

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
Katedra biologických a biochemických věd

**BUNĚČNÁ LINIE SH-SY5Y JAKO MODEL
PRO TESTOVÁNÍ NEUROTOXICITY**

AUTOR BAKALÁŘSKÉ PRÁCE:	Nikola Bezdíčková
VEDOUCÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE:	Mgr. Jiří Handl
KONZULTANT BAKALÁŘSKÉ PRÁCE:	Mgr. Jana Báčová

Bakalářská práce

2019

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
Department of biological and biochemical sciences

**SH-SY5Y CELL LINE AS A MODEL FOR
NEUROTOXICITY TESTING**

AUTHOR OF BACHELOR THESIS:	Nikola Bezdíčková
SUPERVISOR OF BACHELOR THESIS:	Mgr. Jiří Handl
CONSULTANT OF BACHELOR THESIS:	Mgr. Jana Báčová

Bachelor thesis

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Nikola Bezdíčková**
Osobní číslo: **C16220**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Buněčná linie SH-SY5Y jako model pro testování neurotoxicity**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši o buněčné linii SH-SY5Y a jejím využití při testování neurotoxicity. V první části textu bakalářské práce se zaměřte na charakterizaci buněčné linie SH-SY5Y a dále popište její vznik a případné výhody či nevýhody jejího využití pro testování neurotoxického působení látek.
2. V hlavní části práce charakterizujte, k testování jakých látek je buněčná linie SH-SY5Y používána nejčastěji a jakých výsledků bylo v oblastech jejího využití dosaženo. V práci stručně zmiňte i jiné buněčné linie, které jsou v publikacích rovněž zmiňovány jako vhodné buněčné modely pro testování neurotoxicity látek.
3. Jako zdroj informací pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce využijte odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *Science-Direct*, *Web of Science*, *Scopus*, *apod.*

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jiří Handl**

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Jana Báčová**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

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

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

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 3. 6. 2020

.....

Nikola Bezdíčková

Touto formou bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Jiřímu Handlovi za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval.

ANOTACE

Bakalářská práce „Buněčná linie SH-SY5Y jako model pro testování neurotoxicity“ pojednává o neurální dopaminergní lidské buněčné linii SH-SY5Y a jejím využití při testování neurotoxického působení látek. Cílem této práce bylo zhodnotit vlastnosti této buněčné linie a na základě literární rešerše posoudit, zda je vhodným modelem pro testování neurotoxicity látek, které by mohly negativně ovlivnit lidský organismus. Úvodní část práce je zaměřena na charakterizaci buněčné linie SH-SY5Y a popis jejího vzniku. Následně je podrobně popsána diferenciace SH-SY5Y buněk včetně vybraných hlavních diferenciačních činidel. V hlavní části práce jsou pak zmíněny výhody a nevýhody využití SH-SY5Y buněk pro testování neurotoxicity, a dále jsou uvedeny i látky, jejichž testování je s buněčnou linií SH-SY5Y často spojováno. Závěrem jsou v práci popsány i další buněčné linie, které jsou rovněž buněčnými modely pro studium neurotoxicity.

KLÍČOVÁ SLOVA

buněčná linie SH-SY5Y, neurotoxicita, diferenciace, kyselina retinová

ANNOTATION

Bachelor thesis "SH-SY5Y cell line as a model for neurotoxicity testing" deals with human neural dopaminergic cell line SH-SY5Y and its utilization in testing of neurotoxic effects of substances. The aim of this study was to evaluate the properties of this cell line and to verify whether it is a suitable model for testing the neurotoxicity of substances that could negatively affect the human organism. The introductory part focuses on characterization of SH-SY5Y cell line and description of its origin. Subsequently, differentiation of SH-SY5Y cells including main selected differentiation agents is described in detail. Advantages and disadvantages of utilizing SH-SY5Y cells for neurotoxicity testing are mentioned in the main part of the thesis as well as substances, which testing is often associated with SH-SY5Y cell line. Other cell lines which are also cell models for neurotoxicity studies, are described at the end.

KEYWORDS

SH-SY5Y cell line, Neurotoxicity, Differentiation, Retinoic acid

OBSAH

ÚVOD.....	14
1 BUNĚČNÁ LINIE SH-SY5Y	15
1.1 Kultivace SH-SY5Y buněk	17
1.1.1 Pasáž udržovacích kultur SH-SY5Y.....	19
1.1.2 Zamrazení buněk SH-SY5Y	19
1.1.3 Rozmrazení a kultivace nerozlišených buněk SH-SY5Y	20
1.2 Výhody a nevýhody buněčné linie SH-SY5Y	21
1.3 Diferenciace buněčné linie SH-SY5Y.....	22
1.3.1 Vznik SH-SY5Y buněk v průběhu jednotlivých dnů.....	25
1.3.2 Diferenciace navozená kyselinou retinovou	29
1.3.3 Diferenciace navozená estery fosfolu	30
1.3.4 Diferenciace navozená pomocí dibutyryl-cAMP.....	31
1.3.5 Diferenciace navozená neurotropiny.....	32
1.3.6 Diferenciace navozená dalšími látkami.....	33
2 VYUŽITÍ SH-SY5Y BUNĚK PRO TESTOVÁNÍ NEUROTOCICITY.....	34
2.1 Parkinsonova choroba	35
2.2 Cisplatina a oxaliplatina	37
2.3 Křemík.....	38
2.4 Arsen a dopamin	39
2.5 Amfetamin a jeho metabolity.....	40
2.6 Methylrtuť, kyselina okadaová a akrylamid	41
3 DALŠÍ BUNĚČNÉ MODELY PRO TESTOVÁNÍ NEUROTOXICITY	43
3.1 Buněčná linie SK-N-SH	43
3.2 Buněčná linie SK-N-MC.....	44
3.3 Buněčná linie SK-N-BE.....	44
ZÁVĚR.....	46
POUŽITÁ LITERATURA.....	48

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Imunofluorescenčně značené markery neurální diferenciaci.....	23
Obrázek 2: Morfologický vzhled nediferencovaných a diferencovaných SH-SY5Y buněk	24
Obrázek 3: Harmonogram postupu diferenciaci.....	27
Obrázek 4: Průběžné kroky diferenciaci	28

SEZNAM ZKRATEK

4-OHAMPH	4-hydroxyamfetamin
4-OHNE	4-hydroxynorefedrin
AD	Alzheimerova choroba
ADHD	porucha pozornosti s hyperaktivitou
AMPH	amfetamin
ASD	porucha autistického spektra
ATSDR	agentura pro registr toxických látek a nemocí
Bcl-2	antiapoptotický protein
BDNF	mozkový neurotrofní faktor
bFGF	fibroblastový růstový faktor
BMP-2	kostní morfogenetický protein 2
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CDDP	cis-diaminedichlorplatinum (II)
CNS	centrální nervový systém
CNTF	ciliární neurotrofní faktor
D2 a D3	receptory dopaminu
DA	dopamin
DAT	dopaminový transportér
dbcAMP	dibutyrylcyklický adenosinmonofosfát
DBH	dopamin- β -hydroxyláza
DMEM	Dulbeccoovo modifikované Eaglovo médium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrice
EtOH	ethanol
EV71	enterovir 71
FBS	fetální bovinní sérum
GAP-43	protein asociovaný s růstem
GDNF	neurotrofický faktor odvozený z gliových buněk
GFAP	gliový fibrilační acidický protein
GSH	glutathion
hiFBS	tepelně inaktivované fetální bovinní sérum

HSV	herpes simplex virus
ChAT	cholin acetyltransferáza
CHX	cykloheximid
IGF1	inzulinový růstový faktor I
LDH	laktát-dehydrogenáza
MAP	s mikrotubuly asociovaný protein
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinová kináza
MDMA	3,4-methylenedioxymethamphetamin
MPH	methylfenidát
MPP+	1-methyl-4-fenylpyridinium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazolium-bromid
NA	noradrenalin
NAC	N-acetylcystein
NeuN	protein neurálního jádra
NGF	nervový růstový faktor
NPY	neuropeptid tyrosinu Y
NSE	neuron specifická enoláza
NT-3	neurotrophin-3
NT-4/5	neurotrophin-4/5
NTR	neurotrophinový receptor
ODC	ornithin-dekarboxyláza
OHP	oxalato (trans-1,2-diamminocyklohexan) platina (II)
PBS	fosfátový pufr
PC12	feochromocytomová buňka potkanů
PD	Parkinsonova choroba
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PNS	periferní nervový systém
RA	kyselina retinová
RAR	receptory kyseliny retinové
RARE	prvek reakce kyseliny retinové
RNA	ribonukleová kyselina
RXR	receptory retinoického X

SH-SY	buněčná linie a první subklon buněčné linie SK-N-SH
SH-SY5	buněčná linie a druhý subklon buněčné linie SK-N-SH
SH-SY5Y	buněčná linie a třetí subklon buněčné linie SK-N-SH
SK-N-BE	neklonovaná neuroblastomová buněčná linie (1972)
SK-N-MC	neklonovaná neuroblastomová buněčná linie (1971)
SK-N-SH	neklonovaná neuroblastomová buněčná linie (1970)
SV2	synaptický vezikulární protein II
SYN	synaptofysin
TC50	toxická koncentrace (50%)
TGF- β ; β 1	transformující růstový faktor β , β 1
TH	tyrosin-hydroxyláza
TPA	fosfol-12-O-tetradekarbol-13-acetát
TRK	tyrosinkináza
Trypsin-EDTA	trypsin-ethylendiamintetraoctová kyselina
typ I	fenotyp buněk mezibuněčné hmoty
typ N	fenotyp neurálních buněk
typ S	fenotyp Schwannových buněk
TYR	tyrosin
VACht	vezikulární acetylcholinový transportér
VMAT	vezikulární monoaminový transportér
VZV	varicella zoster virus

ÚVOD

Toxicitu látek a účinnost léčiv je třeba před jejich použitím testovat. Nejčastěji jsou k testování využívány zvířecí modely. S postupem času je však z etických a morálních důvodů upřednostňováno testování škodlivých látek na nově vyvíjených buněčných modelech, které dokážou zvířecí modely plně nahradit. Mezi velké objevy v neurologii patřily neurální buněčné linie SK-N-SH, SK-N-MC, SK-N-BE a zejména SH-SY5Y, které slouží k pochopení neurologických onemocnění a objevování nových škodlivých látek pro lidský organismus.

SH-SY5Y je lidská buněčná linie, která byla získána klonováním z buněčné linie SK-N-SH. Důležité je, že tato linie je díky svým vlastnostem hojně využívána jako neurální model v neurologických experimentálních studiích týkajících se neurotoxického působení látek na lidský organismus. Buněčná linie SH-SY5Y se vytváří za přísných aseptických podmínek složitým postupem, který je složen z mnoha kroků. Buněčná linie SH-SY5Y je často diferencována ve zralé neurální buňky za použití různých látek, zejména je diferenciací prováděna pomocí kyseliny retinové. SH-SY5Y buňky se tak stávají stabilním modelem pro studium neurodegenerativních onemocnění. Buněčná linie SH-SY5Y se používá ke zkoumání Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby, patogeneze virových infekcí, lidského cytomegaloviru, viru varicella-zoster, enteroviru 71, viru herpes simplex a k hledání přírodních nebo uměle vytvořených neurotoxinů či neuroprotektantů. Existují i jiné alternativní buněčné linie, které jsou pro testování neurotoxicity využívány. Jedná se zejména o linie SK-N-SH, SK-N-MC, SK-N-BE, ale jejich význam není takový, jako linie SH-SY5Y.

1 BUNĚČNÁ LINIE SH-SY5Y

Vhodné systémy *in vivo* a *in vitro*, které poskytují translační modely lidských nemocí, jsou nedílnou součástí výzkumu v neurobiologii a neurovědách. Mezi tradiční experimentální modely *in vitro* používané v neurobiologii patří primární neurální kultury potkanů a myší, neuroblastomové buněčné linie včetně buněk krys B35, myší buňky Neuro-2A, či potkaní buňky PC12. I když mnoho vědeckých pracovníků na tyto modely spoléhá, postrádají lidskou složku a pozorované experimentální účinky by mohly být specifické pouze pro příslušný druh, ze kterého buňky pochází. Ačkoli jsou tyto buňky neurálního původu, mohou mít nestabilní karyotypy, což činí jejich použití problematickým například pro studie genové exprese a reprodukční studie buněčné signalizace. Pro studium lidských neurologických onemocnění je důležité používat modely konzistentnější (Shiple et al., 2016).

SH-SY5Y buňky jsou podobné neuroblastům, jsou totiž subklonem neklonované rodičovské neuroblastomové buněčné linie SK-N-SH (Shiple et al., 2016; Biedler et al., 1973). Z této buněčné linie byly připraveny až třetím klonováním. Nejprve byly klonovány jako SH-SY, poté jako SH-SY5, a nakonec při třetím klonování byla vytvořena linie SH-SY5Y (Kovalevich et al., 2013). Rodičovská buněčná linie byla původně vytvořena v roce 1970 biopsií z kostní dřve pacienta s neuroblastomem, který byl sympatického adrenergního gangliálního původu (Biedler et al., 1973). Takto získaná buněčná linie obsahovala buňky podobné neuroblastům i epitelu (Shiple et al., 2016; Biedler et al., 1973). SK-N-SH buněčná linie je od počátku 80. let široce využívána jako neurální model, neboť tyto buňky mají mnoho biochemických a funkčních vlastností neuronů. Buněčná linie SK-N-SH obsahuje buňky se třemi různými fenotypy: neurální buňky (typ N), Schwannovy buňky (typ S) a buňky mezibuněčné hmoty (typ I) (Joshi et al., 2006). Buněčná linie SH-SY5Y je poměrně homogenní neuroblastomová buněčná linie typu N. Vykazuje aktivitu enzymů neurálních markerů tyrosinu (TYR) a dopamin- β -hydroxylázy (DBH), specifické vychytávání noradrenalinu (NA) a exprimuje jeden nebo více proteinů neurofilamenta. Tyto buňky také exprimují receptory opioidního, muskarinového a nervového růstového faktoru (NGF) (Ciccarone et al., 1989). Navíc buňky SH-SY5Y mají schopnost proliferace, což znamená dlouhodobou možnost

množení buněk v kultuře, a proto mají předpoklady být *in vitro* buněčným modelem. SH-SY5Y buňky mají stabilní karyotyp skládající se ze 47 chromozomů. Zároveň je možné u SH-SY5Y buněk navodit jejich diferenciaci pomocí různých látek, zejména pomocí kyseliny retinové (RA) (Singh et al., 2007; Kovalevich et al., 2013), pomocí esterů fosfolu, mezi kterými je důležité zmínit fosfol-12-O-tetradekarbol-13-acetát (TPA) (Kovalevich et al., 2013; Pählman et al., 1981). Dále se pro buněčnou diferenciaci využívají neurotropiny, kde se uplatňuje především mozkový neurotrofní faktor (BDNF) (Cernaianu et al., 2008), dibutyrylcyklický adenosinmonofosfát (dbcAMP) (Kume et al., 2008; Kovalevich et al., 2013), nebo staurosporin (Kovalevich et al., 2013). V důsledku toho je buněčná linie SH-SY5Y široce používána v experimentálních neurologických studiích, včetně analýzy diferenciaci neuronů, metabolismu a funkce související s neurodegenerativními a neuroadaptivními procesy, neurotoxicitou a neuroochranou. Předchozí důkazy naznačují, že použití různých metod může selektovat specifické neuronové podtypy, jako jsou adrenergní, cholinergní a dopaminergní neurony (Pählman et al., 1984; Xie et al., 2010). Tento aspekt činí SH-SY5Y buňky užitečnými pro řadu neurobiologických experimentů.

