

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Nika Gržeta Krpan

UČINCI JEDNOZIDNIH UGLJIKOVIH NANOCJEVČICA NA
ASTROCITE IZLOŽENE TRAUMATSKOJ OZLJEDI *IN VITRO*

Doktorski rad

Rijeka, 2026.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET

Nika Gržeta Krpan

UČINCI JEDNOZIDNIH UGLJIKOVIH NANOCJEVČICA NA
ASTROCITE IZLOŽENE TRAUMATSKOJ OZLJEDI *IN VITRO*

Doktorski rad

Mentor: prof. dr. sc. Kristina Pilipović, dr. med.

Rijeka, 2026.

UNIVERSITY OF RIJEKA

FACULTY OF MEDICINE

Nika Gržeta Krpan

EFFECTS OF SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES ON
ASTROCYTES EXPOSED TO *IN VITRO* TRAUMATIC INJURY

Doctoral thesis

Supervisor: Prof. Kristina Pilipović, MD, PhD

Rijeka, 2026.

Mentor rada: prof. dr. sc. Kristina Pilipović, dr. med.

Doktorska disertacija obranjena je dana _____ na Medicinskom fakultetu
Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. _____

2. _____

3. _____

Rad ima 124 lista.

UDK: _____

PREDGOVOR

Istraživanje koje je temelj ovog rada provedeno je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, na Zavodu za temeljnu i kliničku farmakologiju s toksikologijom. Napravljeno je u sklopu projekata voditeljice prof.dr.sc. Kristine Pilipović „Jednozidne ugljikove nanocjevčice u eksperimentalnoj traumatskoj ozljedi mozga“ koje je financirano sredstvima Hrvatske zaklade za znanost te „Istraživanje utjecaja in vitro traumatske ozljede i upotrebe kemijski modificiranih jednozidnih ugljikovih nanocjevčica na razine egzosomalne mikroRNA astrocitnog porijekla“ financiranog sredstvima Sveučilišta u Rijeci.

ZAHVALA

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj ovog doktorskog rada bio je uspostaviti model za ispitivanje učinaka jednozidnih ugljikovih nanocjevčica (engl. *single-walled carbon nanotubes*, SWCNT) funkcionaliziranih polietilenglikolom (PEG) u primarnoj kulturi mišjih astrocita. Učinci SWCNT-PEG ispitivani su u *in vitro* modelu traumatske ozljede mozga (engl. *traumatic brain injury*, TBI), odnosno modelu teške ozljede stanica izazvane rastezanjem. **Materijali i metode:** Na primarnoj kulturi astrocita provedena je ozljeda rastezanjem različitih stupnjeva, nakon čega su analizirani vijabilnost stanica i ekspresija odabranih proteina. Astrociti su tretirani SWCNT-PEG-om (5 µg/mL) ili otapalom (PEG, 1 µg/mL), a provedene su analize vijabilnosti stanica, stupnja oksidativnog oštećenja proteina, ekspresije proteina od interesa te karakterizacija sekretorne funkcije astrocita određivanjem promjena u sadržaju izlučenih citokina. Također je provedena analiza sadržaja odabranih miRNK izoliranih iz egzosoma astrocitnog podrijetla. **Rezultati:** Nakon teške ozljede rastezanjem *in vitro* zabilježeno je značajno smanjenje vijabilnosti astrocita, pri čemu tretman SWCNT-PEG-om nije doveo do dodatnog povećanja stanične smrti. Ozljeda je značajno smanjila ekspresiju glutamatnog transportera EAAT1 nakon 24 sata, dok je primjena SWCNT-PEG potaknula oporavak ekspresije ovog membranskog transportera, što upućuje na potencijalnu korist u prevenciji ekscitotoksičnosti nakon TBI. Također, primjena nanocjevčica značajno je povećala ekspresiju proteina HO-1, što može upućivati na povoljan učinak ispitivanih nanocjevčica na antioksidativne procese. SWCNT-PEG nisu imale značajan utjecaj na ekspresiju ostalih ispitivanih proteina (GFAP, HSP70, Nrf2 i GPX) u astrocitima podvrgnutima ozljedi. Nadalje, SWCNT-PEG su promijenile sekreciju citokina u astrocitima, što je povezano s poticanjem oporavka nakon ozljede te ukazuje na mogući mehanizam njihovih zaštitnih učinaka kod ozljede središnjeg živčanog sustava putem utjecaja na mikrookruženje moždanog tkiva. Ekspresija ispitivanih miRNK u izlučenim egzosomima nije bila promijenjena u našem modelu, ni nakon ozljede ni nakon tretmana SWCNT-PEG-om. **Zaključak:** Rezultati koji ukazuju na oporavak ekspresije EAAT1 nakon ozljede sugeriraju potencijal SWCNT-PEG kao terapijskog pristupa u liječenju TBI, budući da je ekscitotoksičnost jedno od glavnih obilježja sekundarne ozljede koje pokreće kaskadu događaja, uključujući narušavanje krvno-moždane barijere, neuroupalu i neurodegeneraciju. Također je uočen blagi antioksidativni učinak. SWCNT-PEG u primijenjenoj dozi nisu pokazale značajne učinke na povećanje biljega upale niti stanične smrti u astrocitima, što ih čini pogodnim kandidatom za daljnja istraživanja njihovog potencijalnog terapijskog učinka.

Ključne riječi: astrociti, primarna stanična kultura, miš; egzosomi; in vitro ozljeda, traumatska ozljeda mozga; jednozidne ugljikove nanocjevčice, nanomaterijali; miRNK

SUMMARY

Objectives: The goal of this doctoral thesis was to establish a model for testing the effects of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) functionalized with polyethylene glycol (PEG) in primary culture of mouse astrocytes. The effects of SWCNT-PEG were tested in an *in vitro* model of traumatic brain injury (TBI), a severe stretch-induced cell injury. **Material and methods:** Primary astrocyte culture was subjected to various degrees of stretch injury, after which cell viability and the expression of selected proteins were analyzed. Astrocytes were treated with SWCNT-PEG (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or solvent (PEG, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and analyzes of cell viability, degree of oxidative protein damage, expression of proteins of interest, and characterization of the secretory function of astrocytes by determining changes in the content of secreted cytokines were performed. Analysis of the content of selected miRNAs isolated from exosomes of astrocyte origin was also performed. **Results:** After severe *in vitro* stretch injury, a significant decrease in astrocyte viability was observed, while treatment with SWCNT-PEG did not lead to an additional increase in cell death. Injury significantly reduced the expression of the glutamate transporter EAAT1 after 24 h, while the application of SWCNT-PEG promoted the recovery of the expression of this membrane transporter, suggesting a potential benefit in the prevention of excitotoxicity after TBI. Also, the application of nanotubes significantly increased the expression of the HO-1 protein, which may indicate a beneficial effect of the tested nanotubes on antioxidant processes. SWCNT-PEG had no significant effect on the expression of other tested proteins (GFAP, HSP70, Nrf2 and GPX) in astrocytes subjected to injury. Furthermore, SWCNT-PEG altered cytokine secretion in astrocytes, which is associated with the promotion of recovery after injury and indicates a possible mechanism of their protective effects in central nervous system injury via an influence on the brain tissue microenvironment. The expression of the examined miRNAs in secreted exosomes was not altered in our model, neither after injury nor after treatment with SWCNT-PEG. **Conclusion:** The results indicating the recovery of EAAT1 expression after injury suggest the potential of SWCNT-PEG as a therapeutic approach in the treatment of TBI, since excitotoxicity is one of the main features of secondary injury that initiates a cascade of events, including blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and neurodegeneration. A mild antioxidant effect was also observed. SWCNT-PEG at the administered dose did not show significant effects on the increase of inflammatory markers or cell death in astrocytes, making them a suitable candidate for further investigation of their potential therapeutic effect.

Keywords: astrocytes, primary cell culture, mouse; exosomes; in vitro injury, traumatic brain injury; single-walled carbon nanotubes, nanomaterials; miRNA

SADRŽAJ

1.1. Primarna i sekundarna ozljeda.....	2
1.1.1. Mehanizmi nastanka sekundarne ozljede	2
1.2. Astrociti i njihova uloga u traumatskoj ozljedi mozga.....	7
1.2.1. Uloga astrocita u očuvanju krvno-moždane barijere i cerebralnog protoka krvi nakon traume	7
1.2.2. Reaktivna astroglioza i astrocitni ožiljak	8
1.2.3. Regulacija sinapse i gliotransmisija.....	9
1.2.4. Modulacija funkcije neurona i drugih glija stanica putem lučenja egzosoma	11
1.3. Uloga mikroRNK u patofiziologiji traumatske ozljede mozga	13
1.3.1. Sinteza i lučenje mikroRNK	13
1.3.2. Uloga miRNK u središnjem živčanom sustavu.....	13
1.4. Strategije liječenja traumatske ozljede mozga	15
1.4.1. Pregled standardnih terapijskih pristupa traumatske ozljede mozga	15
1.4.2. Farmakološka neuroprotekcija u terapiji traume mozga.....	16
1.4.3. Terapije u razvoju	17
1.4.4. Nanomedicina u neurotraumi.....	19
1.4.5. Ugljikove nanocjevčice	21
1.5. Modeli traumatske ozljede mozga <i>in vitro</i>	28
1.5.1. Model ozljede rastezanjem (engl. <i>stretch-induced traumatic brain injury</i>)	29
1.5.2. Model ozljede kompresijom.....	29
1.5.3. Model transekcije	30
1.5.4. Model ozljede smicanjem.....	30
1.5.5. Model traumatske ozljede eksplozijom	30
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	31
3. MATERIJALI I METODE.....	32

3.1. Eksperimentalne živali	32
3.2. Materijali	32
3.2.1. Kemikalije	32
3.2.2. Reagensi i materijali za rad sa staničnim kulturama	33
3.2.3. Ostali reagensi	33
3.2.4. Primarna i sekundarna protutijela	34
3.3. Metode	35
3.3.1. Priprema primarne kulture astrocita	35
3.3.2. <i>In vitro</i> model traumatske ozljede astrocita mehaničkim rastezanjem	36
3.3.3. Jednozidne ugljikove nanocjevčice funkcionalizirane s polietilen glikolom	37
3.3.4. Inkubacija primarnih astrocita s SWCNT-PEG ili samo funkcionalizacijskim agensom PEG-om	38
3.3.5. Određivanje stupnja ozljede astrocita	39
3.3.6. Postupak izolacije egzosoma iz medija za uzgoj stanica	40
3.3.7. Western blotting	40
3.3.8. Dot blotting	41
3.3.9. Analiza citokina	42
3.3.10. Izolacija miRNK iz egzosoma	42
3.3.11. Analiza izražaja miRNK	42
3.3.12. Imunocitokemija	43
3.3.13. Prikupljanje, obrada podataka i statistička analiza	44
4. REZULTATI	45
4.1. Karakterizacija modela traumatske ozljede rastezanjem <i>in vitro</i> na primarnu kulturu mišjih astrocita	45
4.1.1. Utjecaj različitih stupnjeva ozljede rastezanjem na preživljenje astrocita	45

4.1.2. Utjecaj ozljede na izražaj EAAT1, GFAP i iNOS proteina	46
4.2. Učinci funkcionaliziranih nanocjevčica (SWCNT-PEG) na primarnu kulturu mišjih astrocита	49
4.2.1. SWCNT-PEG nemaju utjecaj na izražaj proteina GFAP i EAAT1	49
4.2.2. Utjecaj SWCNT-PEG na oslobađanje citokina	50
4.3. Učinci funkcionaliziranih SWCNT na primarnu kulturu mišjih astrocита podvrgnutu teškoj ozljedi rastezanjem <i>in vitro</i>	53
4.3.1. SWCNT-PEG ne uzrokuju dodatnu staničnu smrt kod ozlijeđenih astrocита	53
4.3.2. SWCNT-PEG nemaju učinka na razinu oksidativnih oštećenja proteina	54
4.3.3. Utjecaj SWCNT-PEG na izražaj EAAT1 i GFAP	55
4.3.4. Utjecaj SWCNT-PEG na oslobađanje citokina u astrocیتima podvrgnutim teškoj ozljedi rastezanjem	57
4.3.6. Utjecaj SWCNT-PEG na izražaj proteina uključenih u antioksidativne procese	62
4.3.7. Utjecaj SWCNT-PEG na stres stanica nakon teške ozljede rastezanjem	64
4.4. Promjene u molekularnim karakteristikama egzozoma nakon traume	65
4.4.1. Karakterizacija egzozoma.....	66
4.4.2. Utjecaj SWCNT-PEG na izražaj miRNK u egzozomima	67
4.4.3. Utjecaj SWCNT-PEG na izražaj miRNK u egzozomima astrocита podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem	68
RASPRAVA.....	70
5.1. Uspostava modela ozljede i karakterizacija stanica.....	70
5.2. Utjecaj PEG i SWCNT-PEG na izražaj proteina i oslobađanje citokina u primarnoj kulturi astrocита	73
5.3. Utjecaj SWCNT-PEG na primarnu kulturu astrocита nakon teške ozljede rastezanjem <i>in vitro</i>	75

5.4. Utjecaj SWCNT-PEG na izražaj proteina EAAT1 i GFAP u astrocitima podvrgnutim teškoj ozljedi rastezanjem <i>in vitro</i>	77
5.5. Utjecaj SWCNT-PEG na izražaj citokina u astrocitima podvrgnutim teškoj ozljedi rastezanjem <i>in vitro</i>	79
5.6. Utjecaj SWCNT-PEG na antioksidativni sustav u astrocitima podvrgnutim teškoj ozljedi rastezanjem <i>in vitro</i>	82
5.7. Utjecaj SWCNT-PEG na stanični stres u astrocitima podvrgnutim teškoj ozljedi rastezanjem <i>in vitro</i>	84
4.8. Utjecaj SWCNT-PEG na miRNK profil u egzosomima porijeklom iz astrocита	85
5. ZAKLJUČAK	88
6. LITERATURA	89

UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Traumatska ozljeda mozga (engl. *traumatic brain injury*, TBI) jedan je od vodećih uzroka morbiditeta i mortaliteta osoba mlađih od 45 godina u svijetu, te stoga predstavlja velik problem u javnom zdravstvu. Zahvaća ljude svih dobnih skupina, s time da u zemljama s visokim dohotkom prevladava kod djece i osoba starije životne dobi, dok u zemljama s niskim dohotkom prevladava u skupini adolescenata. Najčešći uzroci TBI su padovi i prometne nesreće, što prate sudari s objektom, fizički napadi, sportske ozljede te vojni sukobi [1].

Glasgowska ljestvica kome (engl. *Glasgow Coma Scale*, GCS) najčešće je korištena ljestvica u procjeni ozbiljnosti ozljede. Ono što mjeri su motorički odgovor tijela na bol, verbalni odgovor, te otvaranje očiju sa ili bez stimulusa nakon pretrpljene traume [2]. Prema ovoj ljestvici, pacijenti s ocjenom 3-8 imaju tešku ozljedu, oni s ocjenom 9-12 umjerenu, dok ocjena 13-15 označava blagu ozljedu mozga. Oko 75% svih pacijenata s TBI zadobije blagu ozljedu mozga koja, unatoč tome što često ne zahtijeva hospitalizaciju, u određenom broju slučajeva ostavlja dugotrajne učinke na funkciju mozga. Od pacijenata koji budu hospitalizirani, gotovo polovica ostaje s trajnim ozljedama te razvijaju kroničnu ozljedu mozga, koja zahtjeva dugoročnu terapiju za poboljšanje ne samo fizičkog stanja, već i održavanje samostalnosti pacijenata i njihovih socijalnih aktivnosti [3].

Incidenciju TBI u svijetu teško je odrediti, pošto veliki broj država ima loše praćenje medicinskih podataka, ne dijele podatke ili imaju generalno loš zdravstveni sustav gdje velik broj TBI prolazi neprijavljeno. Zna se da je broj TBI relativno povezan s brojem nesreća u prometu, pošto je to najčešći uzrok ovakve vrste ozljede, pa se i u zemljama iz kojih nisu dostupni podatci može napraviti procjena kada se uzme u obzir broj prijavljenih prometnih nesreća [4]. Stoga su i rezultati studija koje prate incidenciju znatno varijabilni. U jednoj studiji, koja je uzimala samo dostupne medicinske podatke, procijenjena TBI je bila 349 slučajeva po 100 000 osoba godišnje [5], dok se u drugoj studiji, koja je uz dostupne podatke radila i procjenu po broju nesreća, incidencija se pokazala puno većom, čak 939 slučajeva na 100 000 ljudi. Ovaj podatak upućuje na to da svake godine otprilike 69 milijuna ljudi pretrpi neki oblik TBI, od kojih se procjenjuje da 5,5 milijuna slučajeva obuhvaća tešku TBI [4]. Upravo zbog toga što TBI, a pogotovo blagi oblik, često biva neprijavljena od strane pacijenata ili neprepoznata od strane liječnika tijekom pregleda, teško je u potpunosti biti siguran koliki je realan broj ljudi koji su pretrpjeli ovakvu ozljedu. Iz tog razloga, TBI se često naziva i tihom epidemijom [5,6].

1.1. Primarna i sekundarna ozljeda

Uobičajeno je da se TBI razmatra kroz dvije ključne faze – primarnu i sekundarnu. Primarna TBI rezultat je samog udarca i odnosi se na mehaničko oštećenje koje nastaje u trenutku traume. Može biti fokalna, čija klinička slika uključuje hematome, krvarenje i lom lubanje, ili difuzna, koja nema očiti patomorfološki nalaz na početnoj slikovnoj dijagnostici. Naime, kod difuzne ozljede mehaničko oštećenje obuhvaća difuznu ozljedu aksona, petehijalno krvarenje, dendritičku ozljedu i poremećaj sinapsi [7]. Difuzna ozljeda aksona ima izrazitu važnost zbog prekida povezanosti određenih regija mozga, što prouzrokuje brojne poremećaje u ponašanju i kogniciji, a pokazala se i kao najranija odrednica težine ozljede mozga [8]. Primarna ozljeda je ireverzibilna, te se ne može tretirati, osim preventivnim mjerama.

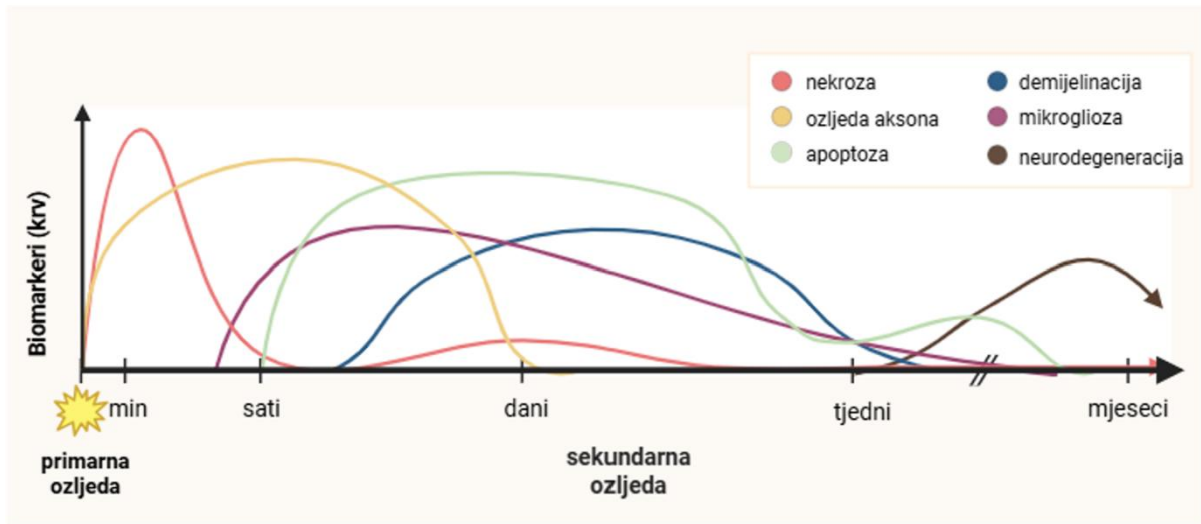
Sekundarna ozljeda nastaje kao posljedica primarne, a njeni znakovi i simptomi počinju se pojavljivati već nekoliko minuta nakon traume i mogu se razvijati i do nekoliko mjeseci, pa i godinama nakon primarne ozljede. Ona podrazumijeva progresivnu atrofiju mozga koja se očituje kroz simptome koji uključuju poremećaje spavanja, pamćenja i kognicije, a mogu se razviti i psihijatrijski poremećaji. Kada ti poremećaji traju duže od mjesec dana, to stanje naziva se postkomocijski sindrom kojeg karakteriziraju glavobolja, umor, promjene u raspoloženju (koje uključuju iritabilnost, anksioznost i depresiju), poremećaji učenja, pamćenja i koncentracije, kao i nesаница. Kod većine pacijenata ovi poremećaji ne traju duže od godine dana, ali kod nekih perzistiraju kroz duže vrijeme [9,10].

S druge strane, posljedice sekundarne ozljede mogu se osjetiti i u kasnijim fazama života, u obliku pojave neurodegenerativnih bolesti. Brojne studije pokazale su povezanost TBI s razvojem Alzheimerove (engl. *Alzheimer's disease*, AD) i Parkinsonove bolesti (engl. *Parkinson's disease*, PD), kao i kronične traumatske encefalopatije te amiotrofične lateralne skleroze (ALS) [9]. Još jedna od teških dugotrajnih posljedica TBI je epilepsija, koja nastaje kao posljedica reorganizacije neuralnih krugova koji uzrokuju epileptogeničnost [11]. Rizik od nastanka epilepsije varira ovisno o mjestu udarca, kao i težini ozljede. Ne izazivaju sve ozljede posttraumatsku epilepsiju, no studije su pokazale da ukoliko do nje dođe, pacijent ima i lošije funkcionalne ishode [12].

1.1.1. Mehanizmi nastanka sekundarne ozljede

Postoji više različitih mehanizama uključenih u razvoj sekundarne ozljede (Slika 1). Nekroza, gliozna i ozljeda aksona započinju već unutar nekoliko minuta od ozljede. Ti procesi potiču imunološki odgovor, čija je funkcija čišćenje staničnog otpada koji nastaje kao

posljedica smrti neurona. Unutar nekoliko sati dolazi do povećane aktivacije mikroglije i neuropale, koja dugoročno ostaje prisutna i nekoliko mjeseci nakon TBI [13]. Dugotrajna neuropala vodi do proteinopatije, te ubrzava pojavu neurodegenerativnih bolesti povezanih sa starenjem ili u ljudi s genetskom predispozicijom, kao što su AD, PD ili ALS [14]. Apoptoza i demijelinizacija povećavaju se unutar nekoliko dana i mogu trajati tjednima. U konačnici dolazi do razvoja neurodegeneracije [13].



Slika 1. Slijed razvoja sekundarne ozljede nakon primarne TBI. Slika prilagođena iz Nokkari i sur., 2018 [15] objavljena pod licencom *Creative Commons* (CC).

1.1.1.1. Ekscitotoksičnost

Jedan od glavnih mehanizama vezanih uz posttraumatsku smrt stanica, odnosno nekrozu i apoptozu, jest neuronska ekscitotoksičnost. Za normalnu neurološku funkciju središnjeg živčanog sustava (SŽS) ključan je balans glutamata i gama-aminomaslačne kiseline (engl. *gamma aminobutyric acid*, GABA), glavnih ekscitacijskih, odnosno inhibicijskih neurotransmitera, do čijih poremećaja dolazi u traumi [16]. Nakon TBI dolazi do bubrenja membrana i njene rupture, te oslobađanja neurotransmitera i iona u izvanstanični prostor (engl. *extracellular matrix*, ECM), što rezultira povećanom aktivacijom presinaptičkih završetaka, koji se počinju pojačano depolarizirati i opsežno otpuštati ekscitacijske aminokiseline (engl. *excitatory amino acid*, EAA), poput glutamata, u sinapsu. Glutamat se nakuplja u ECM-u te aktivira receptore za N-metil-d-aspartat (NMDA) i alfa-amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4-propionsku kiselinu (AMPA) na površini neurona, čime se omogućava povećan utok Ca^{2+} i Na^{+} u stanice. Stanice se tako prezasićuju kalcijem, a kao rezultat se aktiviraju putovi stanične smrti. Oslobađaju se brojne fosfolipaze, proteaze i endonukleaze koje dovode do uništenja membrana, citoskeleta i fragmentacije DNA [17]. Glijna stanice, čija je funkcija regulacija izvanstaničnih razina EAA u traumi, smanjuju svoju aktivnost, dolazi do regulacije na niže EAA transportera te se smanjuje unos EAA iz ECM [16]. EAA se otpuštaju i iz nekrotičnih stanica, tako da opseg nekroze također utječe na razine glutamata i dovodi do pogoršanja ekscitotoksičnosti [18,19].

1.1.1.2. Oksidativni stres

Moždano tkivo je puno osjetljivije na oksidativna oštećenja od drugih tkiva. Do toga dolazi zbog visoke potrošnje kisika; naime, čak 20% ukupnog kisika u tijelu troši se na stvaranje adenzin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*, ATP) u mozgu, ključnog za neuronsku aktivnost, poput provođenja akcijskih potencijala i otpuštanja neurotransmitera. Za proizvodnju ATP-a ključni su mitohondriji i proces oksidativne fosforilacije. Već i mali poremećaji u funkciji mitohondrija mogu dovesti do velikih posljedica na preživljavanje neurona [20]. Ekscitotoksičnost koja nastaje u TBI uzrokuje porast unutarstaničnih razina kalcija te se povećava njegovo sekvestriranje u mitohondriju uz proizvodnju visokih razina reaktivnih kisikovih (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i dušikovih spojeva (engl. *reactive nitrogen species*, RNS), dok se u isto vrijeme smanjuje proizvodnja ATP-a. Kalcij potiče aktivaciju neuronske sintaze dušičnog oksida (engl. *neuronal nitric oxide synthase*, nNOS) uz povećano stvaranje NO i RNS. Inducibilni NOS (iNOS) iz mikroglije i makrofaga također ima veliku ulogu u stvaranju toksičnih razina NO. ROS i RNS uzrokuju oksidativno oštećenje

staničnih struktura, proteina, masti i nukleinskih kiselina. Tkivo mozga ima manju razinu antioksidativne zaštite, jer proizvodi niže razine važnih antioksidativnih enzima – katalaze, superoksid dismutaze (SOD) i glutation perooksidaze (GPX) – nego druga tkiva. Neuroni su pogotovo podložni oštećenju zbog svog sastava bogatog polinezasićenim lipidima koji se lako oksidiraju pod djelovanjem fosfolipaze A2, enzima koji se također pojačano aktivira s povišenjem razina kalcija u stanici. ROS i RNS mogu dovesti do smrti neurona nekrotičkim ili apoptotičkim putem. [21,18,22]. Smatra se da su mehanizmi stanične smrti posredovani H₂O₂ u neuronima nakon TBI vezani uz aktivaciju kaspaze 3 i povećanu aktivnost signalnog puta kinaze regulirane izvanstaničnim signalima (engl. *extracellular signal-regulated kinase*, ERK) 1/2 i protein kinaze aktivirane mitogenima (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK). NO i drugi RNS inhibiraju citokrom C oksidazu i sprječavaju nastanak ATP-a čime dolazi do povećane smrti stanice putem nekroze, ali potiču i apoptotičke putove smrti aktivacijom putova c-Jun N-terminalne kinaze (engl. *c-Jun N-terminal kinase*, JNK) [23].

1.1.1.3. Poremećaj krvno-moždane barijere

Krvno-moždana barijera (KMB) je barijera između tkiva mozga i cirkulirajuće krvi, a sagrađena je od endotelnih stanica mozga povezanih uskim spojevima, pericita i perivaskularnih ogranaka astrocita. Uski spojevi smanjuju permeabilnost i onemogućuju nereguliran prolaz polarnim molekulama u smjeru SŽS-a ili periferije. Selektivno je propusna za lipofilne molekule, kao i vodu i neke plinove, dok se veće molekule poput inzulina ili glukoze prenose transporterima [24]. Ona omogućava stvaranje posebnog okoliša u SŽS, u koji ne mogu prodrijeti imunološke stanice iz krvi, kao ni brojne druge makromolekule. Nakon TBI, dolazi do narušavanja integriteta KMB i njene povećane permeabilnosti [25]. Ozlijeđene i umiruće stanice mozga otpuštaju ATP, HMBG1, interleukin (IL) 33 i druge molekule povezane s ozljedom, koji stimuliraju proizvodnju raznih proupalnih citokina (IL-1 β , čimbenik nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor α* , TNF- α), IL-18) te protein koji veže kalcij S100B. Oni aktiviraju mikrogliju i astrocite, te induciraju njihovu proizvodnju kemokina i površinskih adhezivnih molekula, nužnih za privlačenje monocita, neutrofila i T-limfocita i njihovu infiltraciju kroz oštećenu KMB [25,26].

1.1.1.4. Neuroupala

Neuropala je jedan od ključnih procesa u putu oporavka i regeneracije ozlijeđenog tkiva, no kada izađe iz fiziološkog okvira odgovorna je za povećanu smrt i poremećaj funkcije neurona te pogoršanje ishoda ozljede [27]. Neutrofil i makrofagi koji infiltriraju u SŽS luče

IL-10, neurotrofni faktor porijeklom iz mozga (engl. *brain-derived neurotrophic factor*, BDNF) i druge protektivne molekule kojima štite neurone, uništavaju patogene kada se radi o nesterilnoj ozljedi i odstranjuju otpad umrlih stanica. S druge strane proizvode glutamat i NO⁺ kojima potiču smrt neurona, kao i oštećenje aksona. Zbog te dvojne uloge, kontrola neuroupale od izrazite je važnosti za poboljšanje ishoda TBI [26]. Ukoliko je koncentracija proupalnih citokina previsoka ili ako traje predugo pa iz akutne neuroupale postane kronična, dolazi do povećanja ekscitotoksičnosti, povećanja stanične smrti, daljnjeg narušavanja KMB, te prodora još više imunoloških stanica s periferije koje uzrokuju daljnje pogoršanje bolesti [28]. Prejaka stimulacija mikroglije dovodi do patološke agregacije proteina i smanjene sposobnosti njihovog odstranjivanja, koja vodi u neurodegeneraciju.

1.1.1.5. Neurodegeneracija

Trauma mozga, posebice traumatsko oštećenje aksona, za posljedicu ima stvaranje patoloških količina ili oblika proteina poput tau, amiloida beta ili TAR DNK-vezujućeg proteina 43 (TDP-43), koji su uključeni u patofiziologiju neurodegenerativnih bolesti poput AD, PD ili ALS. Smatra se i da je otprilike 1,5 puta veći rizik od razvoja demencije u pacijenata koji su pretrpili TBI. Do stvaranja tih promijenjenih oblika proteina dolazi zbog sila smicanja koje djeluju na citoskelet, te imaju veliki utjecaj na prijenos raznih molekula duž aksona. Pošto je aksonalni transport narušen, dolazi do agregacije brojnih proteina, uključujući gore navedene, koji mogu izazivati patologiju. Primjerice, p-tau agregati vode u apoptozu i oštećuju mitohondrije, a nađeni su skupa s agregatima beta amiloida u AD. Nakupljanje patoloških oblika TDP-43 povezano je s razvojem ALS-a i frontotemporalne demencije [29]. Na neurodegeneraciju utječe i dugotrajni poremećaj funkcije KMB, jer u perivaskularnom prostoru dolazi do nakupljanja patoloških proteina iz krvi, a uz to dolazi i do degeneracije mikrovaskulature u mozgu čime se smanjuje odstranjivanje toksičnih produkata [30]. Poznato je da promjene koje se dogode nakon TBI, a povezane su uz neurodegeneraciju, poput reaktivne astroglioze, oštećenja neurona i degeneracije bijele tvari te povišenih razina biljega AD, perzistiraju i 10 godina nakon TBI, te uzrokuju demenciju u kasnijim fazama života [31].

1.2. Astrociti i njihova uloga u traumatskoj ozljedi mozga

1.2.1. Uloga astrocita u očuvanju krvno-moždane barijere i cerebralnog protoka krvi nakon traume

Astrociti su potporne stanice mozga odgovorne za regulaciju mikrookoliša, preživljavanje neurona i održavanje sinaptičke funkcije, ali i jedne od najvažnijih stanica u patofiziologiji traume mozga. Jedna od njihovih ključnih funkcija je u razvoju i održavanju KMB. Perivaskularni ogranci astrocita omogućavaju dodatnu kontrolu prijenosa molekula kroz endotelni sloj KMB, tako što stvaraju glijalnu bazalnu laminu oko vaskulature [32,33]. Astrociti tada djeluju kao posrednici između neurona i krvožilnog sustava - reguliraju protok hranjivih tvari i kisika iz periferije u SŽS, dok istovremeno štite neurone od neurotoksina iz krvi i ROS. Također, ogranci astrocita koji tvore KMB imaju puno akvaporina 4 (AQP4) kojima reguliraju volumen tekućine u stanici te intersticijskom i vaskularnom prostoru mozga, što upućuje na to da astrociti imaju ključnu ulogu u homeostazi vode i iona u SŽS-u. AQP4 su udruženi s drugim transportnim proteinima na astrocitnoj membrani, poput ortogonalnih nizova čestica (engl. *orthogonal arrays of particles*, OAP) s kojima sudjeluju u procesima selektivnog transporta molekula kroz KMB [32]. Prolaz otpadnih produkata iz SŽS-a u krv ide putem glimfatičkog sustava, koji je također posredovan s AQP4. Cerebrospinalna tekućina se izmjenjuje s intersticijskom tekućinom djelovanjem gradijenta pritiska potpomognuta arterijskim pulsiranjem, te se intersticijska tekućina izliva u perivenozni prostor kojim odlazi u cervikalni limfni sustav [34–36].

Astrociti reguliraju i cerebralni protok krvi, ovisno o tome u kojim regijama je povećana aktivnost neurona, a time i povećana potreba za glavnim izvorima energije mozga, kisikom i glukozom. Oni služe kao posrednici koji prenose signale o energetskeim zahtjevima neurona u vaskularni endotel, putem porasta unutarstaničnog Ca^{2+} i lučenja prostaglandina E_2 i epoksieikozatrienoičnih kiselina, te 20-hidroksieikozatrienoičnu kiselinu, kojima izazivaju vazodilataciju, odnosno vazokonstrikciju [37].

U traumi dolazi do poremećaja regulacije KMB od strane astrocita koji luče brojne čimbenike povezane s otvaranjem KMB kao što su glutamat, aspartat, ATP, TNF- α , dušikov oksid (NO) i upalni protein makrofaga 2 [38]. Dolazi do disfunkcije AQP4 i njegove mislokalizacije, kao i smanjenog utoka cerebrospinalne tekućine u mozak. Disfunkcija AQP4 dovodi do poremećaja permeabilizacije KMB. Ti čimbenici mogu biti povezani s razvojem edema mozga, kao i smanjenim odstranjivanjem tau proteina, koji kasnije može doprinijeti

razvoju neurodegenerativnih bolesti [35,39]. Također dolazi i do gubitka vaskulature, ali se u roku nekoliko dana pokreće proces angiogeneze, kako bi se ponovno uspostavio protok krvi. U tom procesu astrociti igraju jednu od glavnih uloga lučeći čimbenik rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) koji povećava migraciju i proliferaciju endotelnih stanica i omogućava izbijanje novih krvnih žila [40].

1.2.2. Reaktivna astroglia i astrocitni ožiljak

Glavni biljeg astrocita je fibrilarni kiseli protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) [41]. GFAP ima brojne važne uloge u mozgu, a njegov povećan izražaj u traumi upućuje na njegove važne uloge koje ima u tom stanju. Povezan je s proliferacijom astrocita, ali i supresijom proliferacije neurona i rasta neurita. Sudjeluje u stvaranju fizičke barijere kako bi se odvojio oštećeni dio mozga nakon traume od okolnog zdravog tkiva. Sudjeluje u regulaciji protoka krvi nakon ishemije, pridonosi mijelinaciji i funkciji KMB, te pruža mehaničku snagu [42,43].

Nakon traume može doći do prejake aktivacije astrocita, stanja koje se naziva reaktivna astroglia, koja je karakterizirana povećanim izražajem GFAP-a, čiji porast u izražaju često odgovara jačini ozljede [44]. Dolazi do proliferacije i hipertrofije astrocita koji poprimaju zvjezdasti oblik, uz povećanu proizvodnju intermedijarnih filamenata. Nastaje gusta mreža aktiviranih astrocita, okruženih specijaliziranim izvanstaničnim matriksom, koja onemogućava rast aksona s jedne strane pružajući fizičku barijeru, a s druge lučeći razne inhibitore rasta aksona, poput NG2 proteoglikana, tenascina C i semaforina 3A. Takvo stanje naziva se astrocitni ožiljak, te može imati štetne posljedice po pitanju oporavka, a uz to može uputiti i na progresiju i ishod TBI [45–47]. Astrocitni ožiljak s jedne strane odvaja mjesto ozljede od zdravog tkiva, sprječava širenje upale i omogućava odstranjivanje patogena i umirućih stanica, ali u isto vrijeme i prekida veze između neurona, što je glavni problem kod aksonalne regeneracije i obnove veza neurona [47,48]. Povišene razine GFAP-a nakon TBI mogu se naći i u krvi, te se mogu koristiti u klinici kao jedan od biljega težine ozljede, a mogu ostati povišene i do 14 godina nakon TBI [31].

Astrociti su u stalnoj komunikaciji s neuronima i drugim glija stanicama oslobađajući gliotransmitere, neuromodule, faktore rasta, citokine i egzosome kojima mogu modulirati njihovu funkciju i utjecati na sinaptičku plastičnost [49,50,44].

1.2.3. Regulacija sinapse i gliotransmisija

Još jedna od važnih funkcija astrocita je održavanje sinaptičke povezanosti, kao i modulacija sinaptičke plastičnosti – procesa modulacije sinaptičke transmisije između dva neurona, ovisne o njihovoj aktivnosti [51,52]. Svojim izdancima oko sinapsi stvaraju perisinaptičke ovojnice, u kojima se nalaze brojni transporteri, ioni, neurotransmiteri i druge molekule poput kolesterola, trombospondina, estradiola i integrina, kojima reguliraju sinaptičke procese, uključujući i njihovo stvaranje i sazrijevanje [33,53,54]. Takav oblik sinapse naziva se tripartitna sinapsa [49,55]. Astrociti integriraju i procesiraju informacije koje se izmjenjuju između dva neurona, ali i susjednih sinapsi te nisu samo pasivni sudionici koji reagiraju na različite razine oslobođenih neurotransmitera, već aktivno sudjeluju modulirajući prijenos signala [56].

Astrociti posjeduju brojne receptore kojima nadgledaju mikrookoliš mozga i sudjeluju u održavanju homeostaze [57,58]. Neki od tih receptora su transporteri za ekscitacijske aminokiseline (engl. *excitatory aminoacid transporter*, EAAT), članovi SLC1 (engl. *solute carrier 1*) superobitelji, što je skupina transmembranskih transportera za aminokiseline. Postoji 5 podtipova EAAT transportera (1-5), od kojih su na astrocitima prisutni EAAT1 i EAAT2 [59]. Izraženi su na perisinaptičkim astrocitnim završecima u velikoj gustoći, te se smatra da EAAT1 protein zastupa oko 1% svih proteina eksprimiranih u mozgu [19]. To ukazuje na njihovu veliku važnost u regulaciji sinapse, gdje održavaju izvanstanične razine EAA, posebice glutamata, u normalnim razinama i na taj način sprječavaju njegovu toksičnost na neurone putem prejake stimulacije [60]. Zna se da otprilike 90% sinapsi koristi glutamat te da one troše 80% energije producirane u mozgu. Stoga je iznimno važno kontrolirati razine ovog neurotransmitera u sinapsi i ECM [19].

Glutamat se ne može u potpunosti metabolizirati na sinapsi, već se višak glutamata vraća u neurone i unosi u astrocite [59]. Proces regulacije količine glutamata između neurona, astrocita i ECM zove se glutamat-glutamin ciklus. On je važan za regulaciju metabolizma neurotransmitera u neuronima, posebno zato što je glutaminergičko signaliranje iznimno energetski zahtjevno za neurone [61]. Taj ciklus ide po principu da su astrociti glavne stanice za unos glutamata, od kojeg jednu četvrtinu metaboliziraju, a ostatak uz pomoć glutamin sintaze pretvaraju u glutamin, kojeg oslobađaju u ECM. Glutamin potom neuroni unesu u sebe gdje se opet pretvaraju u glutamat. Na taj način se nadoknađuje zaliha glutamata u neuronima [19]. Također, astrociti reguliraju i razine dostupnog Ca^{2+} u sinapsama, posebice u situacijama

česte i jake neuronske aktivnosti, kada postoji rizik od pada količine Ca^{2+} ključnog neuronima za rad. Astrociti iz svog endoplazmatskog retikuluma oslobađaju svoje zalihe kalcija, koje $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ transporterima bivaju oslobođene u ECM. [62]. Stimulacija astrocita glutamatom i unutarstanične oscilacije Ca^{2+} potiču oslobađanje gliotransmitera [63].

Gliotransmisija podrazumijeva oslobađanje brojnih neuroaktivnih tvari poput glutamata, ATP-a i adenoizina, GABA-e, D-serina te brojnih citokina, kojima astrociti reguliraju funkciju neurona, ali i drugih glija stanica. Na taj način mogu sudjelovati u održavanju plastičnosti, jer moduliraju komunikaciju između neurona, tako što aktiviraju izvansinaptičke receptore na pre- i post-sinaptičkim neuronima. Na presinaptičkim neuronima mogu utjecati na otpuštanje neurotransmitera, na način da ga povećavaju ili smanjuju, kako na ekscitacijskim, tako i na inhibicijskim sinapsama. Postsinaptički djeluje na stupanj aktivacije NMDA receptora ili direktno na depolarizaciju neurona [48,52]. Gliotransmisija je važna i za proces neurogeneze, jer svojim sekretomom i regulacijom brojnih faktora u izvanstaničnom prostoru utječu na neurogensku nišu, što je dokazano kod astrocita hipokampusa, ali ne i leđne moždine. Oni proizvode neurotrofni i mitogeni protein S100 β koji dovodi do proliferacije i diferencijacije progenitorskih stanica. Mogu diferencirati u manje specifičan fenotip koji pokazuje karakteristike matičnih stanica [64].

TBI uzrokuje značajan poremećaj rada sinapse i gliotransmisije. Gubitak EAAT1 transportera smanjuje sposobnost odstranjivanja izvanstaničnog glutamata, što rezultira glutamatnom ekscitotoksičnošću i potiče kaskadu sekundarnog odgovora na ozljedu [65–67]. Također, veliko oslobađanje ATP-a iz astrocita aktivira okolne astrocite u lančanom nizu stimulacijom oslobađanja Ca^{2+} u tzv. kalcijevom valu, a također potiče aktivaciju mikroglije putem purinergičnih P2 receptora [68,69]. Razgradnjom ATP-a dolazi do nakupljanja gliotransmitera adenoizina, čija je uloga supresija sinaptičke aktivnosti smanjenjem oslobađanja EAA i hiperpolarizacijom postsinaptičke membrane. Smatra se da je disregulacija adenoizina odgovorna za određene psihijatrijske simptome nakon TBI poput anksioznosti, da utječe na poremećaj pamćenja te da sudjeluje u procesu epileptogeneze [70,71]. Također, nakon TBI astrociti počinju proizvoditi i otpuštati D-serin, koaktivator NMDA receptora kojeg inače oslobađaju samo neuroni, a ovaj gliotransmiter porijeklom iz astrocita može izazvati disfunkciju sinapse i smatra se jednim od uzročnika nastanka kognitivnih poremećaja [72].

1.2.4. Modulacija funkcije neurona i drugih glia stanica putem lučenja egzosoma

Brojne stanice u našem organizmu proizvode izvanstanične vezikule koje su posrednici u komunikaciji između stanica i tkiva. Jedne od takvih vezikula su egzosomi, kružnog oblika i veličine 30-100 nm, koje se oslobađaju procesom egzocitoze iz multivezikularnog endosoma. Egzosome proizvode sve stanice mozga, pa tako i astrociti. Oni sadrže brojne proteine, lipide, molekule ribonukleinske kiseline (RNK) i mitohondrijske deoksiribonukleinske kiseline (DNK), kojima neurološke stanice međusobno komuniciraju, utječu na rast i moduliraju funkcije [50]. Osim modulacije stanica prijenosom brojnih molekula, na funkciju se može utjecati i aktivacijom signalnih kaskada, tako da se egzosomi vežu se na membranske receptore, ili regulacijom razine određenih proteina u izvanstaničnom matriksu [73]. Nemaju učinke samo na stanice u neposrednoj blizini mjesta oslobađanja, već se luče i u cerebrospinalnu tekućinu (*engl. cerebro-spinal fluid, CSF*) i krv, kojima putuju do distalnih organa i tkiva, te dostavljaju važne molekularne informacije [74]. Egzosomi se karakteriziraju detekcijom raznih proteina prisutnih u njihovoj membrani i citosolu, specifičnih za tu vrstu vezikula. Neki od njih su intravezikularni protein TSG101 (*engl. tumor susceptibility gene 101*) i membranski proteini tetraspanini CD81 i CD63 (*engl. cluster of differentiation, CD*) [75].

Egzosomi su ključni za održavanje zdravog SŽS-a, što uključuje procese plastičnosti, mijelinizacije i regulaciju izbijanja neurona. Recimo, EV prenose Arc proteine (*engl. activity-regulated cytoskeleton-associated protein; Arc*), jedne od glavnih regulatora neuroplastičnosti koji utječu na citoskelet i na izražaj receptora za neurotransmitere. Također mogu prenositi komponentu komplementa C3, potencijalno uključenu u proces neuroplastičnosti na razini eliminacije slabijih sinapsi u procesima razvoja i učenja [74].

Egzosomi porijeklom iz astrocita (*engl. astrocyte derived exosomes, ADE*) imaju ulogu u preživljenju, rastu i razvoju neurona, ali i u patofiziologiji, kao i u komunikaciji s perifernim imunološkim sustavom [76]. Neki od proteina koje sadrže su HSP70, koji se pojačano oslobađa u uvjetima povišene temperature i upale i iskazuje neuroprotektivno djelovanje [77]. Sinapsin se pojačano oslobađa u uvjetima niskih koncentracija glukoze i kisika ili kod pojačanog stvaranja H₂O₂, omogućava veće preživljenje i potiče rast neurita [78]. U normalnim uvjetima, ADE sadrže i faktore rasta važne u procesu angiogeneze FGF-2 i VEGF, čime mogu utjecati na rast vaskularnog endotela [79]. U ADE su prisutni i transporteri za ekscitacijske aminokiseline EAAT1 i EAAT2, čija se koncentracija povećava u reaktivnim astrocitima, što

upućuje na potencijalnu ulogu ADE u povećavanju kapaciteta za odstranjivanje viška glutamata [80].

