým postupům také časově náročný. Pro přežití a následnou diferenciaci primárních kultur jsou klíčové počáteční hodiny, kdy jsou buňky po jejich extrakci z mozku embryí laboratorních zvířat přeneseny do živného média. Je zapotřebí pracovat vysoce šetrně. Diferenciaci buněčných linií trvá obvykle dva až deset dní, u primárních kultur se může jednat i o týdny (Liu, Xia et al., 2019; Lopes et al., 2017; Weinert et al., 2015). Jsou také známy postupy pro získání cholinergních neuronů z embryonálních kmenových buněk a také z lidských fetálních nervových kmenových buněk s jejich následnou diferenciací. Tímto způsobem získané cholinergní neurony však nejsou plně zralé, nevykazují rozsáhlé neuritové a axonální výrůstky a poskytují pouze jedno dobový akční potenciál (Jordan et al., 2008). Lidské embryonální kmenové buňky jsou v současné době hojně studovány jako zdroj buněk s neomezenou proliferací, a především potenciálem vícenásobné diferenciaci. Staly se nástrojem pro modely nejrůznějších patologií, pro screening potenciálních léčiv, ale také pro regenerativní medicínu. Jejich používání však čelí jistě kontroverzi ze stran etiky, neboť jejich izolace vyžaduje lidské embryo a jeho usmrcení (Gao et al., 2020). Etické bariéry překonávají takzvané indukované pluripotentní kmenové buňky. Ty mohou být vytvořeny přeprogramováním jádra lidských somatických buněk na pluripotentní kmenové buňky, které se vyznačují charakteristikami kmenových buněk (Yu et al., 2007).

Mezi sekundární buněčné linie, které jsou využívány ke studiu neuronálních buněk, patří buněčná linie SH-SY5Y, NT2 a PC12. O buněčné linii SH-SY5Y pojednává samostatná kapitola, viz níže. Buněčná linie U-87 je nyní rovněž studována pro využití ke studiu cholinergních neuronů (Liu, Xia et al., 2019). O této linii i její diferenciaci na cholinergní fenotyp pojednává kapitola níže. Linie NT2, rovněž nazývaná NTera, pochází z maligního pluripotentního embryonálního karcinomu varlat (Gordon et al., 2013). Nediferenciové buňky NT2 exprimují nestin a cytokeratiny, ale neexprimují žádné neuronové, astrocytární nebo oligodendrocytární markery (Ferarri et al., 2000). Ošetření buněk této linie ATRA vede k jejich diferenciaci na plně zralé neurony schopné produkce neuronových markerů (Pleasure et al., 1992). Takto diferenciované neurony mají dopaminergní charakter a byla u nich prokázána exprese tyrosinhydroxylázy (TH), aldehyddehydrogenázy, dopaminového transportéru (DAT) a dopaminergního receptoru D2. Z neuronových markerů exprimovaných po diferenciaci ATRA můžeme jmenovat neurofilament-M (NF-M), s mikrotubuly asociovaný protein (MAP), β -III tubulin (TuJ1) a gliový fibrilární kyselý protein (GFAP) (Haile et al., 2014; Kanda et al., 2005; Zigova et al., 2000). Dále byla zaznamenána exprese transkripčních faktorů Nurr1 a Ptx3, které jsou klíčové pro diferenciaci dopaminergních neuronů (Misiuta et al., 2006). Diferenciace přináší také expresi funkčních receptorů N-methyl-D-asparagové kyseliny (NMDA) a receptorů A gama-aminomáselné kyseliny (GABA_A) (Gracia et al., 2006). Mimo neurony se v populaci diferenciovaných buněk NT2 pomocí ATRA objevují také gliové buňky (Andrews et al., 1984). Ošetření ATRA vede u obou diferenciovaných fenotypů k masivnímu rozvoji neuritů u neuronových buněk a neuritů u astrocytových buněk (Haile et al., 2014). Nutno ovšem podotknout, že postup diferenciaci NT2 na neuronální fenotyp pomocí ATRA je komplikovaný postup, který je zejména časově náročný. Diferenciace vyžaduje alespoň 5 týdnů inkubace s ATRA a následné tři krokové ošetření mitotickými inhibitory na kultivačních nádobách pokrytými poly-D-lysinem a lamininem (Ferarri et al., 2000). Buňky linie NT2 se velmi podobají lidským embryonálním kmenovým buňkám (Haile et al., 2014). Jedná se o nervové prekurzory, které jsou vázány na všechny tři hlavní buněčné linie CNS, neurony, astrocyty a oligodendrocyty (Misiuta et al., 2006). K diferenciaci buněk NT2 lze využít také mléčný růstový faktor, který vedl k rozvoji obdobného fenotypu jako po ATRA-diferenciaci (Kanda et al., 2005).

Linie PC12 nemá lidský původ, jedná se o původem krysí buněčnou linii, která byla odvozena z feochromocytomu dřeně nadledvin těchto zvířat (Gordon et al., 2013).

Spadá mezi noradrenalinové buněčné linie, které ve svém nediferenciovaném stavu syntetizují katecholaminy a ACh. Buňky této linie mohou být diferenciovány pomocí neuronového růstového faktoru (NGF) na synaptické neurony. V důsledku tohoto diferenciačního činidla dochází k zesílené syntéze a ukládání katecholaminových neurotransmiterů dopaminu (DA) a norepinefrinu (NE) (Greene, Tischler et al., 1976). V nediferenciovaném i diferenciovaném stavu také exprimují nikotinové acetylcholinové receptory (nAChR) (Mussina, Toktarkhanova et al., 2021). Diferenciace pomocí NGF vede ke ztrátě oblého tvaru buněk a masivnímu nárůstu neuritů (Fujita et al., 1989). Kromě NGF může k diferenciaci buněk PC12 být použit také epidermální růstový faktor, cholera toxin, dibutyryl cyklický AMP a další (Ohuchi et al., 2002).

2.3 Buněčná linie SH-SY5Y

Buněčná linie SH-SY5Y je široce oblíbenou a hojně využívanou adherentní linií. Oblíbená je zejména pro svou snadnou kultivaci a manipulaci (Teppola et al., 2016; Xicoy, Wieringa et al., 2017). Linie SH-SY5Y byla odvozena trojí selekcí z původní linie SK-N-SH, která byla získána v roce 1970 z kostní dřeně čtyřleté pacienty s diagnostikovaným metastatickým neuroblastomem. Jedná se tedy o buněčnou linii s lidským původem, což je jednoznačnou výhodou, ale zároveň také s onkogenními a mitogenními vlastnostmi (Biedler et al., 1973). Onkogenní původ má zcela jasný dopad na diferenciaci linie, rychlost proliferace, životaschopnost, metabolické vlastnosti a také genomovou stabilitu (Xicoy, Wieringa et al., 2017). Jako příklad zde můžeme uvést mutaci v genech pro proteinkinázu B iniciovanou fosfatidylinositol-3-kinázou (Akt/PI3K), která má vliv na inhibici apoptózy nebo také extracelulárním signálem regulované kinázy (ERK) $\frac{1}{2}$, které podněcují přežití buněk v závislosti na růstových faktorech (Waetzig et al., 2019). Tato buněčná linie je částečně katecholaminergní a buňky tak disponují pozitivní aktivitou TH a dopamin- β -hydroxylázy (Kovalevich, Langford, 2013). Linie SH-SY5Y není striktně dopaminergní, ale je schopna produkovat noradrenalin (NA) a DA. Enzym TH omezuje rychlost syntézy katecholaminů a jeho působením se tyrosin přeměňuje na L-dopa, tedy prekurzor DA. Kromě již zmíněných markerů dopaminergních neuronů jsou buňky schopny produkce ChAT, AChE a butyryl-cholinesterázy (BChE) (Xicoy, Wieringa et al., 2017).

Buňky linie SH-SY5Y lze pomocí různých činidel diferenciovat na fenotyp, který má více společných vlastností s neurony. Diferenciací se navíc utlumí proliferace

buněk. Pro diferenciaci linie SH-SY5Y na cholinergní fenotyp se nejčastěji používá kyselina retinová, biologicky aktivní forma vitamínu A, konkrétně ATRA, která je ze všech jejích izomerů transkripčně neaktivnější (López-Carballo et al., 2002; Waetzig et al., 2019). Právě ATRA řadíme mezi silná diferenciací činidla, jejichž signální dráhy jsou zajištěny dvěma typy receptorů, RAR a RXR, které spadají mezi hormonální jaderné receptory a fungují jako ligandem regulované transkripční faktory (López et al., 2002). Kromě inhibice buněčné proliferace také mění buněčnou vodivost sodíku, pravděpodobně iniciací zvýšené tvorby sodíkových kanálů, které jsou podobné těm u zralých neuronů (Toselli et al., 1996). Dále také zvyšuje aktivitu AChE a posiluje synaptické vezikuly, váčky, které se podílejí na regulované sekreci neurotransmiterů exocytózou a podporují tak vznik neuronálních sítí. Strategicky významnou složkou těchto váček je synaptofyzin (SYP), který je při diferenciaci pomocí ATRA roz distribuován z oblasti okolo jader do tvořících se neuritů a tím se stává dostupným pro tvorbu synaptických vezikul (Sarkanen et al., 2007; Teppola et al., 2016). Vlivem ATRA se u ošetřených buněk zvyšuje exprese NF-M jakožto hlavní složky neuronálního cytoskeletu (Teppola et al., 2016).

Také morfologie buněk SH-SY5Y po ATRA-diferenciaci mění. Nediferenciované buňky SH-SY5Y mají morfologii podobnou neuroblastům. Typická jsou kulatá těla s krátkými neurity doprovázená vysokou proliferací a také častým růstem ve shlučích. Nediferenciované buňky jsou také schopné vyšší migrace. Diferenciací mění svůj vzhled, který následně připomíná primární neurony s dlouhými neurity. Růst neuritů je jedním z hlavních morfologických znaků diferenciaci pomocí ATRA. Je možné také pozorovat rozvětvení těchto neuritů. Tvar těla se dá popsat jako pyramidový. Proliferace je diferenciací utlumena, stejně jako migrace. Diferenciací se buňky obvykle homogenně distribuují v rámci své kultivační plochy (Gordon et al., 2013; Pählman et al., 1984).

K dalším znakům diferenciaci na cholinergní fenotyp pomocí ATRA je nárůst exprese se synapsemi asociovaného proteinu 97, proteinů Bcl-2 a zvýšená tvorba nukleárního markeru NeuN, který odráží funkční zralost neuronů. Naopak se snižuje exprese inhibitoru diferenciaci-1 a nestinu, který je považován za marker nediferenciovaných buněk (Cheung et al., 2009; Itano et al., 1996; Lopes et al., 2010). Neuronové markery, které se zvyšují po ATRA-diferenciaci jsou například synaptický protein Sv2, s MAP tau, TuJ1 a s růstem spojený protein 43 (Shipley, Mangold et al., 2016). Dále můžeme jmenovat také neuron-specifickou enolázu (NSE), mírně také NA

a navýšení exprese TH. Diferenciace pomocí ATRA také vede k aktivaci fosfatázy 2A, která následně defosforyluje a tím aktivuje TH. Buňky s takto aktivovaným TH poté mohou produkovat DA (Lopes et al., 2010; Páhlman et al., 1984; Weatzig et al., 2019). Diferenciace buněk SH-SY5Y pomocí ATRA je dále charakteristická aktivací dráhy Akt a ERK1/2 a PI3K/Akt, což následně vede k degradaci proteinu p53 a tím snížení proapoptické signalizace. Dráha Akt dále fosforyluje regulátor buněčného cyklu p21, což má za následek tvorbu komplexu s kaspázou-3. Tyto procesy mají za následek zvýšení životaschopnosti buněk (López-Carballo et al., 2002; Waetzig et al., 2019). Zvýšená fosforylace PI3K/Akt dráhy byla zaznamenána také jako ochranný mechanismus dopaminergních neuronů při jejich poškození. Dochází k tomu skrze BDNF a neurotrofickým z glií odvozeným faktorem (GDNF) produkovaným okolními astrocyty (Lui et al., 2012). Diferenciací se také buňky stávají méně citlivé k některým toxinům jako je například 6-hydroxydopamin (6-OHDA) nebo 1-methyl-4-phenylpyridinový ion (MPP+) (Cheung et al., 2009). Po inkubaci buněk SH-SY5Y s ATRA dochází dále ke zvýšení hladin adenosintrifosfátu (ATP) a k nárůstu aktivity plazmatické membrány. Ke snížení exprese dochází u genů, které reagují na buněčný stres. Nediferenciované buňky SH-SY5Y mají proti diferenciovaným pomalejší metabolismus (Forster et al., 2016). Diferenciace snižuje expresi genu *ASCL1* specifického pro neuroblasty a naopak vede k expresi genů podporující diferenciaci *NEUROD6* (NEX-1, HATH-2) a *NEUROD1*. V souvislosti s ovlivněním genové exprese, ATRA utlumuje expresi genů *ID1*, *ID2* a *ID3*, které inhibují buněčnou diferenciaci. (López et al., 2002).

Kromě ATRA se k diferenciaci buněčné linie SH-SY5Y využívají také látky jako je dibutyrylový cyklický AMP, 12-*o*-tetradekoyl-forbol-13-acetát, vanadát, BDNF, cholesterol, vitamín D3, neuregulin β 1 nebo staurosporin (Kovalevich, Langford, 2013; Teppola et al., 2016). Pro použití buněčné linie SH-SY5Y jako neuronální *in vitro* model se k diferenciaci nejčastěji využívá ATRA a BDNF (Şahin, Öncü et al., 2021).

Ačkoliv není linie SH-SY5Y striktně dopaminergní, je s oblibou využívána pro studium PD, především po ošetření 6-OHDA. Díky značné molekulární podobnosti 6-OHDA s DA se tento toxin silně váže na DAT a účinně tak vyvolává poškození napodobující patologii PD (Lopes et al., 2010). Kromě PD se využívá rovněž pro studium AD, neurotoxicity, ischemie nebo ALS (Xicoy, Wieringa et al., 2017).

2.4 Buněčná linie U-87

Široce využívanou linií je také astrocytární buněčná linie U-87, která byla založena již v roce 1968 na švédské univerzitě v Uppsale. Tato adherentní linie byla odvozena z lidského glioblastomu a má tudíž lidský původ a onkogenní vlastnosti. Využití nachází především jako *in vitro* model glioblastomu (Pontén et al., 1968). Dále je také hojně využívána pro *in vivo* studie, kdy se buňky U-87 transplantují intrakraniálně do vybraných modelových organismů, například myši nebo potkanů (Vrazhnov et al., 2022). Po takto provedené transplataci dochází k tvorbě masivních homogenních nádorů, které jsou dobře prostoupeny cévami (de Vries et al., 2009). Vzniklé nádory vykazují zvýšenou expresi proteinů p53, ale nedostatečnou expresi GFAP (Radaelli et al., 2009).

Buněčná linie U-87 je charakteristická expresí mutantních proteinů fosfatázy a homologu tenzinu (PTEN) a proteinů dráhy PI3K/Akt. Ačkoliv je tato linie gliového původu, neexprimují buňky U-87 S100 β , který působí jako neutrofický faktor (Schulz, Rodgers et al., 2022). Při studiích s touto buněčnou linií bylo ovšem také upozorněno na fakt, že během kultivace může docházet ke změnám genetické informace oproti původnímu zdroji buněk, přičemž k tomuto fenoménu dochází pravděpodobně v důsledku selekčního tlaku (de Vries et al., 2009). K dalším obecným charakteristikám linie U-87 náleží jejich poměrně značná odolnost vůči stresu (Hess et al., 2010). Na rozdíl od jiných buněčných linií, které byly rovněž získány z lidského glioblastomu, buňky U-87 jsou náchylnější k autofagii a jsou méně citlivé na léky zaměřené na metabolismus purinů (Li et al., 2017).

Jsou-li buňky linie U-87 vhodným způsobem kultivovány, vytváří kromě standardních populací také velké shluky buněk, takzvané sféroidy. Jedná se o kompaktní shluky buněk, které jsou vzájemně v rámci jednotlivých sféroidů a i s okolními buňkami propojeny. Tyto buněčné útvary mohou být používány jako trojrozměrné modely pro studium rozličných patologií (Hess et al., 2010). Centra větších sféroidů jsou tvořena nekrotickými buňkami. Směrem od středu sféroidů přecházejí nekrotické buňky v buňky apoptické. Střední sféroidů obsahují rovněž autofagické buňky a vnější vrstvy jsou tvořeny buňkami viabilními. Sféroidy se při kultivaci buněk U-87 tvoří přirozeně, ale při déletrvající kultivaci již nemají tendenci dále narůstat a zvětšovat se. Velikost sféroidů má vliv na průchodnost metabolitů z kultivačního prostředí do vrstev sféroidů. Je zajímavé, že u sféroidů tvořených buňkami linie U-87 se vyskytují apoptické buňky dříve, než je tomu například u

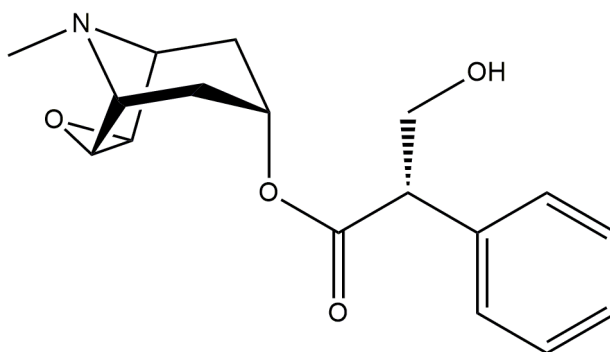
sféroidů tvořených buňkami glioblastomové linie A-172 (Bell et al., 2001).

Poměrně nedávno byl publikován nový způsob využití linie U-87, a sice jako *in vitro* model cholinergních neuronů. K dosažení neuronálního, konkrétně cholinergního fenotypu buněk, se přitom používá inkubace s NaB, který působí jako diferenciací činidlo. Tímto způsobem diferenciované buňky U-87 jsou poté označovány jako D-U87. Vlivem NaB se u buněk U-87 potlačuje proliferace, mění se jejich morfologie a rovněž se exprimují cholinergní markery. Mezi tyto markery exprimované po diferenciaci butyrátem sodným patří ChAT, s MAP 2 a NF-M. Nebyly však pozorovány změny v rámci exprese GFAP. Změna exprese po diferenciaci nastává u mAChR M1, M4 a M3 a pomocí mRNA chip analýzy byla také potvrzena zvýšená exprese genu *CHRNE* pro nikotinové acetylcholinové receptory. Značný je rovněž nárůst specifického markeru neuronálních synapsí SYP. Dále bylo u buněk D-U87 oproti buňkám U-87 pozorován nárůst exprese proteinů Akt, Bad, p53, JNK a TAK1 a také snížení hladin HSP27. Za zmínku zajisté také stojí zvýšená produkce neurotransmiteru ACh a snížení hladin NA/NE. Diferenciací dochází k razantní změně morfologie buněk, která se vyznačuje masivním nárůstem neuritů, které se oproti nediferencované formě zvětšují až dojnásobně (Liu, Xia et al., 2019). Dalším důkazem diferenciaci buněk U-87 po inkubaci s NaB na cholinergní fenotyp je jejich spolupráce s imunitními buňkami, podobně jako funguje lidský imunitní systém v kooperaci s cholinergními neurony. Buňky U-87 po diferenciaci NaB byly kultivovány společně s CD4 T lymfocyty, které následně byly D-U87 buňkami polarizovány směrem na Th 2 lymfocyty (Liu et al., 2020).

2.5 Skopolamin

V případě *in vivo* i *in vitro* studií rozličných patologií jsou zapotřebí látky, které na daných modelech indukují potřebné poškození. Například pro indukci PD je běžně používaný toxin 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), konkrétně jeho metabolit MPP⁺, který způsobuje mitochondriální poškození přes inhibici mitochondriálního elektronového transportního komplexu I (Nicklas et al., 1987). Pro PD je využíván zejména pro jeho vysokou selektivitu k DAT a je tudíž specifickým dopaminergním neurotoxinem (Lopes et al., 2017). Specifický pro DAT je také 6-OHDA, který se uplatňuje rovněž jako neurotoxin k indukci PD. Jeho toxický účinek spočívá zejména v indukci ROS a následně tak oxidativního stresu (OS) (Soto-Otero et al., 2000). Jako další příklad je možno uvést 3-nitropropionovou kyselinu, která je

využívána pro stimulaci poškození charakteristické pro Huntingtonovu chorobu (HD). Mechanismus účinku tohoto toxinu je zprostředkován přes likvidaci mitochondriálního elektronového transportéru II (Túnez, Tasset, 2010). Pro *in vivo* i *in vitro* poškození napodobující PD lze použít také salsolinol, který je strukturně podobný MPTP a jeho toxické účinky jsou založeny zejména na indukci OS (Kurnik-Łucka et al., 2018). Jako další příklad můžeme uvést glutamát. Ačkoliv se jedná o fyziologický excitační neurotransmitter CNS, jeho nadměrné působení vyvolává excitotoxicitu, tedy nekontrolovatelnou depolarizaci neuronů, která v konečném důsledku vede ke smrti neuronů. V důsledku excitotoxicity dochází k vzestupu intracelulárního Ca^{2+} , poškození mitochondrií, produkci ROS a uvolňování lyzozomálních enzymů. S excitotoxicitou se setkáváme u různých onemocnění jako je AD, HD, PD, mrtvice, ALS a další (Kritis, Paniskaki, Stamoula, Vavilis; 2015). Pro tuto práci je klíčový SCOP, který je možné využít pro indukci cholinergního poškození a je proto dále podrobněji popsán (Balaban, Demirci et al., 2017).



Obr. 1. L-Skopolamin

Toxin SCOP řadíme mezi přírodní tropanové alkaloidy. Alkaloidy jsou takové látky, které ve své struktuře obsahují více atomů dusíku a název je odvozen od jejich základní charakteristiky, alkalické povahy. Tropanové alkaloidy jsou pak takové alkaloidy, které ve své molekule obsahují tropanový kruh (N-methyl-8-azabicyklo[3.2.1]oktan), charakteristický pro skupinu přibližně 200 sloučenin přirozeně se vyskytující ve většině rostlin čeledi *Solanaceae* (lilkovité). Tropanové alkaloidy dělíme na majoritně zastoupené tropiny, estery 3 α -tropanolu a na minoritně se vyskytující pseudotropiny, estery 3 β -tropanolu. Další dělení tropanových alkaloidů provádíme na základě jejich rostlinného výskytu. Hyoscyamin a SCOP pocházejí z rostlin čeledi *Solanaceae* (lilkovité), kokain je biosyntetizován *Erythoxylum cocaea* (rudodřev koka) a kalysteginy, hydroxylované nortropanové alkaloidy, se nacházejí

v celé řadě rostlin, například rostlin z čeledi *Convolvulaceae* (svlačcovité), *Moraceae* (morušovníkovité) a dalších. Veškeré tropanové alkaloidy jsou si strukturně podobné, nicméně jejich biologické účinky se značně liší (Gryniewicz et al., 2008; Kohnen-Johannsen et al., 2019). Dominantní izomerní formou SCOP je L-SCOP. Forma D-SCOP se rovněž přirozeně vyskytuje, ale v razantně menším zastoupení (Armstrong et al., 1987).

Oproti jiným tropanovým alkaloidům je SCOP méně vázán zákonem, má značný hospodářský význam a poptávka po něm stále roste (Kohnen-Johannsen et al., 2019). Velmi ceněný je SCOP pro farmaceutický průmysl, pro nějž je extrahován z rostlin rodu *Duboisia* (jedovatice) jejíž rozsáhlé plantáže se nacházejí například v Queensladnu v Austrálii. Rovněž lze SCOP získávat i chemickou syntézou, která zahrnuje meziprodukt tropinon, který se následně přeměňuje na tři hlavní sloučeniny, tropin a jeho estery tropeiny, skopin a deriváty nortropinu a kvarterní aminové soli (Gryniewicz et al., 2008). Chemická syntéza je však stále poměrně drahá, mnohokroková a není tak vůči extrahování z rostlin konkurenceschopná (Ullrich et al., 2017). Pro efektivnější získávání SCOP jsou zaváděny do praxe stále nové postupy jako jsou například rostlinné buněčné kultury, které jsou výhodné možností řízení kultivace a tím i ovlivnění podmínek biosyntézy. Ale ani tento postup zatím nepředčí standardní extrahování z rostlin (Kohnen-Johannsen et al., 2019).

Hlavní bioaktivita SCOP spočívá v působení na mAChR. Je kompetitivním neselektivním antagonistou mAChR, v důsledku čehož zabraňuje vazbě neurotransmiteru ACh na tyto receptory (Kohnen-Johannsen et al., 2019). Celkově se mAChR účastní celé řady fyziologických funkcí a rozlišujeme 5 typů těchto receptorů značených M1-M5, z nichž každý má svou specifickou úlohu. Nejpočetněji zastoupený mAChR M1 moduluje signalizaci neurotransmiteru, konkrétně v kůře mozkové a hipokampu. Podtyp mAChR M2 se vyskytuje v thalamu, mozkové kůře, hipokampu a striatu. Častou jsou také lokalizovány na volných cholinergních nervových zakončeních, kde při své aktivaci negativně regulují uvolňování ACh. Podtyp M3 se podílí na sekreci exokrinních žláz, stazích hladkého svalstva, dilataci zornice, příjmu potravy a přírůstku tělesné hmotnosti. Další podtyp, M4 formuje dopaminovou aktivitu v motorických traktech a funguje jako inhibiční autoreceptor ve striatu. Po jeho aktivaci ACh tedy dochází k inhibici uvolňování ACh. A nakonec podtyp M5 se zapojuje do modulace centrální dopaminové funkce, konkrétně napomáhá uvolňování DA z dopaminových nervových zakončení a dále se zapojuje do tonusu mozkových krevních cév (Brady et

al., 2012; Bymaster et al., 2003).

Alkaloid SCOP je snadno vstřebáván z gastrointestinálního traktu, následně je rychle a extenzivně distribuován do tkání a jeho vylučování probíhá převážně močí. Je rovněž schopen přecházet přes placentu a hematoencefalickou bariéru (Beuerle et al., 2013). Svým působením na mAChR ovlivňuje SCOP centrální i periferní nervový systém a je proto široce využíván jako anticholinergikum. Působí jako spasmolytikum a lokální anestetikum. V medicíně je využíván při léčbě kinetóz a různých onemocnění CNS (Kohnen-Johannsen et al., 2019). Hlavní antimuskarinergní účinky spočívají ve snížené produkci slinných, bronchiálních a žlázových sekrecí, mydriázy, cykloplegie (ochabnutí svalstva řasnatého tělíska), zvýšené srdeční frekvenci, inhibici močení, snížení gastrointestinálního tonusu a sekreci žaludečních kyselin. Využití našel také při léčbě pooperačních nevolností, hypersalivací, zvracení a gastrointestinálních, renálních a biliárních křečích. Obvykle je aplikován ve formě transdermálních náplastí. Své místo nachází také mezi antidepresivy při vrcholných stádiích PD. Mydriáza, která se po jeho aplikaci objevuje, je využívána ve formě roztoku v očním lékařství (Ullrich et al., 2017). Zejména v nižších dávkách zpomaluje srdeční frekvenci (Beuerle et al., 2013). Genotoxicita nebyla u SCOP hlášena, ale překážkou pro jeho širší medicínální využití jsou jeho vedlejší účinky na CNS, které jsou zapříčiněny přestupem přes hematoencefalickou bariéru. Řešením jsou přípravky tvořené látkami od SCOP odvozené, které schopnost přecházet přes hematoencefalickou bariéru ztrácejí (Beuerle et al., 2013; Kohnen-Johannsen et al., 2019). Mezi polosyntetická léčiva odvozená od SCOP patří například tiotropiumbromid nebo SCOP-N-butylbromid, který se používá při léčbě bolestí břicha, křečích močového měchýře nebo také při hypersalivaci (Ullrich et al., 2017).

Mimomedicínální použití, volná konzumace a aplikace SCOP, může způsobovat halucinace a psychoaktivní účinky. Vzhledem k těmto skutečnostem je snadné si domyslet, že historie využívání SCOP sahá až do starověku. Byl používán nejen pro navození halucinogenních stavů při rituálech, ale také jako lék na astma nebo jako přídavek do piva, ve kterém umocňoval jeho působení (Kohnen-Johannsen et al., 2019). Byl dokonce používán jako takzvané sérum pravdy. Jeho podání vedlo k amnézii, kterou předcházela série výslechů za účelem získání pravdivých informací od potenciálních zločinců, tedy při vyšetřování. Po aplikaci byly totiž vyslýchané osoby schopny přesně odpovídat na předložené otázky a následně si výslech nepamatovaly (Geis, 1959). Laické užití SCOP je samozřejmě zatíženo možností předávkování, které

může vést až ke smrti. Při akutní intoxikaci SCOP je možné jako antidotum použít fyzostigmin, pyrolo-indolový alkaloid, přirozeně se vyskytující v kalabáрске fazoli, který působí jako parasympatomimetikum reverzibilní inhibicí cholinesterázy (Kohnen-Johannsen et al., 2019).

Jak již bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, využití SCOP nachází také při *in vivo* a *in vitro* studiích nejrůznějších patologií neuronálního poškození (Puangmalai, Thangnipon et al., 2017). Celkově SCOP narušuje kognitivní funkce jako například procesy učení a paměti. Způsobuje také morfologické poškození, u buněk mozku způsobuje ztmavnutí tkáně a atrofii, což ve výsledku vede ke spongioformní ztrátě neutrofilů. Na *in vivo* modelech byly potvrzeny hlavní oblasti poškození cholinergních neuronů po aplikaci SCOP. Jedná se o oblasti předního mozku, konkrétně septohipokampální a *nucleus basalis* – mozkové kortikální dráhy (Min et al., 2015). Jedním z hlavních patologických vlivů, který SCOP na neurony má, je OS. Ten je SCOP indukován mimo jiné mitochondriálním poškozením (Wong-Guerra et al., 2017). Inhibuje totiž ATPázy (Na, K-ATPázy a Ca²⁺-ATPázy) v hipokampu a mozkové kůře. ATPáza je jedním z klíčových enzymů zodpovědných za iontovou homeostázu CNS. Tyto poklesy mohou vést k toxickým účinkům jako jsou částečná depolarizace membrán neuronů, edém, zvýšený influx vápenatých iontů spjatý s excitotoxicitou (Fan et al., 2005). Právě zvýšená koncentrace intracelulárního vápníku se podílí na depolarizaci membrán mitochondrií. Dále SCOP vyvolaný OS je způsoben také snížením množství antioxidantu glutathionu a enzymů podílejících se na metabolismu ROS, tedy glutathionperoxidázy, superoxiddismutázy a katalázy (Balaban, Demirci et al., 2017; Fan et al., 2005; Ghumatkar et al., 2015). Poškození mitochondrií a také snížené množství antioxidantů poté vede k nárůstu ROS, jako je superoxidový radikál ($\bullet\text{O}_2^-$) a jeho produkty peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál ($\bullet\text{OH}$), které se následně podílí na dalším neuronálním poškození. Důkazem OS je zvýšená peroxidace lipidů, která byla po aplikaci SCOP pozorována (Balaban, Demirci et al., 2017). Zvyšuje totiž hladiny malondialdehydu, který je hlavním ukazatelem *in vivo* peroxidace lipidů v kůře a hipokampu, ke kterému dochází vlivem poškození buněčné stěny vlivem OS (Ghumatkar et al., 2015; Kwon et al., 2010). Skrze OS vyvolaný ROS dochází ke snížení ACh, což následně vede k dysregulaci cholinergní neurotransmise v mozku (Min et al., 2015).