1.1 Kultivace SH-SY5Y buněk

Pasážování, zmrazení, rozmrazení, kultivace nerozlišených buněk a diferenciací SH-SY5Y buněk v průběhu jednotlivých dnů se provádí za přísných aseptických podmínek a během 18 dnů lze vytvořit vysoce životaschopné, homogenní, diferencované neuronové kultury, které lze použít pro následné biochemické a zobrazovací analýzy. Mezi faktory, které jsou zásadní pro získání reprodukovatelných a životaschopných neurálních kultur, patří použití tepelně inaktivovaného fetálního bovinního séra (hiFBS), minimalizace doby inkubace buněk s trypsinem a jemné rozmělnění pevné látky na prášek. Diferenciací SH-SY5Y buněk závisí na postupné sérové deprivaci, na přidání RA, BDNF, extracelulárních matrixových proteinů a na sériovém dělení s cílem vybrat diferencované zralé přidružené neurony (Shiple et al., 2016).

Před použitím je nutné nechat médium zahřát a vyrovnat pH v inkubátoru, aby před každým krokem došlo k vytvoření správné pH rovnováhy. Nejčastěji je používán dvoustupňový postup štěpení, který vyžaduje, aby byly částečně diferencované SH-SY5Y buňky trypsinizovány. Pro tyto mimořádně křehké buňky je to stresující proces, a proto je důležité inkubovat buňky v trypsinu po minimální dobu. To umožní přednostní uvolnění neuronů, takže buňky podobné epitelu zůstanou stále připojeny k misce. Rozmělnění diferencovaných buněk se provádí pomalou rychlostí. Vlastní postupy přípravy buněčné linie SH-SY5Y byly popsány ve studii Shiple et al., 2016 a jsou uvedeny v tabulce 1.

Tab. I: **Pokyny pro přípravu buněčné linie SH-SY5Y** (převzato a upraveno z Shipley et al., 2016); zkratky: RA – kyselina retinová; EtOH – ethanol; KCl – chlorid draselný; db-cAMP – dibutyrylcyklický adenosinmonofosfát; BDNF – mozkový neurotrofni faktor; hiFBS – tepelně inaktivované fetální bovinní sérum.

Složka	Mr	Zásobní koncentrace látky	Příprava a uchování
10 μ M RA (Citlivá na teplo, světlo a vzduch.)	(300,44 g/mol)	5 mM	Promíchat 50 mg RA ve 33,3 ml 95% EtOH. Uchovávat ve tmě při 4°C. Při použití naředit v diferenčním médiu v poměru 1:500.
1x B-27	B-27 přídavek	neuveдена	Skladovat při -80 °C.
20 mM KCl	(74,55 g/mol)	1 M	K 18,6 g KCl přidat 250 ml vody.
2 mM db-cAMP (Citlivý na světlo a vlhkost.)	(491,37 g/mol)	1 M	Promíchat lahvičku přidáním 2,04 ml vody do 1 g db-cAMP.
50 ng/ml BDNF	neuveдена	neuveдена	10 μ g BDNF promíchat v 1 ml Neurobazálního média + 1x B27 (nebo 5 μ g ampulky v 0,5 ml Neurobazálního média + 1x B27), aby bylo získáno 10 μ g/ml. Při použití naředit v diferenčním médiu v poměru 1:200. Skladovat při -80 °C.
hiFBS	neuveдена	neuveдена	Zahřát na 56 °C ve vodní lázni po dobu 30 min a každých 10 minut obracet. Skladovat při -20 °C.

1.1.1 Pasáž udržovacích kultur SH-SY5Y

Nejprve je nutné rozdělit udržovací kultury. To je prováděno v okamžiku, kdy buňky dosáhnou konfluence, tj. splynutí na kultivační nádobě, a jejich číslo pasáže se pohybuje v rozmezí mezi 10. a 15. pasáží. Kultury je obvykle potřeba pasážovat jednou za 3–5 dní (Kovalevich et al., 2013; Shipley et al., 2016). Pasážování je proces, při kterém dochází k přenesení původních kultivovaných buněk do nové kultivační nádoby s čerstvým živným prostředím. Zároveň při tomto procesu dochází k redukci počtu původních kultivovaných buněk, protože je do nové kultivační nádoby nasazena pouze část buněk původních. Kultivační nádoba s buňkami je propláchnuta pomocí přibližně 10 ml fosfátového pufru (PBS), který je následně odsán. Poté je nutné přidat 2,5 ml 0,05% trypsin ethylendiamintetraoctové kyseliny (Trypsin-EDTA), která účinkuje efektivněji při absenci séra, protože sérum inhibuje jeho aktivitu (Kovalevich et al., 2013; Shipley et al., 2016). Po splnění tohoto postupu proběhne 2–3minutová inkubace v inkubátoru a po jejím skončení je kultivační nádoba opatrně nakloněna, aby se uvolnily buňky z povrchu. Dále je třeba přidat 10 ml základního růstového média a 1–2krát triturovat, čímž dojde k jemnému rozmělnění pevné látky na prášek. Následuje centrifugace po dobu 2 minut při 1 000 × g, odsátí média a promíchání pelety s 5 ml základního růstového média. Závěrem dojde k zředění buněk v poměru 1:3 až 1:5 v celkovém objemu 20 ml pro normální nanášení do kultivační nádoby T-75 nebo je spočítána a označena destička pro rozlišení (Shipley et al., 2016).

1.1.2 Zamrazení buněk SH-SY5Y

Při zamrazování buněčných linií je třeba dodržet několik základních pravidel. Velmi důležité je zamrazovat pouze časně pasáže neuroblastomů SH-SY5Y v základním růstovém médiu (Kovalevich et al., 2013; Shipley et al., 2016), které je doplněné o 5% (v/v) dimethylsulfoxidu (DMSO). V první fázi zamrazení jsou části buněk zmrazeny na teplotu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, a to po dobu 24 hodin. Poté dojde k převedení již zamrazených buněk do kapalného dusíku, kde mohou být dlouhodobě uchovávány (Kovalevich et al., 2013; Shipley et al., 2016).

1.1.3 Rozmrazení a kultivace nerozlišených buněk SH-SY5Y

K rozmrazení buněk dojde ve vodní lázni o teplotě 37 °C během 2 minut (Kovalevich et al., 2013). Následně je nutné buňky promíchat v 9 ml základního růstového média a centrifugovat po dobu 2 minut při 1000 × g. Poté je odsán supernatant a buňky je třeba jemně promíchat v 10 ml základního růstového média. Závěrem dojde k přenesení do kultivační nádoby a výměně média, aby byly odstraněny odumřelé buňky (Shiple et al., 2016).

1.2 Výhody a nevýhody buněčné linie SH-SY5Y

K výhodám patří schopnost rozsáhlé expanze před diferenciací s relativní snadností a nízkými náklady ve srovnání s primárními neurony. Jelikož jsou buňky SH-SY5Y buněčnou linií, etické obavy spojené s lidskými primárními neurálními kulturami se jich netýkají. Navíc vzhledem k tomu, že SH-SY5Y buňky jsou lidského původu, vyjadřují množství proteinů specifických pro člověka a proteinových izoform, které se v primárních kulturách hlodavců nevyskytují. Diferenciace navíc synchronizuje buněčný cyklus, který může dramaticky kolísat v nediferencovaných SH-SY5Y buňkách a dalších běžně používaných buněčných liniích a vytvářet homogenní populaci neurálních buněk (Encias et al., 2000; Ross et al., 1983).

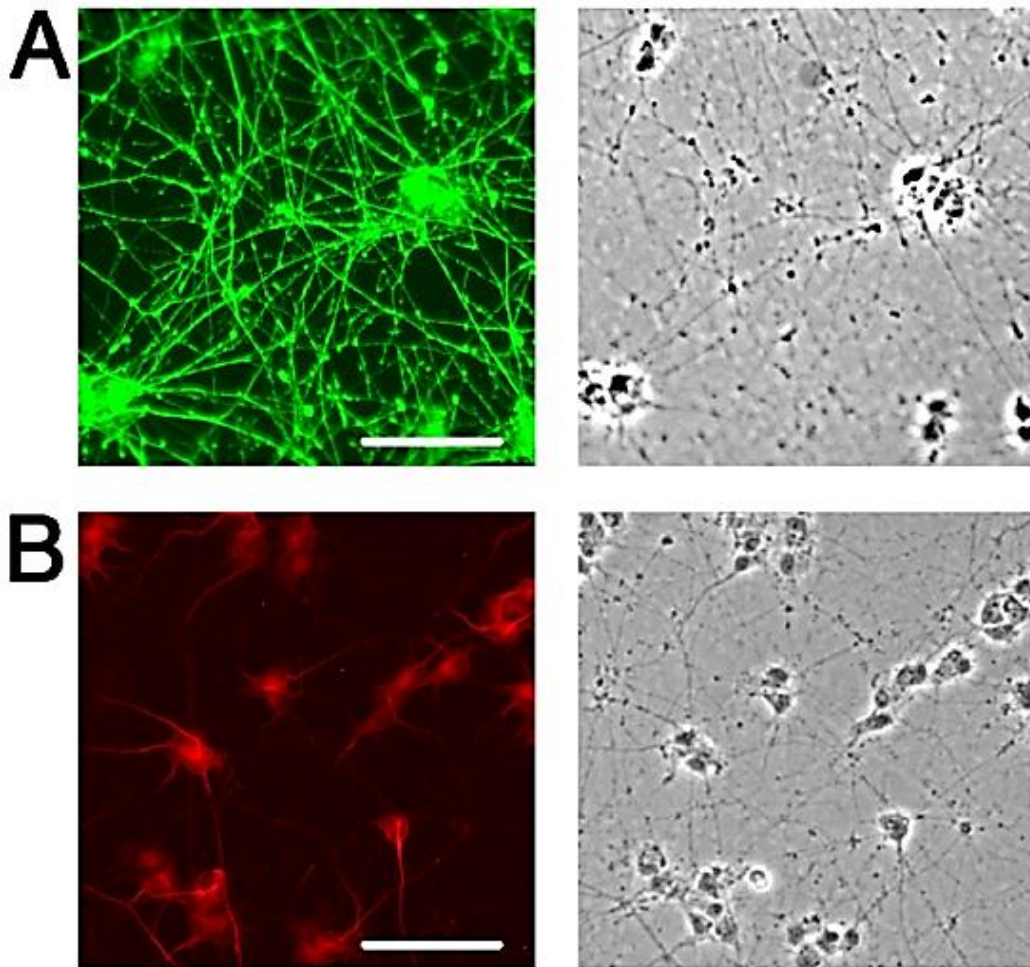
Ačkoli nediferencované a diferencované SH-SY5Y buňky jsou široce používány jako buněčný model pro studium Parkinsonovy choroby (PD), použití nediferencovaných SH-SY5Y buněk s sebou nese určité nevýhody. První z nich je, že patří mezi kontinuálně se dělící buněčné linie a počet nediferencovaných SH-SY5Y buněk se v průběhu experimentu zvyšuje, takže je obtížné rozlišit, zda neuroprotektivní a neurotoxické látky ovlivňují rychlost proliferace nebo rychlost odumírání buněk (Datki et al., 2003). Druhou významnou nevýhodou je, že SH-SY5Y buňky jsou v kulturách nesynchronizované, a ne vždy vykazují typické markery zralých neuronů, což při experimentech vede k nejistotě. Třetí nevýhodou je, že nediferencované SH-SY5Y buňky nevyjadřují vysoké hladiny syntetických enzymů dopaminu (DA) a dopaminových transportérů (DAT) (Presgraves et al., 2004). Poslední nevýhodou je, že nediferencované SH-SY5Y buňky vykazují nižší citlivost na neurotoxiny a neuroprotektivní látky než primární mezencefalické neurony (Storch et al., 2000). Problémem, který je také třeba řešit, je vstup 1-methyl-4-fenylpyridinimu (MPP⁺) do nediferencovaných SH-SY5Y buněk, který je odlišný od vstupu do neuronů *in vivo*. Navíc nízká exprese DA receptorů ztěžuje studium léčebných účinků agonistů DA u PD. Přestože buňky SH-SY5Y exprimují aktivitu DBH a tyrosin-hydroxylázy (TH), může být syntéza katecholaminů DA a NA omezena nedostatkem aktivity dihydroxyfenylalanin-dekarboxylázy (Ikeda et al., 1994).

