

# CELIČNI MODELI NEURODEGENERACIJE IN NEVROVNETJA KOT ORODJE PREDKLINIČNIH RAZISKAV: PRIMER ZAVIRALCA KATEPSINA X

## CELLULAR MODELS OF NEURODEGENERATION AND NEUROINFLAMMATION AS TOOLS FOR PRECLINICAL RESEARCH: THE CASE OF A CATHEPSIN X INHIBITOR

AVTORICI / AUTHORS:

asist. dr. Selena Horvat, mag. farm.

izr. prof. dr. Anja Pišlar, mag. farm.

*Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,  
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana*

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: selena.horvat@ffa.uni-lj.si



### POVZETEK

Nevrodegenerativne bolezni, kot sta Alzheimerjeva bolezen in Parkinsonova bolezen, so povezane s progresivno izgubo nevronov, pri čemer nevrovnetje deluje kot ključni pospeševalec degenerativnih procesov. V raziskavi smo vzpostavili in ovrednotili sklop celičnih modelov za ponovljivo posnemanje ključnih procesov neurodegeneracije in nevrovnetja ter funkcionalno vrednotenje spojin vodnic. Vključili smo model Alzheimerjeve bolezni, model Parkinsonove bolezni in modele nevrovnetja v celicah glije, tj. mikrogliji, astrocitih in oligodendrocitih, ki pomembno sodelujejo pri vnetnih procesih v osrednjem živčevju. Na vzpostavljenih modelih smo ovrednotili spojino AMS36, zaviralec katepsina X, z obetavnim zaščitnim učinkom na poškodovane nevrone in protivnetnim delovanjem. V celičnih modelih smo spremljali spremembe celičnega fenotipa, izražanje specifičnih celičnih označevalcev, stopnjo celične poškodbe ter aktivacijo poti apoptoze. Rezultati so potrdili ustreznost vzpostavljenih modelov, kar se odraža v povzročeni poškodbi celic in vnetnem odzivu, ter pokazali, da AMS36 poveča preživetje celic, zmanjša kazalce apoptoze in ublaži vnetni odziv. Predstavljeni sklop modelov predstavlja uporabno predklinično platformo za usmerjeno vrednotenje kandidatnih učinkovin pri procesih neurodegeneracije in nevrovnetja.

### KLJUČNE BESEDE:

celični modeli, neurodegeneracija, nevrovnetje, zaviralec katepsina X

### ABSTRACT

Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease are associated with progressive neuronal loss, with neuroinflammation acting as a key driver that accelerates degeneration. In this study, we established and validated a set of cellular models to reproducibly mimic key aspects of neurodegeneration and neuroinflammation and to enable functional evaluation of lead compounds. The set included an Alzheimer's disease model, a Parkinson's disease model, and neuroinflammation models in glial cells, namely microglia, astrocytes, and oligodendrocytes, which play important roles in inflammatory processes in the central nervous system. Using these models, we evaluated AMS36, a



cathepsin X inhibitor, with promising neuroprotective effects on injured neurons and anti-inflammatory activity. Across the established models, we monitored changes in cellular phenotype, expression of specific cellular markers, the extent of cellular injury, and activation of apoptotic pathways. The results confirmed the suitability of the models, reflected by induced cellular damage and an inflammatory response, and showed that AMS36 increases cell survival, reduces apoptotic markers, and attenuates the inflammatory response. The presented set of models provides a useful preclinical platform for targeted evaluation of candidate compounds in the context of neurodegeneration and neuroinflammation.

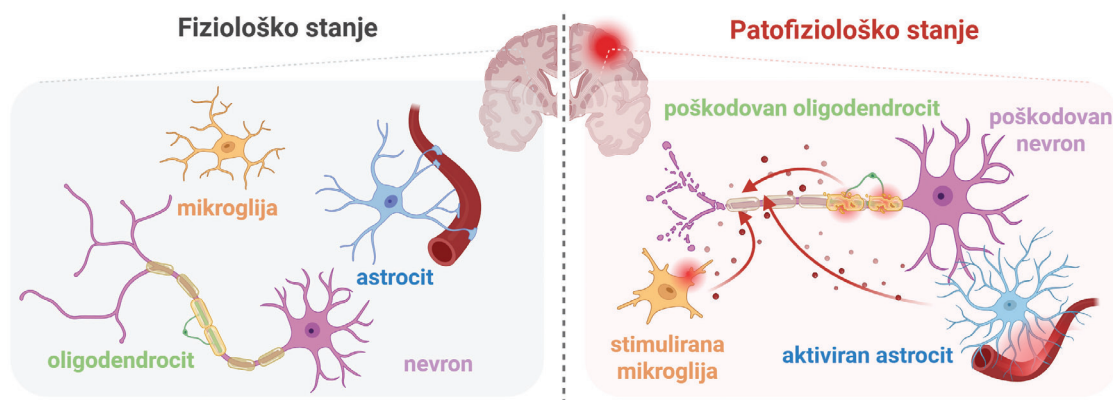
**KEY WORDS:**

cathepsin X inhibitor, cellular models, neurodegeneration, neuroinflammation

# 1 UVOD

Nevrodegenerativne bolezni, kot sta Alzheimerjeva bolezen (AB) in Parkinsonova bolezen (PB), zaradi staranja prebivalstva predstavljajo vse večji zdravstveni izziv (1, 2). Kljub različnim kliničnim in patološkim značilnostim, ju povezuje po-

stopna in selektivna izguba določenih populacij nevronov (3). Pri AB so posebej prizadeti holinerški nevroni, pri PB pa dopaminergični nevroni nigrostriatnega sistema (4, 5). Selektivna ranljivost posameznih nevronskega podtipov kaže, da morajo raziskovalni pristopi v obzir vzeti njihove funkcionalne posebnosti, saj se patološki procesi in odzivi na dražljaje med populacijami nevronov pomembno razlikujejo (6). Nevrodegeneracija ni omejena le na nevrone, temveč je tesno povezana z nevrovnetjem in delovanjem celic glije, med katere sodijo mikroglija, astrociti in oligodendrociti (7–10) (slika 1). Mikroglija je glavni imunski nadzornik osrednjega živčevja, ki se ob aktivaciji preusmeri v vnetno stanje in izloča citokine ter reaktivne kisikove in dušikove zvrsti (11). Astrociti, ki v fizioloških razmerah podpirajo sinaptično delovanje, se v bolezenskih razmerah preoblikujejo v reaktivne fenotipe, ki lahko okrepijo vnetno okolje (12). Sproščeni vnetni mediatorji lahko škodljivo vplivajo tudi na oligodendrocite, ki v fizioloških razmerah tvorijo mielinsko ovojnico okoli aksonov ter s tem omogočajo hitro prevajanje živčnih impulzov (13–15). V patofizioloških razmerah pa vnetno mikrookolje okvari oligodendrocite in oslabi njihovo sposobnost ohranjanja mielinizirajočega fenotipa (14). Osrednje živčevje je kompleksen sistem nevronov in celic glije, kjer patološke spremembe določajo medcelična komunikacija, regulacijske zanke in mikrookolje (16). Celični modeli so zato v začetnih predkliničnih fazah nepogrešljivi, ker omogočajo nadzorovano primerjavo eksperimentalnih pogojev, odmerkov spojin vodnic in kvantitativno ovrednotenje celičnih odzivov, s čimer je mogoče presojati farma-



**Slika 1:** Fiziološko in patofiziološko stanje celic osrednjega živčevja. V fiziološkem stanju so celice osrednjega živčevja v ravnovesju, v patofiziološkem pa pride do vnetnega mikrookolja ter poškodbe oligodendrocitov in nevronov. Povzeto po (10). Ustvarjeno v programu BioRender. Horvat, S. (2026). BioRender.com/i8gen51.

