

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

STUDIUM NEUROTOXICITY TĚŽKÝCH KOVŮ
IN VITRO
DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Lenka Tichá
VEDOUCÍ PRÁCE: RNDr. Jiří Handl, Ph.D.
KONZULTANT: Mgr. Jan Čapek, Ph.D.

2022

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL
SCIENCES

**STUDY OF NEUROTOXICITY OF HEAVY
METALS *IN VITRO***

THESIS

AUTHOR: Bc. Lenka Tichá
SUPERVISOR: RNDr. Jiří Handl, Ph.D.
CONSULTANT: Mgr. Jan Čapek, Ph.D.

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Tichá**
Osobní číslo: **C20486**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Studium neurotoxicity těžkých kovů *in vitro***
Téma práce anglicky: **Study Neurotoxicity Of Heavy Metals *in vitro***
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na charakterizaci toxicity vybraných těžkých kovů s využitím moderních bioanalytických metod. Charakterizujte neurotoxicitu vybraných těžkých kovů *in vitro* u buněk. Studujte zejména mechanismy buněčného poškození po inkubaci buněk s CdCl_2 a HgCl_2 .
2. V rámci teoretické části dále popište nejčastější buněčné modely využívané pro studium neurotoxicity těžkých kovů. Popište metody využívané při studiu cytotoxického působení látek *in vitro* u vybraných neurálních buněčných linií. V souvislosti se studiem toxicity těžkých kovů shrňte možnosti využití moderních bioanalytických metod včetně testů na stanovení metabolické aktivity buněk a moderních mikroskopických technik v kombinaci s fluorescenčními sondami pro vizualizaci buněčného jádra, mitochondrií a cytoskeletu.

Experimentální část:

1. V rámci praktické části se zaměřte na přípravu a dlouhodobou kultivaci vybrané neurální buněčné linie pro potřeby pokročilých bioanalytických metod. U vybrané buněčné linie popište změny, ke kterým dochází při působení modelových těžkých kovů (CdCl_2 a HgCl_2). Zaměřte se zejména na neurotoxické působení CdCl_2 a porovnejte výsledky i s dalšími toxiny, jako je cisplatina či t-BHP. K detekci funkčních a morfologických změn u buněk inkubovaných s toxiny využijte stanovení buněčné viability a koncentrace glutathionu a mikroskopické techniky využívající fluorescenční sondy.
2. Získaná experimentální data zpracujte a diskutujte. Výsledky práce následně porovnejte s výstupy jiných autorů.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Ke zpracování literárního přehledu využijte elektronické databáze
(*ScienceDirect, NCBI, PubMed, Web of Science*)

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Jiří Handl, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Jan Čapek, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2022

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji:

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

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

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

V Pardubicích dne 6. 5. 2022

.....

Bc. Lenka Tichá

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce RNDr. Jiřímu Handlovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, ale také za trpělivost a vstřícný přístup při zpracovávání této práce. Dále bych také chtěla poděkovat doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. za vstřícnost a věcné připomínky při konzultacích, Mgr. Janu Čapkovi, Ph.D. a Mgr. Pavlíně Majtnerové, Ph.D. za užitečné rady, odborný dohled a pomoc, které mi při zpracování mé diplomové práce věnovali. Poděkování patří také mé rodině, která mě podporuje po celou dobu mého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřena na studium neurotoxicity těžkých kovů *in vitro* pomocí moderních bioanalytických metod. Pro sledování neurotoxicity CdCl₂ a HgCl₂ byla použita buněčná linie lidského neuroblastomu SH-SY5Y. V teoretické části práce jsou shrnuty mechanismy působení kadmia a rtuti na nervové buňky, informace o hlavním intracelulárním antioxidantu glutathionu a dále jsou také popsány bioanalytické metody, které lze využít pro sledování neurotoxického účinku těžkých kovů. Zvláštní pozornost je věnována stanovení buněčné viability, míry oxidačního stresu a apoptózy. Experimentální část je zaměřena na testování vlivu CdCl₂ a HgCl₂ na koncentraci intracelulárního glutathionu a na dehydrogenázovou aktivitu buněk SH-SY5Y. Dále jsou s využitím pokročilých mikroskopických technik detekovány změny buněčné morfolgie v reálném čase. Pomocí mikroskopie ve fázovém kontrastu a fluorescenčních sond jsou navíc vizualizována buněčná jádra a cytoskelet. V poslední části diplomové práce jsou shrnuty naměřené výsledky, které jsou následně diskutovány.

KLÍČOVÁ SLOVA

Buněčná linie SH-SY5Y, neurotoxicita, kadmium, rtuť, glutathion

ANNOTATION

This diploma thesis is focused on the study of neurotoxicity of heavy metals *in vitro* using modern bioanalytical methods. The human neuroblastoma cell line SH-SY5Y was used to monitor the neurotoxicity of CdCl₂ and HgCl₂. The theoretical part summarizes the mechanisms of action of cadmium and mercury to neural cells, the main intracellular antioxidant glutathione and also bioanalytical methods that can be used to monitor the neurotoxic effect of heavy metals. Special attention is paid to the determination of cell viability, oxidative stress and apoptosis. The experimental part is focused on testing the effect of CdCl₂ and HgCl₂ on the concentration of intracellular glutathione and on the dehydrogenase activity of SH-SY5Y cells. Furthermore, changes in cell morphology are detected in real time using advanced microscopic techniques. Cell nuclei and the cytoskeleton are visualized using phase contrast microscopy and fluorescent probes. The last part of the diploma thesis summarizes the results.

KEYWORDS

SH-SY5Y cell line, Neurotoxicity, Cadmium, Mercury, Glutathione

OBSAH

ÚVOD.....	14
1. TEORETICKÁ ČÁST	15
1.1 Těžké kovy	15
1.1.1 Kadmium	16
1.1.1.1 Neurotoxicita kadmia	20
1.1.1.2 Apoptóza indukovaná kadmiem	21
1.1.2 Rtuť	22
1.1.2.1 Neurotoxicita rtuti	23
1.1.2.2 Indukce oxidačního stresu rtutí	24
1.1.2.3 Narušení intracelulární homeostázy vápníku	25
1.1.2.4 Změna genové exprese proteinů	26
1.2 Glutathion.....	27
1.2.1 Syntéza glutathionu.....	27
1.2.2 Funkce glutathionu	28
1.2.3 Stanovení hladiny glutathionu	31
1.2.3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie	32
1.2.3.2 Spektrofotometrické metody	33
1.2.3.3 Spektrofluorimetrické metody.....	34
1.2.3.4 Chemiluminiscenční metody	35
1.3 Testy metabolické aktivity a buněčné viability.....	36
1.3.1 Formazanové testy	36
1.3.2 Barvení trypanovou modří a fluorescenčními barvivy	40
1.3.3 Stanovení úniku laktátdehydrogenázy	41
1.4 Možnosti stanovení apoptózy.....	42
1.4.1 Stanovení produkce ROS.....	42
1.4.2 Stanovení změn exprese proteinů	44
1.4.3 Stanovení poškození DNA.....	47
1.4.4 Stanovení změn mitochondriálního membránového potenciálu.....	50
1.4.5 Fluorescenční značení buněčných organel	51
2. CÍLE PRÁCE.....	54
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	55
3.1 Biologický materiál.....	55
3.2 Seznam použitých chemikálií	55
3.3 Příprava roztoků	55

3.4	Laboratorní pomůcky, přístroje a software	57
3.5	Kultivace buněk SH-SY5Y	58
3.6	Testování neurotoxicity pomocí bioanalytických metod	59
3.6.1	Stanovení koncentrace glutathionu	59
3.6.2	Stanovení dehydrogenázové aktivity	59
3.7	Sledování změn buněčné morfologie v reálném čase	60
3.8	Vizualizace buněk a buněčných organel	60
3.8.1	Vizualizace aktinových vláken	60
3.8.2	Vizualizace buněčných jader	61
3.9	Statistická analýza naměřených dat	61
4.	VÝSLEDKY	62
4.1	Optimalizace denzity buněk SH-SY5Y	62
4.2	Testování neurotoxicity pomocí bioanalytických metod	64
4.2.1	Stanovení koncentrace glutathionu	64
4.2.2	Stanovení dehydrogenázové aktivity	67
4.3	Sledování změn buněčné morfologie v reálném čase	70
4.4	Vizualizace buněk a buněčných organel	73
5.	DISKUZE	76
6.	ZÁVĚR	86
7.	POUŽITÁ LITERATURA	87

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obr. 1: Následky intoxikace kadmíem v buňkách	17
Obr. 2: Mitochondriální změny způsobené intoxikací kadmíem.....	19
Obr. 3: Syntéza glutathionu	28
Obr. 4: Antioxidační funkce glutathionu	30
Obr. 5: MTT formazanový test	37
Obr. 6: Vzorce tetrazoliových solí MTS, WST-1 a XTT	38
Obr. 7: Schéma redukce MTS.....	39
Obr. 8: Test úniku laktátdehydrogenázy	41
Obr. 9: Schéma vazby FLICA na aktivované kaspázy	46
Obr. 10: Možnosti značení 3'-hydroxylových konců, metoda TUNEL	48
Obr. 11: DNA po provedení kometového testu	49
Obr. 12: Vzorce sloučenin Hoechst 33258 a Hoechst 33342.	52
Obr. 13: Mikrofotografie buněk SH-SY5Y inkubovaných s 25 μM CdCl_2 nebo HgCl_2	71
Obr. 14: Mikrofotografie buněk SH-SY5Y inkubovaných s 200 μM CdCl_2 nebo HgCl_2	72
Obr. 15: Mikrofotografie buněk SH-SY5Y inkubovaných s CdCl_2 (0-100 μM)	74
Obr. 16: Mikrofotografie buněk SH-SY5Y inkubovaných s HgCl_2 (0-100 μM).....	75
Graf 1: Optimalizace denzity buněk SH-SY5Y	62
Graf 2: Optimalizace konfluency buněk SH-SY5Y.....	63
Graf 3: Vliv testovaných látek na koncentraci glutathionu	65
Graf 4: Vliv testovaných látek na dehydrogenázovou aktivitu.....	68
Tabulka 1: Vliv testovaných látek na koncentraci glutathionu.....	66
Tabulka 2: Vliv testovaných látek na dehydrogenázovou aktivitu.....	69

SEZNAM ZKRATEK

•OH	hydroxylový radikál
AP-1	aktivátorový protein 1
ATP	adenosintrifosfát
ASK-1	kináza regulující apoptotický signál 1
BrdU	bromdeoxyuridin
CisPt	cisplatina
CNS	centrální nervová soustava
CTRL	kontrola
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenylindol
DCF	2',7'-dichlorfluorescein
DCFDA	2',7'-dichlordihydrofluorescein diacetát
DCFH	2',7'-dichlordihydrofluorescein
DEVD	kyselina asparagová-kyselina glutamová-valin-kyselina asparagová
DFF40	DNA fragmentační faktor 40
DFF45	inhibitor DNA fragmentačního faktoru 40
DMEM/F-12	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12 (1:1)</i>
DMT1	divalentní kotransportér dvojmocných iontů
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ERK	extracelulárním signálem regulovaná kináza
FAM	karboxyfluorescein
FBS	fetální bovinní sérum
FITC	fluoresceinisothiokyanát
FLICA	fluorochromem značené inhibitory kaspáz
FMK	fluormethylketon
FMN	flavinmononukleotid
GSH	glutathion
GSSG	glutathiondisulfid
GS-TNB	konjugát 5-thionitrobenzoátu s glutathionem
HIF-1	hypoxií indukovatelný faktor 1
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSP	proteiny teplotního šoku
INT	2-(p-jodfenyl)-3-(p-nitrofenyl)-5-fenyltetrazoliumchlorid

JNK	c-Jun N-terminální kináza
LDH	laktátdehydrogenáza
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MBB	monobromobiman
MCB	monochlorobiman
MMP	mitochondriální membránový potenciál
MRP	proteiny mnohočetné lékové rezistence
MS	hmotnostní spektrometrie
MT	metalothionein
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrotetrazolium bromid
NADH	nikotinamidadenin dinukleotid
NADPH	nikotinamidadenin dinukleotidfosfát
NDA	naftalen-2,3-dikarboxaldehyd
NFAT	nukleární faktor aktivovaných T buněk
NF- κ B	jaderný faktor kappa B
NMDA	N-methyl D-aspartátový receptor
O ₂ ^{•-}	superoxidový radikál
OAT	transportéry organických aniontů
OPA	ortho-ftalaldehyd
PARP	poly (ADP-ribóza) polymeráza
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDS	dodecylsulfát sodný
TdT	terminální deoxynukleotidyltransferáza
TMRE	tetramethylrhodamin ethyl ester
TMRM	tetramethylrhodamin methyl ester
TNB	5-thionitrobenzoát
TNF α	tumor nekrotizující faktor α
Trx	thioredoxin
TrxR	thioredoxinreduktáza
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase Nick-End Labeling</i>
WST	ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl
WST-1	2-(4-jodfenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium
WST-8	2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid

ÚVOD

Těžké kovy představují rozmanitou skupinu prvků zahrnující jednak kovy, které jsou v nízkých koncentracích důležité pro správnou funkci lidského metabolismu, ale také kovy, které pro člověka představují závažné riziko. Toxické účinky těžkých kovů zahrnují nefrotoxicitu, hepatotoxicitu, neurotoxicitu nebo plicní toxicitu. Významné a závažné je především působení na nervový systém a jeho součásti, z tohoto důvodu je studium neurotoxického působení těžkých kovů důležitým bodem pro výzkum.

Pro účely analýzy toxického působení vybraných látek jsou hojně využívány *in vitro* buněčné modely, které umožňují sledování změn, ke kterým dochází po jejich vystavení dané látce. Pro testování neurotoxicity je s výhodou používán model lidské neuroblastomové linie SH-SY5Y. Buňky mohou být prostřednictvím těžkých kovů poškozeny na několika úrovních. Může docházet jak ke změnám biochemických drah, tak k morfologickým a funkčním změnám jednotlivých organel nebo i celých buněk. Pro charakterizaci buněčného poškození a změn je možné využít širokou škálu bioanalytických metod zahrnující metody zaměřené například na změnu buněčné viability, oxidačního stavu buněk, aktivity enzymů, biochemických procesů nebo koncentrace biomolekul.

Důležitým prvkem obrany buněk proti toxicitě nejen těžkých kovů je stav antioxidačního systému. Nejvýznamnější součástí antioxidační obrany buňky je glutathion. Tento nízkomolekulární intracelulární antioxidant se účastní regulace buněčného cyklu, ovlivňuje funkci imunitního systému a má mimo jiné také vliv na regulaci buněčné smrti a buněčného dělení. Při oxidačním stresu dochází k jeho vyčerpávání. Jak jsme ale v této práci pozorovali, v reakci na stres může docházet i ke zvýšení jeho intracelulární hladiny. Stanovení schopnosti buněk vyrovnat se s oxidačním stresem je vhodné doplnit o posouzení stavu jejich metabolické aktivity, resp. buněčné viability. Proto jsme využili studium dehydrogenázové aktivity a na základě výsledků jsme do studia cytotoxicity u vybraných koncentrací těžkých kovů zahrnuli také pozorování buněk a jejich poškození v reálném čase a s využitím fluorescenčních sond.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Těžké kovy

Existuje několik definic těžkých kovů. Obecně se jedná o všechny kovy, které mají hodnotu hustoty rovnu nebo větší než 5, atomové číslo větší než 11 a představují riziko pro životní prostředí a pro člověka (Sall et al., 2020). Patří sem například kadmium, rtuť, olovo, arsen, antimon, baryum, beryllium, cesium, kobalt nebo platina a další (Sas-Nowosielska and Pawlas, 2015). Některé těžké kovy (železo, kobalt, měď, mangan, zinek, molybden) jsou v nízkých koncentracích důležité pro metabolismus a jsou považovány za základní prvky. Když však jejich koncentrace překročí prahovou hodnotu, mají nepříznivé účinky. Arsen, kadmium, olovo, rtuť a chrom jsou bezprahové toxické látky a jsou popisovány jako nejproblematictější těžké kovy. Často jsou označovány jako toxické těžké kovy, které se v přírodě vyskytují v různých oxidačních stavech s různou úrovní toxicity (Rahman and Singh, 2019). Tyto kovy jsou toxické i ve velmi nízkých koncentracích a nejsou biologicky odbouratelné (Sall et al., 2020). To znamená, že se akumulují v životním prostředí, ze kterého se dostávají do lidského organismu a zde narušují metabolismus a fyziologické pochody.

Znečištění životního prostředí těžkými kovy je způsobeno spalováním fosilních paliv, odpadů, výfukovými plyny vozidel a těžbou. V důsledku rozšiřování měst, rozvoje průmyslu a zemědělství založeném na používání uměle vyráběných hnojiv, pesticidů a herbicidů, dochází ke kontaminaci přírodních ekosystémů těžkými kovy, dusičnany a fosfáty. Těžké kovy se ale v přírodě také vyskytují přirozeně v důsledku eroze, činnosti sopek a termálních pramenů (Sall et al., 2020).

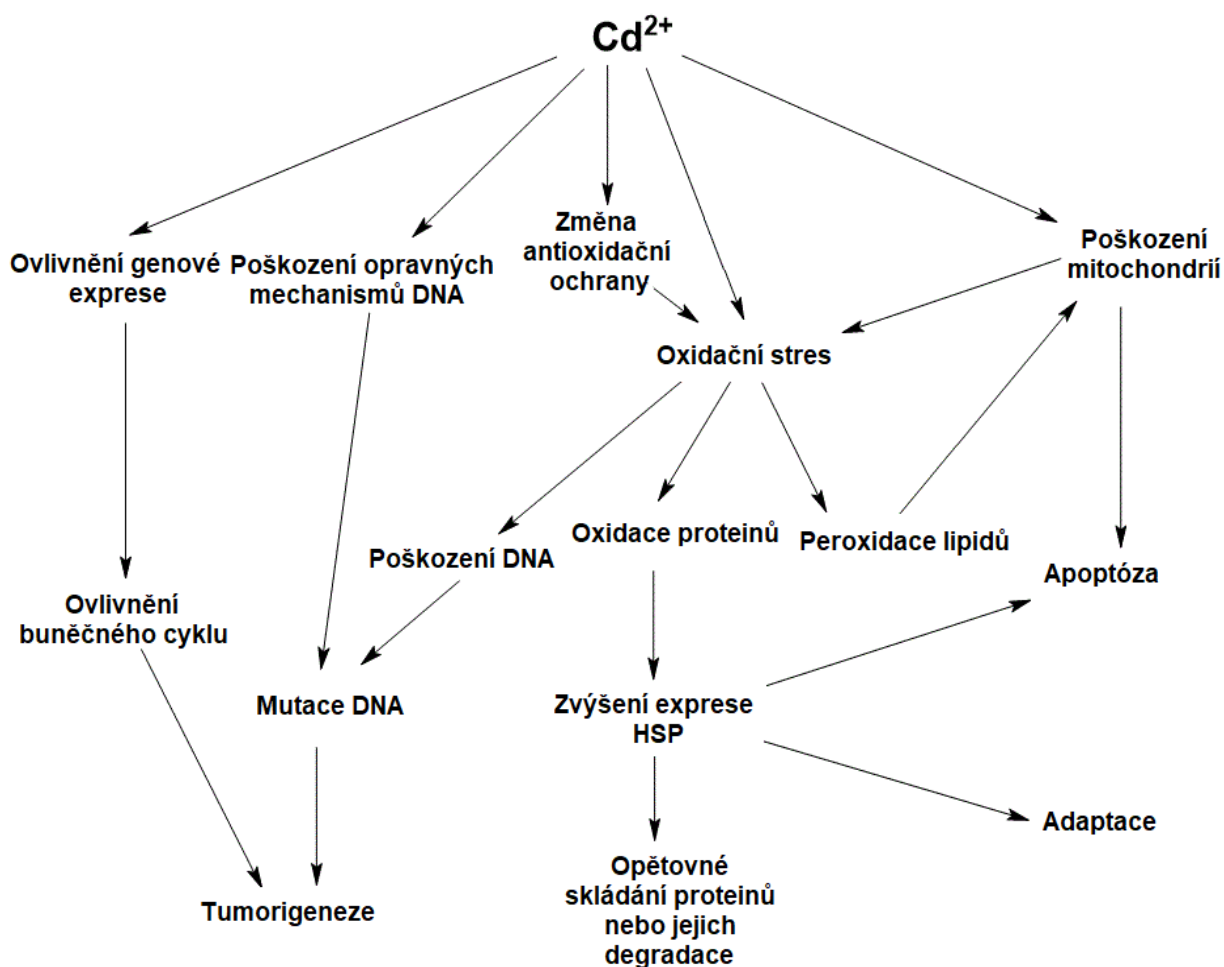
Těžké kovy mají negativní dopad na rostliny a zvířata. V mikroskopickém měřítku mají nepříznivé účinky na bakteriální populace, které mají přímý vliv na fungování celého ekosystému (Sall et al., 2020). Těžké kovy vážně poškozují i lidské zdraví. Pochopení jejich toxicity u člověka je však složité. Různé těžké kovy jsou spojeny s různými účinky v závislosti na mnoha faktorech. Mezi tyto faktory patří přijatá dávka, způsob expozice, věk jedince, pohlaví, genetické predispozice a stav výživy (Rahman and Singh, 2019). Těžké kovy mohou přispívat ke zvýšenému výskytu kardiovaskulárních a respiračních onemocnění. Známý jsou rovněž nefrotoxické, neurotoxické a imunotoxické účinky a vlastnosti narušující endokrinní systém (Sas-Nowosielska and Pawlas, 2015). Většina těžkých kovů je silně karcinogenní (Sall et al., 2020). Navíc mohou procházet placentou a zasahovat do vývoje plodu (Rahman and Singh, 2019).

Těžké kovy mohou do buněk vstupovat mnoha různými cestami. Často využívají konstitutivní složky buněčné membrány, jako jsou proteinové transportéry a iontové kanály. Kovy, které jsou ve fyziologických koncentracích důležité pro metabolismus, procházejí membránou prostřednictvím iontově specifických kanálů. Většina známých toxických těžkých kovů napodobuje tyto ionty a vstupuje do buněk prostřednictvím jejich specifických kanálů a transportérů. Po překonání plazmatické membrány mohou kovy negativně působit i na buněčná jádra, interferovat s nukleovými kyselinami a indukovat poškození genetické informace (Sas-Nowosielska and Pawlas, 2015).

1.1.1 Kadmium

Kadmium je velmi toxický těžký kov a průmyslová znečišťující látka přítomná v životním prostředí. Hlavní zdroje expozice kadmiu jsou kouření, průmyslově znečištěné ovzduší a kontaminovaná voda. Mezi další zdroje expozice patří hnojiva, pesticidy, pigmenty nebo plasty. Kadmium má biologický poločas kolem 20 let a jeho negativní účinek je umocněn tím, že je schopno hromadit se v orgánech. Asi 30 % absorbovaného kadmia se akumuluje v játrech a stejné množství v ledvinách. Zbytek je distribuován do dalších orgánů včetně mozku. Jeho akumulace v organismu může způsobit vážné poškození reprodukčního systému, gastrointestinálního traktu, sliznic a periferního i centrálního nervového systému (Elkhadragy et al. 2018). V mozku kadmium přispívá ke vzniku neurodegenerativních onemocnění. U Alzheimerovy choroby zhoršuje toxický účinek apolipoproteinu E4, čímž podporuje progresi tohoto onemocnění. Také přispívá ke vzniku Parkinsonovy choroby prostřednictvím narušení ubikvitin-proteazomového systému (Ijomone et al., 2020). Kadmium dále napomáhá vzniku amyotrofické laterální sklerózy nebo roztroušené sklerózy. Také má vliv na vznik myalgické encefalomyelitidy, periferní neuropatie, čichové dysfunkce, mentální retardace a poruch učení (Branca et al., 2019).

Narušením buněčných signálních drah podporuje karcinogenezi. Kadmium se nepřímo podílí na tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS). Inhibuje antioxidační obranu tím, že dokáže reagovat s exogenními, ale i endogenními antioxidanty, jako je glutathion (GSH) (Genchi et al., 2020). Také inhibuje opravné mechanismy DNA. Z toho vyplývá, že oxidační stres je jedním z nejdůležitějších mechanismů toxicity kadmia (Elkhadragy et al. 2018). Jeho toxicita ovlivňuje řadu orgánů a tkání při akutní i chronické expozici. Účinek je závislý na dávce. Při vysokých dávkách může kadmium postupně vyvolat poškození buněk, buněčnou smrt a selhání orgánů (Obr. 1) (Branca et al., 2019).



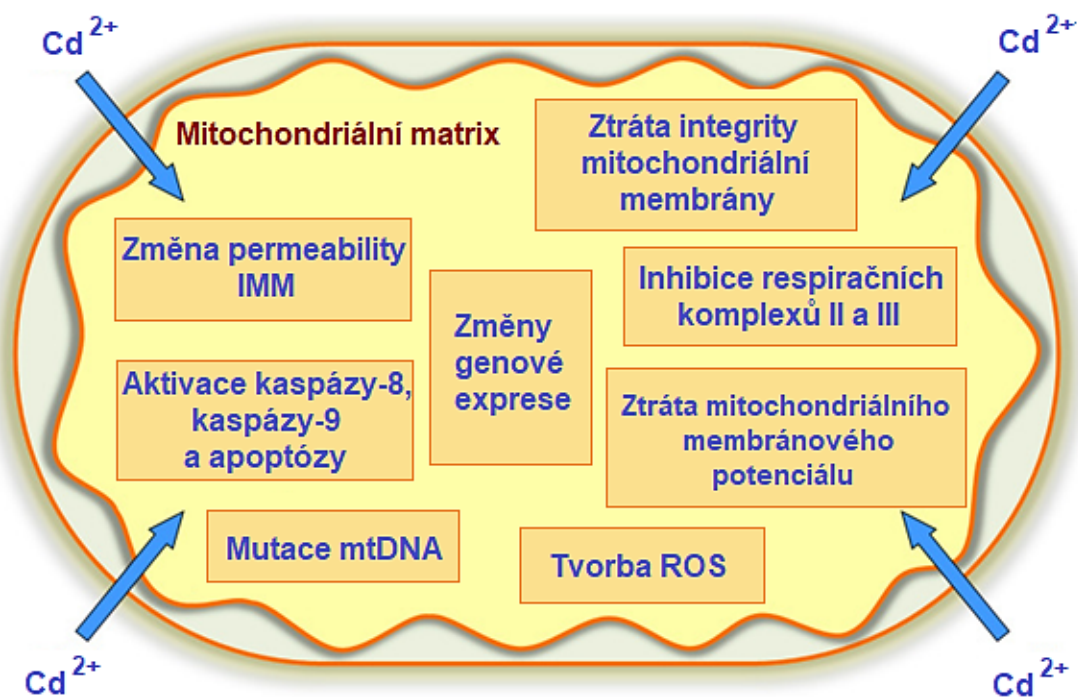
Obr. 1: Následky intoxikace kadmíem v buňkách. HSP – proteiny teplotního šoku (upraveno podle Bertin and Averbeck, 2006).

K absorpci kadmia dochází především dýchacími cestami a gastrointestinálním traktem. Absorpce přes kůži je málo častá (Genchi et al., 2020). Vzhledem k podobnosti transportního systému je absorpce kadmia do určité míry závislá na velikosti částic a přítomnosti dalších kovů, jako je železo, vápník a zinek. Nedostatek některého z těchto kovů je spojen se zvýšením absorpce kadmia (Ijomone et al., 2020). Poté, co kadmium vstoupí do organismu, je transportováno krevním řečištěm prostřednictvím albuminu nebo ve vazbě na metalothionein (MT), jehož expresi indukuje (Genchi et al., 2020; Wang and Du, 2013).

Metalothioneiny jsou proteiny s nízkou molekulovou hmotností, vysokým obsahem cysteinu a vysokou afinitou ke kovům (Wang and Du, 2013). Jedná se o reaktanty akutní fáze spojené s oxidativním metabolismem, které jsou schopny svými volnými thiolovými skupinami cysteinu redukovat volné radikály. Mezi jejich důležité funkce patří udržování homeostázy esenciálních kovů mědi a zinku. U savců jsou exprimovány čtyři různé izoformy, které se označují MT1, MT2, MT3 a MT4. MT1 a MT2 jsou exprimovány téměř ve všech

tkáních, zatímco MT3 a MT4 jsou tkáňově specifické. U savců jsou metalothioneiny lokalizovány v cytoplazmě, lysozomech, mitochondriích a buněčných jádrech (Genchi et al., 2020). Bylo prokázáno, že erytrocyty, leukocyty a trombocyty mohou metalothioneiny exprimovat také (Lu et al., 2005; Rahman et al., 2000; Sugiura et al., 1994). U těchto krevních elementů fyziologicky pravděpodobně slouží k regulaci homeostázy kovů nebo jako zásoba kovů pro aktivaci enzymů. Po intoxikaci kadmiiem jsou ale využity k transportu tohoto těžkého kovu po organismu (Sugiura et al., 1994). Ačkoliv zralé erytrocyty nejsou schopny syntetizovat proteiny, v jejich raných prekurzorech v kostní dřeni, v normoblastech a retikulocytech k biosyntéze MT dochází. Proto zralé erytrocyty metalothioneiny obsahují (Lambert et al., 1996; Rahman et al., 2000).

Kadmium má vliv i na mitochondrie, u kterých indukuje oxidační stres a produkci reaktivních forem kyslíku, aktivuje apoptózu, způsobuje mutace mitochondriální DNA, změny genové exprese, inhibuje komplexy dýchacího řetězce, snižuje syntézu adenosintrifosfátu (ATP) a mění propustnost vnitřní mitochondriální membrány (Obr. 2). Toxický účinek je způsoben hlavně blokováním elektronového transportního řetězce, konkrétně komplexů II a III (Genchi et al., 2020). Intoxikace kadmiiem vede k akumulaci semi-ubichinonů v místě Q_o komplexu III, který je hlavním místem tvorby ROS. Semi-ubichinony mohou být zodpovědné za přenos jednoho elektronu na molekulární kyslík za vzniku superoxidového radikálu. Superoxidový radikál lze převést spontánní nebo enzymatickou přeměnou na H_2O_2 , který může pomocí Fentonovy reakce generovat velmi reaktivní hydroxylový radikál (Bertin and Averbeck, 2006). Navíc snížením potenciálu mitochondriálních membrán narušuje kadmium oxidační fosforylaci a syntézu ATP. Kadmium indukuje zvýšení permeability vnitřní mitochondriální membrány pro ionty tím, že způsobí otevření přechodového póru mitochondriální permeability. Tento kov může také změnit aktivitu mitochondriálních enzymů a transportních systémů inhibicí enzymů dýchacího řetězce. Kadmium přímo zvyšuje propustnost a snižuje potenciál mitochondriální membrány, což vede k uvolňování cytochromu c a aktivaci kaspáz. Kadmium dále inhibuje aktivitu ATPázy, laktátdehydrogenázy, superoxidodismutázy a glutathionperoxidázy, čímž zvyšuje hladiny ROS a stimuluje peroxidaci lipidů. Ionty kadmia zároveň vykazují vysokou afinitu k biologickým strukturám obsahujícím thiolové skupiny, kam patří například cystein a glutathion. Také má afinitu ke sloučeninám obsahujícím disulfidové skupiny jako je cystin a glutathiondisulfid. To způsobuje narušení jejich funkcí. Inaktivace thiolových skupin enzymů může způsobit funkční deficit v jádře, endoplazmatickém retikulu a mitochondriích (Genchi et al., 2020). V důsledku tohoto působení dochází k narušení antioxidačních mechanismů buněk.



Obr. 2: Mitochondriální změny způsobené intoxikací kadmíem. IMM – vnitřní mitochondriální membrána; ROS – reaktivní formy kyslíku (upraveno podle Genchi et al., 2020).

Snížení aktivity nebo hladiny antioxidantních enzymů zprostředkované tímto těžkým kovem může způsobit akumulaci ROS v buňkách. Následná nadprodukce oxidantů může být nepřímo zodpovědná za tvorbu abnormálních nebo špatně složených proteinů, ale také za poškození DNA. Vysoké koncentrace kadmia jsou spojeny s jednořetězcovými zlomy DNA, chromozomálními aberacemi a selháním DNA vazebných proteinů (Bertin and Averbeck, 2006; Mourón et al., 2004). Intoxikace kadmíem také modifikuje expresi dalších důležitých proteinů reagujících na stres, jako jsou proteiny teplotního šoku (HSP) (Misra et al., 2003). Po expozici kadmíem dochází k nadměrné expresi genů, které tyto proteiny kódují. HSP hrají důležitou roli při skládání, ale také při degradaci proteinů. Některé navíc aktivují nebo inhibují apoptózu (Bertin and Averbeck, 2006).

Kadmium je zároveň schopno nepřímo působit na buněčný cyklus. Velké množství genů zapojených do regulace buněčného cyklu je po expozici kadmíem nadměrně exprimováno a mnoho proteinů je upregulováno. Například GRB2 a SHC, což jsou dva důležité proteiny signální dráhy RAS, které jsou zapojeny do buněčné proliferace a diferenciace. Kadmium také zvyšuje hladinu kináz RAF-1, MAPK, MEK1/2, ERK1/2, p38 a JNK, které jsou taktéž součástí dráhy RAS (Misra et al., 2003). V savčích buňkách kadmium indukuje expresi

cyklinu D a cyklinu E aktivací transkripčního faktoru typu Myb, což má vliv především na G1 fázi buněčného cyklu. Významným negativním účinkem kadmia je i jeho schopnost zvyšovat expresi protoonkogenů C-FOS, C-MYC a C-JUN a některých translačních faktorů. Důsledkem je stimulace proliferace buněk a vývoj nádorů (Bertin and Averbeck, 2006).

1.1.1.1 Neurotoxická kadmia

Důsledkem působení kadmia je také centrální a periferní neurotoxická (Rahimzadeh et al., 2017). Kadmium způsobuje změny v histologických a morfologických charakteristikách hematoencefalické bariéry, které vedou k její zvýšené permeabilitě, následné intracelulární akumulaci kadmia a jeho toxicitě (Ijomone et al., 2020). Neurotoxická kadmia zahrnuje tvorbu reaktivních forem kyslíku a volných radikálů, peroxidaci lipidů, dysregulaci systémů pro opravu buněk a epigenetické modifikace (Branca et al., 2018). Oxidační stres je mechanismus, který při expozici kadmium ovlivňuje metylaci DNA. Nárůst hladiny reaktivních forem kyslíku má za následek nízkou interakci methyltransferázy s DNA a následnou hypomethylaci cytosinu v CpG místech. To může být také způsobeno přímou interakcí kadmia s DNA vázající doménou methyltransferázy. Modifikace histonů je dalším mechanismem, kterým kadmium indukuje toxicitu. Kadmium způsobuje změnu methylačního stavu lysinových zbytků histonu H3 a také snižuje fosforylaci H3 prostřednictvím inhibice kinázy VRK1/2 (Ijomone et al., 2020).

V centrální nervové soustavě (CNS) kadmium vyvolává poškození tkání oxidačním stresem vedoucím k apoptóze, dále narušením intracelulární homeostázy vápníku. Kadmium může blokovat příliv Ca^{2+} přes membránové kanály do nervového zakončení po akčním potenciálu. Tato blokáda přítoku vápníku je spojena se změněným uvolňováním neurotransmiterů (Ijomone et al., 2020). CdCl_2 u buněk SH-SY5Y inhibuje buněčnou proliferaci a ovlivňuje buněčný cyklus. Po expozici dochází ke snížení počtu buněk v G1 fázi a zvýšení počtu v S fázi (Sudo et al., 2019). Působením kadmia dochází k poškození buněk a peroxidaci lipidů v mozku (Rahimzadeh et al., 2017). Peroxidace lipidů může způsobit zesíťování a polymeraci složek membrány. Tímto způsobem může být modifikováno lipidové složení membrán, a v důsledku toho i buněčné funkce. Produkty rozkladu lipidových peroxidů mohou také reagovat s dusíkatými bázemi DNA a proteiny (Bertin and Averbeck, 2006).