Razna patološka stanja mogu utjecati na stvaranje subpopulacija egzosoma te na taj način modulirati njihove učinke. Ozljeda ima velik utjecaj na sadržaj ADE. Mehaničko rastezanje i povišene razine glutamata povećavaju oslobađanje ATP-a koji potiče oslobađanje egzosoma i povećava u njima udio proteina RPL10 i NETO1 koji su uključeni u sinaptogenezu i rast neurita [76]. Proupalni citokini TNF α i IL-1 β povećavaju količine mikroRNK (miRNK) koje inhibiraju neurotrofno signaliranje i na taj način suprimiraju funkciju neurona [81]. Pojačano oslobađanje IL-1 β utječe i na NF- κ B put u astrocitima te se oslobađaju egzosomi s povećanim sadržajem komponente komplementa C3 koji potiču migraciju neutrofila na mjesto ozljede, oštećuje neurone i sinapse, te povećan sadržaj lizil oksidaze koja potiče izražaj adhezijskih molekula kao i proizvodnju citokina [76,82]. U uvjetima traume ili stresa SŽS-a, u astrocitima se povećava proizvodnja čimbenika inhibicije leukemije, koji se prenosi u neurone putem egzosoma, omogućava im otpornost protiv glutamatne ekscitotoksičnosti i omogućava veće preživljenje [83]. Ukoliko su astrociti izloženi većim razinama IL-10, povećava se udio proteina uključenih u rast aksona i neuroplastičnost. Oksidacijski stres, koji također nastaje u uvjetima ozljede, povećava u ADE sadržaj apolipoproteina D, PrP i STI-1, koji pružaju neuroprotekciju od ROS, ishemije, hipoksije i hipoglikemije [84]. Egzosomi imaju velik utjecaj i u razvoju neurodegenerativnih bolesti. Mogu pridonijeti neurodegeneraciji šireći agregate proteina u zdrave stanice, ali s druge strane mogu sudjelovati i u njihovom čišćenju [74]. Jedno *in vitro* istraživanje pokazalo je da ADE u modelu AD imaju povećan sadržaj HspB1 proteina, koji se luči kao odgovor na amiloid-beta i djeluje protektivno na neuronima [85].

ADE bili su predmet istraživanja u *in vitro* i *in vivo* modelu ishemijske ozljede mozga. Rezultati ove studije pokazali su da astrociti putem egzosoma reguliraju autofagiju i na taj način smanjuju apoptozu neurona. Protektivna autofagija može zaštititi neurone od apoptoze, jer odstranjuje oštećeno tkivo i proteine, ali u prevelikoj količini dovodi do suprotnog učinka, potiče smrt. U modelu ishemijske bolesti, pokazalo se da inhibicija autofagije dovodi do smanjene apoptoze i do smanjenja ozljede neurona [86]. Naknadnom studijom, utvrdilo se da je ovaj učinak rezultat povećanog prijenosa jedne miRNK, miR-190b, u neurone, gdje se smanjuje apoptoza potaknuta uskraćivanjem kisika i glukoze, na način da se sprječava autofagija [87].

Komunikacija stanica putem egzosoma jedan je od važnih načina kako stanice mozga međusobno moduliraju svoje funkcije. ADE i egzosomi generalno, imaju velik terapijski potencijal zbog svoje sposobnosti prijenosa brojnih proteina i miRNK koje bi mogle utjecati na razvoj sekundarne ozljede nakon TBI. Uz to, moguć je njihov prolaz kroz KMB, posebice intranazalnim putem primjene, što im povećava terapijski potencijal za liječenje oboljenja SŽS-a [88].

1.3. Uloga mikroRNK u patofiziologiji traumatske ozljede mozga

1.3.1. Sinteza i lučenje mikroRNK

MikroRNK (miRNK) male su jednolančane, nekodirajuće RNK, dužine 20-25 nukleotida, koje imaju brojne važne uloge u regulaciji izražaja gena, na razini posttranslacije. Sekvence nukleotida na 5' kraju miRNK vežu se na komplementarnu sekvencu 3' netranslatiranog kraja mRNK čime se onemogućuje njihova translacija ili usmjerava u put degradacije [89]. Imaju važne uloge u svim staničnim procesima – proliferaciji, diferencijaciji, metabolizmu, kao i u regulaciji imunološkog odgovora, a posebnu značajnost imaju i u neurorazvoju [90].

MiRNK se nalaze u citoplazmi, ali i brojnim staničnim odjeljcima – endoplazmatskom retikulumu, mitohondrijima, dendritima, sinapsama, jezgri te egzosomima. Koncentrira se na mjestima gdje je važna njena funkcija, te miRNK koje imaju djelovanje na sinaptičku funkciju nakupljaju se u dendritima i aksonima gdje je puno mRNK koje kodiraju proteine sinapse. One se translociraju na razna mjesta u stanici putem fosforilacije argonut proteina na kojeg su vezane, u kompleksu za utišavanje [91].

1.3.2. Uloga miRNK u središnjem živčanom sustavu

Svaka miRNK može utjecati na utišavanje, a u nekim slučajevima i poticanje izražaja stotine gena [92]. Dosadašnja istraživanja ukazala su na njihovu važnost u razvoju i regulaciji SŽS-a, te su poznate brojne miRNK uključene u procese proliferacije stanica i neurogeneze poput miRNK 19, miRNK 21, miRNK 96, miRNK 143, miRNK 145, miRNK 182, miRNK 206 i druge [90]. Izražaj brojnih miRNK važan je u embrionalnom razvoju za usmjeravanje diferencijacije, odnosno, one su jedan od čimbenika koji određuje hoće li stanice postati neuroni ili neka od glija stanica. I nakon razvoja, miRNK imaju važne uloge u kontroli funkcije stanica mozga i ekscitabilnosti [91].

Osim fizioloških, miRNK su uključene i u patofiziološke procese u mozgu. Nakon moždanog udara primijećena je povećana razina miRNK 191 koja pogoršava ishemiju tkiva inhibicijom angiogeneze. Kod razvoja neurodegenerativnih bolesti također dolazi do njihove deregulacije, a određene se miRNK mogu koristiti kao biljezi Alzheimerove bolesti [93]. Nakon TBI, dolazi do poremećaja izražaja miRNK što se može mjeriti određivanjem njihovih razina u krvi, likvoru i slini. Identificiran je niz miRNK koje ili povećavaju ili smanjuju izražaj brojnih gena uključenih u procese koji utječu na ishod TBI, poput preživljavanja neurona, poremećaja KMB i utoka limfocita, agregaciju trombocita i infarkt tkiva [94].

Osim negativnih utjecaja, oscilacije u izražaju miRNK nakon bolesti ili ozljede povezane su i s poboljšanjem ishoda nakon TBI. Za miRNK 92b 3p porijeklom iz ADE pokazano je da smanjuje smrt i apoptozu uzrokovanu deprivacijom kisika i glukoze u neuronima [95]. Smanjenje izražaja miRNK 15a nakon moždanog udara pogoduje angiogenezi, povećavajući stvaranje FGF2 i VEGF, a smanjen izražaj miRNK 9 i miRNK 200b u istim uvjetima potiče remijelinaciju [96]. Pojačani izražaj miRNK 17-92 klastera ili miRNK 27a aktivira intrinzične neuronske signale rasta. MiRNK imaju učinak i na neurovaskularnu jedinicu koja je osnova KMB, mogu utjecati na propusnost djelovanjem na uske spojeve između endotelnih stanica, miRNK 132 sprječava djelovanje metalopeptiraze matriksa 9 i onemogućava razgradnju proteina uskih spojeva, dok miRNK 210 ima suprotan učinak i ometa djelovanje proteina spojnica. [93].

MiRNK porijeklom iz astrocita ne utječu samo na neurone, već mogu modulirati i funkcije mikroglije. Studije su pokazale da ADE koji sadrže miRNK 873a 5p mogu potaknuti prelazak mikroglije na protuupalni M2 fenotip, što podrazumijeva smanjeno lučenje proupalnih faktora iz mikroglije, a povećano lučenje onih protuupalnih, s posljedičnim smanjenjem nauroupale i edema mozga [97].

Iz navedenog, izvjesno je da miRNK imaju izrazito značajan utjecaj na ishod raznih oboljenja SŽS-a, uključujući TBI, te da su ove mikrovezikule jedne od zanimljivih meta za potencijalnu terapiju.

1.4. Strategije liječenja traumatske ozljede mozga

1.4.1. Pregled standardnih terapijskih pristupa traumatske ozljede mozga

U liječenju TBI, rani početak terapijskih intervencija od iznimne je važnosti, kako bi se minimizirala hipoksija, ekscitotoksičnost, rana smrt stanica te se smanjilo opseg i težinu kasnijih posljedica. Teški oblici traume liječe se čim ranije moguće, jer se smatra da neuroprotektivnost tih postupaka opada s vremenom [98]. Primarni pristup u terapiji blažih oblika traume je simptomatsko liječenje – odmor, hidracija i primjena analgetika, a mogu se primijeniti i osteopatske masaže i hiperbarična terapija kisikom [99].

Tijekom terapije TBI, važno je kontinuirano pratiti intrakranijalni pritisak (IKP), cerebralni perfuzijski tlak i oksigenaciju mozga. Bazirano na dobivenim informacijama o stanju pacijenta, bira se terapijski pristup koji može varirati ovisno o vrsti, obliku i težini ozljede. IKP je važno pratiti pošto on snažno korelira s mortalitetom i morbiditetom nakon TBI te se prati u stvarnom vremenu ugradnjom probe u parenhim mozga. Smatra se da je povišen u vrijednosti ≥ 20 mmHg. Na njega se može utjecati pozicioniranjem glave, sedacijom, indukcijom kome lijekovima, terapijom hiperosmolarnim otopinama natrija ili manitola, dekompresijskom kraniotomijom i drenažom cerebrospinalne tekućine [100,101]. Terapija hipertoničnom otopinom natrija povećava osmolarnost, sprječava ulaz vode u međustanični prostor i stanice i povećava volumen unutar krvnih žila. Time dolazi do poboljšanja protoka krvi u mozgu i smanjenja edema. Ovaj oblik terapije pokazao se pozitivnim po pitanju prevencije komplikacija nakon TBI i količini potrebnih intervencija. Nažalost, pozitivni učinci nisu bili značajni po pitanju dugoročnog neurološkog ishoda [102], te mogu imati nuspojave poput akutnog zatajenja bubrega, trombocitopenije i neutropenije [103]. Dekompresijska kraniotomija podrazumijeva odstranjivanje određene količine kosti lubanje kako bi se poboljšao IKP, cerebralni perfuzijski tlak i oksigenacija mozga, te kako bi se smanjio pritisak na moždano deblo. Ova metoda poboljšava vrijednosti ishoda na glasgowskoj ljestvici ishoda (engl. *Glasgow outcome scale*, GOS) i smanjuje smrtnost. No, preživljenje ne podrazumijeva i potpun oporavak pošto pacijenti mogu razviti ozbiljne komplikacije kao što su proširenje postojeće ozljede, hematom, hernijacija mozga kroz kraniotomijski otvor, epileptički napadaji ili hidrocefalus, a dio njih može ostati u perzistentno vegetativnom stanju [100]. Ovim metodama smanjuje se napredak ozljede uzrokovan edemom i smanjenom oksigenacijom tkiva, no mogu imati svoje neželjene posljedice i ne mogu dovesti do popravka strukturnih oštećenja nastalih u traumi.

Brojne studije bile su posvećene pronalasku načina kako povećati preživljenje i oporavak pacijenata s TBI. Jedna od tih metoda bila je terapija hipotermijom. Neke studije pokazale su da već male promjene u temperaturi mogu dovesti do promjene patoloških procesa u mozgu. Naime, hipotermijom se usporava se moždani metabolizam, smanjuju se zahtjevi za kisikom i potrošnja energije. Smanjuje se i stvaranje laktata, te stabilizira pH TBI pacijenata [104]. Smanjuje se oslobađanje glutamata, kao i oslobađanje proupalnih citokina što utječe i na permeabilnost KMB [105]. Po pitanju učinka na signalne putove u stanici, hipotermija inhibira aktivaciju nekoliko apoptotičkih putova, a s druge strane pojačava izražaj proteina poput BDNF, ERK, BCL2, uključenih u stanično preživljenje [106]. Djeluje i na mitohondrije gdje smanjuje oslobađanje kaspaze 3 i citokroma c. Unatoč tome što su rezultati eksperimentalnih istraživanja bili obećavajući, problem kod hipotermije je taj što ju je teško translirati u kliniku. Pokazalo se da su stare metode postizanja hipotermije poput leda i hladnih pokrivača izazivale komplikacije u pogledu kardiovaskularnih poremećaja i većeg rizika od infekcija te se ova metoda opširno koristila samo kroz 60-te godine prošlog stoljeća, dok se sada sve više okreće drugim metodama [105].

Uz navedenu terapiju, potencijal je pokazala i hiperbarična terapija kisikom, u svrhu prevencije ishemije i posljedičnog oštećenja tkiva uzrokovanog manjkom kisika. U traumi je povećan metabolizam u mozgu, a nedostatak kisika posredovan edemom, povišenim IKP i kolapsom kapilara rezultira povećanjem anaerobnog metabolizma i gubitka ATP-a, što posljedično dovodi do smanjenja rada Na^+/K^+ ATP-aze, disbalansa elektrolita i aktivaciju putova stanične smrti [107]. Pacijentima se daje 100%-tni kisik, pod tlakom iznad 1 atmosfere, čime se postiže veća zasićenost plina u krvi te se omogućuje da više kisika dospije do hipoksičnog tkiva. Time se postiže povratak na aerobni metabolizam, poboljšava se prokrvljenost i smanjuje IKP, smanjuje se neuroupala i edem. Nedostatak ove terapije je toksičnost kisika zbog produkcije ROS-a, što je posebno izraženo u tkivu pluća i mozga [107]. Oba navedena oblika terapije pokazala su da dolazi do poboljšanja ishoda na GOS ljestvici.

1.4.2. Farmakološka neuroprotekcija u terapiji traume mozga

Primjena farmakološke neuroprotekcije u terapiji traumatske ozljede mozga započela je 1980-tih godina, te je u početku bila usmjerena na održavanje strukture i funkcije neurona, dok su ostale stanice mozga bile u tim istraživanjima zanemarene. S vremenom se pokazalo da je od velike važnosti zaštititi i glija stanica mozga, kao i vaskularne stanice te se opseg istraživanja proširio [1].

Neki od obećavajućih lijekova bili su iz skupine lijekova za liječenje dijabetesa, glitazoni i glibenklamid, potom kortikosteroidi, statini, eritropoetin i progesteron [1,108]. Glitazoni su zbog svojeg akutnog djelovanja na inhibiciju NF- κ B signalnog puta bili povoljni za smanjenje upale i oksidativnog stresa [109], a uz kroničnu primjenu pokazali su povećan oporavak tkiva mozga, obnovu neurovaskularne jedinice i popravak KMB [110]. Primjena deksametazona, posebice u kombinaciji sa statinima, djelovala je obećavajuće zbog učinka na smanjenje lučenja proupalnih faktora i inhibiciju apoptoze, obnovu neuralne funkcije te smanjenje poremećene angiogeneze [111,112]. Statini sami po sebi pokazali su protuupalno djelovanje na tkivo mozga nakon TBI, a uz to i poboljšanje cerebralnog protoka krvi povećanjem izražaja eNOS-a i produkciju NO [103]. Eritropoetin se također pokazao kao dobar terapijski kandidat, zbog svojeg snažnog antiapoptotičkog utjecaja na stanice u SŽS-u [113]. Progesteron je u *in vivo* modelima ozljede pokazao svojstva neuroprotekcije, smanjenja edema i volumena lezije te boljeg ishoda oporavka [114,115]. Rezultati ovih istraživanja dobiveni su pokusima na životinjskim modelima miša i štakora, te su zbog svojih povoljnih ishoda navedeni lijekovi bili razmatrani kao kandidati za klinička istraživanja.

Nažalost, iako su pretkliničke studije pokazale obećavajuće rezultate, njihova translacija u kliničke uvjete nije dovela do usporedivih ishoda. Razlozi za to su brojni, od razlika u vrsti, mjestu i težini ozljede preko kompleksnosti mehanizama sekundarne ozljede, ograničenosti u znanju o djelovanju lijeka u smislu nedovoljno opsežne pretkliničke farmakološke evaluacije, razlike u eksperimentalnim procedurama, vrstama traume, vrstama životinja na kojima se provode istraživanja. nepoznavanje terapijskog okvira, i drugo [116]. Većina ovih lijekova ima djelovanje usmjereno na samo jedan mehanizam sekundarne ozljede, te je teško očekivati da će terapija biti uspješna dok se ne razvije neki lijek koji će utjecati na više komponenti sekundarne ozljede [27]. Također, često je primjena ovih lijekova imala i brojne neželjene posljedice zbog kojih se terapija morala prekinuti, dok pozitivni rezultati nisu bili reproducibilni [116,117]. Još jedan od problema farmakološke neuroprotekcije je i to što često molekule lijekova ne mogu prijeći KMB, te su potrebne inovativne metode kojima bi se omogućio lakši unos tih molekula u SŽS [118], a i nakon prolaska KMB tu je problem distribucije i akumulacije na željenom mjestu gdje je terapija potrebna [119].

1.4.3. Terapije u razvoju

Ne postoji jedinstven oblik terapije koji bi pomogao svim pacijentima u sprječavanju razvoja sekundarne ozljede. Unatoč tome što se rade brojna predklinička ispitivanja, mali broj

njih dolazi do razine kliničke primjene zbog neuspješne translacije. [120]. Smatra se da bi se trebalo ispitivati robusnije oblike terapije, te da bi one mogle biti dovoljno potentne kako bi uspjele nadići heterogenost slučajeva [98].

Jedan od novih pristupa u fazi istraživanja je terapija induciranim pluripotentnim matičnim stanicama (IPMS), kojima bi se potaknuo nastanak novih neurona. Pošto su neuroni u postmitotičkoj fazi i ne mogu se nadoknaditi nakon gubitka, na ovaj način bi se dostavilo nove neurone na mjesto ozljede. Ovim pristupom, somatske stanice samog pacijenta pretvorile bi se u IPMS primjenom različitih faktora dediferencijacije. Problem s ovom terapijom je sama uspješnost usmjeravanja diferencijacije u neurone, te izbjegavanja stvaranja tumorskih tvorbi. Stoga se preferira direktno linijsko reprogramiranje, kada se somatska stanica pacijenta, npr. fibroblast, usmjeri u novi neuron. Pokazalo se da se ova terapija može provoditi i *in situ*, čime bi se direktno mogli nadomjestiti neuroni samo tamo gdje su potrebni, na mjestu ozljede. No, prije primjene u klinici, potrebno je u potpunosti razjasniti mehanizme diferencijacije takvih stanica, te poboljšati efikasnost konverzije koja je dosta niska. Također, potrebno je naći načine kako starije stanice usmjeriti u neurone, pošto se pokazalo da starije stanice imaju manji potencijal za procese diferencijacije/dediferencijacije [121,122].

Terapije u razvoju fokusiraju se i na ciljane strukture u stanicama, poput mitohondrija. Poremećaji rada mitohondrija usmjeravaju stanicu u putove stanične smrti, a s povećanim stvaranjem ROS i RNS nakon traume, dolazi i do velike mitohondrijske disfunkcije, koja uzrokuje opsežnu smrt neurona. Stoga bi se minimizacijom oštećenja mitohondrija, primjenom terapije koja će djelovati lokalizirano u njima, moglo poboljšati ishode nakon TBI. Specifično, može se ciljati produkciju ROS-a, koja ostane visoka produljeno vrijeme nakon traume, kao i smanjenje aktivnosti iNOS-a [22].

Sve više se u medicini govori o važnosti miRNK i regulaciji genskog izražaja kao sredstva u dijagnostici i liječenju niza bolesti. miRNK imaju jednostavnu građu, a izrazito široke i snažne učinke na regulaciju stotine gena, te su stoga zanimljive. U tijeku su brojna klinička istraživanja gdje je glavni fokus na primijeni miRNK kao terapijskog sredstva za liječenja raka. No sve više se spominju i u kontekstu SŽS oboljenja, uključujući moždani udar, TBI i ozljede leđne moždine. Kao dijagnostičko sredstvo, miRNK se izoliraju iz krvi ili CSF-a, gdje su dobro očuvane u sklopu argonaut proteina ili egzosoma. Za određivanje potencijalne koristi primjene ovih miRNK u kontekstu liječenja TBI, provode se mnoga *in vivo* i *in vitro* istraživanja. Neka *in vivo* istraživanja na miševima pokazala su da mimetici miRNK-23a i

miRNK-27a, nakon iniciranja u ventrikule, smanjuju volumen lezije i gubitak neurona. Mimetici miRNK 21 također utječu na smanjenje volumena lezije, smanjuju edem i oštećenje KMB, dok miRNK-124-3p smanjuje neuroupalu i potiče rast neurita. Problem kod ovakvog oblika terapije je prijenos molekula kroz KMB, te se smatra da bi potencijalna metoda mogla biti prijenos putem egzosoma [94].

1.4.4. Nanomedicina u neurotraumi

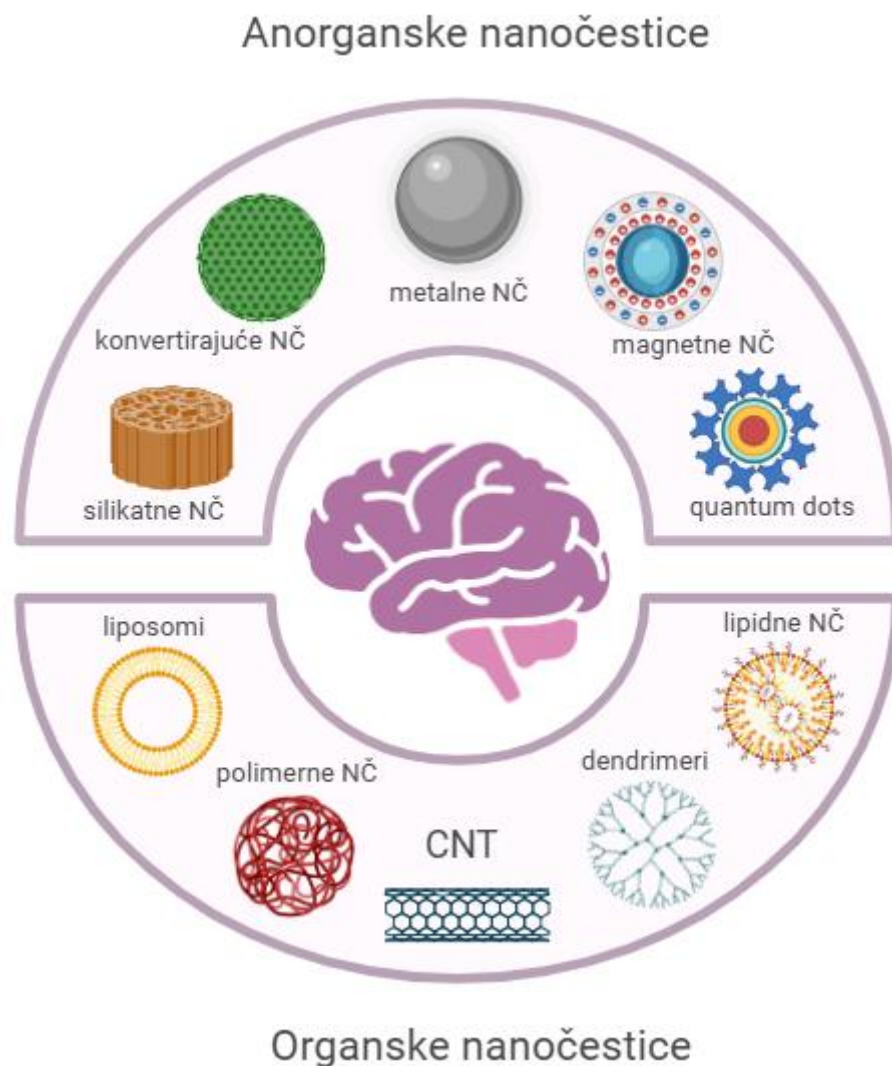
Kao što je navedeno, dosta terapija koje su u razvoju imaju problem slabe translacije i još uvijek se traga za učinkovitom metodom terapije koja bi bila primjenjiva za liječenje različitih fenotipova ozljede. Dosadašnja terapija je suportivna, usmjerena na sprječavanje daljnjih oštećenja, ali ne pruža mogućnost popravka tkiva koje je oštećeno i uspostavljanja neuronske povezanosti kroz to tkivo. Također, kod liječenja TBI, velik problem predstavlja KMB koja je jedna od glavnih prepreka u dijagnostici i liječenju ne samo ozljede, već i drugih neuroloških oboljenja. Neka terapijska sredstva i lijekovi koji bi mogli biti učinkoviti u terapiji, imaju problem prolaska te barijere i prodiranja do ozlijeđenog tkiva mozga. Stoga se znanost sve više okreće razvoju novih tehnologija kojima bi se moglo premostiti te prepreke i omogućiti terapiju s boljim ishodom, od kojih popularnost sve više stiče nanotehnologija [123].

Nanotehnologija je pojam koji je skovao Richard Feynman 1959. godine, i podrazumijevao je „korištenje mehaničkih alata sa sve manjim mehaničkim alatima do atomske razine“. Podrazumijeva korištenje alata veličine manje od 100 nm, za primjenu u različitim strukama. Kada se nanotehnologija primjenjuje u medicini, naziva se nanomedicina [124]. S vremenom i napretkom znanosti, sve je više prisutna u neurologiji u područjima dijagnostike i terapije, a posebice u svrsi dostave lijekova. Neki od primjera nanočestica (NČ) koje se istražuju u svrhu dostave lijekova su polimerne micelle, lipidne nanočestice, nanoemulzije, nanogelovi i nanokapsule te ugljikove nanocjevčice (Slika 2). Također, nanočestice se koriste i u dijagnostičke svrhe, poput biooslikavanja, te se u tom području istražuju zlatne nanočestice, željezov oksid i kvantne točke [123].

Liposomi i lipidne nanočestice pogodne su za dostavu lijekova i mRNK, jer mogu prenositi hidrofoban i hidrofilan sadržaj, lako se modificiraju, relativno su netoksične i biorazgradive. Njihov problem je povećan afinitet prema jetri kod sustavne primjene i prolaz preko KMB, no raznim modifikacijama može se izaći na kraj i tom izazovu [125]. Polimerne micelle su nešto stabilnije od lipidnih nanočestica, lakše se modificiraju po pitanju distribucije i oslobađanja sadržaja i koriste se većinom za prijenos mRNK. Anorganske čestice poput

metala, magnetskih čestica, silikatnih čestica i kvantnih točaka imaju prednost da su jednostavnije i jeftinije za proizvodnju, a lako se modificiraju s raznim polimerima u svrhu povećanja biokompatibilnosti. Mane ovih nanočestica su problem biodistribucije i visoka razina toksičnosti, pogotovo na SŽS [126].

Jedna od obećavajućih NČ su i nanozimi, nanočestice s enzimatskim svojstvima. U razvoju je velik broj ovakvih molekula, a u kontekstu oksidativnih oštećenja koja nastaju u TBI zanimljivi bi bili magnetosomi i feritinske nanočestice, koji mogu smanjiti unutarstanično stvaranje ROS-a i na taj način utjecati na stanična oštećenja i smrt različitih tkiva koje su u upali, pa isto tako i neurona. Njihova prednost je da su mali, mogu agregirati u okolini gdje su visoke količine ROS-a, kao što su mitohondriji, te smanjiti njihovo štetno djelovanje [127,128].



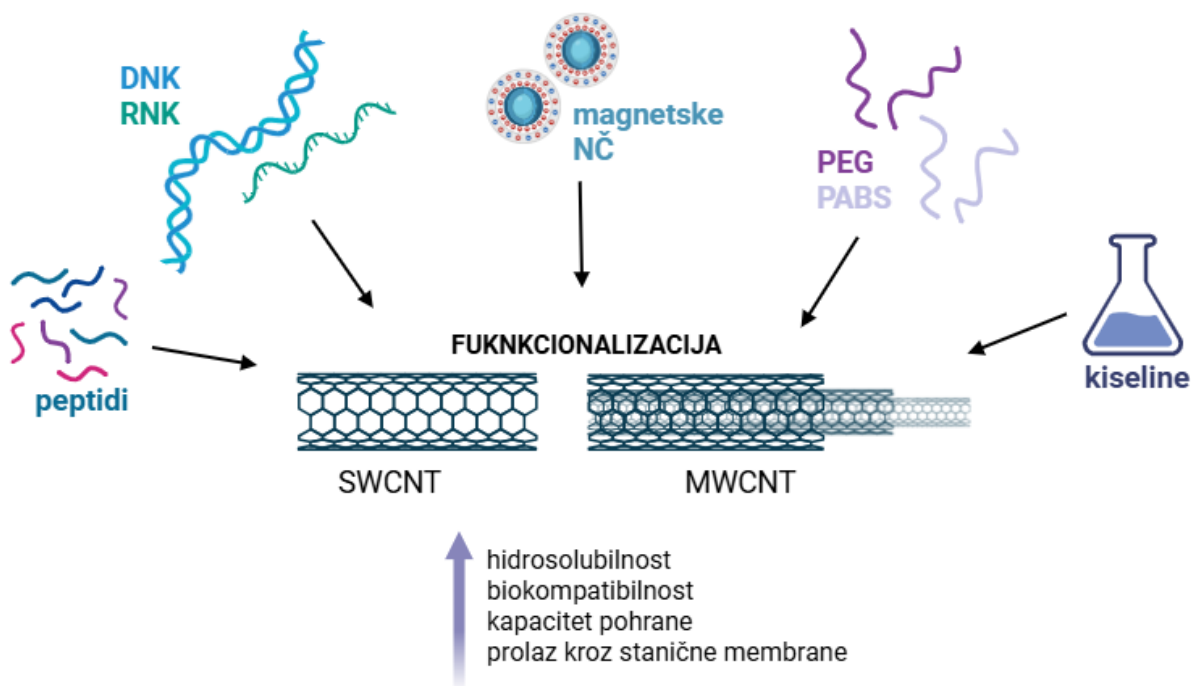
Slika 2. Prikaz različitih vrsta organskih i anorganskih nanočestica za primjenu u neurologiji. Slika prilagođena prema Shabani i sur., 2023. [123] objavljena pod licencom *Creative Commons* (CC). NČ, nanočestice; CNT, ugljikove nanočestice.

Brojne NČ su u *in vivo* fazi istraživanja terapije TBI [129–131], između ostalog, tu su brojna istraživanja o neuroprotektivnim svojstvima NČ koje se baziraju na ugljiku [132,133], ali do sada nije provedeno puno istraživanja o potencijalu ugljikovih nanocjevčica u iste svrhe.

1.4.5. Ugljikove nanocjevčice

1.4.5.1. Općenito o ugljikovim nanocjevčicama

Ugljikove nanocjevčice (engl. *carbon nanotubes*, CNT) jedan su od obećavajućih nanomaterijala za primjenu u različitim biološkim sustavima, pa tako i neurologiji. Prednosti ovog nanomaterijala su njihova veličina, izvrsna toplinska i električna provodljivost, čvrstoća i fleksibilnost, te sposobnost prodiranja u stanice [134]. Po svojoj strukturi, mogu biti jednozidne (engl. *single-walled* CNTs, SWCNTs), u obliku cilindra s jednim slojem grafena, ili višezidne (engl. *multi-walled* CNTs, MWCNTs), kada se cilindar sastoji od više zasebnih slojeva grafena, ili jednog sloja omotanog više puta oko sebe. Veličina SWCNTs je do 2 nm u promjeru, dok MWCNTs mogu biti promjera i do 100 nm. Po duljini variraju, ali dosežu do nekoliko μm . [135]. Krajevi nanocjevčica zavijeni su i podsjećaju na sfere fullerena. Postoji mnogo metoda proizvodnje CNT; neke od njih su laserska ablacija, metoda električnog luka i metoda depozicije kemijskih para. Metoda depozicije kemijskih para najčešće se koristi, jer ima brojne prednosti – jeftinija je, zahtjeva manju potrošnju energije te osigurava najveće konačne količine CNT uz stvaranje manjih količina otpadnih produkata. S druge strane ova metoda na velikoj skali stvara onečišćenja koja se moraju odstraniti pošto imaju utjecaj na svojstva CNT, što je skup proces [135,136].

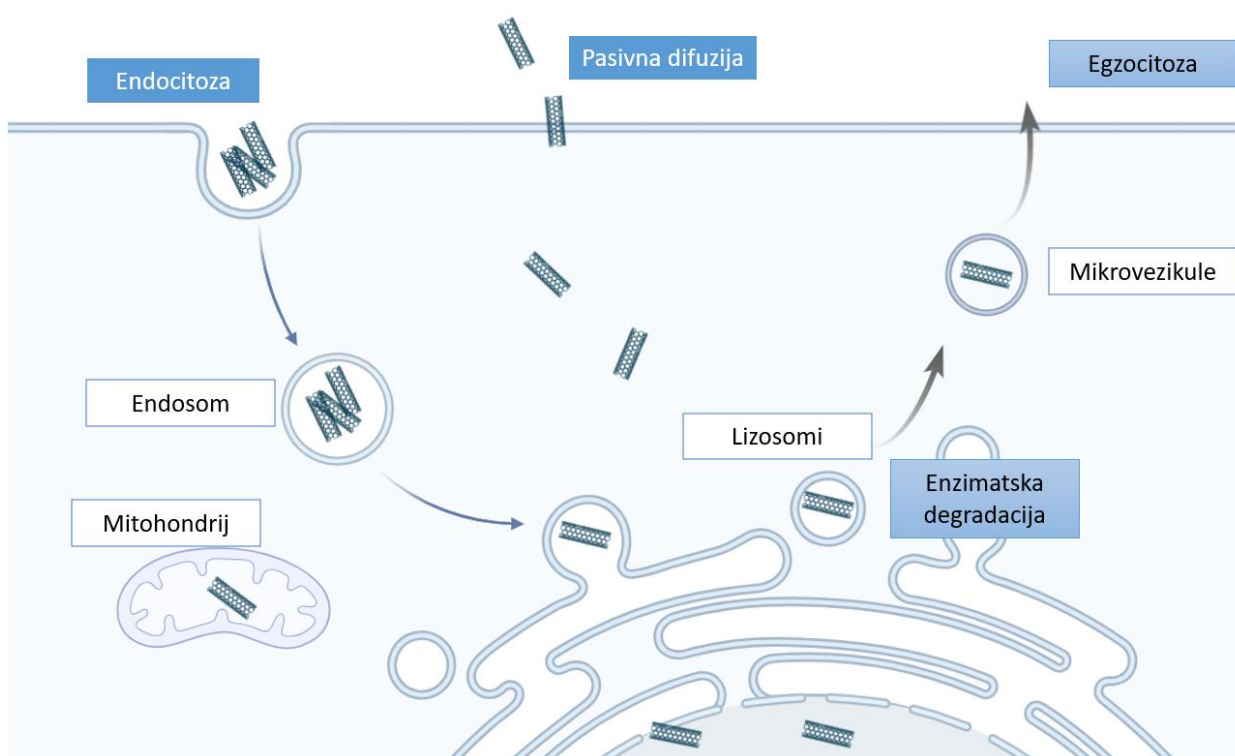


Slika 3. Prikaz razliĉitih sredstava za funkcionalizaciju ugljikovih nanocjevĉica i uĉinci funkcionalizacije na njihova svojstva. DNK – deoksiribonukleinska kiselina, MWCNT – višezidne ugljikove nanocjevĉice, NĀ – nanoĉestice, PABS – poli-m-aminobenzen sulfonska kiselina, PEG – polietilen glikol, RNK – ribonukleinska kiselina, SWCNT – jednozidne ugljikove nanoĉestice.

Hidrofobne po prirodi, CNT imaju veliku toksiĉnost ako se primjenjuju u ĉistom obliku, a veĉinom do nje dolazi zbog agregacije CNT koja je glavni uzrok oštećenja staniĉnih struktura i staniĉne smrti [137]. SWCNT najviše se nakupljaju u lizosomima, ali se njihova citotoksiĉnost najviše oĉituje na mitohondrijima. U tim organelama dovode do oštećenja stijenke, isticanja sadržaja, i stvaranja šupljina. U mitohondrijima dolazi do bubrenja i uništavanja krista, te u konaĉnici i cijelih mitohondrija [138]. Kako bi se učinile biokompatibilnima, CNT se moraju funkcionalizirati, te na taj naĉin povećati njihova topljivost u vodi. Funkcionalizacija moŹe biti s kovalentno ili nekovalentno vezanim molekulama. Za kovalentnu funkcionalizaciju, CNT se izlaŹu jakom oksidacijskom sredstvu poput dušićne kiseline, koja karboksilira krajeve CNT, a karboksilne skupine mogu se kasnije iskoristiti za vezanje drugih molekula, kao Źto su polietilen glikol (PEG) ili poli-m-aminobenzen sulfonska kiselina (PABS) [139]. Dodatkom tih polimera povećava se hidrosolubilnost i otvara potencijal za primjenu CNT u biološkim sustavima. Osim toga, funkcionalizacija se provodi i u svrhu

poboljšanja stvaranja interakcija s različitim biomolekulama poput DNK, RNK i drugih, koje se na nanocjevčice vežu nekovalentnim vezama (Slika 3) [140].

Po pitanju unosa nanocjevčica u stanice, ne postoji jedinstveni mehanizam. Hoće li to biti pasivna difuzija, endocitoza ili fagocitoza, ovisi o svojstvima CNT i vrsti stanice. [141,142]. Smatra se da nakupine nanocjevčica ulaze endocitozom, dok pojedinačne cjevčice, posebice one kraćih dužina, prolaze kroz membranu pasivnom difuzijom, koja se još naziva i difuzija nalik igli [143]. Proces unosa endocitozom posredovan je klatrinom, kaveolama ili folatnim ili lektinskim receptorima. Nakon ulaska u stanicu u sklopu endosoma, usmjeravaju se u lizosome, dok se CNT koje su ušle difuzijom nakupljaju u mitohondrijima, a mogu proći i jezgrenu ovojnicu i nakupljati se u jezgri (Slika 4) [144–146,137]. U makrofage ulaze fagocitozom ili makropinocitozom. Po pitanju ulaska u progenitorske stanice neurona, poznato je da ulaze putem endocitoze posredovana receptorima [147]. Što se tiče sposobnosti prolaska kroz KMB, CNT to čine procesom transcitoze posredovane receptorima ili pasivnim prolaskom zbog svog oblika nalik igli [145], što potvrđuju *in vitro* [148] i *in vivo* istraživanja [90,149].



Slika 4. Životni ciklus ugljikovih nanočestica u stanici.

Ugljikove nanocjevčice spadaju u grupu grafenskih ugljikovih nanomaterijala, koji su iznimno stabilni. Zbog toga je i biodegradacija nanocjevčica spora [150], te se one zadržavaju u stanicama kroz duži period. Koliko će taj period trajati, ovisi o vrsti funkcionalizacije. Npr. CNT koje su karboksilirane, prolaze degradaciju kroz 90 dana unutar fagolizosoma [151]. Nemodificirane nanocjevčice ostaju nepromijenjene nakon 90 dana, kao i one koje su funkcionalizirane ozonom ili arilsulfonatom [151,152]. Dugotrajno zadržavanje nanocjevčica unutar stanice, kao i znanje da se mogu nakupljati u jezgri, ostavljaju prostor za razvijanje potencijalne kronične genotoksičnosti [90].

Iz tijela se CNT mogu eliminirati degradacijom ili u nepromijenjenom stanju. Kemijska degradacija pokazana je prvi put uz pomoć peroksidaze hrena (HRP), u prisutnosti niskih koncentracija vodikovog peroksida (H_2O_2) [153,154]. U stanicama sisavaca, tu funkciju obavlja mijeloperoksidaza, koju proizvode većinom neutrofili, te u manjoj dozi makrofagi. Te stanice pokazale su *in vitro* da imaju sposobnost svojim enzimima potaknuti razgradnju SWCNT na način da polako skraćuju njihove krajeve, dok potpuno ne nestanu, uz oslobađanje CO_2 [155]. To je posebno zanimljivo jer se pokazalo da cjevčice funkcionalizirane PEG-om imaju sposobnost same potaknuti neutrofile na proizvodnju hipoklorne kiseline, koja također potiče degradaciju nanocjevčica [156]. Osim biodegradacijom, SWCNT se odstranjuju iz stanice egzocitozom (Slika 4) [145].

Klirens nanocjevčica iz tkiva je spor proces te se pokazalo da, ovisno o vrsti funkcionalizacije, dolazi do akumulacije nanocjevčica u raznim organima, posebno slezeni i jetri. SWCNT koje su bile vezane na razgranate molekule PEG-a pokazale su najveću inertnost, najmanje interakcija s proteinima krvi i manju opsonizaciju, te smanjenu akumulaciju u organima. Izlučuju se iz organizma većinom bilijarnim putem, kraće nanocjevčice mogu i renalnim [157,158].

1.4.5.2. Toksičnost jednozidnih ugljikovih nanocjevčica

Jedan od velikih problema primjene SWCNT u biološkim sustavima je potencijalna toksičnost cjevčica na stanice i tkiva, kako je prethodno navedeno. Toksičnost CNT značajno će varirati ovisno o čistoći, veličini, funkcionalizaciji, dozi i putu izlaganja. Smatra se da su glavni mehanizmi toksičnosti SWCNT stvaranje ROS i posljedična oksidativna oštećenja, te aglomeracija cjevčica [159,160]. Još jedan od krivaca za toksičnost SWCNT mogu biti i čestice metala zaostale od proizvodnje te se treba obratiti posebnu pozornost na pročišćavanje ovog materijala da se minimizira onečišćenje [161,162].

Kod ljudi velik rizik predstavljaju nanocjevčice u proizvodnji kada se radnici mogu naći u prisutnosti SWCNT raspršenih u zraku. Nakon udisanja SWCNT, pokazalo se da imaju veliku toksičnost na pluća, slično azbestnoj toksičnosti [163,164]. *In vivo*, provedena su istraživanja na miševima gdje su SWCNT bile injektirane u abdominalnu šupljinu ili bile unesene u pluća udisanjem. Oba istraživanja rezultirala su sličnim učincima gdje je također evidentirana toksičnost nalik azbestozi [165]. To uključuje procese upale, stvaranja ROS-a, nakupljanja kolagena i fibroze. Jedan od uzroka tome je sposobnost SWCNT da probiju kroz alveolarni epitel gdje stimuliraju produkciju transformirajućeg faktora rasta $\beta 1$ koji potiče fibrogenezu [162]. Osim toksičnosti na pluća, pokazale su se štetne i za ostala tkiva i stanice – kožu, oko, slezenu i imunološki sustav.

In vitro istraživanja toksičnosti SWCNT pokazala su da nefunkcionalizirane nanocjevčice smanjuju proliferaciju i funkciju stanica mezotelioma, da potiču stvaranje nakupina aktinskih filamenata, deorganizaciju citoskeleta i mijenjaju morfologiju stanice, te da je taj toksični efekt povezan jači kod nakupina cjevčica u stanici nasuprot dispergiranih nanocjevčica. S druge strane, raspršene SWCNT povećavale su apoptozu stanica i poticale gubitak adherencije stanica zbog interakcije s integrinima. Sličan, ali slabiji učinak primijećen je i kod epitelnih stanica [166]. Po pitanju toksičnosti cjevčica na tkivo SŽS-a, pokazalo se da SWCNT izazivaju stres endoplazmatskog retikuluma i remete stabilnost genoma, što se pokazalo analizom brojnih mRNK i miRNK u stanicama astrocita, no ova istraživanja napravljena su s nefunkcionaliziranim cjevčicama [90,167]. Dovode do zastoja stanice u G1 fazi staničnog ciklusa te induciraju apoptozu [162]. Uz to, pokazalo se da nefunkcionalizirane SWCNT uzrokuju velike promjene u metabolizmu, što također doprinosi njihovoj toksičnosti [168], kao i epigenetske promjene poput promjena u metilaciji DNK [169,170].

S druge strane, SWCNT koje su funkcionalizirane s PEG-om, imaju puno višu razinu biokompatibilnosti te su pokazale niže razine toksičnosti u *in vitro* uvjetima, ovisno o dozi [171]. Njihova topljivost je veća, a produkcija ROS-a manja u usporedbi s nefunkcionaliziranim nanocjevčicama [172]. *In vivo* istraživanja akutne toksičnosti SWCNT-PEG na jetru nisu pokazale promjene u izražaju biljega oksidativnog stresa malondialdehida i glutationa (GSH), kao ni biljega ozljede jetre aspartat i alanin aminotransferaze. Proteomska analiza pokazala je promjene u izražaju 14 proteina uključenih u različite procese, posebno porast enzima uključenih u antioksidativne procese [173]. Neke *in vivo* studije pokazale su da SWCNT nemaju značajnu toksičnost kada se primijene intravenski ili intramuskularno, uzimajući u obzir analize histologije i krvi [149,157,174]. Analize stvaranja slobodnih radikala

i aktivnosti iNOS-a u tkivu mozga nakon intratekalne primjene karboksiliranih SWCNT također nisu pokazale značajnu toksičnost [149].

1.4.5.3. Primjena ugljikovih nanocjevčica

Prvotna primjena ugljikovih nanocjevčica bila je unutar različitih strukturalnih materijala, u svrhu poboljšanja njihove čvrstoće, pošto CNT imaju i do 10 puta veću snagu od bilo kojeg drugog sintetskog vlakna. Stoga se koriste u elektronici i optici, za proizvodnju tranzistora, senzora, fotodetektora, elektroda, solarnih ćelija i baterija, te se koriste i kao premazi za metale u svrhu zaštite od hrđanja i poboljšanja čvrstoće i snage [135,140,136].

U medicini su se nanocjevčice počele primjenjivati kao sredstvo za dostavu molekula u ciljane stanice pošto imaju velika adsorptivna svojstva i veliku površinu na koju mogu vezati širok spektar molekula – lijekove, proteine ili nukleinske kiseline. CNT mogu mijenjati farmakokinetiku lijekova koji su vezani na njih, te povećati biodostupnost, odnosno olakšati ulaz lijekovima u stanice i prolaz kroz biološke barijere, od kojih je najznačajnija KMB [145]. Neki od lijekova koji se primjenjuju na ovaj način su paklitaksel, doksorubicin i metotreksat, ali i razni drugi antitumorski spojevi [175–178]. Brojna istraživanja ispituju CNT u svrhu genetske terapije, za dostavu različitih miRNK kojima se mogu regulirati različiti procesi poput angiogeneze ili kao sredstvo za dostavu gena, npr. gena supresora onkogeno [179,146]. U pogledu terapije raka, CNT se mogu koristiti i za fototermalnu terapiju [180,181].

Osim toga, ugljikove nanocjevčice imaju primjenu kao biosenzori, npr. u obliku trakica za detekciju spolnih hormona ili mikročip ploča za detekciju DNK i proteina [135,182]. Sve više se koriste i kao sredstva za biooslikavanje, jer posjeduju sposobnost fluorescencije u polju zračenja blizu infracrvenog, a imaju i veliku stabilnost u različitim biološkim uvjetima gdje pružaju dugotrajan signal [183,184]. Kao sredstva za biooslikavanje mogle bi se koristiti za nadzor raznih patofizioloških procesa poput hipoksije, nekroze ili razvoja tumora. Jedna od najčešćih metoda, koja se koristi za ovakvo biooslikavanje, je Ramanova spektroskopija, ali SWCNT se mogu povezati s radioizotopima ili kontrastnim sredstvima, te vizualizirati i metodama kompjutorizirane tomografije ili magnetske rezonance [185].