**Figure 1:** Physiological and pathophysiological states of central nervous system cells. In a physiological state, the cells of the central nervous system are in balance, but in a pathophysiological state, an inflammatory microenvironment and damage to oligodendrocytes and neurons occur. Adapted from (10). Created with BioRender. Horvat, S. (2026). BioRender.com/i8gen51.

kološki učinek posameznih celičnih tipov in usmerjati nadaljnje raziskave (6, 17, 18).

Med pomembnimi molekularnimi tarčami neurodegeneracije je katepsin X, lizosomska cisteinska peptidaza s pomembno vlogo v celicah imunskega odziva in glije (19). Njegova aktivnost je povezana z uravnavanjem vnetnih odzivov celične signalizacije, adhezije in migracije, kar lahko prispeva k večji ranljivosti nevronov (20–22). Katepsin X proteolitično cepi tudi  $\gamma$ -enolazo, protein z zaščitno vlogo v živčevju. Encim  $\gamma$ -enolaza poleg glikolitične funkcije deluje kot nevrotrofični dejavnik, saj spodbuja preživetje nevronov, rast nevitov in diferenciacijo nevronske celice, njeno delovanje pa je posebej povezano z ohranjenim C-končnim delom (23, 24). Povečana proteolitična aktivnost katepsina X v pogojih nevrovnetja in neurodegeneracije dodatno prispeva k napredovanju poškodbe nevronov, zato predstavlja utemeljeno tarčo za zaviranje (25).

Namen raziskave je postaviti in ovrednotiti sklop predkliničnih celičnih modelov za spremljanje celičnega fenotipa, okvare, preživetja in izločanja vnetnih mediatorjev. V posameznih modelih bomo kot kandidatno učinkovino uporabili AMS36, kovalentni zaviralec katepsina X, ter preverili, ali zaviranje katepsina X vpliva na izbrane funkcionalne kazalnike v različnih celičnih tipih osrednjega živčevja.

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1 GOJENJE CELIČNIH KULTUR IN VZPOSTAVITEV MODELOV NEURODEGENERACIJE IN NEVROVNETJA

Za vzpostavitev celičnih modelov neurodegeneracije smo uporabili človeško celično linijo nevronov SH-SY5Y (ATCC), za celične modele nevrovnetja pa človeško celično linijo oligodendrocitov HOG (Sigma-Aldrich), mišjo celično linijo mikroglie BV2 (darilo dr. Biljane Božić Nedeljković, Univerza v Beogradu) in mišjo celično linijo astrocitov C8-D1A (ATCC). Celice SH-SY5Y in HOG smo gojili v gojišču DMEM/F12 (angl. *Dulbecco's modified eagle medium*; Sigma-Aldrich), dopolnjenim z 10 % fetalnega govejega seruma (angl. *fetal bovine serum*; FBS; Thermo Fisher Scientific) in 1 % penicilina/streptomocina (Sigma-Aldrich). Celice BV2 in C8-D1A smo gojili v go-

### KLJUČNA SPOROČILA

- Vzpostavili smo celične modele, ki posnemajo spremembe pri Alzheimerjevi in Parkinsonovi bolezni ter nevrovnetja.
- Modeli omogočajo zanesljivo preučevanje poškodb živčnih celic in vnetnega odziva.
- Zaviralec katepsina X AMS36 je zaščitil celice, zmanjšal znake celične smrti in oslabil vnetje.
- Raziskava ponuja uporabno osnovo za razvoj novih pristopov zdravljenja neurodegenerativnih bolezni.

jišču aDMEM (angl. *advanced Dulbecco's modified eagle medium*; Thermo Fisher Scientific), dopolnjenim z 10 % FBS, 1 % L-glutamina (Sigma-Aldrich) in 1 % penicilina/streptomocina. Vse celične kulture smo vzdrževali pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub>.

Za diferenciacijo celic SH-SY5Y smo plošče predhodno prekrili s kolagenom (20 µg/mL; Sigma-Aldrich) v fosfatnem pufru (PBS; Sigma-Aldrich) za 2 h pri 37 °C, nato pa plošče sprali s PBS. Za vzpostavitev modela AB smo celice diferencirali v holinergični podtip nevronov po protokolu, povzetem iz literature (26). Celice SH-SY5Y smo najprej diferencirali z retinojsko kislino (RA; angl. *retinoic acid*; 10 µM; Sigma-Aldrich) v gojišču z zmanjšanim serumom (2 % FBS) za 72 h, nato dodatnih 72 h z RA (10 µM) v kombinaciji z rastnim dejavnikom možganskega izvora (angl. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF; 50 ng/mL; Sigma-Aldrich). Peptid amiloid beta (A $\beta$ <sub>1–42</sub>, Merck Millipore) smo raztopili v dimetilsulfoksidu (DMSO; Sigma-Aldrich) in ga pred uporabo agregirali pri koncentraciji 100 µM 24 h pri 37 °C. Diferencirane celice smo nato izpostavili fibriliranemu peptidu A $\beta$ <sub>1–42</sub> (1 µM) v gojišču z zmanjšanim serumom za 24 h. Za vzpostavitev modela PB smo celice diferencirali v dopaminergični podtip nevronov po protokolu, povzetem iz literature (26). Celice SH-SY5Y smo najprej diferencirali z RA (10 µM) v gojišču z zmanjšanim serumom (2 % FBS) za 72 h, nato dodatnih 72 h z RA (10 µM) v kombinaciji z 12-O-tetradekanoilforbol-13-acetatom (angl. *phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA; 80 nM; Sigma-Aldrich). Diferencirane celice smo izpostavili nevrotoksinu, 6-hidroksidopaminu (angl. *6-hydroxydopamine*, 6-OHDA; 100 µM; Sigma-Aldrich) za 24 h.

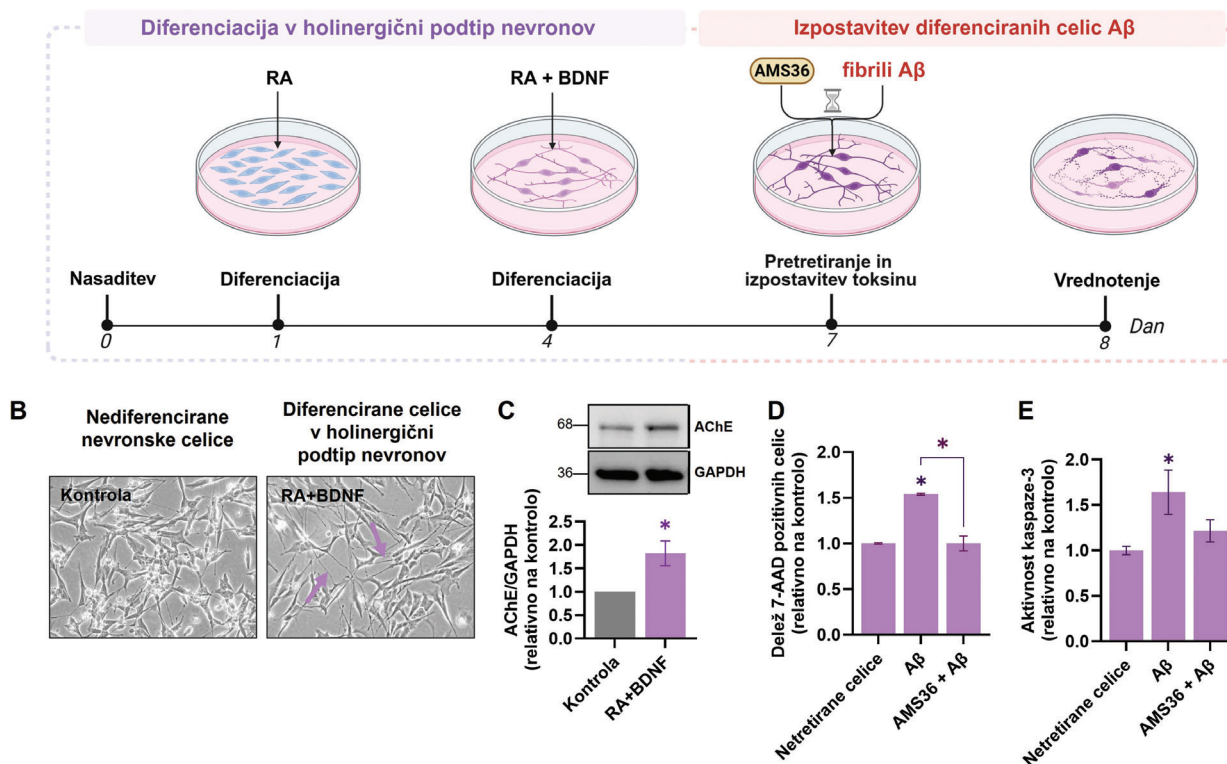
Za vzpostavitev modela vnetno poškodovanih celic oligodendrocitov smo celice HOG najprej diferencirali v mielinizirajoči fenotip po protokolu, povzetem iz literature (27). Diferenciacijo celic smo sprožili dan po nasaditvi z gojiščem



