

# Utjecaj kemijski funkcionaliziranih jednozidnih ugljikovih nanocjevčica na osobitosti astrocita izloženih in vitro traumatskoj ozljedi

---

Mladenić, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:543799>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
„Biotehnologija u medicini“

Tea Mladenić

Utjecaj kemijski funkcionaliziranih jednozidnih ugljikovih  
nanocjevčica na osobitosti astrocita izloženih *in vitro* traumatskoj ozljedi

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU  
Diplomski sveučilišni studij  
„Biotehnologija u medicini“

Tea Mladenić

Utjecaj kemijski funkcionaliziranih jednozidnih ugljikovih  
nanocjevčica na osobitosti astrocita izloženih *in vitro* traumatskoj ozljedi

Diplomski rad

Rijeka, 2020.

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

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY  
Graduate programme  
„Biotechnology in medicine“

Tea Mladenić

Influence of chemically functionalized  
single-walled carbon nanotubes on the characteristics of astrocytes  
exposed to *in vitro* traumatic injury

Master thesis

Rijeka, 2020.

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

Završni rad obranjen je dana 31.07.2020.

pred povjerenstvom:

1. Doc. dr. sc. Jelena Ban
2. Izv. prof. dr. sc. Ivana Munitić dr. med
3. Izv. prof. dr. sc. Kristina Pilipović dr. med.

Rad ima 61 stranice, 11 slika, 1 tablicu i 47 literaturnih navoda.

Ovo je istraživanje u potpunosti potpomognuto sredstvima Hrvatske zaklade za znanost dodijeljenih uspostavnom istraživačkom projektu UIP-2017-05-9517 "Jednozidne ugljikove nanocjevčice u eksperimentalnoj traumatskoj ozljedi mozga" voditeljice izv. prof. dr. sc. Kristine Pilipović, dr. med.

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
1.1. Epidemiologija TBI.....	1
1.2. Patofiziologija TBI.....	4
1.2.1. Primarna ozljeda mozga .....	4
1.2.2. Sekundarna ozljeda mozga .....	6
1.2.3. Uloga astrocita u patofiziologiji TBI .....	7
1.3. Liječenje TBI .....	10
1.3.1. Trenutni terapijski pristupi u liječenju TBI.....	10
1.3.2. Budući terapijski pristupi u liječenju TBI .....	11
1.3.3. Ugljikove nanocjevčice u liječenju TBI .....	12
1.4. Eksperimentalni modeli TBI .....	14
1.4.1. Modeli žarišne TBI .....	14
1.4.2. Modeli difuzne TBI .....	15
1.4.3. Kombinirani model žarišne i difuzne TBI .....	15
1.4.4. <i>In vitro</i> modeli.....	15
2. Cilj rada.....	17
3. Materijali i metode .....	18
3.1. Pokusne životinje .....	18
3.2. <i>In vitro</i> istraživanja .....	18
3.2.1. Primarna stanična kultura astrocita .....	18
3.2.2. Model ozljede stanica .....	19
3.2.3. Inkubacija primarne kulture astrocita s otopinama PABS-SWCNTs-a.....	20
3.2.4. Određivanje stupnja ozljede astrocita .....	20

3.2.5. Određivanje razine citokina u mediju za kulturu stanica	22
3.2.6. Imunocitofluorescencija .....	22
3.2.8. Prikupljanje podataka i statističke analize .....	23
4. Rezultati .....	24
4.1. Teška ozljeda brzim rastezanjem ne utječe na razinu ekspresije GFAP-a u preživjelim astrocitima .....	24
4.2. PABS-SWCNTs ne utječu na preživljenje astrocita nakon teške ozljede, brzim rastezanjem .....	26
4.3. PABS-SWCNTs utječu na otpuštanje citokina iz astrocita, nakon teške ozljede brzim rastezanjem .....	28
5. Rasprava .....	37
5.1. PABS-SWCNTs nemaju značajan učinak na ekspresiju GFAP-a u astrocitima izloženim teškoj ozljedi brzim rastezanjem.....	37
5.2. PABS-SWCNTs ne utječu na preživljenje astrocita izloženih teškoj <i>in vitro</i> TBI .....	38
5.3. Ozljeda astrocita brzim rastezanjem i primjena PABS-SWCNTs utječu na otpuštanje određenih citokina .....	39
6. Zaključak.....	42
6. Literatura.....	43

# Sažetak

Traumatska ozljeda mozga (engl. *traumatic brain injury*, TBI) je jedan od vodećih uzroka smrti i invaliditeta širom svijeta, a posebno u osoba mlađih od 45 godina i predstavlja značajan javnozdravstveni problem današnjice. Astrociti, stanice rasprostranjene širom središnjeg živčanog sustava (engl. *central nervous system*, CNS), značajno su podložne oštećenju nakon TBI. Dosadašnja su istraživanja potvrdila ulogu astrocita u održavanju strukture, funkcije i aktivnosti CNS-a, ali i u potencijalnoj regeneraciji CNS-a nakon ozljede. Do danas učinkoviti terapijski pristup u liječenju TBI nije otkriven, stoga su se istraživači okrenuli ka novom pristupu - tkivnom inženjeringu, točnije primjeni nanomaterijala. Cilj ovog istraživanja bio je istražiti utječu li jednozidne ugljikove nanocjevčice (engl. *single walled carbon nanotubes*, SWCNTs), kemijski funkcionalizirane s poli-m-aminobenzen sulfonskom kiselinom (engl. *poly-m-aminobenzene sulfonic acid*, PABS), na preživljavanje i određene karakteristike astrocita u *in vitro* modelu teške TBI. Istražen je utjecaj PABS-SWCNTs na ekspresiju kiselog fibrilarnog proteina glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) u ozlijeđenim astrocitima. Nije zamijećena značajna razika u intenzitetu GFAP fluorescencije u traumatiziranim stanicama u odnosu na neozlijeđene, a nije uočena ni promjena ekspresije ovog markera u traumatiziranim stanicama tretiranim s PABS-SWCNTs. U drugom je pokusu praćen utjecaj PABS-SWCNTs na preživljenje astrocita nakon traume *in vitro* te su rezultati istraživanja pokazali da PABS-SWCNTs ne potiču bolje preživljenje, ali nisu ni citotoksične za ozlijeđene astrocite u kulturi. Kako bi se istražilo postoje li promjene u sadržaju sekretoma astrocita nakon ozljede, odnosno primjene istraživanog nanomaterijala, analiziran je sadržaj citokina u mediju za kulturu stanica. Ozljeda stanica uzrokovala je smanjeno otpuštanje Eotaksina-1 i povećanu razinu SDF-1 alfa u mediju, a primjena PABS-SWCNTs nije značajno utjecala na ove promjene. Aplikacija ovog



tipa funkcionaliziranih nanocjevčica bila je praćena povećanim otpuštanjem RANTES-a iz ozlijeđenih astrocita u odnosu i na neozlijeđene i ozlijeđene netretirane stanice.

Zaključno, rezultati ovog rada ukazuju da primjena PABS-SWCNTs ne djeluje na preživljenje astrocita podvrgnutih teškoj *in vitro* TBI unutar prva 24 sata nakon ozljede, no uzrokuje neke promjene u profilu izlućenih citokina koje bi mogle utjecati na funkcije ove vrste stanica u patofiziološkim procesima nakon TBI.

**Ključne riječi:** astrociti, fibrilarni kiseli protein glije, laktatna dehidrogenaza, traumatska ozljeda mozga

## Summary

Traumatic brain injury (TBI) is one of the major causes of death and disability all over the world, especially among people under the age of 45, which is why it is considered a major public health problem of the modern age. Astrocytes are cells located in the central nervous system (CNS), which are significantly susceptible to damage after TBI. Previous researches have confirmed the importance of astrocytes in maintaining the structures, functions and activity of the CNS, but also the potential role in regeneration of the CNS, after TBI. So far, the effective therapeutic approach has not been discovered, which is why researchers have turned to a new approach, which includes tissue engineering, with nanomaterials. The aim of this study was to investigate the effect of single-walled carbon nanotubes (SWCNTs), chemically functionalized with poly-m-aminobenzene sulfonic acids (PABS), to better viability and proliferation of an astrocyte in an *in vitro* model of severe TBI. The effect of PABS-SWCNT on the expression of glial fibrillary acid (GFAP) was investigated in injured astrocytes. There was no significant difference in GFAP fluorescence intensity in injured cells compared to uninjured ones, also there was no change observed in expression of this marker, in traumatized cells compared to ones treated with PABS-SWCNTs. In the second case, experiment monitored the effect of PABS-SWCNT on astrocyte survival after *in vitro* trauma, and the results of the study showed that PABS-SWCNTs did not lead to better survival, but also did not have cytotoxic effect on injured astrocytes in culture. In order to investigate whether there are changes in the content of astrocyte secretome or in the application of the investigated nanomaterial, cytokine content in the culture cell medium was analyzed. Cell injury caused decrease of Eotaxin-1 release and increase in SDF-1 alpha in the medium, and administration of PABS-SWCNT did not affect these changes. Application of this type of functionalized nanotubes was followed by an increased dismissal of

RANTES, from injured astrocytes compared to uninjured and injured untreated cells.

In conclusion, the results of this study indicate that the use of PABS-SWCNTs does not affect the survival of astrocytes subjected to severe *in vitro* TBI within the first 24 hours after injury, but there was some changes in expression profile of cytokines that could affect on function of this type of cells in pathophysiological process after TBI.

**Key words:** astrocytes, carbon nanotubes, glial fibrillary acid protein, lactate dehydrogenase, traumatic brain injury

# 1.Uvod

Traumatska ozljeda mozga (engl. *traumatic brain injury*, TBI) predstavlja jedan od vodećih uzroka smrti i invaliditeta u razvijenim zemljama svijeta (1). TBI je karakterizirana ozljedom moždanog tkiva, koja privremeno ili trajno narušava funkciju mozga, ali istovremeno utječe i na druge organe i organske sustave (2). Ozljede mozga nastaju kao posljedica djelovanja vanjske mehaničke sile u obliku udarca, nagnječenja, trzaja ili penetracije, a njihova težina ovisi o jačini, smjeru i duljini djelovanja sile (3). U osnovi svake TBI tri su osnovna mehanizma nastanka ozljede; izravnim udarcem čvrstim tijelom o glavu ili glavom o čvrsto tijelo, naglim ubrzanjem ili usporenjem glave (akceleracijsko/deceleracijske sile) i rotacijom ili distorzijom (uvrtanjem) (4).

## 1.1. Epidemiologija TBI

TBI je jedan od vodećih uzroka smrti i invaliditeta osoba mlađih od 45 godina, stoga predstavlja značajan javnozdravstveni problem u suvremenom svijetu (5). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO), godišnje više od 10 milijuna ljudi u svijetu zadobije TBI, koje ishoduje hospitalizacijom i/ili smrću, a procjenjuje se da je 57 milijuna ljudi, koji trenutno žive u svijetu, pretrpjelo ozljedu mozga (3). U Europi su ozljede glave vodeći uzrok smrtnosti zbog ozljeda te se ukupna incidencija kreće oko 235 slučajeva/100 000 stanovnika, a prosječna je smrtnost 15/100 000 stanovnika, odnosno oko 60 000 smrti godišnje (6,7). Također, zbog visoke stope mortaliteta i morbiditeta populacije, bitne za sveukupni društveni razvoj, TBI predstavlja i važan socioekonomski problem (8). U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), godišnje 1,4 milijuna ljudi

pretrpi traumu mozga, a troškovi liječenja iznose vrtoglavih 400 milijardi američkih dolara, što TBI svrstava na sam vrh medicinskih troškova u svijetu (9,10). Unatoč visokoj prevalenciji, učinkovite metode liječenja pacijenata s TBI do danas su ograničene.

Prema epidemiološkim podacima Američkog Centra za kontrolu i prevalenciju bolesti (engl. *Center for Disease Control, CDC*) iz 2014. godine, tri su najčešća uzroka pojave TBI: padovi (47,9%), ozljede zadobivene u sudaru s drugim objektom (17,1%) i ozljede uzrokovane motornim vozilima, odnosno prometne nesreće (13,2%); dok su rjeđe uzroci ozljede glave, nasilje i nezgode vezane uz sport i rekreaciju (11). Također, dosadašnje studije pokazuju da su muškarci mlađi od 45 godina, žrtve traume mozga dva do tri puta češće od žena, uz pretpostavku da prometne nesreće, nasilje i sportske ozljede češće spadaju u aktivnosti muškog spola (12). Proporcionalno s porastom dobi pacijenata, u istraživanjima, opada razlika u prevalenciji ozljede mozga između muškaraca i žena te TBI uzrokovan padovima češće pogađa žene, starije dobi (12,13). S obzirom na posljedice traume mozga, najugroženije skupine su djeca u dobi 0 do 4 godine, zatim adolescenti u dobi od 15 do 24 godina i osobe starije od 65 godina (10).

Za procjenu ozbiljnosti TBI najčešće se koristi Glasgowska ljestvica kome (engl. *Glasgow Coma Scale, GCS*), tj. bodovni sustav za procjenu stanja svijesti pacijenta na temelju vizualnog, verbalnog i motoričkog odgovora, nakon ozljede (14). Sukladno odgovoru pacijenta, težina ozljede mozga dijeli se na: blage, umjerene i ozbiljne/teške (7). Pacijenti s GSC rezultatom 12, 13 ili 14 od 15 imaju blage ozljede mozga, koje najčešće samo privremeno narušavaju funkciju mozga, dok u pacijenata s GSC rezultatom 9 do 12, umjerene i 3 do 8 ozbiljne ozljede, mogu dovesti do propadanja moždanog parenhima, moždanog krvarenja te razvoja upale s teškim i po život opasnim komplikacijama (2,14). U Europi se omjer blage, umjerene i teške ozljede mozga kreće oko 22:1,5:12

(blaga:umjerenateška), odnosno procjenjuje se da je godišnje oko 10 slučajeva teških ozljeda mozga na 100 000 stanovnika (5).

Dijagnozu ozljede mozga nije jednostavno postaviti, posebice kod pacijenata s blagom ozljedom, jer su simptomi često nespecifični, a ponekad se javljaju tek nekoliko dana nakon traume. Pravovremena i točna dijagnoza ključna je za ishod bolesti, a u dijagnostici se osim kliničkog pregleda, koriste i različite slikovne tehnike poput kompjuterizirane tomografije (engl. *computed tomography*, CT) i magnetska rezonancija (engl. *magnetic resonance*, MR), koje su objektivnije i preciznije od GSC (5).

TBI može uzrokovati široki raspon komplikacija koje mogu biti prisutne kratkoročno, dugoročno, a pojedine i doživotno, nakon ozljede glave. Učestale neurološke komplikacije su promjene osobnosti, poremećaji spavanja, napadaji te kognitivni i motorički poremećaji, koji uvelike smanjuju kvalitetu života osoba koje su preživjele TBI. Najčešći kognitivni poremećaji, koji nastaju kao posljedica traume, su poremećaji pamćenja i dosjećanja (dugoročno pamćenje) te mišljenja (kratkoročno pamćenje) no značajno je povećana i incidencija različitih oblika neurodegenerativnih bolesti poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti. Prema jednoj studiji provedenoj na veteranima Drugog svjetskog rata, pacijenti koji su pretrpjeli umjerenu i/ili tešku ozljedu mozga imaju dva puta veći rizik od razvijanja Alzheimerove bolesti i drugih oblika demencije u kasnijem životu, od pojedinaca koji nisu pretrpjeli traumu mozga (15). Epilepsija je jedan od neuroloških poremećaja, obilježen čestim ponavljajućim napadajima, koji pogađa pacijente nakon ozbiljnije traume mozga. U velikoj populacijskoj studiji provedenoj u Minnesoti, SAD, trauma mozga je identificirana kao uzrok epilepsije u 30% pojedinaca u dobi 15 do 34 godina, 14% djece mlađe od 14 godina i u 8% osoba starijih od 65 godina (16). U pacijenata su često su prisutni emocionalni problemi, tjeskoba, agresija, depresija, ali i posttraumatski stresni i opsesivno kompulzivni poremećaji koji značajno povećavaju komorbiditet

žrtava. TBI smanjuje očekivano trajanje života te se svega 25% osoba koje su pretrpjele ozljedu mozga u potpunosti oporavi i ostaje dugoročno funkcionalno samostalan (17). Medicinske, psihološke i socioekonomske posljedice traume mozga imaju značajan utjecaj na pojedince, obitelji i širu zajednicu. Najznačajnija dugotrajna posljedica TBI je invaliditet. Danas, u SAD-u živi 5 milijuna, a u Europi 7 milijuna pojedinaca s dugotrajnim invaliditetom kao posljedicom ozljede mozga te su većina ozlijeđenih pacijenata mladi adolescenti (18).

