

Toksikološka procjena nanočestica zlata u ulozi nosača L-Dope na in vitro modelu diferenciranih SH-SY5Y stanica

Frančić, Manuela

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:194065>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Manuela Frančić

**Toksikološka procjena nanočestica zlata u
ulozi nosača L-Dope na *in vitro* modelu
diferenciranih SH-SY5Y stanica**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada pod neposrednim vodstvom dr.sc. Ivane Vinković Vrček i akademskim vodstvom prof. dr. sc. Krešimira Rotima, u sklopu znanstvenog projekta “Siguran pristup za razvoj nano-sustava za ciljanu isporuku lijekova u mozak - SENDER”, HRZZ-PZS-2019-02-4323, voditeljice dr.sc. Vinković Vrček i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2022./2023.

POPIS KRATICA I SIMBOLA

Ad	adamantan
Ad-AuNP	nanočestice zlata funkcionalizirane adamantanom
ATCC	American Type Culture Collection
AuNF	nanočestice zlata „Nanocvijet“
AuNP	nanočestice zlata
BDNF	od engl. <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> (moždani neurotrofni čimbenik)
cDNA	od engl. <i>complementary DNA</i> (komplementrana DNA)
CO ₂	ugljičkov dioksid
COMT	katekol-O-metil transferaza
CT	granični ciklus
D2R	dopaminski receptor D2
DAT	dopaminski transporter
DCF	2', 7'-diklorofluorescein
DCFH	oksidirani 2', 7'-diklorofluorescein
DCFH-DA	dikloro-dihidro-fluorescein diacetat
DDS	od engl. <i>Controlled Drug Delivery System</i> (sustav za ciljanu isporuku lijekova)
d_H	hidrodinamički promjer
dH ₂ O	destilirana voda
DHE	dihidroetidij
DLS	od engl. <i>Dinamic Light Scattering</i> (dinamičko raspršenje svjetlosti)
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	od engl. <i>DeoxyriboNucleic Acid</i> (deoksiribonukleinska kiselina)
d_{TEM}	promjer AuNP određen pomoću TEM-a
E	efikasnost umnažanja
EOH	2-hidroetidij
Et	etidij
FBS	od engl. <i>Fetal Bovine Serum</i> (fetalni goveđi serum)

FSC	od engl. <i>Forward Scatter</i>
GAPDH	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza
GOI	od engl. <i>Gene of Interest</i> (gen od interesa)
GSH	reducirani oblik glutationa
GSSH	oksidirani oblik glutationa
IL	linterleukin
KMB	krvno-moždana barijera
LD	L-Dopa
MAO-B	monoamin-oksidaza B
mCBL	monoklorobiman
MMP	mitohondrijski membranski potencijal ($\Delta\psi_m$)
MPP+	1-metil-4-fenilpiridin
MPTP	1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridin
mRNA	od engl. <i>messenger RiboNucleic Acid</i> (glasnička RNA)
mV	mikrovolt
nm	nanometar
NP	od engl. <i>nanoparticle</i> (nanočestice)
p	prag statističke značajnosti
PB	Parkinsonova bolest
PBS	od engl. <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	od eng. <i>Polymerase Chain Reaction</i> lančana reakcija polimerazom
PEG	perkutana endoskopska gastrostoma
PI	propidijev jodid
PMTs	od engl. <i>PhotoMultiplying Tubes</i>
ppm	parts per milion
qPCR	od engl. <i>qualitative Polymerase Chain Reaction</i> (kvantitativna polimeraze) lančana reakcija
RA	od engl. <i>Retinoic Acid</i> (retinoična kiselina)
RCF	od engl. <i>Relative Centrifugal Force</i>

RFU	od engl. <i>Relative Fluorescence Unit</i>
Rh123	rodamin 123
RNA	od engl. <i>RiboNucleic Acid</i> (ribonukleinska kiselina)
ROS	od engl. <i>Reactive Oxygen Species</i> (reaktivne kisikove vrste)
SD	standardna devijacija
SNpc	od lat. <i>Substantia Nigra pars compacta</i> ,
SSC	od engl. <i>Side Scatter</i>
tbOH	tert-butil hidroperoksid
TEM	od engl. <i>Transmission Electron Microscopy</i> (transmisijska elektronska mikroskopija)
TH	tirozin hidroksilaza
TPA	tetradekanoilforbol acetat
TNF	od engl. <i>Tumor Necrosis Factor</i> (tumorski faktor nekroze)
VMAT2	vezikularni monoaminski transporter 2
ζ	zeta potencijal
μM	mikromolarna koncentracija

Sadržaj

SAŽETAK	VII
SUMMARY	VIII
1 UVOD	1
1.1 Parkinsonova bolest	1
1.2 Terapija Parkinsonove bolesti	2
1.3 Nanotehnologija i nanoznanost	3
1.3.1 Nanočestice zlata	5
2 CILJEVI RADA	6
2.1 Glavni cilj	6
2.2 Specifični ciljevi	6
3 MATERIJALI I METODE	7
3.1 Sinteza i karakterizacija AuNP	7
3.2 Stanična kultura	9
3.3 Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu	10
3.4 Imunocitokemija	13
3.5 Vizualizacija unosa nanočestica u stanice	16
3.6 Protočna citometrija	17
3.6.1 Određivanje unosa nanočestica u stanice protočnim citometrom	18
3.6.2 Određivanje stanične vijabilnosti i apoptoze	18
3.7 Određivanje oksidativnog stresa	20
3.8 Statistička obrada rezultata	22
4 REZULTATI	23
4.1 Lančana reakcija polimeraze	23
4.2 Imunocitokemija	24
4.3 Vizualizacija unosa nanočestica u stanice	27
4.4 Protočna citometrija	28
4.4.1 Određivanje unosa nanočestica u stanice	28
4.4.2 Određivanje stanične vijabilnosti i apoptoze	28
4.5 Oksidativni stres	30
5 RASPRAVA	32
6 ZAKLJUČCI	36

7	ZAHVALE	37
8	LITERATURA.....	38
12	ŽIVOTOPIS.....	44

SAŽETAK

TOKSIKOLOŠKA PROCJENA NANOČESTICA ZLATA U ULOZI NOSAČA L-DOPE NA *IN VITRO* MODELU DIFERENCIRANIH SH-SY5Y STANICA

Autor: Manuela Frančić

Primjena nanočestica zlata za dostavu L-Dope mogla bi se pokazati kao inovativna terapija Parkinsonove bolesti. No, prije ispitivanja njihove učinkovitosti, važno je utvrditi kompatibilnost s biološkim sustavima. Na modelu stanica sličnih dopaminergičkim neuronima ispitivan je utjecaj AuNP na vijabilnost i oksidativni stres, kao i moguće zaštitno djelovanje. Model stanica sličnih dopaminergičkim neuronima dobiven je RA/TPA diferencijacijom SH-SY5Y stanica što je potvrđeno qPCR-om i imunocitokemijom. Unos AuNP u stanice određen je imunocitokemijom i protočnom citometrijom kojom su analizirane i stanična vijabilnost i apoptoza. Oksidativni stres istražen je mjerenjem razine reaktivnih kisikovih vrsta, koncentracije glutationa i potencijala mitohondrijske membrane.

Ključne riječi: nanočestice zlata, oksidativni stres, Parkinsonova bolest

SUMMARY

TOXICOLOGICAL ASSESSMENT OF GOLD NANOPARTICLES IN THE ROLE OF L-DOPE CARRIERS ON THE IN VITRO MODEL OF DIFFERENTIATED SH-SY5Y CELLS

Author: Manuela Frančić

The use of gold nanoparticles to deliver L-Dopa could prove to be an innovative therapy for Parkinson's disease. But before examining their effectiveness, it is important to determine compatibility with biological systems. The effect of AuNP on viability and oxidative stress, as well as possible protective effects, was investigated in a cell model of dopaminergic neuron-like cells. A cell model similar to dopaminergic neurons was obtained by RA / TPA differentiation of SH-SY5Y cells as confirmed by qPCR and immunocytochemistry. The uptake of AuNP into cells was determined by immunocytochemistry and flow cytometry which analyzed both cell viability and apoptosis. Oxidative stress was investigated by measuring the level of reactive oxygen species, glutathione concentration, and mitochondrial membrane potential.

Key words: gold nanoparticles, oxidative stress, Parkinson's disease,

1 UVOD

1.1 Parkinsonova bolest

Neurološki poremećaji vodeći su uzrok invalidnosti i drugi najčešći uzrok smrti u svijetu (1). Među njima se, zbog najbrže rastuće incidencije i prevalencije, ističe Parkinsonova bolest (PB) (2) - progresivni neurodegenerativni poremećaj koji danas zahvaća između 7 i 10 milijuna ljudi u svijetu (3). U razvijenim zemljama prevalencija PB u općoj populaciji iznosi 0,3 %. Jedan posto osoba starijih od 60 godina i tri posto starijih od 80 godina boluje od PB. Godišnja incidencija se kreće između 8 i 10 na 100 000 osoba (4). Uslijed starenja populacije procjena je kako će se broj oboljelih od PB-a u svijetu udvostručiti do 2040. godine (5). Multifaktorijalna etiologija bolesti posljedica je međudjelovanja okolišnih (6) i genskih čimbenika (7). Najznačajniji rizični čimbenik za razvoj PB-a je starija dob. Povećana incidencija zabilježena je i u osoba muškog spola, a poznato je da i rasa i etnička pripadnost igraju ulogu: incidencija je najveća među hispanoamerikancima, zatim bijelcima, pa azijatima, dok je najmanja pojavnost zabilježena među pripadnicima crne rase. Sur. čimbenici koji predisponiraju razvoju PB-a su izloženost pesticidima (parakvat, rotenon), život u ruralnom području, prijašnja traumatska ozljeda mozga i uporaba β -blokatora, dok je smanjena pojavnost povezana s pušenjem, konzumacijom kave, alkohola, nesteroidnih protuupalnih lijekova i blokatora kalcijevih kanala (8).

Većina je slučajeva PB-a sporadična, a u malog dijela pacijenta moguće je detektirati monogenske mutacije koje se nasljeđuju autosomno dominantno (npr. SNCA, PARK8, PARK17) ili autosomno recesivno (npr. PARK2, PARK6, PARK7) (7). Patofiziologija PB nije u potpunosti razjašnjena, no poznato je da važnu ulogu ima agregacija α -sinukleina, disfunkcija mitohondrija, sinaptičkog transporta, autofagije i neuroinflamacija (6). Najznačajniji patohistološki nalaz u oboljelih su Lewyjeva tjelešca (LT) te gubitak dopaminergičkih neurona crne tvari (*Substantia Nigra pars compacta*, SNpc) srednjeg mozga (9). U inicijaciji i progresiji propadanja dopaminergičkih neurona važnu ulogu igra oksidativni stres koji se javlja i u sporadičnim i u monogenim oblicima PB (10). Oksidativni stres očituje se nerazmjerom između stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) i djelovanja antioksidansa, pri čemu velike razine ROS-a dovode do gubitka potencijala mitohondrijske membrane i oštećenja stanične membrane, DNA, proteina i lipida (11). Oksidativni stres javlja se kao posljedica inhibicije kompleksa I u lancu prijenosa

elektrona, poremećaja koncentracija željeza i kalcija, ali i samog metabolizma dopamina (12). Poznati inhibitor respiracijskog kompleksa I, koji uzrokuje simptome parkinsonizma u ljudi je 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridin (MPTP). MPTP je lipofilna molekula koja prolazi kroz KMB, a katalitičkim djelovanjem monoaminoksidaze B (MAO B) prelazi u 1-metil-4-fenilpiridin (MPP⁺). Preko dopaminskog transportera MPP⁺ ulazi u neurone i narušava metabolizam mitohondrija, vjerojatno inhibicijom kompleksa I u lancu prijenosa elektrona (13). Do gubitka crne tvari dovodi i nakupljanje LT-a, citoplazmatskih inkluzija građenih od α -sinukleina, fibrila i ubikvitina (14). α -sinuklein smanjuje promet presinaptičkih vezikula i dovodi do propadanja aksona s posljedičnim smanjenim otpuštanjem neurotransmitora (15).

Interakcije različitih mehanizama oštećenja uzrokuju pozitivnu povratnu spregu koja dovodi do progresivnog propadanja dopaminergičkih neurona, smanjenja razine dopamina te konačno do karakterističnih simptoma PB: tremora, rigora i bradikinezije. Od motornih simptoma ističu se posturalna neravnoteža i poteškoće hoda (16). Nemotorni simptomi kao što su anosmija, depresija i poremećaji spavanja mogu se javiti godinama ili desetljećima prije motornih simptoma, a u kasnijim stadijima bolesti javljaju se i autonomna disfunkcija, kognitivno propadanje i bol (17). Određivanje diferencijalne dijagnoze temelji se na genetičkom testiranju te slikovnim prikazima mozga: računalnoj tomografiji (engl. *Computed Tomography*, CT), magnetskoj rezonanciji (engl. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI), pozitronskoj emisijskoj tomografiji (engl. *Positron Emission Tomography*, PET) i računalnoj tomografiji emisijom jednog fotona (engl. *Single-Photon Emission Computed Tomography*, SPECT) (18).