z zmanjšanim serumom (2 % FBS) v kombinaciji z dodatkom N2 (Gibco), dibutilil cikličnim adenozin monofosfatom (dbcAMP; 500  $\mu$ M; Sigma-Aldrich) in 3-izobutil-1-metilksantinom (IBMX; 500  $\mu$ M; Sigma-Aldrich) za 72 h. Diferencirane celice smo nato izpostavili vnetnima dejavnikoma tumorje nekrotizirajočemu faktorju alfa (TNF- $\alpha$ ; 100 nM;

Biolegend) in interferonu gama (IFN- $\gamma$ ; 100 nM; Biolegend) za 24 h.

Za postavitve modela nevrovnetja smo celice mikroglije BV2 en dan po nasaditvi stimulirali v gojišču brez seruma. Stimulacijo smo sprožili z lipopolisaharidom (LPS; 0,1  $\mu$ g/mL; Sigma-Aldrich) za 24 h po protokolu, povzetem iz literature



**Slika 2:** Diferenciacija celic SH-SY5Y v holinergični podtip nevronov in učinek zaviralca katepsina X, AMS36, pri A $\beta$ -spodbujeni toksičnosti. (A) Shema eksperimentalnega poteka. Ustvarjeno v programu BioRender. Horvat, S. (2026). BioRender.com/67j1mhv. (B) Reprerzentativni fazno-kontrastni posnetki nediferenciranih in diferenciranih celic. Puščice nakazujejo celične izrastke. (C) Prikaz izražanja AChE z GAPDH in pripadajoča denzitometrična kvantifikacija razmerja AChE/GAPDH. Rezultati so prikazani kot povprečje  $\pm$  SEM treh neodvisnih poskusov ( $n = 3$ ), relativno na nediferencirane kontrolne celice. \* $P < 0,05$ . (D) Delež celic, pozitivnih na 7-AAD. Rezultati so prikazani kot povprečje  $\pm$  SEM treh neodvisnih poskusov ( $n = 3$ ), izvedenih v dveh paralelah, relativno na diferencirane netretirane celice. \* $P < 0,05$ . (E) Aktivnost kaspaze-3. Rezultati so prikazani kot povprečje  $\pm$  SEM treh neodvisnih poskusov ( $n = 3$ ), izvedenih v dveh paralelah, relativno na diferencirane netretirane celice. \* $P < 0,05$ . A $\beta$  – amiloid beta; AChE – acetilholin esteraza; BDNF – rasti dejavnik možganskega izvora; GAPDH – glicer aldehid-3-fosfat dehidrogenaza; RA – retinojska kislina; SEM – standardna napaka srednje vrednosti.

**Figure 2:** Differentiation of SH-SY5Y cells into a cholinergic neuronal subtype and the effect of the cathepsin X inhibitor AMS36 on A $\beta$ -induced toxicity. (A) Experimental flow chart. Created in BioRender. Horvat, S. (2026). BioRender.com/67j1mhv. (B) Representative phase-contrast images of undifferentiated and differentiated cells. Arrows indicate cell protrusions. (C) Expression of AChE with GAPDH, and corresponding densitometric quantification of the AChE/GAPDH ratio. Results are shown as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments ( $n = 3$ ), relative to undifferentiated control cells. \* $P < 0.05$ . (D) Proportion of 7-AAD positive cells. Results are shown as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments ( $n = 3$ ), performed in duplicate, relative to differentiated untreated cells. \* $P < 0.05$ . (E) Caspase-3 activity. Results are shown as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments ( $n = 3$ ) performed in duplicate, relative to differentiated untreated cells. \* $P < 0.05$ . A $\beta$  – amyloid beta; AChE – acetylcholinesterase; BDNF – brain-derived neurotrophic factor; GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; RA – retinoic acid; SEM – standard error of the mean.

(21). Supernatante smo po stimulaciji zbrali, centrifugirali 5 min pri 2000 vrtljajih na minuto in shranili pri  $-80^{\circ}\text{C}$ . Za vzpostavitev modela aktiviranih astrocitov smo celice C8-D1A aktivirali s kondicioniranim gojiščem mikroglije (angl. *microglia conditioned media*, MCM), pripravljenim iz celic BV2 po zgoraj opisanem postopku stimulacije z LPS, zbiranja in centrifugiranja supernatantov, nato pa smo celice C8-D1A dan po nasaditvi izpostavili pridobljenemu MCM za 24 h.

## 2.2 TRETIRANJE Z ZAVIRALCEM KATEPSINA X (AMS36)

Zaviralec katepsina X AMS36 so sintetizirali sodelavci Katedre za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani (28). Zaviralec smo uporabljali na vseh celičnih modelih, pri čemer smo kontrolnim skupinam celic vedno dodali enak volumen topila DMSO. Za oceno zaščitnega učinka smo celice predtretirali 1 h z AMS36 ( $10\ \mu\text{M}$ ), nato pa jih izpostavili ustreznemu toksičnemu oz. vnetnemu dražljaju.

## 2.3 PRIPRAVA CELIČNIH LIZATOV

Na predvidenih časovnih točkah smo celice poželi in lizirali z enim od naslednjih pufrov: (i) za določanje ravni proteinov z metodo prenosa western ali encimsko-immunskim testom v sestavi 50 mM 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonske kisline (HEPES), 150 mM NaCl, 1 mM etilendiamintetraoacetne kisline (EDTA) in 0,25 % Triton X-100 s pH 6,5 ali (ii) za določanja aktivnosti kaspaze-3 v sestavi 100 mM fosfatni pufer, 100 mM NaCl, 1,3 mM EDTA in 0,1 % Triton X-100 s pH 6,0. Po lizi celic smo celokupne lizate 30 min inkubirali na ledu in jih shranili pri  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pred nadaljnjo analizo smo lizate sonicirali in centrifugirali 15 min pri 15.000 vrtljajih na minuto, da smo pridobili končne celične lizate. Slednjim smo določili koncentracijo proteinov s kompletom DC (angl. *detergent compatible*; Bio-Rad), pri čemer smo kot standard uporabili goveji serumski albumin (angl. *bovine serum albumin*, BSA; Sigma-Aldrich).

## 2.4 PRENOS WESTERN

Enake koncentracije proteinov iz celokupnih celičnih lizatov smo denaturirali z dodatkom nanašalnega pufru za elektroforezo v poliakrilamidnem gelu v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata, segreli 5 min pri  $100^{\circ}\text{C}$  in ločili na 12-% Tris-glicinskih gelih. Proteine smo prenesli na membrane iz poliviniliden difluorida z napravo iBlot (Thermo Fisher

Scientific). Membrane smo blokirali 1 h pri sobni temperaturi v 5 % posnetem mleku v pufru Tris z dodatkom detergenta Tween 20 (TBST) in jih nato inkubirali čez noč pri  $4^{\circ}\text{C}$  v raztopini primarnih protiteles v 3 % BSA v TBST s protitelesi proti acetilholin esterazi (AChE; Santa Cruz Biotechnology), tirozin hidroksilazi (TH; Santa Cruz Biotechnology), mielin-skemu bazičnemu proteinu (MBP; Abcam), glialnemu fibrilarnemu kislemu proteinu (GFAP; Proteintech) in glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenazi (GAPDH; Cell Signaling). Po spiranju smo membrane inkubirali 1 h z raztopino sekundarnih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo (Jackson ImmunoResearch), signal pa razvili s kompletom reagentov za kemiluminiscenco (Thermo Fisher Scientific) in zajeli s sistemom G:Box (Syngene). Intenzitete pasov smo kvantificirali s programsko opremo GeneTools (Syngene), rezultate pa izrazili kot razmerje do GAPDH in jih normalizirali na kontrolni vzorec.

