Procjena utjecaja kemijski funkcionaliziranih jednozidnih ugljikovih nanocjevčica na razine parametara oksidativnog stresa i upale u astrocitima izloženih in vitro traumatskoj ozljedi

Jurički, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

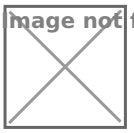
2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:355428

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

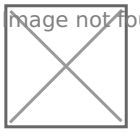


Repository / Repozitorij:

Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository







SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
„Istraživanje i razvoj lijekova"

Ivana Jurički

Procjena utjecaja kemijski funkcionaliziranih jednozidnih ugljikovih nanocjevčica na razine parametara oksidativnog stresa i upale u astrocitima izloženih *in vitro* traumatskoj ozljedi

Diplomski rad

Rijeka, 2021. godine

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
„Istraživanje i razvoj lijekova"

Ivana Jurički

Procjena utjecaja kemijski funkcionaliziranih jednozidnih ugljikovih nanocjevčica na razine parametara oksidativnog stresa i upale u astrocitima izloženih *in vitro* traumatskoj ozljedi

Diplomski rad

Rijeka, 2021. godine

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Kristina Pilipović, dr. med.
Komentorica: dr.sc. Anja Harej Hrkać, mag. biotech. in med.

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Graduate programme
"Drug research and development"

Ivana Jurički

Evaluation of the influence of chemically functionalized single-walled carbon nanotubes on the levels of oxidative stress and inflammation parameters in astrocytes exposed to in vitro traumatic injury

Master`s thesis

Rijeka, 2021

Mentor: Associate Professor Kristina Pilipović, MD, PhD
Co-Mentor: Anja Harej Hrkać, PhD

Sažetak

Svake godine traumatska ozljeda mozga (engl. *traumatic brain injury*, TBI) pogađa gotovo 15 milijuna ljudi uz visoku stopu smrtnosti i invalidnosti te predstavlja ozbiljan globalni javnozdravstveni i socioekonomski problem. Astrociti su ključne stanice središnjeg živčanog sustava (SŽS) u odgovoru na traumu te dosadašnja istraživanja upućuju na njihovu potencijalnu ulogu u oporavku SŽS-a nakon ozljede. Manjak učinkovite farmakološke terapije potaknuo je ideju za korištenjem nanomaterijala kao potencijalnim rješenjem u liječenju TBI. U ovom radu opisani su neki učinci primjene jednozidnih ugljikovih nanocjevčica (engl. *single walled carbon nanotubes*, SWCNTs), kemijski funkcionaliziranih s poli-m-aminobenzen sulfonskom kiselinom (PABS) na primarne mišje astrocite u *in vitro* modelu teške traumatske ozljede mozga (engl. *severe traumatic brain injury*, sTBI).

Ispitan je utjecaj PABS-SWCNTs na razine oksidativnog oštećenja proteina nakon ozljede astrocita brzim rastezanjem te nije zamijećena značajna razlika u razini sadržaja karboniliranih proteina u ozlijeđenih stanica, netretiranih ili nakon dodavanja PABS-SWCNTs u odnosu na kontrolnu skupinu. Primjena PABS-SWCNTs povećala je razinu izražaja kiselog fibrilarnog proteina glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) nakon sTBI u odnosu razine zabilježene u uzrocima stanica kontrolne skupine, ali i ozlijeđenih, netretiranih stanica. Primjena PABS-SWCNTs na ozlijeđene stanice ne utječe na razinu ekspresije iNOS, markera oksidativnog stresa, te EAAT1, membranskog prijenosnika ekscitotoksičnih aminokiselina.

Zaključno, rezultati ovog rada upućuju da PABS-SWCNTs ne utječu na razinu oksidativnog stresa u ozlijeđenim astrocitima. Također pokazan je utjecaj PABS-SWCNTs na povećanu ekspresiju GFAP-a. Međutim, potrebno je provesti daljnja kako bi se utvrdilo jesu su PABS-SWCNTs učinkovite, ali i sigurne za primjenu u liječenju ove bolesti.

Ključne riječi: astrociti, fibrilarni kiseli protein glije, inducibilna sintaza dušikovog oksida, oksidacijski stres, traumatska ozljeda mozga

Abstract

Each year, traumatic brain injury (TBI) affects nearly 15 million people with high mortality and disability rates and is a serious global public health and socioeconomic problem. Astrocytes are key cells of the central nervous system (CNS) in response to trauma, and research to date suggests their potential role in CNS recovery after injury. The lack of effective pharmacological therapy has prompted the idea of using nanomaterials as a potential solution in the treatment of TBI. This thesis reports some effects of the application of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) chemically functionalized with poly-m-aminobenzene sulfonic acid (PABS) on primary mouse astrocytes in an in vitro model of severe traumatic brain injury (severe traumatic brain injury, sTBI).

The effect of PABS-SWCNTs on levels of oxidative protein damage after astrocyte injury by rapid stretching was examined and no significant difference was observed in the level of carbonylated proteins in injured cells, untreated or after the addition of PABS-SWCNTs compared to the control group. The use of PABS-SWCNTs increased the level of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression after sTBI in relation to the level recorded in the control cells but also injured, untreated cells. Application of PABS-SWCNTs to injured cells does not affect the expression level of iNOS, a marker of oxidative stress, and EAAT1, a membrane transporter of excitotoxic amino acids.

In conclusion, the results of this study suggest that PABS-SWCNTs do not affect the level of oxidative stress in injured astrocytes. The effect of PABS-SWCNTs on increased GFAP expression has also been shown. However, further implementation is needed to determine if PABS-SWCNTs are effective, but also safe for use in the treatment of this disease.

Keywords: astrocytes, glial fibrillary acidic protein, inducible nitric oxide synthase, oxidative stress, traumatic brain injury

Diplomski rad obranjen je dana 24. rujna pod povjerenstvom:

1. prof.dr. sc. Anđelka Radojčić Badovinac dr. med.
2. izv. prof. dr. sc. Elitza Markova Car
3. izv. prof. dr. sc. Kristina Pilipović dr. med.

Rad ima 59 stranica, 6 slika, 3 tablice i 51 literaturni navod.

Želim se zahvaliti mentorici izv. prof. dr. sc. Kristini Pilipović, dr. med. na iznimnoj suradnji tijekom protekle akademske godine, na uvijek prisutnom optimizmu i vedrini te odgovorima na bezbroj mojih pitanja.

Također se želim zahvaliti komentorici dr.sc. Anji Harej Hrkać, mag. biotech. in med., na svom nesebično prenesenom praktičnom znanju.

Zahvaljujem se i Niki Gržeti, mag. bioteh. u med., na stalnoj dostupnosti, neizmjernom strpljenju i pozitivnoj energiji.

Zahvaljujem se i svim ostalim djelatnicima Zavoda za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci na pomoći, savjetima, podršci, pozitivnom okruženju i nezaboravnom iskustvu.

Zahvaljujem se i svojoj obitelji i prijateljima što su bili uz mene u svakom trenutku i pružili mi neizmjernu podršku.

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Epidemiologija traumatske ozljede mozga 1
1.2. Patofiziologija traumatske ozljede mozga 2
1.2.1. Primarna ozljeda mozga 3
1.2.2. Sekundarna ozljeda mozga 5
1.2.3. Oksidativni stres 5
1.3. Uloga astrocita u središnjem živčanom sustavu 8
1.3.1. Reaktivna astroglioza 9
1.3.2. Ekscitotoksičnost 10
1.3.3. Stvaranje glijalnog ožiljka 10
1.3.4. Dvojna uloga astrocita u traumatskoj ozljedi mozga 11
1.4. Liječenje traumatske ozljede mozga 12
1.4.1. Budući terapijski pristupi u liječenju traumatske ozljede mozga 13
1.5. Ugljikove nanocjevčice 14
1.5.1. Funkcionalizacija ugljikovih nanocjevčica 15
1.5.2. Potencijalna uporaba ugljikovih nanocjevčica u poremećajima središnjeg živčanog sustava 16
1.5.3. Toksikologija ugljikovih nanocjevčica 16
1.6. Eksperimentalni modeli koji se koriste pri istraživanju traumatske ozljede mozga 17
1.6.1. *In vivo* modeli traumatske ozljede mozga 17
1.6.1.1.1.OZLJEDA USLIJED PADA UTEGA 18
1.6.1.1.2.KONTROLIRANA KORTIKALNA OZLJEDA 18
1.6.1.2.1.AKCELERACIJSKO-DEAKCELERACIJSKI MODEL 19
1.6.1.2.2.MODEL PADA UTEGA PO MARMAUROU 19
1.6.2. *In vitro* modeli traumatske ozljede mozga 20
2. CILJEVI RADA 22
3. MATERIJALI I METODE 23
3.1. Pokusne životinje 23
3.2. *In vitro* istraživanja 23
3.2.1. Izolacija primarne stanične kulture astrocita 23
3.2.2. Priprema primarne stanične kulture astrocita 23
3.2.3. Nasađivanje stanične kulture astrocita na kolagenske ploče 24

3.3. *In vitro* model ozljede brzim rastezanjem primarnih kultura astrocita 25
3.3.1. Dodavanje ugljikovih nanočestica u primarnu kulturu astrocita.... 25
3.5. Western blot (promjena ekspresije enzima iNOS) 26
3.6. Dot blot analiza za određivanje razine oksidativnog oštećenja proteina (mjerenje sadržaja proteinskih karbonilnih skupina)..... 28
3.7. Imunocitofluorescencija 29
3.8. Prikupljanje podataka i statističke analize..... 29
4. REZULTATI 30
4.1. PABS-SWCNTs ne utječu na razinu oksidativnog oštećenja proteina nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro* 30
4.2. PABS-SWCNTs povećavaju izražaj GFAP nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro* 31
4.3. PABS-SWCNTs ne utječu na izražaj iNOS nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro* 32
4.4. PABS-SWCNTs ne utječu značajno na izražaj EAAT1 nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro* 34
5. RASPRAVA 36
5.1. PABS-SWCNTs ne utječu na razinu oksidativnog oštećenja proteina nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro* 36
5.2. PABS-SWCNTs povećavaju izražaj GFAP nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro* 36
5.3. PABS-SWCNTs ne utječu na izražaj iNOS nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro* 37
5.4. PABS-SWCNTs ne utječu značajno na izražaj EAAT1 nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro* 38
6. ZAKLJUČAK..... 40
7. LITERATURA 41
8. ŽIVOTOPIS 47

1. Uvod

1.1. Epidemiologija traumatske ozljede mozga

Traumatska ozljeda mozga (engl. *traumatic brain injury*, TBI) svake godine pogađa milijune ljudi diljem svijeta a najviše pogađa mlađe dobne skupine ljudi: djecu (0-4 godine), adolescente i mlađe odrasle osobe (15-24 godine) zbog prometnih nesreća, slučajnih padova ili sportskih ozljeda (1).

Globalna godišnja stopa incidencije TBI iznosi oko 200 slučajeva na 100000 ljudi što predstavlja približno 15 milijuna pogođenih ljudi, od čega je 1.5 milijuna smrtnih slučajeva (2). Glasgowska ljestvica kome (engl. *Glasgow Coma Scale*, GCS) najčešće se koristi kao sustav kliničke procjene ozbiljnosti TBI-ja. Ozljede osoba s GCS rezultatom od 3 do 8 klasificirane su kao teške TBI, 9 do 12 kao umjerene TBI i 13 do 15 kao blage TBI (3).

Od ukupnog broja slučajeva, udio blagog oblika TBI iznosi 81%, umjerenog TBI 11% i teškog TBI 8% (1). Iako u Sjedinjenim Američkim Državama blagi oblik TBI predstavlja većinu godišnjih slučajeva TBI (75%), troškovi hospitalizacije povezani s teškim TBI-jem čine približno 90% troškova svih oblika TBI (3). Ekonomski i socijalni utjecaj značajan je zbog izravnih i neizravnih troškova liječenja, rehabilitacije i trajnih posljedica. Svjetska zdravstvena organizacija procjenjuje da gotovo 90% smrtnih slučajeva uslijed zadobivenih ozljeda pogađa zemlje s niskim i srednjim prihodima gdje živi 85% svjetskog stanovništva (1).

Dostupni podaci pokazuju ukupno povećanje broja TBI, ali nižu stopu smrtnih slučajeva. Rezultat je rastuća populacija pojedinaca koji žive sa značajnom invalidnošću izravno povezanom s TBI-jem (4).

Tablica 1. Glasgowska ljestvica kome

REAKCIJA	OPIS	BODOVI
OTVARANJE OČIJU	Spontano	4
	Na poziv	3
	Na bol	2
	Nema odgovora	1
VERBALNA REAKCIJA	Orijentiran	5
	Smeten	4
	Neprimjerene riječi	3
	Nerazumljivi glasovi	2
	Nema odgovora	1
MOTORNA REAKCIJA	Sluša naredbe	6
	Lokalizira bol	5
	Povlači se na bol	4
	Odgovor u fleksiji	3
	Odgovor u ekstenziji	2
	Nema odgovora	1

1.2. Patofiziologija traumatske ozljede mozga

Patofiziologija TBI-ja složen je proces koji proizlazi iz primarne i sekundarne ozljede koje uzrokuju smrt stanica, gubitak moždanog tkiva, strukturne i metaboličke abnormalnosti te krajnju neurološku disfunkciju u pacijenata (5).

Primarna ozljeda mozga odnosi se na događaje neposredno nakon mehaničke ozljede i uzrokuje kontuzije i krvarenja. Sekundarna ozljeda

mozga nastupa u roku od nekoliko minuta do nekoliko dana nakon primarne ozljede i uključuje molekularne, kemijske i upalne kaskade molekula odgovorne za daljnje oštećenje mozga (4, 6).

1.2.1. Primarna ozljeda mozga

Primarna ozljeda mozga posljedica je izravnog udarca u glavu ili nagle promjene smjera i brzine gibanja glave (7). Uzrokuje smicanje aksona te mehaničko oštećenje neurona, glija stanica i krvnih žila. Oštećenje nastalo primarnom ozljedom mozga ireverzibilno je i moguće ga je izbjeći samo preventivnim mjerama (8).

Traumatska ozljeda mozga javlja se u različitim oblicima, od blagih promjena svijesti do komatoznog stanja i smrti (4). Razlikuje se žarišna ozljeda mozga koja se javlja u lokaliziranom području i difuzna ozljeda koja uključuje veliko područje mozga (9).

Žarišna ozljeda mozga uključuje kortikalna nagnječenja, epiduralna i subduralna krvarenja (engl. *subdural hematoma*, SDH) te subarahnoidna i intrakranijalna krvarenja (9).

Kortikalne kontuzije rezultat su pritiska mozga uz lubanju i učinka odskoka moždanog tkiva u suprotnom smjeru od smjera udarca. Jačina kontuzije izravno ovisi o količini energije koja se prenosi udarcem te se simptomi različito manifestiraju s obzirom na jačinu i mjesto udarca. Najčešća mjesta na kojima se događaju kontuzije su čeoni i sljepoočni režanj koji su odgovorni za pozornost, pamćenje, motivaciju, planiranje, samokontrolu, osjećaje i opće ponašanje (9).