Účinek kadmia na monoaminoxidázu je zodpovědný za oxidační deaminaci monoaminových neurotransmiterů. Kadmium zvyšuje produkci volných radikálů v CNS a snižuje buněčnou obranu před oxidací. Výsledkem tohoto mechanismu je čichová dysfunkce, neurobehaviorální poruchy pozornosti, porucha psychomotorické aktivity a paměti

(Rahimzadeh et al., 2017). K dalšímu poškození dochází vlivem vytváření epigenetických změn v DNA, které mění genovou expresi. Epigenetických změn je dosaženo metylací DNA, modifikací histonů a miRNA. Mezi další patologické mechanismy patří kompetitivní interference s fyziologickým působením zinku nebo hořčíku. Zinek a kadmium jsou kationty podobné velikosti a náboje. Bylo prokázáno, že kadmium brání absorpci zinku pomocí transportních systémů, které slouží ke kontrole hladin zinku v mozku (Ijomone et al., 2020).

1.1.1.2 Apoptóza indukovaná kadmiiem

Bylo prokázáno, že po intoxikaci kadmiiem dochází k indukci apoptózy. U potkaních gliomových buněk C6 a myších fibroblastů NIH3T3 bylo prokázáno, že množství apoptotických buněk je závislé na koncentraci kadmia. U myších fibroblastů L929, myších preadipocytů 3T3L1, lidských fibroblastů VH16 a buněk lidského plicního adenokarcinomu A549 ale tato skutečnost prokázána nebyla. Vliv má tudíž s největší pravděpodobností i typ použité buněčné linie. Apoptóza spojená s kadmiiem je charakterizována poklesem mitochondriálního membránového potenciálu, kondenzací chromatinu a fragmentací DNA a jádra (Wätjen et al., 2002). Bylo prokázáno, že kadmium indukuje stres endoplazmatického retikula. Ten vede k buněčné smrti cestou, která není závislá na mitochondriích. K apoptóze neurálních buněk vede také aktivace MAP kinázové a mTOR signální dráhy (Branca et al., 2018).

Hlavním zdrojem ROS jsou mitochondrie. Mitochondriální dýchací řetězec hraje zásadní roli při udržování energetické homeostázy prostřednictvím oxidativní fosforylace, při které dochází k produkci ATP. Kromě toho jsou mitochondrie zapojeny do syntézy aminokyselin, lipidů a fosfolipidů, do iontové homeostázy a apoptózy. Počet a funkce mitochondrií se liší v závislosti na typu tkáně, na energetických potřebách buněk a na podmínkách, ve kterých se buňky nachází (Genchi et al., 2020). Jako indikátor mitochondriální funkce může sloužit enzym cyklooxygenáza, protože její dysfunkce zvyšuje tvorbu ROS a zhoršuje energetický metabolismus (Wang and Du, 2013).

Apoptóza vyvolaná kadmiiem zahrnuje dvě hlavní apoptotické cesty – vnější a vnitřní. Vnější cesta je zprostředkována receptory smrti Fas na plazmatické membráně a reaguje na vnější podněty. Vnitřní cesta zprostředkována mitochondriemi spouští apoptózu v reakci na vnitřní podněty, jako je například poškození DNA nebo působení ROS (Bertin and Averbeck, 2006). Tyto stresové podněty vedou k permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a uvolnění cytochromu c z mitochondriálního mezimembránového prostoru do cytosolu. Obě cesty jsou vzájemně propojeny a molekuly z jedné dráhy mohou

ovlivňovat molekuly z dráhy druhé (Genchi et al., 2020). Každá dráha aktivuje své iniciátory, jako je kaspáza-8 nebo kaspáza-10 pro vnější dráhu a kaspáza-9 pro vnitřní dráhu. Tyto poté aktivují efektorové enzymy kaspázu-3 a kaspázu-7, které spouštějí buněčnou smrt štěpením proteinových substrátů. V důsledku intoxikace může být apoptóza vyvolána také vlivy nezávislými na kaspázách, například procesy vázanými na Ca^{2+} s kalpainem nebo translokací faktoru indukujícího apoptózu do jádra (Bertin and Averbeck, 2006).

Kadmiem indukovaná apoptóza je spojena se zvýšenými hladinami proteinu p53. Za normálních podmínek obsahuje protein p53 doménu vázající zinek se třemi cysteiny a jedním histidinem. Jedním z možných vysvětlení účinku kadmia je, že tento kov naruší fungování p53 vazbou na thiolové skupiny v této struktuře. Bylo zjištěno, že u myších splenocytů a buněčných linií lidského hepatomu je kadmiem indukovaná apoptóza nezávislá na expresi p53, ale závisí na produkci ROS, zatímco u plicních buněk primárního epitelu potkana je tomu naopak. Zapojení p53 do apoptózy vyvolané kadmiem tedy může záviset na typu buněk (Bertin and Averbeck, 2006).

1.1.2 Rtuť

Hlavní cesta, kterou se rtuť dostává do organismu, je orální. Průchod gastrointestinální bariérou je zásadním krokem, který ovlivňuje vstup tohoto prvku do systémové cirkulace a následnou distribuci do cílových orgánů (Vázquez et al., 2015). Bylo zjištěno, že transport rtuti přes plazmatickou membránu enterocytů může probíhat jak pasivně, tak aktivně. Vstřebávání v lumen střeva je závislé na složení přijímané potravy. Ta často obsahuje vysoké koncentrace aminokyselin a peptidů obsahujících thiolové skupiny, se kterými se může rtuť vázat a vytvářet lineární koordinačně kovalentní komplexy. Konjugáty s thiolem vytvořené v lumen gastrointestinálního traktu mohou mít podobný tvar a velikost jako endogenní molekuly, které jsou absorbovány v tenkém střevě. Vzhledem k těmto podobnostem, a protože v enterocytech je velké množství přenašečů aminokyselin a peptidů, jsou konjugáty vychytávány těmito transportéry. Požitá rtuť může být po disociaci z thiolového konjugátu vychytávána a transportována prostřednictvím iontových transportérů. Zde může hrát významnou roli divalentní kotransportér dvojmocných iontů DMT1 (Bridges and Zalups, 2017). DMT1 transportuje přechodné kovy lokalizované v apikální membráně epitelálních buněk střeva. Tento protein je schopen transportovat velké množství esenciálních dvojmocných kationtů Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} a Ni^{2+} . Existují také důkazy o tom, že by se DMT1 mohl podílet i na absorpci toxických kationtů kovů, jako je Hg^{2+} , Cd^{2+} a Pb^{2+} . Studie prokázaly, že buňky v reakci na rtuť snižují expresi DMT1, což by mohl být jeden z obranných

mechanismů (Vázquez et al., 2015). Kromě DMT1 jsou při transportu a eliminaci rtuti využívány také transportéry organických aniontů (OAT) a proteiny mnohočetné lékové rezistence (MRP) (Yang et al., 2020). Po přechodu do krve je díky svým elektrofilním vlastnostem většina rtuťnatých iontů přítomných v plazmě navázána na proteiny obsahující thiol. Množství rtuti v krvi se následně rychle snižuje, což naznačuje, že jsou ionty rtuti přijímány cílovými buňkami (Bridges and Zalups, 2017).

Protože jsou receptory v buněčných membránách složeny z proteinů, jsou pro rtuť snadným cílem. Pokud se tento kov naváže na některý z aminokyselinových zbytků v receptorových proteinech, blokuje nebo zeslabuje normální metabolickou funkci buňky. Důsledkem vazby rtuti tedy může být ohrožení správné fyziologické funkce buňky nebo jejích organel (Risher and Tucker, 2017).

1.1.2.1 Neurotoxická rtuti

Anorganické soli rtuti jsou obecně méně neurotoxické než organické sloučeniny. S největší pravděpodobností je to proto, že rychlost jejich transportu do parenchymu CNS je nižší než v případě organických. Přesto může HgCl_2 působit jako přímá toxická látka pro hematoencefalickou bariéru (Zheng et al., 2003). Anorganická rtuť může vzniknout v mozku po dlouhodobé expozici methylrtuti její demethylací. HgCl_2 je velmi reaktivní formou rtuti, protože interaguje s mnoha makromolekulami a má spoustu negativních účinků na nervové buňky. Ukázalo se, že v buňkách SH-SY5Y zvyšuje sekreci β -amyloidu, což přispívá ke vzniku Alzheimerovy choroby (Gassó et al., 2001). Po dlouhodobé inkubaci s HgCl_2 bylo pozorováno silné zvýšení integrity lysozomů (Lohren et al. 2015).

Neurotoxická rtuti zahrnuje nespočet mechanismů a buněčných cílů. Patří mezi ně porucha homeostázy vápníku, dysfunkce mitochondrií, změna glutamátergí excitability, narušení struktur cytoskeletu, ovlivnění aktivity Na^+/K^+ ATPázy a mnoho dalších (Abdel Moneim, 2015; Xu et al., 2012). Důležitými znaky neurotoxicity rtuti jsou inhibice transportu glutamátu, inhibice glutaminsyntetázy, bránění migraci neuronů a oxidační stres (Branco et al., 2017; Xu et al., 2012). Na základě studií *in vitro* bylo zjištěno, že toxicita rtuti zahrnuje odpovědi HSP nebo stresovou reakci zprostředkovanou nukleárním transkripčním faktorem Nrf2, u kterého dochází k jeho zvýšené aktivaci a transpozici (Yang et al., 2020). HgCl_2 dále způsobuje degeneraci a narušuje excitabilitu neuronů. Má výrazné škodlivé účinky na vyvíjející se kortikální neurony, spouští v nich proces apoptózy a v důsledku tak způsobuje snížené přežití buněk. Narušuje růst neuritů, brání správnému sestavení neuronální sítě a vede k degeneraci již vytvořených sítí. Neurony vystavené HgCl_2 jsou také mnohem menší.

Degenerace struktur cytoskeletu je spojena s glutamátergní excitací. Charakteristickými znaky glutamátergní excitace indukované HgCl_2 jsou narušení cytoskeletu a buněčná smrt v důsledku poruchy homeostázy vápníku nebo jiných buněčných signálních drah vyplývajících z nadměrné stimulace N-methyl D-aspartátových receptorů (NMDA) (Xu et al., 2012).

1.1.2.2 Indukce oxidačního stresu rtuť

Rtuť ovlivňuje redoxní rovnováhu. Jak vysoké hladiny ROS, tak snížená regulace endogenních antioxidantních systémů mohou vést k oxidačnímu stresu. Ačkoli se tvorba ROS podílí na cytotoxicitě HgCl_2 , není zatím s jistotou prokázáno, že by tato sloučenina rtuť způsobovala i peroxidaci lipidů (Gassó et al., 2001). Nadměrné hladiny ROS způsobují značné poškození buněk, což vede k apoptóze a dalším formám buněčné smrti. HgCl_2 dále způsobuje změny v buněčném cyklu. Po expozici HgCl_2 se snižuje počet buněk v G1 fázi a zvyšuje počet v S fázi. Tyto výsledky dokazují, že dochází k inhibici buněčné proliferace a dysregulaci buněčného cyklu. Inhibice proliferace může být jednou z významných příčin snížení buněčné viability (Sudo et al., 2019).

Ačkoli HgCl_2 vyvolává zvýšení tvorby ROS, v některých studiích nebyla prokázána změna aktivity kaspáz ani populace buněk sub-G1. To naznačuje, že i když HgCl_2 ovlivňuje apoptotické cesty, ROS při indukci apoptózy nemusí hrát zásadní roli (Sudo et al., 2019). Rtuť indukovaná apoptóza a nekróza v buňkách je regulována MAPK p38 a tumor nekrotizujícím faktorem α (TNF- α). Rtuť aktivuje receptory růstových faktorů, G-proteiny, tyrosinkinázy, transkripční faktory jako je například jaderný faktor kappa B (NF- κ B), nukleární faktor aktivovaných T buněk (NFAT), aktivátorový protein 1 (AP-1), protein p53, hypoxií indukovatelný faktor 1 (HIF-1) a signální dráhu JAK/STAT (Yang et al., 2020). Sloučeniny rtuť způsobují narušení plazmatické membrány a významný únik laktátdehydrogenázy (LDH), což značí, že indukce nekrózy je jednou z hlavních příčin snížení životaschopnosti buněk (Lohren et al. 2015; Sudo et al., 2019).

Je dobře známo, že anorganická i organická rtuť může tvořit silnou vazbu s thiolovými skupinami, což následně vede k ovlivnění funkcí proteinů. Především se jedná o cysteinové i selenocysteinové zbytky v peptidech a proteinech (Branco et al., 2017). Rtuť může negativně ovlivňovat složky hlavních buněčných antioxidantních systémů. Narušuje expresi a aktivitu enzymů a neenzymatických lapačů volných radikálů. To následně vede ke snížení antioxidantních schopností, a tím i ke zvýšení náchylnosti intracelulárního prostředí vůči oxidaci. V buňkách neuroblastomu N18TG-2 způsobuje HgCl_2 významný pokles glutathionu. Snižování buněčných koncentrací GSH snižuje životaschopnost buněk. Deplece

intracelulárních thiolů prostřednictvím vazby se rtuť může změnit aktivitu těchto proteinů, což může přispět k oxidačnímu stresu (Becker and Soliman, 2009). HgCl_2 může také změnit poměr redukovaného a oxidovaného glutathionu buď přímou vazbou na redukovaný GSH, deplecí GSH nebo snížením hladin glutathionperoxidázy (Yang et al., 2020). Díky své vysoké koncentraci v buňkách může být GSH prvním cílem ROS generovaných rtuť. Glutathion také slouží jako záložní molekula pro thioredoxinreduktázu (TrxR), která udržuje thioredoxin (Trx) v redukovaném stavu. Toho lze dosáhnout buď přímou redukcí Trx pomocí GSH nebo nepřímo prostřednictvím glutaredoxinu. Deplece glutathionu po působení HgCl_2 je přímo spojena se zvýšenou oxidací Trx (Branco et al., 2017). Sloučeniny rtuť mohou také narušit pentózafosfátovou dráhu, což vede k ovlivnění thioredoxinového systému a produkce NADPH (Yang et al., 2020). Na aktivitě thioredoxinového systému jsou závislé důležité buněčné funkce jako syntéza DNA, vyčytávání ROS, regulace buněčné signalizace a skládání a opravy proteinů. Oxidace Trx má za následek snížení antioxidační kapacity a dysregulaci specifických proteinů, konkrétně peroxiredoxinů. Selenoenzym thioredoxinreduktáza je extrémně náchylný k inhibici rtuť. Tato citlivost je způsobena reaktivitou a polohou selenocysteinového zbytku v otevřeném C-konci aktivního místa TrxR. Aktivita TrxR je po expozici HgCl_2 významně ovlivněna jak v cytosolických, tak v mitochondriálních kompartmentech. Narušení aktivity tohoto enzymu lze považovat za biomarker akutní toxicity rtuť, protože je jedním z prvních cílů, na které tento těžký kov působí (Branco et al., 2017).

Expozice HgCl_2 také vede k disociaci Nrf2 z komplexu Nrf2/Keap1, což následně způsobí změnu redoxního stavu uvnitř buňky. Ta potom přispívá ke zvýšení tvorby ROS a indukci oxidačního stresu. Inhibice cytokinové signalizace prostřednictvím oxidačního stresu je dalším důležitým důvodem, proč jsou neurony po expozici rtuť náchylnější ke smrti (Yang et al., 2020).

1.1.2.3 Narušení intracelulární homeostázy vápníku

K neurotoxicitě zprostředkované HgCl_2 přispívá kromě oxidačního stresu také narušení intracelulární homeostázy vápníku. HgCl_2 účinně aktivuje vápníkové kanály TRPC4 a TRPC5 prostřednictvím vazby na dva extracelulární cysteinové zbytky v blízkosti těchto kanálů. Z toho důvodu dochází ke zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} , což může ovlivnit délku axonů a spojení mezi synapsi (Yang et al., 2020). V cerebelárních granulárních buňkách indukuje HgCl_2 apoptózu v závislosti na vstupu vápníku do buňky. Vzestup hladiny Ca^{2+} v buňkách může být způsoben jeho nadměrným uvolněním z endoplazmatického retikula nebo zvýšením prostupu přes plazmatickou membránu. Zvýšený influx vápníku do buňky vedoucí k apoptóze může

probíhat přes napětově řízené kanály L-typu. Intracelulární koncentrace Ca^{2+} se potom zvyšuje úměrně s dobou expozice HgCl_2 (Gassó et al., 2001). Porucha synaptické aktivity a homeostázy vápníku aktivuje řadu kaskád, které zahrnují aktivaci proteinázy, generování reaktivních forem kyslíku a mitochondriální selhání. To vše má za následek letální účinek na složky buněčného cytoskeletu a na DNA. Bylo prokázáno, že intracelulární hladiny Ca^{2+} výrazně stoupají nad optimální hladinu, a tím inhibují růst neuritů. HgCl_2 způsobuje ireverzibilní, dvojnásobné až pětinasobné zvýšení intracelulární koncentrace vápníku. HgCl_2 také zvyšuje frekvenci spontánních synaptických potenciálů následovaných trvalou depolarizací membrány (Xu et al., 2012). Je dobře známo, že zvýšení hladiny Ca^{2+} vyvolané poruchou homeostázy může indukovat tvorbu ROS a vést k neuronální smrti (Gassó et al., 2001).

Toxické účinky na neurony jsou zprostředkovány nadměrnou aktivací NMDA receptorů. Konkrétně se ukázalo, že nadměrná stimulace NMDA receptorů a následné přetížení vápníkem způsobuje rychlé narušení komponent cytoskeletu nebo inhibici sestavování nových prvků cytoskeletu (Heo et al., 2008; Xu et al., 2012). Konkrétně se jedná o aktinová vlákna (F-aktin) a mikrotubuly (β -tubulin). Neuronální cytoskeletální proteiny jsou extrémně citlivé na hladinu intracelulárního vápníku. Jejich skládání a degradace může být ovlivněna vápníkem buď přímo nebo nepřímo prostřednictvím regulace proteinů asociovaných s cytoskeletem, jako je například tau protein vázající se na tubulin. Experimentálně indukovaná trvalá elevace vápníku způsobuje hyperfosforylaci tau proteinu, což vede k depolymerizaci mikrotubulů a neuronální degeneraci v kultivovaných lidských kortikálních neuronech. Přežití neuronů významně závisí na stavu složek cytoskeletu. Jakékoli narušení těchto dynamických struktur v důsledku environmentálních nebo genetických faktorů může ohrozit přežití buněk. Protože je Ca^{2+} důležitým regulátorem buněčné dráždivosti a genové exprese, ukázalo se, že jeho vstup prostřednictvím NMDA receptorů ovlivňuje synaptickou aktivitu, která hraje zásadní roli ve vývoji neuronů, synaptické plasticitě, přežití buněk a zpřesňování synaptických obvodů. Bylo zjištěno, že thiolová skupina v cysteinových zbytcích NMDA receptorů je potenciálním cílem pro regulaci funkce NMDA receptoru redoxními nebo alkylačními činidly. Činidla oxidující thiolovou skupinu snižují aktivitu tohoto receptoru, zatímco redukující činidla ji zesilují (Xu et al., 2012).

1.1.2.4 Změna genové exprese proteinů

Současné poznatky naznačují, že nepřímým důsledkem buněčného stresu vyvolaného Hg^{2+} ionty v buňkách jsou změny genové exprese proteinů zapojených do ubikvitin-proteazomového systému, antioxidačního obranného systému, regulačních drah

buněčného cyklu, proliferace buněk a apoptózy. U většiny proteinů v lidských neuroblastomových buňkách ovlivněných působením HgCl₂ jsou změněny procesy modifikace proteinů včetně skládání a degradace. HgCl₂ významně upreguluje transkripční faktory ATF2, ATF3, FOS, FOS-like antigen 1, stejně jako MafG a MafK. Ovlivněny jsou také geny pro proteiny zapojené do buněčného metabolismu včetně cytochromu P450. Sloučeniny rtuti ovlivňují metalothioneiny, které hrají důležitou roli při ochraně před jejich cytotoxickými účinky (Yang et al., 2020). HgCl₂ indukuje expresi genů kódující metalothioneiny (Zalups and Koropatnick, 2000). Dokáže se hromadit v astrocytech a zde indukovat expresi astrocytárních metalothioneinů (Zheng et al., 2003).

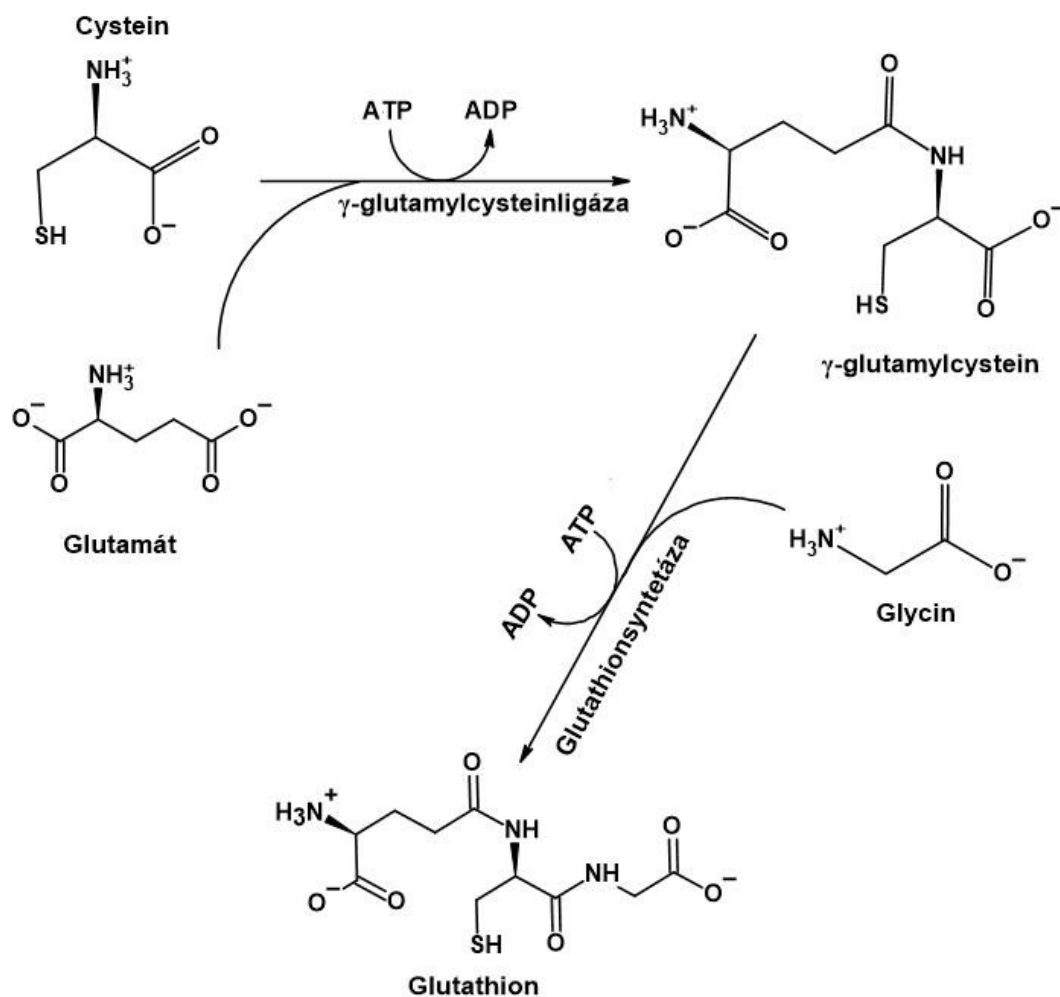
Působení ROS v důsledku expozice HgCl₂ je spojeno s klastogenním účinkem, který se projevuje poškozením DNA. Konkrétně dochází ke vzniku zlomů a strukturním přestavbám chromozomů. HgCl₂ má kromě toho také aneugenní účinky, což znamená, že dceřiné buňky obsahují abnormální počet chromozomů neboli aneuploidii. Část účinku HgCl₂ je pravděpodobně způsobena narušením funkce motorického proteinu kinesinu a mikrotubulů, což vede k poruchám v distribuci chromozomů. Aneugenní sloučeniny rtuti mohou mít vliv na tvorbu tubulů nebo segregaci chromozomů, což může následně vést ke ztrátě chromozomů (Bonacker et al., 2004).

1.2 Glutathion

Glutathion neboli γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycin je nevýznamnější nízkomolekulární intracelulární antioxidant, jež je přítomný ve všech savčích tkáních v milimolárních koncentracích. Jeho nejvyšší koncentrace je v hepatocytech (Forman et al., 2009; Lu, 2013). Účastní se regulace buněčného cyklu, modulace imunitních funkcí a fibrogeneze a je důležitý v různých buněčných kompartmentech. Například v mitochondriích má význam při regulaci apoptózy a nekrózy a v jádře je regulátorem buněčného dělení (Forman et al., 2009).

1.2.1 Syntéza glutathionu

Syntéza glutathionu (Obr. 3) se skládá ze dvou kroků. V prvním kroku dochází k reakci cysteinu s glutamátem, která je katalyzovaná enzymem γ -glutamylcysteinligázou neboli γ -glutamylcysteinsyntetázou. K vytvoření amidové vazby mezi γ -karboxylovou skupinou glutamátu a aminoskupinou cysteinu je potřeba hydrolýza adenosintrifosfátu. Produktem první reakce je γ -glutamylcystein, ke kterému se ve druhém kroku připojuje glycin. Druhá reakce je katalyzována enzymem glutathionsyntetázou a je zde také nutná hydrolýza ATP. Výsledným produktem je glutathion (Bachhawat and Yadav, 2018; Forman et al., 2009).



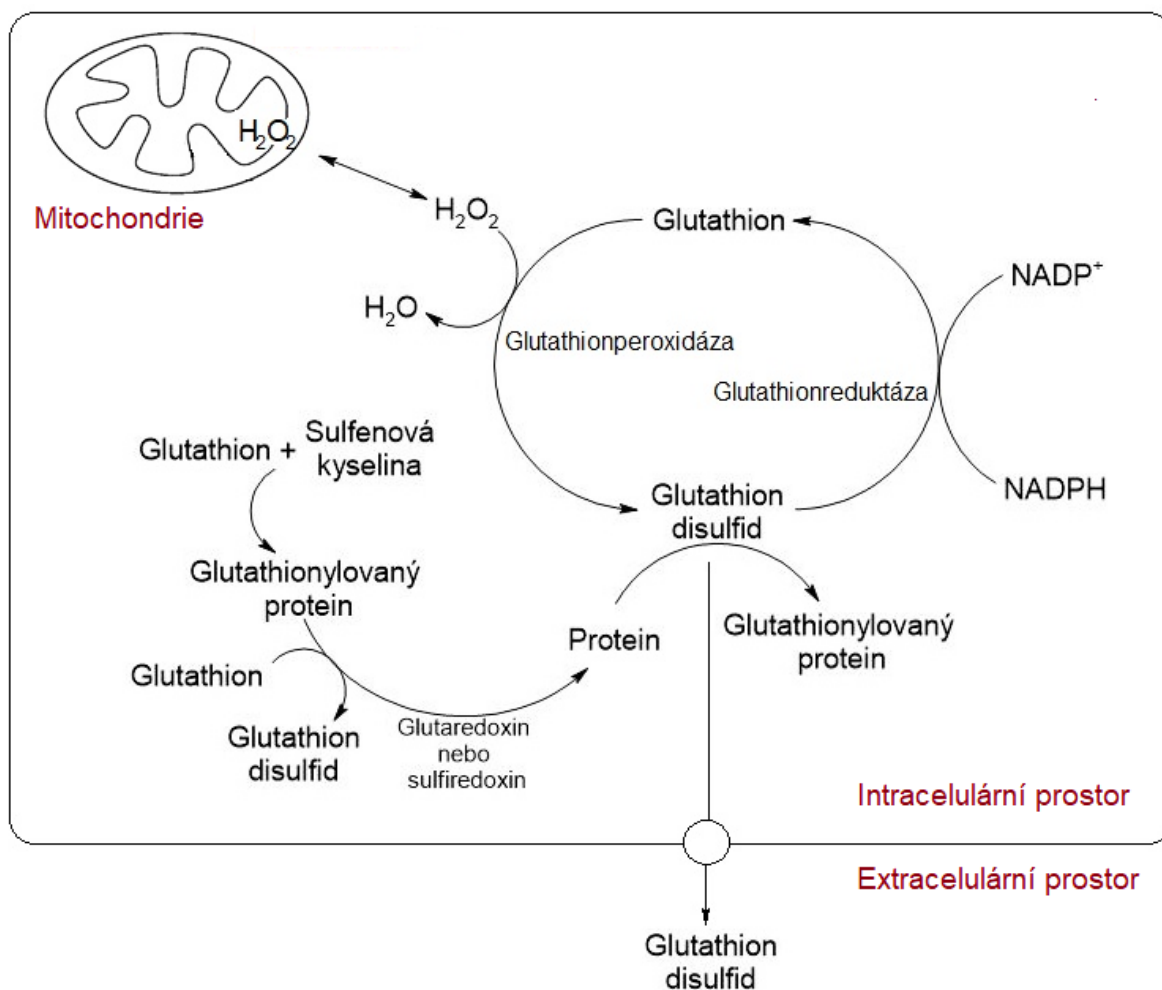
Obr. 3: Syntéza glutathionu (upraveno podle Forman et al., 2009).

1.2.2 Funkce glutathionu

Ačkoliv je glutathion intracelulární antioxidant, může být transportován z buněk. Tento mechanismus je velmi důležitý v hepatocytech. GSH transportovaný z hepatocytů do plazmy je využíván jako zdroj cysteinu pro syntézu GSH v jiných buňkách. Jediným enzymem, který dokáže hydrolyzovat γ -vazbu mezi glutamátem a cysteinem, je γ -glutamyltranspeptidáza, která je přítomna pouze na vnějších površích některých buněk. V důsledku toho je glutathion odolný vůči intracelulární degradaci a je metabolizován pouze extracelulárně buňkami, které γ -glutamyltranspeptidázu exprimují (Lu, 2013). Při štěpení GSH γ -glutamyltranspeptidázou vzniká cysteinylglycin, který je následně štěpen dipeptidázou, přičemž vzniká cystein a glycin. Tyto aminokyseliny jsou do ostatních buněk transportovány specifickými přenašeči a v buňkách jsou potom využity pro biosyntézu GSH (Forman et al., 2009).

Klíčovou částí GSH je thiolová skupina cysteinu, která se účastní redukčních a konjugčních reakcí. Ty napomáhají odstraňování ROS a dalších xenobiotických sloučenin. Při konjugaci ve fázi II biotransformace se xenobiotika váží na GSH právě prostřednictvím této skupiny na cysteinu. Rozštěpením γ -vazby se uvolňuje glutamát a vzniká cysteinylglycinový produkt, který je transportován z buňky. Následně dipeptidázy rozštěpí vazbu mezi cysteinem a glycinem. Výsledkem je cysteinový konjugát s xenobiotikem, který je N-acetylován působením N-acetyltransferázy. Konečnou sloučeninou je N-acetylcystein neboli merkapturát, který je vyloučen z organismu močí (Forman et al., 2009).

V antioxidační ochraně (Obr. 4) je glutathion využíván enzymy z rodiny glutathionperoxidáz a peroxiredoxinů. V cytosolu a mitochondriích je peroxid vodíku metabolizován glutathionperoxidázou na vodu. Glutathion je při této reakci oxidován na glutathiondisulfid (GSSG), kde jsou dvě molekuly GSH spojeny disulfidickou vazbou. GSSG je poté pomocí glutathionreduktázy přeměněn zpět na GSH přijetím vodíku z NADPH, čímž se vytváří redoxní cyklus. Glutathion také hraje klíčovou roli v proteinové redoxní signalizaci. Během oxidačního stresu může být cystein obsažený ve struktuře proteinů oxidován na sulfenovou kyselinu, která může s GSH reagovat za vzniku glutathionylovaných proteinů. Ty lze následně přes glutaredoxin nebo sulfiredoxin redukovat zpět na proteiny. Kapacita buňky redukovat GSSG na GSH může být překročena v důsledku těžkého oxidačního poškození, což vede k akumulaci GSSG. Aby se zabránilo posunu v redoxní rovnováze, bývá GSSG aktivně transportován ven z buňky nebo se tvoří glutathionylované proteiny (Forman et al., 2009; Lu, 2013).



Obr. 4: Antioxidační funkce glutathionu (upraveno podle Lu, 2013).

Glutathion má důležitou roli při udržování odolnosti buněk proti exogenním a endogenním reaktivním formám kyslíku. Současná zjištění ukazují, že pokles intracelulárního glutathionu pod prahovou hladinu představuje apoptotický signál, který iniciuje aktivaci Fas receptoru smrti nebo mitochondriální apoptotickou signalizaci. Naproti tomu jeho zvýšené hladiny v buňkách poskytují ochranu před apoptózou. Bylo zjištěno, že narušení redoxní homeostázy GSH způsobené oxidací nebo efluxem GSH z buňky přispívá k apoptóze. Během několika minut po expozici oxidantu dochází ke snížení hladiny GSH, což předchází aktivaci mitochondriální apoptotické signalizace. Ani obnovení intracelulárního poměru GSH/GSSG po expozici oxidantům nedokáže buňky zachránit před apoptózou. Export glutathionu z buňky do extracelulárního prostoru je důležitý jev, který buď iniciuje apoptotickou signalizaci, nebo podporuje progresi apoptózy (Circu and Aw, 2012).

Oxidační stres aktivuje mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK), které se účastní apoptózy. Součástí rodiny MAPK jsou extracelulárním signálem regulované kinázy (ERK), c-Jun N-terminální kinázy (JNK) a p38 kinázy. Transdukce signální kaskády je složitá

a dochází při ní k postupné fosforylaci, kdy aktivace specifické MAPK kinázy kinázy (MAP3K) vede k následné aktivaci MAPK kinázy (MAP2K), která dále aktivuje MAPK. Aktivace JNK a p38 je spojena se stresem indukovanou apoptózou, což je proces, ke kterému dochází prostřednictvím dráhy sestávající z kinázy regulující apoptotický signál 1 (ASK-1), MAPK kinázy 4/7 (MAP2K 4/7) a JNK, nebo prostřednictvím dráhy ASK-1, MAPK kinázy 3/6 (MAP2K 3/6) a p38. Redoxní nerovnováha GSH/GSSG a narušení *de novo* syntézy glutathionu aktivuje MAPK signalizaci a apoptózu. Důvod aktivace apoptotických signálů při nízké hladině glutathionu může mít souvislost s jeho buněčným prahem. Při zahájení mitochondriální apoptotické signalizace je zajímavá role glutathiondisulfidu. Extracelulární glutathiondisulfid v buňkách U937 selektivně aktivuje osu ASK-1/MAP2K3/6/p38. Tento redoxní stres aktivuje komplex Trx-1/ASK-1 a dráhu p38. Buňky SH-SY5Y jsou vůči této apoptóze indukované glutathiondisulfidem rezistentní. Pro účinek glutathiondisulfidu v signalizaci MAPK a apoptóze u těchto buněk je nutná prahová hodnota glutathionu (Circu and Aw, 2012).

Pro GSH existují v lidských buňkách různé transportéry. Pro transport z buňky slouží transportéry přítomné v plazmatické membráně využívající hydrolyzu ATP k získání energie. Lidské buňky exprimují 13 proteinů z rodiny MRP. Z této rodiny jsou využívány například transportéry ABCG2 a CFTR. Dalším typem exportéru je *Ra1A-binding protein 1*, který je považován za významný mediátor lékové rezistence u rakovinných buněk. Původně se předpokládalo, že pro import glutathionu do buněk jsou v savčích buňkách využívány organické anionické transportéry OAT1 a OAT3. Dále potom transportér dikarboxylátu sodného NaC3. V současných studiích bylo zjištěno, že tyto přenašeče nemají v importu glutathionu žádnou roli, ale spíše zprostředkovávají transport glutamátových derivátů. Momentálně tedy u savců nejsou známy žádné importéry GSH do buněk (Oestreicher and Morgan, 2019).