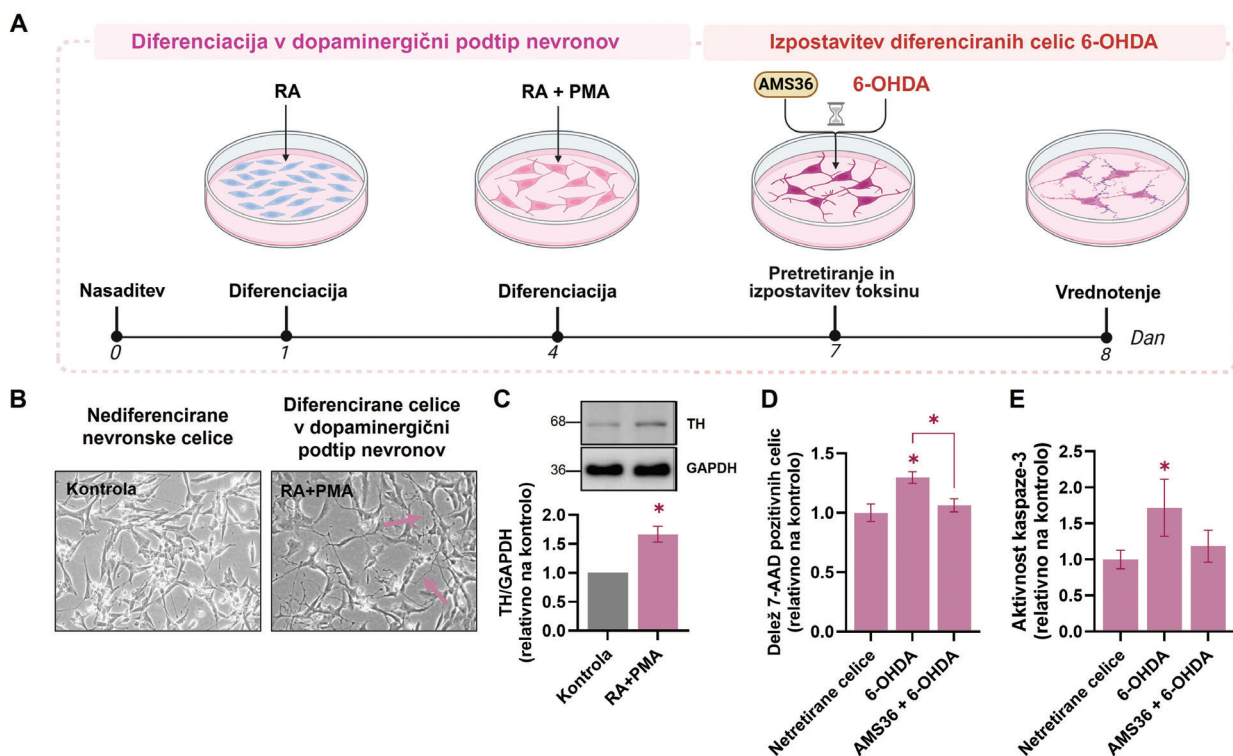
## 2.5 PRETOČNA CITOMETRIJA

Za vrednotenje stimulacije celic mikroglije BV2 in določanje izražanja površinskega označevalca aktivirane mikroglije CD68 s pretočno citometrijo smo celice dan po nasaditvi stimulirali, kot opisano zgoraj. Po inkubaciji smo celice odstranili od podlage, jih sprali s PBS ter fiksirali 20 min s 4-% formalinom (Sigma). Nato smo celice ponovno sprali in permeabilizirali 10 min v 2-% BSA v PBS z dodanim 0,5-% Triton X-100, nato pa jih 1 h inkubirali s protitelesi proti CD68, konjugiranimi s fluorokromom alofikocianinom (Biolegend). Po končnem spiranju smo celice resuspendirali v PBS in jih analizirali na pretočnem citometru Attune NxT (Thermo Fisher Scientific). Delež CD68-pozitivnih celic smo analizirali s programom FlowJo (FlowJo, LLC) ter ga izrazili relativno na kontrolne celice.

## 2.6 DOLOČANJE CELIČNEGA PREŽIVETJA Z OZNAČEVANJEM S 7-AAD IN PRETOČNO CITOMETRIJO

Citotoksičnost in neuroprotektivne učinke smo ocenili z označevanjem s 7-aminoaktinomycinom D (7-AAD; Sigma-Aldrich) in pretočno citometrijo. Na izbrano časovno točko smo zbrali adherentne in plavajoče celice SH-SY5Y, jih sprali v PBS in označili s 7-AAD ( $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 10 min pri sobni temperaturi v temi. Analizo smo izvedli na pretočnem citometru Attune NxT. Delež 7-AAD-pozitivnih celic smo analizirali s programom FlowJo in ga izrazili relativno na kontrolne celice.





**Slika 3:** Diferenciacija celic SH-SY5Y v dopaminergični podtip nevronov in učinek zaviralca katepsina X, AMS36, pri 6-OHDA-spodbujeni toksičnosti. (A) Shema eksperimentalnega poteka. Ustvarjeno s programom BioRender. Horvat, S. (2026). BioRender.com/67j1mhv. (B) Reprerentativni fazno-kontrastni posnetki nediferenciranih in diferenciranih celic. Puščice nakazujejo celične izrastke. (C) Prikaz izražanja TH z GAPDH in pripadajoča denzitometrična kvantifikacija razmerja TH/GAPDH. Rezultati so prikazani kot povprečje ± SEM treh neodvisnih poskusov (n = 3), relativno na nediferencirane kontrolne celice. \*P < 0,05. (D) Delež celic, pozitivnih na 7-AAD. Rezultati so prikazani kot povprečje ± SEM treh neodvisnih poskusov (n = 3), izvedenih v dveh paralelah, relativno na diferencirane netretirane celice. \*P < 0,05. (E) Aktivnost kaspaze-3. Rezultati so prikazani kot povprečje ± SEM dveh neodvisnih poskusov (n = 2), izvedenih v dveh paralelah, relativno na diferencirane netretirane celice. \*P < 0,05. GAPDH – glicer aldehid-3-fosfat dehidrogenaza; PMA – 12-O-tetradekanoilforbol-13-acetat; RA – retinojska kislina; SEM – standardna napaka srednje vrednosti; TH – tirozin hidroksilaza; 6-OHDA – 6-hidroksidopamin; 7-AAD – 7-aminoaktinomomicin D.

**Figure 3:** Differentiation of SH-SY5Y cells into a dopaminergic neuronal subtype and the effect of the cathepsin X inhibitor AMS36 on 6-OHDA-induced toxicity. (A) Experimental flow chart. Created in BioRender. Horvat, S. (2026). BioRender.com/67j1mhv. (B) Representative phase-contrast images of undifferentiated and differentiated cells. Arrows indicate cell protrusions. (C) Expression of TH with GAPDH, and corresponding densitometric quantification of the TH/GAPDH ratio. Results are shown as mean ± SEM of three independent experiments (n = 3), relative to undifferentiated control cells. \*P < 0.05. (D) Proportion of 7-AAD positive cells. Results are shown as mean ± SEM of three independent experiments (n = 3), performed in duplicate, relative to differentiated untreated cells. \*P < 0.05. (E) Caspase-3 activity. Results are shown as mean ± SEM of two independent experiments (n = 2) performed in duplicate, relative to differentiated untreated cells. \*P < 0.05. GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; PMA – phorbol 12-myristate 13-acetate; RA – retinoic acid; SEM – standard error of the mean; TH – tyrosine hydroxylase; 6-OHDA – 6-hydroxydopamine; 7-AAD – 7-Aminoactinomycin D.