Mimo OS se na neuronálním poškození indukovaném SCOP podílí mnoho dalších faktorů. Například SCOP snižuje expresi BDNF neurotrofinu, který se účastní

synaptické plasticity a formování paměti, hraje klíčovou roli ve vývoji, udržování a fungování CNS. Také snižuje expresi transkripčního faktoru cAMP-response element-binding proteinu, který reguluje hladinu BDNF. Zvyšuje expresi AChE, která hydrolyzuje ACh. Snižuje expresi genu *NQO1* kódující NAD(P)H chinonoxidoreduktázu-1 a naopak zvyšuje hladiny hipokampální indukibilní syntázy oxidu dusného (iNOS) a cyklooxygenázy 2 (COX-2) (prozánětlivé enzymy) (Ghumatkar et al., 2015; Min et al., 2015). Podání SCOP dále iniciuje tvorbu proteinových plaků vedoucích ke glióze, čímž se zvyšují hladiny GFAP, který je v tomto procesu markerem neurozánětu (Ghumatkar et al., 2015). Působením SCOP na mAChR je indukován neuronální zánět přes nárůst tumor nekrotizujícího faktoru α (TNF- α), prozánětlivého cytokinu, který poté slouží jako signální molekula pro jaderné faktory T lymfocytů κ B (NF- κ B), p-p65 a p-I κ B α . Zvýšené hladiny TNF- α a iNOS navíc přispívají k agregacím beta-amyloidu, který pak způsobuje další patologie a v konečném důsledku také poruchy paměti (Jang et al., 2013). Může dokonce snižovat počty samotných mAChR M1 (Jahanshahi et al., 2013). Dále můžeme zmínit také sníženou fosforylaci drah ERK1/2 a Akt. Dráhy ERK1/2 zvyšují transkripci proteinů souvisejících s růstem, například c-Fos (Svoboda et al., 2017).

S oblibou je SCOP používán pro studium AD. Při aplikaci SCOP potkanům byl potvrzen nárůst tau proteinu a beta-amyloidního prekurzorového proteinu, jenž jsou zásadními faktory v patogenezi AD, tedy v tvorbě amyloidních plaků. Ošetření laboratorních zvířat SCOP doprovází histopatologické změny mozkové kůry, neuronální degenerace jako je vakuolizace cytoplazmy, krvácivé gliózy a další (Bihaqi et al., 2012).

Je také využíván při *in vitro* modelech. Často je pro tyto účely využívána buněčná linie SH-SY5Y, a to jak v nediferenciované, tak diferenciované podobě. Ošetření buněk SH-SY5Y SCOP vede, v závislosti na použité koncentraci toxinu, ke snížení životaschopnosti buněk. Morfologie ošetřených buněk se vyznačuje smrštěním a narušením až ztrátou neuritů (Suthprasertporn, Mingchinda et al., 2020). V rámci změn morfologie nediferenciovaných buněk SH-SY5Y ošetřených SCOP dochází také k jejich zmenšení, přestávají být adherentní, dendrity mizí a obrysy se stávají špatně rozpoznatelnými (Bastola, Pariyar et al., 2020). Nediferenciované buňky této linie po ošetření SCOP vykazují patologické znaky jako je tvorba ROS, zvýšená aktivita enzymu AChE, zvýšení apoptózy (potvrzena přítomností aktivní kaspázy-3, zvýšením Bax a zároveň snížením antiapoptického proteinu Bcl-2), snížením ChAT a také aktivace drah p38, JNK a také Akt, které jsou spojeny s buněčným stresem a

protizánětlivými reakcemi. Zejména pak zvýšená aktivita AChE je znakem cholinergního poškození, jenž vede k poklesu hladin ACh, a tudíž i cholinergního přenosu. U buněk SH-SY5Y ošetřených SCOP bylo prokázáno snížení neuronálního markeru IMR32 a gliového markeru C6 (Puangmalai, Thangnipon et al., 2017; Suthprasertporn, Mingchinda et al., 2020). Aplikace SCOP výrazně snižuje hladiny enzymu 1 štěpícího protein s prekurzorem amyloidu místě β (BACE1). Enzym BACE1 je hlavní β -sekretáza v neuronech a je nutná pro produkci beta-amyloidu 42. Regulace celé řady proteinů, jež je zprostředkována receptorem exprese cílových genů vyžaduje fosforylaci cytoplazmatického transkripčního faktoru NF- κ B. Toto se děje i u buněk ošetřených SCOP spolu se zvýšením hladin interleukinů IL-1 β a IL-6, tedy zánětlivých cytokinů (Suthprasertporn, Mingchinda et al., 2020). Mitochondriální membránový potenciál je výrazně narušen a mitochondriální dysfunkce (poškození produkce ATP) poté následně vede ke spuštění procesu apoptózy. Dalším důkazem apoptózy je štěpení poly(ADP-ribóza)polymeráza (PARP). Snižuje fosforylační hladiny ERK, Akt a GSK3 β . Jedná se o dobře známé signální transdukční dráhy, které podporují přežití, růst a proliferaci buněk. U myši defosforyluje ERK a CREB. Tyto dráhy rovněž hrají důležité role v procesech učení, paměti a modulaci funkce cholinergního systému. (Bastola, Pariyar et al., 2020). Inhibice GSK3 β , indukovaná fosforylací Akt, potlačuje ztrátu neuronů útlumem poapoptických proteinů. Aktivace ERK je spojena s přežitím neuronálních buněk (Pariyar et al., 2017).

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie a roztoky

- Použité chemikálie – kultivace a diferenciacce: ATRA (Sigma-Aldrich), Dulbecco's modified Eagle's Medium and Ham's F12 Nutrient Mixture (DMEM) (DMEM:F12, 1:1) (D8437, Sigma-Aldrich), enzym Trypsin (Sigma-Aldrich), fetální bovinní sérum (FBS) (Biosera), NaB (Sigma-Aldrich), penicillin-streptomycin (PS) (10 000 jednotek 10 mg streptomycinu v 1 l) (Sigma-Aldrich)
- Použité roztoky – kultivace a diferenciacce:
Kultivační médium 10% FBS/1% PS DMEM/F12 (1:1): 500 ml DMEM/F12 (1:1) + 50 ml filtrovaného FBS + 5 ml PS
Diferenciační médium a médium pro testování biologické aktivity látek: 1% FBS/1% PS DMEM/F12 (1:1): 500 ml DMEM/F12 (1:1) + 5 ml filtrovaného FBS + 5 ml PS
Fosfátový pufr (PBS): 800 g NaCl; 2 g KCl; 23,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; 2 g KH_2PO_4 pH 7,4
Trypsin-EDTA roztok – 0,5 g Trypsin, 0,2 g EDTA 4Na/L Hankův balancovaný solný roztok s fenolovou červení (Sigma-Aldrich)
10mM ATRA: 1,5 mg + 500 μl DMSO
4M NaB: 200,2 mg + 500 μl DMSO
- Použité chemikálie – lyzace, elektroforéza, western blot a imunodetekce proteinů: akrylamid (AA) (Sigma-Aldrich), aprotinin (Sigma-Aldrich), dithiothreitol (DTT) (Roche Diagnostics), dodecylsírán sodný (SDS) (Lach-ner), chemiluminiscenční substrát (Thermo Scientific), fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Sigma-Aldrich), fluorid sodný (Sigma-Aldrich), glycin (Calbiochem), hovězí sérový albumin (BSA) (Biowest), chlorid sodný (Penta), kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Fluka), kyselina ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraoctová (EGTA) (Serva), Leupeptin (Sigma-Aldrich), marker molekulových hmotností proteinů Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (ThermoFisher), sušené mléko (Sigma-Aldrich), *N,N,N',N'*-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Biorad), *N,N,N',N'*-

methylenbisakrylamid (Bis AA) (Sigma-Aldrich), Nonidet P-40 (oktylfenoxypolyethoxyethanol) (Sigma-Aldrich), orthovanadičnan sodný (Sigma-Aldrich), peroxodisíran amonný (APS) (Biorad), Ponceau S (Serva), tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) (VWR Biochemicals), Tween 20 (MP Biomedicals)

- Použité roztoky – lyzace, elektroforéza, western blot a imunodetekce proteinů:

10% APS

10% SDS

1M TRIS/HCl pH 6,8

1M TRIS/HCl pH 8,8

5% sušené mléko v TBS + 0,1% Tween 20

5% BSA v TBS + 0,1% Tween 20

AA + Bis AA: 30% AA + 0,8% Bis AA

Blotovací pufr

Činidlo Bradford

Elektroforetický pufr

Chemiluminiscenční činidlo: luminol-peroxid (1:1)

Laemmli vzorkový pufr (5xSDS)

roztok 0,01% Ponceau S v 0,06% kyselině octové

Radioimunodetekční pufr (RIPA): 20mM TRIS-HCl pH 7,4; 100mM NaCl; 5mM EDTA; 2mM EGTA; 0,2% Nonidet P-40 (pH = 7,4), před použitím přidáno: 1mM DTT; 1mM PMSF; 0,5 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 2mM NaF, 1mM Na₃VO₄

Separční gel 12,5% (viz Tab. 3)

TBS 10x

TBS 1x/0,1% Tween 20

TRIS/HCl pH 7,4

Zaostřovací gel 5% (viz Tab. 3)

- Použité chemikálie – imunofluorescenční detekce proteinů: aceton (Lach:ner), BSA (Sigma-Aldrich), FluorSaveTM Reagent (Millipore), methanol (Lach:ner), Triton X-100 (Sigma-Aldrich), Tween 20 (MP Biomedicals)

- Použité roztoky – imunofluorescenční detekce proteinů:

10x PBS: 800 g NaCl; 2 g KCl; 23,1 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 2 g KH₂PO₄ pH 7,4

1x PBS: 100 ml 10xPBS + 900 ml destilované H₂O

1x PBS-0,1% Tween 20: 500 ml 1x PBS + 500 µl Tweenu 20

1% BSA/1x PBS-0,1% Tween 20: 50 mg BSA + 5 ml 1x PBS-0,1% Tween 20

1% BSA/1x PBS: 50 mg BSA + 5 ml 1x PBS

Fixační roztok: methanol-aceton (1:1)

- Použité chemikálie – optimalizace koncentrace SCOP, výběru vhodné detekční metody, nalezení mechanismu smrti indukované SCOP a testování kandidátních sloučenin: Autophagy Assay kit (Sigma-Aldrich), Cytotoxicity Detection Kit (Laktátdehydrogenáza (LDH)) (Roche), dihydroethidium (DHE) (Sigma-Aldrich), DMSO (Sigma-Aldrich), Donepezil (DON) (Sigma-Aldrich), DTT (Sigma-Aldrich), Galantamin (GAL) (Sigma-Aldrich), JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (Merck), LY294002 (Sigma-Aldrich), MitoSox Red, Mitochondrial Superoxide indicator (Invitrogen), Necrostatin-1 (NEC-1) (Sigma-Aldrich), PMSF (Sigma-Aldrich), Propidium jodid (PI) (Sigma-Aldrich), Rivastigmin (RIV) (Sigma-Aldrich), Skopolamin hydrobromid (Sigma-Aldrich), substrát kaspáz Ac-DEVD-AFC (Sigma-Aldrich), Triton X-100 (Sigma-Aldrich), VM583 (syntetizovaná látka Mgr. Václavem Mikem, Ph.D.), WST-1 Assay for Cell Proliferation and Viability (Roche), YO_PRO™ 1 jodid (Invitrogen)
- Použité roztoky – optimalizace koncentrace SCOP, výběru vhodné detekční metody, nalezení mechanismu smrti indukované SCOP a testování kandidátních sloučenin:

1M SCOP: SCOP byl rozpuštěn v destilované H₂O s výslednou 1M koncentrací Kaspázový pufr: připravený dle Carrasco et al., 2003.

Hankův vyvážený solný roztok (HBSS): ve 250 ml destilované vody rozpustit: 2 g NaCl, 100 mg KCl, 35 mg CaCl₂, 25 mg MgSO₄·7H₂O, 25 mg MgCl₂·6H₂O, 15 mg Na₂HPO₄·2H₂O, 15 mg KH₂PO₄, 250 mg D-glukosa, 87,5 mg NaHCO₃; pH upraveno na 7,2–7,6

2% Triton X-100/1x PBS: 200µl Triton X-100 + 10 ml 1x PBS

Zásobní roztoky testovaných látek: veškeré testované látky byly na základě své molekulové hmotnosti naváženy a rozpuštěny v DMSO na 10mM koncentraci

3.1.2 Biologický materiál

- Buněčná linie SH-SY5Y (Evropská sbírka autentických buněčných kultur – ECACC)

- Buněčná linie U-87MG (Americká sbírka typových kultur – ATCC)

3.1.3 Použité protilátky

Pro imunodetekci proteinů a pro imunofluorescenční detekci proteinů byly použity primární protilátky, které jsou uvedeny v Tab. 1 Následující Tab. 2 obsahuje použité sekundární protilátky.

Tab. 1. Použité primární protilátky, jejich cíl, zdroje, výrobce a ředění.

Cíl	Molekulová hmotnost cíle (kDa)	Zdroj	Klon	Výrobce	Ředění
NF-M	160	Myší/monoklonální	E-9	Santa Cruz	WB: 100x IF: 100x
mAChR M1	52	Myší/monoklonální	G-9	Santa Cruz	WB: 100x IF: 50x
SYP	38-48	Myší/monoklonální	D-4	Santa Cruz	WB: 5000x IF: 50x
GFAP	50	Králičí/monoklonální	D1F4Q	Cell Signaling	WB: 500
BChE	68(78)	Králičí/polyklonální		Sigma-Aldrich	WB: 250x IF: 50x
AChE	68(71)	Myší/monoklonální	A-11	Santa Cruz	WB: 200x IF: 50x
TuJ1	55	Králičí/polyklonální		Sigma-Aldrich	IF: 200x
β-aktin	42-43	Myší/monoklonální	C4	Santa Cruz	WB: 5000x
Nestin	190(200)	Myší/monoklonální	10c2	Santa Cruz	IF: 100x

Tab. 2. Použité sekundární protilátky, jejich popis, výrobce a ředění.

Název	Zdroj	Výrobce	Ředění
Alexa Fluor 488 Goat-anti-rabbit	Koží/monoklonální	Invitrogen	IF: 1000x
Alexa Fluor 488 Rabbit-anti-mouse	Králičí/polyklonální	ThermoFisher	IF: 1000x
RAM/Px Rat anti-mouse Ig	Králičí	Sigma-Aldrich	WB: 1000x
SWAR/Px Swine anti-rabbit Ig	Prasečí	Cell Signaling	WB: 1000x

3.2 Použité přístroje a zařízení

- Použité přístroje a zařízení – kultivace, diferenciací optimalizace koncentrace, SCOP, výběru vhodné detekční metody, nalezení mechanismu buněčné smrti indukované SCOP a testování aktivity kandidátních sloučenin: analytická váha (LabSystem), automatické pipety o různých objemech (Finpipette, Eppendorf), Bürkerova počítací komůrka (Fisher scientific), CO₂ inkubátor MCO-18AIC (SANYO), laminární flowbox s vertikálním prouděním vzduchu (MSC ADvantage), lázeň Heat master (Heat), mikroskop CKX41 (Olympus), mikroskop AE 42 ERGO (Intraco Micro), kamera Moticam S3 (Motic Scientific), odsávačka (VWR), pipetor (Swiftpipet Pro), vortex Minishaker MS2 (IKA), centrifuga Hettich Zentrifugen universal 320 R (Schoeller), spektrofotometr infinite M200 Pro (Tecan)
- Použité přístroje a zařízení – lyzace, elektroforéza, western blot a imunodetekce proteinů: analytická váha KERN ABT 120-5DM (KERN), aparatura pro SDS-PAGE Mini-Protean Tetra Systém (Bio-Rad), aparatura pro western blot Mini Trans-Blot Module (Bio-Rad), automatické pipety o různých objemech (Eppendorf), CCD kamera s příslušenstvím Luminescent image analyzer LAS-4000 (Fujifilm), centrifuga CompactStar CS4 (VW), chlazená centrifuga Heraeus Megafuge 16R (ThermoFisher Scientific), kývačka mini-Rocker Shaker, MR-1 (Biosan), laboratorní váhy KERN PCB 200-2 (KERN), lednice Liebherr FKvsl 5413 (Liebherr), magnetická míchačka Arex-6 (VELP Scientifica), míchačka zkumavek s bezdotykovým spínačem (VLEP Scientifica), minicentrifuga D1008 (DLAB Scientific), pH metr pH 50 (XS Instrument, Itálie) a skleněná pH elektroda (Sentek), předvážky KERN-PCB (KERN), termoblok (ThermoFisher Scientific), ultrazvukový homogenizátor (Bandelin), UV-VIS spektrofotometr UV-1800 (Schimadzu), vortex V-1 plus (Biosan), zdroj napětí PowerPac Basic (Bio-Rad)
- Použité přístroje a zařízení – imunofluorescenční detekce proteinů: Konfokální mikroskop Leica, TCS SP2 (Leica), lasery Ar-Kr, He a Ne (Leica), inverzní fluorescenční mikroskop Leica DMIRE2 (Leica)
- Spotřební zboží: Kultivační misky Ø 100 a 50 mm (TPP), 96jamkové mikrotitrační desky (TPP, Eppendorf), konické centrifugační zkumavky – 15ml (Eppendorf), mikrozukavky – 0,6, 1,5 a 2ml (Eppendorf), Sterilní zkumavky o

objemu 15 a 50 ml (TPP), 15 μ m 8jamkové mikrotitrační komůrka (Ibidi cells in focus), jehly, nitrocelulosevá membrána pro western blot (Bio-Rad)

- Běžné laboratorní vybavení: kádinky, odměrné válce, lžičky, váženky, špičky, stojan na zkumavky a mikrozukavky, skalpel, pinzeta, podložka pokrytá parafilmem, parafilm

3.3 Použité programy – Software

- GraphPad Prism 9.3.1. (2021) (GraphPad Software, La Jolla California USA)
- ImageJ (FiJi software)
- Inkscape 1. 2. 2. (Inkscape)
- Motic Images Plus 3.0 (Motic)
- Past 4.03 (Oycind Hammer)

3.4 Kultivace a diferenciacie buněk

Buňky linie U-87MG i SH-SY5Y byly kultivovány v kultivačním médiu DMEM/F12 (1:1) s 10% FBS a 1% PS na kultivačních miskách Ø 100 mm v inkubátoru při teplotě 37 °C, obsahu 5 % CO₂ a 95% vzdušné vlhkosti. Při dosažení konfluencie 70-80 % byly buňky pasážovány. Z kultivačních misek odsáto veškeré médium, buňky opláchnuty 1 ml 1x PBS, které bylo následně také odsáto. Poté byl na buňky aplikován 1 ml enzymu trypsinu a ponechán na krátkou inkubaci (buňky linie SH-SY5Y cca 5 min, buňky linie U-87MG asi 2-3 min) při laboratorní teplotě. Po skončení inkubace s trypsinem byly k suspenzi napipetovány 4 ml média DMEM/F12 (1:1) s 10% FBS a 1% PS. Vzniklá suspenze byla rozesuspendována a rozdělena dle potřeby do připravených kultivačních misek s čerstvým médiem. Buněčná linie U-87MG byla obvykle rozdělena v poměru 1:6, aby bylo zabráněno vzniku sféroidů, které vznikají při vyšších konfluencích buněk této linie. Suspenze buněk linie SH-SY5Y byla obvykle rozdělována na nové kultivační misky v poměru 1:2. Buňky linie SH-SY5Y byly kultivovány po pasáž 20 od založení kultury, buňky linie U-87MG je možno využívat bez omezení čísla pasáže.

Buňky byly dále nasazovány na 96jamkové mikrotitrační destičky nebo 15 μ m 8jamkové destičky. Buňky byly uvolněny z kultivační nádoby pomocí trypsinu, viz výše. Buněčné suspenze byly poté přeneseny do zkumavek, točeny 5 min při rychlosti 1 000 g za laboratorní teploty, supernatant byl odsán a k peletu přidáno 10 ml čerstvého média. Suspenze byla homogenizována, poté počítána pomocí Bürkerovy počítací

komůrky a následně byl vypočten objem suspenze potřebný pro násadu. Vzniklá buněčná suspenze byla rovnoměrně pipetována do jamek destiček v objemech 100 µl/jamku. Dle potřeb experimentu byly buňky linie U-87MG nasazovány na 96jamkové mikrotitrační destičky v konfluencích 3 000 nebo 6 000 buněk/jamku (buňky linie SH-SY5Y 20 000 buněk/jamku) a na 15µm 8jamkové destičky 30 000 buněk/jamku (SH-SY5Y 50 000 buněk/jamku). Po násadě byly buňky kultivovány za standardních podmínek.

Den po násadě byly buňky diferenciovány. K buňkám byl připipetován objem 100 µl DMEM/F12 (1:1) s 1% FBS a 1% PS s diferenciacním činidlem. Pro linie U-87MG NaB ve výsledné koncentraci 4 nebo 2 mM, pro linii SH-SY5Y 10µM ATRA. Buňky, které bylo zapotřebí ponechat v nediferenciovaném stavu, byly ošetřeny 100 µl DMEM/F12 (1:1) s 10% FBS a 1% PS. V případě diferenciac buněk na kultivačních miskách bylo z misek odsáto médium a přidáno 10 ml 2mM NaB v DMEM/F12 (1:1) s 1% FBS a 1% PS, 10% FBS a 1% PS (1:1) pro buňky linie U-87MG nebo 10µM ATRA pro SH-SY5Y. Kontrolní nediferenciované buňky byly ošetřeny DMEM/F12 (1:1) s 10% FBS a 1% PS. Buňky byly následně inkubovány za standardních podmínek po dobu 48 h.

3.5 Validace diferenciac na cholinergní fenotyp

3.5.1 Kultivace buněk pro western blot a jejich sklizení

Buňky obou linií byly kultivovány a diferenciovány dle předchozího popisu. Pro analýzu western blot byly použity dvě misky obou buněčných linií (SH-SY5Y a U-87MG).

Pro všechny experimentální skupiny byl následující postup sklizení jednotný. Po dokončení inkubace byly adherované buňky sklizeny pomocí škrabky a spolu s médiem/diferenciacním roztokem byly přeneseny do zkumavky umístěné na ledu. Kultivační miska byla poté opláchnuta 1 ml vychlazeného 1x PBS a tento objem byl rovněž přenesen do příslušné zkumavky. Suspenze byly následně točeny při 4 °C 10 min a rychlosti 1000 rpm. Po centrifugaci byl odsát supernatant a pelet rozesuspendován v 1 ml vychlazeného 1x PBS. Suspenze byla přenesena do označených mikrozkuvek, které byly poté opět centrifugovány za předchozích podmínek. Po centrifugaci byl supernatant opatrně odsát pomocí jehly a zbylé pelety buněk byly v mikrozkuvkách zamrazeny v tekutém dusíku a uloženy do -80 °C.

Tento experiment byl proveden ve dvou biologických opakováních.

3.5.2 Lyzace buněk pro western blot analýzu

Buňky v mikrozkuřavkách byly z -80 °C umístěny na led. Poté k nim byl přidán vychlazený lyzační pufr a obsah mikrozkuřavky byl řádně rozesuspendován. Objem lyzačního pufru byl odhadnut na základě velikosti peletu, pro buňky linie SH-SY5Y cca 30-45 µl, pro buňky linie U-87MG cca 45-50 µl. Buňky byly 30 min inkubovány s lyzačním puffrem na ledu a během této doby 3x promíchány.

Následně byly buňky sonikovány a 30 min centrifugovány při 4 °C a rychlosti 14 000 g. Supernatanty byly přeneseny do čistých mikrozkuřavek na ledu, přičemž byly zaznamenány jejich přesné objemy.

Dále byla stanovena celková koncentrace proteinů pomocí Bradfordova činidla v duplikátech pro každý vzorek.

K vzorkům byl přidán denaturační vzorkový pufr (5xSDS) o objemu, který odpovídal ¼ objemu vzorku. Po promíchání byly vzorky umístěny po dobu 5 min do termobloku předeřřátého na 96 °C. Na závěr byly vzorky krátce stočeny a uschovány do -20 °C. Tímto byly připraveny na elektroforetickou analýzu.

3.5.3 Polyakrylamidová elektroforéza a western blot

K separaci proteinů byla použita diskontinuální elektroforéza za denaturujících podmínek v 1mm polyakrylamidových gelech (SDS-PAGE). Gel byl složen z 12,5% dělicí části a 5% zaostřovací části. Gely byly připravovány dle Tab. 3, viz níže.

Tab. 3. Objemy jednotlivých složek pro přípravu 1mm gelů pro SDS-PAGE.

Složka	Dělicí gel 12,5% (2 gely)	Zaostřovací gel 5% (2 gely)
AA + Bis AA	3,90 ml	0,84 ml
Destilovaná H ₂ O	1,94 ml	3,51 ml
TRIS pH 8,8	3,50 ml	
TRIS pH 6,8		0,63 ml
SDS (10%)	94,00 µl	50,00 µl
TEMED	6,25 µl	5,00 µl
APS (10%)	37,50 µl	30,00 µl

Po smísení všech složek 12,5% dělicího gelu, byl připravený roztok urychleně napipetován mezi připravená skla a povrch převrstven malým objemem butanolu. Po 45min polymeraci byl butanol z povrchu dělicího gelu odsán. Byl připraven 5% zaostřovací gel, nanesen na gel dělicí a mezi skla byl zasunut 15jamkový hřebínek.

Takto připravený gel byl opět ponechán 45 min polymerizovat.

Připravené gely byly vloženy v komůrce do elektroforetické vany a zality elektroforetickým, Tris-glycinovým, puftrem. Vzorky byly po dobu 2 min zahřáty v termobloku nastaveném na teplotu 96 °C. Do první jamky byly napipetovány 3 µl markeru molekulových hmotností a následně vzorky, jejichž objemy odpovídaly obsahu proteinů 35 µg. Počáteční napětí bylo nastaveno na 90 V a po přechodu proteinů ze zaostřovacího gelu do dělicího bylo zvýšeno na 120 V. Elektroforéza byla ukončena poté, co čelo dělicích se proteinů dosáhlo spodního okraje gelu.

Gel se separovanými proteiny byl umístěn na nitrocelulosovou membránu mezi filtrační papíry a pěnové podložky a uzavřen v blotovací kazetě, která byla umístěna do vany s blotovacím puftrem a chladícím blokem. Zdroj byl po celou dobu (3 h) nastaven na 270 mA. Po 1,5 h hodině byl obměněn ledový blok, aby bylo zachováno chlazení.

Po ukončení western blotu byla membrána s přenesenými proteiny umístěna na 5 min do roztoku Ponceau S, čímž se přenesené proteiny zviditelnily, promyta v destilované vodě a ponechána volnému proschnutí na filtračním papíře při laboratorní teplotě.

3.5.4 Imunodetekce proteinů

Z membrány byly podle markeru molekulových hmotností skalpelem vyřezány oblasti, ve kterých se nacházely požadované proteiny. Vyřezané části membrány byly 5 min odbarvovány v 1x TBS a poté inkubovány 1 h na kývačce v blokovacím pufru (5% BSA v 1x TBS-Tween 20 nebo 5% sušené mléko v 1x TBS-Tween 20). Blokací zabráníme vzniku nespecifických vazeb protilátky.

Po blokaci byly membrány omyty 5 min v 1x TBS, rychle osušeny a převrstveny naředěnými primárními protilátkami viz Tab. 1. Membrány byly uzavřeny ve vlhké komůrce, aby bylo zabráněno vyschnutí a uloženy na inkubaci přes noc při 4 °C.

Po inkubaci primárních protilátek byly membrány promývány podle následujícího schématu: 5 min 1x TBS, 5 min 1x TBS-Tween 20, 5 min 1x TBS a 10 min 1x TBS. Promývací roztoky byly v každém kroku vyměněny. Během procesu promývání byly naředěny sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou v odpovídajících blokačních roztocích. Sekundární protilátky byly voleny na základě původu primárních protilátek a ředěny dle Tab. 2. Po dokončení promývání byly membrány krátce osušeny na filtračním papíru, uspořádány na plastovou podložku, převrstveny příslušnými naředěnými sekundárními protilátkami a uloženy na 1 h při

laboratorní teplotě do vlhké komůrky.

Následně byly membrány promyty podle následujícího schématu: 10 min 1x TBS, 5 min 1x TBS-Tween 20, 5 min 1x TBS a 10 min 1x TBS (promývací roztoky byly mezi jednotlivými kroky opět vyměňovány). Po promytí byly membrány krátce osušeny na filtračním papíře, převrstveny vyvíjecím roztokem peroxid:luminol (1:1) a 5 minut inkubovány. Peroxid vodíku v tomto případě funguje jako substrát pro křenovou peroxidázu konjugovanou na protilátkách, která následně katalyzuje oxidaci luminolu a s ní spojenou emisi světla. Vzniklá chemiluminiscence byla detekována pomocí CCD kamery.

V průběhu těchto experimentů byly nejprve provedeny optimalizace výběru vhodného blokačního pufru pro jednotlivé protilátky a také vhodné ředění protilátek. Zoptimalizovaný postup byl poté proveden ve dvou biologických opakováních.

3.5.5 Imunofluorescenční detekce proteinů

Pro detekci stanovovaných markerů a pořizování jejich snímků pomocí konfokálního mikroskopu byly buňky obou linií kultivovány a diferenciovány na 15 μ m 8jamkové destičce dle předchozího popisu. Po dokončení diferenciace přišla na řadu fixace.

3.5.5.1 Fixace formaldehydem

Prvotní experimenty byly prováděny dle následujícího schématu. Z jamek bylo odsáto médium a buňky byly 3x opláchnuty 1x PBS. Následně byly buňky 15-20 min inkubovány se 200 μ l 4% paraformaldehydem při pokojové teplotě. Roztok paraformaldehydu byl poté odsán a byl proveden oplach ledovým 1x PBS 3x v řadě, každý po dobu 4 min. Dále byla prováděna 15min inkubace při laboratorní teplotě s 200 μ l permeabilizačního roztoku 0,2% Tritonu X-100. Následovalo promytí 3x 1x PBS každé po dobu 4 min. Následovala blokáce 30 min při laboratorní teplotě pomocí 200 μ l 5% BSA/1 x PBS. Blokační roztok byl odsán, bylo nanášeno 150 μ l naředěné protilátky (protilátky byly ředěny v blokačním pufru) a ponecháno inkubaci přes noc při 4 °C. Dalším krokem bylo opět promývání 3x 4 min 1x PBS následované aplikací sekundární protilátky (viz Tab. 2) naředěné v blokačním roztoku, která byla ponechána na 1h inkubaci ve tmě při laboratorní teplotě. Od okamžiku použití sekundární protilátky nebyl vzorek vystavován světlu. Vzorek byl 5x 5 min promyt 1x PBS a po posledním promytí byl veškerý roztok 1x PBS odsán a vzorek byl ponechán lehkému zaschnutí. Na závěr byly jamky překryty tenkou vrstvou (4-5 kapek) vodného montovacího média (FluorSave). Následně byla provedena detekce proteinů

pomocí fluorescenčního mikroskopu, která ovšem odhalila nedostatečnosti tohoto postupu fixace a barvení. Zejména buňky linie U-87MG byly tímto způsobem fixace a permeabilizace značně poškozeny, čímž byla narušena jejich původní morfologie a docházelo k nadměrným ztrátám buněk při jejich promývání. Tyto nepříznivé výsledky byly pozorovány i při opakováních tohoto postupu. Z těchto důvodů bylo přikročeno k jinému pracovnímu postupu, viz dále.