1.2.3 Stanovení hladiny glutathionu

Glutathion se v buňkách vyskytuje ve dvou různých formách: redukovaný a oxidovaný. Za fyziologických podmínek bývá poměr hladin redukovaného GSH ku oxidovanému GSSG vyšší než 99 %. Působením oxidačního stresu se ale tento poměr může významně změnit (Roušar et al., 2012). Pro stanovení koncentrace glutathionu bylo vyvinuto množství analytických metod. Mezi nejpoužívanější separační techniky pro stanovení GSH a příbuzných sloučenin patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) (Camera and Picardo, 2002; Roušar et al., 2012).

Protože GSH a GSSG ve své molekule postrádají přítomnost silných chromoforů nebo fluoroforů, je nutné tyto sloučeniny derivatizovat (Camera and Picardo, 2002). Existuje celá řada derivatizačních činidel. Pro spektrofotometrická stanovení se využívají například Ellmanovo činidlo (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina, DTNB), 4,4'-dithiopyridin nebo 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen. Pro spektrofluorimetrická stanovení se používají ortho-ftalaldehyd (OPA), naftalen-2,3-dikarboxaldehyd (NDA), bimany a fluorobenzofurazany. Pro stanovení pomocí plynové chromatografie v tandemu s hmotnostní spektrometrií je vhodné použít trifluoroacetanhydrid, pentafluoropropionanhydrid a N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (Kand'ár, 2016). Hlavním problémem při těchto stanoveních je oxidace thiolů, ke které může dojít během manipulace se vzorkem. V jejím důsledku často dochází k nadhodnocení koncentrace. K prevenci tohoto jevu se různými činidly blokují thiolové skupiny. Využívá se například N-ethylmaleimid, kyselina jodoctová nebo 2-vinylpyridin (Pastore et al., 2003).

1.2.3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Velmi často používanou metodou je vysokoučinná kapalinová chromatografie. Mezi její výhody bezesporu patří vysoká specifita a citlivost. Hlavní nevýhodou je ale nákladnost a dlouhá doba analýzy. Citlivost analýzy je závislá na typu detekce (Roušar et al., 2012). Pro stanovení GSH a GSSG lze využít ultrafialovou, fluorescenční, elektrochemickou detekci nebo detekci pomocí hmotnostní spektrometrie (MS). Oblíbenou metodou je HPLC s coulometrickým detektorem. Nevýhodou této metody je použití vysokého oxidačního potenciálu při stanovení hladiny GSSG (Kand'ár, 2007). HPLC separace derivatizovaných sloučenin se ve většině případů, vzhledem k poměrně hydrofobní reakci s fluorescenční značkou, provádí na obrácených fázích. Nejčastěji používanou stacionární fází je oktadecylsilikagel. Pokud jsou GSH a GSSG analyzovány bez derivatizace nebo pokud je provedena postkolonová derivatizace, jsou také separovány v módu obrácených fází. V tomto případě jsou použity kyselé eluenty, které udržují GSH, GSSG a příbuzné sloučeniny v nedisociované formě, což zlepšuje interakci se stacionární fází. Navíc nízká hodnota pH minimalizuje autooxidaci thiolů. Například kyselina trifluoroctová přidaná do mobilní fáze snižuje vznik chvostujících chromatografických píků, k čemuž dochází především u stanovení GSSG (Camera and Picardo, 2002).

HPLC metody s UV/VIS fotometrickou detekcí nebo s použitím diodového pole jsou relativně málo využívány. Pravděpodobně tomu tak je kvůli nízké senzitivitě a specifičnosti ve srovnání s dalšími detektory (Camera and Picardo, 2002). HPLC s ultrafialovou detekcí vyžaduje derivatizaci s UV/VIS absorbujícími thiol-reaktivními látkami. Vzhledem

ke špatnému limitu detekce není tato metoda pro některé biologické vzorky dostatečně citlivá (Kand'ár, 2007).

Mezi oblíbené a velmi citlivé metody patří HPLC s fluorimetrickou detekcí. Častá je předkolumnová derivatizace fluorogenními derivatizačními činidly. Ta s glutathionem tvoří adukty s takovou intenzitou fluorescence, která je dostačující pro měření GSH v pikomolárních a nižších koncentracích. Ideální činidlo by mělo být nefluorescenční, nemělo by obsahovat žádné fluoreskující nečistoty a mělo by reagovat rychle a specificky s glutathionem za vzniku stabilních produktů. Žádné reálné činidlo nesplňuje všechny tyto požadavky, ale mezi dostupnými fluorogenními činidly byly shledány vhodnými bimany a halogensulfonylbenzofurazany (Pastore et al., 2003). Nespornou výhodou fluorimetrické detekce je, že systém HPLC je možné připojit k reaktoru, do kterého se zavádějí nederivatizované aminothioly oddělené v koloně a nechají se reagovat s fluorogenními činidly. Takové systémy lze optimalizovat za účelem standardizace doby a teploty reakce před detekcí. Tento přístup minimalizuje chyby způsobené preanalytickým zpracováním vzorku a zkracuje čas analýzy (Camera and Picardo, 2002).

Dělení pomocí HPLC a MS významně zvyšuje možnost automatizované analýzy biologických vzorků. Senzitivita a specifčnost detekčního systému je velmi vysoká a může být dále zlepšena spojením zařízení HPLC s tandemovým hmotnostním spektrometrem. Mezi různými kombinacemi dostupných chromatografických a hmotnostně spektrometrických režimů se ukázalo, že HPLC s obrácenými fázemi a elektrosprejová ionizační hmotnostní spektrometrie jsou nejvhodnější pro přímé propojení HPLC a MS (Camera and Picardo, 2002).

1.2.3.2 Spektrofotometrické metody

Analytické metody využívající kolorimetrická činidla a detekci absorbance v UV/VIS oblasti jsou méně citlivé, ale jednoduché ve srovnání s elektrochemickým nebo fluorimetrickým stanovením (Pastore et al., 2003). Pro stanovení glutathionu lze využít enzymatickou metodu, která je známá také jako recyklační test. Tato metoda je založena na spektrofotometrické detekci chromoforu generovaného v přítomnosti glutathionreduktázy. Dochází zde k reakci glutathionu s 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoovou kyselinou (DNTB) neboli Ellmanovým činidlem, při které vzniká konjugát 5-thionitrobenzoátu (TNB) s glutathionem GS-TNB. GS-TNB je za katalýzy glutathionreduktázy redukován na glutathion za současného uvolnění barevného TNB (Kand'ár, 2016). Donorem elektronů je zde NADPH. Pro stanovení se sleduje buď produkce TNB při 412 nm, nebo spotřeba NADPH (Kamencic et al., 2000). Koncentrace celkového glutathionu a GSSG se měří nezávisle na sobě. Pro stanovení GSSG je

nutné ke vzorku přidat N-ethylmaleimid. Hladina redukovaného GSH se potom vypočítá jako rozdíl mezi těmito hodnotami (Kand'ár, 2016; Roušar et al., 2012). Výhodou tohoto testu je vysoká senzitivita, krátká doba analýzy a jednoduchost zpracování. Nevýhodou je možná interference sloučenin inhibujících glutathionreduktázu (Čapek et al., 2017).

1.2.3.3 Spektrofluorimetrické metody

Spektrofluorimetrické metody využívají schopnost některých látek fluoreskovat. Tyto látky jsou nejdříve excitovány elektromagnetickým zářením. Primární záření je těmito látkami absorbováno a po návratu do základního energetického stavu dochází k vyzaření sekundárního fluorescenčního záření o nižší energii a vyšší vlnové délce ve srovnání se zářením primárním.

Bimany jsou nefluorescenční sloučeniny, které po reakci s thiolem tvoří fluorescenční adukty. Nejpoužívanějšími bimany jsou monochlorobiman (MCB) a monobromobiman (MBB). Obě tyto sloučeniny dokáží pronikat přes buněčnou membránu intaktních buněk a lze je použít pro stanovení glutathionu. Oproti OPA je právě tato vlastnost značnou výhodou. Ačkoli lze oba bimany využít pro detekci GSH, MCB je pro detekci glutathionu specifitější než MBB. To je způsobeno tím, že reakce mezi GSH a MCB je katalyzována intracelulární glutathion-S-transferázou (Čapek et al., 2017; Kamencic et al., 2000). Pro úspěšné barvení GSH v živých buňkách je nutné, aby fluorescenční sonda byla pro buňky netoxická a snadno pronikala skrz membránu. Samotné nenavázané barvivo by nemělo fluoreskovat a po navázání na GSH musí dojít k selektivnímu zvýšení fluorescence. Fluorescenční produkt musí být stabilní a měl by zůstat uvnitř buněk (Stevenson et al., 2002).

Test využívající MCB je jednoduchý, levný, rychlý a umožňuje měření koncentrace GSH buňkách bez nutnosti preanalytického zpracování vzorku. Lipofilní MCB je přidán do kultivačního média a difunduje do buňky, kde pomocí intracelulární glutathion-S-transferázy vzniká fluoreskující konjugát GSH-MCB (Kamencic et al., 2000; Stevenson et al., 2002). Následně je využita spektrofluorimetrická detekce vazby MCB na GSH. Nenavázaný MCB nevykazuje žádnou fluorescenci v důsledku zhasení svou chlorovou skupinou (Stevenson et al., 2002). Díky průchodu MCB přes membránu intaktních buněk je eliminováno riziko možné oxidace GSH, ke které může dojít při postupu vyžadujícím lýzu buněk. Nevýhodou ovšem je, že výsledky mohou být hodnoceny jen jako procenta hladin GSH ovlivněných buněk ku procentům hladiny GSH kontrolních neovlivněných buněk (Čapek et al., 2017).

Monobromobiman je činidlo specifické pro thiolovou funkční skupinu a tvoří adukty s relativně vysokou fluorescenční emisí, která umožňuje detekci analytů i při nízké koncentraci

(Camera and Picardo, 2002). V porovnání s MCB reaguje MBB s buněčnými thioley výrazně rychleji. Při využití MBB je ale nevýhodou, že reaguje s mnoha buněčnými redukovanými thioley, a tudíž není specifický jen pro GSH (Stevenson et al., 2002). Negativním faktorem je také fakt, že MBB je samofluorescenční a podléhá fotodegradaci za vzniku fluorescenčních produktů, které následně interferují se stanovením thiolu ve vzorku (Camera and Picardo, 2002).

Dalším spektrofluorimetrickým testem je o-ftalaldehydová metoda. O-ftalaldehyd je široce využíván, jelikož s GSH reaguje za vzniku vysoce fluorescenčních produktů. OPA je sám o sobě nefluorescenční, ale pokud reaguje s primárním aminem v přítomnosti thiolu, vzniká silně fluorescenční 1-alkylthio-2-alkylisoindol. Derivatizace GSH pomocí OPA je závislá na pH. Maximálního fluorescenčního výtěžku je dosaženo při nastavení pH reakce mezi 9,5 a 12,0. Přestože GSSG nemůže přímo reagovat s OPA za vzniku fluorescenčního derivátu, díky jeho hydrolyze při pH 12,0 za vzniku GSH lze následně reakcí s OPA fluorescenční derivát získat (Camera and Picardo, 2002; Pastore et al., 2003). Hlavní nevýhodou tohoto testu je špatná specifita v důsledku významné interference aminokyselin a jiných thiolů (Pastore et al., 2003).

1.2.3.4 Chemiluminiscenční metody

Pro stanovení GSH a GSSG bylo vyvinuto také několik chemiluminiscenčních metod, které jsou založeny na oxidaci GSH silným oxidantem. Po oxidaci luminoforu je změřena chemiluminiscence. Příkladem chemiluminiscenčního systému může být luminol v kombinaci s H_2O_2 . Modifikací enzymatické recyklační metody je detekována spotřeba NADPH vysoce citlivou luminiscenční reakcí v systému flavinmononukleotidu (FMN) a oxidoreduktázy, případně může být použita luciferáza (Kand'ár, 2016). GSH je napojen na redoxní systém NADP/NADPH+ H^+ prostřednictvím specifických enzymů. Tento redox systém potom může být spojen s oxidoreduktázou, případně luciferázou prostřednictvím FMN. Měřenou veličinou je zde vyzářená chemiluminiscence. Tato metoda je vysoce flexibilní, protože každá látka, která může být kvantitativně spojena se systémem NADP/NADPH+ H^+ , může být takto testována. Tento test může být použit v širším rozsahu koncentrací GSH. Nevýhody testu spočívají v tom, že je semikvantitativní a touto metodou nelze stanovit GSSG (Pastore et al., 2003).

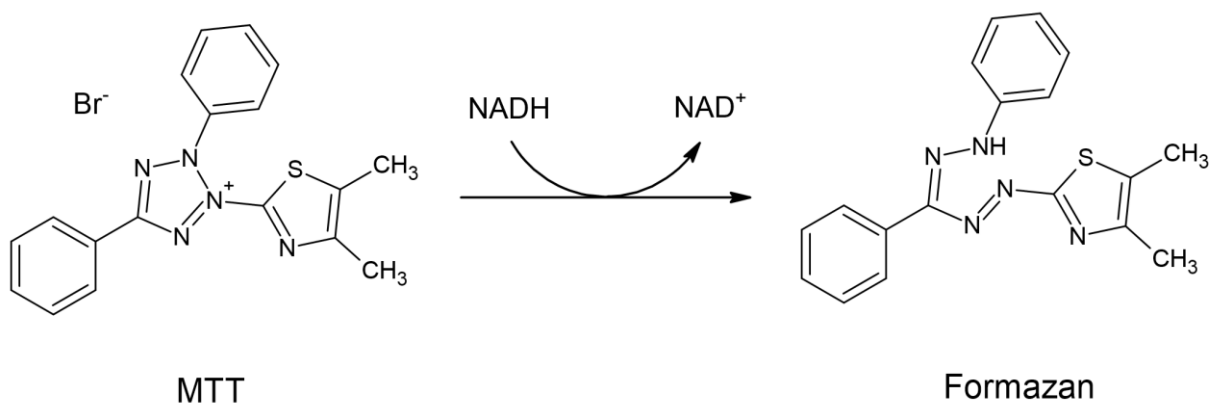
1.3 Testy metabolické aktivity a buněčné viability

Existuje řada testů, které lze použít ke zjištění počtu metabolicky aktivních buněk. Při těchto testech jsou buňky inkubovány s reakčním činidlem obsahujícím substrát, který je metabolizován za vzniku barevného nebo fluorescenčního produktu. Inkubace substrátu s aktivními buňkami vede k vytvoření signálu, který je úměrný metabolické aktivitě buněk. Pokud jsou buňky usmrceny nebo je zpomalena až zastavena jejich metabolická aktivita, dojde ke ztrátě schopnosti přeměnit substrát na produkt (Riss et al., 2013).

1.3.1 Formazanové testy

K detekci viabilních buněk se využívají tetrazoliové soli, což jsou sloučeniny obsahující kladně nabitě jádro kvartérního tetrazoliového kruhu (Xie et al., 2018). Chemické a biologické vlastnosti tetrazoliových solí závisí na kladně nabitě kvartérním tetrazoliovém kruhu obsahujícím čtyři atomy dusíku. Tato centrální struktura je obklopena třemi aromatickými skupinami, které obvykle obsahují fenylové skupiny (Berridge et al., 2005). Redukce těchto sloučenin vede k rozpadu tetrazoliového kruhu a přeměně na formazany odlišné barvy, než byla barva původní sloučeniny. Mezi nejčastěji používané patří 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitetrazolium bromid (MTT), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium (MTS), 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl)-2H-tetrazolium-5-karboxanilid (XTT) a ve vodě rozpustné tetrazoliové soli (WST) (Riss et al., 2013).

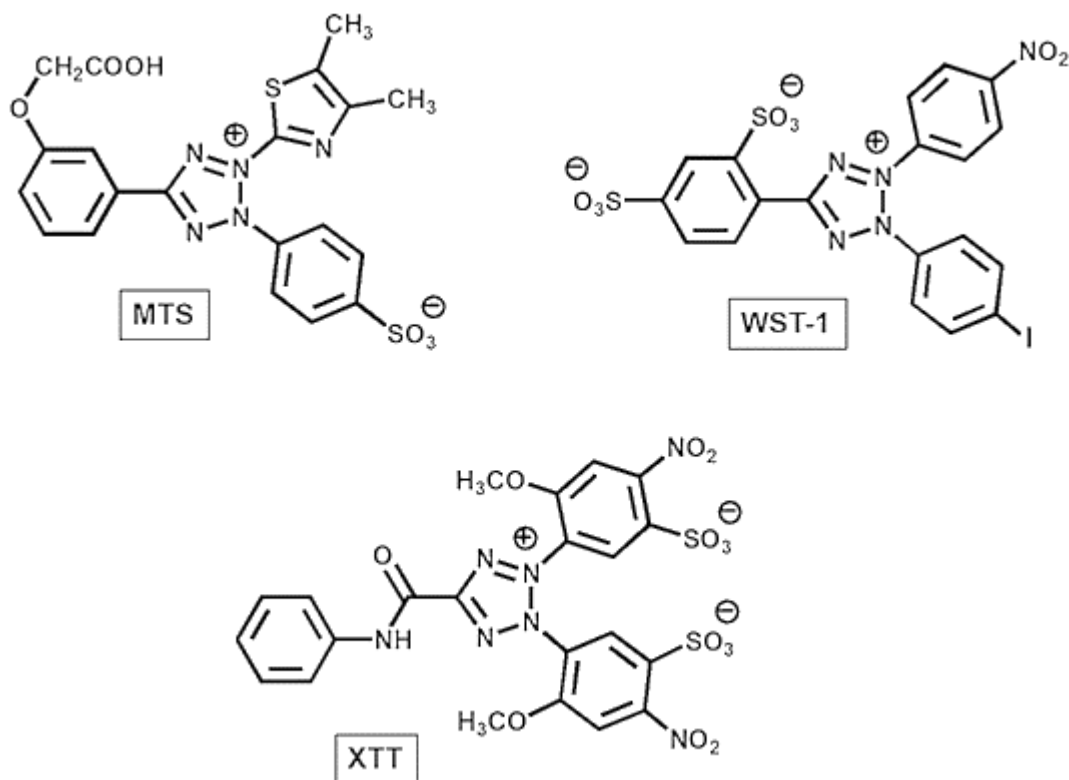
MTT test byl vyvinut jako neradioaktivní alternativa k začlenění tritiovaného thymidinu do DNA, využívaného pro stanovení buněčné proliferace (Riss et al., 2013). Tento test byl dlouho považován za zlatý standard mezi testy cytotoxicity. Byl miniaturizován a jedná se o vysoce citlivý screeningový test (Van Tonder et al., 2015). MTT tetrazolium je ve vodě rozpustné žluté barvivo. Jedná se o lipofilní a amfifilní kationt, který přechází přes plazmatickou membránu a hromadí se v živých buňkách. Nejdříve se akumuluje v mitochondriích, následně v endoplazmatickém retikulu. Redukčním štěpením tetrazoliového kruhu se převádí na ve vodě nerozpustný fialovomodrý formazan (Obr. 5) (Stockert et al., 2018). Přesný buněčný mechanismus redukce MTT na formazan pravděpodobně zahrnuje reakci s NADH nebo podobnými redukčními molekulami, které přenášejí elektrony na MTT.



Obr. 5: MTT formazanový test (upraveno podle Riss et al., 2013).

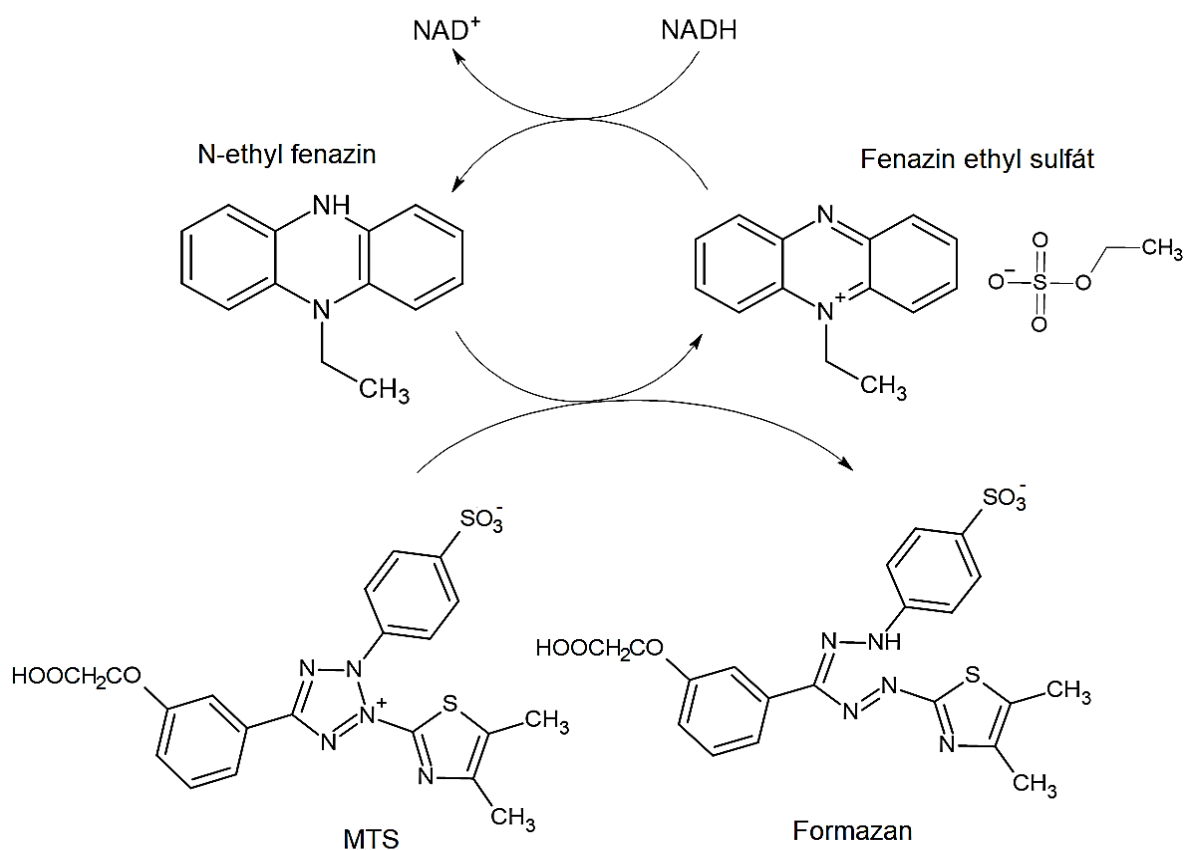
Množství vzniklého formazanu je přímo úměrné počtu viabilních buněk. Pokud buňky nejsou viabilní, nedokáží MTT přeměnit (Riss et al., 2013). Pro vyhodnocení je potřeba odstranit kultivační médium a formazan extrahovat, aby byl kolorimetricky stanoven (Stockert et al., 2018). Tato metoda se v průběhu používání vyvíjela. Zpočátku nebyly zahrnuty žádné promývací kroky a formazanové krystaly se solubilizovaly v kyselém isopropanolu, což je časově náročné. Toto rozpouštědlo navíc způsobuje nízké hodnoty optické absorpce. Ke zjednodušení a zvýšení citlivosti se využívá solubilizace krystalů v dimethylformamidu nebo dimethylsulfoxidu. Další rozpouštědla, která se mohou používat, jsou například dioxan, cyklohexan nebo tetrahydrofuran (Stockert et al., 2018; Van Tonder et al., 2015).

Nezbytný krok odstranění média a solubilizace formazanu před jeho kvantifikací může vést k chybám. Z tohoto důvodu byly popsány další tetrazoliové soli, které šetří čas a potenciální chyby eliminují (Funk et al., 2007). Novější tetrazoliová činidla jsou viabilními buňkami redukována na formazany, které jsou rozpustné ve vodě a v buněčném kultivačním médiu. Sem spadají sloučeniny MTS, XTT a WST-1 (Obr. 6) (Riss et al., 2013).



Obr. 6: Vzorce tetrazoliových solí MTS, WST-1 a XTT (upraveno podle Stockert et al., 2018).

MTS, WST a XTT tetrazoliové soli jsou hydrofilní anionty, pro které je membrána nepropustná (Stockert et al., 2018). WST-1, neboli 2-(4-jodfenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfatofenyl)-2H-tetrazolium se extracelulární redukcí přeměňuje na ve vodě rozpustný formazan, a proto je ideální pro přímou spektrofotometrickou detekci (Bommer and Ward, 2016). Redukován je během transportu elektronů přes plazmatickou membránu buněk (Berridge et al., 2005). Jeho negativní náboj sice přispívá k rozpustnosti, ale snižuje schopnost pronikat do buňky. Proto je nutné přidat intermediární akceptory elektronů, jako je fenazin methyl sulfát nebo fenazin ethyl sulfát. Intermediární akceptor elektronů fenazin ethyl sulfát přenáší elektrony z NADH na N-ethyl fenazin v cytoplasmě a ten je využit k redukcii tetrazoliové soli v médiu na rozpustný formazan (Obr. 7) (Riss et al., 2013).



Obr. 7: Schéma redukce MTS (upraveno podle Riss et al., 2013).

Během posledních let bylo vyvinuto několik sloučenin WST, které se odlišují ve své struktuře a jsou inovovány k lepším vlastnostem. Například WST-8, neboli 2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium využívá stejný reakční mechanismus jako WST-1 (Chamchoy et al., 2019). WST-8 kombinuje vysokou stabilitu WST-1 s vysokou citlivostí WST-3. Citlivost této látky není tolik závislá na hodnotě pH, proto například při pH 8 probíhá redukce WST-8 téměř kvantitativně, zatímco redukce WST-1 pouze z 60 %. V porovnání s WST-1 zajišťuje použití této sloučeniny vyšší citlivost, která je dána tím, že snáze reaguje s NADH (Ishiyama, 1997).

U tohoto druhu testů však může docházet k interferencím různých testovaných sloučenin. Tyto testy měří životaschopnost buněk z hlediska redukční aktivity dehydrogenáz vyskytujících se v mitochondriích živých buněk. Do redukce se ale zapojují také enzymy umístěné v jiných organelách, například v endoplazmatickém retikulu (Van Tonder et al., 2015). Bylo popsáno, že interferují také složky médií, jako jsou antioxidanty, glukóza a vitamíny (Funk et al., 2007; Van Tonder et al., 2015). Mezi nejvýznamnější interferující látky patří kyselina askorbová, cystein, kyselina dihydrolipoová, glutathion, glutathion S-transferáza a α -tokoferoly (Stockert et al., 2018).

Také sérový albumin hovězího nebo lidského původu může vést ke zvýšení signálu, což vede k nadhodnocení počtu buněk a k podhodnocení potenciálních cytotoxických účinků sloučenin, které jsou testovány (Funk et al., 2007). Kultivační médium při zvýšeném pH nebo dlouhodobém vystavení činidel přímému světlu může také způsobit zrychlenou spontánní redukci tetrazoliových solí a vést ke zvýšení hodnot absorbance pozadí (Riss et al., 2013). S testem MTS interferují například inhibitory glykolýzy, jako je 3-brompyruvát, dále fytoolátky s vnitřním redukčním potenciálem, antioxidanty nebo polyfenoly (Van Tonder et al., 2015).

1.3.2 Barvení trypanovou modří a fluorescenčními barvivy

Jednou z nejběžnějších metod stanovení životaschopnosti buněk je vylučovací test s trypanovou modří. Tento test umožňuje kvantifikaci životaschopných buněk pomocí světelného mikroskopu (Strober, 2015). Jedná se o přímé stanovení počtu živých a mrtvých buněk v dané populaci (Chan et al., 2015). Živé buňky mají neporušené buněčné membrány a jsou navíc schopny aktivně vypumpovávat některá barviva, jako je trypanová modř nebo eosin, zatímco mrtvé buňky nikoli (Strober, 2015).

Trypanová modř je barvivo odvozené od toluidinu s molekulovou hmotností 960 Da. Proniká pouze do buněk s narušenou integritou buněčné membrány. Po vstupu do mrtvé buňky se váže na intracelulární proteiny, čímž buňky získávají modrou barvu. Nelze zde rozlišit apoptotické a nekrotické buňky (Piccinini et al., 2017).

Provedení tohoto testu není náročné. Nejdříve jsou buňky resuspendovány ve fosfátovém pufru obsahujícím trypanovou modř. Následně se zjistí poměr počtu buněk, které mají čirou cytoplazmu oproti počtu buněk, které mají modrou cytoplazmu, čímž se určí životaschopnost (Strober, 2015). Ačkoli je test často využíván pro měření životaschopnosti buněk, má několik potenciálních nevýhod. Trypanová modř má toxický účinek na buňky, a proto umožňuje počítat buňky pouze krátký časový interval od obarvení. Jelikož se trypanová modř váže na buněčné proteiny, může dojít k vazbě na nespecifické artefakty, zejména v klinických a primárních buněčných vzorcích. Další nevýhodou je, že neexistuje žádná standardizovaná koncentrace trypanové modři pro měření viability buněk. Navíc ruční počítání pomocí počítací komůrky může být časově náročné (Chan et al., 2015). A jelikož je příjem barviva hodnocen subjektivně, poškozené buňky, u kterých došlo k přijetí pouze malého množství barviva, mohou zůstat bez povšimnutí (Strober, 2015).

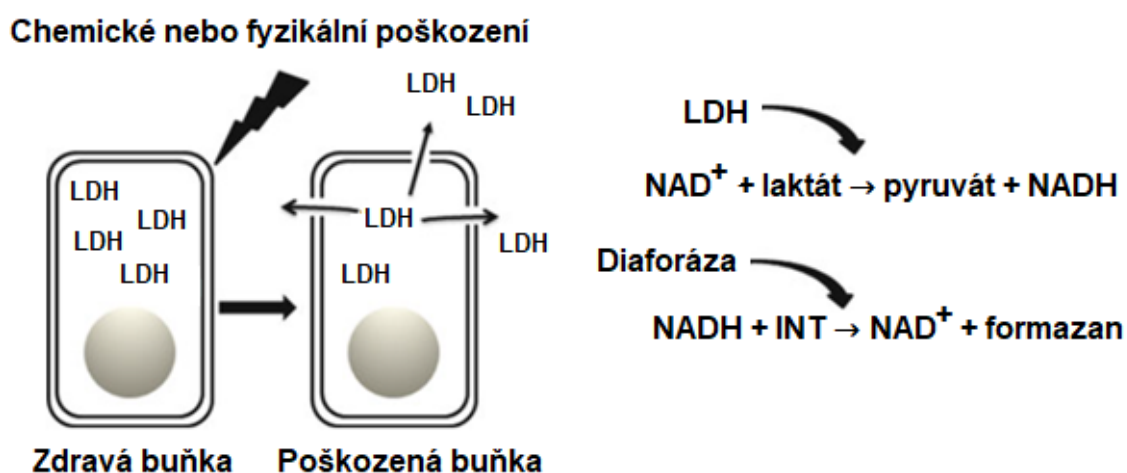
Bylo zjištěno, že některá fluorescenční barviva jsou spolehlivějšími indikátory životaschopnosti buněk než trypanová modř. Například se jedná o barvení akridinovou oranží a propidium jodidem. Akridinová oranž je kationické barvivo, které prochází přes plazmatickou

membránu a váže se na nukleové kyseliny životaschopných buněk. Při nízkých koncentracích způsobuje zelenou fluorescenci. Propidium jodid přes neporušenou membránu neprochází, ale snadno proniká membránami v umírajících nebo již odumřelých buňkách a váže se na DNA nebo RNA, což způsobuje oranžovou fluorescenci. Pokud jsou obě tato barviva použita současně, životaschopné buňky fluoreskují zeleně a neživotaschopné buňky oranžově (Piccinini et al., 2017).

Bez ohledu na případné nevýhody je trypanová modř stále nejčastěji používaným barvivem pro analýzu životaschopnosti buněk, protože je cenově dostupná, snadno se používá, rychle reaguje a buňky lze pozorovat pomocí standardního světelného mikroskopu (Piccinini et al., 2017).

1.3.3 Stanovení úniku laktátdehydrogenázy

Laktátdehydrogenáza je cytosolický enzym přítomný v savčích buňkách, který z buněk uniká při poškození nebo prasknutí plazmatické membrány (Parhamifar et al., 2013). Test úniku LDH je založen na tom, že mrtvé nebo poškozené buňky uvolňují tento enzym do extracelulárního média v důsledku permeabilizace plazmatické membrány. Uvolněná laktátdehydrogenáza se měří enzymatickým testem, který vede ke konverzi tetrazoliové soli na červený formazanový produkt (Kabakov and Gabai, 2018). Laktátdehydrogenáza uvolněná do média katalyzuje přeměnu laktátu na pyruvát a převádí NAD^+ na NADH. NADH v přítomnosti diaforázy přeměňuje žlutou tetrazoliovou sůl 2-(p-jodfenyl)-3-(p-nitrofenyl)-5-fenyltetrazoliumchlorid (INT) na červený formazan (Obr. 8). Změna barvy je úměrná množství uvolněné LDH, a tím i rozsahu buněčné smrti a poškození membrány (Parhamifar et al., 2013).



Obr. 8: Test úniku laktátdehydrogenázy. LDH – laktátdehydrogenáza; NAD^+ , NADH – nikotinamidadenindinukleotid; INT – 2-(p-jodfenyl)-3-(p-nitrofenyl)-5-fenyltetrazoliumchlorid (upraveno podle Parhamifar et al., 2013).

Tento test je spolehlivý, rychlý a má jednoduché vyhodnocení (Fotakis and Timbrell, 2006). Ve srovnání s testem MTS tato metoda kvantifikuje pouze skutečně mrtvé buňky, které mohou být nekrotické nebo pozdně apoptotické. Buňky, které zastavují proliferaci, např. senescentní buňky, nebo časně apoptotické buňky, které nemají porušenou plazmatickou membránu, neuvolňují do okolí laktátdehydrogenázu (Kabakov and Gabai, 2018).

1.4 Možnosti stanovení apoptózy

Apoptóza je vysoce regulovaný buněčný sebedestrukční mechanismus, který je nezbytný pro udržení homeostázy a odstraňování nežádoucích buněk. Zahrnuje aktivaci mnoha biochemických a molekulárních kaskád (Suman et al., 2012). Apoptóza může být iniciována samotnou buňkou, pokud prostřednictvím intracelulárních receptorů detekuje poškození. Také může být důsledkem interakce mezi imunitním systémem a poškozenou buňkou (D'Arcy, 2019). Buněčné poškození se morfologicky projevuje smršťováním buněk, kondenzací chromatinu, jadernou fragmentací a tvorbou apoptotických tělísek (Suman et al., 2012). Apoptotická tělíska obsahují části mrtvé buňky a jsou fagocytována makrofágy (D'Arcy, 2019).

K indukci buněčné smrti dochází na více úrovních. Proto je možné sledovat jednotlivé fáze apoptózy různými metodami. Oxidační stres ve smyslu produkce ROS lze sledovat pomocí fluorescenčních sond 2',7'-dichlordihydrofluorescein diacetátu (DCFDA), Amplex Red a MitoSOX. K detekci změn exprese proteinů, stejně jako ke stanovení aktivace kaspáz, lze využít Western blot. Pro stanovení aktivace kaspáz je dále možné využít fluorochromem značené inhibitory kaspáz (FLICA) nebo Rhodamin 110. Poškození a fragmentace DNA mohou být analyzovány díky DNA žebříku, metodě *Terminal deoxynucleotidyl transferase Nick-End Labeling* (TUNEL) a kometovému testu. Změny mitochondriálního membránového potenciálu lze detekovat s použitím JC-1, tetramethylrhodamin methyl esteru (TMRM) a tetramethylrhodamin ethyl esteru (TMRE). Pro vizualizaci změn v chromatinu a jaderné matrici je vhodné použít fluorescenční sondy 4'-6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) a Hoechst. Poškození plazmatické membrány buněk v důsledku apoptózy lze detekovat díky barvení Annexinem V a propidium jodidem.