## 2.7 MERJENJE AKTIVNOSTI KASPAZE-3

Aktivnost kaspaze-3 smo določili v celokupnih celičnih lizatih z uporabo fluorescenčnega substrata Ac-DEVD-AFC (Bachem). 20 µg proteinov v reakcijskem pufri v sestavi 20 mM PIPES, 10 % saharoze, 0,1 % CHAPS, 1 mM

EDTA in 100 mM NaCl s pH 7,2 smo inkubirali 30 min pri 37 °C. Po dodatku substrata Ac-DEVD-AFC (100 µM) smo začeli merjenje fluorescence za 30 min s čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan Safire<sup>2</sup>. Rezultate smo izrazili kot spremembo fluorescence skozi čas, aktivnost kaspaze-3 pa prikazali relativno na kontrolne celice.

## 2.8 ENCIMSKO-IMUNSKI TEST NA TRDNEM NOSILCU (ELISA)

Ravni vnetnih mediatorjev TNF- $\alpha$  in interleukina 6 (IL-6) smo določili s kompletoma ELISA (Abcam) v skladu z navodili proizvajalca. V vdolbinice smo nanесли standarde ter enake volumne vzorcev celičnih supernatantov in dodali mešanico protiteles. Po 1-urni inkubaciji smo ploščo sprali, dodali substrat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin in po 10 min reakcijo zaustavili z raztopino H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Absorbanco smo izmerili pri 450 nm s spektrofotometrom Tecan Safire<sup>2</sup>, rezultate pa izrazili relativno na kontrolne celice.

## 2.9 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Rezultate smo statistično vrednotili in jih prikazali kot povprečno vrednost neodvisnih bioloških meritev (n)  $\pm$  standardna napaka povprečja (SEM). Za analizo več kot dveh vzorcev smo uporabili analizo enosmerne variance (ANOVA), ki ji je sledil post-hoc Tukeyjev test za večkratne primerjave med skupinami. Statistično analizo smo izvedli s pomočjo programske opreme GraphPad Prism.

# 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

## 3.1 VZPOSTAVITEV CELIČNEGA MODELA ALZHEIMERJEVE BOLEZNI IN VREDNOTENJE UČINKA ZAVIRALCA KATEPSINA X

Za vzpostavitev celičnega modela AB smo celice SH-SY5Y diferencirali v holinergični podtip nevronov z RA v kombinaciji z BDNF. Po zaključeni diferenciaciji smo celice predhodno tretirali z zaviralcem katepsina X, AMS36, in jih nato izpostavili fibriliranemu peptidu A $\beta$ , ki je znan ključni patološki dejavnik pri AB, povezan s sinaptično disfunkcijo, nevrotoksičnostjo in sprožitvijo vnetnih odzivov (29). Vrednotenje smo izvedli 24 h po izpostavitvi (slika 2A). Morfološka analiza je pokazala, da je diferenciacija povzročila večje število in daljše celične izrastke v primerjavi z nediferenciranimi kontrolnimi celicami, kar potrjuje prehod v bolj zrel, nevronu podoben fenotip (slika 2B). Analiza prenosa western je pokazala povečano izražanje AChE, denzitometrična kvantifikacija pa statistično značilno povečanje njegovega signala pri diferenciranih celicah, kar potrjuje

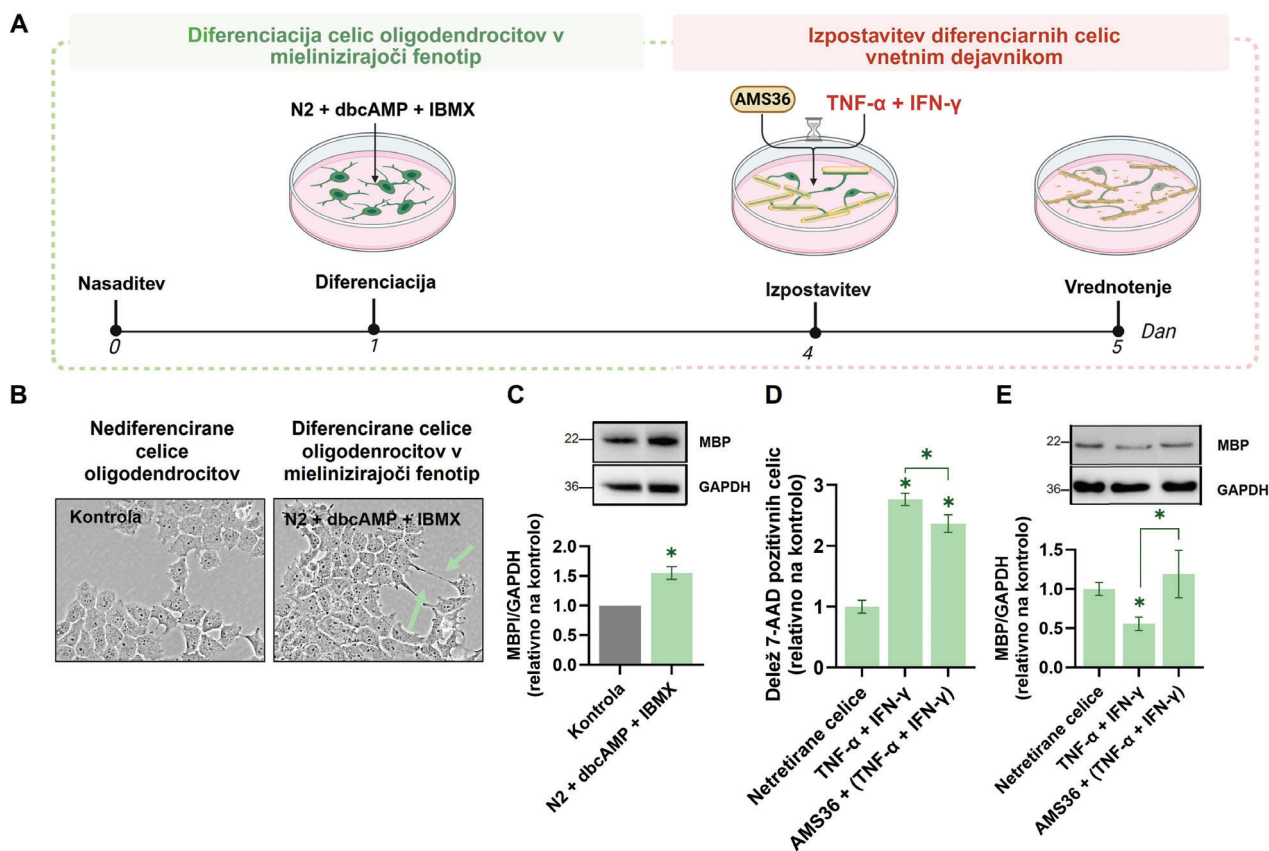
funkcionalno zorenje celic (slika 2C). Po izpostavitvi diferenciranih celic A $\beta$  smo zaznali povečanje kazalnikov celične poškodbe. To se je odrazilo v povečanem deležu celic, pozitivnih na 7-AAD, ki predstavlja kazalnik izgube membranske integritete (slika 2D), ter v povišani aktivnosti kaspaze-3, značilnega označevalca apoptoze (slika 2E). Predhodno tretiranje z AMS36 je z A $\beta$ -sprožene nevrotoksične učinke ublažilo, kar se je pokazalo kot nižje vrednosti obeh merjenih izidov, pri čemer je bilo zmanjšanje deleža celic, pozitivnih na 7-AAD, statistično značilno.