1.3 Diferenciace buněčné linie SH-SY5Y

Schopnost vědců diferencovat neuroblastomové buňky SH-SY5Y na buňky s vyspělejším neuronovým fenotypem pomocí manipulace s kultivačním médiem přinesla řadu výhod v oblasti neurovědeckého výzkumu (Kovalevich et al., 2013). Při diferenciaci mají buňky SH-SY5Y více biochemické, ultrastrukturální, morfologické a elektrofyziologické podobnosti s neurony (Xie et al., 2010). Po diferenciaci se buňky přestanou množit, stanou se stabilní populací a vykazují rozsáhlý „nervový výrůstek“ (Fagerström et al., 1996) s morfologickou podobností s živými neurony v lidském mozku. Od roku 1981, kdy byl bioaktivní TPA poprvé použit k indukci diferenciaci SH-SY5Y buněk, bylo zveřejněno velké množství diferenciacních protokolů. Diferencované buňky se od nediferencovaných buněk liší také úrovní neurotransmiterových a neuropeptidových receptorů, jako je DA (Millan et al., 2004) a opioidy (Jenab et al., 2002). Vysoké hladiny DBH, TH a DAT aktivity v diferencovaných SH-SY5Y buňkách jsou rovněž funkčními ukazateli diference adrenergních neuronů. Tyto vlastnosti naznačují, že díky diferenciaci dochází k velké podobnosti s vlastnostmi zralých neuronů. Ačkoliv se diferencované SH-SY5Y buňky liší od dospělých neuronů v lidském mozku, diferencované SH-SY5Y buňky se mohou stát ideálním modelem i pro složitější neurologické studie.

Existují důkazy, že diferencované SH-SY5Y buňky jsou více excitovatelné a jejich membránový potenciál se oproti nediferencovaným buňkám zvyšuje. Tyto buňky například začínají uvolňovat NA po stimulaci acetylcholinu (Akerman et al., 1984), expresi funkčních změn vodivosti draslíku (Tosetti et al., 1998) a vstupu Ca^{2+} indukovaného hormonu (Brown et al., 2005).

Několik studií zaznamenalo významné rozdíly mezi SH-SY5Y buňkami v jejich nediferencovaných a diferencovaných stavech. Je důležité, aby při diferenciaci SH-SY5Y buněk byly buňky inkubovány trypsinem po minimální dobu, aby se zajistilo, že se z misky uvolní pouze neurony. Nediferencované epiteliální buňky, které by jinak kontaminovaly diferencovanou populaci neurálních buněk, se díky krátkodobé trypsinizaci nestihnou uvolnit ze dna kultivační nádoby. Neuronové charakteristiky plně diferencovaných SH-SY5Y buněk jsou demonstrovány technikami, jako je imunofluorescenční detekce klasických neurálních markerů (Shipley et al., 2016).



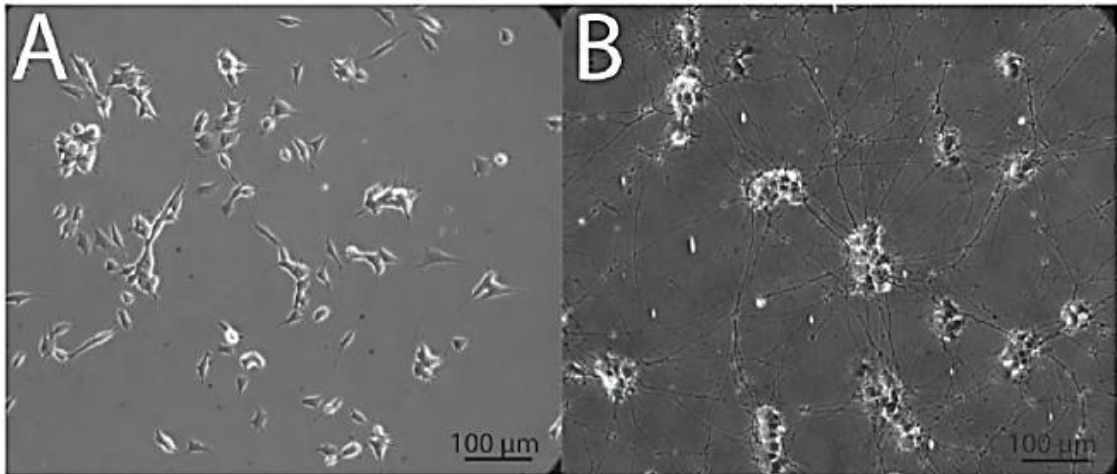
Obrázek 1. Imunofluorescenčně značené markery neurální diferenciace

(převzato a upraveno z Shipley et al., 2016).

A) vlevo Anti-SMI31 (zelená) barví fosforylované neurofilamentum H v rozsáhlé síti neuritů, vpravo odpovídající obraz ve fázovém kontrastu

B) vlevo AntiMAP2 (červená) označuje protein 2 spojený s mikrotubuly a odhaluje neurální tělo a proximální část neuritů, vpravo odpovídající obraz ve fázovém kontrastu obrácený epifluorescenční mikroskop; zvětšení 10×; měřítko 100 μm .

Nediferencované buňky se rychle množí a jeví se jako nepolarizované s velmi malým počtem krátkých výběžků rozšiřujících se ven. Často mají tendenci růst ve shlucích a jejich expresní znaky svědčí o tom, že jsou velmi blízké nezralým neuronům (Kovalevich et al., 2013; Pählman et al., 1995). Buňky neuroblastomu (Shipley et al., 2016) kontinuálně proliferují, exprimují markery nezralých neuronů a postrádají markery zralých (Pählman et al., 1984). Nerozlišené buňky nejvíce připomínají nezralé katecholaminergní neurony (Lopes et al., 2010; Xie et al., 2010).



Obrázek 2. Morfologický vzhled nediferencovaných a diferencovaných SH-SY5Y buněk

(převzato a upraveno z Shipley et al., 2016).

A) nediferencované SH-SY5Y buňky

*B) diferencované SH-SY5Y buňky s protáhlými axony neuronů
obrácený epifluorescenční mikroskop; zvětšení 20×; měřítko 100 µm.*

Diferencované buňky mají naopak několik neuritických výběžků, které se připojují k okolním buňkám (Shipley et al., 2016), prodlužují dlouhé rozvětvené výběžky, snižují proliferaci a v některých případech i polarizují (Gimenez-Cassina et al., 2006; Kovalevich et al., 2013). Diferencované SH-SY5Y buňky představují homogenní neurální populaci a odstranění BDNF vede k buněčné apoptóze (Encinas et al., 2000). To naznačuje, že přežití diferencovaných SH-SY5Y buněk závisí na trofických faktorech, podobných vyspělým neuronům. Neexprimují sice gliové markery, jako je gliový fibrilační acidický protein (GFAP) (Encinas et al., 2000), ale bylo prokázáno, že plně diferencované SH-SY5Y buňky exprimují celou řadu různých markerů zralých neuronů včetně proteinu asociovaného s růstem (GAP-43), proteinu spojený s mikrotubuly (MAP), proteinu neurálních jader (NeuN), neuron specifické enolásy (NSE), synaptofysinu (SYN) a synaptického vezikulárního proteinu II (SV2) (Gimenez-Cassina et al., 2006; Cheung et al., 2009; Xie et al., 2010).

1.3.1 Vznik SH-SY5Y buněk v průběhu jednotlivých dnů

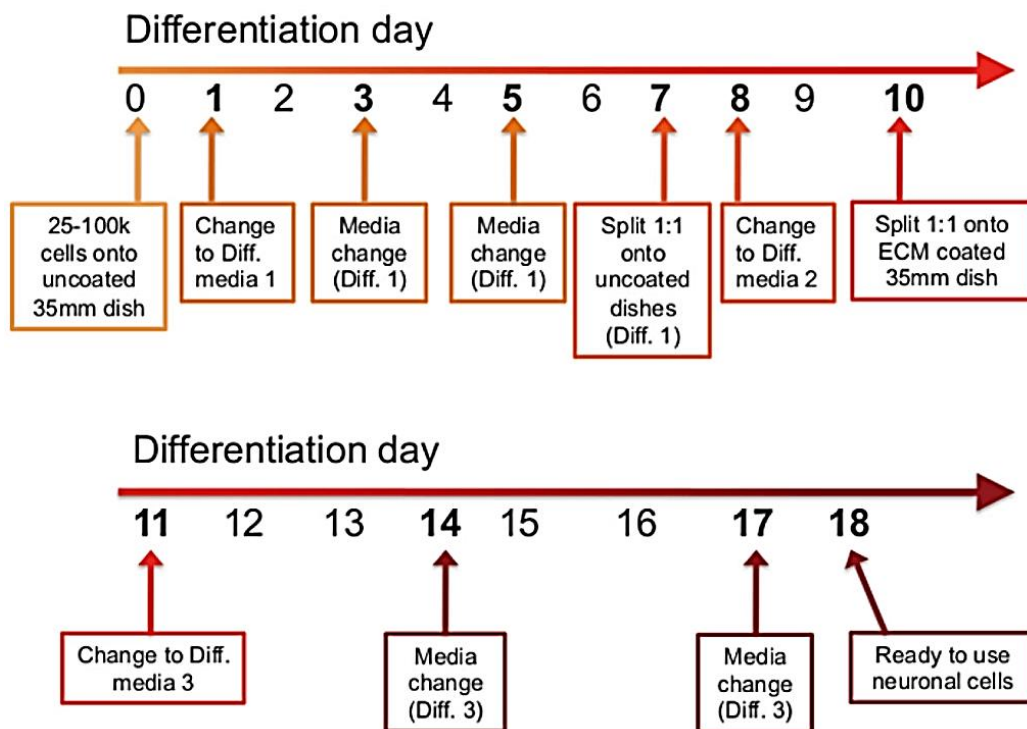
Nejprve musí dojít ke krytí buněk pro diferenciaci. Nediferencované buňky je třeba jednou opláchnout pomocí PBS, odsát a poté trypsinizovat za použití 1–2 ml zahřátého 0,05% roztoku Trypsin-EDTA. Po spojení buněk s trypsinem je nádoba vložena přibližně na 3 minuty do inkubátoru. Jakmile uplyne inkubační doba, musí být vyjmuta kultivační nádoba z inkubátoru, dále musí být přidáno 10 ml základního růstového média, opláchnuty stěny kultivační nádoby a poté jemně 1–3krát triturovat. Následně je obsah přenesen do centrifugační zkumavky a vložen do centrifugy, kde se odstředuje přibližně 2 minuty při $1000 \times g$. Po skončení dojde k odsátí média, resuspendaci zbylé pelety v 5 ml růstového média a opět k trituraci. Následuje sčítání buněk pomocí hemocytometru a zředění základním růstovým médiem, asi 2 ml buněk se nanesou na misku a umístí zpět do inkubátoru (Shiple et al., 2016).

Další den dojde ke změně média (Rozlišovací médium č. 1). Rozlišovací médium č. 1 o objemu 50 ml je vyhřáto na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, a poté ponecháno hodinu v inkubátoru ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\text{ }\%$ CO_2), aby se před použitím vytvořila správná pH rovnováha. Do zahřátého a rovnovážného média je bezprostředně před jeho přidáním do misek aplikována RA. Následně dojde k odsátí starých médií, přidání 2 ml rozlišovacího média č. 1 s RA na misku a vložení zpět do inkubátoru. Vše se po dobu 3 dnů opakuje.

Díky přidání RA do zahřátého a rovnovážného rozlišovacího média č. 1 dojde k rozdělení buněk 1:1 a k odsátí starých médií. Do kultivační nádoby je nutné přidat 200 μl zahřátého roztoku 0,05% Trypsin EDTA a vše zahřát v inkubátoru po dobu přibližně 2–3 minut. Přidáním 2 ml rozlišovacího média č. 1 s RA na misku dojde k potlačení trypsinu a pomocí média k opláchnutí zbývajících neurálních buněk. Poté je obsah přenesen do nové kultivační nádoby o objemu 50 ml a pouze 2 ml buněčné suspenze jsou přeneseny do misek a uloženy zpět do inkubátoru. V dalším kroku dojde ke změně média (Rozlišovací médium č. 2), kdy je do zahřátých a rovnovážných médií přidána RA bezprostředně před přidáním média do misek. Stará média je opět nutné odsát. Následuje přidání 2 ml rozlišovacího média č. 2 s RA na misku a uložení do inkubátoru (Shiple et al., 2016).

Devátý den je připravena extracelulární matrice (ECM) rozpuštěním jedné lahvičky roztoku ECM na ledu, kterou je nutno zředit v poměru 1:100 na studené

Dulbeccovo modifikované Eaglovo médium (DMEM). Do každé misky se přidají 2 ml směsi a následně umístí do inkubátoru (37 °C, 5 % CO₂) na 1 hodinu nebo maximálně přes noc. Směs aspirátu je potřeba nechat v digestoři oschnout na přibližně 1 hodinu a uchovat při pokojové teplotě po dobu až 2 měsíců. Další den se buňky převádí na nanosené desky ECM 1:1. Do zahřátých a rovnovážných médií je přidána RA a jsou odsáta média. Každá miska je poté obohacena o 200 µl zahřátého trypsinu a uložena do inkubátoru při pokojové teplotě po dobu přibližně 1–2 minut nebo dokud nebudou neurony viditelně zvednuty z misek pozorovaných pod mikroskopem. Trypsin může být potlačen přidáním 2 ml rozlišovacího média č. 2 na misku a pomocí média se následně opláchnou zbývající neurální buňky. Poté je obsah přenesen do kuželovité kultivační nádoby o objemu 50 ml, následně dojde k vyjmutí 2 ml buněčné suspenze do misek potažených ECM a umístění zpět do inkubátoru. Jedenáctý den dojde ke změně média (Rozlišovací médium č. 3), kdy se do zahřátých a rovnovážných médií přidá RA, a dále k odsátí starých médií. Poté jsou přidány 2 ml rozlišovacího média č. 3 s RA na misku a vše je vloženo opět do inkubátoru. Další dva dny se tento postup opakuje a posledním dnem jsou neurální kultury připravené k použití. Pro udržení neuronového zdraví je médium každé 3 dny vyměněno na čerstvé rozlišovací médium č. 3 s RA.