3.5.5.2 Fixace methanol-aceton (1:1)

Dále používaný postup se skládal z následujících kroků, postup byl převzat z práce Steigerová et al., 2010. Z jamek bylo odsáto médium, buňky byly opláchnuty vytemperovaným 1x PBS a po jeho odsátí byly buňky inkubovány 10 min se 150 μ l vychlazeného roztoku methanol-aceton (1:1). Methanol-aceton byl poté odsán a buňky byly ponechány lehkému proschnutí. Takto zafixované buňky bylo následně možno uchovávat v -20 °C nebo ihned pokračovat v dalších krocích. Jamky byly zavodněny roztokem 1x PBS-0,1% Tween-20 po dobu 3 min. Dále byly buňky blokovány 30 min při laboratorní teplotě 150 μ l 1% BSA/1 x PBS-0,1% Tween-20 (čerstvě připravený roztok). Následovalo 1x promytí 1x PBS-0,1% Tween-20 po dobu 3 min. Po promytí a odsátí promývacího roztoku byly aplikovány primární protilátky naředěné v blokačním roztoku a inkubovány přes noc v 4 °C. Následujícího dne byly jamky 5x po dobu 3 min promyty 1x PBS-0,1% Tween-20. Po posledním promytí byl promývací roztok odsán a aplikována sekundární protilátka konjugovaná s fluoroforem Alexa Fluor 488 naředěná v blokačním roztoku (viz Tab. 2). Buňky byly se sekundární protilátkou inkubovány ve tmě, nejdříve 30 min při laboratorní teplotě a poté 1 h při 4 °C. Od momentu použití sekundární protilátky, bylo se vzorkem manipulováno ve tmě. Po inkubaci sekundární protilátky následovalo opět 5x 3min promytí 1x PBS-0,1% Tween-20, následované 2x 3min promytím 1 x PBS a na závěr promytí 2x 3min destilovanou H₂O. Po posledním promytí byla destilovaná H₂O odsána a vzorek ponechán krátkému proschnutí. Na závěr bylo do každé jamky nakapáno 4 až 5 kapek vodného montovacího média FluorSave. Tento postup úpravy vzorku pro pořizování fluorescenčních snímků se ukázal jako vyhovující a byl dále používán. Bylo ovšem potřeba optimalizovat ředění protilátek, vyhovující ředění jsou zaznamenána v Tab. 1. Po nalezení vhodných koncentrací byly experimenty provedeny ve dvou biologických opakováních.

Samotné pořizování fluorescenčních snímků probíhalo pomocí konfokálního

mikroskopu s kamerou a příslušným softwarem. U pořízených mikrofotografií byla poté provedena jednotná korekce jasu a kontrastu v programu ImageJ.

3.6 Optimalizace modelu – ošetření buněk skopolaminem

Po dokončení diferenciaci byly buňky ošetřeny SCOP o koncentracích 5 až 10mM a kontrolní skupinou (0,1% DMSO). Byly připraveny roztoky SCOP o koncentracích 5 až 10mM ředěním zásobního 1M roztoku SCOP v DMEM/F12 (1:1) s 1% FBS a 1% PS a roztok pro kontrolní skupinu – 0,1% DMSO v DMEM/F12 (1:1) s 1% FBS a 1% PS. Z desek s buňkami bylo pomocí jehly odsáto diferenciací médium a poté urychleně aplikováno 100 µl roztoku SCOP/kontroly. Ošetřené buňky byly poté inkubovány za standardních podmínek 24 nebo 48 h.

Po uplynutí inkubační doby s roztoky SCOP byly desky s buňkami podrobeny testování viability pomocí různých činidel.

3.6.1 Propidium jodid

Stanovení buněčné smrti bylo provedeno pomocí PI, které funguje jako interkalační činidlo. Díky svému kladnému náboji není schopné procházet přes membrány zdravých buněk. Jsou-li buňky dostatečně poškozené, PI prochází přes membránu a interaguje s bázemi DNA, přičemž se posouvá jeho excitační a emisní maximum. Zásobní 1mg·ml⁻¹ roztok PI byl naředěn 500x v 1x PBS a po 100 µl napipetován do média k buňkám a do jamek blanku. Deska byla poté 15 min inkubována ve tmě při laboratorní teplotě a poté centrifugována 1 min při 1 400 rpm. Následně byla měřena na spektrofotometru při ex./em. 535/617 nm.

3.6.2 YO-PRO™ 1 jodid

Další měření probíhalo pomocí YO-PRO 1 barviva, které díky své velikosti prostupuje pouze přes membránu buněk v rané fázi apoptózy (tedy buňky, které ještě nejsou barveny pomocí PI), ve kterých interaguje s DNA. Zásobní 1mM roztok YO-PRO 1 byl naředěn 1000x v 1x PBS. Buňky v 96jamkových deskách byly stočeny pomocí centrifugy 5 min při 1 400 rpm, poté z nich bylo šetrně jehlou odsáto médium a napipetováno 100 µl naředěného roztoku YO-PRO 1. Desky byly poté 15 min inkubovány ve tmě při laboratorní teplotě a následně měřeny pomocí spektrofotometru při ex./em. 488/530 nm.

3.6.3 Test pro buněčnou proliferaci a viabilitu WST-1

Tetrazolová sůl WST-1 (4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzensulfonát) je pomocí mitochondriální dehydrogenázy živých buněk štěpena na formazán. V závislosti na počtu živých buněk je tvořeno formazánové barvivo, jehož absorbanci je poté možno měřit. Do média bylo přidáno 10 µl činidla WST-1, deska byla poté inkubována v inkubátoru při teplotě 37 °C, obsahu 5 % CO₂ a 95% vzdušné vlhkosti po dobu 1 h. Měření absorbance pomocí spektrofotometru probíhalo po 30 min a 1 h inkubace při 440 nm s referenční vlnovou délkou pozadí 600 nm.

3.6.4 Měření oxidativního stresu pomocí dihydroethidia (DHE)

Pro stanovení OS v živých buňkách lze využít fluorescenční sondu DHE. Sonda DHE je selektivní pro superoxidový radikál, který DHE oxiduje za tvorby hydroxyethidia a ten lze fluorescenčně kvantifikovat měřením emisní vlnové délky 580 nm při excitaci vlnovou délkou 500 nm. Zásobní 10mM roztok DHE byl naředěn 1000x v 1x PBS. Dále byl postup jednotný viz YO_PROTM 1 jodid. Desky byly následně inkubovány 30 min ve tmě při laboratorní teplotě a poté měřeny ve spektrofotometru při ex./em. 500/580 nm.

3.6.5 Stanovení buněčné smrti pomocí laktátdehydrogenázy (LDH)

Při všech typech buněčné smrti je buněčná membrána buněk narušena a z cytosolu buněk je do okolí uvolněna LDH. Enzym LDH může katalyzovat přeměnu laktátu na pyruvát a při následných spřažených reakcích dochází k redukci tetrazoliové soli na formazán. Množství vytvořeného formazánu je tak přímo úměrné počtu buněk s porušenou membránou. Desky byly stočeny viz YO_PROTM 1 jodid (2 min a 30 s). Po stočení bylo z desek přepipetováno 50 µl supernatantu do čisté 96jamkové desky, přidáno 50 µl roztoku LDH release (předpřipravený na základě pokynů výrobce) a deska byla poté ponechána 30min inkubaci ve tmě při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubace bylo do jamek přidáno 25 µl roztoku STOP solution a poté byla ihned měřena absorbance při 490 nm a referenční vlnové délce 680 nm.

3.7 Nalezení mechanismu buněčné smrti indukované skopolaminem

Pro nalezení mechanismu buněčné smrti byly buňky obou linií ošetřeny třemi koncentracemi SCOP (7, 8 a 9 mM U-87MG; 2,5; 5 a 10 mM SH-SY5Y) dle předchozího popisu, případně byla použita jen jedna koncentrace SCOP (8mM pro U-87MG; 5mM pro SH-SY5Y) a k ní přidána látka LY294002 ve třech koncentracích (0,01; 0,1 a 1 µM). Dále byla stanovována buněčná smrt pomocí PI, YO_PROTM 1 jodid

a LDH a tvorba superoxidových radikálů pomocí DHE dle předchozího popisu. Byly přidány další typy měření, viz níže.

3.7.1 Měření autofagie

Pro detekci autofagie byl zvolen fluorescenční autofagozomální marker s excitační vlnovou délkou 333 nm a emisní vlnovou délkou 518 nm. Desky byly točeny při pokojové teplotě po dobu 5 min a 1 400 rpm. Médium bylo poté šetrně odsáto jehlou a do jamek bylo přidáno 50 μ l autofagozomálního detekčního reagentu zředěného 500x v barvicím pufru. Deska byla inkubována 30 min v inkubátoru, poté opět stočena, supernatant byl šetrně odsán jehlou, do jamek bylo napipetováno 100 μ l promývacího pufru a následně bylo provedeno měření pomocí spektrofotometru při ex./em. 333/518 nm.

3.7.2 Měření aktivity kaspázy 3/7

Fluorescenční sonda pro stanovení aktivity kaspáz 3/7 je konjugovaná s tetrapeptidem, který je těmito kaspázami rozpoznáván a štěpen. Po štěpení tetrapaptidu je uvolněná fluorescenční sonda schopna emise světla o vlnové délce 505 nm při excitaci vlnovými délkami 400 nm. Byl připraven kaspázový pufr (dle Carrasco et al., 2003) s obsahem 30mM DTT, 3mM PMSF a 75 μ M substrátu kaspáz 3/7 (Ac-DEVD-AFC). Vzniklý roztok byl v objemu 50 μ l přidán do obsahu jamek a deska byla poté 2 h inkubována v inkubátoru. Po inkubaci byl měřen fluorescenční signál při ex./em. 400/505 nm.

3.7.3 Pozorování autofagozomů

Na 15 μ m 8jamkové destičce byly kultivovány buňky linie U-87MG a SH-SY5Y, které byly diferenciovány a dále ošetřeny pomocí SCOP (8mM pro U-87MG, 5mM pro SH-SY5Y) dle předchozích popisů. Po 24 a 48 h byl aplikován marker pro detekci autofagie, viz výše. Dále bylo prováděno morfologické pozorování a zachycování mikrosnímků pomocí fluorescenčního mikroskopu s kamerou.

3.8 Testování protektivní aktivity kandidátních sloučenin a stanovení cytotoxicity

Následně bylo přistoupeno k testování kandidátních sloučenin z řad inhibitorů cholinesteráz, inhibitorů autofagie a dalších vybraných skupin. Desky byly nasezeny, diferenciovány a ošetřeny SCOP s látkami dle předchozích postupů. Látky RIV, GAL a DON byly použity v koncentracích 0,1; 1 a 10 μ M; NEC-1 0,2; 2 a 20 μ M a LY294002 a

VM583 0,01; 0,1 a 1 μ M. Desky byly poté měřeny po 24 nebo 48 h inkubace pomocí PI, YO-PRO1, DHE, LDH a také pomocí MitoSoxu a JC-10.

3.8.1 Stanovení cytotoxicity

Pro stanovení případné cytotoxicity testovaných kandidátních sloučenin byly buňky obou linií standardním způsobem ošetřeny testovanými skupinami ovšem bez přítomnosti toxinu SCOP. Po 24h a 48h inkubaci s látkami bylo poté z poloviny jamek DMSO kontroly odsáto 50 μ l média a místo něj přidáno 50 μ l 2% Tritonu X-100, finální koncentrace Tritonu X-100 tedy činila 1 %. Po 2 min byla deska standardně změřena pomocí PI. Získaná data byla přepočtena na procenta buněčné smrti, kde DMSO kontrola ošetřená 1% Tritonem X-100 činila 100 %.

3.8.2 Mitochondriální superoxidový indikátor MitoSox

Činidlo MitoSox proniká do živých buněk, kde je při přítomnosti superoxidového radikálu v mitochondriích oxidováno za vzniku fluorescenčního barviva. Zásobní 5mM roztok MitoSox byl zředěn 1000x v HBSS pufru. Buňky byly připraveny dle předchozího popisu (viz YO_PROTM 1 jodid), zásobní 5mM roztok MitoSox byl zředěn 1000x v HBSS pufru a po 50 μ l přidán do jamek. Desky byly poté inkubovány celkově 1 h v inkubátoru. Měření probíhalo po 15 a 30 min inkubace ve spektrofotometru při ex/em vlnové délce 500/580 nm.

3.8.3 Měření mitochondriálního membránového potenciálu pomocí JC-10

Buňky s nepoškozenými mitochondriemi, a tedy fyziologickým mitochondriálním membránovým potenciálem, polymerizují JC-10 na fluorescenční barvivo s excitací v červené oblasti spektra. Naopak buňky s poškozeným mitochondriálním potenciálem schopnost polymerizace JC-10 ztrácejí a JC-10 zůstává v podobě monomeru zeleně fluorescenčního barviva. Jsou-li změřeny fluorescenční signály pro oba typy barviva, je následně možné jejich poměr přepočítat na procentuální mitochondriální membránový potenciál. Oproti jiným testům byly buňky pro měření mitochondriálního membránového potenciálu ošetřeny pouze 50 namísto 100 μ l testovaných skupin. K obsahu jamek desky bylo připipetováno 25 μ l 50x zředěného barviva JC-10 v testovacím pufru A. Deska byla poté inkubována 30 min v inkubátoru a po dokončení inkubace bylo do jamek přidáno 25 μ l testovacího pufru B. Fluorescenční signál byl poté měřen na spektrofotometru při ex./em. 490/525 nm a ex/em 540/590 nm.

4 Výsledky a diskuse

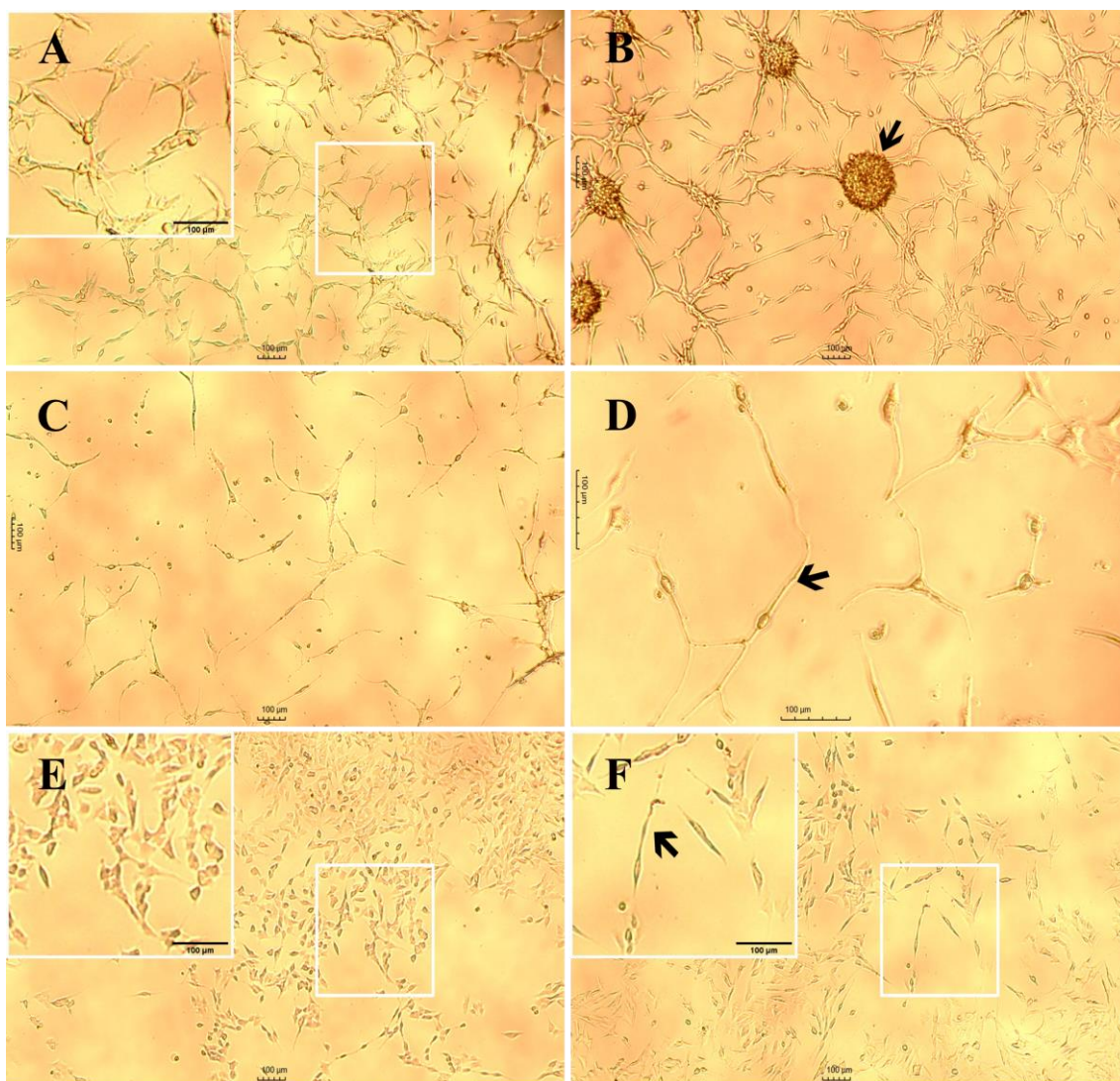
4.1 Validace diferenciaci na cholinergní fenotyp

Pro diferenciaci na cholinergní fenotyp byly buňky U-87MG inkubovány 48 h v 2mM roztoku NaB dle Liu, Xia et al., 2019. Po proběhlé diferenciaci byl jejich získaný fenotyp porovnáván s kontrolní skupinou, která byla kultivována stejným způsobem, ale finálních 48 h inkubace probíhalo ve standardním kultivačním médiu bez diferenciacního činidla. Následně byla prováděna validace diferenciaci na cholinergní fenotyp, k čemuž sloužilo pozorování změn morfologie, western blot s následnou imunodetekcí vybraných proteinů a imunofluorescenční analýza vybraných proteinů. Celý proces byl pro srovnání prováděn také na buněčné linii SH-SY5Y, která je dobře charakterizovaným a dlouhodobě zavedeným modelem. Diferenciovaný fenotyp linie SH-SY5Y reprezentují buňky ošetřené po dobu 48 h 10 μ M ATRA.

Nárůst exprese TuJ1, SYP a NF-M je markerem neuronální diferenciaci. Všechny tyto tři markery jsou součástí cytoskeletu buněk a jejich zvýšená exprese je ukazatelem neuronální diferenciaci. Redistribuce SYP do neuritů poukazuje na jeho funkci při tvorbě synaptických váčků, které jsou nedílnou součástí neuronální komunikace v raných stádiích vývoje neuronů (Sarkanen et al., 2007; Shipley, Mangold et al., 2016; Teppola et al., 2016). Protein NF-M je nepostradatelný při tvorbě nových axonálních výběžků a podílí se na celkové stabilitě neuronových vláken (Lee et al., 2018). Nestin je znám jako marker nediferenciovaných buněk a buněčná diferenciaci je obvykle provázána snížením exprese tohoto markeru (Lopes et al., 2010). Dále mAChR M1, AChE a BChE jsou markery cholinergních neuronů.

4.1.1 Pozorování změn morfologie

Pro zachycení změn morfologie byly pořizovány mikroskopické snímky kontrolní i diferenciované skupiny pomocí světelného mikroskopu s kamerou. Obr. 2. shrnuje pozorované změny na obou použitých buněčných liniích.



Obr. 2. Změn morfologie nediferencovaných a diferencovaných buněk U-87MG a SH-SY5Y. A: U-87MG kontrolní skupina; B: U-87MG kontrolní skupina, šipka ukazuje sféroid; C: U-87MG po 48h inkubaci s 2mM NaB; D: U-87MG po 48h inkubaci s 2mM NaB, šipka ukazuje na neurit; E: SH-SY5Y kontrolní skupina; F: SH-SY5Y po 48h inkubaci s 10µM ATRA, šipka ukazuje na neurit. Snímky A, B, C, E a F byly pořizovány při zvětšení 40x. Snímek D byl pořizen při zvětšení 100x.

Obr. 2A ukazuje kontrolní nediferencované buňky linie U-87MG. Na snímku je možné pozorovat trojúhelníková těla s oblými okraji a vzájemnou propojenost buněk. Buňky typicky rostou ve vzájemně propojených sítích. Díky zrychlené proliferaci a tendenci buněk vytvářet shluky, se při kultivaci objevují také sféroidy, které jsou zachyceny na Obr. 2B (viz šipka). Přítomnost sféroidů je charakteristickým rysem linie U-87MG a objevují se zejména při vysoké konfluenci buněk. Ačkoliv jsou sféroidy tvořeny ve středu nekrotickými a apoptotickými buňkami, vnější povrch je tvořen viabilními buňkami, a proto jsou sféroidy adharovány k povrchu kultivační nádoby (Bell et al., 2001). Pouze ojediněle byly při kultivaci pozorovány volně se pohybující

sféroidy, které byly obvykle menších rozměrů než sféroidy přichycené k povrchu kultivační nádoby. Ačkoliv se sféroidy využívají ke studium rozličných patologií (Hess et al., 2010), pro účely této práce byly nežádoucí. V průběhu práce s touto buněčnou linií vyšlo najevo, že vzniku takovýchto buněčných útvarů lze zabránit řádným rozesuspendováním v průběhu pasážování, násad a také kultivací buněk v nižších denzitách. Obr. 2C a 2D ukazuje buňky linie U-87MG diferenciované pomocí 48h inkubací s 2mM NaB. Na těchto mikroskopických snímcích můžeme vidět radikální změnu morfologie oproti kontrolní skupině. Buňky se vlivem 2mM NaB značně prodlužují a vytváří dlouhé neurity (například šipka na Obr. 2D). Je možné dobře rozlišit kulovitá těla buněk, ze kterých vystupují dlouhé výběžky neuritů následně se propojující s okolními buňkami. Pozorovaný fenotyp buněk po diferenciaci 2mM NaB je v korelaci s pozorováním Liu, Xia et al., 2019.

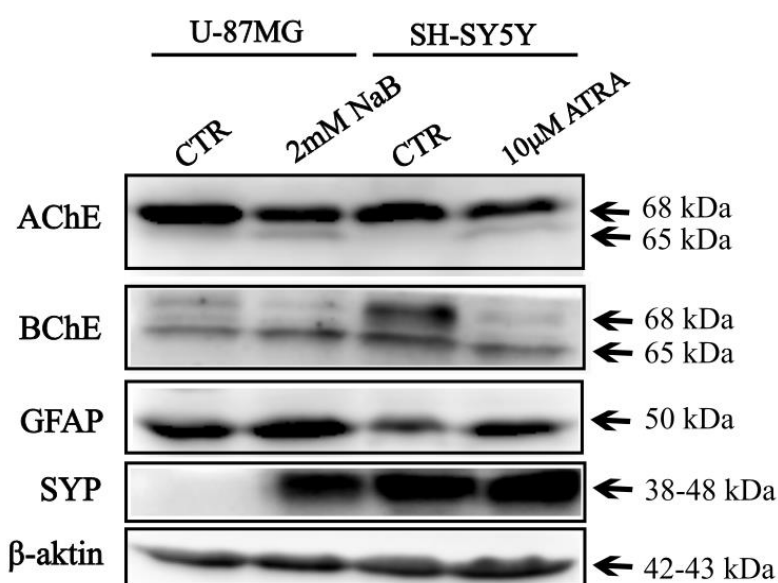
Obr. 2E a 2F zobrazují rozdíly mezi nediferenciovanými buňkami linie SH-SY5Y (Obr. 2E) a buňkami této linie po 48h inkubaci s 10 μ M ATRA (Obr. 2F). Na mikroskopickém snímku E lze vidět kulatá těla nediferenciovaných buněk SH-SY5Y s pouze velmi krátkými neurity. Jak poté ukazuje Obr. 2F, ATRA-diferenciace prodlužuje těla buněk, která získávají pyramidový vzhled a neurity se zvětšují. Pozorované změny morfologie jsou v souladu s pozorováními Pählman et al., 1984.

Při porovnání linie U-87MG (Obr. 2A až 2D) s linií SH-SY5Y (Obr. 2E a 2F), je jasně patrné, že buňky linie U-87MG jsou o poznání větších rozměrů než linie SH-SY5Y. Pozorované změny v morfologii, zejména masivní nárůst neuritů a zastavení proliferace, po diferenciaci u obou linií ukazuje na jejich úspěšnou diferenciaci.

4.1.2 Western blot analýza

Dále byla pro validaci diferenciaci na cholinergní fenotyp u buněčné linie U-87MG použita metoda western blot s následnou imunodetekcí vybraných proteinů. Proteiny byly vybrány z řad markerů cholinergních neuronů (mAChR M₁, AChE, BChE), neuronálních markerů (NF-M, SYP) a markeru gliových buněk (GFAP). Po prvotních pokusech, na kterých byl zoptimalizován proces blokace a ředění primárních protilátek (data nejsou uvedena) byly úspěšné experimenty provedeny v biologickém duplikátu, které měly stejný výsledek. Výsledky jsou znázorněny na Obr. 3, nejsou zde zaznamenány proteiny mAChR M₁ a NF-M, neboť ani jeden z těchto proteinů se nepodařilo zaznamenat. V případě mAChR M₁ se můžeme domnívat, že se jedná o nevhodnost primární protilátky pro tuto metodu, ačkoliv její výrobce western blot udává

jako možnou aplikační metodu. Proteiny pro mAChR M_1 se nepodařilo při imunodetekci zachytit při blokaci pomocí 5% BSA v 1x TBS-Tween 20 ani při blokaci v 5% sušeném mléku v 1x TBS-Tween 20 a ani přes snížení ředění primární protilátky (v souladu s doporučením výrobce). Protein NF-M se rovněž nepodařilo zachytit i přes změnu blokace a snížení ředění. V tomto případě nebyl experiment úspěšný zřejmě z důvodu použité lyzace, která pro cytoskeletální protein NF-M není vhodná, ačkoliv výrobce primární protilátky jako referenci udává western blot, při jehož lyzaci byl použit RIPA pufr. Pro extrakci cytoskeletálních proteinů je možné namísto RIPA pufru použít Tris-Triton pufr. Jiný typ lyzace pro zjištění NF-M nebyl použit z časových důvodů a také proto, že se jej podařilo stanovit pomocí imunofluorescenční analýzy.



Obr. 3. Záznam imunodetekce vybraných proteinů získaných z lyzátů kontrolních skupin buněk U-87MG a SH-SY5Y a buněk ošetřených 2mM NaB (U-87MG) a 10μM ATRA (SH-SY5Y). Proužky představují hladiny jednotlivých proteinů. Proužky β-aktinu slouží jako kontrola stejnoměrného nanesení vzorků.

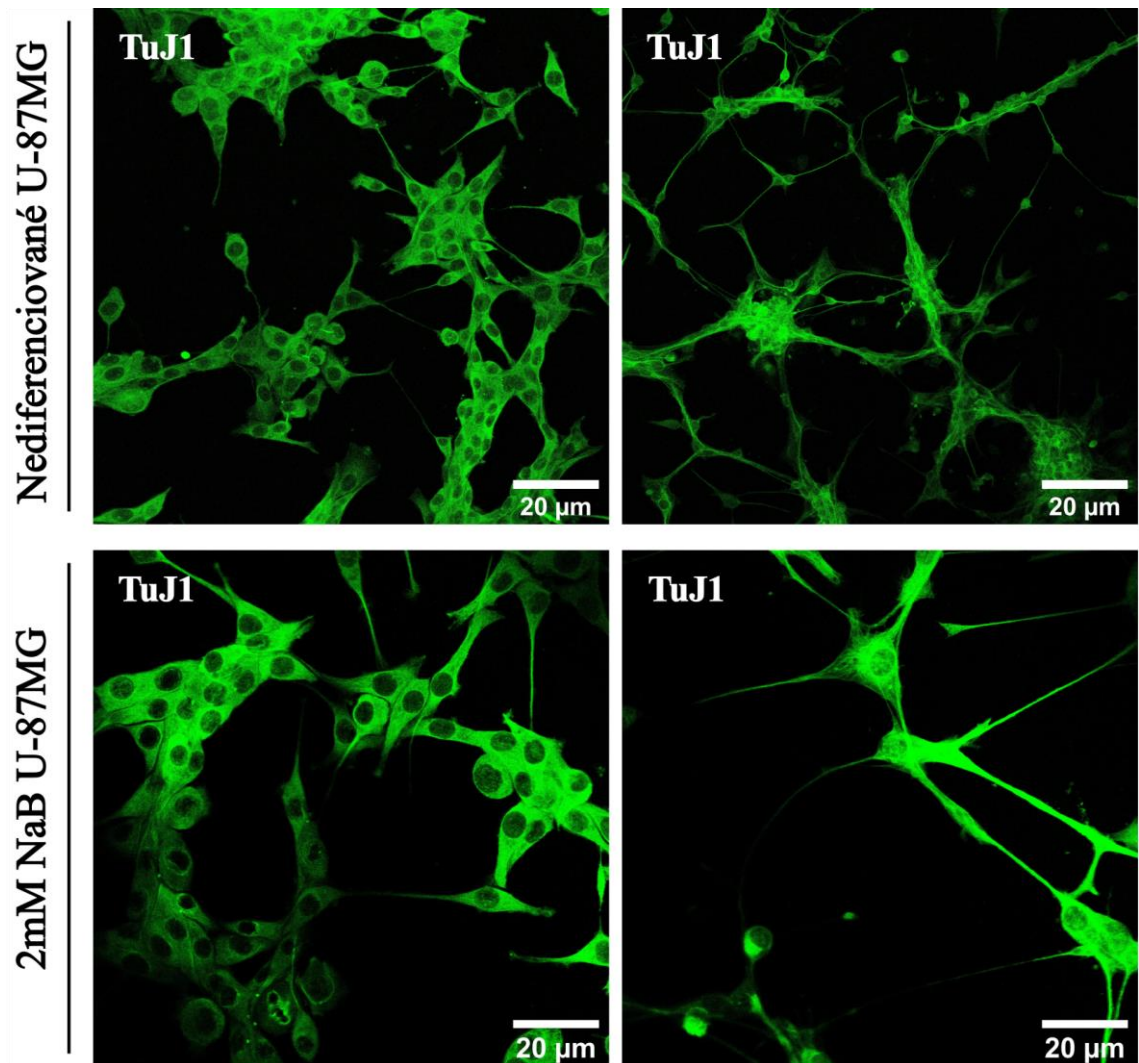
Na základě Obr. 3. můžeme říci, že v nediferenciovaných buňkách U-87MG jsou exprimovány všechny stanovované proteiny kromě SYP. I tento protein byl u nediferenciovaných buněk U-87MG stanoven, nicméně při světelné expozici, při níž byl proužek SYP u ostatních vzorků již přesvícen, a proto není na obrázku zachycen. Expres prvního proteinu shora, AChE, se zdá být po diferenciaci lehce snížena, nicméně se u diferenciovaných buněk linie U-87MG navíc objevuje proužek navíc. Jedná se pravděpodobně o neúplně glykosylovaný AChE (Onder et al., 2022). S tímto fenoménem se setkáváme i u BChE, kde jsou dvě frakce proteinu přítomny jak u diferenciovaných, tak i nediferenciovaných buněk U-87MG. U BChE se spodní proužek proteinu zdá být diferenciací nezměněn, nicméně horní proužek se jeví diferenciací

oslaben. Dolní proužek přitom odpovídá nedostatečně glykosylovanému monomeru BChE (Onder et al., 2022). Pro buněčnou linii U-87MG dle provedené literární rešerše nebyly doposud enzymy AChE a BChE stanovovány. Změny v expresi GFAP diferenciací u buněčné linie U-87MG nebyly zaznamenány. Toto zjištění je v korelaci s prací Liu et al., 2019 a rovněž vyvrací tvrzení Schulz, Rodgers et al., 2022, jejichž práce udává, že buňky linie U-87MG nejsou schopny exprese GFAP. Markantní nárůst exprese SYP u buněk U-87MG po diferenciaci 2mM NaB je v korelaci s výsledky Liu et al., 2019.