Epiduralna krvarenja razvijaju se iznad tvrde ovojnice mozga i obično su rezultat oštećenja ili pucanja arterija. Simptomi uključuju prolazni gubitak svijesti, lucidno razdoblje koje traje od nekoliko minuta do nekoliko sati te brzo pogoršanje neurološkog statusa procijenjeno prema GCS-u (9).

Subduralna krvarenja odnosno subduralni hematomi razvijaju se ispod tvrde ovojnice mozga i rezultat su oštećenja vena te se klasificiraju kao akutna, subakutna ili kronična krvarenja. Akutni SDH-ovi obično se razvijaju tijekom prvih 24 do 48 sati nakon ozljede. Hematomi i cerebralni

edemi koji se šire mogu uzrokovati porast intrakranijalnog tlaka (engl. *intracranial pressure*, ICP). Subakutni SDH obično se razvija nakon nekoliko dana do nekoliko tjedana, a kronični SDH razvija se nakon nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci. Porast ICP-a nije tipičan za subakutni i kronični SDH jer cerebralno tkivo ima vremena prilagoditi se rastućem hematomu. Međutim, u slučaju daljnjeg rasta hematoma može doći do točke u kojoj nije moguć smještaj hematoma što dovodi do povećanja ICP-a i neurološkog pogoršanja ovisno o mjestu ozljede i stupnju kompresije (9).

Intrakranijalni hematomi uključuju subarahnoidna krvarenja (engl. *subarrachnoid hemorrhage*, SAH) koja su najčešće rezultat traume i rupture malih kapilara te posljedičnog izlijevanja krvi u subarahnoidni prostor (9) (4). Najčešći uzroci SAH-a su hipertenzija ili puknuće aneurizme međutim mogu nastati i kao rezultat prostrijelnih rana odnosno traumatske ozljede (9).

Potres mozga i difuzna ozljeda aksona dvije su vrste difuzne ozljede mozga. Potres mozga definiran je kao privremena neurološka disfunkcija koja nastaje kao rezultat sile koja djeluje na mozak i može biti blag ili umjeren. Blagi potres mozga rezultira privremenom žarišnom neurološkom disfunkcijom, bez gubitka svijesti ili pamćenja. Umjereni potres mozga rezultira privremenom žarišnom neurološkom disfunkcijom ali uključuje nesvjesticu i gubitak pamćenja a oporavak obično traje nekoliko minuta, sati ili dana. Često se javlja sindrom poslije potresa mozga (postkomocijski sindrom) čiji su simptomi razdražljivost, umor, glavobolja, poteškoće s koncentracijom, vrtoglavica i problemi s pamćenjem koji mogu trajati danima, mjesecima i godinama nakon početne ozljede (9).

Difuzna ozljeda aksona (engl. *diffuse axonal injury,* DAI) rezultat je smicanja aksona. Za nastanak takve ozljede potrebne su značajne rotacijske sile ubrzanja odnosno usporavanja. DAI se radiografski može uočiti kao suptilno hemoragično žarište. Ovisno o tome gdje se aksonalno smicanje odvija, pacijenti imaju različitu kliničku sliku. Simptomi variraju od promijenjene svijesti koja traje nekoliko dana, do trajnog gubitka svijesti

uslijed narušenog integriteta aksona u dijelovima retikularnog aktivacijskog sustava (4).

1.2.2. Sekundarna ozljeda mozga

Unutar nekoliko sati do nekoliko tjedana od primarne ozljede pokreće se niz staničnih i molekularnih mehanizama koji rezultiraju sekundarnom ozljedom mozga. Sistemska oštećenja moždanog tkiva uključujući edeme, povećani ICP i krvarenja uzrokuju smanjeni cerebralni krvotok i poremećaje metabolizma što rezultira ishemijom. Ishemija doprinosi pokretanju biokemijskih i staničnih kaskada koje uključuju: ekscitotoksičnost glutamata, preopterećenje kalcijem, stvaranje slobodnih radikala, disfunkciju mitohondrija, upalne procese i aktivaciju pro-apoptotskih gena (8, 6).

Nakon početne ozljede, oštećene stanice oslobađaju citokine i kemokine koji potiču migraciju perifernih imunosnih stanica na mjesto ozljede. Daljnjim oslobađanjem signalnih molekula pokreće se snažni, sterilni imunološki odgovor. To je potvrđeno mnogim istraživanjima koja izvješćuju o pojačanoj ekspresiji citokina i kemokina u ranoj fazi TBI-ja. Neki od citokina koji su pokazali pojačanu ekspresiju su: interleukin (IL) -1β, faktor tumorske nekroze (TNF) -α, transformirajući faktor rasta-β (TGF-β), interferon-γ (IFNγ), IL-6, IL-10 i IL-12 a kemokini: kemokin (motiv C-C) ligand (CCL) 2, CCL3, CCL4, kemokin (motiv C-X-C) ligand (CXCL) 1, CXCL2, CXXL4, CXCL8 / IL-8 i CXCL10 (5).

Oštećene stanice također oslobađaju ekscitotoksične molekule poput glutamata i aspartata. Ekscitotoksičnost rezultira povećanjem unutarstanične razine kalcija koji pokreće niz mehanizma koji uključuju aktivaciju kaspaza i kalpaza te stvaranje slobodnih radikala što pokreće apoptozu (5, 4).

1.2.3. Oksidativni stres

Stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i reaktivnih dušikovih vrsta (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) u

moždanom tkivu nakon TBI-ja ima ključnu ulogu u pokretanju raznih procesa molekularnog oštećenja, a tu spadaju: peroksidacija lipida, oštećenje DNA i oksidacija proteina. Osim toga, ROS i RNS pojačavaju ekscitotoksičnost glutamata, disfunkciju mitohondrija, ionsku disregulaciju i aktivaciju staničnih proteaza (10).

Slobodni radikal je molekula s nesparenim valentnim elektronom i međusobno se razlikuju u kemijskim svojstvima, reaktivnosti i sposobnosti redukcije odnosno oksidacije. Prvi radikal koji se stvara u TBI djelomičnom redukcijom molekularnog kisika je superoksidni anion (11). Mehanizmi kojima se stvara su sljedeći: fosfolipaze i kaskada arahidonske kiseline (cikloksigenaza, COX), pretvorba ksantin dehidrogenaze u ksantin oksidazu I te ometanje lanca prijenosa elektrona u mitohondrijima. Osim navedenih mehanizma, izvori superoksidnog radikala su: aktivirana mikroglija, infiltrirajući neutrofili i makrofagi te oksidirani Fe^{2+} vezan na hemoglobin (Hb) koji potječe iz oštećenih krvnih žila. Superoksid dismutaza (SOD) brzo i učinkovito eliminira superoksidni anion pretvorbom u H_2O_2+ O_2, koje dalje detoksificira enzim glutation peroksidaza u O_2 + H_2O (10).

Hidroksilni radikal nastaje reakcijom vodikovog peroksida (H_2O_2) i reduciranog željeza odnosno Fentonovom reakcijom. Ove molekule nemaju karakteristične obrambene antioksidanse te imaju izuzetno visok oksido-reduktivni potencijal i mogu lako napasti bilo koju biološku molekulu koja može donirati jedan elektron i nepovratno ju modificirati (10).

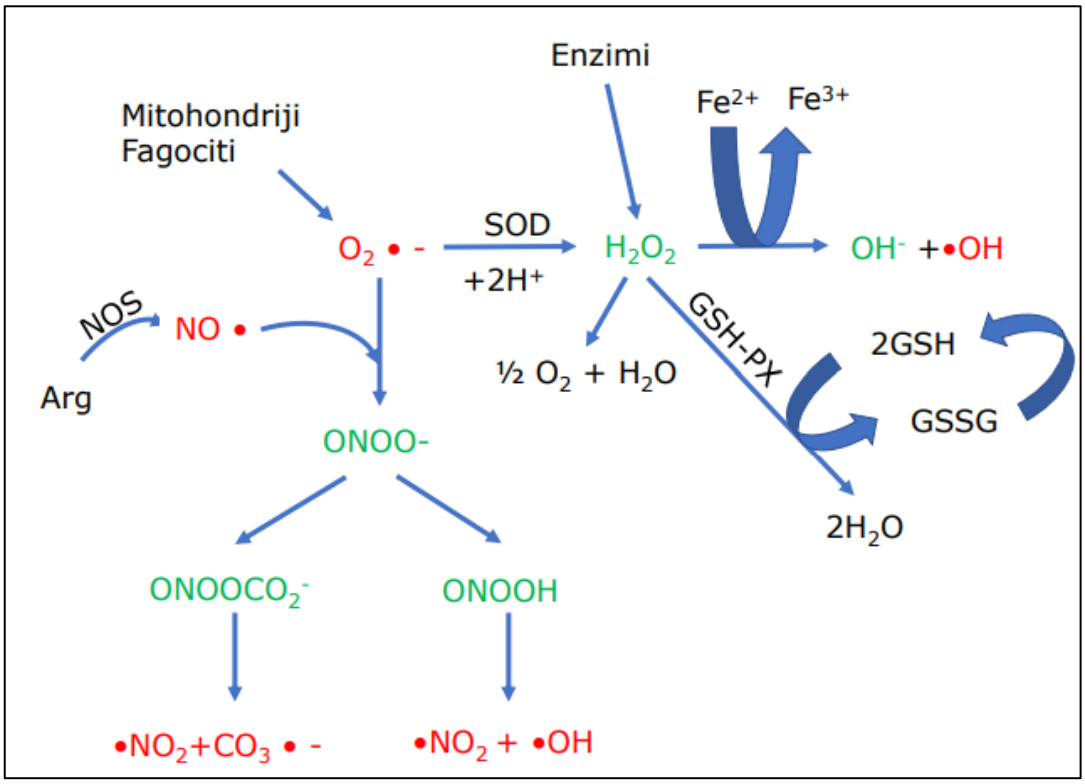
Visok oksido-reduktivni potencijal omogućuje hidroksilnim radikalima da reagiraju s vodikom iz dvostrukih veza nezasićenih membranskih fosfolipida. Tako pokreću proces peroksidacije lipida koji remeti funkciju bioloških membrana (10).

Dušikov oksid (NO) važna je signalna molekula u živčanom, imunološkom i kardiovaskularnom sustavu koja prenosi unutarstanične i međustanične signale presudne za preživljavanje stanica i organa. Proizvode ju enzimi sintaze dušikovog oksida (engl. *nitric oxide synthase*, NOS), a postoje 3 izoforme NOS-a (endotelna, neuronska i inducibilna) koje određuju djelovanje NO (10).

Endotelna i neuronska forma NOS-a (eNOS i nNOS) stvaraju NO koji djeluje kao vazodilatator i ključna je molekula u održavanju cerebralnog protoka krvi (10). Inducibilna forma NOS enzima (iNOS) stvara toksične razine dušikovog oksida (NO). NO koji proizvodi iNOS odgovoran je za toksični učinak aktivirane mikroglije i makrofaga i pogoršava oštećenje neurona posredovano glutamatom *in vitro* (12).

Pojačan izražaj iNOS u astrocitima može se otkriti u rasponu od nekoliko sati do nekoliko dana nakon ishemijske ozljede. U miševa s genetskim nedostatkom iNOS-a zamijećena je smanjena veličina infarkta i smanjeni motorički deficit u odnosu na kontrolu, što upućuje da je izražaj iNOS-a jedan od čimbenika koji doprinose širenju oštećenja mozga koje se javlja u post-ishemijskom razdoblju (12, 13).

Reakcija između NO radikala i superoksidnog aniona ($NO + O_2 \bullet -$) stvara peroksitnitrit ($ONOO \bullet -$) koji se raspada u razne nestabilne RNS te stabilne konačne produkte nitrite i nitrate. Peroksinitrit i RNS uzrokuju lipidnu peroksidaciju mitohondrijskih membrana, daljnje pogoršanje homeostaze Ca^{2+} te proteolizu posredovanu kataliziranim kalpainom (10).



Slika 1. Mehanizam nastajanja ROS i RNS u ozlijeđenim astrocitima. Crvenom su bojom označeni ROS i RNS, a zelenom su bojom označeni ne-radikali. Skraćenice: O2 •- , superoksidni anion; •OH, hidroksilni radikal; OH- , hidroksil; H2O2, vodikov peroksid; NO•, dušikov monoksid; •NO2, dušikov dioksid; CO3 •- , karbonat; ONOO- , peroksinitrit; ONOOCO2 - , nitrozoperoksikarbonat; ONOOH, peroksinitritna kiselina; SOD, superoksid dizmutaza; GSH-Px, glutation peroksidaza; CAT, katalaza; GSSG, oksidirani glutation; GSH, reducirani glutation; Arg, arginin; NOS, sintaza dušikovog oksida.

1.3. Uloga astrocita u središnjem živčanom sustavu

Većinu stanica u mozgu odraslog čovjeka čine glija stanice koje uključuju astrocite, oligodendrocite, mikrogliju i hondroitin sulfat proteoglikan NG2 – pozitivne stanice od kojih su najzastupljenije upravo astrociti (14).

Astrociti predstavljaju ključne stanice u višestaničnom odgovoru na traumu i bolesti središnjeg živčanog sustava (SŽS) te su strukturno, molekularno i funkcionalno različiti u zdravom SŽS i u odgovoru na oštećenje (15).

Karakteristični marker za astrocite je fibrilarni kiseli protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein,* GFAP) koji je jedan od proteina intermedijarnih filamenata, ključnih komponenata citoplazmatskog citoskeleta. Intermedijarni filamenti imaju višestruku ulogu: strukturna su

potpora, čine skele za enzime i organele te reagiraju na mehaničke podražaje iz okoline (16).

Astrociti strukturno podržavaju neurone i razdvajaju SŽS od moždanih ovojnica, krvnih žila i perivaskularnih prostora stvaranjem funkcionalne barijere nazvane *glia limitans*, koja nastaje interakcijom astrocitnih izdanka ili nožica sa bazalnom membranom parenhima. Osim toga, astrociti pružaju i funkcionalnu podršku za neurone što uključuje recikliranje neurotransmitera glutamata putem transportera glutamata i antiporter sustava cistin-glutamat. Imaju ulogu u oslobađanju neurotrofičnih čimbenika i gliotransmitera kao što su glutamat, adenozin trifosfat (ATP), gama - aminomaslačna kiselina (GABA), i D-serin; sintezi glutamina, kolesterola, superoksid dismutaze, glutationa, askorbata i trombospondina (TSP) -1 i -2. Također su uključeni u regulaciju metabolizma pretvaranjem glukoze u laktat te održavanjem homeostaze vode kroz koncentraciju izvanstaničnih iona (5).