Rezultati potrjujejo uspešno vzpostavitev holinergičnega modela AB. Diferenciacija celic je privedla do fenotipa, ki je morfološko in biokemijsko bližje prizadetim holinergičnim nevronom, AMS36 pa je v pogojih z A $\beta$  povzročene poškodbe pokazal zaščitni učinek.

## 3.2 VZPOSTAVITEV CELIČNEGA MODELA PARKINSONOVE BOLEZNI IN VREDNOTENJE UČINKA KATEPSINA X

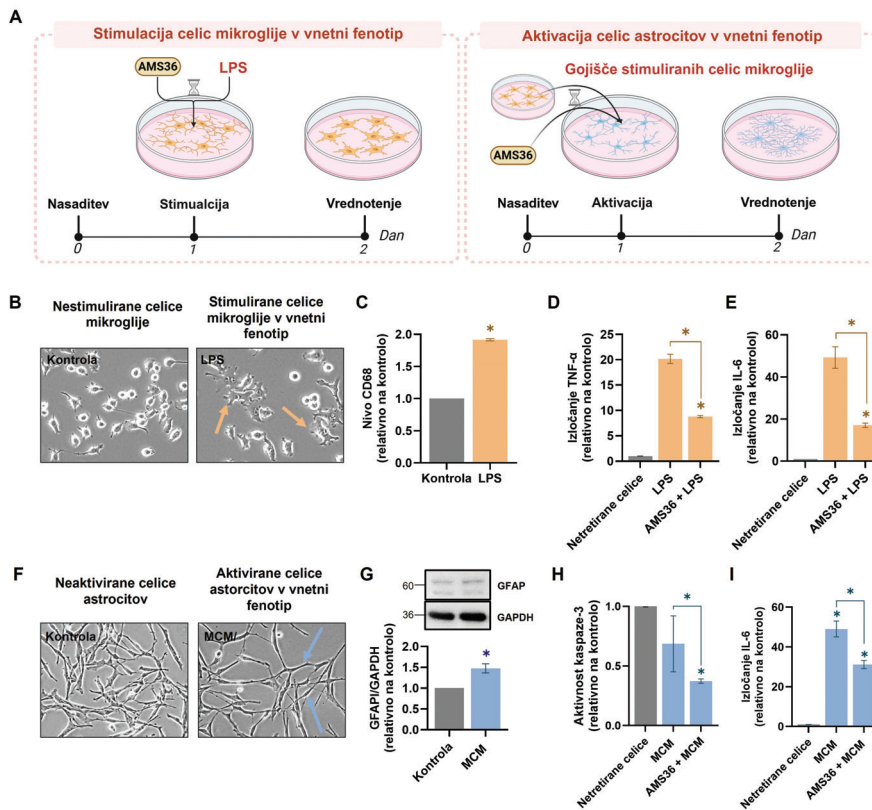
Za vzpostavitev celičnega modela PB smo celice SH-SY5Y diferencirali v dopaminergičnemu fenotipu podoben nevrski podtip z uporabo RA v kombinaciji s PMA (slika 3A). Po diferenciaciji smo opazili morfološke spremembe, značilne za dopaminergično usmerjeno diferenciacijo, predvsem podaljšane celične izrastke v primerjavi z nediferenciranimi kontrolnimi celicami (slika 3B). Dopaminergičnim nevronom podoben podtip smo dodatno potrdili z metodo prenosa western, kjer je bila v diferenciranih celicah povišana raven TH, ključnega encima dopaminergičnega metabolizma (slika 3C). Diferencirane celice smo nato uporabili za vzpostavitev dopaminergične poškodbe s 6-OHDA, ki je uveljavljen nevrotoksin za eksperimentalno posnemanje patologije PB, saj selektivno poškoduje dopaminergične nevrone predvsem prek sprožitve oksidativnega stresa in posledične celične okvare (30). Rezultati so pokazali izrazito celično poškodbo, izkazano kot povečan delež celic, pozitivnih na 7-AAD (slika 3D), in povišana aktivnost kaspaze-3 (slika 3E), pri čemer ugotovitev glede aktivnosti kaspaze-3 temelji na omejenem številu neodvisnih poskusov. Predhodno tretiranje z zaviralcem katepsina X, AMS36, je toksične učinke 6-OHDA ublažilo, pri čemer je bil učinek najbolj izrazit na ravni zmanjšanja deleža celic, pozitivnih na 7-AAD. Skupni rezultati potrjujejo, da je bil celični model dopaminergične poškodbe uspešno vzpostavljen, hkrati pa kažejo, da zaviranje katepsina X prispeva k zaščiti dopaminergičnemu podtipu podobnih nevronov v pogojih poškodbe, sprožene s 6-OHDA.





**Slika 4:** Diferenciacija celic oligodendrocitov HOG v mielinizirajoči fenotip in učinek zaviralca katepsina X, AMS36, pri vnetni stimulaciji. (A) Shema eksperimentalnega poteka. Ustvarjeno s programom BioRender. Horvat, S. (2026). BioRender.com/67j1mhv. (B) Reprezentativni fazno-kontrastni posnetki nediferenciranih in diferenciranih celic. Puščice nakazujejo celične izrastke. (C) Prikaz izražanja MBP z GAPDH in pripadajoča denzitometrična kvantifikacija razmerja MBP/GAPDH po diferenciaciji. Rezultati so prikazani kot povprečje ± SEM štirih neodvisnih poskusov (n = 4), relativno na nediferencirane kontrolne celice. \*P < 0,05. (D) Delež celic, pozitivnih na 7-AAD, po vnetni stimulaciji (TNF-α + IFN-γ). Rezultati so prikazani kot povprečje ± SEM treh neodvisnih poskusov (n = 3), izvedenih v dveh paralelah, relativno na diferencirane netretirane celice. \*P < 0,05. (E) Prikaz izražanja MBP z GAPDH in pripadajoča denzitometrična kvantifikacija razmerja MBP/GAPDH po vnetni stimulaciji (TNF-α + IFN-γ). Rezultati so prikazani kot povprečje ± SEM dveh neodvisnih poskusov (n = 2), relativno na nediferencirane kontrolne celice. \*P < 0,05. dbcAMP – dibutilil ciklični adenosin monofosfat; GAPDH – gliceralehid-3-fosfat dehidrogenaza; IBMX – 3-izobutil-1-metilksantin; IFN-γ – intereferon gama; MBP – mielinški bazični protein; N2 – dodatek N2; SEM – standardna napaka srednje vrednosti; TNFα – tumorje nekrotizirajoči faktor alfa.

**Figure 4:** Differentiation of HOG oligodendrocyte cells into a myelinating phenotype and the effect of the cathepsin X inhibitor, AMS36, under inflammatory stimulation. (A) Experimental flow chart. Created in BioRender. Horvat, S. (2026). BioRender.com/67j1mhv. (B) Representative phase-contrast images of undifferentiated and differentiated cells. Arrows indicate cell protrusions. (C) Depiction of MBP expression with GAPDH, and corresponding densitometric quantification of the MBP/GAPDH ratio after differentiation. Results are shown as mean ± SEM of four independent experiments (n = 4), relative to undifferentiated control cells. \*P < 0.05. (D) Proportion of 7-AAD positive cells after inflammatory stimulation (TNF-α + IFN-γ). Results are shown as mean ± SEM of three independent experiments (n = 3), performed in duplicate, relative to differentiated untreated cells. \*P < 0.05. (E) Depiction of MBP expression with GAPDH and corresponding densitometric quantification of the MBP/GAPDH ratio after inflammatory stimulation (TNF-α + IFN-γ). Results are shown as mean ± SEM of two independent experiments (n = 2), relative to undifferentiated control cells. \*P < 0.05. dbcAMP – dibutyl cyclic adenosine monophosphate; GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IBMX – 3-Isobutyl-1-methylxanthine; IFN-γ – intereferon gamma; MBP – myelin basic protein; N2 – supplement N2; SEM – standard error of the mean; TNFα – tumor necrosis factor alpha



