

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Matija P. Krunić

**Molekularni mehanizmi protektivnog dejstva
grafenskih kvantnih tačaka u *in vitro* modelu
oštećenja neuronskih ćelija oksidativnim stresom**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Matija P. Krunić

**Molecular mechanisms of graphene quantum
dots induced cell protection in the in vitro model
of oxidative stress-mediated neuronal cell damage**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022.

PODACI O ČLANOVIMA KOMISIJE:

Mentor

Dr Vladimir Trajković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Komentor

Dr Biljana Ristić, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Članovi komisije

Dr Sonja Misirlić Denčić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Dr Verica Paunović, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Dr Mihajlo Bošnjak, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Dr Miloš Mojović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju

Dr Silvana Andrić, redovni profesor
Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet

Zahvalnica

Doktorska disertacija "Molekularni mehanizmi protektivnog dejstva grafenskih kvantnih tačaka u in vitro modelu oštećenja neuronskih ćelija oksidativnim stresom" urađena je u laboratorijama Instituta za mikrobiologiju i imunologiju, Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju, Instituta za histologiju i embriologiju "Aleksandar Đ. Kostić", Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" i Fakultetu za Fizičku hemiju, Prirodno matematičkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Eksperimentalno istraživanje realizovano je u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu unutarćelijski balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“, broj III41025 čiji je rukovodilac prof. dr Vladimir Trajković.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Vladimiru Trajkoviću, na velikom razumevanju, ukazanom poverenju, podršci, na svim savetima, predlozima i idejama kojima je usmeravao moj rad, počev od doktorskih studija, tako i tokom izrade doktorske teze. Zahvalan sam profesoru na nesebičnoj, velikoj pomoći, ličnom i profesionalnom zalaganju pri izradi teze. Nadam se da ću u budućnosti biti bar upola dobar naučnik i teniser kao i učitelj;

Veliku zahvalnost dugujem dr Biljani Ristić, mojoj komentorki, koja je nesebično delila veliko znanje i iskustvo sa mnom, na svim prijateljskim savetima, stručnim sugestijama i pomoći, konsultacijama, razgovorima, naročito korisnim savetima tokom pisanja doktorske disertacije. Stigosmo do kraja!

Poštovanim članovima komisije prof. dr Sonji Misirlić Denčić, dr Verici Paunović, dr Mihajlu Bošnjaku, prof. dr Milošu Mojoviću i prof. dr Silvani Andrić, zahvaljujem se na uloženom trudu i pomoći pri oblikovanju konačne verzije disertacije;

Ne mogu a da ne spomenem koliko sam zahvalan svim sjajnim kolegama iz Laboratorije za imunologiju na prijateljstvu, vođenju, nadzoru i pomoći tokom laboratorijskih istraživanja. Zahvaljujem se na ukazanom poverenju, nesebičnoj pomoći, na svim savetima i trudu, na omogućenom eksperimentalnom radu i razmeni mišljenja, vremenu uloženom pri analizi dobijenih rezultata i na lepim zajedničkim trenucima.

U Beogradu, 2022. godine

Mojoj fantastičnoj četvorci

Molekularni mehanizmi protektivnog dejstva grafenskih kvantnih tačaka u *in vitro* modelu oštećenja neuronskih ćelija oksidativnim stresom

Sažetak

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivani su molekularni mehanizmi protektivnog dejstva grafenskih kvantnih tačaka (GKT) u oksidativnom stresu indukovanom natrijum nitroprusidom (engl. *sodium nitroprusside*, SNP) u ćelijama humanog neuroblastoma. Povećane koncentracije reaktivnih kiseoničnih (RKV) i azotnih vrsta (RAV) unutar ćelija indukuju oksidaciju i nitraciju proteina, peroksidaciju lipida i oštećuju molekul DNK, što dovodi do apoptoze ili nekroze ćelija. Nervne ćelije su posebno osetljive na oštećenja uzrokovana oksidativnim stresom usled značajne potrošnje molekulskog kiseonika, visokih koncentracija višestruko nezasićenih masnih kiselina podložnih procesu lipidne peroksidacije i slabih antioksidativnih mehanizama. Visoki nivoi RKV i RAV dovode do oštećenja i smrti neuronskih i glijalnih ćelija, koja je u osnovi patogeneze Parkinsonove bolesti, Alchajmerove bolesti, multiple skleroze i ishemijske bolesti mozga. Usled ograničenja postojeće antioksidativne terapije, noviji pristupi bazirani su na antioksidativnim svojstvima sintetičkih materijala, od kojih se ističu GKT. GKT su ovalne ugljenične dvodimenzionalne nanočestice, koje se karakterišu izrazitom biokompatibilnošću, niskom citotoksičnošću i izraženim antioksidativnim karakteristikama. Uz to, GKT indukuju proces autofagije, koji predstavlja mehanizam razgradnje oštećenih ćelijskih organela i proteina u autolizozomima nastalim spajanjem lizozoma i autofagozoma. Neuronu su veoma osetljivi na poremećaje proteolitičke razgradnje ćelijskog materijala u procesu autofagije, a povećano nakupljanje oštećenih proteina predstavlja osnovu patogeneze brojnih neurodegenerativnih oboljenja. U ovoj doktorskoj disertaciji ispitani su molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi antioksidativnih i proautofagnih karakteristika GKT.

Rezultati istraživanja pokazali su da GKT smanjuju citotoksičnost indukovanu SNP, utičući na smanjenje mitohondrijalne depolarizacije, aktivnosti kaspaze-2 i apoptotske smrti SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma. Iako je tretman GKT smanjivao nivo azot (II) oksida (NO) nakon tretmana SNP, tretman supstancama koje vezuju NO nisu imale značajan uticaj na uočenu protekciju SH-SY5Y ćelija. Pokazano je da neutralizacija NO nije ključan mehanizam u GKT indukovanoj zaštiti ćelija od citotoksičnosti SNP. Tretman GKT smanjivao je nivo hidroksilnog radikala ($\text{OH}\cdot$), superoksidnog radikala ($\text{O}_2\cdot^-$) i lipidne peroksidacije indukovane SNP. Tretmani neselektivnim antioksidantima, kao i supstancama sa sposobnošću vezivanja $\text{OH}\cdot$ i jona gvožđa (Fe^{2+}), ukazali su da GKT štite ćelije neutrališući $\text{OH}\cdot$ nastao u reakciji Fe^{2+} jona oslobođenih iz SNP i vodonik peroksida (H_2O_2). Unutarćelijska lokalizacija GKT neophodna je za zaštitu ćelija od oksidativnog stresa indukovano SNP. Kombinovani tretman GKT i SNP takođe je indukovao autofagiju inhibicijom Akt/PRAS40/mTOR signalnog puta. Indukcija autofagije pokazana je na transkripcionom i post-translacionom nivou. Antioksidativne i proautofagne karakteristike GKT nisu međusobno uslovljene, s obzirom da tretman antioksidansima (N-acetilcistein i DMSO) nije indukovao autofagiju u kombinovanom tretmanu sa SNP. Tretman farmakološkim inhibitorima rane (vortmanin i 3-metiladenin) i kasne faze autofagije (amonijum hlorid) smanjio je protektivno dejstvo GKT, što potvrđuje ulogu autofagije u ovom procesu.

Dobijeni rezultati ukazuju da GKT štite SH-SY5Y ćelije od neurotoksičnosti indukovane SNP delujući dvostruko, kao antioksidansi i aktivatori citoprotektivne autofagije. Ispitivanje efekata GKT u ovom modelu citotoksičnosti moglo bi da doprinese razjašnjenju molekularnih mehanizama koji se nalaze u osnovi njihovog neuroprotektivnog dejstva. Od naročitog značaja u ovom kontekstu je uticaj modulacije oksidativnog stresa i autofagije, kao bitnih regulatora

neurotoksičnosti sa potencijalnom ulogom u terapiji neurodegenerativnih i neuroinflamatornih oboljenja.

KLJUČNE REČI: grafenske kvantne tačke, natrijum nitroprusid, autofagija, antioksidansi, neuroni

NAUČNA OBLAST: Medicina

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna medicina

UDK: 61/577

Molecular mechanisms of the graphene quantum dots induced cell protection in the *in vitro* model of oxidative stress-mediated neuronal cell damage

Abstract

This dissertation examined the molecular mechanisms of graphene quantum dot (GQD)-mediated protection of the human neuroblastoma cells from oxidative stress induced by sodium nitroprusside (SNP). Increased intracellular levels of reactive oxygen (ROS) and nitrogen species (RNS) are involved in protein oxidation and nitration, lipid peroxidation and DNA damage, which ultimately lead to apoptotic or necrotic cell death. Neurons are particularly sensitive to the damage caused by oxidative stress due to significant consumption of molecular oxygen, high concentrations of unsaturated fatty acids susceptible to lipid peroxidation, and weak antioxidant mechanisms. High levels of ROS and RNS are involved in the damage and death of neurons and glia in Parkinson's disease, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, and ischemic brain damage. Due to the limitations of existing antioxidant therapy, newer approaches are based on the antioxidant properties of synthetic materials, out of which GQD have shown the most promise. GQD are oval, two-dimensional carbon nanoparticles, characterized by their distinctive biocompatibility, low cytotoxicity and exceptional antioxidant properties. In addition to antioxidant characteristics, GQD can induce autophagy, a cellular mechanism used for degradation of the damaged cell compartments and proteins in autolysosomes, formed by the fusion of lysosomes and autophagosomes. Neurons are particularly sensitive to disturbances in proteolytic cellular material degradation in the autophagy process, and the increased accumulation of damaged proteins is the main cause of numerous neurodegenerative diseases. This research examined the molecular mechanisms of the antioxidative and proautophagic actions of GQD.

The results of this study showed that GQD reduce SNP cytotoxicity through the decrease of mitochondrial depolarization, caspase-2 activity, and the apoptotic death of the human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Although GQD reduced the levels of nitric oxide (NO) after SNP treatment, NO scavengers only slightly reduced the cytoprotective effect of GQD in SH-SY5Y cells. The results show that NO quenching is not the main cytoprotective mechanism of GQD. GQD reduced the levels of hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$), superoxide radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and lipid peroxides detected after the SNP treatment. Treatments with nonselective antioxidants and scavengers of $\text{OH}\cdot$ and iron ion (Fe^{2+}) indicated that GQD protect cells by neutralizing the high levels of $\text{OH}\cdot$ generated in the presence of SNP-released Fe^{2+} and the intracellular hydrogen peroxide (H_2O_2). The cytosolic localisation of GQD is necessary for the protection of SH-SY5Y cells from the SNP-induced oxidative stress. Also, the combined treatment with GQD and SNP induced autophagy via Akt/PRAS40/mTOR signalling pathway. The induction of autophagy has been observed at both transcriptional and post-translational levels. The antioxidative effects of GQD were not directly related to their ability to induce autophagy, since the treatment with antioxidants (N-acetylcysteine and DMSO) did not induce autophagy in combination with SNP. In addition, treatments with pharmacological inhibitors of early (wortmannin and 3-methyladenine) and late (ammonium chloride) stages of autophagy effectively reduced the protective effects of GQD.

The results of this dissertation suggest that GQD protect SH-SY5Y cells from the SNP-induced neurotoxicity by exerting dual, antioxidant and pro-autophagic action. Examining the effects of GQD on the SNP-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells could contribute in elucidating the molecular mechanisms underlying their neuroprotective action. Of particular importance in this context is to determine the influence of oxidative stress and autophagy modulation, considering their roles as important regulators of neurotoxicity with therapeutic potential in neurodegenerative and neuroinflammatory diseases.

KEY WORDS: graphene quantum dots, sodium nitroprusside, autophagy, antioxidants, neurons

SCIENTIFIC FIELD : Medicine

SPECIALISED SCIENTIFIC FIELD: Molecular medicine

UDC: 61/577

SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1 Grafenske kvantne tačke.....	1
1.1.1 Sinteza i fizičko-hemijske karakteristike	1
1.1.2. Upotreba GKT u biomedicini	3
1.2 Oksidativni stres.....	4
1.2.1. Opšte karakteristike	4
1.2.2. Natrijum nitroprusid	6
1.2.3. Mehanizam biološkog dejstva SNP.....	7
1.2.4. SNP kao ćelijski model oksidativnog stresa.....	8
1.2.5. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi bolesti centralnog nervnog sistema.....	9
1.3 Apoptoza.....	9
1.4 Autofagija.....	11
1.5 Uticaj grafenskih kvantnih tačaka na proces autofagije.....	13
2. Ciljevi.....	16
3. Materijal i metode.....	20
3.1 Reagensi i rastvori	22
3.2 Sinteza i karakterizacija GKT.....	22
3.3 Ćelije i ćelijska kultura	23
3.4 Testovi vijabiliteta.....	24
3.4.1. Test aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze (MTT).....	24
3.4.2. Kristal violet test.....	24
3.4.3. Procena antagonističkog dejstva tretmana	25
3.5 Fazno-kontrastna mikroskopija.....	25
3.6 Određivanje produkcije NO u supernatantima.....	25
3.7 Određivanje nivoa lipidne peroksidacije.....	26
3.8 Analiza parametara ćelijske smrti	26
3.8.1. Analiza fragmentacije DNK.....	26
3.8.2. Analiza apoptoze i nekroze	27
3.8.3. Merenje membranskog potencijala mitohondrija	27
3.9 Merenje autofagije protočnom citofluorimetrijom	28
3.10 Detekcija i merenje RKV i RAV u sistemu bez ćelija	28
3.10.1. Određivanje antioksidativnog profila GKT	28
3.10.2. Sposobnost GKT da neutrališu OH•	29
3.10.3. Sposobnost GKT da neutrališu O ₂ ^{•-}	29
3.11 Elektronska paramagnetna rezonanca.....	29

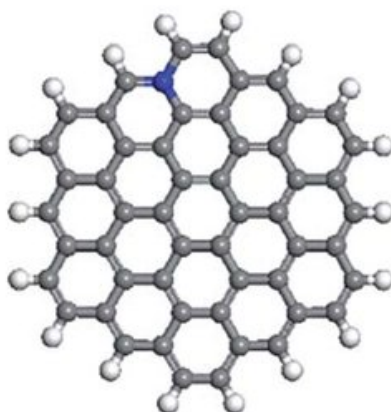
3.12 Detekcija i merenje RKV i RAV u ćelijama.....	30
3.12.1. Detekcija RKV i RAV protočnom citofluorimetrijom	30
3.12.2. NBT test za unutarćelijsku detekciju $O_2^{\bullet -}$	30
3.12.3. Intracelularna detekcija $OH^{\bullet}$ radikala.....	31
3.13 Imunoblot analiza	31
3.13.1. Priprema ćelijskih ekstrakata.....	31
3.13.2. Određivanje koncentracije proteina	31
3.13.3. Denaturišuća gel elektroforeza (SDS PAGE).....	32
3.13.4. Detekcija proteina	32
3.14 Strukturna analiza ćelija transmisijom elektronskom mikroskopijom	33
3.15 Određivanje nivoa ekspresije iRNK gena značajnih za proces autofagije	33
3.15.1. Izolacija RNK.....	33
3.15.2. Reverzna transkripcija	34
3.15.3. Reakcija lančanog umnožavanja	35
3.16 Statistička analiza	35
4. Rezultati	37
4.1 Karakterizacija GKT	39
4.2 Antioksidativni profil GKT	40
4.3 GKT štite ćelije od citotoksičnosti SNP.....	43
4.4 GKT štite SH-SY5Y ćelije od apoptoze indukovane SNP-om	49
4.5 Sposobnost GKT da neutrališu NO i $OH^{\bullet}$ doprinosi zaštiti ćelija od citotoksičnosti SNP.....	53
4.6 GKT indukuju autofagiju inhibicijom Akt/mTOR signalnog puta	59
4.7 GKT indukuju citoprotektivnu autofagiju nezavisno od njihove antioksidativne aktivnosti	63
5. Diskusija.....	69
6. Zaključci	81
7. Literatura	85

1. Uvod

1.1 Grafenske kvantne tačke

1.1.1 Sinteza i fizičko-hemijske karakteristike

Reč grafen, izvedenu iz reči grafit, uveo je Hans Peter Boem (*Hanns-Peter Boehm*) 1962. godine da bi opisao jednoslojne ugljenične folije. Nakon što su Novosel i Geim uspostavili metodu za izolaciju grafena iz visoko orijentisanog pirolitičkog grafita (engl. *highly oriented pyrolytic graphite*, HOPG) započinje period intenzivnog istraživanja fizičko-hemijskih karakteristika i potencijalne upotrebe grafena (Novoselov i sar., 2004). Proces raslojavanja HOPG dovodi do formiranja grafitnih ljuspica, koje se daljom obradom na silicijumskoj podlozi svode na sloj debljine jednog atoma (Hauser i sar., 2013). Dobijeni grafen poseduje dvodimenzionalnu planarnu strukturu i debljine je svega jedne atomske jedinice. Kao alotropsku modifikaciju ugljenika, grafen sačinjavaju sp^2 -hibridizovani ugljenični atomi, organizovani u šestougaoonu rešetku koja podseća na strukturu saća (Benítez-Martínez i sar., 2015). Po tri sp^2 -hibridizovane orbitale atoma ugljenika sa tri susedna atoma ugljenika formiraju jake kovalentne σ veze koje su odgovorne kako za stabilnost rešetke, tako i za elastične osobine grafena. Interakcije susednih nehibridizovanih 2pz orbitala formiraju provodnu zonu grafena. Fizičko-hemijske karakteristike grafena su: izrazita termička i hemijska stabilnost, visoka provodljivost kao i velika površina (Chen i sar., 2017). Međutim, slaba rastvorljivost i aglomerizacija prilikom rastvaranja značajno umanjuju njegovu biokompatibilnost (Geim, 2009). Usled pomenutih nedostataka, poslednju deceniju obeležila su istraživanja modifikacija grafena i njihove primene u biomedicinske svrhe. Jedna od takvih modifikacija grafena su grafenske kvantne tačke (engl. *Graphene quantum dots*, GKT) (Slika 1).



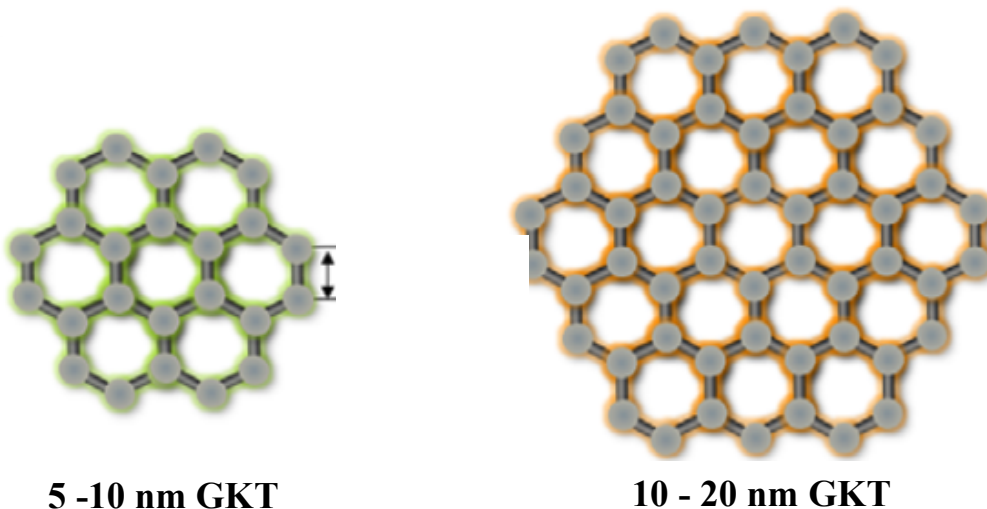
Slika 1. Struktura grafenskih kvantnih tačaka

Sp^2 -hibridizovani ugljenični atomi GKT, pozicionirani su u šestougaoonu rešetku koja podseća na strukturu saća. Jedan od sp^2 -hibridizovanih ugljeničnih atoma GKT obeležen je plavim (po uzoru na Bentez-Martinez i Valcárcel, 2015).