Dle Obr. 3. jsou buňky SH-SY5Y schopny exprese AChE i BChE jak v nediferenciovaném stavu, tak po ATRA-diferenciaci. Imunodetekce AChE u buněk SH-SY5Y v diferenciovaném i nediferenciovaném stavu se shoduje s výsledky pro buněčnou linii U-87MG. Změny v expresi po ATRA-diferenciaci patrné nejsou, u diferenciovaných buněk se však objevuje frakce nedostatečně glykosylovaného AChE, což jsou výsledky, které byly nalezeny u diferenciovaných buněk SH-SY5Y již dříve (Onder et al., 2022). V případě BChE byla po diferenciaci pomocí ATRA zaznamenána snížená exprese obou frakcí proteinu, a to zejména v případě zcela glykosylované BChE. Diferenciace ATRA vedla k nárůstu exprese GFAP u buněk SH-SY5Y, což je výsledek shodující se s literaturou, například práce Encinas et al., 2000, ve které autoři udávají nárůst GFAP po krátkodobé inkubaci s ATRA (2 dny) a poté pokles tohoto proteinu po delší době inkubace (5 dní) s ATRA. U proteinu SYP nedošlo v případě linie SH-SY5Y vlivem ATRA-diferenciace ke změně exprese. Diferenciované i nediferenciované buňky SH-SY5Y SYP exprimují, což je v souladu s Redova et al., 2010, kde ke změnám v expresi SYP došlo až po sedmidenní ATRA-diferenciaci.

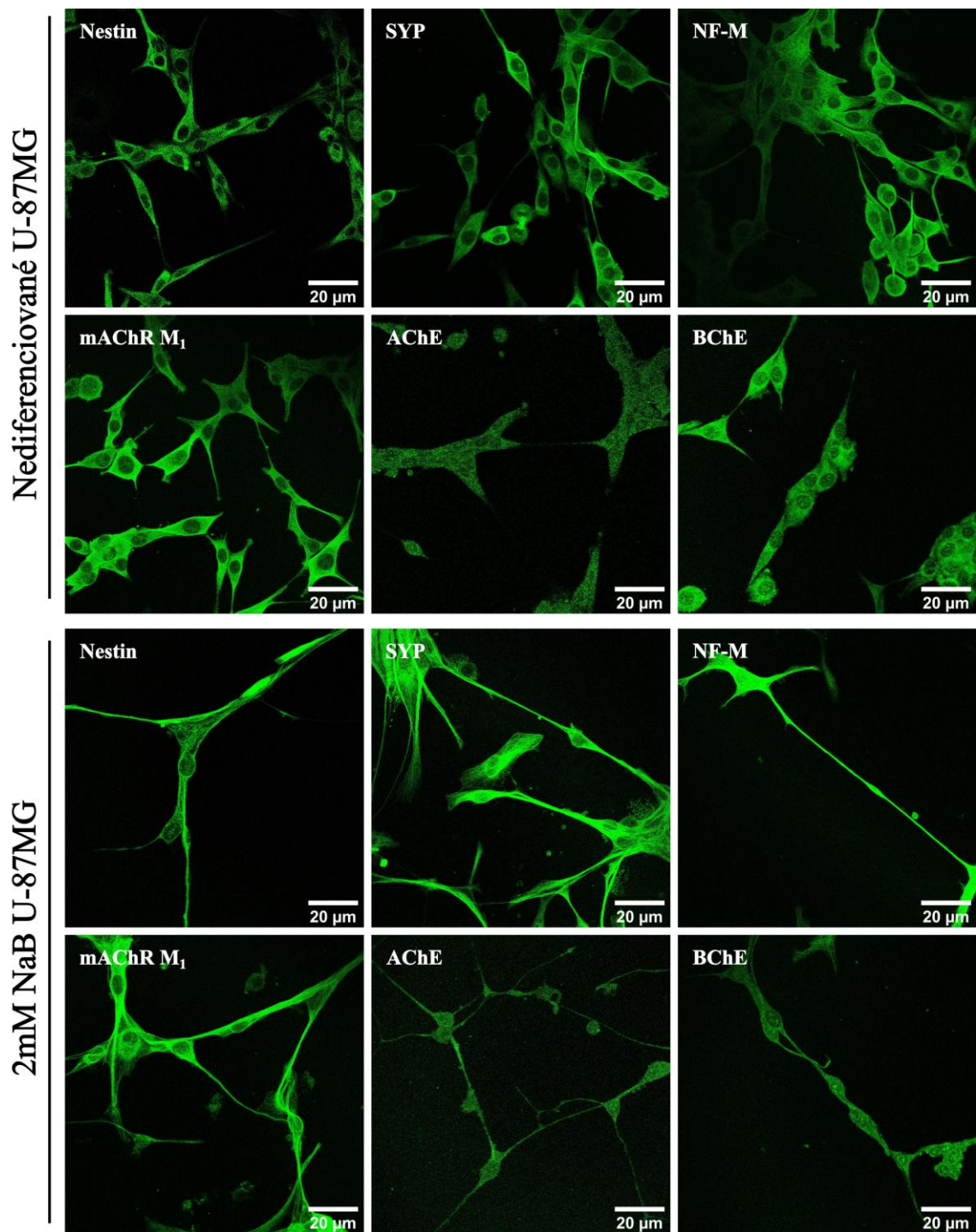
4.1.3 Imunofluorescenční analýza

Kromě analýzy western blot s následnou imunodetekcí vybraných proteinů byla pro validaci diferenciace použita také metoda imunofluorescence. Tato metoda nám umožňuje pozorovat změny v morfologii buněk, změnu exprese sledovaných proteinů jakožto zvýšení nebo snížení intenzity fluorescence a také případné změny v distribuci v rámci buněk s možností pořizování snímků. Fluorescenční mikroskopické snímky byly pořizovány pomocí konfokálního mikroskopu. Výsledné snímky jsou zachyceny na Obr. 4. až 7.



Obr. 4. Fluorescenční mikroskopické snímky nediferenciovaných buněk U-87MG a buněk U-87MG po 48h inkubaci s 2mM NaB. Snímky zachycují protein TuJ1. Snímky na levé straně byly pořízeny objektivem se zvětšením 10x, celkové zvětšení snímků 100x. Snímky vpravo byly pořízeny objektivem s imerzním olejem se zvětšením 63x, celkové zvětšení snímků 630x.

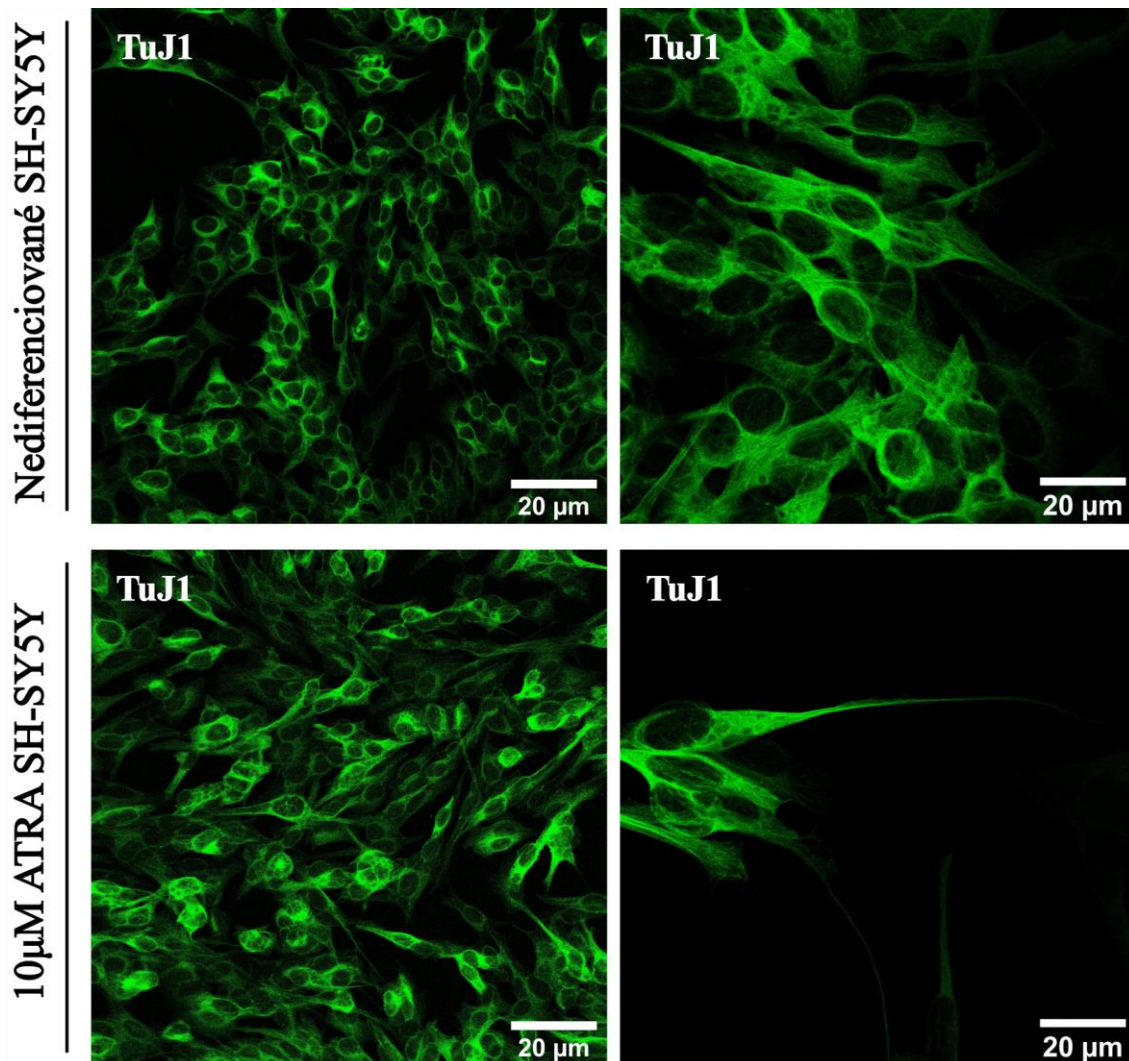
Na Obr. 4. je zobrazena imunofluorescence proteinu TuJ1. Můžeme pozorovat zvýšenou expresi tohoto proteinu po diferenciaci buněk U-87MG a také změnu morfologie buněk, která je doprovázená distribucí TuJ1 do neuritů, kdežto u nediferenciovaných buněk je TuJ1 situován zejména v okolí jader buněk. Zvýšený fluorescenční signál tohoto markeru byl zaznamenán zejména z důvodů prodloužení buněk, které bylo diferenciací indukováno. Při literární rešerši nebyly nalezeny studie porovnávající expresi či distribuci TuJ1 u nediferenciovaných U-87MG a diferenciovaných pomocí 2mM NaB.



Obr. 5. Fluorescenční mikroskopické snímky nediferenciovaných buněk U-87MG a buněk U-87MG po 48h inkubaci s 2mM NaB. Snímky zachycují proteiny nestin, SYP, NF-M, mAChR M₁, AChE a BChE. Veškeré snímky tohoto obrázku byly pořízeny objektivem s imerzním olejem se zvětšením 63x, celkové zvětšení snímků 630x.

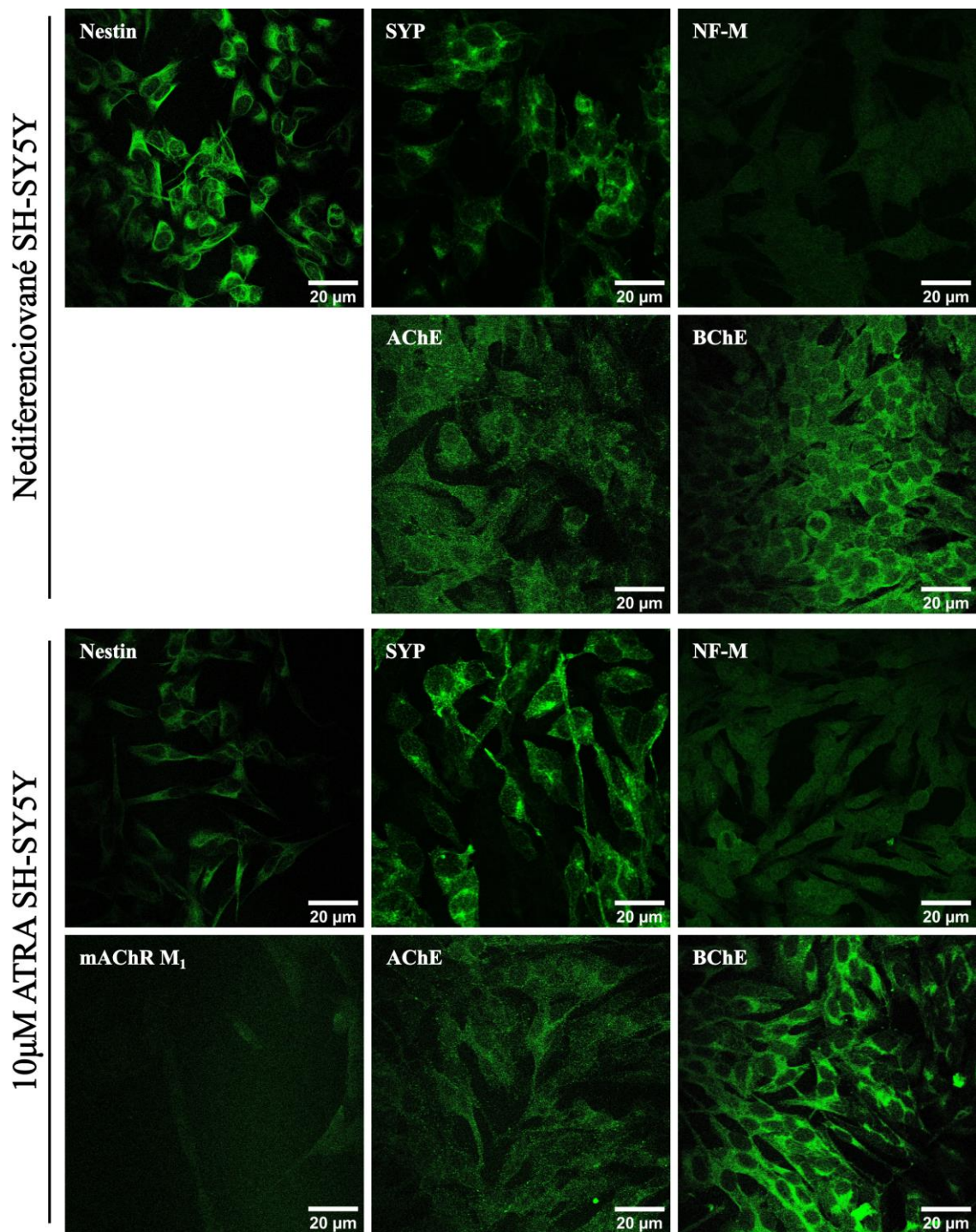
Obr. 5 zobrazuje změny ve fluorescenčním signálu zbylých stanovovaných markerů mezi nediferencovanými a 2mM NaB-diferenciovanými buňkami U-87MG. V případě nestinu ke změně signálu nedošlo. Výraznější fluorescence v horní části snímku 2mM NaB U-87MG byla pravděpodobně způsobena překryvem buněk. Při

porovnání SYP je patrné, že po diferenciaci buněk U-87MG 2mM NaB došlo ke zvýšení exprese, a především k jeho redistribuci v rámci buněk. U nediferenciovaných buněk U-87MG je možno SYP pozorovat zejména v okolí jádra, v případě diferenciovaných buněk U-87MG vidíme SYP rozmístěn po celém povrchu buňky s vyšší koncentrací v neuritech. Imunofluorescenční analýza pro SYP porovnání diferenciovaných a nediferenciovaných buněk linie U-87MG nebyla v dostupné literatuře nalezena. Nárůst exprese SYP po 2mM NaB diferenciaci se však shoduje s western blot analýzou v práci Liu, Xia et al., 2019. Další část Obr. 5. ukazuje na změny v expresi proteinu NF-M po diferenciaci pomocí NaB u buněk U-87MG. Cytoskeletální protein NF-M se po diferenciaci 2mM NaB zvýšeně exprimuje v rámci celého prostoru buňky. Nárůst exprese po diferenciaci je v korelaci s Liu, Xia et al., 2019. Dalším proteinem na Obr. 5. je mAChR M₁, vidíme nárůst exprese tohoto markeru cholinergních neuronů po NaB-diferenciaci. Podobně jako v případě SYP, imunofluorescenční analýza pro rozdíly v expresi po diferenciaci buněk U-87MG u mAChR M₁ nebyla doposud provedena. Získané výsledky jsou však v korelaci s Liu, Xia et al., 2019, kde byla zvýšená exprese po 2mM NaB diferenciaci buněk U-87MG potvrzena pomocí western blotu. Dále můžeme na Obr. 5 pozorovat, že ke změně exprese AChE po NaB-diferenciaci nedošlo. Viditelný je však pokles u BChE po NaB-diferenciaci. Porovnání změn těchto proteinů diferenciací buněk U-87MG nebyla doposud jinými autory provedena.



Obr. 6. Fluorescenční mikroskopické snímky nediferenciovaných buněk SH-SY5Y a buněk SH-SY5Y po 48h inkubaci s 10μM ATRA. Snímky zachycují protein TuJ1. Snímky na levé straně byly pořízeny objektivem se zvětšením 10x, celkové zvětšení snímků 100x. Snímky vpravo byly pořízeny objektivem s imerzním olejem se zvětšením 63x, celkové zvětšení snímků 630x.

Fluorescenční mikrofotografie Obr. 6. ukazují na změny v expresi TuJ1 po diferenciaci buněk SH-SY5Y 10μM ATRA. Kromě zvýšené exprese tohoto proteinu lze pomocí tohoto proteinu pozorovat změny v morfologii a nárůst neuritů. Pozorované změny se shodují s dřívějšími imunofluorescenčními analýzami (Castelli et al., 2020).



Obr. 7. Fluorescenční mikroskopické snímky nediferenciovaných buněk SH-SY5Y a buněk SH-SY5Y po 48h inkubaci s 10 μM ATRA. Snímky zachycují proteiny nestin, SYP, NF-M, mAChR M₁, AChE a BChE. Veškeré snímky tohoto obrázku byly pořízeny objektivem s imerzním olejem se zvětšením 63x, celkové zvětšení snímků 630x.

Na fluorescenčních mikrosnímčích Obr. 7. je jasný pokles fluorescence nestinu u diferenciovaných SH-SY5Y oproti nediferenciované kontrole, což byl na základě literární rešerše očekávaný výsledek. Dvoudenní diferenciace SH-SY5Y ATRA, totiž vede k poklesu exprese nestinu (Ferguson, Subramanian et al., 2016). Pozorovatelný je

rovněž rozdíl mezi nediferenciovanými a diferenciovanými buňkami SH-SY5Y v rámci proteinu SYP. Kromě zvýšené exprese tohoto proteinu je dobře patrná také redistribuce SYP. U kontrolních nediferenciovaných buněk jsou patrné shluky SYP v okolí jádra. Po ATRA diferenciaci má SYP stále tendenci vytvářet shluky, ale již v rámci celé plochy buněk. Tento nálezn je v korelaci s Cheung, Lau et al., 2009, kde byl nalezen stejný výsledek. Významné zvýšení exprese je možné pozorovat po ATRA-diferenciaci SH-SY5Y také v rámci proteinu NF-M. Ačkoliv v práci Cheung, Lau et al., 2009 nebyly pomocí imunofluorescenční analýzy a western blot analýzy viditelné změny v expresi NF-M po ATRA diferenciaci, jiní autoři Silvis et al., 2016 při western blot analýze nárůst po diferenciaci potvrdili. Na Obr. 7. je také znázorněn zachycený fluorescenční signál mAChR M₁ u diferenciovaných buněk SH-SY5Y. Snímek nediferenciovaných SH-SY5Y není uveden, neboť fluorescenční signál zde byl téměř nulový. Z těchto výsledků je tedy zřejmé, že ATRA-diferenciace u SH-SY5Y iniciuje zvýšenou expresi mAChR M₁. V dostupné literatuře se nepodařilo najít porovnání exprese mAChR M₁ mezi nediferenciovanými a ATRA-diferenciovanými SH-SY5Y, nicméně dle dostupných zdrojů jsou obě formy SH-SY5Y schopny mAChR M₁ exprimovat (Naznin, Waise et al., 2022, Züchner et al., 2004). V případě AChE, nedošlo k rozdílu v expresi ani v distribuci. U enzymu BChE, došlo po ATRA-diferenciaci k nárůstu exprese. Ačkoliv se v dostupné literatuře nepodařilo nalézt porovnání exprese těchto enzymů mezi nediferenciovanými a ATRA-diferenciovanými SH-SY5Y, víme, že obě formy, diferenciované i nediferenciované, exprimují tyto enzymy (Biedler et al., 1978; Onder et al., 2022; Sun, Chen et al., 2017).

V rámci validace diferenciaci na cholinergní fenotyp, byla pozorována změna morfologie buněk mezi kontrolními nediferenciovanými buňkami U-87MG a buňkami téže linie po 48h inkubaci s 2mM NaB, viz Obr. 2. Byl pozorován masivní nárůst neuritů a výrazné zpomalení buněčné proliferace. Výsledky odpovídaly očekáváním na základě Liu, Xia et al., 2019. Dále byla provedena western blot analýza, Obr. 3., s následnou imunodetekcí vybraných proteinů. Z ne zcela jasných důvodů se při ní nepodařilo detekovat proteiny NF-M a mAChR M₁. Oba tyto proteiny se následně podařilo stanovit pomocí imunofluorescenční analýzy, proto nebyly opakovaně stanovovány pomocí western blotu s odlišným postupem. Změny v expresi po diferenciaci U-87MG při analýze western blot byla zaznamenána u SYP. Následné imunofluorescenční analýzy umožnily detekovat u linie U-87MG veškeré stanovované proteiny. Zvýšení exprese po diferenciaci buněk U-87MG bylo zaznamenáno u TuJ1,

SYP, NF-M a mAChR M₁. Beze změny zůstaly nestin a AChE a snížení bylo zjištěno u BChE. Současně s porovnáváním nediferenciovaných a diferenciovaných buněk U-87MG byla prováděny totožné experimenty s buněčnou linií SH-SY5Y, která byla diferenciovaná pomocí 10μM ATRA. Nediferenciované i diferenciované buňky linie SH-SY5Y jsou dobře zavedeným a charakterizovaným modelem neuronálních buněk a soužil jako pozitivní kontrola. Při pozorování morfologie byl po ATRA-diferenciaci zaznamenán nárůst neuritů, elongace buněk a výrazné zpomalení proliferace. V rámci western blot analýzy byla změna v expresi zaznamenána pro BChE, konkrétně pokles po diferenciaci a nárůst po diferenciaci pro GFAP. Imunofluorescenční analýza buněk SH-SY5Y přinesla následující výsledky. Proteiny TuJ1, SYP, NF-M, mAChR M₁ a BChE byly po ATRA-diferenciaci zvýšeny, a naopak ke snížení došlo u nestinu a AChE.

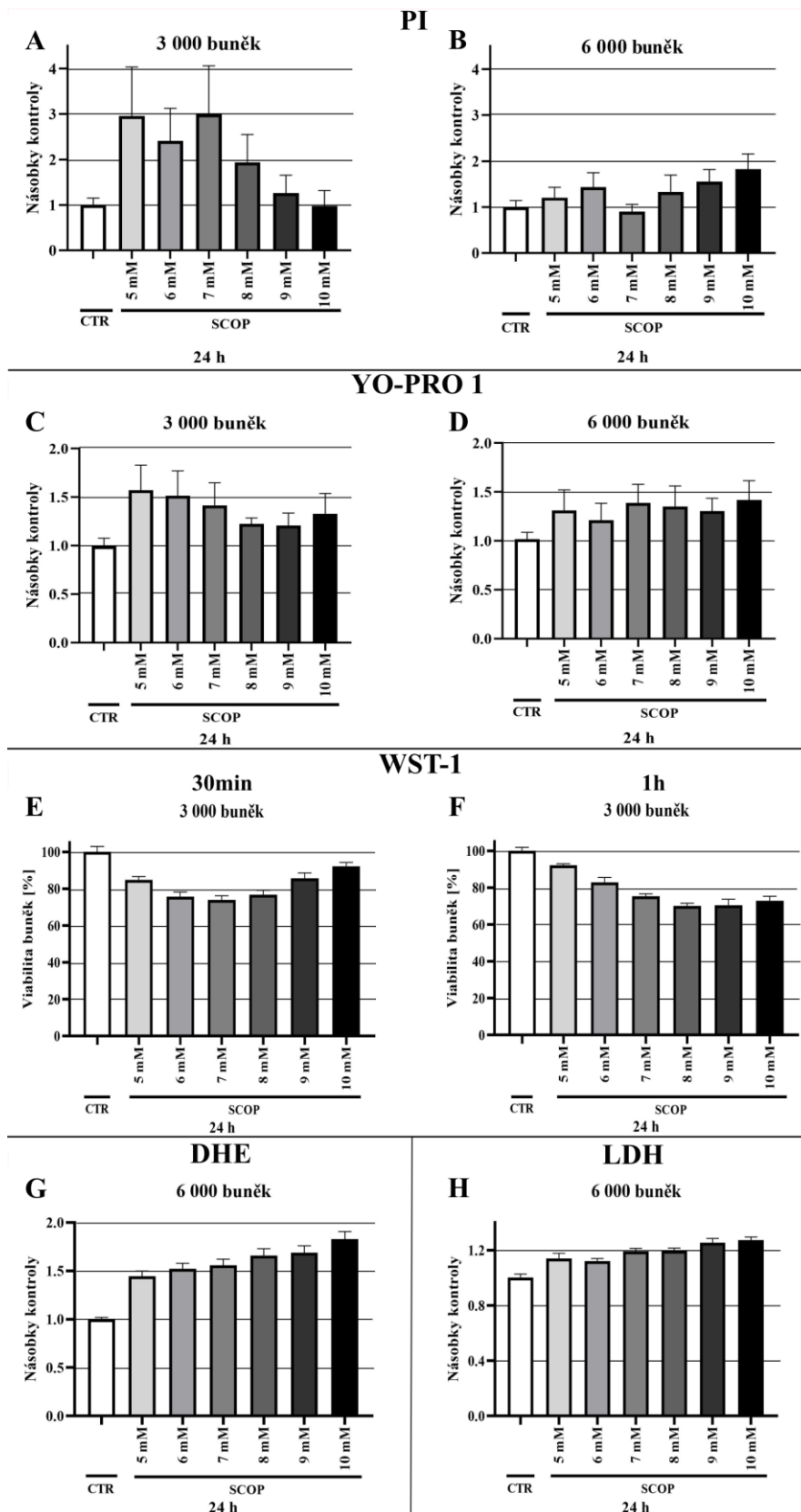
Porovnáme-li výsledky validace diferenciací obou použitých linií, můžeme tvrdit, že obě použité linie se po použití daných diferenciacích činidel diferencují na neuronální buňky. Pro diferenciaci na cholinergní fenotyp buněk U-87MG po diferenciaci NaB svědčí zejména nárůst exprese mAChR M₁. I když jsou buňky SH-SY5Y schopny exprese těchto receptorů, buněčná linie U-87MG v diferenciovaném i nediferenciovaném stavu má na základě snímků z konfokálního mikroskopu při imunofluorescenční analýze zřetelně vyšší expresi. Obdobná situace byla pozorována také pro AChE. Naopak větší expresi BChE má dle výsledků imunofluorescenční analýzy této práce buněčná linie SH-SY5Y.

4.2 Optimalizace modelu skopolaminem indukované toxicity na modelu cholinergních neuronů

4.2.1 Optimalizace násady

Hlavním cílem této práce byla optimalizace modelu cholinergních neuronů za použití buněčné linie U-87MG diferenciované pomocí NaB a poškozením indukovaným SCOP pro testování potenciálních neuroprotektivních látek. Pro tyto účely bylo zapotřebí nejprve optimalizovat násadu buněk pro testování na 96jamkových mikrotitračních deskách. Na základě zkušeností se zavedeným buněčným modelem SH-SY5Y a porovnání velikosti s buňkami U-87MG (viz Obr. 2.) byly navrženy dvě konfluence (3 000 a 6 000 buněk/jamku) buněk U-87MG, které byly následně použity pro analýzy stanovování buněčné smrti (PI, YO-PRO 1 a LDH), buněčné viability (WST-1) a OS (DHE). Po násadě buněk a 48h diferenciaci pomocí 4mM NaB (při prvotních

experimentech byla využívána koncentrace 4mM NaB, která byla poté změněna na 2mM NaB viz dále) byly buňky ošetřeny roztoky 5–10mM SCOP a ponechány na 24h inkubaci s tímto toxinem. Poté byla buněčná smrt, viabilita a OS měřena a výsledky zpracovány do podoby grafů, viz Obr. 8.



Obr. 8. Porovnání násad buněk U-87MG diferenciovanych 4mM NaB po 24h inkubaci se SCOP v koncentracích 5–10 mM měrené pomocí různých metod. Grafy pro PI, YO-PRO 1, DHE a LDH jsou vyjádřeny jako násobky DMSO kontroly, která byla stanovena na hodnotu 1. Grafy pro WST-1 jako procenta viabilních buněk vztažených k DMSO kontrole, která činí 100 %. Veškeré grafy jsou vyjádřeny jako průměry ± standardní chyba průměru (SEM) z minimálně dvou na sobě nezávislých experimentů provedenými v triplicátech.

