

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Biologie

Studijní obor:

Fyziologie živočichů



Bc. Michal Paluba

**Vliv morfinové prekondice a aktivity mKATP kanálu na přežití
diferencovaných buněk SH-SY5Y linie po působení oxidativního stresu**

**Effect of morphine preconditioning and mKATP channel activity on survival of
differentiated SH-SY5Y cell line after oxidative stress**

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Lucie Hejnová, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 8. 2022

Podpis

Poděkování:

Mé poděkování patří zejména mé školitelce RNDr. Lucii Hejnové, Ph.D., za její cenné rady, bezbřehou pomoc a vstřícné a laskavé vedení mé diplomové práce. Dále děkuji RNDr. Vladimíru Rudajevovi, Ph.D., že mě naučil kultivovat buňky, Mgr. Daniele Novákové za její osvětlení elektroforézy, Mgr. Ondřeji Honcovi za jeho vysvětlení a pomoc při průtokové cytometrii a také celému kolektivu naší laboratoře za ochotu kdykoliv s čímkoli poradit a za vytvoření příjemné přátelské atmosféry. V neposlední řadě bych rád poděkoval i své rodině a přátelům, kteří mi byli velkou oporou v průběhu celého mého magisterského studia.

Abstrakt

Morfin jakožto jedno z nejefektivnějších analgetik se v medicíně používá už více než století. Morfin je však znám i pro svůj neuroprotektivní a kardioprotektivní efekt při ischemických poruchách, kdy navozuje zvýšenou rezistenci buněk k oxidativnímu stresu. Jedním z cílů naší práce bylo analyzovat vliv chronického působení morfinu na viabilitu diferencovaných buněk neuroblastomové linie SH-SY5Y po vyvolání oxidativního stresu tert-butyldihydroperoxidem (tBHP). Podrobný mechanismus protektivního účinku morfinu není však dodnes znám. Současný výzkum zabývající tímto tématem, a hlavně morfinem indukovanou prekondicí, upírá velkou pozornost na mitochondriální ATP senzitivní draselné kanály (mKATP). Existují důkazy o tom, že morfin přes aktivaci opioidních receptorů imituje protektivní efekt ischemické prekondice právě skrz aktivaci mKATP kanálů. Modulace aktivity mKATP kanálu je podle všeho zodpovědná za funkční stav mitochondrie díky změně mitochondriálního membránového potenciálu a regulace produkce reaktivních forem kyslíku (ROS). Dalším cílem naší práce bylo tedy odhalit roli mKATP kanálů v morfinové prekondici a vliv jejich aktivity na přežití buněk. Posledním cílem práce bylo zkoumat vliv permeability mKATP kanálů na změny v produkci ROS a mitochondriální membránový potenciál, jakožto možných faktorů regulovaných mKATP kanály a ovlivňujících odolnost buněk k oxidativnímu stresu.

Výsledky naší práce prokázaly, že morfin má neuroprotektivní účinky proti oxidativnímu stresu vyvolaného tBHP. Nejvyššího protektivního účinku morfinu bylo dosaženo při jeho 1 mM koncentraci. V naší práci jsme však neprokázali vliv aktivity mKATP kanálů na přežití buněk po působení oxidativního stresu a ani vliv mKATP kanálů na produkci ROS a mitochondriální membránový potenciál.

Klíčová slova: morfin, morfinová prekondice, neuroprotektce, oxidativní stres, SH-SY5Y buňky, mKATP kanál

Abstract

As one of the most effective analgesics, morphine has been used in medicine for more than a century. However, morphine is also known for its neuroprotective and cardioprotective effect in ischemic disorders, where it induces increased cellular resistance to oxidative stress. One of the aims of our study was to analyze the effect of chronic morphine treatment on the viability of differentiated cells of the neuroblastoma cell line SH-SY5Y after induction of oxidative stress by tert-butylhydroperoxide (tBHP). However, the detailed mechanism of the protective effect of morphine is still unknown. Current research on this topic, and in particular on morphine-induced preconditioning, has focused much attention on mitochondrial ATP-sensitive potassium channels (mKATPs). There is evidence that morphine, through activation of opioid receptors, mimics the protective effect of ischemic preconditioning precisely through activation of mKATP channels. Modulation of mKATP channel activity is thought to be responsible for the functional state of the mitochondria by altering mitochondrial membrane potential and regulating reactive oxygen species (ROS) production. Thus, the next aim of our work was to reveal the role of mKATP channels in morphine preconditioning and the effect of their activity on cell survival. The last aim of this work was to investigate the influence of mKATP channel permeability on changes in ROS production and mitochondrial membrane potential as possible factors regulated by mKATP channels and affecting cellular resistance to oxidative stress.

Our results demonstrated that morphine has neuroprotective effects against tBHP-induced oxidative stress. The highest protective effect of morphine was achieved at its 1 mM concentration. However, our work did not demonstrate the effect of mKATP channel activity on cell survival after oxidative stress, nor did we demonstrate the effect of mKATP channels on ROS production and mitochondrial membrane potential.

Keywords: morphine, morphine preconditioning, neuroprotection, oxidative stress, SH-SY5Y cells, mKATP channel

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Seznam zkratk	8
1. Úvod.....	11
2. Literární přehled.....	12
2.1. Buněčná linie SH-SY5Y	12
2.2. Diferenciace SH-SY5Y	13
2.3. Oxidativní stres a tvorba ROS	14
2.4. Morfin – protektivní účinek a vliv na oxidativní stres.....	16
2.5. Morfin a jeho vliv na mitochondriální KATP kanál	19
3. Cíle práce	22
4. Materiál a metody	23
4.1. Kultivace a diferenciace buněčné kultury	23
4.2. Sklizení buněčné kultury.....	23
4.3. Stanovení koncentrace proteinů	24
4.4. SDS-PAGE elektroforéza	25
4.5. Western blot	26
4.6. Ovlivnění buněk.....	28
4.7. MTT test.....	29
4.8. Průtoková cytometrie	29
4.9. Statistická analýza.....	31
5. Výsledky	32
5.1. Diferenciace buněk SH-SY5Y	32
5.2. Vliv morfinu na viabilitu buněk po vyvolání oxidativního stresu	34
5.3. Vliv mKATP kanálu na viabilitu buněk po vyvolání oxidativního stresu.....	37

5.4. Role mKATP kanálu a morfinu v regulaci produkce ROS a mitochondriálního membránového potenciálu	41
5.5. Vliv morfinu na expresi podjednotek mKATP kanálu.....	44
6. Diskuze	46
7. Závěr	53
8. Literatura.....	55

Seznam zkratek

$\cdot\text{O}_2^-$	superoxidový radikál
$\cdot\text{OH}^-$	hydroxylový radikál
5-HD	5-hydroxydekanová kyselina
6-OHDA	6-hydroxydopamin
AAS	antibiotický/antimykotický roztok
ABCB8	ATP-vazebná kazeta podskupiny B člen 8
ADP	adenosindifosfát
Akt	proteinkináza B
AMP	adenosinmonofosfát
APS	persulfát amonný
ATP	adenosintrifosfát
BAX	Bcl-2 asociovaný s X proteinem
BCA	kyselina bicinchoninová
Bcl-2	protein B-buněčného lymfomu-2
BSA	hovězí sérový albumin
Ca^{2+}	vápenatý kationt
CAT	kataláza
CCDC51	coiled-coil doména obsahující 51
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CO_2	oxid uhličitý
DCF-DA	2',7' -dichlorfluorescein diacetát
dH₂O	destilovaná voda
DIAZO	diazoxid
DMEM	Dulbeccovo modifikované Eagle médium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová
ERK	extracelulárním signálem řízenou kinázu
FBS	fetální hovězí sérum
FCCP	karbonylkyanid-4-(trifluormethoxy)fenylhydrazon
GAP-43	s růstem spojený protein 43

GLYB	glybenclamid
GPCRs	receptory spřažené s heterotrimerními G proteiny
GPX	glutathionreduktáza
GSH	glutathion
GSK-3β	glykogen syntáza kináza-3 β
H⁺	vodíkový kationt
H₂O₂	peroxid vodíku
I/RI	ischemicko/reperfuzní poškození
IMS	mezimembránový mitochondriální prostor
IPC	ischemická prekondice
JAK	Janus kináza
K⁺	draselný kation
LPS	lipopolysacharidy
MAP-2	s mikrotubulem asociovaný protein 2
mKATP	mitochondriální ATP senzitivní draselné kanály
MPP⁺	1-methyl-4-fenylpyridiniový iont
MPTP	1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mPTP	mitochondriální pór přechodné propustnosti
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NeuN	neurální jaderný protein
NO[•]	oxid dusnatý
NO₂[•]	oxid dusičitý
NSE	neuron-specifická enoláza
PBS	fosfátový pufr
PI3K	fosfatidylinositol 3-kináza
PKC	proteinkináza C
PKCϵ_1	proteinkináza C ϵ_1
PKCϵ_2	proteinkináza C ϵ_2
PKG	proteinkináza G
PRX	peroxiredoxin
RA	kyselina all- <i>trans</i> -retinová
RAR	receptory kyseliny retinové

RNS	reaktivní formy dusíku
ROO[•]	peroxylový radikál
ROS	reaktivní formy kyslíku
SDS	dodecylsulfát sodný
SOD	superoxiddismutáza
STAT	přenašeč signálu a aktivátor transkripce
tBHP	terc-butyhydroperoxid
TBS	Tris-pufrovaný roztok
TEMED	tetramethylethylendiamin
TH	tyrosinhydroxyláza
TLR4	Toll-like receptory 4
TOR	cíl rapamycinu
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	polyoxyethylensorbitanmonolaurát
$\Delta\mu\text{H}^+$	protonový elektrochemický gradient
$\Delta\Psi\text{m}$	mitochondriální potenciál

1. Úvod

Morfin, který se řadí mezi opioidy, je v lékařství využíván jakožto analgetikum k tišení silných a chronických bolestí, zvláště pak u pacientů s onkologickým onemocněním. Je tak považován za tzv. „zlatý standard“ v tlumení bolesti, jež doporučuje i Světová zdravotnická organizace. Dlouhodobé užívání morfinu sebou však přináší negativní vedlejší účinky jako je vznik tolerance a závislosti, zvláště pak ve vysokých dávkách, kdy se už projevuje jeho neurotoxický a apoptotický účinek.

V poslední době je však stále více zkoumán i jeho neuroprotektivní a kardioprotektivní efekt proti oxidativnímu stresu vznikajícího při ischemických a ischemicko/reperfuzních poruchách. Oxidativní stres je charakteristický vysokou koncentrací reaktivních forem kyslíku či dusíku, způsobených nadměrnou produkcí těchto reaktivních částic či nedostatečnou účinností antioxidačních mechanismů. Oxidativní stres pak může vést k narušování lipidických biologických membrán, vzniku zlomů ve struktuře DNA a ve výsledku až k apoptotické smrti buněk. Dlouhodobě pak může vést ke vzniku různých patologií, neurodegenerativních onemocnění a syndromů. Studie však popisují i pro-oxidativní vliv morfinu. Nesourodost výsledků studií mezi protektivními a pro-oxidativními účinky morfinu zřejmě souvisí s volbou modelu, druhu, věku, pohlaví, typu tkáně, ale i s dávkou a délkou podávání morfinu.

Protektivní vliv morfinu byl zaznamenán hlavně u studií věnujících se morfinové prekondici, u které však dosud není odhalen její podrobný protektivní mechanismus. Současný výzkum věnující se morfinové prekondici upírá velkou pozornost k mitochondriálním ATP senzitivním draselným kanálům (mKATP), jakožto možnému členu signální kaskády aktivované opioidními receptory. Objevují se důkazy o tom, že aktivace mKATP vede ke stabilizaci mitochondriálního membránového potenciálu a regulaci produkce reaktivních forem kyslíku při oxidativním stresu.

Výzkum v oblasti vlivu chronické morfinové prekondice na přežití buněk neuroblastomové linie SH SY5Y vystavených oxidativnímu stresu a objasnění role mKATP kanálů v tomto efektu by mohlo přispět k lepšímu porozumění působení morfinu. Tyto znalosti by pak mohly být použity pro potenciální klinické využití ke snížení ischemického poškození mozku a mnohých onemocnění spojených s oxidativním stresem.

2. Literární přehled

2.1. Buněčná linie SH-SY5Y

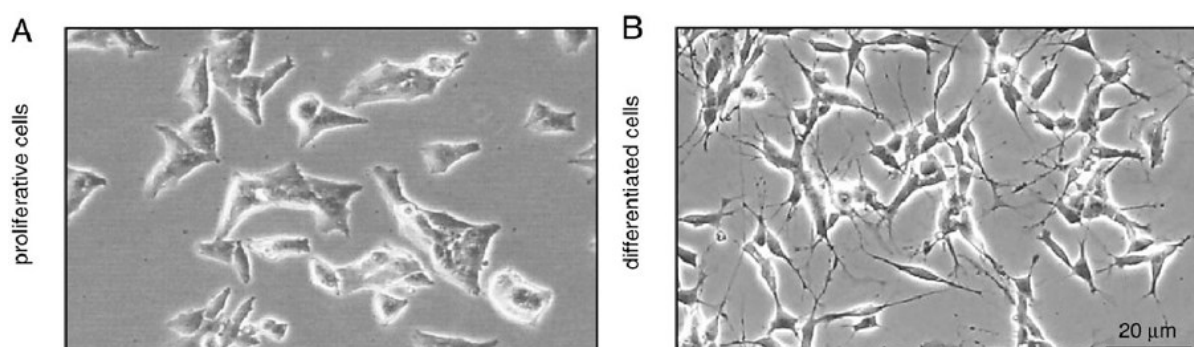
Buněčná linie SH-SY5Y je původně odvozena z biopsie metastazujícího nádoru kostní dřeně čtyřleté dívky neznámého etnika. Jedná se o podlinii rodičovské linie SK-N-SH založené v roce 1970 June L. Biedlerovou. SK-N-SH byly třikrát subklonovány; nejprve na SH-SY, poté na SH-SY5, a nakonec na SH-SY5Y (Biedler et al., 1973, 1978). Tato buněčná linie obsahuje jak adherentní, tak plovoucí buňky, přičemž většina uváděných studií využívá adherentní populace a plovoucí buňky při výměně média zcela vyřazuje. Adherentní populace buněk byla pro své vlastnosti využita i v této práci.

Z prvních studií J. L. Biedlerové vyplývá, že rodičovské diferencované buňky SK-N-SH obsahují dva morfologicky odlišné fenotypy: buňky podobné neuroblastům (tzv. typ N) a buňky podobné epitelům (Ross et al., 1983) (tzv. typ S; označení těchto dvou fenotypů jako "N" a "S" se zavedlo díky pozdějším studiím SH-SY5Y buněk Encinasem et al. (Encinas et al., 2000). Ačkoli je linie SH-SY5Y odvozena od SK-N-SH zachovává si poměrně nízký podíl S-typů, který však může za určitých podmínek převážit nad N-typem (Encinas et al., 2000). Buňky s morfologií podobnou neuroblastům exprimují tyrosinhydroxylázu (TH) a dopamin- β -hydroxylázu, které jsou charakteristické pro katecholaminergní neurony. Zatímco jejich protějšek, buňky epiteliálního typu, tyto enzymatické aktivity postrádají (Ross et al., 1983). Velkou výhodou linie SH-SY5Y je možnost diferencovat je do zralejšího fenotypu podobného neuronům. Jelikož jsou buňky SH-SY5Y lidského původu, exprimují řadu proteinů a izoform proteinů specifických pro člověka, které by v primárních kulturách odvozených od hlodavců nebyly přítomny (Encinas et al., 2000).

Diferenciace navíc synchronizuje buněčný cyklus a převádí buňky do G₀ fáze buněčného cyklu. Buněčný cyklus může u nediferencovaných buněk SH-SY5Y a dalších běžně používaných buněčných linií dramaticky kolísat, avšak diferenciací synchronizovaný buněčný cyklus umožňuje vytvořit homogenní populaci neuronálních buněk velmi podobným primárním neuronům (Encinas et al., 2000).

Morfologie nediferencované SH-SY5Y buňky se vyznačuje nepolarizovaným buněčným tělem s několika zkrácenými výběžky (obr. 1). Buňky mají tendenci růst ve shlucích což může vést k tvorbě centrální buněčné masy, kde jedna buňka roste přes druhou. Nediferencované buňky SH-SY5Y se neustále replikují, exprimují nezralé neuronální markery a postrádají zralé

neuronální markery (Påhlman et al., 1984). Nediferencované buňky pak nejvíce připomínají nezralé katecholaminergní neurony (Biedler et al., 1973; Lopes et al., 2010 b). Při indukci diferenciaci začíná u buněk SH-SY5Y morfologická i biochemická přestavba, díky které se buňky začínou stále více podobat primárním neuronům s dlouhými, vytvarovanými výběžky (obr. 1). Maturované buňky mohou vykazovat četné, ale náhodně rozmístěné výběžky nebo se mohou stát výrazně polarizovanými, v závislosti na metodě indukce diferenciaci. Jak už bylo řečeno dříve, diferenciaci buněk SH-SY5Y vyvolává snížení míry proliferace, jelikož jsou buňky diferenciací vyřazeny z buněčného cyklu (Encinas et al., 2000; Kunzler et al., 2017).



Obrázek 1: Morfologické rozdíly SH-SY5Y diferencovaných pomocí kyseliny retinové.

Reprezentativní snímky SH-SY5Y buněk v kultivačním médiu s 10 % FBS (A) a RA diferencovaných SH-SY5Y buněk kultivovaných 7 dní s 10 μ M RA v kultivačním médiu s 1 % FBS (B). Upraveno podle Lopes et al., 2010.

2.2.Diferenciaci SH-SY5Y

Neuronální diferenciaci SH-SY5Y buněk zahrnuje řadu morfologických, biochemických a biofyzikálních změn, včetně tvorby a prodlužování neuritických výběžků, změnu elektrické excitability plazmatické membrány, tvorbu funkčních synapsí, tvorbu neurotransmiterů a neurotransmiterových receptorů a indukci neuronálních specifických enzymů (Agholme et al., 2010; Shipley et al., 2016; Teppola et al., 2016; Alrashidi et al., 2021; Şahin et al., 2021). Výsledný fenotyp je možné ovlivnit výběrem příslušné diferenciační metody. Tím může být cholinergní, adrenergní či dopaminergní fenotyp. Diferenciaci buněk SH-SY5Y lze indukovat kyselinou all-*trans*-retinovou (RA) (Korecka et al., 2013; Zhang et al., 2020), dibutyrylovým cyklickým AMP (Kume et al., 2008), 12-o-tetradekanoyl-forbol-13-acetátem (Påhlman et al., 1981; Alrashidi et al., 2021), mozkovým neurotrofickým faktorem (Goldie et al., 2014; de Medeiros et al., 2019; Hromadkova et al., 2020), vanadátem (Rogers et al., 1994), nervovým růstovým faktorem (Oe et al., 2005; Cernaianu et al., 2008; Borsani et al., 2020) či

cholesterolem (Sarkanen et al., 2007; Teppola et al., 2016). Signální dráhy, které vedou k terminální diferenciaci buněk SH-SY5Y, jsou však stále z velké části neznámé.

Jednou z nejčastěji používaných a nejlépe charakterizovaných metod indukce diferenciaci buněk SH-SY5Y je přidání RA do kultivačního média, obvykle v koncentraci 10 μ M po dobu minimálně 3-5 dnů v médiu bez nebo s nízkým obsahem séra (Påhlman et al., 1984; Cheung et al., 2009).

RA, derivát vitamínu A, je známá jako silný diferenciační faktor, který působí prostřednictvím jaderných receptorů kyseliny retinové (RAR) (Qiao et al., 2012). Existují však i důkazy o tom, že diferenciaci by RA mohla navozovat i mechanismy nezávislémi na RAR prostřednictvím reaktivních forem kyslíku (ROS) (Kunzler et al., 2017). Kunzler et al. poukazují na to, že RA indukuje produkci ROS a použitím antioxidantů je diferenciaci SH-SY5Y inhibována. ROS podle všeho aktivují signální dráhu Akt a extracelulárním signálem řízenou kinázu (ERK), které hrají důležitou roli v procesu diferenciaci (Kunzler et al., 2017).

Plně diferencované SH-SY5Y buňky pak exprimují řadu specifických markerů zralých neuronů mezi které počítáme synaptofysin, neuron-specifickou enolázu (NSE), TH, s mikrotubulem asociovaný protein 2 (MAP-2), s růstem spojený protein 43 (GAP-43), neuronální jaderný protein (NeuN), β -III tubulin a synapsin (Agholme et al., 2010; Shipley et al., 2016; Jauhari et al., 2017). Výhoda diferenciaci pomocí RA nadále leží i v tom, že podporuje přežívání buněk SH-SY5Y buněk. Studie připisují tento jev aktivaci signální dráhy fosfatidylinositol-3-kináza/Akt a upregulaci antiapoptotického proteinu Bcl-2 (Itano et al., 1996; López-Carballo et al., 2002). Některé studie navíc poukazují na možnost, že RA-diferencované buňky jsou oproti nediferencovaným buňkám méně zranitelné vůči toxinům, jako jsou 6-hydroxydopamin (6-OHDA), 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) nebo jeho metabolit 1-methyl-4-fenylpyridiniový iont (MPP⁺) (Cheung et al., 2009).

2.3. Oxidativní stres a tvorba ROS

Oxidativní stres je definován jako nerovnováha mezi produkcí ROS a reaktivních forem dusíku (RNS) a jejich odbourávání antioxidantními mechanismy. Volné radikály jsou vysoce reaktivní atomy nebo molekuly s jedním nebo více nespárovanými elektrony ve vnějším elektronovém obalu. Pojem ROS označuje reaktivní radikálové ale i neradikálové deriváty kyslíku. Ve všeobecném pojetí je však požíván hlavně k popisu radikálů odvozených od molekuly kyslíku. Mezi ROS zařazujeme superoxidový radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál ($\text{OH}^{\cdot}$),

peroxid vodíku (H_2O_2) či peroxylový radikál ($\text{ROO}^\bullet$). Pod pojem RNS se řadí molekuly jako oxid dusnatý ($\text{NO}^\bullet$) nebo oxid dusičitý ($\text{NO}_2^\bullet$)

V relativně vyšších koncentracích způsobují ROS poškození a změnu struktury makromolekul, jako jsou proteiny, lipidy, DNA, což následně může u buněk vést ke snížení jejich viability nebo až k buněčné smrti. ROS a RNS však v buňce nehrají pouze negativní roli jako škodlivé a nežádoucí produkty oxidačního stresu. ROS hrají důležitou roli v buněčné signalizaci, imunitních reakcích, diferenciaci kmenových buněk (Le Belle et al., 2011), ale i v nejranějších fázích embryonálního vývoje počínaje oplodněním (Lopes et al., 2010 a). Nejznámějším příkladem RNS je oxid dusný (NO), který se uplatňuje jako druhý posel v buněčné signalizaci, podílí se na oxidativním vzplanutí u fagocytů a působí i jako relaxant hladké svaloviny (Gantner et al., 2020).