Termin GKT se prvi put pojavljuje u "pionirskim" istraživanjima Silvestrova i Efetova 2007. godine (Silvestrov i Efetov, 2007). GKT su vrsta ugljeničnih kvantnih tačaka, oblika diska ili elipse, sa prečnikom manjim od 100 nm. Predstavljaju nula-dimenzionalnu ili dvodimenzionalnu grafensku strukturu, izgrađenu od izrazito tankog sloja grafena (3-20 nm). Ključne osobine GKT su: nanometarske dimenzije, efekat kvantnog ograničenja (engl. *quantum confinement effect*) i sposobnost fotoluminiscencije (Benítez-Martínez i Valcárcel, 2015). Središnji disk GKT poseduje uobičajenu strukturu kristalne rešetke grafena (Slika 2), dok se na površini nalaze različite funkcionalne grupe. Broj atoma na površini u odnosu na broj atoma u središnjem disku

značajno je veći kod GKT u odnosu na grafit (Volkov, 2015). U zavisnosti od tipa bočnih funkcionalnih grupa, GKT mogu imati ulogu akceptora ili donora slobodnih elektrona.

Takođe, vrsta bočnih funkcionalnih grupa ima uticaj na stepen rastvorljivosti GKT u vodi (Kim i sar., 2012). Iako poseduju zajedničke karakteristike sa drugim tipovima kvantnih tačaka, osnovna prednost GKT jeste izrazita biokompatibilnost i niska citotoksičnost. GKT poseduju sposobnost optičke apsorpcije u UV delu spektra. Usled efekta kvantnog ograničenja, UV-Vis spektri ukazuju da veličina GKT ima uticaj na poziciju apsorpcionog pika u delovima crvenog spektra (Peng i sar., 2012). Mogućnost modifikacije bočnih grupa značajno utiče na njihove fizičko-hemijske karakteristike, što omogućava njihovu raznovrsnu primenu (Chen i sar., 2017).



Slika 2. Dvodimenzionalni prikaz kristalna strukture GKT različitih veličina

Veličina GKT diktira njihove fizičko-hemijske osobine. Sa povećanjem dijametra (preko 6 nm), povećava se razlika u energetskim nivoima. Takva promena dovodi do smanjenja fluorescencije GKT (Liu i sar., 2021).

Proces sinteze GKT bazira se na dva osnovna pristupa:

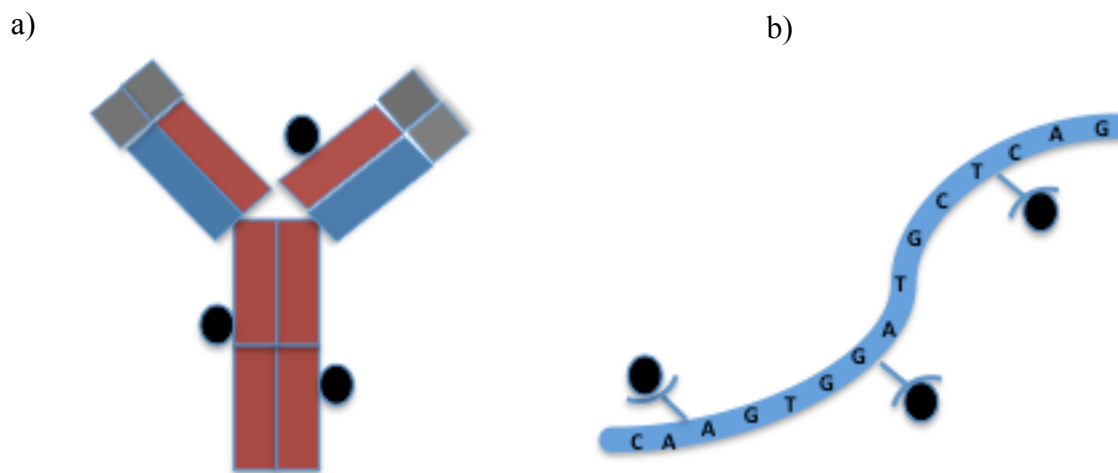
1. **”Top down” pristup** je zastupljeniji i započinje obradom i daljom razgradnjom makroskopskih početnih materijala (Shen i sar., 2012). U slučaju grafenskih nanomaterijala, početni materijal su grafenski oksidi (Ananthanarayanan i sar., 2014), grafitni prah (Kwon i sar., 2014), jednoslojne ugljenične nanotube (Dong i sar., 2013), grafen (Ananthanarayanan i sar., 2014) pa čak i ugalj (Ye i sar., 2013). Nedostatak ovakvog pristupa je obrada materijala upotrebom agresivnih pristupa kao što su primena koncentrovanih kiselina, toksičnih organskih reagenasa i jakih električnih stimulusa (Dong i sar., 2012; Shinde i sar., 2012). Zbog ovakve manipulacije, dobijeni nanomaterijali često poseduju defekte u kristalnoj strukturi što dovodi do promene fizičko-hemijskih karakteristika GKT (Shen i sar., 2011).

2. **”Bottom down” pristup** se karakteriše većom stabilnošću dobijenih čestica i započinje adicijom gradivnih blokova (atoma, molekula i/ili nanoklastera) u odgovarajućem odnosu i hemijskom okruženju (Yan i sar., 2010). Iako se sintetisane kvantne tačke odlikuju manjim brojem defekata, stabilnom strukturom i oblikom, ovakav pristup sinteze manje je zastupljen od prethodnog usled visokih troškova sinteze (Shinde i sar., 2012). Kao početni materijal za sintezu GKT ”bottom down” pristupom najčešće se koriste haloaromatična jedinjenja kao što su hlorbenzen i dihlorbenzen (Gokhale, 2014), kao i vodeni rastvori prostih šećera (glukoza, sukroza i fruktoza) (Tang i sar., 2012).

Kao što je prethodno pomenuto, sposobnost izmene bočnih grupa predstavlja jednu od značajnih karakteristika GKT. U svom osnovnom obliku, GKT poseduju bočne karboksilne, hidroksilne, karbonilne i epoksilne grupe (Yang i sar., 2012). Različiti heteroatomski mogu biti supstituisani u okviru funkcionalnih grupa. Neki od najčešće inkorporiranih heteroatoma su azot (Xu i sar., 2015), sumpor (Li i sar., 2014), fluor (Feng i sar., 2013) i brom (Zhang i sar., 2014). Promene u optičkim, električnim i hemijskim karakteristikama nanomaterijala posredovane izmenama bočnih grupa mogu uticati na povećanje kvantnog prinosa (engl. *quantum yield*), intenziteta fotoluminiscencije i fluorescencije GKT (Zhu i sar., 2012).

1.1.2. Upotreba GKT u biomedicini

Automatizacija postupka sinteze i hemijske modifikacije GKT omogućili su širu primenu ovih nanomaterijala. Jedna od prvih primena GKT bila je u detekciji različitih jonskih vrsta (Ananthanarayanan i sar., 2014), koja se bazira na koordinativnim interakcijama između hidroksilne grupe GKT i jona Fe^{2+} . Ove interakcije su posledica promene u elektronskoj konfiguraciji GKT nakon modifikacije bočnih grupa, što dovodi do promena u intenzitetu njihove fotoluminiscencije (Li i sar., 2014). U zavisnosti od veličine, GKT emituju fotoluminiscentnu svetlost koji se može detektovati od vidljivog pa sve do infracrvenog dela spektra (Zhu i sar., 2012). Pored detekcije jona, GKT se mogu koristiti i kao senzori u cilju detekcije različitih biomolekula poput aminokiselina (Zhang i sar., 2015) i proteina (Wang i sar., 2013). Primer biosenzorske funkcije su GKT konjugovane sa antitelima/antigenima. Vezivanjem većeg broja GKT za molekule antitela povećavaju se dipol interakcije između kvantnih tačaka, čime se obezbeđuje jak fotoluminiscentni/fluorescentni signal (Sun i sar., 2021). Pored antitela, GKT mogu biti konjugovane i sa aptamerima, sintetskim oligonukleotidima (Slika 3), u cilju detekcije specifičnih sekvenci u molekulu DNK (Liu i sar., 2014).



Slika 3. Primer bioloških sistema konjugovanih sa GKT

- Postoje različiti mehanizmi konjugovanja GKT sa antitelima, jedan od najčešćih je vezivanje preko karboksilnih bočnih grupa GKT korišćenjem karbodimida.
- GKT sa karboksilnom bočnom grupom su vezane kovalentnom vezom za sintetske aptamere (Modifikovano od Sun i sar., 2021).

Pored prethodno opisanih uloga, GKT se koriste i kao fluorescentne probe u cilju:

- 1) *In vitro* detekcije ćelijskih odeljaka. Ovakva sposobnost GKT bazira se na promeni fotoluminiscencije nakon njihove ćelijske internalizacije (Wang i sar., 2018).

2) *In vivo* detekcije različitih ćelijskih tipova, kao na primeru apoptotskih ćelija u modelu zebra ribe (*Danio rerio*) koristeći GKT konjugovane sa aneksin-V proteinom (Roy i sar., 2015).

Poboljšanje fizičko-hemijskih karakteristika GKT omogućilo je i njihovu potencijalnu upotrebu u terapijske svrhe. Bočne grupe GKT mogu biti mesto vezivanja ciljnih liganada i/ili različitih terapeutika, čime se povećava efikasnost dopremanja i oslobađanja terapeutika *in vivo* (Chung i sar., 2019). Do sada je pokazana efikasnost u vezivanju anti-tumorskih terapeutika poput doksorubicina i metotreksata (Khodadadei, 2017). Međutim, terapijske sposobnosti GKT se ne ogledaju samo u vezivanju i transportu terapeutika. Naime, GKT imaju sposobnost generisanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV) prilikom osvetljavanja svetlošću odgovarajuće talasne dužine. GKT pobuđene svetlošću iz UV-Vis spektra prenose elektron na molekularni kiseonik u ćelijama, čime se generišu različite RKV kao i singletni kiseonik (Clo i sar., 2007). Ovakav vid terapije označava se kao fotodinamička terapija (FTD), u kojoj visoki nivoi RKV učestvuju u indukciji oksidativnog stresa koji dovodi do oštećenja i smrti ćelija. FDT se može koristiti za ubijanje mikroorganizama, ali i kao alternativa standardnoj hemio- i radioterapiji usled niske sistemske citotoksičnosti, male invazivnosti i malog broja neželjenih dejstava (Ristic i sar., 2014). S druge strane, pokazano je da GKT u odsustvu fotoekscitacije imaju sposobnost da neutrališu različite RKV (Christensen i sar., 2011).

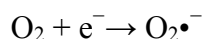
Višestruke uloge GKT omogućene su njihovom izrazitom biokompatibilnošću. Inicijalne studije citotoksičnosti ukazale su da GKT sa bočnim amino (-NH₂), karboksilnim (-COOH) i amidnim (-CHO-N-(CH₃)₂) grupama pokazuju nisku citotoksičnost u koncentracijama nižim od 200 µg mL⁻¹. GKT sa hidroksilnim bočnim grupama (-OH) pokazuju nešto veću citotoksičnost u koncentracijama iznad 100 µg mL⁻¹ (Xie i sar., 2019). Pored niske citotoksičnosti GKT, sposobnost prolaska kroz ćelijsku membranu doprinosi njihovoj širokoj primeni u biološkim sistemima. Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM) je potvrdila unutarćelijsku lokalizaciju GKT, dok se u osnovi mehanizma njihove internalizacije nalaze procesi endocitoze posredovane receptorima (Wang i sar., 2014) i/ili šaperonima (Wu i sar., 2013).

1.2 Oksidativni stres

1.2.1. Opšte karakteristike

Termin oksidativni stres, ustanovljen je 1986. godine od strane Helmuta Siesa (Sies i Berndt, 2017). Definiše se kao neravnoteža u procesu formiranja i uklanjanja RKV (Radi, 2004). Proces ćelijskog disanja i metabolizma generišu slobodne elektrone, što dovodi do redukcije molekularnog kiseonika i nastanka različitih formi RKV, ali i reaktivnih azotnih vrsta (RAV). Povećane količine RKV i RAV mogu učestvovati u oksidaciji i nitraciji proteina, peroksidaciji lipida, oštećenju molekula DNK, ali i dovesti do narušavanja mitohondrijalnog membranskog potencijala kroz inaktivaciju kompleksa transportnog lanca elektrona. Sve prethodno pomenute promene oštećuju ćelije i dovode do programirane ćelijske smrti tipa I - apoptoze i/ili nekroze (Orrenius i Gogvadze, 2007).

Inicijalno, u procesu redukcije molekularnog kiseonika u prisustvu proteina koji imaju sposobnost da prenose kiseonik ili različitih endogenih raduktanata, nastaje superoksidni radikal (O₂•⁻) (Terwel i sar., 2000).



U bazalnom ćelijskom metabolizmu, formiranje $O_2^{\bullet-}$ posledica je "nesavršenosti" transportnog lanca elektrona. Naime, oslobađanje elektrona na nivou kompleksa I i III obezbeđuje redukcionu sredinu za početnu redukciju molekulskog kiseonika (Terwel i sar., 2000).

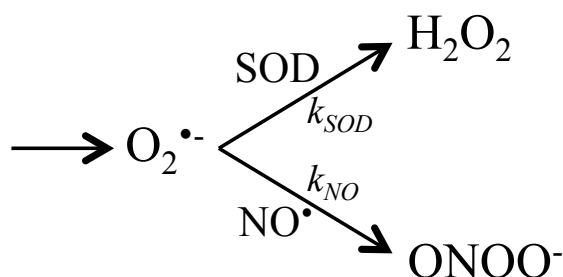
Prisustvo $O_2^{\bullet-}$ ima dve značajne posledice na ćelijski metabolizam:

- 1) inaktivaciju enzima akonitaze, jednog od ključnih oksido-senzitivnih enzima u procesu Krebsovog ciklusa (Radi, 2018).
- 2) povećanu aktivnost lipidne peroksidacije, procesa u kome oksidujući agensi poput slobodnih radikala napadaju dvostruku kovalentnu vezu u lipidnim molekulima, pogotovo višim nezasićenim masnim kiselinama (Ayala i sar., 2014).

Iako $O_2^{\bullet-}$ ne poseduje jaku oksidujuću aktivnost, njegova citotoksičnost ogleda se u reakcijama sa drugim molekulima, sa kojima gradi reaktivne vrste sa značajno jačim oksidujućim sposobnostima (Kagan i sar., 2005). Peroksinitrit ($ONOO^-$) je jak oksidujući agens koji se formira u reakciji $O_2^{\bullet-}$ sa slobodnim $NO^{\bullet}$ radikalom:



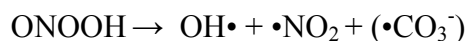
U fiziološkim uslovima (pK_a 6.8 na $37^\circ C$), peroksinitrit se nalazi u ekvilibrijumu sa peroksinitroznom kiselinom ($ONOOH$) (Fridovich, 1995). Poluvreme raspada $ONOO^-$ iznosi 10-20 milisekundi, nakon čega sledi ciklus katalizovanog raspada u prisustvu protona i formiranja nitritnog i hidroksilnog radikala ($OH^{\bullet}$) (Radi i sar., 1991). Upravo se $OH^{\bullet}$ smatra jednim od najtoksičnijih RKV (Ferrer-Sueta, 2009). Zaštita ćelija od jake oksidujuće aktivnosti $OH^{\bullet}$ vrši se uz pomoć metaloenzima superoksid dismutaze (SOD), koja vrši dismutaciju $O_2^{\bullet-}$ prevodeći ga u vodonik peroksid (H_2O_2). Povećana unutarćelijska koncentracija H_2O_2 neutrališe se enzimskim sistemom koji uključuje katalazu, glutation i peroksireduksine (Terwel i sar., 2000). Konstanta brzine hemijske reakcije formiranja peroksinitrita za red veličine je veća od reakcije dismutacije posredovane SOD (Godínez-Rubí i Rojas-Mayorquín, 2013). Ovaj podatak ukazuje da je nemoguće neutralisati generisanje $ONOO^-$ u prisustvu fluksa $NO^{\bullet}$ (Slika 4).



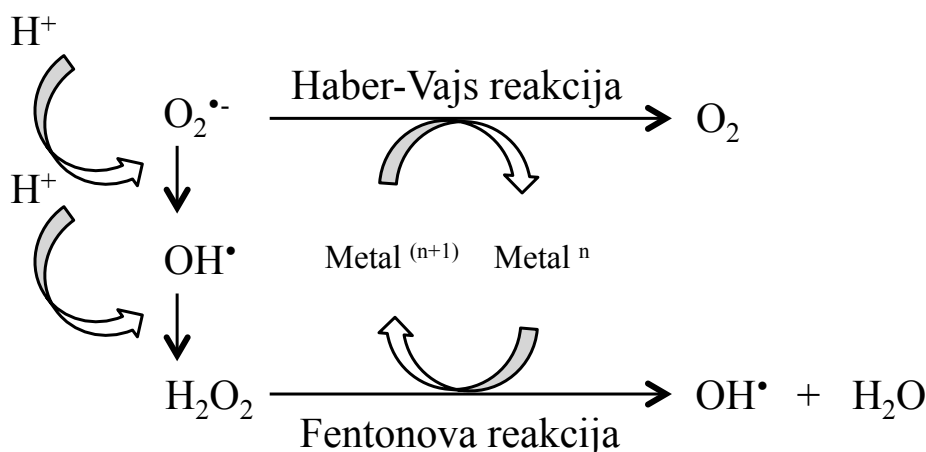
Slika 4. Metabolizam $O_2^{\bullet-}$

Balans između reakcije $O_2^{\bullet-}$ sa $NO^{\bullet}$ i aktivnosti ćelijske SOD u neutralizaciji oksidujućih agenasa, zavisi od konstanti brzina hemijskih reakcija. k_{NO} je za red veličine veća od k_{SOD} .

Usled kratkog poluvremena od svega nekoliko milisekundi, $ONOO^-$ se spontano homolitički raspada, pri čemu se formiraju nove oksidujuće radikalske forme: hidroksilni radikal ($OH^{\bullet}$), radikal azot (II) oksida ($\bullet NO_2$) i/ili radikalski anjon karbonata ($\bullet CO_3^-$) (Sies i Berndt, 2017).



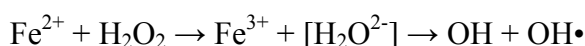
Prosečna ćelija napravi oko 50 OH• radikala svake sekunde. U toku dana, taj broj iznosi i do 4 miliona OH• radikala. Merenja elektronske paramagnetna rezonanca (EPR) ukazala su da je svega 0.9 - 4.0 % mase formiranog OH• posledica raspada ONOO⁻ (Yang i sar., 2006). Preostali OH• nastaje uz pomoć citosolnog enzima SOD i nekih od unutarćelijskih tranzicionih metalnih jona. Kako je prethodno objašnjeno, SOD prevodi O₂^{•-} u H₂O₂ (Godínez-Rubí i Rojas-Mayorquín, 2013), od koga može da nastane OH• u takozvanoj Fentonovoj reakciji (Slika 5), jednoj od specifičnih vrsta Haber-Vajs reakcije (Haber-Weiss) (Pou i sar., 1995).



Slika 5. Odnos Fentonove i klasične Haber-Vajsove reakcije

Redukovana forma metala (**Metalⁿ**; najčešće Fe²⁺) u Fentonovoj reakciji reaguje sa H₂O₂ i formira jak oksidujući agens OH•. Prisutni O₂^{•-} može reagovati sa oksidovanom formom metala (**Metal⁽ⁿ⁺¹⁾**; najčešće Fe³⁺) u Haber-Vajsovoj reakciji vodeći redukciji metalnog jona i daljoj propagaciji Fentonove reakcije (Ayala i sar., 2014).