1.2 Terapija Parkinsonove bolesti

Terapija PB isključivo je simptomatska i usmjerena na kontrolu motoričkih simptoma bolesti. Lijekovi koji se koriste u tu svrhu su: levodopa (L-Dopa/LD), agonisti dopaminskih receptora (ertogaminski i neergotaminski), inhibitori monoamin oksidaze-B (MAO-B) i katekol-O-metil transferaze (COMT), amantadin, antagonisti adenozijskih receptora te antikolinergici (6). Zlatni standard farmakološkog liječenja je supstitucijska terapija dopaminom točnije L-3,4-dihidrofenilalaninom (L-Dopom) koja nakon oralne administracije prelazi krvno-moždanu barijeru (KMB) i pretvara se u dopamin. Veliki dio levodope metabolizira se u perifernim tkivima dopa

dekarboksilazom, a samo mali dio (~1 %) dolazi do mozga. S ciljem ostvarivanja maksimalne koncentracije levodope na ciljnom mjestu njezina djelovanja – crnoj tvari i strijatumu – i smanjivanja neželjenih nuspojava, levodopa se daje u kombinaciji s karbidopom ili benzerazidom, perifernim inhibitorima dopa dekarboksilaze (19). Zabrinjavajući aspekt terapije antiparkinsonicima je razvoj neželjenih učinaka. Levodopa i agonisti dopamina povezani su s pojavom mučnine, somnolencije i edema. Problemi s kontrolom impulsa (kockanje, kompulzivno ponašanje, hiperseksualnost) i halucinacije češće se javljaju s agonistima dopamina. Kod psihotičnog ponašanja mogu pomoći klozapin i kветiapin, ali oni mogu imati ozbiljne nuspojave (20). Levodopa je najučinkovitiji lijek u smanjenju motornih simptoma, no njezina dugotrajna primjena je povezana s razvojem motornih komplikacija koje smanjuju kvalitetu života (21). Diskinezije i motorne komplikacije javljaju se kao posljedica propadanja neurona pri čemu intracerebralne koncentracije LD-a postaju sličnije onima u plazmi pa primjenom LD-a dolazi do pulsatorne stimulacije strijatalnih dopaminskih receptora (22). Selektivnom oštećenju nigrostrijatalnih dopaminergičkih neurona pridonosi i oksidativni stres uzrokovan autooksidacijom katekolamina, dopamina i LD, koji ubrzavaju željezo i bakar (23). Fluktuacije koncentracije dopamina mogu se smanjiti primjenom MAO i COMT inhibitora ili levodope s produljenim djelovanjem. Za liječenje diskinezija propisuju se i amantadin i klozapin. Kontinuirana primjena levodope putem perkutane endoskopske gastrostome (PEG) ili supkukutanog apomorfina primjenjuju se kada oralna terapija ne daje zadovoljavajuće rezultate (22). Veliki značaj pokazuje duboka mozgovna stimulacija, a potencijalne metode liječenja u budućnosti su genska terapija (24), terapija matičnim stanicama (25) i dostava lijekova nanonosaićima (26).

1.3 Nanotehnologija i nanoznanost

Nanotehnologija i nanoznanost su interdisciplinarna područja koja se bave razvojem nanomaterijala. Dok je nanoznanost usmjerena na manipulaciju materijalima na atomskoj i subatomskoj razini, nanotehnologija nastoji iskoristiti takve materijale za projektiranje, karakterizaciju i proizvodnju uređaja i sustava unaprijedene strukture i oblika čija je barem jedna dimenzija veličine 1-100 nm. Područje biomedicinskih znanosti koje se bavi primjenom nanotehnologije je nanomedicina u kojoj prihvaćena veličina nanomaterijala iznosi i nekoliko stotina nanometara. Nanostrukture se u

nanomedicini koriste za dijagnozu bolesti, oslikavanje, kao uređaji, za regeneraciju tkiva te za isporuku lijekova i terapiju.

Nanotehnologija predstavlja veliki potencijal u liječenju Parkinsonove bolesti, a prednosti njezine primjene su sljedeće:

1. Može pomoći u razvoju senzora za niske koncentracije biomarkera uz prisutnosti drugih analita te pomoći u razvoju dijagnostičkih uređaja veće ekonomičnosti.
2. Sustavi za isporuku lijekova temeljeni na nanotehnologiji mogu doprinjeti terapijskoj učinkovitosti i povećati bioraspoloživost.
3. Može se koristiti za unaprjeđenje uređaja za duboku mozgovnu stimulaciju kako bi se osigurao bolji kontakt s moždanim tkivom.
4. Može pomoći u neurokirurgiji povećanjem preciznosti laserskih aksotomija na nanorazini.
5. Može se koristiti za razvoj sustava za učinkovitu terapiju matičnim stanicama u tkivnom inženjerstvu (27).

Posljednjih nekoliko desetljeća nanotehnologija, točnije nanočestice (engl. *nanoparticles*, NP) pokazale su velik potencijal za unaprjeđenje terapije Parkinsonove bolesti. NP sintetizirane od različitih biorazgradivih materijala kao što su prirodni ili sintetski polimeri, metali ili lipidi mogu imati ulogu nanonosača, ali i neuroprotektivnu i antioksidativnu ulogu (28). Nanonosači optimiziranih fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava lakše ulaze u stanicu u odnosu na veće molekule pa pokazuju veliki potencijal za kontroliranu isporuku lijeka (engl. *Controlled Drug Delivery System*, DDS) (29). Sustavi za kontroliranu isporuku lijekova omogućavaju dostavu lijeka na ciljno mjesto i smanjuju neželjene učinke. Time se povećava količina dostavljenog lijeka pa su i potrebne doze manje, što je važno kada postoji nesklad između doze ili koncentracije lijeka i njegovih terapijskih i/ili toksičnih učinaka. Lijekovi, tj. bioaktivne tvari mogu biti adsorbirane na površinu nanonosača i/ili enkapsulirane. Dostava lijeka u ciljna tkiva i stanice omogućena je aktivnim i pasivnim mehanizmima. Aktivna dostava temelji se na konjugaciji nanonosača specifičnim ligandima koji prepoznaju ciljne molekule ili manipulaciji fizikalnih čimbenika (npr. temperature, pH), a pasivna na vaskularnoj permeabilnosti i retenciji (30). Otpuštanje bioaktivnih tvari na mjestu

djelovanja osiguravaju temperatura, pH, osmolalnost ili enzimska aktivnost. Za korištenje nanonosaa u medicini najvažnije su biokompatibilnost i neškodljivost. Neželjeni učinci nanočestica ovise o njihovom hidrodinamičkom promjeru, koncentraciji, obliku, interakcijama s drugim molekulama, putu administracije, interakcijama s imunološkim sustavom i vremenu zadržavanja u krvotoku (28). Studije ukazuju da NP hidrodinamičkog promjera 10-100 nm imaju optimalna farmakokinetička svojstva za *in vivo* primjenu. Manje NP ekstravaziraju u tkiva ili bivaju izlučene bubrezima, a veće bivaju opsonizirane i odstranjene stanicama retikuloendotelnog sustava (31).

1.3.1 Nanočestice zlata

Nanočestice metala, posebno nanočestice zlata (engl. *gold nanoparticles*, AuNP), privukle su pozornost znanstvenika zbog svoje stabilnosti, otpornosti na oksidaciju, biokompatibilnosti, relativno jednostavnog procesa sinteze i mogućnosti prelaska krvno-moždane barijere (32). AuNP sastoje se od jezgre koja sadrži nekoliko stotina atoma zlata i zaštitnog vanjskog sloja organskih liganda. Dimenzije AuNP-a osiguravaju veliku površinu za modificiranje ligandima za prepoznavanje specifičnih antigena ili receptora radi ciljane isporuke lijekova koji se na NP lako pričvršćuju ionskim ili kovalentnim vezama ili putem adhezije. Mogu se koristiti i kao potencijalno sredstvo za isporuku proteina ili nukleinskih kiselina (26). AuNP pokazuju manju toksičnost od sur.h anorganskih nanočestica (33), kao na primjer nanočestica srebra i željezovog oksida, koje su toksične za neurone i nisu primjenjive za manipulaciju neuronalnim procesima (34). AuNP poboljšavaju diferencijaciju, regeneraciju i preživljavanje neurona. Osim toga, reguliraju električnu aktivnost živčanih stanica (35). AuNP utječu na ekspresiju citokina (snižavaju razinu tumorskog faktora nekroze (TNF) i povećavaju razinu interleukina (IL-4 i IL-10)), potiču ekspresiju antiapoptotičnih proteina i smanjuju ekspresiju proapoptotičnih molekula ovisno o veličini. Imaju antiangiogena, antioksidativna i protuupalna svojstva (36). Zbog optimalnih svojstava nanočestica zlata, istražuje se njihova primjena u liječenju Parkinsonove bolesti.

2 CILJEVI RADA

2.1 Glavni cilj

Dostava L-Dope pomoću nanočestica mogla bi unaprijediti terapiju PB poboljšanjem apsorpcije, stvaranjem depoa i postupnog oslobađanja lijeka, zaštitom od razgradnje i osiguravanjem veće koncentracije lijeka na ciljnom mjestu, dok bi same NP mogle štiti stanice od oštećenja stanica i oksidativnog stresa. Međutim, prije ispitivanja učinkovitosti, potrebno je utvrditi sigurnost primjene nanočestica zlata kao nosača lijekova, odnosno L-Dope. Stoga je glavni cilj ovog istraživanja ispitati utjecaj AuNP na vijabilnost i oksidativni stres, te moguće zaštitne učinke, na modelu stanica sličnih dopaminergičkim neuronima (engl. *dopaminergic like neurons*).

2.2 Specifični ciljevi

Definirani specifični ciljevi su:

1. Odrediti učinak diferencijacije na ekspresiju markera dopaminergičkih neurona u SH-SY5Y staničnoj liniji;
2. Odrediti unos AuNP u diferencirane SH-SY5Y stanice;
3. Odrediti utjecaj nanočestica na vijabilnost stanica i apoptozu u diferenciranim SH-SY5Y stanicama;
4. Ispitati utjecaj AuNP na stvaranje oksidativnog stresa;
5. Ispitati potencijalne zaštitne učinke AuNP protiv L-Dope i MPP⁺-a *in vitro*.

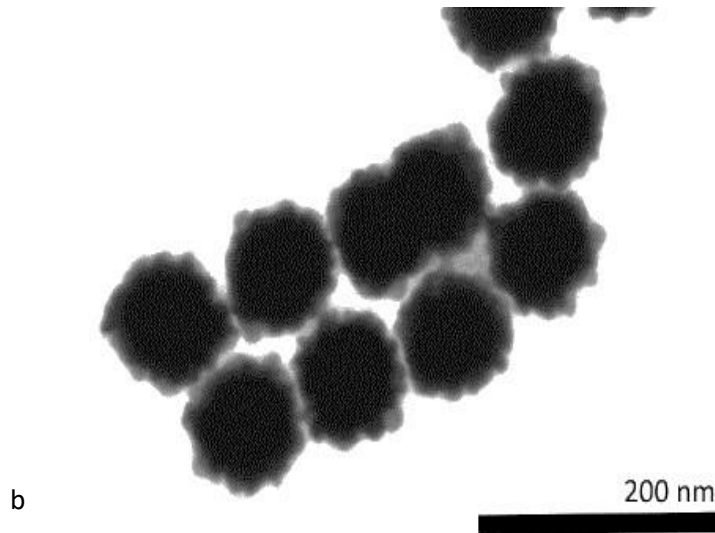
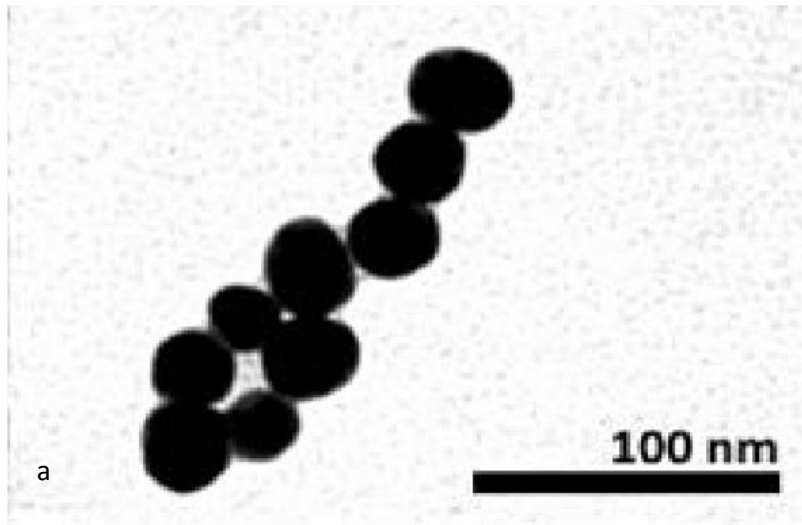
3 MATERIJALI I METODE

3.1 Sinteza i karakterizacija AuNP

AuNP sintetizirane su u Laboratoriju za nanomedicinu i nanotoksikologiju (LAOM) Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada. Sinteza i karakterizacija napravljena je od strane zaposlenika LAOM-a te nije fokus ovog rada. Ipak, zbog važnosti fizikalno-kemijskih svojstava nanočestica na njihove biološke učinke, navedene su osnovne informacije o sintezi i karakterizaciji. AuNP dobivene su redukcijom zlatnog hidroklorida uz natrijev borhidrid u prisustvu amantadina (Ad-AuNP) ili L-Dopa (AuNF-Dopa). Nanočestice AuNF-Dopa već su funkcionalizirane L-Dopom dok Ad-AuNP L-Dopu vežu nekovalentnim vezama u otopini. Za određivanje hidrodinamičkog promjera čestica (d_H , nm) i ζ potencijala (mV) korištene su metode dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *Dynamic Light Scattering*, DLS) i elektroforetskog raspršenja svjetlosti (engl. *Electrophoretic Light Scattering*, ELS) na Zetasizer Nano ZS uređaju (Malvern Instruments, Malvern, UK) opremljenim zelenim laserom (532 nm). Oblik i primarna veličina (dTEM, nm) AuNP određeni su transmisijskim elektronskim mikroskopom (engl. *Transmission Electron Microscope*, TEM) (Zeiss 902A; Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany). Mikroskop je radio u svjetlom polju pri naponu ubrzanja od 80kV. Za TEM vizualizaciju, uzorci su pripremljeni stavljanjem kapi suspenzije AuNP-a na Formvar®-om obloženu bakrenu rešetku (SPI Supplies, West Chester, PA) i osušeni na zraku pri sobnoj temperaturi. Fotografije su snimljene Canon Power-Shot S50 kamerom spojenom na mikroskop (37,38). U tablici 1 prikazana su osnovna fizikalno-kemijska svojstva korištenih AuNP, a na slici 1 izgled i oblik nanočestica vizualizirani TEM-om.