Původ ROS může být jak exogenní (znečištěné ovzduší a voda, tabák, alkohol, těžké kovy, léky jako cyklosporin, takrolimus, gentamycin a bleomycin; průmyslová rozpouštědla či záření), tak endogenní. Mezi endogenní producenty ROS se řadí hlavně mitochondrie, které se považují za největší producenty ROS v buňce. ROS jsou produkovány zejména v komplexu I a komplexu III (St-Pierre et al., 2002; Chen et al., 2003). Mezi minoritní, ale ne nezanedbatelné enzymy produkující ROS patří nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) oxidáza, myeloperoxidáza a lipoxigenáza. NADPH oxidáza je hlavním zdrojem radikálu $\text{O}_2^\bullet$, který vzniká jednoelektronovou redukcí molekulárního kyslíku s elektrony dodanými NADPH během mitochondriálního buněčného dýchání. Tento enzym, který vytváří velmi velké množství superoxidu, se nachází ve fagocytech (neutrofilech (Batot et al., 1995), eozinofilech, monocytech a makrofázích (Segal et al., 1981)), kterého využívají k destrukci parazitů, mechanismem oxidačního vzplanutí (Rossi et al., 1964; Babior et al., 1973).

K zachování buněčné homeostázi využívá buňka antioxidační mechanismy, které zabraňují vzniku oxidačnímu stresu a vzniku poškození buňky volnými radikály. Oxidační stres vzniká právě v případě, když jsou tyto mechanismy překonány. Buňka využívá v zásadě dvou mechanismů ochrany před volnými radikály. V první řadě se jedná o antioxidační enzymy, které svou aktivitou transformují radikály na neškodné látky jako je voda. Mezi tyto enzymy se zpravidla řadí superoxiddismutáza (SOD), kataláza (CAT), glutathionperoxidáza (GPX), glutathionreduktáza, laktoperoxidáza. V druhé řadě se jedná tzv. neenzymový antioxidační systém, v kterém molekuly jako glutathion (GSH) nebo molekuly vitamínů působí jako scavengery pro ROS. Typickým příkladem takových vitamínů je vitamín E nebo C (Huang et al., 2002; Abdulkhaleq et al., 2018).

Mezi hlavní enzymy likvidující ROS se řadí antioxidační enzym SOD přeměňující superoxidový radikál. SOD, která přeměňuje $\cdot\text{O}_2^-$ na H_2O_2 , se v buňce nachází v několika izoformách. SOD_1 se nachází v mitochondriálním mezimembránovém prostoru a cytosolu, SOD_2 se nachází v mitochondriální matrix a SOD_3 je vázána na extracelulární matrix (Zelko et al., 2002). Mitochondriální SOD_2 využívá coby kofaktor mangan oproti cytosolické SOD_1 , která využívá měď/zinek (Zelko et al., 2002). H_2O_2 vznikající při přeměně superoxidu pak odstraňují enzymy jako GPX (ve spolupráci s GSH), katalázy a peroxiredoxiny (PRX), přeměňují H_2O_2 na vodu. GSH, tripeptid skládající se z L-gama-glutamyl-L-cysteinyl-glycinu, obnovuje oxidované GPX zpět do aktivní redukované formy (Lushchak, 2014). GSH je během glutathionoxidázové reakce přeměňován na glutathion disulfid, který je pak zpětně redukován pomocí NADPH-dependentní flavoenzymem glutathionreduktázou. Pokud není H_2O_2 odstraněn pomocí antioxidačních mechanismů může v cytosolu prostřednictvím tzv. Fentonovy reakce reagovat s kovovými ionty, což vede ke vzniku velice reaktivního, a tudíž nebezpečného hydroxylového radikálu (Lushchak, 2014).

2.4. Morfin – protektivní účinek a vliv na oxidativní stres

Morfin je definován jako μ -opioidní agonista díky své vysoké afinitě k μ -receptoru, nicméně jeho interakce i s κ - a δ -receptory z něj činí nespecifického opioidního agonistu (Ela et al., 1997; Stein, 2016). Je dobře známo, že morfin může napodobit kardioprotekci ischemické prekondice (IPC) prostřednictvím opioidních receptorů u zvířat, izolovaných srdcí nebo kardiomyocytů (Schultz et al., 1996; McPherson et al., 2001; Gross, 2003). IPC je definována jako adaptivní reakce, na přechodnou ischemii před delší masívní ischemií (Murry et al., 1986), která vytváří silnou ochranu proti ischemicko/reperfučnímu poškození (I/RI) (Murry et al., 1986; Gross, 2003). Významný kardioprotektivní účinek proti I/RI vyvolaný morfinem je zprostředkován jak prekondicí (podávání morfinu před vyvoláním insultu) (Schultz et al., 1996; Dorsch et al., 2016), tak postkondicí (podávání morfinu po vyvolání insultu) (Chen et al., 2008, 2016). Méně probádaný, avšak neméně důležitý fakt je, že morfinovou prekondicí (Lim et al., 2004; Arabian et al., 2018 a; b) i postkondicí (Pateliya et al., 2008) může morfin vyvolat nezanedbatelný protektivní vliv i u neuronů a v nervové tkáni.

Mechanismus protektivního účinku morfinu je do dnešních dnů stále z velké části neznámý. Existují však důkazy o tom, že morfin své protektivní účinky primárně vyvolává aktivací opioidních receptorů, jež spadají do třídy A (tzv. Rhodopsinové rodiny) receptorů spářených s heterotrimerními G proteiny (GPCRs) které transdukují signál pomocí Gi/o proteinů. Ze všech

tří druhů opioidních receptorů se na protekci podílí jak μ - tak δ -opioidní receptory (Zhang et al., 2001; Gross, 2003; Zhao et al., 2006). Existují i názory, že do protektivních drah aktivovaných morfinem by mohly být zapojeny i Toll-like receptory 4 (TLR4). Recentní studie ukazují na aktivaci TLR4 pomocí morfinu, kdy TLR4 receptor je schopen vázat morfin (Hutchinson et al., 2008; Wang et al., 2016). Morfin se váže do stejného vazebného místa na TLR4 jako lipopolysacharidy (LPS), ale aktivuje TLR4 signalizaci s nižší účinností než LPS (Stevens et al., 2013; Grace et al., 2014). Existují studie, které naznačují, že do protektivního mechanismu by mohly být zapojeny i jiné signalizační dráhy. Autoři připisují protektivní účinky morfinu inhibici glykogensyntázy kinázy-3 β (GSK-3 β) zprostředkované fosfatidylinositol 3-kinázou (PI3K) (Gross et al., 2004), cílem rapamycinu (TOR) (Gross et al., 2004; Arabian et al., 2019), JAK/STAT dráhou (Gross et al., 2006) nebo NO/cGMP/PKG dráhou (Xi et al., 2010). Inaktivace GSK-3 β zabraňuje otevření mitochondriálního póru přechodné propustnosti (mPTP), čímž zlepšuje respirační funkci mitochondrií a snižuje produkci ROS (Juhaszova et al., 2004; Obame et al., 2008). Účinek na produkci ROS mají i mitochondriální ATP senzitivní draselné kanály (mKATP), které by mohly hrát centrální roli v protektivním účinku morfinové prekondice (Arabian et al., 2018 b).

Vliv morfinu na produkci a vychytávání ROS je stále velmi diskutované a rozporuplné téma. Byl prokázán jeho protektivní ale i pro-oxidativní účinek. Dle dostupné literatury se bohužel nedá jednoznačně určit hranice koncentrací, kde morfin působí protektivně či pro-oxidativně. Zdá se, že vliv morfinu na buněčnou redoxní rovnováhu, a tedy na oxidativní stres, se může lišit podle konkrétních okolností a závisí na více faktorech, jako je druh, věk, pohlaví, typ tkáně, dávka a délka expozice a současné podávání jiných léčiv, jež by mohli interagovat buď se samotným morfinem, či ovlivňovat signalizační kaskády morfinem aktivované (Skrabalova et al., 2013). Právě zvýšená tvorba ROS, ke které dochází během ischemie a reperfuze, je jedním z hlavních rizikových faktorů, které se podílejí na poškození tkání (Becker, 2004). Studie provedené na buňkách H9c2, buněčné linii kardiomyoblastů potkana, prokázaly, že ovlivnění těchto buněk morfinem (1 μ M až 10 mM) nevede k nadměrné tvorbě ROS (Hargrave et al., 2003) a může snížit produkci ROS vyvolanou oxidem arseničitým (Amini-Khoei et al., 2016). U buněk H9c2 bylo navíc zjištěno, že podání morfinu před simulovanou ischemií a reperfuzí zvyšuje viabilitu buněk a zabraňuje poškození mitochondrií způsobenému oxidačním stresem prostřednictvím mírně zvýšené produkce ROS, která před simulovanou ischemií a reperfuzí aktivuje protektivní signální dráhy (Xu et al., 2011, 2012). Podle těchto studií hrají ROS

důležitou roli při aktivaci již zmiňované signální dráhy PI3K/Akt, a mohou se tak podílet na cytoprotekci zprostředkované morfinem.

V rámci morfinové prekondice u srdce bylo dále zjištěno, že velikost a trvání protektivních účinků morfinu závisí i na době expozice. Podle všeho jsou účinky chronické expozice morfinu lepší než účinky jednorázové dávky morfinu a účinek také trvá déle (Lu et al., 2015), což podporují i studie na nervové tkáni (Arabian et al., 2015). Zdá se však, že protektivní efekt různě dlouhých expozic morfinu je zprostředkován různými signálními cestami (Peart et al., 2006).

Existují však i důkazy o tom, že samotný morfin má určité antioxidační účinky jakožto scavenger. Literatura uvádí, že morfin může sloužit jako silný antioxidant schopný posilovat buněčnou antioxidační kapacitu (Gülçin et al., 2004; Borges et al., 2016). Studie Lee et al. prokázala scavengerový účinek morfinu závislý na jeho koncentraci, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo při 200 μ M morfinu (Lee et al., 2004). Obdobné výsledky byly zjištěny při studiu přímé scavengerové aktivity morfinu vzhledem k H_2O_2 . Teprve až 100 μ M koncentrace morfinu měla signifikantní 26,5 % účinek (Almeida et al., 2014). Některé studie však hovoří i o nižším rozmezí koncentrací okolo 5-10 μ M. Nicméně tento efekt byl popsán na základě reakce s 1,1diphenyl-2-picrylhydrazylem (Costa-Malaquias et al., 2014). Interakce s jinými radikály může vykazat jinak silné scavengerové vlastnosti morfinu (Gülçin et al., 2004).

Mnohé studie poukazují i na pro-oxidativní účinek morfinu, který je většinou navozen jeho chronickým působením (Payabvash et al., 2006; Zhou et al., 2011; Samarghandian et al., 2014; Cao et al., 2016). Nicméně existují i studie, které prokázali jeho pro-oxidativní účinek i po hodinovém působení (Guzmán et al., 2006, 2009). Několik studií prokázalo, že chronická i akutní expozice morfinu může vést k významnému poklesu hladin GSH v mozku hlodavců a lidí, a i v játrech myši (Goudas et al., 1999; Zhang et al., 2004; Guzmán et al., 2006; Sumathi et al., 2011). Chronická expozice morfinu ovlivňuje enzymové aktivity enzymů zapojených do endogenní antioxidační obrany jako SOD, CAT a GPX. Výsledky studií jsou však rozporuplné. Studie zaměřující se na vznik závislosti a tolerance k morfinu často popisují pokles aktivit těchto enzymů (Zhang et al., 2004; Payabvash et al., 2006; Abdel-Zaher et al., 2010; Sumathi et al., 2011; Zhou et al., 2011; Rozisky et al., 2013). Studie věnující se morfinové prekondici však naopak zaznamenaly zvýšení exprese a aktivity antioxidačních enzymů jako je CAT (Arabian et al., 2018 b; Skrabalova et al., 2018 a). U morfinu byl zaznamenán protektivní vliv i díky inhibici NADPH oxidázy, resp. zábrany jejího správného složení (Qian et al., 2007).

2.5. Morfin a jeho vliv na mitochondriální KATP kanál

Současný výzkum zabývající se protektivními účinky morfinu, a hlavně morfinem indukovanou prekoníci, upírá velkou pozornost na mitochondriální ATP senzitivní draselné kanály (mKATP). Bylo prokázáno, že aktivátory mKATP kanálů jako diazoxid jsou účinné v prevenci apoptózy a nekrózy v různých patologických stavech prostřednictvím regulace produkce ROS v mitochondriích. Naopak inhibitory mKATP kanálů jako 5-hydroxydekanová kyselina (5-HD) či glybenclamid tyto protektivní účinky ruší (Garlid, 1996; Costa et al., 2008; Akopova, 2017).

Mitochondriální KATP byly nejprve identifikovány v játrech potkanů jako malé, vysoce selektivní, K^+ propustné kanály umístěné ve vnitřní mitochondriální membráně, jenž byly úzce spjaty s funkcemi, fyziologií a dynamikou mitochondrií, jelikož sledují a reagují na energetický stav mitochondrie pomocí poměru ATP/ADP (Inoue et al., 1991; Guillet et al., 2011; Wojtovich et al., 2013). Identifikace podjednotek mKATP kanálu umožnila další přesnější pochopení jeho funkce v mitochondriích. Nadměrná exprese podjednotek mKATP kanálu vedla k výraznému mitochondriálnímu bobtnání, a naopak snížení exprese způsobilo nestabilitu mitochondriálního potenciálu, zvětšení prostoru mezi kristami a snížení oxidativní fosforylace (Paggio et al., 2019). Změna v permeabilitě mKATP kanálů má zásadní roli v indukci cytoprotektivity, jelikož otevření mKATP kanálů může aktivovat dráhy vedoucí k inaktivaci mPTP a zvýšit přežití buněk proti oxidačnímu stresu (Liang et al., 1999; Costa et al., 2006, 2008). Obecně se předpokládá, že zvýšená rezistence k oxidačnímu stresu je založena na bioenergetických účincích otevírání kanálů mKATP (Garlid et al., 2003). Podle současných poznatků, ATP-citlivý transport K^+ , který je nasměrován do matrixového prostoru mitochondrií, disipuje protonový elektrochemický gradient ($\Delta\mu H^+$) generovaný elektronovým transportním řetězcem a snižuje a stabilizuje tak mitochondriální potenciál ($\Delta\Psi_m$) (Xu et al., 2001). Snížení $\Delta\Psi_m$ otevřením mKATP snižuje hnací sílu pro influx Ca^{2+} iontů (Holmuhamedov et al., 1999; Crestanello et al., 2000), a tím zmírňuje přetížení mitochondrií Ca^{2+} ionty a poškození buněk. Otevření mKATP kanálu však vede i k rozpojení dýchacího řetězce a snížení koncentrace H^+ v mezimembránovém mitochondriálním prostoru (IMS) v důsledku příjmu K^+ do mitochondriální matrix, jelikož následné přečerpání K^+ zpět do IMS přes výměník K^+/H^+ vede H^+ do mitochondriální matrix. Pokles koncentrace H^+ v IMS vede ke zvýšení protonového čerpání elektronovým transportním řetězcem a zvýšení spotřeby kyslíku k udržení $\Delta\Psi_m$, což pak vede k mírnému zvýšení produkce ROS (Garlid et al., 2003; Akopova, 2017). Zvýšená produkce ROS vlivem otevření mKATP kanálů však poskytuje ochranu buněk spuštěním

ochranných signálních drah nebo zablokováním cest buněčné smrti. Z velké části bylo prokázáno, že zapojení mKATP kanálů do buněčné signalizace dochází právě modulací produkce ROS. Jedním z nejvíce studovaných buněčných cílů cytoprotekce, které otevírání mKATP kanálů ovlivňuje, je mPTP. Jak již bylo doloženo v raných pracích Garlidovy skupiny, mírné zvýšení produkce ROS prostřednictvím aktivace mKATP vedlo ke spuštění jedné z nejúčinnějších cest kardioprotekce, kterou je aktivace mitochondriální proteinkinázy $C\epsilon_2$ ($PKC\epsilon_2$) s následnou bloádou mPTP (Costa et al., 2008). Souvislost mezi otevřením mKATP, modulací tvorby ROS a potlačením aktivity mPTP vedoucí k podobným efektům jako prekondice je v literatuře dobře popsána (Busija et al., 2008; Garlid et al., 2009; C Correia et al., 2011). Cytosolická fáze této dráhy může zahrnovat aktivaci PI3K, Akt, NO, cGMP a PKG s výsledným otevřením mKATP kanálu, mírným zvýšením produkce ROS a aktivací PKC (Garlid et al., 2009). Je také možné, že zvýšená intracelulární koncentrace volných radikálů zprostředkovaná otevřením mKATP kanálů, vede k pozitivní zpětné vazbě, kdy ROS pomocí PKC dále aktivují mKATP kanály a aktivace mKATP může vyvolat další produkci volných radikálů (Costa et al., 2008). Tyto krátké fáze zvýšené produkce volných radikálů by pak mohly ochránit buňku proti následnému velkému I/RI poškození, podobně jako v případě ischemické prekondice.

Existují důkazy o tom, že morfin přes aktivaci opioidních receptorů imituje kardioprotektivní efekt ischemické prekondice. Tohoto efektu morfin pravděpodobně dosahuje skrze aktivaci $\delta 1$ opioidních receptorů, což v důsledku zapříčiní otevření mKATP kanálu (Liang et al., 1999; McPherson et al., 2001). Mechanismus, kterým opioidní receptory aktivují mKATP kanál není stále jasně osvětlen. Existují však studie o intramitochondriálních drahách, které aktivaci mKATP kanálu přisuzují mitochondriální proteinkináze $C\epsilon$ ($PKC\epsilon$) respektive $PKC\epsilon_1$. Mitochondriální $PKC\epsilon_1$ aktivuje mKATP, což následně vede ke zvýšené produkci ROS. Zvýšená koncentrace ROS aktivuje druhou izoformu proteinkinázy a to $PKC\epsilon_2$, která svou aktivitou inhibuje otevření mPTP (Costa et al., 2008), který je při svém otevření zodpovědný za apoptózu buněk po I/RI poškození (Crompton, 1999; Di Lisa et al., 2001).

Existuje tedy otázka, jakým způsobem je morfinem aktivována $PKC\epsilon_1$. Jak se ukázalo $PKC\epsilon_1$ je možno aktivovat samotným ROS, respektive H_2O_2 , a také pomocí cytosolické proteinkinázy G (PKG). Tato kináza podle teorie aktivuje dosud neznámý receptor na vnější mitochondriální membráně, který svou aktivitou aktivuje $PKC\epsilon_1$ (Costa et al., 2005, 2008).

Další studie ukazují, že existuje zajímavá interakce mezi aktivitou mKATP kanálů a anti-apoptotickými cestami. Otevření mKATP může ovlivnit stabilitu mitochondriálních

membrán, zvýšením exprese anti-apoptotického proteinu B-buněčného lymfomu-2 (Bcl-2) na úrovni mitochondrií (Liu et al., 2002 a). Lokalizace Bcl-2 na vnější mitochondriální membráně je nezbytná k inhibici apoptózy, jelikož inhibuje translokaci pro-apoptotického proteinu Bcl-2 asociovaného s X (BAX) na mitochondriální membránu (Ferrari, 1996; Lindsay et al., 2011). Liu et al., kteří prokázali, že diazoxid (selektivní agonista mKATP kanálů) je schopen zvýšit vazbu Bcl-2 a inhibovat translokaci BAX do mitochondriální membrány, dospěli k závěru, že diazoxid uplatňuje své anti-apoptotické účinky právě prostřednictvím aktivace mKATP kanálů (Liu et al., 2002 b). Což potvrzuje i studie zabývající se rolí mKATP kanálů a jejich interakce s pro- a anti-apoptotickými proteiny v srdci (Gross et al., 2003).

3. Cíle práce

1. Diferencovat buňky SH-SY5Y buněčné linie do stavu plně maturovaných neuronů.
2. Určit vliv morfinové prekondice na viabilitu diferencovaných buněk po působení tBHP.
3. Ověřit účast mKATP kanálů v morfinové prekondici.
4. Analyzovat vliv morfinové prekondice a mKATP kanálu na produkci ROS a mitochondriální membránový potenciál po působení tBHP.

4. Materiál a metody

4.1. Kultivace a diferenciacie buněčné kultury

Modelovou linií pro experimenty byla zvolena buněčná linie SH-SY5Y lidských neuroblastomových buněk (American Type Culture Collection). Buňky byly pro vlastní experimenty diferencovány do neurálního typu.

Nediferencované buňky byly pěstovány v Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) s vysokým obsahem glukózy, s 5 % fetálním hovězím sérem (FBS, Gibco) a s 1 % roztokem antibiotik a antimitotik (AAS, Sigma-Aldrich). Pasáž buněk byla prováděna prostřednictvím roztoku trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich) v poměru 1:5 ve fosfátovém pufru (PBS). Následně byly buňky po inaktivaci trypsinu (pomocí média s 5 % FBS) sedimentovány na centrifuze (Universal 30R, Hettich) při 1250 RPM po dobu 3 minut při pokojové teplotě. Poté byly buňky suspendovány v potřebném množství média a nasazeny do nových lahví. Buňky byly kultivovány v plastových kultivačních lahvích o rozměru 75 cm² (Thermo Scientific™ BioLite).