Najčešći tip Fentonove reakcije zasniva se na interakciji divalentnog jona gvožđa (Fe²⁺) i H₂O₂



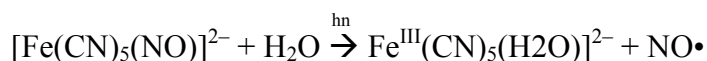
U fiziološkim uslovima, joni gvožđa se nalaze u kompleksu sa feritinima i ostalim proteinima koji poseduju hem grupu. U okviru ovih kompleksa pozicija Fe²⁺ onemogućava odvijanje Fentonove reakcije. Međutim, O₂^{•-} može uticati na proteinske komplekse i izazvati oslobađanje Fe²⁺, stvarajući uslove za odvijanje Fentonove reakcije (Winterbourn, 1995).

1.2.2. Natrijum nitroprusid

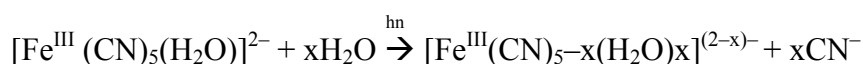
Natrijum nitroprusid (engl. *Sodium nitroprusside*, SNP), takođe poznat kao natrijum nitrofericijanid (III) dihidrat, je kompleksno jedinjenje sa oktaedralnim jonom gvožđa (Fe²⁺) koordinativno vezanim za dva tipa liganada: azot (II) oksidom (nitrozil grupa, NO•) i pet cijanidnih anjona (CN⁻) (Novoselov i sar., 2004). Čak 44% ukupne molekulske težine SNP pripada cijanidnim anjonskim ligandima. Prisustvo molekula vode u strukturi SNP omogućava visok stepen njegove rastvorljivosti (Hottinger i sar., 2014). Pri fiziološkim pH vrednostima i u odsutvu svetlosti, SNP je termički stabilna supstanca. Na sobnoj temperaturi i u prisustvu svetlosti iz UV i vidljivog dela spektra, SNP oslobađa nitrozilni radikal (NO•) i anjon cijanida (CN⁻) (Friederich i sar., 1995).

Usled fotonestabilnosti i sposobnosti indukcije oksidativnog stresa, SNP može biti kandidat za fotodinamičku terapiju. Međutim, oslobađanje male količine NO• u odsustvu svetlosti predstavlja glavnu prepreku za korišćenje SNP kao fotodinamičkog agensa (Shishido i De Oliveira, 2001). SNP se u kliničkoj praksi koristi kao arterijski i venski vazodilatator i primenjuje se u terapiji akutne i hronične hipertenzije (Novosel i sar., 2004). Sintetisan je 1849. godine od strane Plajfera (Playfair, 1849). Terapeutska uloga SNP potvrđena je 1922. godine (Chas i Johnson, 1928), a efikasnost i sigurnost u intravenskoj terapiji snižavanja pritiska tek 1955. godine.

Reakcija raspada SNP odvija se u nekoliko koraka. Najpre dolazi do fotooslobađanja slobodnog radikala NO•:



Nakon inicijalne reakcije fotoraspada, dobijeni kompleksni anjon $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_5(\text{H}_2\text{O})]^{2-}$ podleže naknadnom rastvaranju cijanidnog jona u prisustvu svetlosti:



Fotolabilnost SNP i mogućnost otpuštanja NO• i CN⁻ zavise su od talasne dužine svetlosti. Naime, svetlost talasne dužine veće od 480 nm ($\lambda_{\text{irr}} > 480 \text{ nm}$) dovodi do jednostepenog raspada SNP i oslobađanja NO• (Friederich i sar., 1995). Imajući prethodno u vidu, u prisustvu svetlosti iz UV-Vis spektra, solubilizovana forma SNP predominantno će oslobađati NO•.

1.2.3. Mehanizam biološkog dejstva SNP

Nakon ulaska u krvotok, SNP interaguje sa sulfhidrilnim grupama različitih proteina pri čemu se oslobađa gasoviti azot (II) oksid (NO•). Vezivanje SNP za oksihemoglobin i njegova konverzija u metehemoglobin, stimuliše oslobađanje azotnog a potom i cijanidnog radikala (Ivankovich i Miletich, 1978). Najveći broj organskih jedinjenja koja imaju sposobnost oslobađanja gasovitog NO• poseduju tiolnu grupu. Međutim, fotonestabilni SNP oslobađa NO• bez tiolne grupe u svojoj strukturi (Page i sar., 1955). Pionirski radovi o mehanizmu delovanja SNP ukazuju da su za vazodilataciju indukovanu SNP zaslužna nitrozotiolna jedinjenja koja se generišu u ćeliji nakon tretmana SNP (Ivankovich i Miletich, 1978).

Oslobodeni azot (II) oksid je kratkoživeći, heteronuklearni dvoatomska molekul, koji zbog prisustva nesparenog elektrona predstavlja slobodni radikal azota (NO•) sa poluvremenom ($t_{1/2}$) od svega nekoliko sekundi. Usled kratkog poluvremena, NO• se oksiduje i brzo prevodi u stabilne, inertne produkte, nitrite i nitrate (NO₂⁻ i NO₃⁻) (Kröncke i sar., 1995). Nakon oslobađanja iz SNP kompleksa, NO• vrši autokrinu i parakrinu funkciju. Najpre, utiče na aktivaciju enzima guanilat ciklaze, čime se stimuliše proizvodnja molekula cikličnog guanozin monofosfata (cGMP) (Nathan, 1992). Pored guanilat ciklaze, NO• i njegovi metabolički produkti mogu uticati na brojne enzime među kojima su: gvožđe-sulfurne komponente transportnog lanca elektrona, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza pa čak i molekul DNK (Fok i sar., 2012; Bolanos i sar., 1995). Oslobodeni cijanidni anjoni delom se vezuju za hemoglobin formirajući cijanohemoglobin, dok se ostali anjoni cijanida konvertuju u tiocijanat uz pomoć enzima rodinaze (tiosulfat sulfurtransferaze) (Wiseman i Halliwell, 1996). Na ovaj način vrši se zaštita ćelija od prekomerne koncentracije cijanida koji ispoljava toksičnost vezujući se i blokirajući

aktivnost kompleksa IV mitohondrijalnog respiratornog lanca, što dovodi do hipoksije i acidoze (Ivankovich, 1983).

1.2.4. SNP kao ćelijski model oksidativnog stresa

Pored kliničke uloge u vazodilataciji, SNP se eksperimentalno koristi i kao egzogeni donor $\text{NO}\bullet$ u cilju ispitivanja različitih ćelijskih procesa (Hall, 1992). Najčešće ispitivan proces je ćelijska smrt indukovana SNP (Godínez-Rubí i sar., 2013). Visoke koncentracije $\text{NO}\bullet$ nakon tretmana SNP dovode do prestanka rada kompleksa IV transportnog lanca elektrona, povećanog nakupljanja elektrona i formiranja $\text{O}_2\bullet^-$. U takvim uslovima, $\text{NO}\bullet$ iz SNP može reagovati sa ćelijskim $\text{O}_2\bullet^-$ i formirati ONOO^- , koji utiče na inaktivaciju kompleksa I, II i V (ATP sinaza) transportnog lanca elektrona (Beckman i sar., 1990). Pored uticaja na aktivnost transportnog lanca elektrona i ćelijsku respiraciju, ONOO^- dovodi do specifične post-translacione modifikacije proteina u formi nitracije bočnih tirozinskih grupa (Moncada, 2015).

Pored $\text{NO}\bullet$ i $\text{O}_2\bullet^-$, citotoksičnosti SNP doprinosi i prisustvo Fe^{2+} metalnog jona koji može da inicira Fentonovu reakciju, što dovodi do formiranja citotoksičnog $\text{OH}\bullet$. U skladu s tim, različiti helatori Fe^{2+} smanjuju ćelijsku smrt indukovanu SNP (Smith i Fernhoff, 2012). Oslobođanje $\text{NO}\bullet$ dovodi do strukturne promene i formiranja novog koordinativnog mesta u novonastalom anjonu, čime se omogućava da Fe^{2+} iz SNP sa unutarćelijskim H_2O_2 pokrenu Fentonovu reakciju (Winterbourn, 1995; Reef, 1992). Tretman SNP nakon fotoindukovanog oslobađanja $\text{NO}\bullet$ ("trošenja" SNP) i dalje dovodi do smanjenja vijabiliteta ćelija u kulturi. Naime, nakon "trošenja" SNP, preostali rastvor (engl. *exhausted SNP*) produkuje i do pet puta veću koncentraciju $\text{OH}\bullet$ (Rauhala i sar., 1998). Kako bi produkcija $\text{OH}\bullet$ bila kontinuirana, redoks ciklus gvožđa mora biti obezbeđen ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$). Nervne ćelije poseduju visoke unutarćelijske koncentracije jakog redukujućeg agensa askorbinske kiseline, što ukazuje da je ovaj tip ćelija najpogodniji *in vitro* sistem za ispitivanje oksidativnog stresa indukovanog SNP (Kumari i sar., 2014; Rauhala i sar., 1998). Još jedna od posledica tretmana SNP je i prisustvo lipidne peroksidacije (Rao i sar., 1991). Imajući u vidu da lipidi predstavljaju ključne strukturne komponente bioloških membrane, njihova oksidacija narušava strukturnu homeostazu ćelija. Formiranje $\text{OH}\bullet$ indukovano SNP-om može dovesti do istiskivanja jona vodonika iz bisalicilnog metilena masnih kiselina dugog lanca, formirajući lipidni peroksil radikal ($\text{ROO}\bullet$) (Repetto, 2012). Nakon interakcije sa slobodnim jonima vodonika, formira se lipidni peroksid (ROOH). Na ovaj način reakcija lipidne peroksidacije je samopropagirajuća, dovodeći do daljeg oštećenja ćelijskih membrana (Gaschler i Stockwell, 2017).

U skladu sa gore navedenim rezultatima, pored programirane ćelijske smrti po tipu apoptoze, novija istraživanja ukazuju na ferroptozu kao potencijalno novi tip ćelijske smrti indukovane SNP (Rauhala i sar., 2002). Ferroptozu je tip ćelijske smrti koji zavisi od jona gvožđa i karakteriše se povećanim unutarćelijskim nivoima lipidnih peroksida (Lewerenz i sar., 2018). Farmakološki inhibitori apoptoze i nekroze nemaju uticaj na proces ferroptoze. Ključni regulatori ferroptoze su proteini elastin i RSL-3, koji onesposobljavaju proteinski sistem za neutralisanje lipidnih peroksida i to prevashodno kofaktor glutation i enzim glutation peroksidazu 4 (Guiney i sar., 2019).

1.2.5. Uloga oksidativnog stresa u patogenezi bolesti centralnog nervnog sistema

Oksidativni i nitrozativni stres nalaze se u osnovi patogeneze brojnih poremećaja centralnog nervnog sistema (CNS), uključujući neurotoksičnost, neuroinflamaciju i ishemiju mozga (Federico i sar., 2012). Uticaj oksidativnog stresa na nastanak neurodegenerativnih oboljenja kao što su Alchajmerova bolest, Hantingtonova bolest i Parkinsonova bolest, bio je predmet brojnih istraživanja. Smanjena aktivnost sistema za reparaciju DNK, disbalans mitohondrijalne aktivnosti, prisustvo lipidne peroksidacije, kao i disfunkcija procesa autofagije samo su neke od posledica oksidativnog stresa (Article i sar., 2015).

Nervne ćelije su posebno osetljive na oštećenja uzrokovana oksidativnim stresom jer su izrazito metabolički aktivne i značajno troše molekulski kiseonik. Smatra se da humani nervni sistem troši preko 20% ukupne koncentracije molekulskog kiseonika organizma (Federico i sar., 2012). Metalni joni, koji su neophodni kao katalizatori u formiranju različitih kiseoničnih vrsta ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ i Cu^{2+}), prisutni su u visokim koncentracijama u neuronima. Takođe, neuroni se karakterišu prisustvom visokih koncentracija višestruko nezasićenih masnih kiselina podložnih procesu lipidne peroksidacije (Ferreira i sar., 2015). Koncentracija kofaktora glutaciona (GSH) niža je u neuronima u odnosu na ćelije perifernih tkiva, što ukazuje na sniženu zaštitu od oksidujućih/radikalnih agenasa (Radi i sar., 2014). Prethodna istraživanja na modelu Alchajmerove bolesti ukazala su da akumulacija vanćelijskih amiloidnih plaka ($\text{A}\beta$) dovodi do povećanja oksidativnog stresa. Ovakva promena dovodi do poremećaja u radu mitohondrija, povećanja koncentracije produkata lipidne peroksidacije (malonilaldehida), kao i oksidacije proteina i nukleinskih kiselina. Istraživanja na neuronima *substantia nigra pars compacta* kod pacijenata sa Parkinsonovom bolešću pokazuju disfunkciju kompleksa I elektron transportnog lanca (NADH dehidrogenaza) (Schapira, 2008). Disfunkcija kompleksa I može se povezati sa povećanom učestalošću tačkastih mutacija mitohondrijalne DNK. Takođe, povećana koncentracija jona Fe^{2+} u dopaminergičnim neuronima *substantia nigra pars compacta* sugerise da se u osnovi oksidativnog stresa potencijalno nalazi $\text{OH}\cdot$ nastao u Fentonovoj reakciji (Hauser i Hastings, 2013).

1.3 Apoptoza

Apoptoza, programirana ćelijska smrt tip I, je evolutivno konzerviran proces kojim se omogućuje održavanje ćelijske homeostaze eliminacijom oštećenih ćelija. Termin apoptoza prvi put je uveden od strane Kerr i saradnika 1972. godine (Kerr i Wyllie, 1972). Kod kičmenjaka, proces apoptoze je od izuzetnog značaja tokom embrionalnog razvoja, tkivnog remodelovanja, održavanja ćelijske i tkivne homeostaze, regulacije imunskog sistema, kao i prevencije nastanka tumora (Ke i sar., 2018; Knudson i sar., 1995). Uz aktivaciju efektorskih proteina, apoptoza dovodi do morfoloških promena ćelija koje uključuju smanjivanje ćelijskog volumena, gubitak adherentnosti, kondenzaciju hromatina i fragmentaciju DNK.

Tokom apoptoze dolazi do pupljenja ćelijske membrane, čiji integritet ostaje očuvan. Na ovaj način formiraju se apoptotska tela koja na svojoj površini imaju fosfatidilserin koji predstavlja signal za fagocite (Taylor i Cullen, 2008). Fagocitoza sprečava oslobađanje degradiranog materijala u okolnu sredinu, kao i indukciju sekundarne nekroze i produkciju citokina (Elmore, 2007). Za razliku od drugih tipova ćelijske smrti, apoptoza je energetski zavisna proces koji čine niz konzerviranih koraka koji zajednički vode aktivaciji kaspaza, cistein-zavisnih aspartat-specifičnih proteaza (engl. *caspase*). Kaspaze su proteolitički enzimi koji se u

zdravim ćelijama nalaze u neaktivnoj formi (proenzimi). Predstavljaju glavne efektore procesa apoptoze i učestvuju u proteolitičkoj degradaciji ćelijskog materijala koja dovodi do smrti ćelija (Sabbatini i sar., 1997). Kaspaze se po svojoj funkciji mogu podeliti u tri grupe:

1. **Inicijatorske** (kaspaza 2, 8, 9, 10) – prekursorske forme prokaspaza grupišu se u komplekse čime se omogućava autokatalitička aktivacija ovih enzima (Cohen, 1997).
2. **Efektorske** (kaspaza 3, 6, 7) – prekursorske forme aktiviraju se katalitičkim isecanjem od strane inicijatorskih kaspaza. Nakon aktivacije, ovi enzimi učestvuju u aktivaciji endonukleaza i proteaza. Aktivacija ovih enzima dovodi do fragmentacije molekula DNK kao i isecanja citosolnih i nuklearnih proteina (Los i sar., 1995).
3. **Inflamatorne** (kaspaza 1, 4, 5)

Na osnovu načina regulacije, postoje dva jasno definisana signalna puta koja aktiviraju proces apoptoze:

1. **Spoljašnji put** započinje aktivacijom receptora smrti iz TNFR familije (engl. *tumor necrosis factor receptors*). Nakon vezivanja liganda, konformaciona promena membranskog TNFR receptora vodi aktivaciji i grupisanju adaptorskih proteina za FADD (engl. *Fas-associated protein with death domain*) unutarćelijski domen receptora. Vezivanje inicijatorske prokaspaze-8 u kompleks sa adaptornim proteinima vodi formiranju DISC kompleksa (engl. *death-inducing signaling complex*). Na ovaj način je omogućena autokatalitička aktivacija kaspaze 8. Aktivna forma kaspaze 8 aktivira egzekutornu kaspazu 3 vodeći egzekuciji procesa apoptoze (Cabal-Hierro i Lazo, 2012; Lavrik i sar., 2005).
2. **Unutrašnji put**, poznat kao mitohondrijalni put, karakteriše se gubitkom polarizacije i povećanjem permeabilnosti mitohondrijalne membrane. Na ovaj način dolazi do oslobađanja dve grupe proapoptotskih proteina iz intramembranskog odeljka u citosol. Prvoj grupi pripadaju citohrom c, SMAC/DIABLO (engl. *Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI*) i serin proteaza HtrA2/Omi (engl. *High temperature requirement protein A2*). Drugoj grupi pripadaju proapoptotski enzimi i to: endonukleaza G, AIF (engl. *Apoptosis inducing factor*) i kaspazama aktivirana dezoksiribonukleaza CAD (engl. *Caspase-activated Dnase*) (Elmore, 2007). Citohrom c pokreće mitohondrijalni put zavisen od kaspaza kroz interakciju sa Apaf-1 proteinom (engl. *apoptotic peptidase activating factor 1*) pri čemu se formira kompleks nazvan apoptozom. Formiranje kompleksa omogućuje autokatalitičku aktivnost inicijatorskih kaspaza i posledičnu aktivaciju efektorskih kaspaza 3, 6 i 7 (Saelens i sar., 2004).

Nekontrolisana indukcija apoptoze nalazi se u osnovi patogeneze brojnih oboljenja, među kojima su i neurodegenerativna oboljenja. Naime, pokazano je da je apoptoza mehanizam smrti neurona kod pacijenata sa Alchajmerovom i Parkinsonovom bolesti. Smrt dopaminergičnih neurona u patogenezi Parkinsonove bolesti povezana je sa inaktivacijom kompleksa I transportnog lanca elektrona, što povećava nivoje RKV (Langston i sar., 1983). Povišeni nivoi H₂O₂ i posledično povećanje u ekspresiji proapoptotskih proteina sa BH3 domenom (Puma, Noxa, Bax) uočeni su u neuronima pacijenata sa neuroinflamacijom (Kayagaki i sar., 2011). Takođe, smrt oligodendrocita u lezijama tipa III kod pacijenata sa multiplom sklerozom pripisuje se procesu apoptoze (Meyer i sar., 2001). Pored proapoptotskih proteina, aktivacija kaspaza je takođe povećana u prisustvu visokih nivoa RKV. Regulacija kaspaza oksidativnim stresom ostvaruje se kroz post-translacione modifikacije cisteina u katalitičkim regionima i to prevashodno oksidacijom i S-glutatiolacijom. Na taj način povišeni nivoi RKV aktiviraju inicijatorske prokaspaze, ali mogu i da inaktiviraju enzimsku aktivnost kaspaze 3, 8 i 9 kroz njihovu post-translacionu modifikaciju (Circu i Aw, 2010).