Tablica 1. – Fizikalno-kemijska svojstva Ad-AuNP i AuNF-Dopa.

Svojstvo	Ad-AuNP	AuNF-Dopa
d_{TEM}/nm	$23,8\pm 3,3$	<100
d_H/nm	$87,9\pm 2,0$	97.4- 119.9
ζ/mV	$-31,5\pm 0,4$	-41.1 – (-25)
Oblik	Sferične	„Nanocvijet“



Slika 1. Ad-AuNP (a) i AuNF-Dopa (b) oslikane metodom transmisijske elektronske mikroskopije. Prema: Kalčec, Peranić, i sur., 2022; Kalčec, Ljulj, i sur., 2022; uz dopuštenje autora.

3.2 Stanična kultura

Kao testni model za provedeno istraživanje odabrana je stanična linija SH-SY5Y kupljena od American Type Culture Collection (ATCC, Virginia, SAD). SH-SY5Y je subklon roditeljskoj staničnoj liniji SK-NSH koja je izolirana 1970. godine iz metastatskih stanica neuroblastoma iz koštane srži četverogodišnje djevojčice. Spomenuta stanična linija primjenjuje se u istraživanju PB zbog mogućnosti diferencijacije u stanice slične dopaminergičkim neuronima, odnosno stanice koje eksprimiraju dopaminergičke markere (tirozin hidroksilaza, dopamin receptor D2, dopaminski transporter), mogućnosti izazivanja fenotipa PB toksinima (MPP⁺, 6-hidroksidopamin, rotenon) koji uzrokuju disfunkciju mitohondrija i oksidativni stres, jednostavnosti uzgoja i zbog prikladnosti za „high-content“ istraživanja (39). Stanice su uzgajane u potpunom staničnom mediju DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, Njemačka) s 1 %-tnim L-glutaminom (Sigma-Aldrich, Njemačka), 1 %-tnom otopinom neesencijalnih aminokiselina (Sigma-Aldrich, Njemačka), 1 %-tnom otopinom penicilina i streptomocina (Sigma-Aldrich, Njemačka) te 10 %-tnom otopinom inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS; Sigma-Aldrich, Njemačka). Stanice su uzgajane u plastičnim tikvicama za uzgoj staničnih kultura površine 75cm² (T-75; Sarstedt Ag & Co, Sarstedt, Njemačka), u inkubatoru na 37 °C i u atmosferi s 5 % ugljikova dioksida (CellXpert C710, Eppendorf, Njemačka). Medij je mijenjan svaka 2-3 dana, a stanice su presađivane u prosjeku svakih 4-7 dana, odnosno kada je konfluentost iznosila između 70 i 90 %.

Stanice u svim pokusima bile su između 15. i 25. pasaže. Prilikom presađivanja, stanice su isprane PBS-om (engl. *Phosphate-Buffered Saline*) i odvojene od podloge otopinom tripsin/EDTA (Sigma-Aldrich, Njemačka). Nakon odvajanja, stanice su razrijeđene staničnim medijem, nakon čega im je određena koncentracija na automatskom brojaču stanica TC-20 (Bio-Rad, Kalifornija, SAD). U svrhu diferencijacije stanice su tretirane retinoičnom kiselinom (RA; Sigma-Aldrich, Njemačka) i tetradekanoilforbol acetatom (TPA; Sigma-Aldrich, Njemačka). Stanice su nasađene u T-75 tikvicu za uzgoj staničnih kultura, u potpunom staničnom mediju, pri gustoći od 5 000 stanica/cm². Nakon 24satne inkubacije, stanice su tretirane RA medijem (DMEM/F12, 1 %-tni L-glutamin, 1 %-tni penicilin/streptomocin, 1 %-tne neesencijalne aminokiseline, 1 %-tni FBS i 10 μM RA) tijekom 3 dana. Nakon 3 dana, RA medij je uklonjen, stanice su isprane PBS-om i tretirane TPA medijem (DMEM/F12,

1 %-tni L-glutamin, 1 %-tni penicilin/streptomycin, 1 %-tne neesencijalne aminokiseline, 1 %-tni FBS i 80 nM TPA) tijekom sljedeća 3 dana.

3.3 Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

Kvantitativna lančana reakcija polimeraze (engl. *quantitative PCR*, qPCR) je laboratorijska tehnika u molekularnoj biologiji temeljena na umnažanju DNA segmenata termostabilnom DNA polimerazom. Za razliku od klasičnog PCR-a gdje se proizvod reakcije detektira na samom kraju, qPCR omogućava istovremeno umnažanje DNA (engl. *DeoxyriboNucleic Acid*, DNA) i njezinu kvantifikaciju. Polazni genetski materijal u qPCR -u je molekula mRNA (od engl. *messenger RiboNucleic Acid*) koja se prvo prepíše (transkribira) pomoću enzima reverzne transkriptaze u komplementranu DNA (engl. *complementary DeoxyriboNucleic Acid*, cDNA) koja zatim služi kao kalup za umnažanje željenog gena. Za detektiranje umnožene DNA postoji nekoliko pristupa, a najčešće korišteni su primjena kemijskog spoja (npr. SYBER GREEN) koji se ugrađuje između nukleotida dvostruke uzvojnice DNA i emitira fluorescenciju te specijaliziranih proba komplementarnih ciljnoj sekvenci cDNA obilježenih različitim kombinacijama spojeva koji emitiraju svjetlosnu energiju (engl. *reporter dye*) i spojeva koji blokiraju takvo djelovanje (engl. *quencher*). Izmjerena fluorescencija proporcionalna je količini umnoženog produkta u svakom ciklusu.

Rezultati qPCR -a prikazuju se na grafu gdje je broj ciklusa prikazan na x osi, a fluorescencija, odnosno količina umnoženog produkta na y osi. Graf amplifikacije ima dvije faze: eksponencijalnu fazu nakon koje slijedi neeksponencijalna, plato faza. U vrijeme eksponencijalne faze, količina produkta se svakim ciklusom prosječno udvostručuje. Kako reakcija napreduje, količina dostupnih komponenti reakcije se smanjuje, reakcija usporava i doseže fazu platoa kada više nema komponenti potrebnih za umnažanje. U početku, fluorescenciju koja potječe od produkta PCR reakcije nije moguće razlikovati od pozadinske fluorescencije (engl. *background fluorescence*), međutim, kako s vremenom količina produkta raste, fluorescencija koja potječe od produkta PCR reakcije postaje sve intenzivnija. Ciklus pri kojem se javlja naglo povećanje intenziteta fluorescencije naziva se granični ciklus (engl. *threshold cycle*, C_T value). Učinkovitost PCR reakcije određuje se iz standardne krivulje. Za konstruiranje standardne krivulje potrebno je provesti PCR reakciju s deseterostrukim razrjeđenjima cDNA. Nakon što se konstruira standardna krivulja, logaritam broja

inicijalnih kopija se prikaže na x-osi, a C_T vrijednost se prikaže na y-osi. Kada bi se svakim ciklusom količina DNA udvostručila, graf $C_T=m(\log(\text{DNA}))+b$ bi imao oblik pravca čiji nagib iznosi -3,32 ($2=10^{-1/\text{nagib pravca}}$), a učinkovitost reakcije bila bi 100 %. Učinkovitost se računa iz standardne krivulje formulom $E=10^{-1/\text{nagib pravca}}$, pri čemu je $\%E=(E-1)\times 100\%$. Prihvaćena učinkovitost reakcije je između 90 i 110% (Arya i sur., 2005).

Stanice su uzgojene i diferencirane prema prije opisanom protokolu. Osim diferenciranih, u ovom eksperimentu koristili smo i nediferencirane stanice kako bismo mogli odrediti relativnu ekspresiju gena i potvrditi da diferencijacija uzrokuje fenotip sličan dopaminergičkim neuronima. Kako bismo u potpunosti oponašali uvjete kojima su izložene diferencirane stanice, nediferencirane stanice nasađene su u T-75 tikvici, u kompletnom staničnom mediju, pri gustoći od 5 000 st/cm². Stanicama je zamijenjen medij nakon 24 sata inkubacije i zatim ponovno nakon 3 dana, između čega su stanice ispirane PBSom. Nakon završetka diferencijacije, diferencirane i nediferencirane stanice ispirane su PBS-om, odlijepljene od podloge otopinom tripsin/EDTA, te im je izmjerena koncentracija.

Izolacija RNA provedena je prema uputama proizvođača kita BIO-RAD Aurum Total RNA (Bio-Rad, Kalifornija, SAD). Za izolaciju RNA (od engl. *RiboNucleic Acid*) u oba je slučaja korišteno 500 000 stanica. U svim koracima centrifugiranje je provedeno na 12 000 RCF-a (od engl. *Relative Centrifugal Force*). Odgovarajući volumen staničnih suspenzija prebačen je iz tikvice u plastične epruvete za centrifugiranje te su stanice centrifugirane 2 minute. Nakon toga je odstranjen supernatant i stanice su resuspendirane u otopini za liziranje, a zatim i u 70 %-tnom etanolu. Homogenizirane otopine prebačene su u kolonice za izolaciju RNA i centrifugirane 30 sekundi. Zatim je odstranjen supernatant, dodana otopina za ispiranje „low stringency“ i uzorci su ponovno centrifugirani. Otopina za ispiranje je odstranjena, dodana je otopina DNaze I i uzorci su inkubirani 15 minuta kako bi razgradili genomsku DNA koja bi u sljedećim fazama PCR reakcije predstavljala onečišćenje. Nakon toga je dodana otopina za ispiranje „high stringency“, uzorci su centrifugirani, otopina je odstranjena te je ponovno dodana otopina za ispiranje „low stringency“ i ponavljen prethodni postupak. Na kraju je dodana otopina za eluiranje i uzorci su centrifugirani 2 minute kako bi se s kolonica isprala RNA.

Konačno, provedena je reverzna transkripcija prema uputama u kitu BIO-RAD iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad, Kalifornija, SAD). U svaku epruvetu s RNA dodan je iScript RT Supermix i voda bez nukleaze. U ovom je koraku također napravljena i kontrola bez reverzne transkriptaze (engl. *No Reverse Transcriptase*, NRT) gdje je u reakcijsku smjesu umjesto reverzne transkriptaze dodana voda. Epruvete su inkubirane 5 minuta na 25 °C, pa 20 minuta na 46 °C (reverzna transkripcija) i na kraju 1 minutu na 95 °C (inaktivacija) kako bismo dobili cDNA. Reverzna transkripcija provedena je u termalnom mikseru Eppendorf ThermoMixer C (Eppendorf, Njemačka).

Kvantitativna polimerazna lančana reakcija (qPCR) provedena je prema kitu iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad, Kalifornija, SAD). Svi uzorci napravljeni su u triplicatima. U epruvete u kojima se nalazio iTaq Universal SYBR Green Supermix i početnice dodana je cDNA. Korištene početnice (Metabion, Njemačka) bile su: dopaminski receptor D2 (500 μ M) , tirozin hidroksilaza (100 μ M), dopaminski transporter (100 μ M) i gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH; 100 μ M). U qPCR reakciji korištene su NRT i NTC (engl. *No Template Control*) kontrola. NTC kontrola ne sadrži cDNA, a služi za detekciju dimera početnica. NRT kontrola, kao što je već spomenuto, služi za otkrivanje DNA onečišćenja (bilo koje DNA koja nije cDNA). Uzorci su pomiješani na vortex mješalici i na kraju inkubirani prema preporučenom protokolu za Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sustav. Prije određivanja relativne ekspresije gena, koncentracije svih korištenih primera optimizirane su tako da je učinkovitost umnažanja bila u rasponu od 90-110 % (rezultati nisu prikazani). Prije pokretanja PCR reakcije, pločica s reakcijskom smjesom je centrifugirana radi uklanjanja mjehurića zraka. CT vrijednosti određene su automatski u programu 7500 System SDS Software (Applied Biosystems, Massachusetts, SAD).