## 1.2. Patofiziologija TBI

Traumatska ozljeda mozga karakterizirana je mehaničkom ozljedom, koja uzrokuje direktno oštećenje ili oštećenje s odgođenim djelovanjem kompleksnih patofizioloških procesa (9). Patofiziološki se procesi koji su vezani uz traumu mozga mogu podijeliti na primarne i sekundarne.

### 1.2.1. Primarna ozljeda mozga

Primarna ozljeda mozga direktna je posljedica djelovanja vanjske sile, koja uzrokuje strukturno oštećenje moždanog parenhima (19). Ozljeda mozga najčešće nastaje zbog izravnog udarca u glavu, trzaja te nagle promjene smjera ili brzine (akceleracijsko-deceleracijskih) gibanja mozga u kostima lubanje, oštećujući pritom krvne žile, neurone i glijalne stanice (14).

Ozljede mozga uzrokovane mehaničkom silom mogu se podijeliti na žarišne (fokalne) i difuzne (20). Žarišne ozljede mozga su lokalno ograničene te najčešće uzrokuju kontuzije, laceracije, intrakranijalne hematome i povišeni intrakranijalni tlak (21). Uzrok navedenih oštećenja su žarišne TBI lezije koje nastaju uslijed nagle i neselektivne stanične smrti većine neuralnih stanica (20,22). Navedene žarišne lezije značajno

osciliraju u veličini, mogu obuhvaćati velika područja ili biti ograničene na male nakupine stanica (22). Ozljede koje je teže dijagnosticirati standardnim metodama oslikavanja mozga jer su karakterizirane mikroskopskim promjenama na staničnoj razini, su difuzne ozljede (1). Posljedica su djelovanja unutarnjih sila uslijed naglog akceleracijskog ili deceleracijskog gibanja mozga u trenutku ozljede. Dva najčešća tipa difuzne ozljede mozga su difuzna aksonalna ozljeda (engl. *diffuse axonal injury*, DAI) i potres mozga (21). Difuzna aksonalna ozljeda posljedica je naglog istežanja i kidanja aksona, lokaliziranih u moždanom deblu, *corpus callosumu* i moždanim hemisferama. Smith i Meany u studiji provedenoj 2000. godine zaključuju da je osjetljivost aksona na mehaničke ozljede uzrokovana njihovim elastičnim svojstvima i visokoorganiziranom strukturom, u bijeloj tvari mozga (23). Naime, aksoni su u normalnim uvjetima fleksibilni (savitljivi), no nakon izlaganja naglim deformacijama, povezanim s TBI postaju krhki (21,23). Brzo istežanje oštećuje aksonski citoskelet, rezultira gubitkom elastičnosti i oštećenjem aksoplazmatskog transporta, koji je potom odgovoran za bubrenje (oticanje) aksona, međusobno odvajanje i prestanak komunikacije koji vodi ka neuropatološkim promjenama u tkivu mozga (21,23). Ozbiljnost DAI je direktno povezana s teškim poremećajima svijesti, visokom smrtnošću i lošim ishodom preživljenja (21). DAI pripada u teške tjelesne ozljede, uz česte komplikacije i trajne posljedice, dok je potres mozga nasuprot tome laka ozljeda mozga, bez posljedica. Potres mozga najčešći je uzrok poremećaja svijesti, koji nastaje nakon akceleracijsko-deceleracijskih ozljeda kao prolazni i kratkotrajni poremećaj funkcije neurona (5,21,23).

Izvor i karakter posttraumatske kome, čini razliku između žarišne i difuzne ozljede mozga. Međutim, na primarne ozljede mozga nemoguće je utjecati, stoga je od presudne važnosti spriječiti navedene, npr. nošenjem kacige na motociklu, ili umanjiti intenzitet sekundarne ozljede mozga (5,21).



## 1.2.2. Sekundarna ozljeda mozga

Patofiziološki mehanizmi obuhvaćaju niz molekularnih događaja koji započinju nakon početne ozljede i nastavljaju se danima, mjesecima, čak i godinama nakon ozljede, uzrokujući pritom različite molekularne, kemijske i stanične promjene (3,10). Mehanizam nastanka sekundarne ozljede potaknut je posljedicama direktnog oštećenja te poremećaja regulacije moždanog krvotoka i metabolizma, koji rezultiraju nastankom edema mozga (24). Mehanički gledano, niz čimbenika koji doprinose sekundarnoj ozljedi uključuje ekscitotoksičnost, mitohondrijsku disfunkciju, oksidativni stres, upalu i programiranu staničnu smrt (7,25).

U neposrednom razdoblju nakon primarne ozljede dolazi do masovnog poremećaja ionske homeostaze u stanicama te membranske depolarizacije uzrokovane unutarstaničnim priljevom natrijevih i kalcijevih te izlučivanjem kalijevih iona (3,7). Unutarstanično nakupljanje kalcijevih iona smatra se ključnim događajem rane posttraumatske ozljede (25). Nakupljeni kalcijevi ioni aktiviraju proteaze ovisne o kalciju, uključujući kaspaze, fosfolipaze i endonukleaze koje potom uzrokuju oštećenja mitohondrija, degradaciju lipida, proteina i nukleinskih kiselina te potiču proizvodnju slobodnih radikala koji imaju destruktivan učinak na stanicu (3,7,25).

Posttraumatska reakcija karakterizirana je prekomjernim oslobađanjem ekscitacijskih neurotransmitera, glutamata i aspartata iz presinaptičkih vezikula u izvanstanični prostor (3,10). U fiziološkim uvjetima su razine glutamata u izvanstaničnom prostoru regulirane unosom glutamata i aspartata u glijalne stanice, astrocite, a proces je posredovan o energiji ovisnim glutamatnim receptorima (26). Međutim, posttraumatski se glutamat i aspartat pretjerano izlučuju te su glutamatni receptori neprestano stimulirani, što rezultira izlaskom iona kalija,

aulaskom iona kalcija i natrija te vode, koji potiču bubrenje stanica (1,3,26). Navedeni se proces naziva ekscitotoksičnost. Pretpostavlja se da su mitohondriji najpogođeniji procesom ekscitotoksičnosti jer porast koncentracije iona kalcija uzrokuje poremećaje u procesima pretvorbe energije (10,26). Naime, posttraumatske stanice trebaju veću količinu energije, no ozlijeđeni mitohondriji imaju smanjenu mogućnost sintetiziranja iste te posljedično oslobađaju reaktivne kisikove spojeve i uzrokuju oštećenja stanicama koja nerijetko vode u apoptozu (26).

Upala se javlja kao reakcija tkiva na ozljedu te je jedan od najvažnijih sekundarnih procesa u patofiziološkoj kaskadi zbivanja nakon traume mozga. Posttraumatski se potiče upalni proces, odnosno sinteza i otpuštanje brojnih transkripcijskih faktora, upalnih medijatora i neuroprotektivnih gena te citokina i kemokina, koji dodatno oštećuju neurone i potiču narušavanje integriteta krvno moždane barijere (engl. *blood brain barrier*, BBB) (9). Navedene upalne medijatore mogu sintetizirati neuroni, astrociti i stanice mikroglije, koji ispoljavaju za njih specifične receptore. Rezultat ove kompleksne kaskade događaja, nekoliko sati, dana ili mjeseci nakon ozljede mozga je najčešće nekrotična smrt stanice ili pokretanje apoptoze (9,10). Navedena oštećenja na poslijetku rezultiraju moždanim krvarenjima, hipoksijom i edemom mozga pacijenata koji su pretrpjeli traumu (9,10,25).

### 1.2.3. Uloga astrocita u patofiziologiji TBI

Astrociti su glija stanice koje pružaju strukturnu potporu stanicama i staničnim komponentama te održavaju fiziološku homeostazu i kontrolu protoka krvi u središnjem živčanom sustavu (engl. *central nervous system*, CNS) (1). U interakciji su s endotelnim stanicama kapilara te na taj način održavaju integritet BBB-a, a međusobno se spajaju i komuniciraju, pritom stvarajući kompleksnu mrežu koja dalje utječe na

strukturu, funkciju i aktivnost kako neurona, tako i ostalih stanica živčanog sustava (20). Novije studije ističu multifunkcionalnu ulogu astrocита, kako u odgovoru mozga na ozljedu, tako i u poticanju regeneracije u CNS-a nakon ozljede mozga (9).

Postoji indikacija da astrociti imaju važnu ulogu u procesu ekcitetoksičnosti koji se javlja kao sekundarni odgovor na ozljedu mozga. Naime, glutamatni transporter astrocита (engl. *excitatory amino acid transporter*, EAAT), EAAT1 i EAAT2, esencijalni su u reapsorpciji glutamata koji se pretjerano nakuplja u procesu ekcitetoksičnosti te se blokiranjem navedenih transportera značajno povećava koncentracija glutamata u izvanstaničnom području, koja doprinosi ekcitetoksičnosti i posljedično neurodegeneraciji (1) .

Astrociti imaju važnu ulogu u posttraumatskom odgovoru mozga na traumu. Naime, astrociti izražavaju niz receptora koji sudjeluju u imunološkom odgovoru stanice, a koji su aktivirani posttraumatskim signalima (1,7). Biokemijsko okruženje u stanici se mijenja nakon TBI-a te signali opasnosti induciraju promjene u morfologiji i funkcionalne promjene astrocита, uključujući hipertrofiju staničnih nastavaka i pojačanu ekspresiju proteina intermedijarnih filamenata, poput kiselog fibrilarnog proteina glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP), koji je glavni strukturni protein odraslih astrocита (1,9). Također, posttraumatski signali potiču proliferaciju astrocита i izlučivanje brojnih upalnih medijatora i faktora rasta (7). Povećanje reaktivnosti astrocита, kao odgovor na ozljede mozga naziva se astrocitoza. Astrociti se kao i brojne druge glijalne stanice aktiviraju u roku od 24 sata, a vrhunac reaktivnosti im je od 3. do 7. dana, međutim astrociti, za razliku od ostalih stanica poput mikroglije, pokazuju dugotrajan proliferativni odgovor, najmanje 28 dana nakon ozljede mozga (9). Također, astrocitoza može varirati ovisno o težini ozljede, od blage do ozbiljne TBI, a najčešće rezultira stvaranjem glijalnog ožiljka.

Pokretanjem upalnog odgovora, astrociti zajedno s mikroglijom, endotelnim stanicama, fibroblastima i izvanstaničnim matriksom, oko ozlijeđenog tkiva formiraju glijalni ožiljak. Smatra se da ožiljci djeluju kao fizička barijera koji izolira oštećeno područje od susjednog, potencijalno zdravog živčanog tkiva te se na taj način sprječava daljnje širenje upalnih procesa. Naime, glijalni su ožiljci gotovo u cijelosti sastavljeni od novoproliferiranih astrocita koji se dinamički isprepliću u svrhu stvaranja barijere koja će upalne stanice zadržati na mjestu lezije (20). Rezultat aktivacije astrocita je snažan i dugotrajan neuroinflamatorni odgovor urođenih i adaptivnih imunoloških stanica. Istraživanja provedena na transgeničnim miševima s nefunkcionalnim astrocitima, koji su pretrpjeli traumu mozga, pokazala su da onemogućeno stvaranje glijalnog ožiljaka uzrokuje širenje upale u okolno tkivo, a sam oporavak miševa se uvelike produžava (20).

Unatoč tome, nakon traume mozga, astrocitoza može imati negativan utjecaj na oporavak pacijenta te se glijalni ožiljak može smatrati jednom od prepreka u aksonskoj regeneraciji i oporavku neuronske povezanosti (9). Astrocitoza može biti definirana u kontekstu neuroprotekcije, ali i neurodegeneracije (1). Reaktivni astrociti mogu proizvoditi protuupalne citokine i kemokine koji posljedično razgrađuju izvanstanični matriks i narušavaju integritet BBB, no astrociti su sposobni i izlučivati faktore koji potiču obnavljanje i regeneraciju nakon oštećenja CNS-a (1,9). Navedene činjenice ukazuju da u kontekstu farmakoterapije, reaktivnu astrogliozu ne možemo jednostavno suzbiti ili promicati, već moramo selektivno potaknuti blagotvorne učinke i utišati štetne.

## 1.3. Liječenje TBI

### 1.3.1. Trenutni terapijski pristupi u liječenju TBI

Unatoč desetljećima provedenim na istraživanja s ciljem razumijevanja patofiziologije TBI, terapijski pristupi za poboljšanje ishoda nakon ozljede mozga su i dalje ograničeni (27). Postojeći pristupi uključuju intervencije za suzbijanje primarnih i minimalizaciju sekundarnih ozljeda i/ili komplikacija, kao i ranu rehabilitaciju u svrhu poboljšanja funkcije, kvalitete života i samostalnosti pacijenata koji su pretrpjeli traumu (28). Vrsta i opseg liječenja uvelike ovisi o težini i anatomskom položaju ozljede, kao i o vremenu proteklom od nastanka ozljede mozga (27). Trenutne mogućnosti liječenja TBI podrazumijevaju stabilizaciju pacijenta, prevenciju intrakranijalne hipertenzije, održavanje moždanog perfuzijskog tlaka te izbjegavanje sekundarnih oštećenja i održavanje optimalne i zadovoljavajuće cerebralne oksigenacije (10). Nadalje, TBI je povezan s većim rizikom od trombotičkih događaja, poput moždanog udara, stoga se pacijentima daje antikoagulantna terapija, no s oprezom kako bi se preveniralo moguće daljnje oštećenje moždanog tkiva izazvano obilnim krvarenjima.

Desetljećima je primarni pristup i cilj terapije TBI bilo liječenje ozlijeđenog tkiva, u svrhu smanjenja veličine lezije. Potom su veliki napori uloženi u razvoj neuroprotektivnih sredstava koji su ciljali mehanizme sekundarnih oštećenja u TBI, uključujući one koji uklanjaju slobodne radikale, antagoniste glutamata, blokatore kalcijevih kanala, inhibitore ekscitacijskih aminokiselina te mnogih drugih (28). Mogući uzrok neuspjeha je heterogenost patofiziologije TBI, stoga do danas ne postoje učinkoviti terapijski pristupi koji poboljšavaju neurološki ishod nakon TBI.

### 1.3.2. Budući terapijski pristupi u liječenju TBI

Iz godine u godinu se povećava broj istraživanja u svrhu pronalaska efikasnog terapijskog pristupa u liječenju TBI. U brojnim se prekliničkim i kliničkim istraživanjima TBI, provedenim na životinjskim modelima, testirala terapijska efikasnost lijekova koji su ciljali mehanizme sekundarnih oštećenja u TBI. Recentnim su se istraživanjima identificiralo nekoliko obećavajućih terapijskih pristupa u liječenju TBI, od kojih su neki pokazali visoki terapijski potencijal.

Jedan od potencijalnih terapijskih pristupa uključuje blokatore kalcijevih kanala. Naime, povećana koncentracija unutarstaničnog kalcija ima značajnu ulogu u poticanju kaskade stanične smrti nakon TBI, stoga se korištenjem blokatora kalcijevih kanala može neutralizirati pretjerano izlučivanje kalcija i spriječiti apoptoza stanice (10).