Vrlo često koriste se i kao baze za skafolde čime se povećava njihova čvrstoća i provodljivost. Pokazalo se da te potporne matrice napravljene s CNT-ovima imaju povoljne učinke na rast i proliferaciju neuralnog tkiva jer pružaju biokompatibilan okoliš s dobrom provodljivošću koji omogućava migraciju neurona, rast aksona i mijelinaciju. Osim toga, koriste se i kao potporne matrice za srčano, mišićno i koštano tkivo [123,186].

1.4.5.4. Mehanizam djelovanja SWCNT na stanice

Mehanizam djelovanja samih CNT-ova na stanice još nije u potpunosti razjašnjen. Nekoliko studija pokazalo je da male SWCNT, ovisno o koncentraciji, fizički blokiraju kalijeve kanale i ometaju prolaz iona, kao i prijelaz između otvorenog stanja kanala u inaktivno stanje [187]. Kasnije se pokazalo mogućim da je ovaj učinak rezultat djelovanja raznih nečistoća, poput itrija i nikla, katalizatora korištenih u proizvodnji, te da se nakon purifikacije SWCNT ovaj učinak smanjuje [188].

Brojna istraživanja pokazala su da nanocjevčice djeluju na redistribuciju aktinskih filamenata i poremećaj adhezije stanica. Dužina i promjer nanocjevčica su slični kao i kod F-aktina, s kojim mogu ući u interakciju, ili se SWCNT mogu udružiti u „nanouže“ te pokazivati slična svojstva fleksibilnosti kao i sam F-aktin [189]. Osim aktina, SWCNT mogu ući u interakcije i s mikrotubulima, uzrokovati poremećaj stvaranja mitotičkog vretena, oštećenje kromatina i mutagenosti, kao i poremećaje organizacije i transporta organela u citosolu [190].

Zbog svog malog promjera, SWCNT mogu blokirati određene strukturne komponente (šupljine, kanale) u organelima koje odgovaraju njihovom promjeru. Mogu ulaziti u interakcije s ribosomima, proteasomima ili membranom mitohondrija i narušavati njihovu funkciju. Također, mogu ometati funkciju određenih proteina poput HIV-1 proteaze, glutation-S transferaze ili MMP, te se vezati i na molekule DNK i utjecati na njihovu stabilnost i strukturu [190].

Uz sve navedeno, smatra se da SWCNT imaju utjecaj na regulaciju procesa endocitoze i egzocitoze. Jedna studija pokazala je da SWCNT smanjuju mogućnost endocitoze glutamata ovisne o Ca^{2+} te da ometaju ATP-om posredovanu egzocitozu i oslobađanje glutamata. Smatra se da do tog učinka dolazi zbog interakcije SWCNT s vezikularnim proteinima, čime se ometa unos glutamata u vezikule i prijanjanje vezikula na membranu, odnosno njihova fuzija [191].

1.4.5.5. Dosadašnja ispitivanja jednozidnih ugljikovih nanocjevčica na središnji živčani sustav na SŽS

Utjecaj SWCNT-a na SŽS do danas je ispitan u malom broju studija. Jedna od tema proučavanja bili su potencijalni toksični učinci na astrocite. Primjena nefunkcionaliziranih SWCNT-a na staničnu liniju humanih astrocita imala je utjecaj na disregulaciju izražaja brojnih molekula antigena humanih leukocita, te porasta izražaja lamina B1 i određenih miRNK, što je rezultiralo stimulacijom imunološkog odgovora, smanjenja stabilnosti kromatina i

poremećaja genskog izražaja [192]. Dodatna studija na istoj vrsti stanica utvrdila je da su promjene u izražaju mRNK koje dovodi do genotoksičnosti ovisne o transkripcijskim i posttranskripcijskim mehanizmima s kojima interferiraju nanocjevčice [167].

Po pitanju SWCNT-a funkcionaliziranih s PEG-om, dosadašnja *in vitro* ispitivanja učinaka na astrocite pokazala su da ove nanocjevčice uzrokuju promjenu morfologije astrocita, dovode do zaokruživanja i razgranatosti kakve su primijećeni u zrelim astrocitima. Uzrokuju i povećanje aktivnosti GFAP-a, čime se povećava prijenos EAAT1 transportera na površinu stanice, te se omogućava veći kapacitet za unos glutamata iz ECM. Paralelno s porastom GFAP-a raste i izražaj sintaze glutamina koja glutamat pretvara u glutamin, molekulu koja nema svojstva ekscitacije [193]. Po pitanju utjecaja na primarnu kulturu neurona, primjena SWCNT-PEG dovela je do smanjenja broja neurita, ali je potakla njihov rast u duljinu. Mehanizam ovog učinka nanocjevčica bilo je smanjenje utoka Ca^{2+} u neurone i blokada depolarizacije, kao i modulacija vezikularnog recikliranja [194,195].

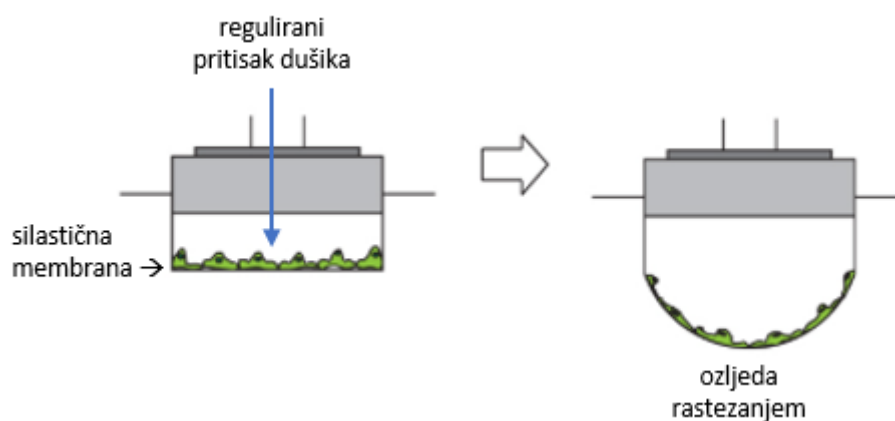
Što se tiče *in vivo* istraživanja utjecaja SWCNT na SŽS, provedeno je istraživanje na hipertenzivnim štakorima injektiranim vodenom otopinom raspršenih SWCNT različitim putovima administracije, koje je pokazalo da nanocjevčice mogu utjecati na kardiovaskularni sustav centralnim mehanizmima. Točnije, SWCNT su prošle kroz KMB, potaknule aktivnost citosolnog NOS-a u *medulli oblongati* i stimulirale proizvodnju NO koji se oslobađao sustavno i djelovao na regulaciju krvnog tlaka [149]. Po pitanju učinka nanocjevčica na ozljedu SŽS-a, do sada je provedeno jedno *in vivo* istraživanje na ozljedi leđne moždine štakora. Aplikacija SWCNT-PEG na mjesto ozljede rezultirala je smanjenjem volumena lezije, popravkom aksona i poboljšanjem lokomotornog oporavka udova [196].

1.5. Modeli traumatske ozljede mozga *in vitro*

Cilj modela TBI *in vitro* je omogućiti istraživanje ozljede na izoliranim populacijama stanica mozga koje su nam od interesa, bez sustavnih utjecaja, ali da imamo što sličniji slijed patofizioloških događaja kakvi su prisutni nakon *in vivo* TBI. Ovi modeli moraju biti precizni, kako bi omogućili istraživanje različitih stupnjeva ozljede, te kako bi bili reproducibilni i omogućili što točnije rezultate, koji će se moći ponavljati između studija [197].

1.5.1. Model ozljede rastezanjem (engl. *stretch-induced traumatic brain injury*)

Za izvođenje ozljede rastezanjem postoji više modela. Jedan od modela koristi utiskivač za deformiranje membrane na kojoj su nasadene stanice, dok drugi model koristi pritisak zraka ili dušika [198].



Slika 5. *In vitro* model traumatske ozljede rastezanjem reguliranim tlakom dušika. Slika prilagođena iz Wu i sur., 2021. [199] objavljena pod licencom *Creative Commons* (CC)

Ozljeda rastezanjem koja se bazira na primjeni komprimiranog plina vrši udarac na stanice uzgajane na površini koja se deformira (Slika 5). Oblik ozljede koji se postiže u ovom modelu je biaksijalan. Prednost je da se ona se može precizno reproducirati i podesiti za postizanje cijelog spektra jačine ozljede uz pomoć preciznog kontrolnog sustava. Ozljeda se provodi brzo, time je i sličnija *in vivo* ozljedi, i obuhvaća stanice na cijeloj membrani u jednakom omjeru [200]. Promjene koje se događaju u stanici nakon ozljede rastezanjem odgovaraju razvoju patofiziologije nakon *in vivo* ozljede [201].

1.5.2. Model ozljede kompresijom

Model ozljede kompresijom koristi se za istraživanje žarišne ozljede i to najčešće teškog oblika. Bazira se na principu ispuštanja utega na tkivo ili stanice u kulturi. Iako se težina utega, oblik utega te trajanje ozljede mogu modificirati ovisno o tome koju težinu ozljede želimo, u konačnici je teško mjeriti konačnu silinu ozljede i razinu deformacije tkiva. Također, ne prolaze sve stanice u kulturi jednaku ozljedu, jer je ona znatno jača u središtu jažica, dok slabi prema stijenkama [202].

1.5.3. Model transekcije

Model ozljede transekcijom (engl. *scratch injury*) koristi se najviše za proučavanje ozljede aksona, posebice u modelu ozljede leđne moždine, ali se primjenjuje i za proučavanje učinka TBI na glija stanice, recimo na astrocitima za proučavanje njihove reaktivnosti. Ozljeda se izvodi oštrim predmetom poput vrška pipete ili igle, te laserom, nakon čega se pokreće kaskada sekundarne ozljede [198].

1.5.4. Model ozljede smicanjem

Ozljeda koja bi modelirala rotaciju glave u traumi može se postići primjenom sila smicanja pomoću rotacijskog diska. Rotacijski disk se postavi iznad stanica nasadenih u kulturu, a ozljeda se modificira regulacijom brzine vrtnje diska, kao i njegovom udaljenosti od stanica. Ozljeda smicanjem može se primijeniti nad cijelom staničnom kulturom ili se mogu ozlijediti pojedinačni aksoni. Za ozljedu određene regije ili aksona medij se ispušta iz mikropipete direktno na mjesto gdje želimo ozljedu.

1.5.5. Model traumatske ozljede eksplozijom

Model traumatske ozljede eksplozijom (engl. *blast-induced traumatic brain injury*) važan je za izučavanje traume koja nastaje nakon aktivacije eksplozivne naprave, a koja je glavni oblik traume koja nastaje u vojnim sukobima. U ovom modelu, stanice su nasadene na vrh ili dno eksperimentalne komorice kroz koju prolaze dvije elektrode koje stvaraju električno izbijanje. Šok valovi i mikromjehurići koji nastaju kao posljedica izbijanja oponašaju *in vivo* ozljedu i uzrokuju oštećenje stanica [203].

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Hipoteza ovog istraživanja jest da SWCNT kemijski funkcionalizirane s PEG-om doprinose povećanom preživljenju astrocita, potiču njihovu proliferaciju te moduliraju njihovu funkcionalnu aktivnost nakon *in vitro* traumatske ozljede inducirane mehaničkim rastezanjem.

Radi provjere postavljene hipoteze definirani su sljedeći ciljevi:

1. Uspostaviti i validirati eksperimentalni model za ispitivanje promjena u primarnoj kulturi astrocita nakon *in vitro* traumatske ozljede izazvane mehaničkim rastezanjem.
2. Ispitati promjene u molekularnim karakteristikama egzosoma koje oslobađaju astrociti nakon *in vitro* TBI.
3. Procijeniti učinke SWCNT-PEG na preživljenje, proliferaciju i funkcionalna svojstva primarne kulture astrocita izložene *in vitro* traumatskoj ozljedi.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Eksperimentalne životinje

U ovoj studiji korišteni su miševi soja C57BL/6, uzgojeni u Centru za uzgoj i inženjering laboratorijskih miševa (LAMRI) u Rijeci. Za svrhe pokusa, novorođeni miševi oba spola stari 1-3 dana bili su žrtvovani dekapitacijom, kako bi se iz njihovih mozгова mogla pripremiti primarna kultura astrocita. Za izolaciju stanica korištene su tri do četiri neovisne skupine miševa različitog materinskog podrijetla, čime je osigurana biološka replikacija. Unutar svake skupine u postupak izolacije uključeno je 4–6 životinja. Svi postupci s miševima provedeni su na Zavodu za temeljnu i kliničku farmakologiju s toksikologijom Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Korištenje životinja za izolaciju primarne stanične kulture odobreno je od strane Etičkog povjerenstva za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta u Rijeci, kao i Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede, a provedeni su u skladu s hrvatskim Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/06, 37/13, 125/13, 55/13, 39/17), koji je usklađen s važećim zakonodavstvom Europske unije (210/63/EU).

3.2. Materijali

3.2.1. Kemikalije

Za provođenje analiza izražaja proteina, korištene su sljedeće kemikalije: akrilamid (C_3H_5NO), albumin goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumine*, BSA), amonijev persulfat ($(NH_4)_2S_2O_8$), Bradford reagens, brom fenol plavi (A.C.S. reagens), cOmplete™ inhibitor proteaza i fosfataza (kat. br. 11873580001), 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), etilendiaminotetraoctena kiselina (EDTA), glicerol, glicin, kloridna kiselina (HCl), metanol, 2-merkaptotanol, mlijeko u prahu, natrijev azid (NaN_3), natrijev dodecil-sulfat (SDS), natrij klorid (NaCl), N, N, N, N-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED), nitrocelulozna membrana, octena kiselina (CH_3COOH), poliviniliden difluorid (PVDF), Ponceau S, streptavidin konjugiranim sa peroksidazom hrena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP), SuperSignal® West Pico kemiluminescentni supstrat, tekući dušik, Triton X®, Tween® 20

Za provođenje imunocitokemijske analize korištene su sljedeće kemikalije: BSA, 4',6'-diamino-2-fenilindol (DAPI), fosfatni pufer (engl. *phosphate buffer saline*, PBS), Mowiol® 4-88, 4% paraformaldehid (PFA), Triton X®

Proizvođači navedenih kemikalija su: Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, Missouri, SAD), Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, SAD), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe, Njemačka), Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, SAD), Kemika d.d. (Zagreb, Hrvatska), Gram-mol d.o.o (Zagreb, Hrvatska), Roche (Basel, Švicarska)

3.2.2. Reagensi i materijali za rad sa staničnim kulturama

Za rad sa staničnim kulturama korišteni su sljedeći materijali i reagensi: BioFlex® ploče sa 6 jažica; medij za uzgoj stanica *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) s fenol crvenom bojom (kat. broj P04-01161) i bez nje (P04-04510); *Dulbecco's phosphate buffer saline* (DPBS); fetalni goveđi serum (*fetal bovine serum*, FBS); konjski serum (engl. *horse serum*, HS); otopina antibiotika i antimikotika (*Antibiotic-antimycotic solution* (100x), kat. broj A5955); ploče za uzgoj stanica (25cm² i 75 cm²); polietilen glikol (PEG); SWCNT-PEG; trypsin 0,5%/EDTA 0,2%/PBS; Trypan blue

Proizvođači navedenih reagensa su: PAN-Biotech (Aidenbach, Njemačka); Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, Missouri, SAD); Carbon Solutions, Inc. (Riverside, California, SAD); FlexCell® International Corporation (Burlington, North Carolina, SAD); Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe, Njemačka); Greiner Group AG (Kremsmünster, Austrija)

3.2.3. Ostali reagensi

Za provođenje ostalih analiza, korišteni su komercijalni kitovi: CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity assay (Promega Corporation; Madison, Wisconsin, SAD); Total Exosome Isolation kit (from cell culture media) (Invitrogen; Carlsbad, California, SAD); Mouse Cytokine Array C3 i Mouse Inflammation Array C1 (Ray Biotech Inc., Norcross, Georgia, SAD); miRNeasy Tissue/Cells Advanced Micro Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka); TaqMan® Advanced miRNA Assays (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD, kat. broj A25576)

3.2.4. Primarna i sekundarna protutijela

Tablica 1. Primarna i sekundarna protutijela korištena u istraživanju

Protutijelo	Imunogen	Proizvođač; kataloški broj; RRID*; vrsta domaćina i tip protutijela	Razrjeđenje
anti-GFAP	nativni GFAP iz leđne moždine svinje	Cell Signaling Technology; 3670; AB_561049; mišje monoklonalno	1:1,000 WB;
anti-EAAT1	sintetski peptid koji odgovara ostatcima oko Glu230 na ljudskoj EAAT1	Cell Signaling Technology; 5685; AB_10694915; zečje monoklonalno	1:1,000 WB;
anti-β-aktin	β-aktin (C4) iz kokoši	Santa Cruz Biotechnology; sc-47778; AB_2714189; mišje monoklonalno	1:1,000
anti-GAPDH	sintetski peptid u humanom GAPDH	Cell Signaling Technology; 2118; AB_561053; zečje monoklonalno	1:5000
anti-iNOS	sintetski peptid koji odgovara mišjem iNOS ak 1-100	Abcam; ab3523; AB_303872; zečje poliklonalno	1:1000
anti-Nrf2	Ag9489	Proteintech; 16396-1-AP; AB_2782956; zečje monoklonalno	1:500
anti-SOD1	ak 1-154 humani SOD1	Santa Cruz Biotechnology; sc-11407; AB_2193779; zečje poliklonalno	1:1000
anti-GPX1	sintetski peptid	Abcam; ab108427; AB_10890636; zečje monoklonalno	1:1000
anti-HO1	rekombinantni fragment	Abcam; ab189491; AB_3096492; zečje monoklonalno	1:1000
anti-HSP70	rekombinantni fragment u humanom HSP70 ak 122-264	Abcam; ab2787; AB_303300; mišje monoklonalno	1:1000
anti-TSG101	humani TSG101 ak 350 do C-terminusa	Abcam; ab30871; AB_2208084; zečje poliklonalno	1:1000
anti-histon3	sintetski peptid	Abcam; ab1791; AB_302613; zečje monoklonalno	1:1000

anti-CD63	sintetski peptid u humanom CD63	Abcam; ab216130; AB_3076642; zečje poliklonalno	1:1000
anti-DNP (OxyBlot™)	sintetski peptid	EMD Millipore, Billerica, MA, SAD; zečje monoklonalno	1:100
biotinylated goat anti-rabbit	gama imunoglobulini	Thermo Fisher Scientific; 65- 6140; AB_2533969; kozje poliklonalno	1:2000
biotinylated goat anti-mouse	gama imunoglobulini	Thermo Fisher Scientific; A16070; AB_2534743; kozje poliklonalno	1:3000
Alexa Fluor™ 488-conjugated goat anti- mouse	gama imunoglobulini	Cell Signaling Technology; 4408; AB_10694704; kozje poliklonalno	1:200
DyLight™ 594-conjugated goat anti-rabbit	gama imunoglobulini	Abcam; ab96901; AB_10679699; kozje poliklonalno	1:200

*RRID, research resource identifier

3.3. Metode

3.3.1. Priprema primarne kulture astrocita

Primarna kultura astrocita uspostavljena je prema prethodno opisanoj proceduri [204], uz manje modifikacije. Mišji mozgovi izolirani su iz novorođenih miševa, koji su bili žrtvovani dekapitacijom. Nakon izolacije, iz mozgova su izolirani korteksi, očišćeni su od moždanih ovojnica, te stavljeni u ledeno hladni medij za stanične kulture. Korteksi su homogenizirani pomoću pipetora, nakon čega su profiltrirani kroz sita s porama 230 μm i 140 μm . Filtrat se centrifugirao kako bi dobio talog, koji je resuspendiran u 2,5 ml DMEM medija, kompletiranog s 10% FBS-a; s dodatkom 1% antibiotika-antimikotika. Medij sa stanicama profiltriran je kroz sito s porama veličine 73 μm . Stanice su izbrojane i nasađene na ploče površine 75 cm^2 , u gustoći 2×10^5 stanica/ cm^2 , te pohranjene u inkubator na 37°C u atmosferi s 5% CO_2 i relativnom vlažnošću zraka 95%. Stanice su uzgajane 7 dana, nakon čega su stavljene na kružnu tresilicu (Unimax 1010 Orbital Platform Shaker, Heidolph, Schwabach, Njemačka). Prvo su tresene 30 minuta na 180 rpm, zatim je promijenjen medij pa su opet tresene 6 sati na 240 rpm, nakon čega je također promijenjen medij. Stanice su potom vraćene u inkubator, gdje su uzgajane dodatnih 7-14 dana prije nego što su iskorištene za daljnje pokuse. Prije pokusa

provedena je maturacija stanica primjenom 10% konjskog seruma. Iz medija za uzgoj stanica postupno je odstranjen serum prije provođenja pokusa.

3.3.2. *In vitro* model traumatske ozljede astrocita mehaničkim rastezanjem

Astrociti su nasadeni na ploče sa 6 jažica, koje imaju silastične membrane na svojem dnu, presvučene s kolagenom tipa I (BioFlex® *culture plates*, Cat. No. BF-3001C; FlexCell® International Corporation, SAD). Nasađeno je 150 000 stanica po jažici u 2,5 ml kompletiranog staničnog medija. Nakon 3-5 dana, kada su stanice postigle konfluentnost, medij stanica zamijenjen je s 2 ml DMEM-a bez fenol-crvene uz dodatak 1% antibiotika-antimikotika. Nakon toga, stanice su podvrgnute udarcu dušika pod pritiskom, provedenom na uređaju Cell Injury Controller II (Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, SAD) (Slika 6). Princip rada ovog uređaja je da kontrolirano ispušta dušik određenim pritiskom koji naglo deformira membranu jažice u kojoj su nasadene stanice, te time dolazi do biaksijalnog rastezanja membrane i ozljede stanica koje koreliraju s *in vivo* traumatskom ozljedom [45]. Pomoću tog uređaja provedeni su udarci različitih jačina koji odgovaraju tipu ozljede u rasponu od blage do teške. Za blagu ozljedu, primijenjen je vršni pritisak od 1,8 psi, za umjerenu ozljedu vršni pritisak od 2,7 psi, dok je za teški oblik ozljede primijenjen je vršni pritisak od 4,0 psi, što je izazvalo rastezanje membrane za 5,5 mm (20%), 6,5 mm (35%) odnosno 7,5-mm (55%), ovisno o jačini ozljede [205,206]. Za pokuse analize proteina i citokina koristila se ozljeda vršnog pritiska od 3,8-4,2 psi, dok su za pokuse karakterizacije egzosoma i izolacije miRNK stanice bile podvrgnute vršnom pritisku od 2,7-2,8 psi. Nakon ozljede, stanice su pohranjene u inkubator.

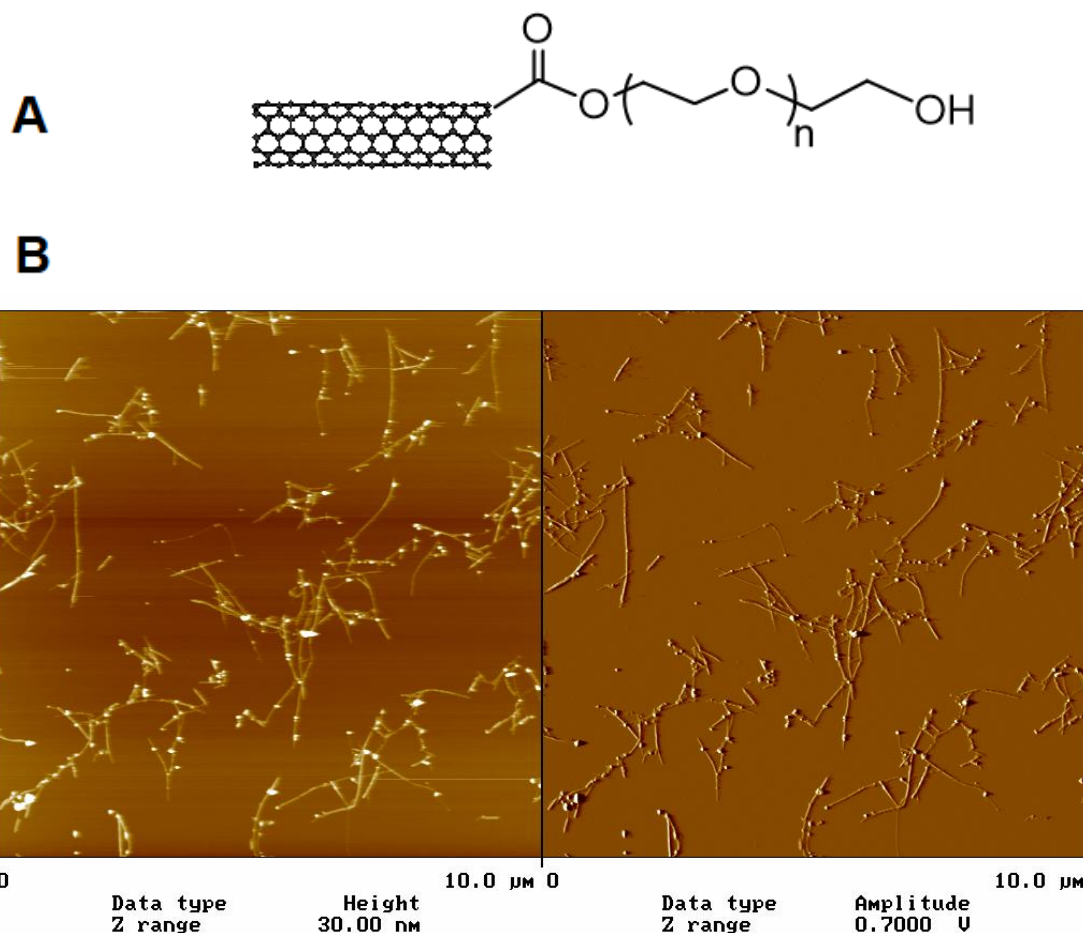


Slika 6. Cell injury controller II, uređaj za provođenje *in vitro* ozljede rastezanjem.

3.3.3. Jednozidne ugljikove nanocjevčice funkcionalizirane s polietilen glikolom

Jednozidne ugljikove nanocjevčice funkcionalizirane karboksilnom kiselinom (SWCNT-COOH) proizvedene su metodom električnog luka u Carbon Solutions, Inc. (Riverside, Kalifornija, SAD), a za ovo istraživanje su bile ljubazno ustupljene od strane prof. dr. sc. Vladimira Parpure s Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou, Kina.

Metoda funkcionalizacije SWCNT-COOH s PEG-om opisana je detaljno je u drugim radovima [207,208]. Ukratko, nanocjevčice su ultrazvučno raspršene u N,N-dimetil formamidu (DMF) (1 L) dok nije nastala homogena otopina. Tretirane su oksalil kloridom kako bi se karboksilna skupina pretvorila u acil klorid. Zagrijavanjem na 70 °C kroz 12 h odstranio se višak oksalil klorida, a kada je smjesa dosegla sobnu temperaturu dodan je PEG (10 g). Zagrijavanjem na 120 °C kroz 5 dana izazvana je reakcija acil kloridnih grupa sa OH-grupama na PEG-u i stvaranjem kovalentnih veza u polimeru. Mješavina je profiltrirana kroz 0.22 μm Teflonske membrane, isprana DMF-om i destiliranom vodom te posušena vakuumom dok se nije dobila suha masa. Dobivene SWCNT-PEG bile su promjera 1.5 nm, te duljine 0.3 – 1.5 μm (Slika 7).



Slika 7. Jednozidne ugljikove nanocjevčice funkcionalizirane s polietilen glikolom (SWCNT-PEG). A) shematski prikaz i B) vizualizacija atomskom silnom mikroskopijom.

Izvor slika: [209]

U dobivenim SWCNT-PEG, 72.3 masenog udjela (wt %) nose SWCNT, 22.6 wt % nose PEG te 5.1 wt % nose metali (nikal i itrij) koji su zaostali kao onečišćenje u proizvodnom procesu. Temeljna otopina SWCNT-PEG u koncentraciji 2.0 mg/mL pripremljena je homogenizacijom ultrazvukom suhe tvari u pročišćenju vodi (ultrazvučni homogenizator Aquasonic 50HT, VWR Scientific, Radnor, Pennsylvania, SAD; snaga 75 W, frekvencija ~ 40 kHz).

3.3.4. Inkubacija primarnih astrocita s SWCNT-PEG ili samo funkcionalizacijskim agensom PEG-om

U svrhu testiranja učinaka SWCNT-PEG, istraživane nanocjevčice dodane su u medij za stanice 1 sat nakon ozljede, u koncentraciji 5 $\mu\text{g/ml}$, nakon čega su stanice vraćene u

inkubator tijekom sljedeća 23 sata (za potrebe istraživanja njihove citotoksičnosti te učinaka na izražaj citokina i proteina od interesa) ili 71 sat (u svrhu ispitivanja učinaka na promjenu sadržaja egzosoma). Temeljna otopina dodana je u medij koji je vorteksiran kako bi se postiglo optimalno raspršenje nanocjevčica i prevenirala agregacija, nakon čega je dodan na stanice. Ova koncentracija izabrana je prema prethodnim istraživanjima njihovih učinaka, a u kojima je pokazan povoljan učinak na astrocite, poput porasta izražaja proteina GFAP i EAAT1 [208,193]. U medij sa stanicama koje nisu bile podvrgnute ozljedi ili su bile ozlijeđene, ali netretirane s nanocjevčicama, dodana je pročišćena voda s PEG (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), u konačnoj koncentraciji od 1 µg/ml PEG-a. Ova koncentracija PEG-a odgovara masenom udjelu PEG-a u SWCNT-PEG (oko 20%). U konačnici, istraživanja su se radila na sljedećim grupama: neozlijeđenim, netretiranim astrocitima; neozlijeđenim astrocitima tretiranim s PEG-om; neozlijeđenim astrocitima tretiranim s SWCNT-PEG-om; astrocitima podvrgnutim ozljedi i tretiranim s PEG-om; te astrocitima podvrgnutim ozljedi i tretiranim SWCNT-PEG-om.

3.3.5. Određivanje stupnja ozljede astrocita

Za određivanje stupnja ozljede astrocita, koristio se test citotoksičnosti CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity assay (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, SAD), koji mjeri otpuštanje enzima laktat dehidrogenaze (LDH) u stanični medij. Princip ovog testa je da LDH konvertira laktat u piruvat uz pretvorbu nikotinamid adenin dinukleotida (NAD⁺) u nikotinamid adenin dinukleotid dehidrogenazu (NADH). NADH koji nastaje iskorištava se za redukciju supstrata koji potom oslobađa boju koja se može detektirati. Jače obojenje upućuje na veću koncentraciju oslobođenog LDH-a u mediju, što ukazuje na veći stupanj staničnog oštećenja ili citotoksičnosti. U prvom pokusu mjerio se utjecaj razine ozljede astrocita (blaga, umjerena i teška) na stupanj citotoksičnosti. Uzorci medija prikupljeni su u vremenskim točkama 15 min, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h nakon ozljede. Uzorci na ploči s 96 jažica tretirani su reagensima iz kita, prema uputama proizvođača, te su analizirani spektrofotometrijskom metodom na čitaču mikroploča BioTek EL808 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD). Za istraživanje učinka SWCNT-PEG na preživljenje uzimali smo uzorke medija neozlijeđenih stanica te stanica podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem tretiranih s PEG-om i stanica podvrgnutim teškoj ozljedi tretiranih sa SWCNT-PEG. Uzorci za analizu uzimani su u istim vremenskim točkama. Rađena su 3 tehnička replikata po biološkom replikatu.

3.3.6. Postupak izolacije egzosoma iz medija za uzgoj stanica

Egzosomi su izolirani iz medija stanica podvrgnutima teškoj ozljedi, s tretmanom SCWNT-PEG ili PEG-om, te medija stanica kontrolne skupine. Mediji su prikupljeni 72 sata nakon ozljede iz svih pokusnih grupa. Zbog ograničenog volumena po jažici, mediji iz više jažica su objedinjeni kako bi se postigao ukupni volumen od približno 20 ml. U te svrhe učinjeno je 4 do 6 tehničkih replikata po biološkom replikatu. Medij je centrifugiran 30 min na 2000 g, kako bi se odvojio stanični otpad. Nadsloj je profiltriran kroz sito s porama veličine 0.2 μm , te je potom prebačen u plastične epruvete za koncentriranje uzoraka (PierceTM Protein Concentrators PES, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Pritom su uzorci centrifugirani na $4000 \times g$ do postizanja volumena od $\sim 500 \mu\text{L}$. U koncentrirani medij dodan je reagens za precipitaciju egzosoma (Total Exosome Isolation Reagent, kat. br. 4478359; Invitrogen; Carlsbad, California, SAD) u omjeru 1:2 u odnosu na volumen medija ($\sim 250 \mu\text{L}$). Nakon homogenizacije na vorteksu, otopina je inkubirana preko noći na $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Sljedeći dan, uzorci su centrifugirani na $10000 \times g$, 1 h na $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Nadsloj je odstranjen, a talog koji sadrži egzosome pohranjen je na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do daljnje upotrebe.

3.3.7. Western blotting

Primjenom ove metode ispitivan je izražaj proteina u stanicama podvrgnutim ozljedi rastezanjem različitih jačina, te u stanicama podvrgnutim teškoj ozljedi tretiranim sa SCWNT-PEG-om ili PEG-om. Uzorci su se dobili liziranjem cijelih stanica astrocita ili izoliranih egzosoma. Rađeni su iz najmanje 3 tehnička replikata po biološkom replikatu. Uzorci stanica pripremljeni su 24 h nakon ozljede, tako što je odstranjen stanični medij, a stanice su tretirane sa $100 \mu\text{L}$ /jažici ledeno hladnog RIPA (*engl. radioimmunoprecipitation assay*) pufera (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TritonX, 1% Na-deoksikolat, 0,1% SDS), kompletiranog s inhibitorima proteaza i fosfataza cCompleteTM. Stanice su postrugane sa silastičnih membrana, a ploča je stavljena 20 min na led na kružnu tresilicu. Nakon toga, lizat je skupljen u tubice i centrifugiran na $14\ 000 \times g$ 10 min na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ dok se nije odvojio talog. Nadslojena tekućina s otopljenim proteinima je prikupljena i pohranjena na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ do daljnje analize. Uzorci proteina iz egzosoma dobiveni su tako što je na talog, dobiven nakon izolacije egzosoma, nanoseno $80 \mu\text{l}$ kompletiranog RIPA pufera. Talog je homogeniziran vorteksiranjem, te ostavljen na ledu 20 min. Dobiveni lizat je centrifugiran na $14\ 000 \times g$ 10 min na $4 \text{ }^\circ\text{C}$ dok se nije odvojio talog, nakon čega se nadsloj pohranio na $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Koncentracija proteina u uzorcima određena je metodom po Bradfordu [210].

Proteini su odvajani na poliakrilamidnom gelu, gdje su nanoseni u koncentracijama ~1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Elektroforeza se provodila na uređaju Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, SAD). Transfer s gela na nitrocelulozne membrane preveden je pomoću uređaja Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, SAD). Membrane su blokirane sa 5% mlijekom u prahu ili 5%-tnom otopinom BSA, u kojima su inkubirane tijekom 1 h, kako bi se spriječilo nespecifično vezanje primarnih protutijela. Primarna protutijela od interesa navedena su u Tablici 1. β -aktin i GAPDH korišteni su kao kontrola. Primarna protutijela inkubirana su preko noći na 4 °C. Nakon toga, membrane su ispirane tri puta po 10 min s TBS-om (*engl. Tris-buffered saline*) koji sadrži 0,1% Tween-a (TBST) i inkubirane 1 h s odgovarajućim sekundarnim protutijelom. Sekundarna protutijela prikazana su u Tablici 1. Nakon inkubacije, membrane su ispirane tri puta po 10 min s TBST-om. Za vizualizaciju proteina, korišten je kemiluminiscentni supstrat SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Membrane su snimane na skeneru Kodak Image Station 440, te analizirane u programu Kodak 1D (v.3.6.5, Kodak Scientific Imaging Systems, Rochester, New York, SAD).

3.3.8. Dot blotting

Dot blot metoda korištena je za određivanje sadržaja karboksiliranih proteina što ukazuje na razine oksidativne štete na proteinima. Ovaj pokus provodio se samo na stanicama podvrgnutima teškoj ozljedi s tretmanom SCWNT-PEG-om ili PEG-om, te kontrolnoj, neozlijeđenoj, netretiranoj skupini. 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) tvori 2,4-dinitrofenilhidrazon (DNP hidrazon) kada dođe u kontakt s karbonilnim skupinama na proteinima. Radilo se najmanje 3 tehnička replikata po biološkom replikatu. Svaki uzorak uzet je u 2 alikvota, od kojih se jedan podvrgnuo reakciji, dok je drugi služio kao negativna kontrola. Uzorci proteina su tretirani s 10 mM DNPH, u prisutnosti 12% natrijevog dodecil sulfata (*engl. sodium dodecyl sulfate, SDS*), tijekom 15 min na sobnoj temperaturi (20-25 °C), u mraku. Zatim se uzorak tretirao s neutralizacijskom otopinom, koja se sastoji od 2 M Trisa, 30 % glicerola i 19% 2-merkaptoetanol. Uz pomoć naprave za dot blot (Clever Scientific Ltd, Warwickshire, UK), uzorci su nanoseni na PVDF membranu, koja se zatim osušila tijekom 15 minuta i potom tretirala s koncentriranom octenom kiselinom, te vodom. Membrane su ispirane puferom za ispiranje (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween; TBST2), nakon čega su blokirane s 5% BSA tijekom 1 sata. Zatim su membrane tretirane s anti-DNP protutijelom (OxyBlot™, EMD Millipore, Billerica, MA, SAD), u razrjeđenju 1:100, te su inkubirane preko noći na 4 °C. Nakon inkubacije, membrane su ispirane s TBST2, tri puta po 5

minuta, te je na njih nanoseno sekundarno kozje anti-zečje protutijelo u razrjeđenju 1:3000. Inkubacija je trajala 1 h, na sobnoj temperaturi, nakon čega su se membrane opet isprale sa TBST2. Inkubacija sa streptavidinom konjugiranim s HRP trajala je 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega su membrane opet isprane s TBST2. Zatim je dodan supstrat za detekciju SuperSignal™ West Pico PLUS, te su membrane snimane na skeneru Kodak Image Station 440, i analizirane u programu Kodak 1D.

3.3.9. Analiza citokina

Skupine koje su se koristile u ovom pokusu bile su: neozlijeđene, netretirane stanice; neozlijeđene stanice tretirane PEG-om, neozlijeđene stanice tretirane SWCNT-PEG-om; stanice podvrgnute teškoj ozljedi rastezanjem, tretirane PEG-om, te stanice podvrgnute ozljedi, tretirane SWCNT-PEG-om. Razine oslobođenih citokina mjerile su se iz 1 ml staničnog medija, koji se skupljao 24 h nakon ozljede ili lažne ozljede. Medij je bio centrifugiran 5 min na 1200 rpm kako bi se odstranio stanični otpad. Kitovi za detekciju citokina koji su se koristili su Mouse Cytokine Array C3 i Mouse Inflammation Array C1 (Ray Biotech Inc., Norcross, Georgia, SAD), koji mogu odrediti koncentracije 62, odnosno 40, citokina. Kitovi su se koristili u skladu s uputama proizvođača. Medij staničnih kultura u volumenu od 200 µL nanošen je na membrane koje su priložene u kitu, nakon čega su se membrane tretirale s primarnim protutijelom i otopinom streptavidina konjugiranog s HRP. Vizualizacija se provela pomoću skenera Kodak Image Station 440, a analiza u programu Kodak 1D.

3.3.10. Izolacija miRNK iz egzosoma

Iz taloga koji je dobiven nakon izolacije egzosoma, izolirana je miRNK. Za izolaciju se koristio miRNeasy Tissue/Cells Advanced Micro Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka), te je ona provedena prema protokolu proizvođača. Za dobivanje dovoljnih količina miRNK za analizu, rađeno je 4-6 tehničkih replikata po biološkom replikatu. Kit sadržava reagens za lizu uzoraka, inhibiciju RNaza, kolone za eliminaciju gDNK, reagens za precipitaciju proteina i kolone za pročišćavanje i izolaciju miRNK. Nakon izolacije, miRNK zaleđena je u tekućem dušiku i pohranjena na -80°C do daljnje upotrebe. Kvantifikacija miRNK napravljena je na uređaju NanoPhotometer P300 (IMPLEN GmbH, Munchen, Njemačka).

3.3.11. Analiza izražaja miRNK

Nakon izolacije miRNK, rađena je reverzna transkripcija i amplifikacija pomoću TaqMan® Advanced miRNK Assays sustava (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD, kat. br. A25576), prema uputama proizvođača. Korišteno je 2 µL eluata

miRNK po reakciji. Reakcije su uključivale četiri uzastopne faze: poliadenilaciju, ligaciju adaptora, reverznu transkripciju (RT) i predamplifikaciju (miR-Amp). Ukratko, u prvoj fazi izvedena je poliadenilacija RNK inkubacijom sa specifičnom enzimskom smjesom na 37 °C tijekom 45 minuta. Zatim je provedena ligacija adaptora pomoću RNK ligaze i PEG 8000, pri 16 °C kroz 60 minuta. Slijedila je reverzna transkripcija korištenjem univerzalnog RT primera i odgovarajuće enzimске smjese, pri čemu su reakcije inkubirane na 42 °C kroz 15 minuta. Dobiveni cDNK podvrgnut je miR-Amp amplifikaciji, koristeći odgovarajuću predamplifikacijsku smjesu s ciljanim početnicama, u reakciji koja uključuje 14 ciklusa denaturacije i elongacije. Za kvantifikaciju izražaja pojedinih miRNK korištena je real-time PCR analiza s odgovarajućim TaqMan probama i Fast Advanced Master Mixom (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Reakcije su provedene u dva tehnička ponavljanja, a analiza rezultata izvršena je korištenjem $\Delta\Delta C_t$ metode. Svi termociklički protokoli izvedeni su prema preporučenim postavkama za QuantStudio™ sustav.

3.3.12. Imunocitokemija

Nakon provedene ozljede stanica i inkubacije 24 h, sa stanica je odstranjen medij, te su one isprane 2 puta sa PBS-om. U svaku jažicu je dodano 400 μ l 4% PFA 20 min, s ciljem fiksacije stanica na podlogu. PFA se odstranio, a svaka jažica se isprala 2 puta s PBS-om. Membrana Flex ploče izrezana je skalpelom na komade od interesa i tretirana 0,2% TritonX u PBS-u tijekom 20 minuta, kako bi se postigla permeabilizacija. TritonX je odstranjen, a jažice isprane PBS-om. Za analizu EAAT1 nije rađena permeabilizacija. Membrana je blokirana 3% BSA u PBS-u tijekom 30 min, nakon čega se tretirala s primarnim protutijelom (antiGFAP, anti-EAAT1) otopljenim u 1% BSA/PBS. Inkubacija primarnih protutijela je bila tijekom noći na 4°C. Primarno protutijelo isprano je 3 puta PBS-om, te je membrana tretirana odgovarajućim sekundarnim protutijelom obilježenim fluorokromom u koncentraciji 1:200 tijekom 2 h na sobnoj temperaturi. Sekundarno protutijelo je isprano 2 puta PBS-om i jednom s ultrapročišćenom H₂O nakon čega se nakapala nuklearna boja DAPI, koncentracije 1 μ g/ml, i inkubirala 1 min. DAPI je ispran s upH₂O, a membrane su montirane na stakla za mikroskopiju pomoću medija za uklapanje Mowiol®. Za vizualizaciju stanica koristio se Olympus IX73 inverzni mikroskop (Olympus Corporation, Tokio, Japan). Za snimanje mikrofotografija korišten je program CellSense Imaging (Olympus Corporation, Tokio, Japan), a analizirane su pomoću programa ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, SAD).

3.3.13. Prikupljanje, obrada podataka i statistička analiza

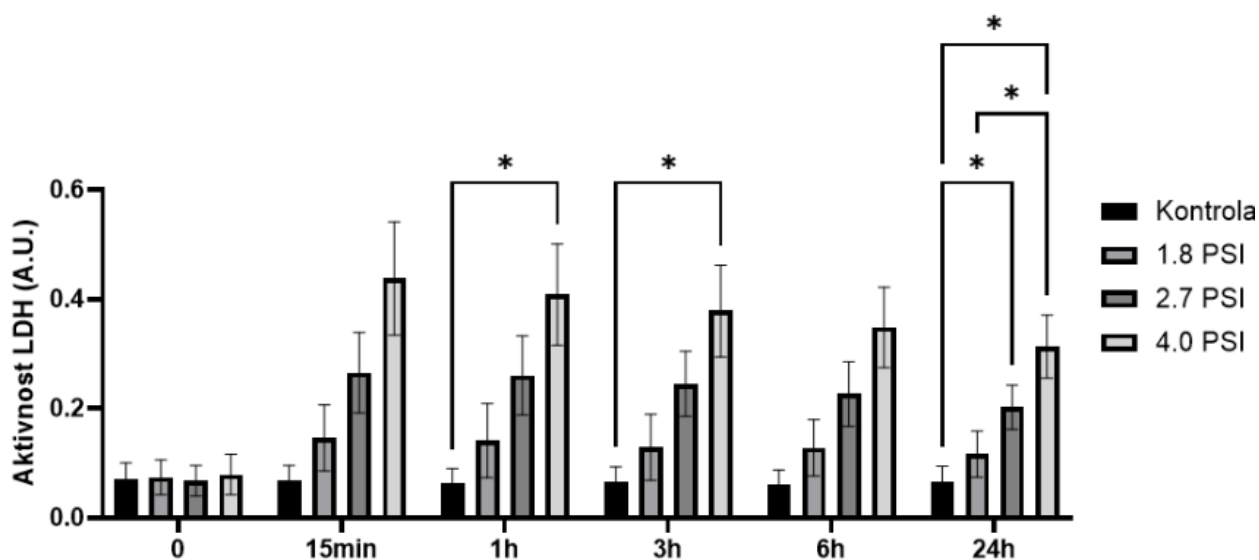
Sve analize provedene su na najmanje tri odvojena, neovisna eksperimenta (biološka replikata). U analizama Western blot i dot blot mjerenja, kao i kod određivanja razina citokina, svaka membrana predstavlja jedan biološki replikat. Bendovi korišteni za denzitometrijsku analizu su snimani i pohranjeni kao .bip datoteke, te posjeduju sirove podatke koje generira Kodak Image Analysis sustav za obradu slika. U ovoj vrsti datoteka zadržava se puni dinamički raspon te se razine intenziteta mogu skalirati bez gubitka informacija. Denzitometrijska analiza provedena je na izvornim (neskaliranim) podacima, analiziranim u Kodak Image Analysis sustavu za obradu slika. Podaci su prikupljeni pomoću programa Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, SAD) i, po potrebi, korigirani su za varijacije između sesija kako je prethodno opisano [211]. Statističke analize provedene su pomoću programa GraphPad Prism 10 (GraphPad Inc., San Diego, CA, SAD). Raspodjela podataka procijenjena je na normalnost korištenjem odgovarajućih testova normalnosti. Na temelju distribucije i homogenosti varijance, primijenjeni su parametarski ili neparametrijski statistički testovi. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti \pm standardne devijacije (SD) ili standardne pogreške sredine (SEM), kako je navedeno u opisu slika i tablica. U grafičkim prikazima srednje vrijednosti prikazane su stupcima, dok su SD ili SEM prikazani kao linije pogreške. U svim usporedbama, vrijednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Karakterizacija modela traumatske ozljede rastezanjem *in vitro* na primarnu kulturu mišjih astrocita

4.1.1. Utjecaj različitih stupnjeva ozljede rastezanjem na preživljenje astrocita

Prvi cilj ovog istraživanja bio je uspostaviti model za istraživanje promjena u primarnoj kulturi astrocita nakon *in vitro* ozljede rastezanjem. Astrociti su nasađeni na ploče sa silastičnim membranama, a nakon što su postigli konfluentnost na njima je izvršena ozljeda. Ispitan je utjecaj blage (1.8 PSI), umjerene (2.7 PSI) i teške (4.0 PSI) ozljede na njihovo preživljavanje, unutar 24 h nakon ozljede. Razina oštećenja astrocita mjerena je u vremenskim točkama od 15 min, 30 min, 1 h, 6 h, 12 h i 24 h nakon ozljede. Kao kontrola korišteni su neozlijeđeni astrociti. Rezultati su pokazali da teška ozljeda uzrokuje značajni porast aktivnosti LDH u mediju za uzgoj stanica u vremenskim točkama od 1 h, 3 h i 24 h, dok blaga ozljeda nije imala značajan utjecaj na vijabilnost stanica u usporedbi s kontrolom. Astrociti izloženi umjerenom ozljedi pokazali su značajan pad vijabilnosti tek 24 h nakon ozljede (Slika 8).