Astrociti ispoljavaju i niz receptora putem kojih primaju širok raspon endogenih i egzogenih signala te dinamički reagiraju na ozljede i zarazne čestice. Neki od receptora na astrocitima su: *Toll like* receptori, purinergični receptori, receptori za manozu, receptori za uklanjanje (engl. *scavenger receptors*), nukleotid vežući oligomerni proteini, dvolančana RNA ovisna protein kinaza i komponente komplementarnog sustava (5).

1.3.1. Reaktivna astroglioza

Nakon početka TBI-ja, signali opasnosti induciraju strukturne i funkcionalne promjene astrocita što rezultira aktivacijom astrocita odnosno reaktivnom astrogliozom. Ovaj proces uključuje promjene u morfologiji astrocita, povećanu ekspresiju intermedijarnih filamenata, GFAP-a i vimentina, pojačanu proliferaciju te lučenje upalnih medijatora i čimbenika rasta (6).

Reaktivni astrociti mogu poprimiti hipertrofičnu morfologiju nakon ozljede, što uključuje produženje izdanaka i oticanje stanica. Nedavno istraživanje provedeno na mišjem CCI (engl. *controlled cortical impact*, CCI)

modelu izvijestilo je o hipertrofičnim astrocitima u lezijama i peri-lezijskom području 3 dana nakon TBI-ja a nakon 7 dana uočeno je stvaranje glijalnog ožiljka. Reaktivna glioza zadržana je do 60 dana nakon ozljede demonstrirajući stalni odgovor astrocita na ozljedu mozga (6).

1.3.2. Ekscitotoksičnost

Dok su neuroni vrlo osjetljivi na ekscitotoksičnost, astrociti imaju ključnu ulogu u sprječavanju ekscitotoksičnog učinka. Astrociti unose glutamat iz sinapsi, sprečavajući na taj način pretjerano izvanstanično nakupljanje glutamata. Prijenosnici glutamata EAAT1 (engl. *excitatory amino acid transporter 1)* i EAAT2 (engl. *excitatory amino acid transporter)* neophodni su za ponovni unos glutamata (6). Poznato je da je prisutnost određenog tipa prijenosnika glutamata razvojno regulirana te rani neonatalni astrociti štakora pokazuju vrlo niske razine ekspresije EAAT2 u usporedbi s EAAT1 (17).

Blokiranje EAAT1 i EAAT2 na astrocitima davanjem antisense oligonukleotida u štakora rezultiralo je povećanom izvanstaničnom koncentracijom glutamata (18). Studije o ljudskom TBI pokazale su smanjenje ekspresije EAAT1 i EAAT2 u glija stanicama nakon TBI-a u lezijskim i peri-lezijskim područjima, sugerirajući nizvodnu regulaciju ovih transportera nakon ozljede. Smanjen izražaj EAAT1 i EAAT2 uzrokuje nakupljanje glutamata u izvanstaničnim područjima što pridonosi ekscitotoksičnosti koja dovodi do neurodegeneracije (19).

1.3.3. Stvaranje glijalnog ožiljka

Stvaranje glijalnog ožiljka uključuje astrocite, mikrogliju, endotelne stanice, fibroblaste te izvanstanični matriks. U proces nastanka glijalnih ožiljaka uključeno je nekoliko posrednih molekula, uključujući transformirajući faktor rasta (TGF)-β1, transformirajući faktor rasta (TGF)-2, IFN (interferon)-γ, faktor rasta fibroblasta (FGF) i fibrinogen. Ožiljci djeluju kao fizička barijera za inkapsuliranje oštećenog tkiva koja sprječava istjecanje toksičnih molekula i DAMP-ova (engl.*damage-*

associated molecular patterns) u zdravo tkivo i onemogućava pristup invazivnim stanicama na mjesto ozljede. Suprotno tomu, pokazano je da glijalni ožiljak ima inhibitorni učinak na ponovni rast i regeneraciju aksona (6).

1.3.4. Dvojna uloga astrocita u traumatskoj ozljedi mozga

Odgovori astrocita na ozljedu ovise o njihovoj sposobnosti da poprime različite morfologije i fenotipove na što utječe nekoliko čimbenika: njihovo mjesto u odnosu na ozljedu, signali koje dobivaju iz okoline i razvojni čimbenici (6, 22, 5, 15).

Aktiviranje i proliferacija glija stanica uzrokuje oslobađanje signalnih čimbenika i pokretanje snažne imunološke reakcije koja ima neuroprotektivni učinak i promiče zacjeljivanje rana, ali može postati štetna tijekom vremena. Kako upalni odgovor napreduje, lokalni astroglijalni progenitori oko ozlijeđenog tkiva formiraju glijalni ožiljak koji izolira oštećeno područje, ograničava širenje upalnih stanica, pruža povoljno okruženje za preživjele neurone i održava integritet krvno moždane barijere. Unatoč tome, glijalni ožiljak smatra se glavnom preprekom regeneraciji aksona i oporavku mreže neurona.

Specifične uloge reaktivnih astrocita proučavane su u modelima umjerenog i teškog oblika TBI u mišjem CCI modelu. Uklanjanje proliferirajućih reaktivnih astrocita u miševima rezultiralo je degeneracijom neurona i upalom što upućuje na njihovu ulogu u očuvanju neuronskog tkiva nakon umjerenog TBI-a (19, 20). Pokazalo se da reaktivni astrociti imaju ključnu ulogu u sprječavanju infiltracije upalnih stanica u regije koje sadrže netaknute kortikalne neurone. Suprotno tome blokiranje proliferacije astrocita pomoću sredstava koja remete različite faze staničnog ciklusa dovodi do smanjene smrti neuronskih stanica nakon ozljeda tlakom tekućine u štakora (22). Smanjena proliferacija astrocita popraćena je i smanjenim stvaranjem glijalnih ožiljaka, mikroglijalnom aktivacijom i poboljšanim histološkim i kognitivnim ishodom nakon TBI-a (6, (5) .

1.4. Liječenje traumatske ozljede mozga

TBI karakterizira heterogenost patofizioloških mehanizama što predstavlja jedan od glavnih izazova u liječenju (5). Trenutno ne postoje specifični standardizirani kirurški i farmakološki pristupi u liječenju, što dodatno naglašava potrebu za razjašnjavanjem mehanizma u pozadini TBI (5, 10).

U kliničkoj praksi postoji više načina liječenja koji se razlikuju ovisno o težini ozljede i variraju od dnevne kognitivne terapije sve do radikalnih kirurških procesa poput bilateralne dekompresivne kranijektomije (4).

Dostupna farmakološka terapija usmjerena je na kontrolu intrakranijalnog tlaka, održavajući tako cerebralni protok krvi i smanjujući na taj način oštećenja povezana sa sekundarnom ozljedom (10).

Manitol i hipertonična fiziološka otopina koriste se u sklopu osmotske terapije i djeluju tako da smanjuju edem mozga, poboljšavaju cerebralni protok te reološka svojstva krvi (10).

Antiepileptički lijekovi: fenitoin, fenobarbital, karbamazepin, valproat i levetiracetam sprječavaju napadaje, osobito u prvom tjednu nakon ozljede i indirektno sprječavaju porast ICP-a (10).

Sedativi, kao što su barbiturati (pentobarbital) i benzodiazepini (midazolam) smanjuju ICP te metaboličke zahtjeve neurona (10). Sukcinilkolin, atrakurij i rokuronij izazivaju paralizu. Morfin, fentanil i alfentanil su opioidni analgetici koji djeluju na neuronalne opioidne receptore i smanjuju osjet boli (10).

Od medicinskih intervencija treba spomenuti povišenje glave čime se smanjuje srednji karotidni tlak što rezultira smanjenjem ICP-a bez remećenja cerebralnog protoka krvi. Hiperventilacija se obično koristi tijekom akutnog pogoršanja neurološkog stanja pacijenta. Ona smanjuje parcijalni tlak ugljikovog dioksida u arterijama što uzrokuje smanjenje ICP-a i vazokonstrikciju koja negativno utječe na cerebralni protok krvi i može se javiti lokalna ishemija. Koristi se i terapijska hipotermija. Smanjivanjem tjelesne temperature, metabolička potražnja u mozgu opada i indirektno se na taj način smanjuje učinak oksidativnog oštećenja. Međutim, ova vrsta

terapije može dovesti do promjene razine šećera u krvi, broja trombocita i razine faktora zgrušavanja (4).

Kirurške intervencije koriste se za smanjenje pritiska koji nastaje zbog rastućih epiduralnih ili subduralnih hematoma (4, 10).

1.4.1. Budući terapijski pristupi u liječenju traumatske ozljede mozga

Budući pristupi u liječenju traume mozga usmjereni su na ublažavanje oštećenja nastalih u sekundarnoj ozljedi mozga. Mnogi lijekovi pokazali su terapijski učinak u pretkliničkoj fazi razvoja. Najznačaniji lijekovi su: nimodipin, zikonotid, amantadin, eritropoetin, protein S100B (10).

Dva tipa blokatora kalcijevih kanala pokazali su neuroprotektivni učinak. Nimodipin je L-tip blokator kalcijevih kanala koji učinkovito smanjuje ulazak kalcija u unutarstanični prostor te na taj način sprječava pokretanje kaskade molekula odgovornih za apoptozu stanica u TBI. Kostron i suradnici (24) u svojoj su studiji zabilježili neuroprotektivni učinak nimodipina na temelju regulacije u perfuziji mozga i sprečavanja daljnjeg oštećenja neurona.

Međutim, rezultati meta-analize koju su proveli Vergouwen i suradnici (25) bili su proturječni i pokazali su da nije bilo razlike u smrtnosti pacijenata liječenih nimodipinom i kontrolne skupine.

Zikonotid je N-tip blokatora kalcijevih kanala koji je u više studija pokazao neuroprotektivan učinak. Berman i suradnici (26) pokazali su na modelu difuzne ozljede mozga na štakorima poboljšanje u motoričkim i kognitivnim zadacima nakon administracije zikonotida.

Amantadin djeluje kao antagonist N-metil-D-aspartatnih (NMDA) receptora te štiti neurone od ekscitotoksičnosti glutamata u akutnoj fazi TBI (4).

Sawyer i suradnici (27) u svojoj su studiji pokazali da amantadin u dozama od 200–400 mg/dan poboljšava budnost i kogniciju u bolesnika s TBI-jem.

Eritropoetin (EPO) je glikoprotein čija je primarna uloga u hematopoetskom sustavu, ali ima ulogu i u SŽS. Eritropoetin i njegov receptor (EpoR) vrlo su rašireni te su nedavna istraživanja pokazala njihovu pojačanu ekspresiju u TBI te njihov antiekscitotoksični, antioksidativni, antiedematozni i protuupalni učinak. Predloženi mehanizam kojim EPO ostvaruje svoje djelovanje je vezanje na EpoR i aktiviranje signalnog puta JAK-2 / NF-kB i PI3K. JAK-2 fosforilacija aktivira PI3K / AKT i Ras / MAPK puteve te promiče homodimerizaciju STAT-5 za koju se pokazalo da ima antiapoptotički i neurotrofični učinak (4).

S100β protein veže kalcij koji proizvode glija stanice te je marker oštećenja krvno moždane barijere. U malim dozama djeluje neuroprotektivno dok u većim dozama pojačava neuroinflamaciju i smanjuje preživljenje neurona (4).

Promjena mikrookoliša nakon TBI također može biti terapijska. Molekule paraveksin 1 i neki β-laktamski antibiotici smanjili su ekscitotoksični učinak glutamata (5).

1.5. Ugljikove nanocjevčice

Ugljikove nanocjevčice (engl. *carbon nanotubes*, CNT) konstruirane su nanočestice (engl. *nanoparticles*, NP) nastale iz grafena i mogu biti jednoslojne (engl. *single-walled carbon nanotubes*, SWCNT) ili višeslojne (engl. *multi-walled carbon nanotubes*, MWCNT). Slojevi (od 2 do 50) u MWCNT povezani su Van der Waalsovim vezama. SWCNT i MWCNT imaju slične duljine koje se kreću od nekoliko stotina nanometara do nekoliko desetaka mikrometara, dok im je promjer različit i iznosi 1-3 nm i 10-200 nm za SWCNT, odnosno MWCNT (28). Ugljikove nanocjevčice mogu ući u organizam udisanjem, gutanjem i unosom preko kože (29). Općenito u stanice ulaze na dva načina: endocitozom i / ili pasivnom difuzijom, a zatim se premještaju u različite substanične odjeljke (28).

1.5.1. Funkcionalizacija ugljikovih nanocjevčica

Preduvjet za primjenu CNT-ova u medicini i ostalim područjima je površinski inženjering odnosno funkcionalizacija kojom se modificiraju morfološka i fizikalno kemijska svojstva CNT-ova. Zbog Van der Waalsovih sila koje se javljaju na površini, netaknute ugljikove nanocjevčice imaju tendenciju da aglomeriraju u vodenom okolišu. Funkcionalizacija ublažava snažnu hidrofobnost čime ujedno pojačava njihovu raspršenost u vodenim otopinama. Funkcionalne skupine vezane su na površinu CNT-ova kovalentnom vezom ili nekovalentnim interakcijama (28).

Kovalentno povezane nabijene organske skupine stvaraju elektrostatske odbojne sile između pojedinih cijevi, promičući tako raspršenost (28).

Nekovalentna funkcionalizacija uključuje van der Waalsove sile, π-π interakcije, elektrostatske interakcije i vodikove veze. Nanocjevčice povezane nekovalentnim interakcijama s hidrofobnim dijelovima amfifilnih organskih molekula tvore supramolekularne komplekse. Nekovalentna funkcionalizacija izvodi se presvlačenjem CNT-ova s nekoliko hidrofilnih materijala poput polietilenimina, polidialdimetilamonij klorida, poliakrilnom kiselinom, polioksietilen sorbitan monooleatom, poli-m-aminobenzen sulfonskom kiselinom (PABS), polietilen glikolom (PEG) i polivinilpirolidonom (30). Osim što povećavaju topljivost u vodi, navedeni materijali pokazuju visoku stabilnost u biološkim medijima. PEG se najčešće koristi zbog ograničene citotoksičnosti. Ovisno o duljini PEG lanca, PEG-ilacija povećava poluživot CNT-ova u krvnim žilama, sprečavajući imunološki klirens zbog opsonizacije (28).

Ni i suradnici (31) u svom su istraživanju utvrdili da su PABS-SWCNTs i PEG-SWCNTs uzrokovali produženje neurita. Malarkey i suradnici (32) pokazali su da PEG-SWCNT u uskom rasponu vodljivosti promiču rast neurita i povećanje površine stanice, dok pri većoj vodljivosti ti učinci nestaju.

U usporedbi s netaknutim, funkcionalizirani CNT-ovi više su raspršeni te lakše prolaze kroz membrane pasivnom difuzijom. Osim toga

funkcionalizacija poboljšava međufazno prianjanje, promičući interakcije CNT-ova i staničnih membrana. Uzevši sve u obzir, funkcionalizacija znatno regulira biološki poluživot, biodistribuciju i farmakokinetiku CNT-ova (28).