Osmoterapija, je također jedan od pristupa, koji je pokazao pozitivne učinke na pacijente koji su pretrpjeli tešku traumu mozga. Manitol je jedan od osmotskih diuretika, koji se injektirao pacijentima, nakon traume kao otopina za infuziju, te je značajno snižavao intrakranijalni tlak bolesnika i utišavao upalni odgovor (27).

Za terapiju bolesnika s TBI, također se efikasan pokazao amantadin, dopaminski agonist, koji se koristi u liječenju Parkinsonove bolesti. Smatra se da amantadin može zaštititi neurone od ekscitotoksičnosti koju izaziva nagomilavanje glutamata u izvanstaničnom području (10).

Biološki terapijski pristupi, poput terapije kalcij vezujućim proteinom B (engl. *calcium-binding protein B*, S100B), u odgovarajućim dozama, pozitivno utječu na oporavak neurona, nakon ozljede. Međutim, povećanjem doze, S100B značajno potiče neuroinflamaciju(10).

Utjecaj hipotermije na mozak, nakon ozljede, se također pokazao važnim. Točnije, temperaturni raspon od 30-35 °C neuroprotektivno utječe

na pacijente s teškom traumom mozga. Točan mehanizam djelovanja i dalje je nepoznat, no novije studije na životinjskim modelima pokazuju značajne promjene u ekspresiji miRNA, kao i sintezi proteina, nakon terapije hipotermijom (10).

### 1.3.3. Ugljikove nanocjevčice u liječenju TBI

U posljednjem desetljeću zabilježen je sve veći interes i bolje razumijevanje mogućnosti primjene nanotehnologije na bolesti CNS-a. Cilj navedenih istraživanja je razvoj budućih strategija za popravak tkiva i poticanje funkcionalnog oporavka nakon oštećenja mozga (29). Iako još uvijek ograničena, primjena nanomaterijala u biomedicinskim istraživanjima bilježi impresivan rast, a upravo su ugljikove nanocjevčice (engl. *carbon nanotubes*, CNTs) na samom vrhu otkrića u nanotehnologiji. CNTs posjeduju jedinstvena fizička i kemijska svojstva, kao što su omjer širine i duljine, čvrstoća, fleksibilnost, vodljivost itd., te imaju obećavajuću primjenu u medicini, posebno u području neuroprotetike (29,30).

CNTs su cilindrične strukture, građene od jednoatomnog sloja grafita, odnosno grafena s promjerom u nanometarskoj skali i s ogromnom površinom i odličnom električnom i toplinskom provodljivošću (30). Ovisno o broju prisutnih cilindričnih struktura, CNTs mogu biti:

1. jednozidni (engl. *single-walled CNTs*, SWCNTs), čija se cilindrična struktura sastoji od jednog cilindra grafena u rasponu od 0,4 do 2 nm;
2. višeslojni (engl. *multi-walled CNTs*, MWCNTs), koji se sastoje od više koaksijalnih cilindara, s vanjskim promjerom u rasponu od 2 do 100 nm;
3. dvostrani (engl. *double-walled CNTs*), koje se sastoje od dva koaksijalna cilindra.

Sve su CNTs duljine od jednog do nekoliko mikrometara (29,30). Budući da je uporaba CNTs u biološkim sustavima ograničena njihovom

slabom topljivošću i biokompatibilnošću u vodenom mediju, one se mogu modificirati nekovalentnim ili kovalentnim vezanjem molekula. Kovalentna se vezanja postižu inkubacijom CNTs jakim oksidacijskim sredstvima, poput dušične kiseline. Naime dušična kiselina dodaje karboksilnu skupinu na krajeve CNTs te se vezana skupina potom može pretvoriti u međuprodukt acetil klorid koji potom može ostvarivati veze sa spojem od interesa. Jedan od mogućih takvih spojeva je i topivi polimer, poli-m-aminobenzen sulfonska kiselina (engl. *poly-m-aminobenzene sulfonic acid*, PABS) (30).

U području liječenja ozljeda CNS-a, CNTs kao nanomaterijali imaju obećavajuću primjenu, bilo zbog jednostavnosti dizajniranja za proučavanje organizacije neuralnih mreža ili zbog njihove električne provodljivosti, koja omogućava praćenje i stimulaciju neurona (31). Također se CNTs smatraju kandidatima za isporuku lijekova jer osim što ulaze u stanice i ostvaruju komunikaciju, iste prolaze i BBB te je upravo iz tog razloga ključno proučiti utjecaje CNTs na neuralne stanice (30,31). U istraživanjima je dokazano da CNTs imaju mogućnost moduliranja morfoloških i funkcionalnih karakteristika neurona, ali i glijalnih stanica. Astrociti su, među ostalim vrstama glijalnih stanica, najvažniji u stvaranju sinaptične neuralne mreže koja služi za uspostavljanje dvosmjerne komunikacije s neuronima te promjene u plastičnosti astrocita nakon ozljede CNS-a mogu dovesti do poremećaja u električnom provođenju signala (32). Također je proces reaktivne astroglioze ključan u progresiji sekundarnog odgovora, stoga je nakon traume izrazito važno proučiti učinke koje kemijski funkcionalizirane CNTs imaju na ovu vrstu glijalnih stanica (30,32). Ideja ovoga rada počiva na studijama koje su dokazale da kemijski funkcionalizirane CNTs utječu na funkciju i morfologiju astrocita, koji potom potiču oporavak CNS-a nakon traume (33).



## 1.4. Eksperimentalni modeli TBI

Životinjski modeli TBI igraju važnu ulogu u procesu procjene i razumijevanja složenih fizioloških, bihevioralnih i histopatoloških promjena povezanih s TBI (21). Obzirom na složenu prirodu klinički iznimno heterogene ozljede, razvijeno je nekoliko životinjskih modela. Usprkos činjenici da su veće životinje bliže čovjeku po veličini i fiziologiji, glodavci se najčešće koriste u istraživanjima traume mozga što zbog male veličine i skromnih troškova skladištenja, ali i lakoće standardizacije rezultata eksperimenata (3). TBI se u eksperimentalnim uvjetima može se proučavati koristeći životinjske *in vitro* ili *in vivo* modele. *In vitro* modeli simuliraju ozljede cijelog tkiva ili izoliranih tipova stanica, dok se *in vivo* ozljede uglavnom izvode na modelima TBI životinja (3)

Dizajn i odabir modela TBI-a ovisi o fokusu istraživanja, a općenito se eksperimentalni modeli *in vivo* mogu podijeliti na modele žarišne, difuzne ili kombinirane žarišno/difuzne ozljede (34).

### 1.4.1. Modeli žarišne TBI

Dva najčešće korištena modela TBI u kojima se istražuje utjecaj traume na CNS su model pada utega (engl. *weight drop model*, WD) i model kontroliranog kortikalnog udara (engl. *controlled cortical impact*, CCI).

U WD modelu, pod utjecajem gravitacijske sile i utega poznate mase, anesteziranoj životinji (fiksiranoj za horizontalnu površinu), ispušta se uteg koji udara lubanju eksperimentalne životinje. Ovaj model je ekonomičan, brz i jednostavan za korištenje, no korištenjem ovoga modela za primjenu teških/ozbiljnih ozljeda postoji opasnost od pucanja lubanje životinje, ali i pojave ponovnog udara (zbog odskoka utega, nakon udara u tvrdu površinu) (34).

U CCI modelu, eksperimentalnoj životinji se izaziva udarac impaktorom, kojemu se može kontrolirati brzina, vrijeme i dubina ozljede

u usporedbi s WD modelom. Nedostatak ove metode je to da na mjestu udara ne može izazvati difuznu ozljedu, koja je najčešća kod trauma mozga (21).

#### 1.4.2. Modeli difuzne TBI

Model udarca tlakom tekućine (engl. *fluid percussion injury*, FPI) je dosada, najčešće korišteni model difuzne ozljede u predkliničkim studijama. Model uključuje otvaranja lubanje te izvođenje udarca tlakom tekućine koji udara u duralnu površinu zatim se koncentrično kreće u epiduralni prostor, što dovodi do difuznog oštećenja (21). Idući model, koji je također poznat jer reproducira DAO, naziva se model unutarnjeg ubrzanja (engl. *internal acceleration*, IN). IN se razvio po uzoru na žarišni model WD te najbolje opisuje rotacijsku TBI dobivenu u prometnoj nesreći (21). Od WD modela se razlikuje po tome što se eksperimentalnu životinju postavlja na čeličnu pločicu, koja smanjuje vjerojatnost od pojave frakture lubanje te glava eksperimentalne životinje nije fiksirana, u svrhu imitiranja stvarnih pokreta glave prilikom udarca (10).

#### 1.4.3. Kombinirani model žarišne i difuzne TBI

Jedan od modela koji najbolje opisuje *in vivo* TBI je model lateralne ozljede tlakom tekućine (engl. *lateral fluid percussion injury*, LFPI). Navedeni model sadrži karakteristike žarišne i difuzne ozljede, odnosno stvara žarišnu kortikalnu konturziju, ali istovremeno prenosi ozljedu i u subkortikalne strukture poput hipokampusu i talamusu. Ovom metodom ozljeđivanja eksperimentalnih životinja pobuđuje se gubitak neurona već 7 dana nakon ozljede, a sekundarni događaji se nastavljaju mjesecima nakon, u subkortikalnim strukturama mozga.(10)

#### 1.4.4. *In vitro* modeli

*In vitro* modeli su alat koji se koristi za razumijevanje mehanizama uključenih u TBI na razini tkiva, nakon ozljede. Navedeni se modeli ne temelje samo na trenutnoj akutnoj ozljedi već i na napretku ozljede od početnog mehaničkog udarca do nekoliko dana, tjedana kasnije, u svrhu

pribavljanja kronoloških podataka o patofiziologiji TBI, kako bi se saznalo koje je vrijeme optimalno za primjenu određenog terapijskog pristupa (34).

Narašireni *in vitro* model je model ozljede izazvan rastezanjem (engl. *cell stretch, CS*). Ozljeda se započinje nakon što su stanice ili tkivo adherirale na površinu na kojoj su uzgojene (35). Također, postoji nekoliko načina provođenja traume izazvane rastezanjem. Model tlačnog rastezanja stanica tlačnim impulsom (engl. *Abrupt Preassure Pulse Stretching, APPS*), najbolje simulira *in vivo* ozljedu, eksperimentalnog tkiva ili stanica. Naime, stanicama u kulturi, koje su prethodno uzgojene na površini silastičnih membrana će se uz pomoć tlaka komprimiranog plina, zadati brza ozljeda rastezanja, kojom se *in vitro* simulira rotacijska, akceleracijska/deceleracijska trauma (36). Navedena metoda ima odličnu reproducibilnost, ali i daje mogućnost kontrole ozljede, od blage do teške.

*In vitro* TBI imaju prednost nad *in vivo* modelima jer se njima omogućuje direktna kontrola okolišnih faktora, a također su i puno dostupnije. Međutim, jedna od ograničenja *in vitro* metoda je nedostatak psiholoških i neuroloških odgovora, koje *in vivo* modeli omogućuju (35). Također jedan od nedostataka je to što nemaju krvožilni sustav stoga u istraživanjima upalnog odgovora treba uzeti u obzir činjenicu da se u *in vivo* uvjetima bolje vidi aktivacija signalne kaskade upale, posredovane citokinima (34).

## 2. Cilj rada

Glavna hipoteza ovoga istraživanja bila je da CNTs kemijski funkcionalizirane s PABS potiču preživljavanje i mijenjaju profil sekretoma astrocita u *in vitro* modelu TBI.

Specifični su ciljevi istraživanja bili:

1. ispitati kako primjena PABS-SWCNTs djeluje na morfologiju astrocita i ekspresiju markera GFAP-a nakon ozljede,
2. odrediti utječe li aplikacija PABS-SWCNTs na preživljenje astrocita izloženih teškoj ozljedi brzim rastezanjem,
3. odrediti učinke PABS-SWCNTs na otpuštanje citokina iz teško ozlijeđenih astrocita.

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Pokusne životinje

Za *in vitro* eksperimente 0 do 2 dana stari mladunci miševa C57BL/6 soja oba spola korišteni su za izolaciju astrocita. Uzgoj i održavanje životinja obavljalo se u Laboratoriju za uzgoj i inženjering miševa Rijeka (engl. *Laboratory for Mice Breeding and Engineering Rijeka*, LAMRI). Svi eksperimenti u kojima su se koristite životinje napravljeni su na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

### 3.2. *In vitro* istraživanja

#### 3.2.1. Primarna stanična kultura astrocita

Primarna stanična kultura astrocita pripravljena je metodom prema Wanner (36) uz neke prilagodbe. Ukupno su učinjena tri postupka izolacije astrocita (tri biološka replikata). Vidljivi korteksi mišjih mladunaca izolirani su, očišćeni od bijele tvari i meninga, te usitnjeni i stavljeni u sterilnu 50 mL epruvetu s kompletiranim medijem za uzgoj stanica (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM), bez fenol-crvenog. Potom su automatskom pipetom homogenizirani korteksi te ih propušteni kroz 230  $\mu\text{m}$  i 140  $\mu\text{m}$  sterilni filter na metalnom nosaču. Suspenzija stanica centrifugirana je na 12 000 rotacija po minuti (rpm) tijekom 5 min. Nakon centrifugiranja, odvojen je supernatant te je pelet resuspendiran u 2,5 ml kompletiranog medija za stanice (10% FSB, 1% antibiotik Antimikotik i DMEM), sve dok se nakupine nisu razdvojile u pojedinačne stanice. Suspenzija stanica je potom propuštena kroz filter s otvorima veličine 73  $\mu\text{m}$  u sterilnu epruvetu. Stanice su obojane s Trypan Blue i prebrojane u Neubauerovoj komorici te je izračunat broj stanica po mL medija. Nakon izračuna, stanice su nasađene na 75  $\text{cm}^2$  tikvice za kulturu tkiva (T75) te inkubirane na 37°C, 5% CO<sub>2</sub> i relativnoj vlažnosti 95%, u koncentraciji od  $2 \times 10^5$  stanica/cm<sup>2</sup>.

Nakon 7 dana inkubacije astrociti, mikroglia i oligodendrociti formirali su različite slojeve, a astrociti, adherirani na dno T75 tikvice, postali su konfluentni. T75 tikvica stavljena je na kružnu tresilicu na 180 rpm/30 minuta, nakon čega se supernatant koji sadrži mikrogliju uklonio pipetom. Kompletirani medij za uzgoj astrocita dodan je u tikvicu s preostalim stanicama i tikvicu smo ponovno stavili na kružnu tresilicu na 37°C, 240 rpm/6 sati kako bi se odvojile prekursorske stanice oligodendrocita.

Nakon postupaka trešnje, tikvice smo dva puta ispirali fosfatom puferiranom otopinom soli (engl. *phosphate buffered saline*, PBS), a preostali adherirani astrociti su izolirani nakon inkubacije s 5 ml tripsin-EDTA na 37°C tijekom približno 5 minuta. U pojedinačne stanice dodan je kompletirani medij za kulturu astrocita i potom je cijeli volumen prenesen u 50 mL epruvete i centrifugiran je na 12 000 rpm tijekom 5 minuta. Talog smo potom resuspendirali u svježem mediju za uzgoj astrocita nakon čega smo stanice razdijelili u dvije T75 tikvice za kulturu stanica te smo ih stavili na inkubaciju (37°C u atmosferi s CO<sub>2</sub>).

Jedna T75 tikvica za kulturu stanica dala je oko  $1 \times 10^6$  stanica nakon prvog razdjeljivanja. Medij smo mijenjali svaka 2-3 dana, a 12-14 dana nakon prvog razdjeljivanja i 24 do 48 sati prije provođenja eksperimenta, astrocite smo prikupili tripsinacijom, isprali, centrifugirali i potom pobrojali te smo  $6 \times 10^4$  stanica u 1 mL medija premjestili u kolagenom obložene silastične membrane s 6 jažica (Flexcell International Corp.). Na navedenim je pločama po jažici nasađeno otprilike 150 000 stanica. Ovim postupkom se dobivala stanična kultura astrocita s otprilike 95%-tnom čistoćom.