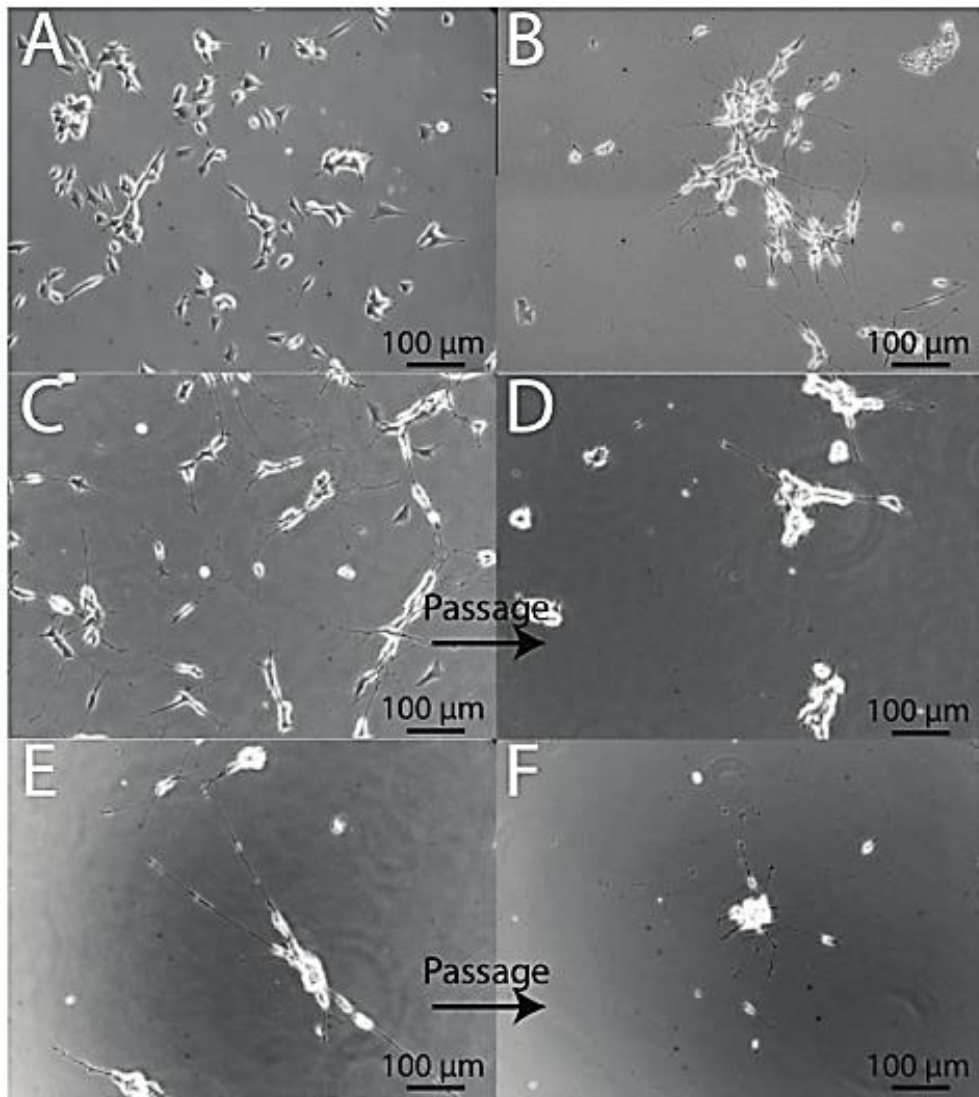


Obrázek 3. **Harmonogram postupu diferenciacie**

(převzato z Shipley et al., 2016).

Proces diferenciacie sestává z 11 kroků rozložených do 18 dnů. První den diferenciačního protokolu (den 0) se na nepotažené misky o velikosti 35 mm nanese 25 000 až 100 000 buněk. 1., 3. a 5. den je odstraněno staré médium a je použita metoda rozlišovacího média č. 1. 7. den jsou buňky rozděleny 1:1 na nenatírané 35 mm nádoby v rozlišovacím médiu č. 1. 8. den je médium změněno na rozlišovací médium č. 2 a 10. den jsou buňky opět rozděleny v poměru 1:1, ale tentokrát na 35 mm misky v ECM obalu v rozlišovacím médiu č. 2. 11., 14. a 17. den je odstraněno staré médium a použito rozlišovací médium č. 3. 18. den jsou diferencované neurony připraveny k použití pro následné aplikace.

Kultury jsou obvykle stabilní až 14 dní po terminální diferenciaci, nicméně trvání životaschopnosti neuronů závisí na počtu pasáže nediferencovaných buněk na začátku diferenciacie. Vyšší počty pasáží poskytují diferencované neurony s kratší dobou životnosti (Shipley et al., 2016).



Obrázek 4. Průběžné kroky diferenciace

(převzato a upraveno z Shipley et al., 2016).

- A) 1. den diferenciace: před zavedením diferenciačního média č. 1 mají buňky plochý zasunutý fenotyp s krátkými výběžky. B) 5. den buňky diferenciace: buňky SH-SY5Y vyvíjejí delší projekce a vykazují více neurální fenotyp. C) 7. den diferenciace: buňky vykazují vysoký počet dlouhých výběžků, přičemž menší počet buněk vykazuje epiteliální fenotyp. D) 8. den diferenciace: po rozdělení se vytvoří shluky buněčných těles a výběžky se v důsledku průchodu jeví jako krátké. E) 10. den diferenciace: buňky demonstrují delší výběžky, které navazují spojení s blízkými buňkami. F) 11. den diferenciace: buňky jsou po druhé pasáži vystresované a mnoho neuronů je nakonec ztraceno.

Zbývající populace je životaschopná, homogenní a neurální ve fenotypu. Buněčná tělesa produkují větší shluky a výběžky začínají emitovat ze základny shluků.

1.3.2 Diferenciace navozená kyselinou retinovou

Kyselina retinová (RA) je nejčastěji používaným činidlem pro diferenciaci a její účinky na SH-SY5Y buňky jsou dobře charakterizovány. Obvykle se podává do média bez séra v koncentraci 10 μ M po dobu minimálně 3–5 dnů, aby se vyvolala diferenciace (Påhlman et al., 1984; Cheung et al., 2009). Patří mezi deriváty vitamínu A, o němž je známo, že má silné růstové a buněčné diferenciační vlastnosti. Ve skutečnosti je ale jeho nedostatek spojen s rozvojem skvamózní metaplazie v různých epiteliálních tkáních, zatímco podávání vitamínu A může tyto účinky zvrátit a obnovit normální buněčnou diferenciaci (Lotan, 1996).

Kyselina retinová uplatňuje své účinky vazbou na receptory kyseliny retinové (RAR) a receptory retinoického X (RXR), což jsou skupiny nesteroidních receptorů jaderného hormonu. Ačkoliv se RA může vázat pouze na RAR, aktivovaná RAR heterodimerizuje s RXR a RAR/RXR heterodimery se váží na prvek reakce RA (RARE), což má za následek transkripční aktivaci RA (Joshi et al., 2006).

Fenotyp buněk SH-SY5Y léčených RA je v literatuře předmětem některých kontroverzí. Při léčbě RA dochází po stimulaci karbacholem k uvolňování NA (Encias et al., 2000), čímž následně dochází k diferenciaci SH-SY5Y buněk na adrenergní fenotyp. Jiné zprávy však ukázaly, že RA-diferencované SH-SY5Y buňky jsou zralého cholinergního fenotypu (Påhlman et al., 1984), což naznačuje vyšší expresi aktivity cholin acetyltransferázy (ChAT) (Adem et al., 1987) a vezikulárního monoaminového transportéru (VMAT) (Presgraves et al., 2004). Všechny zdroje naznačují, že neexistují významné rozdíly v expresi DAT a TH mezi RA-diferencovanými a nediferencovanými SH-SY5Y buňkami (Cheung et al., 2009; Presgraves et al., 2004). Některé DAergní/adrenergní vlastnosti SH-SY5Y buněčné linie byly sníženy léčbou RA, zatímco cholinergní vlastnosti byly zvýšeny. Ačkoliv RA sama produkuje fenotyp cholinergní neurální diferenciace, RA spolu s dalšími látkami, jako je cholesterol (Sarkanen et al., 2007) nebo TPA (Presgraves et al., 2004), může indukovat dopaminergní neurální fenotyp.

Bylo prokázáno, že použití RA podporuje přežití SH-SY5Y buněk prostřednictvím aktivace signální dráhy 3-kinázy fosfatidylinizolu/Akt a zvyšuje regulaci antiapoptotického proteinu Bcl-2 (Lopez-Carballo et al., 2002; Itano

et al., 1996). Některé studie navíc ukazují, že RA-diferencované buňky jsou méně zranitelné než nediferencované buňky vůči toxinu, který zprostředkovává buněčnou smrt neboli apoptózu (Cheung et al., 2009).

Apoptóza je jedním z typů programované buněčné smrti, která probíhá převážně u živočichů. Je to dědičná forma buněčného zániku naprogramovaného ve všech normálních buňkách, která umožňuje buňce spáchat molekulárně-kontrolovanou sebevraždu, přičemž nedochází k zánětu, poškození sousedních buněk ani prostředí buňky (Green et al., 2015; Fulda et al., 2010). Zahrnuje tedy sled biochemických reakcí, které mají za následek změny vzhledu buňky: degradaci cytoskeletu, smrštění buňky, membránové blebování, nebo fragmentaci chromozomů (pyknóza). Dochází i k odstranění zbytků těchto fragmentů, čímž se buňka liší od nekrózy, u které se právě vyvine zánět (Green et al., 2015; Fulda et al., 2010). Apoptické mechanismy se obecně řadí do tří drah. Vnější cesta smrtelného receptoru, vnitřní mitochondriální cesta a dráha závislá na granzymu (Green et al., 2015; Elmore et al., 2016). Mitochondriální dráha se spouští na základě ztráty integrity vnější mitochondriální membrány, která pomocí skupiny proteinů Bcl-2 umožňuje uvolňování proapoptických faktorů (např. cytochrom C) z mitochondrie do cytosolu, což končí aktivací kaspázových proteáz a štěpením intracelulárních proteinů, a proto dojde ke zmíněné „demontáži“ buňky (Green et al., 2015; Fulda et al., 2010; Elmore et al., 2016).

1.3.3 Diferenciace navozená estery fosfolu

Kromě diferenciace zprostředkované RA bylo prokázáno, že SH-SY5Y buňky se diferencují v přítomnosti esterů fosfolu, jako je např. acetát 12-O-tetradecanoyl-fosfol-13 (TPA) (Påhlman et al., 1981) a mají drastické účinky na růst a diferenciaci buněk. Použití TPA mělo za následek částečnou inhibici růstu, snížení aktivity ornithin-dekarboxylázy (ODC), přibližně dvojnásobné zvýšení aktivity NSE a výskyt cytoplazmatické neurosekreční granule, kterou lze vizualizovat pomocí elektronové mikroskopie (Påhlman et al., 1981; Påhlman et al., 1984). Bylo prokázáno, že buňky SH-SY5Y vystavené $1,6 \times 10^{-8}$ M TPA po dobu 4 dnů se jevíly morfologicky diferencované s dlouhými, rovnými výběžky nerovnoměrného vzhledu a s přítomností častých varikozit (Påhlman et al., 1981).

Diferenciační účinky esterů fosfolu jsou primárně zprostředkovány izoformami proteinkinázy C (PKC). Ta může zvýšit uvolňování NA v SH-SY5Y buňkách zvýšením aktivity Ca^{2+} kanálu (Fagerström et al., 1996). Jeden z hlavních rozdílů mezi diferenciací SH-SY5Y buněk za pomoci TPA a RA je, že použití TPA při optimální koncentraci vyvolává dvěstě násobný nárůst NA, zatímco u RA je nárůst pozorován pouze čtyřnásobný (Påhlman et al., 1984). TPA diferencované SH-SY5Y buňky navíc vykazují řadu vlastností adrenergního neurálního fenotypu, včetně exprese TH, neuropeptidu tyrosinu Y (NPY) a také NSE (Jalava et al., 1992).

Dostupné údaje naznačují, že RA a TPA mohou vyvolat diferenciaci SH-SY5Y buněk na cholinergní a adrenergní fenotypy prostřednictvím různých účinků na transformující růstový faktor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) a kostní morfogenetický protein 2 (BMP-2) (Gómez-Santos et al., 2002). TGF- β zvyšuje expresi TH a tento účinek je neutralizován BMP-2, což naznačuje, že prevalence jednoho nebo druhého z těchto faktorů může být důležitá pro konečné získání adrenergního nebo cholinergního fenotypu. Nicméně SH-SY5Y buňky léčené nejprve RA a poté TPA vyvíjejí DAergní fenotyp a mají vyšší hladiny TH a DAT, ale nižší hladiny VMAT než nediferencované buňky. Důležité je, že buňky diferencované RA/TPA mají vysokou hustotu receptorů D2 a D3 ve srovnání s nediferencovanými, RA-diferencovanými nebo TPA diferencovanými buňkami (Presgraves et al., 2004).

1.3.4 Diferenciace navozená pomocí dibutyryl-cAMP

Hormony a neurotransmitery, které regulují intracelulární hladiny cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), podporují diferenciaci v neurálních buňkách (Frey et al., 1993; Sanchez et al., 2004). Expozice SH-SY5Y buněk pomocí dbcAMP vede k rozšíření neuritu a také ke zvýšené expresi GAP43 souvisejícího s růstem neurálního markeru (Sanchez et al., 2004; Kume et al., 2008). Bylo prokázáno, že při použití 1 mM dbcAMP po dobu 3 dnů se snižuje buněčná agregace, která připomíná běžně pozorovanou agregaci u nediferencovaných kultur a vyvolává významné neuritové elongace a větvení (Kume et al., 2008). Dibutyryl-cAMP snižuje Bcl-2, na rozdíl od RA a TPA, které expresi Bcl-2 zvyšují, což zdůrazňuje biochemický rozdíl

mezi diferenciačními metodami. Dále bylo prokázáno, že diferenciace SH-SY5Y buněk pomocí dbcAMP vytváří morfologický fenotyp podobný tomu, který je pozorován u buněk s diferencovanou RA a TPA, a že diferencovanou kulturu tvoří především buňky adrenergního typu (Kovalevich et al., 2013).