Diferenciacie buněk probíhala po dobu 10 dnů opět v DMEM (Sigma-Aldrich) s vysokým obsahem glukózy, 1 % AAS (Sigma-Aldrich) ovšem s pouze 1 % FBS (Gibco) a přídavkem RA (Sigma-Aldrich) o výsledné koncentraci 10 μM v médiu. RA byla přidána 2. den po nasazení buněk při výměně 75 % média a následně vždy při následovných výměnách média 5. a 8. dne (opět jen s výměnou 75 % média). Při poslední a tentokrát již 100 % výměně média 10. dne RA nebyla přidávána, kvůli její možné interakci s podávanými látkami v následujících pokusech.

Buňky byly pro pokusy kultivovány v plastových kultivačních lahvích o rozměru 75 cm², v 96-jamkových destičkách a v 24-jamkových destičkách (Thermo Scientific™ BioLite).

Diferencované i nediferencované buňky byly kultivovány při 37 °C a 5 % CO₂ atmosféře.

4.2. Sklizení buněčné kultury

Při sklizení buněčné kultury SH-SY5Y byly nejprve plastové kultivační lahve přeneseny na led. Následně byly buňky mechanicky uvolněny z podkladu pomocí buněčné škrabky. Uvolněné buňky byly společně s médiem odsáty do centrifugační kyvety. Kultivační lahve byly ještě opláchnuty pomocí vychlazeného PBS a spolu se zbylými buňkami odsáty do centrifugační

kyvety k ostatním buňkám. Buňky pak byly stočeny na centrifuze (Universal 320, Hettich) při 4 °C, 1800 RPM po dobu 5 minut. Po odsátí supernatantu byly buňky suspendovány ve vychlazeném PBS a znovu stočeny při stejných podmínkách. Po odsátí supernatantu byly buňky suspendovány v 100 µl PBS/1 kultivační lahev společně s inhibitory proteáz a fosfatáz (Complete Preotease Inhibitor Cocktail a PhosSTOP, Roche). Buňky byly na závěr sonikovány (Bandelin Sonoplus) 5 sekund při 50 % výkonu. Získaný vzorek byl následně zamražen v tekutém dusíku a poté uskladněn v mrazáku při -75 °C.

4.3. Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů ve vzorku byla stanovena Bicinchoninovou metodou (BCA metoda). Roztoky použité pro toto stanovení jsou uvedeny v tabulce 1. Kalibrační křivka byla realizována dle tabulky 2, jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA). Vzorky byly nanášeny po 5 µl v triplicátech na 96-jamkovou destičku k 95 µl dH₂O a tak 100x zředěny. Poté bylo ke vzorkům a standardům přidáno 100 µl pracovního roztoku, který byl připraven z jednotlivých reagensů v následujícím poměru 26:25:1 (A:B:C). Destička byla inkubována při 60 °C po dobu 30 minut na termobloku (Techne). Následně byla změřena absorbance pomocí spektrofotometru (Synergy HT, Biotek) při vlnové délce 562 nm. Množství proteinů ve vzorcích bylo vypočteno z kalibrační křivky v programu Gen5.

Tabulka 1: Složení činidel pro zjištění koncentrace proteinů

Činidlo A	8 g NaCO ₃ · H ₂ O; 1,6 g vínan sodný (doplněno do 100 ml dH ₂ O; pH 11,25)
Činidlo B	4 g BCA (doplněno do 100 ml dH ₂ O)
Činidlo C	0,4 g CuSO ₄ · 5 H ₂ O (doplněno do 10 ml dH ₂ O)

Tabulka 2: Rozpis přípravy vzorků pro sestavení kalibrační křivky

Standard č.	BL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
µg BSA	0	0,2	0,5	1,0	1,5	2,5	4	6	10	15	20	30	50
BSA (0,1 µg/µl) (µl)	-	2	5	10	15	25	40	60	100	-	-	-	-
BSA (1 µg/µl) (µl)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15	20	30	50
dH₂O (µl)	100	98	95	90	85	75	60	40	-	85	80	70	50

4.4.SDS-PAGE elektroforéza

Ředění vzorků pro elektroforézu bylo zvoleno tak, aby výsledná koncentrace proteinů činila 0,5 µg/µl. Vzorek byl naředěn pomocí dH₂O a 4x koncentrovaného Laemmliho pufru, jež tvořil jednu čtvrtinu celkového objemu. Vzorky byly následně důsledně promíchány a inkubovány na termobloku při 100 °C po dobu 1 minuty. Roztoky použité k elektroforéze jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Složení roztoků pro SDS-PAGE elektroforézu

<i>Pufr 1</i>	18,17 g Tris-HCl pH 8,8 doplněno do 1000 ml dH ₂ O
<i>Pufr 2</i>	6,05 g Tris-HCl pH 6,8 doplněno do 1000 ml dH ₂ O
<i>Elektorforetický pufr 10x konc.</i>	30,3 g Tris-HCl 141,1 g glycinu 10 g SDS doplněno do 1000 ml dH ₂ O
<i>Laemmliho pufr 4x konc.</i>	2,4 ml 1M Tris-HCl; pH 6,8 4 ml glycerolu 0,8 g SDS 4 ml merkapttoethanol 20 mg bromfenolové modři doplněno do 10 ml dH ₂ O

K docílení optimální separace proteinů byl zvolen 8 % či 10 % separační gel, který byl namíchán dle tabulky 4. Připravený roztok byl nalit mezi dvě skla (s rozstupem 1,5 mm), která byla nejprve očištěna 70 % ethanolem a následně upevněna v aparatuře pro nalévání gelů. Pro zlepšení polymerizace byl gel překryt roztokem butanolu (3:1 s dH₂O) a takto ponechán při pokojové teplotě po dobu cca 45 minut. Po uplynutí této doby byl roztok butanolu vymyt dH₂O a separační gel vysušen pomocí filtračního papíru. Na separační gel byl navrstven 4 % zaostřovací gel, který byl připraven podle tabulky 4. Pro vytvoření jamek na vzorky byl

do zaostřovacího gelu zasunut speciální hřebínek. Zaostřovací gel polymerizoval po dobu přibližně 15 minut při pokojové teplotě. Po uplynutí stanoveného času byl gel přenesen do elektroforetické aparatury s elektroforetickým pufrem, odstraněn hřebínek a nanášeny vzorky. Nanáška jednotlivého vzorku byla 10 µg proteinů/jamka a molekulárního standardu 4 µl. Po nanesení vzorků byla aparatura připojena ke zdroji elektrického napětí. Separace proteinů probíhala přibližně 60 min při konstantním napětí 200 V.

Tabulka 4: Složení SDS-Page gelů

	Separační gel 10 %	Separační gel 8 %	Zaostřovací gel
<i>dH₂O</i>	4 ml	4,7 ml	3 ml
<i>Pufr 1</i>	2,5 ml	2,5 ml	
<i>Pufr 2</i>			1,25 ml
<i>30% akrylamid</i>	3,35 ml	2,65 ml	0,65 ml
<i>10 % SDS</i>	100 µl	100 µl	50 µl
<i>10 % APS</i>	45 µl	45 µl	45 µl
<i>TEMED</i>	4 µl	4 µl	4 µl

Hodnoty v tabulce jsou uvedeny pro přípravu jednoho gelu; zkratky: APS, persulfát amonný; SDS, dodecylsulfát sodný; TEMED, tetramethylethyldiamin

4.5. Western blot

Gel byl vyňat z elektroforetické aparatury a byl odstraněn zaostřovací gel. Gel byl pak vložen do blotovací aparatury pro přenos proteinů. Složení použitých roztoků pro Western blot jsou uvedeny v tabulce 5. Proteiny byly z gelu přenášeny na nitrocelulózovou membránu (velikost pórů 0,45 µm, Amersham, Protran, GE Healthcare) na základě jejich záporného náboje uděleného SDS. Přenos proteinů na membránu probíhal za konstantního napětí 100 V po dobu 1 hodiny. Po uplynutí této doby byla membrána vyjmuta a přenesené proteiny byly obarveny roztokem Ponceau S (Sigma-Aldrich). Po naskenování výsledku barvení byla membrána umístěna do blokovacího pufru na 30 minut. Zablockovaná membrána byla vložena do ředícího pufru s příslušnými naředěnými primárními protilátkami (tab. 6) a inkubována přes noc ve 4 °C. Následujícího dne byl ředící pufr odstraněn a membrána byla následně 3x promyta promývacím pufrem pokaždé po dobu 10 minut. Po promytí membrán promývacím pufrem byla membrána

ponořena do ředícího pufru s naředěnými sekundárními protilátkami (tab. 6) a inkubována po dobu 1 hodiny. Poté byla membrána opět 3x promyta promývacím pufrem. Membrána pak byla inkubována se substrátovým roztokem pro křenovou peroxidázu (SuperSignal West Dura, ThermoFischer Scientific) po dobu 1 minuty. Ihned poté byla membrána exponována na film (CP-BU M, Agfa). Film byl vyvolán v temné místnosti vyvolávacím přístrojem (Optimax). Vyvolané filmy byly naskenovány a vyhodnoceny programem ImageJ a ImageLab. Normalizace výsledků na množství nanesených proteinů byla provedena pomocí barvení Ponceau S nebo vzhledem na množství β -aktinu.

Tabulka 5: Složení roztoků použitých pro Western blot

Blotovací pufr	15 g Tris 72 g glycinu 1000 ml methanolu Doplněno do 5000 ml dH ₂ O
TBS pufr, pH 8, 10x koncentrovaný	84,15 g NaCl 11,63 g Tris pH 8,0 Doplněno do 1000 ml dH ₂ O
Promývací pufr	100 ml TBS pufru 900 ml dH ₂ O 3 ml Tween
Blokovací pufr	2,5 g sušeného mléka 50 ml TBS pufru 50 μ l Tween
Ředící pufr	0,5 g sušeného mléka 50 ml TBS pufru 50 μ l Tween
Roztok Ponceau S	0,1 g Ponceau S 5 ml kyselina octová 95 ml dH ₂ O

Zkratky: TBS, Tris-pufrovaný roztok, Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethan; Tween, polyoxyethylensorbitanmonolaurát

Tabulka 6: Použité primární a sekundární protilátky

Primární protilátka	Katalogové číslo	Výrobce	Ředění	Sekundární protilátka	Ředění
NSE	PA146203	Invitrogene	40 000x	Anti-Rabbit	40 000x
Synaptofyzin	MA51452	Invitrogene	5 000x	Anti-Rabbit	40 000x
TH	sc-14007	Santa Cruz Biotech.	1 000x	Anti-Rabbit	40 000x
β-aktin	sc-47778	Santa Cruz Biotech.	5 000x	Anti-Mouse	20 000x
CCDC51	HPA010980	Sigma-Aldrich	2 000x	Anti-Rabbit	40 000x
ABCB8	PA5-120826	Invitrogene	2 000x	Anti-Rabbit	40 000x

Identifikace použitých sekundárních protilátek – Anti-Rabbit IgG Horseradish Peroxidase-linked, Anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase-linked (GE Healthcare). Zkratky: ABCB8, ATP-vazebná kazeta podskupiny B člen 8; CCDC51, coiled-coil doména obsahující 51; NSE, neuron-specifická enoláza; TH, tyrosinhydroxyláza.

4.6. Ovlivnění buněk

Diferencované SH-SY5Y buňky byly vystaveny chronickému působení morfinu (rozpuštěn v PBS, Saneca Pharmaceutical, Ltd.) v plastových kultivačních lahvích o rozměru 75 cm², dále v 96-jamkových destičkách a v 24-jamkových destičkách (Thermo Scientific™ BioLite).

Buňky v plastových kultivačních lahvích o rozměru 75 cm² byly ovlivněny 10 μ M a 1 mM morfinem podobu 24 hodin a následně sklizeny a zamraženy v tekutém dusíku a skladovány v -75 °C pro SDS-Page.

Buňky v 96-jamkových destičkách byly ovlivněny morfinem v koncentracích 1 mM, 100 μ M, 10 μ M a 1 μ M po dobu 24 hodin. Následně byl vyvolán oxidativní stres přidáním terc-butyldihydroperoxidu (tBHP, Sigma-Aldrich) ve výsledné koncentraci 10 mM po dobu 4 hodin. tBHP byl přidán buď bez výměny média (tzn. morfin zůstal i po dobu působení tBHP) nebo bylo po inkubaci buněk s morfinem médium vyměněno za čerstvé bez morfinu. Role mKATP kanálu v morfinové prekonici byla testována pomocí specifického inhibitoru kanálu 5-HD (rozpuštěn v dH₂O), nespecifického inhibitoru glybenclamidu (rozpuštěn v DMSO) a aktivátoru diazoxidu (rozpuštěn v methanolu). 5-HD inhibitor mKATP kanálu byl přidáván k výsledné koncentraci 100 μ M a 500 μ M. Glybenclamid a diazoxid byly přidávány ve výsledné koncentraci 100 μ M. Aktivátor a inhibitory byli přidávány po výměně média na 30 minut před vyvoláním oxidačního stresu přidáním tBHP. Buňky byly ovlivněny látkami

jednotlivě nebo ve vzájemných kombinacích. Následně byla hodnocena viabilita buněk pomocí MTT testu (kap. 4.7.).

Buňky v 24-jamkových destičkách byly pěstovány pro detekci produkce ROS a mitochondriálního membránového potenciálu průtokovou cytometrií. Přesný postup ovlivnění buněk jednotlivými látkami a inkubace s potřebnými fluorescenčními sondami pro detekci je uveden v kapitole 3.8. Buňky byly ovlivněny látkami jednotlivě nebo ve vzájemných kombinacích. Následně byly buňky měřeny na průtokovém cytometru.

4.7.MTT test

MTT test je kolorimetrická metoda, určená k měření aktivity metabolismu buněk. Právě díky tomu ho lze využít jako test viability buněk, jelikož pouze živé buňky jsou metabolicky aktivní. Mechanismus této metody je založen na redukční reakci probíhající pomocí mitochondriálních oxidoreduktáz. Ty mění žlutý solubilní (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid (MTT) na nerozpustný formazan, jenž má podobu fialových krystalů. Krystaly formazanu jsou následně rozpuštěny pomocí rozpouštědla. Míra zabarvení se vyhodnocuje pomocí spektrofotometrie. Hodnota naměřené absorpance pak odpovídá množství metabolicky aktivních, a tedy živých buněk.

Po uplynutí 4 hodin působení tBHP na buňky v 96-jamkových destičkách bylo odsáto veškeré médium a následně přidáno 100 μ l média DMEM (Sigma-Aldrich), s 1% FBS (Gibco) s přídavkem 12 mM MTT (Sigma-Aldrich). Buňky byly inkubovány po dobu 4 hodin, než se vytvořily tmavé krystaly formazanu. Následně bylo odsáto 85 μ l média a pro rozpuštění krystalů formazanu přidáno 50 μ l dimethylsulfoxidu (DMSO). Destička byla mírně promíchána a následně změřena absorpance při vlnové délce 540 nm pomocí spektrofotometru (Synergy HT, Biotek). Získaná data byla pak vyhodnocena programem Gen5.

4.8.Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je jedinečná metoda, která umožňuje analýzu mnoha vlastností na úrovni jedné buňky, a to opakovaně ve vzorku o velkém množství buněk. To vše během velmi krátkého časového úseku. Princip této metody je založen na detekci specifického rozptylu monochromatického světla a fluorescenčního záření každé buňky v laminárním toku kapaliny.

Už jen díky specifickému odrazu světla od buněk je možné rozeznávat velikost, populace či mrtvé buňky.

Přidanou hodnotu této metodě poskytují specifické fluorescenční sondy, které mohou formou fluorochrom/protilátka značit specifické buněčné struktury. Fluorescenční sondy mohou sledovat také fyzikální vlastnosti (membránový potenciál) nebo různé chemické látky (ROS).

Fluorescenční sondy pracují na principu excitace fluorochromu monochromatickým světlem laseru a následnou detekci vyzářených fotonů vzniklých při zpětném přechodu elektronů fluorochromu na jeho základní elektronovou hladinu. Toto emisní záření má pak větší vlnovou délku, a tedy nižší frekvenci oproti záření excitačnímu. Tento fenomén se nazývá Stokesův posun, díky kterému je pak možné rozlišit jednotlivé vlnové délky a použít i několik sond se stejnou excitační vlnovou délkou, ale jinou emisní. Emisní fotony jsou následně pomocí sběrné optiky, tvořenou soustavou filtrů, zrcadel a čoček, rozdělovány podle vlnové délky k příslušným předem zvoleným detektorům. Signály z detektorů jsou následně převedeny na elektrické impulsy, které jsou zpracovány počítačovým programem, v našem případě BD FACSDiva Software.

Buňky v 24-jamkových destičkách byly ovlivněny 1 mM morfinem po dobu 24 hodin. Poté bylo médium vyměněno za čerstvé a přidána fluorescenční sonda 2',7'-dichlorofluorescein diacetát (DCF-DA, Sigma-Aldrich) pro detekci ROS na 30 min. Následně byly buňky ovlivněny aktivátorem či inhibitory o koncentraci 100 μ M po dobu 30 minut před vyvoláním oxidačního stresu přidáním 100 μ M tBHP po dobu 1 hodiny. V době oxidačního stresu byla přidána fluorescenční sonda MitoTracker Red CMXRos (ThermoFisher Scientific) pro detekci mitochondriálního membránového potenciálu. Sonda byla přidána 30 minut před ukončením oxidačního stresu. Oxidační stres byl ukončen odsátím média a promytím buněk 1 ml PBS. Funkčnost sondy MitoTracker Red CMXRos byla ověřena protonovým ionoforem karbonylkyanid-4-(trifluormethoxy)fenylhydrazonem (FCCP), který snižuje mitochondriální membránový potenciál. FCCP o koncentraci 5 μ M byl inkubován společně s neovlivněnými buňkami 15 minut před přidáním sondy MitoTracker Red CMXRos.

Po promytí bylo k buňkám přidáno 250 μ l roztoku trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich) v poměru 1:5 v PBS. Následně byly buňky po inaktivaci trypsinu (pomocí přidání 500 μ l média s 1 % FBS) sedimentovány na centrifuze (Centrifuge 5810R, Eppendorf) při 1250 RPM po dobu 5 minut při 4°C. Po odsátí supernatantu byly buňky suspendovány v 300 μ l PBS a připraveny k měření na průtokovém cytometru LSR II (Becton Dickinson). Buňky byly ovlivněny látkami

jednotlivě nebo ve vzájemných kombinacích. Naměřená data byla zpracována v programu BD FACSDiva Software a následně vyhodnocena v programu Kaluza.

4.9. Statistická analýza

Výsledky jednotlivých měření byly vyhodnoceny statistickou analýzou dat v programu GraphPad a jsou v celé práci vyjádřeny jako průměr $\pm$ SEM. Data vždy pocházejí z nejméně tří nezávislých experimentů (přesný počet uveden v legendách obrázků). Statistická významnost byla u hodnocení výsledků markerů diferenciací SH-SY5Y buněk stanovena pomocí t-testu. Statistická významnost u ostatních experimentů byla stanovena pomocí jednocestné ANOVA a následného Tukeyho testu. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

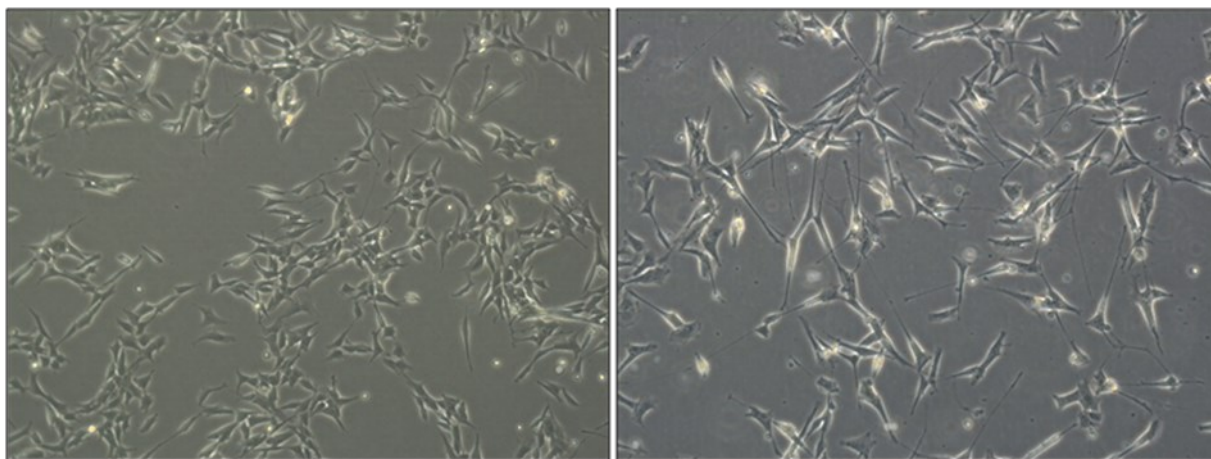
5. Výsledky

5.1. Diferenciace buněk SH-SY5Y

Diferenciace buněk buněčné linie SH-SY5Y prostřednictvím RA byla ověřena porovnáním exprese vybraných diferenciačních markerů plně maturovaných neuronů pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Analýza byla provedena mezi kontrolní skupinou buněk, které byly pěstovány za standardních podmínek v DMEM s 5 % FBS, a mezi skupinou buněk pěstovaných v DMEM s 1 % FBS a ovlivněných 10 μ M koncentrací RA po dobu 10 dnů. Pro kontrolu diferenciace byly zvoleny 3 markery plně maturovaných neurálních buněk: NSE, synaptofysin a TH.