### 3.2.2. Model ozljede stanica

Kultura astrocita uzgojena na BioFlex pločama za kulturu stanica podvrgnute su traumi izazvanoj rastezanjem pomoću uređaja Cell Injury Controller II (Virginia Commonwealth University, Richmond, VA, SAD) koji

može regulirati puls/tlak komprimiranog plina kako bi se izazvala brza i kratkotrajna deformacija silastične membrane i adheriranih stanica. Navedenim uređajem smo precizno kontrolirali veličinu i trajanje ozljede. Tijekom deformacije membrane, adherirane stanice uzgojene na površini silastične membrane izložene su biaksijalnom rastezanju te smo na taj način simulirali rotacijsku, akceleracijsku/deceleracijsku traumu *in vitro*. Prije svakog pokusa, uređaj kojim se provodi trauma izazvana rastezanjem kalibriran je prema uputama proizvođača. Tlačni impuls trajao je oko 50 ms, a stupanj pomaka membrane kretao se od 3,5 do 4,3 funti po kvadratnom inču (engl. *pound per square inch*, PSI) pri čemu je nastalo 55%-tno (7,5 mm) rastezanje koje korespondira s teškom ozljedom nakon TBI. Prije ozljede stanica na pločama, na ploči za kontrolu smo 3 puta isprobali udarac (kalibracija). Zatim smo udarili stanične kulture u jažicama na ploči i potom stanice inkubirali (37°C, 5% CO<sub>2</sub> i relativnoj vlažnosti 95%). Svi eksperimenti napravljeni su u triplikatima, svaki put s novom serijom stanične kulture astrocita.

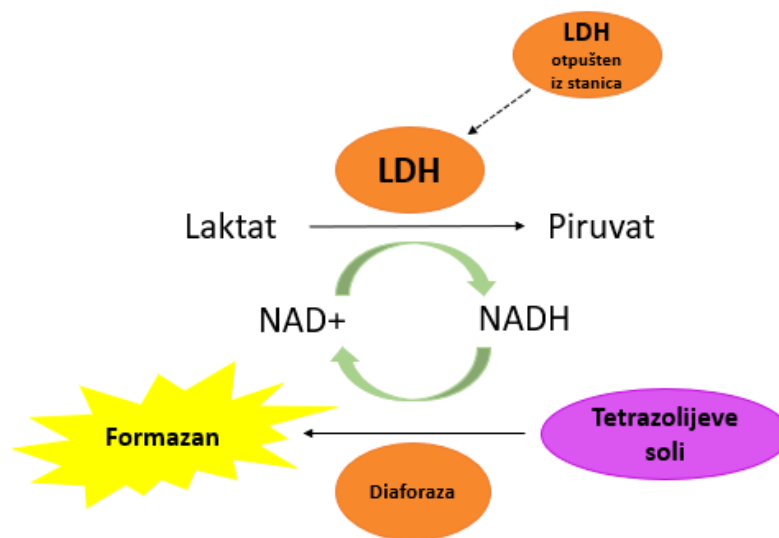
### 3.2.3. Inkubacija primarne kulture astrocita s otopinama PABS-SWCNTs-a

PABS-SWCNTs, korištene u ovom eksperimentu, sintetizirane su i opisane kako je prethodno objavljeno (37). PABS-SWCNTs su se dodavale u dvije jažice s staničnim kulturama, 1 sat nakon ozljede u koncentraciji 5 µg/mL. Važno je napomenuti da smo PABS-SWCNTs, prije dodavanja u kulturu stanica, izvorteksirali u 150 µL medija iz stanične kulture, kako bi se što bolje raspršile te kako bi se spriječilo stvaranje nakupina cjevčica u kulturi. Astrociti su inkubirani s PABS-SWCNTs tijekom ukupno 23 sata nakon čega su stanice korištene za različite analize.

### 3.2.4. Određivanje stupnja ozljede astrocita

Stupanj ozljede astrocita nakon ozljede brzim rastezanjem određen je mjerenjem količine otpuštenog unutarstaničnog enzima laktatne

dehidrogenaze (engl. *lactate dehydrogenase*, LDH) u mediju za uzgoj stanica. LDH je topljivi stabilni citosolni enzim brojnih stanica, koji se brzo oslobađa u medij stanične kulture nakon oštećenja membrane stanica. LDH pripada skupini oksidoreduktaznih enzima, koji katalizira reverzibilnu reakciju oksidacije laktata u piruvat uz redukciju NAD<sup>+</sup> u NADH. Naime, dodavanje LDH kita (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega Corporation, SAD), koji sadrži laktat, NAD<sup>+</sup>, reduktazu, substrat za reduktazu i luciferazu, započinje reakcija u kojoj ljubičaste tetrazolijeve soli (engl. *iodonitro-tetrazolium violet*, INT) u prisustvu LDH prelaze u crveni formazan (Slika 1). Formazan je spoj, koji je dobro topljiv u vodi te se lako detektira korištenjem kalorimetrije, odnosno mjerenjem apsorbancije na 492nm, stoga je količina crvenog obojenja proporcionalna broju liziranih stanica.



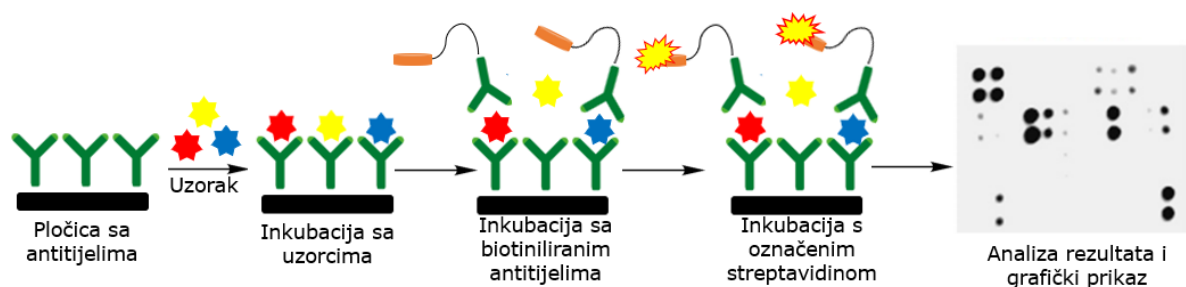
**Slika 1.** Prikaz reakcije koja opisuje otpuštanja LDH iz ozlijeđenih stanica, prema uputama proizvođača (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega Corporation, SAD).

Ukratko, na kraju svakog eksperimentalnog razdoblja (15 min, 1 h, 3 h, 6 h i 24 h nakon ozljede), odvojeno je po 50 µL medija iz kulture stanica za mjerenje aktivnosti LDH. Nakon dodavanja supstrata iz LDH kita, razine aktivnosti LDH analizirane su spektrofotometrijom na mikrotitarskoj ploči.



### 3.2.5. Određivanje razine citokina u mediju za kulturu stanica

Za detekciju raznih citokina koje astrociti otpuštaju u medij za kulturu stanica, učinjena je mikročip analiza prema uputama proizvođača (RayBiotech, Norcross, GA, SAD). RayBiotech kit jednostavnog je formata, visoke osjetljivosti (pg/mL) te omogućava detekciju razine izražaja mnogih citokina. Ukratko, membrane iz kita su prvo blokirane te prekrivene uzorcima medija i inkubirane tijekom noći. Idućeg dana, nakon ispiranja, na membrane je dodano biotinizirano anti-citokinsko protutijelo (*Biotinylated Antibody Cocktail*), nakon čega je primijenjen streptavidin konjugiran s peroksidazom iz hrena (Slika 2). Signali su detektirani izravno s membrane uporabom sustava za detekciju kemiluminiscencije (Kodak Image Station 440CF i Kodak 1D Image Analysis Software, oboje Eastman Kodak, Rochester, NY, SAD). Usporedba dobivenih signala s tablicom, koja je sastavni dio kita, omogućila je identifikaciju citokina.



**Slika 2.** Princip rada mikročip analize proizvođača RayBiotech (Norcross, GA, SAD).

### 3.2.6. Imunocitofluorescencija

Stanice nasađene u jažicama BioFlex ploča su isprane PBS-om i fiksirane 4% paraformaldehidom u PBS-u, na sobnoj temperaturi u trajanju 20 minuta. Permeabilizacija stanica u 0,3% Triton X-100 trajala je 10 minuta, nakon čega su isprane PBS-om te su kulture tretirane 30 minuta puferom za blokiranje koji je sadržavao 3% goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) u PBS-u kako bi se smanjilo nespecifično vezanje. Primarna protutijela pripremljena su u 1% otopini

BSA u PBS-u. Inkubacija s primarnim protutijelima provodila se preko noći na 4°C nakon čega su stanice isprane u PBS-u i tretirane s odgovarajućim sekundarnim protutijelima u trajanju 2 sata. Potom su stanice isprane u PBS-u te je na stanice stavljena fluorescentna boja za jezgre 4,6-diamidino-2-fenilindol (engl. *4,6-diamidino-2-phenylindole*, DAPI). Nakon toga su membrane sa stanicama isprane i posušene te montirane na predmetna stakalca uz dodatak medija za uklapanje Mowiol (Merck Millipore, SAD). Poklopljeni preparati, ostavljeni su na sušenje te su potom mikroskopirani na fluorescentnom invertnom mikroskopu (Olympus IX73 Inverted Microscope, Olympus Corporation, Japan) koji omogućava brzo i precizno snimanje fluorescentno obilježenih citoloških uzoraka. Uzorci su slikani u programu cellSens (cellSens Imaging Software, Olympus Corporation, Japan) te su potom analizirani u programu ImageJ (NIH, Bethesda, MD, SAD).

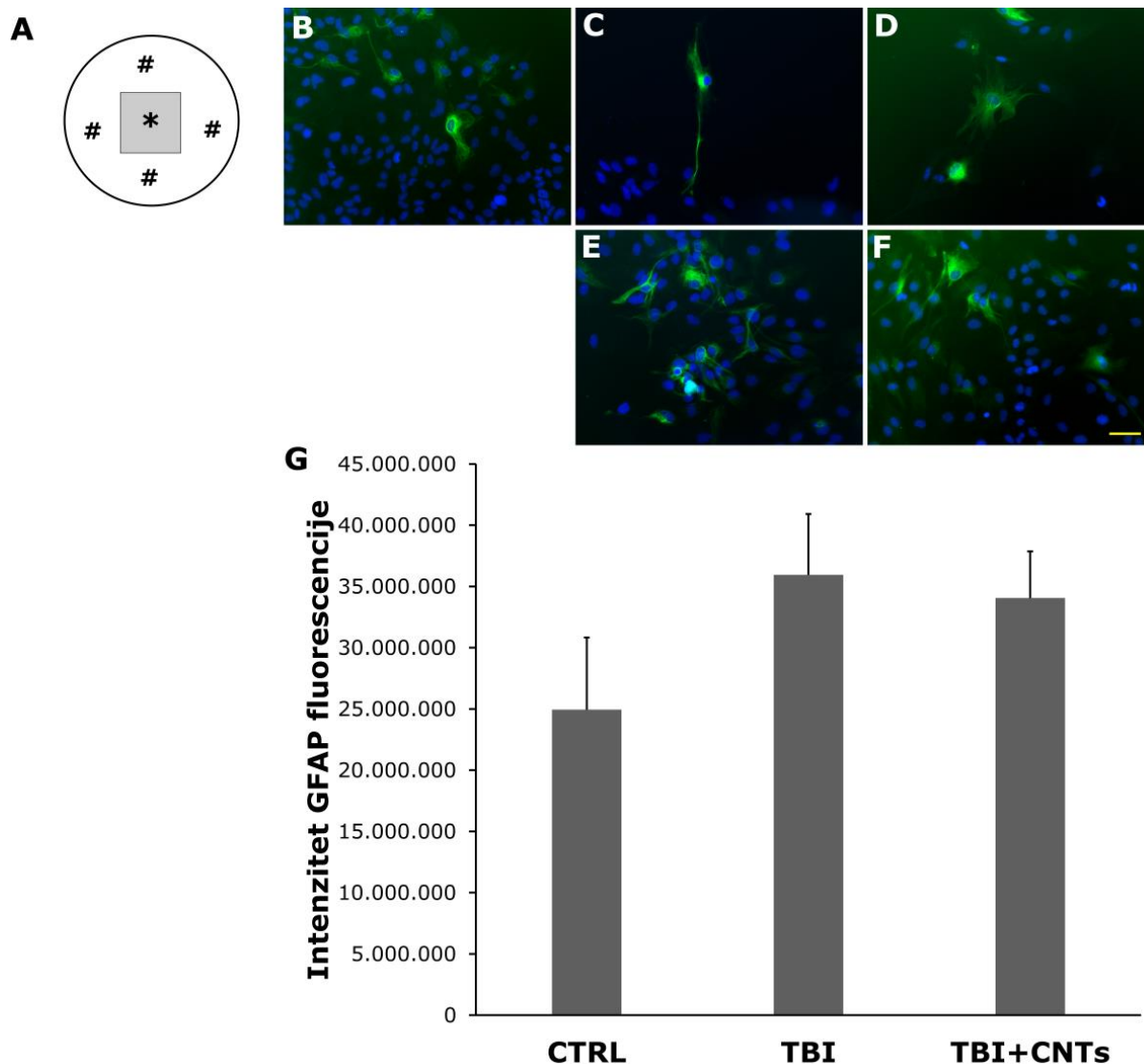
### 3.2.8. Prikupljanje podataka i statističke analize

Za pohranu podataka te izradu grafičkih prikaza korišten je program Microsoft Office Excel® (Microsoft Corp., Redmond, WA, SAD). Za analizu citoloških preparata astrocita na elastičnim membranama korištene su mikrofotografije učinjene na 400x povećanju slučajnim odabirom područja slikanja. Analiza mikrofotografija učinjena je pomoću ImageJ programa. Vrijednosti koje su dobivene kvantitativnim mjerenjima izražene su kao mjera središnjice i raspršenja. Za statističku obradu podataka korišteni su parametrijski postupci statističke raščlambe, jednosmjerna (*one-way*) analiza varijance (ANOVA) s Duncan *post-hoc* testom. Razina od  $P < 0,05$  smatrana je statistički značajnom. Postupci statističke raščlambe učinjeni su pomoću računalne programske potpore STATISTICA® inačica 13 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD).

## 4. Rezultati

### 4.1. Teška ozljeda brzim rastezanjem ne utječe na razinu ekspresije GFAP-a u preživjelim astrocitima

Kako bi se istražilo utječe li teška ozljeda brzim rastezanjem na ekspresiju GFAP u ozlijeđenim astrocitima te koji je učinak primjene PABS-SWCNTs, učinjeno je imunofluorescentno bojanje silastičnih membrana nasađenih istraživanim stanicama. Na slici 3. prikazane su reprezentativne mikrofotografije na kojima se uočava da *in vitro* TBI uzrokuje određene morfološke promjene astrocita. U odnosu na neozlijeđene astrocite (Slika 3B), 24 h nakon istezanja se u područjima maksimalne ozljede (Slika 3C-D) uočava značajan gubitak stanica. U tom području, ali i u okolnim dijelovima membrane (Slika 3E-F), astrociti su kontrahirani, poprimili su zvjezdoliki oblik, s izduženim izdancima koji se pružaju u različitim smjerovima. Astrociti u suspenziji s PABS-SWCNTs izgledali su većima u odnosu na ozlijeđene netretirane stanice, no daljnje morfološke analize u ovom istraživanju nisu rađene. Učinjeno je i mjerenje intenziteta fluorescencije GFAP (Slika 3G), no analizom rezultata nije se uočila značajna razlika u GFAP obojenju između eksperimentalnih grupa [ $F(2;9) = 1,408$ ;  $P = 0,294$ ].