1.3.5 Diferenciace navozená neurotropiny

Ukázalo se, že neurotropiny modulují přežití, diferenciaci, synaptogenezi a aktivitu neuronů. Rodina neurotropinů se skládá především z NGF, BDNF, neurotrophinu-4 (NT-4/5) a neurotrophinu-3 (NT-3). Tyto neurotropiny se mohou vázat na dva typy povrchových receptorů buněk: na receptory tyrosinkinázy (TRK) a receptory neurotropinu (NTR). Tyto receptory zprostředkovávají téměř všechny své aktivity podporující přežití, přičemž NGF aktivují přednostně TrkA a BDNF, NT-4/5 aktivují TrkB a NT-3 aktivují TrkC (Kaplan et al., 2000). Kromě toho se na indukci buněčné diferenciace podílí i několik dalších růstových faktorů, včetně základního fibroblastového růstového faktoru (bFGF), inzulinového růstového faktoru I (IGF1), neurotrofického faktoru odvozeného z gliových buněk (GDNF) a ciliárního neurotrofického faktoru (CNTF). Z těchto růstových faktorů účinně indukují diferenciaci SH-SY5Y buněk převážně bFGF a IGF1 (Lavenius et al., 1994).

SH-SY5Y buněčné linie obecně postrádají funkční neurotropinové receptory a při stimulaci neurotropiny nerozlišují. Nicméně léčba RA však způsobuje zvýšenou regulaci neurotropinových receptorů, což způsobuje, že SH-SY5Y buňky reagují na neurotropiny (Cernaianu et al., 2008). Přežití léčených buněk je závislé na nepřetržité koexistenci neurotropinů v kultivačním médiu (Kou et al., 2008). Jakmile jsou neurotropiny odstraněny z kultivačního média, buňky vstupují do apoptotické buněčné smrti doprovázené pokusem o znovuzahájení buněčného cyklu.

Protože přidání BDNF může zamezit hromadění S-typu v buňkách SH-SY5Y s RA (Encinas et al., 2000), sekvenční diferenciace s RA a BDNF (RA/BDNF) dává téměř homogenní populaci diferencovaných buněk podobných lidským neuronům. Byly poskytnuty důkazy, že léčba RA/BDNF vedla ke zvýšené expresi genů všeobecných neurálních markerů, cholinergních markerových genů vezikulárního acetylcholinového transportéru (VACHT) a ChAT, což naznačuje,

že léčba SH-SY5Y buněk RA/BDNF vyvolává posun od sympatického noradrenergního fenotypu k cholinergnímu neurálnímu fenotypu (Edsjö et al., 2003). Také bylo zjištěno, že buňky SH-SY5Y léčené RA/BDNF mají nízkou hladinu NA a nedostatek indukce TH, ale exprese NPY je zvýšená, což by mohlo naznačovat, že se buňky SH-SY5Y léčené RA/BDNF vyvíjejí v sympatický cholinergní neurální fenotyp (Edsjö et al., 2003). Další zjištění bylo, že buňky SH-SY5Y léčené RA/BDNF vykazují mnoho vlastností primárních DAergních neuronů, včetně aktivity TH a DAT, absorpce DA a uvolnění DA po stimulaci K⁺ (Mastroeni et al., 2009). K určení jejich fenotypu bude zapotřebí další studie SH-SY5Y buněk léčených RA/BDNF.

1.3.6 Diferenciace navozená dalšími látkami

Byla popsána i řada méně obvyklých alternativních metod k vyvolání diferenciace v buňkách SH-SY5Y (Kovalevich et al., 2013). Staurosporin, neselektivní inhibitor PKC, je silným induktorem diferenciace buněčné linie SH-SY5Y. Použití staurosporinu vykazuje zvýšenou náchylnost k toxickým inzulínům včetně cisplatin, 5-fluorouracilu, 6-OHDA a γ -záření a vyjadřují sníženou hladinu Bcl-2 (Tieu et al., 1999). V důsledku toho buňky léčené staurosporinem podléhají apoptóze v závislosti na dávce (Kovalevich et al., 2013). Indukuje zralý adrenergní neurální fenotyp charakterizovaný vzestupnou regulací aktivity TH, DAT a NPY a třicetinásobným zvýšením obsahu NA (Jalava et al., 1993). Guanosin a guanosin-5'-trifosfát vyvolávají zástavu buněčného cyklu v SH-SY5Y buňkách a silný nárůst hladiny TH a DAT. Tento jev podporuje názor, že tyto puriny indukují DAergní/adrenergní fenotyp (Guarnieri et al., 2009).

Mezi další metody patří léčba cholesterolem, vitamínem D, inzulínem nebo kultivace buněk na substrátu, který je určený k podpoře diferenciace neuronů a přežití (Kovalevich et al., 2013).

Hypoxie může také vyvolat fenotypové změny v buňkách neuroblastomu. V hypoxických podmínkách tyto buňky připomínají nezralé kmenové buňky. Molekulární mechanismy, které jsou základem diferenciace vyvolané hypoxií, jsou složité (Edsjö et al., 2007).

2 VYUŽITÍ SH-SY5Y BUNĚK PRO TESTOVÁNÍ NEUROTOXICITY

Neurotoxikologie se zabývá studiem nežádoucích účinků chemických či biologických neurotoxinů a některých fyzikálních činitelů na nervový systém. Nervový systém se skládá z centrálního nervového systému (CNS), kam můžeme zařadit mozek a míchu, a periferního nervového systému (PNS), který se skládá z ganglií a periferních nervů. V nervovém systému se nachází dva typy buněk: neurogliální buňky a neurony, které mají vlastnosti axonů a dendritů a umožňují vedení nervových impulsů pro komunikaci s jinými nervovými buňkami. Látky, které negativně ovlivňují nebo poškozují nervový systém, označujeme jako neurotoxiny. S řadou z nich se setkáváme v běžném životě (Harry et al., 1998).

Bylo zjištěno, že stále toxičtější prostředí plné přírodních a synteticky vyrobených bioaktivních chemikálií, sloučenin a biologických látek, může nepříznivě ovlivnit lidské zdraví. Řada těchto látek je často i ve velmi nízkých koncentracích toxická pro lidský CNS a PNS, a dokonce některé chemické látky také významně narušují lidský genom. Dále došlo k objevu, že i léčiva jsou v určité míře „hepatotoxická“, což vyvolává zvýšené obavy u starších pacientů, kteří mají ve stáří zhoršenou funkci jater (Pogue et al., 2016). Chemikálie, pesticidy, herbicidy či neurotoxické prvky, plyny a zejména kovy se podílejí na vzniku několika lidských neurologických poruch včetně Alzheimerovy choroby (AD) a poruchy autistického spektra (ASD). Díky rozsáhlému používání těchto látek můžeme očekávat, že neurologické poruchy budou v dohledné době ještě významnější a složitější (Pogue et al., 2016; Pogue et al., 2014; Virk et al., 2015).

Použití SH-SY5Y buněk se od založení subklonu v roce 1978 zvýšilo (Biedler et al., 1978). Mezi příklady jejich využití patří zkoumání Parkinsonovy (Xie et al., 2010) a Alzheimerovy choroby (Agholme et al., 2010), patogeneze virové infekce včetně polioviru (La Monica et al., 1989), enteroviru 71 (EV71) (Cordey et al., 2012; Xu et al., 2013), viru varicella-zoster (VZV) (Christensen et al., 2011), lidského cytomegaloviru (Luo et al., 2007) a viru herpes simplex (HSV) (Gimenez-Cassina et al., 2006; Sun et al., 2010). Je důležité poznamenat, že několik studií použilo SH-SY5Y buňky v jejich nediferencované formě,

zejména v oblasti neurovirologie (Yun et al., 2014; Garrity-Moses et al., 2005; Kalia et al., 2013; Xu et al., 2014). Rozdíl pozorovaného fenotypu nediferencovaných oproti diferencovaným SH-SY5Y buňkám vyvolává otázku, zda by pozorovaná progresivní infekce byla odlišná u zralých diferencovaných neuronů. Například diferencované SH-SY5Y buňky mají vyšší účinnost vychytávání HSV-1 oproti nediferencovaným proliferujícím SH-SY5Y buňkám, což může být způsobeno nedostatkem povrchových receptorů, které se vážou na HSV a modulují vstup na nediferencovaných SH-SY5Y buňkách (Gimenez-Cassina et al., 2006). Je proto nezbytné, aby při navrhování experimentu zaměřeného na testování neuronů *in vitro* byly SH-SY5Y buňky diferencovány tak, aby byly získány co nejpřesnější výsledky pro překlad a srovnání s *in vivo* modely.

Vývoj spolehlivé metody pro vytváření lidských neurálních kultur je nezbytný k tomu, aby výzkumníci mohli provádět translační experimenty, které přesně modelují lidskou nervovou soustavu. V současné době existuje mnoho případů v oblasti neurobiologie a neurovirologie, kdy jsou nediferencované SH-SY5Y buňky používány jako funkční model pro lidské neurony (Yun et al., 2014; Garrity-Moses et al., 2005; Kalia et al., 2013; Xu et al., 2014) a je důležité, že nediferencované buňky mohou postrádat fenotypy, jako je optimální vychytávání virů (Gimenez-Cassina et al., 2006), které jsou nezbytné pro přesnou interpretaci. Je potřeba, aby při použití SH-SY5Y buněk nebo jakéhokoli jiného neurálního systému *in vitro* byly buňky vhodně diferencovány na neurony s cílem získat údaje, které co nejlépe reprezentují to, co se může v neuronech vyskytovat *in vivo*.

2.1 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba (PD) je progresivní neurodegenerativní porucha související s věkem a prevalencí 1-2% u lidí starších 50 let, která není způsobena genetickými, ale ekologickými faktory životního prostředí (Tanner et al., 1999). Toto onemocnění je spojeno se ztrátou dopaminergních neuronů v nigrostriatální oblasti mozku a odhaduje se, že 60-80% těchto neuronů se ztratí před nástupem viditelných symptomů onemocnění. Tyto dopaminergní neurony jsou pozoruhodné přítomností DA, DAT, VMAT a receptorů DA. Příčina ztráty

dopaminergních neuronů v nigro-striální oblasti není známa, ale posmrtné vyšetření mozku pacientů s PD ukazuje, že na dopaminergní neurony v této oblasti působí zvýšený oxidační stres (Shavali et al., 2008). Vzhledem ke svému rozšíření a nedostatku účinné léčby představuje PD závažný zdravotní problém společnosti. V poslední době došlo k významnému pokroku v experimentálních studiích PD, zejména díky použití buněčných modelů.

Vývoj stabilního a spolehlivého modelu DAergních neurálních buněk je nezbytný zejména pro studium patogeneze PD a rozvoj terapeutických strategií. Ideální model PD buněk *in vitro* by měl být vytvořen v postmitotických lidských DAergních neurálních buňkách vnímavých k neurotoxinům produkovaným během PD, aby bylo možné řešit otázky týkající se selektivní ztráty DAergních neuronů v substantia nigra. V současné době zahrnují modely PD buněk primárně neurální buněčné linie nádorových buněk, jako jsou PC12 buňky (Koch et al., 2009), neurální nádorové buněčné linie reprezentované buňkami lidského neuroblastomu (Cheng et al., 2009) a primární mezencefalické neurony (Takeuchi et al., 2009). Tyto buňky napodobují mnoho aspektů úmrtí DAergních neuronů pozorovaných při léčbě PD neurotoxiny, jako je MPP+, 6-hydroxopamin nebo rotenon. Primární mezencefalické neurony jsou vhodným zdrojem DAergických neuronů. Lidské primární neurony je však mimořádně obtížné získat, kultivovat a zvládnout. Aplikaci tohoto buněčného zdroje navíc omezují i etické obtíže při získávání dostatečných a vhodných lidských primárních neuronů. Buněčná linie SH-SY5Y poskytuje neomezenou zásobu buněk lidského původu s podobnými biochemickými vlastnostmi jako lidské DAergické neurony.

Patologicky je PD charakterizována ztrátou mezencefalických DAergních neuronů. Jelikož buňky SH-SY5Y mají mnoho vlastností DAergických neuronů, byla buněčná linie SH-SY5Y nedávno použita jako DAergický neurální model pro výzkum PD. Několik vlastností buněčné linie SH-SY5Y ji činí užitečnou jako model pro DAergické neurony: zaprvé, buňky SH-SY5Y mají schopnost syntetizovat DA a NA, protože buňky exprimují TYR a DBH. Za druhé, buňky SH-SY5Y exprimují DAT, což je bílkovina exprimovaná pouze v neuronech DAergních uvnitř centrálního nervového systému a DAT reguluje DA homeostázu specifickým vychytáváním a sekvestrací DA (Takahashi et al., 1994). Zatřetí, ačkoliv SH-SY5Y buňky exprimují pouze nízké hladiny DA receptorů, mohou být agonisté DA, kteří mohou být neuroprotektivní. SH-SY5Y buňky mohou být

diferencovány na výraznější DAerní neurální fenotyp za přítomnosti různých látek a některé diferencované SH-SY5Y buňky jsou podobné primárním mezencefalickým neuronům. Látky (například RA), které indukují diferenciaci, také propůjčují SH-SY5Y buňkám toleranci, proto nelze roli toxicity nebo ochrany hodnotit v těchto diferencovaných buňkách (Cheung et al., 2009). To znamená, že nediferencované SH-SY5Y buňky, ale nikoli diferencované buňky, jsou vhodným buněčným modelem pro studium neurotoxicity nebo neuroochrany, a jsou tedy relevantní v experimentálním výzkumu PD.

2.2 Cisplatina a oxaliplatina

Sloučeniny platiny jsou široce používané a jsou velmi účinnými protinádorovými látkami. Cisplatina (cis-diaminedichlorplatinum (II), CDDP) se používá v klinické praxi a patří stále mezi léčiva první volby při řešení problémů s nádory. V průběhu let ale došlo k omezení jejího využití, protože vysoké dávky CDDP způsobily u pacientů nefrotoxicitu a periferní neurotoxicitu (Quasthoff et al., 2002). Oxaliplatina (oxalato (transl-1,2 diamminocyklohexan) platina (II), OHP) je nová sloučenina platiny, která je účinná i u rakoviny, která nereaguje na léčbu CDDP (Raymond et al., 1998). Rozpouští se lépe než CDDP a nefrotoxicita proto nepředstavuje pro tuto sloučeninu problém (Culy et al., 2000). Navzdory tomuto pozitivnímu objevu léčba pomocí OHP vyvolává „akutní“ neurotoxicitu (Screnci et al., 1999). I když je OHP méně neurotoxická než CDDP, tak obě platinové sloučeniny jsou toxické a způsobují buněčnou smrt vyvoláním apoptózy. Způsoby neurotoxicity CDDP a OHP jsou velmi podobné a zahrnují nejen poškození DNA, ale také modulaci specifických molekul podílejících se na regulaci buněčné rovnováhy mezi apoptotickou smrtí a buněčným cyklem (Donzelli et al., 2004).