1.4 Autofagija

Autofagija predstavlja proces razgradnje unutarćelijskih molekula i organela u lizozomima, čime se održava ćelijske homeostaze i omogućava prevazilaženje uslova ćelijskog stresa usled deficijencije nutrijenata i/ili ATP. Na osnovu puta kojim ćelijski materijal dospeva u lizosome razlikujemo tri tipa autofagije: mikroautofagiju, makroautofagiju i autofagiju posredovanu šaperonima (Mizushima, 2011). Mikroautofagija se karakteriše invaginacijom membrane lizozoma, dok u autofagiji posredovanoj šaperonima glavnu ulogu imaju proteini iz klase proteina temperaturnog šoka (engl. *heat shock proteins*) i to prevashodno Hsc70 (engl. *heat shock cognate 70*). Ovakav tip autofagije se suštinski razlikuje od prethodna dva tipa jer zahteva da proteini sa specifičnim aminokiselinskim motivom izgube svoju sekundarnu, tercijarnu ili kvaternu strukturu (Glick i sar., 2010).

Dominantan i najbolje ispitan proces autofagije predstavlja makroautofagija (u daljem tekstu - autofagija). U ovom procesu, oko materijala obeleženog za eliminaciju se formira fagofora, membranska struktura koja daljim procesom maturacije formira autofagozom (Wang i Klionsky, 2011). Autofagozom ima dvostruku membranu i omogućava usmereno kretanje označenog materijala ka lizozomima u kojima se vrši razgradnja katalizovana lizozomalnim proteolitičkim enzimima (Wang i Klionsky, 2011). Autofagija može da bude neselektivna i selektivna. Selektivnost procesa autofagije bazira se na postojanju adapterskih proteina kojima se ostvaruje interakcija između proteina obeleženih za eliminaciju i proteina uključenih u proces autofagije (Yang i Klionsky, 2010). Za razliku od selektivnog, neselektivni tip autofagije ne zahteva prisustvo adapterskih proteina, što dovodi do raznolikog sastava materijala za razgradnju u okviru autofagozoma. Na osnovu vrste materijala razlikujemo različite tipove selektivne autofagije, pa se tako npr. obeležavanje i selektivna razgradnja oštećenih i nefunkcionalnih mitohondrija označava kao mitofagija (Wang i Klionsky, 2011). U procesu autofagije učestvuju produkti ATG gena (engl. *autophagy related genes*) (Dengjel i Abeliovich, 2017), koji regulišu tri osnovne faze autofagije (Slika 6) (Nakatogawa i sar., 2009):

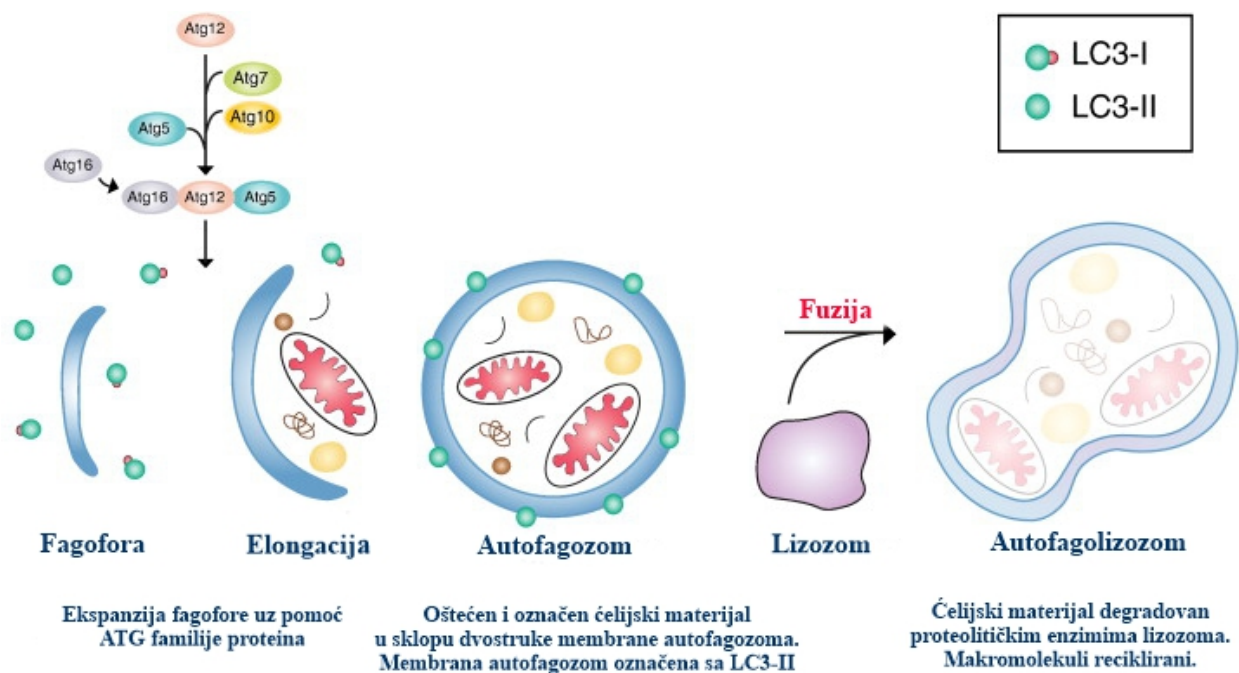
1. Indukcija autofagije - proces indukcije u ćelijama eukariotskih organizama omogućen je kompleksom proteina koji uključuje ATG1 - ULK (engl. *Unc-51-like kinase*) 1 ili 2, ATG13, RB1CC1/FIP200 (engl. *RB1-inducible coiled-coil 1*) i ATG101 koji se vezuje za ATG13 (Kundu i Thompson, 2008). Glavni negativni regulator procesa autofagije je mTORC1 (engl. *mechanistic target of rapamycin complex 1*), koji ujedno predstavlja i jedan od ključnih regulatora signalnih puteva u ćeliji. Ovaj kompleks fosforiliše ULK1/2 i ATG13, čime se inhibira indukcionni kompleks (Hosokawa i sar., 2009). U uslovima ćelijskog stresa i deficijencije nutrijenata, kinazna aktivnost mTORC1 kompleksa je inaktivirana, što dovodi do aktivacije indukcionog kompleksa (Kundu i Thompson, 2008).

2. Nukleacija, elongacija i sazrevanje nastalih autofagozoma - Nakon inicijacije procesa autofagije, naredni korak predstavlja formiranje membranskih odeljaka u kojima se skladišti materijal za degradaciju. Za ovu fazu autofagije zalužan je kompleks koji sačinjavaju katalitička subjedinica tipa 3 fosfoinozitol kinaze (PIK3C3)/VPS34, beclin-1 (BECN1), ATG14 i UVRAG (engl. *UV irradiation resistance-associated tumor suppressor gene*) (Hosokawa i sar., 2009). Uloga ovog proteinskog kompleksa je formiranje fosfatidilinozitol (PI) 3-fosfata, ključnog membranskog proteina uključenog u regulaciju unutarćelijskog transporta vezikula (Parzych i Klionsky, 2014). Proces nukleacije regulusan je različitim proteinima. Antiapoptotski protein BCL2 (engl. *B-cell lymphoma 2*), kao i Rubicon inhibiraju proces nukleacije vezujući se za BECN1 i PIK3C3 (Nascimbeni i Codogno, 2017).

Pored negativnih regulatora, značajan broj pozitivnih regulatora procesa nukleacije učestvuje u održavanju ravnoteže između aktivacije i inhibicije autofagije. BNIP 3 (engl. *BCL2-related BH3-only protein*) je inhibitorski molekul BCL2, čijom se aktivnošću omogućuje uklanjanje inhibitorskog efekta BCL2 u slučajevima hipoksije i deficijencije nutrijenata (Hosokawa i sar., 2009). Nakon nukleacije, u procesu elongacije dolazi do formiranja autofagozomalnih vezikula. U ovom procesu ključnu ulogu imaju dva konjugaciona enzimska sistema, slična po funkciji i enzimskom mehanizmu ubikvitin konjugujućim enzimima (Klionsky i sar., 2016). Prvi sačinjavaju ATG7 protein sa funkcijom E1 aktivirajućeg enzima i ATG10 sa funkcijom E2 konjugujućeg enzima. Ova dva enzima omogućavaju kovalentno vezivanje ATG12 i ATG5 koji sa ATG16L1 formiraju kompleks sličan E3 ligazi. ATG4 svojom enzimskom aktivnošću iseca LC3-I (engl. *microtubule-associated protein light chain 3*), koji se zatim vezuje se za fosfatidiletanolamin i formira LC3-II kao jedan od glavnih markera autofagozoma (Nascimbeni i sar., 2017).

3. Formiranje autolizozoma i razgradnja ćelijskog sadržaja - Nakon formiranja dvostruke membrane autofagozoma sledi njena fuzija sa lizozomima u cilju degradacije ćelijskog materijala. Različiti stresni stimulusi poput gladovanja i oksidativnog stresa dovode do nakupljanja lizozoma u perinuklearnom regionu, dok se autofagozomi formiraju na periferiji citosola. Kako bi se omogućila fuzija, formirani autofagozomi se transportuju duž mikrotubularnih filamenata u perinuklearni region ćelije uz pomoć motornog proteina dineina. Transport autofagozoma u neuronima uslovljen je njihovom specifičnom građom. Naime, autofagozomi se najpre fuzionišu sa endozomalnim vezikulama obogaćenim dineinom, a zatim se transportuju u deo ćelije u kojem se odvija fuzija (Cheng i sar., 2015). Proces fuzije i formiranje autolizozoma posredovan je proteinima iz SNARE familije (engl. *Soluble N-ethylmale-imide-sensitive factor-attachment protein receptors*) i to Ykt6 i sintaksin-17 (Stx17) kao i Rab GTP-aznim enzimima koji se nalaze na spoljašnjoj membrani fagozoma i omogućavaju potpuno zatvaranje lipidne membrane (Weidberg i sar., 2010). U slučaju selektivne autofagije, materijal za degradaciju nalazi se u kompleksu sa membranskim receptorom označenim kao sekvestozom 1 (engl. *sequestosome*, SQSTM1/p62) (Itakura i sar., 2012). p62 receptor se direktno vezuje za LC3 i razgrađuje zajedno sa ćelijskim materijalom dejstvom lizozomalnih hidrolitičkih enzima (Bjorkoy i sar., 2009). Prema preporukama za ispitivanje procesa autofagije (Klionsky i sar., 2016), merenje nivoa p62 i LC3-II proteina koristi se u analizi autofagnog fluksa. Disbalans u procesu autofagije može dovesti do nakupljanja p62 u citosolu, koji se u slučaju neurona mogu detektovati u formi inkluzionih tela (Klionsky i sar., 2016). Nakon degradacije ćelijskog materijala, autolizozomi se razgrađuju u procesu koji se označava kao ALR (engl. *autophagic lysosome reformation*) (Rong i sar., 2012).

Proces autofagije regulisan je na translacionom i transkripcionom nivou. Translaciona regulacija ostvaruje se prevashodno aktivnošću proteina iz ATG familije. S obzirom na kompleksnost odnosa autofagije i apoptoze, značajan broj proteina ima ulogu u signalnim putevima koji kontrolišu oba procesa. Jedan od takvih proteina je beclin-1, koji pored uloge u indukciji autofagije, pripada familiji proteina sa BH3 domenom. Članovi BCL2 familije proteina se vezuju za BH3 domene beklina-1 i na taj način blokiraju autofagiju (Robert i sar., 2012). Takođe, kaspaze 3 i 8 mogu koristiti beclin-1 kao supstrat, pri čemu se sudbina ćelije usmerava ka apoptozi. p62, glavni supstrat autofagije, može interagovati sa kaspazom 8, čime se pojačava ćelijska smrt indukovana inhibicijom BCL2 (Zhang i sar., 2015). Pored translacione regulacije, proces autofagije regulisan je i transkripciono, aktivnošću ključnih transkripcionih faktora FOXO familije (engl. *Forkhead Box O*) 1 i 3 i ATF4 (engl. *activating transcription factor 4*) (Mizushima, 2011).



Slika 6. Faze autofagije

Fagofora se formira u citosolu u procesu konjugacije sa ATG familijom proteina. LC3-II membranska forma konjugovana sa fosfatidiletanolaminom označava membranu autofagozoma. Autofagozom se fuzioniše sa lizozomom formirajući autofagolizozom, u kome se razgrađuje ćelijski materijal (Kotiadis i sar., 2013).

1.5 Uticaj grafenskih kvantnih tačaka na proces autofagije

Uticaj nanočestica na ćelijske procese je kompleksan. Imajući u vidu njihovu internalizaciju, koja se odvija najverovatnije endocitozom, nanočestice podležu ubikvitinaciji u cilju njihovog daljeg sekvstriranja u fagoforama (Medema, 2010). Hemijski sastav i veličina nanočestica od presudnog su značaja za uticaj na autofagiju. Nanočestice mogu uticati na proces autofagije dvojako. Sa jedne strane, nakon internalizacije uočava se povećano formiranje autofagozoma i pojačan autofagni fluks, dok sa druge strane prisustvo nanočestica može dovesti do blokade procesa autofagije (Carlson i sar., 2008). Nanočestice mogu da suprimiraju autofagiju inhibicijom transporta autofagozoma (engl. *autosome trafficking*) zbog oštećenja citoskeleta, kao i smanjenjem aktivnosti i stabilnosti lizozoma (Zheng i sar., 2009). U oba slučaja nanočestice dovode do povećane akumulacije LC3-II, dok dejstvo na p62 zavisi od tipa nanočestica. Fulereni i njihovi derivati dovode do akumulacije autofagozoma i potpune blokade autofagnog fluksa (Stern i sar., 2012), dok u citotoksičnim koncentracijama mogu da aktiviraju autofagiju produkcijom RKV (Zhang i sar., 2009). Za razliku od fulerena, kvantne tačke, aluminijumske, silicijumske, TiO_2 i paladijumske nanočestice dovode do aktivacije autofagije inhibicijom mTOR kompleksa ili povećanjem fosforilacije proteina BCL2 familije (Markovic i sar., 2012).

Grafen oksid (GO) indukuje autofagiju aktivacijom c-Jun N-terminal kinaze (JNK) i posledičnom fosforilacijom inhibitora autofagije BCL2. Takođe, GO povećavaju unutarćelijsku koncentraciju Ca^{2+} , koja zatim aktivacijom MAP kinaza indukuje autofagiju (Zhang i sar., 2009). *In vitro* studija o uticaju GKT na oksidativni stres izazvan visokim dozama H_2O_2 potvrdila je sposobnost neosvetljenih GKT da snižavaju unutarćelijske koncentracije RKV i odnos pro- i

anti-apoptotskih proteina (BAX/BCL2), kao i da aktiviraju autofagiju inhibicijom mTOR signalnog puta (Hua i sar., 2019). S druge strane, nakon ekscitacije svetlošću talasne dužine 470 nm, GKT indukuju citotoksičnu autofagiju produkcijom RKV, što predstavlja prvu potvrdu uloge autofagije u fotodinamičkom dejstvu GKT (Markovic i sar., 2012). Pored *in vitro* ispitivanja, dejstvo GKT na autofagiju je takođe ispitivano i u *in vivo* studijama. Intravenozna administracija GKT je, smanjenjem aktivnosti procesa autofagije i apoptoze, dovela do smanjenja konkanavalinom-A indukovano oštećenja jetre (Volarevic i sar., 2014). Takođe, *in vivo* ispitivanja su pokazala da GKT smanjuju demijelinizaciju, oštećenja aksona i posledičnu smrt nervnih ćelija CNS u eksperimentalnom modelu neuroinflamacije. Međutim, uloga autofagije u neuroprotektivnom dejstvu GKT do sada nije ispitivana.

U ovoj doktorskoj disertaciji će prvi put biti ispitano neuroprotektivno dejstvo GKT u oksidativnom stresu izazvanom SNP tretmanom *in vitro*, kao i njegovi molekularni mehanizmi. Antioksidativno dejstvo GKT i sposobnost modulacija autofagije kao jednog od osnovnih mehanizama za održavanje ćelijske homeostaze mogli bi da budu od izuzetnog značaja za razvoj GKT kao potencijalnih neuroprotektivnih agenasa. Imajući u vidu da se oksidativni stres i disfunkcija autofagije nalaze u osnovi patologije različitih neurodegenerativnih i neuroinflamatornih oboljenja, rezultati ove doktorske disertacije mogli bi da doprinesu boljem razumevanju neuroprotektivnog dejstva GKT i njihovog terapijskog potencijala.

2. Ciljevi

Imajući u vidu da neuroprotektivno dejstvo GKT u modelu oksidativnog stresa izazvanog SNP-om do sada nije ispitivan, u okviru ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

- Ispitati citoprotektivno dejstvo GKT u oksidativnom stresu izazvanom SNP-om u SH-SY5Y neuronskim ćelijama *in vitro*.
- Ispitati mehanizme i ulogu modulacije reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta u neuroprotektivnom dejstvu GKT u modelu oksidativnog stresa izazvanog SNP-om *in vitro*.
- Ispitati mehanizme i ulogu autofagije u neuroprotektivnom dejstvu GKT u oksidativnom stresu izazvanom SNP-om *in vitro*.

3. Materijal i metode

3.1 Reagensi i rastvori

U izradi ove doktorske disertacije korišćeni su sledeći reagensi: medijum za kultivaciju ćelija – mešavina Opti-MEM (engl. *Dulbecco's Minimal Essential Medium*) i F12 medijuma (1:1) (PAA Laboratories); medijum za kultivaciju ćelija - RPMI-1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute Medium*); serum fetusa govečeta (engl. *fetal calf serum*, FCS); L-glutamin; neesencijalne amino kiseline (GIBCO); rastvor antibiotika i antimikotika (PAA Laboratories); PBS (engl. *phosphate buffered saline*) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ i 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4); tripsin; SNP; dietilentriamin pentaacetat; 4,7-difenil-1,10-fenantrolindisulfonska kiselina (BPDSA) (Merck); 5-(2,6-Difluorofenoksi)-3-[[3-metil-1-okso-2-[(2-kvinolinil-karbonil)amino] butil]amino]-4-okso-hidrat pentanoične kiseline (Q-VD-OPh-hidrat) (Merck); bafilomicin A1; hlorokin (Bio-Techne); amonijum hlorid; 3-metiladenin (Merck); N-acetilcistein (NAC); dietilamonijum (Z)-1-(N,N-dietilamino)diazen-1-ium-1,2-diolat (DEA-NONOat) (Cayman Chemicals); superoksid dismutaza (SOD); dimetilsulfoksid (DMSO); tokoferol/vitamin E; 4,4,5,5-tetrametilimidazol-1-oksil 3-oksil (PTIO); mokračna kiselina; natrijum nitrit; tiobarbiturna kiselina; 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT); kristal violet (Merck); fosforna kiselina; natrijum hidroksid; hlorovodonična kiselina; metanol; etanol; gvožđe (II) sulfat; vodonik peroksid; natrijum salicilat; glicerol; paraformaldehid (Hemofarm); tripan plavo (Thermo Fisher Scientific); Grisov reagens (vodeni rastvor 0.1% naftiletilendiamin dihidrohlorida sa dodatkom 1% sulfanilamida u 5% fosfornoj kiselini) (Merck); propidijum jodid (BD Pharmingen); aneksin V-FITC (BD Biosciences); Rnaza; 5,6,6-tetrahaloro1,1,3, tetraetilbenzimidazilkarbocijanin jodid (JC-1), dihidroetidijum (DHE); diaminofluorescein (DAF); dihidrorodamin 123 (DHR); 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH); akridin oranž; nitro plavi tetrazolijum hlorid (NBT) (Thermo Fisher Scientific); mitohondrijalni kit za detekciju hidroksilnog radikala (Abcam); 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH); p-nitrofenil fosfat; Tween 20; TRIS; natrijum acetat; triton X-100 (Merck); kit za izolaciju RNK (Qiagen), TaqMan prajmeri i probe, dezoksinukleotidi, pufer za reverznu transkripciju; reverzna transkriptaza (Thermo Fisher Scientific); akrilamid/bisakrilamid (30% w/v); natrijum dodecil sulfat (SDS); N, N, N', N'-tetrametiletilen-1, 2-diamin (TEMED) (Serva); koktel inhibitora proteaza; natrijum ortovanadat (Merck); nitrocelulozne membrane (Bio-Rad); natrijum fluorid; odmašćeno mleko u prahu (Carl Roth); smeša referentnih proteina (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US); zečja antitela na fosforilisanu i/ili totalnu formu proteina caspaze-2; Poli (ADP-riboza) polimeraza-1 (PARP-1); AKT, PRAS40, p38, mTOR, LC3, β-aktin (Cell Signaling Technology); sekvestozom-1/p62; beklin-1 (Novus Biologicals, Littleton); sekundarno kozje anti-zečje IgG antitelo konjugovano sa peroksidazom rena (Jackson ImmunoResearch Laboratories); reagens za hemiluminiscenciju (GE Healthcare Life Sciences); osmijum tetraoksid; kakodilatni pufer (Merck); sarkozin-N-ditiokarbamat (DTCS) (Ramidius AB); 5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirolin-N-oksil (DEPMPO) (Focus Biomolecules); N-acetil cistein; redukovani glutation; dietilentriaminopentasilrćetna kiselina (DTPA) (Merck).