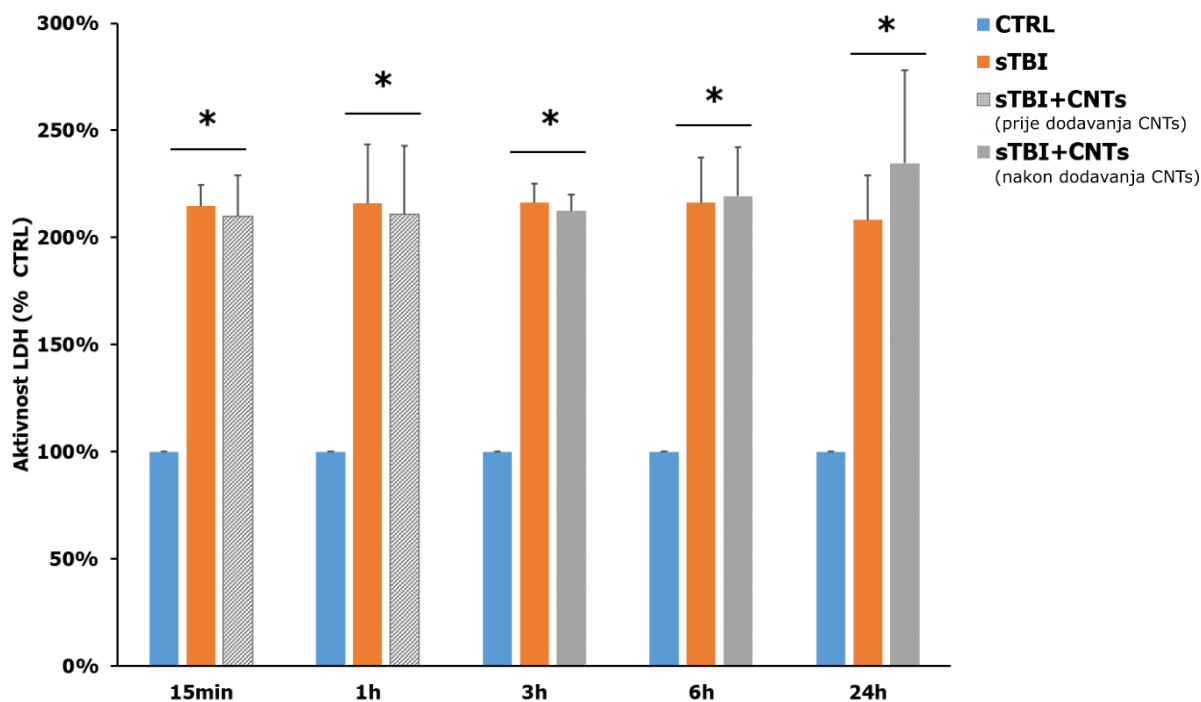


**Slika 3. Utjecaj primjene PABS-SWCNTs na ekspresiju astrocitnog markera GFAP nakon teške ozljede brzim rastezanjem.** (A) Shematski prikaz jačica s označenim pozicijama izrade mikrofotografija na mjestu maksimalne razine rastezanja (\*) ili okolnom području s nižom razinom ozljede (#). (B-F) Odabrane mikrofotografije nezlijeđenih astrocita (B) te stanica podvrgnutih teškoj ozljedi brzim rastezanjem, netretiranih (C, E) ili kojima je primijenjen medij s PABS-SWCNTs (D, F), učinjenih u području maksimalne ozljede (C, D) ili okolnom području (E, F). Zelenim fluorescentnim bojanjem označene su stanice imunoreaktivne na GFAP uz kontraobojanje jezgri plavom DAPI bojom. Linija skale: 50  $\mu\text{m}$ . (G) Histogram prikazuje promjene intenziteta GFAP fluorescencije u astrocita kontrolne skupine (CTRL) te ozlijeđenih stanica, netretiranih (sTBI) ili kojima su primijenjene PABS-SWCNTs-a (sTBI+CNTs). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. Mjerenja su učinjena na uzorcima iz 2 odvojena pokusa, s ukupno 4 analizirane membrane po skupini (N =4).

## 4.2. PABS-SWCNTs ne utječu na preživljenje astrocита nakon teške ozljede brzim rastezanjem

Za određivanja stupnja ozljede astrocита, korišten je *in vitro* model teške ozljede brzim rastezanjem astrocита izoliranih iz korteksa mozga novookoćenih miševa C57BL/6 soja. Preživljenje, tj. razina ozljede *in vitro* astrocита nakon teške traume, odnosno 1 h nakon dodavanja PABS-SWCNTs, određena je mjerenjem aktivnosti unutarstaničnog enzima LDH. Enzim LDH se otpušta iz citoplazme u izvanstanični prostor kao odgovor na ozljedu stanica. Zbog svoje stabilnosti, mjerenjem količine otpuštenog enzima LDH omogućuje se brza i pouzdana kvantifikacija preživljenja stanica u kulturi.

Aktivnost LDH mjerena je u različitim vremenskim točkama nakon ozljede astrocита (15 min, 1 h, 3 h, 6 h i 24 h) s namjerom da se istraži utječu li PABS-SWCNTs na preživljenje ove vrste stanica (Slika 4.). PABS-SWCNTs su u kulturu stanica dodane nakon drugog mjerenja (1 h), stoga su za prve dvije vremenske točke, 15 min i 1 h, vrijednosti zabilježene za eksperimentalne grupe sTBI i sTBI+CNTs ujedno i služile kao provjera da se razina ozljede u sTBI grupi nije razlikovala u odnosu na sTBI+CNTs grupu. U svim istraživanim vremenskim točkama zabilježen je statistički značajan učinak ozljede na aktivnost LDH u kulturama astrocита, odnosno 15 min [ $F(2;6) = 27,557$ ;  $P < 0,001$ ], 1 h [ $F(2;6) = 7,262$ ;  $P = 0,025$ ], 3 h [ $F(2;6) = 96,132$ ;  $P < 0,001$ ], 6 h [ $F(2;6) = 14,538$ ;  $P = 0,005$ ] i 24 h [ $F(2;6) = 6,546$ ;  $P = 0,031$ ] nakon *in vitro* TBI. *Post-hoc* analizom utvrđeno je da je razina LDH aktivnosti bila značajno veća u mediju za kulturu stanica uzorkovanom u jažicama s ozlijeđenim astrocitima, i to netretiranima, ali i tretiranima s PABS-CNTs. Također, primjena nanocjevčica nije utjecala na aktivnost LDH u odnosu na razine zabilježene u sTBI grupi niti u jednoj ispitivanoj vremenskoj točki.



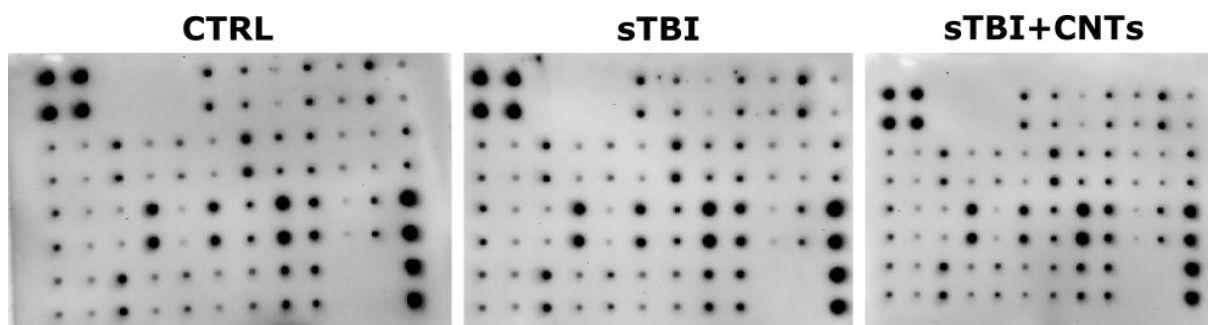
**Slika 4. PABS-SWCNTs ne utječu na preživljenje astrocита nakon teške ozljede brzim rastezanjem *in vitro*.** Histogram prikazuje promjene aktivnosti laktatne dehidrogenaze (LDH) u različitim vremenskim točkama (15 min, 1 h, 3 h, 6 h i 24 h) nakon teške *in vitro* traumatske ozljede (sTBI) te nakon dodavanja PABS-SWCNTs (sTBI+CNTs). PABS-SWCNTs su aplicirane 1 h nakon ozljede, odnosno poslije uzimanja uzorka za mjerenje LDH aktivnosti u toj vremenskoj točki. Na histogramu su vrijednosti prikazane kao udio (%) aktivnosti LDH stanica kontrolne skupine (CTRL). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. Mjerenja LDH aktivnosti su učinjena u duplikatima, a prikazani su rezultati analiza učinjenih u 3 odvojena biološka replikata. \* $P < 0,05$ ; statistički značajno različito od CTRL skupine.

### 4.3. PABS-SWCNTs utječu na otpuštanje citokina iz astrocита, nakon teške ozljede brzim rastezanjem

U svrhu praćenja utjecaja PABS-SWCNTs na otpuštanje citokina iz teško ozlijeđenih astrocита korištena je mikročip analiza. U ovoj su analizi korištene membrane kojima je bilo moguće detektirati promjene razina brojnih citokina od interesa. U ovom eksperimentu analizirane su razine određenih odabranih citokina koji su prikazani u tablici 1. Uzorci medija uzeti su 24 h nakon ozljede astrocита, iz tri različita pokusa, odnosno biološka replikata te su učinjene kvantitativne analize razina citokina otpuštenih u medij za kulturu stanica (Slika 5.).

ANOVA testom su analizirane razlike u razini citokina između svih eksperimentalnih grupa, a zatim je korišten Duncan test za *post-hoc* analizu razlika između pojedinih grupa. Detektirana je statistički značajna razlika u otpuštanju citokina Eotaksina-1 [ $F(2, 6) = 6,223; P = 0,034$ ], RANTES-a [ $F(2, 6) = 34,103; P < 0,001$ ] i SDF-1 alfa [ $F(2, 6) = 5,293, P = 0,047$ ]. *Post-hoc* analiza je za citokin Eotaksin-1 ukazala na značajno nižu razinu ovog citokina detektiranu u uzorcima medija ozlijeđenih stanica, i to netretiranih kao i onih kojima su dodane PABS-CNTs (Slika 6.). Ozlijeđeni astrociti tretirani s PABS-CNTs otpustili su znatno veću količinu RANTES-a u odnosu na neozlijeđene astrocitate, ali i u odnosu na ozlijeđene, netretirane stanice (Slika 7.). Razine SDF-1 alfa izmjerene u obje grupe ozlijeđenih stanica bila je značajno viša u usporedbi s razinom ovog citokina otpuštenog od strane neozlijeđenih stanica (Slika 8.).

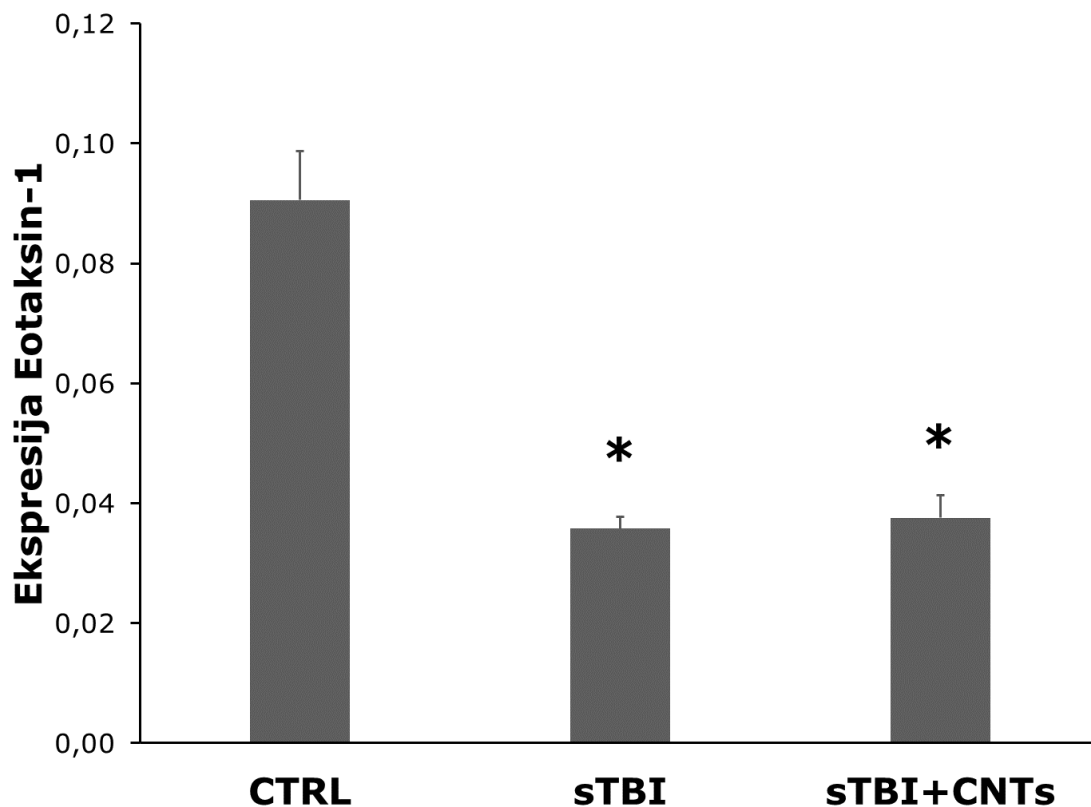
Rezultati analiza razina ostalih citokina od interesa prikazani su u Tablici 1. i na slikama 8., 9. i 10. Detektirane su i određene razlike u koncentracijama otpuštenog citokina MIP-1 $\gamma$  [ $F(2, 6) = 4,656 P = 0,060$ ] i BLC-a [ $F(2, 6) = 3.576 P = 0,095$ ], no razlike između eksperimentalnih grupa nisu bile statistički značajne (Slika 10.).