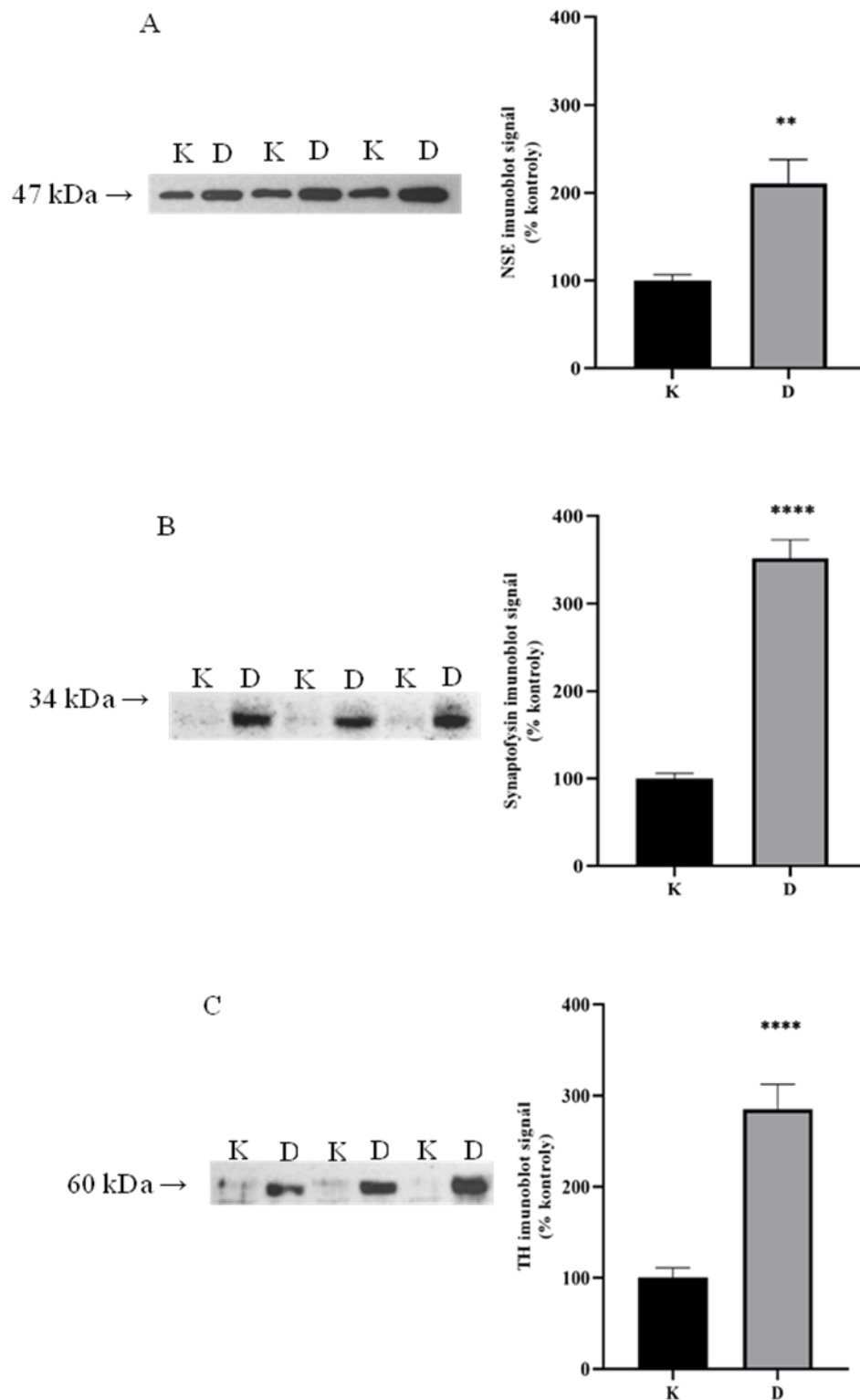
Všechny tři diferenciační markery byly u buněk ovlivněných RA signifikantně zvýšeny oproti kontrole, což dokazuje jejich diferenciaci do plně maturovaných neuronů. NSE byla zvýšena o 110 % oproti kontrole ($p < 0,05$), synaptofysin byl zvýšen o 252 % oproti kontrole ($p < 0,0001$) a TH byla zvýšena o 185 % oproti kontrole ($p < 0,0001$) (obr. 3).

Diferencované SH-SY5Y buňky se lišily od nediferencovaných i svojí morfologií. Nediferencované buňky se vyznačují nepolarizovaným buněčným tělem s několika zkrácenými výběžky (obr. 2). Nediferencované buňky mají navíc tendenci růst ve shlucích. Diferencované buňky mají protáhlá těla a tvoří mnoho dlouhých výběžků.



Obrázek 2: Diferenciace SH-SY5Y buněk

Reprezentativní snímky ze světelného mikroskopu buněk SH-SY5Y. Jako kontrola (vlevo) byly nafočeny buňky bez ovlivnění a následně ovlivněny RA (vpravo).



Obrázek 3: Markery diferenciace SH-SY5Y buněk

Reprezentativní imunoblotty (vlevo) a grafy exprese (vpravo) sledovaných proteinů NSE (A), synaptophysin (B) a TH (C) u buněk kontrolních (K) a ovlivněných RA (D). Imunoblotty znázorňují expresi proteinů v K a D skupinách u tří nezávislých ovlivnění. Procenta na osách y udávají relativní míru exprese jednotlivých proteinů oproti kontrole. Data byla normalizována na celkové množství proteinů určené barvením Ponceau S. Výsledky reprezentují průměr $\pm$ SEM ze 3-4 nezávislých ovlivnění. Každé ovlivnění bylo stanoveno 2x. (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ oproti kontrole).

5.2. Vliv morfinu na viabilitu buněk po vyvolání oxidativního stresu

Vliv chronického ovlivnění buněk morfinem na jejich viabilitu po působení oxidativního stresu byl testován pomocí MTT testu. Byl sledován vliv 24 hodinového působení morfinu v koncentracích 1 mM, 100 μ M, 10 μ M a 1 μ M na viabilitu diferencovaných buněk SH-SY5Y linie po vyvolání oxidativního stresu prostřednictvím tBHP o koncentraci 10 mM po dobu 4 hodin. Morfin byl před podáním tBHP vymyt pomocí výměny čerstvého média DMEM.

Viabilita buněk byla měřena u následujících experimentálních skupin:

- kontrola
- buňky inkubované s morfinem ve vybraných koncentracích, 24 hod.
- buňky inkubované s tBHP 10 mM, 4 hod.
- buňky inkubované s morfinem ve vybraných koncentracích a následně s tBHP

Samotný morfin v koncentracích od 1 mM po 1 μ M po 24 hodin neměl signifikantní vliv na změnu buněčné viability v porovnání s kontrolou (obr. 4). Oxidativní stres vyvolaný působením tBHP vedl k signifikantně významnému snížení viability buněk v porovnání s kontrolní skupinou (snížení viability na 48 ± 4 %; $p < 0,0001$). Působení tBHP signifikantně snížilo viabilitu buněk i u skupin buněk ovlivněných morfinem ve veškerých použitých koncentracích ($p < 0,05$, 1 mM morfin; $p < 0,0001$, ostatní koncentrace morfinu). Viabilita buněk byla tBHP snížena na 89 ± 4 % v případě 1 mM morfinu, 64 ± 4 % v případě 100 μ M morfinu, 54 ± 2 % v případě 10 μ M morfinu a 57 ± 4 % v případě 1 μ M morfinu (obr. 5A).

Statistická analýza vlivu jednotlivých koncentrací morfinu na přežití buněk po působení tBHP ukázala, že buňky ovlivněné 1 mM morfinem na 24 hodin signifikantně zvýšily svoji viabilitu v porovnání s buňkami ovlivněnými pouze tBHP (zvýšení o 41 %) ($p < 0,0001$). Buňky ovlivněné ostatními koncentracemi morfinu zvýšily viabilitu v reakci na působení tBHP pouze nesignifikantně v porovnání s viabilitou buněk ovlivněných pouze tBHP. 100 μ M morfin zvýšil viabilitu buněk o 16 %, 10 μ M morfin zvýšil viabilitu buněk o 6 %, 1 μ M morfin zvýšil viabilitu buněk o 10 %.

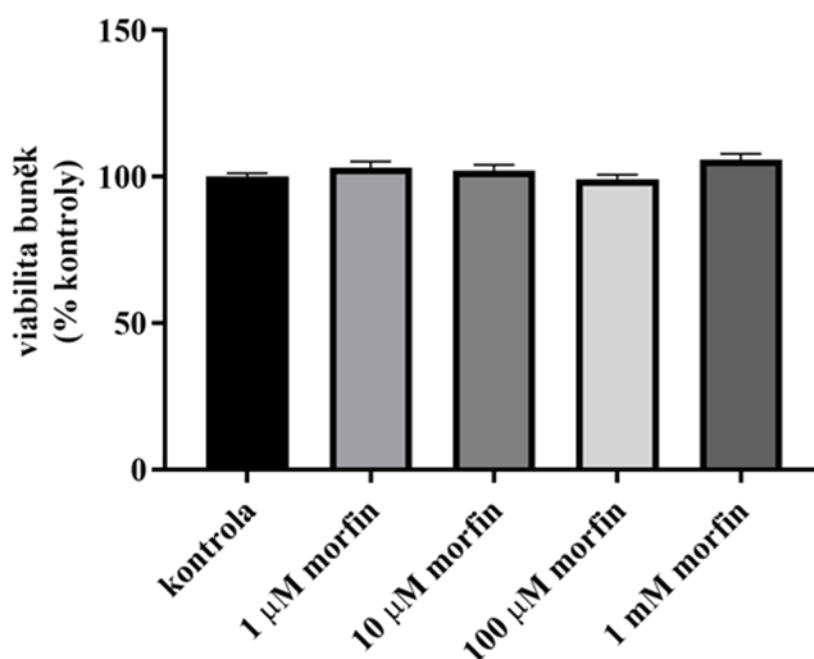
Byla testována i hypotéza, zda samotný morfin nemá antioxidační účinky. Morfin po 24 hod. působení nebyl vymyt výměnou média za čerstvé, a tudíž byl přítomen i při vyvolaném oxidačním stresu pomocí tBHP.

Viabilita buněk byla sledována u následujících skupin:

- kontrola
- buňky inkubované s morfinem ve vybraných koncentracích
- buňky inkubované s tBHP
- buňky inkubované s morfinem ve vybraných koncentracích a následně spolu s tBHP

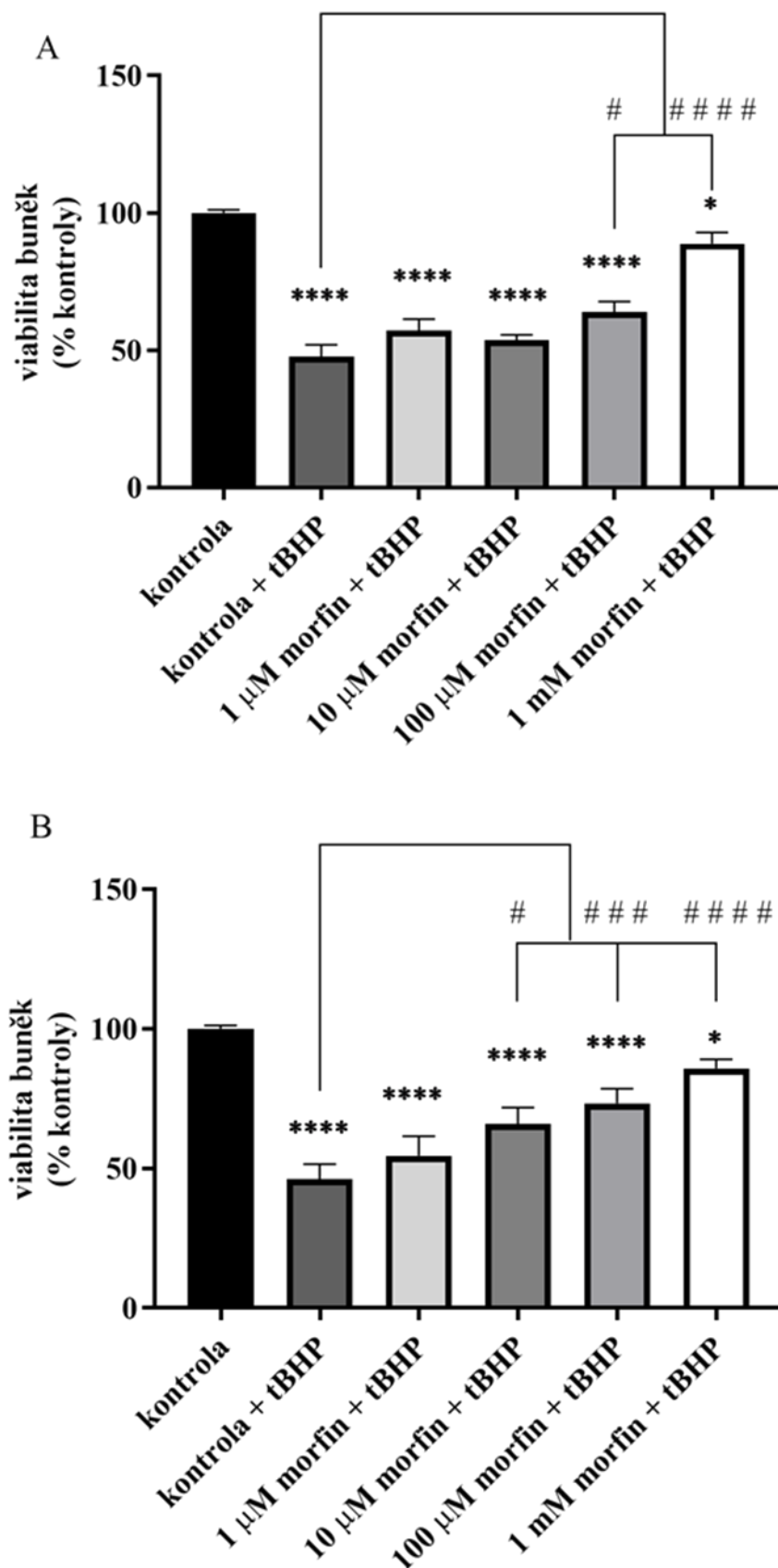
I v tomto případě oxidativní stres vyvolaný působením tBHP vedl k signifikantně významnému snížení viability buněk v porovnání s kontrolní skupinou (snížení viability na $46 \pm 5 \%$; $p < 0,0001$). Působení tBHP signifikantně snížilo viabilitu buněk i u skupin buněk ovlivněných morfinem ve veškerých použitých koncentracích ($p < 0,05$, 1 mM morfin; $p < 0,0001$, ostatní koncentrace morfinu). Viabilita buněk byla tBHP snížena na $86 \pm 3 \%$ v případě 1 mM morfinu, $73 \pm 5 \%$ v případě 100 μM morfinu, $66 \pm 6 \%$ v případě 10 μM morfinu a $54 \pm 7 \%$ v případě 1 μM morfinu. Protektivní účinek morfinu byl signifikantní u 1 mM, 100 μM a 10 μM morfinu s tBHP v porovnání s kontrolou + tBHP (obr. 5B).

Statistická analýza vlivu jednotlivých koncentrací morfinu na přežití buněk po působení tBHP však neukázala signifikantní rozdíl viability buněk u skupin bez vymytého oproti skupinám s vymytým morfinem.



Obrázek 4: Vliv morfinu na viabilitu buněk.

Procenta na ose y udávají relativní změnu buněčné viability u ovlivněných buněk oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr $\pm$ SEM z 8 nezávislých měření v pentaplikátech.



Obrázek 5: Vliv morfinu na viabilitu buněk po navození oxidačního stresu.

Oxidativní stres byl vyvolán prostřednictvím působení tBHP jednak po vymytí morfinu (A) a bez vymytí morfinu (B). Procenta na ose y udávají relativní změnu buněčné viability u ovlivněných buněk oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr $\pm$ SEM z 5 (A) nebo 4 (B) nezávislých měření v pentaplikátech. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ oproti kontrole; # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$ oproti kontrole + tBHP)

5.3. Vliv mKATP kanálu na viabilitu buněk po vyvolání oxidativního stresu

V rámci studia vlivu morfinu na mKATP kanál a jeho efektu na viabilitu buněk při působení oxidačního stresu byl i zde morfin použit k 24 hodinovému ovlivnění buněk. Po analýze vlivu 24 hodinového působení morfinu na viabilitu diferencovaných buněk SH-SY5Y linie po vyvolání oxidativního byla k dalším pokusům vybrána koncentrace 1 mM morfinu, jakožto nejúčinnější koncentrace, a dále 10 μ M koncentrace morfinu pro srovnání protektivního účinku jednotlivých koncentrací.

Role mKATP kanálu byla zkoumána pomocí selektivního inhibitoru mKATP kanálů (5-HD) ve 100 μ M a 500 μ M koncentraci, neselektivního inhibitoru KATP kanálů (glybenclamid) ve 100 μ M koncentraci, a pomocí selektivního aktivátoru mKATP kanálů (diazoxid) ve 100 μ M koncentraci. Aktivátor a inhibitory byly podávány po 24 hodinovém ovlivnění buněk morfinem ve vybraných koncentracích, 30 minut před vyvoláním oxidačního stresu pomocí tBHP v 10 mM koncentraci po dobu 4 hodin. Jelikož ale u 10 μ M koncentrace morfinu nebyla prokázáno signifikantní zvýšení viability po působení tBHP v kombinacích s 5-HD nebyla k experimentům s diazoxidem a glybenclamidem používána.

Účast mKATP kanálu v morfinové prekonkci a jeho vliv na viabilitu buněk po navození oxidačního stresu byl testován na těchto skupinách:

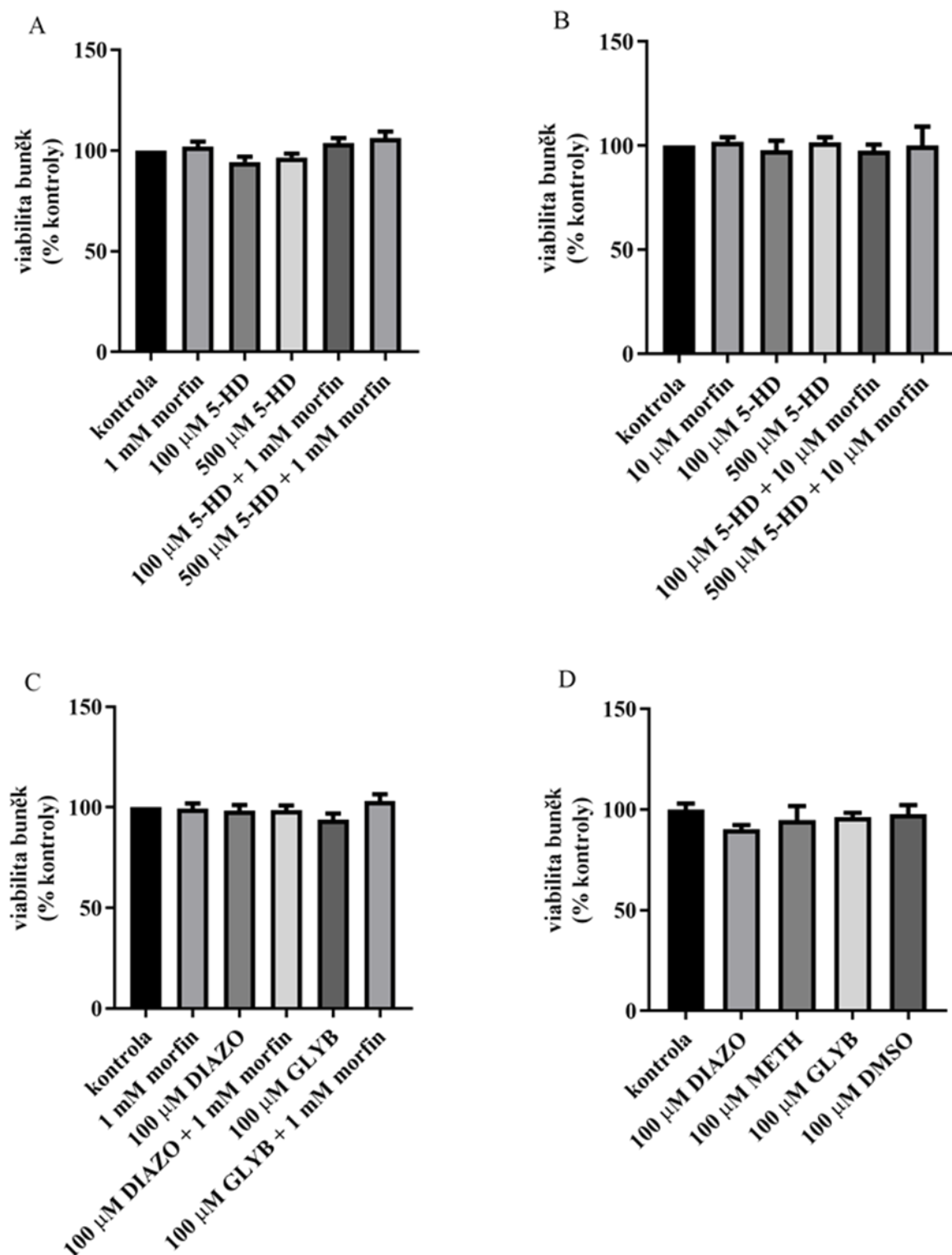
- kontrola
- buňky ovlivněné morfinem
- buňky ovlivněné tBHP
- buňky ovlivněné morfinem + tBHP
- buňky ovlivněné 5-HD
- buňky ovlivněné 5-HD + morfinem
- buňky ovlivněné 5-HD + tBHP
- buňky ovlivněné 5-HD + morfinem + tBHP
- buňky ovlivněné glybenclamidem
- buňky ovlivněné glybenclamidem + morfinem
- buňky ovlivněné glybenclamidem + tBHP
- buňky ovlivněné glybenclamidem + morfinem + tBHP
- buňky ovlivněné diazoxidem
- buňky ovlivněné diazoxidem + morfinem

- buňky ovlivněné diazoxidem + tBHP
- buňky ovlivněné diazoxidem + morfinem + tBHP

Analýza neprokázala signifikantní vliv aktivátoru a inhibitorů na viabilitu buněk a ani u skupin ovlivněných aktivátorem a inhibitory po působení morfinu ve vybraných koncentracích oproti kontrolám (obr. 6A,B,C). Signifikantní změna viability buněk nebyla pozorována ani u skupin ovlivněných pouze rozpouštědly inhibitorů (methanol, DMSO) oproti kontrolám (obr. 6D).