Bylo prokázáno, že chronickou neurotoxicitu CDDP i OHP na buněčné úrovni lze vysvětlit nejen poškozením DNA, ale také aktivací molekulárních drah, které vedou buňky k apoptóze, protože OHP i CDDP aktivují specifické mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK), o nichž je známo, že se podílejí na apoptotické smrti. Později byl také zpozorován úbytek proteinů Bcl-2, p53 a MAPK. Tento účinek je pravděpodobně způsoben poškozením DNA

a následným snížením syntézy RNA. Bylo prokázáno, že cisplatina je schopna vyvolat apoptózu u postmitotických neuronových kultur prostřednictvím pokusu neuronů o opětovný vstup do buněčného cyklu (Gill et al., 1998). Díky tomuto zjištění o CDDP jsou lidské neuroblastové buňky SH-SY5Y spolehlivým modelem pro studium neurotoxicity platinových sloučenin, i přesto, že to jsou buňky, které se stále dělí (Donzelli et al., 2004).

2.3 Křemík

Křemík (Si) je stopový a druhý nejrozšířenější prvek v zemské kůře, který byl po mnoho let považován za znečišťující látku životního prostředí, i když mnohé studie uváděly, že je základním prvkem pro živé buňky (Greenwood et al., 1997). Částečně blokuje buněčné poškození spojené s oxidačním stresem a zabraňuje toxicitě hliníku (Al) tím, že snižuje jeho absorpci a usnadňuje jeho vylučování (Birchall et al., 1989). Snížená hladina Si byla zjištěna zejména u starší populace, protože může být spojena s aterosklerózou, která patří mezi degenerativní onemocnění (Pérez-Granados et al., 2002). Na druhé straně křemičité nanočástice vykazují škodlivé účinky a krystalický oxid křemičitý může dokonce vyvolat poškození a zánět buněk (Garcimartín et al., 2015).

Účinek Si závisí na testovaných koncentracích a výsledky zdůrazňují dvojitou funkci Si – buď jako protektora, nebo jako neurotoxického činitele v závislosti na koncentraci. V nízkých koncentracích působí Si jako neuroprotektor tím, že vyvolává antiapoptotické účinky a snižuje zánět snížením hladiny TNF. Organický Si zvyšuje životaschopnost bazálních buněk a snižuje aktivaci kaspázy-3 a -8, aniž by ovlivňoval uvolňování laktát-dehydrogenázy (LDH). Tyto výsledky tedy naznačují, že nízké koncentrace Si mají ochranný účinek na buněčnou linii SH-SY5Y, pravděpodobně zprostředkovaný antiapoptotickým mechanismem. Naopak při vysokých koncentracích působí Si jako neurotoxická látka prostřednictvím dvou mechanismů: nekrózy, která navozuje uvolnění LDH, a apoptózy, zvyšující aktivitu kaspázy-3 a produkující fragmentaci DNA (Garcimartín et al., 2015). Neuronové modely, jako je buněčná linie lidského neuroblastomu SH-SY5Y, se jeví jako užitečný nástroj pro hodnocení neuroprotektivních nebo neurotoxických účinků křemíku (Xie et al., 2010).

2.4 Arsen a dopamin

Arsen (As) je látka, která znečišťuje životní prostředí tím, že se vyskytuje v podzemních vodách, průmyslových odpadech a hnojivech. Agentura pro registr toxických látek a nemocí (ATSDR) uvádí As jako jednu ze sedmi nejtoxičtějších látek přítomných v životním prostředí (Shavali et al., 2008). Odhaduje se, že několik milionů lidí na celém světě trpí díky As toxicitou způsobenou uvolňováním do životního prostředí (Centeno et al., 2002). Arsen může ovlivnit periferní i centrální nervový systém (CNS), a bylo zjištěno, že by mohl hrát významnou roli při vyvolání neurologických onemocnění (Rodríguez, 2003). Pomocí studie na zvířatech bylo prokázáno, že dokáže překonat hematoencefalickou bariéru, hromadí se v různých oblastech mozku, mění syntézu a uvolňování neurotransmiterů a snižuje pohybovou aktivitu (Tadanobu et al., 1990; Rodríguez, 2003).

Při experimentech s cílem stanovit úroveň expozice DA i As^{+3} , která byla minimální nutnou úrovní k vyvolání významné ztráty životaschopnosti SH-SY5Y buněk, byly SH-SY5Y buňky po dobu 24 hodin expozice vystaveny stupňované sérii koncentrací DA a As^{+3} . Bylo prokázáno, že koncentrace 100 μM DA a 10 μM As^{+3} jsou minimální úrovní, které by vyvolaly významnou ztrátu životaschopnosti buněk. Tyto dvě úrovně expozice As^{+3} a DA byly poté použity ke stanovení účinku kombinace obou chemických látek dohromady na životaschopnost SH-SY5Y buněk a bylo prokázáno, že směs 10 μM As^{+3} a 100 μM DA způsobila zvýšením toxicity téměř úplnou ztrátu životaschopnosti buněk, zatímco každá látka samotná měla toxicitu minimální (Shavali et al., 2008). Neurotoxické účinky směsi As^{+3} a DA jsou zprostředkovány intracelulárními ději a předpokládá se, že tato směs může produkovat vysoce toxické volné radikály, jako je DA-chinon (Sulzer et al., 1999) nebo 6-hydroxydopamin v buňkách SH-SY5Y. Zvýšený oxidační stres je zodpovědný za ztrátu životaschopnosti buněk a studie ukazují, že odumírání buněk vyvolané směsí As^{+3} a DA na buňkách SH-SY5Y by mohlo být oslabeno antioxidanty N-acetylcysteinem (NAC) a sulforafenem, které snižují toxicitu směsi (Shavali et al., 2008).

2.5 Amfetamin a jeho metabolity

Amfetamin (AMPH) je široce zneužívaná psychotropní droga díky svým stimulačním, euforickým a halucinogenním účinkům. Ačkoli jsou amfetaminy obecně uznávány jako syntetické drogy, z nichž amfetamin, metamfetamin a 3,4-methylenedioxyamfetamin (MDMA, extáze) jsou dobře známými příklady, lidé používají přírodní amfetaminy po několik tisíciletí prostřednictvím konzumace amfetaminů vyráběných v rostlinách, konkrétně katinonu (khat), získávaného z rostliny *Catha edulis* a efedrinu, získávaného z různých rostlin rodu *Ephedra*. Po celém světě se běžně používá v léčbě narkolepsie, obezity a poruchy pozornosti s hyperaktivitou (ADHD). Podle Evropského monitorovacího centra pro drogy a drogovou závislost konzumovalo amfetaminy jen v Evropě 12 milionu lidí a jsou to druhé nejčastěji užívané nedovolené látky. Potenciální neurotoxicita AMPH je hlášena již několik let, zejména u dopaminergního systému, ale základní mechanismy jsou stále málo známé. Hlavní metabolity AMPH jsou 4-hydroxynorefedrin (4-OHNE) a 4-hydroxyamfetamin (4-OHAMPH). Je o nichž je známo, že v mozku přetrvávají déle než AMPH (Feio-Azevedo et al., 2017; Carvalho et al., 2012).

Neurotoxické účinky AMPH ovlivňují dopaminergní systém (Ricaurte et al., 2005), a proto jsou neurální dopaminergní SH-SY5Y lidské buňky vhodným *in vitro* modelem. Jako jeden z hlavních původců AMPH toxicity byl mnohokrát popsán oxidační stres (Carvalho et al., 2001). AMPH způsobuje toxicitu závislou na koncentraci v dopaminergně diferencovaných buňkách SH-SY5Y. Buňky byly vystaveny AMPH (rozsah koncentrací 0-5 mM), 4-OHAMPH a 4-OHNE (rozsah koncentrací 0-10 mM) po dobu 24 nebo 48 hodin. Životaschopnost byla stanovena testy 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazolium-bromidem (MTT) a LDH. Výsledky ukázaly, že jak u AMPH, tak i u metabolitů byla pozorována toxicita závislá na koncentraci. Toxická koncentrace 50 % (TC50) pro AMPH a 4-OHNE po 24 hodinové expozici byla cca 3,5 mM, resp. 8 mM. Metabolit 4-OHNE způsobil významné poškození buněk a při srovnání s AMPH byla pozorována postupná buněčná smrt tím, že byly poškozeny neurity a docházelo k pozdní apoptotické a nekrotické buněčné smrti. U 4-OHAMPH nebylo v testovaném rozsahu koncentrací dosaženo hodnoty TC50. Tím pádem je metabolit 4-OHNE toxičtější než

4-OHAMPH, nicméně obě látky jsou *in vitro* méně toxické než mateřská sloučenina. Je důležité poznamenat, že existují i látky N-acetyl cystein (NAC), methylfenidát (MPH), L-karnitin a cykloheximid (CHX), které snižují toxicitu vyvolanou AMPH (Feio-Azevedo et al., 2017).

2.6 Methylrtuť, kyselina okadaová a akrylamid

Methylrtuť (MeHg) je organická forma rtuti (Hg) těžkých kovů. Rtuť se přeměňuje na MeHg v bakteriích (Schaefer et al., 2011) a akumuluje se v rybách (Souza-Araujo et al., 2016), tím pádem se k člověku dostane díky konzumaci mořských plodů. Je vysoce toxická pro CNS a zejména pro vyvíjející se mozek (Ekino et al., 2007). Jedním z klíčových cílů toxicity MeHg je antioxidační systém glutathionu (GSH) (Choi et al., 1996; Sanfeliu et al., 2001), ale u lidských neuronů, astrocytů a SH-SY5Y buněk chrání před cytotoxicitou vyvolanou MeHg extracelulární léčba GSH. Dále inhibuje mikrotubulovou polymerizaci v cytoskeletu *in vitro* (Sager et al., 1983), což je důležitý proces pro udržení buněčné struktury a životaschopnosti (Poulain et al., 2010), inhibuje výrůstek neuritu a způsobuje degeneraci neuritu. Kyselina okadaová je mořský biotoxin zodpovědný za průjmové otravy z měkkýšů. Akrylamid je široce využíván v průmyslu po celém světě a přirozeně se tvoří i ve škrobu, který se vyskytuje v potravinách vařených při vysokých teplotách (Exon, 2006; Popova et al., 2017).

Studie prokázaly, že buňky SH-SY5Y jsou zranitelné vůči neurotoxicitě vyvolané MeHg při expozici na počátku diferenciačních procesů. V buňkách SH-SY5Y léčených RA byla MeHg toxická v nižších koncentracích, když se spolu s RA zavedla na začátku procesu diferenciace, než po 2 dnech diferenciace (Kim et al., 2007). MeHg vyvolala v diferencovaných buňkách SH-SY5Y toxicitu závislou na koncentraci, která byla od 1 μM . Kyselina okadaová nevykazovala statisticky významnou toxicitu v buňkách SH-SY5Y a akrylamid taktéž významně neovlivnil životaschopnost SH-SY5Y buněčných linií. I když došlo k objevu, že akrylamid aplikovaný na SH-SY5Y buňky na počátku procesu diferenciace po dobu 3-6 dnů značně snížil proliferaci buněk při stejné koncentraci. Stejná studie navíc uvedla, že akrylamid po 3 dnech expozice narušil výrůstek neuritu při koncentraci 100 nM. To by mohlo naznačovat, že buňky SH-SY5Y

jsou náchylnější k neurotoxicitě akrylamidu v rané fázi diferenciaci než v pozdější fázi (Popova et al., 2017).

I přes tyto výsledky došlo k objevu, že ještě užitečnějším modelem pro studium neurotoxických účinků chemických látek jsou neurony P19, protože jsou citlivější na detekci cytotoxicity MeHg, kyseliny okadaové a akrylamidu než SH-SY5Y buňky (Popova et al., 2017).

3 DALŠÍ BUNĚČNÉ MODELY PRO TESTOVÁNÍ NEUROTOXICITY

Kromě buněčné linie SH-SY5Y existují i další vhodné modely buněčných linií pro testování neurotoxicity, které byly získány biopsií kostní dřeně od pacientů s neuroblastem. Do této skupiny můžeme zařadit buněčné linie SK-N-SH, SK-N-MC a SK-N-BE (Biedler et al., 1973). Všechny slouží pro studie týkajících se studia růstu nádorových a neurálních buněk (Biedler et al., 1978).

Výsledky studií o těchto buňkách naznačují, že odrážejí vlastnosti nádoru, ze kterého byly získány (Biedler et al., 1973).

3.1 Buněčná linie SK-N-SH

V květnu 1970 byla u čtyřleté dívky neznámé etniky diagnostikována infekce horních cest dýchacích, která byla rezistentní na antibiotika. Protože dušnost neustupovala ani po torakocentéze či podání fibrinolyzinu a došlo k celkovému zhoršení stavu, bylo provedeno několik rentgenových vyšetření, které prokázaly nádorové bujení v hrudníku. Během operace byl nalezen velký neuroblastom v horní části hrudníku, který tým lékařů z části odstranil a hned po operaci byla zahájena radioterapie a chemoterapie pomocí vinkristinu, cyklofosfamidu a daunomycinu. I přesto, že léčba byla zahájena, došlo v prosinci 1970 k rozvinutí metastáz do stehenní kosti, jater a kostní dřeně. Tento nález vedl k aspiraci neboli biopsii kostní dřeně, ze které byla kultivováním metastatických buněk vytvořena buněčná linie SK-N-SH (Biedler et al., 1973).