1.4.1 Stanovení produkce ROS

Tvorba reaktivních forem kyslíku je důležitý proces potřebný pro fungování buněk v každém aerobním organismu. ROS zahrnují například superoxidový radikál $O_2^{\bullet-}$, peroxid vodíku H_2O_2 nebo hydroxylový radikál $\bullet OH$. Tyto sloučeniny hrají důležitou roli v regulačních

mechanismech, přenosu biochemických signálů a v indukcii apoptózy za fyziologických i patologických podmínek (Sreekanth et al., 2013; Dębski et al., 2016). Nadměrná produkce a nedostatečná detoxikace reaktivních forem kyslíku může vést k oxidativnímu poškození buněk. Vývoj spolehlivých metod pro detekci a kvantifikaci ROS je proto velmi důležitý (Dębski et al., 2016).

Sonda 2',7'-dichlordihydrofluorescein diacetát je jednou z nejpoužívanějších sond pro detekci ROS a oxidačního stresu. Pro intracelulární měření se používá nenabitá, nefluorescenční a lipofilní molekula DCFDA, která pasivně difunduje přes plazmatickou membránu do buňky (Kim et al., 2010). V buňce reaguje s intracelulárními esterázami odštěpujícími acetátové skupiny za vzniku 2',7'-dichlordihydrofluoresceinu (DCFH), což je hydrofilní nefluorescenční sloučenina. Pokud je DCFH oxidován pomocí ROS na 2',7'-dichlorfluorescein (DCF), výsledkem je zelená fluorescence. Specifickými nevýhodami sondy DCFDA jsou jeho náchylnost k autooxidaci a zvýšená fluorescence pozadí při dlouhodobém vystavení světlu (Sreekanth et al., 2013; Ledoux et al., 2014). Kromě toho je tato sonda citlivá na pH a její použití také často závisí na katalytické aktivitě peroxidáz, které mohou způsobit oxidaci na DCF i bez přítomnosti ROS, a tím snížit přesnost detekce (Kim et al., 2010).

Peroxid vodíku je relativně stabilní ROS, a proto ho lze snadno stanovit. Je klíčovým hráčem v intracelulární signalizaci a v iniciaci patofyziologických kaskád. Také je produktem jiných reakcí souvisejících s ROS, jako je dismutace superoxidových radikálů zprostředkovaná superoxidodismutázou. Dále se jedná o prekurzor dalších, škodlivějších ROS, jako je hydroxylový radikál, kyselina chlorná nebo peroxynitrit (Kim et al., 2010). Enzymatické stanovení peroxidu vodíku lze provést s vysokou citlivostí pomocí 10-acetyl-3,7-dihydroxyfenoxazinu (Amplex Red). Amplex Red je bezbarvý nefluorescenční derivát dihydroresorufinu. Jedná se o stabilní substrát křenové peroxidázy se selektivitou pro peroxid vodíku (Zhou et al., 1997). Křenovou peroxidázou katalyzovaná oxidace sloučeniny Amplex Red peroxidem vodíku je zlatým standardem pro stanovení tvorby H_2O_2 v extracelulárním médiu (Dębski et al., 2016; Karakuzu et al., 2019). H_2O_2 uvolněný do pufru reaguje v přítomnosti křenové peroxidázy s činidlem Amplex Red za vzniku červeného fluorescenčního resorufinu. Ten lze měřit jak fluorimetricky, tak spektrofotometricky. Fluorescenční měření jsou ale citlivější a mohou detekovat nižší hladiny H_2O_2 (Karakuzu et al., 2019).

Hlavní funkcí mitochondrií je spojení elektrochemického protonového gradientu a syntézy ATP s elektronovým transportním řetězcem a mitochondriální respirací. Významná

je čtyřelektronová redukce kyslíku, jejímž posledním krokem je vznik molekuly vody na komplexu IV. V elektronovém transportním řetězci může dojít k předčasné jednoelektronové redukci kyslíku za vzniku superoxidového radikálu (Polster et al., 2014). K jeho tvorbě dochází především na komplexu I, komplexu III a v souvislosti s enzymy cyklu trikarboxylových kyselin (Roelofs et al., 2015). Superoxid je velmi nebezpečný ROS především díky tomu, že je velmi reaktivní a má extrémně krátký poločas rozpadu. Dříve byl pro stanovení superoxidu používán hydroethidin, nazývaný také dihydroethidium, který po oxidaci vede ke vzniku fluorescenčního 2-hydroxyethidia. Reakce dihydroethidia s ROS poskytuje kromě fluorescenčního produktu také vedlejší, nefluorescenční produkty, jako jsou dimery ethidia. Bohužel 2-hydroxyethidium a ethidium vykazují červené, značně se překrývající fluorescenční emisní spektrum (Polster et al., 2014). Proto byl syntetizován konjugát dihydroethidia s trifenylfosfoniovou skupinou, známý jako MitoSOX (Kauffman et al., 2016). MitoSOX je fluorescenční sonda používaná pro selektivní detekci mitochondriálního superoxidového radikálu v živých buňkách. Lipofilní, kladně nabitá trifenylfosfoniová skupina způsobuje akumulaci sondy v negativně nabitou mitochondriální matrix (Roelofs et al., 2015). K detekci produkce superoxidu uvnitř mitochondrií lze využít fluorescenční mikroskopii nebo průtokovou cytometrii (Kauffman et al., 2016).

Selektivita sondy je dána elektrochemickým potenciálem. Kladně nabitý MitoSOX se redistribuuje přes plazmatickou a mitochondriální membránu (Polster et al., 2014). Pokud dojde ke snížení potenciálu mitochondriální membrány, MitoSOX se může uvolňovat mimo mitochondrie. To znamená, že celkový fluorescenční signál ovlivňují i další faktory, nejen působení superoxidu. Proto je stanovení tímto způsobem pouze semikvantitativní (Mukhopadhyay et al., 2007; Roelofs et al., 2015).

1.4.2 Stanovení změn exprese proteinů

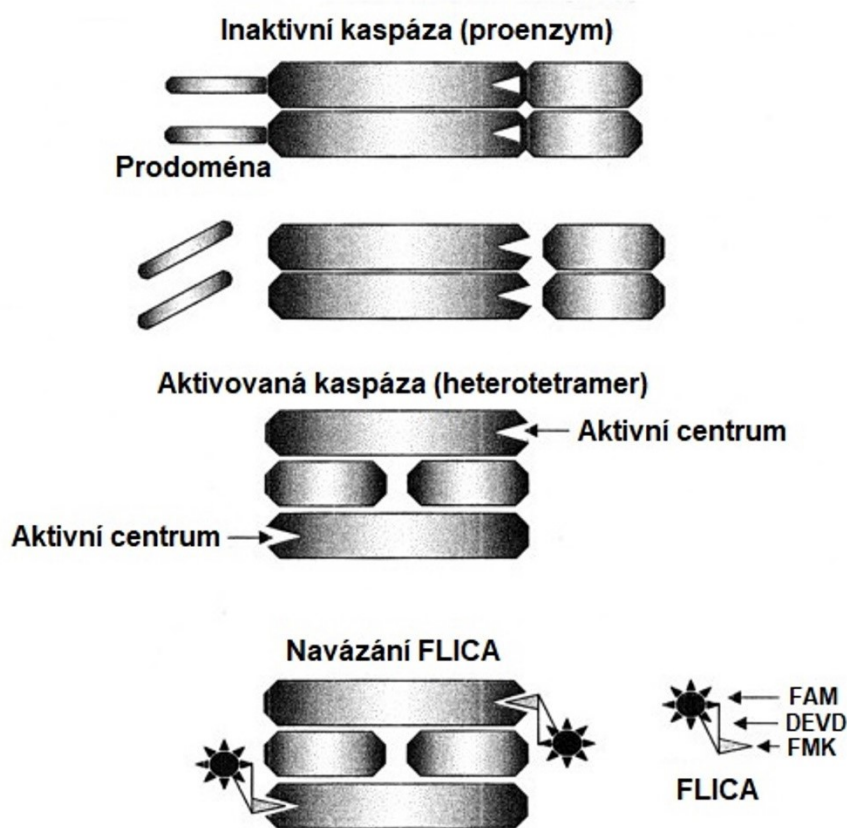
Řada proteinových markerů zapojených do apoptózy může být stanovena pomocí metody Western blot. Významnými markery jsou například klíčové regulátory mitochondriální apoptotické dráhy – antiapoptotický protein Bcl-2 a proapoptotický protein Bax. Dále se stanovují například aktivované kaspázy, naštěpená poly (ADP-ribóza) polymeráza (PARP) nebo hladina cytochromu c (Huang et al., 2015).

Buňky jsou před analýzou lyzovány. Proteiny obsažené v lyzátu jsou následně rozděleny podle molekulové hmotnosti pomocí SDS elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Poté jsou přeneseny na polyvinylidendifluoridovou nebo nitrocelulóзовou membránu, která má vysokou afinitu k proteinům. Na této membráně je následně potřeba pomocí mléčných proteinů

nebo bovinního sérového albuminu zablokovat volná místa, aby nedocházelo k nespecifické vazbě protilátek (Jeong et al., 2014). Poté se proteiny na membráně inkubují se specifickou primární protilátkou třídy IgG proti stanovovanému proteinu. Následuje krok promytí a po něm inkubace se sekundární protilátkou anti-IgG, která je konjugována například s enzymem, fluorescenční nebo chemiluminiscenční značkou. Po promytí se provádí detekce, jejíž způsob závisí na typu značky (Kijima et al., 2019; Kikuchi et al., 2011).

V dnešní době jsou nejznámější dvě hlavní apoptotické dráhy. Vnější cesta, která je ovlivněna mimo jiné Fas receptorem a vnitřní cesta závislá z velké míry na mitochondriích. Mitochondrie hrají důležitou roli v buněčné smrti tím, při změně permeability jejich vnitřní a vnější membrány vede k uvolnění cytochromu c a aktivaci kaspáz. Kaspázy jsou enzymy ze skupiny cysteinových proteáz, účastníci se apoptózy. Specificky štěpí peptidovou vazbu za aspartátem a jsou rozděleny na iniciační (kaspáza 8, 9 a 10) a efektorové (kaspáza 3, 6 a 7). Kaspáza-3 je klíčovou kaspázou v apoptóze a je aktivována jak ve vnitřní, tak ve vnější apoptotické dráze (Huang et al., 2015). Aktivace kaspáz je časným a definitivním biomarkerem apoptózy (Kupcho et al., 2019).

FLICA jsou používány jako markery aktivace těchto enzymů v živých buňkách během apoptózy. FLICA jsou karboxyfluoresceinem (FAM) nebo fluoresceinisothiokyanátem (FITC) značené peptidové fluormethylketony (FMK), které se specificky váží na aktivní centra kaspáz (Darzynkiewicz et al., 2011). Tyto ketolátky pronikají plazmatickou membránou a jejich vazba je zprostředkována FMK, který interaguje s cysteinem aktivního centra kaspázy. Díky tomu vzniká thiomethylketon a enzym je nevratně inaktivován. Používaným inhibitorem je například FAM-DEVD-FMK specifický pro kaspázu-3, kde DEVD označuje sekvenci kyselina asparagová-kyselina glutamová-valin-kyselina asparagová (Grabarek et al., 2002). Konkrétní aminokyselinová sekvence zaručuje selektivitu vůči příslušné kaspáze. Existují ale i inhibitory, které nejsou specifické pouze pro jednu konkrétní kaspázu (Smolewski et al., 2001). Schéma vazby FLICA na aktivované kaspázy je znázorněno na Obr. 9. Kaspázy jsou syntetizovány a v buňce jsou ve formě proenzymu, který obsahuje N-koncovou prodoménu následovanou dvěma katalytickými podjednotkami – velkou (20 kDa) a malou (10 kDa). Pokud dojde k aktivaci signálu smrti, prokaspázy jsou štěpeny mezi velkou a malou podjednotkou, což vede k jejich oddělení. Druhé štěpení vede k oddělení prodomény. Obě štěpení probíhají v místě, které obsahuje kyselinu asparagovou. Podjednotky ze dvou kaspáz se spojí do heterotetrameru, čímž vznikne aktivní proteáza se dvěma aktivními centry na opačných koncích molekuly. Aktivní centra jsou přístupná substrátům a mohou se zde vázat také FLICA.



Obr. 9: Schéma vazby FLICA na aktivované kaspázy.
 DEVD – kyselina asparagová-kyselina glutamová-valin-kyselina asparagová;
 FAM – karboxyfluorescein; FLICA – fluorochromem značené inhibitory kaspáz;
 FMK – fluormethylketon (upraveno podle Smolewski et al., 2001).

Komplikací při použití FLICA je křehkost apoptotických buněk. Tento test vyžaduje inkubaci živých buněk s činidly a následným promytím pufrů pro odstranění nnavázaných FLICA z neapoptotických buněk. Apoptotické buňky, zejména v pozdních stádiích apoptózy, jsou však velmi křehké a může dojít k jejich poškození. Toto lze částečně řešit přidáním séra nebo hovězího sérového albuminu do pufrů (Smolewski et al., 2001; Darzynkiewicz et al., 2011).

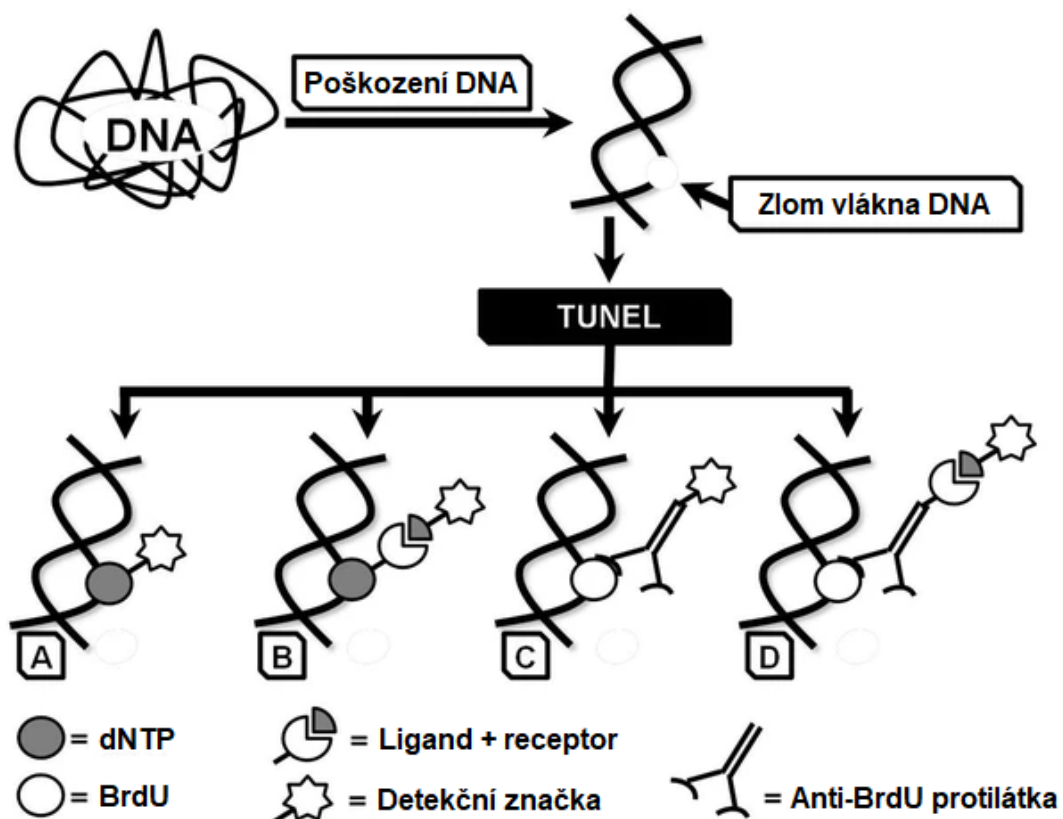
Mezi substráty použitelné k měření aktivity kaspáz patří substráty obsahující Rhodamin 110. Rhodamin 110 je navázán na aminokyseliny nebo peptidy prostřednictvím svých aminoskupin. Tím vzniká jeho nefluoreskující bisubstituovaný derivát, který dokáže procházet do intaktních buněk. Jako příklady využívaných substrátů lze uvést (Asp)₂-Rhodamin 110, (Glu)₂-Rhodamin 110 a (Asn)₂-Rhodamin 110 (Hug et al., 1999). Tyto molekuly obsahují dva aminokyselinové substituenty. Proto jsou relativně velké, což do určité

míry omezuje jejich schopnost pronikat do buněk (Wang et al., 2005). V buňce, která má aktivované kaspázy, dochází ke dvoustupňovému štěpení. Po prvním štěpení vzniká z bisubstituovaného peptidového derivátu monosubstituovaný Rhodamin 110, který je slabě fluorescenční. Při druhém štěpení se odštěpuje samotný Rhodamin 110, jehož molekuly vyzařují výraznou zelenou fluorescenci (Martinez et al., 2010).

1.4.3 Stanovení poškození DNA

Jedním ze znaků časně i pozdní fáze apoptózy je štěpení dvouvláknové genomové DNA endonukleázami, jako je kaspázou aktivovaná DNáza. Ta je také nazývána jako DNA fragmentační faktor 40 (DFF40). DFF40 ve fyziologické buňce tvoří komplex se svým inhibitorem DFF45. Pokud je tento komplex rozštěpen kaspázou, dojde k vytvoření homodimeru ze dvou molekul DFF40. Ten má schopnost štěpit DNA na menší fragmenty s volnými 3'-hydroxylovými skupinami (Majtnerová and Roušar, 2018; Mirzayans and Murray, 2020).

TUNEL je metoda sloužící k identifikaci apoptotických buněk prostřednictvím detekce fragmentace DNA (Huang et al., 2013). Uvolněné 3'-hydroxylové konce jsou značeny pomocí terminální deoxynukleotidyltransferázy (TdT). Ta má jedinečnou schopnost syntézy krátkých nukleotidových řetězců na 3'-hydroxylovém konci DNA bez potřeby templátového řetězce. Proto dokáže označit jakoukoli molekulu DNA s dostupným 3'-hydroxylovým koncem (Mirzayans and Murray, 2020). Pro detekci je možné využít různé způsoby značení, a to využití deoxynukleotid trifosfátu (dNTP) nebo bromdeoxyuridinu (BrdU). TdT katalyzuje přidání dNTP, který může být značen fluorescenční značkou a přímo detekován pomocí fluorescenčního mikroskopu nebo průtokové cytometrie. Další možností je, že se na 3'-hydroxylový konec naváže dNTP s navázaným receptorem a tento receptor následně reaguje s fluorescenčně nebo enzymaticky značeným ligandem. Zde může být příkladem vazba streptavidinu a značeného biotinu (Huang et al., 2013; Liu et al., 2012). Další dvě možnosti detekce zahrnují nepřímou detekci pomocí BrdU, což je analog thymidinu. Zde je nutné použití protilátek anti-BrdU. BrdU je navázán na 3'-hydroxylový konec a na něj je navázána buď protilátka s detekční značkou nebo protilátka, která je vázána s receptorem, a ten bude následně interagovat se značeným ligandem (Obr. 10) (Majtnerová and Roušar, 2018).



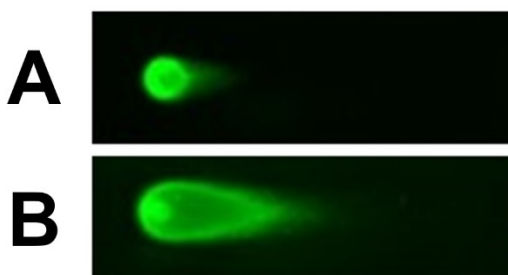
Obr. 10: Možnosti značení 3'-hydroxylových konců, metoda TUNEL. (A) Přímé značení pomocí dNTP s detekční značkou; (B) Značení pomocí dNTP s navázaným receptorem, který interaguje se značeným ligandem; (C) Do řetězce DNA je navázán BrdU, který je rozpoznán značenou anti-BrdU protilátkou; (D) Do řetězce DNA je navázán BrdU, který je rozpoznán anti-BrdU protilátkou s navázaným receptorem, a ten interaguje se značeným ligandem. BrdU – bromdeoxyuridin; dNTP – deoxynukleotid trifosfát (upraveno podle Majtnerová and Roušar, 2018).

Nevýhodou při hodnocení apoptotické buněčné smrti je, že TdT označí všechny volné 3'-hydroxylové konce bez ohledu na molekulární mechanismy, které vedly ke vzniku těchto konců. TUNEL bude tedy detekovat také nekrotické degenerující buňky, buňky procházející opravou DNA a mechanicky poškozené buňky (Mirzayans and Murray, 2020).

Kometová metoda je také známá jako jednobuněčná gelová elektroforéza. Jedná se o jednoduchou, citlivou a spolehlivou metodu, díky které lze studovat poškození DNA na úrovni jednotlivých buněk. Původní metoda mikrogelové elektroforézy ke stanovení zlomů DNA řetězců byla vyvinuta za podmínek neutrálního pH. Později byl test modifikován a prováděn při alkalickém pH, což je momentálně nejpoužívanější modifikace (Gyori et al., 2014). Volba podmínek ovlivňuje detekci různých typů poškození DNA. Dlouhou dobu převládal názor, že za neutrálních podmínek dochází k odhalení dvouřetězcových zlomů, zatímco při použití alkalických podmínek je detekováno širší spektrum poškození zahrnující kromě dvouřetězcových také jednořetězcové zlomy a přítomnost míst postrádajících dusíkatou

bázi (apurinní a apyrimidinová místa). V poslední době však výzkum naznačuje, že spektrum detekovaných poškození se při těchto podmínkách elektroforézy do určité míry překrývá (Cordelli et al., 2021).

Základní princip tohoto testu je jednoduchý. Buňky jsou aplikovány do agarózy, která je nanášena na mikroskopické sklíčko, a zde jsou fixovány. Poté jsou lyzovány v přítomnosti detergentu a vysoké koncentrace soli, což vede k rozpuštění buněčné membrány. Následně jsou lyzované buňky vystaveny alkalickému prostředí, aby došlo k rozpletení nadšroubovicových struktur (Møller et al., 2020; Muruzabal et al., 2021). Následuje elektroforéza, při které zůstává nepoškozená DNA v superspiralizovaném stavu. Uvolněné fragmenty poškozené DNA se v elektrickém poli pohybují jinou rychlostí a od intaktní DNA se podle své délky oddalují. Tím dojde k vytvoření struktury, která připomíná tvar komety (Obr. 11). Následným krokem je promytí a vizualizace pomocí DNA vázajícího barviva a fluorescenční mikroskopie. Pro posouzení úrovně poškození DNA je nutné změřit velikost komety, její tvar a množství DNA v ní. Komety lze identifikovat a vyhodnotit vizuálně nebo pomocí počítačového softwaru (Gyori et al., 2014).



Obr. 11: DNA po provedení kometového testu. (A) Buňka s mírnou fragmentací DNA; (B) Buňka s vysokým rozsahem poškození DNA (upraveno podle Gyori et al., 2014).

Analýza fragmentace DNA pomocí metody DNA žebříku je často používanou technikou pro detekci apoptózy a pomáhá rozlišit apoptotický a neapoptický způsob buněčné smrti (Suman et al., 2012). Při apoptóze dochází ke štěpení chromatinové DNA a vzniku internukleozomálních fragmentů. Vzniklé fragmenty mají velikost násobků délky 180 párů bází (Huang et al., 2013). Oproti tomu u nekrotických buněk vznikají genomové fragmenty nepravidelných velikostí (Mizuta et al., 2013).

Při provádění testu jsou buňky nejprve lyzovány. Následně je z uvolněného buněčného obsahu izolována genomová DNA. Izolát je poté nanášen do agarózového gelu, kde dojde k elektroforetickému rozdělení (Suman et al., 2012). Po proběhnutí elektroforézy následuje

vizualizace. K té může být využit ethidium bromid, což je interkalační barvivo předem přidané buď přímo do vzorku, do agarózového gelu nebo do elektroforetického pufru. Ethidium bromid vmezeřený do DNA po ozáření UV světlem emituje záření (Lu et al., 2006). U fragmentované DNA dochází k vytvoření žebříčkovitého vzoru, který je považován za charakteristický znak apoptózy (Huang et al., 2013). Celistvá DNA se na proužky nerozdělí. Výsledek elektroforézy vzorku se porovnává s elektroforézou referenčního standardu, který poskytuje porovnání pro určení velikosti fragmentů DNA ze vzorku (Reis et al., 2020).

1.4.4 Stanovení změn mitochondriálního membránového potenciálu

Mitochondrie hrají důležitou roli v indukci apoptózy a jejich dysfunkce je často spojena se ztrátou vnitřního membránového potenciálu (Ganga Reddy et al., 2016). Mitochondriální membránový potenciál (MMP) je hlavní složkou proton motivní síly, což je hlavní faktor, který ovlivňuje oxidativní fosforylaci. Změny v mitochondriálním protonovém gradientu vedou k poruše elektronového transportního řetězce. Některé toxické látky inhibují přímo transport elektronů a tím blokují buněčné dýchání (Du et al., 2010). Ke ztrátě MMP může vést také zvýšení intracelulární hladiny ROS a oxidační stres. Pro stanovení MMP v různých typech buněk a tkání lze použít několik fluorescenčních sond (Nagarsenkar et al., 2016).

JC-1 je lipofilní kationická sonda, která může snadno procházet plazmatickou membránou a akumulovat se v aktivně respirujících mitochondriích. Toto fluorescenční barvivo je schopné selektivně vstupovat do mitochondrií a působit zde jako duální emisní sonda, která reverzibilně mění barvu v závislosti na polarizaci mitochondriální membrány (Chakraborty et al., 2016). Pokud je potenciál mitochondriální membrány nízký, sonda se akumuluje jen z malé části ve formě monomeru vyzařující zelenou fluorescenci. Se zvýšením MMP se akumulace barviva v mitochondriích zvyšuje a JC-1 tvoří agregáty. Agregace způsobuje posun fluorescenční emise ze zelené na červenou (Huang et al., 2013). Intenzita a barva fluorescence je hodnocena pomocí průtokového cytometru (Nagarsenkar et al., 2016). Jako indikátor buněk s depolarizovanými mitochondriemi slouží procento zelené fluorescence. Výsledek se často uvádí také jako poměr červené a zelené fluorescence (Chakraborty et al., 2016).

TMRM a TMRE jsou kationtové fluorofory na bázi rhodaminu (Venable et al., 2013). Tato barviva se hromadí v matrix energizovaných mitochondrií s negativním MMP. Intenzita fluorescence koreluje s velikostí potenciálu vnitřní mitochondriální membrány (Du et al., 2012). Pokud dojde k mitochondriální depolarizaci, následuje redistribuce fluorescenční sondy z mitochondriální matrix do cytosolu a extracelulárního prostoru

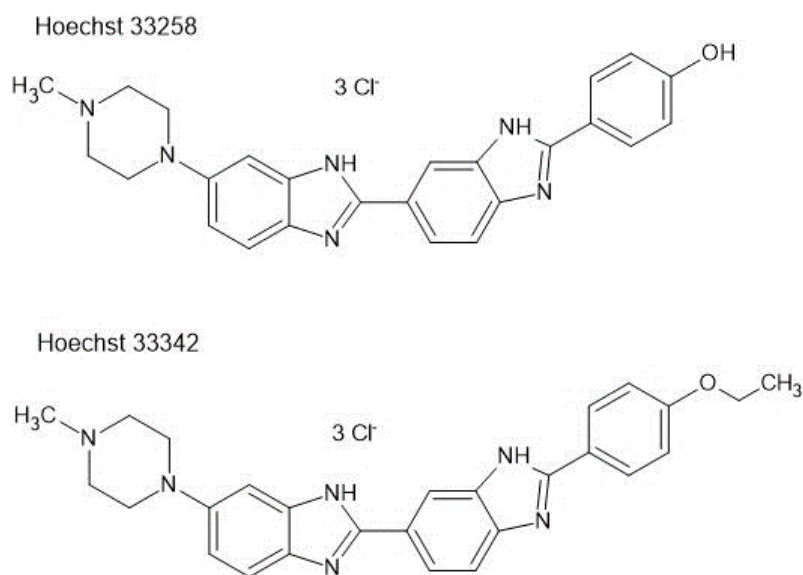
(Venable et al., 2013). To vede ke snížení intenzity fluorescence, která je po inkubaci s barvivem analyzována pomocí fluorescenční mikroskopie a fluorescenční spektrometrie (Gooyit et al., 2014).

1.4.5 Fluorescenční značení buněčných organel

Apoptotické buňky vykazují charakteristickou morfologii svého jádra. Dochází ke změnám v chromatinu a jaderné matrixi. Tyto změny jsou obtížně detekovatelné světelným mikroskopem, ale jsou jasně vidět ve fluorescenčním mikroskopu po obarvení fluorescenční sondou vázající se na chromatin (Kabakov and Gabai, 2018).

Sondy Hoechst umožňují snadnou vizualizaci buněčného jádra a značení chromozomů v mitotických buňkách (Chazotte, 2011a). Existují tři typy barviva Hoechst: Hoechst 33258, Hoechst 33342 a Hoechst 34580, která se mezi sebou liší strukturou. Nejběžněji používaná jsou barviva Hoechst 33258 a 33342 (Atale et al., 2014).

Hoechst 33342 a Hoechst 33258 jsou funkčně podobná barviva, která mají podobná také excitační a emisní spektra (Atale et al., 2014). K excitaci je nutné využití ultrafialového světla, které vyvolává emisi modré fluorescence. Protože ale UV záření poškozuje buněčnou DNA, je použití těchto barviv v mikroskopii živých buněk časově velmi omezené (Martin et al., 2005). Tato modrá fluorescenční barviva umožňují odhalit změny chromatinu související s apoptózou, které se ve fluorescenčním mikroskopu projevují jako abnormality ve velikosti nebo tvaru jádra nebo jako heterogenní zbarvení jádra. Neapoptotické buňky mají normální morfologii jader a jsou homogenně obarvena (Kabakov and Gabai, 2018). Jednou z výhod barviv Hoechst je, že prochází přes cytoplazmatickou membránu, a proto mohou barvit živé buňky. Hoechst 33342 prochází do buněk snáze, jelikož ve své molekule obsahuje terminální ethylether, zatímco Hoechst 33258 má terminální hydroxylovou skupinu, která snižuje lipofilitu této sloučeniny (Obr. 12). Obě tyto sondy se váží na oblasti malého žlábků DNA bohaté na adenin a thymin (Chazotte, 2011a).



Obr. 12: Vzorce sloučenin Hoechst 33258 a Hoechst 33342.

Výhodou je rychlé zpracování, kvantitativní vyhodnocení a nízká cena (Majnerová et al., 2021). Tato metoda je relativně necitlivá při pH 5–10, ale je citlivá na změny teploty a iontové síly a na zhášení fluorescence dvojmocnými kationty nebo kationty těžkých kovů. Sondy Hoechst se vážou na DNA, a proto někdy interferují s replikací DNA během buněčného dělení. V důsledku toho jsou potenciálně mutagenní a karcinogenní, proto je třeba s nimi zacházet opatrně (Atale et al., 2014).

DAPI je fluorescenční činidlo využívané pro kvantifikaci buněčné DNA (Coleman et al., 1981). Jedná se o jaderné barvivo používané pro imunofluorescenční mikroskopii. DAPI vizualizuje jaderné změny jako jsou fragmentace, kondenzace nebo deformace jádra (Atale et al., 2014). Toto modré fluorescenční barvivo přednostně barví dvouvláknovou DNA tím, že vytvoří silnou vazbu v oblastech bohatých na adenin a thymin (Gichner et al., 2006). DAPI má větší fotostabilitu než Hoechst (Chazotte, 2011b). Vazba tohoto barviva způsobuje zvýšenou fluorescenci díky vytěsnění molekul vody jak z DAPI, tak z DNA. Pro fluorescenční mikroskopii je barvivo DAPI excitováno ultrafialovým světlem (Atale et al., 2014). Fluorescence je potom úměrná množství DNA (Coleman et al., 1981). Jelikož se jedná o sloučeninu vážající DNA, má pravděpodobně mutagenní vlastnosti (Atale et al., 2014).

Fosfatidylserin je fosfolipidovou složkou vnitřní stěny plazmatické membrány. V časných stádiích apoptózy dochází k jeho translokaci z vnitřní strany na vnější povrch buněčné membrány, což je také označováno jako *eat-me* signál umírajících buněk (Liu et al., 2012). Buněčná smrt je dynamický proces, při kterém jsou odumírající nebo mrtvé

buňky rychle odstraněny. Proto existuje jen krátký časový úsek, během kterého dochází k expozici fosfatidylserinu (Zhang et al., 2013). Pro zobrazení externalizace fosfatidylserinu během buněčné smrti je používán Annexin V (Bahmani et al., 2011).

Annexin V je na vápníku závislý endogenní protein s molekulovou hmotností 36 kDa, který se skládá z 319 aminokyselin. Specificky a s vysokou afinitou se váže na fosfatidylserin a další aniontové fosfolipidy (Bahmani et al., 2011; Zhang et al., 2011). Annexin V patří mezi nejrozšířenější ligandy při vizualizaci buněčné smrti. Počet vazebných míst pro tento protein se může během apoptózy zvýšit stokrát až tisíckrát. Annexin V může být značen různými signálními molekulami. Často je využívána kombinace testu s Annexinem V označeným zelenou fluorescenční značkou a barvení propidium jodidem. Barvení propidium jodidem, které již bylo popsáno v kapitole 1.3.2, lze použít pro vizualizaci DNA po porušení plazmatické membrány. Při této kombinaci barvení září membrána poškozené apoptotické buňky zeleně a jádro červeně (Bahmani et al., 2011).

2. CÍLE PRÁCE

- 1) Dlouhodobě kultivovat neuroblastomovou buněčnou linii SH-SY5Y.
- 2) Charakterizovat cytotoxické působení CdCl_2 a HgCl_2 pomocí bioanalytických a pokročilých mikroskopických metod.
- 3) Vzájemně porovnat výsledky neurotoxického působení CdCl_2 a HgCl_2 u lidské neuroblastomové buněčné linie SH-SY5Y.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Biologický materiál

- Buněčná linie lidského neuroblastomu SH-SY5Y (CRL-2266; ATCC, USA)

3.2 Seznam použitých chemikálií

- Cisplatina, CisPt ($\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$; Mr = 300,1 g/mol; Sigma Aldrich, USA)
- Chlorid kademnatý (CdCl_2 ; Mr = 183,32 g/mol; Sigma Aldrich, USA)
- Chlorid rtuťnatý (HgCl_2 ; Mr = 271,52 g/mol; Sigma Aldrich, USA)
- Chlorid zinečnatý (ZnCl_2 ; Mr = 136,29 g/mol; Sigma Aldrich, USA)
- Deionizovaná voda pro buněčné kultury (Lonza, USA)
- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12 (1:1)* s nebo bez fenolové červeně, DMEM/F-12 (Sigma Aldrich, USA)
- *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline 10x*, DPBS 10x (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Faloidin-FITC ($\text{C}_{58}\text{H}_{63}\text{N}_{10}\text{O}_{14}\text{S}_4$; Mr = 1252,44 g/mol, Sigma Aldrich, USA)
- Fetální bovinní sérum, FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Formaldehyd (CH_2O ; Mr = 30,03 g/mol; Erba Lachema, Česká republika)
- Hoechst 33258 ($\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{Cl}_3\text{N}_6\text{O}_6$; Mr = 623,96 g/mol; Sigma Aldrich, USA)
- L-glutamin ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$; Mr = 146,14 g/mol; Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Trypsin-EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Triton X-100 ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$, n = 9-10; Mr = 647 g/mol; Sigma Aldrich, USA)
- Monochlorobiman, MCB ($\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{Cl}_1\text{N}_2\text{O}_2$; Mr = 226,66 g/mol; Sigma Aldrich, USA)
- Neesenciální aminokyseliny, NAA (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Penicilin/streptomycin, P/S (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- WST-1 (Roche, Německo)

3.3 Příprava roztoků

Kultivační médium pro SH-SY5Y – Pro přípravu média pro buněčnou linii SH-SY5Y bylo použito médium DMEM/F12 (1:1) s fenolovou červení obohacené 15 % fetálního bovinního séra, 1 % neesenciálních aminokyselin, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicilinu se streptomycinem a 2 mM glutaminu.