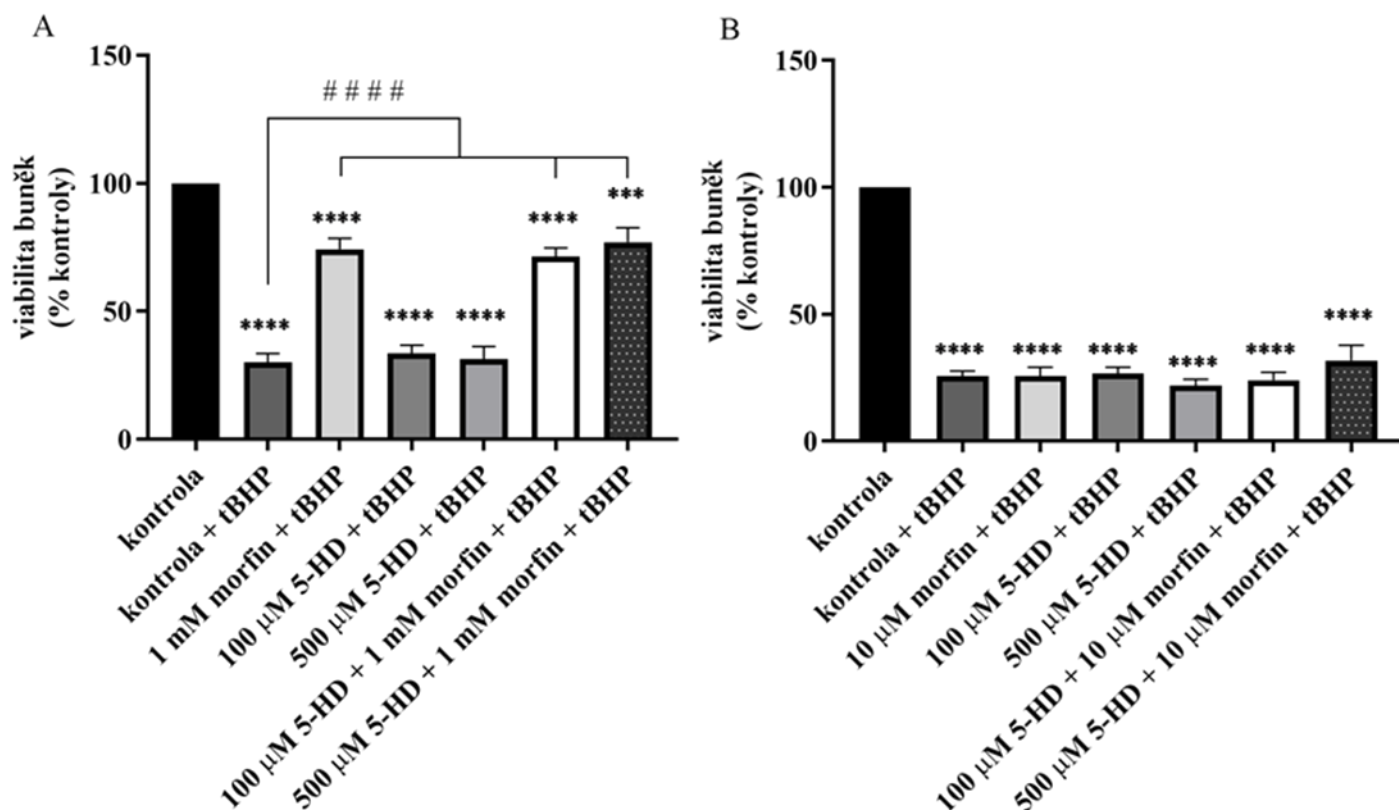
Všechny skupiny, u kterých byl vyvolán oxidativní stres, vykazovaly signifikantní snížení viability buněk oproti kontrole ($p < 0,001$; $p < 0,0001$) (obr. 7). V experimentech zaměřených na morfinovou prekondici s 1 mM morfinem, tBHP snížil viabilitu buněk na 30 ± 3 % u skupiny kontrola + tBHP, samotný 5-HD viabilitu buněk po působení tBHP prakticky neovlivnil (5-HD 100 μ M + tBHP na 33 ± 3 % a 5-HD 500 μ M + tBHP na 31 ± 5 %).

Preinkubace buněk s 1 mM morfinem opět signifikantně zvýšila viabilitu buněk následně vystavených tBHP (skupina 1 mM morfin + tBHP) narozdíl od neovlivněných buněk vystavených tBHP (kontrola + tBHP), viabilita buněk byla 74 ± 4 % oproti neovlivněným buňkám (kontrola). Použití inhibitoru 5-HD před vyvoláním oxidativního stresu tBHP u buněk ovlivněných 1mM morfinem nemělo žádný signifikantní vliv na viabilitu buněk v porovnání se samotnou preinkubací s morfinem (skupina 5-HD 100 μ M + morfin 1 mM + tBHP - viabilita 71 ± 3 % a skupina 5-HD 500 μ M + morfin 1 mM + tBHP - viabilita 77 ± 6 % kontroly) (obr. 7A). Pokusy s morfinovou prekondicí v jeho 10 μ M koncentraci neprokázaly žádný signifikantní vliv morfinu a 5-HD na viabilitu buněk po působení tBHP. Skupiny vykazovaly viabilitu buněk mezi 22 a 32 % oproti kontrole (kontrola + tBHP - 26 ± 2 %, morfin 10 μ M + tBHP - 26 ± 4 %, 5-HD 100 μ M + tBHP - 27 ± 3 %, 5-HD 500 μ M + tBHP - 22 ± 2 %, 5-HD 100 μ M + morfin 10 μ M + tBHP - 24 ± 3 % a 5-HD 500 μ M + morfin 10 μ M + tBHP - 32 ± 6 %) (obr. 7B).



Obrázek 6: Vliv inhibitorů a aktivátoru mKATP kanálu na viabilitu buněk

Test vlivu vybraných koncentrací morfinu (MOR) (A, B, C), diazoxidu (DIAZO) (C), 5-HD (A,B) a glybenclamidu (GLYB) (C) a jejich rozpouštědel, methanolu (METH) a DMSO (D), na viabilitu buněk. Procenta na ose y udávají relativní změnu buněčné viability u ovlivněných buněk oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr $\pm$ SEM z 4-6 nezávislých měření v pentaplikátech.

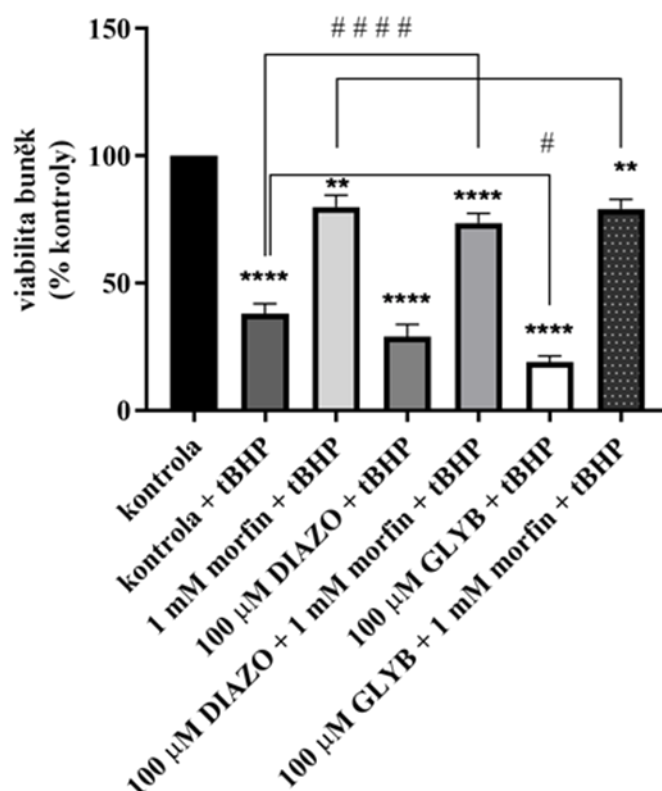


Obrázek 7: Efekt inhibitoru mKATP kanálu na morfinovou prekondici

Vliv inhibitoru 5-HD na viabilitu buněk po působení tBHP u neovlivněných a preinkubovaných buněk s 1 mM (A) a 10 μM (B) morfinem (MOR). Procenta na ose y udávají relativní změnu buněčné viability u ovlivněných buněk oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr ± SEM z 5 nezávislých měření v pentaplikátech. (** p < 0,01 oproti kontrole; *** p < 0,001 oproti kontrole; **** p < 0,0001 oproti kontrole; #### p < 0,0001 oproti kontrole + tBHP)

Další tentokrát nespecifický inhibitor KATP kanálů (glybenclamid) a aktivátor mKATP kanálu (diazoxid) byly použity pro detailnější studium vlivu mKATP kanálu na viabilitu buněk po působení oxidativního stresu a morfinovou prekondici (obr. 8). Působení tBHP vedlo u všech sledovaných skupin k signifikantnímu poklesu viability buněk oproti kontrole. Statistická analýza vzájemného srovnání skupin buněk ovlivněných tBHP prokázala statisticky významnou změnu pouze u skupin ovlivněných 1 mM morfinem a u skupiny glybenclamid + tBHP. U všech skupin buněk preinkubovaných s 1 mM morfinem došlo k signifikantnímu zvýšení viability oproti kontrole + tBHP (p < 0,0001). Samotné působení tBHP signifikantně snížilo viabilitu buněk na 38 ± 4 % kontroly. Inkubace buněk s diazoxidem a tBHP také snížilo signifikantně viabilitu buněk na 29 ± 5 % kontroly, při srovnání se skupinou kontrola + tBHP nebyl prokázán signifikantní rozdíl. Naopak působení glybenclamidu spolu s tBHP vyvolalo

vyšší snížení viability buněk. Viabilita buněk poklesla na 19 ± 3 % kontroly. Tato hodnota je signifikantně odlišná jak od samotné kontroly, tak i od skupiny kontrola + tBHP. Morfinová prekondice vyvolaná 24 hod. působením 1 mM morfinu zvýšila viabilitu buněk oproti kontrole + tBHP. Samotná morfinová prekondice (morfin 1 mM + tBHP) vedla ke snížení viability buněk na 80 ± 5 % kontroly. Použití diazoxidu nebo glybenclamidu nemělo žádný signifikantní vliv na morfinovou prekondici (porovnání skupin morfin 1 mM + tBHP a DIAZO 100 μ M + morfin 1 mM + tBHP nebo GLYB 100 μ M + morfin 1 mM + tBHP). Pokles viability buněk u těchto skupin byl na 74 ± 4 % resp. 79 ± 4 % kontroly.



Obrázek 8: Vliv aktivace a inhibice mKATP kanálu na morfinovou prekondici

Efekt diazoxidu (DIAZO), nebo glybenclamidu (GLYB) na viabilitu buněk po působení tBHP u neovlivněných a preinkubovaných buněk s 1 mM morfinem. Procenta na ose y udávají relativní změnu buněčné viability u ovlivněných buněk oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr $\pm$ SEM z 5 nezávislých měření v pentaplikátech. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ oproti kontrole; **** $p < 0,0001$ oproti kontrole; ### $p < 0,0001$ oproti kontrole + tBHP).

5.4. Role mKATP kanálu a morfinu v regulaci produkce ROS a mitochondriálního membránového potenciálu

Vliv mKATP kanálu, morfinu a zapojení mKATP kanálu v morfinové prekondici na regulaci produkce ROS a mitochondriálního potenciálu po navození oxidačního stresu pomocí 100 μ M

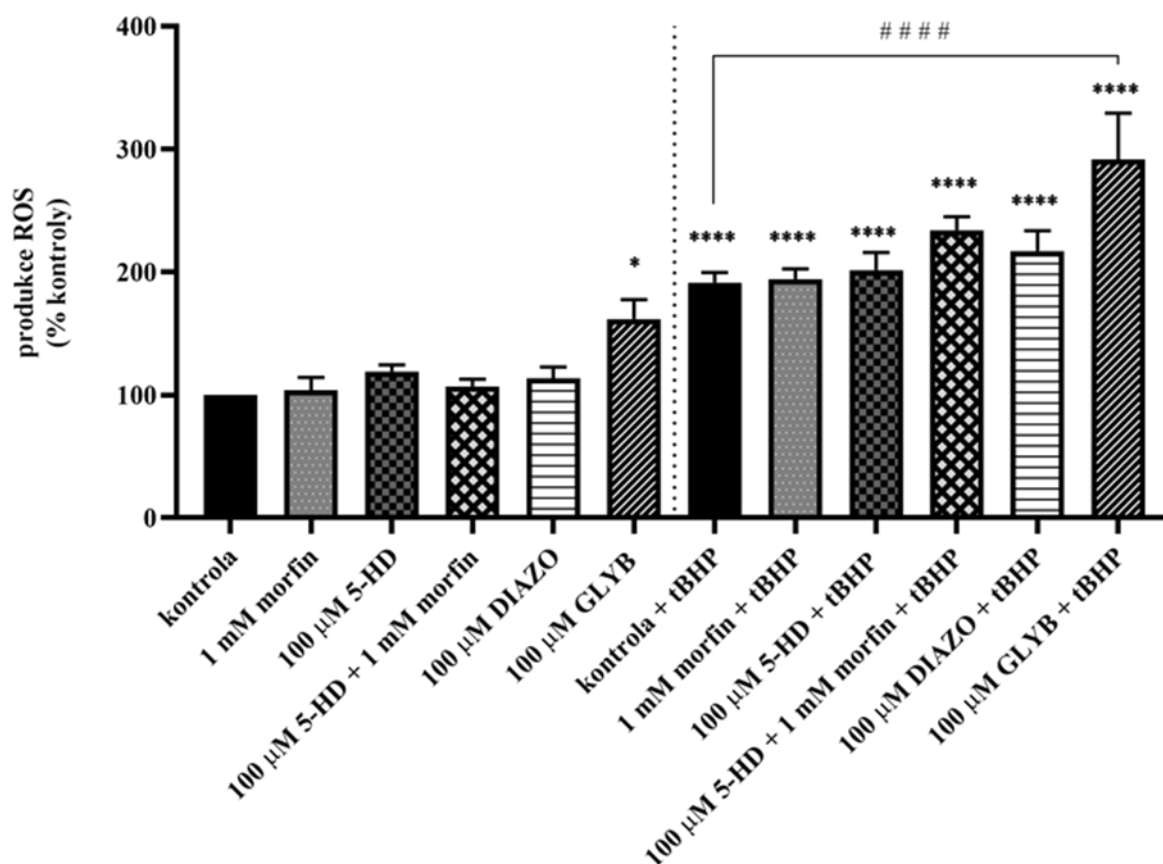
tBHP po dobu 1,5 hodiny byl stanoven metodou fluorescenční průtokové cytometrie. Role mKATP kanálu byla zkoumána pomocí selektivního inhibitoru mKATP kanálů (5-HD) v 100 μ M koncentraci, neselektivního inhibitoru KATP kanálů (glybenclamid) ve 100 μ M koncentraci, a pomocí selektivního aktivátoru mKATP kanálů (diazoxid) ve 100 μ M koncentraci. V rámci studia vlivu morfinu na mKATP kanál při morfinové prekondici byl i zde použit k 24 hodinovému ovlivnění buněk 1mM morfin. Změny v produkci ROS byly měřeny pomocí sondy DCF-DA v 20 μ M koncentraci a změny v mitochondriálním membránovém potenciálu byly měřeny pomocí sondy MitoTracker™ Red CMXRos v 100 nM koncentraci.

Vliv morfinu a mKATP kanálu na produkci ROS a mitochondriální membránový potenciálu po navození oxidačního stresu byl testován na těchto skupinách:

- kontrola
- buňky ovlivněné tBHP
- buňky ovlivněné morfinem
- buňky ovlivněné morfinem + tBHP
- buňky ovlivněné 5-HD
- buňky ovlivněné 5-HD + morfinem
- buňky ovlivněné 5-HD + morfinem + tBHP
- buňky ovlivněné diazoxidem
- buňky ovlivněné diazoxidem + tBHP
- buňky ovlivněné glybenclamidem
- buňky ovlivněné glybenclamidem + tBHP

Statistická analýza výsledků neprokázala u skupin bez tBHP signifikantní změny v produkci ROS, krom skupiny ovlivněné glybenclamidem, kde bylo zaznamenáno signifikantní zvýšení produkce ROS oproti kontrole. Produkce ROS u buněk ovlivněných glybenclamidem byla zvýšena na $162 \pm 16 \%$ ($p < 0,05$) oproti kontrole. Výsledky ostatních skupin vzhledem ke kontrole byly následující: morfin 1 mM - $104 \pm 10 \%$; 5-HD 100 μ M - $119 \pm 5 \%$; 5-HD 100 μ M + morfin 1 mM - $107 \pm 6 \%$ a diazoxid 100 μ M - $114 \pm 9 \%$. Při statistickém vyhodnocení dat bylo prokázáno signifikantní zvýšení produkce ROS u všech skupin inkubovaných s tBHP oproti kontrole ($p < 0,0001$). U skupiny kontrola + tBHP byla produkce ROS navýšena na $191 \pm 8 \%$ oproti kontrole, morfin 1 mM + tBHP na $194 \pm 8\%$, 5-HD 100 μ M + tBHP na $202 \pm 15 \%$, 5-HD 100 μ M + morfin 1 mM + tBHP na $234 \pm 11 \%$, diazoxid 100 μ M + tBHP na $217 \pm 16 \%$ a glybenclamid 100 μ M + tBHP na $292 \pm 38 \%$. Při vzájemném

porovnávání těchto skupin bylo zaznamenáno signifikantní zvýšení produkce ROS u skupiny glybenclamid + tBHP oproti kontrole + tBHP ($p < 0,0001$) (obr. 9).



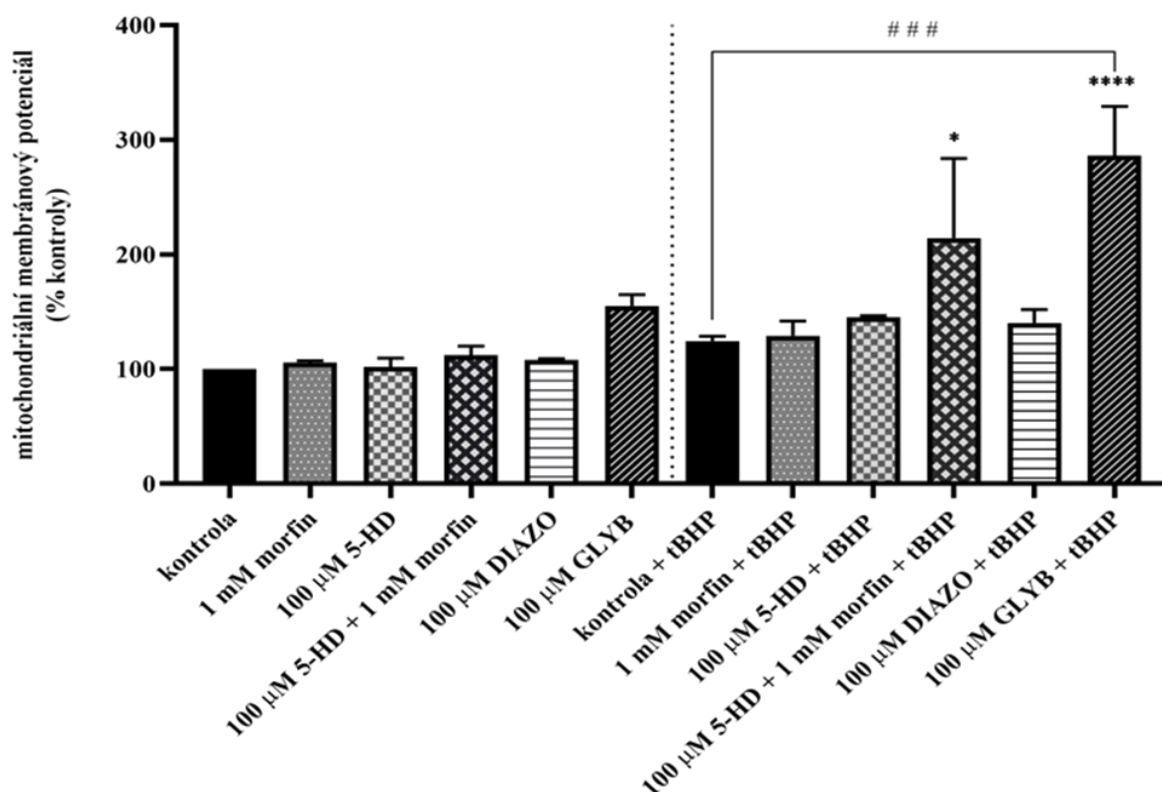
Obrázek 9: Vliv morfinu a mKATP kanálu na produkci ROS

Vliv morfinu (MOR), 5-HD, diazoxidu (DIAZO), a glybenclamidu (GLYB) na produkci ROS. Procenta na ose y udávají relativní změnu buněčné produkce ROS u ovlivněných buněk oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr $\pm$ SEM ze 3 nezávislých měření v triplicátech (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ oproti kontrole; #### $p < 0,0001$ oproti kontrole + tBHP).

Statistická analýza získaných dat neprokázala u skupin bez ovlivnění tBHP signifikantní změny mitochondriálním membránovým potenciálem. Naměřené hodnoty mitochondriálního membránového potenciálu byly u jednotlivých skupin v porovnání s kontrolou následující:

morfin 1 mM - 105 ± 2 %; 5-HD 100 μM - 102 ± 8 %; 5-HD 100 μM + morfin 1 mM - 112 ± 8 %; diazoxid 100 μM - 108 ± 1 % a glybenclamid 100 μM - 155 ± 10 %. U skupin inkubovaných s tBHP nebyla zaznamenána signifikantní změna v membránovém potenciálu mitochondrií, kromě skupin 5-HD 100 μM + morfin 1 mM + tBHP ($p < 0,05$) a glybenclamid + tBHP ($p < 0,0001$) (obr. 10). Ve skupině 5-HD 100 μM + morfin 1 mM + tBHP bylo detekováno zvýšení mitochondriálního membránového potenciálu na 214 ± 70 % oproti kontrole a u skupiny glybenclamid 100 μM + tBHP zvýšení na 287 ± 43 % oproti kontrole.

Hodnoty mitochondriálního membránového potenciálu vzhledem ke kontrole byly u ostatních nesignifikantních skupin tyto: kontrola + tBHP - 125 ± 4 %; morfin 1 mM + tBHP - 129 ± 13 %; 5-HD 100 μ M + tBHP - 145 ± 1 %; diazoxid 100 μ M + tBHP - 141 ± 12 %. Vzájemné porovnání skupin ovlivněných tBHP ukázalo signifikantní zvýšení mitochondriálního membránového potenciálu pouze u skupiny glybenclamidu 100 μ M + tBHP oproti kontrola + tBHP ($p < 0,001$). Inkubace buněk s protonovým ionoforem FCCP snížila mitochondriální membránový potenciál na 60 %.