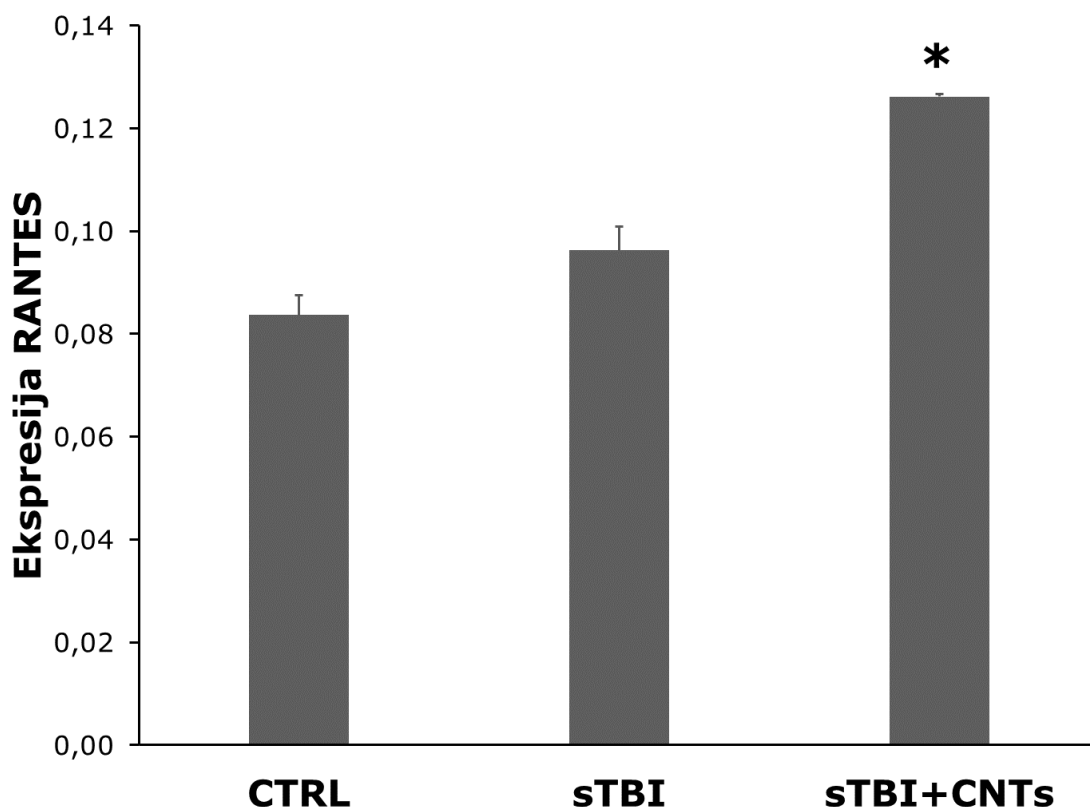
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	C
1	Positive control	Positive control	Negative control	Negative control	Blank	BLC	CD30 ligand	Eotaxin -1	Eotaxin -2	Fas Ligand	Fractal kine	G-CSF
2	GM-CSF	INF- $\gamma$	IL-1 alpha	IL-1 beta	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-9	IL-10	IL-12 p40/p70	IL-12 p70
3	IL-13	IL-17A	I-TAC	KC	Leptin	LIX	XCL1	MCP-1	M-CSF	MIG	MIP-1 $\alpha$	MIP-1 $\gamma$
4	RANTES	SDF-1 $\alpha$	I-309	TECK	TIMP-1	TIMP-2	TNF- $\alpha$	TNFR I	TNFR II	Blank	Blank	Positive control
5												
6												
7												
8												

**Slika 5. Reprezentativne membrane mikročip analize citokina otpuštenih iz astrocita kontrolne skupine (CTRL) i stanica podvrgnutih teškoj ozljedi rastezanjem, netretiranih (sTBI) ili tretiranih s PABS-CNTs (sTBI+ CNTs).** U gornjem su panelu prikazane membrane, a u donjem tablica s popisom citokina analiziranih pomoću RayBiotech kita.

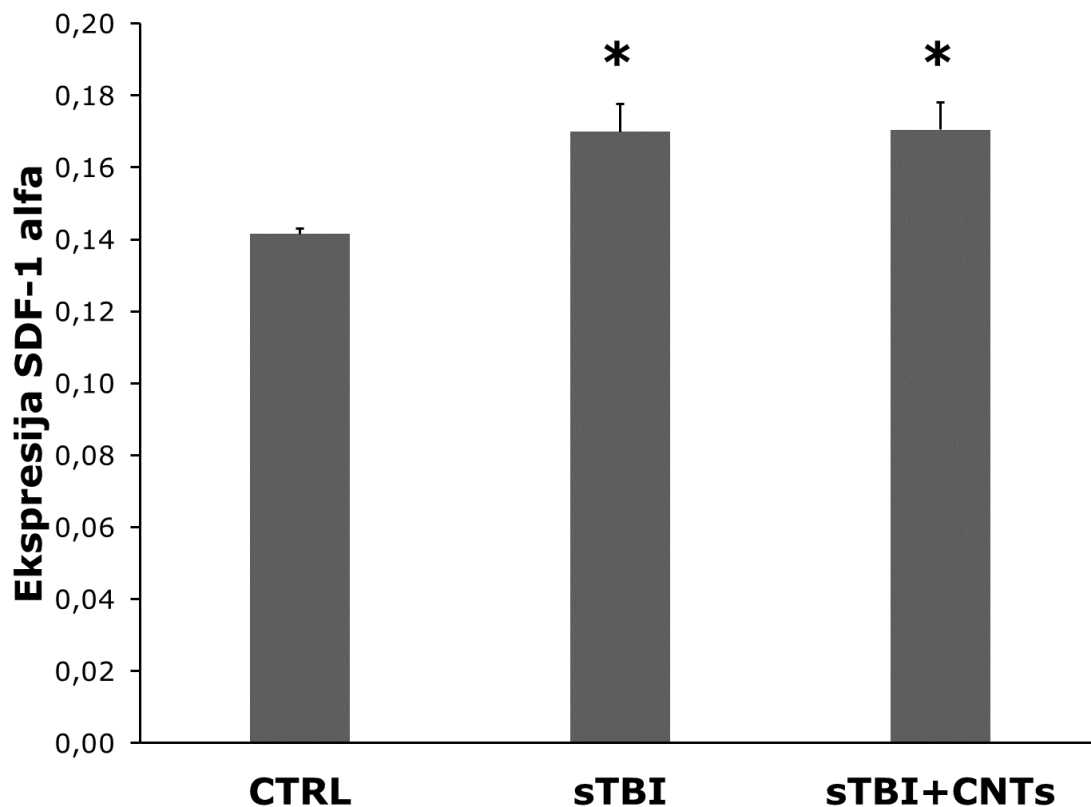




**Slika 6. Otpuštanje Eotaksina-1 smanjeno je u astrocitu podvrgnutih teškoj ozljedi brzim rastezanjem.** Histogram prikazuje koncentraciju Eotaksina-1 u mediju za kulturu stanica otpuštenim od astrocitu kontrolne skupine (CTRL) te ozlijeđenih stanica, netretiranih (sTBI) ili kojima su primijenjene PABS-SWCNTs-a (sTBI+CNTs). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. Mjerenja razine Eotaksina-1 su učinjena u uzorcima iz 3 odvojena pokusa. \* $P < 0,05$ ; statistički značajno različito od CTRL skupine.



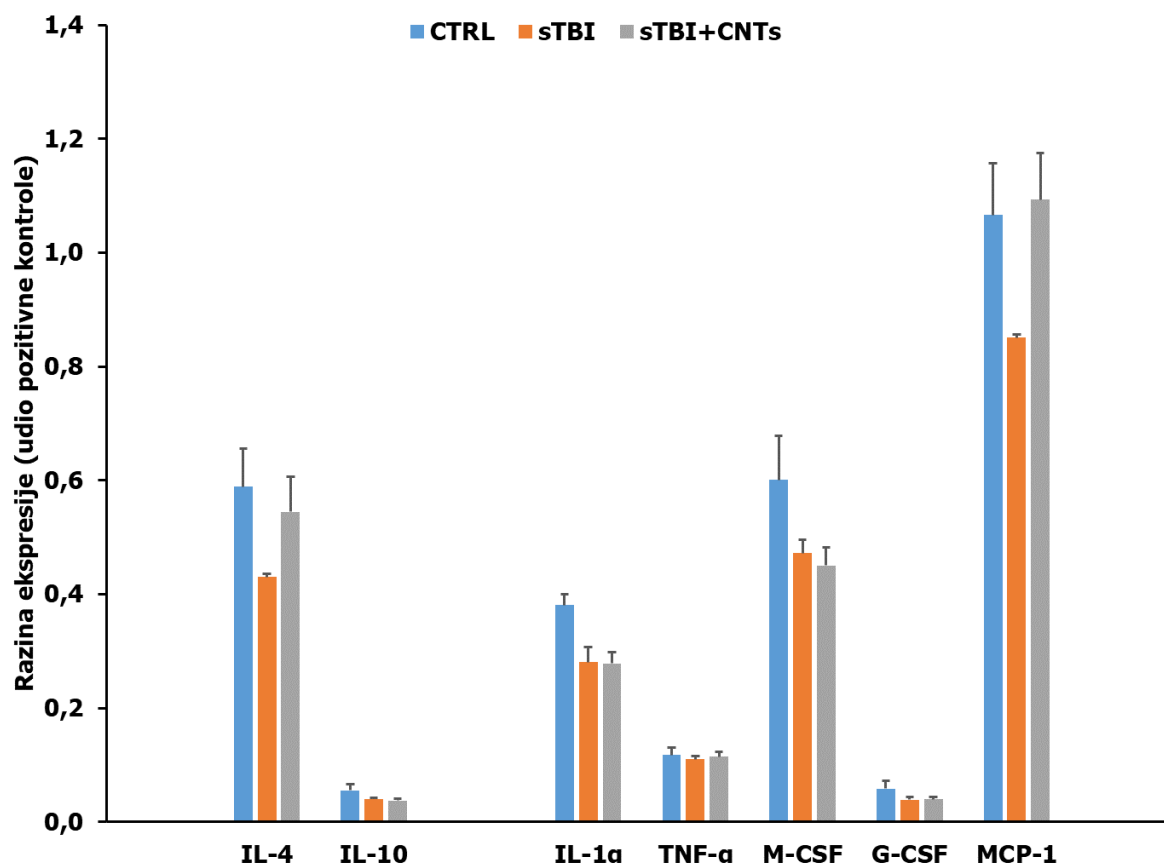
**Slika 7. Primjenom PABS-SWCNTs povećava se razina RANTES otpuštenog iz astrocita podvrgnutih teškoj ozljedi brzim rastezanjem.** Histogram prikazuje razine RANTES-a određene u mediju za kulturu stanica otpuštenom iz astrocita kontrolne skupine (CTRL) te ozlijeđenih stanica, netretiranih (sTBI) ili kojima su primijenjene PABS-SWCNTs-a (sTBI+CNTs). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. Mjerenja razine RANTES-a su učinjena u uzorcima iz 3 odvojena pokusa. \* $P < 0,05$ ; statistički značajno različito od CTRL i sTBI skupina.



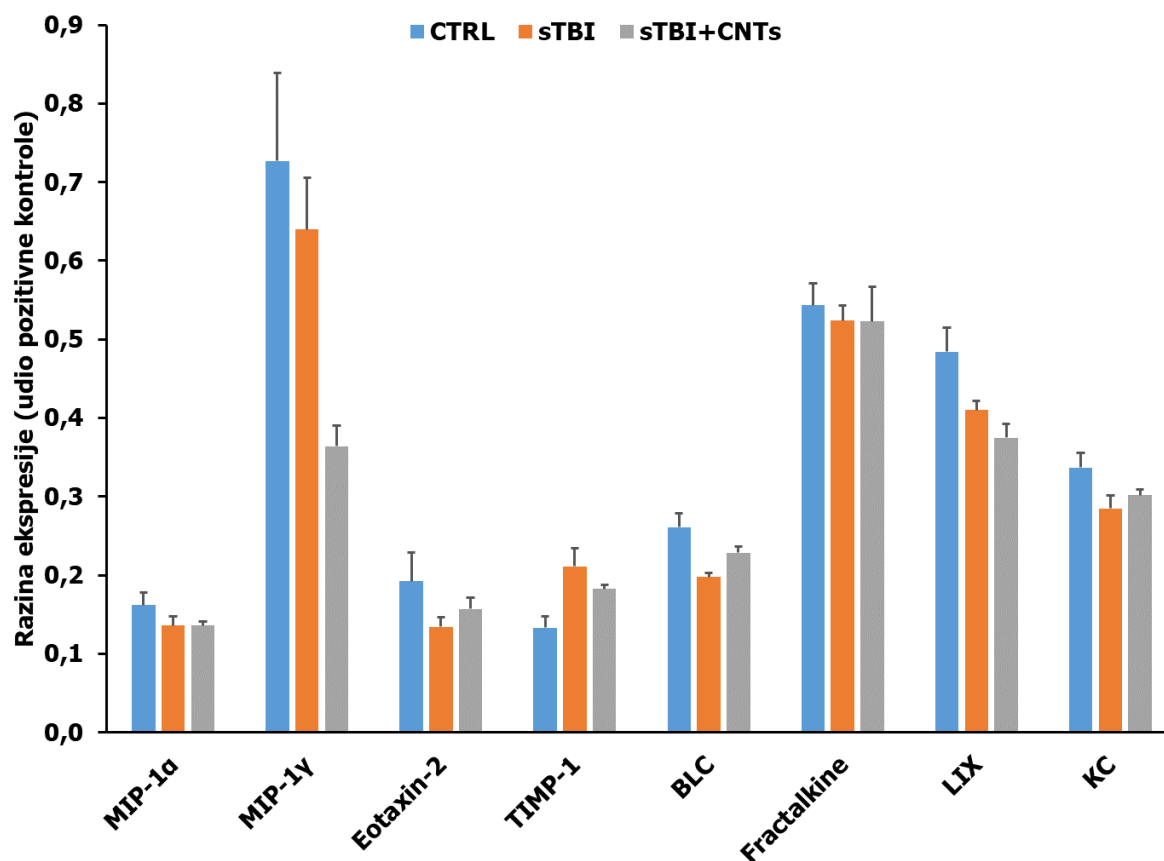
**Slika 8. Otpuštanje kemokina SDF-1 alfa povećano je u astrocitu podvrgnutih teškoj ozljedi brzim rastezanjem.** Histogram prikazuje razine SDF-1 alfa detektirane u mediju za kulturu stanica otpuštenom od astrocitu kontrolne skupine (CTRL) te ozlijeđenih stanica, netretiranih (sTBI) ili kojima su primijenjene PABS-SWCNTs-a (sTBI+CNTs). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. Mjerenja razine SDF-1 alfa su učinjena u uzorcima iz 3 odvojena pokusa. \* $P < 0,05$ ; statistički značajno različito od CTRL skupine.

**Tablica 1.** Popis citokina i kemokina analiziranih na RayBiotech membranama, podjela prema najrelevantnijim ulogama i rezultati statističke analize (ANOVA test).