3.2 Sinteza i karakterizacija GKT

GKT su sintetisane elektrohemijском metodom kako je prethodno opisano (Ristic i sar, 2014; Markovic i sar., 2012). Mehanizam sinteze zasniva se na elektrohemijскоj oksidaciji grafitnih elektroda koje su uronjene u 3% rastvor NaOH u etanolu (96%) pri struji intenziteta 20 mA. Nakon inicijalne oksidacije, rastvor GKT je neutralisan HCl, a NaCl dobijen neutralizacijom uklonjen filtriranjem. Preostali etanol uklonjen je isparavanjem. Formirani prah grafena rastvoren je u acetonu radi uklanjanja hidrofobne frakcije. GKT su rastvorene u vodi (po uklanjanju acetona) i

dalje prečišćene dijalizom. Iz vodenog rastvora, GKT su dobijene u obliku praha uparavanjem pod sniženim pritiskom. Prah GKT rastvoren je u fiziološkom rastvoru u koncentraciji od 1 mg ml⁻¹. Rastvor GKT čuvan je na +4 °C u mraku.

Nakon sonifikacije u demineralizovanoj vodi (0.25 mg ml⁻¹), UV-Vis spektar GKT meren je na sobnoj temperaturi i atmosferskom pritisku koristeći Cintra 6 spektrofotometar (GBC Scientific Equipment). UV-Vis spektroskopija se bazira na korišćenju monohromatskog snopa svetlosti iz ultraljubičastog (UV) i vidljivog dela spektra i pojedinačnom merenju apsorpcione sposobnosti uzoraka na različitim talasnim dužinama. Molekuli koji poseduju nesparene elektrone apsorbuju energiju u formi svetlosti, čime se omogućava tranzicija elektrona u molekulske orbitale više energije (Sooväli i sar., 2006). Za potrebe spektrofotometrijskog merenja korišćene su kvarcne ćelije dužine 1 cm i ukupne zapremine od 4 ml. Hemijska struktura GKT ispitivana je *Fourier Transform-InfraRed* (FTIR) spektroskopijom koristeći Nicolet 6700 FTIR instrument (Thermo Fisher Scientific). FTIR spektroskopija se bazira na korišćenju polihromatskog snopa svetlosti i merenju apsorpcione sposobnosti uzorka pri kombinaciji različitih talasnih frekvencija (Griffiths i de Hasseth, 2007). Spektri su mereni u uslovima atenuirane totalne refleksije na spektralnoj rezoluciji od 2 cm⁻¹. Fotoluminiscentne karakteristike GKT ispitivane su Jobin Yvon Fluoromax-4 spektrometrom (Horiba). Vodena disperzija GKT (finalna koncentracija 0.25 mg ml⁻¹) stavljena je u kvarcnu ćeliju dužine 1 cm i zapremine 4 ml. Spektri GKT mereni su na sobnoj temperaturi i uslovima atmosferskog pritiska, koristeći talasne dužine ekscitacije od 300 do 400 nm.

Morfološke karakteristike (visina i lateralne dimenzije) GKT proučavane su metodom mikroskopije atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM). Ova metoda se zasniva na interakciji između čestica na površini ispitivanog uzorka i čestica koje se nalaze na površini merne sonde. Merenjem intenziteta sile određuje se rastojanje od ispitivanog uzorka i formira slika. Uzorak GKT nanešen je na mineral liskun (sušenje na 60 °C, 1 h), a analiza je rađena na Quesant mikroskopu u visoko amplitudnom dinamičkom režimu na 20 °C. Korišćene su AFM Q-WM300 monolitijumske silicijumske probe za visokofrekventnu beskontaktnu primenu i standardne silicijumske iglice (Nano and More GmbH) sa konstantom sile od 40 N m⁻¹ (Markovic i sar., 2012). Za analizu dobijenih podataka korišćen je javno dostupan Gwyddion softver (<http://gwyddion.net>). Morfologija i struktura GKT takođe su ispitivani transmissionom elektronskom mikroskopijom visoke rezolucije (engl. *high resolution transmission electron microscopy*, HR-TEM). Ova metoda se zasniva na merenju interakcije snopa elektrona sa tankim slojem uzorka. HR-TEM daje informacije o obliku i veličini čestica, kao i načinu uređenja atoma u kristalnoj strukturi uzorka. Vodena disperzija GKT u finalnoj koncentraciji (1 mg ml⁻¹) naneta je na bakarne mreže obložene ugljenikom i analizirana koristeći JEM-2100F mikroskop (JEOL). Dobijene mikrografije analizirane su uz pomoć Image Lab softvera (Bio-Rad Laboratories).

3.3 Ćelije i ćelijska kultura

Uticaj GKT i SNP ispitivan je na dva tipa ćelija u kulturi: SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma i U251 ćelijama humanog glioma. SH-SY5Y ćelije nabavljene su od ATCC (*American Type Culture Collection*), dok su U251 ćelije nabavljene od ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*). Obe ćelijske linije gajene su u inkubatoru na temperaturi od 37 °C u uslovima sa 96% vlažnosti vazduha i 5% CO₂. Za SH-SY5Y ćelije korišćen je medijum od modifikovanog MEM i F12 medijuma (1:1) u koji su dodati 10% FCS, 2 mM L-glutamin, 1% neesencijalne aminokiseline i 1% rastvor antibiotika/antimikotika (PAA). Za U251 ćelije korišćen je RPMI 1640 medijum sa 20 mM HEPES pufera, 5% FCS, 2 mM L-glutamina i 1% rastvora antibiotika/antimikotika. Nakon odmrzavanja iz tečnog azota, ćelije su dalje propagirane u Petrijevim posudama prečnika 100 mm.

Nakon dostizanja 80% konfluentnosti, ćelije su odvajane od podloge koristeći tripsin, centrifugirane (500 g, 5 minuta) i dalje zasejavane u različitim gustinama. U cilju određivanja vijabilnosti, ćelije su sadene u polistirenske ploče sa 96 bunara i ravnim dnom u gustini od 3×10^4 ćelija po bunaru. Za analize na protočnom citofluorimetru, ćelije su sadene u polistirenske ploče sa 24 bunara i ravnim dnom u gustini od 3×10^5 ćelija po bunaru. Za imunoblot i TEM analizu, 7×10^6 ćelija zasađeno je u polistirenske Petri šolje prečnika 100 mm. Nakon 24 h od zasejavanja, ćelije su tretirane sa GKT i/ili SNP, pri čemu su GKT dodavane 30 minuta pre SNP. Nakon dodavanja GKT i/ili SNP, ćelije su dalje tretirane različitim reagensima, detaljno objašnjenim u okviru prikazanih rezultata. Pored SNP, ćelije su tretirane drugim donorima NO, kao što su dietilamin NONOat i SNAP, dok su GKT zamenjene drugim supstancama sa antioksidativnim sposobnostima kao što su glutathion, NAC, SOD, DMSO i tokoferol. Detalji tretmana, uključujući trajanje inkubacije i koncentracije korišćenih reagenasa dati su u legendama slika u okviru prikazanih rezultata.

3.4 Testovi vijabiliteta

Uticaj GKT i SNP na preživljavanje ćelija humanog neuroblastoma i glioma određivani su kolorimetrijskim testovima vijabiliteta. Ovi testovi se zasnivaju na merenju aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze, kao i broja živih ćelija pričvršćenih za podlogu kultivacione ploče.

3.4.1. Test aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze (MTT)

Unutarćelijski enzim mitohondrijalna dehidrogenaza redukuje tetrazolijumsku so MTT, pri čemu nastaje nesolubilno ljubičasto jedinjenje formazan. Mitohondrijalna dehidrogenaza je aktivna i poseduje sposobnost redukcije MTT samo u živim ćelijama. Na osnovu ove sposobnosti, test redukcije MTT se koristi za određivanje vijabiliteta ćelija, njihove metaboličke aktivnosti i proliferacije. SH-SY5Y i U251 ćelije zasejane se u polistirenske ploče sa 96 bunara sa ravnim dnom i tretirane odgovarajućim agensima. Nakon inkubacije uklonjen je medijum za kultivaciju i dodato je 50 μ l rastvora MTT u koncentraciji od 0.5 mg ml⁻¹. Posle inkubacije od 1 h na 37 °C, supernatanti su uklonjeni i dodato je 50 μ l/bunaru rastvora DMSO u cilju rastvaranja nastalog formazana karakteristične ljubičaste boja. Intenzitet nastalog obojenog rastvora bio je proporcionalan broju živih ćelija sposobnih da formiraju formazan. Merenje apsorbance (570 nm) vršeno je na spektrofotometrijskom čitaču (Sunrise; Tecan, Dorset, UK). Vrednost apsorbance MTT rastvora u odsustvu ćelija oduzeta je od vrednosti apsorbance uzoraka i dobijeni rezultati su prikazani kao % apsorbance izmerene u kontrolnim, netretiranim ćelijama čija je vijabilnost 100%.

3.4.2. Kristal violet test

Kristal violet je supravitalna boja koja se vezuje za proteine i nukleinske kiseline i koristi za određivanja relativnog broja živih, adherentnih ćelija (Flick i Gifford, 1984). Test je izvođen u pločama sa 96 bunara. Nakon tretmana, ćelije su više puta ispirane PBS-om u cilju odstranjivanja mrtvih, neadherentnih ćelija. Nakon ispiranja ćelije su fiksirane 10 minutnom inkubacijom sa apsolutnim metanolom na sobnoj temperaturi. Fiksirane ćelije bojene su 1% rastvorom kristal violeta (50 μ l/bunaru) u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Ploče su više puta ispirane dejonizovanom vodom kako bi se odstranio višak boje koja nije vezana za adherentne ćelije. Obojene ćelije su zatim inkubirane sa 33% sirćetnom kiselinom (50 μ l/bunaru) u cilju rastvaranja boje. Intenzitet boje određivan je merenjem apsorbance na talasnoj dužini od

570 nm, koristeći spektrofotometrijski čitač (Sunrise; Tecan, Dorset, UK). Blanko vrednost apsorbance kristal violet boje oduzeta je od dobijenih vrednosti apsorbance uzorka. Dobijeni rezultati predstavljeni su kao % vijabilnosti ćelija u tretmanu u odnosu na netretirane (kontrolne) ćelije čija se vijabilnost smatra 100%.

3.4.3. Procena antagonističkog dejstva tretmana

Efekti kombinovanih tretmana mogu biti aditivni, sinergistički i antagonistički. Procena antagonističkog efekta kombinacije SNP i GKT na vijabilnost ćelija određivana je izračunavanjem α indeksa po formuli:

$$\alpha = SF_A \times SF_B / SF_{A+B}$$

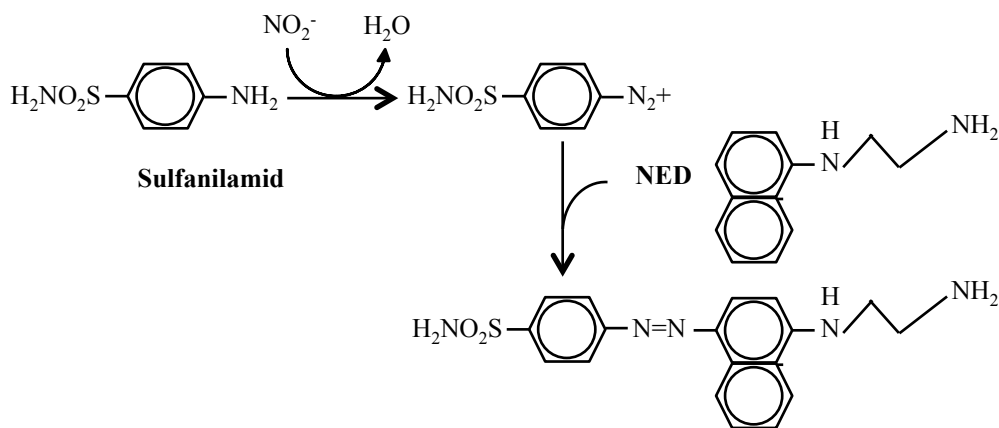
gde SF_A i SF_B predstavljaju procenat živih ćelija nakon tretmana A i B, dok SF_{A+B} prestavlja procenat živih ćelija nakon kombinovanog tretmana agensima A i B. U ovoj analizi, $\alpha = 1$ ukazuje na aditivni efekat, $\alpha > 1$ na sinergistički efekat, dok $\alpha < 1$ ukazuje na antagonistički efekat kombinovanja agenasa.

3.5 Fazno-kontrastna mikroskopija

Za analizu morfoloških promena na ćelijama korišćen je fazno-kontrastni invertni mikroskop Leica DMIL sa ukupnim uveličanjem od 400 x, opremljen DCF320 kamerom i Leica Application Suite (v2.8.1) softverom (Leica Microsystems).

3.6 Određivanje produkcije NO• u supernatantima

Za merenje koncentracije NO• korišćen je Griess-ov reagens (Griess, 1879). Merenje se zasniva na određivanju koncentracije nitrita (NO_2^-) kao stabilnog produkta metabolizma NO• u prisustvu 1% sulfanilamida i 0.1% N-1-naftiletilendiamin dihidrohlorida u sredini sa niskom pH vrednošću (5% H_3PO_4). Esej se bazira na reakciji modifikovane diazotizacije (Slika 7). Po završetku tretmana, 50 μl ćelijskog supernatanta izdvojeno je u novu ploču i u svaki bunar dodata je ekvimolarna količina Griess-ovog reagensa. Nakon 10 minuta inkubacije u mraku na sobnoj temperaturi, razvija se ljubičasta boja rastvora čiji je intenzitet meren na spektrofotometrijskom čitaču (Sunrise; Tecan, Dorset, UK) na talasnoj dužini od 570 nm. U cilju kvantifikacije koncentracije NO_2^- napravljena je standardna kriva poznatih koncentracija NO_2^- . Vrednost apsorbance medijuma bez ćelija oduzeta je od dobijenih vrednosti apsorbance uzoraka.



Slika 7. Reakcija diazotizacije koja se nalazi u osnovi merenja NO_2^- Griess-ovom reakcijom (preuzeto sa worldwide.promega.com)

3.7 Određivanje nivoa lipidne peroksidacije

U toku oksidativnog stresa, povećane koncentracije RKV i RAV vode oksidaciji i nitraciji makromolekula, što narušava njihov strukturni integritet. Jedan od primera ćelijskog oštećenja karakterističnog za oksidativni stres je proces lipidna peroksidacije. Za ispitivanje nivoa lipidne peroksidacije korišćen je kolorimetrijski test detekcije malonildialdehida (MDA). MDA predstavlja sekundarni produkt lipidne peroksidacije i može se detektovati u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom. Produkt reakcije je hromogeno jedinjenje malonilaldehid-bi-(dimetilacetal)1,1,3,3-tetrametoksipropan, koje se može detektovati kolorimetrijski. Čelije su zasejane u polistirenske petri šolje prečnika 100 x 20 mm. Nakon uspostavljanja gustine od 7×10^6 po petri šolji, ćelije su tretirane GKT i SNP u odgovarajućim koncentracijama. Nakon tretmana, ćelije su odvojene od podloge tripsinizacijom i homogenizovane koristeći hladnu 10% trihlorsirćetnu kiselinu. Nakon 10 minuta centrifugiranja na 800 g, dobijeni supernatanti pomešani su u ekvimolarnim količinama sa 0.6 % 2-tiobarbiturnom kiselinom i inkubirani u vodenom kupatilu 10 minuta na temperaturi od 100° C. Apsorbanca formiranog kompleksa merena je na talasnoj dužini od 535 nm koristeći spektrofotometrijski čitač (Sunrise; Tecan, Dorset, UK). Rezultati su prikazani kao relativna promena u odnosu na izmerenu apsorbancu netretiranih (kontrolnih) ćelija.

3.8 Analiza parametara ćelijske smrti

Parametri ćelijske smrti analizirani su metodom protočne citofluorimetrije na FACSCalibur (BD Biosciences) aparatu. Analizirano je 10.000 ćelija po uzorku pomoću BD Cell Quest Pro softvera (BD Biosciences).

3.8.1. Analiza fragmentacije DNK

Analiza fragmentacije DNK vršena je metodom protočne citofluorimetrije. Čelije su fiksirane u etanolu, a zatim bojene propidijum jodidom (PI) po prethodno opisanom protokolu (Raicevic i sar., 2005). PI je fluorescentna boja koja se vezuje za dvolančani molekul DNK.

Emisioni maksimum PI je u crvenom delu spektra, a njegova fluorescencija se pobuđuje svetlošću talasne dužine od 488 nm. Intenzitet emitovane svetlosti direktno je proporcionalan količini DNK u uzorku. U kasnoj fazi apoptoze endonukleaze isecaju molekul DNK na fragmente veličine 180 baznih parova, pa apoptotične ćelije imaju smanjenu količinu DNK, a samim tim i nižu fluorescenciju PI. Ćelije su sadene u ploče sa 24 bunara u odgovarajućoj gustini. Nakon tretmana, ćelije su odvojene od podloge procesom tripsinizacije i više puta ispirane PBS-om (300 μ l/bunaru), a zatim resuspendovane u 300 μ l PBS i fiksirane sa 700 μ l hladnog 70% etanola. Resuspendovane ćelije držane su na temperaturi od +4°C preko noći. Sledećeg dana, ćelije su centrifugirane (22 °C), 5 minuta na 800g. Zatim su talozi ćelija isprani PBS-om (300 μ l/bunaru) i resuspendovani u 300 μ l PBS-a uz dodatak 0.1 % Triton X-100 i 1 mg ml⁻¹ RNAze. Inkubacija sa RNazama tokom 15 minuta, razgrađuje RNK molekule u uzorku pre dodavanja PI, čime se sprečava njegovo vezivanje za RNK. Resuspendovane ćelije inkubirane su 30 minuta na 37 °C sa 0.05 mg ml⁻¹ PI. Uzorci obojenih ćelija analizirani su na protočnom citofluorimetru. Na histogramu distribucije intenziteta fluorescence crvenog spektra (FL2) apoptotične ćelije nalaze se ispred ćelija sa intaktnom DNK u G0/G1 fazi ćelijskog ciklusa. Rezultati su predstavljeni kao procenat sub-G₀/G₁ ćelija u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija.