**Slika 5:** Aktivacija mikroglije in astrocitov v vnetni fenotip ter učinek zaviralca katepsina X, AMS36, pri nevrovnetju. (A) Shema eksperimentalnega poteka. Ustvarjeno v programu BioRender. Horvat, S. (2026). BioRender.com/67j1mhv. (B) Reprerativni fazno-kontrastni posnetki kontrolne in stimulirane mikroglije. Puščice nakazujejo morfološke spremembe po stimulaciji. (C) Analiza izražanja CD68. Rezultati so prikazani kot povprečje ± SEM dveh neodvisnih poskusov (n = 2), izvedenih v dveh paralelah, relativno na netretirane kontrolne celice. \*P < 0,05. (D,E) Kvantifikacija izločanja TNF-α (D) in IL-6 (E) iz celic mikroglije. Rezultati so prikazani kot povprečje ± SEM dveh neodvisnih poskusov (n = 2), izvedenih v dveh paralelah, relativno na netretirane kontrolne celice. \*P < 0,05. (F) Reprerativni fazno-kontrastni posnetki kontrolnih in aktiviranih celic astrocitov. Puščice nakazujejo celične izrastke. (G) Prikaz izražanja GFAP z GAPDH in pripadajoča denzitometrična kvantifikacija razmerja GFAP/GAPDH po aktivaciji astrocitov. Rezultati so prikazani kot povprečje ± SEM dveh neodvisnih poskusov (n = 2), relativno na netretirane kontrolne celice. \*P < 0,05. (H) Kvantifikacija izločanja IL-6 iz celic astrocitov. Rezultati so prikazani kot povprečje ± SEM dveh neodvisnih poskusov (n = 2), izvedenih v dveh paralelah, relativno na netretirane kontrolne celice. \*P < 0,05. (I) Aktivnost kaspaze-3 v celicah astrocitov. Rezultati so prikazani kot povprečje ± SEM dveh neodvisnih poskusov (n = 2), izvedenih v dveh paralelah, relativno na netretirane kontrolne celice. \*P < 0,05. CD68 – označevalec pripadnosti 68; GAPDH – gliceralehid-3-fosfat dehidrogenaza; GFAP – glijalni fibrilarni kisl protein; IL-6 – interlevkin 6; LPS – lipopolisaharid; MCM – kondicionirano gojišče mikroglije; SEM – standardna napaka srednje vrednosti; TNFα – tumorje nekrotizirajoči faktor alfa.

**Figure 5:** Activation of microglia and astrocytes toward an inflammatory phenotype and the effect of the cathepsin X inhibitor AMS36 in neuroinflammation. (A) Experimental flow chart. Created in BioRender. Horvat, S. (2026). BioRender.com/67j1mhv. (B) Representative phase-contrast images of control and stimulated microglia. Arrows indicate morphological changes after stimulation. (C) Analysis of CD68 expression. Results are shown as mean ± SEM of two independent experiments (n = 2) performed in duplicate, relative to untreated control cells. \*P < 0.05. (D, E) Quantification of TNF-α (D) and IL-6 (E) secretion from microglia cells. Results are shown as mean ± SEM of two independent experiments (n = 2) performed in duplicate, relative to untreated control cells. \*P < 0.05. (F) Representative phase-contrast images of control and activated astrocyte cells. Arrows indicate cell protrusions. (G) Depiction of GFAP expression with GAPDH and corresponding densitometric quantification of the GFAP/GAPDH ratio after astrocyte activation. Results are shown as mean ± SEM of two independent experiments (n = 2), relative to untreated control cells. \*P < 0.05. (H) Quantification of IL-6 secretion from astrocyte cells. Results are shown as mean ± SEM of two independent experiments (n = 2), performed in duplicate, relative to untreated control cells. \*P < 0.05. (I) Caspase-3 activity in astrocyte cells. Results are shown as mean ± SEM of two independent experiments (n = 2), performed in duplicate, relative to untreated control cells. \*P < 0.05. CD68 – cluster of differentiation; GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFAP – glial fibrillary acidic protein; IL-6 – interleukin 6; LPS – lipopolysaccharide; MCM – microglia conditioned media; SEM – standard error of the mean; TNFα – tumor necrosis factor alpha.

### 3.3 DIFERENCIACIJA OLIGODENDROCITNIH CELIC V MIELINIZIRAJOČI FENOTIP TER UČINEK ZAVIRALCA KATEPSINA X NA POŠKODBO, POVZROČENO Z VNETJEM

Za vzpostavitev celičnega modela poškodbe oligodendrocitov, povzročene s citokini, smo celice oligodendrocitov diferencirali z dodatkom N2, dbcAMP in IBMX (slika 4A). Po diferenciaciji smo opazili morfološke spremembe, značilne za zrele oligodendrocite, ki so sposobni tvoriti mielin, kar se je kazalo predvsem z izrazitejšimi in daljšimi izrastki v primerjavi z nediferenciranimi kontrolnimi celicami (slika 4B). Prehod v mielinizirajoči fenotip smo potrdili z analizo specifičnega označevalca mielina MBP s prenosom western, pri čemer je bilo razmerje MBP/GAPDH statistično značilno povišano glede na kontrolo (slika 4C). Za posnemanje vnetnega mikrookolja smo diferencirane celice izpostavili kombinaciji vnetnih dejavnikov, in sicer TNF- $\alpha$  in IFN- $\gamma$ . Vnetna stimulacija je povzročila povečano celično poškodbo diferenciranih oligodendrocitov, kar se je odrazilo v višjem deležu celic, pozitivnih na 7-AAD (slika 4D). Hkrati se je znižalo razmerje MBP/GAPDH, kar kaže na poškodbo mielinskega fenotipa celic oligodendrocitov pod vnetnimi pogoji (slika 4E). Predhodno tretiranje z AMS36 je citotoksični učinek vnetnih citokinov ublažilo, kar se je pokazalo kot nižji delež celic, pozitivnih na 7-AAD, in ohranitev MBP.

Rezultati potrjujejo, da model omogoča zanesljivo pridobitev mielinizirajočega fenotipa oligodendrocitov in je primeren za preučevanje vnetno posredovane poškodbe. Povečan delež mrtvih celic in znižana raven MBP po izpostavitvi TNF- $\alpha$  in IFN- $\gamma$  kažeta, da vnetje prispeva tako k odmiranju oligodendrocitov kot k okrnitvi njihovih mielinizirajočih lastnosti. Zmanjšanje celične smrti po tretiranju z AMS36 podpira vlogo katepsina X pri vnetno sproženi poškodbi oligodendrocitov, učinek na raven MBP pa je treba presojeti v okviru omejenega števila neodvisnih poskusov.

### 3.4 AKTIVACIJA CELIC MIKROGLIJE IN ASTROCITOV V VNETNI FENOTIP IN UČINEK ZAVIRALCA KATEPSINA X NA NEVROVNETJE

Za posnemanje nevrovnetnega mikrookolja smo najprej aktivirali celice mikroglije in nato ovrednotili vpliv mikrogljsko sproščenih mediatorjev na reaktivnost astrocitov. Celice

mikroglije smo stimulirali z LPS (slika 5A), ki sproži vnetno aktivacijo mikroglije in s tem posnema izpostavljenost patogenim signalom v vnetnem mikrookolju (21). Po stimulaciji mikroglije z LPS smo opazili morfološke spremembe, skladne z aktivacijo mikroglije, in sicer prehod v bolj razvejan fenotip s kratkimi izrastki (slika 5B). To preoblikovanje je spremljalo tudi povišano izražanje površinskega označevalca CD68, ki je značilno za vnetno, t. i. M1 polarizacijo mikroglije (slika 5C). Predhodno tretiranje z zaviralcem katepsina X, AMS36, je pri celicah mikroglije, stimuliranih z LPS, značilno zmanjšalo izločanje TNF- $\alpha$  in IL-6 v primerjavi s celicami, stimuliranimi z LPS, a brez tretiranja z zaviralcem, kar kaže na ublažitev vnetnega odziva.