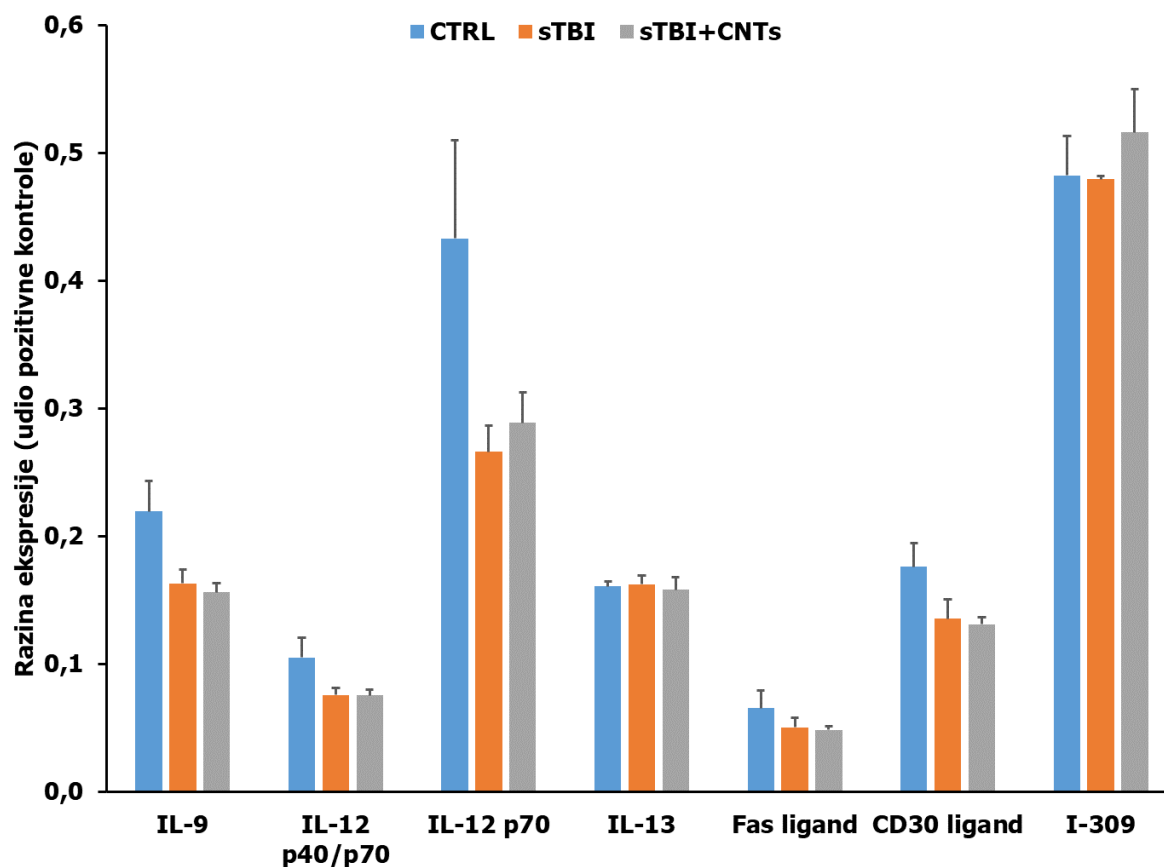
	Kratica	Puni naziv	ANOVA
<b>Antiinflamatorni medijatori astrocita</b>	IL-4	Interleukin-4	$F(2;6) = 1,930; P = 0,225$
	IL-10	Interleukin-10	$F(2;6) = 1,270; P = 0,347$
<b>Proinflamatorni medijatori astrocita</b>	IL-1 $\alpha$	Interleukin-1 alfa	$F(2;6) = 2,593; P = 0,154$
	TNF- $\alpha$	Faktor nekroze tumora alfa	$F(2;6) = 0,108; P = 0,899$
	M-CSF	Markofagni čimbenik rasta kolonija	$F(2;6) = 1,673; P = 0,265$
	G-CSF	Granulocitni čimbenik rasta kolonija	$F(2;6) = 1,031; P = 0,412$
	MCP-1	Monocitni kemoatraktantni protein 1	$F(2;6) = 2,968; P = 0,127$
<b>KEMOKINI</b>			
<b>CC: privlače T stanice, granulocite i monocite</b>	MIP-1	Makrofag upalni protein 1 alfa	$F(2;6) = 1,028; P = 0,413$
	MIP-1 $\gamma$	Makrofag upalni protein 1 gama	$F(2;6) = 4,656; P = 0,060$
	Eotaxin-1	Eozinofilni kemoprivlačni protein 1	$F(2;6) = 6,223; P = 0,034$
	Eotaxin-2	Eozinofilni kemoprivlačni protein 2	$F(2;6) = 1,352; P = 0,328$
	RANTES	Reguliran aktiviranjem, eksprimiran i izlučen od normalnih T stanica	$F(2;6) = 34,103; P < 0,001$
	SDF-1 $\alpha$	Čimbenik 1 stromalnih stanica	$F(2;6) = 5,293; P = 0,047$
	TIMP-1	Inhibitor metaloproteinaze 1	$F(2;6) = 2,967; P = 0,127$
<b>CXC: privlače B limfocite i monocite</b>	BLC	Kemoprivlačni protein B limfocita	$F(2;6) = 3,578; P = 0,095$
	Fractalkine	Kemokini ligand 1	$F(2;6) = 0,109; P = 0,899$
	LIX	Kemokin 5	$F(2;6) = 2,942; P = 0,129$
	KC	Keratinocitni citokin	$F(2;6) = 1,513; P = 0,294$
<b>OSTALI CITOKINI</b>			
	IL-9	Interleukin-9	$F(2;6) = 2,031; P = 0,212$
	IL-12 p40/p70	Interleukin-12 p40/p70	$F(2;6) = 1,798; P = 0,245$
	IL-12 p70	Interleukin-12 p70	$F(2;6) = 1,850; P = 0,237$
	IL-13	Interleukin-13	$F(2;6) = 0,091; P = 0,914$
	Fas Ligand	Transmembranski protein obitelji TNF	$F(2;6) = 0,706; P = 0,531$
	CD30 ligand	Membranski protein obitelji TNF	$F(2;6) = 1,647; P = 0,269$
	I-309	Ljudski kemoprivlačni protein	$F(2;6) = 0,568; P = 0,594$



**Slika 9. Utjecaj primjene PABS-SWCNTs na razine određenih antiinflamatornih (IL-4, IL-10) i proinflamatornih (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , M-CSF, G-CSF, MCP-1) medijatora astrocita otpuštenih nakon teške ozljede brzim rastezanjem.** Histogram prikazuje razine medijatora otpuštenih u medij za kulturu stanica iz astrocita kontrolne skupine (CTRL) te ozlijeđenih stanica, netretiranih (sTBI) ili kojima su primijenjene PABS-SWCNTs-a (sTBI+CNTs). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. Mjerenja su učinjena na uzorcima iz 3 odvojena pokusa.



**Slika 10. Utjecaj primjene PABS-SWCNTs na razine određenih kemokina (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\gamma$ , Eotaxin-2, TIMP-1, BLC, Fractalkine, LIX, KC) otpuštenih iz astrocita nakon teške ozljede brzim rastezanjem.** Histogram prikazuje razine medijatora otpuštenih u medij za kulturu stanica iz astrocita kontrolne skupine (CTRL) te ozlijeđenih stanica, netretiranih (sTBI) ili kojima su primijenjene PABS-SWCNTs (sTBI+CNTs). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. Mjerenja su učinjena na uzorcima iz 3 odvojena pokusa.



**Slika 11. Utjecaj primjene PABS-SWCNTs na razine određenih citokina (IL-9, IL-12 p40/p70, IL-12 70, IL-13, Fas ligand, CD30 ligand, I-309) otpuštenih iz astrocita nakon teške ozljede brzim rastezanjem.** Histogram prikazuje razine medijatora otpuštenih u medij za kulturu stanica iz astrocita kontrolne skupine (CTRL) te ozlijeđenih stanica, netretiranih (sTBI) ili kojima su primijenjene PABS-SWCNTs (sTBI+CNTs). Stupci predstavljaju srednje vrijednosti  $\pm$  SEM. Mjerenja su učinjena na uzorcima iz 3 odvojena pokusa.

## 5. Rasprava

U ovom radu praćena je razina ekspresije GFAP-a, preživljenje astrocита i otpuštanje citokina nakon teške traumatske ozljede astrocита. Teška je TBI simulirana modelom ozljede stanićnih kultura astrocита ozljedom brzim rastezanjem. Navedena ozljeda potiče brojne procese poput poticanja upalnog odgovora s proizvodnjom protuupalnih citokina i kemokina koji posljedićno narušavaju integritet BBB i time otežavaju oporavak i regeneraciju astrocита ključnih za održavanje funkcije CNS-a. Brojne studije provedene na astrocitima, ali i ostalim glijalnim stanicama, ističu utjecaj CNTs na poticanje oporavka stanica CNS-a nakon teške traume (30,33). Obzirom na slabu topljivost i biokompatibilnost CNTs u vodenim otopinama, u ovome su radu korištene kemijski funkcionalizirane PABS-SWCNTs koje su dodavane u kulture stanica astrocита sat vremena nakon teške ozljede. Osim poticanja preživljenja, primjena PABS-SWCNTs je u dosad provedenim studijama povezana i s poticanjem rasta neurona te smo vođeni ovom pretpostavkom istražili učinke PABS-SWCNTs na preživljenje, morfologiju i molekularni profil sektretoma *in vitro* astrocита izoliranih iz korteksa eksperimentalnih miševa.

### 5.1. PABS-SWCNTs nemaju znaćajan učinak na ekspresiju GFAP u astrocitima izloženim teškoj ozljedi brzim rastezanjem

Ekspresija GFAP-a jedan je od najpouzdanijih markera aktivacije astrocита nakon ozljede CNS-a (38). Naime, prethodne studije u kojima je istraživan utjecaj SWCNTs na morfologiju i funkciju astrocита, otkriveno je da SWCNTs imaju potencijal u modeliranju svojstava astrocита, tako što ih ćini većima i zvjezdastijima te također povećavajući aktivnost GFAP-a (32). U ovome istraživanju pratili smo utjecaj PABS-SWCNTs na ekspresiju GFAP-a u ozljeđenim astrocitima. Rezultati istaživanja pokazali su da se ozljeđeni astrociti po obliku razlikuju od neozljeđenih stanica, no ekspresija



GFAP-a se ne razlikuje značajno između eksperimentalnih grupa. Morfološka analiza nije učinjena, stoga detaljna obrada morfoloških promjena postaje mogućim predmetom budućih istraživanjima.

## 5.2. PABS-SWCNTs ne utječu na preživljenje astrocita izloženih teškoj *in vitro* TBI

Sljedeći cilj istraživanja bio je utvrditi utječu li PABS-SWCNTs na preživljenje astrocita *in vitro* nakon pretrpjele ozljede brzim rastezanjem. Rezultati istraživanja pokazali su da PABS-SWCNTs ne potiču bolje preživljenje, ali istovremeno ne djeluju ni toksično na stanice u kulturi. Naime, u 24-satnom praćenju otpuštanja enzima LDH iz prethodno ozlijeđenih astrocita *in vitro*, u odnosu na kontrolnu staničnu kulturu aktivnost enzima LDH je bila povećana u staničnim kulturama koje su pretrpjele tešku ozljedu te u staničnim kulturama kojima su sat vremena od ozljede dodane PABS-SWCNTs. Eksperiment je proveden u triplikatima, svaki put s novom serijom stanične kulture astrocita, no sve tri su potvrdile povećanje aktivnosti enzima LDH nakon traume i nakon traume s dodanim PABS-SWCNTs. Sukladno navedenim rezultatima zaključujemo da PABS-SWCNTs ne utječu na bolje preživljenje *in vitro* astrocita. Jedno od mogućih objašnjenja može biti slično kao u studiji provedenoj SWCNTs u kojoj se polietilen glikol (engl. *polyethylene glycol*, PEG) koristio za sintezu PEG-SWCNTs, a u kojima kemijski funkcionalizirani dio SWCNTs pokazao štetan za *in vitro* astrocite (39). U navedenoj studiji je dodavanje PEG-SWCNTs u kulturu astrocita vodilo ka povećanju stanične smrti stanica, dok je u našem istraživanju preživljenje stanica, nakon ozljede i nakon dodavanja PABS-SWCNTs u prethodno ozlijeđene stanice, bilo slično. Dobiveni rezultati potvrđuju da PABS-SWCNTs nisu toksične za primarne stanice astrocita u kulturi, iako ne promiču bolje preživljenje istih nakon ozljede. Također je dobiveni rezultat potrebno kritički prihvatiti jer je povećanje ili smanjenje smrti stanica potrebno pratiti u periodu dužem od 24 sata. Naime, prethodne su studije pokazale citotoksičnost različito kemijski funkcionaliziranih SWCNTs nakon 48 sati do 4 dana.

Stoga je u svrhu otkrivanja djelovanja SWCNTs na *in vitro* astrocite nakon ozljede potrebno provesti još studija citotoksičnosti prije potencijalnog prelaska na *in vivo* modele (39,40).

### 5.3. Ozljeda astrocita brzim rastezanjem i primjena PABS-SWCNTs utječu na otpuštanje određenih citokina

Astrociti mogu sudjelovati u imunološkim i upalnim odgovorima CNS-a. Općenito je upalni odgovor obrambeni mehanizam usmjeren na zaštitu mozga od infekcije ili ozljede, no neuroinflamacija je uključena u brojne patogeneze nakon ozljede mozga (41). Aktivirani astrociti su važan regulator upale mozga jer kao odgovor na podražaje i ozljede otpuštaju široki spektar upalnih medijatora poput proinflammatoryh i antiinflammatoryh citokina i kemokine koji za posljedicu imaju neuroprotektivne ili neurotoksične učinke na mozak (41). Citokini su signalni proteini koje otpuštaju stanice, a imaju važnu ulogu u upalnom odgovoru, apoptozi, angiogenezi, rastu i diferencijaciji stanica (42).

U ovom istraživanju, praćeno je otpuštanje citokina iz astrocita *in vitro* nakon ozljede i dodatka PABS-SWCNTs.

Citokin Eotaksin-1, odnosno eozinofilni kemoprivlačni protein, pripada u skupinu CC kemokina koji se vežu na CCR3 receptore, a izraženi su na bazofilima, mastocitima i T limfocitima te na taj način potiču stećeni imunološki odgovor (43). Povišene razine Eotaksina-1 u prijašnjim su studijama praćene starenjem, neurogenom i neurodegeneracijom (44). U ovom je istraživanju detektirana statistički značajna razlika u koncentracijama Eotaksina-1 između uzoraka kontrolnih stanica i astrocita koji su pretrpjeli tešku ozljedu brzim rastezanjem te između kontrole i astrocita kojima su nakon ozljede dodane PABS-SWCNTs. U studijama se Eotaksin-1 spominje u kontekstu poticanja smrti neuralnih stanica jer sudjeluje u otpuštanju reaktivnih kisikovih spojeva (43,45). Također se spominje pojaćano otpuštanje navedenog citokina tijekom reaktivne astrocitoze koje promiće ulazak eozinofila i uzrokuje oštećenja neuralnog

tkiva na mjestima ozljede (45). U prethodnim se studijama povećana koncentracija otpuštenog Eotaksina-1 povezivala s ozljedom CNS-a, no u provedenom istraživanju ne postoji razlika u otpuštanju između ozlijeđenih astrocita sa i bez PABS-SWCNTs. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se dodatkom PABS-SWCNTs ne mijenja koncentracija oslobođenog citokina za kojeg se smatra da sudjeluje u patogenezi TBI.

Reaktivni astrociti su glavni izvor kemoatraktanata za T limfocite u stečenom imunološkom odgovoru. Jedan od najpoznatijih je RANTES koji se oslobađa nakon TBI (42). U prethodnim je studijama na životinjskim modelima dokazano povećano otpuštanje RANTES-a u korteksu nakon TBI te u krvi pacijenata, a povećana koncentracija RANTES-a je korelirala s lošijim ishodom (46). Rezultati ovog istraživanja ukazuju da primjena PABS-SWCNT značajno utjecala na povećanje koncentracije otpuštenog RANTES-a iz ozlijeđenih astrocita. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se dodatkom PABS-SWCNTs povećava koncentracija oslobođenog citokina za kojeg se smatra da sudjeluje u patogenezi TBI tako što pobuđuje jak imunološki odgovor regrutacijom T stanica i monocita (46).

Citokin SDF-1 alfa poznati je kemoatraktant T i B limfocita, kojega tijekom upalnog odgovora proizvode astrociti (42). U brojnim je studijama dokazano da aktivacijom SDF-1 alfa započinje kaskada aktivacije ostalih proinflamatornih citokina koji potiču apoptozu primarnih astrocita (42,47). Također, aktivacija ovog citokina nakon TBI indirektno potiče otpuštanje glutamata iz aktiviranih astrocita te time započinje proces ekscitotoksičnosti. Autokrinim signalima također može stimulirati proliferaciju astrocita, te proizvodnju drugih kemokina i citokina poput proinflamatornog citokina TNF- $\alpha$  (47). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da PABS-SWCNTs ne djeluje na otpuštanje SDF-1 alfa citokina iz astrocita nakon teške ozljede brzim rastezanjem.

Također je važno napomenuti da su u ovom istraživanju detektirane određene razlike u koncentracijama citokina BLC i MIP-1 $\gamma$  između grupa, a

koje nisu bile statistički značajne. Citokin BLC je kemoprivlačni protein B limfocita koji se pojačano izlučuje iz astrocita nakon TBI. U ovom istraživanju je pokazano smanjeno otpuštanje BLC nakon traume, a primjenom je PABS-SWCNTs dodatno smanjena razina istraživnog citokina, no rezultati nisu bili statistički značajni. Rezultati su pokazali da se razina otpuštenog citokina MCP-1 $\gamma$ , upalnog makrofagnog proteina 1 $\gamma$ , smanjila nakon ozljeđivanja te dodatno nakon dodavanja PABS-SWCNTs. Navedeni se citokin u do danas provedenim studijama ne spominje u kontekstu istraživanja astrocita (46) .