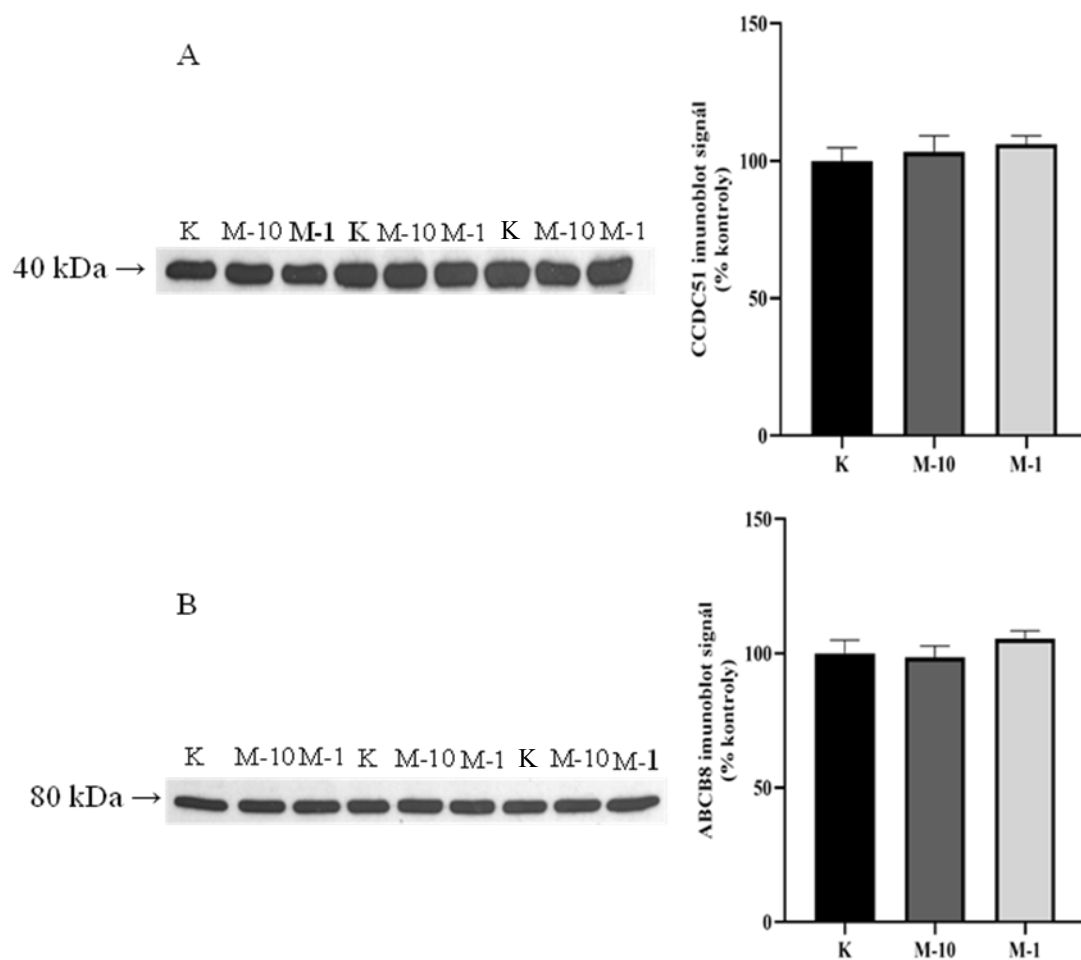


Obrázek 10: Vliv morfinu a mKATP kanálu na mitochondriální membránový potenciál

Vliv morfinu (MOR), 5-HD, diazoxidu (DIAZO), a glybenclamidu (GLYB) na membránový potenciál mitochondrií. Procenta na ose y udávají relativní změnu mitochondriálního membránového potenciálu u ovlivněných buněk oproti kontrole. Výsledky reprezentují průměr $\pm$ SEM ze 3 nezávislých měření v triplicátech (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ oproti kontrole; ### $p < 0,001$ oproti kontrole + tBHP).

5.5. Vliv morfinu na expresi podjednotek mKATP kanálu

Obě podjednotky tvořící mKATP kanál byly detekovány u kontrolní skupiny buněk a u skupin buněk ovlivněných morfinem v 10 μ M a 1 mM koncentraci metodou SDS-PAGE. Nebyl prokázán signifikantní vliv 24 hod. inkubace s morfinem ani v jedné jeho koncentraci na expresi obou podjednotek (obr. 11).



Obrázek 11: Efekt morfinu na expresi podjednotek mKATP kanálu

Reprezentativní imunoblotty (vlevo) a grafy exprese (vpravo) sledovaných proteinů CCDC51 (A) a ABCB58 (B) u diferencovaných buněk kontrolních (K), ovlivněných 10 μ M morfinem (M-10) a 1 mM morfinem (M-1). Procenta na osách y udávají relativní míru exprese jednotlivých proteinů oproti kontrole. Data byla normalizována na množství β -aktinu. Výsledky reprezentují průměr $\pm$ SEM ze 3 nezávislých ovlivnění. Každé ovlivnění bylo stanoveno 2x.

6. Diskuze

Buňky SH-SY5Y buněčné linie jsou poměrně dlouho využívány jako standartní model pro výzkum neuronů. Důvodů využití těchto buněk je několik. SH-SYHY buňky se dají relativně snadno a levně kultivovat a díky rychlé expanzi nediferenciovaných SH-SY5Y buněk mohou poskytovat velké množství buněk pro experimenty. Poněvadž se jedná o lidskou neuroblastomovou linii, exprimují tak řadu proteinů a izoform proteinů specifických pro člověka, které při použití primárních kultur hlodavců nejsou přítomny. Jelikož jsou tyto buňky považovány za buněčnou linii, odpadají tak i etické problémy spojené s kultivací primárních lidských neuronů.

Mezi jejich nesporné výhody také patří možnost jejich snadné diferenciaci v plně maturované neurony rozdílných fenotypů. Tím může být cholinergní, adrenergní či dopaminergní fenotyp. Výsledný fenotyp je možné ovlivnit výběrem příslušné diferenciací metody. Nejpoužívanější a nejlépe charakterizovanou diferenciací metodou je přidání 10 μ M RA do média s nízkým obsahem séra po dobu minimálně 3-5 dnů (Påhlman et al., 1984; Cheung et al., 2009; Agholme et al., 2010). Z těchto a výše zmíněných důvodů byla vybrána SH-SY5Y buněčná linie a obdobný diferenciací protokol i pro naše experimenty. Diferenciace buněk byla prokázána pomocí SDS-PAGE elektroforézy detekcí zvýšené exprese markerů plně maturovaných nervových buněk. K ověření diferenciaci buněk byly vybrány standartní markery plně maturovaných neuronů: NSE, TH a synaptophysin. Bylo prokázáno signifikantní zvýšení exprese těchto markerů u buněk SH-SY5Y linie ovlivněných 10 μ M RA po dobu 10 dnů. Uvedené výsledky jsou v souladu s literaturou, která popisuje změny v expresi diferenciací markerů (Cheung et al., 2009; Cockova et al., 2019). Diferencované buňky se liší od nediferencovaných i svojí morfologickou stavbou. Diferencované SH-SY5Y buňky tvoří dlouhé větvičky se výběžky (neurity) a nemají tendenci růst ve shlucích na rozdíl od nediferencovaných buněk (Lopes et al., 2010 b; Cockova et al., 2019). Tento morfologický rozdíl byl rovněž zřetelně pozorován i v našem diferenciací protokolu (obr. 2).

Od roku 1996, kdy Schulz et al. poprvé uvedli, že morfin je schopen významně snížit poškození tkáně, ke kterému dochází při ischemii myokardu (Schultz et al., 1996), byla provedena řada studií, které se snažily vysvětlit mechanismy, jež jsou základem cytoprotekce vyvolané morfinem proti oxidativnímu stresu vznikajícím při ischemii či ischemicko/reperfuzním poškození. Literatura však udává rozporuplné výsledky, jelikož byl prokázán pro-oxidativní i protektivní vliv morfinu, a to v závislosti na různých koncentracích a době působení. Podle

dostupných zdrojů závisí na faktorech, jako je druh, věk, pohlaví, typ tkáně, dávka a délka expozice morfinu a současné podávání jiných látek (Skrabalova et al., 2013).

Jedním z cílů této práce proto bylo určit, zda chronické 24 hodinové působení morfinu v koncentracích 1 mM, 100 μ M, 10 μ M a 1 μ M má protektivní vliv proti oxidativnímu stresu vyvolaného působením stabilního analogu H_2O_2 - tBHP u diferencovaných buněk linie SH-SY5Y. Již dříve bylo prokázáno, že tBHP zvyšuje oxidativní stres u SH-SY5Y buněk a může tak vést k apoptotické až nekrotické smrti buněk (Krishnamurthy et al., 2000; Choi et al., 2011). Pozorovali jsme, že vystavení buněk SH-SY5Y rostoucím koncentracím tBHP vedlo k poklesu viability buněk v závislosti na dávce. Pro účely této práce jsme zvolili 10 mM koncentraci tBHP působící na diferencované SH-SY5Y buňky po dobu 4 hodin, jelikož tato koncentrace a čas snižovaly viabilitu buněk měřenou pomocí MTT testu na 48 %. Samotný morfin (ani v koncentraci 1 mM) neměl negativní vliv na životaschopnost buněk, ale ve všech případech snižoval nepříznivý účinek tBHP. Tento protektivní efekt však výrazně závisel na koncentraci účinkujícího morfinu. Prokazatelně signifikantní protektivní účinek byl pozorován v případě ovlivnění diferencovaných buněk 100 μ M a 1 mM morfinem. V 1 mM koncentraci morfinu byla zjištěna o 41 % zvýšená viabilita buněk oproti neovlivněným buňkám po působení tBHP, v případě 100 μ M koncentrace byl tento rozdíl 16 %. U koncentrací 10 μ M a 1 μ M morfinu nebyl zaznamenán protektivní efekt dostatečně vysoký, aby dosáhl hladiny statistické významnosti. Srovnání s literaturou věnující se vlivu morfinu na oxidativní stres je poměrně obtížné, jelikož žádná z dostupných prací nevyužívala podobného experimentálního modelu nastavení indukce oxidačního stresu. Nicméně studie zabývající se cytoprotektivním účinkem morfinu u různých typů buněk po působení tBHP či u jiných experimentálních modelů vyvolávajících oxidativní poškození prokázaly obdobný cytoprotektivní účinek morfinu. V závislosti na experimentálním modelu se sice lišila účinnost morfinu, ale cytoprotektivní účinek byl prokázán. 1 mM morfin byl též popsán jako nejúčinnější protektivní koncentrace v práci Skrabalova et al. Morfin zde působil jako silný antioxidant, který výrazně zvýšil celkovou antioxidační kapacitu buněk H9c2 a zabránil zvýšení tvorby ROS, karbonylace proteinů i peroxidace lipidů, ke které by jinak došlo v přítomnosti tBHP, který zde byl použit pro vyvolání oxidačního stresu (Skrabalova et al., 2018 b). Protektivní účinky morfinu prokázal i v modelu poškození SH-SY5Y buněk 6-hydroxydopaminem. V této studii také testovali vliv samotného morfinu na viabilitu buněk a v nejvyšší 100 μ M použité koncentraci morfinu nezjistili vliv na přežití buněk (Elyasi et al., 2014). Morfin prokázal své protektivní účinky i v modelu poškození doxorubicinem u SH-SY5Y buněk. Morfin v 400 μ M koncentraci nesnížil

viabilitu buněk, ale v kombinaci s doxorubicinem snížil jeho toxicitu (Lin et al., 2007). Vliv vysokých koncentrací samotného morfinu na snížení viability nediferencovaných SH-SY5Y buněk byl prokázán po 48 hodinách inkubace v koncentracích morfinu 0,5 - 4 mM. Nicméně 1 mM koncentrace morfinu vyvolala pouze zhruba 30 % snížení viability buněk a apoptóza nebyla zvýšená (Lin et al., 2009). Přestože existují studie, které ukazují, že vysoké dávky morfinu mohou vyvolat oxidační stres, snížení viability buněk až apoptózu u různých typů buněk (Hatsukari et al., 2007; Lin et al., 2009), v našich experimentálních podmínkách 1 mM koncentrace morfinu nevykázala negativní vliv na viabilitu buněk a naopak se ukázala být nejúčinnější pro zvýšení rezistence buněk k oxidativnímu stresu a jeho škodlivým účinkům. Jak už bylo zmíněno výše morfin nelze jednoduše považovat za pro-oxidační nebo antioxidační sloučeninu, protože výsledný efekt podávání morfinu mohou ovlivnit různé faktory, jako je dávka, doba expozice, typ a druh tkáně (Skrabalova et al., 2013). Je důležité zmínit, že např. heroin (blízce příbuzný derivát morfinu) u myši zvýšil produkci ROS a oxidační poškození proteinů a lipidů v mozku a játrech, ale ne v srdci, což naznačuje lepší toleranci opioidů srdeční tkáně (Flemming, 2010). Tuto teorii podporují i výsledky proteomické analýzy srdce potkanů po dlouhodobé expozici morfinu (Arabian et al., 2018 b).

Možné vysvětlení vyšší odolnosti SH-SY5Y buněk k oxidativnímu poškození by mohlo souviset i se samotnou jejich diferenciací. Podle studie L. Schneider et al. se zvyšuje rezistence SH-SY5Y buněk k oxidativnímu stresu po diferenciaci do neuronového typu buněk (Schneider et al., 2011). Tuto myšlenku podporují i studie, které poukazují na fakt, že RA používaná při diferenciaci zvyšuje produkci ROS v nediferenciováných SH-SY5Y buňkách a indukuje tak jejich diferenciaci (de Bittencourt Pasquali et al., 2016; Kunzler et al., 2017). Díky tomuto efektu RA je možné, že diferenciované buňky získají vyšší rezistenci k oxidativnímu stresu, podobným mechanismem, jaký je popisován u ischemické prekondice a je přisuzován i morfinové prekondici. Diferenciací RA získaná zvýšená rezistence buněk k oxidativnímu stresu pak by mohla vysvětlovat proč v našich experimentálních podmínkách diferencované SH-SY5Y buňky reagovali sníženou viabilitou až na vyšší koncentrace tBHP, než je v literatuře častěji popisováno. Je možné, že při tomto nastavení už oxidační stres mohl překročit práh diferenciací RA získané zvýšené rezistence k oxidativnímu stresu, což ve výsledku vedlo ke snížené viabilitě buněk, jež jsme ověřili pomocí MTT testu. Diferenciované SH-SY5Y buňky pak v tomto nastavení mohly reagovat zvýšenou viabilitou až při relativně vysoké koncentraci 1 mM morfinu, jelikož jen tato koncentrace byla schopna ještě zvýšit a aktivovat protektivní mechanismy proti oxidačnímu stresu, které doposud nebyli aktivovány diferenciací

RA. Tuto myšlenku by mohla potvrzovat i námi získaná data, že samotný 1 mM morfin nesnižoval viabilitu buněk u skupin neovlivněných tBHP, jelikož RA diferenciované buňky měly již získanou zvýšenou rezistenci k oxidačnímu stresu a hladinám ROS, které morfin mohl v této koncentraci vyvolávat.

Dalším rozhodujícím faktorem je i doba působení tBHP na SH-SY5Y buňky. Modely se v tomto parametru liší. Nízké 40 - 100 μ M koncentrace tBHP vyvolávaly snížení viability buněk typicky po 24 hodinovém působení (Petcharat et al., 2015; Cai et al., 2016). Vyšší 300 μ M koncentrace tBHP byla potřeba k obdobnému účinku na viabilitu buněk při době působení 12 hodin (Choi et al., 2011). Existuje i model přechodného působení tBHP. V tomto modelu přidali 5 mM tBHP k buňkám na 40 min a viabilitu buněk měřili až po další inkubaci buněk bez tBHP. Efekt tohoto impulsu tBHP se projevil na snížené viabilitě buněk až po 6 hodinách inkubace (Krishnamurthy et al., 2000). Z tohoto pohledu se zdá, že pro námi zvolené krátké 4 hodinové působení tBHP byla jeho 10 mM koncentrace odpovídající.

V naší práci jsme testovali, zda i samotný morfin nepřispívá k protektivnímu efektu svými anti-oxidačními účinky jakožto scavenger, které zmiňuje literatura. Studie Lee et al. prokázala antioxidační scavengerový účinek morfinu, kdy nejlepších výsledků bylo dosaženo při 200 μ M morfinu (Lee et al., 2004). Podobný výsledek pozorovali i ve studii od Gülçina et al. (Gülçin et al., 2004). Při vzájemném srovnání experimentálních skupin buněk, u kterých bylo vyměněné médium za čerstvé bez morfinu před působením tBHP a skupin buněk, kde k výměně média nedošlo a morfin tak byl přítomen i během působení tBHP pro navození oxidačního stresu, jsme však nezaznamenali signifikantní rozdíl ve změně viability buněk v žádné z měřených koncentrací morfinu. Z výsledku tohoto srovnání vyvozujeme, že případný scavengerový efekt morfinu není v protektivním účinku morfinu v našem experimentálním modelu významný.

Účinky morfinu jsou tradičně spojovány s aktivací opioidních receptorů, kdy se na protektivním efektu podílí jak μ - tak δ -opioidní receptory (Zhang et al., 2001; Gross, 2003; Zhao et al., 2006). Některé studie ukázaly, že do morfinové prekondice a její protektivní kaskády by mohly být zapojeny mKATP kanály (Liang et al., 1999; McPherson et al., 2001; Arabian et al., 2018 b). Naším dalším cílem pak bylo ověřit účast mKATP kanálů v morfinové prekondici u diferencovaných SH-SY5Y buněk. Účast mKATP kanálů byla ověřována pomocí selektivního inhibitoru mKATP kanálů 5-HD, pomocí neselektivního inhibitoru KATP kanálů glybenclamidu a pomocí aktivátoru mKATP kanálů diazoxidu. Bylo prokázáno, že aktivátory mKATP kanálů jsou účinné v prevenci apoptózy a nekrózy v různých patologických stavech

prostřednictvím regulace produkce ROS v mitochondriích (Garlid, 1996; Costa et al., 2008; Akopova, 2017). Změna v permeabilitě mKATP kanálů má zásadní roli v indukci cytoprotektivity, jelikož otevření mKATP kanálů může aktivovat dráhy vedoucí k inaktivaci mPTP a zvýšit přežití buněk proti oxidačnímu stresu (Liang et al., 1999; Costa et al., 2006, 2008). Za aktivací mPTP stojí akumulace vápenatých iontů v mitochondriální matrix, která je průvodním jevem I/R. Stimulace mKATP kanálů by měla vyvolávat mírnou depolarizaci mitochondriálního potenciálu, což snižuje hnací sílu pro influx Ca^{2+} , čímž zabraňuje vápenatému přetížení mitochondrií a zabraňuje tak aktivaci mPTP a následné apoptózy (Ishida et al., 2001; Wang et al., 2001). Protektivní účinky aktivátorů mKATP kanálů jako je diazoxid potvrzují i výsledky studie zabývající se jeho neuroprotektivním efektem. V této studii diazoxid dokázal zvýšit viabilitu NSC-34 motoneuronů, u kterých bylo vyvoláno poškození glutamátem, oxidativním i zánětlivým insultem (Virgili et al., 2013). V našich experimentálních podmínkách diazoxid nejevil žádný signifikantní protektivní účinek proti oxidačnímu poškození. Inhibice mKATP kanálů by naopak teoreticky měla zabraňovat protektivnímu efektu a snižovat viabilitu buněk při indukci oxidativního stresu. Negativní vliv inhibitorů mKATP kanálu byl prokázán na modelu primárních kortikálních neuronů, kde přidání inhibitoru vedlo k vyšší smrti neuronů po působení glukózo-kyslíkové deprivace. V tomto modelu byl též prokázán pozitivní vliv na viabilitu buněk aktivací mKATP kanálu diazoxidem (Liu et al., 2016). V našich experimentálních podmínkách však po přidání 5-HD před vyvoláním oxidativního stresu tBHP nebylo pozorováno signifikantní snížení viability v porovnání s kontrolou ovlivněnou pouze tBHP. Naopak neselektivní inhibitor KATP kanálu glybenclamid signifikantně snížil viabilitu buněk oproti kontrole inkubované pouze s tBHP. Zdůvodnění, proč diazoxid či 5-HD nejevily žádný signifikantní vliv na viabilitu buněk by mohl souviset s tím, že atak tBHP byl na tento sofistikovaný mechanismus možná příliš silný a tento mechanismus tak nebyl dostatečný. Existují studie, které aktivaci mKATP kanálu přisuzují mitochondriální proteinkináze $\text{C}\epsilon_1$ ($\text{PKC}\epsilon_1$). $\text{PKC}\epsilon_1$ dle této teorie aktivuje mKATP, což následně vede ke zvýšené produkci ROS. Zvýšená koncentrace ROS aktivuje druhou izoformu proteinkinázy $\text{PKC}\epsilon_2$, která svou aktivitou inhibuje otevření mPTP (Costa et al., 2008). Je možné, že mírně zvýšená hladina ROS způsobená RA, vede k pozitivní zpětné vazbě, kdy ROS pomocí PKC dále aktivují mKATP kanály a aktivace mKATP může vyvolat další produkci volných radikálů. Morfin přes aktivaci opioidních receptorů imituje kardioprotektivní efekt ischemické prekondice. Tohoto efektu morfin pravděpodobně dosahuje skrze aktivaci $\delta 1$ opioidních receptorů, což v důsledku zapříčiní otevření mKATP kanálu (Liang et al., 1999; McPherson et al., 2001). Mechanismus, kterým opioidní receptory aktivují mKATP kanál není