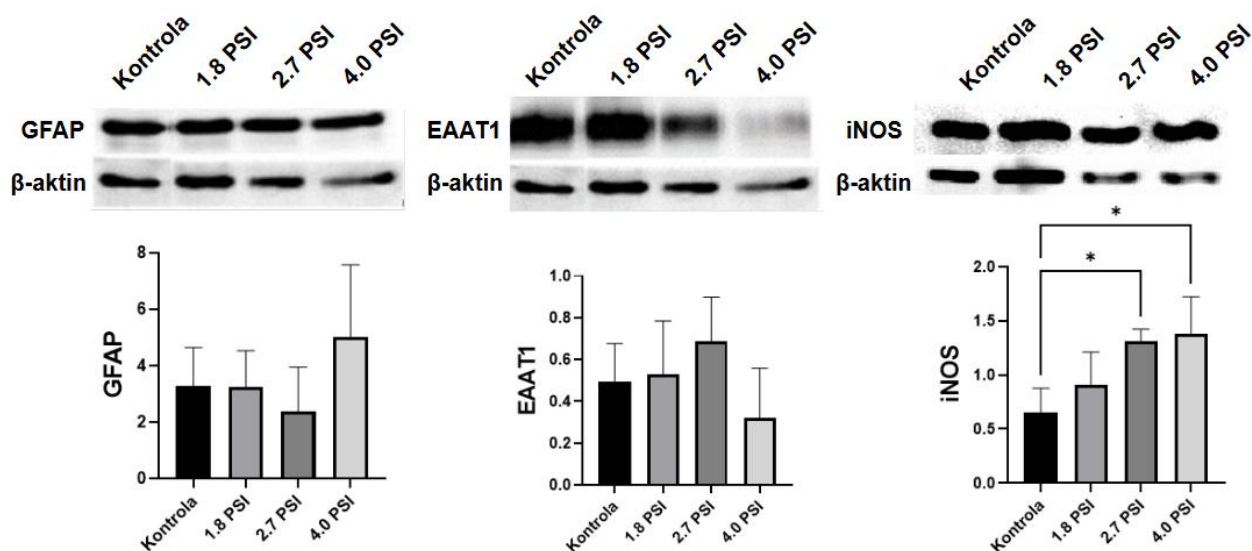
Slika 8. Utjecaj različitih stupnjeva ozljede rastezanjem *in vitro* na oslobađanje laktat dehidrogenaze (LDH) u primarnim mišjim astrocitima. Astrociti su podvrgnuti ozljedi blagog (1.8 PSI), umjerenog (2.7 PSI) ili teškog (4.0) stupnja. Kontrolne stanice su neozlijeđene. Mediji za stanične kulture prikupljeni su u različitim vremenskim točkama nakon ozljede (15 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h i 24 h), iz kojih je kvantificirano oslobađanje LDH. Rezultati su izraženi kao proizvoljne jedinice (engl. *arbitrary units*, A.U.) odnosno srednje vrijednosti ±

SD (N = 3). *p < 0,05, značajno različito od kontrolne (neozlijeđene i tretirane nosačem) skupine (dvosmjerna ANOVA, Tukeyev HSD *post-hoc* test). Nije bilo značajne promjene aktivnosti LDH tijekom vremena u kontrolnoj skupini.

4.1.2. Utjecaj ozljede na izražaj EAAT1, GFAP i iNOS proteina

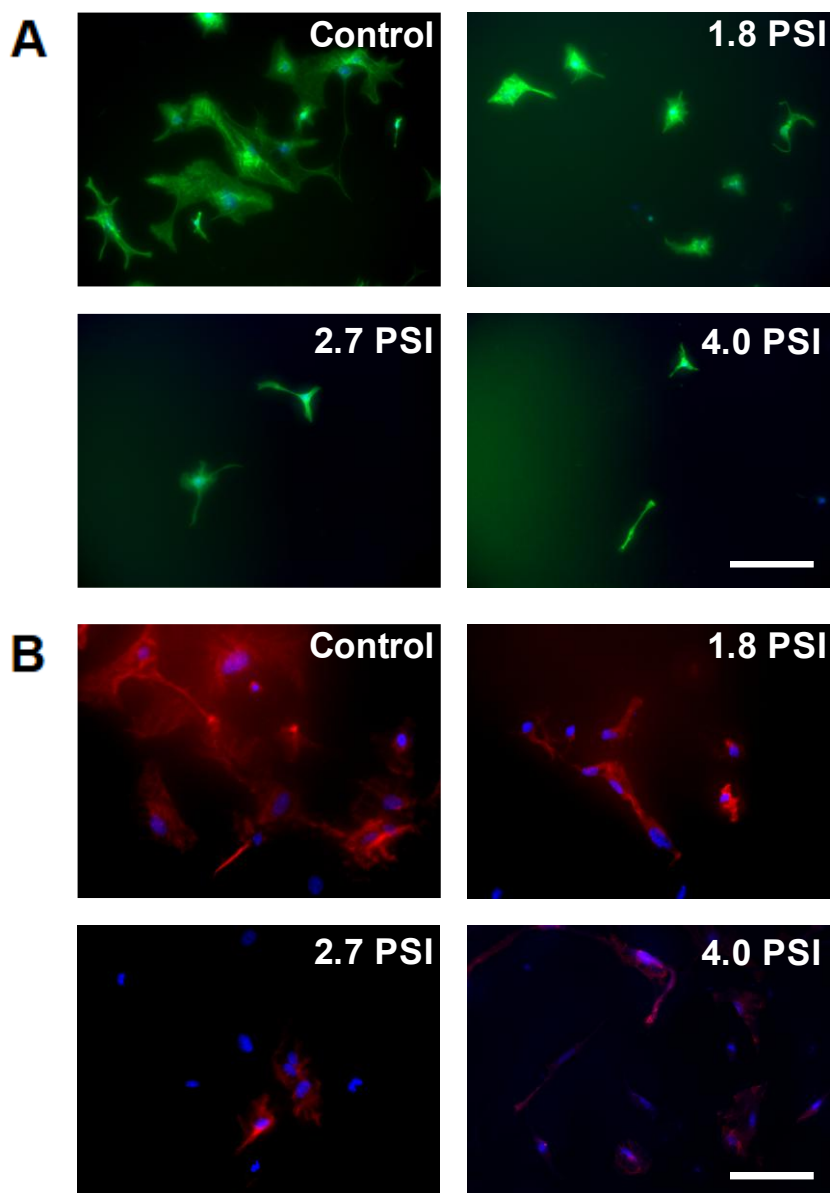
Sljedeći korak bio je ispitati kako ozljeda različitog stupnja utječe na razine odabranih proteina čiji izražaj nam je važan u kontekstu TBI, odnosno odgovora astrocita na istu. Analize su provedene Western blot metodom. Proteini od interesa bili su GFAP, korišten kao biljeg astrocitne reaktivnosti, budući da je njegov povećani izražaj obilježje reaktivne astroglioze; EAAT1, jedan od ključnih astrocitnih transportera glutamata uključen u regulaciju izvanstanične koncentracije glutamata; te iNOS, biljeg upalnih procesa i reaktivnog fenotipa astrocita.

Astrociti u kulturi podvrgnuti su blagoj, umjerenoj i teškoj ozljedi, a 24 h kasnije su lizirani za pripremu uzoraka za Western blot analizu. Rezultati denzitometrijskih analiza prikazani su na Slici 9. Analize izražaja GFAP-a pokazale su da nema značajnih oscilacija u izražaju ovog proteina niti u kojem stupnju ozljede u odnosu na kontrolne, neozlijeđene stanice. Kod analize izražaja EAAT1, blaga i umjerena ozljeda nisu imale utjecaj na promjene njegovih razina, dok je u uvjetima teške ozljede izražaj ovog glutamatnog transportera bio značajno snižen. Što se tiče proupalnog enzima iNOS, uočava se značajan porast izražaja ovog proteina i kod umjerene i kod teške ozljede rastezanjem u usporedbi s kontrolnim, neozlijeđenim stanicama i blagom ozljedom.



Slika 9. Učinak blage (1,8 PSI), umjerene (2,7 PSI) i teške (4,0 PSI) ozljede rastezanjem *in vitro* na izražaj proteina GFAP, EAAT1 i iNOS u primarnoj kulturi mišjih astrocita. Stanice su podvrgnute različitim stupnjevima mehaničke ozljede, a 24 sata nakon tretmana lizirane su i analizirane metodom Western blot. Kao kontrola korištene su neozlijeđene stanice. Prikazani su reprezentativni blotovi, a grafički prikazi predstavljaju denzitometrijsku analizu izražaja GFAP (50 kDa) (A), EAAT1 (60 kDa) (B) i iNOS (130 kDa) (C). Rezultati su korigirani za vrijednosti izražaja β-aktina (42 kDa) i izraženi kao srednja vrijednost ± SD (N = 3-4). *p < 0,05 značajno različito od kontrolne skupine (jednosmjerna ANOVA s Tukey HSD *post hoc* testom).

Nakon provođenja ozljeda različitog stupnja, astrociti su bili vizualizirani i imunofluorescencijom. Stanice su fiksirane na silastične membrane i obojane odgovarajućim protutijelima 24 h nakon provođenja ozljede. Iz mikrofotografija očitava se značajan gubitak stanica nakon umjerene i teške ozljede (Slika 10).



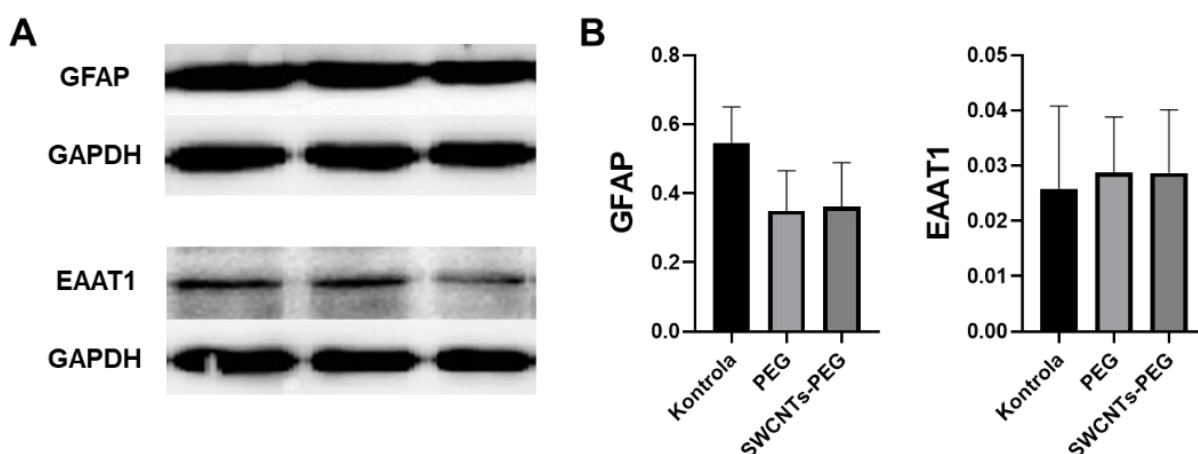
Slika 10. Reprezentativne mikrofotografije prikazuju raspodjelu i intenzitet imunoreaktivnosti GFAP-a (A) i EAAT1 (B) u kontrolnim te blago (1,8 PSI), umjereno (2,7 PSI) i teško (4,0 PSI) ozlijeđenim stanicama 24 h nakon ozljede rastezanjem *in vitro*. GFAP i EAAT1 detektirani su primjenom specifičnih primarnih protutijela i odgovarajućih fluorescentno obilježenih sekundarnih protutijela, dok su jezgre stanica kontrastno obojene DAPI-jem (plavo). Linija skale: 50 μ m.

4.2. Učinci funkcionaliziranih nanocjevčica (SWCNT-PEG) na primarnu kulturu mišjih astrocita

Sljedeći cilj bio je procijeniti učinke funkcionaliziranih nanocjevčica (SWCNT-PEG) na primarnu kulturu astrocita. Astroцити su bili tretirani s 5 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT-PEG, što je koncentracija koja je u prethodnim studijama pokazala netoksičnom, ali i iskazala modulacijske učinke na astroцитима [193,212]. Učinci SWCNT-PEG na stanice uspoređivani su s tretmanom s 1 $\mu\text{g/mL}$ funkcionalizacijskim sredstvom PEG-om, što odgovara masenom udjelu PEG-a u molekuli SWCNT-PEG. Kontrolna skupina bile su netretirani astroцити. Inkubacija s navedenim tretmanima trajala je 23 h. Nakon inkubacije, stanice su lizirane za pripremu uzoraka za analizu izražaja proteina metodom Western blot, a medij iz staničnih kultura se prikupljao za analizu citokina.

4.2.1. SWCNT-PEG nemaju utjecaj na izražaj proteina GFAP i EAAT1

Za početak, ispitivan je učinak primjene kemijski funkcionaliziranih SWCNT na izražaj pojedinih proteina u astroцитима. Dva proteina koja su nam bila najzanimljivija u pogledu utjecaja ozljede na funkciju stanica su biljeg astrocita GFAP te transporter za ekscitacijske aminokiseline EAAT1. Slika 11 prikazuje reprezentativne blotove (A), kao i njihove pripadajuće denzitometrijske analize (B). Rezultati ukazuju na to da ni PEG niti SWCNT-PEG nemaju sami po sebi značajnog utjecaja na razine ovih proteina, u usporedbi s kontrolnim, netretiranim stanicama.



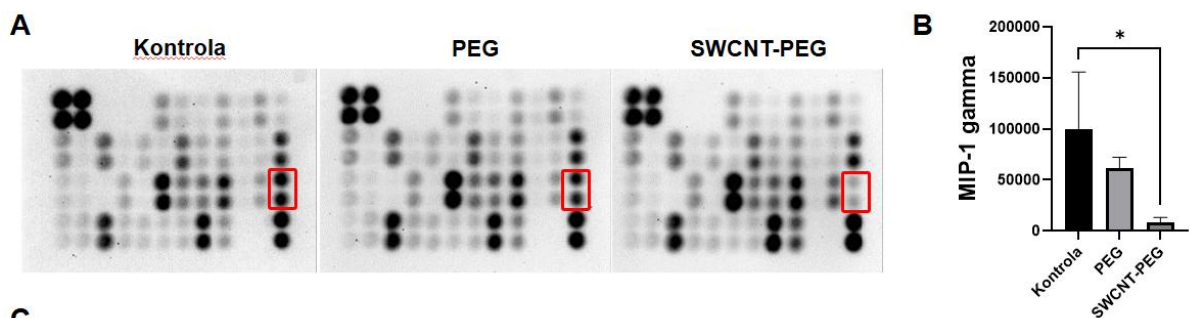
Slika 11. Učinci jednozidnih ugljikovih nanocjevčica funkcionaliziranih s PEG-om (SWCNT-PEG) i samog funkcionalizacijskog sredstva PEG-a na izražaj proteina GFAP

i EAAT1 u primarnoj kulturi astrocita. Stanice su bile netretirane ili tretirane sa SWCNT-PEG ili PEG te lizirane nakon inkubacije u trajanju od 23 h. Prikazani su reprezentativni blotovi (A) i histogrami (B) koji prikazuju rezultate denzitometrijske analize izražaja GFAP (50 kDa) i EAAT1 (60 kDa). Rezultati su korigirani za vrijednosti izražaja GAPDH (36 kDa) i izraženi kao srednja vrijednost \pm SD (N = 3-6).

4.2.2. Utjecaj SWCNT-PEG na oslobađanje citokina

Astrociti su jedni od glavnih sekretornih stanica mozga, te sa svojim citokinima reguliraju brojne funkcije neurona i drugih glija stanica, a posebice su važni u upalnom odgovoru [50,213]. Za procjenu učinaka koje bi tretman SWCNT-PEG i PEG-om mogli imati na razinu oslobođenih citokina koristio se kit Mouse Inflammation Array C1 koji mjeri izražaj 40 citokina važnih u upalnim procesima. Istraživani citokini navedeni su u Tablici 2.

Za analize citokina koristio se medij iz kultura astrocita prikupljen 23 h nakon tretmana. Za utvrđivanje mogućih učinaka PEG-a i SWCNT-PEG na same astrocite koristile su se neozliježene stanice. U mediju tretiranom PEG-om, u odnosu na kontrolu, nije bilo značajnih razlika u izražaju niti jednog od ispitivanih citokina. U mediju stanica tretiranih SWCNT-PEG primijećeno je značajno sniženje izražaja citokina MIP-1 γ , u usporedbi i sa kontrolom i medijem stanica tretiranih samo PEG-om (jednosmjerna ANOVA, $p=0.038$) (Slika 12).



C

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
Each antibody is spotted in duplicate vertically	1	POS	POS	NEG	NEG	Blank	BLC (CXCL13)	CD30 Ligand (TNFSF8)	Eotaxin-1 (CCL11)	Eotaxin-2 (MIP1-2/CCL24)	Fas Ligand (TNFSF6)	Fractalkine (CX3CL1)	GCSF
	2												
	3	GM-CSF	IFN-gamma	IL-1 alpha (IL-1 F1)	IL-1 beta (IL-1 F2)	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-12 p70
	4												
	5	IL-13	IL-17A	I-TAC (CXCL11)	KC (CXCL1)	Leptin	LIX	Lymphotactin (XCL1)	MCP-1 (CCL2)	M-CSF	MIG (CXCL9)	MIP-1 alpha (CCL3)	MIP-1 gamma
	6												
	7	RANTES (CCL5)	SDF-1 alpha (CXCL12 alpha)	I-309 (TCA-3/CCL1)	TECK (CCL25)	TIMP-1	TIMP-2	TNF alpha	TNF RI (TNFRSF1A)	TNF RI (TNFRSF1B)	Blank	Blank	POS
	8												

Slika 12. Utjecaj SWCNT-PEG i PEG na oslobađanje citokina u primarnim mišjim astrocitima. Stanice su bile netretirane (kontrola) ili tretirane sa SWCNT-PEG ili PEG tijekom 23 h, nakon čega je analiziran citokinski profil u staničnom mediju. (A) Reprezentativne citokinske membrane; crvenim kvadratom označeni su citokini sa značajnom promjenom signala. (B) Značajno smanjenje razine MIP-1 γ u skupini tretiranoj sa SWCNT-PEG u usporedbi s kontrolom. Podatci su izraženi kao srednja vrijednost \pm SD. * $p < 0,05$ značajno različito od kontrolne skupine (jednosmjerna ANOVA s Tukey HSD post hoc testom). (C) Shematski prikaz rasporeda citokina na membrani.

Tablica 2. Rezultati multipleks analize citokina iz uzoraka medija astrocita tretiranih PEG-om ili SWCNT-PEG-om. Citokini su navedeni abecednim redom. Podatci su izraženi kao srednja vrijednost \pm SEM. * $p < 0,05$ označava statistički značajne razlike između skupina (jednosmjerna ANOVA s Tukey HSD *post hoc* testom).

	Kontrola		PEG		SWCNT-PEG		<i>p</i>-vrijednost
	Srednja vrijednost	\pm SEM	Srednja vrijednost	\pm SEM	Srednja vrijednost	\pm SEM	
BLC	12560	\pm 3015	12481	\pm 1809	10658	\pm 1367	0.791
CD30L	6816	\pm 1474	5824	\pm 886	5772	\pm 598	0.742
Eotaksin	2670	\pm 717	1910	\pm 145	1701	\pm 302	0.353
Eotaksin-2	8900	\pm 1374	8638	\pm 604	8864	\pm 766	0.979
FAS ligand	2846	\pm 189	2742	\pm 110	2687	\pm 278	0.858
Fraktalkin	15659	\pm 1178	15866	\pm 1025	17410	\pm 271	0.394
G-CSF	2504	\pm 62	3050	\pm 429	2983	\pm 431	0.528
GM-CSF	8466	\pm 2400	7473	\pm 1065	6487	\pm 925	0.700
IFN- γ	2330	\pm 405	1898	\pm 226	1136	\pm 138	0.059
IL1- α	23515	\pm 4326	21113	\pm 1366	18503	\pm 1893	0.500
IL1- β	1862	\pm 205	2371	\pm 930	1060	\pm 303	0.336
IL2	4488	\pm 1028	4381	\pm 151	3934	\pm 640	0.844
IL3	1913	\pm 501	2295	\pm 152	1956	\pm 314	0.716
IL4	31027	\pm 11283	18523	\pm 3996	11987	\pm 2978	0.237
IL6	2819	\pm 428	2612	\pm 334	1986	\pm 246	0.280
IL9	7597	\pm 799	7781	\pm 184	8436	\pm 621	0.603
IL10	1744	\pm 121	2132	\pm 171	1863	\pm 207	0.324
IL12-p40/p70	3070	\pm 544	3006	\pm 626	3283	\pm 791	0.954

IL12-p70	16631	± 983	15564	± 1239	17786	± 1237	0.449
IL13	6324	± 1505	6905	± 958	7039	± 998	0.903
IL17	2336	± 355	2610	± 220	2006	± 368	0.460
I-TAC	2797	± 471	2618	± 166	2058	± 235	0.303
KC	16338	± 3828	16306	± 1882	13862	± 3390	0.821
Leptin	1306	± 347	1339	± 146	1258	± 297	0.979
LIX	42406	± 7081	38489	± 3903	33905	± 2487	0.508
Limfotaktin	11457	± 1088	11111	± 752	10266	± 782	0.642
MCP-1	22598	± 1744	20876	± 3223	24203	± 3872	0.757
M-CSF	26969	± 2142	30575	± 716	28239	± 2334	0.438
MIG	1023	± 242	1521	± 253	1533	± 252	0.325
MIP-1- α	9421	± 2369	7722	± 753	10407	± 2559	0.666
MIP-1- γ	100010	± 32148	61422	± 6244	8175	± 2957	0.038*
RANTES	10348	± 1620	8082	± 212	5814	± 1087	0.079
SDF-1	7165	± 1010	5958	± 291	5038	± 477	0.157
TCA-3	32171	± 5981	29170	± 2886	29705	± 2865	0.866
TECK	2424	± 187	4090	± 655	4439	± 724	0.098
TIMP-1	5416	± 517	6486	± 614	4841	± 51	0.112
TIMP-2	5168	± 391	5111	± 411	4079	± 183	0.115
TNF-alfa	4538	± 353	5264	± 457	4890	± 118	0.381
sTNF RI	40916	± 4356	36272	± 1380	40744	± 3058	0.538
sTNF RII	20143	± 3752	20787	± 1113	29477	± 4157	0.162

Skraćenice: BLC, kemoatraktant B limfocita; CD30L, CD30 ligand; G-CSF, čimbenik stimulacije kolonije granulocita; GM-CSF, čimbenik stimulacije kolonije granulocita-makrofaga; IFN- γ , interferon gama; IL1- α , interleukin 1 alfa; IL1- β , interleukin 1 beta; IL2, interleukin 2; IL3, interleukin 3; IL4, interleukin 4; IL5, interleukin 5; IL6, interleukin 6; IL9, interleukin 9; IL10, interleukin 10; IL12-p40/p70, interleukin 12 p40/p70 heterodimer; IL12-p70, interleukin12 p70 homodimer; IL13, interleukin 13; IL17, interleukin 17; KC, citokin porijeklom iz keratinocita; LIX, CXC kemokin induciran lipopolisaharidom; MCP-1, protein kemoatraktant monocita 1; M-CSF, čimbenik stimulacije kolonije makrofaga; MIG, monokin induciran interferonom gama; MIP-1 α , upalni protein makrofaga 1 alfa; MIP-1 γ , upalni protein makrofaga 1 gama; RANTES reguliran aktivacijom, u normalnim T stanicama izražen i oslobođen; SDF-1, čimbenik porijeklom iz stromalnih stanica 1; TCA-3, protein aktivacije T stanica 3; TECK, kemokin izražen u timusu; TIMP-1, tkivni inhibitor metaloproteinaza 1; TIMP-2, tkivni inhibitor metaloproteinaza 2; TNF- α , čimbenik nekroze tumora alfa; sTNF RI,

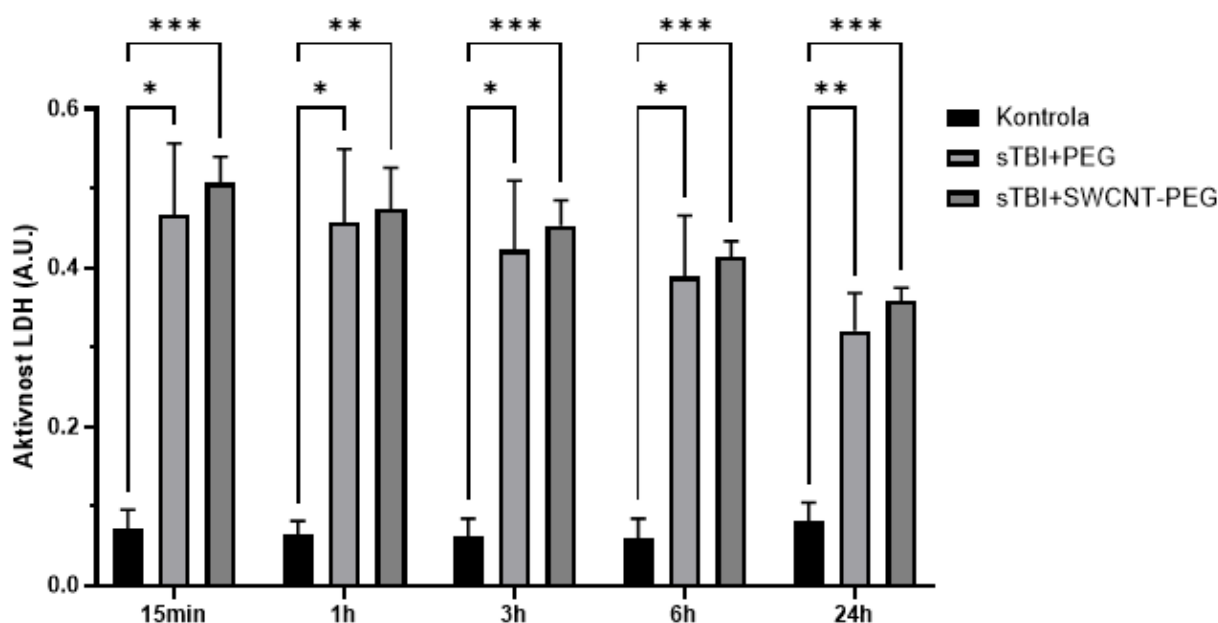
ljudski topljivi receptor za čimbenik nekroze tumora I; sTNF RII, ljudski topljivi receptor za čimbenik nekroze tumora II.

4.3. Učinci funkcionaliziranih SWCNT na primarnu kulturu mišjih astrocita podvrgnutu teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro*

Sljedeći cilj bio je procijeniti učinke funkcionaliziranih nanocjevčica na primarnu kulturu astrocita izloženu teškoj traumatskoj ozljedi rastezanjem *in vitro*. Astrociti su bili tretirani s 5 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT-PEG ili 1 $\mu\text{g/mL}$ funkcionalizacijskog sredstva PEG-a, počevši 1 h nakon ozljede ili lažne ozljede, dok su analize provedene 23 h nakon početka tretmana, odnosno 24 h nakon izazivanja ozljede. Za kontrolnu grupu izabrana je kultura neozlijeđenih astrocita koji su bili tretirani s 1 $\mu\text{g/mL}$ PEG-a, kako bi osigurali da su potencijalni učinci u skupini sTBI + SWCNT-PEG rezultat djelovanja nanocjevčica, a ne PEG-a.

4.3.1. SWCNT-PEG ne uzrokuju dodatnu staničnu smrt kod ozlijeđenih astrocita

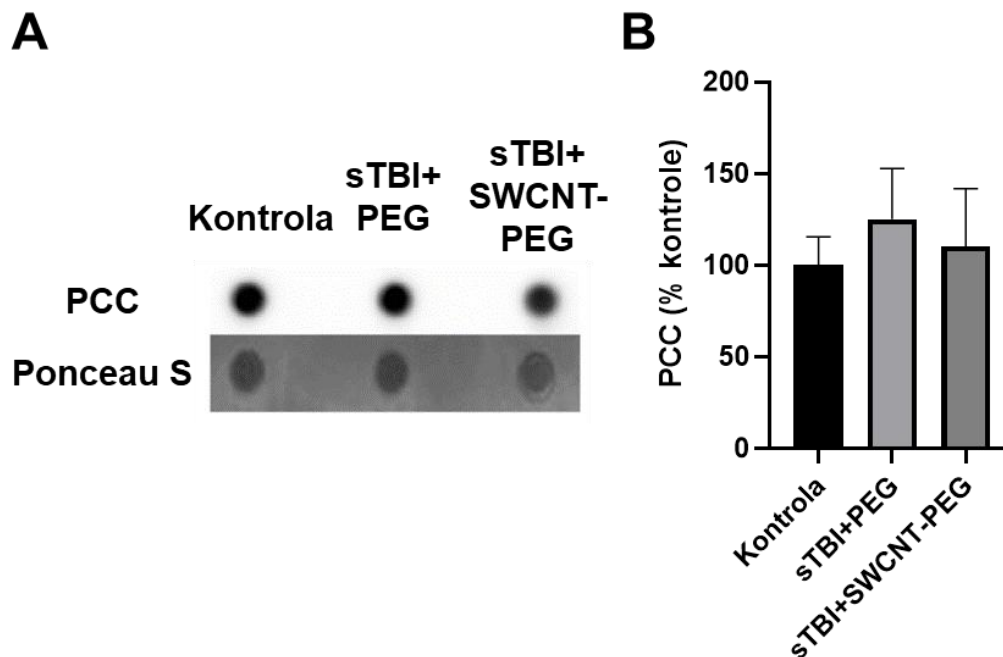
U svrhu sigurne primjene SWCNT kao sredstva za terapiju TBI, važno je ispitati njihove toksikološke učinke. Dosadašnja istraživanja upućuju na smanjenu toksičnost SWCNT nakon funkcionalizacije, a same SWCNT-PEG pokazale su sigurne učinke na astrocitate u koncentraciji 5 $\mu\text{g/ml}$ [193,212]. U našem istraživanju, htjeli smo potvrditi da SWCNT-PEG nisu toksične na kulture astrocita, te da neće izazvati povećanje njihove stanične smrti. Rezultati prikazani na slici 13 pokazuju da ozljeda uzrokuje značajno povećanje aktivnosti LDH ($p < 0,05$) u usporedbi s kontrolnim stanicama, gdje neozlijeđeni astrociti pokazuju niske razine LDH, u svim vremenskim točkama. Izloženost SWCNT-PEG-u ili PEG-u nije utjecala na količinu LDH oslobođenog iz ozlijeđenih astrocita ni u jednoj od određenih vremenskih točaka ($p > 0,05$).



Slika 13. Primjena funkcionaliziranih jednozidnih ugljikovih nanocjevčica (SWCNT-PEG) ne utječe na preživljenje primarnih mišjih astrocita izloženih teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro* (sTBI). Mediji za stanične kulture prikupljeni su u različitim vremenskim točkama nakon ozljede (15 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h i 24 h), te je iz njih kvantificirano oslobađanje stanične laktat dehidrogenaze (LDH). Primjena SWCNT-PEG nije utjecala na razine LDH oslobođene nakon ozljede. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti \pm SD (N = 3). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ značajno različito od kontrolne skupine (jednosmjerna ANOVA).

4.3.2. SWCNT-PEG nemaju učinka na razinu oksidativnih oštećenja proteina

Razine karbonilacije proteina detektirane su „dot blot“ imunoesejem u svrhu utvrđivanja hoće li teška *in vitro* TBI i/ili tretman SWCNT-PEG-om potencijalno uzrokovati oksidativno oštećenje proteina (Slika 14). Slika A prikazuje reprezentativne dot blotove uzoraka svih istraživanih skupina, dok slika B prikazuje denzitometrijske analize istih točaka, korigirane s ukupnim proteinima određenim Ponceau S bojenjem. Rezultati su prikazani kao postotak rezultata uzoraka kontrolne skupine. Iz rezultata je vidljivo da nema statistički značajne promjene u razinama karboniliranih proteina nakon ozljede stanica ili dodavanja ispitivanog nanomaterijala, odnosno sredstva za funkcionalizaciju, određeno 24 sata nakon teške ozljede stanica istezanjem ($p = 0,419$, jednosmjerna ANOVA).

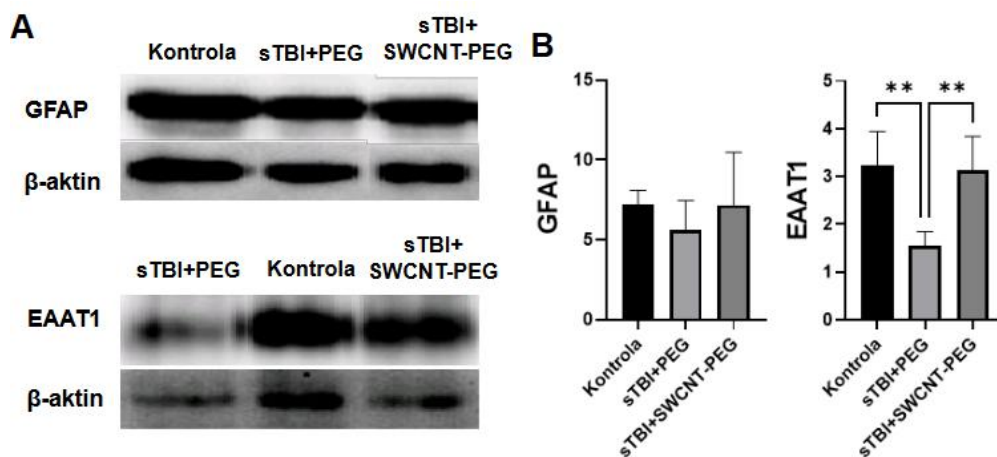


Slika 14. Učinak jednozidnih ugljikovih nanocjevčica kemijski funkcionaliziranih PEG-om (SWCNT-PEG) na razinu oksidativnog oštećenja proteina, određenu mjerenjem sadržaja karboniliranih proteina (PCC), u primarnim astrocitima miševa izloženim teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro*. Prikazani su (A) reprezentativni dot blot i (B) rezultati denzitometrijske analize. Histogram prikazuje razine PCC u kontrolnim uvjetima (neozlijeđene stanice tretirane PEG-om), te 24 sata nakon ozljede, odnosno 23 sata nakon tretmana PEG-om (sTBI+PEG) ili istraživanim nanomaterijalom (sTBI+SWCNT-PEG). Vrijednosti su prikazane kao udio (%) razina PCC detektiranih u stanicama kontrolne skupine, korigirane za ukupne proteine određene Ponceau S bojenjem. Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti \pm SD (N = 4).

4.3.3. Utjecaj SWCNT-PEG na izražaj EAAT1 i GFAP

U nastavku istraživanja smo istražili utjecaj SWCNT-PEG na stanice podvrgnute sTBI. Prvo smo mjerili izražaj GFAP proteina pošto su promjene u izražaju GFAP-a nakon ozljede mozga najkarakterističniji biljezi reaktivnosti astrocita [44]. U našem istraživanju, Western blot analize izražaja GFAP proteina (Slika 15) nisu pokazale značajnu promjenu u razinama GFAP-a 24 h nakon teške ozljede istežanjem ($p = 0.580$ jednosmjerna ANOVA). Ovaj nalaz je u skladu s prethodno objavljenim istraživanjima u kojima nije otkriven značajan porast sinteze GFAP-a, već se poticala relokalizacija postojećeg GFAP-a u astrocitima [45]. Zatim

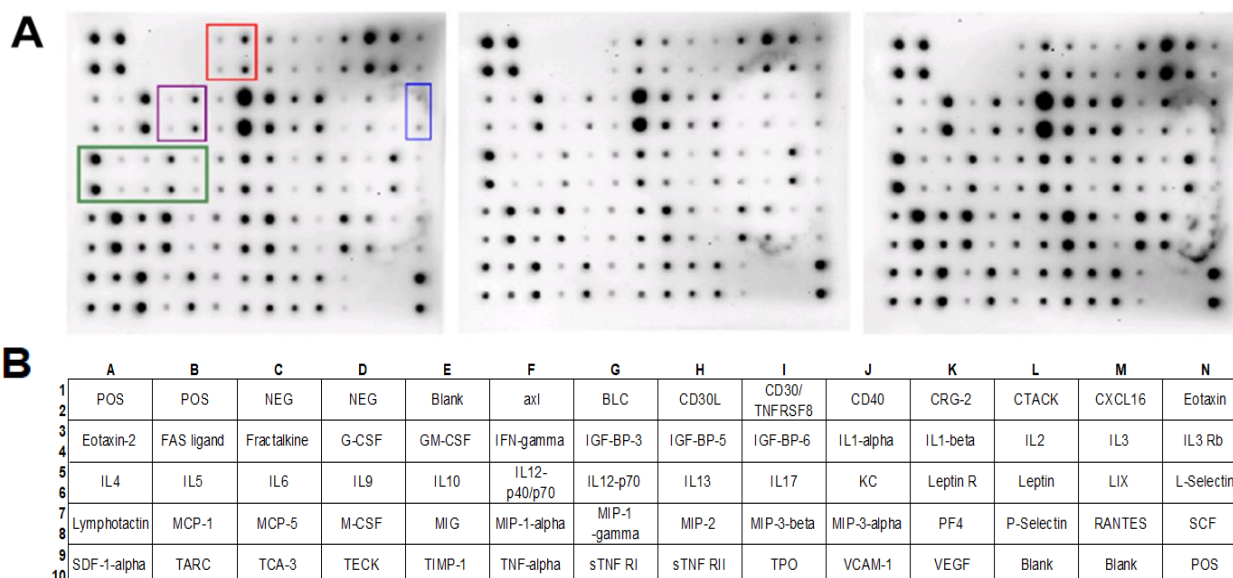
smo ispitali utjecaj ozljede i tretmana na izražaj EAAT1 transportera za unos glutamata u stanicu. Ozljeda je dovela do značajnog smanjenja izražaja EAAT1 proteina, dok je tretman sa SWCNT-PEG-om doveo do povratka izražaja ovog proteina na razine slične kontrolnim (jednosmjerna ANOVA $p = 0.0005$, Tukeyev *post hoc* test, kontrola vs. sTBI+PEG $p = 0.0017$; sTBI+PEG vs. sTBI+SWCNT-PEG $p = 0.0012$).



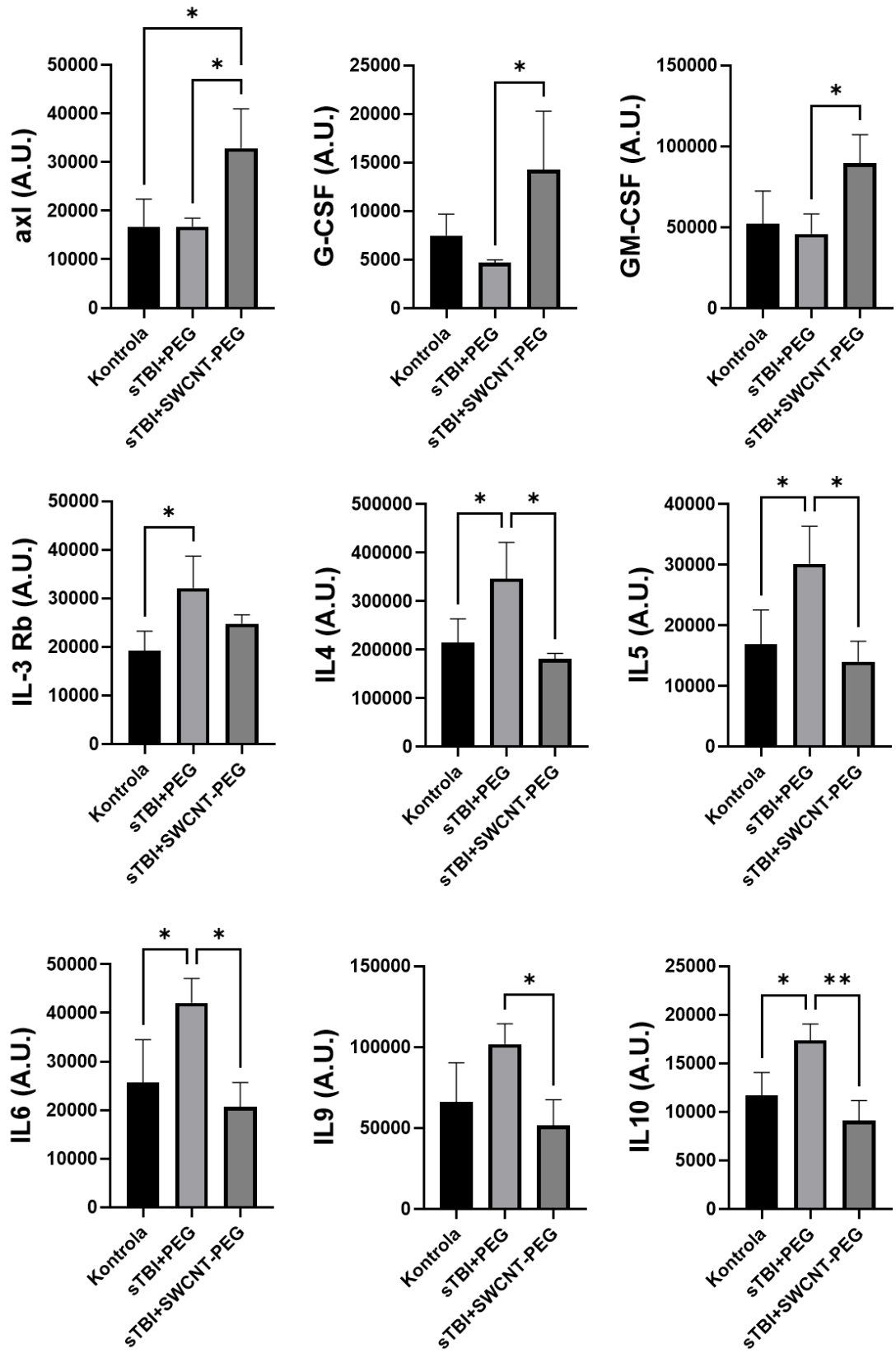
Slika 15. Učinak jednozidnih ugljikovih nanocjevčica funkcionaliziranih polietilenglikolom (SWCNT-PEG) na izražaj proteina GFAP i EAAT1 u primarnoj kulturi mišjih astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem (sTBI) *in vitro*. Jedan sat nakon ozljede stanice su tretirane PEG-om (sTBI+PEG) ili SWCNT-PEG-om (sTBI+SWCNT-PEG), te su lizirane 23 sata nakon tretmana. Kontrolne, neozlijeđene stanice tretirane su isključivo PEG-om tijekom 23 sata. Prikazani su reprezentativni blotovi (A) i histogrami (B) koji prikazuju rezultate denzitometrijske analize izražaja proteina. Vrijednosti su normalizirane na β-aktin, a podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± SD (N = 3-6). Statistička analiza provedena je jednosmjernom ANOVA-om te Tukeyevim HSD *post hoc* testom $**p < 0,01$ značajno različito u odnosu na sTBI+PEG skupinu.

4.3.4. Utjecaj SWCNT-PEG na oslobađanje citokina u astrocitima podvrgnutim teškoj ozljedi rastezanjem

Kako bi se ispitalo imaju li teška ozljeda i tretmani utjecaja na sekretornu funkciju primarnih mišjih astrocita, mjerili smo razine citokina. Za analizu oslobođenih citokina koristili smo Mouse Cytokine Array C3, koji mjeri izražaj 62 citokina. Ispitivani citokini navedeni su u Tablici 3. U medijima dobivenim iz ozlijeđenih stanica koje su bile tretirane samo s PEG-om nisu zabilježene značajne razlike u razinama citokina u usporedbi s kontrolom. Nasuprot tome, rezultati analize izražaja citokina iz medija stanica tretiranih SWCNT-PEG pokazali su značajne razlike u izražaju sljedećih citokina: axl, BLC, G-CSF, GM-CSF, IL-3-Rb, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 i IL-10. Od toga, axl, BLC, GM-CSF, IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10 bili su značajno viši u usporedbi s kontrolom, ali i medijem ozlijeđenih astrocita tretiranih samo PEG-om, dok su razine G-CSF i IL-9 bile povišene samo u usporedbi s rezultatima ozlijeđenih, PEG-om tretiranih astrocita. IL-3-Rb je bio značajno povišen kod tretmana SWCNT-PEG samo u usporedbi s medijem stanica kontrole, dok nije bilo značajne razlike u usporedbi sa medijem ozlijeđenih, PEG-om tretiranih stanica (Slika 16).



C



Slika 16. Utjecaj SWCNT-PEG i PEG na oslobađanje određenih citokina u primarnoj kulturi astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem (sTBI) *in vitro*. Stanice su bile neozlijeđene i tretirane PEG-om ili podvrgnute teškoj ozljedi rastezanjem te tretirane sa SWCN-PEG ili PEG-om. Inkubacije je trajala 23 h nakon čega su se skupljali mediji za provođenje analize citokinskog profila. (A) Reprezentativne membrane na kojima je vršena analiza citokina za kontrolne, neozlijeđene stanice, ozlijeđene stanice tretirane PEG-om i ozlijeđene stanice tretirane SWCNT-PEG; bojama su označena polja na kojima su citokini imali značajnu promjenu u signalu. (B) Shema koja prikazuje pozicije određenih citokina na membrani; slova i brojevi označavaju koordinate na membrani. (C) Rezultati denzitometrijskih analiza prikazuju značajnu razliku u jačini signala citokina između skupina. Podatci su izraženi kao prosječna vrijednost \pm SEM (N = 3), *p < 0,05, **p < 0,001 označavaju statistički značajne razlike između skupina.