3.4 Imunocitokemija

Imunocitokemija je metoda za analizu relativne količine, konformacije i substancične lokalizacije ciljnih antigena. U imunocitokemiji postoje dvije metode detektiranja antigena. Prva uključuje uporabu protutijela obilježenih enzimima i kromogena, a antigeni se detektiraju svjetlosnim mikroskopom. U drugoj metodi, imunofluorenciji, za detektiranje ciljnih antigena koriste se fluoroforom obilježena protutijela, a antigene u ili na stanici možemo detektirati fluorescencijskim mikroskopom izravnom ili neizravnom metodom. Izravna metoda uključuje upotrebu fluoroforom označenog protutijela koje se veže direktno na ciljni antigen (primarno protutijelo). Nedostatak ove metode je slabija osjetljivost zbog nedostatka pojačanja signala pa se upravo zbog toga češće koristi neizravna metoda koja je korištena i u ovoj studiji. Neizravna metoda podrazumijeva detektiranje antigena pomoću fluoroforom konjugiranih sekundarnih protutijela koja prepoznaju neoznačena primarna protutijela vezana za ciljani antigen u ili na stanici. Zbog pojačavanja signala putem sekundarnog protutijela neizravna metoda je osjetljivija od izravne metode (40).

Stanice su diferencirane prema prije opisanom protokolu. U pokusu su korištene diferencirane i nediferencirane stanice radi usporedbe ekspresije dopaminergičkih markera. Dan prije pokusa stanice su tripsinizirane i presađene na sterilne pokrovnice na pločici s 12 jažica gustoćom 10 000 stanica/jažici. Sljedeći dan odstranjen je medij te su pokrovnice isprane PBS-om. Pripremljene pokrovnice inkubirane su s 4 %-tnim paraformaldehidom tijekom 15 minuta. Fiksativ je odstranjen, a stanice su isprane PBS-om. Pokrovnice su inkubirane u 0,25 %-tnom Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich, Njemačka) tijekom 10 minuta kako bi se membrane permeabilizirale. Permeabilizacija membrane stanica je nužna kako bi se omogućilo vezanje protutijela na unutarstanične antigene. Pokrovnice su isprane PBS-om kako bi se uklonio pufer za permeabilizaciju. Nespecifično vezanje protutijela spriječeno je inkubiranjem stanica u otopini 10 %-tnog FBS-a s 0,1 %-tnim Tween-om 20 (Sigma-Aldrich, Njemačka) tijekom 90 minuta na 37 °C.

Nakon što su stanice isprane PBS-om, dodana su primarna protutijela i uzorci su inkubirani preko noći na 4°C. Sva su protutijela razrijeđena u 0,1 %-tnoj otopini Tween-a 20 s 2% FBS-a:

- za detekciju tiroksin hidroksilaze korišteno je anti-TH protutijelo (Chemicon, SAD) (razrjeđenje 1:1000);
- za detekciju dopaminskog transportera korišteno je anti-DAT protutijelo (Chemicon, SAD) (razrjeđenje 1:5000);
- za detekciju dopaminskog receptora D2 korišteno je anti-DR2 protutijelo (Abcam, SAD) (koncentracije 5 µg/mL);
- za detekciju β-tubulina korišteno je anti-β-tubulin protutijelo (Sigma-Aldrich, Njemačka) (razrjeđenje 1:200).

Kontrola autofluorescencije (engl. *Autofluorescence Control*, AFC) i kontrola bez primarnog protutijela (engl. *No Primary Control*, NPC) inkubirane su 0,1 %-tnom otopinom Tween-a 20 s 2 % FBS-a bez primarnog protutijela. Nakon inkubacije primarnim protutijelom, stanice su isprane 0,1 %-tnom otopinom Tween-a 20 te su inkubirane sa sekundarnim protutijelom tijekom sat vremena u mraku na 37 °C.

Korištena su sljedeća sekundarna protutijela:

- pri analizi ekspresije β-tubulina korištena su IgG anti-mišja protutijela iz seruma koze konjugirana bojom Alexa Fluor®488 (Abcam, UK) (koncentracija 2 µg/mL);
- pri analizi ekspresije tiroksin hidroksilaze te analizi ekspresije dopaminskog receptora tipa 2 korištena su IgG anti-zečja protutijela iz seruma magarca konjugirana bojom Alexa Fluor®647 (Abcam, UK) (koncentracija 2 µg/mL);
- pri analizi ekspresije dopaminskog transportera korištena su IgG anti-štakorska protutijela iz seruma koze konjugirana bojom Alexa Fluor®555 (Abcam, UK) (koncentracija 2 µg/mL).

Kontrola autofluorescencije inkubirana je 0,1 %-tnom otopinom Tween-a 20 s 2 % FBS-a. Kontrola bez primarnog protutijela inkubirana je odgovarajućim sekundarnim protutijelom. Nakon inkubacije sekundarnim protutijelom, pokrovnice su isprane puferom za ispiranje. Jezgre su obojane Hoechst bojom koncentracije 10 µg/mL tijekom 10 minuta. Na kraju su pokrovnice isprane destiliranom vodom, osušene i postavljene na mikroskopska stakalca u Fluorshield te pohranjene na -20 °C. Stanice su snimljene na Leica TCS SP8 X mikroskopu (Leica Microsystems, Njemačka).

3.5 Vizualizacija unosa nanočestica u stanice

Konfokalna mikroskopija korištena je za vizualizaciju unosa AuNP u stanice. U ovom pokusu korištene su stanice diferencirane prema prije opisanom protokolu. Stanice su nasađene na sterilne pokrovnice u pločici s 24 jažice (Eppendorff, Hamburg, Njemačka) gustoćom od 10 000 stanica po jažici i inkubirane na 37 °C i 5 % CO₂ tijekom 24 sata kako bi se pričvrstile za podlogu. Sljedeći dan, zamijenjen je medij i stanice su tretirane suspenzijama Ad-AuNP i AuNF-Dopa u koncentracijama od 10 ppm, pripremljenim u kompletnom staničnom mediju. Nakon 24 sata, medij s tretmanima je uklonjen i stanice su isprane PBS-om radi uklanjanja viška nanočestica. Stanice su zatim fiksirane 4 %-tnom otopinom paraformaldehida tijekom 10 minuta te permeabilizirane 0,25 %-tnom otopinom Tritona X-100 tijekom 15 min. Kako bi spriječili nespecifična vezanja protutijela, stanice su inkubirane u 10 %-tnoj otopini FBSa s 0,1 % Tween-a 20 tijekom 90 minuta. Stanice su zatim inkubirane preko noći, na 4 °C, u otopini mišjeg monoklonskog anti- β -tubulin primarnog protutijela (Sigma-Aldrich, Njemačka) razrijeđenog 200 puta. Sljedeći dan, otopina primarnog protutijela je uklonjena, stanice su isprane PBS-om i inkubirane u otopini sekundarnog anti-mišjeg protutijela obilježenog AlexaFluor®488 bojom, koncentracije 2 μ g/mL (Abcam, UK) tijekom 2 sata na 37 °C. Stanice su ponovo isprane PBS-om, inkubirane u otopini faloidina obilježenog fluorescein-izotiocijanatom (Faloidin-FITC; Sigma-Aldrich, Njemačka) koncentracije 1 μ g/mL tijekom 20 minuta. Stanice su opet isprane PBS-om, nakon čega su jezgre obojane Hoechst bojom koncentracije 10 μ g/mL tijekom 10 minuta. Pokrovnice su isprane destiliranom vodom, osušene i postavljene na mikroskopska stakalca u Fluoroshield te pohranjene na -20 °C. Fotografije su snimljene na Leica TCS SP8 X mikroskopu (Leica Microsystems, Njemačka). Internalizirane AuNP su izravno vizualizirane u načinu kontrastne refleksije, dobivene su fotografije spojene sa fotografijama dobivenim u fluorescentnim kanalima. Snimljeno je pet fotografija duž Z-osi (engl. *Z-stack*) kako bi potvrdili da su NP lokalizirane unutar stanica, a ne zalijepljene na pokrovnice ili površinu stanica. Fotografije na zasebno snimljenim kanalima spojene su u ImageJ programu (Sveučilište u Winsconsinu, Winsconsin, SAD).

3.6 Protočna citometrija

Protočna citometrija je multiparametrijska analitička metoda koja omogućuje istovremeno analiziranje više parametara svake stanice u suspenziji. Koristi se za analiziranje ekspresije molekula na staničnoj površini ili u samoj stanici, analiziranje relativne veličine i volumena stanica, karakteriziranje i određivanje tipova stanica u heterogenoj staničnoj populaciji i određivanje čistoće izoliranih subpopulacija stanica. Podaci se dobivaju mjerenjem intenziteta fluorescencije koju emitiraju fluorescentno obilježena protutijela ili ligandi koji se vežu na specifične molekule stanice.

Protočni citometar sastoji se od protočnog, optičkog i elektroničkog sustava. U protočnom dijelu stanice su hidrodinamički fokusirane tako da pojedinačno prolaze kroz citometar pri čemu su obasjane fokusiranim laserskim zrakama određene valne duljine. Raspršenu svjetlost mjere detektori koji se nalaze u smjeru upadne zrake (engl. *Forward Scatter*, FSC) i pod kutom (engl. *Side Scatter*, SSC).

Posebni detektori mjere fluorescentni signal koji potječe od fluorofora vezanih na stanice. Različiti tipovi stanica mogu se razlučiti na temelju FSC-a koji korelira s veličinom stanica, SSC-a koji korelira sa zrnatosti stanica i na temelju ekspresije pojedinog proteina obilježenog fluoroforom koji emitira svjetlost pri pobuđivanju laserskim zrakama određene valne duljine. Raspršena svjetlost i fluorescencija obojenih stanica određene valne duljine usmjeravaju se preko zrcala i filtera na senzore nazvane „*Photomultiplying Tubes*“ (PMTs) koji detektiraju emitiranu svjetlosti i pretvara ju u električni signal (engl. *Voltage puls, event*) koji korelira s intenzitetom svjetlosti.

Rezultati se prikazuju u numeričkom formatu ili grafički, u obliku histograma frekvencije i u obliku dvoparametrijskih dijagrama, citograma ili točkastih prikaza (engl. *dot-plot*). Najčešće se koristi citogram veličine i zrnatosti stanica (FSCxSSC) na kojem se postavlja regija (R) analize oko ciljnih stanica iz kojih će se analizirati fluorescentni signali (41).

3.6.1 Određivanje unosa nanočestica u stanice protočnim citometrom

Fenomen raspršenja na stranu (SSC) ulazne laserske zrake citometra korišten je za ispitivanje učinkovitosti ulaska nanočestica u stanice. Rast intenziteta SSC-a proporcionalan je zrnatosti stanica, odnosno ulasku nanočestica u stanice. Mjerenja su određivana istovremeno s određivanjem stanične vijabilnosti i apoptoze. U svrhu određivanja unosa nanočestica u stanice, korištene su samo žive stanice (41). Dobiveni rezultati analizirani su metodom srednjeg intenziteta fluorescencije kojom je izračunan omjer intenziteta SSC-a uzorka tretiranog nanočesticama i kontrolnog, netretiranog uzorka. Dobivena vrijednost govori koliko je puta porasla zrnatost stanica tretiranih nanočesticama u odnosu na kontrolni uzorak (42).

3.6.2 Određivanje stanične vijabilnosti i apoptoze

Za razlikovanje mrtvih, živih i apoptotičnih stanica u ovom eksperimentu korišten je aneksin V-FITC i propidijev jodid (PI). U početnoj fazi apoptoze dolazi do premještanja fosfolipida fosfatidilserina s unutrašnje na vanjsku stranu stanične membrane što fagocitima omogućava prepoznavanje apoptotskih stanica i tjelešaca te njihovo uklanjanje. Aneksin V je protein koji specifično veže fosfatidilserin pa se koristi za detektiranje stanica u apoptozi. Ova metoda osobito je korisna u početnoj fazi apoptoze kada je stanična membrana cjelovita. Kasnije, nakon cijepanja i fragmentacije DNA postupno dolazi i do promjene propusnosti stanične membrane pa će se aneksin V jednako vezati i na fosfatidilserin s unutrašnje strane membrane, kao kod mrtvih stanica. Za razlikovanje mrtvih od živih stanica dodatno se koristi bojanje propidijevim jodidom koji zbog velike molekularne mase prolazi samo kroz oštećenu staničnu membranu, a vezanjem na DNA daje fluorescentni signal (43).

Određivanje stanične vijabilnosti i apoptoze provedeno je prema kitu ANNEXIN V:FITC ASSAY KIT (Bio-Rad, Kalifornija, SAD). Stanice su uzgajane i diferencirane prema prije opisanom protokolu. Nakon diferencijacije, stanice su odlijepljene od podloge otopinom tripsin/EDTA i nasađene u pločice s 24 jažice (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) pri koncentraciji 100 000 stanica po jažici u kompletnom staničnom mediju. Neposredno prije pokusa pripremljeni su tretmani: AuNF-Dopa i Ad-AuNP koncentracije 10 ppm, MPP⁺ koncentracije 100 μM, L-Dopa koncentracije 50 μM te kombinacije AdAuNP s L-Dopom i MPP⁺-om te AuNF-Dopa s MPP⁺-om. Negativna

kontrola bila je ultračista voda, a pozitivna 10 %-tni DMSO (dimetil sulfoksid). Svi uzorci pripremljeni su u duplikatima u kompletnom staničnom mediju. Stanice su inkubirane tretmanima 24 sata na 37 °C i 5% CO₂. Nakon inkubacije, supernatanti s mrtvim stanicama odvojeni su u epruvete za centrifugu. Stanice su isprane PBS-om i tripsinizirane. Nakon uspješnog odvajanja stanica dodano je 500 µL medija u svaku jažicu, stanice su resuspendirane opetovanim pipetiranjem i spojene s odgovarajućim supernatantom. Epruvete su centrifugirane pri sili od 800 RCF-a tijekom 5 minuta. Nakon toga je uklonjen supernatant, stanice su resuspendirane u PBS-u i centrifugirane na 800 na istim postavkama kao u prethodnom koraku. Supernatant je odvojen i stanice su resuspendirane u puferu za vezanje boja (engl. *binding buffer*). U sve uzorke (osim u neobojanu kontrolu) dodana je boja ANNEXIN V:FITC (Bio-Rad, SAD), uzorci su inkubirani 10 minuta u mraku na sobnoj temperaturi i ponovo centrifugirani, supernatant je uklonjen, dodan je pufer za vezanje te konačno PI (50 µg/mL). (PI; Bio-Rad, SAD) u sve epruvete osim u „neobojanu kontrolu“. Ponovljen je prethodni postupak inkubacije te su uzorci analizirani na CytoFLEX SRT Benchtop Cell Sorter uređaju (Beckman Coulter, SAD).