stále jasně osvětlen. Arabian et al. prokázali, že v případě morfinové prekondice podání selektivního inhibitoru 5-HD před vyvoláním oxidativního stresu vedlo ke zrušení protektivního účinku morfinové prekondice u hipokampálních CA-1 neuronů myšího modelu (Arabian et al., 2018 a). V modelu anoxie/reoxigenace u kultivovaných hepatocytů potkana bylo prokázáno, že podání morfinu před vyvoláním anoxie/reoxigenace zvýšilo viabilitu buněk. Tento efekt byl zablokován podáním inhibitorů mKATP kanálu 5-HD nebo glybenclamidu. Podání samotných inhibitorů bez morfinu neovlivnilo viabilitu buněk (Kim et al., 2006). Obdobné výsledky byly získány na modelu izolovaných endoteliálních buněk z plicní aorty. Morfinová prekondice snížila apoptózu buněk po anoxii/reoxigenaci a tento efekt byl opět zablokován podáním 5-HD (Ding et al., 2016). V našem experimentálním uspořádání se nepodařilo prokázat vliv inhibice mKATP kanálu 5-HD na morfinovou prekondici. 5-HD ani v jedné z testovaných koncentrací signifikantně nesnížil vliv preinkubace buněk s morfinem na viabilitu buněk po vyvolání oxidativního stresu tBHP. Tento výsledek může souviset s tím, že ani samotné inhibitory a aktivátor mKATP kanálu neměly vliv na viabilitu buněk při oxidačním stresu. V rámci studia protektivních účinků morfinu a účasti mKATP kanálu v morfinové prekondici bylo důležité zaměřit se na měření produkce ROS. Jak bylo zmíněno výše ROS hrají roli v navození protekce buněk proti oxidativnímu stresu, a naopak při vysokém množství ROS dochází k apoptóze buněk. Množství ROS bylo měřeno pomocí průtokové cytometrie. K sérii těchto experimentů bylo nutné snížit působení tBHP. K vyvolání oxidačního stresu byl tBHP aplikován v 100 μ M koncentraci po dobu jedné hodiny. 10 mM koncentrace interagovala s fluorescenční sondou DCF-DA. Výsledky našeho měření produkce ROS ukázaly, že preinkubace s 1 mM morfinem u diferencovaných SH-SY5Y buněk signifikantně nemění produkci ROS. Tento výsledek podporuje výsledky stanovení viability buněk. V našem experimentálním uspořádání morfinová prekondice vyvolaná 1 mM koncentrací morfinu nemá pro-oxidativní účinky. Zvýšená produkce ROS působením morfinu byla nicméně u SH-SY5Y buněk v některých studiích detekována (Ma et al., 2015). Tento rozdíl může být způsoben experimentálním uspořádáním. V našem případě jsme zjišťovali produkci ROS až po morfinové prekondici, v uvedené práci ji sledovali v průběhu působení morfinu. Naopak v práci Lin a kol. 200 μ M morfin po 24 hod. působení změny v množství ROS nevyvolal (Lin et al., 2007). Aktivátor diazoxid a selektivní inhibitor 5-HD mKATP kanálu také signifikantně neovlivnily produkci ROS. Naopak ovlivnění buněk glybenclamidem signifikantně zvýšilo produkci ROS vzhledem ke kontrole. Vyvolání oxidativního stresu podáním tBHP vedlo k masivní produkci ROS, produkce ROS se téměř zdvojnásobila oproti neovlivněné kontrole, což je srovnatelné s literaturou (Cai et al., 2016). Výsledky našich měření ukázaly, že

prekondice morfinem nesnižuje produkci ROS po vyvolání oxidačního stresu tBHP. Preinkubace buněk s 1 mM morfinem neměla signifikantní vliv na produkci ROS po podání tBHP v porovnání s kontrolou s tBHP. Morfin v našem experimentálním uspořádání tedy neměl protektivní účinek z hlediska snížení produkce ROS. Protektivní účinek morfinové prekondice může být zprostředkován na jiné úrovni např. aktivací antioxidantních enzymů (CAT), změnou poměru pro- a proti- apoptických proteinů Bax a Bcl-2 či dalších signalizačních kaskád (Arabian et al., 2018 a; Skrabalova et al., 2018 b). Také ovlivnění buněk aktivátorem diazoxidem a selektivním inhibitorem 5-HD nezměnilo produkci ROS ani v případě samotných ligandů, tak i po působení tBHP. Produkce ROS u buněk ovlivněných neselektivním inhibitorem KATP kanálu glybenclamidem po působení tBHP byla signifikantně vyšší než u neovlivněných buněk po tBHP. Z našeho pohledu nejdůležitější experimentální skupina buněk, která podstoupila morfinovou prekondici a byla ovlivněna 5-HD po působení tBHP nevykazovala žádný signifikantní rozdíl v produkci ROS v porovnání s morfinem s tBHP. Tyto výsledky odpovídají výsledkům měření viability buněk, kde také nebyl prokázán vliv změny aktivity mKATP kanálu na viabilitu buněk a ani v případě morfinové prekondice. Zvýšená produkce ROS po působení tBHP u buněk ovlivněných glybenclamidem je v souladu se zjištěním, že stejná kombinace látek vedla k jejich snížené viabilitě.

Na zvýšenou aktivaci mKATP kanálů morfinem by mohly poukazovat výsledky z našeho měření mitochondriálního membránového potenciálu. Snížení mitochondriálního potenciálu morfinem mohlo být vyrovnáno zvýšenou aktivitou mechanismů, které vrátily mitochondriální potenciál zpět na normální úroveň, přes zpětnovazebnou smyčku. Inhibice mKATP kanálů prostřednictvím 5-HD mohla u skupiny předem inkubované s morfinem vyvolat zvýšení mitochondriálního potenciálu po vyvolání oxidačního stresu tBHP, jelikož mechanismy dříve reagující na snížení membránového mitochondriálního potenciálu mohly být v této situaci kvůli předešlému působení morfinu více aktivované a potenciál tak naopak zvyšovaly.

Vliv morfinu na mKATP kanál jsme sledovali také na úrovni exprese jeho podjednotek. Metodou Western blot jsme detekovali dvě podjednotky mKATP kanálu, a to CCDC51 a ABCB8 po 24 hodinovém působení 10 μ M a 1 mM morfinu. Ani jedna podjednotka nevykazovala signifikantní změnu v expresi po působení morfinu.

7. Závěr

V naší práci jsme se věnovali vlivu chronického působení morfinu na přežití buněk po působení oxidativního stresu. Jako vhodný model k řešení tohoto tématu byla zvolena neuroblastomová linie SH SY5Y buněk, které byly diferencovány do stavu plně maturovaných neuronů. Diferenciace buněk byla ověřena změnami v expresi zvolených markerů diferenciace. U všech zvolených diferenciačních markerů byl potvrzen signifikantní vysoký nárůst exprese, čímž byla diferenciace SH-SY5Y buněk potvrzena.

Hlavním cílem naší práce bylo objasnit vliv chronické morfinové prekondice na viabilitu diferencovaných SH-SY5Y buněk po působení oxidativního stresu, který byl navozen tBHP. Výsledky prokázaly, že dlouhodobý vliv morfinu na buňky má protektivní účinky a navozuje rezistenci k vyvolanému oxidativnímu stresu. Nejvyšší nárůst ve viabilitě buněk byl pozorován u 1 mM koncentrace morfinu.

Recentní výzkumy ukazují, že do protektivního účinku morfinové prekondice jsou zapojeny i mKATP kanály, jakožto jeden z cílů signálních drah morfinem aktivovaných opioidních receptorů. Dalším naším cílem bylo ověřit jejich účast v morfinové prekondici a vliv jejich aktivace a inhibice na viabilitu buněk po působení oxidačního stresu. V naší práci se nám nepodařilo prokázat, že by chronické působení morfinu mělo vliv na aktivaci mKATP a ani jejich přímé zapojení do protektivních drah.

Posledním z cílů naší práce bylo analyzovat vliv morfinové prekondice a mKATP kanálu na produkci ROS a mitochondriální membránový potenciál po působení tBHP. Ani v tomto bodě se nám nepodařilo prokázat signifikantní rozdíly v produkci ROS a změně mitochondriálního membránového potenciálu jakožto faktorů majících vliv na viabilitu buněk po působení oxidativního stresu.

Podařilo se nám tedy prokázat protektivní vliv morfinové prekondice na buněčnou viabilitu po působení oxidativního stresu vyvolaného tBHP u diferencovaných buněk SH-SY5Y linie. Nicméně účast mKATP kanálu v morfinové prekondici a i samotný vliv tohoto kanálu na přežití buněk se nám v našem experimentálním uspořádání prokázat nepodařilo. Morfin, který má pleiotropní účinky, působil i na jiné než námi zkoumané ochranné mechanismy, což ve výsledku vedlo k vyšší viabilitě buněk proti účinkům oxidativního stresu.

Porozumění mechanismu morfinové prekondice a jejího protektivního vlivu na buňky vystavené oxidačnímu stresu by pak mohlo být využito pro potenciální klinické použití u ischemického poškození mozku a mnohých onemocnění spojených s oxidativním stresem. V oblasti této problematiky tak bude nutné provést ještě řadu studií.

8. Literatura

Abdel-Zaher, A. O.; Abdel-Rahman, M. S.; ELwasei, F. M., 2010: Blockade of nitric oxide overproduction and oxidative stress by *Nigella sativa* oil attenuates morphine-induced tolerance and dependence in mice. *Neurochemical research.*, **35**, 1557–1565.

Abdulkhaleq, F. M.; Alhussainy, T. M.; Badr, M. M.; Khalil, A. A. A.; Gammoh, O.; Ghanim, B. Y.; Qinna, N. A., 2018: Antioxidative stress effects of vitamins C, E, and B12, and their combination can protect the liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Drug Design, Development and Therapy.*, **12**, 3525.

Agholme, L.; Lindström, T.; Kågedal, K.; Marcusson, J.; Hallbeck, M., 2010: An in vitro model for neuroscience: differentiation of SH-SY5Y cells into cells with morphological and biochemical characteristics of mature neurons. *Journal of Alzheimer's disease.*, **20**, 1069–1082.

*Akopova, O., 2017: Mitochondrial K (ATP) Channels Opening: Pathways of Cytoprotection. *Open Access Journal of Toxicology.*, **1**.

Almeida, M. B. de; Costa-Malaquias, A.; Nascimento, J. L. M. do; Oliveira, K. R.; Herculano, A. M.; Crespo-López, M. E., 2014: Therapeutic concentration of morphine reduces oxidative stress in glioma cell line. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.*, **47**, 398–402.

Alrashidi, H.; Eaton, S.; Heales, S., 2021: Biochemical characterization of proliferative and differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Parkinson's disease. *Neurochemistry International.*, **145**, 105009.

Amini-Khoei, H.; Hosseini, M. J.; Momeny, M.; Rahimi-Balaei, M.; Amiri, S.; Haj-Mirzaian, A.; Khedri, M.; Jahanabadi, S.; Mohammadi-Asl, A.; Mehr, S. E., 2016: Morphine attenuated the cytotoxicity induced by arsenic trioxide in H9c2 cardiomyocytes. *Biological trace element research.*, **173**, 132–139.

Arabian, M.; Aboutaleb, N.; Soleimani, M.; Mehrjerdi, F. Z.; Ajami, M.; Pazoki-Toroudi, H., 2015: Role of morphine preconditioning and nitric oxide following brain ischemia reperfusion injury in mice. *Iranian journal of basic medical sciences.*, **18**, 14.

Arabian, M.; Aboutaleb, N.; Soleimani, M.; Ajami, M.; Habibey, R.; Rezaei, Y.; Pazoki-Toroudi, H., 2018a: Preconditioning with morphine protects hippocampal CA1 neurons from

ischemia–reperfusion injury via activation of the mTOR pathway. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.*, **96**, 80–87.

Arabian, M.; Aboutaleb, N.; Soleimani, M.; Ajami, M.; Habibey, R.; Pazoki-Toroudi, H., 2018b: Activation of mitochondrial KATP channels mediates neuroprotection induced by chronic morphine preconditioning in hippocampal CA-1 neurons following cerebral ischemia. *Advances in Medical Sciences.*, **63**, 213–219.

Arabian, M.; Aboutaleb, N.; Ajami, M.; Habibey, R., 2019: Interaction of mTOR and iNOS pathways in protection against Ischemia/Reperfusion injury. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR.*, **18**, 785.

Babior, B. M.; Kipnes, R. S.; Curnutte, J. T., 1973: Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of clinical investigation.*, **52**, 741–744.

Batot, G.; Martel, C.; Capdeville, N.; Wientjes, F.; Morel, F., 1995: Characterization of neutrophil NADPH oxidase activity reconstituted in a cell-free assay using specific monoclonal antibodies raised against cytochrome b558. *European journal of biochemistry.*, **234**, 208–215.

Becker, L. B., 2004: New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular research.*, **61**, 461–470.

Biedler, J. L.; Helson, L.; Spengler, B. A., 1973: Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research.*, **33**, 2643–2652.

Biedler, J. L.; Roffler-Tarlov, S.; Schachner, M.; Freedman, L. S., 1978: Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer research.*, **38**, 3751–3757.

Borges, R. S.; Vale, J. K. L.; Pereira, G. A. N.; Veiga, A. A. S.; Junior, J. B.; da Silva, A. B. F., 2016: An antioxidant mechanism of morphine and related derivatives. *Medicinal Chemistry Research.*, **25**, 852–857.

Borsani, E.; Buffoli, B.; Bonazza, V.; Brunelli, G.; Monini, L.; Inchingolo, F.; Ballini, A.; Rezzani, R.; Rodella, L. F., 2020: In vitro effects of concentrated growth factors (CGF) on human SH-SY5Y neuronal cells. *Eur. Rev. Med. Pharmacol Sci.*, **24**, 304–314.

- Busija, D. W.; Gaspar, T.; Domoki, F.; Katakam, P. V; Bari, F., 2008: Mitochondrial-mediated suppression of ROS production upon exposure of neurons to lethal stress: mitochondrial targeted preconditioning. *Advanced drug delivery reviews.*, **60**, 1471–1477.
- C Correia, S.; Cardoso, S.; X Santos, R.; Carvalho, C.; S Santos, M.; Perry, G.; A Smith, M.; I Moreira, P., 2011: New insights into the mechanisms of mitochondrial preconditioning-triggered neuroprotection. *Current pharmaceutical design.*, **17**, 3381–3389.
- Cai, L.; Wang, L. F.; Pan, J. P.; Mi, X. N.; Zhang, Z.; Geng, H. J.; Wang, J. H.; Hu, S. H.; Zhang, W.; Gao, Q., 2016: Neuroprotective effects of methyl 3, 4-dihydroxybenzoate against TBHP-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. *Molecules.*, **21**, 1071.
- Cao, L. H.; Li, H. T.; Lin, W. Q.; Tan, H. Y.; Xie, L.; Zhong, Z. J.; Zhou, J. H., 2016: Morphine, a potential antagonist of cisplatin cytotoxicity, inhibits cisplatin-induced apoptosis and suppression of tumor growth in nasopharyngeal carcinoma xenografts. *Scientific reports.*, **6**, 1–10.
- Cernaianu, G.; Brandmaier, P.; Scholz, G.; Ackermann, O. P.; Alt, R.; Rothe, K.; Cross, M.; Witzigmann, H.; Tröbs, R. B., 2008: All-trans retinoic acid arrests neuroblastoma cells in a dormant state. Subsequent nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor treatment adds modest benefit. *Journal of pediatric surgery.*, **43**, 1284–1294.
- Chen, Q.; Vazquez, E. J.; Moghaddas, S.; Hoppel, C. L.; Lesnefsky, E. J., 2003: Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *Journal of Biological Chemistry.*, **278**, 36027–36031.
- Chen, Z.; Li, T.; Zhang, B., 2008: Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts. *Journal of Surgical Research.*, **145**, 287–294.
- Chen, Z.; Zhang, X.; Liu, Y.; Liu, Z., 2016: Morphine postconditioning protects against reperfusion injury via inhibiting JNK/p38 MAPK and mitochondrial permeability transition pores signaling pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry.*, **39**, 61–70.
- Cheung, Y. T.; Lau, W. K. W.; Yu, M. S.; Lai, C. S. W.; Yeung, S. C.; So, K. F.; Chang, R. C. C., 2009: Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology.*, **30**, 127–135.
- Choi, Y. J.; Kwak, E. B.; Lee, J. W.; Lee, Y. S.; Cheong, I. Y.; Lee, H. J.; Kim, S. S.; Kim, M. J.; Kwon, Y. S.; Chun, W. J., 2011: Cytoprotective effects of docosyl cafferate against

tbHP-induced oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Biomolecules & Therapeutics.*, **19**, 195–200.

Cockova, Z.; Ujcikova, H.; Telensky, P.; Novotny, J., 2019: Protein profiling of SH-SY5Y neuroblastoma cells: The effect of rhein. *Journal of Biosciences.*, **44**, 1–16.

Costa-Malaquias, A.; Almeida, M. B.; Souza Monteiro, J. R.; Macchi, B. de M.; do Nascimento, J. L. M.; Crespo-Lopez, M. E., 2014: Morphine protects against methylmercury intoxication: A role for opioid receptors in oxidative stress? *PloS one.*, **9**, e110815.

Costa, A. D. T.; Garlid, K. D.; West, I. C.; Lincoln, T. M.; Downey, J. M.; Cohen, M. V.; Critz, S. D., 2005: Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circulation research.*, **97**, 329–336.

Costa, A. D. T.; Quinlan, C. L.; Andrukhiv, A.; West, I. C.; Jaburek, M.; Garlid, K. D., 2006: The direct physiological effects of mitoKATP opening on heart mitochondria. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.*, **290**, 406–415.

Costa, A. D. T.; Garlid, K. D., 2008: Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKC ϵ , ROS, and MPT. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.*, **295**, H874–H882.

Crestanello, J. A.; Doliba, N. M.; Babsky, A. M.; Doliba, N. M.; Niibori, K.; Osbakken, M. D.; Whitman, G. J. R., 2000: Opening of potassium channels protects mitochondrial function from calcium overload. *Journal of Surgical Research.*, **94**, 116–123.

*Crompton, M., 1999: The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal.*, **341**, 233–249.

de Bittencourt Pasquali, M. A.; de Ramos, V. M.; Albanus, R. D.; Kunzler, A.; de Souza, L. H. T.; Dalmolin, R. J. S.; Gelain, D. P.; Ribeiro, L.; Carro, L.; Moreira, J. C. F., 2016: Gene expression profile of NF- κ B, Nrf2, glycolytic, and p53 pathways during the SH-SY5Y neuronal differentiation mediated by retinoic acid. *Molecular neurobiology.*, **53**, 423–435.

de Medeiros, L. M.; De Bastiani, M. A.; Rico, E. P.; Schonhofen, P.; Pfaffenseller, B.; Wollenhaupt-Aguiar, B.; Grun, L.; Barbé-Tuana, F.; Zimmer, E. R.; Castro, M. A. A., 2019: Cholinergic differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cell line and its potential use as an in vitro model for Alzheimer's disease studies. *Molecular Neurobiology.*, **56**, 7355–7367.

Di Lisa, F.; Menabò, R.; Canton, M.; Barile, M.; Bernardi, P., 2001: Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *Journal of Biological Chemistry.*, **276**, 2571–2575.

Ding, W.; Guo, Y.; Cui, X.; Zhang, B.; Li, D.; Li, W., 2016: Morphine-induced delayed preconditioning against anoxia/reoxygenation injury in pulmonary artery endothelial cells: the role of mitochondrial KATP channels. *Molecular Medicine Reports.*, **13**, 1047–1053.

Dorsch, M.; Behmenburg, F.; Raible, M.; Blase, D.; Grievink, H.; Hollmann, M. W.; Heinen, A.; Huhn, R., 2016: Morphine-induced preconditioning: involvement of protein kinase A and mitochondrial permeability transition pore. *PLoS One.*, **11**, e0151025.

Ela, C.; Barg, J.; Vogel, Z.; Hasin, Y.; Eilam, Y., 1997: Distinct components of morphine effects on cardiac myocytes are mediated by the κ and δ opioid receptors. *Journal of molecular and cellular cardiology.*, **29**, 711–720.

Elyasi, L.; Eftekhar-Vaghefi, S. H.; Esmaeili-Mahani, S., 2014: Morphine protects SH-SY5Y human neuroblastoma cells against 6-hydroxydopamine-induced cell damage: involvement of anti-oxidant, calcium blocking, and anti-apoptotic properties. *Rejuvenation Research.*, **17**, 255–263.

Encinas, M.; Iglesias, M.; Liu, Y.; Wang, H.; Muhaisen, A.; Cena, V.; Gallego, C.; Comella, J. X., 2000: Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *Journal of neurochemistry.*, **75**, 991–1003.

*Ferrari, R., 1996: The role of mitochondria in ischemic heart disease. *Journal of cardiovascular pharmacology.*, **28**, 1–10.

*Flemming, K., 2010: The use of morphine to treat cancer-related pain: a synthesis of quantitative and qualitative research. *Journal of pain and symptom management.*, **39**, 139–154.

*Gantner, B. N.; LaFond, K. M.; Bonini, M. G., 2020: Nitric oxide in cellular adaptation and disease. *Redox Biology.*, **34**, 101550.

Garlid, K. D., 1996: Cation transport in mitochondria—the potassium cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics.*, **1275**, 123–126.