Buněčná neuroblastomová linie SK-N-SH je široce využívána jako neurální model, protože obsahuje buňky se třemi různými fenotypy: neurální buňky (typ N), Schwannovy buňky (typ S) a mezibuněčná hmota (typ I) (Joshi et al., 2006). Další studie ukazují, že linie byla složena ze 2 morfologicky odlišných typů buněk. Jednou z nich byla malá hustá ostnatá buňka s řídkým cytoplazmatem a druhým typem byla velká epiteloidní buňka. Buňky SK-N-SH se vyznačují vysokou aktivitou DBH. Z této linie byla připravena třetím klonováním podrobně zmiňovaná buněčná linie SH-SY5Y. Diferencují za použití RA a následně přijmou neurální fenotyp, který je charakterizovaný rozsáhlým výrůstkem nervových buněk. Díky tomu aspektu je tato buněčná linie důležitá

pro vymezení signálních drah, které se podílejí na diferenciaci neuronů. Dále je známo, že buňky SK-N-SH tvoří nádory u imunokompromitovaných myší (Biedler et al., 1973; Helson et al., 1975) a používají se pro zkoušení neurotoxicity rozpouštědla 2, 5 hexanedionu (Shastry et al., 2009).

3.2 Buněčná linie SK-N-MC

V únoru 1968 byl u dvanáctileté dívky objeven nález, který byl diagnostikován jako neuroblastom. Během operace došlo k jeho odstranění a zahájila se intenzivní radioterapie, díky které došlo v březnu 1970 k proptóze, což je vychýlení oční hmoty směrem dopředu (Rakul Nambiar et al., 2017) a následně k biopsii. Výsledkem tohoto vyšetření byl další nález neuroblastomu. Ani po nasazení chemoterapie, kdy se střídal vinkristin a cyklofosfamid po dobu 8 měsíců, nedošlo ke zlepšení stavu pacienta. V listopadu 1970 se opět objevila proptóza a další komplikace spojené s nádorovým onemocněním, které byly léčeny chemoterapeutickými látkami až do dubna 1971. Jediným východiskem byla enukleace neboli odstranění oka a biopsie metastatického místa, který byl kultivován, a vznikla tím buněčná linie SK-N-MC (Biedler et al., 1973).

SK-N-MC byla původně popsána jako neuroblastomová buněčná linie, později ale bylo zjištěno, že tato linie pochází z Ewingovy skupiny nádorů, které se u dětí a adolescentů vyskytují nejčastěji mezi 5-30 rokem života a způsobují maligní nádory kostí (Grünewald et al., 2018). Buňky SK-N-MC jsou podobné lidským fibroblastům, mají malou aktivitu DBH, ale vykazují zvýšenou aktivitu ChAT ve srovnání s jinými neuroblastomovými buněčnými liniemi, jako jsou SK-N-SH a SH-SY5Y. Je známo, že tyto buňky tvoří nádory u imunokompromitovaných myší (Biedler et al., 1973; Biedler et al., 1978; Helson et al., 1975).

3.3 Buněčná linie SK-N-BE

Neklonovaná SK-N-BE linie se rozlišuje na velmi podobné typy. SK-N-BE(1) buněčná linie neuroblastomu byla získána *in vitro* v červnu 1972 z biopsie kostní dřeně dvouletého chlapce s neuroblastomem. V listopadu 1972 byla provedena další biopsie kostní dřeně od stejného pacienta, která přinesla

druhou neklonovanou linii neuroblastomu označenou SK-N-BE(2), která vykazovala největší schopnost přeměny TYR na DA (Anagnoste et al., 1972; Biedler et al., 1978). Linie jsou morfologicky a biochemicky podobné, mají středně vysokou hladinu aktivity DBH a jsou složeny z malých buněk s krátkými neuritovými buněčnými výběžky (Biedler et al., 1978). Buněčná linie neuroblastomu SK-N-BE se používá jako model pro hodnocení neurotoxických účinků fenthionu a jeho metabolitů (Shastry et al., 2009).

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši o buněčné linii SH-SY5Y a jejím využití při testování neurotoxicity. Lidské neuroblastomové buňky SH-SY5Y jsou třetím subklonem rodičovské linie SK-N-SH, která byla získána biopsií kostní dřeně a následně kultivováním metastatických buněk roku 1970. Díky svým vlastnostem je buněčná linie SH-SY5Y široce využívána jako neurální model pro studium neurodegenerativních onemocnění, jako je Parkinsonova a Alzheimerova choroba, dále se používá pro zkoumání patogeneze virové infekce a také se díky této linii zjišťují neuroprotektorové či neurotoxické látky, které by mohly nepříznivě ovlivnit lidský organismus a způsobit poruchu správné funkce nervové soustavy. Vytvoření této linie se skládá z několika kroků. Proces začíná pasážováním, zmrazením, rozmrazením, kultivací nerozlišených buněk a nakonec diferenciací. Diferenciace je proces, který pomocí diferenciačních činidel, jako jsou kyselina retinová, estery fosfolu, dibutyryl-cAMP, neurotropiny nebo staurosporin vytvoří za zhruba 18 dní buňky, které jsou více podobné zralým neuronům v mozku. Po tomto procesu jsou buňky připraveny pro neurobiologické experimenty. K výhodám patří nízké náklady na kulturu ve srovnání s primárními neurony a schopnost rozsáhlé a snadné expanze buněk před diferenciací. Použití nediferencovaných SH-SY5Y buněk s sebou nese určité nevýhody. Je obtížné rozlišit, zda neuroprotektivní nebo neurotoxické látky ovlivňují rychlost proliferace nebo rychlost odumírání buněk, protože vykazují nižší citlivost na neurotoxiny a neuroprotektivní látky než primární mezencefalické neurony.

Buněčná linie SH-SY5Y se dále využívá ke zkoumání přírodních nebo uměle vytvořených neurotoxinů či neuroprotektorů. V této práci bylo popsáno působení cisplatinu a oxaliplatinu, křemíku, arsenu a dopaminu, amfetaminu a jeho metabolitů, methylrtuti, kyseliny okadaové a akrylamidu na buněčnou linii SH-SY5Y. Všechny tyto zmíněné látky se jeví pro SH-SY5Y buňky v určitých koncentracích jako neurotoxické, až na kyselinu okadaovou a křemík. Kyselina okadaová významně neovlivnila životaschopnost buněk a křemík v nízkých koncentracích naopak působil na SH-SY5Y buňky jako neuroprotektor, který má ochranný účinek pravděpodobně zprostředkovaný antiapoptotickým mechanismem. V poslední řadě byly zmíněny i další modely buněčných linií

pro testování neurotoxicity, kterými jsou buněčné linie SK-N-SH, SK-N-MC a SK-N-BE. Závěrem je důležité poznamenat, že díky těmto informacím bylo vyhodnoceno, že lidská buněčná linie SH-SY5Y je velmi častým a vhodným modelem pro testování neurotoxicity, pomocí které můžeme odhalovat příčiny onemocnění způsobených neurotoxickými látkami, objevovat nové potenciální neurotoxiny a přispět k eradikaci chorob.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Adem A., Mattsson M. E., Nordberg A., Pålman S.: Muscarinic receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line: regulation by phorbol ester and retinoic acid-induced differentiation. *Developmental Brain Research*. 1987, 33 (2), 235–242.
- [2] Agholme L., Lindström T., Kågedal K., Marcusson J., Hallbeck M.: An *in vitro* model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *Journal of Alzheimer's disease*. 2010, 20 (4), 1069–1082.
- [3] Åkerman K. E. O., Scott I. G., Andersson L. C.: Functional differentiation of human ganglion cell derived neuroblastoma cell line SH-SY5Y induced by a phorbol ester (TPA): regulation by phorbol ester and retinoic acid-induced differentiation. *Neurochemistry International*. 1984, 6 (1), 77–80.
- [4] Anagnoste B., Freedman L. S., Goldstein M., Broome J., Fuxe K.: Dopamine-*O*-hydroxylase activity in mouse neuroblastoma tumors and in cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1972, 69 (7), 1883–1886.
- [5] Biedler J. L., Helson L., Spengler B. A.: Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Research*. 1973, 33 (11), 2643–2652
- [6] Biedler J. L., Roffler-Tarlov S., Schachner M., Freedman L. S.: Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Research*. 1978, 38 (11 Part 1), 3751–3757.
- [7] Birchall J. D., Exley C., Chappell J. S., Phillips M. J.: Acute toxicity of aluminium to fish eliminated in silicon-rich acid waters. *Nature*, 1989, 338, 146–148.
- [8] Brown A. M., Riddoch F. C., Robson A., Redfern C. P., Cheek T. R.: Mechanistic and functional changes in Ca²⁺ entry after retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells. *Biochemical Journal*. 2005, 388 (3), 941–948.
- [9] Carvalho F., Fernandes E., Remião F., Gomes-Da-Silva J., Tavares M. A., et al.: Adaptive response of antioxidant enzymes in different areas of rat brain after repeated d-amphetamine administration. *Addiction Biology*. 2001, 6 (3), 213–221.

- [10] Carvalho M., Carmo H., Costa V. M., Capela J. P., Pontes H., et al.: Toxicity of amphetamines: an update. *Archives of Toxicology*. 2012, 86 (8), 1167–1231.
- [11] Centeno J. A, Mullick F. G., Martinez L., Page N. P., Gibb H., et al.: Pathology related to chronic arsenic exposure. *Environmental Health Perspectives*. 2002, 110 (5), 883–886.
- [12] Cernaianu G., Brandmaier P., Scholz G., Ackermann O. P., Alt R., et al.: All-trans retinoic acid arrests neuroblastoma cells in a dormant state. Subsequent nerve growth factor/brain derived neurotrophic factor treatment adds modest benefit. *Journal of Pediatric Surgery*. 2008, 43 (7), 1284–1294.
- [13] Ciccarone V., Spengler B. A., Meyers M. B., Biedler J. L., Ross R. A.: Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Research*. 1989, 49 (1), 219–225.
- [14] Cordey S., Petty T. J., Schibler M., Martinez Y., Gerlach D., et al.: Identification of site-specific adaptations conferring increased neural cell tropism during human enterovirus 71 infection. *PLoS Pathogens*. 2012, 8 (7), 1–11.
- [15] Culy C. R., Clemett D., Wiseman L. R.: Oxaliplatin. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in metastatic colorectal cancer and its potential in other malignancies. *Drugs*. 2000, 60 (4), 895–924.
- [16] Datki Z., Juhász A., Gálfi M., Soós K., Papp R., et al.: Method for measuring neurotoxicity of aggregating polypeptides with the MTT assay on differentiated neuroblastoma cells. *Brain Research Bulletin*. 2003, 62 (3), 223–229.
- [17] Donzelli E., Carfi M., Miloso M., Strada A., Galbiati S., et al.: Neurotoxicity of Platinum Compounds: Comparison of the Effects of Cisplatin and Oxaliplatin on the Human Neuroblastoma Cell Line SH-SY5Y. *Journal of Neuro-Oncology*. 2004, 67(1–2), 65–73.
- [18] Edsjö A., Holmquist L., Pählman S.: Neuroblastoma as an experimental model of neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. *Seminars in Cancer Biology*. 2007, 17 (3), 248–256.
- [19] Edsjö A., Lavenius E., Nilsson H., Hoehner J. C., Simonsson P., et al.: Expression of trkB in human neuroblastoma in relation to MYCN expression and retinoic acid treatment. *Laboratory Investigation*. 2003, 83 (6), 813–823.
- [20] Ekino S., Susa M., Ninomiya T., Imamura K., Kitamura T.: Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl

- mercury poisoning. *Journal of the Neurological Sciences*. 2007, 262 (1–2), 131–144.
- [21] Elmore S., Wyllie A. H., Currie A. R.: Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 2016, 35 (4), 495–516.
- [22] Encinas M., Iglesias M., Liu Y., Wang H., Muhaisen A., et al.: 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*. 2000, 75 (3), 991–1003.
- [23] Exon J. H.: A Review of the Toxicology of Acrylamide. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2006, 9 (5), 397–412.
- [24] Fagerström S., Pählman S., Gestblom C., Nånberg E.: Protein kinase C-epsilon is implicated in neurite outgrowth in differentiating human neuroblastoma cells. *Cell Growth & Differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1996, 7 (6), 775–785.
- [25] Feio-Azevedo R., Costa V.M., Ferreira L.M., Branco P.S., Pereira F.C., et al.: Toxicity of the amphetamine metabolites 4-hydroxyamphetamine and 4-hydroxynorephedrine in human dopaminergic differentiated SH-SY5Y cells. *Toxicology Letters*. 2017, 269, 65–76.
- [26] Frey U., Huang Y.Y., Kandel E.R.: Effects of cAMP simulate a late stage of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Science*. 1993, 260 (5114), 1661–1664.
- [27] Fulda S., Gorman A. M., Hori O., Samali A.: Cellular stress responses: cell survival and cell death. *International Journal of Cell Biology*. 2010, vol. 2010, 1–23.
- [28] Garcimartín A., Merino J. J., Santos-López J. A., López-Oliva M. E., González M. P., et al.: Silicon as neuroprotector or neurotoxic in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Chemosphere*. 2015, 135, 217–224.
- [29] Garrity-Moses M. E., Teng Q., Liu J., Tanase D., Boulis N. M.: Neuroprotective adeno-associated virus Bcl-xL gene transfer in models of motor neuron disease. *Muscle & Nerve*. 2005, 32 (6), 734–744.
- [30] Gill J. S., Windebank A. J.: Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. *Journal of Clinical Investigation*. 1998, 101 (12), 2442–2450.
- [31] Gimenez-Cassina A., Lim F., Diaz-Nido J.: Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to

- transduction by herpesviral vectors. *Journal of Neuroscience Research*. 2006, 84 (4), 755–767.
- [32] Gómez-Santos C., Ambrosio S., Ventura F., Ferrer I., Reiriz J.: TGF-beta I increases tyrosine hydroxylase expression by a mechanism blocked by BMP-2 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Research*. 2002, 958 (1), 152–160.
- [33] Green D. R., Llambi F.: Cell Death Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2015, 7 (12), 1–17.
- [34] Greenwood N. N., Earnshaw A.: Chemistry of the elements. 2nd ed. Oxford, Butterworth-Heinemann, c1997.
- [35] Grünewald T. G. P., Cidre-Aranaz F., Surdez D., Tomazou E. M., Kovar H., et al.: Ewing sarcoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 2018, 4 (1), 1–5.
- [36] Guarnieri S., Pilla R., Morabito C., Sacchetti S., Mancinelli R., et al.: Extracellular guanosine and GTP promote expression of differentiation markers and induce S-phase cell-cycle arrest in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *International Journal of Developmental Neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2009, 27 (2), 135–147.
- [37] Harry G. J., Billingsley M., Bruinink A., Campbell I. L., Classen W., et al.: In vitro techniques for the assessment of neurotoxicity. *Environmental Health Perspectives*. 1998, 106 (1), 131–158.
- [38] Helson L., Das S. K., Hajdu S. I.: Human neuroblastoma in nude mice. *Cancer Research*. 1975, 35 (9), 2594–2599.
- [39] Chen J., Chattopadhyay B., Venkatakrishnan G., Ross A. H.: Nerve growth factor-induced differentiation of human neuroblastoma and neuroepithelioma cell lines. *Cell Growth & Differentiation*. 1990, 1 (2), 79–85.
- [40] Cheng Y. F., Zhu G. Q., Wang M., Cheng H., Zhou A., et al.: Involvement of ubiquitin proteasome system in protective mechanisms of Puerarin to MPP(+)-elicited apoptosis. *Neuroscience Research*. 2009, 63 (1), 52–58.
- [41] Cheung Y. T., Lau W. K. W., Yu M. S., Lai C. S., Yeung S. C., et al.: Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as *in vitro* model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology*. 2009, 30 (1), 127–135.
- [42] Choi B. H., Yee S., Robles M.: The Effects of Glutathione Glycoside in Methyl Mercury Poisoning. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1996, 141 (2), 357–364.