3.7 Određivanje oksidativnog stresa

Za mjerenje oksidativnog stresa provedeni su testovi monoklorobiranom (mCBL), dikloro-dihidrofluorescein diacetatom (DCFH-DA), rodaminom 123 (Rh123) te dihidroetidijem (DHE).

Test mCBL koristi se za mjerenje unutarstaničnog glutationa. Glutation je tripeptid koji štiti stanicu od oksidativnog stresa, teških metala i organskih toksina. Javlja se u dva oblika: reducirani (GSH) i oksidirani oblik (GSSG). Monoklorobiman se koristi kao pokazatelj koncentracije GSH u stanicama. Monoklorobiman fluorescira kada se veže u kompleks GSH-mCBL u reakciji koju katalizira glutationS-tranferaza. U zdravoj stanici omjer GSH/GSSG je >100 , a smanjenje na 1-10 ukazuje na patološke promjene. Fluorescencija GSH-mCBL mjerena je pri pobudnoj svjetlosti od 380 nm i emitiranoj svjetlosti od 460 nm (44).

Test DCFH-DA bazira se na oksidaciji 2', 7'-diklorofluoresceina (DCFH) različitim ROS-ovima. DCFH-DA ulaskom u stanicu cijepaju intracelularne esterase pri čemu nastaje DCFH. Sam DCFH ne pokazuje fluorescentna svojstva, ali reakcijom s reaktivnim kisikovim vrstama 2', 7'-diklorofluorescein (DCFH) prelazi u fluorescentni 2', 7'-diklorofluorescein (DCF) (Griffiths i sur., 2011). Pobudna svjetlost DCF-a je pri 450 nm, a emisijska pri 520 nm. Intenzitet emitirane svjetlosti je proporcionalan količini ROS-a u stanici (45).

Učinak tretmana na mitohondrijski membranski potencijal (MMP, $\Delta\psi_m$) diferenciranih SH-SY5Y stanica određen je rodamin123 testom. Rh123 je kationska lipofilna boja koja prelazi staničnu membranu i nakuplja se u područjima negativnog membranskog potencijala kao što je unutrašnja mitohondrijska membrana (46). Rh123 koristi se za mjerenje MMP-a pri akutnoj izloženosti toksinima. Narušavanje fiziološkog MMP-a uzrokuje stvaranje ROS-ova i utječe na elektrokemijski gradijent nužan za sintezu ATP-a, stoga je promjena MMP-a pokazatelj zdravlja stanice. Nakupljanjem u mitohondrijskom matriksu Rh123 ne daje fluorescentni odgovor. Mitohondrijskom depolarizacijom dolazi do otpuštanja boje što vidimo kao fluorescentni signal, a posljedična hiperpolarizacija mitohondrijske membrane ponovno uzrokuje nakupljanje boje u matriksu i smanjenje intenziteta fluorescencije. Fluorescencijase mjeri pri pobudnoj svjetlosti od 507 nm i emitiranoj svjetlosti od 529 nm (47).

Test DHE koristi se za mjerenje količine superoksidnih iona (O_2^-) u stanici, markera oksidativnog stresa. DHE je fluorescentna boja koja u stanici reducira u 2-hidroetidij (EOH) i intermedijarne produkte. Intermedijarni produkti reagiraju s hidrosilnim radikalima ili vodikovim peroksidom pri čemu nastaje etidij (E). Fluorescencija E se mjeri pri pobudnoj svjetlosti 500-530 nm i emitiranoj svjetlosti 590-620 nm (48).

Stanice su uzgajane i diferencirane prema prije opisanom protokolu. Nakon diferencijacije, stanice su odlijepljene od podloge i nasađene u mikrotitarske pločice s 96 jažica pri koncentraciji 20 000 stanica po jažici u potpunom staničnom mediju. Stanice su inkubirane tijekom 24 sata kako bi se vezale na podlogu. Nakon 24 sata, stanicama je promijenjen medij te su inkubirane sljedećim tretmanima pripremljenim neposredno prije pokusa: nanočestice (AuNF-Dopa, Ad-AuNP) koncentracije 10 ppm, MPP⁺ koncentracije 100 μ M, L-Dopa koncentracije 50 μ M te kombinacije Ad-AuNP/Dopa, AdAuNP/MPP⁺ i AuNF-Dopa/MPP⁺. Negativna kontrola tretirana je ultračistom vodom, a kao pozitivna kontrola korištene su stanice tretirane 50 μ M tBOH (tert-butil hidroperoksid; Sigma-Aldrich, Njemačka). Svi tretmani napravljeni su u triplikatima u potpunom staničnom mediju. Za mCBL i Rh123 testove stanice su inkubirane tretmanima tijekom 4 sata, a za DHE i DCFH-DA testove, 40 minuta. Nakon inkubacije, tretmani su odstranjeni, stanice su tri puta isprane PBS-om i inkubirane 30 minuta bojama sljedećih koncentracija: mCBL 50 μ M, Rh123 0,1 μ M te DHE i DCFH-DA 20 μ M. Nakon 30 minuta, fluorescencija je izmjerena na čitaču mikrotitarskih pločica VictorTM (Perkin Elmer, MA, SAD).

3.8 Statistička obrada rezultata

Sve statističke analize provedene su u GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornija, SAD) programu. Statistička značajnost podataka za protočnu citometriju i oksidativni stres određena je jednosmjernom ANOVA-om, praćeno Dunnettovim višestrukim usporednim testom gdje su sve vrijednosti tretmana uspoređene s vrijednostima negativne kontrole. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD). Prag statističke značajnosti postavljen je na $p < 0,05$. Na svim je grafovima statistička značajnost označena zvjezdicom (*).

4 REZULTATI

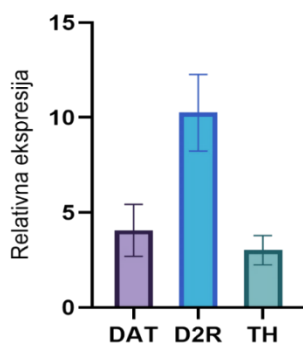
4.1 Lančana reakcija polimeraze

Za analizu dobivenih podataka korištena je Livakova metoda, metoda kompartivne kvantifikacije ili $\Delta\Delta CT$ metoda. Ova metoda nije usredotočena na precizno određivanje broja kopija nego na usporedbu broja kopija DNA testnog uzorka s kontrolnim (kalibracijskim) uzorkom u kojem je poznata razina ekspresije gena. U $\Delta\Delta CT$ metodi uspoređuju se rezultati testnog uzorka s kontrolnim uzorkom (netretirani ili divlji tip) i s referentnim genom (engl. *housekeeping gene*). C_T vrijednosti gena od interesa (engl. *Gene of*

Interest, GOI) u testnom uzroku i kontrolnom uzroku uspoređuju se sa C_T vrijednošću referentnog gena i dobiva se $\Delta\Delta C_T$. Za ovu metodu potrebno je odraditi sljedeće:

1. Normalizirati C_T GOI sa C_T REFERENTNI GEN
 - ΔCT KONTROLA = C_T GOI, KONTROLA - C_T REFERENTNI GEN, KONTROLA
 - ΔCT UZORAK = C_T GOI, UZORAK - C_T REFERENTNI GEN, UZORAK
2. Normalizirati ΔC_T ispitivanog uzorka s ΔC_T kontrole
 - $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ TESTNI UZORAK - ΔCT KONTROLNI UZORAK
3. Izračunati omjer ekspresije ili razliku u ekspresiji
 - $2^{-\Delta\Delta CT}$ = omjer normalizirane ekspresije

Efikasnost umnažanja (E) označena je s 2 jer Livakova metoda pretpostavlja da je učinkovitost qPCR reakcije približno 100 % te da je podjednaka uzorcima s referentnim genom i genom od interesa. U svrhu osiguravanja navedenih uvjeta provedene su reakcije optimizacije svih korištenih početnica i odabrana je ona koncentracija pri kojoj je standardna krivulja imala nagib približno -3,32 (rezultati nisu prikazani).

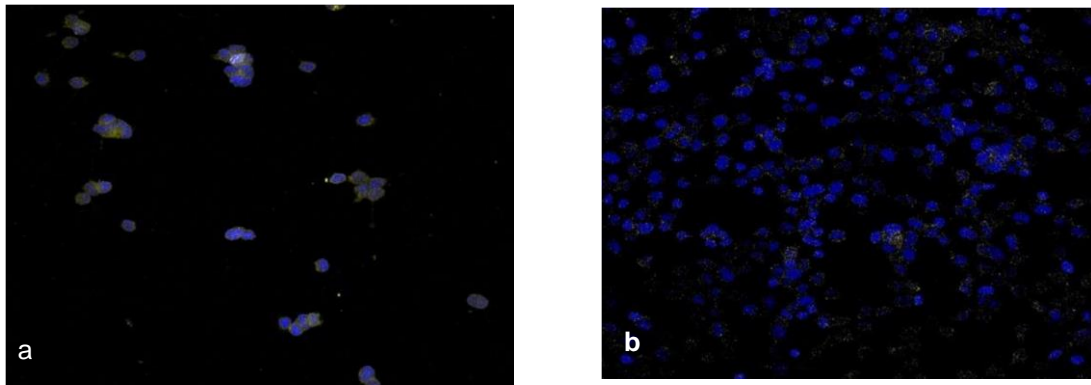


Slika 2. Relativna ekspresija gena u SH-SY5Y stanicama tretiranim RA/TPA u odnosu na nediferencirane stanice određena metodom qPCR. Geni od interesa (DAT, TH, D2R) normalizirani su preko referentnog gena GAPDH. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD).

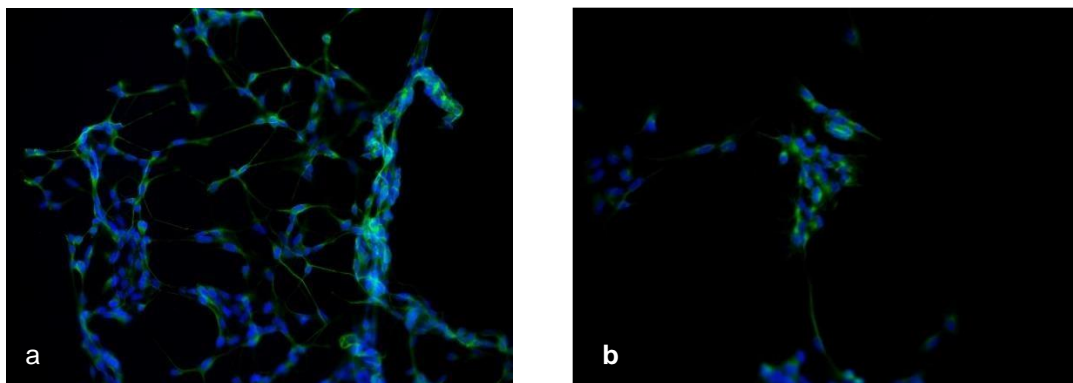
Ekspresija DAT-a je veća 4,07 puta, TH 3,01 puta, a D2R-a 10,25 puta u diferenciranim u odnosu na nediferencirane stanice što ukazuje da navedeni protokol diferencijacije povećava ekspresiju markera dopaminergičkih neurona.

4.2 Imunocitokemija

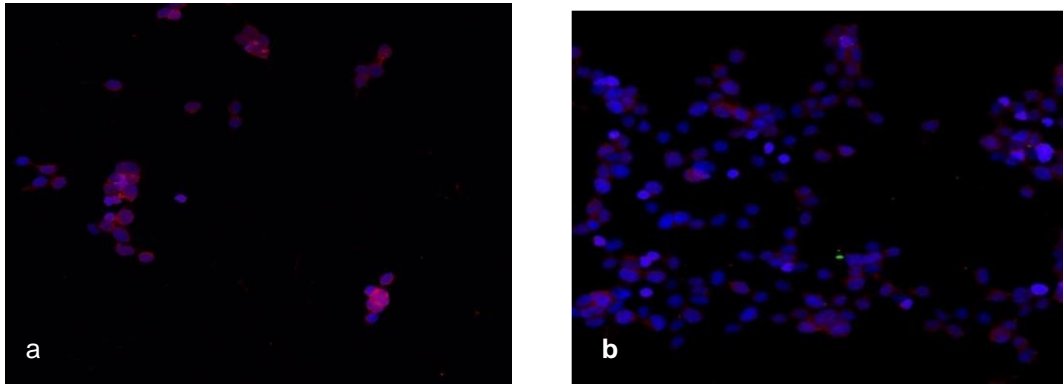
Metodom imunofluorescencije određen je učinak RA/TPA diferencijacije na ekspresiju markera dopaminergičkih neurona (DAT-a, D2R-a i TH-e) i β -tubulina u SH-SY5Y staničnoj liniji. Kao negativna kontrola korištene su nediferencirane stanice. Fotografije su snimljene na Leica TCS SP8 X mikroskopu i preklopljene u programu ImageJ. Rezultati pokazuju signal fluorescencije dopaminergičkih markera diferenciranih SH-SY5Y stanica u usporedbi s nediferenciranim stanicama. Dokaz da se signal odnosi na stanice je kolokalizacija s jezgrama obojenim Hoechst bojom koja daje plavi signal. Paralelno su korištene kontrola autofluorescencije i kontrola bez primarnog protutijela. Kontrola autofluorescencije nije imala signal (rezultati nisu prikazani). Postavke mikroskopa podešene su tako da signal kontrole bez primarnog protutijela ne bude vidljiv, te su s tim postavkama snimljene ispod prikazane fotografije.