Tablica 3. Rezultati multipleks analize citokina iz uzoraka medija astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem (sTBI) i tretiranih PEG-om ili SWCNT-PEG-om. Kontrola je uzorak medija neozlijeđenih astrocita. Citokini su navedeni abecednim redom, vrijednosti su izražene kao srednja vrijednost \pm SEM uz prikazane p-vrijednosti (jednosmjerna ANOVA).

	Kontrola			sTBI			sTBI+CNTs			p-vrijednost
	Srednja vrijednost	\pm	SEM	Srednja vrijednost	\pm	SEM	Srednja vrijednost	\pm	SEM	
axl	16718	\pm	3275	16744	\pm	992	32863	\pm	4688	0.022
BLC	72646	\pm	13101	68306	\pm	7685	114230	\pm	11023	0.044*
CD30L	40834	\pm	7406	37347	\pm	2129	57518	\pm	8129	0.140
CD30/ TNFRSF8	17634	\pm	3056	14769	\pm	550	32816	\pm	7926	0.082
CD40	12789	\pm	3739	13767	\pm	2140	27983	\pm	14188	0.426
CRG-2	70256	\pm	16899	61489	\pm	3534	132431	\pm	40265	0.178
CTACK	168821	\pm	25588	149857	\pm	27855	209095	\pm	13274	0.259
CXCL16	135924	\pm	31167	121224	\pm	12164	206239	\pm	22130	0.084
Eotaksin	17274	\pm	3933	16108	\pm	2149	25180	\pm	6360	0.363
Eotaksin-2	78016	\pm	14912	76439	\pm	3788	152648	\pm	40262	0.121
FAS ligand	13528	\pm	1343	9451	\pm	1178	22810	\pm	5006	0.053
Fraktalkine	218289	\pm	46065	182008	\pm	17973	345859	\pm	46507	0.056

G-CSF	7481	±	1267	4680	±	184	14255	±	3482	0.048
GM-CSF	51936	±	11738	45898	±	7099	89457	±	10259	0.041*
IFN- γ	17532	±	3378	16572	±	2432	21392	±	3084	0.521
IGF-BP-3	448402	±	88861	390930	±	17913	604411	±	108635	0.240
IGF-BP-5	133681	±	34500	115008	±	16867	175032	±	18254	0.284
IGF-BP-6	80456	±	20720	69400	±	9763	169463	±	56161	0.166
IL1- α	112183	±	28635	91247	±	14727	215497	±	62762	0.148
IL1- β	8186	±	2231	8152	±	1474	19227	±	4960	0.084
IL2	38458	±	6567	32970	±	6227	58370	±	7362	0.081
IL3	11386	±	2404	8363	±	929	11350	±	1123	0.380
IL3 Rb	19144	±	2364	24779	±	1053	32123	±	3800	0.037*
IL4	214442	±	28355	180581	±	6772	346468	±	43122	0.018*
IL5	16926	±	3241	14009	±	1939	30137	±	3592	0.019*
IL6	25709	±	5055	20698	±	2874	42066	±	2905	0.016*
IL9	65888	±	14082	51442	±	9205	101808	±	7296	0.037*
IL10	11673	±	1375	9087	±	1193	17373	±	975	0.007*
IL12- p40/p70	19702	±	4236	18016	±	3715	27584	±	1589	0.183
IL12-p70	110394	±	12739	104720	±	27665	214345	±	58593	0.152
IL13	59626	±	13223	50348	±	6015	97722	±	19530	0.114
IL17	9609	±	2794	8648	±	795	21571	±	7935	0.195
KC	109413	±	20505	100752	±	12739	213106	±	54250	0.107
Leptin R	35408	±	8290	33626	±	3933	72109	±	22581	0.173
Leptin	9897	±	740	7366	±	914	11966	±	2075	0.139
LIX	113842	±	12851	112966	±	13461	186224	±	28028	0.060
L-Selektin	14702	±	2472	13238	±	2333	24567	±	4951	0.116
Limfotaktin	83926	±	19325	63803	±	5413	120520	±	18534	0.107
MCP-1	239798	±	49964	205393	±	40509	359565	±	8713	0.060
MCP-5	101423	±	20104	72998	±	9999	139967	±	12897	0.052
M-CSF	210871	±	45931	137746	±	25395	268783	±	19732	0.075
MIG	15348	±	2471	9842	±	2483	18248	±	1373	0.084
MIP-1- α	47635	±	10362	35379	±	5943	68237	±	6437	0.064
MIP-1- γ	307346	±	69618	205631	±	21454	327544	±	43082	0.246
MIP-2	214940	±	37607	173253	±	23345	339213	±	49901	0.052
MIP-3- β	61684	±	10553	54333	±	6345	110907	±	21456	0.061

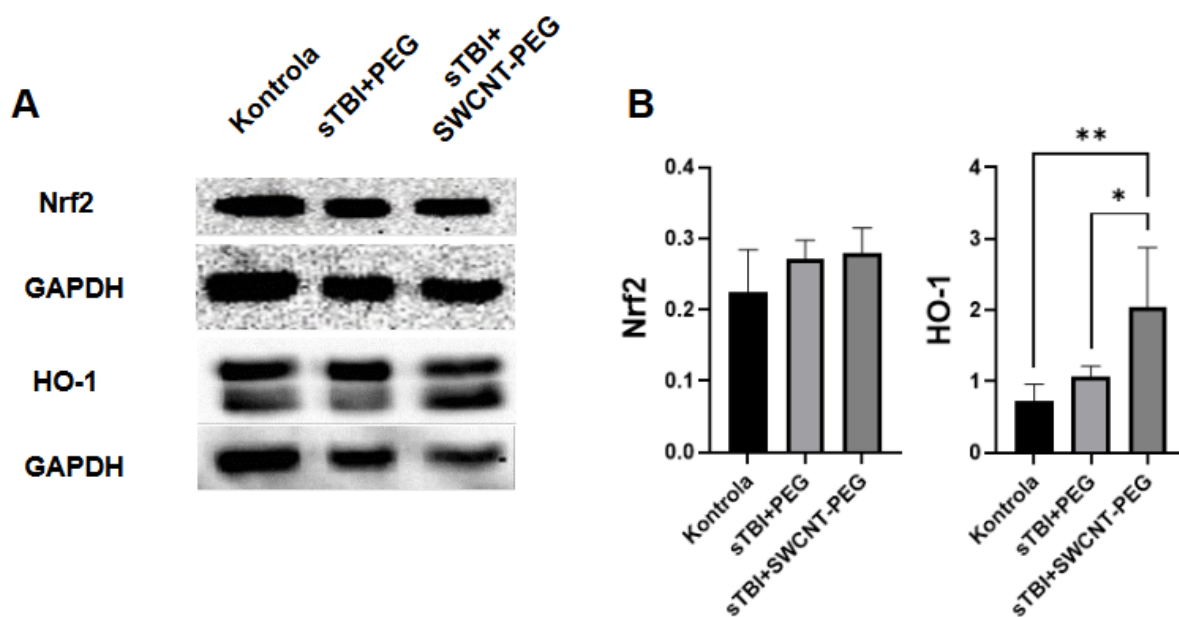
MIP-3- α	15641	\pm	2084	9752	\pm	1472	19260	\pm	4647	0.166
PF4	168461	\pm	32929	121861	\pm	17546	225070	\pm	51474	0.218
P-Selektin	120004	\pm	20395	96472	\pm	9785	151060	\pm	29478	0.272
RANTES	38955	\pm	6024	29829	\pm	3325	43090	\pm	8244	0.365
SCF	23807	\pm	4102	18179	\pm	2934	25900	\pm	6101	0.507
SDF-1- α	113183	\pm	28619	87605	\pm	19485	163462	\pm	28163	0.187
TARC	115059	\pm	30467	80720	\pm	14699	153396	\pm	21837	0.167
TCA-3	247875	\pm	52345	170076	\pm	21707	296098	\pm	35259	0.144
TECK	19522	\pm	2821	14837	\pm	1203	22342	\pm	1732	0.099
TIMP-1	126358	\pm	20060	112581	\pm	18140	155062	\pm	10080	0.262
TNF- α	20712	\pm	4749	20915	\pm	3476	28785	\pm	2109	0.273
sTNF RI	147838	\pm	28012	109439	\pm	11065	193438	\pm	20422	0.079
sTNF RII	121439	\pm	16069	90405	\pm	5325	147920	\pm	20473	0.097
TPO	63183	\pm	9848	57808	\pm	7192	84677	\pm	14297	0.257
VCAM-1	166884	\pm	35232	127283	\pm	8685	213899	\pm	41508	0.236
VEGF	15228	\pm	3170	13308	\pm	1365	20346	\pm	5154	0.412

Skraćenice: axl, receptor za tirozin kinazu Axl; BLC, kemoatraktant B limfocita; CD30L, CD30 ligand; CD30/TNFRSF8, član superobitelji liganda čimbenika nekroze tumora 8; CD40, klaster diferencijacije 40; CRG-2, gen odgovora na citokine 2; CTACK, kutani kemokin koji privlači T stanice; CXCL16, ligand 16 kemokina (C-X-C motiva); G-CSF, čimbenik stimulacije kolonije granulocita; GM-CSF, čimbenik stimulacije kolonije granulocita i makrofaga, IFN- γ , interferon gama; IGF-BP-3, protein koji veže faktor rasta nalik inzulinu 3; IGF-BP-5, protein koji veže faktor rasta nalik inzulinu 5; IGF-BP-6, protein koji veže faktor rasta nalik inzulinu 6; IL1- α , interleukin 1 alfa; IL1- β , interleukin 1 beta; IL2, interleukin 2; IL3, interleukin 3; IL3 Rb, interleukin 3 receptor beta; IL4, interleukin 4; IL5, interleukin 5; IL6, interleukin 6; IL9, interleukin 9; IL10, interleukin 10; IL12, interleukin 12; IL13, interleukin 13; IL17, interleukin 17; KC, citokin porijeklom iz keratinocita; LIX, CXC kemokin induciran lipopolisaharidom; MCP-1, protein kemoatraktant monocita 1; MCP-5, protein kemoatraktant monocita 5; M-CSF, čimbenik stimulacije kolonije makrofaga; MIG, monokin induciran interferonom gama; MIP-1- α , upalni protein makrofaga 1 alfa; MIP-1- γ , upalni protein makrofaga 1 gama; MIP-2, upalni protein makrofaga 2; MIP-3- β , upalni protein makrofaga 3 beta; MIP-3- α , upalni protein makrofaga 3 alfa; PF4, čimbenik trombocita 4; RANTES, reguliran aktivacijom, u normalnim T stanicama izražen i oslobođen; SCF, čimbenik matičnih stanica; SDF-1- α , čimbenik porijeklom iz stromalnih stanica 1 alfa; TARC, kemokin

reguliran timusom i aktivacijom; TCA-3, protein aktivacije T stanica 3; TECK, kemokin izražen u timusu; TIMP-1, tkivni inhibitor metaloproteinaza 1; TNF- α , čimbenik nekroze tumora alfa; sTNF RI, ljudski topljivi receptor za čimbenik nekroze tumora I; sTNF RII, ljudski topljivi receptor za čimbenik nekroze tumora II; TPO, trombopoetin; VCAM-1, molekula adhezije vaskularnih stanica 1; VEGF, čimbenik rasta vaskularnog endotela

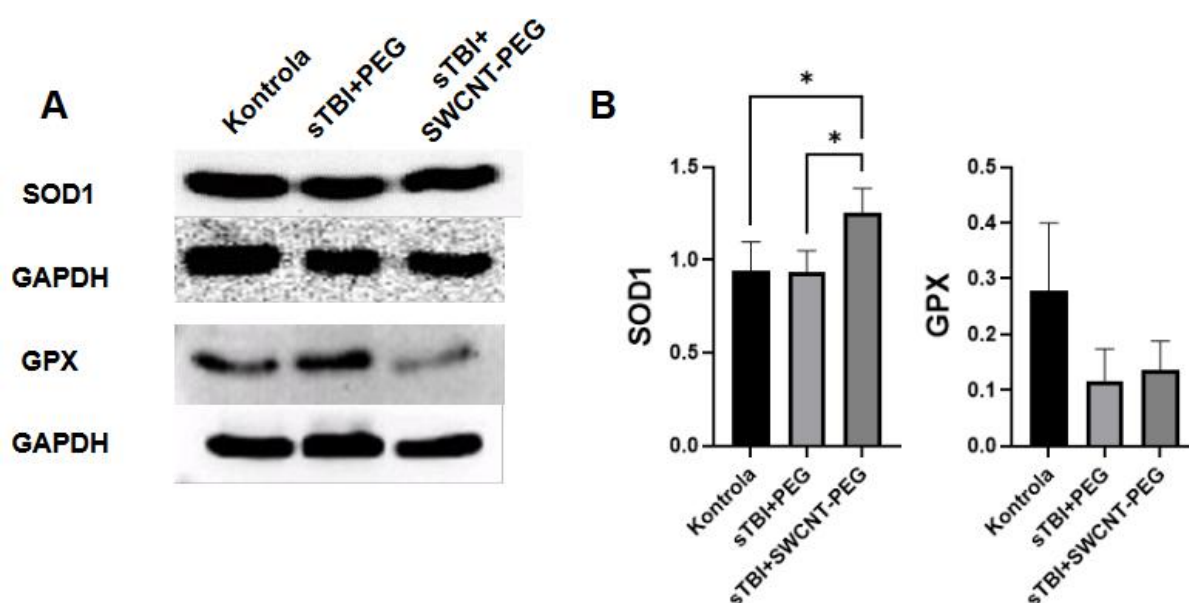
4.3.6. Utjecaj SWCNT-PEG na izražaj proteina uključenih u antioksidativne procese

Ozljeda značajno povećava stvaranje reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta, a za prevenciju oksidativnog stresa potrebna je adekvatna aktivacija antioksidativnih sustava stanice. Tu je od velike važnosti protein nuklearni čimbenik s eritroidnim-2 povezanim čimbenikom 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, Nrf2), kao i proteini čiju transkripciju on regulira – SOD1, GPX i oksigenaza hema 1 (engl. *heme oxygenase 1*, HO-1), koji vrše degradaciju reaktivnih spojeva i preveniraju oštećenja staničnih struktura i DNK. Analiza izražaja ovih proteina provedena je 24 h nakon ozljede, odnosno 23 h nakon tretmana. Teška ozljeda rastezanjem nije dovela do značajnih promjena u izražaju Nrf2 i GPX u stanicama astrocita. S druge strane tretman SWCNT-PEG doveo je do značajnog porasta HO-1 i SOD1 (Slike 17 i 18).



Slika 17. Učinak jednozidnih ugljikovih nanocjevčica funkcionaliziranih polietilenglikolom (SWCNT-PEG) na izražaj proteina Nrf2 i HO-1 u primarnoj kulturi

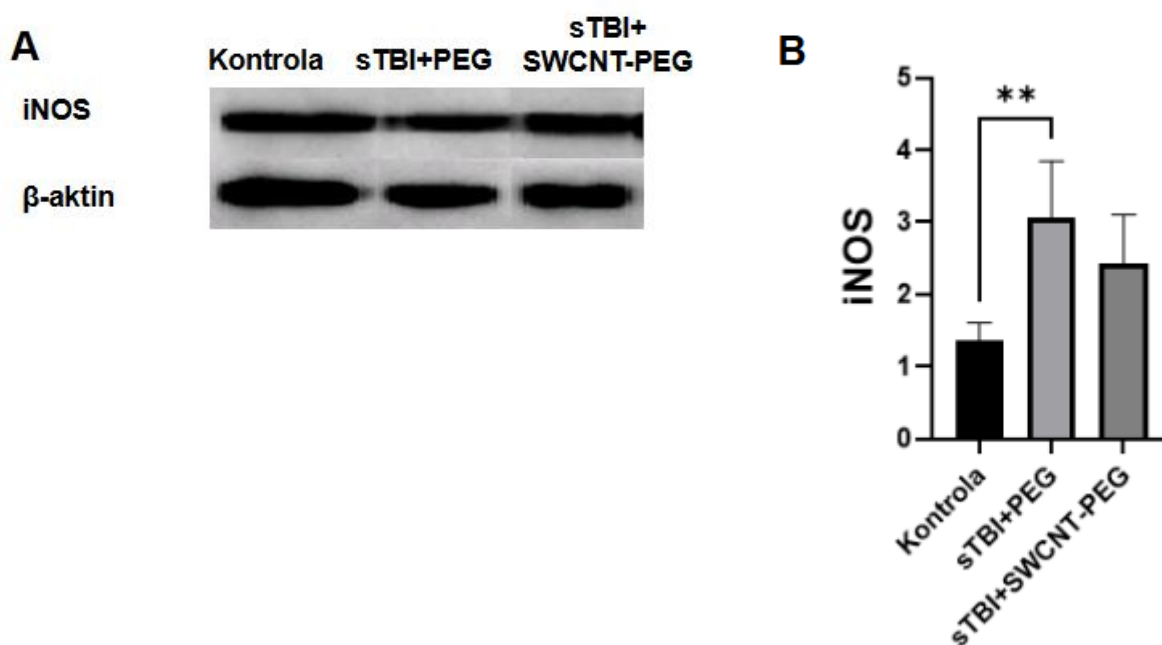
mišjih astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem (sTBI) *in vitro*. Jedan sat nakon ozljede stanice su tretirane PEG-om (sTBI+PEG) ili SWCNT-PEG-om (sTBI+SWCNT-PEG) te su lizirane 23 sata nakon tretmana. Kontrolne, neozlijeđene stanice tretirane su isključivo PEG-om tijekom 23 sata. Prikazani su reprezentativni blotovi (A) i histogrami (B) koji prikazuju rezultate denzitometrijske analize izražaja proteina. Vrijednosti su normalizirane na GAPDH, a podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD (N = 3-6). Statistička analiza provedena je jednosmjernom ANOVA-om te Tukeyevim HSD post-hoc testom; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, značajno različito u odnosu na kontrolu ili sTBI+PEG.



Slika 18. Učinak jednozidnih ugljikovih nanocjevčica funkcionaliziranih polietilenglikolom (SWCNT-PEG) na izražaj proteina SOD1 i GPX u primarnoj kulturi mišjih astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem (sTBI) *in vitro*. Jedan sat nakon ozljede stanice su tretirane PEG-om (sTBI+PEG) ili SWCNT-PEG-om (sTBI+SWCNT-PEG) te su lizirane 23 sata nakon tretmana. Kontrolne, neozlijeđene stanice tretirane su isključivo PEG-om tijekom 23 sata. Prikazani su reprezentativni blotovi (A) i histogrami (B) s rezultatima denzitometrijske analize izražaja proteina. Vrijednosti su normalizirane na GAPDH, a podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD (N=3-4). Statistička analiza provedena je jednosmjernom ANOVA-om te Tukeyevim HSD post-hoc testom; * $p < 0,05$, značajno različito u odnosu na kontrolu ili sTBI+PEG.

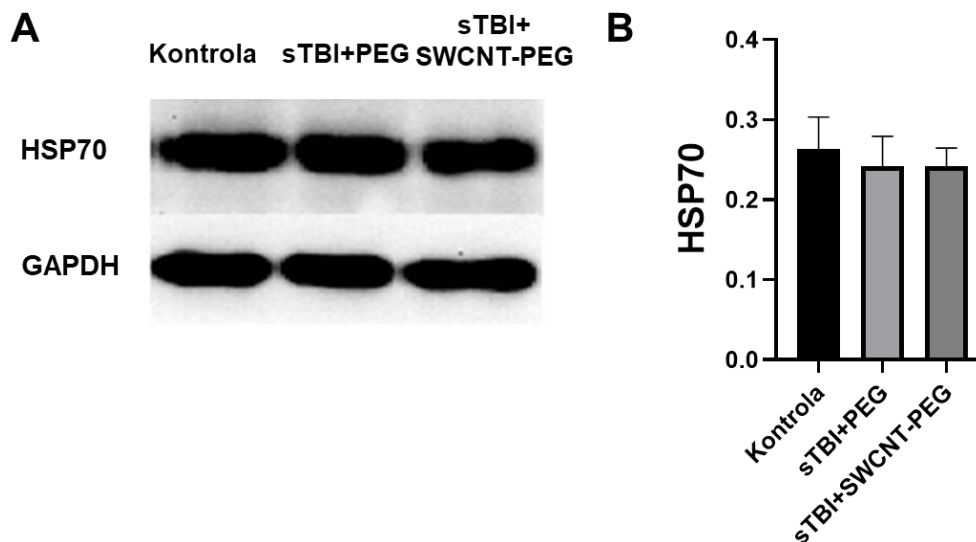
4.3.7. Utjecaj SWCNT-PEG na stres stanica nakon teške ozljede rastezanjem

iNOS je jedan od biljega od interesa u ovom istraživanju zbog svoje uloge u oksidativnom stresu i upali. Zanimalo nas je hoće li naš model ozljede stimulirati njegovu sintezu, a zatim i hoće li primjena nanocjevčica modificirati te vrijednosti ili same po sebi stimulirati upalno stanje. Uzorkovanje i analiza provedeni su po istom principu kao i za druge Western blot analize u ovom istraživanju. Naši rezultati pokazuju da je značajan porast izražaja iNOS-a bio prisutan samo u eksperimentalnoj grupi gdje provedena ozljeda rastezanjem ($p = 0,006$) dok u ozlijeđenim stanicama koje su bile tretirane SWCNT-PEG-om nije bilo značajnih promjena u usporedbi s kontrolom, ali niti sTBI+PEG grupom.



Slika 19. Učinak jednozidnih ugljikovih nanocjevčica funkcionaliziranih polietilenglikolom (SWCNT-PEG) na izražaj iNOS proteina u primarnoj kulturi mišjih astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem (sTBI) *in vitro*. Jedan sat nakon ozljede stanice su tretirane PEG-om (sTBI+PEG) ili SWCNT-PEG-om (sTBI+SWCNT-PEG) te su lizirane 23 sata nakon tretmana. Kontrolne, neozlijeđene stanice tretirane su isključivo PEG-om tijekom 23 sata. Prikazani su reprezentativni blotovi (A) i histogrami (B) koji prikazuju rezultate denzitometrijske analize izražaja iNOS proteina. Rezultati su korigirani s vrijednostima izražaja β -aktina i prikazani kao srednja vrijednost \pm SD ($N = 4-6$). ****** $p < 0,01$ značajno različito od kontrolne skupine (jednosmjerna ANOVA, Tukey *post hoc*)

HSP proteini stvaraju se u različitim uvjetima stresa stanice, pa tako i TBI. HSP70 je jedan od članova te obitelji proteina koji čuva strukturu stanice i omogućava normalno sklapanje proteina u patofiziološkim uvjetima. Za bolje razumijevanje učinaka SWCNT-PEG na astrocite u traumi, ovaj protein je također bio od interesa za analizu. Slika prikazuje dobivene rezultate koji pokazuju da ozljeda, kao ni tretman sa SWCNT-PEG nisu imali značajan utjecaj na izražaj ovog proteina u odnosu na kontrolne, neozlijeđene stanice, u našim eksperimentalnim uvjetima.



Slika 20. Učinak jednozidnih ugljikovih nanocjevčica funkcionaliziranih polietilenglikolom (SWCNT-PEG) na izražaj proteina HSP70 u primarnim mišjim astrocitima podvrgnutim teškoj ozljedi rastezanjem (sTBI) *in vitro*. Prikazani su reprezentativni blotovi (A) i odgovarajuće denzitometrijske analize (B) izražaja proteina HSP70 u primarnim mišjim astrocitima podvrgnutim teškoj ozljedi rastezanjem. Rezultati su korigirani s vrijednostima izražaja GAPDH. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD (N = 3) (jednosmjerna ANOVA).

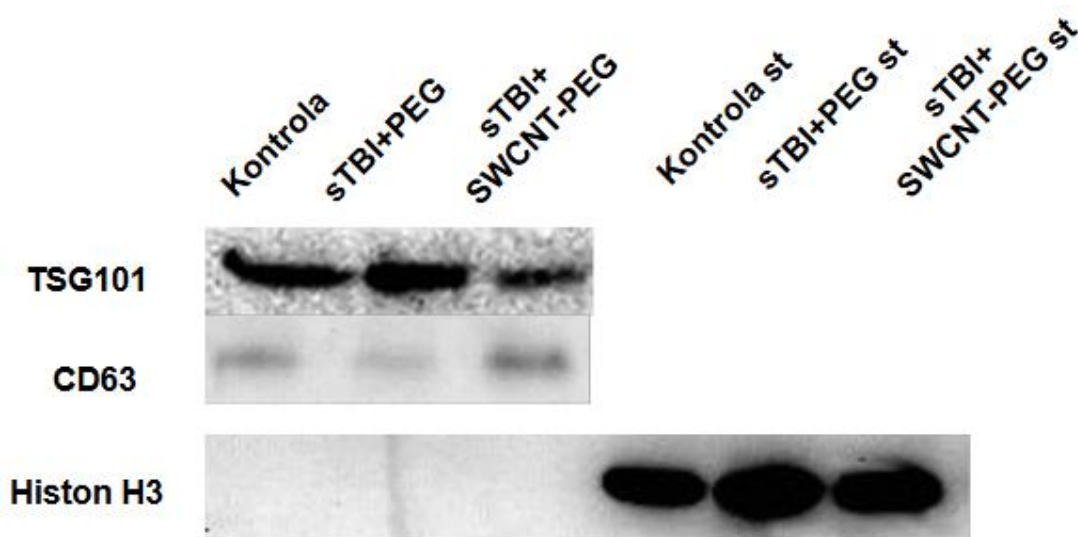
4.4. Promjene u molekularnim karakteristikama egzosoma nakon traume

Posljednji cilj ovog istraživanja bio je ispitati promjene u molekularnim karakteristikama egzosoma oslobođenih iz astrocita nakon teške ozljede rastezanjem *in vitro*. Egzosomi su izolirani iz stanica kontrole, odnosno neozlijeđenih, PEG-om tretiranih stanica, te stanica koje su bile podvrgnute *in vitro* teškoj ozljedi rastezanjem i tretirane PEG-om ili SWCNT-PEG-om. Eksperimentalne grupe su iste kao u prethodnim pokusima, no napravljene

su razlike u izvođenju pokusa u svrhu dobivanja većeg uzorka pogodnog za analizu. Točnije, umjesto udarca vršnog pritiska od 19-29 kPa (3,8-4,2 psi), koristili smo slabiji udarac vršnog pritiska 2,8 psi za kojeg je opisano da inače modelira umjerenu ozljedu, no na mišjim astrocitima, koji su puno osjetljiviji naspram ljudskih ili štakorskih, ta ozljeda i dalje se može karakterizirati kao teška. Razlog provođenja slabije ozljede je to što teška ozljeda izaziva preveliku smrt stanica te se iz preostalih preživjelih stanica oslobađa količina egzosoma premalena za izolaciju i provođenje daljnjih analiza. Također, nakon ozljede, stanice su inkubirane 72 h prije skupljanja medija i izolacije egzosoma, kako bi se omogućilo dovoljno vremena da astrociti oslobode egzosome, odnosno da se omogući skupljanje kvalitetnijeg uzorka za analizu. Izolirani egzosomi su podvrgnuti lizi kako bi napravili uzorke za analizu Western blot metodom ili se iz njih izolirala miRNK za qRT-PCR analizu.

4.4.1. Karakterizacija egzosoma

Za početak, željeli smo potvrditi da su proteini koje smo dobili iz izolata uistinu porijeklom iz egzosoma, a ne iz stanica. U te svrhe bilo je važno analizirati izražaj proteina koji se u literaturi navode kao biljezi egzosoma TSG101 i CD63, a kao negativnu kontrolu mjerili smo izražaj proteina jezgre histona H3 [214]. Rezultati naših analiza (Slika 21) pokazuju rezultate Western blot analize izražaja biljega TSG101 i CD63 prisutnih u uzorcima izoliranih egzosoma, kao i odsustvo negativnog biljega H3 te možemo zaključiti da su naši uzorci uistinu egzosomalnog porijekla te da se mogu koristiti za daljnje analize miRNK.

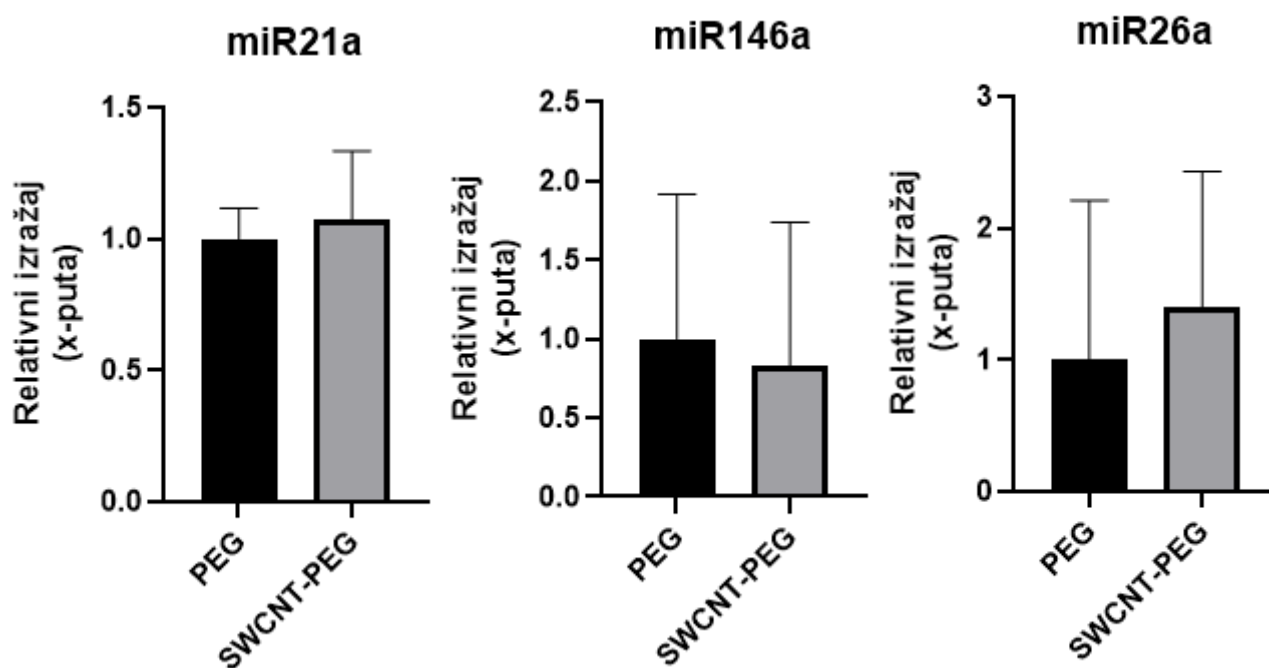


Slika 21. Izražaj biljega egzosoma TSG101 i CD63 u egzosomima primarnih mišjih astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro* i tretiranim PEG-om ili SWCNT-PEG-om. Kontrolne stanice su egzosomi neozlijeđenih stranica tretiranih PEG-om.

Negativna kontrola histon H3 odsutna je u uzorcima egzosoma, ali prisutna u uzorcima stanica, koji su služili u svrhu potvrde ispravnosti korištenog H3 protutijela.

4.4.2. Utjecaj SWCNT-PEG na izražaj miRNK u egzosomima

Nakon što smo dokazali da smo uspješno izolirali egzosome, iz njih smo izolirali ukupnu miRNK. Prvo smo analizirali učinak SWCNT-PEG na izražaj miRNK u egzosomima neozlijeđenih stanica, gdje su kontrola bile neozlijeđene stanice tretirane PEG-om. Dobivena miRNK reverznom transkripcijom prepisala se u cDNK, amplificirala te analizirala qRT-PCR metodom. Kao molekule od interesa izabrali smo miRNK 21a, miRNK 26a i miRNK 146a te miRNK 16a čiji izražaj nam je služio za normalizaciju rezultata. Dobiveni rezultati analizirani su, ali nisu pokazali značajne razlike u usporedbi s kontrolom (Slika 22). Možemo zaključiti da SWCNT-PEG u našem modelu ozljede nema značajan utjecaj na izražaj miRNK od interesa.

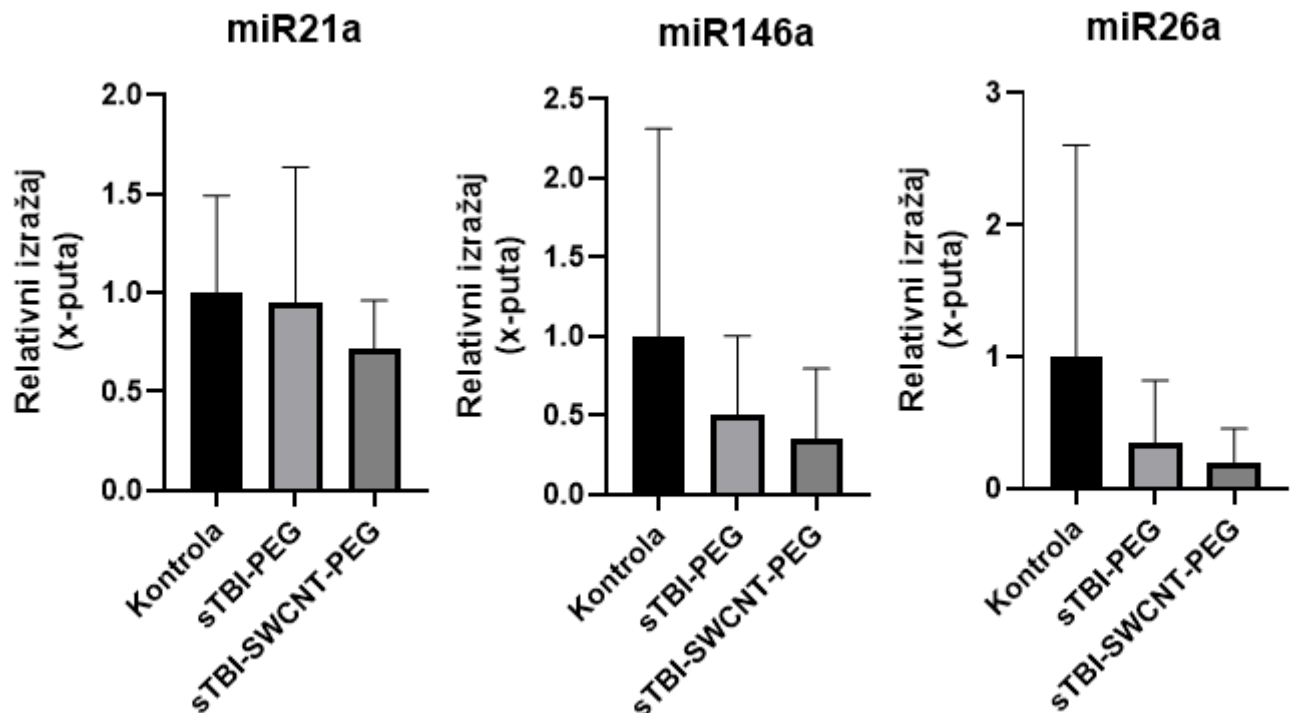


Slika 22. Slika 22. Učinak primjene SWCNT-PEG na izražaj miRNK-21a, miRNK-26a i miRNK-146a u egzosomima porijeklom iz primarnih mišjih astrocita. Izražaj miRNK-21a, miRNK-26a i miRNK-146a u egzosomima izoliranim iz primarnih mišjih astrocita analiziran je metodom kvantitativne reverzno-transkripcijske lančane reakcije polimerazom nakon tretmana SWCNT-PEG-om. Dobiveni rezultati nisu pokazali statistički značajne promjene u izražaju navedenih miRNK u odnosu na kontrolnu skupinu (stanice tretirane PEG-om). Izražaj

je normaliziran na referentnu miRNK-16a, a podaci su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD (N = 3).

4.4.3. Utjecaj SWCNT-PEG na izražaj miRNK u egzomima astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem

U sljedećem koraku analizirali smo učinke SWCNT-PEG u uvjetima teške ozljede rastezanjem. Kontrolna skupina bile su miRNK egzosoma neozlijeđenih stanica tretiranih PEG-om dok su eksperimentalne skupine bile miRNK egzosoma ozlijeđenih stanica tretiranih PEG-om, odnosno SWCNT-PEG-om. Rezultati (Slika 23) nisu pokazali značajne promjene u izražaju niti jedne od ispitivanih miRNK.



Slika 23. Učinak primjene SWCNT-PEG na izražaj miRNK-21a, miRNK-26a i miRNK-146a u egzomima iz primarnih mišjih astrocita nakon teške ozljede rastezanjem *in vitro*. Izražaj miRNK-21a, miRNK-26a i miRNK-146a analiziran je u egzomima izoliranim iz kondicioniranog medija primarnih mišjih astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro*, nakon čega su stanice tretirane SWCNT-PEG-om. Kvantifikacija izražaja provedena je metodom kvantitativne reverzno-transkripcijske lančane reakcije polimerazom. Nisu uočene

statistički značajne promjene u razinama analiziranih miRNK u usporedbi s kontrolnom skupinom, koju su činili egzosomi neozlijeđenih stanica tretiranih PEG-om. Vrijednosti su normalizirane na referentnu miRNK-16a, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SD (N = 3).

RASPRAVA

Nanomaterijali se sve više istražuju u kontekstu oboljenja središnjeg živčanog sustava zbog svog velikog potencijala u dijagnostici i terapiji. Među njima se posebno izdvajaju ugljikove nanocjevčice zbog svojih povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava koje nakon funkcionalizacije s odgovarajućim sredstvom poput PEG-a pokazuju visoku biokompatibilnost i smanjenu toksičnost [215]. TBI je stanje za koje nema konkretnog lijeka i za kojeg se terapija intenzivno istražuje, ali nažalost s malo uspjeha. Puno istraživanja primjene lijekova u svrhu terapije zaustavljeno je u fazi kliničkog ispitivanja zbog slabe translacije obećavajućih rezultata iz pretklinike [116,117]. Nanomedicina je relativno novo područje s velikim potencijalom za razvoj terapija te se stoga istraživanja sve više usmjeravaju k njoj. U ovoj studiji istraživali smo učinke SWCNT-PEG u modelu teške *in vitro* TBI na primarne astrocite. Parametri koje smo pratili bili su preživljavanje stanica, razine oksidativnih oštećenja, izražaj odabranih proteina važnih u razvoju sekundarne ozljede te sekretornu funkciju astrocita. Koliko nam je poznato, ovo je prvo istraživanje koje ispituje učinke ugljikovih nanocjevčica u teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro*.

5.1. Uspostava modela ozljede i karakterizacija stanica

Prvi cilj ovog rada bio je uspostaviti model za istraživanje promjena u primarnoj kulturi astrocita nakon *in vitro* teške ozljede rastezanjem. Model ozljede koji smo izabrali je model biaksijalne ozljede rastezanjem, koji se kroz literaturu dokazao kao dobar i najčešće biran model ozljede koji izaziva učinak sličan *in vivo* akceleracijsko-deceleracijskoj ozljedi [199,216]. Prednosti ove metode su to što je udarac precizno kontroliran, a rezultat udarca je mjerljiv, stoga je model i reproducibilan, pa je i lakše dobiti statistički značajne informacije o učinku ozljede [197,217].

Od velike važnosti je potvrditi da naš *in vitro* model ozljede može reproducirati *in vivo* TBI i dovesti do slične kaskade promjena u stanici [197]. Za to smo morali napraviti karakterizaciju ozljede u različitim stupnjevima, određivanjem preživljenja stanica i razlika u izražaju odabranih proteina. Cilj je bio doći do zaključaka je li naš model uistinu dobar za daljnja ispitivanja TBI, odnosno za mjerenje učinka nanocjevčica na stanice podvrgnute teškoj TBI. Ovaj model ozljede u literaturi se pokazao dobar jer izaziva brojne promjene u astrocitima i neuronima koje koreliraju s *in vivo* ozljedom. To uključuje oštećenje organela i strukture

citoskeleta, porast u unutarstaničnim koncentracijama kalcija, otpuštanje ATP-a i citokina, stvaranje ROS i oksidativna oštećenja [216].

Ispitali smo kakav utjecaj će ovaj model ozljede imati na staničnu kulturu na način da smo u početku uspoređivali tri stupnja ozljede – blagu, umjerenu i tešku – u svrhu što bolje karakterizacije teške ozljede, na kojoj je planirano provesti kasnije faze istraživanja. Parametri koje smo pratili bili su vijabilnost stanica te izražaj određenih proteina koji su nam bili od interesa u kontekstu traume – biljega aktivacije astrocita GFAP-a, transportera za glutamat EAAT1 i biljega oksidacijskih i upalnih procesa iNOS-a.

Vijabilnost smo mjerili testom citotoksičnosti koji radi na principu mjerenja aktivnosti LDH enzima. Ovaj test pokazao je, kao što je i očekivano, da je najveća LDH aktivnost prisutna u mediju sakupljenom sa stanica podvrgnutih teškoj ozljedi, dok su mediji blago ozlijeđenih stanica imali zanemariv porast aktivnosti ovog enzima. Umjerena ozljeda izazvala je značajnu smrt stanica samo u vremenskoj točki od 24 h. Time se potvrdilo da ozljeda koju smo napravili uistinu jest teška TBI, i da je preživljenje stanica kod ovakvog tipa ozljede značajno smanjeno. Slični rezultati dobiveni su u studiji koja je proučavala tešku ozljedu rastezanjem *in vitro* s 50% deformacijom membrane na primarnoj kulturi mišjih neurona, [218] te u studiji različitih stupnjeva ozljede (deformacija membrane 5-50%) na rezovima štakorskih hipokampusa [219].

Vijabilnost je promatrana i metodom imunofluorescencije gdje su vizualizirani astrociti 24 h nakon provođenja različitog stupnja ozljede. Na mikrofotografijama se vidi pad broja stanica u uvjetima umjerene i teške ozljede. U literaturi, istraživanje učinka istog modela ozljede na humanim astrocitima pokazalo je slične učinke na vijabilnost stanica. Mikrofotografije u ovom radu pokazuju značajan gubitak stanica i proširene međustanične prostore nakon teške ozljede rastezanjem [206].

GFAP je strukturni protein citoskeleta, a koristi se kao biljeg zrelih astrocita i reaktivne astroglioze. U tim procesima sudjeluje na način da stimulira rast i zadebljanje stanice i astrocitnih izdanaka. Njegove razine često su povišene kod TBI i neurodegenerativnih bolesti [41]. Hoće li različite težine ozljede izazvati aktivaciju astrocita u našem modelu, analizirali smo mjerenjem izražaja GFAP-a Western blot metodom, 24 h nakon ozljede. Naši rezultati nisu pokazali značajne razlike između eksperimentalnih skupina, niti u usporedbi s kontrolom. U literaturi, izražaj GFAP-a znatno varira ovisno o modelu i jačini ozljede. U većini *in vitro* istraživanja zabilježen je porast GFAP-a [220,45,221], no on ne mora uvijek rasti te može biti i snižen [222]. Razlog tome mogle bi, osim razlika između modela, biti i razlike u provedbi

traume unutar istog modela, recimo po pitanju brzine izvođenja udaraca ili količine udaraca, jačine provođenja ozljede te različitih metoda za analizu podataka. Također, kod prejake ozljede može doći do smrti prevelikog udjela stanica te se mogu vidjeti snižene vrijednosti umjesto tipično povišenih. Naše istraživanje rađeno na uzorcima koji su pripremani samo u jednoj vremenskoj točki, nakon 24 h, što je možda vremenski nedovoljno da bi se vidio značajan porast GFAP te bi bilo zanimljivo napraviti istraživanje izražaja i u drugim vremenskim točkama.

Jedna od glavnih funkcija astrocita je regulacija izvanstaničnih razina glutamata, gdje glavnu ulogu imaju EAAT1 transporteri za prijenos glutamata u stanicu. Razine EAAT1 su od izrazitog značaja pošto je jedan od glavnih mehanizama razvoja sekundarne ozljede i izazivanja smrti neurona upravo ekscitotoksičnost posredovana previsokim razinama glutamata koji se oslobađa iz oštećenih i umirućih stanica [16]. Rezultati analize izražaja EAAT1 proteina između grupa s različitim stupnjem ozljede i kontrole pokazale su značajne razlike samo u skupini koja je bila podvrgnuta teškoj ozljedi, gdje je primijećen smanjeni izražaj ovog proteina. Ovaj rezultat podržavaju dosadašnja *in vivo* istraživanja na štakorima, koja su zabilježila smanjenu prisutnost EAAT1 proteina u periodu 6-72 h nakon ozljede [223]. S druge strane jedna *in vivo* studija na štakorima podvrgnutim FPI ozljedi pokazala je da 3 sata nakon ozljede, koju su oni opisali kao umjerenu, također dolazi do smanjenja izražaja EAAT1 transportera [224], što se ne slaže s rezultatima naših pokusa gdje razlika u izražaju ovog proteina nakon umjerene TBI nije bila značajna. Razlog tome može biti zato što *in vivo* ozljeda ima puno veći raspon i uključuje brojne faktore poput mjesta ozljede na mozgu, narušavanja KMB i neuroupage, naspram *in vitro* ozljede koja je uvijek regulirana i ima mali raspon te je teško uvijek u potpunosti napraviti dobru korelaciju između težina ozljeda. Također, naše istraživanje provedeno je na izoliranoj populaciji astrocita, a u odsustvu neurona i drugih glija stanica nedostaje međustanična komunikacija i brojni čimbenici koje te stanice luče, a koji mogu modificirati funkciju astrocita. Pad izražaja EAAT1 primijećen je i *in vivo* kod ljudi nakon TBI, gdje je u periodu kroz 7 dana nakon ozljede došlo do značajnog smanjenja izražaja ovog transportera [65], s time da u ovom istraživanju nije specificirano da se radilo o teškoj ozljedi, no do tog zaključka se može doći bazirano na vremenu preživljenja pacijenata.

Inducibilni oblike enzima NOS (iNOS) pojačano je izražen nakon ozljede SŽS-a i jedan je od glavnih posrednika upale i proizvodnje citokina, ali i stvaranja RNS i ROS. [225,226]. U *in vivo* modelima ozljede, izražaj iNOS jako ovisi o modelu, recimo kod TBI ispuštanjem utega ili *blast* ozljedi dolazi do porasta izražaja iNOS već nakon 12-48 h, dok u FPI modelu traume

mozga zabilježen je porast izražaja u između 3. i 7. dana nakon traume. Nadalje, u pacijenata s TBI zabilježen je porast iNOS vrijednosti već unutar 8 h nakon TBI [225,227]. Neovisno o eksperimentalnom modelu ozljede, ona je uvijek popraćena porastom izražaja iNOS-a. U ovom istraživanju zabilježeni su slični rezultata, odnosno, u modelu umjerene i teške ozljede rastezanjem značajno je porastao izražaj iNOS-a u astrocitima u usporedbi s kontrolom ili blagom ozljedom.