3.8.2. Analiza apoptoze i nekroze

Tip ćelijske smrti nakon tretmana određivan je metodom protočne citofluorimetrije, korišćenjem dvostrukog bojenja aneksin V-fluorescein izotiocijanatom (Aneksin V-FITC) i PI. Aneksin V-FITC je fluorescentno obeležen protein koji se visokim afinitetom vezuje za fosfatidilserinske ostatke. U slučaju netretiranih (kontrolnih) ćelija, fosfolipid fosfatidilserin lociran je na unutrašnjoj strani ćelijske membrane, dok se u procesu apoptoze premešta na spoljašnju stranu membrane. Promena pozicije fosfatidilserina karakteristična je za ranu fazu apoptoze, a narušen integritet ćelijske membrane i njena permeabilnost za PI karakteristike su kasne faze apoptoze i nekroze. Na osnovu dvostrukog bojenja aneksin V-FITC i PI mogu se razlikovati populacije ćelija koje se u kvadrantima dijagrama prikazuju kao kontrolne (Aneksin⁻/PI⁻), rano apoptotične (Aneksin⁺/PI⁻) i kasno apoptotične/nekrotične (Aneksin⁺/PI⁺). Ćelije su sadene u ploče sa 24 bunara u odgovarajućoj gustini. Nakon tretmana, ćelije su odvojene od podloge procesom tripsinizacije i više puta ispirane PBS-om (300 μ l/bunaru). Nakon ispiranja, ćelije su centrifugirane 5 minuta na 500 g (22 °C) i još jednom isprane PBS-om. Dobijeni ćelijski talog resuspendovan je u odgovarajućem puferu sa Aneksin V-FITC u koncentraciji od 2 μ g ml⁻¹ i PI u finalnoj koncentraciji od 20 μ g ml⁻¹. Dobijeni rezultati obrađeni su u CellQuest Pro softveru (BD GmbH) i prikazani kao procenat odgovarajuće podgrupe ćelija u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija.

3.8.3. Merenje membranskog potencijala mitohondrija

Mitohondrijalni membranski potencijal u ćelijama održava se konstantnim zahvaljujući nizu membranskih proteina čija je funkcija transport jona. Međutim, tokom apoptoze stvaraju se pore na membrani mitohondrija, što narušava ovaj transport i dovodi do depolarizacije mitohondrijalne membrane. U cilju merenja promene mitohondrijalnog membranskog potencijala ($\Delta\Psi$) korišćena je lipofilna katjonska boja JC-1 koja zahvaljujući svom pozitivnom naelektrisanju prolazi kroz membranu mitohondrija. Nakon ulaska, JC-1 formira agregate (takozvane J-agregate), koji emituju narandžasto-crvenu fluorescenciju (FL2). U slučaju apoptotskih ćelija, formirane pore na mitohondrijalnoj membrani narušavaju potencijal i onemogućavaju prolaz JC-1 boje, pa boja zaostaje u citosolu i ne podleže agregaciji.

Monomeri JC-1 fluoresciraju u zelenom delu spektra (FL1). Povećanje crvene fluorescence (FL2) ukazuje na rast membranskog potencijala i hiperpolarizaciju mitohondrijalne membrane, dok je povećanje zelene fluorescence indikator depolarizacije tj. pada membranskog potencijala. Čelije su zasađene u ploče sa 24 bunara u odgovarajućoj gustini. Nakon tretmana, čelije su odvojene od podloge tripsinizacijom i višestruko ispirane PBS-om (300 μ l/bunaru). Nakon ispiranja, čelije su centrifugirane 5 minuta na 500 g (22 °C) i još jednom ispirane PBS-om. Dobijeni čelijski talog resuspendovan je u 100 μ l rastvora JC-1 (finalna koncentracija 5 mg ml⁻¹) u odgovarajućem puferu. Čelije su inkubirane 20 minuta na 37 °C a potom ispirane sa 1 ml PBS u cilju uklanjanja nevezane boje. Pre merenja fluorescence na protočnom citofluorimetru, čelije su resuspendovane u PBS. Rezultati su predstavljeni kao odnos intenziteta zelene i narandžasto-crvene fluorescence (FL1/FL2), čiji porast u odnosu na kontrolne, netretirane čelije (FL1/FL2 = 1) ukazuje na depolarizaciju mitohondrijalne membrane.

3.9 Merenje autofagije protočnom citofluorimetrijom

Za kvantifikaciju autofagije protočnom citofluorimetrijom detektovan je broj čelijskih vezikula koje imaju nisku pH vrednost lumena (kisele vezikule). Za ovu analizu korišćena je pH senzitivna fluorohrom akridin oranž (AO) koji prolazi kroz čelijske membrane pri neutralnoj pH, a u vezikulama sa niskom pH vrednošću lumena biva protonovan. Protonizacija fluorohroma onemogućava napuštanje lumena vezikula. Pobuđivanje AO svetlošću talasne dužine 488 nm u vezikulama sa niskim pH vrednostima lumena (autolizozomi) vodi emitovanju crvene fluorescence (FL3). Pri neutralnim pH vrednostima (citosol), AO emituje zelenu fluorescencu (FL1). Čelije su zasađene u ploče sa 24 bunara u odgovarajućoj gustini. Nakon tretmana, čelije su ispirane sa 500 μ l PBS, a zatim inkubirane 15 minuta u rastvoru AO (1 μ M). Nakon inkubacije, čelije su centrifugirane 5 minuta na 500 g (22 °C) i oprane u 500 μ l PBS. Pred merenje, obojene čelije su resuspendovane u 500 μ l PBS. Rezultati merenja na protočnom citofluorimetru su predstavljeni kao odnos intenziteta crvene i zelene fluorescence (FL3/FL1) koji je u kontrolnim, netretiranim uzorcima sveden na 1.

3.10 Detekcija i merenje RKV i RAV u sistemu bez čelija

3.10.1. Određivanje antioksidativnog profila GKT

U cilju ispitivanja antioksidativnog profila GKT korišćen je DPPH, koji nakon rastvaranja postaje stabilan radikal (DPPH•) ljubičaste boje sa apsorpcionim maksimumom na 515 nm. Antioksidanti (A-H) i druge radikalske forme (R•) mogu reagovati sa DPPH• redukujući ga do 2,2-difenil-1-hidrazina (DPPH-H) ili supstitucionog analoga hidrazina (DPPH-R). Oba produkta redukcije karakterišu se svetlo žutom bojom. Promena u boji omogućava spektrofotometrijsko praćenje reakcije DPPH sa različitim antioksidantima (de Torre i sar., 2019). U cilju provere oksidativnog profila, rastvor GKT (1 mg ml⁻¹) razblažen je u Tris puferu (pH 7.4), dok je DPPH rastvoren u apsolutnom metanolu (MeOH). DPPH i GKT mešani su u ekvimolarnom odnosu. Nakon 30 minuta inkubacije, apsorbanca DPPH merena je na spektrofotometrijskom čitaču (Sunrise; Tecan) na 517 nm talasne dužine. Kao kontrola, korišćen je rastvor DPPH bez GKT. Rezultati su prikazani kao procenat intenziteta izmerene fluorescence u odnosu na kontrolni uzorak (100%).

3.10.2. Sposobnost GKT da neutrališe OH•

U cilju provere sposobnosti GKT da vezuju i neutrališe OH• korišćen je Smirnov-Kjumbsov test (engl. *Smirnov-Kjumbsov test*) (Smirnov i Cumbes, 1989). Esej se zasniva na dva sistema: prvom koji generiše OH• i drugom koji služi za vizuelizaciji prisutnog OH•. U cilju formiranja OH• koristi se smeša 1.5 mM FeSO₄ i 6 mM H₂O₂ (oba u PBS) koji u Fentonovoj reakciji grade OH•. Sistem za detekciju sastoji se od 20 mM natrijum-salicilata, soli salicilne kiseline, koja se u kontaktu sa OH• hidroksiliše i menja boju rastvora. Rastvor GKT (1 mg ml⁻¹) razblažen je u PBS (pH 7.4) do postizanja odgovarajućih koncentracija GKT (1 ml). Razblaženja GKT mešana su sa 2 ml reakcione smeše koja se sastoji od 1 ml (1.5 mM) FeSO₄, 0.7 ml (6 mM) H₂O₂ i 0.3 ml (20 mM) natrijum salicilata. Reakciona smeša je inkubirana 1 h na 37 °C u mraku. Apsorbanca novoizgrađenog hidroksilisanog salicilatnog kompleksa merena je na talasnoj dužini od 570 nm na spektrofotometrijskom čitaču (Sunrise; Tecan, Dorset, UK). Kao kontrola korišćena je reakciona smeša bez GKT. Rezultati su predstavljeni kao procenat izmerene fluorescence u odnosu na kontrolni uzorak (100%).

3.10.3. Sposobnost GKT da neutrališe O₂^{•-}

Sposobnost GKT da neutrališe O₂^{•-} ispitivana je koristeći rastvor DMSO (0.25 M H₂O) u 1 mM NaOH (Hyland i Auclair, 1981). Nivo generisanog O₂^{•-} meren je koristeći prethodno pomenuti NBT test. U reakciji nastalog O₂^{•-} i NBT formiraju se tamno plave granula formazana. Rastvor GKT (1 mg ml⁻¹) razblažen je u PBS (pH 7.4) do postizanja odgovarajućih koncentracija GKT (1 ml). Rastvori GKT mešani su sa alkalnim rastvorom DMSO i NBT rastvorom (0.1 mg ml⁻¹). Promena u boji formazanskog kompleksa merena je na spektrofotometrijskom čitaču (Sunrise; Tecan) na 570 nm. Kao kontrolni uzorak korišćena je smeša alkalnog rastvora DMSO i NBT bez GKT. Rezultati su predstavljeni kao procenat u odnosu na kontrolni rastvor (100%).

3.11 Elektronska paramagnetna rezonancija

Za analizu potencijala GKT da neutrališe različite RKV i RAV (OH•, O₂^{•-} i NO•), korišćena je metoda elektronske paramagnetne rezonance (EPR). EPR predstavlja neinvazivnu spektroskopsku tehniku za detekciju različitih paramagnetnih vrsta (slobodnih radikala, tranzitornih metalnih jona, biradikala i dr.) merenjem mikrotalasnog zračenja koje emituju ili apsorbuju nespareni elektroni u magnetnom polju (Atherton, 1973). Za potrebe EPR analize korišćeni su poznate hemijske reakcije u cilju generisanja različitih RKV i RAV: Fentonova reakcija za generisanje hidroksilnog radikala (OH•), fotostimulacija riboflavina za generisanje superoksidnog radikala (O₂^{•-}) i fotostimulacija SNP za oslobađanje radikala azot (II) oksida (NO•). U cilju identifikovanja interakcije GKT i OH• inicirana je Fentonova reakcija u prisustvu spinske probe DEPMPO po prethodno opisanom protokolu (Nakarada i sar, 2020). 29 µl GKT uzorka (26 µl vodenog rastvora GKT finalne koncentracije 0.87 mg ml⁻¹, 2 µl H₂O₂ finalne koncentracije 0.35 mM, 1 µl DEPMPO finalne koncentracije 3.5 mM) prebačeno je u teflonsku cev propustljivu za gasove i EPR signal je meren odmah nakon dodavanja 1 µl FeSO₄ (finalna koncentracija 0.15 mM) kao inicijatora Fentonove reakcije. Snimanje EPR spektra je rađeno pod sledećim uslovima: mikrotalasna snaga od 10 mW, mikrotalasna frekvencija od 9.85 GHz, modulaciona frekvencija od 100 kHz i modulaciona amplituda od 1 G. Za detekciju interakcije GKT i O₂^{•-}, korišćena je fotoaktivacija riboflavina kao u prethodno opisanom protokolu (Savic i Mojovic, 2012).

Naime, 23 μl GKT uzorka (finalna koncentracija 0.77 mg ml^{-1}) dodato je u prethodno napravljenu smešu od 3.5 μl H_2O , 5 μl vodenog rastvora DTPA (finalna koncentracija 4 mM) i 1 μl DEPMPO (finalna koncentracija 3.5 mM). Nakon dodavanja 7.5 μl vodenog rastvora riboflavina (finalna koncentracija 0.75 mM), uzorak je osvetljen snopom UV svetlosti snage 30 W u trajanju od 30 s. Dobijena smeša prebačena je u teflonsku cev propustljivu za gasove. EPR spektri mereni su 2 minuta nakon dodavanja riboflavina koristeći sledeće uslove: mikrotalasna snaga od 10 mW, mikrotalasna frekvencija od 9.85 GHz, modulaciona frekvencija od 100 kHz, modulaciona amplituda od 2 G u ukupnom broju od 5 akumulacija. Za ispitivanje interakcija GKT i NO radikala, korišćen je proces fotoindukovanog raspada SNP i oslobađanja $\text{NO}\cdot$. Za detekciju ove interakcije korišćen je kompleks $\text{Fe}(\text{DTCS})_2$ kao što je prethodno opisano (Stefánsson i sar., 2005). 25 μl GKT uzorka (19 μl vodenog rastvora GKT finalne koncentracije 0.63 mg ml^{-1} i 6 μl kompleksa $\text{Fe}(\text{DTCS})_2$ finalne koncentracije 0.1 M) prebačeno je u teflonsku cev propustljivu za gasove, a 5 μl vodenog rastvora SNP (finalna koncentracija 9 mM) je dodato neposredno pre početka merenja spektara. Spektar formiranog $\text{NO-Fe}(\text{DTCS})_2$ spinskog adukta meren je pri sledećim uslovima: mikrotalasna snaga od 10 mW, mikrotalasna frekvencija od 9.85 GHz, modulaciona frekvencija od 100 kHz i modulaciona amplituda od 2 G. Kao kontrola u svim merenjima korišćene su prethodno opisane smeše bez prisustva GKT. Eksperimentalno detektovani EPR spektri su kompjuterski simulirani (Bruker SpinFit softver) koristeći prethodno opisane parametre (Nakarada i sar., 2020). Za interpretaciju interakcija GKT i slobodnih radikala korišćeni su rezultati dobijeni iz najmanje dva merenja EPR spektara.

3.12 Detekcija i merenje RKV i RAV u ćelijama-

3.12.1. Detekcija RKV i RAV protočnom citofluorimetrijom

Merenje produkcije RKV i RAV određivana je metodom protočne citofluorimetrije koristeći redoks-senzitivne boje koje slobodno prolaze kroz ćelijsku membranu. DHR se nespecifično vezuje za različite RKV i oksiduje u katjonski rodamin koji emituje zelenu fluorescencu. DHE specifično vezuje superoksidni radikal ($\text{O}_2\cdot^-$) i gradi etidijum koji emituje crvenu fluorescencu nakon interkalacije u molekul DNK. DAF se specifično vezuje za RAV i to NO/ONOO^- , pri čemu nastaje crveno fluorescentni triazol. Ćelije su zasađene u ploče sa 24 bunara u odgovarajućoj gustini. DHR je dodavan u kulturu ćelija na početku tretmana u finalnoj koncentraciji od 2 μM . DHE (finalna koncentracija 20 μM) i DAF (finalna koncentracija 20 μM) su dodavani poslednjih 30 minuta tretmana na 37 °C. Nakon tretmana, ćelije su odvojene od podloge tripsinizacijom i višestruko ispirane PBS-om (30 μl /bunaru). Nakon ispiranja, ćelije su centrifugirane 5 minuta na 500 g (22 °C) i još jednom isprane PBS-om. Pre merenja na protočnom citofluorimetru, obojene ćelije su resuspendovane u 500 μl PBS. Rezultati su prikazani u formi histograma raspodele intenziteta fluorescence i to FL1 (zelena fluorescenca) za DHR i DAF, a FL2 (crveno-narandžasta fluorescenca) za DHE. Kao kontrolne ćelije, korišćene su netretirane obojene ćelije (FL1 i FL2 = 1).

3.12.2. NBT test za određivanje koncentracije $\text{O}_2\cdot^-$

NBT test se koristi za detekciju superoksidnog radikala ($\text{O}_2\cdot^-$) i indirektan je dokaz prisustva oksidativnog stresa u ispitivanom uzorku. Esej se zasniva na redukciji i precipitaciji NBT i formiranja tamno plavih granula formazana. Za ispitivanje prisustva $\text{O}_2\cdot^-$ nakon tretmana SNP i GKT korišćen je modifikovani NBT test (Vrablic i sar., 2001).

Rastvor NBT napravljen je mešanjem 3 mg NBT sa 1.5 ml medijuma za kultivaciju ćelija. Ćelije su zasađene u ploče sa 96 bunara ravnog dna i tretirane SNP-om i GKT u odgovarajućim koncentracijama. Na kraju tretmana, u svaki bunar dodato je 50 μ l NBT rastvora i ćelije su inkubirane 15 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, supernatanti su odliveni i ćelije su fiksirane u hladnom aposolutnom etanolu. U cilju kolorimetrijske detekcije, unutarćelijski formazan mešan je sa 1 M NaOH u DMSO. Apsorbanca je merena na spektrofotometrijskom čitaču na talasnoj dužini od 570 nm. Standardna kriva poznatih koncentracija NBT rastvorenih u NaOH korišćena je za kvantifikaciju. Kao pozitivna kontrola korišćene su ćelije inkubirane sa 100 μ M H₂O₂.

3.12.3. Utvrđivanje koncentracije OH• radikala u ćelijama

U cilju kvantifikacije unutarćelijske koncentracije OH• radikala korišćen je komercijalno dostupni fluorimetrijski test (*Mitochondrial Hydroxyl Radical Detection Assay Kit*; Abcam, Cambridge, UK). Test se zasniva na korišćenju visoko specifične probe OH580, koja prolazi kroz ćelijsku membranu i vezuje slobodne OH• radikale. Nakon interakcije sa OH• radikalom, OH580 proba generiše jak crveni signal koji se može detektovati spektrofotometrijski na talasnoj dužini ekscitacije od 540 nm i emisije od 590 nm. Analiza je urađena po uputstvu proizvođača. Ćelije su sađene u ploče sa 96 bunara ravnog dna i inkubirane sa OH580 probom 1 h na 37°C, a zatim tretirane sa SNP i GKT po prethodno uspostavljenom protokolu. Nakon tretmana, ćelije su isprane sa 1 ml PBS i u bunare je dodat OH580 esej pufer u kome je izvršeno merenje. Fluorescenca OH580 merena je spektrofotometrijskim čitačem Chameleon (Hidex, Turku, Finland), a rezultati su prikazani kao promena fluorescence tretiranih u odnosu na netretirane kontrolne ćelije čija je fluorescenca arbitrarno postavljena kao 1.

3.13 Imunoblot analiza

Za analizu aktivnosti proteina koji učestvuju u regulaciji autofagije i ćelijske smrti korišćena je metoda imunoblota (Qiu i sar., 2014). Princip imunoblot analize zasniva se na razdvajanju proteina iz ćelijskih ekstrakta na osnovu njihove molekulske mase koristeći denaturišuću elektroforezu na poliakrilamidnom gelu, pri čemu se razdvojeni proteini detektuju specifičnim antitelima.

3.13.1. Priprema ćelijskih ekstrakata

Ćelije su tretirane različitim agensima u Petri šoljama prečnika 100 mm. Nakon tretmana, ćelije su lizirane na ledu u puferu za liziranje (30 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 20 mg ml⁻¹ koktela proteaznih inhibitora, 50 mM NaF i 2 mM Na₃VO₄). Nakon liziranja, ćelijski lizati su centrifugirani 15 minuta na 14.000 g (4 °C). Dobijeni ćelijski ekstrakti korišćeni su za dalje analize i čuvani na -20 °C.

3.13.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentraciju proteina u ćelijskim ekstraktima merena je metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). Princip metode se zasniva na interakciji proteina i boje komazi plavo, pri čemu je apsorbanca na 570 nm direktno proporcionalna koncentraciji proteina u uzorku. Dobijeni

ćelijski ekstrakti mešani su sa Bradfordovim reagensom koji predstavlja rastvor 0.1 mg ml⁻¹ *Coomassie Brilliant Blue G-250*, 5% etanola i 10 % H₃PO₄ u destilovanoj vodi. Odnos ćelijskih ekstrakata i Bradfordovog reagensa bio je 1:1000. Promene apsorbance merene su na spektrofotometrijskom čitaču (Sunrise; Tecan) na talasnoj dužini od 570 nm. Za određivanje koncentracije proteina konstruisana je standardna kriva apsorbanci poznatih koncentracija rastvora albumina seruma govečeta (BSA; 5, 10, 15 i 20 mg ml⁻¹).