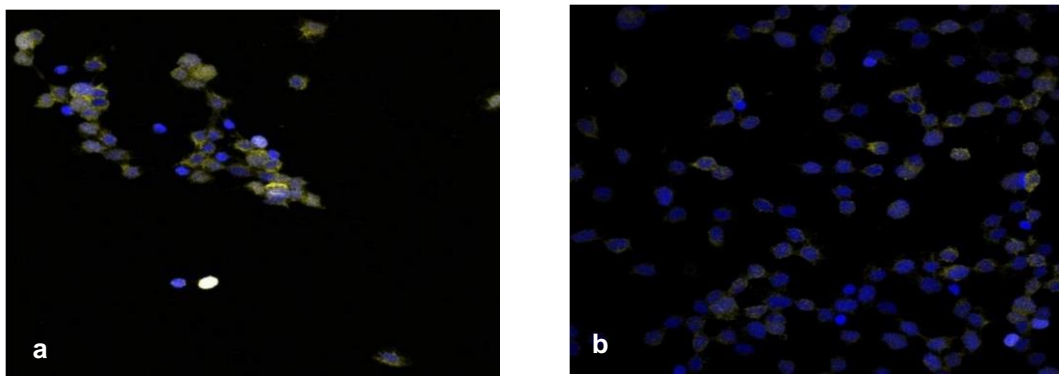
Slika 3. Vizualizacija dopaminskog transportera (DAT) metodom imunofluorescencije u diferenciranim i nediferenciranim (b) SH-SY5Y stanicama pri uvećanju od 40x. Žuti fluorescentni signal potječe od sekundarnih anti-štakorskih IgG protutijela obilježenih bojom AlexaFluor®555 koja su se vezala na antiDAT protutijela. Kromatin u staničnim jezgrama vizualiziran je Hoechst bojom (plavi fluorescentni signali).



Slika 4. Vizualizacija β -tubulina metodom imunofluorescencije u diferenciranim (a) i nediferenciranim SH-SY5Y stanicama pri uvećanju od 40x. Zeleni fluorescentni signal potječe od sekundarnih anti-mišjih IgG protutijela obilježenih bojom AlexaFluor®488 koja su se vezala na anti- β -tubulin protutijela. Kromatin u staničnim jezgrama vizualiziran je bojom Hoechst (zeleni fluorescentni signali).



Slika 5. Vizualizacija dopaminskog receptora tip 2 (D2R) metodom imunofluorescencije u diferenciranim (a) i nediferenciranim (b) SH-SY5Y stanicama pri uvećanju od 40x. Crveni fluorescentni signal potječe od sekundarnih anti-zečjih IgG protutijela obilježenih bojom AlexaFluor®647 koja su se vezala na antiD2R protutijela. Kromatin u staničnim jezgrama vizualiziran je bojom Hoechst (plavi fluorescentni signali).

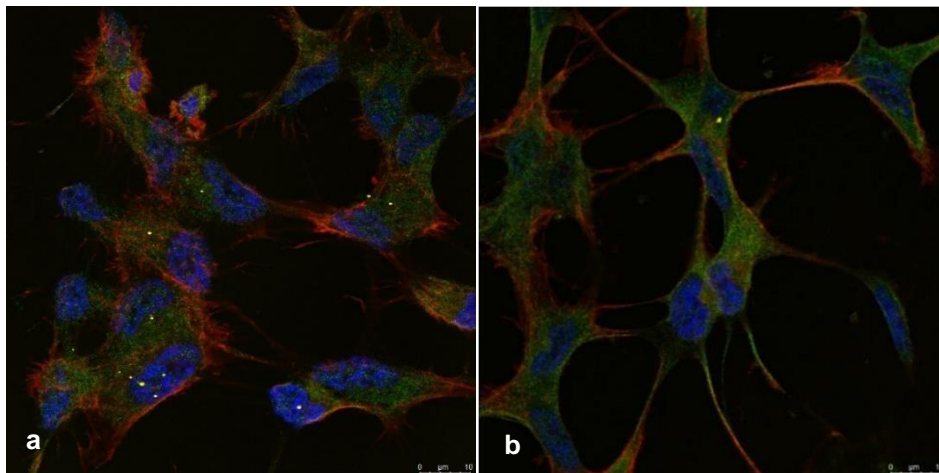


Slika 6. Vizualizacija tirozin hidroksilaze (TH) metodom imunofluorescencije u diferenciranim (a) i nediferenciranim (b) SH-SY5Y stanicama pri uvećanju od 40x. Žuti fluorescentni signal potječe od sekundarnih anti-zečjih IgG protutijela obilježenih bojom AlexaFluor®647 koja su se vezala na anti-TH protutijela. Kromatin u staničnim jezgrama vizualiziran je bojom Hoechst (plavi fluorescentni signali).

Iz gore prikazanih fotografija vidljivo je kako je intenzitet fluorescencije dopaminskog transportera, tirozin hidroksilaze i dopaminskog receptora D2 veći u diferenciranim stanicama u odnosu na nediferencirane stanice što ukazuje na veću razinu ekspresije spomenutih proteina. Nadalje, iz fotografija obilježenog β -tubulina vidljivo je kako je kod diferenciranih stanica broj neurita veći pri čemu su oni i veće duljine.

4.3 Vizualizacija unosa nanočestica u stanice

Metodom imunofluorescencije određen je unos nanočestica Ad-AuNP i AuNF-Dopa u diferencirane SHSY5Y stanice. Fotografije su snimljene na Leica TCS SP8 X mikroskopu i preklopljene u programu ImageJ. Rezultati pokazuju da obje vrste nanočestica slabo ulaze u stanice, no uspoređujući ih međusobno, Ad-AuNP ulaze više od AuNF-Dopa.

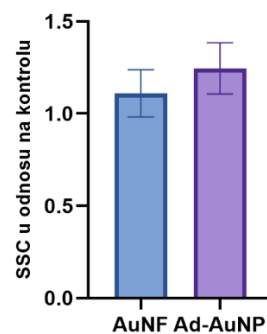


Slika 7. Vizualizacija unosa nanočestica Ad-AuNP (a) i AuNF-Dopa (b) metodom imunofluorescencije u diferenciranim SH-SY5Y stanicama pri uvećanju od 63x. Ad-AuNP i AuNF-Dopa u načinu kontrastne refleksije daju žuti signal. Plavi fluorescentni signali potječe od kromatina u staničnim jezgrama koji je vizualiziran bojom Hoechst. Zeleni fluorescentni signal daje sekundarno anti-mišje protutijelo obilježeno AlexaFluor® 488 bojom koje se vezalo na mišje monoklonskog anti- β -tubulin primarno protutijelo. Crveni fluorescentni signal potječe od falodin-FITC-a koji se vezao na aktin.

4.4 Protočna citometrija

4.4.1 Određivanje unosa nanočestica u stanice

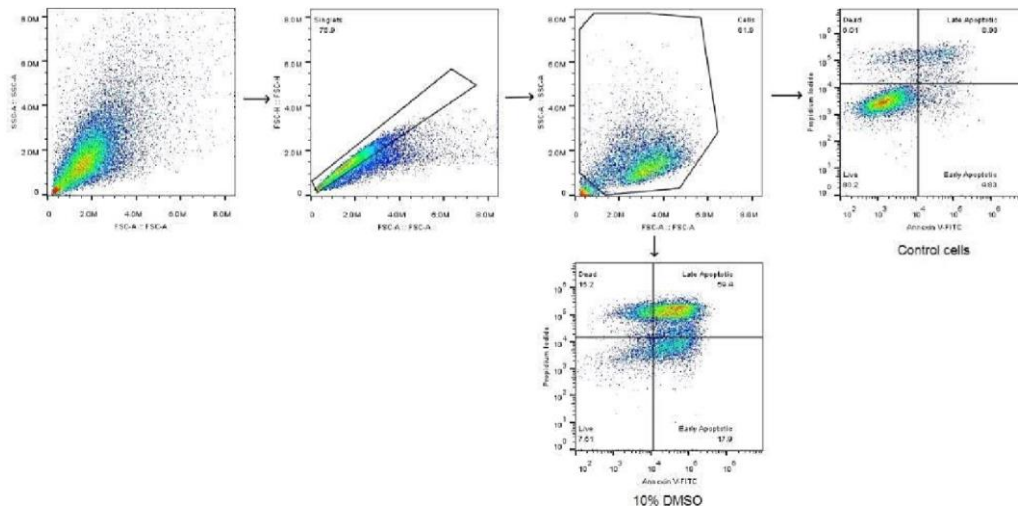
Protočnom citometrijom mjeren je SSC intenzitet kako bi se ispitao unos AuNP u diferencirane SHSY5Y stanice. Rezultati su obrađeni metodom srednjeg intenziteta fluorescencije kojim je izračunat omjer intenziteta SSC-a uzroka tretiranog nanočesticama i kontrolnog, netretiranog uzorka (Slika 8). U obzir su uzete samo vrijednosti SSC živih stanica, obzirom da apoptotične i mrtve stanice pokazuju povećanu zrnatost pa porast SSC-a nije moguće pripisati isključivo unesenim nanočesticama. Rezultati pokazuju da je zrnatost stanica tretiranih AuNF-Dopom u odnosu kontrolni uzorak porasla 1,24 puta, a Ad-AuNP 1,1 puta što ukazuje da obje vrste nanočestica slabo ulaze u stanice, no uspoređujući ih međusobno, unos Ad-AuNP je veći od AuNF-Dopa.



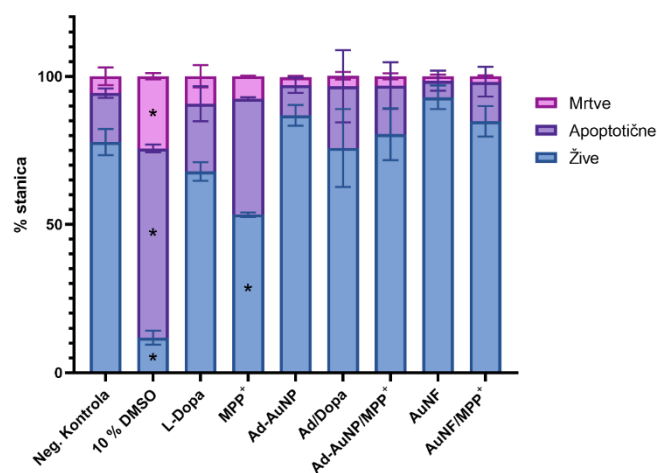
Slika 8. Unos nanočestica u diferencirane SH-SY5Y stanice određen protočnom citometrijom. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD).

4.4.2 Određivanje stanične vijabilnosti i apoptoze

Rezultati protočne citometrije pokazuju statistički značajno smanjenje udjela živih stanica u uzorku tretiranom MPP⁺-om u odnosu na negativnu kontrolu. Uzorci tretirani kombinacijama nanočestica, LDope i MPP⁺-a pokazuju veći udio živih stanica i manji udio stanica u apoptozi nego oni tretirani samo L-Dopom ili MPP⁺-om (vidi slike 9 i 10). Objе vrste nanočestica u manjoj mjeri induciraju apoptozu u odnosu na negativnu kontrolu, no bez statističke značajnosti.