Na Obr. 8. můžeme porovnat vliv konfluence násady buněk U-87MG na analýzy buněčné smrti, viability a OS. Na Obr. 8A a 8B jsou k dispozici grafy porovnávající násobky kontroly buněčné smrti stanovované pomocí PI. Z těchto grafů můžeme usoudit, že pro stanovování buněčné smrti pomocí PI je vhodnější násada o konfluenci 6 000 buněk/jamku, neboť s rostoucí koncentrací toxinu, roste i detekovaná buněčná smrt. Na Obr. 8C a 8D můžeme porovnat obdobnou situaci, tentokrát pro stanovení buněčné smrti pomocí YO-PRO 1. I v tomto případě se pro tento typ měření zdá být optimálnější použití násady 6 000 buněk/jamku, při níž je nárůst buněčné smrti spolu s narůstající koncentrací SCOP rovnoměrnější. Dále byla stanovována viabilita buněk pomocí WST-1. Pro tuto analýzu byla volena nižší konfluence násady, 3 000 buněk/jamku, neboť při použití na buněčné linii SH-SY5Y je užívána rovněž nižší konfluence násady (7 000 buněk/jamku) proti konfluenci při měření PI, LDH nebo YO-PRO 1 (20 000 buněk/jamku). Dle Obr. 8E-F můžeme usoudit, že konfluence 3 000 buněk/jamku je pro toto měření dostatečná. Na základě klesající viability buněk s přibývajícím koncentrací SCOP je možné se dále domnívat, že se jako optimálnější pro analýzu WST-1 po 24h inkubaci se SCOP jeví měření po 1 h od aplikace WST-1. Obr. 8G je věnován analýze OS pomocí DHE. Zde byla zvolena konfluence násady 6 000 buněk/jamku, která se také dle uvedeného grafu jeví jako vhodná. Na sloupcovém grafu můžeme pozorovat postupný nárůst násobků kontroly spolu s narůstající koncentrací SCOP. Podobný trend poté zobrazuje Obr. 8H, na kterém je možno pozorovat nárůst buněčné smrti v závislosti na růstu koncentrace SCOP pomocí analýzy LDH.

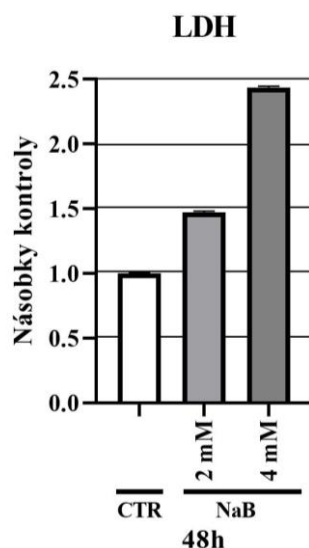
Na základě výsledků zobrazených na Obr. 8. byla pro analýzy stanovované pomocí PI, YO-PRO 1, DHE a LDH volena konfluence násady 6 000 buněk/jamku a pro WST-1 3 000 buněk/jamku.

Vyšší konfluence než 6 000 buněk/jamku nebyla aplikována, neboť při vyšších konfluencích buněk se v jamkách hojně vytvářely sféroidy, které znemožňují získání konzistentních výsledků. Vliv vytváření shluků buněk je patrný i na grafech analýzy PI na Obr. 8A-B.

4.2.2 Optimalizace koncentrace diferenciacního činidla

Při mikroskopickém pozorování buněk před a po diferenciaci buněk U-87MG pomocí 4mM NaB byly zaznamenávány poškozené buňky a také buňky, které byly zcela smrštené a uvolněné od povrchu kultivační nádoby, tedy mrtvé. Byla tedy vyslovena

hypotéza, zde koncentrace diferenciačního činidla není nadměrně cytotoxická. Na základě Liu, Xia et al., 2019 byla koncentrace NaB snížena na 2 mM a následně porovnána s předchozí koncentrací 4mM NaB stanovením buněčné smrti pomocí LDH.



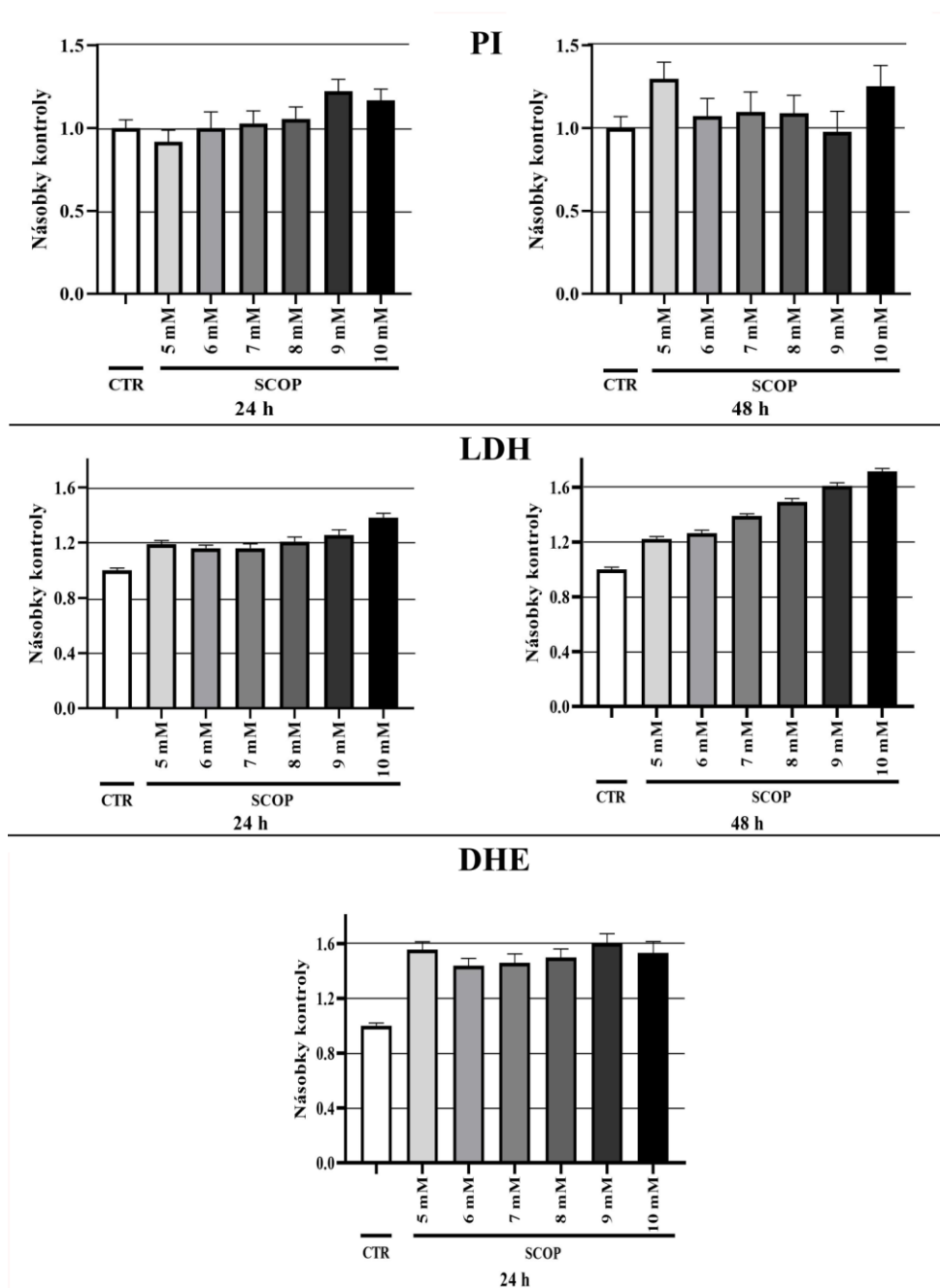
Obr. 9. Stanovení buněčné smrti buněk U-87MG pomocí LDH po 48h inkubaci s 2mM a 4mM NaB. Výsledky jsou vyjádřeny jako násobky nediferenciované kontroly, která byla stanovena na hodnotu 1. Graf znázorňuje průměrné hodnoty \pm standardní chyba průměru (SEM) ze dvou na sobě nezávislých experimentů provedených v hexaplikátu.

Koncentrace 4mM NaB je dle zvýšení hodnot na Obr. 9. nadměrně cytotoxická, neboť dosahuje téměř 2,5násobku signálu kontroly buněčné smrti oproti 2mM NaB, který vedl k 50% nárůstu signálu oproti kontrole. Při pozorování morfologie navíc byla zachována změna morfologie po diferenciaci 2mM NaB (viz Obr. 2.), poškození bylo eliminováno a množství uhynulých buněk razantně sníženo. Dále byla proto používána koncentrace 2mM NaB pro diferenciaci buněk U-87MG. Při validaci diferenciaci na cholinergní fenotyp (předchozí kapitola) byla koncentrace 2mM NaB pro diferenciaci používána od samotného počátku, neboť prvotní experimenty optimalizací buněčného modelu cholinergních neuronů odvozených od buněčné line U-87MG byly prováděny ještě před zahájením validace diferenciaci.

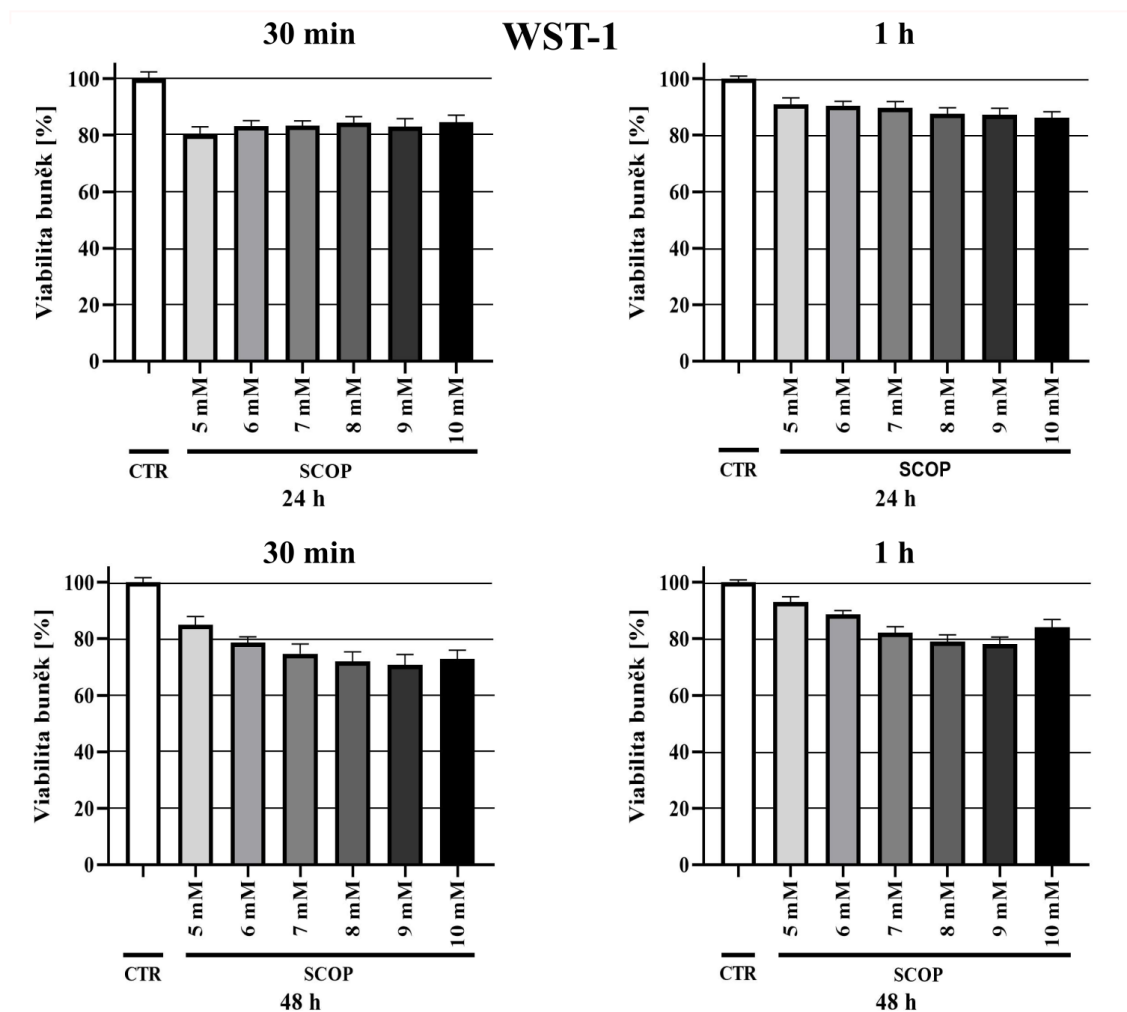
4.2.3 Optimalizace koncentrace použitého toxinu

Dle výsledků optimalizací konfluency násady a koncentrace diferenciačního činidla bylo přistoupeno k sérii experimentů, které si kladly za cíl nalézt vhodnou koncentraci SCOP pro následné testování neuroprotektivní aktivity vybraných látek a zároveň vybrat vhodnou detekční metodu pro následující experimenty. Buňky diferenciované pomocí 2mM NaB byly 24 a 48 h inkubovány se SCOP o koncentracích 5–10 mM a následně byla stanovována buněčná smrt (pomocí PI a LDH) buněčná viabilita (pomocí

WST-1) a OS (pomocí DHE). Výsledky shrnuje Obr. 10. a 11. Na základě těchto výsledků byla poté vybrána trojice koncentrací SCOP (9, 8 a 7 mM pro buňky linie U-87MG, 10, 5 a 2,5 mM pro buňky linie SH-SY5Y), se kterými byla stanovována buněčná smrt pomocí PI (a LDH pro SH-SY5Y) za současné aplikace inhibitoru AChE a BChE GALAN.



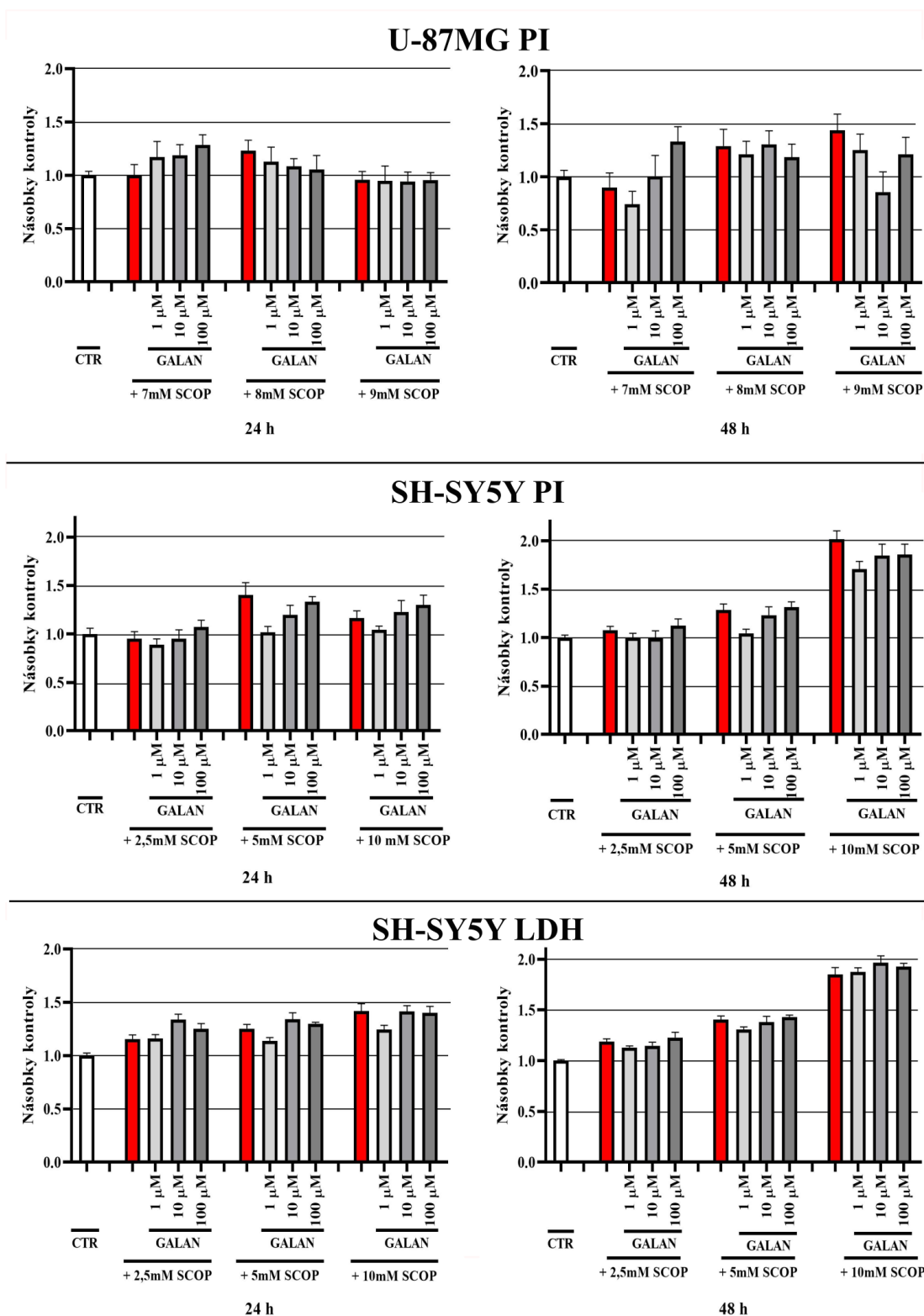
Obr. 10. Stanovení buněčné smrti a OS po 24 a 48h inkubaci se SCOP v koncentracích 5–10 mM. Výsledky jsou uvedeny jako násobky DMSO kontroly, která byla stanovena na hodnotu 1. Grafy jsou uvedeny jako průměry ± standardní chyba průměru (SEM) z minimálně dvou na sobě nezávislých experimentů provedených v triplicátech.



Obr. 11. Stanovení viability buněk U-87MG pomocí WST-1 po 24 a 48h inkubaci se SCOP o koncentracích 5–10 mM. Hodnoty jsou vztaženy k DMSO kontrole (100 %) a uvedeny jako průměry ± standardní chyba průměru (SEM) z minimálně dvou na sobě nezávislých experimentů provedených v triplicátech.

Z Obr. 10. a 11. bylo usouzeno, že metoda stanovení buněčné smrti pomocí PI není pro buněčnou linii U-87MG diferenciovanou pomocí 2mM NaB tou nejvhodnější. Stanovení buněčné smrti pomocí LDH po 48h inkubaci se SCOP se na základě Obr. 10. zdá být vhodnější. Stejných výsledků jako při stanovení buněčné smrti bylo dosaženo při stanovení viability buněk pomocí WST-1 po 48h inkubaci se SCOP a po 30 min měření po aplikaci WST-1. Jelikož je metoda stanovení buněčné smrti pomocí PI snadná, časově a finančně nenáročná, bylo k ní přistoupeno také pro prvotní měření potenciální aktivity látek, konkrétně pro GALAN. Tato látka byla testována v koncentracích 1, 10 a 100 μ M spolu se SCOP, který byl použit v koncentracích 7, 8 a 9 mM. Kromě buněčné line U-87MG byl experiment proveden také na linii SH-SY5Y, kde byly vybrány koncentrace 2,5; 5 a 10mM SCOP. Protože pro linii SH-SY5Y nebyly

provedeny experimenty s LDH, WST-1 a DHE, byly tyto tři koncentrace SCOP spolu s GALAN testovány také pomocí PI a LDH.

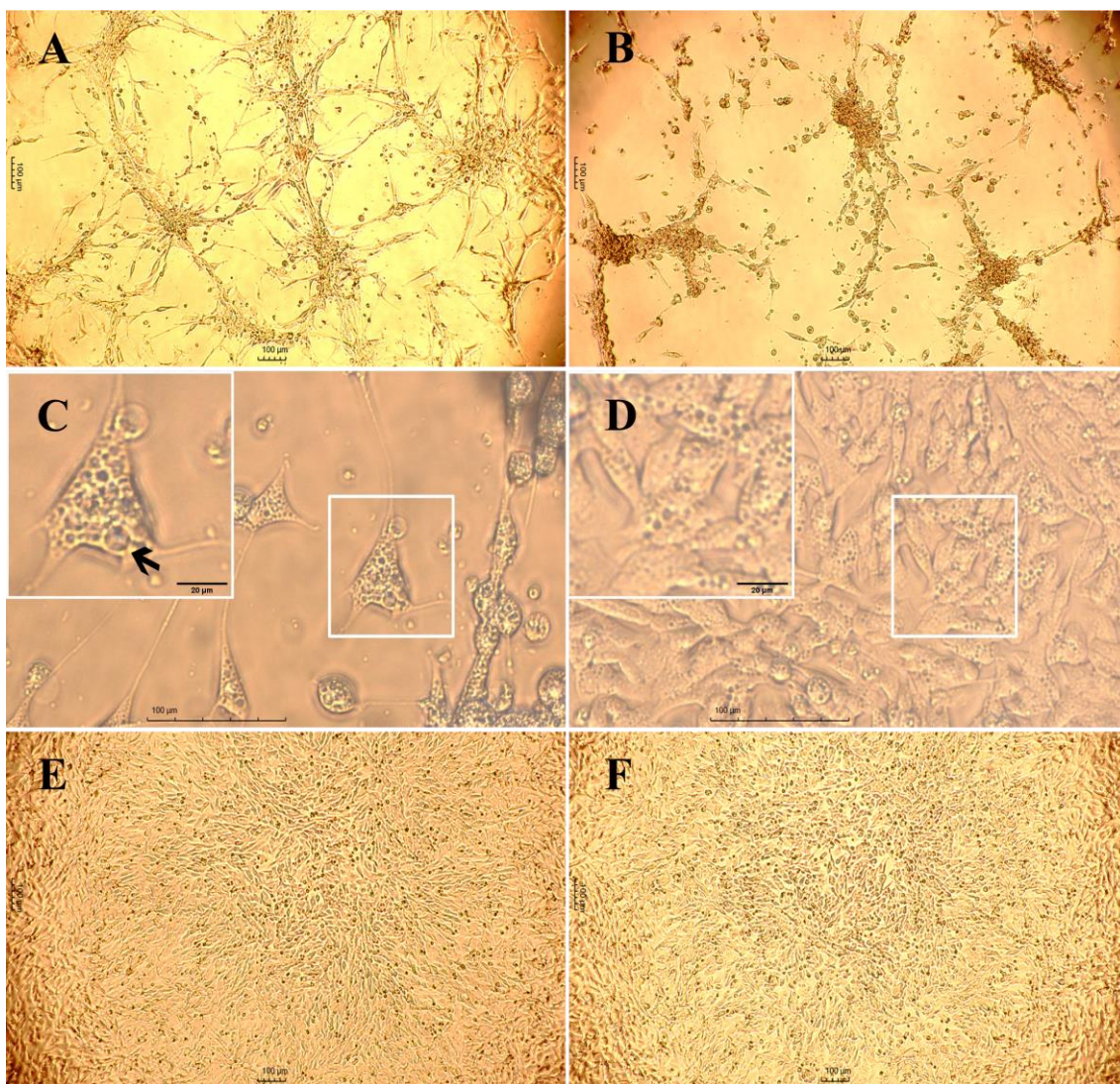


Obr. 12. Stanovení buněčné smrti buněk linie U-87MG a SH-SY5Y pomocí PI a LDH po 24 a 48h inkubaci se SCOP o koncentracích 7, 8 a 9 mM pro U-87MG a 2,5; 5 a 10 mM pro SH-SY5Y. Výsledky jsou uvedeny jako násobky DMSO kontroly, která byla stanovena na hodnotu 1. Grafy jsou uvedeny jako průměry ± standardní chyba průměru (SEM) z minimálně dvou na sobě nezávislých experimentů provedenými v triplicátech.

Na základě výsledků, které zobrazují grafy na Obr. 11. a 12. byla pro následné experimenty vybrána koncentrace 8mM SCOP pro buněčnou linii U-87MG a 5mM SCOP pro linii SH-SY5Y. Při použití této koncentrace byly naměřeny dostatečné hodnoty buněčné smrti oproti DMSO kontrole, GALAN při nich snižoval signál buněčné smrti a hodnoty nebyly od sebe příliš vzdálené. Dále byla na základě těchto výsledku pro další experimenty snížena koncentrace GALAN, neboť dle výše uvedených grafů se vyšší použité koncentrace GALAN zdají být cytotoxické a snižování buněčné smrti bylo zaznamenáno zejména při nejnižší koncentraci 1μM GALAN. Například na grafu stanovení buněčné smrti pomocí PI pro U-87MG po 48h inkubaci s 8mM SCOP. Celkově se použité koncentrace GALAN ukázaly jako více cytotoxické pro buňky SH-SY5Y, u kterých v mnoha případech zvyšovaly signál buněčné smrti až nad hodnoty SCOP. Tento efekt byl u U-87MG pozorován pouze v případě použití 7mM SCOP.

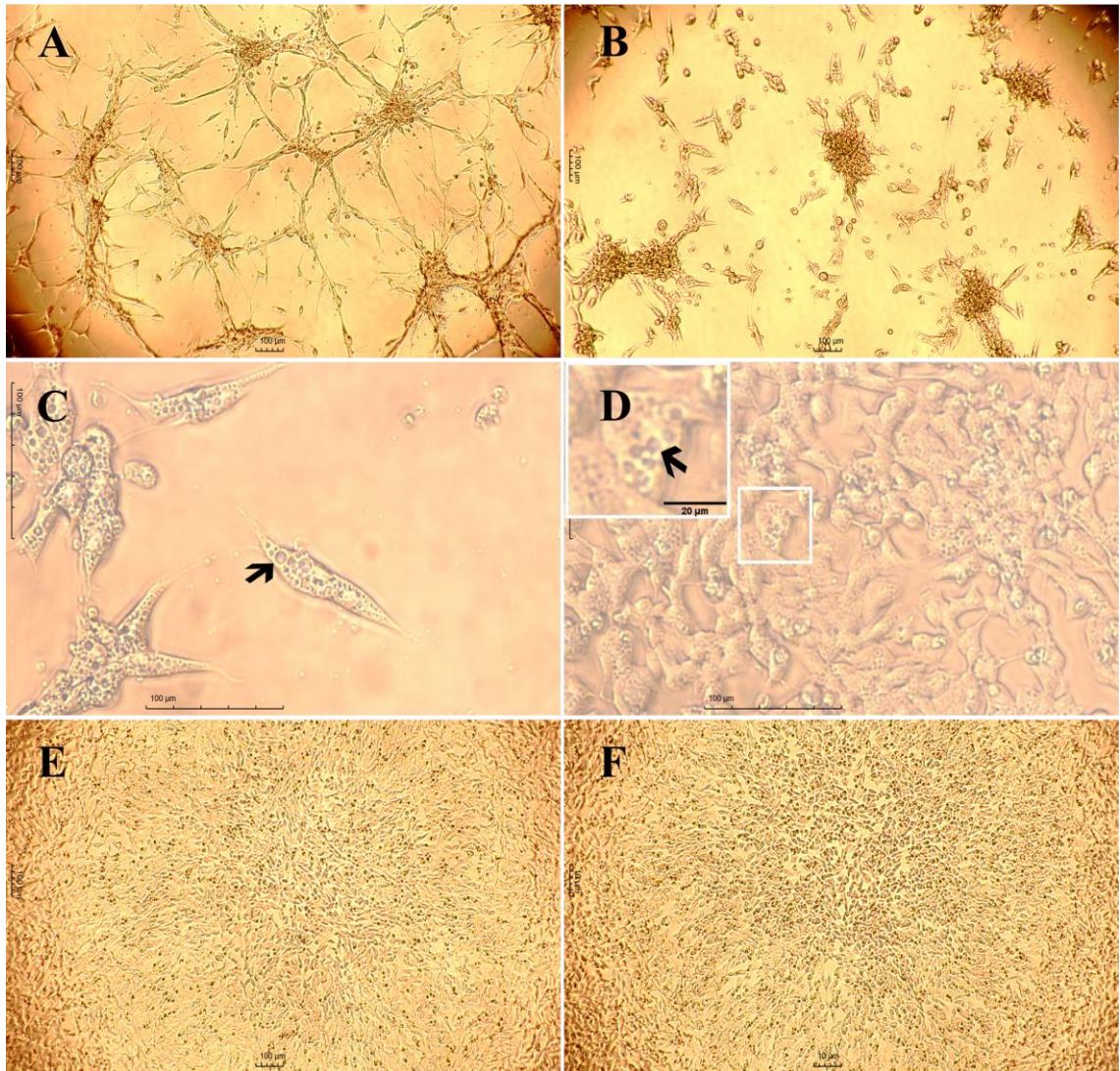
4.3 Nalezení mechanismu buněčné smrti indukované skopolaminem

Na podkladě získaných výsledků, viz výše, bylo při použití 8mM SCOP dosaženo přibližně 76% viability buněk U-87MG. Současně však bylo pozorováno značné poškození buněk U-87MG po aplikaci SCOP.



Obr. 13. Porovnání morfologie kontrolních buněk a buněk ošetřených 24 h SCOP linie U-87MG a SH-SY5Y. Snímek A: kontrolní skupina U-87MG, snímky B a C: U-87MG po 24h inkubaci s 8mM SCOP, snímek E: kontrolní skupina SH-SY5Y, snímky D a F: SH-SY5Y po 24h inkubaci s 5mM SCOP. Snímky A,B, E a F byly pořízeny objektivem 4 s celkovým zvětšením 40x. Snímky C a D byly pořízeny objektivem 20 s celkovým zvětšením 200x.

Jak je možno vidět na Obr. 13A-B, 24h inkubace buněk U-87MG s 8mM SCOP vedla k razantní změně morfologie buněk v podobě ztráty neuritů a smrštění buněk. Při detailnějším pozorování byl zaznamenán vznik útvarů připomínajících drobné kruhové otvory v buňce, viz Obr. 13C. V případě buněk SH-SY5Y, Obr. 13D, se tyto útvary rovněž vytvářely, ale s nižší četností. Také porovnání mezi kontrolními buňkami SH-SY5Y a buňkami ošetřených po dobu 24 h 5mM SCOP je znatelné nižší poškození, viz Obr. 13E-F.