5.2. Utjecaj PEG i SWCNT-PEG na izražaj proteina i oslobađanje citokina u primarnoj kulturi astrocita

Polietilen glikol (PEG) jedna je od molekula koja se često koristi u kozmetici i industriji hrane te se smatra da je sigurna zbog svoje neznatne apsorpcije putem kože i nakon ingestije. Koristi se i u terapiji za modulaciju farmakokinetike lijekova te usporava metabolizam lijeka u jetri i njegovo izlučivanje bubrezima. U dozama kojim se koristi za te svrhe, nije primijećena toksičnost te se smatra da PEG ima jako širok sigurnosni profil. Toksičnost PEG-a primijećena je samo kod izrazito visokih doza primijenjenih parenteralnim putem i to specifično na bubrezima [228].

Zbog svoje netoksičnosti i izostanka učinaka na organizam, PEG je sredstvo koje se često bira za modulaciju nanočestica te značajno utječe na njihova svojstva i farmakokinetiku. PEG produljuje vrijeme cirkulacije nanočestica, čini ih više nevidljivima za imunološki sustav prevencijom opsonizacije te smanjuje nespecifičan unos u dendritičke stanice i makrofage fagocitozom [229]. SWCNT u našem istraživanju također su obložene PEG-om. U kontekstu našeg istraživanja, PEGilacija značajno smanjuje agregaciju ugljikovih nanocjevčica i time smanjuje njihovu toksičnost, kao što su potvrdila brojna istraživanja [157,172,173,149]. Inače, ovaj proces može i povećati njihovu sposobnost da vežu lijekove, što je korisno ukoliko bi se SWCNT koristile u svrhu dostave lijekova, pogotovo u tumorske stanice [230]. S druge strane, novija istraživanja pokazala su da kada je PEG konjugiran s nanočesticama, poput lipidnih nanočestica korištenih za dostavu cjepiva, on može postati imunogeničan i da se mogu stvarati anti-PEG protutijela koja izazivaju hipersenzitivne reakcije [231].

Kako je već navedeno u uvodnom dijelu ovog rada, zabilježeni su pozitivni učinci SWCNT-PEG na preživljenje neurona, rast neurita i obnovu aksona nakon TBI [195,194,196,193]. Stoga je cilj našeg istraživanja bio je ispitati učinke SWCNT-PEG na astrocite podvrgnute teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro*. U prvom koraku, odnosno prije ispitivanja učinaka primjene PEG ili SWCNT-PEG u uvjetima ozljede, potrebno je bilo utvrditi

kakve će učinke ovi spojevi imati na funkciju nezlijeđenih astrocita. Od interesa nam je bilo utvrditi hoće li nanocjevčice same po sebi potaknuti aktivaciju astrocita i izazvati povećan izražaj GFAP, hoće li utjecati na razine EAAT1 u odsustvu ozljede te kako će modulirati upalni odgovor te sekretorni profil astrocita. Stanice astrocita bile su tretirane s 1 $\mu\text{g/mL}$ PEG-a ili 5 $\mu\text{g/mL}$ SWCNT-PEG-a kroz 23 h nakon čega su njihovi mediji pohranjeni ili stanice lizirane za daljnje analize navedenih proteina odnosno citokina.

Rezultati Western blot analize izražaja proteina nisu pokazali značajne varijacije u razinama EAAT1 transportera ni između tretiranih skupina, ni u usporedbi s kontrolnim, netretiranim stanicama, što upućuje na to da SWCNT-PEG, kao ni PEG, sami po sebi nemaju učinak na unos glutamata u zdravoj stanci. Također, primjena PEG-a i SWCNT-PEG-a nije potaknula ni promjene u izražaju GFAP proteina niti u jednoj eksperimentalnoj grupi, što bi moglo upućivati na to da ni nanocjevčice ni otapalo ne potiču reaktivnost astrocita, no naši rezultati se ne slažu s onim dostupnim u literaturi i stoga bi trebalo napraviti dodatne analize. Naime, provedene su studije koje su izučavale utjecaj SWCNT-PEG na primarnim mišjim astrocitima, ali je za analizu GFAP i EAAT1 izražaja bila korištena metoda imunofluorescencije te je tamo prikazana povećana imunoreaktivnost GFAP-a u tretiranim stanicama, kao i povećana imunoreaktivnost EAAT1 na staničnim membranama [232,193]. Moguće je da su razlike u GFAP-u prisutne zbog različitih metoda analize ili eksperimentalnih uvjeta.

Astrociti su u dvosmjernoj komunikaciji s neuronima i drugim glija stanicama putem brojnih faktora koje luče, poput neurotransmitera, iona, egzosoma te citokina. Ta molekularna komunikacija ima veliku važnost u ozljedi, jer brojni faktori koje stanice oslobađaju mogu utjecati na preživljenje, regeneraciju aksona, procese angiogeneze, ali i neuroupalu i neurodegeneraciju, odnosno sve procese koji mogu pridonijeti oporavku, ali i pogoršanju ozljede [50]. Citokini imaju značajan utjecaj na integritet KMB, aktivaciju imunoloških stanica i njihovo dovođenje na mjesto ozljede, moduliraju neuroupalu koja s jedne strane poboljšava odstranjivanje mrtvih oštećenih stanica i ubrzava oporavak, a s druge strane ako u prevelikom opsegu pojačava staničnu smrt i oštećenja te se može proširiti i na zdrave dijelove mozga. Prije ispitivanja učinaka nanocjevčica na oslobađanje citokina iz ozlijeđenih stanica, bilo je važno odrediti početnu točku, odnosno vidjeti hoće li PEG i SWCNT-PEG imati učinke, i u kojem opsegu, na same astrocite.

Rezultati analize citokina pokazali su da PEG ne modificira oslobađanje citokina, dok SWCNT-PEG utječe na značajno smanjenje samo jednog od ispitivanih citokina, a to je MIP-

1 γ (engl. *macrophage inflammatory protein 1 γ*), još poznatog i kao CCL9. MIP-1 γ pripada obitelji CC kemokina, konstitutivno je prisutan u brojnim tkivima, a luče ga makrofagi i dendritičke stanice. Ima važnu ulogu u imunosti, sudjeluje u kemotaksiji T limfocita i monocita [233]. U SŽS-u ima veliku ulogu nakon traumatske ozljede, gdje pridonosi napredovanju sekundarnih oštećenja poticanjem upale te se smatra da sudjeluje u disregulaciji prijenosa osjeta boli i razvoju neuropatske boli, no njegova uloga treba biti još daljnje istražena [234]. Naše istraživanje pokazalo je da primjena SWCNT-PEG dovodi do smanjenja proizvodnje MIP-1 γ , što bi potencijalno moglo imati neuroprotektivne učinke nakon TBI. Po pitanju učinaka MIP-1 γ na ostala tkiva, poznato je da djeluje i na kosti aktivacijom osteoklasta i povećanjem resorpcije kostiju [233], a uključen je i u brojne patološke procese poput stvaranja metastaza raka. Manjak MIP-1 γ u upalnim bolestima crijeva potiče veću upalu i veće oštećenje stanica i tkiva [235]. Rezultati našeg *in vitro* istraživanja provedeni su samo na izoliranim astrocitima, a ne makrofazima i dendritičkom stanicama, pa nije moguće donositi zaključke o tome kako bi SWCNT-PEG utjecale na oslobađanje MIP-1 γ iz tih stanica, no svakako bi bilo zanimljivo za istražiti zbog utvrđivanja sustavnog učinka koje bi SWCNT-PEG mogle izazvati prilikom potencijalne terapije TBI.

Tretman astrocita SWCNT-PEG-om nije izazvao povećano oslobađanje proupalnih citokina, što je zabilježeno kod primjene nefunkcionaliziranih cjevčica [236], pa možemo zaključiti da PEGilacija smanjuje sposobnost nanocjevčica da izazivaju upalno stanje. Za potpunije razumijevanje učinka SWCNT-PEG na stanje upale, svakako bi bilo važno ispitati njihove učinke i na populaciji mikroglije.

5.3. Utjecaj SWCNT-PEG na primarnu kulturu astrocita nakon teške ozljede rastezanjem *in vitro*

Sljedeći cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj SWCNT-PEG na primarnu kulturu astrocita nakon *in vitro* teške ozljede rastezanjem. Utjecaj SWCNT na *in vitro* stanične kulture opisan je kroz razna istraživanja [237], ali naše istraživanje prvo je koje istražuje učinak SWCNT-PEG na kulturu astrocita podvrgnutu ozljedi rastezanjem *in vitro*. Po pitanju učinka na tkivo nakon *in vivo* TBI, SWCNT-PEG su istraživane na modelu ozljede leđne moždine u štakora, gdje je pokazano da primjena ovog oblika nanocjevčica na mjesto oštećenja dovodi do opstanka i rasta aksona što se vidi s povećanjem broja neuronskih vlakana na mjestu lezije [196].

Jedan od najvećih problema SWCNT po pitanju biomedicinske primjene je njihova izrazita toksičnost, koja je dokazana kroz brojne studije, stoga je naš prvi zadatak u sklopu ovog cilja bio dokazati da koncentracija SWCNT-PEG od 5 ug/ml koju ćemo koristiti kroz ovo istraživanje neće imati toksične učinke na primarnu kulturu astrocita, unatoč tome što je njihova sigurnost već bila ispitana u prethodnim istraživanjima [232,193].

Brojna istraživanja proučavala su toksičnost CNT u svrhu određivanja toksikološkog profila raznih oblika CNT, prije nego bi se one mogle početi koristiti u bilo kojem obliku biološke terapije. Ukoliko cjevčice nisu funkcionalizirane, odnosno, ukoliko se primijene u svojem čistom stanju, imaju visoku toksičnost na stanice [162,238]. Agregacija je ključ navedenih toksičnih učinaka, a dispergirane čestice, čak i nefunkcionaliziranih CNT pokazuju manju toksičnost [239]. Ugljikove nanocjevčice funkcionalizirane s PEG-om imaju veću sposobnost disperzije u vodenim otopinama te bi stoga trebale imati i puno nižu toksičnost, što su rezultati naše studije i pokazali.

Tretman nanocjevčicama davao se 1 h nakon provedbe teške ozljede rastezanjem, što bi odgovaralo vremenskom okviru davanja terapije nakon TBI u kliničkim uvjetima. Primjena SWCNT-PEG u koncentraciji 5 ug/ml i na stanicama kontrole, i na ozlijeđenim stanicama, nije pokazala citotoksičnost niti u jednoj vremenskoj točki unutar 24 h od ozljede, što se pokazalo korištenjem LDH testa. Ovi rezultati slažu se s dosadašnjim istraživanjima [172]. S druge strane, nije primijećeno niti povećano preživljenje stanica. Ova istraživanja provedena su u akutnoj fazi nakon ozljede te bi bilo zanimljivo i važno istražiti što se događa po pitanju preživljenja astrocita u vremenskim točkama kasnijim od 24 h, pogotovo s obzirom da su neka istraživanja pokazala više razine citotoksičnosti u dužim vremenskim okvirima.

Jedan od mehanizama toksičnosti nefunkcionaliziranih SWCNT povezan je s mitohondrijalnim oštećenjem, pojačanim stvaranjem ROS i oksidativnim oštećenjem struktura u stanici [162]. U uvjetima ozljede dolazi također do povećanja oksidativnih oštećenja te je to jedan od uzroka povećane smrti neurona i glija stanica nakon TBI [21]. Stoga je bilo od velike važnosti odrediti hoće li naš *in vitro* model teške ozljede rastezanjem dovesti do porasta oksidativnog oštećenja te hoće li primjena PEG-SWCNT imati utjecaj na njega. Toksični učinci mjerili su se određivanjem stupnja karbonilacije proteina u uvjetima teške TBI i primjene SWCNT-PEG na stanice podvrgnute ozljedi. Naše istraživanje nije pokazalo značajne razlike između ovih grupa, kao ni u usporedbi sa kontrolom, netretiranim, neozlijeđenim stanicama. Ovi rezultati nisu u skladu s istraživanjem iste vrste *in vitro* ozljede rastezanjem provedenoj na

astrocitima korteksa štakora, u kojem je teška TBI izazvala povećano stvaranje izoprostana, prostaglandina koji nastaju pod djelovanjem ROS [240]. Povećano stvaranje izoprostana izmjereno je 1 h nakon ozljede, dok je analiza koju smo mi provodili provedena 24 h nakon ozljede. Prethodna istraživanja pokazala su da je najveće oksidativno oštećenje u astrocitima upravo 1 h nakon ozljede te da astrociti u kasnijem periodu povrate svoju sposobnost sinteze fosfolipida [241]. Moguće je da je do tih različitih pokazatelja oksidativnih oštećenja došlo upravo zbog velike vremenske razlike u provođenju analiza. U *in vivo* uvjetima, nakon TBI dolazi do poremećaja KMB i neuropale, što također pridonosi produkciji ROS i RNS, a to nije modelirano u obliku ozlijede rastezanjem koju smo mi koristili [242]. Moguće je da i zbog tih razloga također nije došlo do porasta udjela karboniliranih proteina nakon ozljede te je za više specifična istraživanja utjecaja oksidativnog stresa nakon TBI najbolje kombinirati ovaj oblik teške ozljede rastezanjem s drugim spojevima koji će potaknuti stvaranje slobodnih radikala, poput H₂O₂ [243].

Po pitanju utjecaja SWCNT-PEG na oksidaciju proteina, ovo istraživanje nije pokazalo značajnu razliku u odnosu na kontrolu i sTBI. Dosadašnja istraživanja većinom su pokazala da je jedan od mehanizama toksičnosti nefunkcionaliziranih nanocjevčica pojačano stvaranje ROS i oksidativni stres [162], stoga je naš rezultat značajan jer u koncentraciji od 5 µg/ml PEGilirane nanocjevčice nisu imale takve učinke. Slični rezultati pokazani su u istraživanju učinaka SWCNT-PEG naspram nefunkcionaliziranih SWCNT na PC12 neuronsku staničnu liniju, gdje SWCNT-PEG u koncentracijama od 1 µg/ml nije pojačavao nastanak ROS nakon 24 h kao ni gubitak GSH, dok su čiste SWCNT u istoj koncentraciji dovele do značajnog povećanja ROS iako nije bilo učinka na izražaj GSH. Tek u višim koncentracijama od 10 µg/ml SWCNT-PEG dovele su do blagog povećanja ROS, ali i dalje bez značajnog utjecaja na GSH, dok su SWCNT imale negativan utjecaj na oboje [172]. Možemo zaključiti da su dva ključna parametra u prevenciji oksidativnih oštećenja funkcionalizacija nanocjevčica PEG-om te njihova koncentracija, iako neka istraživanja upućuju na to da bi ROS mogli nastati i kao posljedica djelovanja metala koji zaostaju iz procesa proizvodnje SWCNT, poput nikla i itrija [244].

5.4. Utjecaj SWCNT-PEG na izražaj proteina EAAT1 i GFAP u astrocitima podvrgnutim teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro*

Već je opisana važnost EAAT1 transportera u procesu ekscitotoksičnosti. Naše istraživanje pokazalo je da teška traumatska ozljeda rastezanjem značajno utječe na snižavanje

razina EAAT1 transportera u primarnim mišjim astrocitima 24 h nakon ozljede, što je u skladu s podacima iz brojnih *in vivo* i *in vitro* istraživanja ishemijske i traumatske ozljede mozga [65,223,245–247]. Potencijalni mehanizam koji dovodi do ovog smanjenja moglo bi biti oštećenje aktinskog citoskeleta i promjena morfologije astrocita nakon ozljede. Poznato je da EAAT1 kolokalizira s proteinima citoskeleta, kao što je GFAP te promjene u citoskeletu mogu utjecati na aktivnost ili lokalizaciju ovog transportera [248–250].

Naši rezultati također pokazuju da u ozlijeđenim stanicama tretiranim SWCNT-PEG-om, 24 h nakon ozljede dolazi do oporavka funkcije EAAT1, odnosno značajnog porasta u izražaju ovog transportera u odnosu na stanice koje su bile podvrgnute ozljedi i tretirane samo s PEG-om. Ozljeda dovodi do gubitka transportera, dok ga SWCNT-PEG oporavljaju, što upućuje na mogući povoljan utjecaj nanocjevčica na smanjivanje razine glutamata u izvanstaničnoj tekućini i njihov protektivni učinak po pitanju ekscitotoksičnosti. Ovo saznanje je značajno jer su do sada ispitani samo učinci SWCNT-PEG na neozlijeđenim stanicama, gdje su SWCNT-PEG također imale povoljan učinak na razine EAAT1. Mehanizam zbog kojeg dolazi do toga mogao bi biti povezan s promjenom izražaja GFAP-a prilikom tretmana s SWCNT-PEG. Studije su pokazale da SWCNT povećavaju gustoću GFAP-a, a promjene u razinama GFAP-a potiču promjenu morfologije i posljedično funkcije stanice. SWCNT-PEG utječu na smanjenu razgranatost i veću površinu astrocita [232]. Moguće je da je jedan od razloga povećane razine EAAT1 transportera povećan prijenos ovih molekula na staničnu površinu, što je posredovano GFAP-om. U našem istraživanju teška ozljeda rastezanjem nije uzrokovala značajan porast izražaja GFAP-a nakon 24 h, no razine ovog proteina jako variraju između istraživanja ovisno o modelu traume te nije zabilježen porast GFAP-a kod svakog oblika traume. Ne možemo zaključiti je li došlo do pojave reaktivnih astrocita samo bazirano na tome koliki je izražaj ovog proteina, pogotovo u *in vitro* uvjetima u kojima smo provodili naš pokus te bi trebalo provesti istraživanje *in vivo* i pratiti druge funkcionalne parametre astrocita za dobivanje što točnijeg podatka [44]. Također, naše istraživanje je provedeno na astrocitima porijeklom iz mišjih korteksa, gdje je inače manji udio GFAP pozitivnih astrocita naspram mišjih hipokampusu te porast GFAP-a ne mora u ovim uvjetima biti proporcionalan ozljedi [251,44]. Još jedan od faktora koji utječe na izražaj GFAP-a *in vivo* je i utok brojnih proteina iz krvi kroz narušenu KMB, poput fibrina i trombina, što nije bilo modelirano u našim *in vitro* uvjetima s izoliranom populacijom astrocita [252]. Možemo zaključiti da u našem modelu ozljede GFAP ne možemo koristiti kao pokazatelj reaktivnosti astrocita.

Pošto još nije razjašnjen točan mehanizam kojim SWCNT-PEG utječu na stanice astrocita, bilo bi zanimljivo proširiti istraživanje i na druge proteine plazmatske membrane, kako bi se utvrdio utjecaj SWCNT-PEG na površinu stanice. Od posebnog interesa bilo bi istražiti drugi transporter za glutamat kojeg astrociti posjeduju, EAAT2, koji je zaslužan za većinu unosa glutamata iz ECM u stanicu i za kojeg je pokazano da je također smanjeno izražen nakon TBI *in vivo* [253,254]. No u *in vitro* uvjetima u primarnim mišjim astrocitima nije moguće postići stabilni izražaj ovog proteina, pošto je za njegov izražaj nužna stimulacija astrocita čimbenicima koje luče neuroni ili endotelne stanice [255].

5.5. Utjecaj SWCNT-PEG na izražaj citokina u astrocitima podvrgnutim teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro*

Po pitanju sekretorne uloge astrocita, teška ozljeda rastezanjem sama po sebi nije dovela do značajnih promjena u razinama određenih citokina u mediju astrocita, u usporedbi sa medijem neozlijeđenih, netretiranih stanica. S druge strane, nakon tretmana sa SWCNT-PEG-om došlo je do značajnog povećanja koncentracija axl, BLC, G-CSF, GM-CSF, IL-3-Rb, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 i IL-10 u mediju staničnih kultura nakon ozljede.

Axl je receptorska tirozin kinaza čiji je ligand faktor rasta GAS6. Ona po svojoj aktivaciji regulira brojne funkcije u stanici, poput preživljenja i proliferacije, migracije te diferencijacije. Naši rezultati pokazali su značajan porast axl proteina u ozlijeđenim stanicama tretiranim SWCNT-PEG-om, u usporedbi s vrlo niskim razinama ovog proteina u neozlijeđenim stanicama i onim ozlijeđenim tretiranim samo PEG-om. Axl je pojačano izražen nakon TBI te omogućava astrocitima da fagocitiraju ozlijeđene neurone i stanični otpad [256]. To bi moglo upućivati na poticanje obnove stanica nakon ozljede.

IL-4 jedan je od citokina koji ima imunomodulacijsku ulogu. Potiče snažniji izražaj M2 fenotipa mikroglije, usmjerenog na popravak tkiva, remodeliranje matriksa i supresiju imunološkog odgovora. [27]. Ovaj oblik mikroglije luči neurotrofne faktore, aktivira neuralne progenitorske stanice i potiče rast aksona te utječe na zatvaranje KMB [17]. Osim funkcije na imunološki sustav, IL-4 uz IL-5 potiče povećano stvaranje čimbenika rasta neurona u astrocitima [257]. Naši rezultati pokazuju porast lučenja IL-4 nakon primjene SWCNT-PEG, stoga možemo pretpostaviti povoljan učinak ovih nanocjevčica na TBI po pitanju modulacije funkcije mikroglije stanica, ali i samog učinka na astrocite.

Naši rezultati pokazali su i porast IL-10 nakon ozljede i u stanicama tretiranim samo PEG-om, i u stanicama tretiranim SWCNT-PEG-om. Ozljeda inače potiče porast oslobađanja brojnih citokina i kemokina i brojni radovi prikazali su porast IL-10 i u *in vivo* uvjetima nakon TBI [48]. Važnost proizvodnje IL-10 nakon TBI je povoljna, što je potvrdilo jedno istraživanje TBI na štakorima gdje je intravenska primjena IL-10 smanjila proizvodnju proupalnih citokina TNF α i IL-1 β te imala neuroprotektivne učinke [27]. U našem istraživanju primjena SWCNT-PEG nije značajno utjecala na razine IL-10 koje su bile oslobođene iz astrocita nakon TBI.

Porast izražaja IL-6 bio je prisutan samo u skupini ozlijeđenih stanica koje su bile tretirane SWCNT-PEG-om, što znači da ovaj porast nije bio ovisan o ozljedi, već je posljedica djelovanja nanocjevčica. Za razliku od našeg modela ozljede, u *scratch* modelu *in vitro* ozljede astrocita dolazi do oslobađanja IL-6, uz IL-1 i TNF α [258], kao i u *in vivo* uvjetima ozljede [259]. Što se tiče utjecaja SWCNT na oslobađanje IL-6, naši rezultati se slažu s istraživanjima utjecaja nefunkcionaliziranih nanocjevčica koje također stimuliraju produkciju ovog citokina, iako je ovakav oblik čistih SWCNT uzrokovao i porast IL-1 β , što nije primijećeno u našem modelu [236]. Iako je IL-6 proupalni citokin, povezuje se uz bolje ishode nakon TBI, zbog njegovog povoljnog utjecaja na vaskularizaciju [259].

IL-9 je jedan od proupalnih citokina, čija je važnost manje istražena u kontekstu TBI. U SŽS, *in vivo* uključen je u razvoj nekih oboljenja te potiče aktivaciju pomoćničkih T 17 stanica koji potiču oslobađanje GM-CSF i njegovo djelovanje u smjeru poticanja neuroupale [260]. Istraživanja na miševima pokazala su da nakon teške TBI dolazi do porasta IL-9 [261] te da taj porast korelira s većom neuronskom smrću posredovanu ekscitotoksičnošću [262]. Koristi se i kao biljeg kronične upale nakon blage TBI, jer se pokazalo da njegov porast ostaje prisutan i nakon 12 mjeseci od traume [263]. Oblik ozljede primijenjen u našem istraživanju nije uzrokovao porast ovog citokina, no primjena SWCNT-PEG to jest učinila. Postoji nedovoljna količina podataka o točnim mehanizmima djelovanja IL-9 nakon TBI da bi mogli doći do zaključka je li njegov porast povoljan ili nepovoljan nakon ozljede.

G-CSF u SŽS-u ima ulogu u razvoju pamćenja, ponašanja i motorike. Također sudjeluje u putovima nagrade i neuroendokrinoj komunikaciji. Ima direktne učinke na stanice mozga tako što potiče putove preživljavanja nakon ishemije ili traumatske ozljede i blokira proizvodnju proupalnih citokina. Potiče lučenje BDNF-a, neurogenezu i diferencijaciju mezenhimalnih stanica koštane srži u neurone [264]. Djeluje i posredno, povećava proizvodnju neutrofila koji će proći oštećenu KMB i imati učinke na mjestu ozljede. U *in vivo* istraživanjima

moždanog udara na štakorima, pokazalo se da primjena ovog citokina dovodi do neuroprotektivnih učinaka i smanjenog gubitka tkiva [265,266]. Istraživanje blage TBI pokazalo je dugotrajno povišene razine G-CSF-a, koje su povezane s boljim ishodom oporavka [267], što također upućuje na njegovu neuroprotektivnu ulogu. U našem istraživanju značajan porast G-CSF primijećen je u grupi ozlijeđenih stanica tretiranih PEG-SWCNT u usporedbi samo sa stanicama podvrgnutim ozljedi. Ovi rezultati upućuju na to da bi jedan od potencijalno protektivnih mehanizama nanocjevčica nakon traume bio stimulacija proizvodnje ovog citokina, ali je za to potrebna i *in vivo* potvrda ovog njihovog učinka na astrocite.

GM-CSF u fiziološkim uvjetima u SŽS-u je prisutan u niskim koncentracijama, gdje ima ulogu u razvoju mozga, regulaciji sna i neuroendokrinom komunikaciji. Njegovo povećano stvaranje ima učinak na funkcije mikroglia stanice poput oslobađanja metaloproteinaze matriksa 12 i fagocitoze mijelina, prezentacije antigena i stimulacije upale. Potiče proliferaciju astrocita i lučenje proupalnih faktora, a na neurone djeluje antiapoptički [264]. Od patofizioloških procesa uključen u procese autoimunosti i kronične upale te je uključen u razvoj nekih oblika leukemija, a u SŽS-u ima ulogu u razvoju autoimunog encefalomijelitisa i multiple skleroze, neurodegenerativnih bolesti i psihijatrijskih poremećaja [268]. Njegova uloga u TBI nije još razjašnjena, ali smatra se da ima svojstva neuroprotekcije i da potiče aktivaciju i proliferaciju astrocita [269,264,270,271]. IL-5 ima najvažniju ulogu u aktivaciji eozinofila i u razvoju astme. Ova dva citokina, uz IL-3, vežu se na svoje receptore koji imaju zajedničku podjedinicu IL-3Rb, poznatu još i kao CSF2Rb ili IL-5Rb. Ta podjedinica važna je za aktivnost receptora u imunosti i regulaciji upale te diferencijaciji progenitorskih hematopoetskih stanica [268]. U našem istraživanju ozljeda nije dovela do značajnog porasta navedenih citokina iako se zna da TBI, kao i drugi oblici ozljede mozga, dovodi do njihovog porasta [264]. Nakon tretmana SWCNT-PEG došlo je do značajnog porasta GM-CSF, IL-5 i IL-3Rb. Možemo zaključiti da će taj porast imati utjecaj na proces sekundarne ozljede, ali nedostaju istraživanja koja bi potvrdila kojim mehanizmima. Zna se da GM-CSF i IL-5 aktiviraju signalne putove JAK/STAT, ras-MAPK i fosfatidil inozitol 3 (PI3) kinazni put koji reguliraju preživljenje, rast i diferencijaciju. Jedno istraživanje pokazalo je da mogu ući u interakciju s EPO receptorima prisutnim na svim stanicama mozga, kroz koje mogu prevenirati njihovu apoptozu, čime bi potencijalno djelovali protektivno nakon TBI [268]. Važnost IL3-Rb nije dovoljno istražena u patofiziologiji SŽS oboljenja.

Uzevši u obzir sve navedene rezultate, vidljivo je da se utjecaj SWCNT-PEG na oslobađanje citokina iz astrocita počinje očitovati tek u uvjetima ozljede. S obzirom na

dostupne literaturne podatke o učincima i važnosti pojedinih od navedenih citokina u kontekstu TBI, možemo pretpostaviti da će promjene uzrokovane SWCNT-PEG-om imati povoljan utjecaj na oporavak nakon ozljede.

5.6. Utjecaj SWCNT-PEG na antioksidativni sustav u astrocitima podvrgnutim teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro*

U uvjetima TBI dolazi do pojačanog stvaranja ROS i oksidativnih oštećenja stanica. Kako bi se to kompenziralo, potrebna je pojačana aktivnost antioksidativnog sustava stanice, a jedan od važnih čimbenika je Nrf2 koji potiče izražaj HO-1, a ima utjecaj i na povećani izražaj dismutaze superoksida 1 (SOD1) i GPX1 [272–274]. HO-1 služi u katabolizmu slobodnog hema, koji se nakuplja nakon TBI i potiče stvaranje slobodnih radikala. Produkti te reakcije su ugljični monoksid, koji stimulira transkripciju antioksidacijskih enzima te biliverdin, koji se može konvertirati u bilirubin, molekulu s antioksidacijskim djelovanjem [275,276]. SOD1 katalizira pretvorbu superoksidnog aniona u vodikov peroksid, što se događa u normalnim uvjetima u mitohondrijima tijekom staničnog disanja, ali i u patološkim stanjima povećanog stvaranja ROS-a poput TBI, gdje pojačan izražaj SOD1 ima neuroprotektivne učinke [277,278]. Vodikov peroksid također ima štetne utjecaje na stanicu i mora se neutralizirati u H₂O i O₂, a u tom procesu veliku ulogu ima GPX1 [279]. Nakon TBI dolazi do narušavanja antioksidativnog sustava i smanjene sposobnosti odstranjivanja ROS i RNS, što je posredovano regulacijom naniže transkripcijskog faktora Nrf2, i smanjenom produkcijom HO-1, SOD1 i GPX1, a to je dokazano i u *in vitro* i u *in vivo* istraživanjima [274,280]. S druge strane, postoje i istraživanja koja su pokazala da ozljeda uzrokuje porast Nrf2 i HO-1, s time da je vrhunac izražaja u neuronima nakon 24 h, dok je u astrocitima u toj vremenskoj točki neznatan, nego doseže svoj vrhunac tek nakon 7 dana [281–283]. Ove razlike između istraživanja mogu biti zbog provođenja različitog modela i stupnja ozljede. *In vivo* ispitivanja blage i teške TBI na štakorima potvrdila su da ozljeda izaziva porast HO-1 u glija stanicama već nakon 24 h te da u *in vivo* uvjetima porast HO-1 prati porast težine ozljede [284]. U našem modelu ozljeda nije uzrokovala značajne razlike u izražaju Nrf2, kao ni HO-1, SOD1 ni GPX1. Nažalost, ne postoje istraživanja Nrf2 izražaja u našem modelu ozljede *in vitro* u kulturi astrocita s kojima bi mogli usporediti naše rezultate, pošto je većina prethodno navedenih studija bila rađena na neuronima. Provedeno je jedno istraživanje repetitivne blage *in vitro* ozljede u kulturi neuroblastoma koje također nije pokazalo razlike u izražaju Nrf2 [285]. Bilo bi zanimljivo ispitati izražaj 7 dana nakon ozljede, kada se pokazalo da dolazi do značajnog porasta *in vivo* kad bi se potencijalno pokazala drugačija slika.

Po pitanju učinka SWCNT-PEG, u našem istraživanju pokazali smo da u astrocitima u uvjetima ozljede one ne povećavaju karbonilaciju proteina, odnosno one same po sebi ne povećavaju oksidativni stres. No zanimljivo je bilo utvrditi hoće li imati antioksidativne učinke i djelovati na izražaj Nrf2 i proteina koje on regulira, ili će imati utjecaj na supresiju izražaja navedenih čimbenika. Ovo smo ispitivali u uvjetima teške ozljede rastezanjem, 24 h nakon traume, odnosno 23 h nakon tretmana PEG-om ili SECNT-PEG-om, a proteini od interesa su nam uz Nrf2 bili HO-1, SOD1 i GPX1. Dosadašnja ispitivanja učinka SWCNT na ove signalne putove nisu brojna. Određena *in vivo* istraživanja iniciranja SWCNT-PEG u mišji hipokampus, nakon prvotne prooksidacijske reakcije, pokazala su da ove nanocjevčice imaju potencijalna antioksidativna svojstva. Naime, 7 dana nakon iniciranja, histološke analize pokazale su smanjenu produkciju ROS-a i povećanu aktivnost antioksidativnog sustava, s time da se ovi rezultati odnose samo na raspršene SWCNT-PEG manjih dimenzija u niskim koncentracijama [286,287]. Također, jedno istraživanje pokazalo je da SWCNT mogu imati antioksidativno djelovanje zbog svojih C=C lanaca koji imaju svojstva sakupljanja molekula ROS-a, na sličan način kao karotenoidi [288]. Po pitanju *in vitro* ispitivanja učinka SWCNT-PEG u neuralnim stanicama, jedno istraživanje na PC12 staničnoj liniji pokazalo je da SWCNT-PEG u koncentracijama od 1 µg/ml ne pojačava nastanak ROS nakon 24 h kao niti gubitak GSH, dok u koncentraciji 10 µg/ml povećava ROS, ali bez značajnog utjecaja na GSH. Ostala istraživanja naglašavaju pojačan oksidativni stres [289]. Naši rezultati nisu pokazali značajan utjecaj SWCNT-PEG u modelu ozljede na izražaj Nrf2 i GPX1, no došlo je do pojačanog izražaja SOD1 i HO-1 u usporedbi s kontrolnim stanicama i ozlijeđenim stanicama. HO-1 u procesu razgradnje hema stvara CO, koji u niskim koncentracijama ima povoljne učinke na neurogenezu i angiogenezu, što je važno u kontekstu oporavka od TBI, a između ostalog sudjeluje i u procesiranju pamćenja djelovanjem na dugoročnu potencijaciju sinapsi [290]. Moguće je da se radi o ciljanom odgovoru na redoks stres, a ne koordiniranoj aktivaciji antioksidansa posredovanoj Nrf2 signalnim putem. Indukcija HO-1 može odražavati signalizaciju posredovanu MAPK-om ili Bach1-om potaknutu blagim oksidativnim promjenama povezanim s nanocjevčicama. Istodobna pojačana regulacija SOD1 ukazuje na odgovor na porast superoksidnih aniona. Međutim, smanjenje GPX implicira neriješenu detoksikaciju peroksida ovisnu o glutationu. Ovi rezultati ukazuju da SWCNT-PEG potiče djelomičnu, specifičnu redoks adaptaciju u ozlijeđenim astrocitima, potencijalno pomičući oksidativnu ravnotežu bez potpunog vraćanja antioksidativnog kapaciteta.

5.7. Utjecaj SWCNT-PEG na stanični stres u astrocitima podvrgnutim teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro*

Zbog već poznatog toksičnog učinka SWCNT na plućno tkivo, njihov učinak na izražaj iNOS, biljeg upalnog stanja, je najviše istraživano upravo u stanicama makrofaga i epitela pluća [291,292]. Utjecaj PEGiliranih SWCNT na izražaj iNOS-a u stanicama, između ostalog i astrocitima, još nije istražen, a posebice u uvjetima ozljede. Poznato je da *in vivo* nakon TBI, zbog povećanih razina oslobođenog glutamata i proupalnih citokina, dolazi do stimulacije iNOS-a, a to smo potvrdili i u našem istraživanju *in vitro* ozljede [293]. iNOS može imati toksične učinke na SŽS jer ima sposobnost stvaranja puno viših razina NO naspram eNOS, čija aktivnost je važna za održavanje cerebralnog perfuzijskog tlaka i koja je protektivna [294]. Hoće li SWCNT-PEG imati utjecaj na razine iNOS u ozlijeđenim astrocitima ispitali smo Western blot analizom, 24 h nakon ozljede. Rezultati nisu pokazali značajne razlike u izražaju u usporedbi s kontrolom, ali ni s ozlijeđenim stanicama tretiranim samo PEG-om. Možemo zaključiti da SWCNT-PEG neće pojačavati upalni odgovor u stanicama.

HSP70 je jedan od članova obitelji proteina šaperona, koji čuvaju strukturu proteina i omogućavaju njihov prijenos u stanici, a pojačano se stvaraju u uvjetima ozljede, ishemije i metaboličkog stresa, što je potvrđeno *in vivo* ispitivanjima TBI. Smatra se da je porast HSP70 koji prati ozljedu protektivan te da stimulacija proizvodnje ovog proteina pridonosi boljem oporavku nakon TBI [295]. Mehanizam kojim se očituje njegova neuroprotektivna funkcija je između ostalog smanjena produkcija IL-6 i NO te smanjena aktivnost metaloproteinaza matriksa čiju aktivnost stimulira TBI [296–298]. U našem istraživanju teška ozljeda rastezanjem *in vitro* nije uzrokovala značajne promjene u izražaju HSP70 proteina. *In vivo* istraživanja ishemije mozga pokazala su porast HSP70, ali dominantno u neuronima, i to samo u određenim regijama [298]. Porast HSP70 nakon *in vivo* TBI potvrđen je i u mišjim hipokampusima, već nakon 12 h nakon ozljede [299]. Po pitanju *in vitro* istraživanja izražaja HSP70 u SŽS oboljenjima, najviše istraživanja provedeno je u modelu ishemijske ozljede, gdje je HSP70 uvijek povišen [300]. Jedno *in vitro* istraživanje *scratch* ozljede neurona dodatno tretiranih glutamatom kako bi se stimulirala sekundarna ozljeda također je pokazao povišene razine HSP70 kao odgovor na ozljedu [301]. Nažalost, nema istraživanja HSP70 u modelu *in vitro* ozljede rastezanjem u astrocitima, pa je nemoguće usporediti naše rezultate sa drugim istraživanjima. Moguće da je do izostanka učinka ozljede na porast stvaranja HSP70 u našem istraživanju stvar modela provođenja ozljede te znatne varijacije između *in vitro* i *in vivo*

uvjeta. Također, ni primjena PEG-a i SWCNT-PEG-a nije uzrokovala oscilacije u razinama HSP70 nakon ozljede.

4.8. Utjecaj SWCNT-PEG na miRNK profil u egzosomima porijeklom iz astrocita

Egzosomi, izvanstanične vezikule kojima komuniciraju stanice mozga, imaju važnu ulogu u zdravlju i patofiziologiji raznih oboljenja SŽS. Imaju sposobnost prelaska KMB te se mogu izolirati iz krvi i koristiti kao dijagnostički biljezi. No zanimljivi su i zbog svoje sposobnosti da iz krvi uđu natrag u SŽS te se istražuju u smjeru sredstva za dostavu lijekova koji imaju slabu sposobnost prelaska KMB te za dostavu raznih mRNK molekula s terapijskim potencijalom [302]. Povoljan učinak egzosoma porijeklom iz astrocita (ADE) primijenjenih u terapijske svrhe dokazan je u *in vivo* istraživanjima na štakorima, u uvjetima hipoksije i ishemije, kao i nakon TBI i SCI. U TBI terapija ADE uzrokovala je smanjenje edema, smanjenje oštećenja neurona i apoptoze te bolju motoričku i kognitivnu funkciju. Također, smanjuje i oksidativni stres povećanjem izražaja Nrf2 u neuronima [303]. Djelovanjem na mikrogliju ADE smanjuju njenu polarizaciju u proupalno stanje te mogu regulirati neuroupalu [97,304]. Primjena ADE u terapiji SCI također je dovela do pozitivnih rezultata po pitanju smanjenja upale, apoptoze i stvaranja ožiljka. Smatra se da je velik dio ovih učinaka rezultat djelovanja brojnih miRNK koji se nalaze u egzosomima i koji mogu značajno utjecati na razine proteina u stanicama koje ih primaju [305].

miRNK jedna su od novijih meta od interesa u raznim bolestima povezanim sa središnjim živčanim sustavom, uključujući TBI. Sve se više izučavaju u brojnim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima, ali i u klinici. Nova istraživanja otkrivaju sve više miRNK čiji izražaj se mijenja nakon TBI te se uspostavilo da one mogu služiti kao biljezi TBI u ljudi, ukazivati na težinu ozljede te za predviđanje ishoda. Za ove svrhe, one se mogu detektirati iz krvi ili iz cerebrospinalne tekućine [306]. Dosadašnja *in vivo* istraživanja TBI u štakora i miševa također su pokazala brojne promjene u razinama miRNK nakon traume. Tu su se provodila istraživanja različitog modela i težine ozljede mozga, kao i leđne moždine te su također određene miRNK sa značajnom promjenom izražaja [307,308,306]. I kod ljudi i u životinjskim modelima miRNK 21 izdvojena je kao jedna od najviše dereguliranih molekula u smislu povišenog izražaja.

U našem istraživanju ispitivali smo izražaj miRNK 21a, miRNK 26a i miRNK 146a nakon teške ozljede rastezanjem, a kao unutarnju kontrolu za normalizaciju rezultata koristili smo miRNK 16 (5p). Izabrali smo ove miRNK zbog njihove uloge u SŽS-u i važnosti nakon

TBI, a u literaturi ne postoje podatci o njihovom ispitivanju u *in vitro* TBI na populaciji astrocita.

Kao što je već navedeno, brojne studije pokazale su da TBI najjače utječe na porast izražaja miRNK 21, čije funkcije su stimulacija rasta, proliferacije i preživljenja te inhibicija upale i apoptoze [309–312]. Povišenje izražaja miRNK 21 korelira s boljim ishodom nakon traume, što je potvrđeno i *in vitro* i *in vivo* pokusima [313,314]. Ona smanjuje edem i veličinu lezije inhibicijom apoptoze i poboljšanjem angiogeneze, a mehanizam kojim dolazi do tog učinka povezan je s utjecajem na Akt put signalizacije [93,315]. Jedno istraživanje pokazalo je da je jedna ciljna meta ove miRNK i Rab11a, GTP-aza koja je uključena u promet vezikula i stvaranje autofagosoma, a čije utišavanje suprimira autofagiju i omogućava preživljenje stanice [314]. miRNK 21a pogoduje i očuvanju KMB, smanjujući lučenje TNF- α i IL-6 te utjecajem na NF-KB signalni put, a uz to ima utjecaj i na angiopoetin-1 i njegov receptor [97,312].

Porodica miRNK 146 uključena je u regulaciju imunološkog odgovora i druge procese koje uključuju urođenu imunost. Jedna od ciljnih meta miRNK 146 je Notch 1, protein uključen u signalizaciju nužnu za održavanje neuralnih matičnih stanica i gliogenezu [316]. Pojačan izražaj miRNK 146a primijećen je kod neuroupale te se smatra da ova miRNK ima važnu protuupalnu aktivnost. Pronađena je i u egzosomima te može smanjiti upalno stanje u stanici u koju je ovim putem dostavljena. Recimo, ako se dostavi u mikrogliju, dolazi do utišavanja IRAK1 i NFAT5, čime se smanjuje njihova M1 proupalna polarizacija [317]. miRNK 146a ima inhibitorni učinak i na IRAK1 u stanicama vaskularnog endotela te pruža neuroprotektivni učinak nakon moždanog udara [318]. Osim u upali, povišene razine primijećene su i nakon TBI [310]. miRNK 146a ima utjecaj i na astrocite. U *in vitro* uvjetima transfekcija s ovom miRNK dovela je do značajnog porasta u postotku GFAP pozitivnih stanica [316].

miRNK 26a uključena je u regulaciju lučenja BDNF koji sudjeluje u rastu, proliferaciji i preživljenju stanica putem MAPK/ERK signalnog puta, fosfolipaze C i PI3 kinaznog puta [319]. ERK je jedna od pojačano izraženih proteinskih kinaza nakon traume te njen porast korelira sa stupnjem ozljede i s procesom reaktivne astroglioze [216]. Ova miRNK ima ulogu i u procesu angiogeneze putem lučenja faktora induciranog hipoksijom (engl. *hypoxia inducible factor*, HIF) 1 α i VEGF [93]. Poznato je da je signalni put koji ova miRNK regulira PTEN/AKT/mTOR, čija aktivacija potiče regeneraciju aksona i neurogenezu [317]. U uvjetima kada je smanjen izražaj ove miRNK, kao u Parkinsonovoj bolesti, dolazi do povećane aktivacije DAPK1 signalnog puta i pojačanog umiranja dopaminergičnih neurona.

miRNK 16 koristi se kao endogena kontrola u analizama miRNK, pošto je njegov izražaj prisutan u svim stanicama [320].

U našem istraživanju, nakon teške ozljede rastezanjem nije došlo do značajne razlike u izražaju niti jedne od navedenih miRNK. Mogući razlog tome je što su vršene analize samo miRNK porijeklom iz egzosoma. Dosta navedenih istraživanja mjerilo je izražaj miRNK u stanicama te bi bilo zanimljivo izmjeriti razine miRNK i u samim astrocitima nakon ozljede i tretmana. Također, brojna od navedenih istraživanja radila su analize miRNK iz tkiva mozga ili krvi, gdje brojni drugi okolišni faktori utječu na profil miRNK. *In vitro* istraživanja kokultura astrocita i mikroglije ili neurona, ili dodatak proupalnih citokina u naš model ozljede možda bi doveli do drugačijih rezultata te bi također bili zanimljivi za daljnja istraživanja.

Po pitanju učinka SWCNT-PEG na izražaj miRNK nakon TBI nema istraživanja dostupnih u literaturi. Utjecaj nefunkcionaliziranih SWCNT na izražaj miRNA u astrocitima ispitan je na staničnoj liniji humanih astrocita, gdje su nanocjevčice dovele do disregulacije ispitivanih miRNA [167]. Također, utjecaj SWCNT na tkivo mozga u embrionalnom razvoju ispitan je na embrijima riba zebrica. Tu se pokazalo da nanocjevčice imaju utjecaj na izražaj miRNK uključenih u razvoj mozga te da dolazi do deregulacije miRNK 19, miRNK 21, miRNK 96, miRNK 143, miRNK 145, miRNK 182, i miRNK 206 [90]. Zanimljivo je da su u ovom istraživanju nanocjevčice izazvale promjene u izražaju miRNK 21, koja je bila jedna od miRNK od interesa i u našem istraživanju. Ovi rezultati pokazuju da SWCNT imaju utjecaj na stabilnost genoma, vjerojatno na razini endoplazmatskog retikuluma. U našem modelu ni ozljeda, ni tretman nanocjevčicama nisu imali utjecaj na izražaj miRNK 21, ali niti na druge miRNK koje smo ispitivali. Osim samih razlika u modelu koje bi objasnile ove razlike u rezultatima, u našem istraživanju korištene su PEGilirane nanocjevčice, a o njihovom utjecaju na izražaj miRNK nema dostupnih podataka s kojima bi mogli usporediti naše rezultate. Možemo pretpostaviti da je manjak značajnog utjecaja na razine ispitivanih miRNK posljedica funkcionalizacije SWCNT.