## 6. Zaključak

U ovoj smo studiji istraživali utjecaj PABS-SWCNTs na astrocite *in vitro*, nakon teške ozljede brzim istezanjem. Iz rezultata istraživanja dobili smo nekoliko zaključaka:

1. PABS-SWCNTs nemaju značajan učinak na ekspresiju GFAP-a u astrocitima izloženim teškoj ozljedi brzim istezanjem, no utječu na promjenu oblika astrocita, koji poprimaju zvjezdastu strukturu, ali je potrebno provesti morfološku analizu s ciljem utvrđivanja značajnosti ovih promjena,
2. PABS-SWCNTs ne utječu na bolje preživljenje astrocita izloženih teškoj ozljedi brzim istezanjem, no nemaju ni citotoksičan učinak na stanice u kulturi tijekom prvih 24 h nakon ozljede,
3. PABS-SWCNTs utječu na otpuštanje RANTES-a, za kojeg se smatra da sudjeluje u patogenezi TBI, iz ozlijeđenih astrocita *in vitro*, koncentracija oslobođenih citokina Eotaksina-1 i SDF-1 $\alpha$  mijenja se nakon ozljede, no približno je jednaka u ozlijeđenih astrocita sa i bez primjene PABS-SWCNTs.

Rezultati ovog rada ukazuju da PABS-SWCNTs uzrokuju određene morfološke i funkcionalne promjene astrocita podvrgnutih *in vitro* TBI koje je potrebno dodatno istražiti kako bi se otkrio mogući potencijal primjene ovog nanomaterijala u traumi CNS-a.

## 6. Literatura

- 1 Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol* 2016; **173**: 692–702.
- 2 Mlinari A. Biokemijski biljezi traumatske ozljede mozga. *Zb sveučilišta Lib* 2019; **4**: 155–166.
- 3 Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 2013; **14**: 128–142.
- 4 Tudor M. *Neuroprotektivni učinak egzogenog pentadekapeptida BPC 157 pri eksperimentalnoj kranocerebralnoj ozljedi.* 2010.
- 5 DUBROJA I. Neurorehabilitacija nakon traumatske ozljede mozga s posebnim osvrtom na vegetativno stanje. *Medicus* 2019; **28**: 105–114.
- 6 Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir. (Wien).* 2006; **148**: 255–267.
- 7 Marklund N, Hillered L. Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: Where do we go from here? *Br. J. Pharmacol.* 2011; **164**: 1207–1229.
- 8 Peeters W, van den Brande R, Polinder S, Brazinova A, Steyerberg EW, Lingsma HF *et al.* Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir (Wien)* 2015; **157**: 1683–1696.
- 9 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 Commun. Signal.* 2020; **18**: 1–16.

- 10 Galgano M, Toshkezi G, Qiu X, Russell T, Chin L, Zhao LR. Traumatic brain injury: Current treatment strategies and future endeavors. *Cell Transplant*. 2017; **26**: 1118–1130.
- 11 Centers for Disease Control and Prevention. Traumatic brain injury in the United States: Fact sheet. 2014.
- 12 Brazinova A, Rehorcikova V, Taylor MS, Buckova V, Majdan M, Psota M *et al*. Epidemiology of Traumatic Brain Injury in Europe: A Living Systematic Review. *J Neurotrauma* 2018; **33**: 1–30.
- 13 Faul M, Coronado V. Epidemiology of traumatic brain injury. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V., 2015, pp 3–13.
- 14 Namjoshi DR, Good C, Cheng WH, Panenka W, Richards D, Cripton PA *et al*. Towards clinical management of traumatic brain injury: A review of models and mechanisms from a biomechanical perspective. *DMM Dis. Model. Mech*. 2013; **6**: 1325–1338.
- 15 Gottlieb S. Head injury doubles the risk of Alzheimer’s disease. *BMJ Br Med J* 2000; **321**: 1100.
- 16 Pitkänen A, Kyyriäinen J, Andrade P, Pasanen L, Nnode-Ekane XE. Epilepsy After Traumatic Brain Injury. In: *Models of Seizures and Epilepsy: Second Edition*. Elsevier Inc., 2017, pp 661–681.
- 17 Ahmed S, Venigalla H, Mekala HM, Dar S, Hassan M, Ayub S. Traumatic brain injury and neuropsychiatric complications. *Indian J. Psychol. Med*. 2017; **39**: 114–121.
- 18 Roozenbeek B, Maas AIR, Menon DK. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* 2013; **9**: 231–236.
- 19 Namjoshi DR, Good C, Cheng WH, Panenka W, Richards D, Cripton PA *et al*. Towards clinical management of traumatic brain injury: A review of models and mechanisms from a biomechanical perspective.

- DMM Dis. Model. Mech. 2013; **6**: 1325–1338.
- 20 Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew M V. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 2016; **275**: 305–315.
  - 21 O'Connor WT, Smyth A, Gilchrist MD. Animal models of traumatic brain injury: A critical evaluation. *Pharmacol. Ther.* 2011; **130**: 106–113.
  - 22 Myer DJ, Gurkoff GG, Lee SM, Hovda DA, Sofroniew M V, Sofroniew M V. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* 2006; **129**: 2761–2772.
  - 23 Smith DH, Meaney DF. Axonal Damage in Traumatic Brain Injury. *Neurosci* 2000; **6**: 483–495.
  - 24 Veenith T, Goon SS, Burnstein RM. Molecular mechanisms of traumatic brain injury: the missing link in management. *World J Emerg Surg* 2009; **4**: 7.
  - 25 Ng SY, Lee AYW. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Front. Cell. Neurosci.* 2019; **13**: 528.
  - 26 Krishnamurthy K, Laskowitz DT. Cellular and molecular mechanisms of secondary neuronal injury following traumatic brain injury. In: *Translational Research in Traumatic Brain Injury*. CRC Press. 2016; pp 97–126.
  - 27 Kochanek PM, Jackson TC, Ferguson NM, Carlson SW, Simon DW, Brockman EC *et al.* Emerging therapies in traumatic brain injury. *Semin Neurol* 2015; **35**: 83–100.
  - 28 Xiong Y, Zhang Y, Mahmood A, Chopp M. Investigational agents for treatment of traumatic brain injury. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2015; **24**: 743–760.
  - 29 Fabbro A, Prato M, Ballerini L. Carbon nanotubes in



- neuroregeneration and repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013; **65**: 2034–2044.
- 30 Gottipati MK, Verkhatsky A, Parpura V. Probing astroglia with carbon nanotubes: Modulation of form and function. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2014; **369**.
- 31 Vidu R, Rahman M, Mahmoudi M, Enachescu M, Poteca TD, Opris I. Nanostructures: A platform for brain repair and augmentation. *Front. Syst. Neurosci.* 2014; **8**: 91.
- 32 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**: 4742–4747.
- 33 Gottipati MK, Samuelson JJ, Kalinina I, Bekyarova E, Haddon RC, Parpura V. Chemically functionalized single-walled carbon nanotube films modulate the morpho-functional and proliferative characteristics of astrocytes. *Nano Lett* 2013; **13**: 4387–92.
- 34 Sempere L, Rodríguez-Rodríguez A, Boyero L, Egea-Guerrero JJ. Experimental models in traumatic brain injury: From animal models to in vitro assays. *Med Intensiva (English Ed)* 2019; **43**: 362–372.
- 35 Lauret C. An Overview of In-Vivo, In-Vitro, and Finite Element Models Developed to Study Traumatic Brain Injury. 2006.
- 36 Wanner IB. An in vitro trauma model to study rodent and human astrocyte reactivity. *Methods Mol Biol* 2012; **814**: 189–219.
- 37 Bekyarova E, Haddon RC, Parpura V. Biofunctionalization of Carbon Nanotubes. In: *Nanotechnologies for the Life Sciences*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2007 doi:10.1002/9783527610419.ntls0002.
- 38 Zhang S, Wu M, Peng C, Zhao G, Gu R. GFAP expression in injured

- astrocytes in rats. *Exp Ther Med* 2017; **14**: 1905–1908.
- 39 Hopkins S, Gottipati M, Montana V, Bekyarova E, Haddon R, Parpura V. Effects of Chemically-Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes on the Morphology and Vitality of D54MG Human Glioblastoma Cells. *Neuroglia* 2018; **1**: 327–338.
- 40 Min J-O, Kim SY, Shin US, Yoon B-E. Multi-walled carbon nanotubes change morpho-functional and GABA characteristics of mouse cortical astrocytes. *J Nanobiotechnology* 2015; **13**: 92.
- 41 Aloisi F, Silberstein FC, Levi G. Cytokine and Growth Factor Synthesis in Human Astrocytes. In: *Molecular Signaling and Regulation in Glial Cells*. Springer Berlin Heidelberg, 1997, pp 11–19.
- 42 Cekanaviciute E, Buckwalter MS. Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics*. 2016; **13**: 685–701.
- 43 Teixeira AL, Gama CS, Rocha NP, Teixeira MM. Revisiting the role of eotaxin-1/CCL11 in psychiatric disorders. *Front. Psychiatry*. 2018; **9**: 241.
- 44 Laskowitz DT, Wang H, Chen T, Lubkin DT, Cantillana V, Tu TM *et al*. Neuroprotective pentapeptide CN-105 is associated with reduced sterile inflammation and improved functional outcomes in a traumatic brain injury murine model. *Sci Rep* 2017; **7**: 1–16.
- 45 Parajuli B, Horiuchi H, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A. CCL11 enhances excitotoxic neuronal death by producing reactive oxygen species in microglia. *Glia* 2015; **63**: 2274–2284.
- 46 Gyoneva S, Ransohoff RM. Inflammatory reaction after traumatic brain injury: Therapeutic potential of targeting cell-cell communication by chemokines. *Trends Pharmacol. Sci.* 2015; **36**: 471–480.

- 47 Li M, Ransohoff RM. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: A migration from immunology to neurobiology. *Prog. Neurobiol.* 2008; **84**: 116–131.



## Tea Mladenić

**Adresa:** Mladenići 99, Viškovo 51216, Hrvatska

**Kontakt :** +38591 7245 504

### OBRAZOVANJE

---

*2018 - danas*

**Magistra biotehnologije u medicini  
(mag. biotech. in med.)**

Diplomski sveučilišni studij Biotehnologija u medicini, Odjel za biotehnologiju, Sveučilišta u Rijeci, Hrvatska

Težinski prosjek ocjena: 4,619

---

*2015 - 2018*

**Sveučilišni prvostupnik biotehnologije i istraživanja lijekova  
(univ. bacc. biotechn. et pharm. inv.)**

Preddiplomski studij Biotehnologija i istraživanje lijekova, Odjel za biotehnologiju, Sveučilišta u Rijeci, Hrvatska

Težinski prosjek ocjena: 4,172

---

*2011 - 2015*

**Gimnazija Andrije Mohorovičića Rijeka, Hrvatska**

### RADNO ISKUSTVO

---

*02/2020 – danas*

**Student / Volonter na Zavodu za farmakologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Hrvatska**

Izrada eksperimentalnog dijela diplomskog rada čija je tema, "Utjecaj kemijski funkcionaliziranih jednozidnih ugljikovih nanocjevčica na osobitosti astrocita izloženih *in vitro* traumatskoj ozljedi" (engl. "Influence of chemically functionalized single-walled carbon nanotubes on the characteristics of astrocytes exposed to *in vitro* traumatic injury"). Tijekom rada u laboratoriju savladane su tehnike rada s primarnim staničnim kulturama astrocita, analize preživljenja stanica u kulturi te metode imunocitofluorescencije i western blotinga.

---

*11/2019 -03/2019*

**Promotorica za dodatke prehrani u Almagea d.o.o, Zagreb, Hrvatska**

Promocije dodataka prehrani uključivale su dogovaranje promocije u

---

ljekarnama, na tjednoj bazi. U dogovorenom terminu sam u ljekarnama imala promocije proizvoda za podizanje imuniteta, omega-3 te ostalih dodataka prehrani koji su bili u portfelju Almagea d.o.o. Potom sam na mjesečnoj bazi slala izvještaje koji su obuhvaćali količinu prodanih proizvoda i kratki opis promocije. Tijekom rada za Almagea d.o.o., sudjelovala sam na konferenciji za trudnice pod nazivom "Zdrava mama, zdrava beba", na kojoj sam predstavljala Almagea PRENATAL OMEGA3+.

---

04/2016 – danas

**Student Markeeter u Red Bull d.o.o, Zagreb, Hrvatska**

Radila sam u studentskom timu Rijeka te je studentski posao uključivao promocije energetskog pića Red Bull na sportskim eventima studentskim natjecanjima. Također sam aktivno sudjelovala u organizaciji događaja poput Wings for Life-a (2016.,2017.,2018 i 2019. godine) te konferencija, poput Red Bull "Future IO". U opisu studentskog posla je također bio obilazak trgovina i kafića te unaprjeđenje prodaje. Nakon obavljenog posla, tjedan dana unpred isplaniranog, podnosila sam izvještaje putem Red Bull platforme.

---

03/2019 – 07/2019

**Promotorica za dodatke prehrani u JGL d.o.o, Rijeka, Hrvatska**

Promocije dodataka prehrani uključivale su dogovaranje popusta i promocija u ljekarnama, na tjednoj bazi. U dogovorenom terminu sam u ljekarnama imala promocije probiotika, različitih vrsta magnezija i proizvoda protiv žgaravice. Potom sam na mjesečnoj bazi slala izvještaje koji su obuhvaćali količinu prodanih proizvoda i kratki opis promocije.

---

06/2018 - 07/2018

**Student / Volonter JGL d.o.o, Rijeka, Hrvatska**

Studentska praksa na odjelu za istraživanje i preformulaciju pod mentorstvom Vesne Saršon Beltrame. Tijekom prakse sam radila pred formulijska ispitivanja ambalaže, upisivala podatke u Excel tablice i pretraživala literaturu vezanu za komponente pakiranja na PubChem i PubMed.

---

18/01/2019 – 31/01/2019

**Demonstratorica na laboratorijskim vježbama iz kolegija mikrobiologija, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Hrvatska**

Demonstrature i pomoć pri radu studenata u laboratoriju za mikrobiologiju. Laboratorijske vježbe su uključivale pomoć studentima u savladavanju osnovnih tehnika i vještina te osiguravanje sigurnosti pri radu s bakterijskim kulturama, pripremom mikroskopskih preparata savladavanje metoda transformacije bakterija i određivanja osjetljivosti bakterija na antibiotike.

---

**PUBLIKACIJE I RADVI**

Završni rad: „Kromosomopatije u osoba smanjene plodnosti“ (engl. „Chromosomal Aberrations in Persons with Altered Fertility“), mentor: prof. dr.sc. Anđelka Radojčić Badovinac, komentor: doc. dr.sc. Sanja Dević

---

Pavlić, objavljen na Digitalnom akademskom arhivu i repozitoriju, *DABAR*.

---

### **NAGRADE I PRIZNANJA**

Stipendija općine Viškovo za izvrsnost studenata u akademskoj godini 2019./2020.

Stipendija općine Viškovo za izvrsnost srednjoškolaca, tijekom srednjoškolskog obrazovanja od 2011. do 2015.g.

---

### **OSOBNJE VJEŠTINE**

Jezici: **engleski** (razina C1); Irish School of English, IELTS (rezultat 7,0, C1 razina), **talijanski** (razina B1)

Microsoft Office paket: Microsoft Word, Excel, Power Point, Access  
Statističke analize: Statistica

Kemijski programi i softveri: Chimera, PyMOL, Avogadro, Gamess, Marvin Sketch, CHARMM, Gromacs, R studio, Spark, Vina, Modeller

Vozačka dozvola: AM, B

---

### **KONFERENCIJE**

Sudjelovanje: Projekt „Putujući znanstvenici“ 2017-2018,  
Konferencije: „INTERNATIONAL BIOMEDICAL STUDENT CONGRESS“ 2018,  
Festival znanosti 2018 i Dani otvorenih vrata Odjela za biotehnologiju 2018.

---

### **ČLANSTVA**

Udruga studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci (USBRI) 2015-danas, Savjet mladih općine Viškovo 2018-danas i Udruga „Kunpanija z Halubja“ 2015-danas.

---