1.5.2. Potencijalna uporaba ugljikovih nanocjevčica u poremećajima središnjeg živčanog sustava

Zbog karakterističnih fizikalno kemijskih svojstava: velike hidrofobnosti, velikog omjera duljine i promjera, male težine i velike površine, CNT-ovi učinkovito prelaze membrane što ih čini inovativnim nanoplatformama za isporuku lijekova. Postoji i veliki potencijal za primjenu u terapijskom liječenju neuroloških bolesti, uključujući infekcije, traumu mozga i kralježnice, moždani udar i tumor mozga (28).

Zahvaljujući njihovoj električnoj vodljivosti i morfološkim značajkama koje oponašaju cjevaste strukture SŽS-a, poput aksona i dendrita, CNT-ovi predstavljaju potencijalnu regenerativnu matricu tkiva neurona, potiču rast neurona, promiču njihove funkcije i stimuliraju stvaranje sinapsi. Malarkey i sur. (32) sugeriraju da uski raspon vodljivosti (<0,3 S cm – 1) CNT-a ima ključnu ulogu u rastu neurona i produljenju dendrita.

1.5.3. Toksikologija ugljikovih nanocjevčica

Više istraživanja pokazalo je citotoksični učinak CNT-ova u SŽS-u. Neki od mehanizma odgovornih za citotoksičnost su: prekomjerna proizvodnja ROS-ova, mitohondrijska disfunkcija, genotoksičnost i neuroinflamacija (33).

S obzirom na visoku razinu lipida i povišenu aerobnu metaboličku aktivnost živčanog tkiva uz proporcionalno niži sadržaj antioksidansa, mozak je uglavnom osjetljiviji na redoks neravnotežu (34). Nusprodukti lipidne peroksidacije, poput reaktivnih aldehida (malondialdehid (MDA) i 4-hidroksinonenal (HNE)), pridonose neurodegeneraciji uzrokovanoj ROS-induciranim oštećenjem svih bioloških makromolekula. Osim toga, CNT-ovi u SŽS-u mogu pokrenuti upalni odgovor aktiviranjem NF-κB ili AP-1 transkripcijskih čimbenika (35). Aktivacija mikroglije, zbog produljenog

oslobađanja proupalnih citokina, ima patogenu ulogu u neurodegenerativnim bolestima (28).

Korak koji se pokazao iznimno važnim za smanjenje citotoksičnosti CNT-ova je pročišćavanje od metala i ugljičnih čestica koji su nusprodukt procesa sinteze (33). Prooksidativni učinak metala (Fe, Ni, Co itd.), koji se koriste kao katalizatori u sintezi CNT-a, smanjuju preživljenje stanica, uzrokujući peroksidaciju lipida i stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (36).

Kako bi se smanjio omjer duljine i promjera CNT-a, koji je odgovoran za citotoksičnost, primjenjuju se postupci skraćivanja koji uključuju ultrazvučnu obradu, pročišćavanje parom i mehaničke metode, uz jaku kiselu oksidaciju (33, 27).

1.6. Eksperimentalni modeli koji se koriste pri istraživanju traumatske ozljede mozga

1.6.1. *In vivo* modeli traumatske ozljede mozga

Za oblikovanje dobrog životinjskog modela TBI potrebno je osigurati sljedeće kriterije: (1) kontrola jačine udarca; (2) ponovljivost; (3) prouzrokovana šteta treba biti kvantificirana i ekstrapolirana na kliničke slučajeve u ljudi (6).

Najčešće korištene životinje u modelu TBI su glodavci unatoč većoj složenosti ljudskih astrocita u odnosu na glodavce. Studije su pokazale da su ljudski kortikalni astrociti pokazali veći stupanj heterogenosti i složenosti nego istovrsne stanice u glodavcima. Astrociti izolirani iz ljudskog korteksa bili su veći od astrocita glodavaca i bili su sposobni za brži prijenos Ca^{2+} valova nego astrociti glodavaca. Međutim, istraživanja na astrocitima nakon TBI se najčešće izvode na modelu glodavaca zbog lakoće manipuliranja molekularnim putovima, niske cijene, male veličine i jednostavnosti uzgoja (6) (37).

Danas dostupni modeli mogu se podijeliti u dvije vrste, žarišni i difuzni modeli TBI (38).

1.6.1.1. Modeli žarišne traumatske ozljede mozga

1.6.1.1.1. Ozljeda uslijed pada utega

Model žarišne TBI kod kojeg se ozljeda uzrokuje pomoću slobodno padajuće utega (engl. *weight drop impact acceleration injury*, WDIAI), koristi gravitacijsku silu i težinu poznate mase koja pada preko lubanje pokusne životinje. Nakon sedacije glodavca, životinja se postavlja i učvršćuje na vodoravnoj površini kako bi se izbjegli bilo kakvi pokreti glavom nakon pada težine. Veličina ozljede ovisi o masi utega i visini s koje je pao. Zatvorena ozljeda glave ovog modela uzrokuje neurološki deficit, neurodegeneraciju, upalni odgovor s mikroglijalnom aktivacijom te slom krvno moždane barijere. Značajke patologije ovog modela sadrže slične komponente kao TBI u ljudi koju uzrokuju prometne nesreće ili sportske ozljede (4). Iako je ovaj model jednostavan za upotrebu, jeftin i brz, nije široko korišten jer ima veliku varijabilnost u lomu lubanje što je izravno povezano s količinom energije u udarcu te postoji mogućnost odskoka nakon udarca.

1.6.1.1.2. Kontrolirana kortikalna ozljeda

Model kontrolirane kortikalne ozljede koristi impaktor koji generira ozljedu. Kako bi se izvršila ozljeda potrebno je provesti postupak kraniotomije i zatim upumpati komprimirani zrak na mozak. Uređaj koji se koristi sastoji se od pneumatskog cilindra koji je povezan preko navojnog sustava na impaktor. Intenzitet oštećenja mozga ovisit će o brzini udarača i dubini deformacije. Ovaj model stvara kortikalnu ozljedu, subduralna krvarenja, aksonsku ozljedu i subkortikalnu ozljedu u talamusu i hipokampusu. Ovaj model TBI uzrokuje dugoročne neurobihevioralne deficite koji traju više od godinu dana i povezani su s kortikalnom atrofijom i smanjenom perfuzijom mozga. Prednost ovog modela je što omogućuje učinkovito upravljanje različitim mehaničkim varijablama što znači i precizniju kvantifikaciju štete (4).

1.6.1.2. Modeli difuzne traumatske ozljede mozga

1.6.1.2.1. Akceleracijsko-deakceleracijski model

Uzrok TBI često nije udarac predmetom već brzi i nagli pokreti. Oscilacija i rotacija mozga unutar lubanje deformira mozak i vodi do difuzne ozljede aksona. Kod akceleracijsko-deakceleracijskog modela TBI za dobivanje ozljede koristi se rotacija i produženo ubrzanje na početku nakon čega slijedi naglo usporavanje u kratkom vremenskom razdoblju. Ovaj model dobro reproducira patofiziološke mehanizme nakon DAI. Negativna strana je njegova cijena jer koristi velike životinje i ima visoke tehnološke zahtjeve. Zbog korištenja različitih vrsta životinja, problem predstavlja i ekstrapoliranje podataka na ljude (38).

1.6.1.2.2. Model pada utega po Marmaurou

Model koji su razvili Marmarou i sur. (38) jedan je od najčešće korištenih kod glodavaca zbog svoje niske cijene i visoke ponovljivosti. To je model u kojem uteg u slobodnom padu udara u lubanju. Životinja je postavljena na površinu od pjenaste gume s izloženom lubanjom te je jedan metalni disk pričvršćen na glavu glodavca kako bi se smanjila mogućnost loma lubanje i pojave žarišne ozljede. Težina ozljede usko je vezana za težinu utega i visinu s koje je pao. Jedna od najvećih prednosti ovog modela je ta što simulira DAI i naknadno oticanje mozga koje je povezano s oštećenjem KMB koje pokreće neuroinflamatorne odgovore unutar intrakranijalnog odjeljka. Problem predstavlja ograničena kontrola koju ima istraživač u ovakvom eksperimentu (38).

1.6.1.3. Mješoviti modeli

U tzv. mješovite modele TBI ubraja se model kojim se ozljeda uzrokuje udarom tekućine (engl. *fluid percussion injury model*, FPI). Ovaj je model u početku dizajniran da oponaša žarišnu ozljedu, ali pokazano je da energija oslobođena pri udaru može proizvesti difuznu ozljedu aksona, zbog čega se smatra mješovitim modelom TBI. Korištenje ovog modela zahtijeva prethodnu kraniotomiju. Do ozljede dolazi izravnim pritiskom na

cerebralnu tekućinu preko tvrde ovojnice mozga. Da bi se mogao izvršiti taj pritisak, njihalo povezano s klipom koristi se za pomicanje određene mase tekućine koja je pod utjecajem stalnog tlaka. Ova ozljeda uzrokuje oštećenje uslijed deformacije neuronskog tkiva. Prednost ovog modela je što dobro oponaša ozljedu u ljudi te je visoko reproducibilan. Negativna strana je što ovaj model može utjecati na više područja u mozgu što smanjuje kontrolu istraživača nad eksperimentom (38).

1.6.1.4. Kombinirani životinjski modeli

U TBI prisutne su pojave poput hipoksije, ishemije, hipotenzije i hipovolemije koje pridonose sekundarnom oštećenju mozga. Radi boljeg razumijevanja ovih procesa razvijeno je više životinjskih modela. Neki od najčešće korištenih modela su oni u kojih se TBI kombinira s hipoksijom ili hipotenzijom. Što se tiče hipoksije, životinje imaju niske uvjete oksigenacije (pO_2 od 30-40 mmHg). U modelima TBI u uvjetima hipotenzije izazivaju se krvarenja ili se daju lijekovi za povišenje krvnog tlaka (raste do vrijednosti između 30 i 50 mmHg). Druga široko korištena metodologija je začepljenje karotidne arterije što dovodi do cerebralne ishemije koja simulira ozbiljnu hipotenziju krvi. Ova vrsta intervencije korištena je u kombinaciji s kontroliranim kortikalnim udarcem (38, 4).

1.6.2. *In vitro* modeli traumatske ozljede mozga

In vitro modeli TBI ključni su za razumijevanje staničnih i molekularnih mehanizama koji su dio primarne i sekundarne ozljede mozga. Karakterizira ih ponovljivost, jednostavnost provedbe te omogućavaju praćenje patofizioloških procesa u stvarnom vremenu. Jasno definiranim biomehaničkim parametrima mogu se precizno i kontrolirano utvrditi učinci različitih vrsta ozljeda. Neki od najčešće korištenih modela su: model ozljede rastezanja (engl. *stretch injury model*), model presjeka (engl. *transection model*), kompresijski model (engl. *compression model*) te model hidrostatskog tlaka (engl. *hydrostatic pressure model*) (39, 40).

1.6.2.1. Model ozljede rastezanjem

Model rastezanja stanica tlačnim impulsom (engl. *abrupt pressure pulse stretching*, APPS) idealan je zbog dobre ponovljivosti, jednostavnosti i mogućnosti kontrole jačine ozljede. Model koristi pneumatski uređaj koji oslobađa definirani tlak plina dušika koji naglo deformira stanice adherirane na površini silastičnih membrana. Ovaj model ozljede ekvivalent je rotacijskoj, akceleracijskoj/deceleracijskoj ozljedi (39, 40).

2. Ciljevi rada

Prethodno je pokazano da primjena kemijski funkcionaliziranih jednozidnih ugljikovih nanocjevčica modulira neka morfo-funkcionalna svojstva astrocita *in vitro*. Također, za SWCNTs kemijski funkcionalizirane s PABS otkriveno je da uzrokuju određene morfološke i funkcionalne promjene u astrocita podvrgnutih *in vitro* TBI.

Stoga je hipoteza ovog istraživanja bila da aplikacija koloidne otopine PABS-SWCNTs na astrocite podvrgnute *in vitro* TBI utječe na razine markera oksidativnog stresa i upale.

Specifični su ciljevi istraživanja bili:

- odrediti utječe li aplikacija PABS-SWCNTs na razinu oksidativnog oštećenja proteina ozlijeđenih astrocita,
- odrediti učinke PABS-SWCNTs na razinu izražaja astrocitnog markera GFAP-, te
- utvrditi mijenja li aplikacija PABS-SWCNTs razinu izražaja proteina iNOS u astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem stanica,
- odrediti utječe li aplikacija PABS-SWCNTs na razinu izražaja transportera glutamata EAAT1 uslijed teške ozljede rastezanjem u astrocitima.

3. Materijali i metode

3.1. Pokusne životinje

Za *in vitro* eksperimente korišteni su mladunci miševa soja C57BL/6J stari 0-2 dana, oba spola, koji su uzgojeni i održavani u Laboratoriju za uzgoj i inženjering miševa Rijeka (engl. *Laboratory for Mice Breeding and Engineering Rijeka,* LAMRI*).* Svi eksperimenti koji su uključivali rad na pokusnim životinjama, izvedeni su na Zavodu za temeljnu i kliničku farmakologiju s toksikologijom Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Svi su eksperimenti provedeni najmanje u biološkim triplikatima, s uzorcima stanica iz zasebnih izolacija.

3.2. *In vitro* istraživanja

3.2.1. Izolacija primarne stanične kulture astrocita

Mladunci miševa žrtvovani su dekapitacijom te su izdvojeni korteksi iz mozgova. Pod kontrolom operacijskog mikroskopa (Olympus, Japan), korteksi su izdvojeni, očišćeni od bijele tvari mozga, meninga i krvnih žila te prikupljeni u sterilnu epruvetu s 15 mL kompletiranog medija za uzgoj stanica (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM;* PAN-Biotech, Njemačka*)*. Za svaku su izolaciju korišteni mozgovi prikupljeni od četiri do pet mladunaca miševa.