- *Garlid, K. D.; Paucek, P., 2003: Mitochondrial potassium transport: the K⁺ cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics.*, **1606**, 23–41.
- *Garlid, K. D.; Costa, A. D. T.; Quinlan, C. L.; Pierre, S. V; Dos Santos, P., 2009: Cardioprotective signaling to mitochondria. *Journal of molecular and cellular cardiology.*, **46**, 858–866.
- Goldie, B. J.; Barnett, M. M.; Cairns, M. J., 2014: BDNF and the maturation of posttranscriptional regulatory networks in human SH-SY5Y neuroblast differentiation. *Frontiers in cellular neuroscience.*, **8**, 325.
- Goudas, L. C.; Langlade, A.; Serrie, A.; Matson, W.; Milbury, P.; Thurel, C.; Sandouk, P.; Carr, D. B., 1999: Acute decreases in cerebrospinal fluid glutathione levels after intracerebroventricular morphine for cancer pain. *Anesthesia & Analgesia.*, **89**, 1209–1215.
- Grace, P. M.; Ramos, K. M.; Rodgers, K. M.; Wang, X.; Hutchinson, M. R.; Lewis, M. T.; Morgan, K. N.; Kroll, J. L.; Taylor, F. R.; Strand, K. A., 2014: Activation of adult rat CNS endothelial cells by opioid-induced toll-like receptor 4 (TLR4) signaling induces proinflammatory, biochemical, morphological, and behavioral sequelae. *Neuroscience.*, **280**, 299–317.
- Gross, E. R.; Hsu, A. K.; Gross, G. J., 2004: Opioid-induced cardioprotection occurs via glycogen synthase kinase β inhibition during reperfusion in intact rat hearts. *Circulation research.*, **94**, 960–966.
- Gross, E. R.; Hsu, A. K.; Gross, G. J., 2006: The JAK/STAT pathway is essential for opioid-induced cardioprotection: JAK2 as a mediator of STAT3, Akt, and GSK-3 β . *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.*, **291**, H827–H834.
- *Gross, G. J., 2003: Role of opioids in acute and delayed preconditioning. *Journal of molecular and cellular cardiology.*, **35**, 709–718.
- *Gross, G. J.; Peart, J. N., 2003: KATP channels and myocardial preconditioning: an update. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.*, **285**, H921–H930.
- Guillet, V.; Gueguen, N.; Cartoni, R.; Chevrollier, A.; Desquirit, V.; Angebault, C.; Amati-Bonneau, P.; Procaccio, V.; Bonneau, D.; Martinou, J. C.; Reynier, P., 2011: Bioenergetic defect associated with mK ATP channel opening in a mouse model carrying a mitofusin 2 mutation . *The FASEB Journal.*, **25**, 1618–1627.

- Gülçin, I.; Beydemir, Ş.; Alici, H. A.; Elmastaş, M.; Büyükokuroğlu, M. E., 2004: In vitro antioxidant properties of morphine. *Pharmacological Research.*, **49**, 59–66.
- Guzmán, D. C.; Vázquez, I. E.; Brizuela, N. O.; Alvarez, R. G.; Mejía, G. B.; García, E. H.; Santamaría, D.; de Apreza, M. la R.; Olgún, H. J., 2006: Assessment of oxidative damage induced by acute doses of morphine sulfate in postnatal and adult rat brain. *Neurochemical research.*, **31**, 549–554.
- Guzmán, D. C.; Brizuela, N. O.; Álvarez, R. G.; García, E. H.; Mejía, G. B.; Olgún, H. J., 2009: Cerebrolysin and morphine decrease glutathione and 5-hydroxyindole acetic acid levels in fasted rat brain. *Biomedicine & pharmacotherapy.*, **63**, 517–521.
- Hargrave, B. Y.; Tiangco, D. A.; Lattanzio, F. A.; Beebe, S. J., 2003: Cocaine, not morphine, causes the generation of reactive oxygen species and activation of NF-κB in transiently cotransfected heart cells. *Cardiovascular toxicology.*, **3**, 141–151.
- Hatsukari, I.; Hitosugi, N.; Ohno, R. I. E.; Hashimoto, K.; Nakamura, S.; Satoh, K.; Nagasaka, H.; Matsumoto, I.; Sakagami, H., 2007: Induction of apoptosis by morphine in human tumor cell lines in vitro. *Anticancer research.*, **27**, 857–864.
- Holmuamedov, E. L.; Wang, L.; Terzic, A., 1999: ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *The Journal of physiology.*, **519**, 347.
- Hromadkova, L.; Bezdekova, D.; Pala, J.; Schedin-Weiss, S.; Tjernberg, L. O.; Hoschl, C.; Ovsepián, S. V, 2020: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes molecular polarization and differentiation of immature neuroblastoma cells into definitive neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.*, **1867**, 118737.
- Huang, H. Y.; Appel, L. J.; Croft, K. D.; Miller III, E. R.; Mori, T. A.; Puddey, I. B., 2002: Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition.*, **76**, 549–555.
- Hutchinson, M. R.; Zhang, Y.; Brown, K.; Coats, B. D.; Shridhar, M.; Sholar, P. W.; Patel, S. J.; Crysedale, N. Y.; Harrison, J. A.; Maier, S. F., 2008: Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone: involvement of toll-like receptor 4 (TLR4). *European Journal of Neuroscience.*, **28**, 20–29.
- Inoue, I.; Nagase, H.; Kishi, K.; Higuti, T., 1991: ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature.*, **352**, 244–247.

- Ishida, H.; Hirota, Y.; Genka, C.; Nakazawa, H.; Nakaya, H.; Sato, T., 2001: Opening of mitochondrial KATP channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria. *Circulation research.*, **89**, 856–858.
- Itano, Y.; Ito, A.; Uehara, T.; Nomura, Y., 1996: Regulation of Bcl-2 protein expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: positive and negative effects of protein kinases C and A, respectively. *Journal of neurochemistry.*, **67**, 131–137.
- Jauhari, A.; Singh, T.; Pandey, A.; Singh, P.; Singh, N.; Srivastava, A. K.; Pant, A. B.; Parmar, D.; Yadav, S., 2017: Differentiation induces dramatic changes in miRNA profile, where loss of dicer diverts differentiating SH-SY5Y cells toward senescence. *Molecular neurobiology.*, **54**, 4986–4995.
- Juhaszova, M.; Zorov, D. B.; Kim, S. H.; Pepe, S.; Fu, Q.; Fishbein, K. W.; Ziman, B. D.; Wang, S.; Ytrehus, K.; Antos, C. L., 2004: Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *The Journal of clinical investigation.*, **113**, 1535–1549.
- Kim, J. S.; Lemasters, J. J., 2006: Opioid receptor-independent protection of ischemic rat hepatocytes by morphine. *Biochemical and biophysical research communications.*, **351**, 958–964.
- Korecka, J. A.; van Kesteren, R. E.; Blaas, E.; Spitzer, S. O.; Kamstra, J. H.; Smit, A. B.; Swaab, D. F.; Verhaagen, J.; Bossers, K., 2013: Phenotypic characterization of retinoic acid differentiated SH-SY5Y cells by transcriptional profiling. *PloS one.*, **8**, e63862.
- Krishnamurthy, P. K.; Mays, J. L.; Bijur, G. N.; Johnson, G. V. W., 2000: Transient oxidative stress in SH-SY5Y human neuroblastoma cells results in caspase dependent and independent cell death and tau proteolysis. *Journal of neuroscience research.*, **61**, 515–523.
- Kume, T.; Kawato, Y.; Osakada, F.; Izumi, Y.; Katsuki, H.; Nakagawa, T.; Kaneko, S.; Niidome, T.; Takada-Takatori, Y.; Akaike, A., 2008: Dibutyryl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype. *Neuroscience letters.*, **443**, 199–203.
- Kunzler, A.; Zeidán-Chuliá, F.; Gasparotto, J.; Girardi, C. S.; Klafke, K.; Petiz, L. L.; Bortolin, R. C.; Rostirolla, D. C.; Zanotto-Filho, A.; de Bittencourt Pasquali, M. A., 2017: Changes in cell cycle and up-regulation of neuronal markers during SH-SY5Y neurodifferentiation by retinoic acid are mediated by reactive species production and

oxidative stress. *Molecular neurobiology.*, **54**, 6903–6916.

Le Belle, J. E.; Orozco, N. M.; Paucar, A. A.; Saxe, J. P.; Mottahedeh, J.; Pyle, A. D.; Wu, H.; Kornblum, H. I., 2011: Proliferative Neural Stem Cells Have High Endogenous ROS Levels that Regulate Self-Renewal and Neurogenesis in a PI3K/Akt-Dependant Manner. *Cell Stem Cell.*, **8**, 59–71.

Lee, J.; Kim, M.; Park, C.; Jung, E.; Choi, D.; Kim, T.; Moon, S.; Park, R., 2004: Morphine prevents glutamate-induced death of primary rat neonatal astrocytes through modulation of intracellular redox. *Immunopharmacology and immunotoxicology.*, **26**, 17–28.

Liang, B. T.; Gross, G. J., 1999: Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and K(ATP) channels. *Circulation Research.*, **84**, 1396–1400.

Lim, Y. J.; Zheng, S.; Zuo, Z., 2004: Morphine Preconditions Purkinje Cells against Cell Death under in Vitro Simulated Ischemia-Reperfusion Conditions. *Anesthesiology.*, **100**, 562–568.

Lin, X.; Li, Q.; Wang, Y. J.; Ju, Y. W.; Chi, Z. Q.; Wang, M. W.; Liu, J. G., 2007: Morphine inhibits doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and nuclear factor κ B transcriptional activation in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochemical Journal.*, **406**, 215–221.

Lin, X.; Wang, Y.; Li, Q.; Hou, Y.; Hong, M.; Cao, Y.; Chi, Z.; Liu, J., 2009: Chronic high-dose morphine treatment promotes SH-SY5Y cell apoptosis via c-Jun N-terminal kinase-mediated activation of mitochondria-dependent pathway. *The FEBS journal.*, **276**, 2022–2036.

*Lindsay, J.; Degli Esposti, M.; Gilmore, A. P., 2011: Bcl-2 proteins and mitochondria—specificity in membrane targeting for death. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.*, **1813**, 532–539.

Liu, D.; Lu, C.; Wan, R.; Auyeung, W. W.; Mattson, M. P., 2002a: Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.*, **22**, 431–443.

Liu, D.; Lu, C.; Wan, R.; Auyeung, W. W.; Mattson, M. P., 2002b: Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced

death by a mechanism involving suppression of bax translocation and cytochrome c release. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.*, **22**, 431–443.

Liu, R.; Wang, H.; Xu, B.; Chen, W.; Turlova, E.; Dong, N.; Sun, C. L. F.; Lu, Y.; Fu, H.; Shi, R., 2016: Cerebrovascular safety of sulfonylureas: the role of KATP channels in neuroprotection and the risk of stroke in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.*, **65**, 2795–2809.

Lopes, A. S.; Lane, M.; Thompson, J. G., 2010a: Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes. *Human reproduction.*, **25**, 2762–2773.

Lopes, F. M.; Schröder, R.; da Frota Júnior, M. L. C.; Zanotto-Filho, A.; Müller, C. B.; Pires, A. S.; Meurer, R. T.; Colpo, G. D.; Gelain, D. P.; Kapczinski, F., 2010b: Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain research.*, **1337**, 85–94.

López-Carballo, G.; Moreno, L.; Masiá, S.; Pérez, P.; Barettino, D., 2002: Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry.*, **277**, 25297–25304.

Lu, X. H.; Ran, K.; Xiao, Y. Y.; Yang, D. L.; Chang, Y. T.; Duan, K. M.; Ou, Y. W., 2015: Protective effects of morphine preconditioning in delayed phase on myocardial ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Genet Mol Res.*, **14**, 8947–8954.

*Lushchak, V. I., 2014: Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions.*, **224**, 164–175.

Ma, J.; Yuan, X.; Qu, H.; Zhang, J.; Wang, D.; Sun, X.; Zheng, Q., 2015: The role of reactive oxygen species in morphine addiction of SH-SY5Y cells. *Life sciences.*, **124**, 128–135.

McPherson, B. C.; Yao, Z., 2001: Morphine mimics preconditioning via free radical signals and mitochondrial KATP channels in myocytes. *Circulation.*, **103**, 290–295.

Murry, C. E.; Jennings, R. B.; Reimer, K. A., 1986: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.*, **74**, 1124–1136.

Obame, F. N.; Plin-Mercier, C.; Assaly, R.; Zini, R.; Dubois-Rande, J. L.; Berdeaux, A.; Morin, D., 2008: Cardioprotective effect of morphine and a blocker of glycogen synthase

kinase 3 β , SB216763 [3-(2, 4-dichlorophenyl)-4 (1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2, 5-dione], via inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.*, **326**, 252–258.

Oe, T.; Sasayama, T.; Nagashima, T.; Muramoto, M.; Yamazaki, T.; Morikawa, N.; Okitsu, O.; Nishimura, S.; Aoki, T.; Katayama, Y., 2005: Differences in gene expression profile among SH-SY5Y neuroblastoma subclones with different neurite outgrowth responses to nerve growth factor. *Journal of neurochemistry.*, **94**, 1264–1276.

Paggio, A.; Checchetto, V.; Campo, A.; Menabò, R.; Di Marco, G.; Di Lisa, F.; Szabo, I.; Rizzuto, R.; De Stefani, D., 2019: Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria. *Nature.*, **572**, 609–613.

Påhlman, S.; Odelstad, L.; Larsson, E.; Grotte, G.; Nilsson, K., 1981: Phenotypic changes of human neuroblastoma cells in culture induced by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *International journal of cancer.*, **28**, 583–589.

Påhlman, S.; Ruusala, A. I.; Abrahamsson, L.; Mattsson, M. E. K.; Esscher, T., 1984: Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell differentiation.*, **14**, 135–144.

Pateliya, B. B.; Singh, N.; Jaggi, A. S., 2008: Possible role of opioids and KATP channels in neuroprotective effect of postconditioning in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.*, **31**, 1755–1760.

Payabvash, S.; Beheshtian, A.; Salmasi, A. H.; Kiumehr, S.; Ghahremani, M. H.; Tavangar, S. M.; Sabzevari, O.; Dehpour, A. R., 2006: Chronic morphine treatment induces oxidant and apoptotic damage in the mice liver. *Life sciences.*, **79**, 972–980.

Peart, J. N.; Gross, G. J., 2006: Cardioprotective effects of acute and chronic opioid treatment are mediated via different signaling pathways. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.*, **291**, H1746–H1753.

Petcharat, K.; Singh, M.; Ingkaninan, K.; Attarat, J.; Yasothornsrikul, S., 2015: Bacopa monnieri protects SH-SY5Y cells against tert-Butyl hydroperoxide-induced cell death via the ERK and PI3K pathways. *Siriraj medical journal.*, **67**, 20.

Qian, L.; Tan, K. S.; Wei, S. J.; Wu, H. M.; Xu, Z.; Wilson, B.; Lu, R. B.; Hong, J. S.; Flood, P. M., 2007: Microglia-mediated neurotoxicity is inhibited by morphine through an opioid

receptor-independent reduction of NADPH oxidase activity. *The Journal of Immunology.*, **179**, 1198–1209.

Qiao, J.; Paul, P.; Lee, S.; Qiao, L.; Josifi, E.; Tiao, J. R.; Chung, D. H., 2012: PI3K/AKT and ERK regulate retinoic acid-induced neuroblastoma cellular differentiation. *Biochemical and biophysical research communications.*, **424**, 421–426.

Rogers, M. V; Buensuceso, C.; Montague, F.; Mahadevan, L., 1994: Vanadate stimulates differentiation and neurite outgrowth in rat pheochromocytoma PC12 cells and neurite extension in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience.*, **60**, 479–494.

Ross, R. A.; Spengler, B. A.; Biedler, J. L., 1983: Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *Journal of the National Cancer Institute.*, **71**, 741–747.

Rossi, F.; Zatti, M., 1964: Biochemical aspects of phagocytosis in poly-morphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *Experientia.*, **20**, 21–23.

Rozisky, J. R.; Laste, G.; De Macedo, I. C.; Santos, V. S.; Krolow, R.; Noschang, C.; Vanzella, C.; Bertoldi, K.; Lovatel, G. A.; De Souza, I. C. C., 2013: Neonatal morphine administration leads to changes in hippocampal BDNF levels and antioxidant enzyme activity in the adult life of rats. *Neurochemical research.*, **38**, 494–503.

Şahin, M.; Öncü, G.; Yılmaz, M. A.; Özkan, D.; Saybaşı, H., 2021: Transformation of SH-SY5Y cell line into neuron-like cells: Investigation of electrophysiological and biomechanical changes. *Neuroscience Letters.*, **745**, 135628.

Samarghandian, S.; Afshari, R.; Farkhondeh, T., 2014: Effect of long-term treatment of morphine on enzymes, oxidative stress indices and antioxidant status in male rat liver. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine.*, **7**, 1449.

Sarkanen, J.; Nykky, J.; Siikanen, J.; Selinummi, J.; Ylikomi, T.; Jalonon, T. O., 2007: Cholesterol supports the retinoic acid-induced synaptic vesicle formation in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of neurochemistry.*, **102**, 1941–1952.

Schneider, L.; Giordano, S.; Zelikson, B. R.; S. Johnson, M.; A. Benavides, G.; Ouyang, X.; Fineberg, N.; Darley-Usmar, V. M.; Zhang, J., 2011: Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. *Free*

Radical Biology and Medicine., **51**, 2007–2017.

Schultz, J. E. J.; Hsu, A. K.; Gross, G. J., 1996: Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circulation research.*, **78**, 1100–1104.

Segal, A. W.; Garcia, R.; Goldstone, H.; Cross, A. R.; Jones, O. T., 1981: Cytochrome b-245 of neutrophils is also present in human monocytes, macrophages and eosinophils. *Biochemical Journal.*, **196**, 363–367.

Shipley, M. M.; Mangold, C. A.; Szpara, M. L., 2016: Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *JoVE (Journal of Visualized Experiments).*, e53193.

*Skrabalova, J.; Drastichova, Z.; Novotny, J., 2013: Morphine as a potential oxidative stress-causing agent. *Mini-reviews in organic chemistry.*, **10**, 367–372.

Skrabalova, J.; Karlovska, I.; Hejnova, L.; Novotny, J., 2018a: Protective Effect of Morphine Against the Oxidant-Induced Injury in H9c2 Cells. *Cardiovascular Toxicology.*, **18**, 374–385.

Skrabalova, J.; Karlovska, I.; Hejnova, L.; Novotny, J., 2018b: Protective Effect of Morphine Against the Oxidant-Induced Injury in H9c2 Cells. *Cardiovascular Toxicology.*, **18**, 374–385.

St-Pierre, J.; Buckingham, J. A.; Roebuck, S. J.; Brand, M. D., 2002: Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry.*, **277**, 44784–44790.

*Stein, C., 2016: Opioid Receptors. - PubMed - NCBI. *Annual Review of Medicine.*, **67**, 433–451.

Stevens, C. W.; Aravind, S.; Das, S.; Davis, R. L., 2013: Pharmacological characterization of LPS and opioid interactions at the toll-like receptor 4. *British journal of pharmacology.*, **168**, 1421–1429.

Sumathi, T.; Nathiya, V. C.; Sakthikumar, M., 2011: Protective effect of bacoside-A against morphine-induced oxidative stress in rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.*, **73**, 409.

Teppola, H.; Sarkanen, J. R.; Jalonen, T. O.; Linne, M. L., 2016: Morphological differentiation towards neuronal phenotype of SH-SY5Y neuroblastoma cells by estradiol, retinoic acid and cholesterol. *Neurochemical research.*, **41**, 731–747.

- Virgili, N.; Mancera, P.; Wappenhans, B.; Sorrosal, G.; Biber, K.; Pugliese, M.; Espinosa-Parrilla, J. F., 2013: KATP channel opener diazoxide prevents neurodegeneration: a new mechanism of action via antioxidative pathway activation. *PloS one.*, **8**, e75189.
- Wang, L.; Cherednichenko, G.; Hernandez, L.; Halow, J.; Camacho, S. A.; Figueredo, V.; Schaefer, S., 2001: Preconditioning limits mitochondrial Ca²⁺ during ischemia in rat hearts: role of KATP channels. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.*, **280**, H2321–H2328.
- Wang, X.; Zhang, Y.; Peng, Y.; Hutchinson, M. R.; Rice, K. C.; Yin, H.; Watkins, L. R., 2016: Pharmacological characterization of the opioid inactive isomers (+)-naltrexone and (+)-naloxone as antagonists of toll-like receptor 4. *British journal of pharmacology.*, **173**, 856–869.
- Wojtovich, A. P.; Smith, C. O.; Haynes, C. M.; Nehrke, K. W.; Brookes, P. S., 2013: Physiological consequences of complex II inhibition for aging, disease, and the mKATP channel. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics.*, **1827**, 598–611.
- Xi, J.; Tian, W.; Zhang, L.; Jin, Y.; Xu, Z., 2010: Morphine prevents the mitochondrial permeability transition pore opening through NO/cGMP/PKG/Zn²⁺/GSK-3 β signal pathway in cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.*, **298**, H601–H607.
- Xu, J.; Tian, W.; Ma, X.; Guo, J.; Shi, Q.; Jin, Y.; Xi, J.; Xu, Z., 2011: The molecular mechanism underlying morphine-induced Akt activation: roles of protein phosphatases and reactive oxygen species. *Cell biochemistry and biophysics.*, **61**, 303–311.
- Xu, J.; Tian, W.; Cui, S.; Li, N.; Xu, Z., 2012: MORPHINE PREVENTS OXIDANT STRESS-INDUCED MITOCHONDRIAL DAMAGE VIA AN EGFR TK-ROS-AKT SIGNALLING PATHWAY IN H9C2 CARDIAC MUSCLE CELLS. *Heart.*, **98**, E19–E19.
- Xu, M.; Wang, Y.; Ayub, A.; Ashraf, M., 2001: Mitochondrial KATP channel activation reduces anoxic injury by restoring mitochondrial membrane potential. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology.*, **281**, H1295–H1303.
- Zelko, I. N.; Mariani, T. J.; Folz, R. J., 2002: Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine.*, **33**, 337–349.

Zhang, T.; Gygi, S. P.; Paulo, J. A., 2020: Temporal proteomic profiling of SH-SY5Y differentiation with retinoic acid using FAIMS and real-time searching. *Journal of proteome research.*, **20**, 704–714.

Zhang, Y.; Wu, Y. X.; Hao, Y. B.; Dun, Y.; Yang, S. P., 2001: Role of endogenous opioid peptides in protection of ischemic preconditioning in rat small intestine. *Life Sciences.*, **68**, 1013–1019.

Zhang, Y.; Zheng, Q.; Pan, J.; Zheng, R., 2004: Oxidative damage of biomolecules in mouse liver induced by morphine and protected by antioxidants. *Basic & clinical pharmacology & toxicology.*, **95**, 53–58.

Zhao, P.; Huang, Y.; Zuo, Z., 2006: Opioid preconditioning induces opioid receptor-dependent delayed neuroprotection against ischemia in rats. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.*, **65**, 945–952.

Zhou, J.; Li, Y.; Yan, G.; Bu, Q.; Lv, L.; Yang, Y.; Zhao, J.; Shao, X.; Deng, Y.; Zhu, R., 2011: Protective role of taurine against morphine-induced neurotoxicity in C6 cells via inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicity research.*, **20**, 334–342.

Sekundární citace jsou označeny *