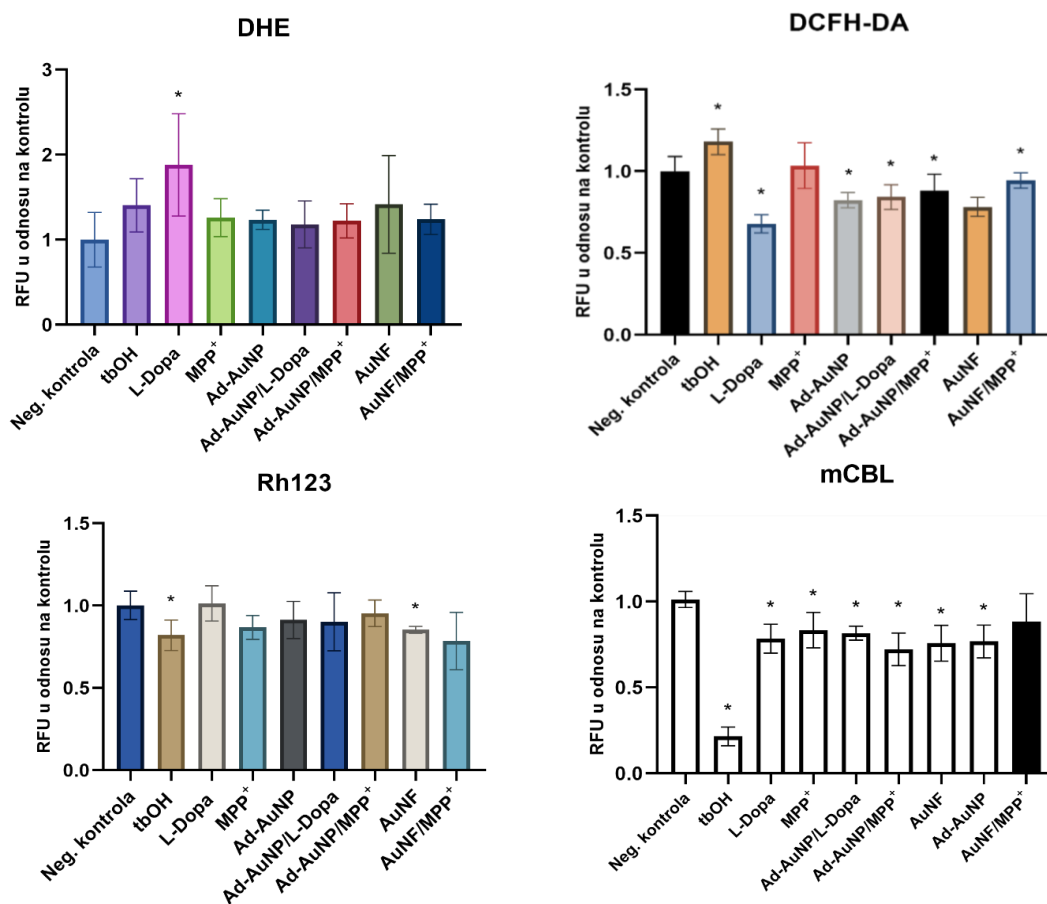
Slika 9. Grafički prikaz FSC i SSC intenziteta te „gateova“ korištenih prilikom analize živih, mrtvih i apoptotičnih stanica. Na grafovima kontrolnih stanica (Control cells i 10% DMSO), mrtve se stanice nalaze u gornjim dvama kvadrantima (kanali pozitivni na PI i PI/Annexin V-FITC), apoptotične stanice se nalaze u donjem desnom kvadrantu (PI negativan, Annexin V-FITC pozitivan kanal) dok su žive stanice smještene u donjem lijevom kvadrantu (PI/Annexin V-FITC negativne).



Slika 10. Stanična vijabilnost i apoptoza diferenciranih SH-SY5Y stanica određena protočnom citometrijom. Stanice su tretirane tijekom 24 sata na 37 °C. Koncentracije MPP⁺-a i L-Dope iznosile su 100 odnosno 50 μM, koncentracije obiju nanočestica zlata 10 ppm, dok su koncentracije u kombinacijama bile jednake onima u pojedinačnim tretmanima. Negativna kontrola bila je ultračista voda, a pozitivna 10 %-tni DMSO.

4.5 Oksidativni stres

Na slici 11 prikazani su rezultati dobiveni ispitivanjem oksidativnog stresa.



Slika 11. Utjecaj nanočestica na stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta i mitohondrijski membranski potencijal u diferenciranim SH-SY5Y stanicama. Stanice su tretirane tijekom 24 sata na 37°C. Koncentracije tbOH, MPP+, L-Dope iznosile su 50, 100 odnosno 50 μ M, koncentracije obiju nanočestica zlata 10 ppm, dok su koncentracije u kombinacijama bile jednake onima u pojedinačnim tretmanima.

Testom DCFH-DA mjerena je količina reaktivnih kisikovih vrsta 40 minuta nakon tretmana. Povećane razine ROS-a zabilježene su u stanicama tretiranim MPP⁺-om i u pozitivnoj kontroli (stanice tretirane tbOH). L-Dopa i nanočestice (Ad-AuNP, Ad-AuNP/Dopa, Ad-AuNP /MPP⁺, AuNF-Dopa, AuNFDopa/MPP⁺) pokazuju manji oksidativni stres u odnosu na kontrole.

Testom DHE mjerena je količina superoksidnih iona u stanicama 40 minuta nakon tretmana. Rezultati pokazuju pojavu oksidativnog stresa nakon svih tretmana pri čemu najznačajniji učinak na stvaranje superoksidnih iona ima L-Dopa. Kombinacija nanočestica i L-Dope uzrokuje manje oksidativnog stresa od same L-Dope što ukazuje na potencijalni protektivni učinak nanočestica. NP nisu uspjele smanjiti oksidativni stres uzrokovan MPP⁺-om.

Testom Monoklorobiman mjerena je količina reduciranog glutationa u stanicama 4 sata nakon tretmana. Pojava oksidativnog stresa zabilježena je kao smanjenje RFU (od engl. *Relative Fluorescence Unit*) u odnosu na negativnu kontrolu jer mCBL detektira reducirani oblik glutationa (GSH) koji se troši prilikom redukcije ROS-ova. Rezultati pokazuju kako i L-Dopa i MPP⁺ smanjuju koncentraciju unutarstaničnog GSH. Rezultati ukazuju da NP nemaju značajan zaštitni učinak protiv MPP⁺-a i L-Dope.

Testom Rh123 mjerena je promjena mitohondrijskog membranskog potencijala 4 sata nakon tretmana.

Svi tretmani, osim L-Dope, smanjuju mitohondrijski membranski potencijal što ukazuje na oštećenje mitohondrija. AuNF-Dopom, MPP⁺ i tbOH pokazuju značajnije smanjenje fluorescencije, pri čemu je ta promjena statistički značajna samo kod stanica tretiranih s tbOH. Utjecaj nanočestica na MMP je slabije izražen, što upućuje na manju toksičnost u odnosu na MPP⁺, ali ne i u odnosu na L-Dopu.

5 RASPRAVA

U svrhu povećanja biorasploživosti lijekova u središnjem živčanom sustavu i poboljšanja njihove učinkovitosti, provode se istraživanja različitih nanočestica/nanonosača. Određivanje njihove potencijalne toksičnosti važan je aspekt prekliničkih studija. U ovom istraživanju ispitan je utjecaj nanočestica zlata funkcionaliziranih adamantanom (Ad-AuNP) i L-Dopom (AuNF-Dopa) na vijabilnost i oksidativni stres na *in vitro* modelu.

SH-SY5Y stanična linija je široko primjenjivana kao model za istraživanje patogeneze Parkinsonove bolesti, ali i za evaluaciju djelovanja novih antiparkinsonika. Navedena stanična linija sastoji se od dva fenotipa: neuronalnog fenotipa (N tip) i stanica sličnih Schwannovim (S tip), koje imaju epitelni izgled (49). SH-SY5Y neuroblastomske stanice mogu se diferencirati u neuronalni fenotip korištenjem različitih agensa kao što su RA, TPA, BDNF (od engl. *Brain-Derived Neurotrophic Factor*, moždani neurotrofni čimbenik), staruosporin ili kondicionarni medij (50). Diferencirane stanice N tipa imaju izdužena tijela, dulje neurite i nižu stopu proliferacije u odnosu na nediferencirane stanice kraćih neurita koje rastu u nakupinama (49). U ovom su istraživanju za uspostavu *in vitro* model Parkinsonove bolesti SH-SY5Y stanice tretirane retinoičnom kiselinom i tetradekanoilforbol acetatom (RA/TPA). RA je glavna signalna molekula koja promovira rast i diferencijaciju neurona, održava neuronalni fenotip aktivacijom receptora retinoične kiseline i nižih signalnih puteva. RA potiče rast neurita i inducira ekspresiju dopaminskog transportera, vezikularnog monoaminskog transportera 2, dopaminskog receptora D2 i tiroksin hidroksilaze (51). Osim RA, za diferencijaciju je korišten i TPA koji djeluje preko aktivacije protein kinaze C (52). Kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze zabilježena je povećana ekspresija gena (DAT, TH i D2R) karakterističnih za dopaminergičke neurone čime je potvrđena diferencijacija SH-SY5Y stanica, tretiranih RA/TPA-om. Dodatno je, metodom imunocitokemije, vizualizirana ekspresija markera dopaminergičkih neurona (DAT-a, D2R-a i TH-e) i β -tubulina. Zabilježena je povećana ekspresija DAT-a, D2R-a i TH-e u odnosu na nediferencirane stanice čime je potvrđen fenotip sličan dopaminergičkim neuronima. Osim toga, pokazatelj neuronalnog fenotipa su i tanja tijela diferenciranih u odnosu na nediferencirane neurone te neuriti građeni od β -tubulina, čiji je značajno veći broj i duljina, vizualiziran u diferenciranim stanicama. Navedena saznanja potvrđuju

prijašnja istraživanja koja navode da RA/TPA potiče diferencijaciju SH-SY5Y stanica prema dopaminergičkom fenotipu (53).

AuNP odabrane su za ovo istraživanje zbog stabilnosti, otpornosti na oksidaciju, biokompatibilnosti i relativno jednostavnog procesa sinteze (32). AuNP korištene u ovom istraživanju bile su funkcionalizirane adamantanom (Ad-AuNP) i L-Dopom (AuNP-Dopa) koji pokazuju učinkovitost u liječenju PB-a. Ispitivanje unosa nanočestica u diferencirane SH-SY5Y stanice je učinjeno metodom imunocitokemije i protočnom citometrijom. Rezultati imunocitokemije pokazuju kako obje vrste nanočestica slabo ulaze u stanice, no uspoređujući ih međusobno, Ad-AuNP ulaze više od AuNF-Dopa.

U protočnoj citometriji se za određivanje unosa nanočestica u stanice koristi fenomen raspršenja na stranu (SSC) ulazne laserske zrake citometra gdje je rast intenziteta SSC-a proporcionalan zrnatosti stanica, odnosno ulasku nanočestica u stanice (41). Rezultati protočne citometrije u skladu su s rezultatima imunocitokemije. Zrnatost stanica tretiranih AuNF-Dopom u odnosu na kontrolni uzorak porasla je 1,24 puta, a Ad-AuNP 1,1 puta što ukazuje da obje vrste nanočestica slabo ulaze u stanice, a unos Ad-AuNP je veći od AuNF-Dopa. Za razlikovanje mrtvih, živih i apoptotičnih diferenciranih SH-SY5Y stanica nakon tretmana nanočesticama, MPP⁺-om i L-Dopom korištena je protočna citometrija. Podaci o vijabilnosti stanica i apoptozi se dobivaju mjerenjem intenziteta fluorescencije koju emitiraju fluorescentno obilježena protutijela ili ligandi koji se vežu na specifične molekule stanice (41). U ovom eksperimentu za detekciju apoptotičnih stanica korišten je aneksin V-FITC, a za razlikovanje mrtvih od živih stanica i propidijev jodid (43). Rezultati protočne citometrije pokazuju statistički značajno smanjenje udjela živih stanica u uzorku tretiranom MPP⁺-om u odnosu na negativnu kontrolu što ukazuje na njegovo poznato toksično djelovanje (13). Uzorci tretirani kombinacijama nanočestica, L-Dope i MPP⁺-a pokazuju veći udio živih stanica i manji udio stanica u apoptozi nego oni tretirani samo L-Dopom ili MPP⁺-om što ukazuje na potencijalno zaštitno djelovanje nanočestica protiv toksičnih tvari. Objе vrste nanočestica u manjoj mjeri induciraju apoptozu u odnosu na negativnu kontrolu, no bez statističke značajnosti te se iz toga ne može zaključiti o njihovom štetnom djelovanju.

U inicijaciji i progresiji propadanja dopaminergičkih neurona važnu ulogu igra oksidativni stres, velike razine ROS-a koje dovode do gubitka potencijala mitohondrijske membrane i oštećenja stanične membrane, DNA, proteina i lipida(10). Najznačajniji uzroci oksidativnog stresa su inhibicija kompleksa I u lancu prijenosa elektrona i autooksidacija katekolamina (12). Poznati inhibitor respiracijskog kompleksa I je MPTP, tj. njegov metabolit MPP⁺ koji preko dopaminskog transportera MPP⁺ ulazi u neurone i narušava metabolizam mitohondrija (13). Oksidativni stres diferenciranih SH-SY5Y stanica nakon tretmana L-Dopom, MPP⁺-om i nanočesticama određen je testovima mCBL, Rh123, DCFH-DA i DHE. Test Monoklorobiman mjeri koncentraciju reduciranog glutationa (GSH) u stanici na način da pokazuje svojstvo fluorescencije kada se veže u kompleks s GSH. Pri stanju oksidativnog stresa dolazi do smanjenja koncentracije GSH u reakcijama neutralizacije slobodnih radikala (44). Rezultati pokazuju kako i L-Dopa i MPP⁺ smanjuju koncentraciju unutarstaničnog GSH što znači da se u stanicama javlja oksidativni stres. Rezultati ukazuju da NP nemaju značajan zaštitni učinak protiv MPP⁺-a i L-Dope. I same NP uzrokuju smanjenje razina GSH što upućuje na mogućnost stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta. Test Rh123 pokazatelj je zdravlja stanica preko mitohondrijskog membranskog potencijala (55). Rh123 je pozitivno nabijena molekula koja se nakuplja u područjima negativnog membranskog potencijala kao što je unutrašnja mitohondrijska membrana. Toksini uzrokuju hiperpolarizaciju i nakupljanje Rh123 u matriksu što se vidi kao smanjenje intenziteta fluorescencije (46). Rezultati pokazuju da je u stanicama tretiranim AuNF-Dopom, MPP⁺-om i tbOH došlo do hiperpolarizacije mitohondrijske membrane, pri čemu statistički značajna samo promjena koju uzrokuje tbOH. Utjecaj nanočestica na MMP je slabije izražen, što upućuje na manju toksičnost u odnosu na MPP⁺, ali ne i u odnosu na L-Dopu. Test DCFH-DA mjeri ukupne slobodne radikale u stanicama koje su pod oksidativnim stresom. Rast oksidativnog stresa bilježi se kao rast fluorescencije jer reakcijom DCFH s reaktivnim kisikovim vrstama nastaje DCF koji pokazuje fluorescentna svojstva (56). Povećane razine ROS-a zabilježene su u stanicama tretiranim MPP⁺-om i stanicama tretiranim tbOH. Rezultati ne pokazuju pojavu oksidativnog stresa nakon tretiranja nanočesticama. L-Dopa i nanočestice (Ad-AuNP, Ad-AuNP/Dopa, Ad-AuNP /MPP⁺, AuNF-Dopa, AuNF-Dopa/MPP⁺) pokazuju manji oksidativni stres u odnosu na kontrole što ukazuje na protektivno djelovanje nanočestica. Test DHE koristi se za mjerenje količine superoksidnih iona (O₂⁻) u

stanici, markera oksidativnog stresa. Metabolizmom DHE u stanici nastaju intermedijarni produkti koji reagiraju s reaktivnim kisikovim vrstama pri čemu nastaje fluorescentni spoj etidij (48). Rezultati testa pokazuju pojavu oksidativnog stresa nakon svih tretmana, no najznačajniji učinak ima L-Dopa. Tretman nanočesticma i L-Dopom u usporedbi s L-Dopom izaziva manji oksidativni stres u odnosu na kontrole što upućuje na potencijalno protektivno djelovanje nanočestica.