3.2.2. Priprema primarne stanične kulture astrocita

Korteksi su homogenizirani automatskom pipetom te su propušteni kroz sterilne mrežaste metalne filtere s otvorima veličine 230 μm i 140 μm. Suspenzija stanica zatim je centrifugirana 10 min na 12000 okretaja u minuti (engl. *revolutions per minute*, rpm). Istaložene stanice resuspendirane su u 2,5 mL medija za stanice kompletiranog s 10% seruma fetusa goveda (engl. *fetal bovine serum*, FBS*;* PAN-Biotech, Njemačka) i 1% otopinom antibiotika/antimikotika (penicilin 100 i.j./mL, streptomicin 0,1 mg/mL, amfotericin B 0,25 μg/mL) (Sigma-Aldrich, SAD) te je suspenzija propuštena kroz 73 μm filter u sterilnu epruvetu. Stanice su obojene Trypan Blue bojom (Mediatech, Inc., Manassas, SAD), ručno

prebrojane koristeći Neubauerovu komoricu (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Njemačka) te je izračunat broj stanica po mL medija. Ukupan broj stanica u komorici podijeljen je sa $5x10^4$ kako bi se dobio volumen medija koji treba dodati za uzgoj stanica u tikvice za kulturu tkiva površine 75 cm^2 (T75). Stanice su inkubirane na 37 °C, 5% CO2 i relativnoj vlažnosti 95% tjedan dana, a tijekom tog vremena im nije mijenjan medij niti se smjelo njima manipulirati. Osim astrocita inkubirane stanice u T75 tikvici sadrže mikrogliju i oligodendrocite. Mikroglija je uklonjena na način da su, nakon isteka prvih sedam dana, T75 tikvice sa stanicama stavljene na kružnu tresilicu (Unimax 1010 S, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Njemačka) 60 min na 180 rpm, na 37 °C, te nakon toga uklonjen supernatant koji sadrži mikrogliju. Potom je kompletirani medij ponovno dodan u tikvicu koja je zatim stavljena na kružnu tresilicu tijekom 6 sati na 240 rpm, na 37 °C, kako bi se odvojile prekursorske stanice oligodendrocita koje se onda mogu ukloniti odbacivanjem supernatanta. Ovim postupcima omogućen je uzgoj visoko čistih kultura astrocita s minimalnim „zagađenjem" ostalim vrstama stanica (maksimalno 5%). Tijekom održavanja stanica, medij je mijenjan svaka 3 do 4 dana, a stanice rasađivane kad bi se postigla oko 90%-tna konfluentnost.

3.2.3. Nasađivanje stanične kulture astrocita na kolagenske ploče

Kako bi se adherirani astrociti na dnu T75 tikvica odvojili, tikvice su najprije isprane dva puta fosfatnom puferiranom otopinom soli (engl. *phosphate buffered saline,* PBS), zatim je dodano 5 mL otopine s 0,05% tripsina i 0,02% EDTA te su stanice inkubirane na 37 °C tijekom približno 5 minuta. Zatim je u tikvicu dodano 5 mL DMEM-a s 10% FBS-a kako bi se zaustavila enzimska reakcija, odvojene stanice su prikupljene i prebačene u 50 mL epruvetu. Suspenzija stanica centrifugirana je 5 min na 1200 rpm. Supernatant je zatim odstranjen i pelet stanica je resuspendiran u 1 mL kompletiranog DMEM-a. Stanice su zatim prebrojane u Neubauerovoj komorici te je izračunat broj stanica po mL medija. Pripravljena suspenzija

stanica prebačena je na kolagenom obložene silastične membrane s 6 jažica (FlexCell® International Corporation, SAD), s 2.5 mL u svaku jažicu. Ploče su inkubirane u inkubatoru (LEEC Ltd., UK) na 37 °C, 5% CO_2 i relativnoj vlažnosti 95% te je po jažici nasađeno po 150 000 stanica.

3.3. *In vitro* model ozljede brzim rastezanjem primarnih kultura astrocita

Model traumatske ozljede u kulturi astrocita učinjen je rastezanjem stanica pomoću uređaja Cell Injury Controller II (Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, SAD) koji izaziva brzu i kratkotrajnu deformaciju silastične membrane djelovanjem tlaka komprimiranog plina dušika. Uređaj omogućuje regulaciju jačine tlaka koji određuje opseg ozljede adheriranih stanica.

Ovaj model ozljede simulira rotacijsku, akceleracijsko/deceleracijsku traumu *in vitro*. Uređaj je prije svakog korištenja kalibriran s 3 udarca na silastičnu membranu bez stanica, prema uputama proizvođača. Korišteni komprimirani plin je dušik, trajanje udarca iznosilo je oko 50 ms, a stupanj pomaka membrane kretao se od 3,5 do 4,3 funti po kvadratnom inču (engl. *pound per square inch,* PSI) što izaziva 55%-tno (7,5 mm) rastezanje koje odgovara teškoj TBI. Nakon provedenih udaraca, ploče sa stanicama su inkubirane na 37 °C, 5% CO_2 i relativnoj vlažnosti 95% tijekom 24 sata.

3.3.1. Dodavanje ugljikovih nanočestica u primarnu kulturu astrocita

U ovom eksperimentu korištene su PABS-SWCNTs koje nam je ljubazno osigurao prof. dr. sc. Vladimir Parpura (University of Alabama in Birmingham, Birmingham, AL, SAD). PABS-SWCNTs dodane su u jažice sa staničnim kulturama 1 sat nakon ozljede u koncentraciji 5 μg/mL. Prethodno su obje vrste nanočestica umiješane u medij za stanične kulture kako bi se spriječilo stvaranje nakupina cjevčica u kulturi.

3.4. Mjerenje koncentracije proteina po Bradfordu

Koncentracije proteina u uzorcima određivane su metodom po Bradfordu, korištenjem pročišćenog BSA kao standarda (41).

3.5. Western blot (promjena ekspresije enzima iNOS)

Uzorci proteina izoliranih iz astrocita pripremljeni su na način da je 100 µL pufera za radioimunoprecipitacijski test (engl. *radioimmunoprecipitation buffer*, RIPA pufer), kompletiranog s inhibitorima proteaza i fosfataza,dodano u svaku jažicu sa staničnim kulturama koje su prethodno isprane dva puta sa PBS-om kako bi se odstranili ostaci medija za uzgoj stanica. Adherirane stanice su zatim postrugane staničnim strugačem, prikupljene u epruvete i centrifugirane 10 min na 14000 rpm, na 4 °C, nakon čega su uzorci zaleđeni i čuvani do analiza na -80 °C. Za svaki uzorak su skupljene stanice iz dvije jažice Flexcell ploča.

Na dan provođenja western blot analiza, najprije je pripremljen sustav za elektroforezu te je u uzorke dodan pufer za nanošenje uzoraka na gel (78% Laemmli Sample Buffer; BIO-RAD, SAD, 5% β merkaptoetanol; Sigma, Njemačka, 16% glicerol; Kemika, Hrvatska), te su pripremljeni slijepa proba i marker, a uzorci su kuhani 5 min na 99°C. Uzorci su zatim stavljeni na gel, a sustav za elektroforezu (Mini-PROTEAN® Tetra System; Bio-Rad Laboratories Inc., SAD) pokrenut je tijekom 40 min na 200 V. Po završetku elektroforeze, gelovi su upotrijebljeni za transfer proteina gelova na nitroceluloznu membranu koristeći Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories Inc., SAD). Nakon prijenosa na membrane, dodana je Ponceau S boja koja je nakon nekoliko minuta isprana kako bi se utvrila uspješnost transfera proteina.

Membrane su blokirane 1 sat s 5%-tnom otopinom mlijeka u prahu. Membrana je potom inkubirana s različitim primarnim protutijelima (Tablica 1) preko noći na 4 °C. Drugi dan je najprije isprano primarno protutijelo 3 puta po 5 minuta s Tris-puferiranom fiziološkom otopinom s 0,1%-tnim Tween 20 (TBST) te je zatim dodano odgovarajuće sekundarno protutijelo (Tablica 1) razrijeđeno u TBST-u, tijekom 1 sata na sobnoj temperaturi,

nakon čega je ponovljen postupak ispiranja s TBST-om. Zatim je na membranu dodan konjugat streptavidina i peroksidaze hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) razrijeđen 10000 puta u TBST-u na 30 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je membrana isprana 3 puta s TBST-om i dodana je otopina za detekciju (kemiluminiscentni supstrat SuperSignal™ West Pico PLUS; Thermo Fisher Scientific, SAD). Membrane su slikane na uređaju Kodak Image Station 440CF, analizirane u programu Kodak 1D Image Analysis Software (oboje Eastman Kodak, Rochester, NY, SAD).

Tablica 2. Korištena primarna protutijela

Epitop	Domaćin i klonalnost	Proizvođač (kataloški broj)	Primjena
GAPDH	mišje monoklonalno	Proteintech, Manchester, UK (HRP-60004)	WB, dot blot
GFAP	zečje poliklonalno	Abcam, Cambridge, UK (ab7260)	WB
iNOS	zečje poliklonalno	Abcam, Cambridge, UK (ab3523)	WB
EAAT1	zečje poliklonalno	Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, SAD (cst-5685)	WB, ICC
DNP	zečje poliklonalno	Merck, Darmstadt, Germany (S7150)	dot blot

Skraćenice: WB, Western blot; ICC, imunocitokemija

Tablica 3. Korištena sekundarna protutijela

Epitop	Domaćin i klonalnost	Proizvođač	Primjena
zečji imunoglobulin	kozje monoklonalno	Dako Cytomation, Glostrup, Danska	WB, dot blot
mišji imunoglobulin	kozje poliklonalno	Dako Cytomation, Glostrup, Danska	WB, dot blot
zečji imunoglobulin	kozje poliklonalno	Abcam, Cambridge, UK (ab96901)	ICC

Skraćenice: WB, Western blot; ICC, imunocitokemija

3.6. Dot blot analiza za određivanje razine oksidativnog oštećenja proteina (mjerenje sadržaja proteinskih karbonilnih skupina)

Utvrđivanje razina karboniliranih proteina prikladna je tehnika za otkrivanje i kvantificiranje oksidativne modifikacije proteina. 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) reagira s karbonilnom skupinom na proteinu i nastaje 2,4-dinitrofenilhidrazon (DNP hidrazon) koji se detektira imunokemijski. Korištena su dva alikvota svakog uzorka od kojih je jedan podvrgnut reakciji derivatizacije dok drugi alikvot predstavlja negativnu kontrolu. Uzorci proteina derivatizirani su s 10 mM DNPH u prisutnosti 12% natrijevog dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS), 15 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku. U uzorke je zatim dodana neutralizacijska otopina (2M Tris, 30% glicerola i 19% 2- merkaptoetanola) i točkasto naneseni na polivinilidenski difluoridnu membranu (PVDF) pomoću dot blot uređaja (Cleaver Scientific Ltd, Warwickshire, UK). Membrana je zatim posušena na zraku 15 min te isprana 2 puta octenom kiselinom te u vodi. Potom je membrana isprana s puferom za ispiranje (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween) i blokirana inkubacijom s 5%-tnim govođim serumski albuminom u TBST-u tijekom sat vremena, nakon čega je dodano anti-DNP protutijelo (OxyBlot™, EMD Millipore, Billerica, MA, SAD), razrijeđeno 1:100 u TBST-u s 1% BSA, a s kojim su membrane inkubirane preko noći na 4 °C. Sljedeći dan membrana je isprana 3 puta po 5 min s puferom za ispiranje te je inkubirana s kozjim protu-zečjim sekundarnim protutijelom (1:3000), sat vremena na sobnoj temperaturi. Nakon toga membrana je ponovno isprana i inkubirana sa streptavidinom konjugiranim sa HRP-om. Na membranu je dodana otopina za detekciju (kemiluminiscentni supstrat SuperSignal™ West Pico PLUS; Thermo Fisher Scientific, SAD) i vizualizirana je na uređaju Kodak Image Station 440CF,analizirana u programu Kodak 1D Image Analysis Software (Eastman Kodak, Rochester, NY, SAD).

3.7. Imunocitofluorescencija

Stanice nasađene u 6 jažica s kolagenom obloženim silastičnim membranama (FlexCell® International Corporation, SAD) isprane su PBS-om i fiksirane 4%-tnim paraformaldehidom u PBS-u, 20 min na sobnoj temperaturi. Stanice su permeabilizirane 10 min u 0,3% Triton X-100 i potom su isprane PBS-om i 30 min tretirane puferom za blokiranje koji je sadržavao 3% goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) u PBS-u čime se smanjuje nespecifično vezanje. Primarno protutijelo pripremljeno je u 1%-tnoj otopini BSA u PBS-u. Stanice su inkubirane s primarnim protutijelom preko noći na 4°C i zatim su isprane u PBS-u i tretirane s odgovarajućim sekundarnim protutijelom u trajanju od 2 sata. Stanice su zatim isprane u PBS-u te je na njih dodana fluorescentna boja za jezgre 4,6- diamidino-2-fenilindol (engl. 4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI). Membrane su potom isprane i posušene te stavljene na predmetna stakalca uz dodatak medija za uklapanje Mowiol (Merck Millipore, SAD). Poklopljeni preparati ostavljeni su na sušenje te su mikroskopirani na fluorescentnom invertnom mikroskopu (Olympus IX73 Inverted Microscope, Olympus Corporation, Japan). Uzorci su slikani u programu cellSens (cellSens Imaging Software, Olympus Corporation, Japan) te su potom analizirani u programu ImageJ (NIH, Bethesda, MD, SAD).

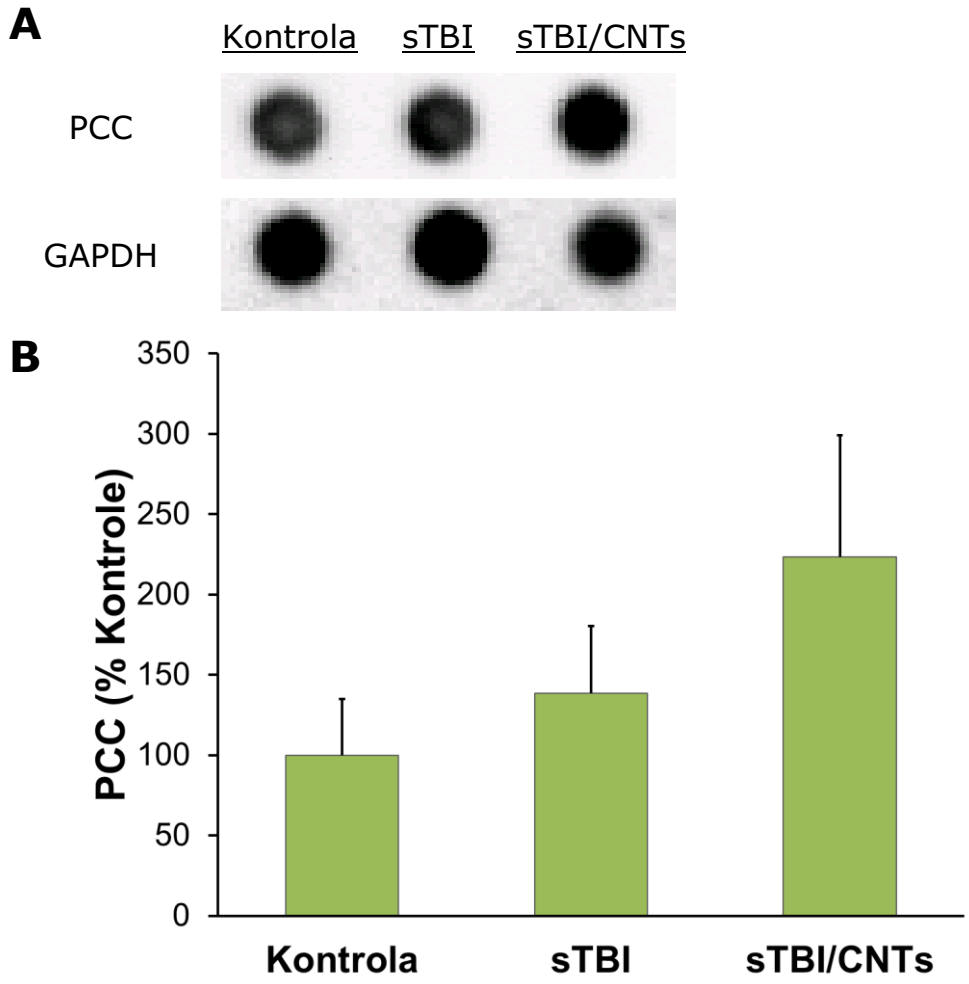
3.8. Prikupljanje podataka i statističke analize

Za pohranu podataka te izradu grafičkih prikaza korišten je program Microsoft Office Excell® (Microsoft Corp., Redmond, WA, SAD). Vrijednosti koje su dobivene izražene su kao mjera središnjice i raspršenja. Za statističku obradu podataka korišteni su parametrijski postupci statističke raščlambe, odnosno jednosmjerna (one-way) analiza varijance (ANOVA) s Duncan Multiple Range *post-hoc* testom. Razina od $P < 0,05$ smatrana je statistički značajnom. Postupci statističke raščlambe učinjeni su pomoću računalne programske potpore STATISTICA® inačica 13 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

4. Rezultati

4.1. PABS-SWCNTs ne utječu na razinu oksidativnog oštećenja proteina nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro*

Kako bi se istražio utjecaj PABS-SWCNTs na razinu oksidativnog oštećenja proteina nakon teške ozljede brzim rastezanjem u astrocitima, utvrđena je razina sadržaja karboniliranih proteina, odnosno razina oksidativno modificiranih proteina (Slika 2).