3.13.3. Denaturišuća gel elektroforeza (SDS PAGE)

Priprema uzoraka za proces elektroforeze podrazumeva kuvanje ćelijskih lizata (5 minuta na 100 °C) u redukujućem puferu (2% natrijum dodecilsulfat, 10% glicerol, 2 mM 2-merkaptotanol, 0,002 % bromofenol plavo, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8). Na ovaj način obezbeđena je denaturacija proteina, kao i njihovo obeležavanje negativno naelektrisanim natrijum dodecilsulfatom. Denaturisani i negativno naelektrisani proteini mogu se razdvajati isključivo na osnovu njihove molekulske mase. U cilju sprečavanja ponovnog formiranja tercijarne strukture proteina (renaturacija) u rastvore proteina je dodat 2-merkaptotanol. Razdvajanje proteina izvršeno je na poliakrilamidnim gelovima različitih gustina (8%, 10% i 12%). Sistem za razdvajanje proteina sastoji se od dva tipa gela:

1. **Gel za poravnanje** (4 % akrilamid/0.14 % bisakrilamid; 0.1 % SDS; 0.125 M Tris-HCl pH 6.8) koristi se kako bi se obezbedila ista početna pozicija proteinima pred proces razdvajanja. U bunare na vrhu gela nalivene su odgovarajuće koncentracije proteinskih uzoraka (10-40 µg). Količina nanetog uzorka zavisi od ispitivanog proteina kao i od prinosa nakon procesa izolacije proteinskog sadržaja ćelija.
2. **Gel za razdvajanje** (8 % akrilamid/0.28 % bisakrilamid; 10 % akrilamid/0.34 % bisakrilamid ili 12 % akrilamid/0.41 % bisakrilamid; 0.1 % SDS; 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8) u kojem se proteini razdvajaju na osnovu njihove molekulske mase.

Formiranje gelova zahteva njihovu polimerizaciju u prisustvu katalizatora 0.033 % TEMED-a i 0.05 % amonijumpersulfata. U cilju određivanja tačne molekulske mase proteina od interesa, korišćena je smeša proteina poznatih molekulskih masa (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder: Thermo Fisher Scientific). Poravnanje proteina vršeno je pri naponu od 100 V u trajanju od 20 minuta. Nakon poravnanja, proteini su razdvajani pri naponu od 150 V do dolaska obojenog fronta bromofenol plavo do kraja gela.

3.13.4. Detekcija proteina

Transfer proteina sa gelova na nitrocelulozne membrane (Hybond C, GE Healthcare) izvršen je uz pomoć aparata TE 70 Semi-dry transfer unit (Amersham Biosciences). U cilju uspostavljanja uslova za transfer proteina korišćen je odgovarajući pufer specifičnog sastava (192 mM glicin, 20 % metanol i 25 mM Tris-HCl, pH 8.3). Transfer je izvršen na sobnoj temperaturi pri konstantnom intezitetu struje (0.8 mA/cm² po membrani). Pozicija nitrocelulozne membrane (ka pozitivnoj elektrodi) i gelova (ka negativnoj elektrodi), omogućuje transfer negativno naelektrisanih proteina sa gela na membranu. Na osnovu molekulske mase proteina od interesa, membrana je isecana radi detekcije više različitih proteina na jednoj membrani. Delovi membrane su inkubirani u 5 % rastvoru odmašćenog mleka u TBS-T puferu (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.05 % Tween 20, pH 7.6). Inkubacija u odmašćenom mleku 45 minuta na sobnoj temperaturi omogućuje nespecifično vezivanje antitela.

Membrane su inkubirane preko noći sa primarnim (zečijim) antitelom od interesa na temperaturi od +4 °C uz konstantno mešanje.

Na ovaj način omogućeno je specifično vezivanje antitela za proteinske epitope na membrani (Towbin i Staehelin, 1979). Finalna koncentracija primarnih antitela postignuta je mešanjem sa rastvorom za blokiranje i to u sledećem odnosu: 1:900 za anti-LC-3; 1:1000 za anti-beklin-1, anti-kaspaza-2, anti-AKT, anti-p-AKT, anti-PRAS40, anti-p-PRAS40, anti-mTOR, anti-p-mTOR i anti-p62 i 1:2000 za anti- β -aktin. Nakon inkubacije sa primarnim antitelima, membrane su ispirane u TBS-T (3 x 10 minuta) kako bi se odstranila većina nespecifično vezanih antitela. Nakon ispiranja, membrane su inkubirane 60 minuta sa sekundarnim, kozijim, anti-zečijim IgG antitelom konjugovanim sa peroksidazom rena u puferu za blokiranje (1:8000). Potom, membrane su ispirane u TBS-T (3 x 10 minuta) i prelivane supstratom za peroksidazu rena tokom 3 minuta. Princip detekcije se zasniva na interakciji H_2O_2 i enzima peroksidaze pri čemu se formiraju H_2O i O_2 . Oslobođeni O_2 reaguje sa supstratom (luminolom) i gradi 3-aminofalat, pri čemu se oslobađa svetlost koja se detektuje hemiluminiscentno na automatskom detektoru ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad Laboratories). Relativna gustina dobijenih traka analizirana je denzitometrijskom metodom uz pomoć softvera *Image Lab* (Bio-Rad Laboratories). Ekspresija proteina izražena je u odnosu na aktin, dok je ekspresija fosforilisanih formi proteina izražena u odnosu na totalne (nefosforilisane) forme proteina.

3.14 Strukturna analiza ćelija transmisijom elektronskom mikroskopijom

U cilju analize morfoloških promena, SH-SY5Y ćelije su vizuelizovane koristeći transmisijom elektronsku mikroskopiju (TEM). Ćelije su zasejane u Petri šolje prečnika 100 mm i tretirane SNP i GKT u odgovarajućim koncentracijama. Nakon tretmana, ćelije su odvajane od podloge procesom tripsinizacije i centrifugirane 5 minuta na 500 g (22 °C). Proces centrifugiranja ponovljen je tri puta i svaki put su ćelije ispirane sa 1 ml PBS. Tokom poslednjeg ispiranja, centrifugalna sila je smanjena na 200 g, a dužina centrifugiranja povećana na 10 minuta. Ćelijski talog je fiksiran 3% formaldehidom i potom ispiran kakodilatnim puferom (pH 7.3) u trajanju od 30 min. Procedura fiksacije nastavljena je dodavanjem 1% osmijum tetroksida (60 minuta) i ponovnim ispiranjem u kakodilatnom puferu. Rastvor uranil acetata (0.5 %) korišćen je za kontrastiranje ćelija na temperaturi od +4 °C. Procedura kalupljenja ćelija u epoksidnu smolu inicirana je dehidracijom taloga u etanolu i propilenoksidu (Epoxy Embedding Medium kit, 45345, Merk Millipore). Nakon kalupljenja, dobijene epoksidne smole sušene su 24 h na temperaturi od 60 °C. Uzorci su sečeni na ultramikrotomu Leica UltraCut UCT (Leica Microsystems). Nakon dobijanja tankih isečaka, uzorci su bojani toluidin plavim, postavljeni na bakarne žice i dodatno kontrastirani uranil acetatom i olovo citratom. Finalna vizuelizacija i analiza je izvršena na Morgagni 268D elektronskom mikroskopu (FEI, Hillsboro).

3.15 Određivanje nivoa ekspresije iRNK gena značajnih za proces autofagije

3.15.1. Izolacija RNK

Izolacija RNK iz SH-SY5Y ćelija nakon tretmana SNP i GKT u odgovarajućim koncentracijama izvršena je komercijalno dostupnim kitom (*RNeasy Protect Mini Kit*, Qiagen). Ćelije su tretirane u pločama sa 6 bunara ravnog dna. Nakon tretmana, ćelije su pomešane sa *RNAProtect* ćelijskim reagensom koji stabilizuje RNK. Ćelije su vorteksovane i centrifugirane na 12000g 15 minuta na temperaturi od +4 °C. Dobijeni ćelijski talozi su resuspendovani u *RLT*

Plus puferu i naliveni su na kolone sa silicijumskom membranom. Čelije su centrifugirane na 12000g, 15 minuta na temperaturi od +4° C. Dobijeni talog predstavlja celokupni RNK sadržaj ćelije, dok se na membrani kolone zadržava genomska DNK. RNK talog je resuspendovan u apsolutnom hladnom etanolu. Sadržaj je naliven na novu kolonu sa silicijumskom membranom i centrifugiran na 12000g 15 minuta na temperaturi od +4 °C. Prečišćena ukupna RNK ostala je vezana za membranu. Kolona je isprana u cilju povećanja prinosa i ukupna RNK eluirana je sa 30–50 µl vode prečišćene od RNaza.

3.15.2. Reverzna transkripcija

Koncentracija RNK merena je spektrofotometrom *GeneQuant pro RNA/DNA Calculator* (Gemini BV). Uzorci RNK su pomešani sa 10 µl demineralizovane vode, a apsorbanca uzoraka merena je na 260 nm i 280 nm. Na ovaj način omogućena je kvantifikacija RNK, ali i procena čistoće dobijenog uzorka. Odnos A_{260nm}/A_{280nm} u vrednostima između 1.7 i 2 ukazuje na visok stepen čistoće RNK uzorka (Wilfinger i sar., 1997). U cilju merenja ekspresije gena, dobijena RNK prevedena je u komplementarnu DNK (cDNK) reakcijom reverzne transkripcije. 1 µg RNK pomešan je sa 15 µl vode sa 0.2 µg nasumičnih heksamernih prajmera i dezoksinukleotida u finalnoj koncentraciji od 1 mM. Vezivanje prajmera za RNK inicirano je na 70 °C u trajanju od 10 minuta, a zatim su uzorci inkubirani na ledu 5 minuta. U sledećem koraku dodavano je po 4 µl pufera za reverznu transkripciju (*5 x First Strand Buffer*) i 1 µl *M-MuLV* reverzne transkriptaze (200 U/µl). Uzorci su potom inkubirani po odgovarajućem programu (Tabela 1). Uzorci komplementarne DNK čuvani su na + 4 °C do upotrebe.

Tabela 1. Program reverzne transkripcije

Ciklus	Temperatura	Dužina trajanja ciklusa
I	70 °C	10 minuta
II	25 °C	15 minuta
III	42 °C	60 minuta
IV	70 °C	10 minuta
V	95 °C	3 minuta
VI	4 °C	+ ∞

3.15.3. Reakcija lančanog umnožavanja

U cilju detekcije promena u ekspresiji gena korišćena je metoda kvantitativne reakcije lančanog umnožavanja u realnom vremenu (engl. *quantitive Real Time Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR*) (Livak i Schmittgen, 2001). Analiza je rađena na Realplex2 Mastercycler aparatu (Eppendorf), a za inkubaciju uzoraka korišćene su optičke ploče sa 96 bunara (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Reakciona smeša sadržala je *Maxima Hot start Master Mix 2x* i *TaqMan* prajmere i probe (Thermo Fisher Scientific) za humani ATG7 (Hs00197348_m1), ATG4B (Hs00367088_m1), GABARAP (Hs00925899_g1), UVRAG (Hs01075434_m1), PIK3C3 (Hs00176908_m1), ATG10 (Hs009197718_m1), ATG3 (Hs00223937_m1), ATF4 (Hs00909569_g1), BCL2 (Hs00608023_m1), BNIP3 (Hs00969291_m1), ATG14 (Hs00208732_m1), ATG5 (Hs00169468_m1), kao i dva konstitutivno eksprimirana gena TBP (Hs99999910_m1) i HPRT1 (Hs99999909_m1). Program amplifikacije uzoraka tokom procesa RT-PCR prikazan je u Tabeli 2. Sve analize rađene su u duplikatu, a prag ciklusa Ct (engl. *cycle trashold*) podešen je na 0.1 relativnih fluorescentnih jedinica. Ct vrednost geometrijske sredine dva konstitutivno eksprimirana gena oduzeta je od Ct vrednosti gena od interesa. Na taj način dobijena je ΔCt vrednost za svaki gen od interesa. Relativna ekspresija gena određivana je kao $2^{-\Delta Ct}$. Rezultati su predstavljeni kao relativna promena u odnosu na kontrolni uzorak, koji je arbitrarno podešen na vrednost 1.

Tabela 2. Program amplifikacije uzoraka tokom procesa RT-PCR

Ciklusi	Temperatura	Dužina trajanja ciklusa
I	50 °C	2 minuta
II	95 °C	10 minuta
 40 ciklusa	95 °C	15 sekundi
	60 °C	1 minuta

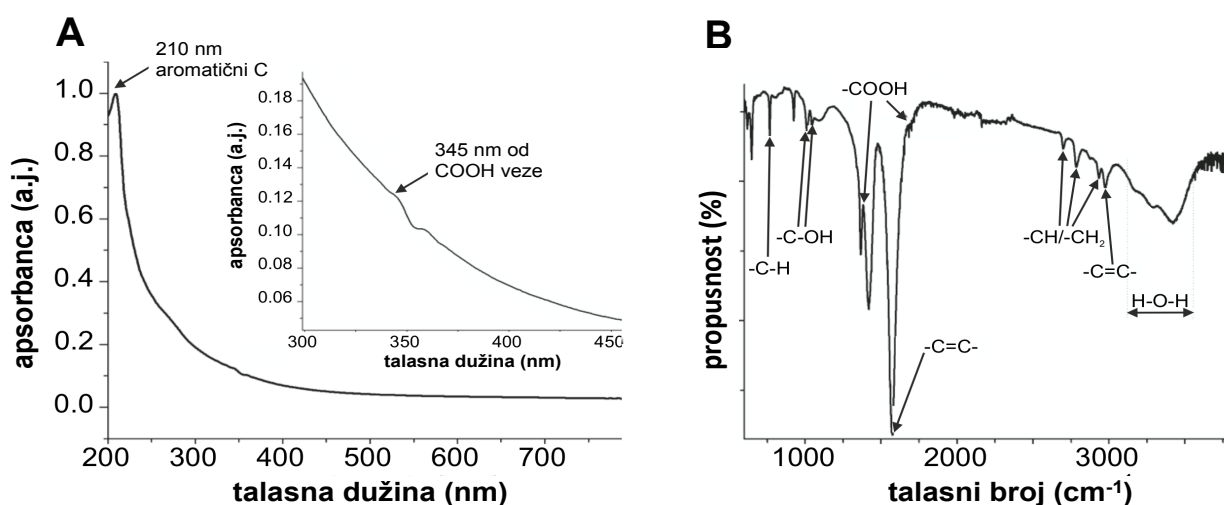
3.16 Statistička analiza

Statistička značajnost analizirana je Studentovim t-testom za dva nezavisna uzorka ili jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) praćenom Student-Newman-Keuls-ovim testom za veći broj nezavisnih uzoraka. Značajnom je smatrana p-vrednost manja od 0,05.

4. Rezultati

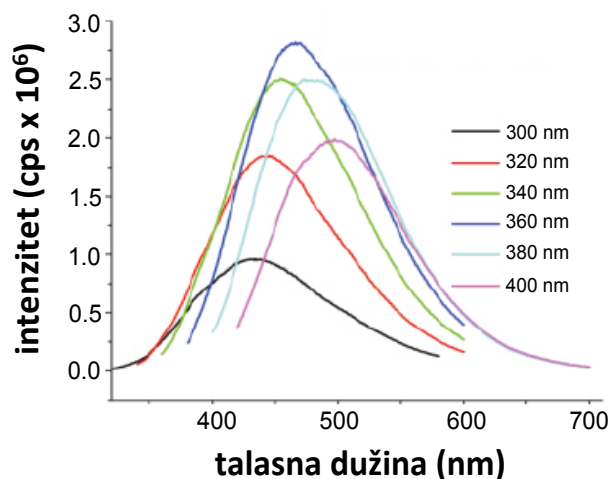
4.1 Karakterizacija GKT

Nakon elektrohemijske sinteze („top-down“ metoda sinteze GKT), ispitivane su optičke i strukturne karakteristike GKT. Optičke karakteristike određivane su primenom metoda UV-Vis i FTIR spektroskopije. Analiza UV-Vis spektara su pokazale da GKT imaju apsorpcioni maksimum u UV oblasti na 210 nm talasne dužine. Ovakva pozicija apsorpcionog maksimuma odgovara $\pi \rightarrow \pi^*$ tranziciji u aromatičnoj C-C vezi (Shi i sar., 2015). Takođe, detektovana je i apsorpciona promena na 345 nm talasne dužine koja odgovara $n \rightarrow \pi^*$ tranziciji karakterističnoj za prisustvo C=O veze (Slika 8A). Analizom FTIR spektara GKT, uočene su promene na 1700, 1360 i 1010 cm^{-1} , koje po poziciji odgovaraju funkcionalnim grupama koje u svojoj strukturi poseduju kiseonik. Takav raspored pikova upućuje na prisustvo funkcionalnih grupa sa C=O, O=C-O i C-O hemijskim vezama (Slika 8B).



Slika 8. UV-Vis i FTIR spektri GKT. (A) UV-Vis spektar apsorbance GKT. (B) FTIR spektar apsorbance GKT. a.j. - arbitarne jedinice

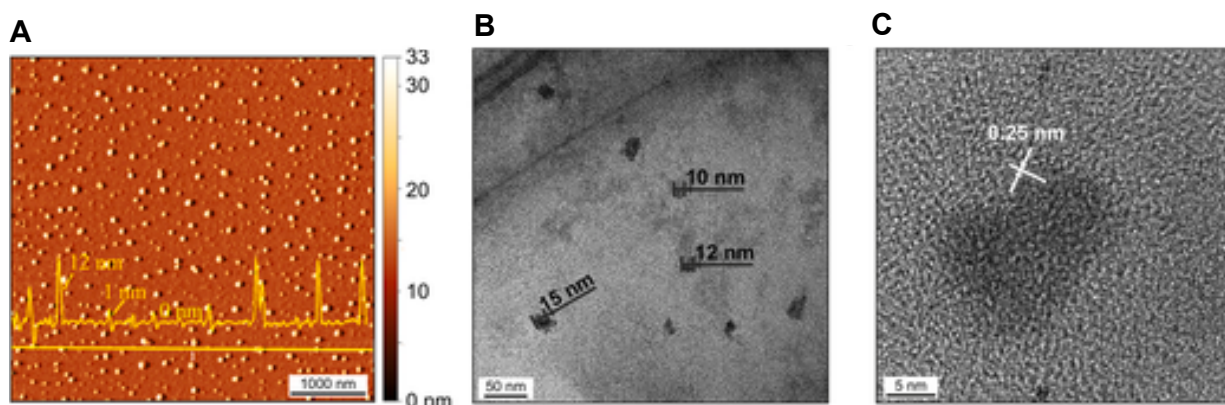
Za ispitivanje fotoluminescentnih karakteristika, uzorak GKT pobuđivan je svetlošću različitih talasnih dužina (300 - 400 nm). Pokazano je da GKT poseduju maksimalan intenzitet emisije nakon ekscitacije svetlošću talasne dužine 360 nm (Slika 9). Centar emisije GKT nalazi se na 465 nm talasne dužine (Slika 8), dok se intenzitet emitovane fotoluminiscencije eksponencijalno smanjivao sa povećanjem ekscitacione talasne dužine. Emisija GKT u plavom delu spektra pri ekscitaciji svetlošću talasnih dužina iznad 450 nm posledica je takozvane rekombinacije elektronske rupe (engl. *electron-hole recombination*) ili kvantnog zig-zag efekta (Zhu i sar., 2012). Različite vrednosti ekscitacionih talasnih dužina pomeraju centralnu emisionu vrednost sa 430 nm na 490 nm, što je u skladu sa prethodno opisanim karakteristikama GKT (Jovanović i sar., 2020; Ding i sar., 2016).