5. ZAKLJUČAK

U ovom istraživanju proučavali smo učinke teške ozljede rastezanjem *in vitro* na primarnu kulturu astrocita te učinke tretmana SWCNT-PEG-om na ozlijeđene stanice. Naši rezultati pokazuju značajnu smrt stanica nakon ozljede, ali i da SWCNT-PEG ne utječu na njeno povećanje te da ne pridonose oksidativnom oštećenju astrocita. U ozljedi dolazi do značajnog gubitka EAAT1 transportera za glutamat, koji je od velike važnosti nakon TBI zbog svoje uloge u čišćenju viška glutamata iz izvanstaničnog prostora i prevencije ekscitotoksičnosti. Naši rezultati upućuju na protektivan učinak SWCNT-PEG, pošto dodatak ovih nanočestica prevenira gubitak EAAT1 transportera. Također, SWCNT-PEG imaju utjecaj na sekreciju citokina u uvjetima ozljede, na način da potiču lučenje citokina koji imaju ulogu u oporavku nakon ozljede. Jedna od karakteristika sekundarne ozljede je i oksidativni stres i narušen antioksidativni kapacitet stanica. U našem modelu ozljede nisu zamijećene oscilacije u proteinima uključenim u te putove, ali nakon terapije SWCNT-PEG došlo je do porasta SOD1 i HO-1 što može upućivati na blago povećan antioksidativni kapacitet. Zbog svega navedenog, možemo zaključiti da SWCNT-PEG imaju terapijski potencijal za liječenje traumatske ozljede mozga, a dobivene rezultate trebalo bi potvrditi i u drugim staničnim kulturama poput neurona kao i u *in vivo* modelima ozljede.

6. LITERATURA

1. Lerouet D, Marchand-Leroux C, Besson VC. Neuropharmacology in traumatic brain injury: from preclinical to clinical neuroprotection? *Fundam Clin Pharmacol*. 2021;35(3):524-538. doi:10.1111/fcp.12656
2. Kodliwadmath HB, Koppad SN, Desai M, Badiger SP. Correlation of Glasgow outcome score to Glasgow coma score assessed at admission. *International Surgery Journal*. 2016;3(4):1959-1963. doi:10.18203/2349-2902.isj20163172
3. Corrigan JD, Hammond FM. Traumatic brain injury as a chronic health condition. *Arch Phys Med Rehabil*. 2013;94(6):1199-1201. doi:10.1016/j.apmr.2013.01.023
4. Dewan MC, Rattani A, Gupta S, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg*. 2018;130(4):1080-1097. doi:10.3171/2017.10.JNS17352
5. Nguyen R, Fiest KM, McChesney J, et al. The International Incidence of Traumatic Brain Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Can J Neurol Sci*. 2016;43(6):774-785. doi:10.1017/cjn.2016.290
6. Taylor CA, Bell JM, Breiding MJ, Xu L. Traumatic Brain Injury-Related Emergency Department Visits, Hospitalizations, and Deaths - United States, 2007 and 2013. *MMWR Surveill Summ*. 2017;66(9):1-16. doi:10.15585/mmwr.ss6609a1
7. Krishna G, Beitchman JA, Bromberg CE, Currier Thomas T. Approaches to Monitor Circuit Disruption after Traumatic Brain Injury: Frontiers in Preclinical Research. *Int J Mol Sci*. 2020;21(2):588. doi:10.3390/ijms21020588
8. Medana IM, Esiri MM. Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. *Brain*. 2003;126(Pt 3):515-530. doi:10.1093/brain/awg061
9. Daneshvar DH, Riley DO, Nowinski CJ, McKee AC, Stern RA, Cantu RC. Long Term Consequences: Effects on Normal Development Profile after Concussion. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2011;22(4):683-700. doi:10.1016/j.pmr.2011.08.009
10. Hou R, Moss-Morris R, Peveler R, Mogg K, Bradley BP, Belli A. When a minor head injury results in enduring symptoms: a prospective investigation of risk factors for postconcussional syndrome after mild traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012;83(2):217-223. doi:10.1136/jnnp-2011-300767
11. Lucke-Wold BP, Nguyen L, Turner RC, et al. Traumatic brain injury and epilepsy: Underlying mechanisms leading to seizure. *Seizure*. 2015;33:13-23. doi:10.1016/j.seizure.2015.10.002
12. Tubi MA, Lutkenhoff E, Blanco MB, et al. Early seizures and temporal lobe trauma predict post-traumatic epilepsy: A longitudinal study. *Neurobiol Dis*. 2019;123:115-121. doi:10.1016/j.nbd.2018.05.014
13. Bramlett HM, Dietrich WD. Long-Term Consequences of Traumatic Brain Injury: Current Status of Potential Mechanisms of Injury and Neurological Outcomes. *J Neurotrauma*. 2015;32(23):1834-1848. doi:10.1089/neu.2014.3352

14. Gupta R, Sen N. Traumatic brain injury: a risk factor for neurodegenerative diseases. *Rev Neurosci*. 2016;27(1):93-100. doi:10.1515/revneuro-2015-0017
15. Nokkari A, Abou-El-Hassan H, Mechref Y, et al. Implication of the Kallikrein-Kinin System in Neurological Disorders: Quest for Potential Biomarkers and Mechanisms. *Prog Neurobiol*. 2018;165-167:26-50. doi:10.1016/j.pneurobio.2018.01.003
16. Guerriero RM, Giza CC, Rotenberg A. Glutamate and GABA imbalance following traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2015;15(5):27. doi:10.1007/s11910-015-0545-1
17. Rauchman SH, Zubair A, Jacob B, et al. Traumatic brain injury: Mechanisms, manifestations, and visual sequelae. *Front Neurosci*. 2023;17:1090672. doi:10.3389/fnins.2023.1090672
18. Cobley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol*. 2018;15:490-503. doi:10.1016/j.redox.2018.01.008
19. Andersen JV, Markussen KH, Jakobsen E, et al. Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology*. 2021;196:108719. doi:10.1016/j.neuropharm.2021.108719
20. Hall CN, Klein-Flügge MC, Howarth C, Attwell D. Oxidative phosphorylation, not glycolysis, powers presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying brain information processing. *J Neurosci*. 2012;32(26):8940-8951. doi:10.1523/JNEUROSCI.0026-12.2012
21. Urano S, Asai Y, Makabe S, et al. Oxidative injury of synapse and alteration of antioxidative defense systems in rats, and its prevention by vitamin E. *Eur J Biochem*. 1997;245(1):64-70. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00064.x
22. Lamade AM, Kenny EM, Anthony-muthu TS, et al. Aiming for the Target: Mitochondrial Drug Delivery in Traumatic Brain Injury. *Neuropharmacology*. 2019;145(Pt B):209-219. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.07.014
23. Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(1):49-89. doi:10.1089/ars.2007.9.49
24. Sahyouni R, Gutierrez P, Gold E, Robertson RT, Cummings BJ. Effects of concussion on the blood-brain barrier in humans and rodents. *J Concussion*. 2017;1:10.1177/2059700216684518. doi:10.1177/2059700216684518
25. Chodobski A, Zink BJ, Szmydynger-Chodobska J. Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Transl Stroke Res*. 2011;2(4):492-516. doi:10.1007/s12975-011-0125-x
26. Gadani SP, Walsh JT, Lukens JR, Kipnis J. Dealing with Danger in the CNS: The Response of the Immune System to Injury. *Neuron*. 2015;87(1):47-62. doi:10.1016/j.neuron.2015.05.019

27. Kumar A, Loane DJ. Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun.* 2012;26(8):1191-1201. doi:10.1016/j.bbi.2012.06.008
28. Chen Y, Chen J, Xing Z, Peng C, Li D. Autophagy in Neuroinflammation: A Focus on Epigenetic Regulation. *Aging Dis.* 2024;15(2):739-754. doi:10.14336/AD.2023.0718-1
29. Graham NS, Sharp DJ. Understanding neurodegeneration after traumatic brain injury: from mechanisms to clinical trials in dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2019;90(11):1221-1233. doi:10.1136/jnnp-2017-317557
30. Nance E, Pun SH, Saigal R, Sellers DL. Drug delivery to the central nervous system. *Nat Rev Mater.* 2022;7(4):314-331. doi:10.1038/s41578-021-00394-w
31. Walter AE, Pike JR, Coresh J, et al. Traumatic brain injury, changes in plasma amyloid, tau, and neurodegenerative biomarkers, and dementia risk. *Alzheimers Dement.* 2025;21(9):e70611. doi:10.1002/alz.70611
32. Wolburg H, Noell S, Wolburg-Buchholz K, Mack A, Fallier-Becker P. Agrin, aquaporin-4, and astrocyte polarity as an important feature of the blood-brain barrier. *Neuroscientist.* 2009;15(2):180-193. doi:10.1177/1073858408329509
33. Verkhratsky A, Nedergaard M, Hertz L. Why are astrocytes important? *Neurochem Res.* 2015;40(2):389-401. doi:10.1007/s11064-014-1403-2
34. Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, et al. Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier. *J Cell Sci.* 2001;114(7):1297-1307. doi:10.1242/jcs.114.7.1297
35. Jessen NA, Munk ASF, Lundgaard I, Nedergaard M. The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res.* 2015;40(12):2583-2599. doi:10.1007/s11064-015-1581-6
36. Abbrescia P, Signorile G, Valente O, et al. Crucial role of Aquaporin-4 extended isoform in brain water Homeostasis and Amyloid- β clearance: implications for Edema and neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol Commun.* 2024;12(1):159. doi:10.1186/s40478-024-01870-4
37. MacVicar BA, Newman EA. Astrocyte Regulation of Blood Flow in the Brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(5):a020388. doi:10.1101/cshperspect.a020388
38. Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids Barriers CNS.* 2020;17:69. doi:10.1186/s12987-020-00230-3
39. Lu Q, Xiong J, Yuan Y, et al. Minocycline improves the functional recovery after traumatic brain injury via inhibition of aquaporin-4. *Int J Biol Sci.* 2022;18(1):441-458. doi:10.7150/ijbs.64187
40. Krum JM, Khaibullina A. Inhibition of endogenous VEGF impedes revascularization and astroglial proliferation: roles for VEGF in brain repair. *Exp Neurol.* 2003;181(2):241-257. doi:10.1016/s0014-4886(03)00039-6

41. Yang Z, Wang KKW. Glial Fibrillary acidic protein: From intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.* 2015;38(6):364-374. doi:10.1016/j.tins.2015.04.003
42. Brenner M. Role of GFAP in CNS injuries. *Neurosci Lett.* 2014;565:7-13. doi:10.1016/j.neulet.2014.01.055
43. Liu Z, Li Y, Cui Y, et al. Beneficial Effects of GFAP/Vimentin Reactive Astrocytes for Axonal Remodeling and Motor Behavioral Recovery in Mice after Stroke. *Glia.* 2014;62(12):2022-2033. doi:10.1002/glia.22723
44. Escartin C, Galea E, Lakatos A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci.* 2021;24(3):312-325. doi:10.1038/s41593-020-00783-4
45. Wanner IB, Deik A, Torres M, et al. A new in vitro model of the glial scar inhibits axon growth. *Glia.* 2008;56(15):1691-1709. doi:10.1002/glia.20721
46. Kimura-Kuroda J, Teng X, Komuta Y, et al. An *in vitro* model of the inhibition of axon growth in the lesion scar formed after central nervous system injury. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 2010;43(2):177-187. doi:10.1016/j.mcn.2009.10.008
47. Peng L, Parpura V, Verkhratsky A. EDITORIAL Neuroglia as a Central Element of Neurological Diseases: An Underappreciated Target for Therapeutic Intervention. *Curr Neuropharmacol.* 2014;12(4):303-307. doi:10.2174/1570159X12999140829152550
48. 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. doi:10.1186/s12964-020-00549-2
49. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 1999;22(5):208-215. doi:10.1016/s0166-2236(98)01349-6
50. Verkhratsky A, Matteoli M, Parpura V, Mothet JP, Zorec R. Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion. *EMBO J.* 2016;35(3):239-257. doi:10.15252/embj.201592705
51. Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jeftinija K, Jeftinija S, Haydon PG. Glutamate-mediated astrocyte–neuron signalling. *Nature.* 1994;369(6483):744-747. doi:10.1038/369744a0
52. De Pittà M, Brunel N, Volterra A. Astrocytes: Orchestrating synaptic plasticity? *Neuroscience.* 2016;323:43-61. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.04.001
53. Mauch DH, Nägler K, Schumacher S, et al. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science.* 2001;294(5545):1354-1357. doi:10.1126/science.294.5545.1354
54. Pfrieger FW. Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. *Brain Res Rev.* 2010;63(1-2):39-46. doi:10.1016/j.brainresrev.2009.11.002
55. Pathak D, Sriram K. Neuron-astrocyte omnidirectional signaling in neurological health and disease. *Front Mol Neurosci.* 2023;16:1169320. doi:10.3389/fnmol.2023.1169320

56. Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in Neurosciences*. 2009;32(8):421-431. doi:10.1016/j.tins.2009.05.001
57. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*. 2004;16(1):1-13. doi:10.1016/j.nbd.2003.12.016
58. Parpura V, Heneka MT, Montana V, et al. Glial cells in (patho)physiology. *Journal of Neurochemistry*. 2012;121(1):4-27. doi:10.1111/j.1471-4159.2012.07664.x
59. Gao Y, Liu N, Chen J, et al. Neuropharmacological insight into preventive intervention in posttraumatic epilepsy based on regulating glutamate homeostasis. *CNS Neurosci Ther*. 2023;29(9):2430-2444. doi:10.1111/cns.14294
60. Parpura V, Verkhratsky A. Astroglial amino acid-based transmitter receptors. *Amino Acids*. 2013;44(4):1151-1158. doi:10.1007/s00726-013-1458-4
61. Hertz L, Rothman DL. Glucose, Lactate, β -Hydroxybutyrate, Acetate, GABA, and Succinate as Substrates for Synthesis of Glutamate and GABA in the Glutamine-Glutamate/GABA Cycle. *Adv Neurobiol*. 2016;13:9-42. doi:10.1007/978-3-319-45096-4_2
62. Zanotti S, Charles A. Extracellular calcium sensing by glial cells: low extracellular calcium induces intracellular calcium release and intercellular signaling. *J Neurochem*. 1997;69(2):594-602. doi:10.1046/j.1471-4159.1997.69020594.x
63. Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med*. 2007;13(2):54-63. doi:10.1016/j.molmed.2006.12.005
64. Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes Give Rise to New Neurons in the Adult Mammalian Hippocampus. *J Neurosci*. 2001;21(18):7153-7160. doi:10.1523/JNEUROSCI.21-18-07153.2001
65. van Landeghem FKH, Weiss T, Oehmichen M, von Deimling A. Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2006;23(10):1518-1528. doi:10.1089/neu.2006.23.1518
66. Beschorner R, Dietz K, Schauer N, et al. Expression of EAAT1 reflects a possible neuroprotective function of reactive astrocytes and activated microglia following human traumatic brain injury. *Histol Histopathol*. 2007;22(5):515-526. doi:10.14670/HH-22.515
67. Piao CS, Holloway AL, Hong-Routson S, Wainwright MS. Depression following traumatic brain injury in mice is associated with down-regulation of hippocampal astrocyte glutamate transporters by thrombin. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019;39(1):58-73. doi:10.1177/0271678X17742792
68. Ding S. Ca²⁺ Signaling in Astrocytes and its Role in Ischemic Stroke. *Adv Neurobiol*. 2014;11:189-211. doi:10.1007/978-3-319-08894-5_10

69. Kobayashi M, Moro N, Yoshino A, et al. Inhibition of P2X4 and P2X7 receptors improves histological and behavioral outcomes after experimental traumatic brain injury in rats. *Exp Ther Med.* 2023;26(2):378. doi:10.3892/etm.2023.12077
70. Lusardi TA. Adenosine Neuromodulation and Traumatic Brain Injury. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7(3):228-237. doi:10.2174/157015909789152137
71. McGuire JL, Ngwenya LB, McCullumsmith RE. Neurotransmitter changes after traumatic brain injury: an update for new treatment strategies. *Mol Psychiatry.* 2019;24(7):995-1012. doi:10.1038/s41380-018-0239-6
72. Perez EJ, Tapanes SA, Loris ZB, et al. Enhanced astrocytic D-serine underlies synaptic damage after traumatic brain injury. *J Clin Invest.* 2017;127(8):3114-3125. doi:10.1172/JCI92300
73. Vogel AD, Upadhyya R, Shetty AK. Neural stem cell derived extracellular vesicles: Attributes and prospects for treating neurodegenerative disorders. *EBioMedicine.* 2018;38:273-282. doi:10.1016/j.ebiom.2018.11.026
74. Holm MM, Kaiser J, Schwab ME. Extracellular Vesicles: Multimodal Envoys in Neural Maintenance and Repair. *Trends Neurosci.* 2018;41(6):360-372. doi:10.1016/j.tins.2018.03.006
75. Conde-Vancells J, Rodriguez-Suarez E, Embade N, et al. Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J Proteome Res.* 2008;7(12):5157-5166. doi:10.1021/pr8004887
76. Datta Chaudhuri A, Dasgheyb RM, DeVine LR, Bi H, Cole RN, Haughey NJ. Stimulus-dependent modifications in astrocyte-derived extracellular vesicle cargo regulate neuronal excitability. *Glia.* 2020;68(1):128-144. doi:10.1002/glia.23708
77. Taylor AR, Robinson MB, Gifondorwa DJ, Tytell M, Milligan CE. Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: role of signaling kinases. *Dev Neurobiol.* 2007;67(13):1815-1829. doi:10.1002/dneu.20559
78. Wang S, Cesca F, Loers G, et al. Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. *J Neurosci.* 2011;31(20):7275-7290. doi:10.1523/JNEUROSCI.6476-10.2011
79. Proia P, Schiera G, Mineo M, et al. Astrocytes shed extracellular vesicles that contain fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor. *Int J Mol Med.* 2008;21(1):63-67.
80. Gosselin RD, Meylan P, Decosterd I. Extracellular microvesicles from astrocytes contain functional glutamate transporters: regulation by protein kinase C and cell activation. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:251. doi:10.3389/fncel.2013.00251
81. Chaudhuri AD, Dastgheyb RM, Yoo SW, et al. TNF α and IL-1 β modify the miRNA cargo of astrocyte shed extracellular vesicles to regulate neurotrophic signaling in neurons. *Cell Death Dis.* 2018;9(3):363. doi:10.1038/s41419-018-0369-4

82. Goetzl EJ, Yaffe K, Peltz CB, et al. Traumatic brain injury increases plasma astrocyte-derived exosome levels of neurotoxic complement proteins. *FASEB J*. 2020;34(2):3359-3366. doi:10.1096/fj.201902842R
83. Moidunny S, Vinet J, Wesseling E, et al. Adenosine A2B receptor-mediated leukemia inhibitory factor release from astrocytes protects cortical neurons against excitotoxicity. *J Neuroinflammation*. 2012;9:198. doi:10.1186/1742-2094-9-198
84. Upadhyia R, Zingg W, Shetty S, Shetty AK. Astrocyte-derived Extracellular Vesicles: Neuroreparative Properties and Role in the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders. *J Control Release*. 2020;323:225-239. doi:10.1016/j.jconrel.2020.04.017
85. Nafar F, Williams JB, Mearow KM. Astrocytes release HspB1 in response to amyloid- β exposure in vitro. *J Alzheimers Dis*. 2016;49(1):251-263. doi:10.3233/JAD-150317
86. Pei X, Li Y, Zhu L, Zhou Z. Astrocyte-derived exosomes suppress autophagy and ameliorate neuronal damage in experimental ischemic stroke. *Exp Cell Res*. 2019;382(2):111474. doi:10.1016/j.yexcr.2019.06.019
87. Pei X, Li Y, Zhu L, Zhou Z. Astrocyte-derived exosomes transfer miR-190b to inhibit oxygen and glucose deprivation-induced autophagy and neuronal apoptosis. *Cell Cycle*. 2020;19(8):906-917. doi:10.1080/15384101.2020.1731649
88. Li P, Sun S, Zhu X, et al. Intranasal delivery of engineered extracellular vesicles promotes neurofunctional recovery in traumatic brain injury. *J Nanobiotechnology*. 2025;23:229. doi:10.1186/s12951-025-03181-9
89. Morel L, Regan M, Higashimori H, et al. Neuronal Exosomal miRNA-dependent Translational Regulation of Astroglial Glutamate Transporter GLT1. *J Biol Chem*. 2013;288(10):7105-7116. doi:10.1074/jbc.M112.410944
90. Minchenko OH, Khita OO, Rudnytska OV, et al. The impact of single walled carbon nanotubes on the expression of microRNA in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Endocr Regul*. 2022;56(2):115-125. doi:10.2478/enr-2022-0013
91. Brennan GP, Henshall DC. MicroRNAs as regulators of brain function and targets for treatment of epilepsy. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(9):506-519. doi:10.1038/s41582-020-0369-8
92. Guarnieri DJ, DiLeone RJ. MicroRNAs: a new class of gene regulators. *Ann Med*. 2008;40(3):197-208. doi:10.1080/07853890701771823
93. Sawant H, Sun B, Mcgrady E, Bihl JC. Role of miRNAs in neurovascular injury and repair. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2024;44(10):1693-1708. doi:10.1177/0271678X241254772
94. Sun P, Liu DZ, Jickling GC, Sharp FR, Yin KJ. MicroRNA-based therapeutics in central nervous system injuries. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018;38(7):1125-1148. doi:10.1177/0271678X18773871

95. Xu L, Cao H, Xie Y, et al. Exosome-shuttled miR-92b-3p from ischemic preconditioned astrocytes protects neurons against oxygen and glucose deprivation. *Brain Res.* 2019;1717:66-73. doi:10.1016/j.brainres.2019.04.009
96. Sun P, Zhang K, Hassan SH, et al. Endothelium-Targeted Deletion of microRNA-15a/16-1 Promotes Post-Stroke Angiogenesis and Improves Long-Term Neurological Recovery. *Circ Res.* 2020;126(8):1040-1057. doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315886
97. Long X, Yao X, Jiang Q, et al. Astrocyte-derived exosomes enriched with miR-873a-5p inhibit neuroinflammation via microglia phenotype modulation after traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation.* 2020;17(1):89. doi:10.1186/s12974-020-01761-0
98. Kochanek PM, Jackson TC, Jha RM, et al. Paths to Successful Translation of New Therapies for Severe Traumatic Brain Injury in the Golden Age of Traumatic Brain Injury Research: A Pittsburgh Vision. *J Neurotrauma.* 2020;37(22):2353-2371. doi:10.1089/neu.2018.6203
99. Patel H, Polam S, Joseph R, Patel H, Polam S, Joseph R. Overview of Treatment Options for Mild Traumatic Brain Injury: A Literature Review. *Cureus.* 2024;16(4). doi:10.7759/cureus.59021
100. Sahuquillo J, Dennis JA. Decompressive craniectomy for the treatment of high intracranial pressure in closed traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;2019(12):CD003983. doi:10.1002/14651858.CD003983.pub3
101. Stevens AR, Belli A, Ahmed Z. Neurotrauma—From Injury to Repair: Clinical Perspectives, Cellular Mechanisms and Promoting Regeneration of the Injured Brain and Spinal Cord. *Biomedicines.* 2024;12(3):643. doi:10.3390/biomedicines12030643
102. Walker PA, Harting MT, Baumgartner JE, Fletcher S, Strobel N, Cox CS. Modern Approaches to Pediatric Brain Injury Therapy. *J Trauma.* 2009;67(2 Suppl):S120-S127. doi:10.1097/TA.0b013e3181ad323a
103. Kochanek PM, Jackson TC, Ferguson NM, et al. Emerging Therapies in Traumatic Brain Injury. *Semin Neurol.* 2015;35(1):83-100. doi:10.1055/s-0035-1544237
104. Algattas H, Huang JH. Traumatic Brain Injury Pathophysiology and Treatments: Early, Intermediate, and Late Phases Post-Injury. *Int J Mol Sci.* 2013;15(1):309-341. doi:10.3390/ijms15010309
105. Dietrich WD, Bramlett HM. The evidence for hypothermia as a neuroprotectant in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics.* 2010;7(1):43-50. doi:10.1016/j.nurt.2009.10.015
106. Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(4):267-278. doi:10.1038/nrn3174
107. Daly S, Thorpe M, Rockswold S, et al. Hyperbaric Oxygen Therapy in the Treatment of Acute Severe Traumatic Brain Injury: A Systematic Review. *Journal of Neurotrauma.* 2018;35(4):623-629. doi:10.1089/neu.2017.5225

108. Kabadi SV, Faden AI. Neuroprotective Strategies for Traumatic Brain Injury: Improving Clinical Translation. *Int J Mol Sci.* 2014;15(1):1216-1236. doi:10.3390/ijms15011216
109. Pilipović K, Župan Ž, Dolenc P, Mršić-Pelčić J, Župan G. A single dose of PPAR γ agonist pioglitazone reduces cortical oxidative damage and microglial reaction following lateral fluid percussion brain injury in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2015;59:8-20. doi:10.1016/j.pnpbp.2015.01.003
110. Cai W, Yang T, Liu H, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): A master gatekeeper in CNS injury and repair. *Prog Neurobiol.* 2018;163-164:27-58. doi:10.1016/j.pneurobio.2017.10.002
111. Song Y, Liu X, Yuan J, et al. Atorvastatin combined with low-dose dexamethasone improves the neuroinflammation and survival in mice with intracerebral hemorrhage. *Front Neurosci.* 2022;16:967297. doi:10.3389/fnins.2022.967297
112. Soltani A, Chugaeva UY, Ramadan MF, et al. A narrative review of the effects of dexamethasone on traumatic brain injury in clinical and animal studies: focusing on inflammation. *Inflammopharmacology.* 2023;31(6):2955-2971. doi:10.1007/s10787-023-01361-3
113. Mammis A, McIntosh TK, Maniker AH. Erythropoietin as a neuroprotective agent in traumatic brain injury Review. *Surg Neurol.* 2009;71(5):527-531; discussion 531. doi:10.1016/j.surneu.2008.02.040
114. Gibson CL, Gray LJ, Bath PMW, Murphy SP. Progesterone for the treatment of experimental brain injury; a systematic review. *Brain.* 2008;131(Pt 2):318-328. doi:10.1093/brain/awm183
115. Robertson CL, Fidan E, Stanley RM, MHSA, Noje C, Bayir H. Progesterone for Neuroprotection in Pediatric Traumatic Brain Injury. *Pediatr Crit Care Med.* 2015;16(3):236-244. doi:10.1097/PCC.0000000000000323
116. DeWitt DS, Hawkins BE, Dixon CE, et al. Pre-Clinical Testing of Therapies for Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2018;35(23):2737-2754. doi:10.1089/neu.2018.5778
117. Mansi IA, English JL, Alvarez CA, Mortensen EM, Pugh MJ. Statins in survivors of traumatic brain injury: a propensity score-matched analysis. *Brain Inj.* 2020;34(10):1367-1374. doi:10.1080/02699052.2020.1802663
118. Wu D, Chen Q, Chen X, Han F, Chen Z, Wang Y. The blood–brain barrier: Structure, regulation and drug delivery. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8:217. doi:10.1038/s41392-023-01481-w
119. Shi J, Tang J, Xu J, et al. Applications of hydrogels and nanoparticles in the treatment of traumatic brain injury. *Front Bioeng Biotechnol.* 2025;12:1515164. doi:10.3389/fbioe.2024.1515164
120. Adams SM, Conley YP, Wagner AK, et al. The pharmacogenomics of severe traumatic brain injury. *Pharmacogenomics.* 2017;18(15):1413-1425. doi:10.2217/pgs-2017-0073

121. Tso D, McKinnon RD. Cell replacement therapy for central nervous system diseases. *Neural Regen Res.* 2015;10(9):1356-1358. doi:10.4103/1673-5374.165209
122. An N, Xu H, Gao WQ, Yang H. Direct Conversion of Somatic Cells into Induced Neurons. *Mol Neurobiol.* 2018;55(1):642-651. doi:10.1007/s12035-016-0350-0
123. Shabani L, Abbasi M, Azarnew Z, Amani AM, Vaez A. Neuro-nanotechnology: diagnostic and therapeutic nano-based strategies in applied neuroscience. *Biomed Eng Online.* 2023;22:1. doi:10.1186/s12938-022-01062-y
124. Freitas RA. Nanotechnology, nanomedicine and nanosurgery. *Int J Surg.* 2005;3(4):243-246. doi:10.1016/j.ijsu.2005.10.007
125. Wang C, Xue Y, Markovic T, et al. Blood–brain-barrier-crossing lipid nanoparticles for mRNA delivery to the central nervous system. *Nat Mater.* 2025;24(10):1653-1663. doi:10.1038/s41563-024-02114-5
126. Yang J, Luly KM, Green JJ. Nonviral nanoparticle gene delivery into the CNS for neurological disorders and brain cancer applications. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2023;15(2):e1853. doi:10.1002/wnan.1853
127. Li Q, Liu Y, Dai X, Jiang W, Zhao H. Nanozymes Regulate Redox Homeostasis in ROS-Related Inflammation. *Frontiers in Chemistry.* 2021;9. Accessed August 16, 2023. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2021.740607>
128. Zhang R, Yan X, Gao L, Fan K. Nanozymes expanding the boundaries of biocatalysis. *Nat Commun.* 2025;16(1):6817. doi:10.1038/s41467-025-62063-8
129. Takahashi T, Marushima A, Nagasaki Y, et al. Novel neuroprotection using antioxidant nanoparticles in a mouse model of head trauma. *J Trauma Acute Care Surg.* 2020;88(5):677-685. doi:10.1097/TA.0000000000002617
130. Narouiepour A, Ebrahimzadeh-Bideskan A, Rajabzadeh G, Gorji A, Negah SS. Neural stem cell therapy in conjunction with curcumin loaded in niosomal nanoparticles enhanced recovery from traumatic brain injury. *Sci Rep.* 2022;12(1):3572. doi:10.1038/s41598-022-07367-1
131. Zhang X, Huang X, Hang D, et al. Targeting pyroptosis with nanoparticles to alleviate neuroinflammatory for preventing secondary damage following traumatic brain injury. *Science Advances.* 2024;10(2):eadj4260. doi:10.1126/sciadv.adj4260
132. Dharmalingam P, Talakatta G, Mitra J, et al. Pervasive Genomic Damage in Experimental Intracerebral Hemorrhage: Therapeutic Potential of a Mechanistic-Based Carbon Nanoparticle. *ACS Nano.* 2020;14(3):2827-2846. doi:10.1021/acsnano.9b05821
133. Mouli K, Liopo AV, McHugh EA, et al. Oxidized Carbon Nanoparticles Enhance Cellular Energetics With Application to Injured Brain. *Adv Healthc Mater.* 2025;14(8):2401629. doi:10.1002/adhm.202401629
134. Malarkey EB, Parpura V. Applications of carbon nanotubes in neurobiology. *Neurodegener Dis.* 2007;4(4):292-299. doi:10.1159/000101885

135. De Volder MFL, Tawfick SH, Baughman RH, Hart AJ. Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications. *Science*. 2013;339(6119):535-539. doi:10.1126/science.1222453
136. Kharlamova MV, Burdanova MG, Paukov MI, Kramberger C. Synthesis, Sorting, and Applications of Single-Chirality Single-Walled Carbon Nanotubes. *Materials*. 2022;15(17):17. doi:10.3390/ma15175898
137. Zare H, Ahmadi S, Ghasemi A, et al. <p>Carbon Nanotubes: Smart Drug/Gene Delivery Carriers</p>. *IJN*. 2021;16:1681-1706. doi:10.2147/IJN.S299448
138. Yang Z, Zhang Y, Yang Y, et al. Pharmacological and toxicological target organelles and safe use of single-walled carbon nanotubes as drug carriers in treating Alzheimer disease. *Nanomedicine*. 2010;6(3):427-441. doi:10.1016/j.nano.2009.11.007
139. Lee W, Parpura V. Chapter 6 - Carbon nanotubes as substrates/scaffolds for neural cell growth. *Prog Brain Res*. 2009;180:110-125. doi:10.1016/S0079-6123(08)80006-4
140. Sun H, Ren J, Qu X. Carbon Nanomaterials and DNA: from Molecular Recognition to Applications. *Acc Chem Res*. 2016;49(3):461-470. doi:10.1021/acs.accounts.5b00515
141. Cherukuri P, Bachilo SM, Litovsky SH, Weisman RB. Near-Infrared Fluorescence Microscopy of Single-Walled Carbon Nanotubes in Phagocytic Cells. *J Am Chem Soc*. 2004;126(48):15638-15639. doi:10.1021/ja0466311
142. Kam NWS, Liu Z, Dai H. Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2006;45(4):577-581. doi:10.1002/anie.200503389
143. Mu Q, Broughton DL, Yan B. Endosomal Leakage and Nuclear Translocation of Multiwalled Carbon Nanotubes: Developing a Model for Cell Uptake. *Nano Lett*. 2009;9(12):4370-4375. doi:10.1021/nl902647x
144. Porter AE, Gass M, Muller K, Skepper JN, Midgley PA, Welland M. Direct imaging of single-walled carbon nanotubes in cells. *Nat Nanotechnol*. 2007;2(11):713-717. doi:10.1038/nnano.2007.347
145. Costa PM, Bourgognon M, Wang JTW, Al-Jamal KT. Functionalised carbon nanotubes: From intracellular uptake and cell-related toxicity to systemic brain delivery. *Journal of Controlled Release*. 2016;241:200-219. doi:10.1016/j.jconrel.2016.09.033
146. Kong F, Liu F, Li W, et al. Smart Carbon Nanotubes with Laser-Controlled Behavior in Gene Delivery and Therapy through a Non-Digestive Trafficking Pathway. *Small*. 2016;12(48):6753-6766. doi:10.1002/sml.201601092
147. Chandrasekar S, Kuipa S, Vargas AI, Ignatova T, Rotkin SV, Jedlicka SS. Cell cycle-dependent endocytosis of DNA-wrapped single-walled carbon nanotubes by neural progenitor cells. *Biophys Rep (N Y)*. 2022;2(3):100061. doi:10.1016/j.bpr.2022.100061
148. Kafa H, Wang JTW, Rubio N, et al. The interaction of carbon nanotubes with an *in vitro* blood-brain barrier model and mouse brain *in vivo*. *Biomaterials*. 2015;53:437-452. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.02.083

149. Shapoval LM, Dmytrenko OV, Sagach VF, et al. Systemic Administrations of Water-Dispersible Single-Walled Carbon Nanotubes: Activation of NOS in Spontaneously Hypertensive Rats. *Neurophysiology*. 2020;52(2):101-109. doi:10.1007/s11062-020-09858-1
150. Liu X, Guo L, Morris D, Kane AB, Hurt RH. Targeted Removal of Bioavailable Metal as a Detoxification Strategy for Carbon Nanotubes. *Carbon N Y*. 2008;46(3):489-500. doi:10.1016/j.carbon.2007.12.018
151. Liu X, Hurt RH, Kane AB. Biodurability of Single-Walled Carbon Nanotubes Depends on Surface Functionalization. *Carbon N Y*. 2010;48(7):1961-1969. doi:10.1016/j.carbon.2010.02.002
152. Lam CW, James JT, McCluskey R, Hunter RL. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci*. 2004;77(1):126-134. doi:10.1093/toxsci/kfg243
153. Allen BL, Kichambare PD, Gou P, et al. Biodegradation of single-walled carbon nanotubes through enzymatic catalysis. *Nano Lett*. 2008;8(11):3899-3903. doi:10.1021/nl802315h
154. Allen BL, Kotchey GP, Chen Y, et al. Mechanistic investigations of horseradish peroxidase-catalyzed degradation of single-walled carbon nanotubes. *J Am Chem Soc*. 2009;131(47):17194-17205. doi:10.1021/ja9083623
155. Kagan VE, Konduru NV, Feng W, et al. Carbon nanotubes degraded by neutrophil myeloperoxidase induce less pulmonary inflammation. *Nat Nanotechnol*. 2010;5(5):354-359. doi:10.1038/nnano.2010.44
156. Vlasova II, Vakhrusheva TV, Sokolov AV, et al. PEGylated single-walled carbon nanotubes activate neutrophils to increase production of hypochlorous acid, the oxidant capable of degrading nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;264(1):131-142. doi:10.1016/j.taap.2012.07.027
157. Liu Z, Davis C, Cai W, He L, Chen X, Dai H. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(5):1410-1415. doi:10.1073/pnas.0707654105
158. Yang ST, Wang X, Jia G, et al. Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice. *Toxicology Letters*. 2008;181(3):182.
159. Manna SK, Sarkar S, Barr J, et al. Single-Walled Carbon Nanotube Induces Oxidative Stress and Activates Nuclear Transcription Factor- κ B in Human Keratinocytes. *Nano Lett*. 2005;5(9):1676-1684. doi:10.1021/nl0507966
160. Belyanskaya L, Weigel S, Hirsch C, Tobler U, Krug HF, Wick P. Effects of carbon nanotubes on primary neurons and glial cells. *Neurotoxicology*. 2009;30(4):702-711. doi:10.1016/j.neuro.2009.05.005

161. Girardi FA, Bruch GE, Peixoto CS, et al. Toxicity of single-wall carbon nanotubes functionalized with polyethylene glycol in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Applied Toxicology*. 2017;37(2):214-221. doi:10.1002/jat.3346
162. Francis AP, Devasena T. Toxicity of carbon nanotubes: A review. *Toxicol Ind Health*. 2018;34(3):200-210. doi:10.1177/0748233717747472
163. Donaldson K, Aitken R, Tran L, et al. Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicol Sci*. 2006;92(1):5-22. doi:10.1093/toxsci/kfj130
164. Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kisin ER, Castranova V. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *J Toxicol Environ Health A*. 2004;67(1):87-107. doi:10.1080/15287390490253688
165. Poland CA, Duffin R, Kinloch I, et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol*. 2008;3(7):423-428. doi:10.1038/nnano.2008.111
166. Kaiser JP, Wick P, Manser P, Spohn P, Bruinink A. Single walled carbon nanotubes (SWCNT) affect cell physiology and cell architecture. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(4):1523-1527. doi:10.1007/s10856-007-3296-y
167. Rudnytska OV, Khita OO, Minchenko DO, et al. The low doses of SWCNTs affect the expression of proliferation and apoptosis related genes in normal human astrocytes. *Curr Res Toxicol*. 2021;2:64-71. doi:10.1016/j.crttox.2021.02.001
168. Ganesan R, Vasantha-Srinivasan P, Sadhasivam DR, Subramanian R, Vimalraj S, Suk KT. Carbon Nanotubes Induce Metabolomic Profile Disturbances in Zebrafish: NMR-Based Metabolomics Platform. *Front Mol Biosci*. 2021;8:688827. doi:10.3389/fmolb.2021.688827
169. Öner D, Ghosh M, Bové H, et al. Differences in MWCNT- and SWCNT-induced DNA methylation alterations in association with the nuclear deposition. *Part Fibre Toxicol*. 2018;15:11. doi:10.1186/s12989-018-0244-6
170. Gedda MR, Babele PK, Zahra K, Madhukar P. Epigenetic Aspects of Engineered Nanomaterials: Is the Collateral Damage Inevitable? *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7:228. doi:10.3389/fbioe.2019.00228
171. Hadidi N, Hosseini Shirazi SF, Kobarfard F, Nafissi-Varchehd N, Aboofazeli R. Evaluation of the Effect of PEGylated Single-Walled Carbon Nanotubes on Viability and Proliferation of Jurkat Cells. *Iran J Pharm Res*. 2012;11(1):27-37.
172. Zhang Y, Xu Y, Li Z, et al. Mechanistic toxicity evaluation of uncoated and PEGylated single-walled carbon nanotubes in neuronal PC12 cells. *ACS Nano*. 2011;5(9):7020-7033. doi:10.1021/nn2016259
173. Ahmadi H, Ramezani M, Yazdian-Robati R, et al. Acute toxicity of functionalized single wall carbon nanotubes: A biochemical, histopathologic and proteomics approach. *Chemico-Biological Interactions*. 2017;275:196-209. doi:10.1016/j.cbi.2017.08.004

174. Schipper ML, Nakayama-Ratchford N, Davis CR, et al. A pilot toxicology study of single-walled carbon nanotubes in a small sample of mice. *Nat Nanotechnol.* 2008;3(4):216-221. doi:10.1038/nnano.2008.68
175. Lay CL, Liu HQ, Tan HR, Liu Y. Delivery of paclitaxel by physically loading onto poly(ethylene glycol) (PEG)-graft-carbon nanotubes for potent cancer therapeutics. *Nanotechnology.* 2010;21(6):065101. doi:10.1088/0957-4484/21/6/065101
176. Liu Z, Fan AC, Rakhra K, et al. Supramolecular Stacking of Doxorubicin on Carbon Nanotubes for In Vivo Cancer Therapy. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(41):7668-7672. doi:10.1002/anie.200902612
177. Sharma P, Jain K, Jain NK, Mehra NK. Ex vivo and in vivo performance of anti-cancer drug loaded carbon nanotubes. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 2017;41:134-143. doi:10.1016/j.jddst.2017.07.011
178. Saeed LM, Mahmood M, Pyrek SJ, et al. Single-walled carbon nanotube and graphene nanodelivery of gambogic acid increases its cytotoxicity in breast and pancreatic cancer cells. *J Appl Toxicol.* 2014;34(11):1188-1199. doi:10.1002/jat.3018
179. Masotti A, Miller MR, Celluzzi A, et al. Regulation of angiogenesis through the efficient delivery of microRNAs into endothelial cells using polyamine-coated carbon nanotubes. *Nanomedicine.* 2016;12(6):1511-1522. doi:10.1016/j.nano.2016.02.017
180. Chakravarty P, Marches R, Zimmerman NS, et al. Thermal ablation of tumor cells with antibody-functionalized single-walled carbon nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(25):8697-8702. doi:10.1073/pnas.0803557105
181. Thiruvengadam M, Rajakumar G, Swetha V, et al. Recent Insights and Multifactorial Applications of Carbon Nanotubes. *Micromachines.* 2021;12(12):12. doi:10.3390/mi12121502
182. Ackermann J, Metternich JT, Herbertz S, Kruss S. Biosensing with Fluorescent Carbon Nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition.* 2022;61(18):e202112372. doi:10.1002/anie.202112372
183. Hernández-Rivera M, Zaibaq NG, Wilson LJ. Toward carbon nanotube-based imaging agents for the clinic. *Biomaterials.* 2016;101:229-240. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.05.045
184. Hendler-Neumark A, Wulf V, Bisker G. In vivo imaging of fluorescent single-walled carbon nanotubes within *C. elegans* nematodes in the near-infrared window. *Mater Today Bio.* 2021;12:100175. doi:10.1016/j.mtbio.2021.100175
185. Liu Z, Yang K, Lee ST. Single-walled carbon nanotubes in biomedical imaging. *J Mater Chem.* 2010;21(3):586-598. doi:10.1039/C0JM02020F
186. Shar A, Shar A, Joung D. Carbon nanotube nanocomposite scaffolds: advances in fabrication and applications for tissue regeneration and cancer therapy. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023;11:1299166. doi:10.3389/fbioe.2023.1299166

187. Park KH, Chhowalla M, Iqbal Z, Sesti F. Single-walled carbon nanotubes are a new class of ion channel blockers. *J Biol Chem.* 2003;278(50):50212-50216. doi:10.1074/jbc.M310216200
188. Jakubek LM, Marangoudakis S, Raingo J, Liu X, Lipscombe D, Hurt RH. The inhibition of neuronal calcium ion channels by trace levels of yttrium released from carbon nanotubes. *Biomaterials.* 2009;30(31):6351-6357. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.08.009
189. Holt BD, Shams H, Horst TA, et al. Altered Cell Mechanics from the Inside: Dispersed Single Wall Carbon Nanotubes Integrate with and Restructure Actin. *J Funct Biomater.* 2012;3(2):398-417. doi:10.3390/jfb3020398
190. Yanamala N, Kagan VE, Shvedova AA. Molecular modeling in structural nanotoxicology: Interactions of nano-particles with nano-machinery of cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(15):2070-2077. doi:10.1016/j.addr.2013.05.005
191. Gottipati MK, Bekyarova E, Haddon RC, Parpura V. Chemically Functionalized Water-Soluble Single-Walled Carbon Nanotubes Obstruct Vesicular/Plasmalemmal Recycling in Astrocytes Down-Stream of Calcium Ions. *Cells.* 2020;9(7):1597. doi:10.3390/cells9071597
192. Minchenko OH, Tsymbal DO, Minchenko DO, et al. Single-walled carbon nanotubes affect the expression of genes associated with immune response in normal human astrocytes. *Toxicol In Vitro.* 2018;52:122-130. doi:10.1016/j.tiv.2018.06.011
193. 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):1379-1388. doi:10.1007/s00726-015-1970-9
194. Malarkey EB, Reyes RC, Zhao B, Haddon RC, Parpura V. Water Soluble Single-Walled Carbon Nanotubes Inhibit Stimulated Endocytosis in Neurons. *Nano Lett.* 2008;8(10):3538-3542. doi:10.1021/nl8017912
195. Ni Y, Hu H, Malarkey EB, et al. Chemically functionalized water soluble single-walled carbon nanotubes modulate neurite outgrowth. *J Nanosci Nanotechnol.* 2005;5(10):1707-1712. doi:10.1166/jnn.2005.189
196. Roman JA, Niedzielko TL, Haddon RC, Parpura V, Floyd CL. Single-Walled Carbon Nanotubes Chemically Functionalized with Polyethylene Glycol Promote Tissue Repair in a Rat Model of Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma.* 2011;28(11):2349-2362. doi:10.1089/neu.2010.1409
197. Morrison B, Elkin BS, Dollé JP, Yarmush ML. In vitro models of traumatic brain injury. *Annu Rev Biomed Eng.* 2011;13:91-126. doi:10.1146/annurev-bioeng-071910-124706
198. Omelchenko A, Singh NK, Firestein BL. Current advances in in vitro models of central nervous system trauma. *Curr Opin Biomed Eng.* 2020;14:34-41. doi:10.1016/j.cobme.2020.05.002