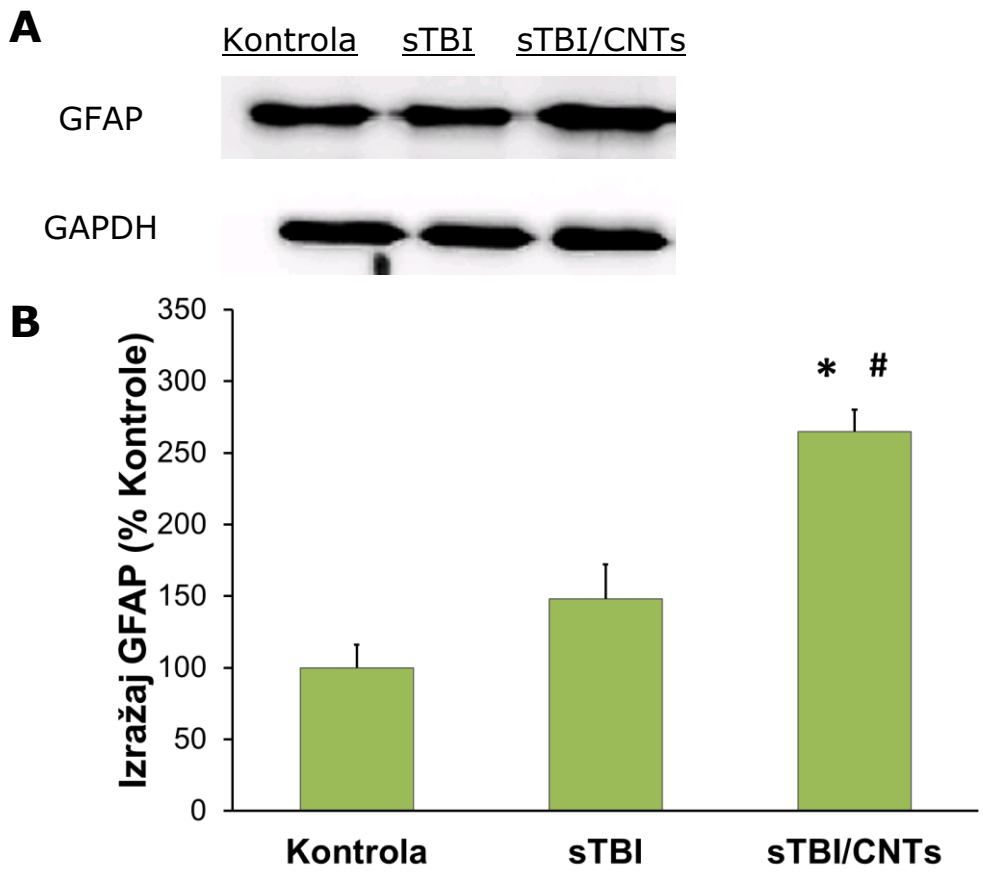


Slika 2. PABS-SWCNTs ne utječu na razinu oksidativnog oštećenja proteina nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro*. Prikazani su (A) reprezentativni točkasti blotovi i (B) rezultati denzitometrijskih analiza. Histogram prikazuje promjene razina sadržaja karboniliranih proteina (PCC), određenih 24 h nakon teške *in vitro* traumatske ozljede (sTBI) te nakon dodavanja PABS-SWCNTs (sTBI/CNTs). Vrijednosti su prikazane kao udio (%) razina PCC u stanica kontrolne skupine (Kontrola), korigiranih za vrijednosti ekspresije kućepaziteljskog proteina GAPDH. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti ± SEM. Prikazani su rezultati analiza učinjenih u 4 odvojena biološka replikata.

Korišteni reagens DNPH reagira s karbonilnom skupinom na proteinu i nastaje DNP hidrazon koji se detektira imunokemijski, odnosno pomoću primjene protutijela protiv DNP skupine. Na slici 2A prikazani su reprezentativni točkasti blotovi uzoraka eksperimentalnih skupina, a na slici 2B pripadajuće denzitometrijske analize korigirane za vrijednosti ekspresije kućepaziteljskog proteina GAPDH, prikazane kao postotni udio uzoraka kontrolne skupine. Iz rezultata je vidljivo da nema statistički značajne razlike u razini sadržaja karboniliranih proteina, određenih 24 sata nakon teške *in vitro* traumatske ozljede kao niti nakon dodavanja PABS-SWCNTs [ANOVA: $F(2;9) = 1,365$; $p = 0,304$].

4.2. PABS-SWCNTs povećavaju izražaj GFAP nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro*

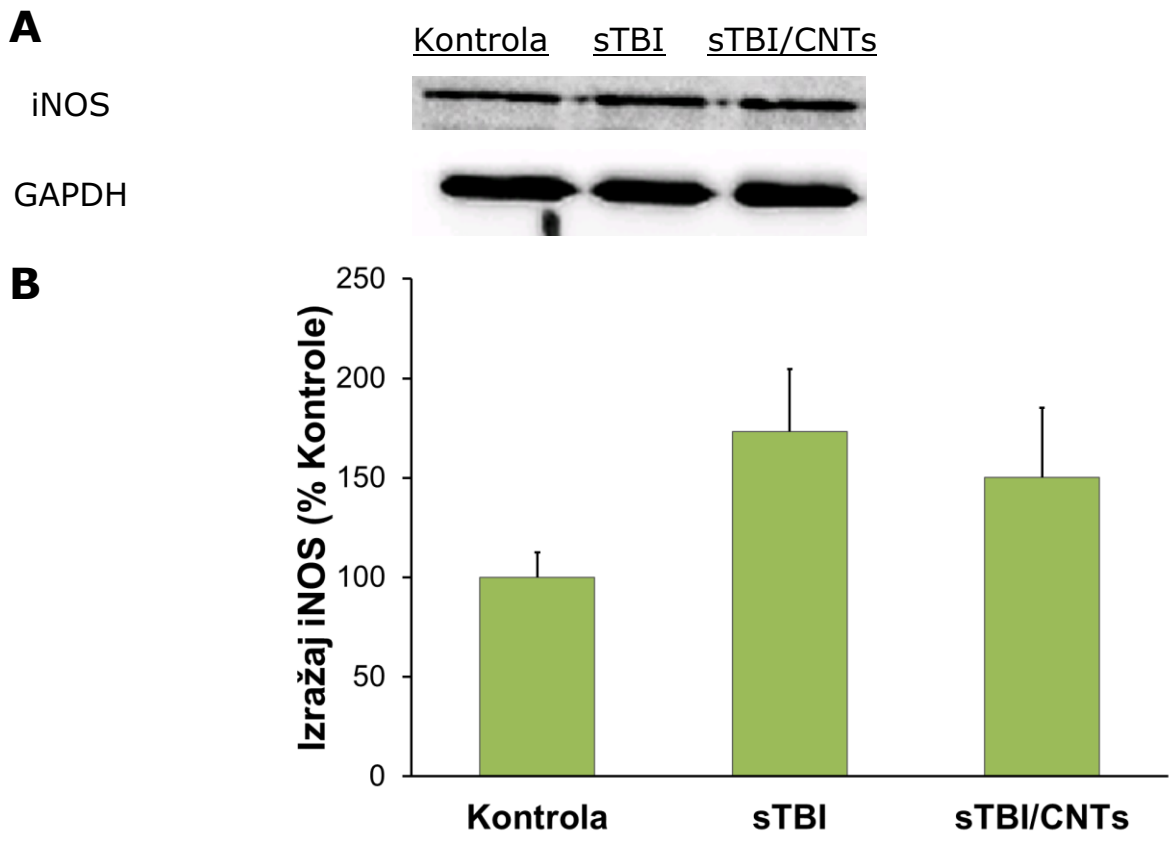
GFAP je karakteristični astrocitni marker čiji se povećan izražaj javlja u procesu reaktivne astroglioze uslijed TBI. U tu je svrhu razina ekspresije GFAP-a nakon teške ozljede brzim rastezanjem u astrocitima utvrđena western blot analizom. Na slici 3A prikazani su reprezentativni blotovi uzoraka proteina pripremljenih iz astrocita podvrgnutih eksperimentalnim, a na slici 3B pripadajuće denzitometrijske analize korigirane za vrijednosti ekspresije GAPDH i prikazane kao udio kontrole. Iz rezultata je razvidno da je razina izražaja GFAP-a 24 h značajno veća u astrocita podvrgnutih teškoj *in vitro* traumatskoj ozljedi kojima je dodan istraživani nanomaterijal [ANOVA: $F(2;9) = 4,918$; $p = 0,036$]. Razina GFAP-a je bila statistički značajno veća u uzorcima ozlijeđenih astrocita tretiranih s PABS-CNTs u odnosu na razine zabilježene u stanica kontrolne skupine [$p = 0,020$], ali i u odnosu na ozlijeđene, netretirane stanice [$p = 0,038$].



Slika 3. PABS-SWCNTs povećavaju izražaj GFAP nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro*. Prikazani su (A) reprezentativni blotovi i (B) rezultati denzitometrijskih analiza. Histogram prikazuje promjene razina izražaja GFAP, određenih 24 h nakon teške *in vitro* traumatske ozljede (sTBI) te nakon dodavanja PABS-SWCNTs (sTBI/CNTs). Vrijednosti su prikazane kao udio (%) razina GFAP u stanica kontrolne skupine (Kontrola), korigiranih za vrijednosti ekspresije kućepaziteljskog proteina GAPDH. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti ± SEM. Prikazani su rezultati analiza učinjenih u 4 odvojena biološka replikata. *P<0,05; značajno različito od Kontrole; #P<0,05; značajno različito od sTBI.

4.3. PABS-SWCNTs ne utječu na izražaj iNOS nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro*

Kako bi se istražio utjecaj primjene PABS-SWCNT-ova na razinu ekspresije markera oksidativnog stresa iNOS učinjena je western blot analiza (Slika 4).

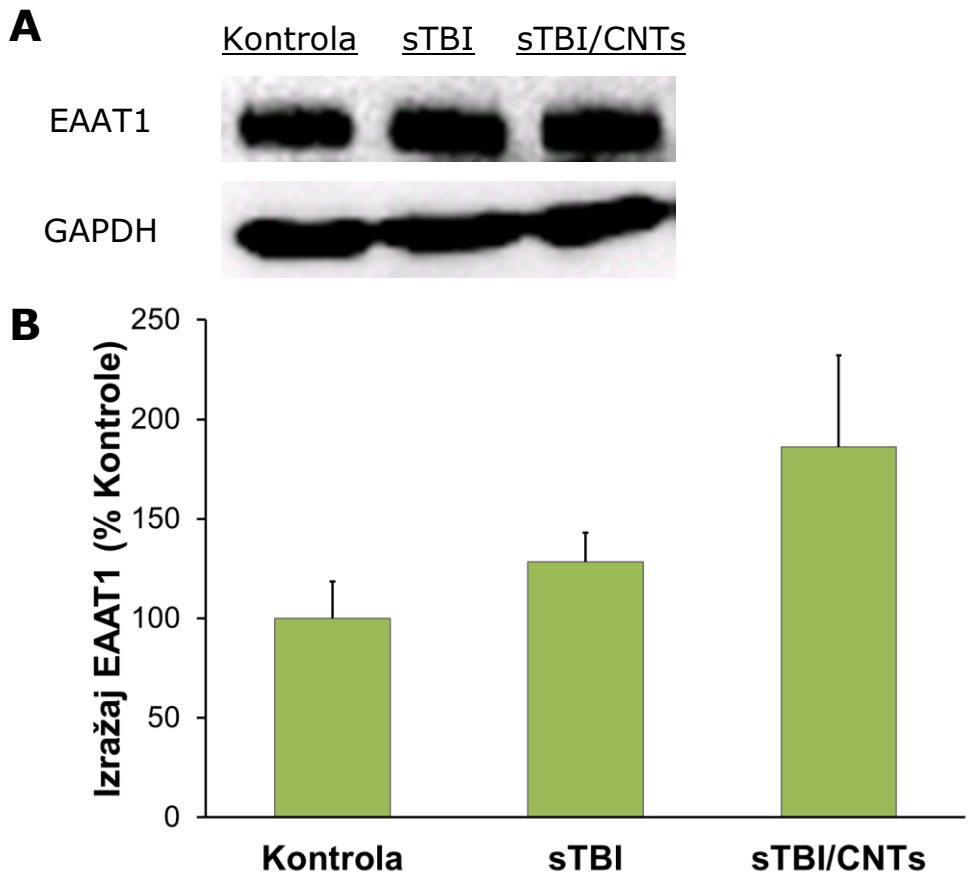


Slika 4. PABS-SWCNTs ne utječu na izražaj iNOS nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro*. Prikazani su (A) reprezentativni blotovi i (B) rezultati denzitometrijskih analiza. Histogram prikazuje promjene razina izražaja iNOS, određenih 24 h nakon teške *in vitro* traumatske ozljede (sTBI) te nakon dodavanja PABS-SWCNTs (sTBI/CNTs). Vrijednosti su prikazane kao udio (%) razina iNOS u stanica kontrolne skupine (Kontrola), korigiranih za vrijednosti ekspresije kućepaziteljskog proteina GAPDH. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti ± SEM. Prikazani su rezultati analiza učinjenih u 4 odvojena biološka replikata.