Ukupno gledajući, MPP⁺ i L-Dopa uzrokuju pojavu oksidativnog stresa u diferenciranim SH-SY5Y stanicama. NP nisu uspjele smanjiti oksidativni stres uzrokovan MPP⁺-om, no pokazuju potencijalno protektivno djelovanje na oksidativni stres izazvan L-Dopom, a same NP djeluju manje toksično nego MPP⁺ i L-Dopa.

6 ZAKLJUČCI

1. RA/TPA potiče diferencijaciju SH-SY5Y stanica prema fenotipu sličnom dopaminergičkim neuronima.
2. Obje vrste nanočestica slabo ulaze u diferencirane SH-SY5Y stanice, no unos Ad-AuNP je veći od AuNF-Dopa.
3. AuNP ne utječu na vijabilnost i apoptozu diferenciranih SH-SY5Y stanica što ukazuje na nisku toksičnost.
4. MPP⁺ i L-Dopa uzrokuju oksidativni stres i smanjuju vijabilnost stanica.
5. AuNP pokazuju protektivno djelovanje na oksidativni stres izazvan L-Dopom, no ne smanjuju oksidativni stres uzrokovan MPP⁺-om.
6. AuNP izazivaju oksidativni stres.

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti da AuNP djeluju protektivno na oksidativni stres izazvan L-Dopom, no i same izazivaju oksidativni stres te njihova primjena potencijalno može imati negativan utjecaj na biološke sustave. S druge strane, AuNP ne povećavaju smrtnost ili apoptozu stanica u odnosu na negativnu kontrolu. U svakom slučaju, potrebna su dodatna istraživanja kojima će se utvrditi mogućnosti primjene AuNP kao nosača lijekova.

7 ZAHVALE

Iskreno zahvaljujem prof. dr. sc. Krešimiru Rotimu na ukazanom povjerenju za izradu ovog rada, velikoj podršci i savjetovanju.

Posebno hvala dr. sc. Ivani Vinković-Vrček na prilici da kao studentica sudjelujem na ovom projektu, suradljivosti i stručnim savjetima.

Zahvaljujem se Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada na pruženim sredstvima za izradu ovog rada.

Zahvaljujem se i Ivanu Mamiću, mag. pharm. na pomoći oko provedbe pokusa, prenesenom znanju, strpljenju i ugodnoj suradnji.

Najviše hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom cijelog školovanja.

8 LITERATURA

1. Feigin VL, Vos T, Nichols E, Owolabi MO, Carroll WM, Dichgans M, et al. The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. *Lancet Neurol.* 2020;19(3):255–65.
2. Feigin VL, Nichols E, Alam T, Bannick MS, Beghi E, Blake N, et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 2019;18(5):459–80.
3. Cieza A, Causey K, Kamenov K, Hanson SW, Chatterji S, Vos T. Global estimates of the need for rehabilitation based on the Global Burden of Disease study 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet.* 2020;396(10267):2006–17.
4. Lee A, Gilbert RM. Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurol Clin.* 2016;34(4):955–65.
5. Dorsey ER, Bloem BR. The Parkinson Pandemic-A Call to Action. *JAMA Neurol.* 2018;75(1):9–10.
6. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *Lancet Lond Engl.* 2015;386(9996):896–912.
7. Nalls MA, Blauwendraat C, Vallerga CL, Heilbron K, Bandres-Ciga S, Chang D, et al. Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet Neurol.* 2019;18(12):1091–102.
8. Noyce AJ, Bestwick JP, Silveira-Moriyama L, Hawkes CH, Giovannoni G, Lees AJ, et al. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann Neurol.* 2012;72(6):893–901.
9. Chatzitaki AT, Jesus S, Karavasili C, Andreadis D, Fatouros DG, Borges O. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for the nasal delivery of ropinirole hydrochloride: In vitro and ex vivo evaluation of efficacy and safety. *Int J Pharm.* 2020;589:119776.

10. Guo JD, Zhao X, Li Y, Li GR, Liu XL. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). *Int J Mol Med*. 2018;41(4):1817–25.
11. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018;13:757–72.
12. Chinta SJ, Andersen JK. Redox imbalance in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1780(11):1362–7.
13. Pathania A, Garg P, Sandhir R. Impaired mitochondrial functions and energy metabolism in MPTP-induced Parkinson's disease: comparison of mice strains and dose regimens. *Metab Brain Dis*. 2021;36(8):2343–57.
14. Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, et al. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. 2000;25(1):239–52.
15. Gaugler MN, Genc O, Bobela W, Mohanna S, Ardah MT, El-Agnaf OM, et al. Nigrostriatal overabundance of α -synuclein leads to decreased vesicle density and deficits in dopamine release that correlate with reduced motor activity. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2012;123(5):653–69.
16. Goetz CG. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1):a008862.
17. Sung VW, Nicholas AP. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: expanding the view of Parkinson's disease beyond a pure motor, pure dopaminergic problem. *Neurol Clin*. 2013;31(3 Suppl):S1-16.
18. Bidesi NSR, Vang Andersen I, Windhorst AD, Shalgunov V, Herth MM. The role of neuroimaging in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2021;159(4):660–89.
19. Brodell DW, Stanford NT, Jacobson CE, Schmidt P, Okun MS. Carbidopa/levodopa dose elevation and safety concerns in Parkinson's patients: a cross-sectional and cohort design. *BMJ Open*. 2012;2(6):e001971.

20. Fahn S. Parkinson's disease: 10 years of progress, 1997-2007. *Mov Disord Off J Mov Disord Soc.* 2010;25 Suppl 1:S2-14.
21. Jankovic J, Stacy M. Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs.* 2007;21(8):677–92.
22. Fox SH, Katzenschlager R, Lim SY, Ravina B, Seppi K, Coelho M, et al. The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2011;26(S3):S2–41.
23. Miller JW, Selhub J, Joseph JA. Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of O-methylation and melatonin. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(2):241–9.
24. Berry AL, Foltynie T. Gene therapy: a viable therapeutic strategy for Parkinson's disease? *J Neurol.* 2011;258(2):179–88.
25. Loewenbrück K, Storch A. Stem cell-based therapies in Parkinson's disease: future hope or current treatment option? *J Neurol.* 2011;258(Suppl 2):S346-353.
26. Chowdhury A, Kunjiappan S, Panneerselvam T, Somasundaram B, Bhattacharjee C. Nanotechnology and nanocarrier-based approaches on treatment of degenerative diseases. *Int Nano Lett.* 2017;7(2):91–122.
27. Adhikary R, Sandbhor Gaikwad P, Banerjee R. Nanotechnology platforms in Parkinson's Disease. *ADMET DMPK.* 2015;3:155–81.
28. Ai J, Biazar E, Jafarpour M, Montazeri M, Majdi A, Aminifard S, et al. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:1117–27.
29. Suri SS, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. *J Occup Med Toxicol Lond Engl.* 2007;2:16.
30. Wilczewska AZ, Niemirowicz K, Markiewicz KH, Car H. Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacol Rep PR.* 2012;64(5):1020–37.

31. Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(33):11613–8.
32. Aghaie T, Jazayeri MH, Manian M, Khani L, Erfani M, Rezayi M, et al. Gold nanoparticle and polyethylene glycol in neural regeneration in the treatment of neurodegenerative diseases. *J Cell Biochem*. 2019;120(3):2749–55.
33. Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev*. 2009;38(6):1759–82.
34. Polak P, Shefi O. Nanometric agents in the service of neuroscience: Manipulation of neuronal growth and activity using nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2015;11(6):1467–79.
35. Baranes K, Shevach M, Shefi O, Dvir T. Gold Nanoparticle-Decorated Scaffolds Promote Neuronal Differentiation and Maturation. *Nano Lett*. 2016;16(5):2916–20.
36. Liu CC, Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(2):106–18.
37. Kalčec N, Peranić N, Barbir R, Hall CR, Smith TA, Sani MA, et al. Spectroscopic study of L-DOPA and dopamine binding on novel gold nanoparticles towards more efficient drug-delivery system for Parkinson's disease. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2022;268:120707.
38. Kalčec N, Ljulj A, Božičević L, Vrcek V, Marson D, Pricl S, et al. Transformation of L-DOPA and dopamine on the surface of gold nanoparticles: An NMR and computational study. *Inorg Chem*. 2022;
39. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener*. 2017;12(1):10.
40. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2019;1897:299–311.

41. Suzuki H, Toyooka T, Ibuki Y. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. *Environ Sci Technol.* 2007;41(8):3018–24.
42. Zucker RM, Daniel KM, Massaro EJ, Karafas SJ, Degn LL, Boyes WK. Detection of silver nanoparticles in cells by flow cytometry using light scatter and far-red fluorescence: Detection of Silver Nanoparticles in Cells. *Cytometry A.* 2013;83(10):962-72.
43. Želender, Vllim. Detekcija apoptoze. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2006;(57):229–36.
44. Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BH. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Anal Biochem.* 2000;286(1):35–7.
45. Vinković Vrček I, Pavičić I, Crnković T, Jurašin D, Babič M, Horák D, et al. Does surface coating of metallic nanoparticles modulate their interference with in vitro assays? *RSC Adv.* 2015;5(87):70787–807.
46. Forster S, Thumser AE, Hood SR, Plant N. Characterization of rhodamine-123 as a tracer dye for use in in vitro drug transport assays. *PloS One.* 2012;7(3):e33253.
47. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques.* 2011;50(2):98–115.
48. Chen J, Rogers SC, Kavdia M. Analysis of kinetics of dihydroethidium fluorescence with superoxide using xanthine oxidase and hypoxanthine assay. *Ann Biomed Eng.* 2013;41(2):327–37.
49. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *JoVE J Vis Exp.* 2016;(108):e53193.
50. Magalingam KB, Radhakrishnan AK, Somanath SD, Md S, Haleagrahara N. Influence of serum concentration in retinoic acid and phorbol ester induced differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Mol Biol Rep.* 2020;47(11):8775–88.

51. Korecka JA, van Kesteren RE, Blaas E, Spitzer SO, Kamstra JH, Smit AB, et al. Phenotypic Characterization of Retinoic Acid Differentiated SH-SY5Y Cells by Transcriptional Profiling. Lim KL, editor. PLoS ONE. 2013;8(5):e63862.
52. Leli U, Cataldo A, Shea TB, Nixon RA, Hauser G. Distinct Mechanisms of Differentiation of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Protein Kinase C Activators and Inhibitors. J Neurochem. 1992;58(4):1191–8.
53. Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S, Joyce JN. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. Neurotox Res. 2003;5(8):579–98.
54. Snezhkina AV, Kudryavtseva AV, Kardymon OL, Savvateeva MV, Melnikova NV, Krasnov GS, et al. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:6175804.
55. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. BioTechniques. 2011;50(2):98–115.
56. Griffiths SM, Singh N, Jenkins GJS, Williams PM, Orbaek AW, Barron AR, et al. Dextran coated ultrafine superparamagnetic iron oxide nanoparticles: compatibility with common fluorometric and colorimetric dyes. Anal Chem. 2011;83(10):3778–85.

12 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 31.8.1997. godine u Čakovcu. Završila sam opći smjer Gimnazije Josipa Slavenskog Čakovec nakon čega sam upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Aktivno sam se bavila mažoret plesom devet godina kao članica Čakovečkih mažoretkinja. Bila sam aktivna članica Studentske sekcije za neuroznanost, Studentske sekcije za kirurgiju i Studentske sekcije za transfuzijsku medicinu. Dobitnica sam Dekanove nagrade za najbolji studentski znanstveni rad u akademskoj godini 2021./2022. Članica sam Rotaract kluba Međimurje, a u rotarijanskoj godini 2023./2024. obavljam dužnost predsjednice. U slobodno vrijeme bavim se fotografijom i lovom te sam članica Lovačkog društva „Zec“ Vratišinec i Lovačke udruge „Lisica“ Đelekovec.