199. Wu YH, Rosset S, Lee T rin, Dragunow M, Park T, Shim V. In Vitro Models of Traumatic Brain Injury: A Systematic Review. *Journal of Neurotrauma*. 2021;38(17):2336-2372. doi:10.1089/neu.2020.7402
200. Ellis EF, McKinney JS, Willoughby KA, Liang S, Povlishock JT. A new model for rapid stretch-induced injury of cells in culture: characterization of the model using astrocytes. *J Neurotrauma*. 1995;12(3):325-339. doi:10.1089/neu.1995.12.325
201. Rzigalinski BA, Weber JT, Willoughby KA, Ellis EF. Intracellular free calcium dynamics in stretch-injured astrocytes. *J Neurochem*. 1998;70(6):2377-2385. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.70062377.x
202. Lotze FP, Riess ML. Poloxamer 188 Exerts Direct Protective Effects on Mouse Brain Microvascular Endothelial Cells in an In Vitro Traumatic Brain Injury Model. *Biomedicines*. 2021;9(8):1043. doi:10.3390/biomedicines9081043
203. Sun S, Kanagaraj J, Cho L, Kang D, Xiao S, Cho M. Characterization of Subcellular Responses Induced by Exposure of Microbubbles to Astrocytes. *J Neurotrauma*. 2015;32(19):1441-1448. doi:10.1089/neu.2014.3699
204. Wanner IB. An In Vitro Trauma Model to Study Rodent and Human Astrocyte Reactivity. In: Milner R, ed. *Astrocytes: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology. Humana Press; 2012:189-219. doi:10.1007/978-1-61779-452-0_14
205. Slemmer JE, Weber JT. The extent of damage following repeated injury to cultured hippocampal cells is dependent on the severity of insult and inter-injury interval. *Neurobiol Dis*. 2005;18(3):421-431. doi:10.1016/j.nbd.2004.09.022
206. Augustine C, Cepinkas G, Fraser DD, Canadian Critical Care Translational Biology Group. Traumatic injury elicits JNK-mediated human astrocyte retraction in vitro. *Neuroscience*. 2014;274:1-10. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.05.009
207. Zhao B, Hu H, Yu A, Perea D, Haddon RC. Synthesis and characterization of water soluble single-walled carbon nanotube graft copolymers. *J Am Chem Soc*. 2005;127(22):8197-8203. doi:10.1021/ja042924i
208. 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):4742-4747. doi:10.1021/nl302178s
209. Gržeta Krpan N, Harej Hrkać A, Janković T, et al. Chemically Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes Prevent the Reduction in Plasmalemmal Glutamate Transporter EAAT1 Expression in, and Increase the Release of Selected Cytokines from, Stretch-Injured Astrocytes in Vitro. *Cells*. 2024;13(3):225. doi:10.3390/cells13030225
210. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
211. Ruijter JM, Thygesen HH, Schoneveld OJLM, Das AT, Berkhout B, Lamers WH. Factor correction as a tool to eliminate between-session variation in replicate experiments:

- application to molecular biology and retrovirology. *Retrovirology*. 2006;3:2. doi:10.1186/1742-4690-3-2
212. Bardi G, Nunes A, Gherardini L, et al. Functionalized Carbon Nanotubes in the Brain: Cellular Internalization and Neuroinflammatory Responses. *PLoS One*. 2013;8(11):e80964. doi:10.1371/journal.pone.0080964
213. Greco TM, Seeholzer SH, Mak A, Spruce L, Ischiropoulos H. Quantitative mass spectrometry-based proteomics reveals the dynamic range of primary mouse astrocyte protein secretion. *J Proteome Res*. 2010;9(5):2764-2774. doi:10.1021/pr100134n
214. Deng F, Miller J. A review on protein markers of exosome from different bio-resources and the antibodies used for characterization. *J Histotechnol*. 2019;42(4):226-239. doi:10.1080/01478885.2019.1646984
215. Pilipović K, Parpura V. The potential of single-walled carbon nanotube-based therapeutic platforms targeting astrocytes. *Nanomedicine*. 2025;20(11):1209-1211. doi:10.1080/17435889.2025.2476376
216. Neary JT, Kang Y, Willoughby KA, Ellis EF. Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase by Stretch-Induced Injury in Astrocytes Involves Extracellular ATP and P2 Purinergic Receptors. *J Neurosci*. 2003;23(6):2348-2356. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-06-02348.2003
217. Wang HC, Ma YB. Experimental models of traumatic axonal injury. *J Clin Neurosci*. 2010;17(2):157-162. doi:10.1016/j.jocn.2009.07.099
218. Du L, Empey PE, Ji J, et al. Probenecid and N-Acetylcysteine Prevent Loss of Intracellular Glutathione and Inhibit Neuronal Death after Mechanical Stretch Injury In Vitro. *J Neurotrauma*. 2016;33(20):1913-1917. doi:10.1089/neu.2015.4342
219. Di Pietro V, Amorini AM, Lazzarino G, et al. S100B and Glial Fibrillary Acidic Protein as Indexes to Monitor Damage Severity in an In Vitro Model of Traumatic Brain Injury. *Neurochem Res*. 2015;40(5):991-999. doi:10.1007/s11064-015-1554-9
220. Floyd CL, Rzigalinski BA, Sitterding HA, Willoughby KA, Ellis EF. Antagonism of group I metabotropic glutamate receptors and PLC attenuates increases in inositol trisphosphate and reduces reactive gliosis in strain-injured astrocytes. *J Neurotrauma*. 2004;21(2):205-216. doi:10.1089/089771504322778668
221. Gao K, Wang CR, Jiang F, et al. Traumatic scratch injury in astrocytes triggers calcium influx to activate the JNK/c-Jun/AP-1 pathway and switch on GFAP expression. *Glia*. 2013;61(12):2063-2077. doi:10.1002/glia.22577
222. Miller AP, Shah AS, Aperi BV, Kurpad SN, Stemper BD, Glavaski-Joksimovic A. Acute death of astrocytes in blast-exposed rat organotypic hippocampal slice cultures. *PLOS ONE*. 2017;12(3):e0173167. doi:10.1371/journal.pone.0173167
223. Rao VL, Başkaya MK, Doğan A, Rothstein JD, Dempsey RJ. Traumatic brain injury down-regulates glial glutamate transporter (GLT-1 and GLAST) proteins in rat brain. *J Neurochem*. 1998;70(5):2020-2027. doi:10.1046/j.1471-4159.1998.70052020.x

224. Dobrachinski F, da Rosa Gerbatin R, Sartori G, et al. Regulation of Mitochondrial Function and Glutamatergic System Are the Target of Guanosine Effect in Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2017;34(7):1318-1328. doi:10.1089/neu.2016.4563
225. Cherian L, Hlatky R, Robertson CS. Nitric Oxide in Traumatic Brain Injury. *Brain Pathol*. 2006;14(2):195-201. doi:10.1111/j.1750-3639.2004.tb00053.x
226. Gage MC, Thippeswamy T. Inhibitors of Src family kinases, inducible nitric oxide synthase, and NADPH oxidase as potential CNS drug targets for neurological diseases. *CNS Drugs*. 2021;35(1):1-20. doi:10.1007/s40263-020-00787-5
227. Logsdon AF, Lucke-Wold BP, Nguyen L, et al. Salubrinal reduces oxidative stress, neuroinflammation and impulsive-like behavior in a rodent model of traumatic brain injury. *Brain Res*. 2016;1643:140-151. doi:10.1016/j.brainres.2016.04.063
228. Webster R, Didier E, Harris P, et al. PEGylated Proteins: Evaluation of Their Safety in the Absence of Definitive Metabolism Studies. *Drug Metabolism and Disposition*. 2007;35(1):9-16. doi:10.1124/dmd.106.012419
229. Li M, Jiang S, Simon J, et al. Brush Conformation of Polyethylene Glycol Determines the Stealth Effect of Nanocarriers in the Low Protein Adsorption Regime. *Nano Lett*. 2021;21(4):1591-1598. doi:10.1021/acs.nanolett.0c03756
230. Yang S, Wang Z, Ping Y, et al. PEG/PEI-functionalized single-walled carbon nanotubes as delivery carriers for doxorubicin: synthesis, characterization, and in vitro evaluation. *Beilstein J Nanotechnol*. 2020;11:1728-1741. doi:10.3762/bjnano.11.155
231. Ibrahim M, Ramadan E, Elsadek NE, et al. Polyethylene glycol (PEG): The nature, immunogenicity, and role in the hypersensitivity of PEGylated products. *Journal of Controlled Release*. 2022;351:215-230. doi:10.1016/j.jconrel.2022.09.031
232. Gottipati MK, Bekyarova E, Brenner M, Haddon RC, Parpura V. Changes in the Morphology and Proliferation of Astrocytes Induced by Two Modalities of Chemically Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes are Differentially Mediated by Glial Fibrillary Acidic Protein. *Nano Lett*. 2014;14(7):3720-3727. doi:10.1021/nl4048114
233. Okamoto Y, Kim D, Battaglino R, Sasaki H, Späte U, Stashenko P. MIP-1 gamma promotes receptor-activator-of-NF-kappa-B-ligand-induced osteoclast formation and survival. *J Immunol*. 2004;173(3):2084-2090. doi:10.4049/jimmunol.173.3.2084
234. Ciechanowska A, Mika J. CC Chemokine Family Members' Modulation as a Novel Approach for Treating Central Nervous System and Peripheral Nervous System Injury—A Review of Clinical and Experimental Findings. *Int J Mol Sci*. 2024;25(7):3788. doi:10.3390/ijms25073788
235. Kagoshima Y, Sachi N, Kasahara Y, et al. CCL9/CCR1 chemokine signaling plays a protective role in limiting intestinal inflammation by maintaining an anti-inflammatory M2 macrophage pool in the intestinal lamina propria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2025;786:152763. doi:10.1016/j.bbrc.2025.152763

236. Qu C, Wang L, He J, et al. Carbon nanotubes provoke inflammation by inducing the pro-inflammatory genes IL-1 β and IL-6. *Gene*. 2012;493(1):9-12. doi:10.1016/j.gene.2011.11.046
237. Zeinabad HA, Zarrabian A, Saboury AA, Alizadeh AM, Falahati M. Interaction of single and multi wall carbon nanotubes with the biological systems: tau protein and PC12 cells as targets. *Sci Rep*. 2016;6(1):26508. doi:10.1038/srep26508
238. Yuan X, Zhang X, Sun L, Wei Y, Wei X. Cellular Toxicity and Immunological Effects of Carbon-based Nanomaterials. *Part Fibre Toxicol*. 2019;16(1):18. doi:10.1186/s12989-019-0299-z
239. Elgrabli D, Dachraoui W, Ménard-Moyon C, et al. Carbon Nanotube Degradation in Macrophages: Live Nanoscale Monitoring and Understanding of Biological Pathway. *ACS Nano*. 2015;9(10):10113-10124. doi:10.1021/acsnano.5b03708
240. Hoffman SW, Rzigalinski BA, Willoughby KA, Ellis EF. Astrocytes generate isoprostanes in response to trauma or oxygen radicals. *J Neurotrauma*. 2000;17(5):415-420. doi:10.1089/neu.2000.17.415
241. Lamb RG, Harper CC, McKinney JS, Rzigalinski BA, Ellis EF. Alterations in phosphatidylcholine metabolism of stretch-injured cultured rat astrocytes. *J Neurochem*. 1997;68(5):1904-1910. doi:10.1046/j.1471-4159.1997.68051904.x
242. Muneer PMA, Chandra N, Haorah J. Interactions of Oxidative Stress and Neurovascular Inflammation in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol*. 2015;51(3):966-979. doi:10.1007/s12035-014-8752-3
243. López-García I, Gerő D, Szczesny B, et al. Development of a stretch-induced neurotrauma model for medium-throughput screening in vitro: identification of rifampicin as a neuroprotectant. *Br J Pharmacol*. 2018;175(2):284-300. doi:10.1111/bph.13642
244. Shvedova AA, Pietroiusti A, Fadeel B, Kagan VE. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;261(2):121-133. doi:10.1016/j.taap.2012.03.023
245. Fukamachi S, Furuta A, Ikeda T, et al. Altered expressions of glutamate transporter subtypes in rat model of neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Brain Res Dev Brain Res*. 2001;132(2):131-139. doi:10.1016/s0165-3806(01)00303-0
246. Moretto MB, Arteni NS, Lavinsky D, et al. Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine. *Exp Neurol*. 2005;195(2):400-406. doi:10.1016/j.expneurol.2005.06.005
247. Rao VL, Bowen KK, Dempsey RJ. Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain. *Neurochem Res*. 2001;26(5):497-502. doi:10.1023/a:1010956711295
248. Lau CL, O'Shea RD, Broberg BV, Bischof L, Beart PM. The Rho kinase inhibitor Fasudil up-regulates astrocytic glutamate transport subsequent to actin remodelling in murine

- cultured astrocytes. *Br J Pharmacol*. 2011;163(3):533-545. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01259.x
249. Sheean RK, Lau CL, Shin YS, O'Shea RD, Beart PM. Links between L-glutamate transporters, Na⁺/K⁺-ATPase and cytoskeleton in astrocytes: evidence following inhibition with rottlerin. *Neuroscience*. 2013;254:335-346. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.09.043
250. Zagami CJ, O'Shea RD, Lau CL, Cheema SS, Beart PM. Regulation of glutamate transporters in astrocytes: evidence for a relationship between transporter expression and astrocytic phenotype. *Neurotox Res*. 2005;7(1-2):143-149. doi:10.1007/BF03033783
251. Batiuk MY, Martirosyan A, Wahis J, et al. Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. *Nat Commun*. 2020;11:1220. doi:10.1038/s41467-019-14198-8
252. George KK, Heithoff BP, Shandra O, Robel S. Mild Traumatic Brain Injury/Concussion Initiates an Atypical Astrocyte Response Caused by Blood–Brain Barrier Dysfunction. *J Neurotrauma*. 2022;39(1-2):211-226. doi:10.1089/neu.2021.0204
253. Gupta RK, Prasad S. Early down regulation of the glial Kir4.1 and GLT-1 expression in pericontusional cortex of the old male mice subjected to traumatic brain injury. *Biogerontology*. 2013;14(5):531-541. doi:10.1007/s10522-013-9459-y
254. Gupta RK, Prasad S. Differential Regulation of GLT-1/EAAT2 Gene Expression by NF- κ B and N-myc in Male Mouse Brain During Postnatal Development. *Neurochem Res*. 2014;39(1):150-160. doi:10.1007/s11064-013-1200-3
255. Martinez-Lozada Z, Robinson MB. Reciprocal communication between astrocytes and endothelial cells is required for astrocytic glutamate transporter 1 (GLT-1) expression. *Neurochem Int*. 2020;139:104787. doi:10.1016/j.neuint.2020.104787
256. Zhou H, Hu L, Li J, et al. AXL kinase-mediated astrocytic phagocytosis modulates outcomes of traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):154. doi:10.1186/s12974-021-02201-3
257. Awatsuji H, Furukawa Y, Hirota M, et al. Interleukin-4 and -5 as modulators of nerve growth factor synthesis/secretion in astrocytes. *J Neurosci Res*. 1993;34(5):539-545. doi:10.1002/jnr.490340506
258. Lau LT, Yu ACH. Astrocytes Produce and Release Interleukin-1, Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor Alpha and Interferon-Gamma Following Traumatic and Metabolic Injury. *Journal of Neurotrauma*. Published online 2001. doi:10.1089/08977150151071035
259. Jassam YN, Izzy S, Whalen M, McGavern DB, Khoury JE. Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. *Neuron*. 2017;95(6):1246-1265. doi:10.1016/j.neuron.2017.07.010
260. Yoshimura S, Thome R, Konno S, et al. IL-9 controls CNS autoimmunity by suppressing GM-CSF production. *J Immunol*. 2020;204(3):531-539. doi:10.4049/jimmunol.1801113

261. Niesman IR, Schilling JM, Shapiro LA, et al. Traumatic brain injury enhances neuroinflammation and lesion volume in caveolin deficient mice. *J Neuroinflammation*. 2014;11:39. doi:10.1186/1742-2094-11-39
262. Mesplès B, Fontaine RH, Lelièvre V, Launay JM, Gressens P. Neuronal TGF-beta1 mediates IL-9/mast cell interaction and exacerbates excitotoxicity in newborn mice. *Neurobiol Dis*. 2005;18(1):193-205. doi:10.1016/j.nbd.2004.09.018
263. Chaban V, Clarke GJB, Skandsen T, et al. Systemic Inflammation Persists the First Year after Mild Traumatic Brain Injury: Results from the Prospective Trondheim Mild Traumatic Brain Injury Study. *J Neurotrauma*. 2020;37(19):2120-2130. doi:10.1089/neu.2019.6963
264. Chitu V, Biundo F, Stanley ER. Colony Stimulating Factors in the Nervous System. *Semin Immunol*. 2021;54:101511. doi:10.1016/j.smim.2021.101511
265. Schneider A, Krüger C, Steigleder T, et al. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115(8):2083-2098. doi:10.1172/JCI23559
266. Sheibani N, Grabowski EF, Schoenfeld DA, Whalen MJ. Effect of granulocyte colony-stimulating factor on functional and histopathologic outcome after traumatic brain injury in mice. *Crit Care Med*. 2004;32(11):2274-2278. doi:10.1097/01.ccm.0000145998.11686.ed
267. Huang X, Dai Y, Ma X, et al. Different changes in granulocyte-colony stimulating factor and its correlation with inflammatory biomarkers in patients after traumatic brain injury. *Neuroreport*. 2020;31(4):293-299. doi:10.1097/WNR.0000000000001397
268. Hercus TR, Dhagat U, Kan WLT, et al. Signalling by the β c family of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(3):189-201. doi:10.1016/j.cytogfr.2013.03.002
269. Wheeler MA, Clark IC, Tjon EC, et al. MAFG-driven astrocytes promote CNS inflammation. *Nature*. 2020;578(7796):593-599. doi:10.1038/s41586-020-1999-0
270. Shultz SR, Tan XL, Wright DK, et al. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Is Neuroprotective in Experimental Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2014;31(10):976-983. doi:10.1089/neu.2013.3106
271. Nishihara T, Ochi M, Sugimoto K, et al. Subcutaneous injection containing IL-3 and GM-CSF ameliorates stab wound-induced brain injury in rats. *Exp Neurol*. 2011;229(2):507-516. doi:10.1016/j.expneurol.2011.04.006
272. Gao F, Wu X, Mao X, et al. Astaxanthin provides neuroprotection in an experimental model of traumatic brain injury via the Nrf2/HO-1 pathway. *Am J Transl Res*. 2021;13(3):1483-1493.
273. Milani P, Gagliardi S, Cova E, Cereda C. SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS. *Neurol Res Int*. 2011;2011:458427. doi:10.1155/2011/458427

274. Muneer PMA. Nrf2 as a Potential Therapeutic Target for Traumatic Brain Injury. *J Integr Neurosci*. 2023;22(4):81. doi:10.31083/j.jin2204081
275. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:323-354. doi:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105600
276. Tang S, Gao P, Chen H, Zhou X, Ou Y, He Y. The Role of Iron, Its Metabolism and Ferroptosis in Traumatic Brain Injury. *Front Cell Neurosci*. 2020;14:590789. doi:10.3389/fncel.2020.590789
277. Jia J, Chen F, Wu Y. Recombinant PEP-1-SOD1 improves functional recovery after neural stem cell transplantation in rats with traumatic brain injury. *Exp Ther Med*. 2018;15(3):2929-2935. doi:10.3892/etm.2018.5781
278. Yu M, Wang Z, Wang D, Aierxi M, Ma Z, Wang Y. Oxidative stress following spinal cord injury: From molecular mechanisms to therapeutic targets. *Journal of Neuroscience Research*. 2023;101(10):1538-1554. doi:10.1002/jnr.25221
279. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(7):1957-1997. doi:10.1089/ars.2010.3586
280. Bhowmick S, D'Mello V, Caruso D, Muneer PMA. Traumatic brain injury-induced downregulation of Nrf2 activates inflammatory response and apoptotic cell death. *J Mol Med*. 2019;97(12):1627-1641. doi:10.1007/s00109-019-01851-4
281. Zhang L, Wang H, Fan Y, et al. Fucoxanthin provides neuroprotection in models of traumatic brain injury via the Nrf2-ARE and Nrf2-autophagy pathways. *Sci Rep*. 2017;7(1):46763. doi:10.1038/srep46763
282. Cheng ZG, Zhang GD, Shi PQ, Du BS. Expression and antioxidation of Nrf2/ARE pathway in traumatic brain injury. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2013;6(4):305-310. doi:10.1016/S1995-7645(13)60061-9
283. Dong W, Sun Y, Cheng H, et al. Dynamic cell type-specific expression of Nrf2 after traumatic brain injury in mice. *European Journal of Neuroscience*. 2019;50(2):1981-1993. doi:10.1111/ejn.14399
284. Fukuda K, Panter SS, Sharp FR, Noble LJ. Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) after traumatic brain injury in the rat. *Neurosci Lett*. 1995;199(2):127-130. doi:10.1016/0304-3940(95)12042-3
285. Hatic H, Kane MJ, Saykally JN, Citron BA. Modulation of transcription factor Nrf2 in an in vitro model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2012;29(6):1188-1196. doi:10.1089/neu.2011.1806
286. Dal Bosco L, Weber GE, Parfitt GM, et al. Biopersistence of PEGylated Carbon Nanotubes Promotes a Delayed Antioxidant Response after Infusion into the Rat Hippocampus. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129156. doi:10.1371/journal.pone.0129156

287. Dal Bosco L, Weber GEB, Parfitt GM, et al. PEGylated Carbon Nanotubes Impair Retrieval of Contextual Fear Memory and Alter Oxidative Stress Parameters in the Rat Hippocampus. *Biomed Res Int*. 2015;2015:104135. doi:10.1155/2015/104135
288. Shao L, Wang C, Xu G, et al. Utilizing reactive oxygen species-scavenging nanoparticles for targeting oxidative stress in the treatment of ischemic stroke: A review. *Open Med (Wars)*. 2024;19(1):20241041. doi:10.1515/med-2024-1041
289. Hu X, Cook S, Wang P, Hwang H min, Liu X, Williams QL. In vitro evaluation of cytotoxicity of engineered carbon nanotubes in selected human cell lines. *Sci Total Environ*. 2010;408(8):1812-1817. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.01.035
290. Choi YK. Role of Carbon Monoxide in Neurovascular Repair Processing. *Biomol Ther (Seoul)*. 2018;26(2):93-100. doi:10.4062/biomolther.2017.144
291. Park EJ, Roh J, Kim SN, et al. Biological Toxicity and Inflammatory Response of Semi-Single-Walled Carbon Nanotubes. *PLoS One*. 2011;6(10):e25892. doi:10.1371/journal.pone.0025892
292. Chen D, Stueckle TA, Luanpitpong S, Rojanasakul Y, Lu Y, Wang L. Gene expression profile of human lung epithelial cells chronically exposed to single-walled carbon nanotubes. *Nanoscale Res Lett*. 2015;10:12. doi:10.1186/s11671-014-0707-0
293. Garry PS, Ezra M, Rowland MJ, Westbrook J, Pattinson KTS. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment--from bench to bedside. *Exp Neurol*. 2015;263:235-243. doi:10.1016/j.expneurol.2014.10.017
294. Hlatky R, Lui H, Cherian L, et al. The role of endothelial nitric oxide synthase in the cerebral hemodynamics after controlled cortical impact injury in mice. *J Neurotrauma*. 2003;20(10):995-1006. doi:10.1089/089771503770195849
295. Eroglu B, Kimbler DE, Pang J, et al. Therapeutic inducers of the HSP70/HSP110 protect mice against traumatic brain injury. *J Neurochem*. 2014;130(5):626-641. doi:10.1111/jnc.12781
296. Kim N, Kim JY, Yenari MA. Anti-inflammatory properties and pharmacological induction of Hsp70 after brain injury. *Inflammopharmacology*. 2012;20(3):177-185. doi:10.1007/s10787-011-0115-3
297. Kim JY, Kim N, Zheng Z, Lee JE, Yenari MA. The 70kD heat shock protein protects against experimental traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*. 2013;58:289-295. doi:10.1016/j.nbd.2013.06.012
298. Sharp FR, Zhan X, Liu D. Heat Shock Proteins in Brain: Role of Hsp70, Hsp 27 and HO-1 (Hsp32) and Their Therapeutic Potential. *Transl Stroke Res*. 2013;4(6):10.1007/s12975-013-0271-0274. doi:10.1007/s12975-013-0271-4
299. Zhang MH, Zhou XM, Cui JZ, Wang KJ, Feng Y, Zhang HA. Neuroprotective effects of dexmedetomidine on traumatic brain injury: Involvement of neuronal apoptosis and HSP70 expression. *Mol Med Rep*. 2018;17(6):8079-8086. doi:10.3892/mmr.2018.8898

300. Kim JY, Barua S, Huang MY, Park J, Yenari MA, Lee JE. Heat Shock Protein 70 (HSP70) Induction: Chaperonotherapy for Neuroprotection after Brain Injury. *Cells*. 2020;9(9):2020. doi:10.3390/cells9092020
301. Chen T, Tao YN, Wu Y, Ren X, Li YF, Wang YH. HSP70 attenuates neuronal necroptosis through the HSP90 α -RIPK3 pathway following neuronal trauma. *Mol Biol Rep*. 2023;50(9):7237-7244. doi:10.1007/s11033-023-08619-7
302. Shi M, Sheng L, Stewart T, Zabetian CP, Zhang J. New windows into the brain: Central nervous system-derived extracellular vesicles in blood. *Prog Neurobiol*. 2019;175:96-106. doi:10.1016/j.pneurobio.2019.01.005
303. Zhang W, Hong J, Zhang H, Zheng W, Yang Y. Astrocyte-derived exosomes protect hippocampal neurons after traumatic brain injury by suppressing mitochondrial oxidative stress and apoptosis. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(17):21642-21658. doi:10.18632/aging.203508
304. Qian Y, Li X, Li G, et al. Astrocyte-Derived Exosomal miR-148a-3p Suppresses Neuroinflammation and Restores Neurological Function in Traumatic Brain Injury by Regulating the Microglial Phenotype. *eNeuro*. 2024;11(2):ENEURO.0336-23.2024. doi:10.1523/ENEURO.0336-23.2024
305. Ma Y, Yu X, Pan J, et al. Exosomes: a promising microenvironment modulator for spinal cord injury treatment. *Int J Biol Sci*. 2025;21(8):3791-3824. doi:10.7150/ijbs.115242
306. Martinez B, Peplow PV. MicroRNAs as diagnostic markers and therapeutic targets for traumatic brain injury. *Neural Regen Res*. 2017;12(11):1749-1761. doi:10.4103/1673-5374.219025
307. Liu L, Sun T, Liu Z, et al. Traumatic Brain Injury Dysregulates MicroRNAs to Modulate Cell Signaling in Rat Hippocampus. *PLoS One*. 2014;9(8):e103948. doi:10.1371/journal.pone.0103948
308. Meissner L, Gallozzi M, Balbi M, et al. Temporal Profile of MicroRNA Expression in Contused Cortex after Traumatic Brain Injury in Mice. *J Neurotrauma*. 2016;33(8):713-720. doi:10.1089/neu.2015.4077
309. Buller B, Liu X, Wang X, et al. MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death. *FEBS J*. 2010;277(20):4299-4307. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07818.x
310. Harrison EB, Hochfelder CG, Lamberty BG, et al. Traumatic brain injury increases levels of miR-21 in extracellular vesicles: implications for neuroinflammation. *FEBS Open Bio*. 2016;6(8):835-846. doi:10.1002/2211-5463.12092
311. Di Pietro V, Ragusa M, Davies D, et al. MicroRNAs as Novel Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Mild and Severe Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2017;34(11):1948-1956. doi:10.1089/neu.2016.4857
312. Ji W, Jiao J, Cheng C, Shao J. MicroRNA-21 in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury. *Neurochem Res*. 2018;43(10):1863-1868. doi:10.1007/s11064-018-2602-z

313. Han Z, Chen F, Ge X, Tan J, Lei P, Zhang J. miR-21 alleviated apoptosis of cortical neurons through promoting PTEN-Akt signaling pathway in vitro after experimental traumatic brain injury. *Brain Res.* 2014;1582:12-20. doi:10.1016/j.brainres.2014.07.045
314. Li D, Huang S, Zhu J, et al. Exosomes from MiR-21-5p-Increased Neurons Play a Role in Neuroprotection by Suppressing Rab11a-Mediated Neuronal Autophagy In Vitro After Traumatic Brain Injury. *Med Sci Monit.* 2019;25:1871-1885. doi:10.12659/MSM.915727
315. Redell JB, Zhao J, Dash PK. Altered expression of miRNA-21 and its targets in the hippocampus after traumatic brain injury. *J Neurosci Res.* 2011;89(2):212-221. doi:10.1002/jnr.22539
316. Xiao WZ, Lu AQ, Liu XW, Li Z, Zi Y, Wang ZW. Role of miRNA-146 in proliferation and differentiation of mouse neural stem cells. *Biosci Rep.* 2015;35(5):e00245. doi:10.1042/BSR20150088
317. Chang C, Weiping L, Jibing C. Exosomal MiRNA Therapy for Central Nervous System Injury Diseases. *Cell Mol Neurobiol.* 2024;45:3. doi:10.1007/s10571-024-01522-0
318. Zhang L, Chopp M, Liu X, et al. Combination therapy with VELCADE and tPA is neuroprotective in aged rats after stroke and targets miRNA-146a and the toll-like receptor signaling pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(8):1856-1864. doi:10.1161/ATVBAHA.112.252619
319. Numakawa T, Richards M, Adachi N, Kishi S, Kunugi H, Hashido K. MicroRNA function and neurotrophin BDNF. *Neurochem Int.* 2011;59(5):551-558. doi:10.1016/j.neuint.2011.06.009
320. Kawashima H, Numakawa T, Kumamaru E, et al. Glucocorticoid attenuates brain-derived neurotrophic factor-dependent upregulation of glutamate receptors via the suppression of microRNA-132 expression. *Neuroscience.* 2010;165(4):1301-1311. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.11.057

POPIS SLIKA

Slika 1. Slijed razvoja sekundarne ozljede nakon primarne TBI.

Slika 2. Prikaz različitih vrsta organskih i anorganskih nanočestica za primjenu u neurologiji.

Slika 3. Prikaz različitih sredstava za funkcionalizaciju ugljikovih nanocjevčica i učinci funkcionalizacije na njihova svojstva.

Slika 4. Životni ciklus ugljikovih nanočestica u stanicima.

Slika 5. *In vitro* model traumatske ozljede rastezanjem reguliranim tlakom dušika.

Slika 6. Cell injury controller II, uređaj za provođenje *in vitro* ozljede rastezanjem.

Slika 7. Jednozidne ugljikove nanocjevčice funkcionalizirane s polietilen glikolom (SWCNT-PEG).

Slika 8. Utjecaj različitih stupnjeva ozljede rastezanjem *in vitro* na oslobađanje laktat dehidrogenaze (LDH) u primarnim mišjim astrocitima.

Slika 9. Učinak blage (1,8 PSI), umjerene (2,7 PSI) i teške (4,0 PSI) ozljede rastezanjem *in vitro* na izražaj proteina GFAP, EAAT1 i iNOS u primarnoj kulturi mišjih astrocita.

Slika 10. Reprezentativne mikrofotografije prikazuju raspodjelu i intenzitet imunoreaktivnosti GFAP-a (A) i EAAT1 (B) u kontrolnim te blago (1,8 PSI), umjereno (2,7 PSI) i teško (4,0 PSI) ozlijeđenim stanicama 24 sata nakon ozljede rastezanjem *in vitro*.

Slika 11. Učinci jednozidnih ugljikovih nanocjevčica funkcionaliziranih s PEG-om (SWCNT-PEG) i samog funkcionalizacijskog sredstva PEG-a na izražaj proteina GFAP i EAAT1 u primarnoj kulturi astrocita.

Slika 12. Utjecaj SWCNT-PEG i PEG na oslobađanje citokina u primarnim mišjim astrocitima.

Slika 13. Izostanak učinka funkcionaliziranih jednozidnih ugljikovih nanocjevčica (SWCNT-PEG) na preživljenje primarnih mišjih astrocita izloženih teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro* (sTBI).

Slika 14. Izostanak učinka jednozidnih ugljikovih nanocjevčica kemijski funkcionaliziranih PEG-om (SWCNT-PEG) na razinu oksidativnog oštećenja proteina, određenu mjerenjem sadržaja karboniliranih proteina (PCC), u primarnim astrocitima miševa izloženim teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro*.

Slika 15. Učinak jednozidnih ugljikovih nanocjevčica funkcionaliziranih polietilenglikolom (SWCNT-PEG) na izražaj proteina GFAP i EAAT1 u primarnoj kulturi mišjih astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem (sTBI) *in vitro*.

Slika 16. Utjecaj SWCNT-PEG i PEG na povećanje oslobađanja određenih citokina u primarnoj kulturi astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro*.

Slika 17. Učinak jednozidnih ugljikovih nanocjevčica funkcionaliziranih polietilenglikolom (SWCNT-PEG) na izražaj proteina Nrf2 i HO-1 u primarnoj kulturi mišjih astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem (sTBI) *in vitro*.

Slika 18. Učinak jednozidnih ugljikovih nanocjevčica funkcionaliziranih polietilenglikolom (SWCNT-PEG) na izražaj proteina SOD1 i GPX u primarnoj kulturi mišjih astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem (sTBI) *in vitro*.

Slika 19. Učinak jednozidnih ugljikovih nanocjevčica funkcionaliziranih polietilenglikolom (SWCNT-PEG) na izražaj iNOS proteina u primarnoj kulturi mišjih astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem (sTBI) *in vitro*.

Slika 20. Izostanak učinka jednozidnih ugljikovih nanocjevčica funkcionaliziranih polietilenglikolom (SWCNT-PEG) na izražaj proteina HSP70 u primarnim mišjim astrocitima podvrgnutim teškoj ozljedi (sTBI) rastezanjem *in vitro*.

Slika 21. Izražaj biljega egzosoma TSG101 i CD63 u egzosomima primarnih mišjih astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro* i tretiranim PEG-om ili SWCNT-PEG-om.

Slika 22. Izražaj miRNK-21a, miRNK-26a i miRNK-146a u egzosomima porijeklom iz primarnih mišjih astrocita analiziran je metodom kvantitativne reverzno-transkripcijske PCR (RT-qPCR) nakon tretmana SWCNT-PEG-om.

Slika 23. Učinak SWCNT-PEG na izražaj miRNK-21a, miRNK-26a i miRNK-146a u egzosomima izoliranima iz primarnih mišjih astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem *in vitro*.

POPIS TABLICA

Tablica 1. Primarna i sekundarna protutijela korištena u istraživanju

Tablica 2. Rezultati multipleks analize citokina iz uzoraka medija astrocita tretiranih PEG-om ili SWCNT-PEG-om.

Tablica 3. Rezultati multipleks analize citokina iz uzoraka medija astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem i tretiranih PEG-om ili SWCNT-PEG-om.

POPIS POKRATA

AD - Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*)

ADE - egzosomi porijeklom iz astrocita (engl. *astrocyte derived exosomes*)

ALS - amiotrofna lateralne skleroze

AMPA - alfa-amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4-propionska kiselina

AQP4 - akvaporina 4 (engl. *aquaporine 4*)

ATP - adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

Axl – receptor za tirozin kinazu Axl

BDNF - neurotrofni faktor porijeklom iz mozga (engl. *brain-derived neurotrophic factor*)

BLC – kemoatraktant B limfocita (engl. *B-lymphocyte chemoattractant*)

CD – klaster diferencijacije (engl. *cluster of differentiation*)

CSF - cerebrospinalna tekućina (engl. *cerebro-spinal fluid*)

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

EAA - ekscitacijske aminokiseline (engl. *excitatory amino acid*)

EAAT - transporter za ekscitacijske aminokiseline (engl. *excitatory aminoacid transporter*)

ECM - izvanstanični prostor (engl. *extracellular matrix*)

ERK - kinaza regulirana izvanstaničnim signalima (engl. *extracellular signal-regulated kinase*)

GABA - gama-aminomaslačna kiselina (engl. *gamma aminobutyric acid*)

G-CSF – čibenik stimulacije kolonije granulocita (engl. *granulocyte colony stimulating factor*)

GFAP - fibrilarni kiseli protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*)

GM – CSF - čibenik stimulacije kolonije granulocita i makrofaga (engl. *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*)

GPX - glutation peroksidaza

GSH - glutation

GCS - glasgowska ljestvica kome (engl. *Glasgow Coma Scale*)

GOS – glasgowska ljestvica ishoda (engl. *Glasgow Outcome Scale*)

HO-1 – oksigenaza hema 1 (engl. *heme oxygenase 1*)

IL - interleukin

iNOS - inducibilna sintaza dušičnog oksida (engl. *inducible nitric oxide synthase*)

JNK - c-Jun N-terminalna kinaza (engl. *c-Jun N-terminal kinase*)

KMB - krvno-moždana barijera

LDH - laktat dehidrogenaza

MAPK - protein kinaza aktivirane mitogenima (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

MWCNT - višezidne ugljikove nanocjevčice (engl. *multi-walled carbon nanotubes*)

NČ - nanočestica

NO - dušikov oksid

nNOS - neuronalna sintaza dušičnog oksida (engl. *neuronal nitric oxide synthase*)

NMDA - N-metil-d-aspartat

Nrf2 - nuklearni čimbenik s eritroidnim-2 povezanim čimbenikom 2 (engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

PEG - polietilen glikol

PD - Parkinsonova bolest (engl. *Parkinson's disease*)

RNK – ribonukleinska kiselina

RNS - reaktivne dušikove vrste (engl. *reactive nitrogen species*)

ROS - reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

SLC1 - prijenosnik otopljenih tvari 1 (engl. *solute carrier 1*)

SOD - superoksid dismutaza

SWCNT - jednozidne ugljikove nanocjevčice (engl. *single-walled carbon nanotubes*)

SŽS – središnji živčani sustav

TBI - traumatska ozljeda mozga (engl. *traumatic brain injury*)

TNF- α - čimbenik nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor α*)

TSG101 – gen podložnosti za tumor (engl. *tumor susceptibility gene 101*)

VEGF - čimbenik rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*)

ŽIVOTOPIS

Ime i prezime

Nika Gržeta Krpan

Adresa

Vukovarska 43a, 51000 Rijeka

Telefon

+385 51 651 243

E-pošta

nika.grzeta@uniri.hr

Datum rođenja

14. siječanj 1991.

RADNO ISKUSTVO

- Datum (od – do) 01. listopada 2018. - danas
- Naziv i sjedište tvrtke Zavod za temeljnu i kliničku farmakologiju s zaposlenja toksikologijom, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
- Zanimanje i položaj koji Asistent obnaša
- Osnovne aktivnosti i odgovornosti
 - rad u nastavi
 - rad na znanstvenim projektima

- Datum (od – do) 03. travnja 2017. – 14. veljače 2018.
- Naziv i sjedište tvrtke Zavod za temeljnu i kliničku farmakologiju s zaposlenja toksikologijom, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
- Zanimanje i položaj koji Asistent obnaša
- Osnovne aktivnosti i odgovornosti
 - rad u nastavi
 - rad na znanstvenim projektima

- Datum (od – do) 09. lipnja 2015. – 31. ožujka 2017.
- Naziv i sjedište tvrtke Jadran – Galenski laboratorij d.d., Rijeka zaposlenja
- Zanimanje i položaj koji Specijalist operativnih registracija obnaša
- Osnovne aktivnosti i odgovornosti
 - pripremanje registracijskih dosjea
 - priprema prvih registracija, obnova i izmjena za lijekove

ŠKOLOVANJE I IZOBRAZBA

- Datum (od – do) 2019. –
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci
- Studij Poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij Biomedicina

- Datum (od – do) 2012. – 2014.
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, diplomski studij Biotehnologija u medicini

- Naslov postignut obrazovanjem Magistra biotehnologije u medicini
- Datum (od – do) 2009. – 2012.
- Naziv i vrsta obrazovne ustanove Odjel za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci, preddiplomski studij Biotehnologija i istraživanje lijekova
- Naslov postignut obrazovanjem Sveučilišna prvostupnica biotehnologije i istraživanja lijekova

MATERINJI JEZIK Hrvatski

DRUGI JEZICI

- sposobnost čitanja iskusni korisnik
- sposobnost pisanja iskusni korisnik
- sposobnost usmenog izražavanja iskusni korisnik

ČLAN STRUČNIH/ZNANSTVENIH DRUŠTAVA Hrvatsko društvo farmakologa, član

OPIS ZNANSTVENO-NASTAVNE DJELATNOSTI

ZNANSTVENA DJELATNOST

I. Originalni znanstveni rad

1. Janković, T; Rajič Bumber, J; Gržeta Krpan, N; Dolenc, P; Jaeger, M; Kriz, J; Župan, G; Pilipović, K; Repetitive Mild but Not Single Moderate Brain Trauma Is Associated with TAR DNA-Binding Protein 43 Mislocalization and Glial Activation in the Mouse Spinal Cord // *Biomedicines*, 13 (2025), 1; 218-218. doi: 10.3390/biomedicines13010218

2. Gržeta Krpan, N; Harej Hrkać, A; Janković, T; Dolenc, P; Bekyarova, E; Parpura, V; Pilipović, K; Chemically Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes Prevent the Reduction in Plasmalemmal Glutamate Transporter EAAT1 Expression in, and Increase the Release of Selected Cytokines from, Stretch-Injured Astrocytes in Vitro // *Cells*, 13 (2024), 3; 225, 18

3. Janković, T; Dolenc, P; Rajič Bumber, J; Gržeta, N; Kriz, J; Župan, G; Pilipović, K; Differential Expression Patterns of TDP-43 in Single Moderate versus Repetitive Mild Traumatic Brain Injury in Mice // International journal of molecular sciences, 22 (2021), 12211, 21

4. Pilipović, Kr; Rajič Bumber, J; Dolenc, P; Gržeta, N; Janković, T; Križ, J; Župan, G; Long-Term Effects of Repetitive Mild Traumatic Injury on the Visual System in Wild Type and TDP-43 Transgenic Mice // International journal of molecular sciences, 22 (2021), 12; 6584, 20

5. Rajič Bumber, J; Pilipović, K; Janković, T; Dolenc, P; Gržeta, N; Križ, J; Župan, G; Repetitive Traumatic Brain Injury Is Associated With TDP-43 Alterations, Neurodegeneration, and Glial Activation in Mice // Journal of neuropathology and experimental neurology, 80 (2021), 1; 2-14

6. Rački, V; Petrić, D; Kučić, N; Gržeta, N; Jurdana, K; Rončević-Gržeta, I; Cortical gray matter loss in schizophrenia: Could microglia be the culprit? // Medical hypotheses, 88 (2016), 18-21

II. Projekti

- 2018 - 2023, “Jednozidne ugljikove nanocjevčice u eksperimentalnoj traumatskoj ozljedi mozga” UIP-05-2017-9517, izvor financiranja: Hrvatska zaklada za znanost, glavni istraživač: izv. prof. dr. sc. Kristina Pilipović
- 2018. – 2024., “Molekularni mehanizmi neurodegeneracije u traumatskoj ozljedi mozga: uloga TAR DNA-vezujućeg proteina 43”, uniri-biomed-18-199, izvor financiranja: Sveučilište u Rijeci, glavni istraživač: izv. prof. dr. sc. Kristina Pilipović
- 2017. – 2021., „Blaga repetitivna traumatska ozljeda mozga: model za istraživanje neuropatologije i neuropale posredovane s TDP-43“, projekt IP-2016-06-4602, izvor financiranja: Hrvatska zaklada za znanost, glavni istraživač: prof. dr. sc. Gordana Župan
- 2024. – 2025., „Utjecaj eukaliptola (1,8-cineola) na signalne puteve mikroglije, astrocita i neurona u eksperimentalnom in vitro modelu Parkinsonove bolesti“, izvor financiranja: Sveučilište u Rijeci, glavni istraživač: dr. sc. Tamara Janković

III. Kongresna priopćenja

1. Pilipović, K; Gržeta Krpan, N; Harej Hrkać, A; Dolenc, P; Janković, T; Parpura, V; “Neurotherapeutic Potential of Chemically Functionalized Carbon Nanotubes in Traumatic Brain Injury: Cellular, Synaptic, and Molecular Insights from In Vitro and In Vivo Models”; International Neuroscience Conference, Tbilisi, Gruzija, 29.11.2025-30.11.2025
2. Rajič Bumber, J; Gržeta Krpan, N; Mežnarić, S; Harej Hrkać, A; Dolenc, P; Janković, T; Parpura, V; Pilipović, K; “Nanomaterial-mediated modulation of exosomal mirnas in astrocytes: toward new strategies for brain trauma treatment”; Knjiga sažetaka 11. Hrvatski kongres farmakologije. Zagreb: Hrvatsko društvo farmakologa, 2025, 80, 1
3. Pilipović, K; Gržeta Krpan, N; Harej Hrkać, A; Janković, T; Dolenc, P; Bekyarova, E; Parpura, V. “Functionalized Carbon Nanotubes Modify Astrocyte Function and Modulate Exosomal miRNA Profiles Following In Vitro Traumatic Brain Injury”; 11. Hrvatski kongres farmakologije: Knjiga sažetaka. Zagreb: Hrvatsko društvo farmakologa, 2025. str. 57-57
4. Pilipović, K; Gržeta Krpan, N; Harej Hrkać, A; Janković, T; Dolenc, P; Bekyarova, E; Parpura, V; “Functionalized Carbon Nanotubes as a Novel Modulator of Astrocyte Function in an In Vitro Model of Traumatic Brain Injury”; The Triangle Neuroscience Conference 2025 Suzhou, Kina, 20.09.2025-23.09.2025
5. Janković, T; Rajič Bumber, J; Gržeta Krpan, N; Pilipović, K; “Selective Immunomodulatory Effect of Eucalyptol (1,8-cineole) on BV2 Microglia”; Knjiga sažetaka 11. Hrvatski kongres farmakologije. Split: -, 2025. str. 69-69
6. Pilipović, K; Janković, T; Rajič Bumber, J; Gržeta Krpan, N; Dolenc, P; Jaeger, M; Križ, J; Župan, G; “Differential Effects of Single Moderate and Repetitive Mild Traumatic Brain Injury on Spinal Cord Cholinergic Function”; FENS Regional Meeting 2025 Abstract book. Oslo: -, 2025. str. 181-181
7. Janković, T; Rajič Bumber, J; Gržeta Krpan, N; Dolenc, P; Jaeger, M; Križ, J; Župan, G; Pilipović, K; “Accumulation of The Pathological TAR DNA-binding Protein 43 in the Spinal Cord is Evident After Repetitive Mild but not Single Moderate Traumatic Brain Injury”; FENS Regional Meeting 2025 Abstract book. Oslo: -, 2025
8. Janković, T; Rajič Bumber, J; Gržeta Krpan, N; Dolenc, P; Jaeger, M; Križ, J; Župan, G; Pilipović, K; “Repetitive Mild but Not Single Moderate Brain Trauma Is Associated with TAR DNA-Binding Protein 43 Mislocalization and Glial Activation

in the Mouse Spinal Cord”; *Biomedicines*, 13 (2025), 1; 218-218. doi:
10.3390/biomedicines13010218

9. Gržeta N, Harej Hrkać A, Mijatović E, Pilipović K; “Protective effects of *Aronia melanocarpa* extract on the astrocytes in the in vitro model of Parkinson's disease”; XVI European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Berlin, Germany, July 8–11, 2023, 08.07.2023 - 11.07.2023, poster
10. Gržeta N, Janković T, Dolenc P, Parpura V, Župan G, Pilipović K; “Chemically-functionalized single walled carbon nanotubes increase EAAT1 expression in mouse primary astrocytes exposed to severe in vitro traumatic brain injury”, EPHAR 2021 virtualni kongres, 06.12.2021. - 08.12.2021., poster
11. Gržeta N, Harej Hrkać A, Parpura V, Župan G, Pilipović K; “Chemically functionalized single-walled carbon nanotubes alter the cytokine profile of the stretch-injured cultured mouse astrocytes”; 15th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, virtualni kongres, 05.07.2021. - 09.07.2021., poster