Na slici 4A prikazani su reprezentativni blotovi, a na slici 4B pripadajuće denzitometrijske analize korigirane za vrijednosti ekspresije GAPDH. Iz prikazanih rezultata može se uočiti da je izražaj iNOS proteina bio nešto veći u ozlijeđenih, netretiranih astrocita u odnosu na stanice koje su održavane u kontrolnim uvjetima, a da je aplikacija PABS-SWCNTs donekle snizila razine ovog proteina. Međutim, navedene promjene nisu bile statistički značajne [ANOVA: $F(2;9) = 1{,}759$; $p = 0{,}227$].

4.4. PABS-SWCNTs ne utječu značajno na izražaj EAAT1 nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro*

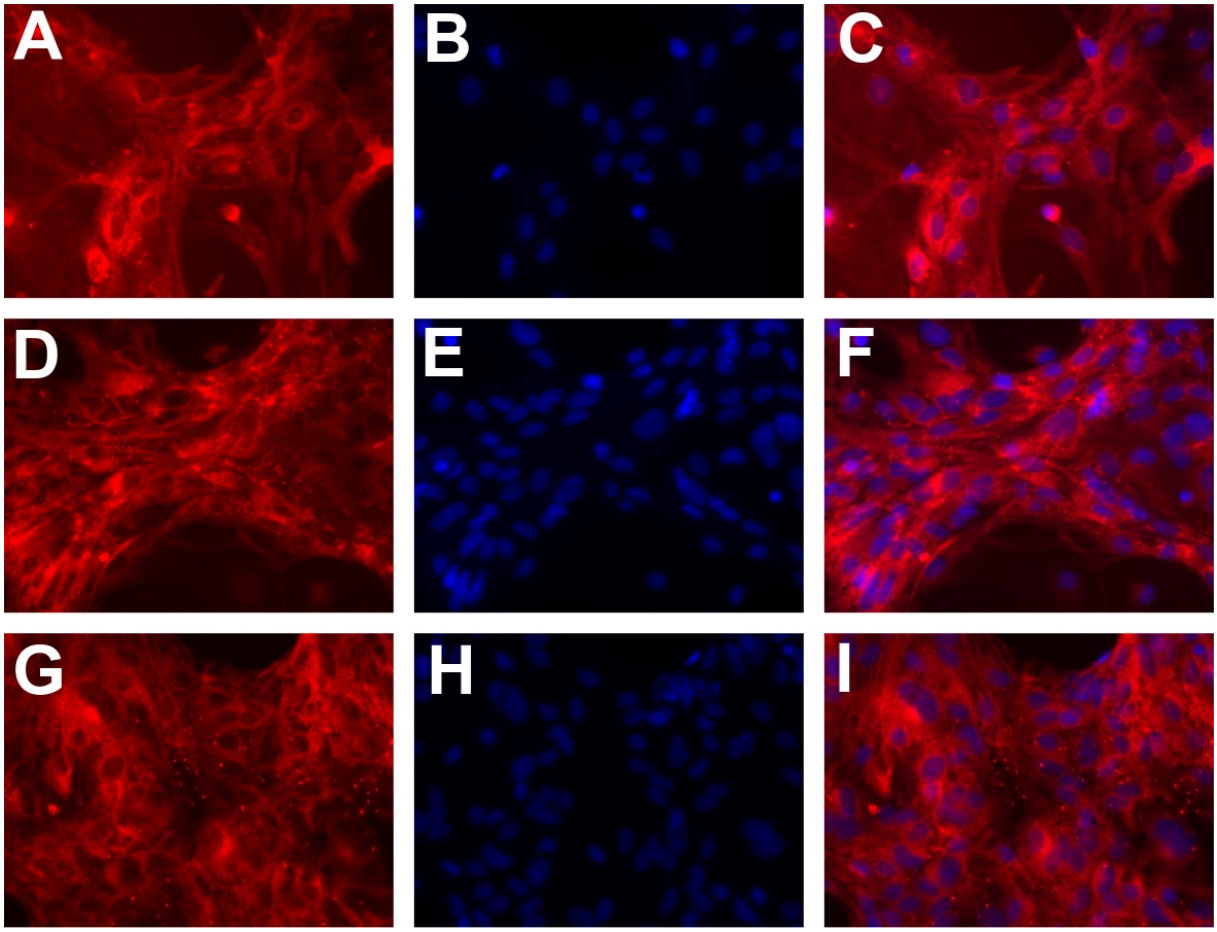
Kako bi se ispitala razina ekspresije prijenosnika glutamata EAAT1 nakon teške ozljede brzim rastezanjem u astrocitima korištena je western blot analiza te je učinjeno immunofluorescentno bojanje silastičnih membrana nasađenih astrocitima. Na slici 5A prikazani su reprezentativni blotovi, a na slici 5B pripadajuće denzitometrijske analize, korigirane za vrijednosti ekspresije kućepaziteljskog proteina GAPDH.



Slika 5. PABS-SWCNTs ne utječu značajno na izražaj EAAT1 nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro*. Prikazani su (A) reprezentativni blotovi i (B) rezultati denzitometrijskih analiza. Histogram prikazuje promjene razina izražaja EAAT1, određenih 24 h nakon teške *in vitro* traumatske ozljede (sTBI) te nakon dodavanja PABS-SWCNTs (sTBI/CNTs). Vrijednosti su prikazane kao udio (%) razina EAAT1 u stanica kontrolne skupine (Kontrola), korigiranih za vrijednosti ekspresije kućepaziteljskog proteina GAPDH. Stupci predstavljaju srednje vrijednosti ± SEM. Prikazani su rezultati analiza učinjenih u 3 odvojena biološka replikata.

Iz rezultata je vidljivo da nema statistički značajne razlike u razini ekspresije EAAT1, određene 24 sata nakon teške *in vitro* traumatske ozljede kao niti nakon dodavanja PABS-SWCNTs u odnosu na kontrolnu skupinu.

Na slici 6. prikazane su odabrane mikrofotografije neozlijeđenih astrocita te stanica podvrgnutih teškoj ozljedi brzim rastezanjem, netretiranih ili tretiranih s PABS-SWCNTs. Crvenim fluorescentnim bojanjem označene su stanice imunoreaktivne na EAAT1. Sukladno rezultatima western bloting mjerenja, imunocitofluorescentne analize izražaja EAAT1 u astrocita podvrgnutih in vitro sTBI nisu razotkrile značajne razlike u izražaju navedenog proteina-transportera.



Slika 6. Utjecaj primjene PABS-SWCNTs na ekspresiju EAAT1 nakon teške ozljede brzim rastezanjem. (A-I) Odabrane mikrofotografije neozlijeđenih astrocita (A-C) te stanica podvrgnutih teškoj ozljedi brzim rastezanjem, netretiranih (D-F) ili kojima je primijenjen medij s PABS-SWCNTs (G-I). Crvenim fluorescentnim bojanjem označene su stanice imunoreaktivne na EAAT1 (A, D, G) uz kontraobojanje jezgri plavom DAPI bojom (B, E, H). Preklopljeni kanali boja prikazani su na slikama C, F, I. Linija skale: 50 μm.

5. Rasprava

5.1. PABS-SWCNTs ne utječu na razinu oksidativnog oštećenja proteina nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro*

Stvaranje ROS i RNS u moždanom tkivu nakon TBI-ja sudjeluje u pokretanju procesa molekularnog oštećenja poput peroksidacije lipida, oštećenja DNA i oksidacije proteina (10). U ovom je radu utvrđen sadržaj oksidiranih proteina, odnosno karbonilne skupine na proteinima u ozlijeđenim astrocitima nakon primjene PABS-SWCNTs.

Rezultati su pokazali da primjena PABS-SWCNTs nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro* nije značajno utjecala na razinu oksidativnog oštećenja na proteinima u odnosu na neozlijeđenu i netretiranu kontrolnu skupinu. Ovo istraživanje nastavlja se na ranije istraživanje koje je pokazalo da nefunkcionalizirane ugljikove nanočestice uzrokuju oksidativno oštećenje u jetri, plućima i slezeni nakon intravenozne injekcije (42). Drugo istraživanje također je potvrdilo statistički značajno povećanje razine oksidiranih proteina u skupini izloženoj CNT-ovima u odnosu na kontrolu (43). Mohammadi i suradnici (43) u svom su radu također ispitali razliku između dva tipa funkcionaliziranih CNTs, s dodatkom amino skupine (SWCNT-NH_2) odnosno s dodatkom karboksilne skupine (SWCNT-COOH). Rezultati su pokazali veće oksidativno oštećenje primjenom SWCNT-NH_2. SWCNT-COOH nisu značajno utjecali na promjenu oksidativnih parametara osim u tkivima pluća i jetre. Rezultati ovog istraživanja kao i prethodnih upućuju na funkcionalizaciju ugljikovih nanocjevčica kao ključan korak u smanjenju toksičnosti CNTs (43).

5.2. PABS-SWCNTs povećavaju izražaj GFAP nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro*

Karakteristični marker za astrocite je protein GFAP koji ima strukturnu ulogu i reagira na mehaničke podražaje (16). Uslijed TBI-ja pokreću se mnogi molekularni mehanizmi koji uzrokuju strukturne i funkcionalne promjene astrocita što rezultira aktivacijom astrocita odnosno reaktivnom

astrogliozom. Ovaj proces inducira povećanu ekspresiju intermedijarnih filamenata, između ostalog i GFAP-a (6).

U ovom je radu ispitana promjena izražaja astrocitnog markera GFAP nakon teške ozljede i nakon dodavanja PABS-SWCNTs. Iz rezultata je vidljivo da postoji statistički značajno povećanje izražaja GFAP-a nakon sTBI i tretmana sa PABS-SWCNT 24 h nakon ozljede u odnosu na kontrolnu skupinu. Nije zamijećeno statistički značajno povećanje izražaja GFAP-a u ozlijeđenim, netretiranim stanicama u odnosu na kontrolu.

U istraživanju u svrhu diplomskog rada koje je prethodilo ovome, mjerenjem intenziteta fluorescencije GFAP, uočeno je da nema statistički značajne razlike u GFAP obojenju između ozlijeđenih stanica, ozlijeđenih stanica tretiranih sa PABS-SWCNT u odnosu na kontrolu (44).

Min i suradnici (45) u svojoj su studiji pokazali utjecaj MW-CNTs na povećanje imunoreaktivnosti GFAP-a u usporedbi s kontrolnom skupinom astrocita uzgajanih na PDL (poli-D-lizin) podlozi. Prethodne studije pokazale su da povećana imunoreaktivnost GFAP-a smanjuje oštećenje tkiva, gubitak tkiva i demijelinizaciju (45, 46). Gottipati i sur. (47, 48) u svojim su istraživanjima pokazali da je tretman sa PABS-SWCNTs doveo do značajnog povećanja gustoće i sadržaja GFAP-a u ozlijeđenim astrocitima.

Uzevši u obzir prethodna istraživanja, rezultati ovog istraživanja sugeriraju da primjena PABS-SWCNTs povećava izražaj GFAP-a, kojeg se smatra jednim od čimbenika reaktivne astroglioze, ključnim procesom u odgovoru astrocita na ozljedu SŽS (50).

5.3. PABS-SWCNTs ne utječu na izražaj iNOS nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro*

Enzim iNOS stvara NO koji je odgovoran za toksični učinak aktivirane mikroglije i makrofaga i pogoršava oštećenje neurona posredovano glutamatom *in vitro* (12). Izražaj markera oksidativnog stresa iNOS ispitan je u ranijim istraživanjima koja su pokazala da se pojačan izražaj iNOS u astrocitima može se otkriti u rasponu od nekoliko sati do nekoliko dana nakon ishemijske ozljede. Također je utvrđeno da je u miševa s genetskim

nedostatkom iNOS-a zamijećena smanjena veličina infarkta i smanjeni motorički deficit u odnosu na kontrolu. Prethodno navedeni rezultati upućuju na to da je pojačan izražaj iNOS-a jedan od čimbenika koji doprinose širenju oštećenja mozga koje se javlja u post-ishemijskom razdoblju (12, 13).

U ovom je radu ispitan utjecaj PABS-SWCNTs na promjenu izražaja markera oksidativnog stresa iNOS u ozlijeđenim astrocitima. Iz rezultata je vidljivo da primjena PABS-SWCNTs nije statistički značajno utjecala na izražaj iNOS-a nakon ozlijede.

Svi navedeni rezultati upućuju da primjena PABS-SWCNTs u ozlijeđenim astrocitima ne utječe na razinu oksidativnog oštećenja nastalog zbog toksičnih razina NO kojeg stvara upravo enzim iNOS.

5.4. PABS-SWCNTs ne utječu značajno na izražaj EAAT1 nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro*

Astrociti unose glutamat iz sinapsi prvenstveno putem prijenosnika glutamata EAAT1 i EAAT2 koji se nalaze na površini astrocita, sprečavajući na taj način ekscitotoksični učinak uslijed ozlijede.

Beschorner i suradnici (51) u svom su istraživanju pokazali su da se izražaj EAAT1 i EAAT2 ubrzano smanjio i raširio u lezijskim, susjednim i udaljenim dijelovima mozga nakon TBI te da je endogeni kompenzatorni mehanizam povećane ekspresije EAAT1 nedovoljan kako bi se smanjio ekscitotoksični učinak glutamata uslijed ozljede. Također sugeriraju kako bi egzogeno povećanje ekspresije moglo ograničiti štetu nastalu pretjeranim izvanstaničnim nakupljanjem glutamata (51).

Ranija istraživanja pokazala su učinak PEG-SWCNTs na povećanje unosa glutamata iz izvanstaničnog prostora, koji se pripisuje povećanoj razini ekspresije proteina EAAT1 koja je također utvrđena (17).

U ovom je radu ispitan utjecaj PABS-SWCNTs na razinu ekspresije prijenosnika glutamata EAAT1 nakon teške ozljede brzim rastezanjem u astrocitima. Suprotno od prethodnih istraživanja, rezultati ovog istraživanja nisu pokazali značajnu razliku u razini ekspresije EAAT1 nakon teške *in vitro*

traumatske ozljede te nakon dodavanja PABS-SWCNTs u odnosu na kontrolu.