Fosfátový pufr (DPBS 1x) – Koncentrovaný roztok DPBS 10x byl ředěn v poměru 1:9. Například bylo napipetováno 90 mL deionizované vody a 10 mL 10x koncentrovaného DPBS. Roztok byl skladován při 4 °C.

Zásobní roztok Hoechst 33258 (c = 40 µg/mL) – do 480 µL deionizované vody bylo napipetováno 20 µL Hoechst 33258 (c = 1 mg/mL).

Pracovní roztok Hoechst 33258 (c = 2 µM) – Do 143,7 µL DPBS 1x bylo napipetováno 6,3 µL zásobního roztoku Hoechst 33258 o koncentraci 1000 µM. Pracovní roztok se připravoval krátce před měřením.

Zásobní roztok faloidin-FITC (c = 80 µM) – 0,1 mg faloidinu značeného FITC bylo rozpuštěno v 1 mL DMSO. Roztok byl uchováván při -20 °C.

Pracovní roztok faloidin-FITC (c = 1 µM) – zásobní roztok byl naředěn tak, že bylo do 1580 µL DPBS 1x napipetováno 20 µL zásobního roztoku faloidin-FITC.

Pracovní roztok formaldehydu (3,7 %) – K 900 µL DPBS 1x bylo napipetováno 100 µL roztoku formaldehydu (37 %). Pracovní roztok se připravoval vždy krátce před použitím.

Pracovní roztok Tritonu X-100 (0,1 %) – K 2997 µL DPBS byly napipetovány 3 µL roztoku triton X-100 (100 %). Pracovní roztok se připravoval krátce před použitím.

Zásobní roztok CdCl₂ (c = 20 mM) – Navážka 0,0183 g CdCl₂ byla rozpuštěna v 5 mL deionizované vody. Roztok byl skladován v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok CisPt (c = 1 mM) – Navážka 0,0015 g CisPt byla rozpuštěna v 5 mL deionizované vody. Roztok byl skladován v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok HgCl₂ (c = 10 mM) – Navážka 0,0136 g HgCl₂ byla rozpuštěna v 5 mL deionizované vody. Roztok byl skladován v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok ZnCl₂ (c = 10 mM) – Navážka 0,0068 g ZnCl₂ byla rozpuštěna v 5 mL deionizované vody. Roztok byl skladován v lednici při 4 °C.

Zásobní roztok MCB ($c = 10 \text{ mM}$) – Navážka 2,5 mg MCB byla rozpuštěna v 1103 μL dimethylsulfoxidu.

Pracovní roztok MCB ($c = 240 \mu\text{M}$) – Do 1220 μL DPBS 1x vyhřátého na 37 °C bylo přidáno 30 μL zásobního roztoku MCB. Pracovní roztok se připravoval vždy krátce před měřením.

3.4 Laboratorní pomůcky, přístroje a software

- Analytické váhy (Mettler Toledo, Švýcarsko)
- Automatické pipety Eppendorf (Eppendorf, Německo)
- Automatický pipetor Accu-Jet Pro (BrandTech Scientific, Německo)
- Biohazard box SafeFAST Elite 212 D (Faster, Itálie)
- Biostation IM-Q (Nikon, Japonsko)
- Cell Culture Slide 8komorová mikroskopická skla (SPL Life Sciences, Jižní Korea)
- Centrifuga Hettich Universal 320 R (Hettich, Německo)
- Centrifugační zkumavky, 15 a 50 mL (Jet Biofil, Čína)
- CO₂ inkubátor (PHCbi, Japonsko)
- Destičkový spektrofotometr a spektrofluorimetr Spark (Tecan, Rakousko)
- Fluorescenční mikroskop Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonsko)
- Invertovaný mikroskop Nikon Eclipse Ts2 (Nikon, Japonsko)
- Komůrka μ -Dish 35 mm Quad 4jamková (Ibidi, Německo)
- Kultivační lahve NUNC T75 s filtrem (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Lednice s mrazákem -20 °C (Liebherr, Česká republika)
- Mikrotitrační destičky 96jamkové (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Mikrozukavky, objem 0,5; 1,5; 2 a 5 mL (Eppendorf, Německo)
- Multisizer 4e Coulter Counter (Beckman Coulter, USA)
- Odsávačka (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Sérologické pipety, 10 a 25 mL (Jet Biofil, Čína)
- Vodní lázeň Isotemp GPD 10 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Vortex (Heathrow Scientific, USA)

Software

- ACD/ChemSketch (Advanced Chemistry Development software, Kanada)
- BioStation IM (Nikon, Japonsko)
- Microsoft Office – Word, Excel (Microsoft, USA)
- Nikon NIS-Elements (Nikon, Japonsko)
- OriginPro 9.0.0 (OriginLab, USA)
- Tecan SparkControl (Tecan, Rakousko)

3.5 Kultivace buněk SH-SY5Y

Do kultivační lahve bylo napipetováno 10 mL kultivačního média pro buňky SH-SY5Y předem vyhřátého na 37 °C. Poté byl do kultivační lahve přenesen vypočítaný objem suspenze buněk SH-SY5Y tak, aby obsahoval $350 \cdot 10^3$ buněk. Buňky byly inkubovány v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Každé 3 až 4 dny bylo kultivační médium vyměněno za čerstvé. Po dosažení konfluencie 75-85 % bylo provedeno pasážování.

Při pasážování bylo kultivační médium odtazeno a buňky byly omyty pomocí DPBS 1x. Po odtazení DPBS 1x byl přidán roztok trypsin-EDTA, který se nechal působit 7 min při 37 °C v inkubátoru. Po uvolnění buněk ze dna kultivační lahve byla suspenze přenesena do inaktivačního média a centrifugována 5 min při 1500 RPM. Následně byl odstraněn supernatant a peleta buněk byla resuspendována v příslušném kultivačním médiu pro buňky SH-SY5Y. Poté bylo spočítáno celkové množství buněk pomocí analyzátoru Multisizer 4e Coulter Cell Analyzer (Beckman Coulter, USA). Buněčná suspenze byla následně ředěna kultivačním médiem podle potřeby pro použití při experimentech a nasazena dle aktuálního experimentu do 96jamkové mikrotitrační destičky, 4jamkové komůrky nebo na 8komorové mikroskopické sklo.

Ještě před započítáním experimentů byla optimalizována denzita buněk SH-SY5Y nasazovaných do 96jamkové mikrotitrační destičky. Do mikrotitrační destičky byly nasazeny buňky o denzitě v rozmezí $10-40 \cdot 10^3$ buněk ve 100 μL suspenze na jamku. Následovala inkubace 24 hod při 37 °C a 5 % CO₂, aby došlo k přisednutí buněk. Po této inkubaci bylo médium odtazeno od buněk a nahrazeno novým kultivačním médiem pro buňky SH-SY5Y bez fenolové červeně. Následovalo dalších 24 hod inkubace při stejných podmínkách. Po inkubaci byla nejprve změřena konfluencie v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky pomocí přístroje Tecan Spark (Tecan, Rakousko). Následně bylo do každé jamky s buňkami přidáno 10 μL roztoku WST-1 a po dobu 180 min byla pomocí spektrofotometru Tecan Spark (Tecan, Rakousko) v desetiminutových intervalech kineticky měřena absorbance při 440 nm.

3.6 Testování neurotoxicity pomocí bioanalytických metod

Neurotoxická koncentrací 1-200 μM CdCl_2 a HgCl_2 byla testována na buněčné linii SH-SY5Y v několika časových intervalech. Pro porovnání toxického působení byl také zařazen ZnCl_2 , jelikož se Zn v periodické soustavě prvků nachází ve stejné skupině s Hg a Cd. Pomocí testu MCB byla stanovena intracelulární koncentrace redukováného glutathionu. Pro sledování vlivu toxických látek na dehydrogenázovou aktivitu buněk byl použit test WST-1.

Experimenty s měřením dehydrogenázové aktivity a koncentrace glutathionu byly prováděny v 96jamkových destičkách. Do každé jamky bylo nasazeno $20 \cdot 10^3$ buněk v objemu 100 μL . Buňky se následně nechaly inkubovat 24 hod při 37 °C a atmosféře 5 % CO_2 , aby došlo k přisednutí na povrch destičky. Po této inkubaci bylo kultivační médium odtaženo a nahrazeno 100 μL kultivačního média bez fenolové červeně obsahujícím danou koncentraci příslušné toxické látky. Ke kontrolním buňkám nebyla přidána toxická látka, ale pouze kultivační médium bez fenolové červeně. Testované intervaly působení dané toxické látky byly 1, 2, 4, 6, 24 a 48 hod.

3.6.1 Stanovení koncentrace glutathionu

Monochlorobimany jsou lipofilní fluorescenční sondy využívané ke stanovení intracelulární hladiny glutathionu. Díky své lipofilitě prochází přes buněčnou membránu a v buňce tvoří konjugáty s glutationem (Stevenson et al., 2002).

U buněčné linie SH-SY5Y bylo do každé jamky mikrotitrační destičky s buňkami přidáno 20 μL pracovního roztoku MCB. Následně byla ihned měřena intenzita fluorescence při excitační vlnové délce 394 nm a emisní vlnové délce 490 nm. K měření byl využit přístroj Tecan Spark (Tecan, Rakousko). Množství GSH v buňkách bylo vztaženo k množství GSH u kontrolních buněk ($=100 \% \pm \text{SD}$).

3.6.2 Stanovení dehydrogenázové aktivity

WST-1 test detekuje dehydrogenázovou aktivitu v buňkách. Podstatou tohoto testu je redukce tetrazoliové soli WST-1 na ve vodě rozpustný formazan žluté barvy, jehož množství je přímo úměrné počtu metabolicky aktivních buněk (Bommer and Ward, 2016).

Po inkubaci bylo do každé jamky 96jamkové mikrotitrační destičky přidáno 10 μL činidla WST-1 a v čase 0 a 60 min byla detekována absorbance při vlnové délce 440 nm pomocí přístroje Tecan Spark (Tecan, Rakousko). Dehydrogenázová aktivita byla vztažena k aktivitě kontrolních buněk ($= 100 \% \pm \text{SD}$).

3.7 Sledování změn buněčné morfologie v reálném čase

Přístroj BioStation IM-Q (Nikon, Japonsko) představuje sestavu mikroskopu, CCD kamery a inkubátoru. To umožňuje dlouhodobé sledování buněk a sběr dat i po dobu několika dní. Je možné ho využít jak pro pozorování ve fázovém kontrastu, tak pro pořizování fluorescenčních snímků.

Buňky byly nasazeny do 4jamkové komůrky (Ibidi, Německo). Do každé čtvrtiny této komůrky bylo nasazeno $30 \cdot 10^3$ buněk v 250 μL média pro buňky SH-SY5Y. Následně byla každá čtvrtina komůrky doplněna tímto médiem na celkový objem 700 μL . Po 24hodinové inkubaci bylo médium odtazeno a nahrazeno 700 μL média bez fenolové červeně obsahujícím danou toxickou látku. Testované látky byly CdCl_2 a HgCl_2 v koncentracích 25 a 200 μM . Po ovlivnění buněk byla spuštěna 24hodinová obrazová analýza s využitím fázového kontrastu.

3.8 Vizualizace buněk a buněčných organel

Pro pozorování buněk a buněčných organel pod mikroskopem byla použita 8komorová mikroskopická skla. Zde bylo do každé komůrky nasazeno $25 \cdot 10^3$ buněk v celkovém objemu 200 μL . Po 24hodinové inkubaci bylo kultivační médium nahrazeno médiem bez fenolové červeně obsahujícím danou toxickou látku. Použity byly následující látky: 5, 25 a 100 μM CdCl_2 , 5, 25 a 100 μM HgCl_2 . U kontrolních buněk bylo použito samotné kultivační médium bez fenolové červeně. Po inkubaci s toxickou látkou byla provedena fluorescenční mikroskopie s využitím sond Hoechst 33258 a faloidin-FITC. Zde byl zvolen časový interval 24 hod inkubace s vybranou látkou.

3.8.1 Vizualizace aktinových vláken

Pro vizualizaci aktinových součástí cytoskeletu buněk je často využíván faloidin značený fluorescenční značkou. Faloidin je přírodní toxický alkaloid izolovaný z muchomůrky zelené, který má vysokou afinitu k F-aktinovým vláknům. Pro snadnou vizualizaci se využívá jeho fluorescenční značení například fluoresceinisothiokyanátem nebo tetramethylrhodaminisothiokyanátem. Aby mohl tento alkaloid obarvit cytoskelet uvnitř buňky, je nutné permeabilizovat buněčnou membránu (Mazloom-Farsibaf et al., 2021; Small et al., 1999).

Pro obarvení aktinových vláken byly buňky nejdříve promyty vyhřátým roztokem DPBS 1x (37 °C). Následně byly fixovány na podložní sklo pomocí 200 μL 3,7% formaldehydu a bylo přidáno 200 μL 0,1% roztoku tritonu X-100, se kterým byly buňky inkubovány 15 min při 37 °C ve tmě. Tento krok zajistil permeabilizaci buněčné membrány.

Po inkubaci byl roztok odtažen a buňky byly promyty roztokem DPBS 1x. Následně bylo k buňkám přidáno 200 μ L pracovního roztoku faloidin-FITC a buňky se nechaly inkubovat 40 min. Poté byly buňky opět promyty DPBS 1x. Po jeho odpipetování bylo aplikováno krycí sklo a následovala fluorescenční mikroskopie pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonsko) s fluorescenčním filtrem FITC při excitační vlnové délce 485 nm a emisní vlnové délce 518 nm. Fluorescence faloidinu-FITC byla na snímcích zaznamenána jako zelené zbarvení vláken aktinu.

3.8.2 Vizualizace buněčných jader

Fluorescenční sonda Hoechst 33258 je často využívána pro barvení buněk několika fluorofory zároveň, protože její excitační ani emisní spektrum se nepřekrývá s dalšími běžně používanými fluorofory. K excitaci se využívá ultrafialové záření, které vyvolává emisi modré fluorescence (Martin et al., 2005). Toto barvivo se váže na oblasti DNA bohaté na adenin a thymin a umožňuje odhalit abnormality ve velikosti nebo tvaru jádra (Kabakov and Gabai, 2018).

Pro obarvení jádra bylo k 200 μ L média v každé komůrce 8komorového mikroskopického skla přidáno 10 μ L pracovního roztoku Hoechst 33258 ($c = 2 \mu\text{M}$), který byl předem vytemperován na 37 °C. Následovala inkubace 10 min při 37 °C ve tmě. Poté byly buňky promyty roztokem DPBS 1x. Následovalo mikroskopování pomocí fluorescenčního mikroskopu Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonsko) s fluorescenčním filtrem DAPI při excitační vlnové délce 352 nm a emisní vlnové délce 461 nm. Fluorescence sondy Hoechst 33258 byla na snímcích zaznamenána jako modré zbarvení chromatinu v jádrech.

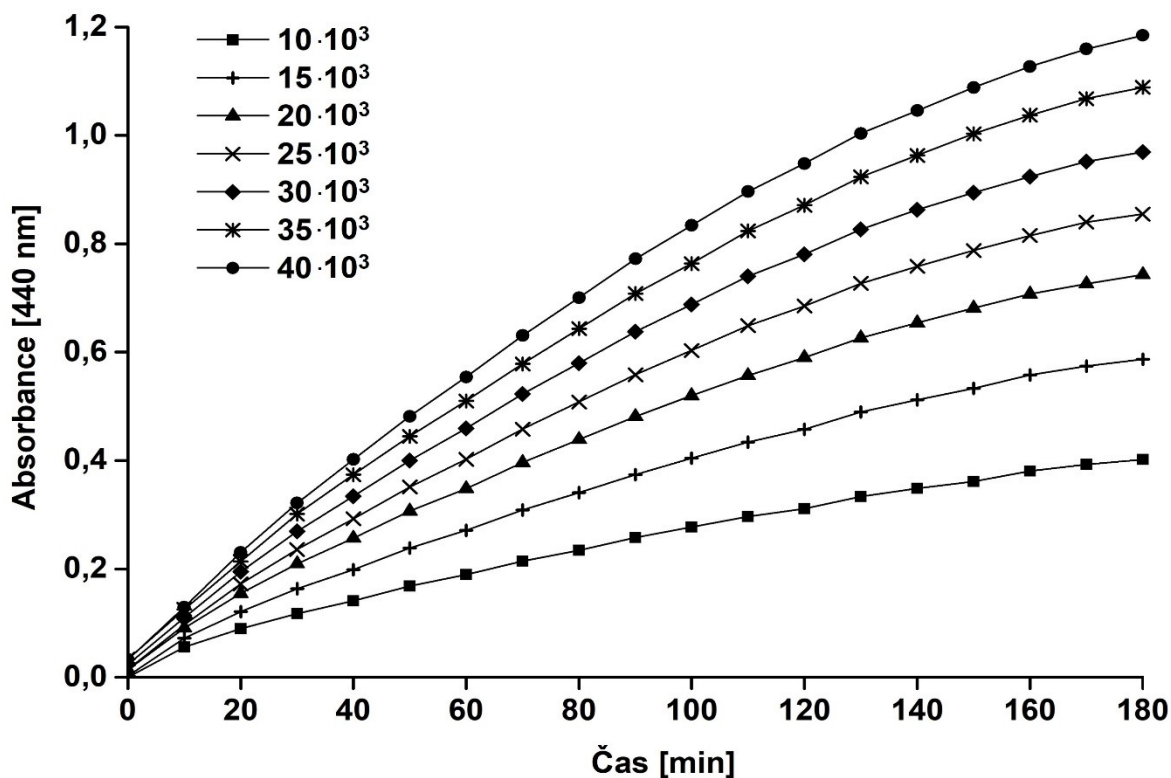
3.9 Statistická analýza naměřených dat

Všechny experimenty byly provedeny alespoň ve třech nezávislých experimentech. Studované charakteristiky byly v rámci jedné analýzy měřeny vždy v kvadrupletech ($n = 4$). Výsledky testů pro stanovení koncentrace glutathionu a dehydrogenázové aktivity jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD. U výsledků byla provedena statistická analýza pomocí softwaru OriginPro 9.0.0 (USA). Po testování normality byla provedena jednorozměrná analýza rozptylu (ANOVA) s využitím Bonferroniho post-testu se zvolenou hladinou významnosti $p = 0,05$ (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

4. VÝSLEDKY

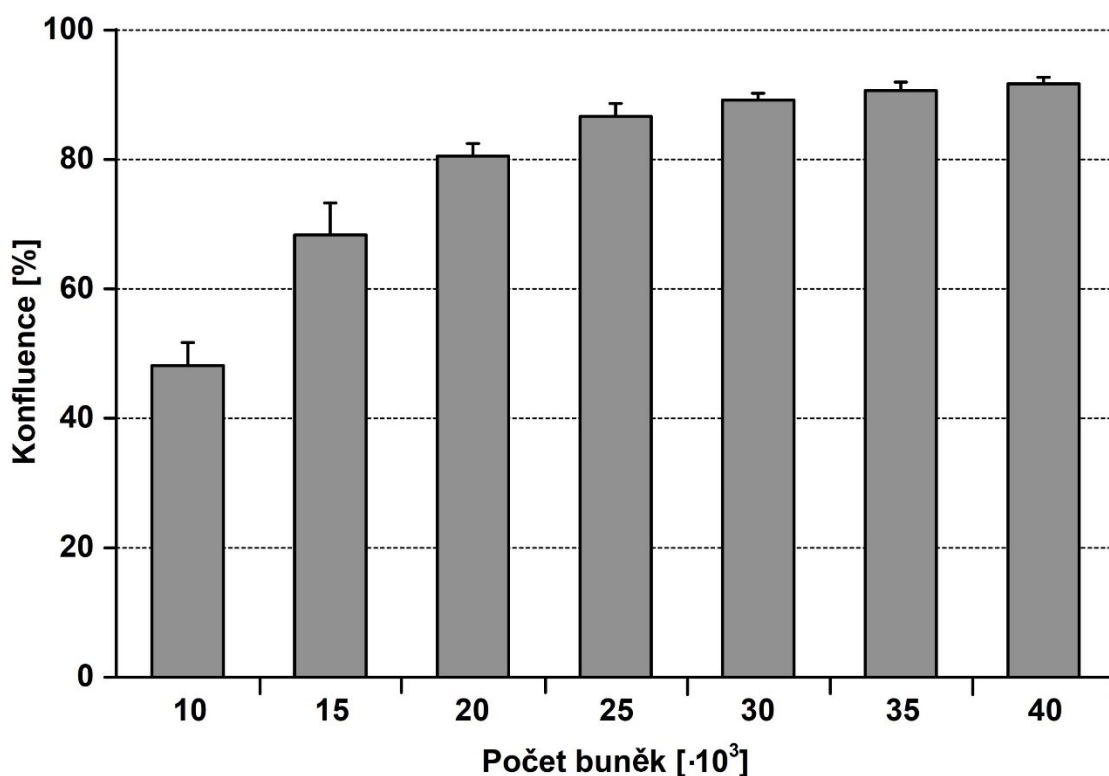
4.1 Optimalizace denzity buněk SH-SY5Y

U buněčné linie SH-SY5Y bylo v první řadě potřeba optimalizovat denzitu buněk pro spektrofotometrická a spektrofluorimetrická stanovení. Pomocí WST-1 testu jsme optimalizovali buněčnou denzitu, čímž jsme stanovili nejvhodnější počet buněk nasazovaných do jamek 96jamkové mikrotitrační destičky. Změna absorbance v závislosti na čase je znázorněna v grafu 1. Hlavním hodnotícím parametrem pro nás byla změna absolutní hodnoty absorbance u různých denzit buněk. Tyto změny jsme porovnávali v čase 60 min. Vlivy jednotlivých denzit byly lépe odlišitelné po delším časovém intervalu, a proto jsme v měření pokračovali ještě dalších 120 min. Mezi denzitami $10 \cdot 10^3$ a $15 \cdot 10^3$ buněk na jamku vidíme výraznou změnu absorbance. U denzit $20 \cdot 10^3$ - $30 \cdot 10^3$ buněk na jamku jsou nárůsty absolutních hodnot absorbance téměř totožné. U vyšších denzit se potom nárůsty absorbance snižují. Proto jsme pro experimenty vybírali z rozmezí denzit $20 \cdot 10^3$ - $30 \cdot 10^3$ buněk na jamku. Důležitým parametrem pro volbu optimální denzity bylo, zda je závislost absorbance na čase v intervalu 0 až 1 hod lineární. Tuto lineární závislost jsme detekovali u denzit $20 \cdot 10^3$, $25 \cdot 10^3$ a $30 \cdot 10^3$ buněk na jamku.



Graf 1: Optimalizace denzity buněk SH-SY5Y. Sledování dehydrogenázové aktivity buněk (WST-1 test, 440 nm). 0-180 min. Inkubace 24 hod. $10 \cdot 10^3$ - $40 \cdot 10^3$ buněk/jamka; 10. pasáž.

Abychom správně optimalizovali denzitu buněk pro spektrofotometrická a spektrofluorimetrická stanovení, doplnili jsme výsledky měření konfluencí buněk (Graf 2). Pro výběr vhodné denzity bylo důležité, aby buňky měly dostatečný prostor pro růst a také, aby byl počet buněk dostatečný i pro experimenty prováděné v krátkých časových intervalech. Denzity $10 \cdot 10^3$ a $15 \cdot 10^3$ buněk na jamku poskytovaly po 24hodinové inkubaci konfluenci $48 \pm 4 \%$ a $68 \pm 5 \%$, což není optimální z pohledu množství buněk. Navíc ani dle předchozích výsledků tyto denzity nejsou příliš vhodné. U denzit $25 \cdot 10^3$ buněk na jamku a vyšších se konfluencí pohybovala kolem 90 %, což by mohlo vést k omezení buněčného růstu a negativnímu ovlivnění prováděných experimentů. Po zhodnocení konfluencí po 24 hod jsme vybrali jako optimální denzitu $20 \cdot 10^3$ buněk na jamku, kde hodnota konfluencí dosahovala $81 \pm 2 \%$. I dle předchozích výsledků je tato denzita vhodná pro experimentální měření, a proto jsme ji použili v následujících experimentech prováděných v mikrotitrační destičce.



Graf 2: Optimalizace konfluencí buněk SH-SY5Y. Buňky inkubovány 24 hod. v médiu, $10 \cdot 10^3$ - $40 \cdot 10^3$ buněk/jamka; 10. pasáž. Konfluencí vyjádřena v %. Průměr \pm SD (n = 6).

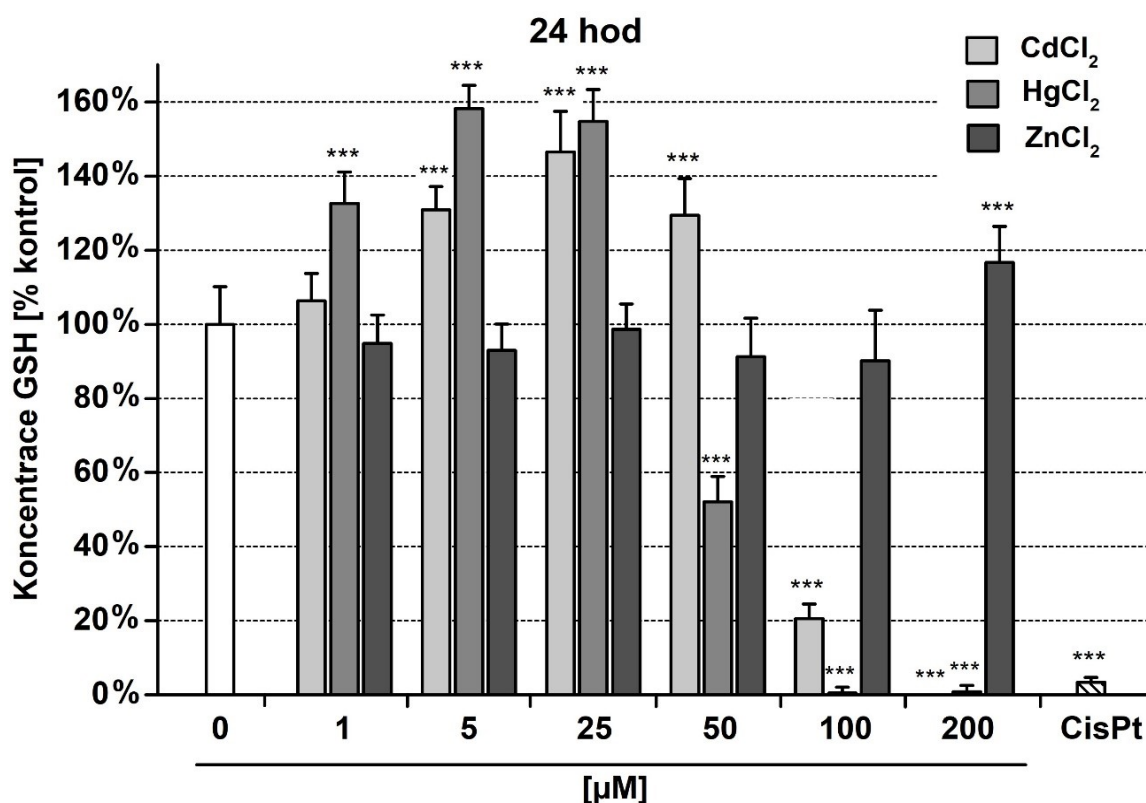
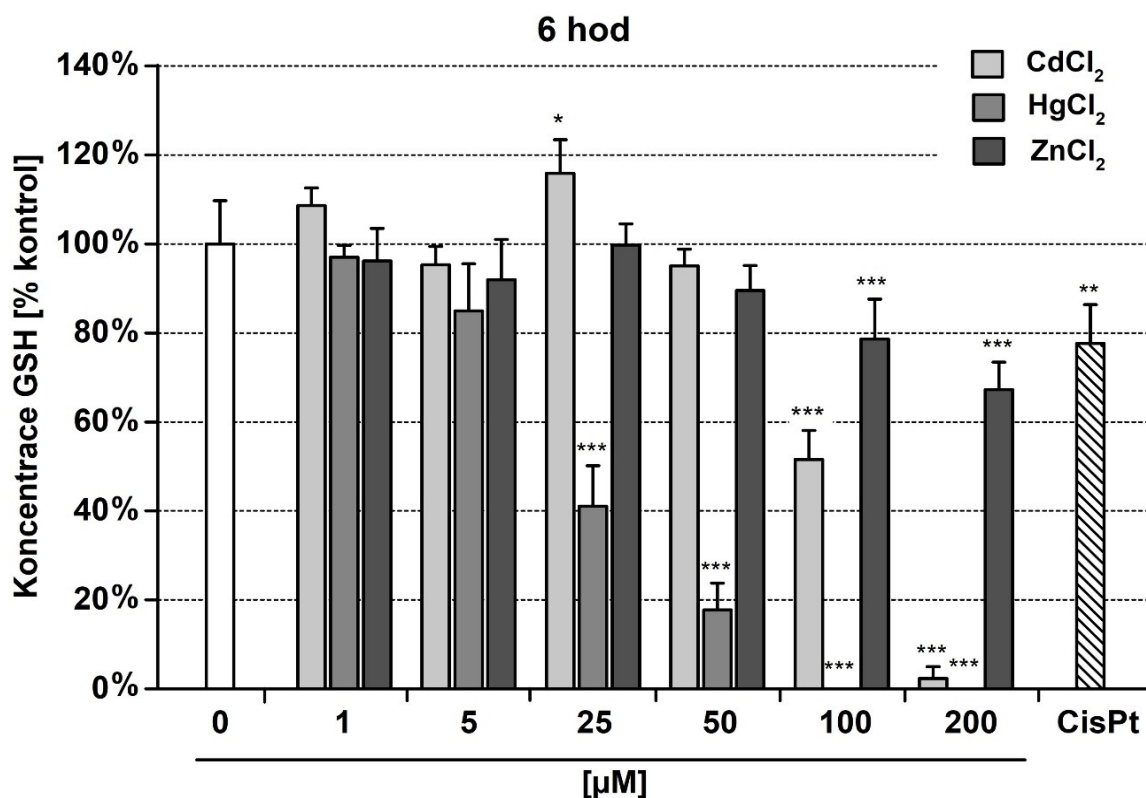
4.2 Testování neurotoxicity pomocí bioanalytických metod

4.2.1 Stanovení koncentrace glutathionu

V důsledku působení vybraných látek může dojít k indukci oxidačního stresu a s tím spojené změně intracelulární koncentrace GSH. U buněk SH-SY5Y jsme nejprve studovali vliv širšího rozmezí koncentrací HgCl_2 , CdCl_2 a ZnCl_2 (1-200 μM) v časových intervalech 6 a 24 hod (Graf 3). Jako pozitivní kontrola byla použita CisPt o koncentraci 50 μM .

Intracelulární koncentrace GSH po 6hodinové inkubaci buněk SH-SY5Y s 1 a 5 μM CdCl_2 je srovnatelná s kontrolními buňkami. Při inkubaci buněk s 25 μM CdCl_2 dochází ke zvýšení a u 50-200 μM CdCl_2 následuje snížení intracelulární koncentrace GSH. Po expozici buněk 100 a 200 μM CdCl_2 vidíme signifikantní pokles intracelulární koncentrace GSH ve srovnání s kontrolními buňkami. U 200 μM CdCl_2 dochází ke snížení o více než 95 % ve vztahu ke kontrolním buňkám. U buněk inkubovaných po dobu 6 hod s 25-200 μM HgCl_2 pozorujeme statisticky významné snížení koncentrace GSH. Inkubace buněk s 100 a 200 μM HgCl_2 způsobila pokles koncentrace glutathionu pod detekovatelnou hladinu. Pokud porovnáme vliv HgCl_2 a CdCl_2 , vidíme odlišný trend změny intracelulární koncentrace GSH. Čím vyšší je koncentrace HgCl_2 , se kterou byly buňky inkubovány, tím větší je pokles koncentrace GSH. To neplatí pro CdCl_2 , kde nižší koncentrace (1 a 5 μM CdCl_2) výrazně neovlivňují intracelulární koncentraci GSH, u 25 μM CdCl_2 potom následuje nárůst a teprve u vyšších koncentrací (50-200 μM CdCl_2) dochází k poklesu intracelulární koncentrace GSH. V porovnání s CdCl_2 a HgCl_2 není u ZnCl_2 viditelný žádný trend v poklesu koncentrace GSH. Buňky ovlivněné ZnCl_2 vykazují statisticky významné snížení intracelulární koncentrace GSH vůči kontrolním buňkám pouze po ovlivnění 100 a 200 μM .

Po 24hodinové inkubaci s 5-50 μM CdCl_2 pozorujeme u buněk SH-SY5Y zvýšení koncentrace GSH oproti kontrolním buňkám. U 100 μM CdCl_2 vidíme výrazné snížení GSH na hodnotu $21 \pm 4 \%$ ve srovnání s kontrolními buňkami a 200 μM CdCl_2 vede k vyčerpání GSH pod detekovatelnou mez. Stejný trend jako u CdCl_2 vidíme po 24 hod i u HgCl_2 . V tomto časovém intervalu u 1-25 μM HgCl_2 pozorujeme signifikantní nárůst koncentrace GSH. 1 μM HgCl_2 způsobuje zvýšení na $133 \pm 9 \%$, 5 μM HgCl_2 na $158 \pm 6 \%$ a 25 μM HgCl_2 na $154 \pm 9 \%$ v porovnání s kontrolními buňkami. U 50 μM HgCl_2 následuje významný pokles na $52 \pm 7 \%$. Jelikož 100 a 200 μM HgCl_2 způsobily depleci GSH pod limit detekce už po 6 hod, po 24 hod tomu není jinak. Oproti CdCl_2 a HgCl_2 způsobuje po 24 hod statisticky významné zvýšení koncentrace glutathionu pouze u 200 μM ZnCl_2 . U CisPt vidíme po 24 hod významný pokles proti kontrolním buňkám, a to na $3 \pm 1 \%$.



Graf 3: Vliv testovaných látek na koncentraci glutathionu. Buňky SH-SY5Y byly inkubovány s CdCl₂, HgCl₂, ZnCl₂ (0-200 μM), cisplatinou (CisPt; 50 μM). Intervaly 6 hod; 24 hod. Monochlorobimannová metoda ($\lambda_{Ex/Em} = 394/490$ nm). Intracelulární koncentrace glutathionu (GSH) vyjádřena jako % neovlivněných kontrolních buněk (= 100 %). Průměr ± SD (n = 4-12; ***, $p < 0,001$; vs. kontroly v daný časový interval).

Pro doplnění testů provedených v intervalech 6 a 24 hod jsme dále testovali koncentrace 25 a 100 μM CdCl_2 a HgCl_2 i v dalších časových intervalech. Abychom zjistili přesnější průběh změn koncentrace glutathionu v buňkách SH-SY5Y po inkubaci s těmito látkami, zvolili jsme krátké intervaly 1, 2 a 4 hod a delší interval 48 hod (Tabulka 1). Výsledky jsou vždy vztaženy ke kontrolním buňkám (= 100 %).