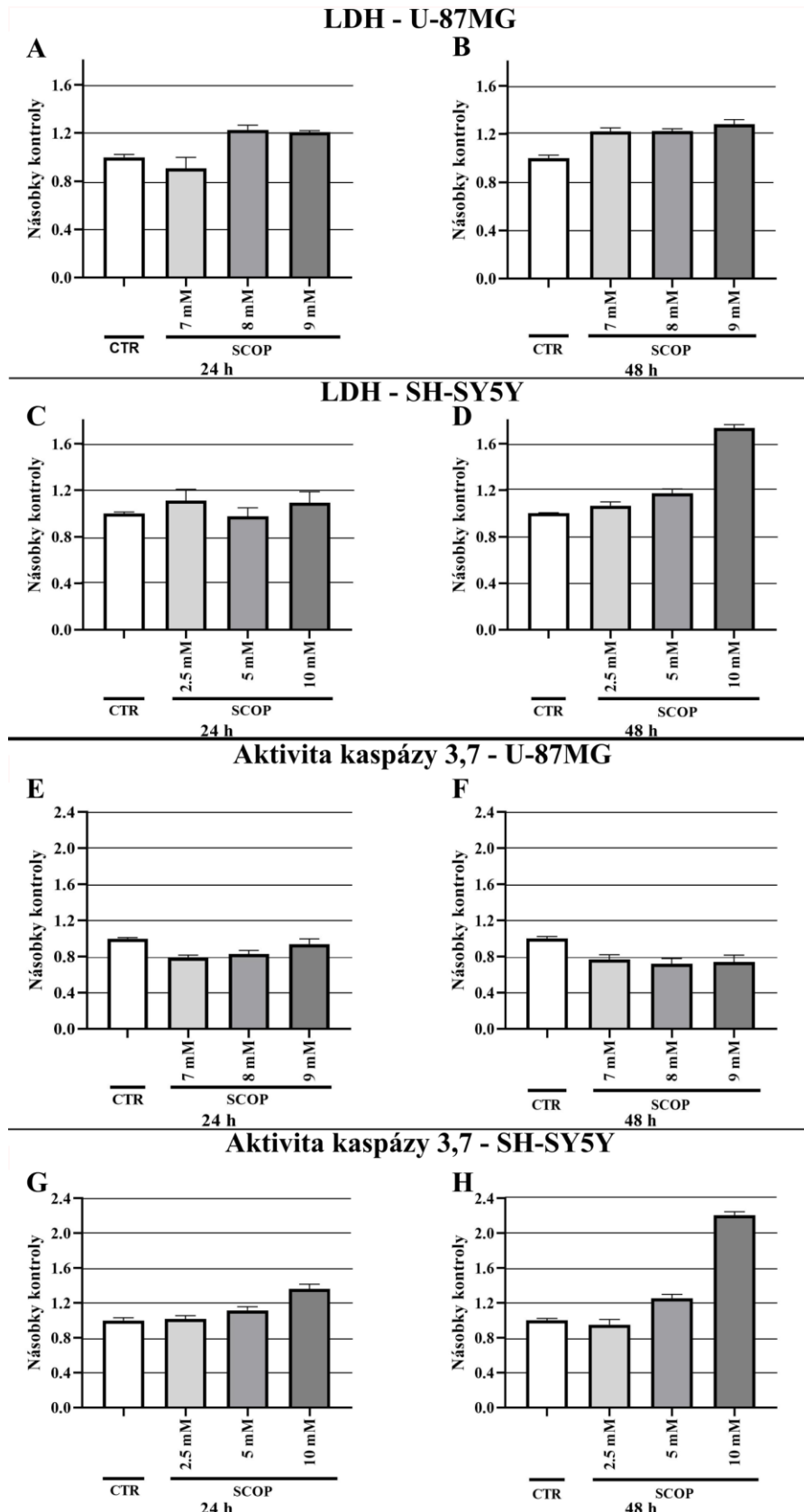


Obr. 14. Porovnání morfologie kontrolních buněk a buněk ošetřených 48 h SCOP linie U-87MG a SH-SY5Y. Snímek A: kontrolní skupina U-87MG, snímky B a C: U-87MG po 48h inkubaci s 8mM SCOP, snímek E: kontrolní skupina SH-SY5Y, snímky D a F: SH-SY5Y po 48h inkubaci s 5mM SCOP. Snímky A,B, E a F byly pořízeny objektivem 4 s celkovým zvětšením 40x. Snímky C a D byly pořízeny objektivem 20 s celkovým zvětšením 200x.

Po 48h inkubaci buněk U-87MG s 8mM SCOP můžeme pozorovat obdobné poškození, jako po 24h inkubaci, nicméně se poškození zdá být větší. Na Obr. 14B vidíme buňky ošetřené 48 h 8mM SCOP, který způsobil ztrátu neuritů, smrštění buněk a znatelné shloučení buněk k sobě. Na Obr. 14C je poté opět možno blíže pozorovat poškození způsobené SCOP charakteristické vznikem kruhových otvorů v buňkách a v porovnání s Obr. 13C je patrné, že se otvory u poškozených buněk nacházejí ve větší míře. U buněk SH-SY5Y může pozorovat rovněž nárůst vzniku otvorů a větší poškození po 48h inkubaci s 5mM SCOP než jaké bylo pozorováno po 24 h.

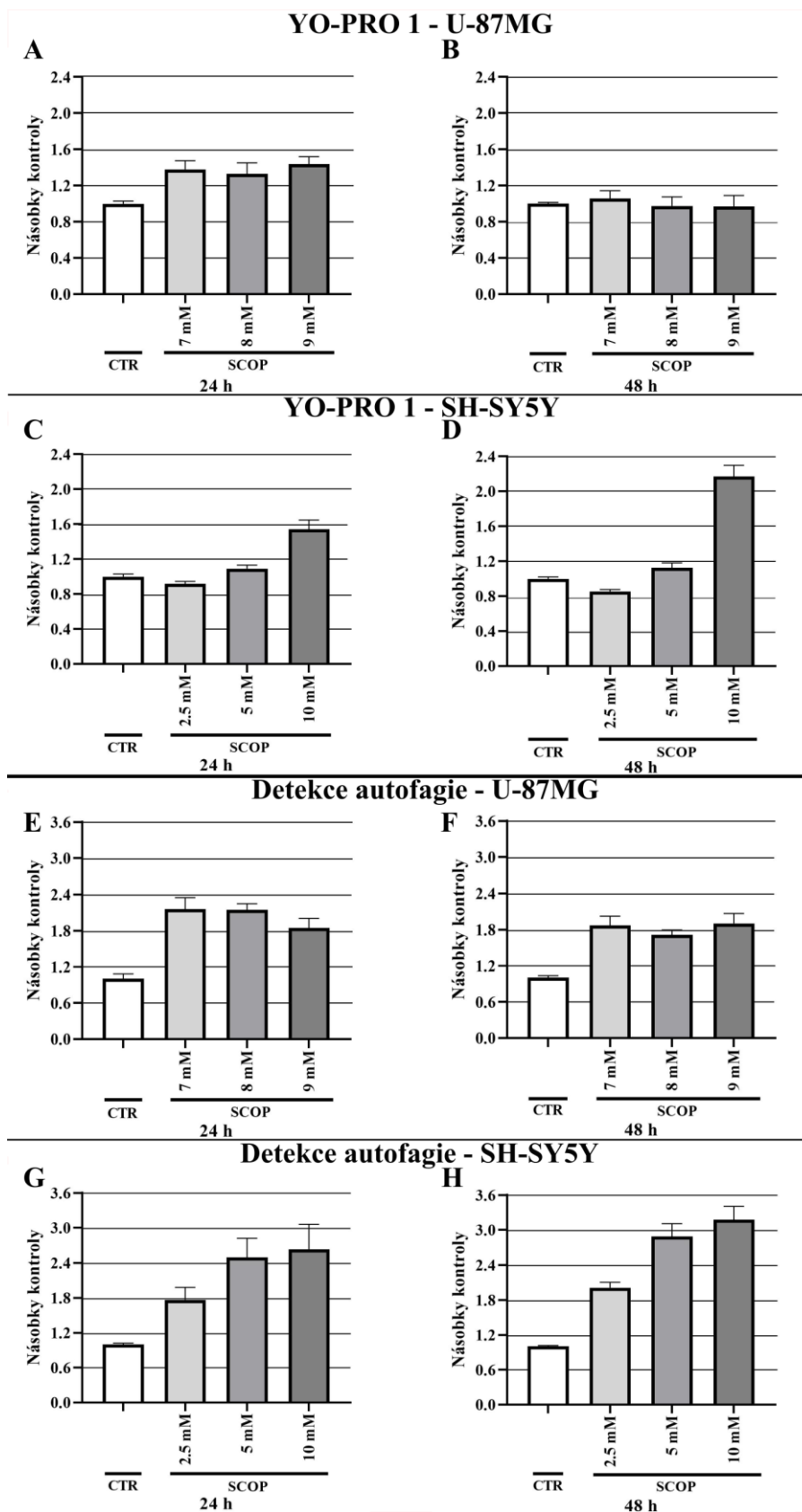
Na základě výše popsaných změn morfologie bychom předpokládali vyšší úbytky viabilních buněk, které se ovšem při dosavadních experimentech neprokázaly.

V dostupné literatuře se nepodařilo nalézt studii, která by SCOP použila k ošetření buněk U-87MG, a proto nebylo možné porovnat výsledky této práce s jinými autory. Proto byla navržena další série experimentů, která měla odhalit mechanismus buněčné smrti indukované SCOP. Pro porovnání byly experimenty prováděny na buněčné linii U-87MG diferenciované 2mM NaB a linii SH-SY5Y diferenciované 10 μ M ATRA. Při experimentech byla používána trojice koncentrací SCOP. Pro linii U-87MG 7, 8 a 9mM, pro linii SH-SY5Y 2,5; 5 a 10mM. Samozřejmostí byla u všech experimentů přítomnost 0,1% DMSO kontroly. Stanovení buněčné smrti probíhalo po 24 a 48 h inkubace s toxinem pomocí PI, YO-PRO 1 a LDH. Dále bylo prováděno měření tvorby superoxidových radikálů pomocí DHE a také měření autofagie a aktivity kaspázy 3 a 7.



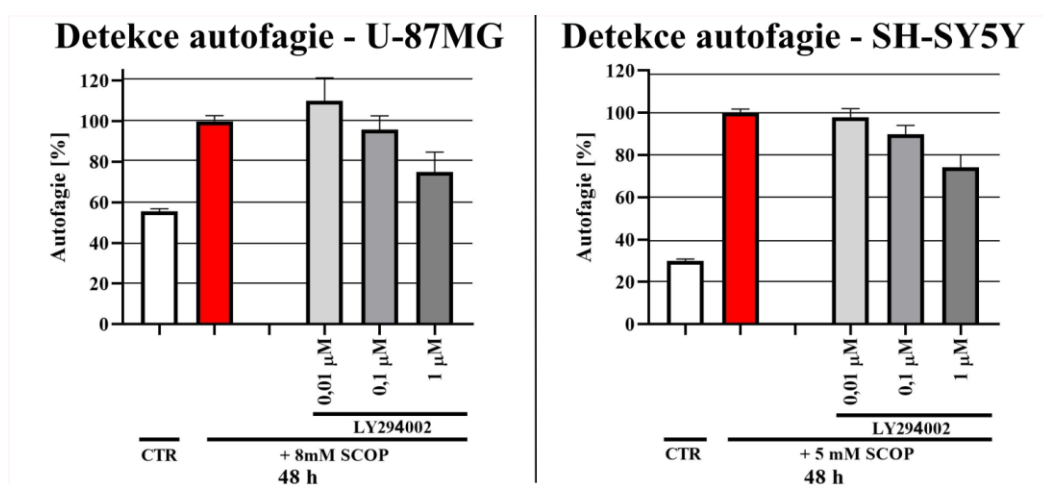
Obr. 15. Srovnání stanovení buněčné smrti pomocí LDH a aktivity kaspázy 3 a 7 u buněčné linie U-87MG a SH-SY5Y. Buňky obou linií byly inkubovány 24 a 48 h se třemi koncentracemi SCOP. Výsledky jsou uvedeny jako násobky DMSO kontroly, která byla stanovena na hodnotu 1. Grafy jsou uvedeny jako průměry \pm standardní chyba průměru (SEM) ze dvou na sobě nezávislých experimentů provedených v triplicátech.

Na Obr. 15. vidíme výsledky stanovení buněčné smrti pomocí LDH a dále stanovení aktivity kaspázy 3 a 7 na obou buněčných liniích. Z grafů pro stanovení buněčné smrti pomocí LDH (Obr. 15A-B) vyplývá, že nárůst smrti buněk linie U-87MG po ošetření SCOP byl jen mírný a mezi 24 a 48 h inkubací s toxinem v nejvyšších koncentracích se příliš neliší. U buněk linie SH-SY5Y (Obr. 15C-D) bylo zejména po 48h inkubaci se SCOP dosaženo zvýšení. Při pohledu na grafy znázorňující aktivitu kaspáz 3 a 7 je jasně viditelné, že k jejich aktivaci v případě linie U-87MG nedochází (Obr. 15E-F), kdežto u linie SH-SY5Y (Obr. 15G-H) ano. Kaspázy jsou aktivovány v případě apoptotické buněčné smrti a jsou jejím jasným ukazatelem. Již v předchozích studiích byla aktivita kaspáz na buňkách SH-SY5Y po aplikaci SCOP potvrzena. Zároveň zjištěné snížení viability buněk bylo ovšem větší. Autoři totiž používali buňky SH-SY5Y nediferenciované, a tudíž více citlivé k toxinům (Suthprasertporn, Mingchinda et al., 2020).



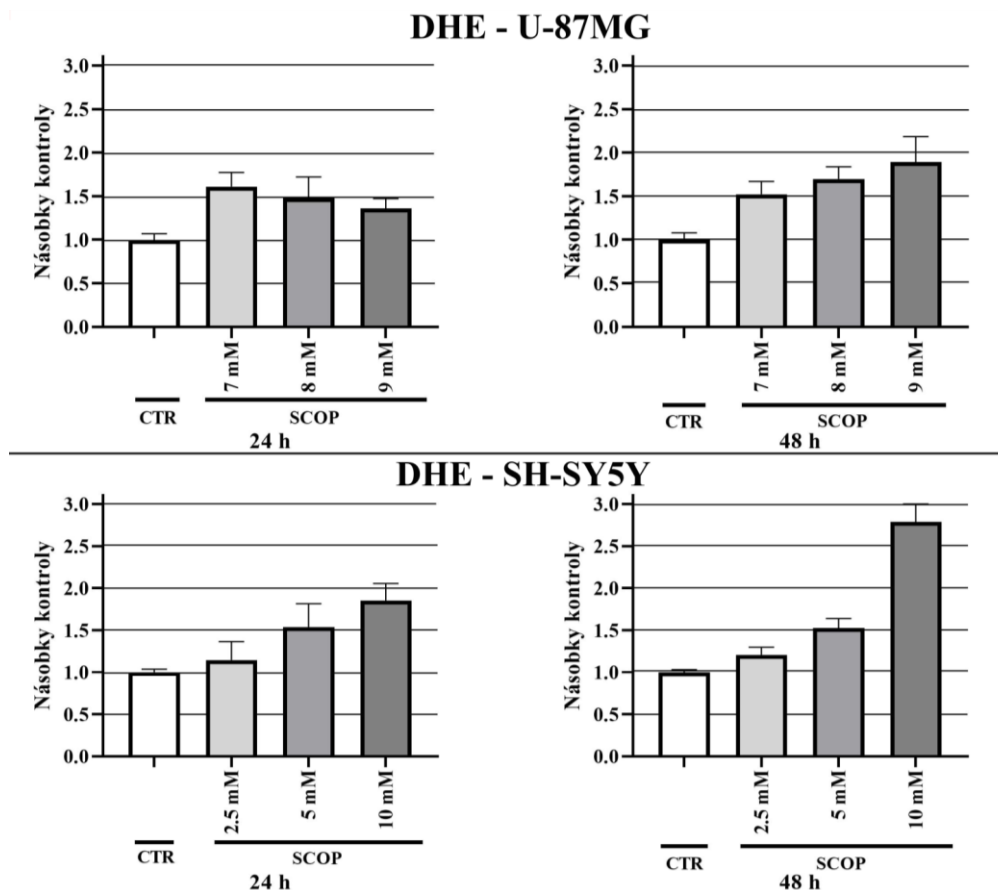
Obr. 16. Srovnání stanovení buněčné smrti pomocí YO-PRO 1 a detekce autofagie u buněčné linie U-87MG a SH-SY5Y. Buňky obou linií byly inkubovány 24 a 48 h se třemi koncentracemi SCOP. Výsledky jsou uvedeny jako násobky DMSO kontroly, která byla stanovena na hodnotu 1. Grafy jsou uvedeny jako průměry \pm standardní chyba průměru (SEM) ze dvou na sobě nezávislých experimentů provedených v triplicátech.

Dále byla stanovována apoptotická buněčná smrt pomocí YO-PRO 1. Tato sonda barví buňky v rané fázi apoptózy, prostupuje i přes membránu lehce poškozených buněk, což sondě umožňuje interakci s DNA buňky a následnou emitaci zelené fluorescence. Z grafů na Obr. 16. můžeme vidět, že k mírnému nárůstu došlo u buněčné linie U-87MG (Obr. 16A-B) pouze po 24h inkubaci se SCOP. U buněk linie SH-SY5Y (Obr. 16C-D) došlo k nárůstu zejména u 10mM SCOP po 24 i 48 h inkubace. Další měření na Obr. 16. ukazuje detekci autofagie, které bylo provedeno pomocí autofagozomálního markeru. U tohoto typu měření můžeme pozorovat nárůst signálu u linie U-87MG (Obr. 16E-F) jako po 24 i 48h inkubaci se SCOP. Ke zvýšení došlo také u buněk SH-SY5Y (Obr. 16G-H).



Obr. 17. Srovnání stanovení detekce autofagie u buněčné linie U-87MG a SH-SY5Y. Buňky obou linií byly inkubovány 48 h se SCOP a LY294002. Výsledky jsou uvedeny jako násobky DMSO kontroly, která byla stanovena na hodnotu 1. Grafy jsou znázorněny jako průměry \pm standardní chyba průměru (SEM) ze dvou na sobě nezávislých experimentů provedených v triplicátech.

Z předchozích měření bylo pojata podezření na indukci autofagie, a proto bylo provedeno měření pomocí autofagozomálního markeru za použití inhibitoru autofagie LY294002. Při jeho použití byly získány výsledky, které jsou uvedeny na Obr. 17. U obou buněčných linií LY294002 snižoval signál autofagie. V případě buněčné linie U-87MG v koncentracích 0,1 a 1 μ M, u linie SH-SY5Y ve všech použitých koncentracích. Nejznatelnější pokles signálu autofagie byl přitom u obou linií zaznamenán při použití nejvyšší koncentrace LY294002 1 μ M, kde inhibitor snížil signál pod 80 %. Z těchto výsledků je patrné, že LY294002 snižuje u buněk U-87MG i SH-SY5Y autofagii.

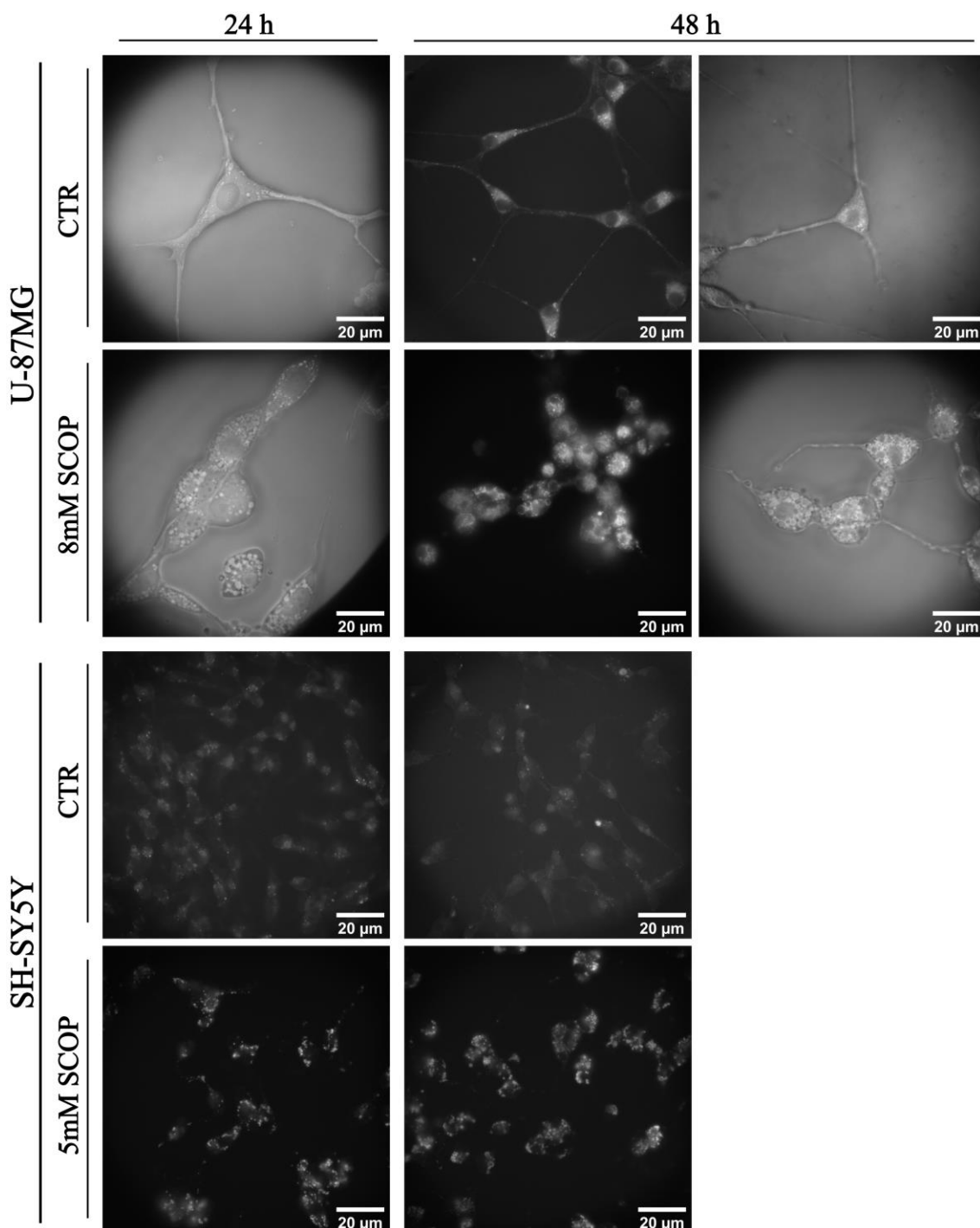


Obr. 18. Srovnání stanovení tvorby superoxidového radikálu pomocí DHE u buněčné linie U-87MG a SH-SY5Y. Buňky obou linií byly inkubovány 24 a 48 h se třemi koncentracemi SCOP. Výsledky jsou uvedeny jako násobky DMSO kontroly, která byla stanovena na hodnotu 1. Grafy jsou uvedeny v průměrech \pm standardní chyba průměru (SEM) ze dvou na sobě nezávislých experimentů provedených v triplicátech.

Dále bylo provedeno stanovení tvorby superoxidového radikálu jakožto ukazatele OS. Za tímto účelem bylo jako činidlo použito DHE a výsledky jsou zobrazeny na Obr. 18. U všech čtyř grafů na tomto obrázku můžeme pozorovat zvýšení signálu u buněk ošetřených SCOP, a tedy zvýšenou tvorbu superoxidových radikálů. Vzestup OS v závislosti na koncentraci SCOP u buněk U-87MG je patrný zejména po 48h inkubaci s toxinem, kde nejvyšší koncentrace SCOP, 9mM, vedla k přibližně 1,8násobnému zvýšení signálu DMSO kontroly. Delší doba inkubace s toxinem zde vedla ke zvýšení tvorby superoxidových radikálů. Vzestupný nárůst superoxidových radikálů v závislosti na koncentraci SCOP byl u buněk SH-SY5Y pozorovaný po 24 i 48h inkubaci s toxinem. Jedná se o předpokládaný výsledek, neboť nárůst OS byl zaznamenán u buněk SH-SY5Y ošetřených SCOP již dříve (Suthprasertporn, Mingchinda et al., 2020). V tomto případě nejvyššího nárůstu dosahovala koncentrace 10mM SCOP po 48h inkubaci, konkrétně přes 2,5 násobku DMSO kontroly. V případě koncentrací 2,5 a 5mM SCOP u buněk SH-SY5Y nedošlo k nárůstu signálu po delší

inkubaci a signály po 24 i 48h inkubaci se SCOP se prakticky neliší.

Autofagozomální marker byl použit také pro pozorování fluorescence pomocí fluorescenčního mikroskopu s kamerou. Zachycována byla černobílá fluorescence, při které čím je barva světlejší, tím je signál vyšší. Na Obr. 19. jsou zobrazeny rozdíly v intenzitě fluorescence u buněk U-87MG a SH-SY5Y po 24 a 48h inkubaci se SCOP a kontrolními buňkami.



Obr. 19. Mikrofotografie černobílé fluorescence zachycující autofagozomy u kontrolních buněk U-87MG, SH-SY5Y a po 24 a 48h inkubaci se SCOP. Snímky byly pořízeny při zvětšení 630x.

Na Obr. 19. jsou znázorněny fluorescenční mikrosnímky, které zachycují rozdíl mezi kontrolními buňkami a buňkami inkubovanými 24 a 48 h se SCOP. Bílé váčky, které jsou na snímcích zachycené, jsou autofagozomy, neboť fluorescence byla v tomto případě zajištěna pomocí autofagozomálního markeru. U buněčné linie U-87MG můžeme po 24h inkubaci se SCOP vidět jasný nárůst bílých bodů, tedy autofagozomů. V případě linie SH-SY5Y je patrný nárůst fluorescence spíše než zvýšený počet autofagozomů. Při porovnávání snímků kontrolních buněk linie U-87MG s těmi po 48h inkubaci se SCOP můžeme pozorovat nárůst fluorescence a zvýšení počtu váček, autofagozomů. Obdobný nicméně méně výrazný rozdíl je poté možné pozorovat také u buněčné linie SH-SY5Y, která byla ošetřena 5mM SCOP.

Autofagie, jako mechanismus buněčné smrti indukované SCOP doposud nebyl v dostupné literatuře popsán. Studie zabývající se SCOP a jeho vlivem na buňky popisují buněčnou smrt jako apoptózu, což dokazují zvýšenou aktivitou kaspáz a přítomností proteinů této programované buněčné smrti, jako je například Bax (Puangmalai, Thangnipon et al., 2017). S těmi to závěry se ztotožňují výsledky této práce v případě buněčné linie SH-SY5Y. U linie U-87MG byly nicméně zjištěny výsledky, které tento způsob buněčné smrti vyvrací. Hlavním důkazem pro to je nepřítomnost aktivity kaspáz 3 a 7, viz Obr. 15. a zároveň detekce autofagie, viz Obr. 16. a 17. Na základě těchto výsledků se můžeme domnívat, že poškození způsobené SCOP na buněčné linii U-87MG patrně vede ke zvýšené autofagii. Dále zvýšená tvorba superoxidových radikálů, viz Obr. 18. a s ní spojený OS napovídá, že mechanismem indukce autofagie, by mohl být právě OS. Po potvrzení této hypotézy by bylo potřeba dalších testů.

4.4 Testování neuroprotektivní aktivity a cytotoxicity

4.4.1 Stanovení cytotoxicity

Pro ověření případné cytotoxicity byly látky použité pro testování neuroprotektivní aktivity testovány také samostatně bez použití toxinu. Stanovení buněčné smrti pomocí PI poté přineslo výsledky zobrazené v Tab. 4. V tabulce jsou uvedeny hodnoty buněčné smrti při inkubaci s látkami v jejich nejvyšších použité koncentraci. Získané hodnoty byly vztaženy k hodnotám 1% Tritonu, který způsoboval smrt všech buněk přítomných v dané jamce a odpovídá tedy 100% buněčné smrti. Na buněčné linii U-87MG byla po 24h inkubaci stanovena buněčná smrt DMSO kontroly 3,32 %, po 48h inkubaci přibližně 5,92 %. Nejvyšší hodnoty byly naměřeny u látky LY294002 v koncentraci

1 μ M. Po 48h inkubaci s touto látkou v 1 μ M koncentraci dosahovala buněčná smrt hodnoty 8,22 % (viz Tab. 4.). V případě buněčné linie SH-SY5Y dosahovala DMSO kontrola po 24 h 5,4 % buněčné smrti a po 48 h přes 9,03 %. Nejvyšší signál přitom opět vykazovala látka LY294002 v 1 μ M koncentraci, která po 48h inkubaci dosahovala hodnot 13,16 %.

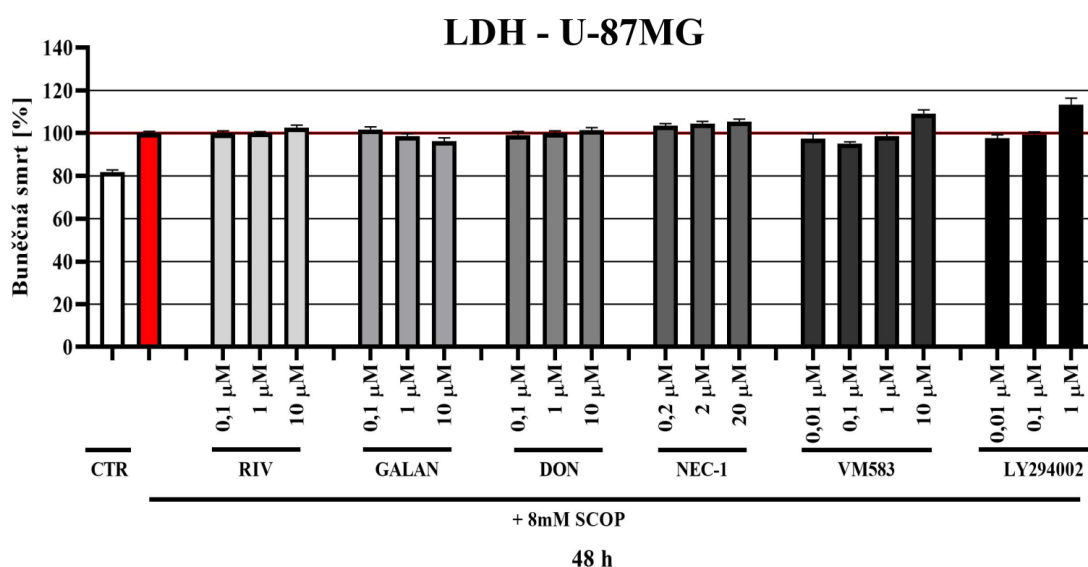
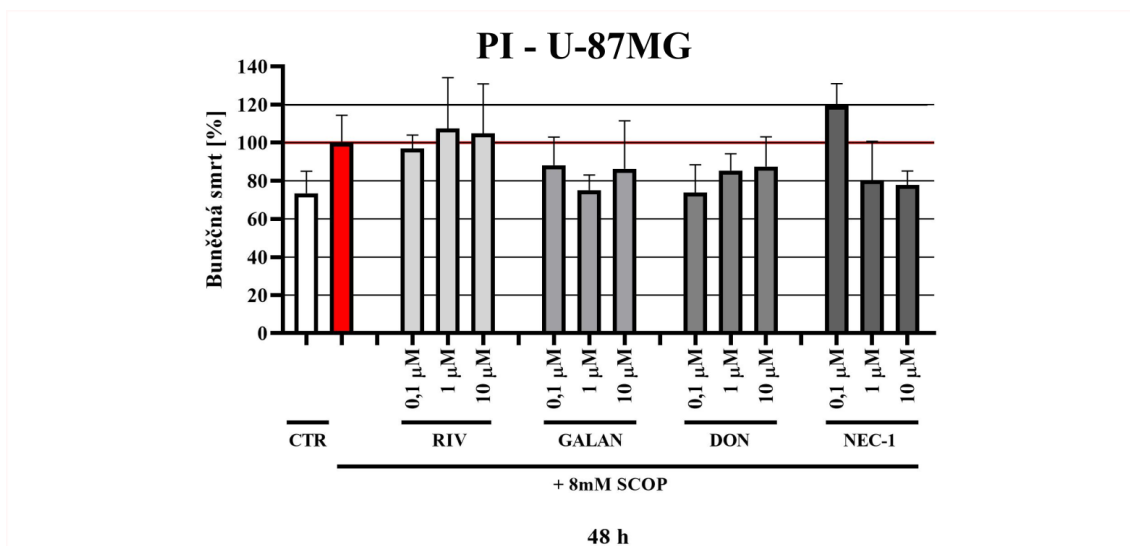
Na základě těchto výsledků nevykazuje žádná z testovaných látek v použitých koncentracích cytotoxicitu.