6. Zaključak

U ovoj je studiji proučavan utjecaj PABS-SWCNTs na astrocite nakon teške ozljede brzim istezanjem *in vitro.*

U SWCNTs kemijski funkcionaliziranim s PABS otkriveno je da uzrokuju određene morfološke i funkcionalne promjene u astrocita podvrgnutih *in vitro* TBI. Iz rezultata su proizašli sljedeći zaključci:

1. PABS-SWCNTs nisu pokazali značajan učinak na razinu oksidativnog oštećenja proteina u ozlijeđenim astrocitima što upućuje na to da funkcionalizacija CNTs smanjuje njihov toksičan potencijal
2. primjena PABS-SWCNT značajno je utjecala na povećanje izražaja GFAP-a u astrocitima nakon teške ozljede brzim istezanjem, što upućuje na potencijalnu ulogu PABS-SWCNTs u aktivaciji astrocita nakon ozljede, odnosno u poboljšanju odgovora astrocita na ozljedu,
3. PABS-SWCNTs ne utječu na promjenu razine izražaja enzima iNOS u astrocitima nakon izlaganja teškoj TBI *in vitro,* što upućuje na to da PABS-SWCNTs ne utječu na razinu oksidativnog stresa koji se stvara nakon ozljede u SŽS-u,
4. PABS-SWCNTs ne utječu značajno na izražaj EAAT1 nakon teške ozljede astrocita brzim rastezanjem *in vitro*, odnosno nije pokazano smanjenje ekscitotoksičnog učinka glutamata nakon TBI što nije u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja.

Korištenje funkcionaliziranih ugljikovih nanocjevčica u liječenju traume SŽS-a pokazalo se obećavajućim u dosadašnjim istraživanjima. Rezultati ovog istraživanja upućuju na smanjenu toksičnost funkcionaliziranih nanocjevčica (PABS-SWCNTs) u odnosu na nefunkcionalizirane. Međutim, potrebno je provesti daljnja toksikološka ispitivanja koja će utvrditi jesu li PABS-SWCNTs sigurne za primjenu u liječenju ove bolesti.

7. Literatura

1. Iaccarino C, Carretta A, Nicolosi F, Morselli C. Epidemiology of severe traumatic brain injury. J Neurosurg Sci. 2018.;62(5):535–41.

2. Souza RS de, Pinheiro PP, Silva JMF de L, Neto MLR, Filho JAM. Traumatic brain injury (TBI): morbidity, mortality and economic implications. International Archives of Medicine. 2015;8(73)

3. Nguyen R, Fiest KM, McChesney J, Kwon C-S, Jette N, Frolkis AD, i ostali. The International Incidence of Traumatic Brain Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. Canadian Journal of Neurological Sciences. studeni 2016.;43(6):774–85.

4. Galgano M, Toshkezi G, Qiu X, Russell T, Chin L, Zhao L-R. Traumatic Brain Injury: Current Treatment Strategies and Future Endeavors. Cell Transplant. 2017.;26(7):1118–30.

5. Zhou Y, Shao A, Yao Y, Tu S, Deng Y, Zhang J. Dual roles of astrocytes in plasticity and reconstruction after traumatic brain injury. Cell Communication and Signaling. 2020.;18(1):62.

6. Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. British Journal of Pharmacology. 2016.;173(4):692–702.

7. Namjoshi DR, Good C, Cheng WH, Panenka W, Richards D, Cripton PA, i ostali. Towards clinical management of traumatic brain injury: a review of models and mechanisms from a biomechanical perspective. Disease Models & Mechanisms. 2013.;6(6):1325–38.

8. Walker KR, Tesco G. Molecular mechanisms of cognitive dysfunction following traumatic brain injury. Front Aging Neurosci. 2013.;5:29.

9. Nolan S. Traumatic brain injury: a review. Crit Care Nurs Q. 2005.;28(2):188–94.

10. Di Pietro V, Yakoub KM, Caruso G, Lazzarino G, Signoretti S, Barbey AK, i ostali. Antioxidant Therapies in Traumatic Brain Injury. Antioxidants (Basel). 2020.;9(3):260.

11. Wilson JX. Antioxidant defense of the brain: A role for astrocytes. Canadian journal of physiology and pharmacology. 2011.;75:1149–63.

12. Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. J Neurosci. 1997.;17(23):9157–64.

13. Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and Brain Injury. J Cereb Blood Flow Metab. 2003.;23(2):137–49.

14. Freeman MR. Specification and Morphogenesis of Astrocytes. Science. 2010.;330(6005):774–8.

15. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. Experimental Neurology. 2016.;275:305–15.

16. Messing A, Brenner M. GFAP at 50. ASN Neuro. 2020.;12:1759091420949680.

17. Gottipati MK, Bekyarova E, Haddon RC, Parpura V. Chemically functionalized single-walled carbon nanotubes enhance the glutamate uptake characteristics of mouse cortical astrocytes. Amino Acids. 2015.;47(7):1379–88.

18. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, i ostali. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. Neuron. 1996.;16(3):675–86.

19. Landeghem FKHV, Weiss T, Oehmichen M, Deimling AV. Decreased Expression of Glutamate Transporters in Astrocytes after Human Traumatic Brain Injury. Journal of Neurotrauma. 2006.;23(10):1518–28.

20. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, i ostali. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. Neuron. 1999.;23(2):297–308.

21. Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew MV. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. Brain. 2006.;129(Pt 10):2761–72.

22. Di Giovanni S, Movsesyan V, Ahmed F, Cernak I, Schinelli S, Stoica B, i ostali. Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005.;102(23):8333–8.

23. Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, i ostali. Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis. J Neurosci. 2012.;32(18):6391–410.

24. Kostron H, Twerdy K, Stampfl G, Mohsenipour I, Fischer J, Grunert V. Treatment of the traumatic cerebral vasospasm with the calciumchannel blocker nimodipine: a preliminary report. Neurol Res. 1984;6(1–2):29–32.

25. Vergouwen MDI, Vermeulen M, Roos YBWEM. Effect of nimodipine on outcome in patients with traumatic subarachnoid haemorrhage: a systematic review. Lancet Neurol. 2006;5(12):1029–32.

26. Berman RF, Verweij BH, Muizelaar JP. Neurobehavioral protection by the neuronal calcium channel blocker ziconotide in a model of traumatic diffuse brain injury in rats. J Neurosurg. 2000;93(5):821–8.

27. Sawyer E, Maura LS, Ohlinger MJ. Amantadine Enhancement of Arousal and Cognition After Traumatic Brain Injury. Ann Pharmacother.

28. Facciolà A, Visalli G, La Maestra S, Ceccarelli M, D'Aleo F, Nunnari G, i ostali. Carbon nanotubes and central nervous system: Environmental risks, toxicological aspects and future perspectives. Environ Toxicol Pharmacol. 2019.;65:23-30.

29. Selvaraj, K., Gowthamarajan, K., Karri, V.V.S.R., 2017. Nose to brain transport pathways an overview: potential of nanostructured lipid carriers in nose to brain targeting. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2018;46(8):2088-2095.

30. Antonelli A, Serafini S, Menotta M, Sfara C, Pierigé F, Giorgi L, i ostali. Improved cellular uptake of functionalized single-walled carbon nanotubes. Nanotechnology. 2010.;21(42):425101.

31. Ni Y, Hu H, Malarkey EB, Zhao B, Montana V, Haddon RC, i ostali. Chemically Functionalized Water Soluble Single-Walled Carbon Nanotubes Modulate Neurite Outgrowth. J Nanosci Nanotechnol 2005.;5(10):1707–12.

32. Malarkey EB, Fisher KA, Bekyarova E, Liu W, Haddon RC, Parpura V. Conductive Single-Walled Carbon Nanotube Substrates Modulate Neuronal Growth. Nano Lett. 2009.;9(1):264–8.

33. Bussy C, Al-Jamal KT, Boczkowski J, Lanone S, Prato M, Bianco A, i ostali. Microglia Determine Brain Region-Specific Neurotoxic Responses to Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. ACS Nano. 2015.;9(8):7815–30.

34. Migliore L, Uboldi C, Bucchianico SD, Coppedè F. Nanomaterials and neurodegeneration. Environmental and Molecular Mutagenesis. 2015.;56(2):149–70.

35. Palomäki J, Välimäki E, Sund J, Vippola M, Clausen PA, Jensen KA, i ostali. Long, Needle-like Carbon Nanotubes and Asbestos Activate the NLRP3 Inflammasome through a Similar Mechanism. ACS Nano. 2011.;5(9):6861–70.

36. Visalli G, Bertuccio MP, Iannazzo D, Piperno A, Pistone A, Di Pietro A. Toxicological assessment of multi-walled carbon nanotubes on A549 human lung epithelial cells. Toxicol In Vitro. 2015;29(2):352-62.

37. Marklund N, Hillered L. Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: where do we go from here? Br J Pharmacol. 2011.;164(4):1207–29.

38. Sempere L, Rodríguez-Rodríguez A, Boyero L, Egea-Guerrero JJ. Experimental models in traumatic brain injury: from animal models to in vitro assays. Med Intensiva (Engl Ed). 2019.;43(6):362–72.

39. Wanner I-B. An in vitro trauma model to study rodent and human astrocyte reactivity. Methods Mol Biol. 2012.;814:189–219.

40. Morrison B, Elkin BS, Dollé J-P, Yarmush ML. In Vitro Models of Traumatic Brain Injury. Annu Rev Biomed Eng. 2011;13:91-126.

41. He F. Bradford Protein Assay. Bio-protocol. 2011.;e45–e45.

42. Qin Y, Li S, Zhao G, Fu X, Xie X, Huang Y, i ostali. Long-term intravenous administration of carboxylated single-walled carbon nanotubes induces persistent accumulation in the lungs and pulmonary fibrosis via the nuclear factor-kappa B pathway. Int J Nanomedicine. 2016;12:263-277.

43. Mohammadi E, Zeinali M, Mohammadi-Sardoo M, Iranpour M, Behnam B, Mandegary A. The effects of functionalization of carbon nanotubes on toxicological parameters in mice. Hum Exp Toxicol. 2020.;39(9):1147–67.

44. Mladenić T. Utjecaj kemijski funkcionaliziranih jednozidnih ugljikovih nanocjevčica na osobitosti astrocita izloženih in vitro traumatskoj ozljedi [Internet] [info:eu-repo/semantics/masterThesis]. University of Rijeka. Department of Biotechnology; 2020 [citirano 04. rujan 2021.]. Dostupno na: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:543799

45. Min J-O, Yoon B-E. Glia and gliotransmitters on carbon nanotubes. Nano Rev Exp. 2017;8(1):1323853.

46. Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. Neuron. 2008.;60(3):430–40.

47. Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. Neuroscientist. 2005.;11(5):400–7.

48. Gottipati MK, Kalinina I, Bekyarova E, Haddon RC, Parpura V. Chemically Functionalized Water-Soluble Single-Walled Carbon Nanotubes Modulate Morpho-Functional Characteristics of Astrocytes. Nano Lett. 2012.;12(9):4742–7.

49. Gottipati MK, Verkhratsky A, Parpura V. Probing astroglia with carbon nanotubes: modulation of form and function. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2014;369(1654):20130598.

50. Min J-O, Kim SY, Shin US, Yoon B-E. Multi-walled carbon nanotubes change morpho-functional and GABA characteristics of mouse cortical astrocytes. J Nanobiotechnology. 2015;13:92.

51. Beschorner R, Dietz K, Schauer N, Mittelbronn M, Schluesener HJ, Trautmann K, i ostali. Expression of EAAT1 reflects a possible neuroprotective function of reactive astrocytes and activated microglia following human traumatic brain injury. Histol Histopathol. 2007.;22(5):515–26.

8. Životopis

IVANA
JURIČKI

Ivana Zajca 108, 32280 Jarmina
+385993392680
Ivanajuricki11@gmail.com

OBRAZOVANJE

Diplomski studij „Istraživanje i razvoj lijekova“ | Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
LISTOPAD 2019. – U TIJEKU

Preddiplomski studij „Biotehnologija i istraživanje lijekova | Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
LISTOPAD 2016. – RUJAN 2019.

Srednjoškolska diploma | Gimnazija "Matija Antun Reljković", Vinkovci
RUJAN 2012. – SRPANJ 2016.

RADNO ISKUSTVO

Izrada diplomskog rada | Medicinski fakultet , Odjel za farmakologiju Sveučilišta u Rijeci
LISTOPAD 2020. – TRENUTNO
TEMA: „Procjena utjecaja kemijski funkcionaliziranih jednozidnih ugljikovih nanocjevčica na razine parametara oksidativnog stresa i upale u astrocitima izloženih *in vitro* traumatskoj ozljedi.”
Mentorica: izv. prof. dr. sc. Kristina Pilipović, dr. med.

- Tijekom rada u laboratoriju savladane su tehnike rada s primarnim staničnim kulturama astrocita, analize preživljenja stanica u kulturi te metode imunocitofluorescencije i western blotinga.

Studentski staž | Jadran galenski laboratorij (JGL), farmaceutska tvrtka
LIPANJ 2019.

Studentski staž | Nastavni zavod za javno zdravstvo (NZJZ)
LIPANJ 2019.

Demonstratorica | Kolegij „Opća kemija“, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
OŽUJAK 2018. – TRAVANJ 2018.
OŽUJAK 2019. – TRAVANJ 2019.

- Laboratorijske vježbe su uključivale pomoć studentima u savladavanju osnovnih tehnika i vještina te osiguravanje sigurnosti pri radu.

STUDENTSKI POSLOVI

Rad u dječjoj igraonici "Veseli dupin”;Poslodavac: Marko Maričić, (Rijeka)
LISTOPAD 2016.– PROSINAC 2016.

Obavljanje inventure; Poslodavac: Takko Fashion, Kaufland, Interspar

Prodaja suvenira; Gift Shop T.B. „Pirati“
LIPANJ 2018.– KOLOVOZ 2018.

Rad u trgovini odjećom Cropp; Cropp Hrvatska
STUDENI 2019.– PROSINAC 2019.

Rad u trgovini odjećom; H&M Hrvatska
PROSINAC 2019.– SIJEČANJ 2020.

Rad u dječjoj igraonici; Igraonica Happy Land (Tower Centar Rijeka)
VELJAČA 2020.– OŽUJAK 2020.

Rad u tvornici voća i povrća; Vinka Plus d.d. (32280, Jarmina)
KOLOVOZ 2020.– RUJAN 2020.

VJEŠTINE

- **STRANI JEZICI: ENGLESKI, NJEMAČKI**
- **DIGITALNE VJEŠTINE**: **Microsoft Office** (Microsoft Word, Excel, Power Point) Statističke analize: Statistica
- Kemijski programi i softveri: Chimera, PyMOL, Avogadro, Gamess, Marvin Sketch, CHARMM, Gromacs, R studio, Spark, Vina, Modeller
- Dobre komunikacijske vještine stečene kroz formalno obrazovanje (prezentacije, seminari).
- Fleksibilnost i spremnost na timski rad.

AKTIVNOSTI

- Volonterstvo:
  2017.: Dani otvorenih vrata Odjela za biotehnologiju (volonter)
- Student-Mentor program (dijeljenje mog iskustva studiranja s mlađim studentima)
- 2016., 2017.: Ulična utrka "Homo si teć"
  2018.: Wings for Life World Run
- Konferencije:
- pasivni sudionik konferencije "Budućnost i perspektiva naših studijskih programa" (godina 2017., 2019. i 2020.)