Po 1, 2 a 4hodinové inkubaci buněk s 25 μM CdCl_2 nebyly detekovány výrazné změny v intracelulární koncentraci GSH. Jak je znázorněno v grafu 3, po 6 a 24hodinové inkubaci dochází ke zvýšení koncentrace intracelulárního glutathionu. Inkubace po dobu 48 hod potom způsobuje mírný pokles na $138 \pm 7 \%$. Expozice 100 μM CdCl_2 způsobuje už po 1 hod pokles intracelulární koncentrace GSH na $70 \pm 7 \%$ a v dalších časových intervalech sledujeme postupný pokles až na hodnotu $6 \pm 5 \%$, kterou jsme naměřili po 48 hod. Při inkubaci buněk s 25 μM HgCl_2 pozorujeme zajímavý jev, kdy prvních 6 hod po inkubaci s toxickou látkou dochází k poklesu intracelulární koncentrace glutathionu o 60 %, ale po 24 hod následuje signifikantní zvýšení nad 155 %, které přetrvává, a dokonce se ještě mírně zvyšuje i po 48 hod. Působení 100 μM HgCl_2 vede ke snížení intracelulárního glutathionu pod mez detekce už po 1 hod inkubace. V rámci všech dalších časových intervalů je potom u této koncentrace HgCl_2 naměřená koncentrace GSH také nulová.

Tabulka 1: Vliv testovaných látek na koncentraci glutathionu. Buňky SH-SY5Y byly inkubovány s 25 a 100 μM CdCl_2 , 25 a 100 μM HgCl_2 . Intervaly 1, 2, 4, 48 hod. Monochlorobimanová metoda ($\lambda_{\text{Ex/Em}} = 394/490 \text{ nm}$). Intracelulární koncentrace glutathionu (GSH) vyjádřena jako % neovlivněných kontrolních buněk (= 100 %). Průměr \pm SD ($n = 4-12$; ***, $p < 0,001$; vs. kontroly v daný časový interval).

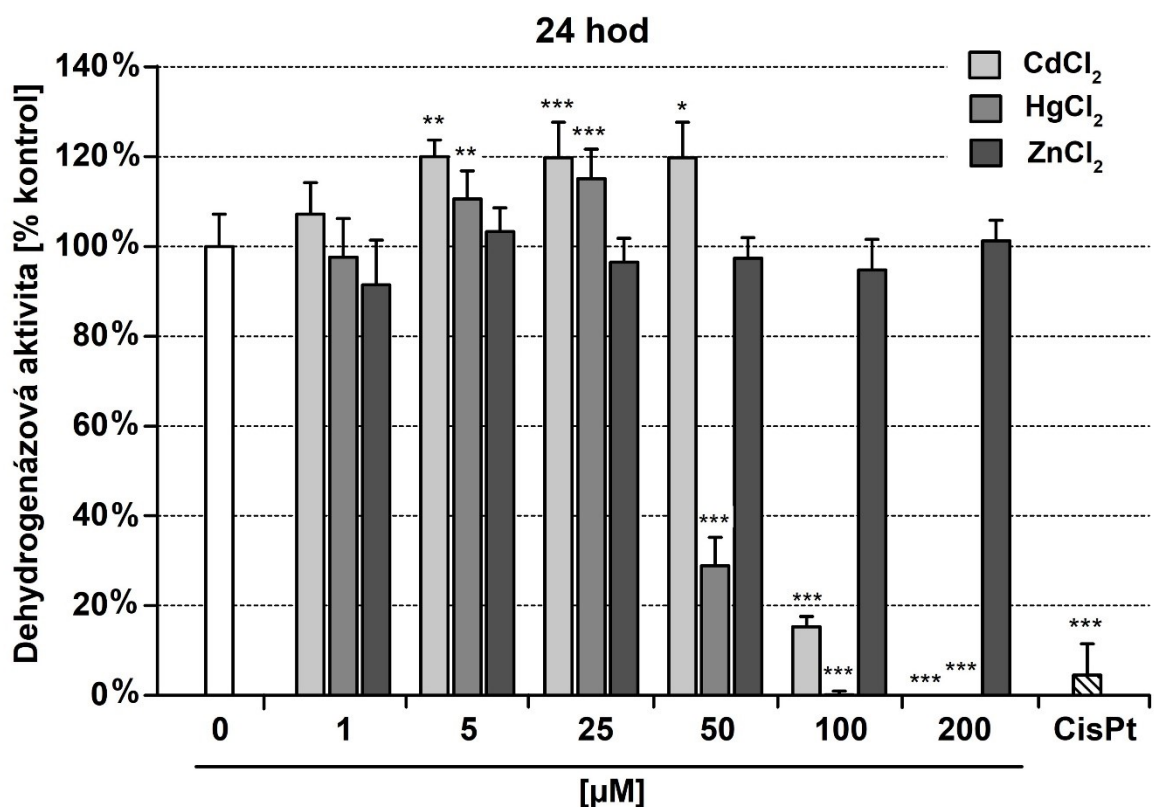
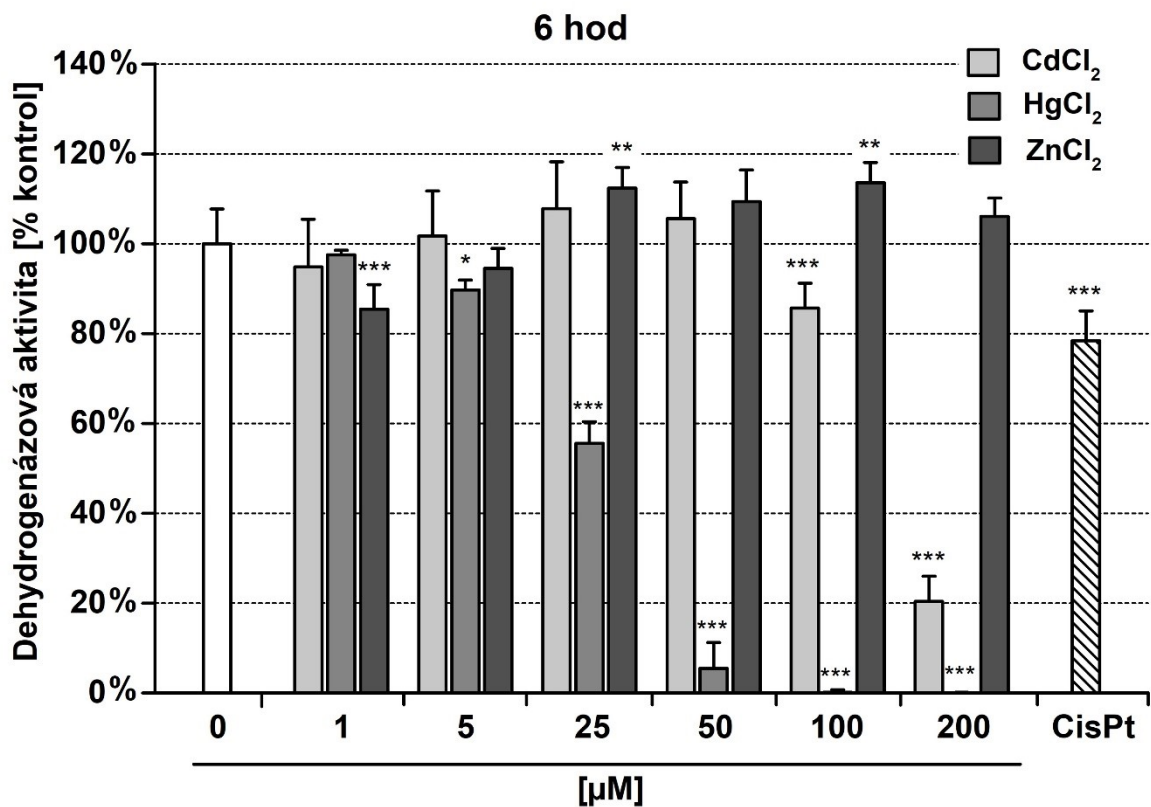
Testovaná látka	Čas [hod]			
	1	2	4	48
Kontrolní buňky	$100 \pm 4 \%$	$100 \pm 5 \%$	$100 \pm 6 \%$	$100 \pm 9 \%$
25 μM CdCl_2	$92 \pm 10 \%$	$91 \pm 9 \%$	$88 \pm 7 \%$ ***	$138 \pm 7 \%$ ***
100 μM CdCl_2	$70 \pm 7 \%$ ***	$67 \pm 7 \%$ ***	$61 \pm 4 \%$ ***	$6 \pm 5 \%$ ***
25 μM HgCl_2	$48 \pm 9 \%$ ***	$45 \pm 6 \%$ ***	$36 \pm 5 \%$ ***	$170 \pm 4 \%$ ***
100 μM HgCl_2	$0 \pm 0 \%$ ***	$0 \pm 0 \%$ ***	$0 \pm 0 \%$ ***	$0 \pm 0 \%$ ***

4.2.2 Stanovení dehydrogenázové aktivity

Pro charakterizaci toxického účinku jsme dále testovali intracelulární dehydrogenázovou aktivitu u buněk SH-SY5Y v širším rozmezí koncentrací CdCl₂, HgCl₂ a ZnCl₂ (1-200 μM). Stejně jako u stanovení intracelulární koncentrace GSH jsme použili 50 μM CisPt jako pozitivní kontrolu. Dehydrogenázovou aktivitu jsme detekovali po inkubaci buněk s vybranými látkami po dobu 6 a 24 hod (Graf 4).

Po 6 hod vidíme u 100 a 200 μM CdCl₂ pokles dehydrogenázové aktivity ve srovnání s kontrolními buňkami. Inkubace buněk SH-SY5Y s 200 μM CdCl₂ způsobuje pokles až na 20 ± 6 %. Vliv HgCl₂ je v porovnání s CdCl₂ výraznější. Zde dochází k poklesu dehydrogenázové aktivity už u 5 μM HgCl₂ a se zvyšující se koncentrací testované látky pozorujeme výrazné snížení dehydrogenázové aktivity. Koncentrace 25-200 μM HgCl₂ vedou k poklesu měřeného signálu. Dehydrogenázová aktivita po inkubaci s 50 μM HgCl₂ klesá na 6 ± 6 % v porovnání s kontrolními buňkami a u obou následujících vyšších koncentrací ji nedetekujeme vůbec. U 1 μM ZnCl₂ pozorujeme snížení oproti kontrolním buňkám. U 25 μM ZnCl₂ sledujeme zvýšení aktivity dehydrogenáz na 112 ± 5 % a u 100 μM zvýšení na 113 ± 5 %. CisPt po 6 hod způsobuje pokles dehydrogenázové aktivity na 78 ± 7 % v porovnání s kontrolními buňkami.

Inkubace buněk SH-SY5Y s CdCl₂ po dobu 24 hod způsobilo signifikantní nárůst dehydrogenázové aktivity u koncentrací 5, 25 a 50 μM ve srovnání s kontrolami. Koncentrace 100 μM CdCl₂ dehydrogenázovou aktivitu snižuje na 15 ± 2 % a u koncentrace 200 μM CdCl₂ vidíme pokles pod mez detekce. Stejný trend můžeme vidět u buněk inkubovaných s HgCl₂. Zde u koncentrací 5 a 25 μM HgCl₂ pozorujeme nárůst nad hodnoty kontrolních buněk, ale na rozdíl od CdCl₂, zde už koncentrace 50 μM HgCl₂ způsobuje významný pokles dehydrogenázové aktivity na 29 ± 6 %. Stejně jako u kratšího časového intervalu, i zde 100 a 200 μM HgCl₂ způsobují vyčerpání dehydrogenázové aktivity pod limit detekce této metody. Po inkubaci buněk SH-SY5Y se ZnCl₂ se hodnoty pohybují srovnatelně jako u kontrolních buněk.



Graf 4: Vliv testovaných látek na dehydrogenázovou aktivitu. Buňky SH-SY5Y byly inkubovány s CdCl₂, HgCl₂, ZnCl₂ (0-200 µM), cisplatinou (CisPt; 50 µM). Intervaly 6 hod; 24 hod. Test WST-1. Dehydrogenázová aktivita vyjádřena jako % neovlivněných kontrolních buněk (= 100 %). Průměr ± SD (n = 4-12; *, *p* < 0,05; **, *p* < 0,01; ***, *p* < 0,001; vs. kontroly v daný časový interval).

Stejně jako tomu bylo u stanovení koncentrace GSH, i zde jsme se po naměření dehydrogenázové aktivity buněk SH-SY5Y po 6 a 24 hod rozhodli otestovat změny dehydrogenázové aktivity po inkubaci s 25 a 100 μM CdCl_2 a HgCl_2 v časových intervalech 1, 2, 4 a 48 hod (Tabulka 2). Výsledky jsou vždy vztaženy ke kontrolním buňkám (= 100 %).

Po inkubaci buněk s 25 μM CdCl_2 v intervalech 1, 2 a 4 hod nepozorujeme žádné výrazné změny dehydrogenázové aktivity buněk SH-SY5Y. K signifikantnímu zvýšení dehydrogenázové aktivity dochází po 24 a 48 hod. Po inkubaci buněk s 100 μM CdCl_2 během prvních 4 hod nepozorujeme významné změny. Inkubace po dobu 6 hod vede k tomu, že začíná aktivita dehydrogenáz klesat. Po 24 hod sledujeme výrazný pokles a po 48 hod už je měřený signál nulový. 25 μM HgCl_2 způsobuje i zde u dehydrogenázové aktivity stejné změny jako tomu bylo u koncentrace glutathionu. Po 1, 2, 4 a 6 hod dochází k postupnému poklesu dehydrogenázové aktivity, který je následován vzestupem po 24 hod, a to až na $115 \pm 7\%$ v porovnání s kontrolními buňkami. Po 48hodinové inkubaci pozorujeme pozvolný pokles na hodnoty blízké kontrolním buňkám. Inkubace buněk SH-SY5Y se 100 μM HgCl_2 způsobila ve všech testovaných intervalech vyčerpání dehydrogenázové aktivity buněk pod detekovatelnou mez.

Tabulka 2: Vliv testovaných látek na dehydrogenázovou aktivitu. Buňky SH-SY5Y byly inkubovány s 25 a 100 μM CdCl_2 , 25 a 100 μM HgCl_2 . Intervaly 1, 2, 4, 48 hod. Test WST-1. Dehydrogenázová aktivita vyjádřena jako % neovlivněných kontrolních buněk (= 100 %). Průměr \pm SD (n = 4-12; * $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; vs. kontroly v daný časový interval).

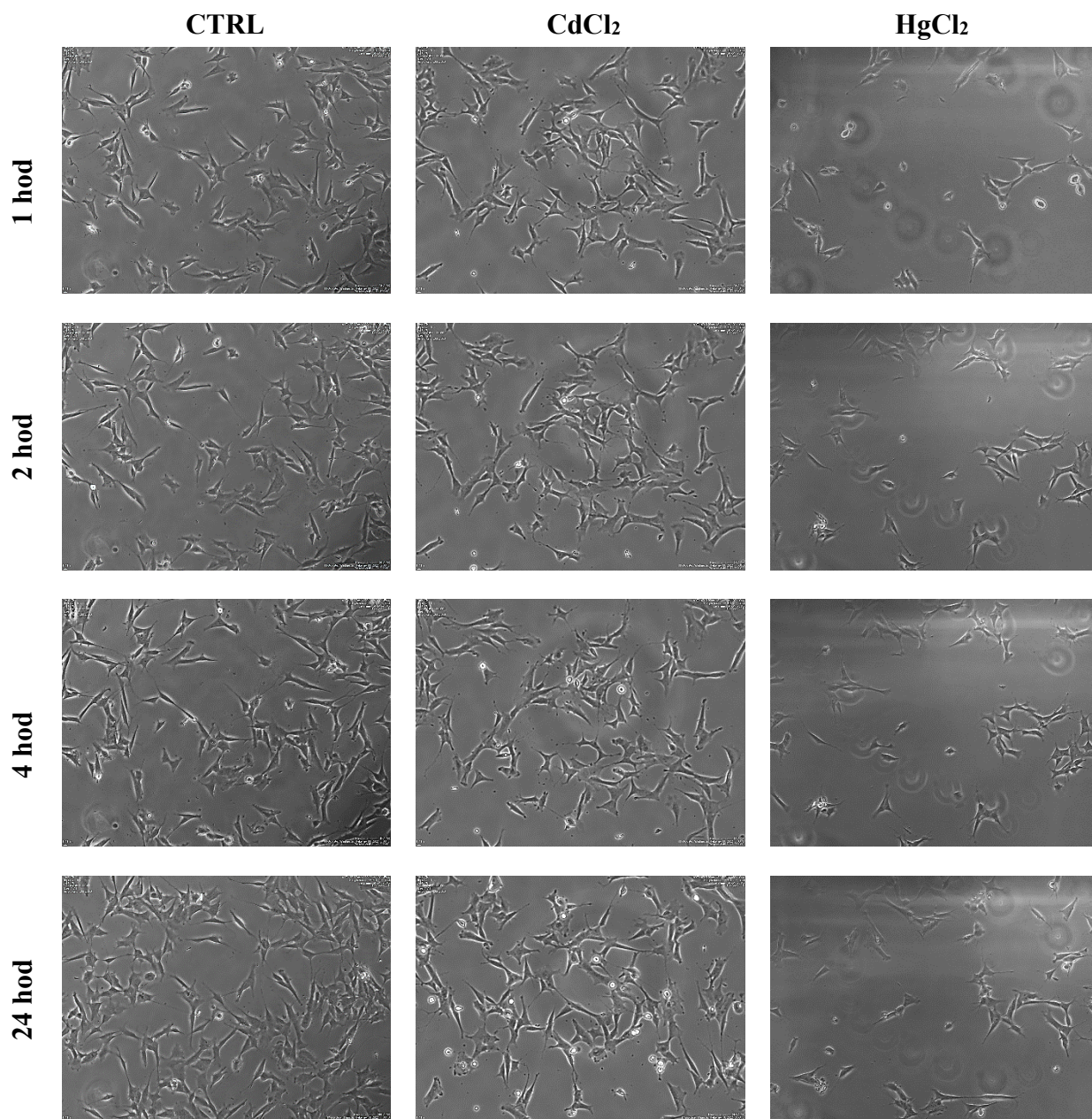
Testovaná látka	Čas [hod]			
	1	2	4	48
Kontrolní buňky	100 \pm 4 %	100 \pm 2 %	100 \pm 4 %	100 \pm 7 %
25 μM CdCl_2	112 \pm 9 %	108 \pm 9 %	105 \pm 9 %	128 \pm 3 % ***
100 μM CdCl_2	105 \pm 12 %	104 \pm 6 %	101 \pm 6 %	0 \pm 0 % ***
25 μM HgCl_2	79 \pm 11 % ***	79 \pm 9 % ***	70 \pm 11 % ***	110 \pm 4 %
100 μM HgCl_2	2 \pm 2 % ***	0 \pm 1 % ***	1 \pm 1 % ***	0 \pm 0 % ***

4.3 Sledování změn buněčné morfologie v reálném čase

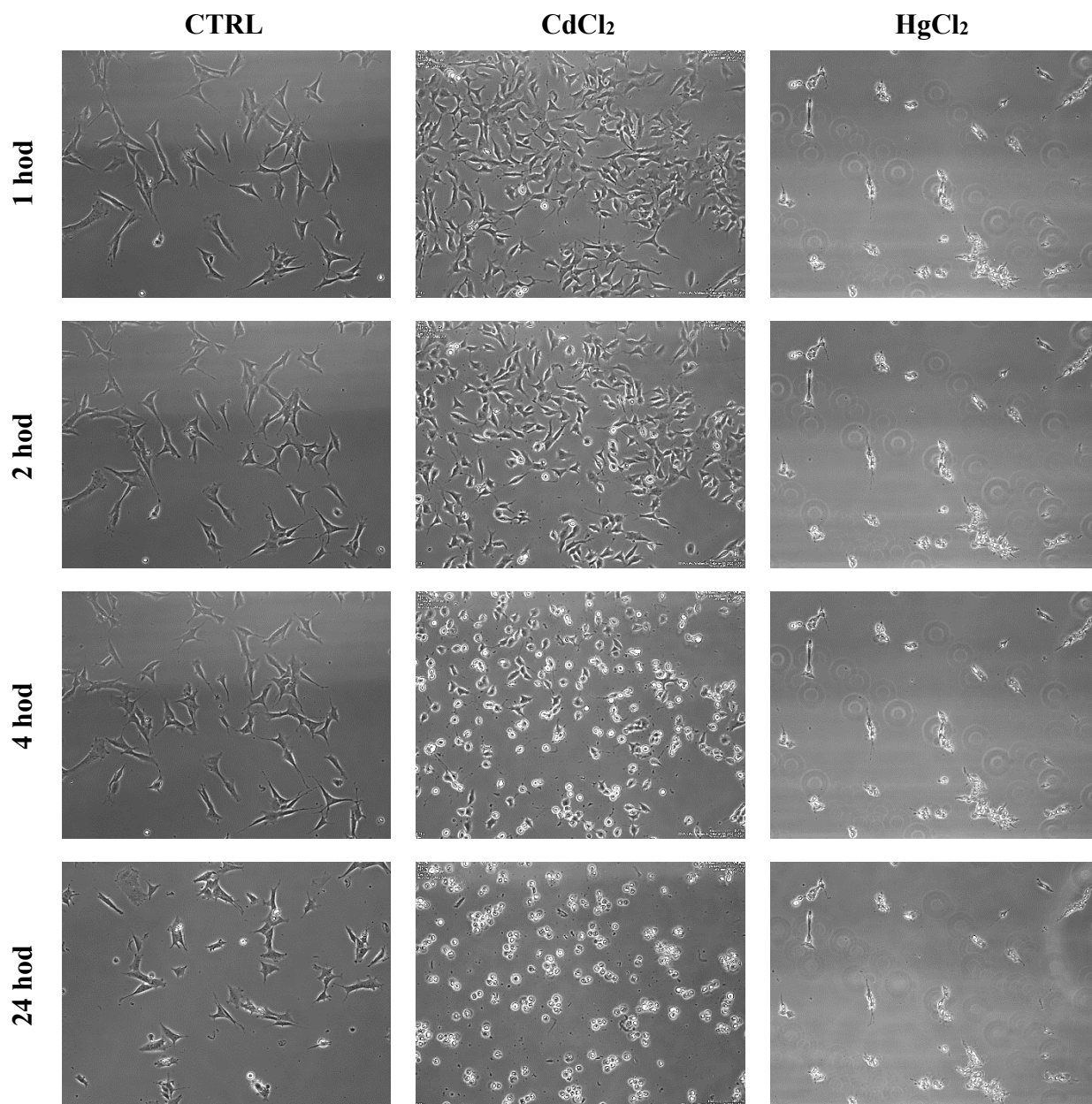
S využitím přístroje Biostation IM-Q jsme pozorovali vliv vybraných koncentrací CdCl_2 a HgCl_2 na morfologii buněk SH-SY5Y v závislosti na době vlivu vybrané testované látky. Na základě výše zjištěných informací jsme vybrali koncentraci $25 \mu\text{M}$ CdCl_2 a HgCl_2 , jelikož zde u obou sloučenin dochází v průběhu času nejprve ke snížení, a následně k výraznému zvýšení jak koncentrace glutathionu, tak dehydrogenázové aktivity (Obr. 13). Jako druhou koncentraci jsme vybrali $200 \mu\text{M}$ CdCl_2 a HgCl_2 , protože je dle předchozích výsledků prokazatelně nejtoxičtější z námi testovaných koncentrací (Obr. 14). Buňky jsme sledovali po dobu 24 hod inkubace s toxickými látkami a změny jsme porovnávali s kontrolními neovlivněnými buňkami (CTRL).

Buňky ovlivněné $25 \mu\text{M}$ CdCl_2 v časech 1, 2 a 4 hod nevykazují proti kontrolám žádné výrazné změny. Po 24 hod můžeme vidět, že se některé buňky začínají zakulacovat a uvolňovat ze dna komůrky. Inkubace s $25 \mu\text{M}$ HgCl_2 po dobu 1 a 2 hod taktéž nezpůsobuje větší změny. Po expozici 4 hod se buňky začínají zmenšovat a po 24 hod se dále zmenšují a přestávají být přisedlé. Vidíme tedy, že HgCl_2 je pro buňky více toxický, protože jeho účinek nastupuje po kratší době inkubace.

U koncentrace $200 \mu\text{M}$ CdCl_2 už po 1 hod pozorujeme zmenšení buněk a jejich zaoblení v porovnání s kontrolami. Po 2 hod vidíme, že je většina buněk v zorném poli zakulacená a dochází k jejich uvolnění z povrchu kultivační komůrky, na který adherovaly. Po 4 hod inkubace s $200 \mu\text{M}$ CdCl_2 přestávají být téměř všechny buňky přisedlé a žádné buňky už nemají původní vzhled. Inkubace 24 hod vede k úplnému poškození buněk a k jejich uvolnění z povrchu kultivační komůrky. Velmi zajímavé je, že u koncentrace $200 \mu\text{M}$ HgCl_2 buňky už po 1 hod ztrácejí svůj tvar a přestávají být přisedlé. Dochází zde k jejich úplnému poškození, což je patrné díky tomu, že po delších časových intervalech v zorném poli nedochází k žádné změně ve tvaru buněk a nedochází k dělení buněk. To potvrzuje vyšší toxicitu HgCl_2 .



Obr. 13: Mikrofotografie buněk SH-SY5Y inkubovaných s 25 μ M CdCl₂ nebo HgCl₂. Kontroly (CTRL) představují neovlivněné buňky. Interval 1, 2, 4, 24 hod. Fázový kontrast. Zvětšení: 100x.

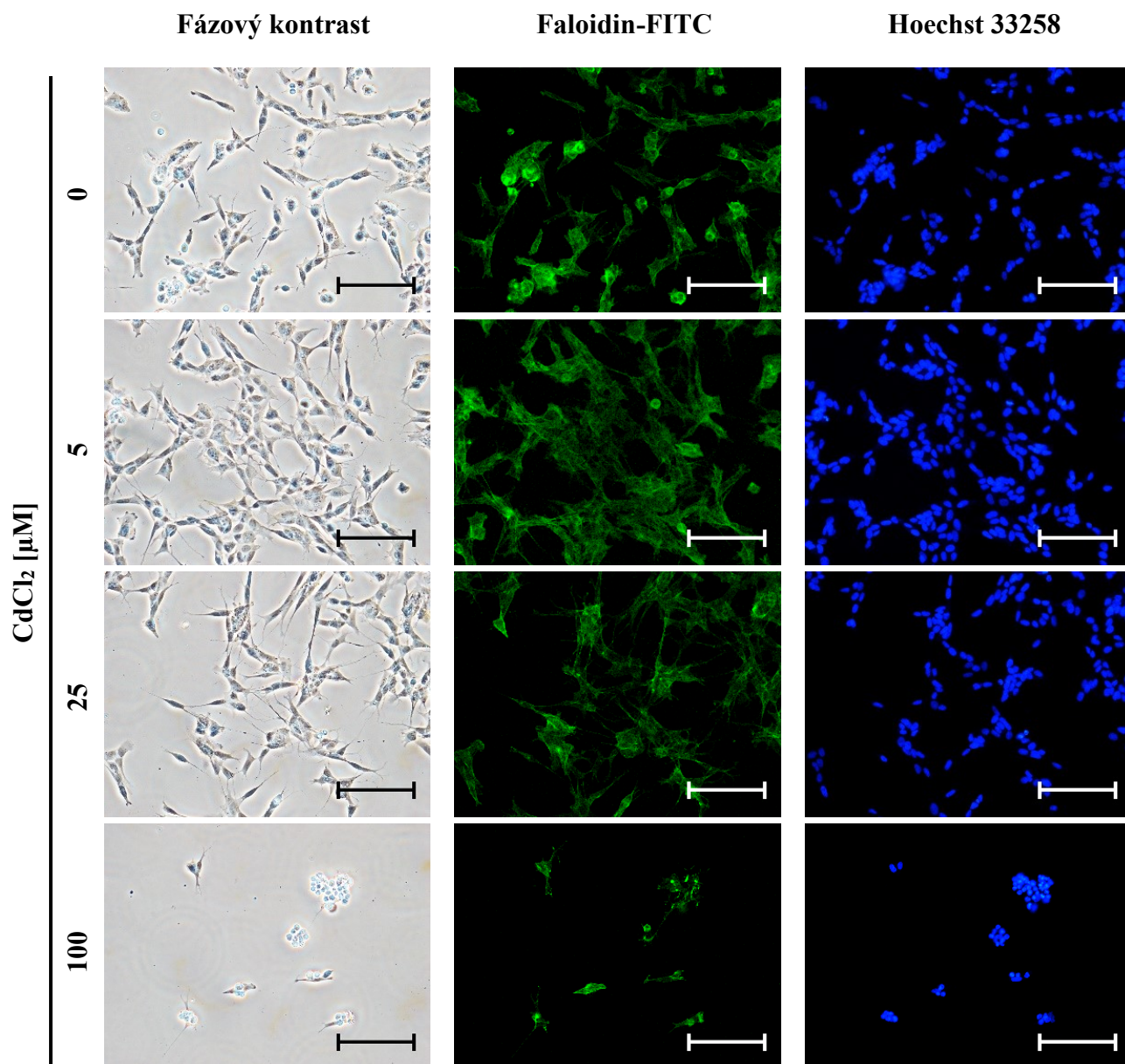


Obr. 14: Mikrofotografie buněk SH-SY5Y inkubovaných s 200 μ M CdCl₂ nebo HgCl₂. Kontroly (CTRL) představují neovlivněné buňky. Interval 1, 2, 4, 24 hod. Fázový kontrast. Zvětšení: 100x.

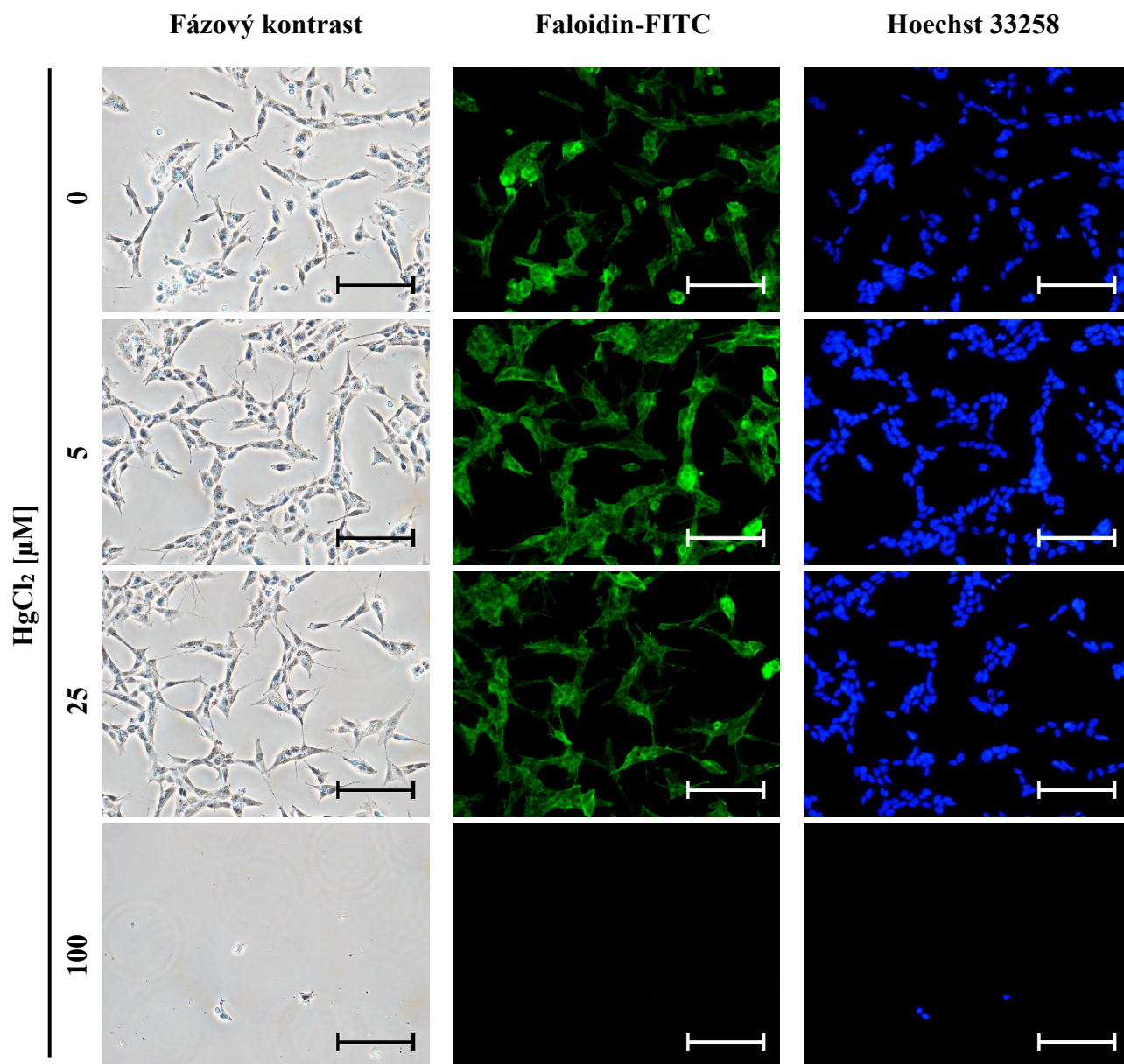
4.4 Vizualizace buněk a buněčných organel

Morfologické změny buněk SH-SY5Y po inkubaci s toxickými látkami jsme hodnotili pomocí mikroskopie ve fázovém kontrastu a s použitím fluorescenční sondy Hoechst 33258 a fluorescenčně značeného faloidinu (faloidin-FITC). Na základě pozorování změn u časosběrné analýzy jsme pro inkubaci buněk zvolili 5, 25 a 100 μM CdCl_2 a HgCl_2 , abychom mohli porovnat toxický účinek zvyšujících se koncentrací těchto látek. Výsledky fluorescenčního značení buněčného jádra a cytoskeletu jsou prezentovány na obrázcích 15 a 16.

Po 24hodinové inkubaci SH-SY5Y buněk s 5 μM CdCl_2 nejsou v porovnání s kontrolními buňkami patrné žádné výrazné změny celkového tvaru buněk ani organel. Cytoskelet je zde plně rozvinut a jádra jsou bez patrného poškození. U 25 μM CdCl_2 vidíme protažení buněk, mírné změny cytoskeletu a u některých jader pozorujeme kondenzaci chromatinu. Pokud se podíváme na účinky 100 μM CdCl_2 , počet buněk oproti kontrolám v zorném poli je výrazně snížen, přibližně o 90 %. Pozorujeme závažné poškození a zhroucení buněčného cytoskeletu. U jader vidíme jejich zmenšení a kondenzaci chromatinu. Na membránách buněk je viditelná tvorba tzv. blebů související s apoptózou a tvorbou apoptotických tělísek. Inkubace buněk s 5 μM HgCl_2 , stejně jako tomu bylo u CdCl_2 , nevede k viditelnému poškození buněk. Koncentrace 25 μM HgCl_2 způsobuje narušení cytoskeletu a kondenzaci jádra některých buněk. Po inkubaci buněk se 100 μM HgCl_2 ovšem sledujeme signifikantní změny. Zde v zorném poli nezůstaly téměř žádné buňky. Cytoskelet všech buněk je zcela poškozen takovým způsobem, že nezůstalo žádné místo, kam by se mohl faloidin-FITC navázat. Na snímku se sondou Hoechst 33258 vidíme jen několik kondenzovaných jader.



Obr. 15: Mikrofotografie buněk SH-SY5Y inkubovaných s CdCl₂ (0-100 μM). Interval 24 hod. Buňky, aktinová vlákna a jádra byly vizualizovány s použitím fázového kontrastu, faloidin-FITC a Hoechst 33258. Zvětšení: 200x. Měřítko: 100 μm.