Tab. 4. Cytotoxická aktivita testovaných látek v jejich nejvyšších použitých koncentracích po 24 a 48h inkubaci na buňkách U-87MG a SH-SY5Y stanovená pomocí PI. Hodnoty jsou vyjádřeny jako procenta buněčné smrti stažená k 1% Tritonu (100 %). Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm standardní chyba průměru (SEM) z minimálně dvou na sobě nezávislých experimentů provedených v triplicátech.

	Cytotoxicita (% \pm SEM)			
	U-87MG		SH-SY5Y	
	24 h	48 h	24 h	48 h
CTR (DMSO)	3,32 \pm 0,31	5,92 \pm 0,67	5,40 \pm 0,42	9,03 \pm 0,39
10μM RIV	2,89 \pm 0,60	3,53 \pm 0,52	6,14 \pm 0,49	9,70 \pm 0,52
10μM GALAN	3,22 \pm 0,84	5,71 \pm 1,35	5,74 \pm 0,28	8,88 \pm 0,55
10μM DON	2,04 \pm 0,59	4,65 \pm 1,22	5,70 \pm 0,67	9,93 \pm 0,54
20μM NEC-1	3,37 \pm 0,50	5,96 \pm 1,44	4,64 \pm 0,54	8,76 \pm 0,46
1μM VM583	1,98 \pm 0,54	5,67 \pm 0,99	4,64 \pm 0,32	8,68 \pm 0,98
1μM LY294002	3,98 \pm 0,51	8,22 \pm 1,81	5,99 \pm 0,78	13,16 \pm 0,53

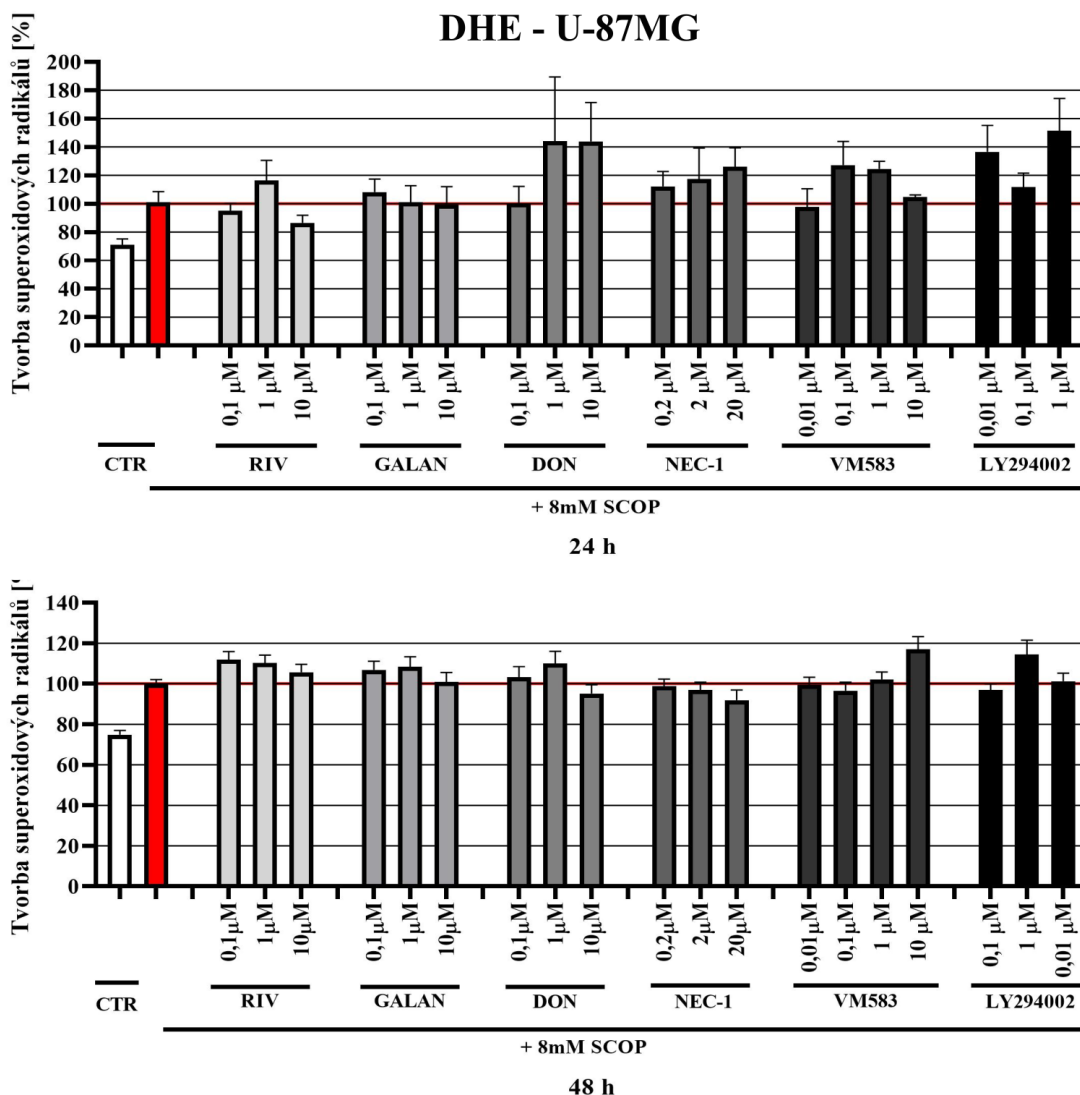
4.4.2 Testování neuroprotektivní aktivity

V poslední části této práce bylo přistoupeno k testování neuroprotektivní aktivity vybraných látek. K testování byly vybrány látky z řad inhibitorů cholinesteráz RIV, GALAN a DON, dále inhibitor nekroptózy NEC-1, inhibitor autofagie LY294002 a inhibitor BChE VM583. Látky byly aplikovány spolu se SCOP obvykle ve třech koncentracích a po 24 nebo 48h inkubaci byla poté stanovována buněčná smrt pomocí PI, LDH (případně YO-PRO 1), tvorba superoxidových radikálů pomocí DHE a MitoSox (mitochondriální OS) a mitochondriální membránový potenciál pomocí JC-10 sondy. Testování probíhalo na obou buněčných liniích.



Obr. 20. Stanovení buněčné smrti pomocí PI a LDH u buněk U-87MG 48 h ošetřených 8mM SCOP a látkami. Výsledky jsou přepočteny na procenta 8mM SCOP, který byl stanoven na hodnotu 100 %. Grafy jsou uvedeny jako průměry ± standardní chyba průměru (SEM) z minimálně dvou na sobě nezávislých experimentů provedenými v triplicátech.

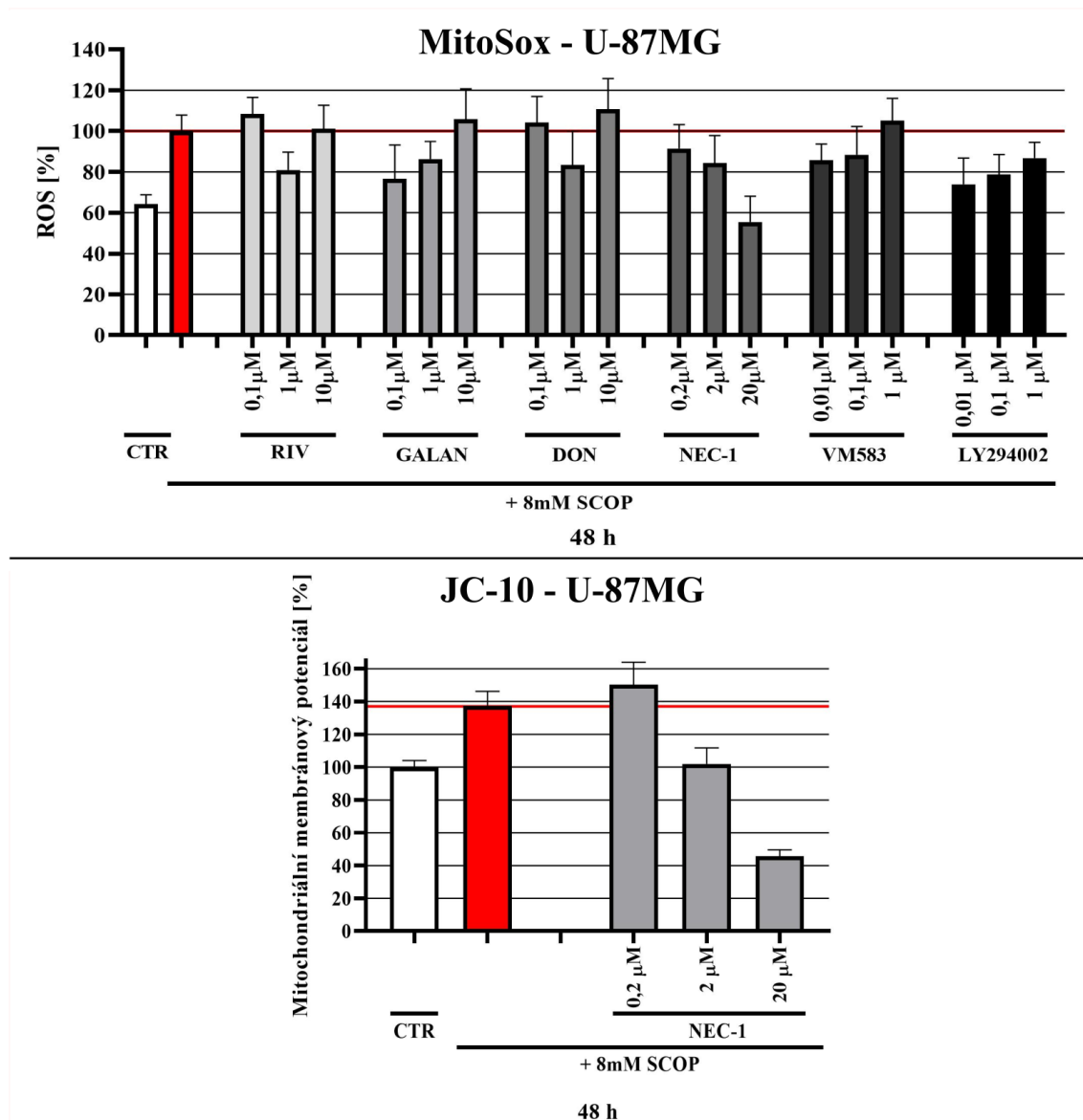
Na Obr. 20. je zachyceno stanovení buněčné smrti pomocí PI a LDH u buněk U-87MG ošetřených 8mM SCOP a vybranými látkami. Na horním grafu můžeme pozorovat částečný protektivní účinek zejména látek GALAN, DON (ve všech koncentracích) a NEC-1 (1 a 10 µM), které snižovaly hodnoty buněčné smrti pod 100 %, tedy 8mM SCOP. Na základě výsledků NEC-1 byla dále používána dvojnásobná koncentrace NEC-1. Na druhém grafu tohoto obrázku je poté možné vidět, že měření buněčné smrti pomocí LDH nepřineslo stejné výsledky, které byly zachyceny pomocí PI. K velice mírnému snížení došlo pouze u látky GALAN (1 a 10 µM), VM583 (0,01 – 1 µM) a LY294002 (0,01 µM).



Obr. 21. Stanovení tvorby superoxidových radikálů pomocí DHE u buněk U-87MG 24 a 48 h ošetřených 8mM SCOP a látkami. Výsledky jsou přepočteny na procenta 8mM SCOP, který byl stanoven na hodnotu 100 %. Grafy jsou uvedeny v průměrech \pm standardní chyba průměru (SEM) z minimálně dvou na sobě nezávislých experimentů, které byly provedeny v triplicátech.

Stanovení tvorby superoxidových radikálů pomocí DHE probíhalo po 24 a 48h inkubaci buněk s toxinem a látkami. Výsledky jsou zobrazeny na Obr. 21. Zde můžeme pozorovat, že po 24h inkubaci docházelo k velké variabilitě zaznamenaných výsledků, která může být způsobena sféroidy. Částečně snížená tvorba superoxidových radikálů byla v tomto případě zachycena u látky RIV (0,1 a 10 μ M) a VM583 (0,01 μ M).

Po 48h inkubaci byly získány konzistentnější výsledky. Je rovněž možné, že tvorba superoxidových radikálů byla po delším časovém úseku inkubace vyrovnanější. V tomto případě snižovaly tvorbu superoxidových radikálů látky DON (10 μ M) NEC-1 (ve všech koncentracích), VM583 (0,1 μ M) a LY294002 (0,1 μ M).



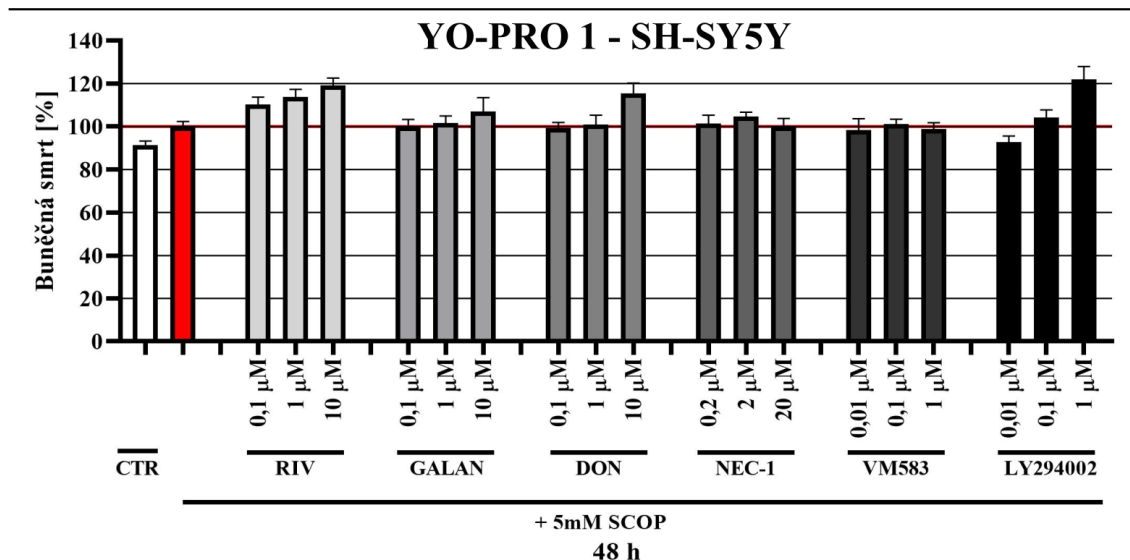
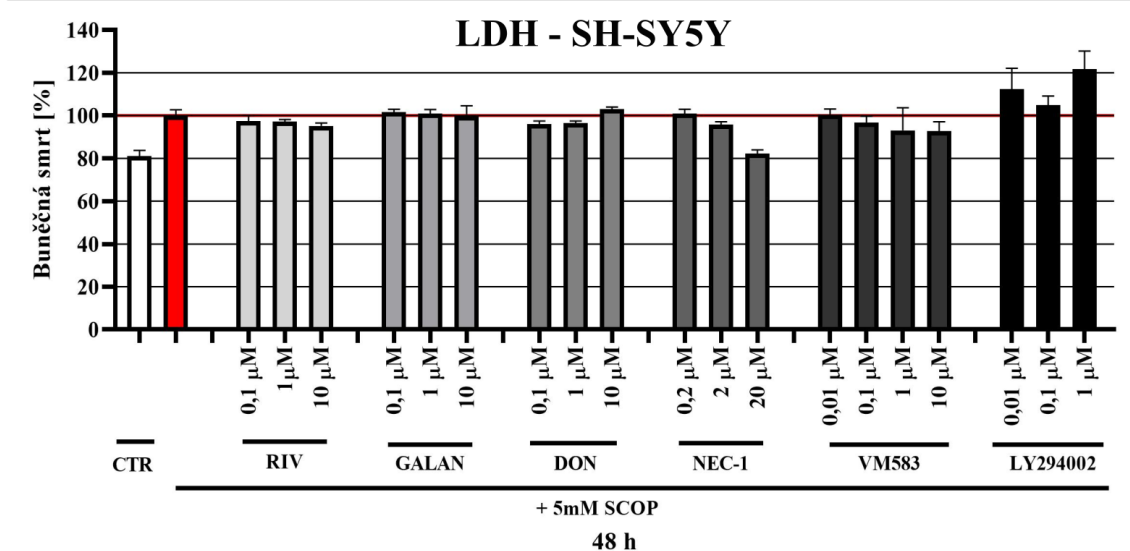
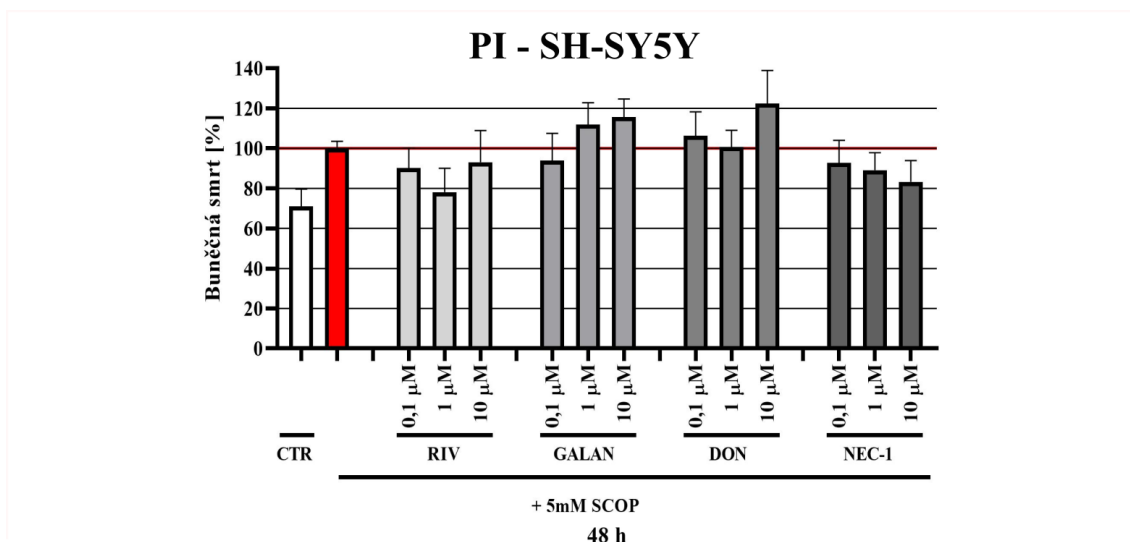
Obr. 22. Stanovení tvorby reaktivních kyslíkových forem pomocí MitoSox a mitochondriálního membránového potenciálu pomocí sondy JC-10 u buněk U-87MG 48 h ošetřených 8mM SCOP a látkami. Výsledky pro sondu MitoSox jsou přepočteny na procenta 8mM SCOP, který byl stanoven na hodnotu 100 %. Výsledky pro sondu JC-10 jsou vypočteny jako procenta oproti DMSO kontrole, která byla stanovená na hodnotu 100 %. Grafy jsou uvedeny jako průměry ± standardní chyba průměru (SEM) z minimálně dvou na sobě nezávislých experimentů provedených v triplicátech.

Na základě předchozích experimentů, u kterých byla prokázána role OS při poškození indukovaném SCOP (viz Stanovení mechanismu buněčné smrti indukované SCOP) a zároveň výsledků testování aktivity vybraných látek (vliv na tvorbu superoxidových radikálů, viz Obr. 21.) bylo přistoupeno k dalšímu typu měření. Jedná se o stanovení mitochondriálního poškození skrze nárůst tvorby superoxidových radikálů v této buněčné organelle pomocí sondy MitoSox. Na Obr. 22. jsou zobrazeny výsledky tohoto typu měření. Na základě nich můžeme říci, že poškození mitochondrií je snižováno po aplikaci RIV (1 μM), GALAN (0,1 a 1 μM), DON (1 μM), NEC-1

(všechny koncentrace), VM583 (0,01 a 0,1 μM) a LY294002 (všechny koncentrace). Také můžeme říci, že při tomto typu měření lze pozorovat účinek největšího počtu látek a že poškození mitochondrií tedy hraje ústřední roli v účinku SCOP na buňky U-87MG. Jako nejúčinnější se přitom zdá být látka NEC-1, které byla proto použita i u dalšího typu měření. Jedná se o stanovení mitochondriálního membránového potenciálu pomocí sondy JC-10 (viz spodní graf na Obr. 22.). Toto měření ukazuje, že 48h inkubace buněk U-87MG s 8mM SCOP vede k hyperpolarizaci mitochondriálních membrán, neboť průměr z naměřených hodnoty zde dosahoval téměř 140 %. Použitá látka NEC-1, zde ve svých koncentracích 2 a 20 μM snižovala mitochondriálních membránový potenciál. V případě 2 μM NEC-1 došlo ke snížení polarizace až na úroveň kontroly, v případě 20 μM NEC-1 až k depolarizaci membrán pod úroveň kontroly. Mitochondriální membránový potenciál je nezbytný pro správnou funkci mitochondrií, a tedy elektronového transportního řetězce. Depolarizace i hyperpolarizace jsou výkyvy, které mají oba patologický ráz a mohou předcházet buněčné smrti. Při hyperpolarizaci mitochondriálních membrán neuronů jsou buňky stále životaschopné, ale následně může docházet k aktivaci apoptózy, programované buněčné smrti (Iijima 2006). Hyperpolarizace mitochondriálních membrán a současná životaschopnost buněk nás v úvahách vrací k předchozí části výsledků, která byla věnována stanovení mechanismu buněčné smrti indukované SCOP. Buňky na základě výsledků této práce umírají neapoptoticky, současně jsou značně poškozené a jejich poškození je patrně indukováno OS. Tyto výsledky jsou tedy v korelaci s nálezem hyperpolarizace mitochondriálních membrán. Současně detekovaná autofagie by tedy mohla být indukována mitochondriálním poškozením, které je způsobeno hyperpolarizací mitochondriálních membrán, která vede k OS a spuštění autofagie tak může být mechanismus, kterým se buňka pokouší přežít. Autofagie je buňkou přísně řízený mechanismus, kterým se snaží vypořádat s buněčným stresem a odstranit poškozené části buňky (například poškozené mitochondrie, tzv. mitofagie). Autofagie může být vyvolána hladověním, OS, také je to způsob, kterým se buňky zbavují starých organel (Maiuri et al., 2007). Kromě ochranného charakteru, který brání buněčné smrti, může autofagie způsobit také samotnou aktivaci apoptózy nebo nekroptózy. Smrt buněk může být také indukována, je-li autofagická dráha dysregulována a její poškozený mechanismus poté vede k hromadění autofagických tělísek uvnitř buněk a buňka dále není schopná se autofagozomů bezpečnou cestou zbavovat (Jeong; Jung et al., 2020). Látka NEC-1 je identifikována jako inhibitor nekroptózy, ale současně je NEC-1 schopen potlačovat

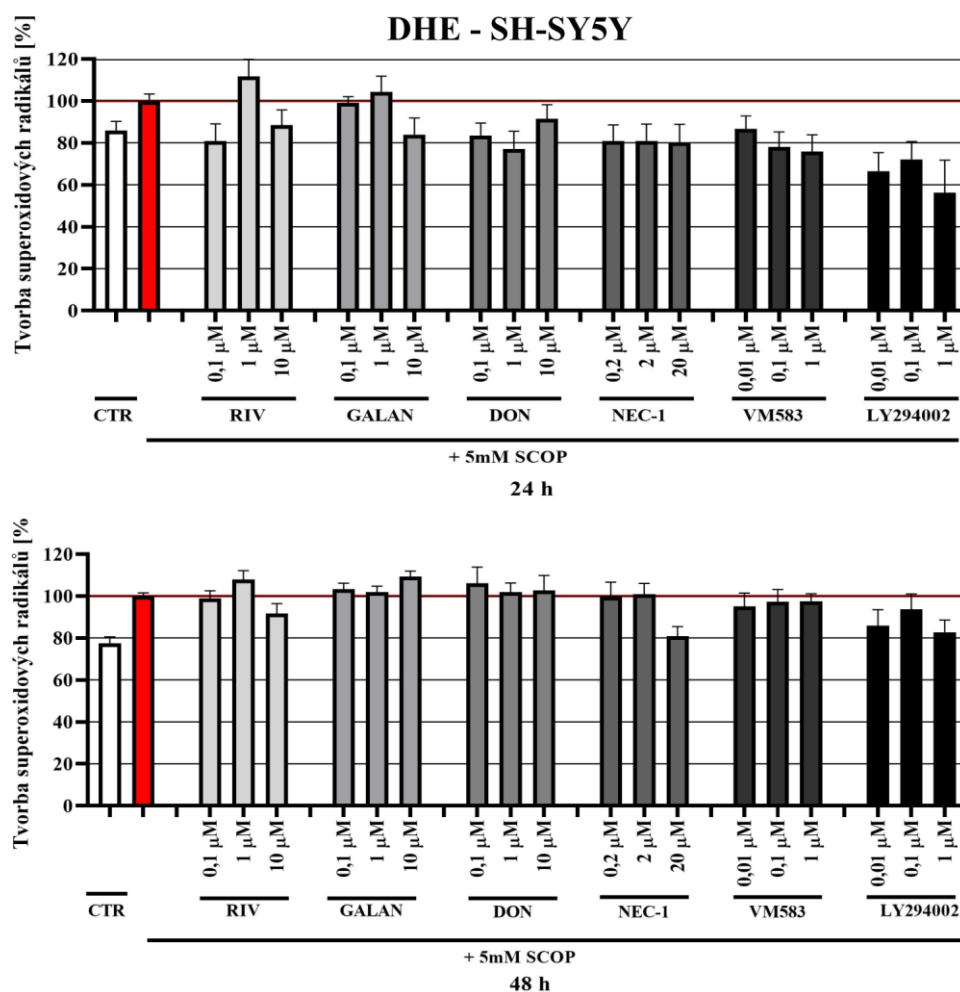
autofagii a apoptózu (Wang et al., 2012). Jedním z účinků NEC-1 je snížení tvorby ROS (Dayani; Kim; Li et al., 2010). Vliv NEC-1 je v korelaci s výsledky jiných autorů, kteří uvádí, že NEC-1 v určitém koncentračním rozmezí zvyšuje viabilitu buněk a zabraňuje indukcii autofagie regulací mitochondriálního membránového potenciálu (Cao; Wu et al., 2015).

Testování neuroprotektivní aktivity bylo prováděno souběžně také na buněčné linii SH-SY5Y. Výsledky jsou uvedeny na obr. 23. až 25.



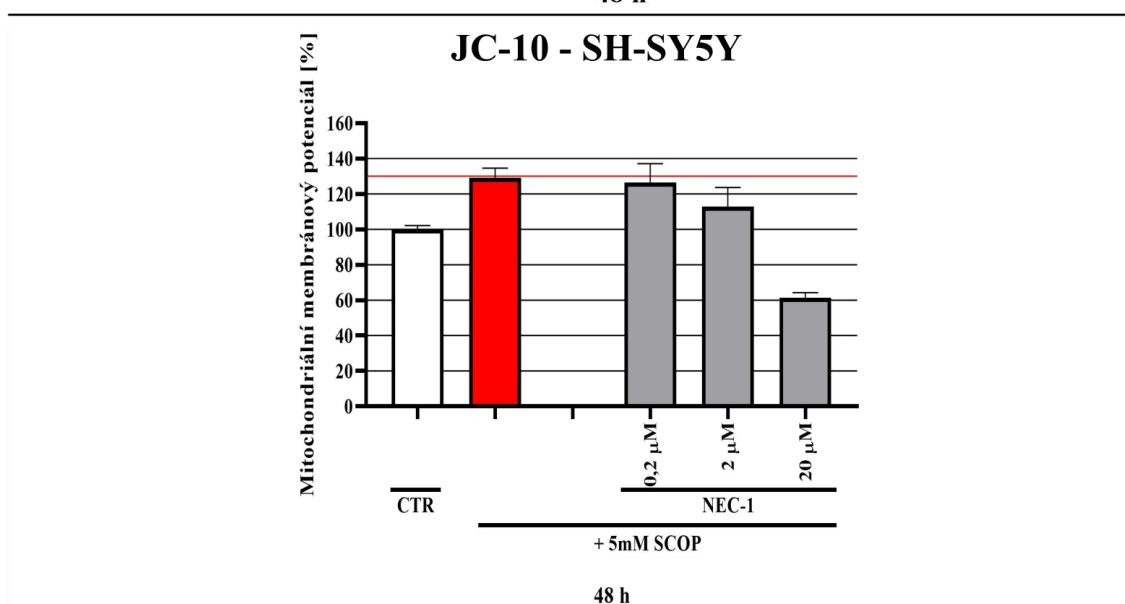
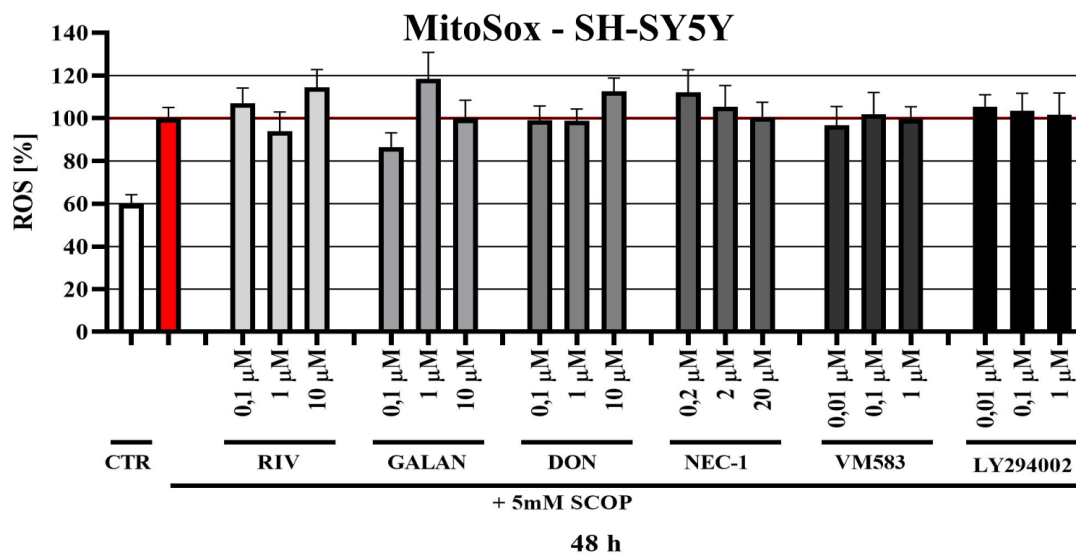
Obr. 23. Stanovení buněčné smrti pomocí PI, LDH a YO-PRO 1 u buněk SH-SY5Y 48 h ošetřených 5mM SCOP a látkami. Výsledky jsou přepočteny na procenta 5mM SCOP, který byl stanoven na hodnotu 100 %. Grafy jsou uvedeny jako průměry ± standardní chyba průměru (SEM) z minimálně dvou na sobě nezávislých experimentů provedenými v triplicátech.