- [43] Christensen J., Steain M., Slobedman B., Abendroth A.: Differentiated neuroblastoma cells provide a highly efficient model for studies of productive varicella-zoster virus infection of neuronal cells. *Journal of Virology*. 2011, 85 (16), 8436–8442.
- [44] Ikeda H., Pastuszko A., Ikegaki N., Kennett R. H., Wilson D. F.: 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) metabolism and retinoic acid induced differentiation in human neuroblastoma. *Neurochemical Research*. 1994, 19 (12), 1487–1494.
- [45] Itano Y., Ito A., Uehara T., Nomura Y.: 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*. 1996, 67 (1), 131–137.
- [46] Jalava A., Akerman K., Heikkilä J.: Protein kinase inhibitor, staurosporine, induces a mature neuronal phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma cells through an alpha-, beta-, and zeta-protein kinase C-independent pathway. *Journal of Cellular Physiology*. 1993, 155 (2), 301–312.
- [47] Jalava A., Heikkilä J., Lintunen M., Akerman K., Pählman S.: Staurosporine induces a neuronal phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma cells that resembles that induced by the phorbol ester 12-O-tetradecanoyl phorbol-13 acetate (TPA). *FEBS Letters*. 1992, 300 (2), 114–118.
- [48] Jenab S., Inturrisi C. E.: Retinoic acid regulation of mu opioid receptor and c-fos mRNAs and AP-1 DNA binding in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Molecular Brain Research*. 2002, 99 (1), 34–39.
- [49] Joshi S., Guleria R., Pan J., DiPette D., Singh U. S.: Retinoic acid receptors and tissue-transglutaminase mediate short-term effect of retinoic acid on migration and invasion of neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Oncogene*. 2006, 25 (2), 240–247.
- [50] Kalia M., Khasa R., Sharma M., Nain M., Vrati S.: Japanese encephalitis virus infects neuronal cells through a clathrin-independent endocytic mechanism. *Journal of Virology*. 2013, 87 (1), 148–162.
- [51] Kaplan D. R., Miller F. D.: Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*. 2000, 10 (3), 381–391.
- [52] Kim Y-J., Kim Y-S., Kim M-S., Ryu J-Ch.: The inhibitory mechanism of methylmercury on differentiation of human neuroblastoma cells. *Toxicology*. 2007, 234 (1–2), 1–9.

- [53] Koch A., Lehmann-Horn K., Dächsel J. C., Gasser T., Kahle P. J., et al.: Proteasomal inhibition reduces parkin mRNA in PC12 and SH-SY5Y cells. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2009, 15 (3), 220–225.
- [54] Kou W., Luchtman D., Song C.: Eicosapentaenoic acid (EPA) increases cell viability and expression of neurotrophin receptors in retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cells. *European Journal of Nutrition*. 2008, 47 (2), 104–113.
- [55] Kovalevich J., Langford D.: Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2013, vol. 1078, 9–21.
- [56] Kume T., Kawato Y., Osakada F., Izumi Y., Katsuki H., et al.: Dibutyryl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype. *Neuroscience Letters*. 2008, 443 (3), 199–203.
- [57] La Monica N., Racaniello V. R.: Differences in replication of attenuated and neurovirulent polioviruses in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Journal of Virology*. 1989, 63 (5), 2357–2360.
- [58] Lavenius E., Parrow V., Nånberg E., Pählman S.: Basic FGF and IGF-I promote differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells in culture. *Growth Factors*. 1994, 10 (1), 29–39.
- [59] Lopes F. M., Schröder R., Zanotto-Filho A., Müller C. B., Pires A. S., et al.: Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an *in vitro* model for Parkinson disease studies. *Brain Research*. 2010, 1337, 85–94.
- [60] Lopez-Carballo G., Moreno L., Masia S., Perez P., Baretino D.: Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277 (28), 25297–25304.
- [61] Lotan R.: Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB Journal*. 1996, 10 (9), 1031–1039.
- [62] Luo M. H., Fortunato E. A.: Long-term infection and shedding of human cytomegalovirus in T98G glioblastoma cells. *Journal of Virology*. 2007, 81 (19), 10424–10436.
- [63] Mastroeni D., Grover A., Leonard B., Joyce J. N., Coleman P. D., et al.: Microglial responses to dopamine in a cell culture model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*. 2009, 30 (11), 1805–1817.

- [64] Millan M. J., Di Cara B., Hill M., Jackson M., Joyce J. N., et al.: S32504, a novel naphthoxazine agonist at dopamine D3/D2 receptors: II. Actions in rodent, primate and cellular models of antiparkinson activity in comparison to ropinirole. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004, 309 (3), 921–935.
- [65] Pålman S., Hoehner J. C., Nånberg E., Hedborg F., Gestblom C., et al.: Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *European Journal of Cancer*. 1995, 31 (4), 453–458.
- [66] Pålman S., Odelstad L., Larsson E., Grotte G., Nilsson K.: Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *International Journal of Cancer*. 1981, 28 (5), 583–589.
- [67] Pålman S., Ruusala A. I., Abrahamsson L., Mattsson M. E., Esscher T.: Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-ester-induced differentiation. *Cell Differentiation*. 1984, 14 (2), 135–144.
- [68] Pérez-Granados A. M., Vaquero M. P.: Silicon, aluminium, arsenic and lithium: essentiality and human health implications. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 2002, 6, 154–162
- [69] Pogue A. I., Lukiw W. J.: Natural and Synthetic Neurotoxins in Our Environment: From Alzheimer's Disease (AD) to Autism Spectrum Disorder (ASD). *Journal of Alzheimer's disease & Parkinsonism*. 2016, 6 (4), 248–250.
- [70] Pogue A. I., Lukiw W. J.: The mobilization of aluminum into the biosphere. *Frontiers in Neurology*. 2014, 5, 261–263.
- [71] Popova D., Karlsson J., Jacobsson S. O. P.: Comparison of neurons derived from mouse P19, rat PC12 and human SH-SY5Y cells in the assessment of chemical- and toxin-induced neurotoxicity. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 2017, 18 (1), 41–43.
- [72] Poulain F. E., Sobel A.: The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2010, 43 (1), 15–32.
- [73] Presgraves S. P., Ahmed T., Borwege S., Joyce J. N.: Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotoxicity Research*. 2004, 5 (8), 579–598.

- [74] Quasthoff S., Hartung H. P.: Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Journal of Neurology*. 2002, 249 (1), 9–17.
- [75] Rakul Nambiar K., Ajith P. S., Arjunan A.: Unilateral proptosis as the initial manifestation of malignancy. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 2017, 29 (3), 159–161.
- [76] Raymond E., Chaney S. G., Taamma A., Cvitkovic E.: Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Annals of Oncology*. 1998, 9 (10) 1053–1071.
- [77] Ricaurte G. A., Mehan A. O., Yuan J., Hatzidimitriou G., Xie T., et al.: Amphetamine Treatment Similar to That Used in the Treatment of Adult Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Damages Dopaminergic Nerve Endings in the Striatum of Adult Nonhuman Primates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005, 315 (1), 91–98.
- [78] Rodríguez V.: The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicology Letters*. 2003, 145 (1), 1–18.
- [79] Ross R. A., Spengler B. A., Biedler J. L.: Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *Journal of the National Cancer Institute*. 1983, 71 (4), 741–747.
- [80] Sager P.R., Doherty R.A., Olmsted J.B.: Interaction of methylmercury with microtubules in cultured cells and in vitro. *Experimental Cell Research*. 1983, 146 (1), 127–137.
- [81] Sanfeliu C., Sebastià J., Kim S. U.: Methylmercury Neurotoxicity in Cultures of Human Neurons, Astrocytes, *Neuroblastoma Cells*. *NeuroToxicology*. 2001, 22 (3), 317–327.
- [82] Sanchez S., Jimenez C., Carrera A. C., Diaz-Nido J., Avila J., et al.: A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation. *Neurochemistry International*. 2004, 44 (4), 231–242.
- [83] Sarkanen J. R., Nykky J., Siikanen J., Selinummi J., Ylikomi T., et al.: Cholesterol supports the retinoic acid-induced synaptic vesicle formation in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*. 2007, 102 (6), 1941–1952.
- [84] Screnci D., McKeage M. J.: Platinum neurotoxicity: clinical profiles, experimental models and neuroprotective approaches. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 1999, 77 (1–2), 105–110.

- [85] Shastry P., Basu A., Rajadhyaksha M. S.: Neuroblastoma Cell Lines-A Versatile in Vitro Model in Neurobiology. *International Journal of Neuroscience*. 2009, 108 (1–2), 109–126.
- [86] Shavali S., Sens D. A.: Synergistic Neurotoxic Effects of Arsenic and Dopamine in Human Dopaminergic Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Toxicological Sciences*. 2008, 102 (2), 254–261.
- [87] Shipley M. M., Mangold C., Szpara M. L.: Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Journal of Visualized Experiments*. 2016, 108, 53192–5394.
- [88] Schaefer J. K., Rocks S. S., Zheng W., Liang L., Gu B., et al.: Active transport, substrate specificity, and methylation of Hg(II) in anaerobic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011, 108 (21), 8714–8719.
- [89] Singh J., Kaur G.: Transcriptional regulation of polysialylated neural cell adhesion molecule expression by NMDA receptor activation in retinoic acid-differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cultures. *Brain Research*. 2007, 1154 (1), 8–21.
- [90] Souza-Araujo J., Giarrizzo T., Lima M. O., Souza M. B. G.: Mercury and methyl mercury in fishes from Bacajá River (Brazilian Amazon): evidence for bioaccumulation and biomagnification. *Journal of Fish Biology*. 2016, 89 (1), 249–263.
- [91] Storch A., Burkhardt K., Ludolph A. C., Schwarz J.: Protective effects of riluzole on dopamine neurons: involvement of oxidative stress and cellular energy metabolism. *Journal of Neurochemistry*. 2000, 75 (6), 2259–2269.
- [92] Sulzer D., Zecca L.: Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: A review. *Neurotoxicity Research*. 1999, 1 (3), 181–195.
- [93] Sun Z., Yang H., Shi Y., Wei M., Xian J., et al.: Establishment of a cell model system of herpes simplex virus type II latent infection and reactivation in SH-SY5Y cells. *Wei Sheng Wu Xue Bao = Acta Microbiologica Sinica*. 2010, 50 (1), 98–106.
- [94] Tadanobu I., Shigeo M., Hiroko S., Hiromichi N., Hiroki M., et al.: The effect of arsenic trioxide on brain monoamine metabolism and locomotor activity of mice. *Toxicology Letters*. 1990, 54 (2–3), 345–353.
- [95] Takahashi T., Deng Y., Maruyama W., Dostert P., Kawai M., et al.: Uptake of a neurotoxin-candidate, (R)-1,2-dimethyl-6, 7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline into human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y

- cells by dopamine transport system. *Journal of Neural Transmission. General Section*. 1994, 98 (2), 107–118.
- [96] Takeuchi H., Yanagida T., Inden M., Takata K., Kitamura Y., et al.: Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models. *Journal of Neuroscience Research*. 2009, 87 (2), 576–585.
- [97] Tanner C. M., Ottman R., Goldman S. M., Ellenberg J., Mayeux R., et al.: Parkinson Disease in Twins: An Etiologic Study. *JAMA*. 1999, 281 (4), 341–346.
- [98] Tieu K., Zuo D. M., Yu P. H.: Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: involvement of bcl-2 and p53 proteins. *Journal of Neuroscience Research*. 1999, 58 (3), 426–435.
- [99] Tosetti P., Taglietti V., Toselli M.: Functional changes in potassium conductances of the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y during *in vitro* differentiation. *Journal of Neurophysiology*. 1998, 79 (2), 648–658.
- [100] Virk S. A., Eslick G. D.: Aluminum levels in brain, serum and cerebrospinal fluid are higher in Alzheimer's disease cases than in controls: A series of meta-analyses. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2015, 47 (3), 629–638.
- [101] Xie H., Hu L., Li G.: SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: *in vitro* cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*. 2010, 123 (8), 1086–1092.
- [102] Xu K., Liu X. N., Zhang H. B., An N., Wang Y., et al.: Replication-defective HSV-1 effectively targets trigeminal ganglion and inhibits viral pathopoiesis by mediating interferon gamma expression in SH-SY5Y cells. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2014, 53 (1), 78–86.
- [103] Xu L. J., Jiang T., Zhang F. J., Han J. F., Liu J., et al.: Global transcriptomic analysis of human neuroblastoma cells in response to enterovirus type 71 infection. *PLoS ONE*. 2013, 8 (7), 1–7.
- [104] Yun S. I., Song B. H., Kim J. K., Yun G. N., Lee E. Y., et al.: A molecularly cloned, live-attenuated Japanese encephalitis vaccine SA14-14-2 virus: a conserved single amino acid in the I₂ hairpin of the viral E glycoprotein determines neurovirulence in mice. *PLoS Pathogens*. 2014, 10 (7), 1–14.