Obr. 16: Mikrofotografie buněk SH-SY5Y inkubovaných s HgCl₂ (0-100 μM). Interval 24 hod. Buňky, aktinová vlákna a jádra byly vizualizovány s použitím fázového kontrastu, faloidin-FITC a Hoechst 33258. Zvětšení: 200x. Měřítko: 100 μm.

5. DISKUZE

Těžké kovy tvoří heterogenní skupinu prvků, které se liší biologickými a chemickými vlastnostmi. Kontaminace životního prostředí těžkými kovy je v současné době středem zájmu mnoha environmentálních studií a přitahuje velkou pozornost (Singh et al., 2011). Největší zastoupení těžkých kovů nalezneme v půdě a vodních zdrojích. Činnosti jako industrializace a urbanizace zvyšují množství těžkých kovů v biosféře. Některé těžké kovy jako například měď a zinek jsou v nízkých koncentracích v organismu nezbytné pro správnou funkci enzymů, účastní se oxidačně-redukčních reakcí a slouží jako prostetická skupina v metalothioneinech. Jiné těžké kovy jako kadmium a rtuť jsou pro lidský organismus velmi toxické. Biologická dostupnost a toxicita těžkých kovů závisí na jejich chemické formě a koncentraci (Sharma and Agrawal, 2005).

Buněčné *in vitro* modely jsou významné pro zkoumání mechanismů spojených s neurotoxicitou. V dnešní době jsou pro testování neurotoxicity k dispozici modely zahrnující neuroblastomové a glioblastomové buněčné linie. Používají se také primární buněčné linie nebo buněčné systémy odvozené z kmenových buněk, které lze diferencovat na neurony, astrocyty nebo oligodendrocyty. Použití nádorové a imortalizovaných buněčných linií v porovnání s primárními buňkami představují určité nevýhody, protože exprese genů souvisejících s nádorovým potenciálem těchto buněk může ovlivnit buněčnou odpověď na expozici těžkému kovu (Bal-Price et al., 2018). Pro studium toxicity těžkých kovů je často používána lidská neuroblastomová linie SH-SY5Y (Bovio et al., 2021; Branca et al., 2018; Sudo et al., 2019; Zhang et al., 2016). Některé studie pro studium neurotoxicity používají také zvířecí buněčné linie jako například krysí feochromocytomové buňky PC12 (Wang et al., 2014; Xu et al., 2016; Zhang et al., 2016; Zhou et al., 2020), krysí astroglie C6 (Lim et al., 2019) nebo myší hipokampální neurony HT-22 (Karri et al., 2018).

Pro výzkum se mohou využívat jak diferencované, tak nediferencované buňky SH-SY5Y (Cheung et al., 2009). Pro diferenciaci je obvykle používána kyselina *all-trans*-retinová, která zajišťuje, že buňky získají vlastnosti podobné neuronům. Kyselina retinová může ale v buňkách SH-SY5Y kromě diferenciaci spouštět také signalizaci přežití, což může snížit buněčnou citlivost vůči neurotoxickým látkám (Cheung et al., 2009; Korecka et al., 2013). Je ale také možné, že kyselina retinová indukuje diferenciaci směrem k cholinergnímu fenotypu a zvyšuje náchylnost buněk SH-SY5Y vůči neurotoxickým látkám. Pokud jsou ale buňky inkubovány s kyselinou retinovou a dalšími činidly, jako je například cholesterol nebo 12-O-tetradekanoylforbol-13-acetát, diferenciaci probíhá směrem

k dopaminergnímu neuronálnímu fenotypu a citlivost vůči neurotoxickým látkám je potom u těchto buněk snižena (Xie et al., 2010).

Pro testování neurotoxicity těžkých kovů jsme v naší práci použili nediferencovanou buněčnou linii SH-SY5Y. Před započítím experimentů jsme provedli optimalizaci buněčné denzity. Jedná se o důležitý krok, protože pokud jsou buňky v příliš vysoké nebo příliš nízké denzitě, může se měnit jejich velikost a morfologie. Nadměrná buněčná konfluence může vést k tomu, že buňky nebudou mít dostatek prostoru pro růst a bude docházet k jejich vzájemnému přerůstání přes sebe. To může mít za následek utlačování buněk ve spodních vrstvách (Leontieva and Blagosklonny, 2014). Nadměrnou buněčnou denzitou je ovlivněna také viabilita buněk. Ve studii zaměřené na vliv konfluence na proliferaci a diferenciaci buněk kostní dřene bylo prokázáno, že při konfluenci 100 % mají mezenchymální kmenové buňky kostní dřene výrazně nižší viabilitu v porovnání s buňkami při konfluenci 70 % a 80 %. Také bylo prokázáno, že při 80% konfluenci tyto buňky nejrychleji proliferují, a při přesažení 80% konfluence se proliferace zpomaluje (Abo-Aziza and Zaki, 2017). To souhlasí se zjištěním Leontieva and Blagosklonny 2014, že při zvyšování konfluence dochází ke shlukování buněk, které zpomaluje jejich růst.

V naší práci jsme se zabývali neurotoxicitou těžkých kovů kadmia a rtuti. Tyto prvky jsou v periodické soustavě prvků zařazeny do 12. skupiny a mají podobné chemické vlastnosti. Spolu s těmito dvěma kovy je do této skupiny zařazen také zinek, což je stopový prvek důležitý pro fyziologickou funkci enzymů. Z důvodu umístění v periodické soustavě prvků jsme se rozhodli sledovat také účinky $ZnCl_2$ na buňky SH-SY5Y a porovnali jsme je s vlivem $CdCl_2$ a $HgCl_2$.

Zinek je druhým nejrozšířenějším stopovým prvkem v lidském organismu. Hraje mimo jiné zásadní roli v imunitním systému, buněčném cyklu, replikaci DNA a syntéze proteinů. Více než 95 % iontů Zn^{2+} je vázáno v proteinech jako strukturální nebo katalytické kofaktory, zbývající část je obsažena v mozku a zde je pravděpodobně využívána v souvislosti s přenosem nervového vzruchu (Paoletti et al., 2009). Zinek je hlavním regulátorem neuronální fyziologie a jeho dyshomeostáza může způsobit smrt neuronových buněk (Lee, 2018). Navzdory jeho nezbytnosti pro normální nervovou funkci je nadměrná koncentrace toxická. Nadbytek zinku je běžným nálezem u neurodegenerativních onemocnění a podílí se na poškození pozorovaném u ischemie mozku, epilepsie a traumatu mozku. Neurotoxicita tohoto těžkého kovu zahrnuje mitochondriální produkci reaktivních forem kyslíku a narušení enzymatických funkcí, což vede k aktivaci apoptózy (Sankhla et al., 2017).

V naší práci jsme pozorovali vliv ZnCl_2 na změny koncentrace intracelulárního glutathionu v buňkách SH-SY5Y. Dle našich výsledků se hladina GSH po působení 1-50 μM ZnCl_2 po dobu 24 hod příliš nemění a je srovnatelná s hladinou GSH v neovlivněných buňkách. Při inkubaci buněk SH-SY5Y s vysokými koncentracemi 100 a 200 μM ZnCl_2 jsme po 6hodinové inkubaci zaznamenali pokles a po 24hodinové inkubaci došlo v našich experimentech k nárůstu koncentrace GSH. Podobné výsledky zaznamenala studie zabývající se neurotoxickým vlivem zinku na krysí neonatální kortikální neurony, kde po 6hodinové inkubaci s 50 μM ZnCl_2 nedošlo ke snížení, ale 200 μM ZnCl_2 po stejně dlouhé inkubaci byl zaznamenán významný pokles GSH (Chen and Liao, 2003). Další studie ukázala, že inkubace buněk PC12 se 100 a 300 μM ZnCl_2 po dobu 2 hod vede k vyčerpávání GSH a mění poměr oxidovaného a redukováného glutathionu ve prospěch oxidované formy. Snížení GSH je zde markantnější u vyšší z těchto dvou koncentrací (Pavlica et al., 2009). Jelikož ale koncentraci GSH ovlivňuje mimo jiné nutnost antioxidační obrany buněk při oxidačním stresu, je přínosné stanovit také hladinu intracelulárních ROS. Liu et al. 2017 stanovili změnu hladiny ROS po inkubaci diferencovaných buněk SH-SY5Y s 2 a 4 μM ZnCl_2 v různých časových intervalech v rozmezí -24 hod. U obou použitých koncentrací daného těžkého kovu a ve všech časových intervalech byla naměřena stejná koncentrace ROS jako u neovlivněných buněk (Liu et al., 2017). Taktéž autoři studie Tanaka et al. 2019 na myších hypothalamických neuronálních buňkách GT1-7 po působení 25 μM ZnCl_2 nezaznamenali žádné signifikantní změny hladiny ROS, což koreluje s námi naměřenou stálou hladinou GSH.

Dále jsme se v rámci našeho testování zaměřili na stav dehydrogenázové aktivity buněk SH-SY5Y po ovlivnění ZnCl_2 . Zde jsme zaznamenali mírné zvýšení po 6hodinové inkubaci s 25 a 100 μM ZnCl_2 . Ostatní hodnoty se jak po 6hodinové, tak po 24hodinové inkubaci pohybovaly srovnatelně s hodnotami kontrolních buněk. Ve studii buněčné toxicity zinku byl pomocí testu MTT stanoven vliv rozmezí 100-1000 μM ZnCl_2 na buňky SH-SY5Y po 24hodinové inkubaci. Výsledkem bylo zjištění, že 100 μM ZnCl_2 zachovává dehydrogenázovou aktivitu srovnatelnou s neovlivněnými buňkami, zatímco koncentrace nad 250 μM ZnCl_2 způsobují postupný pokles závislý na koncentraci (Lee, 2018). Na vliv ZnCl_2 na dehydrogenázovou aktivitu buněk SH-SY5Y byla zaměřena také další studie, kde byly použity buňky SH-SY5Y diferencované kyselinou *all-trans* retinovou a test WST-8. Buňky byly v intervalech 2-24 hod inkubovány s 61,4; 122,9; 245,7; 491,5 a 737,2 μM ZnCl_2 . Zde autoři pozorovali pokles dehydrogenázové aktivity závislý na koncentraci a čase. Po 2 hod došlo k signifikantnímu poklesu dehydrogenázové aktivity již u koncentrace 245,7 μM ZnCl_2 . Koncentrace 122,9 μM ZnCl_2 způsobila po 6 hod mírný pokles, který se prohloubil po 24 hod

ovlivnění. Buňky ovlivněné 61,4 μM ZnCl_2 vykazovaly i po 24 hod dehydrogenázovou aktivitu srovnatelnou s neovlivněnými buňkami (Liu et al., 2017). Tato zjištění korelují s našimi výsledky. Podobně i další studie, kde byly v testu MTT využity buňky PC12, ukazuje, že 50 a 100 μM ZnCl_2 po 24 hod nezpůsobuje žádné signifikantní změny dehydrogenázové aktivity (Pavlica et al., 2009). Oproti předchozím pracím má odlišné výsledky studie Tanaka et al. 2019. Zde byla dehydrogenázová aktivita buněk GT1-7 stanovena pomocí testu WST-8. 24hodinová inkubace s 10 a 20 μM ZnCl_2 nezpůsobila žádné změny. Koncentrace 30, 40, 50 a 60 μM ZnCl_2 potom vedly k poklesu aktivity dehydrogenáz závislému na koncentraci (Tanaka et al. 2019). Je možné, že se výsledky mohou lišit v závislosti na použité buněčné linii.

Kadmium je vysoce toxický neesenciální těžký kov, jehož sloučeniny jsou ve srovnání s jinými kovy více rozpustné ve vodě. Biologická dostupnost sloučenin kadmia je velmi vysoká, a proto má kadmium sklon k bioakumulaci (Jaishankar et al., 2014). Toxicita kadmia zahrnuje množství mechanismů. Nejčastějším cílem tohoto těžkého kovu jsou thiolové skupiny proteinů, jejichž inaktivace může vést k poruše funkce jádra, endoplazmatického retikula a mitochondrií. V souvislosti s toxicitou kadmia může dojít k zablokování dýchacího řetězce a narušení tvorby ATP. V mitochondriích také ovlivňuje permeabilitu a potenciál mitochondriální membrány, což může vést k uvolnění cytochromu c a aktivaci apoptózy. Kromě apoptózy je kadmium schopno indukovat také nekrózu. Nejvýznamnějším mechanismem toxicity kadmia je indukce oxidačního stresu. Kadmium inhibuje aktivitu superoxiddismutázy a glutathionperoxidázy, čímž zvyšuje hladinu ROS. Také reaguje s antioxidantními molekulami jako je glutathion (Cannino et al., 2009; Genchi et al., 2020). ROS tvořící se v důsledku intoxikace kadmíem mohou přímo oxidovat lipidy, proteiny a nukleové kyseliny, měnit jejich funkce a aktivovat související signální dráhy, což může vést k buněčné smrti (Rahimzadeh et al., 2017).

Jelikož je známo, že kadmium reaguje s glutathionem, rozhodli jsme se s využitím monochlorobimánů stanovit intracelulární koncentraci tohoto antioxidantu v buňkách SH-SY5Y. Po 6hodinovém působení 25 μM CdCl_2 jsme detekovali překvapivé významné zvýšení hladiny GSH na $116 \pm 8 \%$. Po 24hodinové inkubaci s 5, 25 a 50 μM CdCl_2 jsme pozorovali překvapivé signifikantní zvýšení koncentrace GSH. Nejvyšší zvýšení jsme naměřili po ovlivnění 25 μM CdCl_2 , a to na $147 \pm 11 \%$. Zajímavé zjištění přinesla studie, kde bylo detekováno kadmíem indukované zvýšení koncentrace celkového glutathionu. Po 24hodinovém ovlivnění buněk SH-SY5Y koncentracemi 10 a 20 μM CdCl_2 byl spektrofotometrickou metodou naměřen nárůst celkového glutathionu dokonce na více

než dvojnásobek ve srovnání s kontrolními buňkami. Tento výsledek byl zdůvodněn tím, že při oxidačním stresu, který je vyvolán působením kadmia, dochází ke zvýšení spotřeby glutaminu, což vede ke zvýšené produkci glutamátu. Také dochází ke zvýšení glykolytických pochodů, při kterých vzniká větší množství glykolytických meziproductů, ze kterých mohou být vytvořeny glycin a cystein. Obranným mechanismem buněk proti oxidačnímu stresu může být tedy zvýšená syntéza glutathionu z glutamátu, glycinu a cysteinu, což může vysvětlovat nárůst jeho intracelulární hladiny. Autoři také po ovlivnění danými toxickými látkami sledovali změnu poměru oxidovaného a redukovaného glutathionu, kdy po ovlivnění 10 i 20 μM CdCl_2 došlo k nárůstu oxidované a poklesu redukované formy, což svědčí o reakci buněk na oxidační stres využitím redukovaného glutathionu. Zvýšení oxidovaného a snížení redukovaného glutathionu ale nezměnilo tento poměr natolik, aby v buňce převládala oxidovaná forma. Tudíž ačkoliv dochází k vyčerpávání redukovaného glutathionu, je možné, že díky zvýšení celkového glutathionu je intracelulární koncentrace redukované formy vyšší v porovnání s kontrolními neovlivněnými buňkami. Autoři ovšem toto přesně nedefinovali (Bovio et al., 2021).

Hladina glutathionu také může být ovlivněna množstvím reaktivních forem kyslíku, které se zvýšeně tvoří po intoxikaci kadmiiem. Zvýšení hladiny ROS po inkubaci buněk SH-SY5Y s CdCl_2 prokázalo několik studií. V publikaci, která se věnovala toxickému působení kadmia, bylo pozorováno zvýšení koncentrace ROS po 24hodinové inkubaci s 10 μM CdCl_2 jak s diferencovanými, tak s nediferencovanými buňkami SH-SY5Y (Branca et al., 2018). V jiné studii byl zaznamenán zajímavý fenomén. Po inkubaci buněk SH-SY5Y s koncentracemi 5, 10 a 20 μM CdCl_2 došlo se zvyšující se koncentrací k postupnému zvýšení hladiny ROS až nad hodnotu 200 % v porovnání s kontrolními buňkami, které značí 100 %. Působení koncentrací 40 a 80 μM CdCl_2 ale nevedlo k tak výraznému nárůstu hladiny ROS jako tomu bylo u nižších koncentrací a 120 μM CdCl_2 dokonce způsobilo pokles pod hodnotu kontrolních buněk. Autoři práce předpokládají, že koncentrace CdCl_2 nad 80 μM jsou natolik toxické, že mají za následek nekrotickou smrt, a tudíž neschopnost buněk reagovat tvorbou ROS. V této studii byla studována také tvorba ROS v závislosti na čase, kde bylo zjištěno, že po 4 hod působení CdCl_2 dochází k významnému nárůstu intracelulárních ROS (Chen et al., 2008). Existuje také další studie, kde byly studovány změny koncentrace ROS po intoxikaci kadmiiem. Zde byly buňky SH-SY5Y inkubovány 6, 12 a 24 hod s 25 μM CdCl_2 a autoři zjistili, že se zvyšující se dobou inkubace s toxickou látkou se zvyšuje také hladina intracelulárních ROS (Kim et al., 2013). Proti zmíněným studiím ale vypovídají výsledky výzkumu, kde byly porovnány toxické účinky kadmia a rtuti na buňky SH-SY5Y. Zde byly

experimenty prováděny v prostředí bez fetálního bovinního séra a po 24hodinové expozici 10 μM CdCl_2 nebylo pozorováno žádné zvýšení ROS (Sudo et al., 2019).

V závislosti na zjištěných změnách koncentrace glutathionu v buňkách jsme se rozhodli stanovit také viabilitu, resp. dehydrogenázovou aktivitu buněk pomocí WST-1 testu. Zde jsme po 24 hod sledovali nárůst viability u koncentrací 5, 25 a 50 μM CdCl_2 , což koreluje s námi detekovaným zvýšením hladiny glutathionu. Sudo et al. 2019 využili test WST-8, pomocí kterého stanovili v prostředí bez fetálního bovinního séra dehydrogenázovou aktivitu buněk SH-SY5Y ovlivněných CdCl_2 . Ve výsledcích této studie je patrný nárůst dehydrogenázové aktivity po 24hodinové inkubaci s 1 a 3 μM CdCl_2 , ale autoři ho nijak nekomentují. Tento nárůst je následován poklesem u koncentrací 10 a 30 μM CdCl_2 (Sudo et al., 2019). Další studie zabývající se toxicitou kadmia zaznamenaly, že viabilita buněk SH-SY5Y se po působení CdCl_2 snižuje se zvyšující se koncentrací (Bovio et al, 2021; Branca et al., 2018; Wang et al., 2022). Branca et al. 2018 studovali vliv koncentrací CdCl_2 v rozmezí 10-100 μM na viabilitu diferencovaných a nediferencovaných buněk SH-SY5Y pomocí testu MTT. Experimenty tito autoři prováděli v prostředí bez fetálního bovinního séra a zjistili, že viabilita po 24hodinové inkubaci s CdCl_2 klesá se zvyšující se koncentrací toxické látky jak u diferencovaných, tak u nediferencovaných buněk. Buňky diferencované kyselinou *all-trans* retinovou jsou ovšem vůči CdCl_2 méně citlivé, protože zde byl pokles menší v porovnání s nediferencovanými buňkami SH-SY5Y (Branca et al., 2018). Ve studii zaměřené na porovnání vlivu CdCl_2 na buněčné linie SH-SY5Y a PC12 byla viabilita buněk stanovena pomocí testu s trypanovou modří. U obou buněčných linií a koncentrací 10 a 20 μM CdCl_2 v časovém intervalu 24 hod autoři zaznamenali signifikantní snížení viability s výraznějším poklesem po působení 20 μM CdCl_2 (Zhang et al., 2017). S našimi výsledky zjištění z těchto studií příliš nekorelují. Je proto otázkou, zda odlišné podmínky kultivace, nasazení odlišné denzity buněk do jamek mikrotitrační destičky nebo použití jiného testu může být zdrojem těchto rozdílů.

V další části naší práce jsme sledovali změny buněčné morfologie v reálném čase s využitím přístroje Biostation. Ve studii Bovio et al. 2021 sledovali morfologii buněk SH-SY5Y pomocí obarvení buněk barvivem Giemsa. Pro experiment buňky inkubovali s 10 a 20 μM CdCl_2 po dobu 24 hod. Buňky ovlivněné 10 μM CdCl_2 nevykazovaly žádné výrazné změny ve své morfologii. Koncentrace 20 μM CdCl_2 způsobila snížení počtu životaschopných buněk a zvýšení počtu zaoblených buněk, což koreluje s našimi výsledky, kde jsme po 24 hod u 25 μM CdCl_2 sledovali zakulacení některých buněk a jejich oddělení od povrchu kultivační komůrky, na který byly původně přisedlé (Bovio et al., 2021).

Morfologické změny byly pozorovány také ve studii zaměřené na sledování vlivu CdCl_2 a s tím souvisejícím působením ROS na buňky SH-SY5Y a PC12. Se zvyšující se koncentrací v rozmezí 0-40 μM CdCl_2 byl zvýšen počet zakulacených a smršťených buněk u obou studovaných buněčných linií, což stejně jako předchozí studie potvrzuje naše pozorování (Chen et al., 2008). Odlišné výsledky poskytuje studie, kde byl pozorován vliv 1-3 μM CdCl_2 na diferencované buňky SH-SY5Y po dobu 48 hod. Při působení těchto koncentrací došlo k inhibici růstu neuritů a také zaoblení některých buněk v pozorovaném zorném poli. Rozdílný výsledek může být způsoben odlišnou dobou působení toxické látky, ale také rozdílem v diferenciaci pozorovaných buněk (Pak et al., 2014).

Dále jsme se rozhodli pozorovat změny buněčných organel po působení toxické látky prostřednictvím jejich fluorescenční vizualizace. Hlavními sledovanými organelami bylo jádro, které jsme vizualizovali pomocí sondy Hoechst 33258 a aktinová vlákna značená pomocí faloidinu-FITC. Po 24hodinové inkubaci s 25 μM CdCl_2 jsme zaznamenali mírné změny cytoskeletu a kondenzaci chromatinu u některých jader buněk SH-SY5Y. Ve studiích zaměřených na možnosti obrany před toxickým účinkem kadmia byla pro detekci fragmentace jaderné DNA využita sonda DAPI. Buňky SH-SY5Y a PC12 byly inkubovány s 10 a 20 μM CdCl_2 po dobu 24 hod. U obou buněčných linií a obou koncentrací byla detekována jaderná fragmentace a kondenzace (Xu et al., 2016; Zhang et al., 2017). Rozdílnost výsledků mikroskopického pozorování může být způsobena použitím rozdílné koncentrace fetálního bovinního séra, které podle některých studií může vést ke snížení dostupnosti kadmia pro buňky (Jiang et al., 2015). Tomu by odpovídal posun, kdy jsme při působení 25 μM CdCl_2 zaznamenali kondenzaci pouze u některých buněk, zatímco ve zmíněných studiích bylo po působení 20 μM CdCl_2 pozorováno větší množství fragmentovaných a kondenzovaných jader. Ve studii Jiang et al. 2015 použili autoři pro sledování nukleárních změn Annexin V, propidium jodid a Hoechst 33342. Působení 10 μM CdCl_2 po dobu 6 hod na primární myší cerebelární kortikální neurony způsobilo u některých buněk nukleární změny a změny plazmatické membrány typické pro časnou fázi apoptózy (Jiang et al., 2015). V naší práci jsme po 24hodinovém působení 100 μM CdCl_2 zaznamenali změny jádra, cytoskeletu i celých buněk SH-SY5Y. Dle tvorby výchlípek na membráně buněk SH-SY5Y lze uvažovat, že se jedná o tzv. bleby, které značí, že by zde mohla probíhat apoptotická buněčná smrt. O apoptóze vyvolané působením kadmia hovoří také několik dalších studií (Branca et al., 2018; Kim et al. 2013). Některé výzkumné práce ale po intoxikaci CdCl_2 zaznamenaly u buněk SH-SY5Y zároveň indukci apoptózy i nekrózy (Chen et al., 2008; Wang et al., 2014).

Rtut' se vyskytuje ve třech hlavních formách, a to jako kovový prvek nebo ve formě anorganických a organických sloučenin. Nervová tkáň je velmi citlivá na všechny tyto formy (Jaishankar et al., 2014). HgCl_2 způsobuje změnu v intracelulární homeostáze vápníku, která následně může vést k oxidačnímu stresu. Také indukuje apoptózu zprostředkovanou navýšením intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Dále zde dochází k peroxidaci lipidů, narušení antioxidačních systémů a zvýšení hladiny ROS, což také vede k oxidačnímu stresu. Oxidační stres vyvolaný těmito změnami redoxního stavu je příčinou smrti neuronů (Gassó et al., 2001).

Stejně jako tomu bylo u CdCl_2 , i u HgCl_2 jsme nejdříve stanovili intracelulární koncentraci GSH. Branco et al. 2017 ve své studii hodnotili vliv 1 a 5 μM HgCl_2 inkubovaných s buňkami SH-SY5Y po dobu 24 hod. Tyto koncentrace nezpůsobily téměř žádný pokles celkové hladiny glutathionu a poměr oxidované a redukované formy zůstal téměř stejný jako u kontrolních neovlivněných buněk (Branco et al., 2017). Můžeme tedy soudit, že se tyto výsledky shodují s našimi výsledky. Vliv HgCl_2 na buňky SH-SY5Y zkoumala také další studie. V této práci použili autoři rozmezí 20-120 $\mu\text{g/L}$ HgCl_2 a pomocí kapilární elektroforézy stanovili, že po 30minutové inkubaci dochází se zvyšující se koncentrací k většímu poklesu intracelulárního GSH. Také zjistili, že 50 $\mu\text{g/L}$ HgCl_2 v čase 0-30 min způsobuje pokles, ale v čase 1, 2 a 3 hod následuje zvýšení koncentrace GSH (Olivieri et al., 2000). Podobný trend jsme v našich experimentech zaznamenali u 25 μM HgCl_2 , kde prvních 6 hod došlo k poklesu hladiny GSH následované zvýšením po 24 a 48 hod. Také v jedné z aktuálních studií byly po inkubaci buněk s HgCl_2 pozorovány změny v koncentraci intracelulárního glutathionu. Došlo zde ke zvýšení hladiny GSH, ale také k nárůstu koncentrace GSSG. Pro tento experiment byly použity buňky PC12 ovlivněné koncentracemi 1 a 5 μM HgCl_2 po dobu 24 hod (Gang et al. 2020). Námi i dalšími autory pozorované zvýšení GSH může značit reakci a přípravu buňky na působení oxidačního stresu. Hladina GSH je v buňkách ovlivněna také přítomností ROS, kdy je GSH využíván pro antioxidační obranu. Ve studiích Jebbet et al. 2013 a Sudo et al. 2019 autoři sledovali zvýšení hladiny ROS u buněk SH-SY5Y po inkubaci HgCl_2 . Stejně tak Monroe and Halvorsen 2006 ve studii s buňkami lidského neuroblastomu BE(2)-C zaznamenali po inkubaci s HgCl_2 zvýšení oxidačního stresu a hladiny ROS.

Následně jsme studovali změny dehydrogenázové aktivity buněk SH-SY5Y po inkubaci s HgCl_2 . Zde jsme po 6 hod sledovali na koncentraci závislý pokles aktivity dehydrogenáz. Po 24 hod ale následovalo signifikantní zvýšení aktivity dehydrogenáz nad hodnoty kontrolních buněk u 25 a 50 μM HgCl_2 . Významný pokles aktivity dehydrogenáz způsobil HgCl_2 v koncentracích 100 a 200 μM . Tyto trendy u 6 i 24hodinového ovlivnění korelují s námi zaznamenanými hodnotami koncentrace GSH. Z výsledků studie Sudo et al. 2019 je

po 24hodinové inkubaci buněk SH-SY5Y s HgCl₂ patrný podobný trend, kdy autoři naměřili nárůst dehydrogenázové aktivity u koncentrací 1 a 3 μM HgCl₂ a signifikantní snížení dehydrogenázové aktivity po inkubaci s 30 μM HgCl₂. Tento jev ale není autory nijak vysvětlen (Sudo et al., 2019). V kratším časovém intervalu Jebbett et al. 2013 zaznamenali pomocí testu MTT pokles viability buněk SH-SY5Y po inkubaci trvající 5 hod až při koncentracích vyšších než 100 μM HgCl₂. To se od našich výsledků odlišuje, protože v naší práci jsme po 6 hod inkubace pozorovali pokles dehydrogenázové aktivity už u 25 μM HgCl₂. V jiné studii bylo detekováno, že s prodlužujícím se intervalem inkubace buněk SH-SY5Y s HgCl₂ se zvyšuje cytotoxicita tohoto těžkého kovu (Toimela and Tähti, 2004). Několik studií (Lohren et al. 2015; Monroe and Halvorsen, 2006; Olivieri et al. 2000) zaznamenalo pokles viability buněk po inkubaci s HgCl₂ závislý na koncentraci. Odlišnosti ve výsledcích mohly nastat v důsledku více faktorů, jak již bylo zmíněno v diskuzi výsledků CdCl₂.

Dalším krokem naší práce bylo pozorování morfologie buněk SH-SY5Y ovlivněných HgCl₂ v reálném čase po dobu 24 hod. Koncentrace 25 μM HgCl₂ po 4 hod způsobila zmenšování buněk a po 24 hod následovalo další zmenšování a oddělování některých buněk od povrchu kultivační komůrky, ve které byly kultivovány. Tuto koncentraci HgCl₂ použili také Xu et al. 2012, kteří ale na rozdíl od nás kultivovali kortikální potkaní neurony. 72hodinová inkubace s 25 μM HgCl₂ vedla u těchto buněk k poškození buněk a narušení tvorby nervových sítí. Ovlivněné buňky nebyly vůbec schopny vyvinout neurity, jako tomu bylo u kontrolních buněk (Xu et al., 2012). V práci zaměřené na apoptózu indukovanou působením HgCl₂ autoři ukázali, že po inkubaci buněk SH-SY5Y s 1 a 15 μM HgCl₂ po dobu 24 hod buňky ztrácejí svou původní morfologii. U některých buněk docházelo k buněčné smrti, ale některé buňky přežívaly (Toimela and Tähti, 2004). Další studie se zabývala vlivem koncentrací 2 a 5 μM HgCl₂ na buňky PC12 po 24 hod inkubace. U těchto nízkých koncentrací nebyly pozorovány žádné morfologické změny (Gang et al. 2020).

Fluorescenční vizualizace organel u 25 μM HgCl₂ odhalila narušení cytoskeletu a kondenzaci jádra některých buněk SH-SY5Y. 100 μM HgCl₂ zcela poškodilo cytoskelet i jádra buněk. Zde uvažujeme o možnosti nekrotické buněčné smrti, jelikož i podle záznamu morfologické analýzy v reálném čase při koncentraci 200 μM HgCl₂ dochází během prvních několika desítek minut k buněčné smrti a oddělení buněk od kultivačního povrchu. V jedné ze studií byla pro vizualizaci fragmentace jader lidských prekursorových neuronálních buněk LUHMES použita sonda DAPI. Buňky byly inkubovány 24 hod s 2,5 a 10 μM HgCl₂. Žádná z těchto koncentrací nezpůsobila fragmentaci jádra (Lohren et al., 2015). Tomuto zjištění odpovídají i naše výsledky, kdy jsme u 5 μM HgCl₂ nezaznamenali žádné výrazné změny

v jádrech a u 25 μM HgCl_2 jsme pozorovali několik jader kondenzovaných. Zajímavé výsledky poskytla studie Xu et al. 2012, kde po 24 hod inkubace potkaních kortikálních neuronů s 25 μM HgCl_2 došlo ke zmenšení neuronů, degradaci neuritů a narušení nervové sítě. Zde byla fluorescenčně značenou protilátkou vizualizována vlákna β -tubulinu a pomocí faloidin-rhodaminu byla značena vlákna F-aktinu. Po inkubaci s tímto těžkým kovem došlo ke ztrátě fluorescenční intenzity β -tubulinu. To značí, že HgCl_2 může způsobovat degeneraci β -tubulinu, ale také je možné, že pouze změní jeho konformaci, a tudíž dojde k inhibici vazby značených protilátek na cílová místa tohoto proteinu. U F-aktinu nenastala žádná výrazná změna, což koreluje s našimi výsledky (Xu et al., 2012). V několika studiích (Branco et al. 2017; Lohren et al. 2015; Sudo et al. 2019) autoři sledovali porušení plazmatické membrány a s tím spojený únik laktátdehydrogenázy, což je jeden z projevů nekrotické buněčné smrti. Zároveň ale v některých výzkumných pracích (Sudo et al. 2019; Toimela and Tähti 2004) autoři stanovili zvýšení aktivity kaspázy-3, která je apoptotickým efektorovým enzymem. Je tedy možné, že neurotoxicita rtuti zahrnuje oba typy buněčné smrti a typ buněčné smrti může také záviset na koncentraci HgCl_2 .

6. ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce byla testována neurotoxicita sloučenin CdCl_2 a HgCl_2 *in vitro* na buněčném modelu SH-SY5Y. V první řadě jsme optimalizovali denzitu buněk nasazovaných do 96-jamkových mikrotitračních destiček. Z testovaných denzit jsme jako nejvhodnější zvolili denzitu $20 \cdot 10^3$ buněk na jamku.

Pro charakterizaci toxicity vybraných sloučenin jsme nejdříve stanovili změnu koncentrace glutathionu po 6 a 24hodinové inkubaci buněk s širším rozmezím koncentrací 1-200 μM CdCl_2 , HgCl_2 nebo ZnCl_2 . Následně byla po inkubaci buněk se stejnými koncentracemi a ve stejných časových intervalech stanovena také dehydrogenázová aktivita. Z výsledků bylo patrné, že ZnCl_2 způsobuje významnější změny až při vysokých koncentracích jako je 100 a 200 μM ZnCl_2 . V souladu s předpoklady o netoxické roli ZnCl_2 jsme zjistili, že při nižších koncentracích ZnCl_2 nevykazuje srovnatelný cytotoxický účinek jako CdCl_2 a HgCl_2 . Proto jsme se dále zaměřili na CdCl_2 a HgCl_2 , které i při nižších koncentracích vykazovaly cytotoxické působení. Abychom získali podrobnější informace o závislosti hladiny glutathionu a dehydrogenázové aktivity buněk na čase inkubace s daným těžkým kovem, vybrali jsme koncentrace 25 a 100 μM CdCl_2 a HgCl_2 , u kterých jsme stanovili koncentraci glutathionu a dehydrogenázovou aktivitu nejen po 6 a 24 hod, ale také po 1, 2, 4 a 48 hod.

V další části práce jsme pomocí přístroje Biostation sledovali morfologické změny buněk po inkubaci s 25 a 200 μM CdCl_2 a HgCl_2 . Zde byl u obou použitých koncentrací HgCl_2 jasně viditelný dřívější nástup morfologických změn a dřívější oddělení buněk z povrchu kultivační komůrky oproti buňkám inkubovaným s CdCl_2 . Pro vizualizaci změn buněčného jádra a cytoskeletu jsme využili fluorescenční sondy a pozorování buněk ve fázovém kontrastu. Díky tomu jsme potvrdili předchozí naměřená data.

Závěrem můžeme říci, že ZnCl_2 během 24hodinové inkubace nezpůsobuje v rozmezí koncentrací 1-50 μM žádné významné změny. Dále jsme zjistili, že HgCl_2 se jeví jako výrazně toxičtější než CdCl_2 . Také jsme pozorovali zajímavý fenomén, kdy po inkubaci s HgCl_2 a CdCl_2 dochází přechodně ke zvýšení dehydrogenázové aktivity i koncentrace glutathionu v buňkách SH-SY5Y. Je možné, že se jedná o reakci buněk a jejich přípravu na zvýšený oxidační stres. S jistotou nelze bez dalších doplňujících bioanalytických testů prokázat, a proto je třeba tuto problematiku dále studovat.