Za oceno vpliva mikrogljsko posredovanega vnetja na astrocite smo le-te izpostavili gojišču mikroglije MCM. Ob izpostavitvi MCM smo opazili morfološke spremembe, značilne za astrocitrno reaktivnost, predvsem izrazitejšo celično hipertrofijo in podaljšanje celičnih izrastkov (slika 5F), kar je skladno s prehodom v reaktivni fenotip. Aktivacijo smo potrdili tudi na proteinski ravni s povišanim razmerjem GFAP/GAPDH (slika 5G). Aktivnost kaspaze-3 se v celicah astrocitov po izpostavitvi MCM ni izrazito povečala, vendar je bila ob predhodnem tretiranju z AMS36 nižja v primerjavi s kontrolno izpostavitvijo MCM, kar nakazuje, da AMS36 lahko prispeva k zmanjšanju apoptotskega odziva na vnetni dražljaj (slika 5H). Izpostavitev celic MCM je hkrati sprožila izrazit porast izločanja IL-6, dodatek AMS36 pa je ta porast značilno zmanjšal, kar kaže na omejitev vnetnega odziva tudi v posrednem ko-kulturnem modelu celic mikroglije in astrocitov (slika 5I).

Rezultati nakazujejo, da zaviranje katepsina X z AMS36 zmanjšuje vnetni odziv mikroglije in omejuje reaktivnost astrocitov. Ugotovitve podpirajo vlogo medcelične komunikacije med obema celičnima tipoma pri nevrovnetju ter kažejo, da zaviranje katepsina X lahko vpliva tudi na posredovano stopnjevanje vnetnega odziva med mikrogljo in astrociti. Ob tem je treba upoštevati, da sklepi v tem delu temeljijo na omejenem številu neodvisnih poskusov.

## 4 SKLEP

Predstavljeni rezultati potrjujejo ustreznost vzpostavljenih predkliničnih celičnih modelov, saj so usmerjena diferenciacija ter toksični in vnetni dražljaji ponovljivo posnemali ključne značilnosti nevrodegeneracije in nevrovnetja v po-

sameznih celičnih tipih osrednjega živčevja. Modeli omogočajo spremljanje celičnega fenotipa, okvare, apoptoze in izločanja vnetnih mediatorjev, zato so primerni za zgodnje predklinično vrednotenje tarčno usmerjenih pristopov. Zavrnanje katepsina X z AMS36 je pokazalo zaščitni učinek na nevrone in protivnetno delovanje v vnetno stimuliranih celicah glije, kar podpira pomembno vlogo katepsina X pri uravnavanju celične okvare in stopnjevanju vnetnega mikrookolja. Pri pridobljenih izsledkih je potrebno v obzir upoštevati omejitve poenostavljenih celičnih sistemov. Nadaljnji koraki zato predstavljajo nadgradnjo v večcelične modele, ki bodo bolj posnemali medcelično komunikacijo in omogočili zanesljivejše vrednotenje učinkovitosti spojin vodnic v bolezenskim razmeram bolj podobnih pogojih.

## 5 LITERATURA

- Ji Z, Chen Q, Yang J, Hou J, Wu H, Zhang L. Global, regional, and national health inequalities of Alzheimer's disease and Parkinson's disease in 204 countries, 1990–2019. *International Journal for Equity in Health*. 2024;23(1):125.
- Wang S, Jiang Y, Yang A, Meng F, Zhang J. The Expanding Burden of Neurodegenerative Diseases: An Unmet Medical and Social Need. *Aging and disease*. 2024;16(5):2937–52.
- Cappa S. Neurodegeneration. *Journal of the Neurological Sciences*. 2019;405:51.
- Surmeier DJ. Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease. *The FEBS Journal*. 2018;285(19):3657–68.
- Hampel H, Mesulam MM, Cuellar AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. *Brain*. 2018;141(7):1917–33.
- Cetin S, Knez D, Gobec S, Kos J, Pišlar A. Cell models for Alzheimer's and Parkinson's disease: At the interface of biology and drug discovery. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;149:112924.
- Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, et al. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Spine*. 2016;1(1):1003.
- Zhang W, Xiao D, Mao Q, Xia H. Role of neuroinflammation in neurodegeneration development. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023(1):267.
- Jessen KR. Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004;36(10):1861–7.
- Salas IH, Burgado J, Allen NJ. Glia: victims or villains of the aging brain? *Neurobiology of Disease*. 2020;143:105008.
- Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*. 2017;35(1):441–68.
- Fan YY, Huo J. A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils? *Neurochemistry International*. 2021;148:105080.
- Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Translational Neurodegeneration*. 2020;9(1):42.
- Festa LK, Jordan-Sciutto KL, Grinspan JB. Neuroinflammation: An Oligodendrocentric View. *Glia*. 2025;10:70007.
- Miron VE, Kuhlmann T, Antel JP. Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2011;1812(2):184–93.
- Zheng Y, Huang R, Pan J. Dynamic Intercellular Networks in the CNS: Mechanisms of Crosstalk from Homeostasis to Neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2025;26(17):8155.
- Slanzi A, Iannoto G, Rossi B, Zenaro E, Constantin G. In vitro Models of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;8:328.
- Balestri W, Sharma R, Da Silva VA, Bobotis BC, Curle AJ, Kothakota V, et al. Modeling the neuroimmune system in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Journal of Neuroinflammation*. 2024(1):32.
- Kos J, Jevnikar Z, Obermajer N. The role of cathepsin X in cell signaling. *Cell Adhesion & Migration*. 2009;3(2):164–6.
- Pišlar A, Tratnjek L, Glavan G, Zidar N, Živin M, Kos J. Neuroinflammation-Induced Upregulation of Glial Cathepsin X Expression and Activity in vivo. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2020;13:575453.
- Pišlar A, Božić B, Zidar N, Kos J. Inhibition of cathepsin X reduces the strength of microglial-mediated neuroinflammation. *Neuropharmacology*. 2017;114:88–100.
- Pišlar A, Tratnjek L, Glavan G, Živin M, Kos J. Upregulation of Cysteine Protease Cathepsin X in the 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2018;11:412.
- Horvat S, Kos J, Pišlar A. Multifunctional roles of  $\gamma$ -enolase in the central nervous system: more than a neuronal marker. *Cell & Bioscience*. 2024;14(1):61.
- Hafner A, Obermajer N, Kos J.  $\gamma$ -Enolase C-terminal peptide promotes cell survival and neurite outgrowth by activation of the PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling pathways. *Biochemical Journal*. 2012;443(2):439–50.
- Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, Fonović UP, Kos J. Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neurite outgrowth of neuronal cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(8–9):1685–96.
- Kovalevich J, Langford D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. In: Amini S, White MK, editors. *Neuronal Cell Culture [Internet]*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013 [cited 2026 Feb 26]. p. 9–21. (Methods in Molecular Biology). Available from: [https://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-640-5\\_2](https://link.springer.com/10.1007/978-1-62703-640-5_2).
- De Kleijn KMA, Zuure WA, Peijnenborg J, Heuvelmans JM, Martens GJM. Reappraisal of Human HOG and MO3.13 Cell Lines as a Model to Study Oligodendrocyte Functioning. *Cells*. 2019;8(9):1096.
- Pišlar AH, Zidar N, Kikelj D, Kos J. Cathepsin X promotes 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of PC12 and SH-SY5Y cells. *Neuropharmacology*. 2014;82:121–31.
- Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, et al. The Amyloid- $\beta$  Pathway in Alzheimer's Disease. *Molecular Psychiatry*. 2021;26(10):5481–503.
- Mendes-Pinheiro B, Soares-Cunha C, Marote A, Loureiro-Campos E, Campos J, Barata-Antunes S, et al. Unilateral Intrastratial 6-Hydroxydopamine Lesion in Mice: A Closer Look into Non-Motor Phenotype and Glial Response. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(21):11530.