Stanovení buněčné smrti na buněčné linii SH-SY5Y proběhlo pomocí PI, LDH a také YO-PRO 1. Výsledky shrnuje Obr. 23. Na prvním grafu, který byl získán měřením buněčné smrti pomocí PI vidíme, že viabilitu buněk zvyšovala látka RIV (ve všech koncentracích), GALAN (0,1 μM) a NEC-1 (všechny koncentrace). Částečně se tyto výsledky shodují s údaji na buněčné linii U-87MG. Testování pomocí LDH přineslo na linii SH-SY5Y lepší výsledky než u linie U-87MG. V případě linie U-87MG nebyly zaznamenány poklesy signálů buněčné smrti, sonda LDH patrně vyžaduje více buněk pro zachycení změn signálů. U buněčné linie SH-SY5Y signál buněčné smrti snižovala látka RIV (všechny koncentrace), DON (0,1 a 1 μM), NEC-1 (všechny koncentrace) a VM583 (0,1–10 μM). Nejvýraznější pokles signálu byl detekován při aplikaci 20 μM NEC-1, při kterém došlo k 20% snížení. Až na látku VM583 se výsledky od linie U-87MG liší. Při detekci buněčné smrti pomocí YO-PRO 1 bylo snížení smrti zaznamenáno pouze u LY294002 (0,01 μM).



Obr. 24. Stanovení tvorby superoxidových radikálů pomocí DHE u buněk SH-SY5Y 48 h ošetřených 5mM SCOP a látkami. Výsledky jsou přepočteny na procenta 5mM SCOP, který byl stanoven na hodnotu 100 %. Grafy jsou uvedeny jako průměry \pm standardní chyba průměru (SEM) z nejméně dvou na sobě nezávislých experimentů, které byly provedeny v triplicátech.

Stanovení tvorby superoxidových radikálů u buněčné linie SH-SY5Y (Obr. 24.) přineslo odlišné výsledky oproti buněčné linii U-87MG. Zde naopak 24h inkubace buněk s toxinem a látkami přinesla aktivitu látek v podobě snížení superoxidových radikálů, látka RIV (0,1 o 20 % a 10 μ M přibližně o 15 %), GALAN (10 μ M téměř o 20 %) a DON, NEC-1, VM583 a LY294002 (všechny ve všech koncentracích). Nejúčinnější snížení signálu u DON dosáhla koncentrace 1 μ M, při které bylo snížení přes 20 %. Látka NEC-1 ve všech použitých koncentracích snížila signál o 20 %. Inhibitor BChE VM583 nejvíce snižoval signál při koncentraci 1 μ M, a to přes 20 %. Inhibitor apoptózy LY294002 snižoval signál tvorby superoxidových radikálů zcela nejúčinněji, ve všech použitých koncentracích přes 20 %, v koncentraci 1 μ M až přes 40 %. Po 48h inkubaci byly látky na snížení tvorby superoxidových radikálů méně účinné. Snížení bylo zaznamenáno u látek RIV (0,1 – mírné snížení a 10 μ M přibližně o 10 %), NEC-1 (20 μ M o 20 %), VM583 (ve všech koncentracích – mírné snížení) a LY294002 (všechny koncentrace z nich nejvíce koncentrace 1 μ M, téměř o 20 %). Po 48h inkubaci tedy nejúčinněji snižoval signál 20 μ M NEC-1. Oproti buněčné linii U-87MG se zdá, že zejména po 24h inkubaci jsou látky na buněčné linii SH-SY5Y účinnější ve snižování superoxidových radikálů.



Obr. 25. Stanovení tvorby reaktivních kyslíkových forem pomocí MitoSox a mitochondriálního membránového potenciálu pomocí sondy JC-10 u buněk SH-SY5Y 48 h ošetřených 5mM SCOP a látkami. Výsledky jsou přečteny na procenta 5mM SCOP, který byl stanoven na hodnotu 100 %. Grafy jsou uvedeny jako průměry \pm standardní chyba průměru (SEM) z minimálně dvou na sobě nezávislých experimentů, které byly provedeny v technických triplicátech.

Stanovení mitochondriálního poškození (tvorby ROS v mitochondriích) u linie SH-SY5Y (viz Obr. 25.) přineslo opět odlišné výsledky než u linie U-87MG. V případě linie SH-SY5Y vykazovaly látky po 48h inkubaci nižší účinnost, než jakou prokázaly na linii U-87MG. Lze se můžeme domnívat, že by látky lépe snižovaly ROS, pokud by měření probíhalo po 24h inkubaci (viz Obr. 26. tvorba superoxidových radikálů pomocí DHE). Ke snížení ROS zde došlo u RIV (1 μ M), GALAN (0,1 μ M) a VM583 (0,01 μ M).

Při stanovení mitochondriálního membránového potenciálu u buněk SH-SY5Y (viz Obr. 25.) byla stejně jako u linie U-87MG zaznamenána hyperpolarizace, ačkoliv

nižší než u U-87MG. Podobně jako u linie U-87MG, NEC-1 snižoval membránový potenciál. Nejvyšší koncentrace, 20 μ M NEC-1, až na hodnoty depolarizace. Oproti linii U-87MG však 2 μ M NEC-1 nedokázal snížit potenciál na hodnotu kontroly.

Apoptotická buněčná smrt indukovaná OS byl u linie SH-SY5Y po ošetření SCOP předpokládaný výsledek. Výsledky však nelze přímo porovnat s jinými pracemi, byly při nich použity nediferenciované buňky této linie (Suthprasertporn, Mingchinda et al., 2020). Srovnání výsledků této práce na linii SH-SY5Y s literaturou ve vztahu k testování použitých látek téměř není možno provést. Toxin SCOP je totiž obvykle využíván k indukci poškození na *in vivo* modelech (nejčastěji myších a krysích) a poté jsou aplikovány látky jako je RIV, GALAN, DON a další.

5 Závěr

Tato práce se ve své teoretické části věnuje poškození cholinergních neuronů a při jakých onemocněních takové poškození najdeme. Dále rozebírá téma možnosti studia cholinergních neuronů, tedy jejich *in vitro* modely. Následují kapitoly zabývající se buněčnými liniemi, které byly použity v experimentální části této práce, SH-SY5Y a U-87MG. Poslední kapitola se následně týká použitého toxinu, SCOP.

Nejobsáhlejší je kapitola obsahující výsledky a diskusi. V rámci této práce byla úspěšně provedena validace diferenciaci na cholinergní fenotyp, která byla provedena pozorováním změn morfologie, Western blot analýzou vybraných proteinů a imunofluorescenční analýzou vybraných proteinů. Podařilo se potvrdit zastavení proliferace a změny v morfologii po diferenciaci 2mM NaB. Dále se kombinací Western blot analýzy a imunofluorescenční analýzy podařilo stanovit vybrané proteiny z řad markerů diferenciaci, zralých neuronů a cholinergních neuronů, jejich případné změny v expresi nebo redistribuci. Diferenciací buněk U-87MG pomocí 48h inkubace s 2mM NaB došlo k nárůstu neuronálních markerů TuJ1, SYP, NF-M a dále markeru cholinergních neuronů mAChR M₁. Beze změny zůstal marker diferenciaci nestin a marker cholinergních neuronů AChE (u cholinergního markeru BChE bylo zaznamenáno mírné snížení). U kontrolní linie SH-SY5Y bylo zaznamenáno ATRA-diferenciací nárůst Tuj1, SYP, NF-M, mAChR M₁ a BChE, nestin spolu s AChE byly vlivem diferenciaci sníženy. Další část práce se zaměřila na optimalizaci modelu cholinergních neuronů odvozených od linie U-87MG. Podařilo optimalizovat násady buněk na experimenty, diferenciaci a výběru vhodné koncentrace SCOP. V průběhu experimentální činnosti navíc vznikl nový cíl práce, kterým bylo stanovení mechanismu buněčné smrti indukované SCOP. Byla provedena série měření a pozorování, která přinesla hypotézu, že SCOP indukuje u linie U-87MG autofagii iniciovanou OS. Plynuje dále práce přinesla výsledky testování neuroprotektivní aktivity vybraných látek. Z těchto výsledků se jako nejaktivnější látkou ukázal NEC-1. Měření navíc přineslo korelaci OS, mitochondriální hyperpolarizace a zvýšené autofagie na buněčné linii U-87MG pomocí SCOP.

Výsledkem této práce je tedy potvrzení diferenciaci buněk linie U-87MG na cholinergní fenotyp pomocí NaB, optimalizace modelu těchto buněk a otestování vybraných látek pro jejich neuroprotektivní aktivitu. Navíc na základě této práce byl navržen mechanismus buněčné smrti indukované SCOP na linii U-87MG

diferenciované na cholinergní fenotyp pomocí NaB, k jehož potvrzení by bylo potřeba dalších experimentů. Celkově tedy práce úspěšně splnila veškeré vytyčené cíle.

Seznam použité literatury

- Andrews P. W. (1984). Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Developmental biology*, **103**, 285–293.
- Armstrong, D. W., Han, S. M., & Han, Y. I. (1987). Separation of optical isomers of scopolamine, cocaine, homatropine, and atropine. *Analytical biochemistry*, **167**, 261–264.
- Balaban, H., Nazıroğlu, M., Demirci, K., & Övey, İ. S. (2017). The Protective Role of Selenium on Scopolamine-Induced Memory Impairment, Oxidative Stress, and Apoptosis in Aged Rats: The Involvement of TRPM2 and TRPV1 Channels. *Molecular neurobiology*, **54**, 2852–2868.
- Bastola, Tonking & Pariyar, Ramesh & Jeon, Byeong-Min & Baek, Jong-In & Chang, Bo & Kim, Sun & Kim, Sung-Yeon & Seo, Jungwon. (2020). Protective effects of SGB121, ginsenoside F1-enriched ginseng extract, on scopolamine-induced cytotoxicity and memory impairments. *Journal of Functional Foods*. **74**. 104165.
- Bell, H.S., Whittle, I.R., Walker, M., Leaver, H.A. and Wharton, S.B. (2001), The development of necrosis and apoptosis in glioma: experimental findings using spheroid culture systems*. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **27**: 291-304.
- Beuerle, Till, Diane J. Benford, Leon Brimer, Bruce Cottrill, Daniel R. Doerge, Birgit Dusemund, Peter B. Farmer, Peter Fürst, Hans-Ulrich Humpf and Patrick P. J. Mulder. (2013), Scientific Opinion on Tropane alkaloids in food and feed. *EFSA Journal*, **11**: 1-113.
- Biedler, J. L., Helson, L., & Spengler, B. A. (1973). Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research*, **33**, 2643–2652.
- Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M., & Freedman, L. S. (1978). Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer research*, **38**, 3751–3757.
- Bihaqi, S. W., Singh, A. P., & Tiwari, M. (2012). Supplementation of *Convolvulus pluricaulis* attenuates scopolamine-induced increased tau and amyloid precursor protein (A β PP) expression in rat brain. *Indian journal of pharmacology*, **44**, 593–598.
- Brady, S. T., Siegel, G. J., Albers, R. W., Price, D. L., & Benjamins, J. (Eds.). (c2012). *Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology* (8th ed). Elsevier Academic Press.
- Bymaster, F. P., McKinzie, D. L., Felder, C. C., & Wess, J. (2003). Use of M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Neurochemical research*, **28**, 437–442.
- Carrasco, R. A., Stamm, N. B., & Patel, B. K. (2003). One-step cellular caspase-3/7 assay. *BioTechniques*, **34**, 1064–1067.
- Casas, C., Herrando-Grabulosa, M., Manzano, R., Mancuso, R., Osta, R., & Navarro, X. (2013). Early presymptomatic cholinergic dysfunction in a murine model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain and behavior*, **3**, 145–158.
- Castelli, V., d'Angelo, M., Lombardi, F., Alfonsetti, M., Antonosante, A., Catanesi, M., Benedetti, E., Palumbo, P., Cifone, M. G., Giordano, A., Desideri, G., & Cimini, A. (2020). Effects of the probiotic formulation SLAB51 in in vitro and in vivo Parkinson's disease models. *Aging*, **12**, 4641–4659.
- Drachman, D. A., & Leavitt, J. (1974). Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging?. *Archives of neurology*, **30**, 113–121.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Ceña, V., Gallego, C., & Comella, J. X. (2000). Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived

- neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *Journal of neurochemistry*, **75**, 991–1003.
- Fan, Y., Hu, J., Li, J., Yang, Z., Xin, X., Wang, J., Ding, J., & Geng, M. (2005). Effect of acidic oligosaccharide sugar chain on scopolamine-induced memory impairment in rats and its related mechanisms. *Neuroscience letters*, **374**, 222–226.
- Ferguson, R., & Subramanian, V. (2016). PA6 Stromal Cell Co-Culture Enhances SH-SY5Y and VSC4.1 Neuroblastoma Differentiation to Mature Phenotypes. *PloS one*, **11**, e0159051.
- Ferrari, A., Ehler, E., Nitsch, R. M., & Götz, J. (2000). Immature human NT2 cells grafted into mouse brain differentiate into neuronal and glial cell types. *FEBS letters*, **486**, 121–125.
- Forster, J. I., Köglsberger, S., Trefois, C., Boyd, O., Baumuratov, A. S., Buck, L., Balling, R., & Antony, P. M. (2016). Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability. *Journal of biomolecular screening*, **21**, 496–509.
- Fujita, K., Lazarovici, P., & Guroff, G. (1989). Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. *Environmental health perspectives*, **80**, 127–142.
- Gao, Jian-Yi & Zhang, Wei & Hu, San-Qiang & Zhang, Lei & Chen, Tian-Yan & Tang, Bin & Zhang, Zhi-jian & Hu, Jia-Bo. (2020). In vitro and in vivo induction of human embryonic stem cells differentiated into rosette neural stem cells and further generation of neuron-like cells. *All Life*. **13**. 466-473.
- Garcia de Arriba, S., Wegner, F., Grüner, K., Verdaguer, E., Pallas, M., Camins, A., Wagner, A., Wohlfahrt, K., & Allgaier, C. (2006). Different capacities of various NMDA receptor antagonists to prevent ischemia-induced neurodegeneration in human cultured NT2 neurons. *Neurochemistry international*, **49**, 466–474.
- Geis, Gilbert. (1959). In Scopolamine Veritas. The Early History of Drug-Induced Statements. *The Journal of Criminal Law, Criminology, and Police Science*, **50**, no. 4: 347–57.
- Geula, C., & Mesulam, M. M. (1996). Systematic regional variations in the loss of cortical cholinergic fibers in Alzheimer's disease. *Cerebral cortex* (New York, N.Y.: 1991), **6**, 165–177.
- Ghumatkar, P. J., Patil, S. P., Jain, P. D., Tambe, R. M., & Sathaye, S. (2015). Nootropic, neuroprotective and neurotrophic effects of phloretin in scopolamine induced amnesia in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, **135**, 182–191.
- Gordon, J., Amini, S., & White, M. K. (2013). General overview of neuronal cell culture. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), **1078**, 1–8.
- Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **73**, 2424–2428.
- Gryniewicz, G., & Gadzikowska, M. (2008). Tropane alkaloids as medicinally useful natural products and their synthetic derivatives as new drugs. *Pharmacological reports: PR*, **60**, 439–463.
- Haile, Y., Fu, W., Shi, B., Westaway, D., Baker, G., Jhamandas, J., & Giuliani, F. (2014). Characterization of the NT2-derived neuronal and astrocytic cell lines as alternative in vitro models for primary human neurons and astrocytes. *Journal of neuroscience research*, **92**, 1187–1198.
- Heckers, S., Geula, C., & Mesulam, M. M. (1992). Cholinergic innervation of the human thalamus: dual origin and differential nuclear distribution. *The Journal of comparative neurology*, **325**, 68–82.
- Hess, M. W., Pfaller, K., Ebner, H. L., Beer, B., Hekl, D., & Seppi, T. (2010). 3D versus 2D cell culture implications for electron microscopy. *Methods in cell biology*, **96**, 649–670.

- Huh, Eugene & Kim, Hyo & Park, Hanbyeol & Kang, Min & Lee, Bongyong & Oh, Myung. (2014). Houttuynia cordata Improves Cognitive Deficits in Cholinergic Dysfunction Alzheimer's Disease-Like Models. *Biomolecules & therapeutics*, **22**, 176-83.
- Cheung, Y. T., Lau, W. K., Yu, M. S., Lai, C. S., Yeung, S. C., So, K. F., & Chang, R. C. (2009). Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*, **30**, 127–135.
- Iijima T. (2006). Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death. *Neuroscience research*, **55**, 234–243.
- Itano, Y., Ito, A., Uehara, T., & Nomura, Y. (1996). Regulation of Bcl-2 protein expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: positive and negative effects of protein kinases C and A, respectively. *Journal of neurochemistry*, **67**, 131–137.
- Jahanshahi, Mehrdad & Nikmahzar, Emsehgol & Seif-hoseini, S & Babakordi, Fatemeh & Moharreri, A. (2013). Scopolamine Reduces the Density of M1 Muscarinic Neurons in Rats' Hippocampus. *International Journal of Morphology*. **31**. 1227-1232.
- Jang, Young & Kim, Jiyoung & Shim, Jaesung & Kim, Chang yul & Jang, Jung-Hee & Lee, Ki & Lee, Hyong. (2013). Decaffeinated coffee prevents scopolamine-induced memory impairment in rats. *Behavioural brain research*. **245**.
- Jordan, P. M., Cain, L. D., & Wu, P. (2008). Astrocytes enhance long-term survival of cholinergic neurons differentiated from human fetal neural stem cells. *Journal of neuroscience research*, **86**, 35–47.
- Jung, S., Jeong, H., & Yu, S. W. (2020). Autophagy as a decisive process for cell death. *Experimental & molecular medicine*, **52**, 921–930.
- Kanda, Yoshikazu & Katsura, Ken-ichiro & Hisayasu, Sanae. (2005). Milk growth factor (MGF)-induced differentiation of NT2/D1 cells. *Neuroscience letters*. **384**. 260-4.
- Kim, S., Dayani, L., Rosenberg, P. A., & Li, J. (2010). RIP1 kinase mediates arachidonic acid-induced oxidative death of oligodendrocyte precursors. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*, **2**, 137–147.
- Kohnen-Johannsen, K. L., & Kayser, O. (2019). Tropane Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Biosynthesis and Production. *Molecules* (Basel, Switzerland), **24**, 796.
- Kovalevich, J., & Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), **1078**, 9–21.
- Kritis, A. A., Stamoula, E. G., Paniskaki, K. A., & Vavilis, T. D. (2015). Researching glutamate - induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Frontiers in cellular neuroscience*, **9**, 91.
- Kurnik-Łucka, M., Panula, P., Bugajski, A., & Gil, K. (2018). Salsolinol: an Unintelligible and Double-Faced Molecule-Lessons Learned from In Vivo and In Vitro Experiments. *Neurotoxicity research*, **33**, 485–514.
- Kwon, S. H., Lee, H. K., Kim, J. A., Hong, S. I., Kim, H. C., Jo, T. H., Park, Y. I., Lee, C. K., Kim, Y. B., Lee, S. Y., & Jang, C. G. (2010). Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *European journal of pharmacology*, **649**, 210–217.
- Lee, J. C., Park, J. H., Ahn, J. H., Park, J., Kim, I. H., Cho, J. H., Shin, B. N., Lee, T. K., Kim, H., Song, M., Cho, G. S., Kim, D. W., Kang, I. J., Kim, Y. M., Won, M. H., & Choi, S. Y. (2018). Effects of chronic scopolamine treatment on cognitive impairment and neurofilament expression in the mouse hippocampus. *Molecular medicine reports*, **17**, 1625–1632.
- Li, H., Lei, B., Xiang, W., Wang, H., Feng, W., Liu, Y., & Qi, S. (2017). Differences in Protein Expression between the U251 and U87 Cell Lines. *Turkish neurosurgery*, **27**, 894–903.

- Liu, H., Wang, T., Xia, J., Ai, J., Li, W., Song, Y., Shen, Y., Zhang, X., & Tan, G. (2020). Cholinergic neuron-like D-U87 cells promote polarization of allergic rhinitis T-helper 2 cells. *International forum of allergy & rhinology*, **10**, 233–242.
- Liu, H., Xia, J., Wang, T., Li, W., Song, Y., & Tan, G. (2019). Differentiation of human glioblastoma U87 cells into cholinergic neuron. *Neuroscience letters*, **704**, 1–7.
- Lopes, F. M., Schröder, R., da Frota, M. L., Jr, Zanotto-Filho, A., Müller, C. B., Pires, A. S., Meurer, R. T., Colpo, G. D., Gelain, D. P., Kapczinski, F., Moreira, J. C., Fernandes, M.daC., & Klamt, F. (2010). Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain research*, **1337**, 85–94.
- Lopes, F. M., Bristot, I. J., da Motta, L. L., Parsons, R. B., & Klamt, F. (2017). Mimicking Parkinson's Disease in a Dish: Merits and Pitfalls of the Most Commonly used Dopaminergic In Vitro Models. *Neuromolecular medicine*, **19**, 241–255.
- López-Carballo, G., Moreno, L., Masiá, S., Pérez, P., & Baretino, D. (2002). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 25297–25304.
- Lui, N. P., Chen, L. W., Yung, W. H., Chan, Y. S., & Yung, K. K. (2012). Endogenous repair by the activation of cell survival signalling cascades during the early stages of rat Parkinsonism. *PLoS one*, **7**, e51294.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., & Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **8**, 741–752.
- Mesulam, M. M., & Geula, C. (1988). Nucleus basalis (Ch4) and cortical cholinergic innervation in the human brain: observations based on the distribution of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase. *The Journal of comparative neurology*, **275**, 216–240.
- Min, A. Y., Doo, C. N., Son, E. J., Sung, N. Y., Lee, K. J., Sok, D. E., & Kim, M. R. (2015). N-palmitoyl serotonin alleviates scopolamine-induced memory impairment via regulation of cholinergic and antioxidant systems, and expression of BDNF and p-CREB in mice. *Chemico-biological interactions*, **242**, 153–162.
- Misiuta, I. E., Saporta, S., Sanberg, P. R., Zigova, T., & Willing, A. E. (2006). Influence of retinoic acid and lithium on proliferation and dopaminergic potential of human NT2 cells. *Journal of neuroscience research*, **83**, 668–679.
- Müller, M. L., & Bohnen, N. I. (2013). Cholinergic dysfunction in Parkinson's disease. *Current neurology and neuroscience reports*, **13**, 377.
- Mussina, K., Toktarkhanova, D., & Filchakova, O. (2021). Nicotinic Acetylcholine Receptors of PC12 Cells. *Cellular and molecular neurobiology*, **41**, 17–29.
- Naznin, F., Waise, T. M. Z., & Fernyhough, P. (2022). Antagonism of the Muscarinic Acetylcholine Type 1 Receptor Enhances Mitochondrial Membrane Potential and Expression of Respiratory Chain Components via AMPK in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells and Primary Neurons. *Molecular neurobiology*, **59**, 6754–6770.
- Nicklas, W. J., Youngster, S. K., Kindt, M. V., & Heikkila, R. E. (1987). MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life sciences*, **40**, 721–729.
- Niewiadomska, G., Mietelska-Porowska, A., & Mazurkiewicz, M. (2011). The cholinergic system, nerve growth factor and the cytoskeleton. *Behavioural brain research*, **221**, 515–526.
- Ohuchi, T., Maruoka, S., Sakudo, A., & Arai, T. (2002). Assay-based quantitative analysis of PC12 cell differentiation. *Journal of neuroscience methods*, **118**, 1–8.

- Onder, S., Schopfer, L. M., Jiang, W., Tacal, O., & Lockridge, O. (2022). Butyrylcholinesterase in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*, **90**, 1–9.
- Påhlman, S., Ruusala, A. I., Abrahamsson, L., Mattsson, M. E., & Esscher, T. (1984). Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell differentiation*, **14**, 135–144.
- Pariyar, R., Lamichhane, R., Jung, H. J., Kim, S. Y., & Seo, J. (2017). Sulforetin Attenuates MPP⁺-Induced Neurotoxicity through Akt/GSK3 β and ERK Signaling Pathways. *International journal of molecular sciences*, **18**, 2753.
- Pasquini, J., Brooks, D. J., & Pavese, N. (2021). The Cholinergic Brain in Parkinson's Disease. *Movement disorders clinical practice*, **8**, 1012–1026.
- Pleasure, S. J., Page, C., & Lee, V. M. (1992). Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, **12**, 1802–1815.
- Pontén, J., & Macintyre, E. H. (1968). Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*, **74**, 465–486.
- Puangmalai, N., Thangnipon, W., Soi-Ampornkul, R., Suwanna, N., Tuchinda, P., & Nobsathian, S. (2017). Neuroprotection of N-benzylcinnamide on scopolamine-induced cholinergic dysfunction in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neural regeneration research*, **12**, 1492–1498.
- Radaelli, E., Ceruti, R., Patton, V., Russo, M., Degrassi, A., Croci, V., Caprera, F., Stortini, G., Scanziani, E., Pesenti, E., & Alzani, R. (2009). Immunohistopathological and neuroimaging characterization of murine orthotopic xenograft models of glioblastoma multiforme recapitulating the most salient features of human disease. *Histology and histopathology*, **24**, 879–891.
- Redova, M., Chlapek, P., Loja, T., Zitterbart, K., Hermanova, M., Sterba, J., & Veselska, R. (2010). Influence of LOX/COX inhibitors on cell differentiation induced by all-trans retinoic acid in neuroblastoma cell lines. *International journal of molecular medicine*, **25**, 271–280.
- Rochester, Lynn & Yarnall, Alison & Baker, Mark & David, Rachel & Lord, Sue & Galna, Brook & Burn, David. (2012). Cholinergic dysfunction contributes to gait disturbance in early Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology*. **135**. 2779-88.
- Şahin, M., Öncü, G., Yılmaz, M. A., Özkan, D., & Saybaşı, H. (2021). Transformation of SH-SY5Y cell line into neuron-like cells: Investigation of electrophysiological and biomechanical changes. *Neuroscience letters*, **745**, 135628.
- Sarkanen, J. R., Nykky, J., Siikanen, J., Selinummi, J., Ylikomi, T., & Jalonen, T. O. (2007). Cholesterol supports the retinoic acid-induced synaptic vesicle formation in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of neurochemistry*, **102**, 1941–1952.
- Shipley, M. M., Mangold, C. A., & Szpara, M. L. (2016). Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *Journal of visualized experiments : JoVE*, **108**, 53193.
- Schliebs, R., & Arendt, T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behavioural brain research*, **221**, 555–563.
- Schulz, J. A., Rodgers, L. T., Kryscio, R. J., Hartz, A. M. S., & Bauer, B. (2022). Characterization and comparison of human glioblastoma models. *BMC cancer*, **22**, 844.
- Silvis, A. M., McCormick, M. L., Spitz, D. R., & Kinningham, K. K. (2016). Redox balance influences differentiation status of neuroblastoma in the presence of all-trans retinoic acid. *Redox biology*, **7**, 88–96.

- Soto-Otero, R., Méndez-Alvarez, E., Hermida-Ameijeiras, A., Muñoz-Patiño, A. M., & Labandeira-Garcia, J. L. (2000). Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, **74**, 1605–1612.
- Steigerová, J., Oklešťková, J., Levková, M., Rárová, L., Kolář, Z., & Strnad, M. (2010). Brassinosteroids cause cell cycle arrest and apoptosis of human breast cancer cells. *Chemico-biological interactions*, **188**, 487–496.
- Sun, W., Chen, L., Zheng, W., Wei, X., Wu, W., Duysen, E. G., & Jiang, W. (2017). Study of acetylcholinesterase activity and apoptosis in SH-SY5Y cells and mice exposed to ethanol. *Toxicology*, **384**, 33–39.
- Suthprasertporn, N., Mingchinda, N., Fukunaga, K., & Thangnipon, W. (2020). Neuroprotection of SAK3 on scopolamine-induced cholinergic dysfunction in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Cytotechnology*, **72**, 155–164.
- Svoboda, J., Popelikova, A., & Stuchlik, A. (2017). Drugs Interfering with Muscarinic Acetylcholine Receptors and Their Effects on Place Navigation. *Frontiers in psychiatry*, **8**, 215.
- Teppola, Heidi & Sarkanen, Jertta-Riina & Jalonen, Tuula & Linne, Marja-Leena. (2016). Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. *Neurochemical research*. **41**.
- Toselli, M., Tosetti, P., & Taglietti, V. (1996). Functional changes in sodium conductances in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y during in vitro differentiation. *Journal of neurophysiology*, **76**, 3920–3927.
- Túnez, Isaac & Tasset, Inmaculada & Cruz, Veronica & Santamaría, Abel. (2010). 3-Nitropropionic Acid as a Tool to Study the Mechanisms Involved in Huntington's Disease: Past, Present and Future. *Molecules* (Basel, Switzerland). **15**. 878-916.
- Ullrich, Sophie & Hagels, Hansjörg & Kayser, Oliver. (2017). Scopolamine: a journey from the field to clinics. *Phytochemistry Reviews*. **16**.
- Undem, B. J., & Taylor-Clark, T. (2014). Mechanisms underlying the neuronal-based symptoms of allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **133**, 1521–1534.
- Vrazhnov, Denis, Anastasia Knyazkova, Maria Konnikova, Oleg Shevelev, Ivan Razumov, Evgeny Zavjalov, Yury Kistenev, Alexander Shkurinov, and Olga Cherkasova. (2022). Analysis of Mouse Blood Serum in the Dynamics of U87 Glioblastoma by Terahertz Spectroscopy and Machine Learning. *Applied Sciences*. **12**.
- de Vries, N. A., Beijnen, J. H., & van Tellingen, O. (2009). High-grade glioma mouse models and their applicability for preclinical testing. *Cancer treatment reviews*, **35**, 714–723.
- Waetzig, V., Haeusgen, W., Andres, C., Frehse, S., Reinecke, K., Bruckmueller, H., Boehm, R., Herdegen, T., & Cascorbi, I. (2019). Retinoic acid-induced survival effects in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of cellular biochemistry*, **120**, 5974–5986.
- Wang, Y. Q., Wang, L., Zhang, M. Y., Wang, T., Bao, H. J., Liu, W. L., Dai, D. K., Zhang, L., Chang, P., Dong, W. W., Chen, X. P., & Tao, L. Y. (2012). Necrostatin-1 suppresses autophagy and apoptosis in mice traumatic brain injury model. *Neurochemical research*, **37**, 1849–1858.
- Weinert, M., Selvakumar, T., Tierney, T. S., & Alavian, K. N. (2015). Isolation, culture and long-term maintenance of primary mesencephalic dopaminergic neurons from embryonic rodent brains. *Journal of visualized experiments : JoVE*, **(96)**, 52475.
- Wong-Guerra, M., Jiménez-Martin, J., Pardo-Andreu, G. L., Fonseca-Fonseca, L. A., Souza, D. O., de Assis, A. M., Ramirez-Sanchez, J., Del Valle, R. M., & Nuñez-Figueredo, Y. (2017). Mitochondrial involvement in memory impairment induced by scopolamine in rats. *Neurological research*, **39**, 649–659.

- Wu, J. R., Wang, J., Zhou, S. K., Yang, L., Yin, J. L., Cao, J. P., & Cheng, Y. B. (2015). Necrostatin-1 protection of dopaminergic neurons. *Neural regeneration research*, **10**, 1120–1124.
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Molecular neurodegeneration*, **12**, 10.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, N.Y.)*, **318**, 1917–1920.
- Zigova, T., Barroso, L. F., Willing, A. E., Saporta, S., McGrogan, M. P., Freeman, T. B., & Sanberg, P. R. (2000). Dopaminergic phenotype of hNT cells in vitro. *Brain research. Developmental brain research*, **122**, 87–90.
- Züchner, T., Perez-Polo, J. R., & Schliebs, R. (2004). Beta-secretase BACE1 is differentially controlled through muscarinic acetylcholine receptor signaling. *Journal of neuroscience research*, **77**, 250–257.