7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Abdel Moneim, A. E. The neuroprotective effect of berberine in mercury-induced neurotoxicity in rats. *Metabolic Brain Disease*. **2015**, 30(4), 935-942. doi: 10.1007/s11011-015-9652-6.
2. Abo-Aziza, F. A. M. and Zaki A. A. The Impact of Confluence on Bone Marrow Mesenchymal Stem (BMMSC) Proliferation and Osteogenic Differentiation. *International Journal of Hematology Oncology and Stem Cell Research*. **2017**, 11(2), 121-132.
3. Atale, N., Gupta S., Yadav U. C. S., Rani V. Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *Journal of Microscopy*. **2014**, 255(1), 7-19. doi:10.1111/jmi.12133.
4. Bachhawat, A. K. and Yadav S. The glutathione cycle: Glutathione metabolism beyond the γ -glutamyl cycle. *IUBMB Life*. **2018**, 70(7), 585-592. doi:10.1002/iub.1756.
5. Bahmani, P., Schellenberger E., Klohs J., Steinbrink J., et al. Visualization of Cell Death in Mice with Focal Cerebral Ischemia using Fluorescent Annexin A5, Propidium Iodide, and Tunel Staining. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. **2011**, 31(5), 1311-1320. doi:10.1038/jcbfm.2010.233.
6. Bal-Price, A., Pistollato F., Sachana M., Bopp S. K., et al. Strategies to improve the regulatory assessment of developmental neurotoxicity (DNT) using in vitro methods. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2018**, 354, 7-18. doi:10.1016/j.taap.2018.02.008.
7. Becker, A. and Soliman K. F. A. The Role of Intracellular Glutathione in Inorganic Mercury-Induced Toxicity in Neuroblastoma Cells. *Neurochemical Research*. **2009**, 34(9), 1677-1684. doi:10.1007/s11064-009-9962-3.
8. Berridge, M. V., Herst P. M. and Tan A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*. **2005**, 11, 127-152. doi:10.1016/S1387-2656(05)11004-7.
9. Bertin, G. and Averbeck D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*. **2006**, 88(11), 1549-1559. doi:10.1016/j.biochi.2006.10.001.
10. Bommer, M. and Ward J. M. Micromolar colorimetric detection of 2-hydroxy ketones with the water-soluble tetrazolium WST-1. *Analytical Biochemistry*. **2016**, 493, 8-10. doi:10.1016/j.ab.2015.09.012.
11. Bonacker, D., Stoiber T., Wang M., Böhm K. J., et al. Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. *Archives of Toxicology*. **2004**, 78(10), 575-583, doi:10.1007/s00204-004-0578-8.
12. Bovio, F., Melchiorretto P., Forcella M., Fusi P., et al. Cadmium promotes glycolysis upregulation and glutamine dependency in human neuronal cells. *Neurochemistry International*. **2021**, 149. doi:10.1016/j.neuint.2021.105144.
13. Branca, J. J. V., Morucci G., Maresca M., Tenci B., et al. Selenium and zinc: Two key players against cadmium-induced neuronal toxicity. *Toxicology in Vitro*. **2018**, 48, 159-169. doi:10.1016/j.tiv.2018.01.007.

14. Branca, J. J. V., Maresca M., Morucci G., Mello T., et al. Effects of Cadmium on ZO-1 Tight Junction Integrity of the Blood Brain Barrier. *International Journal of Molecular Sciences*. **2019**, 20(23). doi:10.3390/ijms20236010.
15. Branco, V., Coppo L., Solá S., Lu J., et al. Impaired cross-talk between the thioredoxin and glutathione systems is related to ASK-1 mediated apoptosis in neuronal cells exposed to mercury. *Redox Biology*. **2017**, 5(13), 278-287 doi:10.1016/j.redox.2017.05.024.
16. Bridges, Ch. C. and Zalups R. K. Mechanisms involved in the transport of mercuric ions in target tissues. *Archives of Toxicology*. **2017**, 91(1), 63-81. doi:10.1007/s00204-016-1803-y.
17. Camera, E. and Picardo M. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *Journal of Chromatography B*. **2002**, 781(1-2), 181-206, doi:10.1016/S1570-0232(02)00618-9.
18. Cannino, G., Ferruggia E., Luparello C. and Rinaldi A. M. Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion*. **2009**, 9(6), 377-384, doi:10.1016/j.mito.2009.08.009.
19. Čapek, J., Hauschke M., Brůčková L. and Roušar T. Comparison of glutathione levels measured using optimized monochlorobimane assay with those from ortho-phthalaldehyde assay in intact cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. **2017**, 25(88), 40-45. doi:10.1016/j.vascn.2017.06.001.
20. Chakraborty, D., Jain Ch. K., Maity A., Ghosh S., et al. Chenopodium album metabolites act as dual topoisomerase inhibitors and induce apoptosis in the MCF7 cell line. *MedChemComm*. **2016**, 7(5), 837-844. doi:10.1039/C5MD00502G.
21. Chamchoy, K., Pakotiprapha D., Pumirat P. and Leartsakulpanich U. Application of WST-8 based colorimetric NAD(P)H detection for quantitative dehydrogenase assays. *BMC Biochemistry*. **2019**, 20(1), doi:10.1186/s12858-019-0108-1.
22. Chan, L. L., Kuksin D., Laverty D. J., Saldi S., et al. Morphological observation and analysis using automated image cytometry for the comparison of trypan blue and fluorescence-based viability detection method. *Cytotechnology*. **2015**, 67(3), 461-473. doi:10.1007/s10616-014-9704-5.
23. Chazotte, B. Labeling Nuclear DNA with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*. **2011a**, 6(1), 83-85. doi:10.1101/pdb.prot087205.
24. Chazotte, B. Labeling Nuclear DNA Using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols*. **2011b**, 6(1), 80-83. doi:10.1101/pdb.prot5556.
25. Chen, C.-J. and Liao S.-L. Neurotrophic and neurotoxic effects of zinc on neonatal cortical neurons. *Neurochemistry International*. **2003**, 42(6), 471-479. doi:10.1016/S0197-0186(02)00154-7.
26. Chen, L., L. Liu and S. Huang. Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2A and 5. *Free Radical Biology and Medicine*. **2008**, 45(7), 1035-1044. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.07.011.
27. Cheung, Y.-T., Lau W. K.-W., Yu M.-S., Lai C. S.-W., 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. doi:10.1016/j.neuro.2008.11.001.

28. Circu, M. L. and Aw T. Y. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. **2012**, 1823(10), 1767-1777. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.06.019.
29. Coleman, A. W., M. J. Maguire and J. R. Coleman. Mithramycin- and 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-DNA staining for fluorescence microspectrophotometric measurement of DNA in nuclei, plastids, and virus particles. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **1981**, 29(8), 959-968. doi:10.1177/29.8.6168681.
30. Cordelli, E., Bignami M. and Pacchierotti F. Comet assay: a versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research*. **2021**, 10(1), 68-78. doi:10.1093/toxres/tfaa093.
31. D'Arcy, M. S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*. **2019**, 43(6), 582-592. doi:10.1002/cbin.11137.
32. Darzynkiewicz, Z., Pozarowski P., Lee B. W. and Johnson G. L. Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspases: Convenient In Vitro and In Vivo Markers of Apoptotic Cells for Cytometric Analysis. *Methods In Molecular Biology*. **2011**, 682, 103-114. doi:10.1007/978-1-60327-409-8_9.
33. Dębski, D., Smulik R., Zielonka J., Michałowski B., et al. Mechanism of oxidative conversion of Amplex® Red to resorufin: Pulse radiolysis and enzymatic studies. *Free Radical Biology and Medicine*. **2016**, 95, 323-332. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.027.
34. Du, L., Mahdi F., Jekabsons M. B., Nagle D. G., et al. Mammaea E/BB, an Isoprenylated Dihydroxycoumarin Protonophore That Potently Uncouples Mitochondrial Electron Transport, Disrupts Hypoxic Signaling in Tumor Cells. *Journal of Natural Products*. **2010**, 73(11), 1868-1872. doi:10.1021/np100501n.
35. Du, L., Mahdi F., Datta S., Jekabsons M. B., et al. Structures and Mechanisms of Antitumor Agents: Xestoquinones Uncouple Cellular Respiration and Disrupt HIF Signaling in Human Breast Tumor Cells. *Journal of Natural Products*. **2012**, 75(9), 1553-1559. doi:10.1021/np3002892.
36. Elkhadragy, M. F., Kassab R. B., Metwally D., Almeer R.S., et al. Protective effects of *Fragaria ananassa* methanolic extract in a rat model of cadmium chloride-induced neurotoxicity. *Bioscience Reports*. **2018**, 38(6). doi:10.1042/BSR20180861.
37. Forman, H. J., Zhang H. and Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*. **2009**, 30(1-2), 1-12. doi:10.1016/j.mam.2008.08.006
38. Fotakis, G. and Timbrell J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*. **2006**, 160(2), 171-177. doi:10.1016/j.toxlet.2005.07.001.
39. Funk, D., Schrenk H. and Frei E. Serum albumin leads to false-positive results in the XTT and the MTT assay. *BioTechniques*. **2007**, 43(2), 178-186. doi:10.2144/000112528
40. Ganga Reddy, V., Srinivasa Reddy T., Lakshma Nayak V., Prasad B., et al. Design, synthesis and biological evaluation of N -((1-benzyl-1 H -1,2,3-triazol-4-yl)methyl)-1,3-diphenyl-1 H -pyrazole-4-carboxamides as CDK1/Cdc2 inhibitors. *European*

- Journal of Medicinal Chemistry.* **2016**, 122, 164-177. doi:10.1016/j.ejmech.2016.06.011.
41. Gassó, S., Cristòfol R. M., Selema G., Rosa R., et al. Antioxidant compounds and Ca²⁺ pathway blockers differentially protect against methylmercury and mercuric chloride neurotoxicity. *Journal of Neuroscience Research.* **2016**, 6(1), 135-145. doi:10.1002/jnr.1205.
 42. Genchi, G., Sinicropi M. S., Lauria G., Carocci A., et al. The Effects of Cadmium Toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* **2020**, 17(11). doi:10.3390/ijerph17113782.
 43. Gichner, T., Mukherjee A. and Velemínský J. DNA staining with the fluorochromes EtBr, DAPI and YOYO-1 in the comet assay with tobacco plants after treatment with ethyl methanesulphonate, hyperthermia and DNase-I. *Mutation Research.* **2006**, 605(1-2), 17-21. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.01.005.
 44. Gooyit, M., Tricoche N., Lustigman S. and Janda K. D. Dual Protonophore–Chitinase Inhibitors Dramatically Affect *O. volvulus* Molting. *Journal of Medicinal Chemistry.* **2014**, 57(13). doi:10.1021/jm5006435.
 45. Grabarek, J., Amstad P. and Darzynkiewicz Z. Use of Fluorescently Labeled Caspase Inhibitors as Affinity Labels to Detect Activated Caspases. *Human Cell.* **2002**, 15(1), 1-12. doi:10.1111/j.1749-0774.2002.tb00094.x.
 46. Gyori, B. M., Venkatachalam G., Thiagarajan P.S., Hsu D., et al. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology.* **2014**, 2, 457-465. doi:10.1016/j.redox.2013.12.020.
 47. Heo, J., Meng F., Sachs F. and Hua S. Z. Dynamic Effects of Hg²⁺-induced Changes in Cell Volume. *Cell Biochemistry and Biophysics.* **2008**, 51(1), 21-32. doi:10.1007/s12013-008-9010-y.
 48. Huang, X.-Ch., Jin L., Wang M., Liang D., et al. Design, synthesis and in vitro evaluation of novel dehydroabiatic acid derivatives containing a dipeptide moiety as potential anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry.* **2015**, 89, 370-385. doi:10.1016/j.ejmech.2014.10.060.
 49. Huang, X.-Ch., Wang M., Pan Y.-M., Yao G.-Y., et al. Synthesis and antitumor activities of novel thiourea α -aminophosphonates from dehydroabiatic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry.* **2013**, 69, 508-520. doi:10.1016/j.ejmech.2013.08.055.
 50. Hug, H., Los M., Hirt W. and Debatin K.-M. Rhodamine 110-Linked Amino Acids and Peptides as Substrates To Measure Caspase Activity upon Apoptosis Induction in Intact Cells. *Biochemistry.* **1999**, 38(42), 13906-13911. doi:10.1021/bi9913395.
 51. Ijomone, O. M., Ijomone O. K., Iroegbu J. D. and Ifenatuoha Ch. W. Epigenetic influence of environmentally neurotoxic metals. *NeuroToxicology.* **2020**, 81, 51-65. doi:10.1016/j.neuro.2020.08.005.
 52. Ishiyama, M. A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta.* **1997**, 44(7), 1299-1305. doi:10.1016/S0039-9140(97)00017-9.
 53. Jaishankar, M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew B. B., et al. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology.* **2014**, 7(2), 60-72. doi:10.2478/intox-2014-0009.

54. Jebbett, N. J., Hamilton J. W., Rand M. D. and Eckenstein F. Low level methylmercury enhances CNTF-evoked STAT3 signaling and glial differentiation in cultured cortical progenitor cells. *NeuroToxicology*. **2013**, 38, 91-100. doi:10.1016/j.neuro.2013.06.008.
55. Jeong, J.-J., Park N., Kwon Y.-J., Ye D.-J., et al. Role of Annexin A5 in Cisplatin-induced Toxicity in Renal Cells. *Journal of Biological Chemistry*. **2014**, 289(4), 2469-2481. doi:10.1074/jbc.M113.450163.
56. Jiang, J. H., Ge G., Gao K., Pang Y., et al. Calcium Signaling Involvement in Cadmium-Induced Astrocyte Cytotoxicity and Cell Death Through Activation of MAPK and PI3K/Akt Signaling Pathways. *Neurochemical Research*. **2015**, 40(9), 1929-1944. doi:10.1007/s11064-015-1686-y.
57. Kabakov, A. E. and Gabai V. L. Cell Death and Survival Assays. *Chaperones*. **2018**, 107-127. doi:10.1007/978-1-4939-7477-1_9.
58. Kamencic, H., Lyon A., Paterson P. G. and Juurlink B. H. J. Monochlorobimane Fluorometric Method to Measure Tissue Glutathione. *Analytical Biochemistry*. **2000**, 286(1), 35-37. doi:10.1006/abio.2000.4765.
59. Kand'ár, R. Stanovení glutathionu a glutathiondisulfidu v biologických vzorcích. *Chemické listy*. **2016**, 110(11), 754-760. ISSN 1213-7103.
60. Karakuzu, O., Cruz M., Liu Y. and Garsin D. Amplex Red Assay for Measuring Hydrogen Peroxide Production from *Caenorhabditis elegans*. *Bio-Protocol*. **2019**, 9(21). doi:10.21769/BioProtoc.3409.
61. Karri, V., Kumar V., Ramos D., Oliveira E., et al. An in vitro cytotoxic approach to assess the toxicity of heavy metals and their binary mixtures on hippocampal HT-22 cell line. *Toxicology Letters*. **2018**, 282, 25-36. doi:10.1016/j.toxlet.2017.10.002.
62. Kauffman, M., Kauffman M., Traore K. and Zhu H. MitoSOX-Based Flow Cytometry for Detecting Mitochondrial ROS. *Reactive Oxygen Species*. **2016**, 2(5), 361-370. doi:10.20455/ros.2016.865.
63. Kijima, M., Yamagishi H., Hara Y., Kasai M., et al. Histone H1 quantity determines the efficiency of chromatin condensation in both apoptotic and live cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2019**, 512(2), 202-207. doi:10.1016/j.bbrc.2019.03.030.
64. Kikuchi, T., Uchiyama E., Ukiya M., Tabata K., et al. Cytotoxic and Apoptosis-Inducing Activities of Triterpene Acids from *Poria cocos*. *Journal of Natural Products*. **2011**, 74(2), 137-144. doi:10.1021/np100402b.
65. Kim, G., Lee Y.-E. K., Xu H., Philbert M. A., et al. Nanoencapsulation Method for High Selectivity Sensing of Hydrogen Peroxide inside Live Cells. *Analytical Chemistry*. **2010**, 82(6), 2165-2169. doi:10.1021/ac9024544.
66. Kim, S., Cheon H.-S., Kim S.-Y., Juhn Y.-S., et al. Cadmium induces neuronal cell death through reactive oxygen species activated by GADD153. *BMC Cell Biology*. **2013**, 14(1). doi:10.1186/1471-2121-14-4.
67. Korecka, J. A., Van Kesteren R. E., Blaas E., Spitzer S. O., et al. Phenotypic Characterization of Retinoic Acid Differentiated SH-SY5Y Cells by Transcriptional Profiling. *Plos One*. **2013**, 8(5). doi:10.1371/journal.pone.0063862.

68. Kupcho, K., Shultz J., Hurst R., Hartnett J., et al. A real-time, bioluminescent annexin V assay for the assessment of apoptosis. *Apoptosis*. **2019**, 24(1-2), 184-197. doi:10.1007/s10495-018-1502-7.
69. Lambert, E., Kille P. and Swaminathan R. Cloning and sequencing a novel metallothionein I isoform expressed in human reticulocytes. *FEBS Lett*. **1996**, 389(2), 210-212. doi:10.1016/0014-5793(96)00587-X.
70. Ledoux, Q., Veys P., Van Cutsem P., Mauro S., et al. Validation of the boronate sensor ContPY1 as a specific probe for fluorescent detection of hydrogen peroxide in plants. *Plant Signaling & Behavior*. **2014**, 8(11). doi:10.4161/psb.26827.
71. Lee, S. R. Cellular toxicity of zinc can be attenuated by sodium hydrogen sulfide in neuronal SH-SY5Y cell. *Molecular & Cellular Toxicology*. **2018**, 14(4), 425-436 [cit. 2022-04-30]. ISSN 1738-642X. Dostupné z: doi:10.1007/s13273-018-0047-8
72. Leontieva, O. V. and Blagosklonny M. V. Gerosuppression in confluent cells. *Aging*. **2014**, 6(12), 1010-1018. doi:10.18632/aging.100714.
73. Lim, H. J., Park J. H., Jo Ch., Yoon K., et al. Cigarette smoke extracts and cadmium induce COX-2 expression through γ -secretase-mediated p38 MAPK activation in C6 astroglia cells. *Plos One*. **2019**, 14(2). doi:10.1371/journal.pone.0212749.
74. Liu, J., Kang Y., Yin S., Song B., et al. Zinc oxide nanoparticles induce toxic responses in human neuroblastoma SHSY5Y cells in a size-dependent manner. *International Journal of Nanomedicine*. **2017**, 12, 8085-8099. doi:10.2147/IJN.S149070.
75. Liu, M.-Ch., Yang S.-J., Jin L.-H. and Hu D.-Y. Synthesis and cytotoxicity of novel ursolic acid derivatives containing an acyl piperazine moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2012**, 58, 128-135. doi:10.1016/j.ejmech.2012.08.048.
76. Lohren, H., Blagojevic L., Fitkau R., Ebert F., et al. Toxicity of organic and inorganic mercury species in differentiated human neurons and human astrocytes. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. **2015**, 29(32), 200-208. doi:10.1016/j.jtemb.2015.06.008.
77. Lu, Ch., Zhu F., Cho Y.-Y., Tang F., et al. Cell Apoptosis: Requirement of H2AX in DNA Ladder Formation, but Not for the Activation of Caspase-3. *Molecular Cell*. **2006**, 23(1), 121-132. doi:10.1016/j.molcel.2006.05.023.
78. Lu, J., Jin T., Nordberg G. and Nordberg M. Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes and renal dysfunction in a population environmentally exposed to cadmium. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2005**, 206(2), 150-156. doi:10.1016/j.taap.2004.12.015.
79. Lu, S. C. Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2013, 1830(5), 3143-3153. doi:10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
80. Majtnerová, P. and Roušar T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports*. **2018**, 45(5), 1469-1478. doi:10.1007/s11033-018-4258-9.
81. Majtnerová, P., Čapek J., Petira F., Handl J., et al. Quantitative spectrofluorometric assay detecting nuclear condensation and fragmentation in intact cells. *Scientific Reports*. **2021**, 11(1). doi:10.1038/s41598-021-91380-3.
82. Martin, R. M., Leonhardt H. and Cardoso M. C. DNA labeling in living cells. *Cytometry Part A*. 2005, 67(1), 45-52. doi:10.1002/cyto.a.20172.

83. Martinez, M. M., Reif R. D. and Pappas D. Early detection of apoptosis in living cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2010**, 396(3), 1177-1185. doi:10.1007/s00216-009-3298-3.
84. Mazloom-Farsibaf, H., Farzam F., Fazel M., Wester M. J., et al. Comparing lifeact and phalloidin for super-resolution imaging of actin in fixed cells. *Plos One*. **2021**, 16(1). doi:10.1371/journal.pone.0246138.
85. Mirzayans, R. and Murray D. Do TUNEL and Other Apoptosis Assays Detect Cell Death in Preclinical Studies?. *International Journal of Molecular Sciences*. **2020**; 21(23), doi:10.3390/ijms21239090.
86. Misra, U. K., Gawdi G. and Pizzo S. V. Induction of mitogenic signalling in the 1LN prostate cell line on exposure to submicromolar concentrations of cadmium⁺. *Cellular Signalling*. **2003**; 15(11), 1059-1070. doi:10.1016/S0898-6568(03)00117-7.
87. Mizuta, R., Araki S., Furukawa M., Furukawa Y., et al. DNase γ Is the Effector Endonuclease for Internucleosomal DNA Fragmentation in Necrosis. *Plos One*. **2013**, 8(12). doi:10.1371/journal.pone.0080223.
88. Møller, P., Azqueta A., Boutet-Robinet E., Koppen G., et al. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nature Protocols*. **2020**, 15(12). doi:10.1038/s41596-020-0398-1.
89. Monroe, R. K. and Halvorsen S. W. Mercury Abolishes Neurotrophic Factor-Stimulated Jak-STAT Signaling in Nerve Cells by Oxidative Stress. *Toxicological Sciences*. **2006**, 94(1), 129-138. doi:10.1093/toxsci/kfl073.
90. Mourón, S. A., Grillo C. A., Dulout F. N. a Golijow C. D. A comparative investigation of DNA strand breaks, sister chromatid exchanges and K-ras gene mutations induced by cadmium salts in cultured human cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **2004**, 568(2), 221-231. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.08.012.
91. Mukhopadhyay, P., Rajesh M., Yoshihiro K., Haskó G., et al. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2007**, 358(1), 203-208. doi:10.1016/j.bbrc.2007.04.106.
92. Muruzabal, D., Sanz-Serrano J., Sauvaigo S., Treillard B., et al. Validation of the in vitro comet assay for DNA cross-links and altered bases detection. *Archives of Toxicology*. **2021**, 95(8), 2825-2838. doi:10.1007/s00204-021-03102-3.
93. Nagarsenkar, A., Guntuku L., Guggilapu S. D., Gannoju S., et al. Synthesis and apoptosis inducing studies of triazole linked 3-benzylidene isatin derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2016**, 124, 782-793. doi:10.1016/j.ejmech.2016.09.009.
94. Oestreicher, J. and Morgan B. Glutathione: subcellular distribution and membrane transport. *Biochemistry and Cell Biology*. **2019**, 97(3), 270-289. doi:10.1139/bcb-2018-0189.
95. Olivieri, G., Brack Ch., Müller-Spahn F., Stähelin H. B., et a. Mercury Induces Cell Cytotoxicity and Oxidative Stress and Increases β -Amyloid Secretion and Tau

- Phosphorylation in SHSY5Y Neuroblastoma Cells. *Journal of Neurochemistry*. **2000**, 74(1), 231-236. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0740231.x.
96. Pak, E. J., Son G. D. and Yoo B. S. Cadmium Inhibits Neurite Outgrowth in Differentiating Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *International Journal of Toxicology*. **2014**, 33(5), 412-418. doi:10.1177/1091581814550338.
 97. Paoletti, P., Vergnano A.M., Barbour B. and Casado M. Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience*. **2009**, 158(1), 126-136. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.061.
 98. Parhamifar, L., Andersen H. and Moghimi S. M. Lactate Dehydrogenase Assay for Assessment of Polycation Cytotoxicity. *Nanotechnology for Nucleic Acid Delivery*. **2013**, 13-22. doi:10.1007/978-1-62703-140-0_2.
 99. Pastore, A., Federici G., Bertini E. and Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*. **2003**, 333(1), 19-39. doi:10.1016/S0009-8981(03)00200-6.
 100. Pavlica, S., Gaunitz F. and Gebhardt R. Comparative in vitro toxicity of seven zinc-salts towards neuronal PC12 cells. *Toxicology in Vitro*. **2009**, 23(4), 653-659. doi:10.1016/j.tiv.2009.03.003.
 101. Piccinini, F., Tesei A., Arienti C. and Bevilacqua A. Cell Counting and Viability Assessment of 2D and 3D Cell Cultures: Expected Reliability of the Trypan Blue Assay. *Biological Procedures Online*. **2017**, 19(1). doi:10.1186/s12575-017-0056-3.
 102. Polster, B. M., Nicholls D. G., Ge S. X. and Roelofs B. A. Use of Potentiometric Fluorophores in the Measurement of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Mitochondrial Function*. **2014**, 547, 225-250. doi:10.1016/B978-0-12-801415-8.00013-8.
 103. Rahimzadeh, M. R., Rahimzadeh M. R., Kazemi S. and Moghadamnia A. Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian Journal of Internal Medicine*. **2017**, 8(3), 135-145. doi: 10.22088/cjim.8.3.135.
 104. Rahman, M. T., Vandingenen A. and De Ley M. Metallothionein biosynthesis in human RBC precursors. *Cellular Physiology and Biochemistry*. **2000**, 10(4), 237-242. doi:10.1159/000016355.
 105. Rahman, Z. and Singh V. P. The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environmental Monitoring and Assessment*. **2019**, 191(7), 1-21. doi:10.1007/s10661-019-7528-7.
 106. Reis, A. L. M., Deveson I. W., Wong T., Madala B. S., et al. A universal and independent synthetic DNA ladder for the quantitative measurement of genomic features. *Nature Communications*. **2020**, 11(1), 1-11. doi:10.1038/s41467-020-17445-5.
 107. Risher, J. F. and Tucker P. Alkyl Mercury-Induced Toxicity: Multiple Mechanisms of Action. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 240*. **2017**, 105-149. doi:10.1007/398_2016_1.
 108. Riss, T. L., Moravec R. A., Niles A. L., Duellman S., et al., **2013**. Cell Viability Assays. *Assay Guidance manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences Bethesda (MD), s. 351-375.

109. Roelofs, B. A., Ge S. X., Studlack P. E. and Polster B. M. Low micromolar concentrations of the superoxide probe MitoSOX uncouple neural mitochondria and inhibit complex IV. *Free Radical Biology and Medicine*. **2015**, 86, 250-258. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.032.
110. Roušar, T., Kučera O., Lotková H. and Červinková Z. Assessment of reduced glutathione: Comparison of an optimized fluorometric assay with enzymatic recycling method. *Analytical Biochemistry*. **2012**, 423(2), 236-240. doi:10.1016/j.ab.2012.01.030.
111. Sall, M. L., Diaw A. K. D., Gningue-Sall D. and Efremova S. Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review. *Environmental Science and Pollution Research*. **2020**, 27(24), 29927-29942. doi:10.1007/s11356-020-09354-3.
112. Sankhla, M. S., Sharma K. and Kumar R. Heavy Metal Causing Neurotoxicity in Human Health. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*. **2017**, 6(5), 7721-7726. doi:10.15680/IJIRSET.2017.0605054.
113. Sas-Nowosielska, H. and Pawlas N. Heavy metals in the cell nucleus - role in pathogenesis. *Acta Biochimica Polonica*. **2015**, 62(1), 7-13. doi:10.18388/abp.2014_834.
114. Sharma, R. K. and Agrawal M. Biological effects of heavy metals: an overview. *Journal of Environmental Biology*. **2005**, 26(2), 301-313.
115. Singh, R., Gautam N., Mishra A. and Gupta R. Heavy metals and living systems: An overview. *Indian Journal of Pharmacology*. **2011**, 43(3), 246–253. doi:10.4103/0253-7613.81505.
116. Small, J. V., Rottner K., Hahne P. and Anderson K. I. Visualising the actin cytoskeleton. *Microscopy Research and Technique*. **1999**, 47(1), 3-17. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19991001)47:1<3::AID-JEMT2>3.0.CO;2-2.
117. Smolewski, P., Bedner E., Du L., Hsieh T.-Ch., et al. Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: Multiparameter analysis by laser scanning cytometry. *Cytometry*. **2001**, 44(1), 73-82. doi:10.1002/1097-0320(20010501)44:1<73::AID-CYTO1084>3.0.CO;2-S.
118. Sreekanth, V., Bansal S., Motiani R. K., Kundu S., et al. Design, Synthesis, and Mechanistic Investigations of Bile Acid–Tamoxifen Conjugates for Breast Cancer Therapy. *Bioconjugate Chemistry*. **2013**, 24(9), 1468-1484. doi:10.1021/bc300664k.
119. Stevenson, D., Wokosin D., Girkin J. and Grant M. H. Measurement of the intracellular distribution of reduced glutathione in cultured rat hepatocytes using monochlorobimane and confocal laser scanning microscopy. *Toxicology in Vitro*. **2002**, 16(5), 609-619. doi:10.1016/S0887-2333(02)00042-5.
120. Stockert, J. C., Horobin R. W., Colombo L. L. and Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*. **2018**, 120(3), 159-167. doi:10.1016/j.acthis.2018.02.005.
121. Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*. **2015**, 111(1). doi:10.1002/0471142735.ima03bs111.

122. Sudo, K., Van Dao C., Miyamoto A. and Shiraishi M. Comparative analysis of in vitro/in vivo neurotoxicity of methylmercury, mercury, cadmium, and hydrogen peroxide on SH-SY5Y cells. *Journal of Veterinary Medical Science*. **2019**, 81(6), 828-837. doi:10.1292/jvms.19-0059.
123. Sugiura, T. and Nakamura H. Metallothionein in platelets. *International Archives of Allergy and Immunology*. **1994**, 103(4), 341-348. doi:10.1159/000236652.
124. Suman, S., Pandey A. and Chandna S. An improved non-enzymatic “DNA ladder assay” for more sensitive and early detection of apoptosis. *Cytotechnology*. **2012**, 64(1), 9-14. doi:10.1007/s10616-011-9395-0.
125. Tanaka, K.-I. and Kawahara M. Copper Enhances Zinc-Induced Neurotoxicity and the Endoplasmic Reticulum Stress Response in a Neuronal Model of Vascular Dementia. *Frontiers in Neuroscience*. **2017**. 11. doi:10.3389/fnins.2017.00058.
126. Tanaka, K.-I., Kasai M., Shimoda M., Shimizu A., et al. Nickel Enhances Zinc-Induced Neuronal Cell Death by Priming the Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2019**, 1-13. doi:10.1155/2019/9693726.
127. Toimela, T. and Tähti H. Mitochondrial viability and apoptosis induced by aluminum, mercuric mercury and methylmercury in cell lines of neural origin. *Archives of Toxicology*. **2004**, 78(10), 565-574. doi:10.1007/s00204-004-0575-y.
128. Van Tonder, A., Joubert A. M. and Cromarty A. D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Research Notes*. **2015**, 8(1). doi:10.1186/s13104-015-1000-8.
129. Vázquez, M., Vélez D., Devesa V. and Puig S. Participation of divalent cation transporter DMT1 in the uptake of inorganic mercury. *Toxicology*. **2015**, 45(331), 119-124. doi:10.1016/j.tox.2015.03.005.
130. Venable, P. W., Taylor T. G., Sciuto K. J. and Zhao J. Detection of mitochondrial depolarization/recovery during ischaemia-reperfusion using spectral properties of confocally recorded TMRM fluorescence. *The Journal of Physiology*. **2013**, 591(11), 2781-2794. doi:10.1113/jphysiol.2012.248153.
131. Wang, B. and Du Y. Cadmium and Its Neurotoxic Effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2013**, 1-12. doi:10.1155/2013/898034.
132. Wang, B., Xiao J.-L., Ling Y.-H., Meng X.-J., et al. BNIP3 Upregulation by ERK and JNK Mediates Cadmium-Induced Necrosis in Neuronal Cells. *Toxicological Sciences*. **2014**, 140(2), 393-402. doi:10.1093/toxsci/kfu091.
133. Wang, H., Sun S., Ren Y., et al. Selenite Ameliorates Cadmium-induced Cytotoxicity Through Downregulation of ROS Levels and Upregulation of Selenoprotein Thioredoxin Reductase 1 in SH-SY5Y Cells. *Biological Trace Element Research*. **2022**. doi:10.1007/s12011-022-03117-6.
134. Wang, Z.-Q., Liao J. and Diwu Z. N-DEVD-N'-morpholinecarbonyl-rhodamine 110: novel caspase-3 fluorogenic substrates for cell-based apoptosis assay. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **2005**, 15(9), 2335-2338. doi:10.1016/j.bmcl.2005.02.081.
135. Wätjen, W., Cox M., Biagioli M. and Beyersmann D. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: Mediation by caspase 9-activation. *BioMetals*. **2002**, 15(1), 15-25. doi:10.1023/A:1013141926228.

136. Xie, H.-R., Hu L.-S. and Li G.-Y. 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. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.08.021.
137. Xie, L., Dai Z., Pang Ch., Lin D., et al. Cellular glucose metabolism is essential for the reduction of cell-impermeable water-soluble tetrazolium (WST) dyes. *International Journal of Biological Sciences*. **2018**, 14(11), 1535-1544. doi:10.7150/ijbs.25629.
138. Xu, F., Farkas S., Kortbeek S., Zhang F.-X., et al. Mercury-induced toxicity of rat cortical neurons is mediated through N-methyl-D-Aspartate receptors. *Molecular Brain*. **2012**, 5(1), 1-14. doi:10.1186/1756-6606-5-30.
139. Yang, L., Zhang Y., Wang F. and Luo Z. Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere*. **2020**, 245, 1-35. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.125586.
140. Zalups, R. K. and Koropatnick J. Temporal Changes in Metallothionein Gene Transcription in Rat Kidney and Liver: Relationship to Content of Mercury and Metallothionein Protein. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **2000**, 295(1), 74-82.
141. Zhang, R., Huang M., Zhou M., Wen X., et al. Annexin A5-Functionalized Nanoparticle for Multimodal Imaging of Cell Death. *Molecular Imaging*. **2013**, 12(3), 182–190.
142. Zhang, R., Zhang N., Zhang H., Liu Ch., et al. Celastrol prevents cadmium-induced neuronal cell death by blocking reactive oxygen species-mediated mammalian target of rapamycin pathway. *British Journal of Pharmacology*. **2017**, 174(1), 82-100. doi:10.1111/bph.13655.
143. Zhang, R., Lu W., Wen X. and Huang M. Annexin A5–Conjugated Polymeric Micelles for Dual SPECT and Optical Detection of Apoptosis. *Journal of Nuclear Medicine*. **2011**, 52(6), 958-964. doi:10.2967/jnumed.110.083220.
144. Zheng, W., Aschner M. and Ghersi-Egea J.-F. Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **2003**, 192(1), 1-11. doi:10.1016/S0041-008X(03)00251-5.
145. Zhou, M., Diwu Z., Panchuk-Voloshina N. and Haugland R. P. A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases. *Analytical Biochemistry*. **1997**, 253(2), 162-168. doi:10.1006/abio.1997.2391.
146. Zhou, R., Zhao J., Li D. and Chen Y. Combined exposure of lead and cadmium leads to the aggravated neurotoxicity through regulating the expression of histone deacetylase 2. *Chemosphere*. **2020**, 252. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126589.