Slika 9. Karakterizacija fotoluminiscentnih karakteristika GKT.

Fotoluminiscentni spektri GKT nakon izlaganja različitim ekscitacionim talasnim dužinama.

Morfologija GKT ispitivana je AFM, TEM i HR-TEM metodom. Rezultati AFM analize pokazali su da su GKT nanometarskih dimenzija i ovalnog oblika. Detektovana je pravilna disperzija pojedinačnih GKT čestica i odsustvo aglomeracije (Slika 10A). Visina GKT varirala je od 1 do 12 nm, ukazujući da se GKT uglavnom sastoje od više slojeva grafena. Prečnik pojedinačnih GKT čestica izmeren na TEM mikrografijama iznosio je 10-15 nm (Slika 10B). HR-TEM analiza potvrdila je da strukturna konfiguracija GKT odgovara heksagonalnoj strukturi grafena (~ 0.25 nm udaljenost između C-C veza) (Slika 10C).

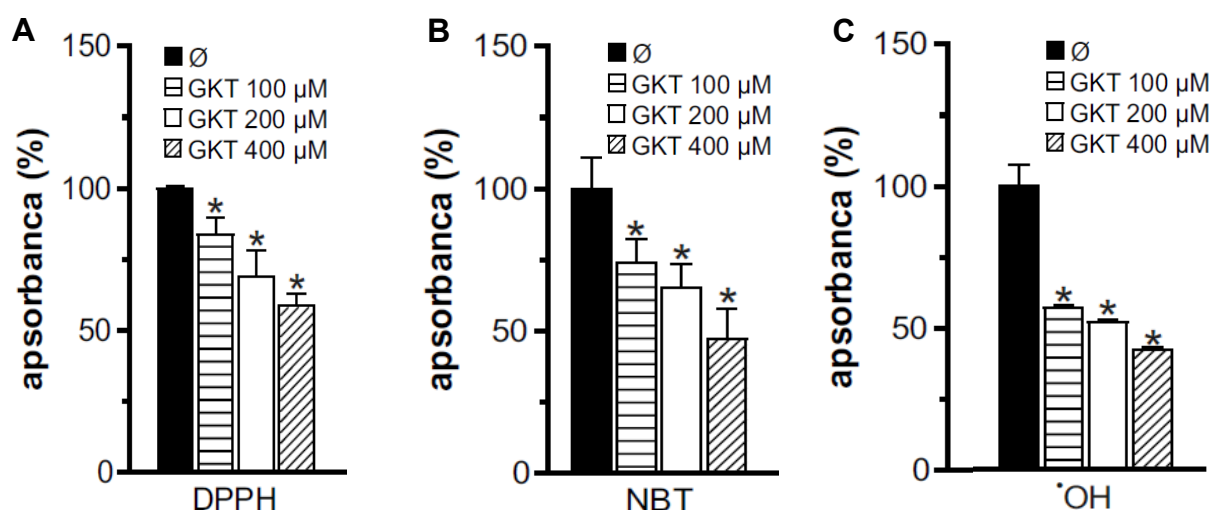


Slika 10. Morfološke karakteristike GKT. (A) Slike GKT dobijene AFM. (B) Mikrografije GKT dobijene TEM. (C) Mikrografije GKT dobijene HR-TEM.

4.2 Antioksidativni profil GKT

Jedna od najvažnijih bioloških karakteristika GKT je sposobnost neutralizacije različitih RKV (Chong i sar., 2016). Sposobnost neutralizacije RKV i RAV, kao i antioksidativni profil GKT, prvo su ispitani u sistemu bez ćelija, čime su eliminisani dodatni faktori koji bi mogli da utiču na merenje antioksidativnih svojstava (npr. sastav medijuma za kultivaciju). U cilju ispitivanja antioksidativnog profila, različite koncentracije GKT inkubirane su sa rastvorom stabilnog radikala DPPH. Smanjenje apsorbance DPPH potvrdilo je sposobnost GKT da neutrališe RKV na dozno-zavisan način (Slika 11A). Aktivnost GKT u neutralizaciji

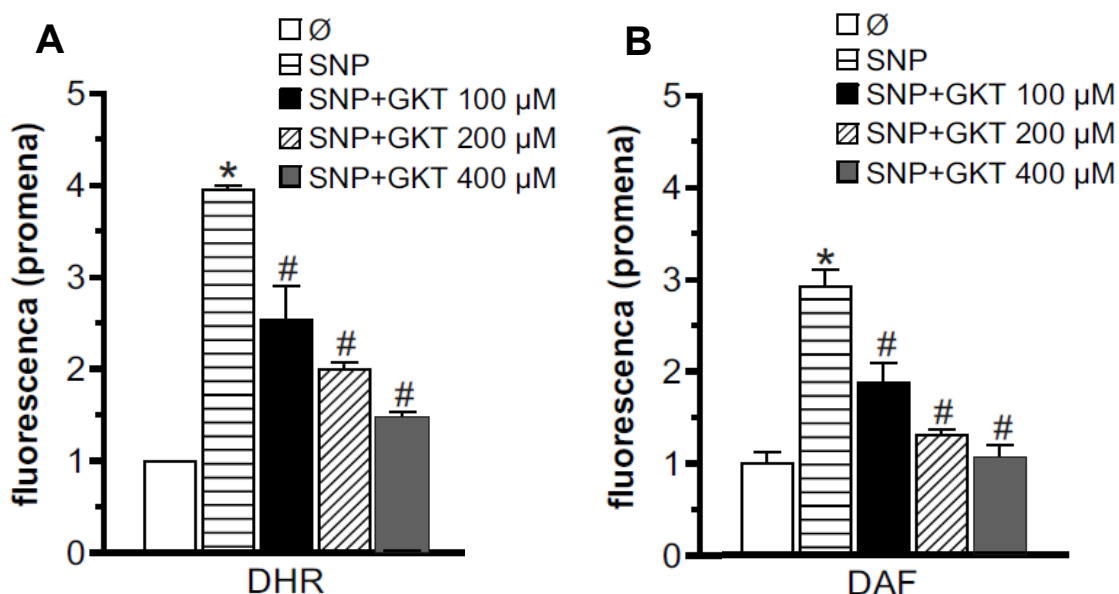
pojedinačnih RKV ispitivana je Smirnof-Kjumbsov i NBT testom. Smirnof-Kjumbsov test koristi se za detekciju hidroksilnog radikala ($\text{OH}\cdot$) u rastvoru. U prisustvu sistema za generisanje $\text{OH}\cdot$ kao i rastućih koncentracija GKT, uočeno je dozno-zavisno smanjenje apsorbance rastvora natrijum salicilata. Ovaj rezultat pokazuje da GKT imaju sposobnost da neutrališu $\text{OH}\cdot$ u rastvoru (Slika 11B). Sposobnost GKT da neutrališu superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) merena je NBT testom. Kao sistem za generisanje $\text{O}_2^{\cdot-}$ korišćen je alkalni DMSO. Spektrofotometrijska merenja promene boje rastvora NBT pokazala su da GKT dovode do dozno-zavisnog smanjenja nivoa $\text{O}_2^{\cdot-}$ u rastvoru (Slika 11C).



Slika 11. Antioksidativni profil GKT. Antioksidativni profil GKT meren je u sistemu bez ćelija koristeći različite spektrofotometrijske testove: (A) DPPH, (B) NBT i (C) Smirnof-Kjumbsov test. Promene koncentracije merenih radikala prikazani su u odnosu na kontrolni uzorak koji je sveden na jediničnu vrednost. Rezultati reprezentativnog od tri eksperimenta prikazani su kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ triplikata (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolni uzorak bez GKT).

Antioksidativna aktivnost GKT dodatno je potvrđena primenom neselektivne redoks senzitivne fluorescentne boje DHR, koja se nespecifično vezuje za različite RKV i oksiduje u katjonski rodamin koji emituje zelenu fluorescencu. Oksidativni stres indukovao prisustvom SNP doveo je do povećanja intenziteta zelene fluorescence DHR. Prisustvo GKT značajno je smanjilo intenziteta zelene fluorescence DHR proporcionalno koncentraciji GKT u uzorku, čime je dodatno potvrđena sposobnost GKT da neutrališu RKV u rastvoru (Slika 12A).

Pored RKV, prilikom fotoindukovanog raspada SNP oslobađaju se značajne količine NO. U cilju ispitivanja sposobnosti GKT da neutrališu RAV korišćen je DAF. U prisustvu SNP uočeno je značajno povećanje intenziteta zelene fluorescence DAF, dok je tretman GKT na dozno-zavisno način doveo do njenog smanjenja (Slika 12B). Imajući u vidu specifičnost DAF u detekciji NO/ONOO^- , ovi rezultati potvrđuju sposobnost GKT da neutrališu RAV, i to prevashodno $\text{NO}\cdot/\text{ONOO}^-$.



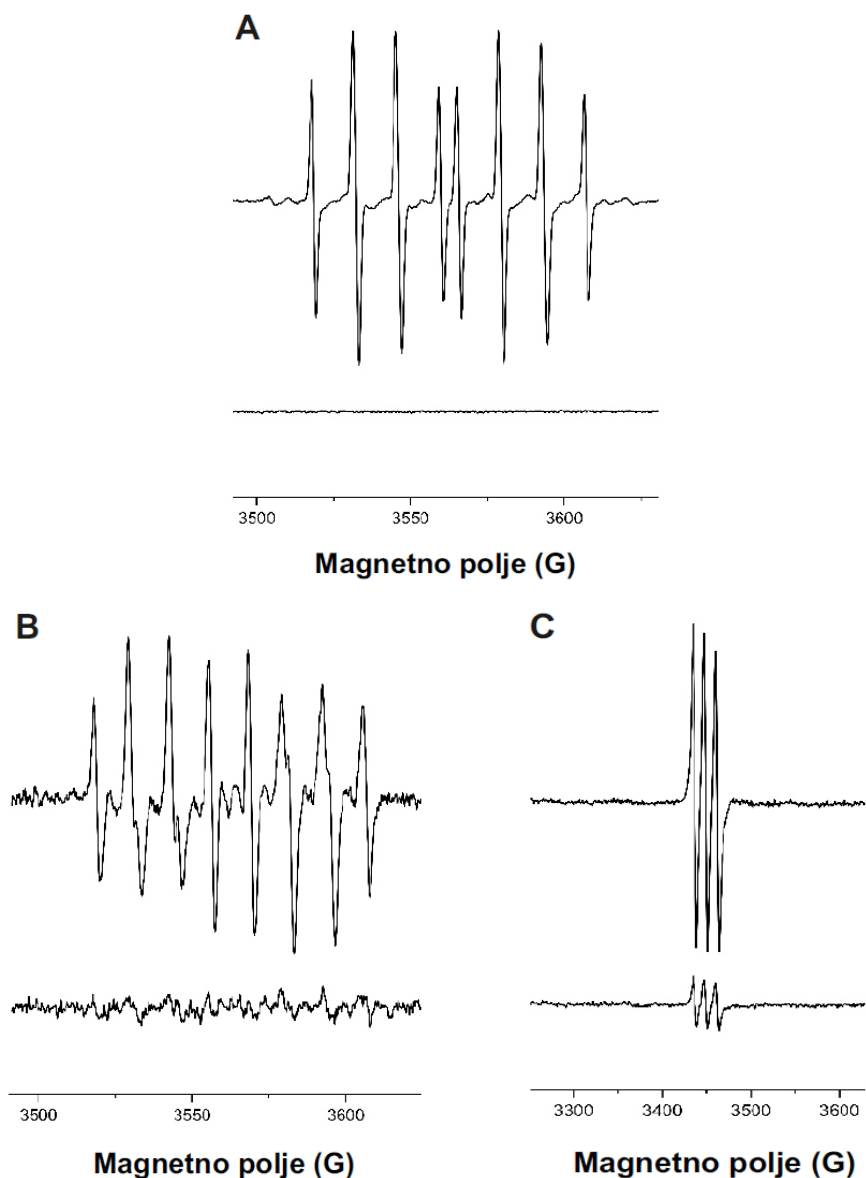
Slika 12. Antioksidativni i antinitrozativni profil GKT u prisustvu SNP

(A) Antioksidativni profil GKT ispitivan je uz pomoć neselektivne redoks senzitivne fluorescentne boje DHR. (B) Antinitrozativni profil GKT meren je uz pomoć DAF. Promene koncentracije merenih radikala prikazani su u odnosu na kontrolni uzorak koji je sveden na jediničnu vrednost. Rezultati reprezentativnog od tri eksperimenta prikazani su kao $SV \pm SD$ triplikata (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolni uzorak bez SNP i GKT, a # $p < 0,05$ u odnosu na uzorak sa SNP-om).

Sposobnost GKT da neutrališu $OH^\bullet$, $O_2^{\bullet-}$ i $NO^\bullet$ u sistemu bez ćelija detaljnije je ispitana EPR metodom. Za potrebe EPR analize korišćeni su poznate hemijske reakcije u cilju generisanja različitih RKV i RAV: Fentonova reakcija za generisanje hidroksilnog radikala ($OH^\bullet$), fotostimulacija riboflavina za generisanje superoksidnog radikala ($O_2^{\bullet-}$) i fotostimulacija SNP za oslobađanje radikala azot (II) oksida ($NO^\bullet$). Za kvantifikaciju antioksidativne aktivnosti GKT, normalizovani dvostruki integrali kompjuterski simuliranih eksperimentalnih vrednosti korišćeni su u sledećoj formuli:

$$QA = \frac{A_0 - A_c}{A_0} 100(\%)$$

gde QA predstavlja sposobnost neutralizacije RKV i RAV (engl. *quenching activity*) dok A_0 i A_c predstavljaju dvostruke integrale kompjuterski simuliranih EPR spektara u odsustvu (A_0) i prisustvu (A_c) GKT. Dobijeni rezultati ukazuju da GKT poseduju značajnu sposobnost neutralizacije $OH^\bullet$ (> 99.3%) (Slika 13A), $O_2^{\bullet-}$ (91.5%) (Slika 13B) i $NO^\bullet$ radikala (84.4%) (Slika 13C).



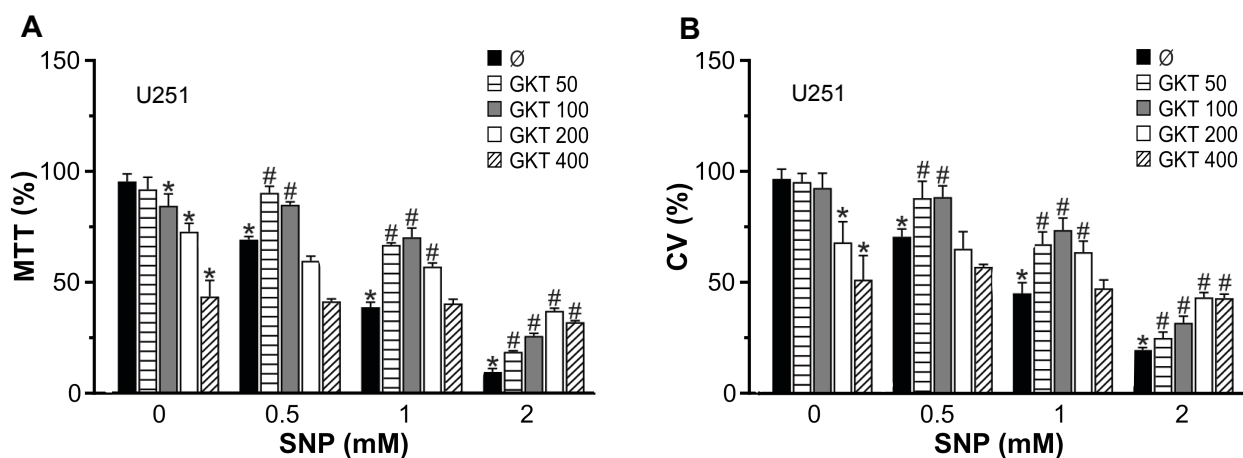
Slika 13. EPR analiza antioksidativne aktivnosti GKT

EPR je korišćen za merenje sposobnosti GKT da neutrališu RKV i RAV. Prikazani su EPR spektri DEPMPO/OH (A), DEPMPO/OOH (B) i NO-Fe(DTCS)₂ (C) u odsustvu (gornji spektar) i prisustvu GKT (donji spektar).

4.3 GKT štite ćelije od citotoksičnosti SNP

Citotoksičnost SNP je prethodno pokazana na različitim tipovima ćelija u kulturi (Hua i sar., 2019; Cardaci i sar., 2008). Imajući u vidu da su brojne studije pokazale da neekscitirane GKT poseduju antioksidativne sposobnosti, u nastavku istraživanja ispitivana je uloga GKT u zaštiti ćelije od oksidativnog stresa indukovano SNP (Hua i sar., 2019; Ristic i sar., 2014). Da bismo utvrdili da li GKT smanjuju citotoksičnost indukovanu SNP, dve ćelijske linije tretirane su različitim koncentracijama SNP (0.5-2 mM) u prisustvu ili odsustvu GKT (50-400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) u trajanju od 24 h. Merenjem aktivnosti mitohondrijalne dehidrogenaze (MTT test), kao i određivanjem relativnog broja ćelija (kristal violet testom) pokazano je da SNP na dozno-zavisan

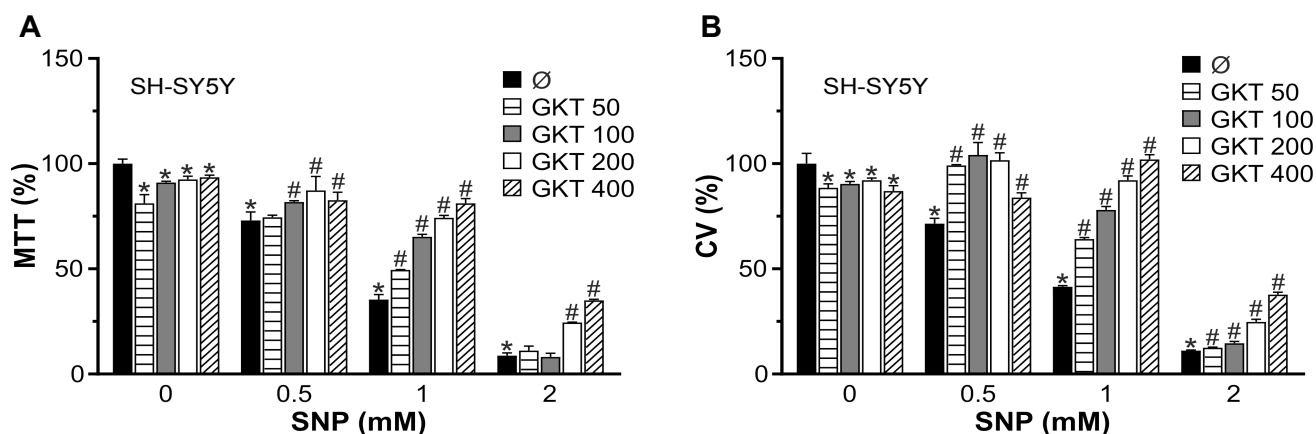
način smanjuje vijabilitet U251 ćelija GKT. I pored antiproliferativnog dejstva u visokim koncentracijama (200 i 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$), GKT su značajno smanjile citotoksičnost SNP u kulturi U251 ćelija (Slika 14A i 14B).



Slika 14. GKT štite U251 ćelije od citotoksičnosti SNP

U251 ćelije humanog glioma su inkubirane sa različitim koncentracijama SNP (0.5-2 mM) i GKT (50-400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) u trajanju od 24 h. Vijabilitet ćelija analiziran je MTT (A) i kristal violet testom (B). Rezultati reprezentativnog od tri eksperimenta prikazani su kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ triplikata (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a # $p < 0,05$ u odnosu na ćelije tretirane SNP-om).

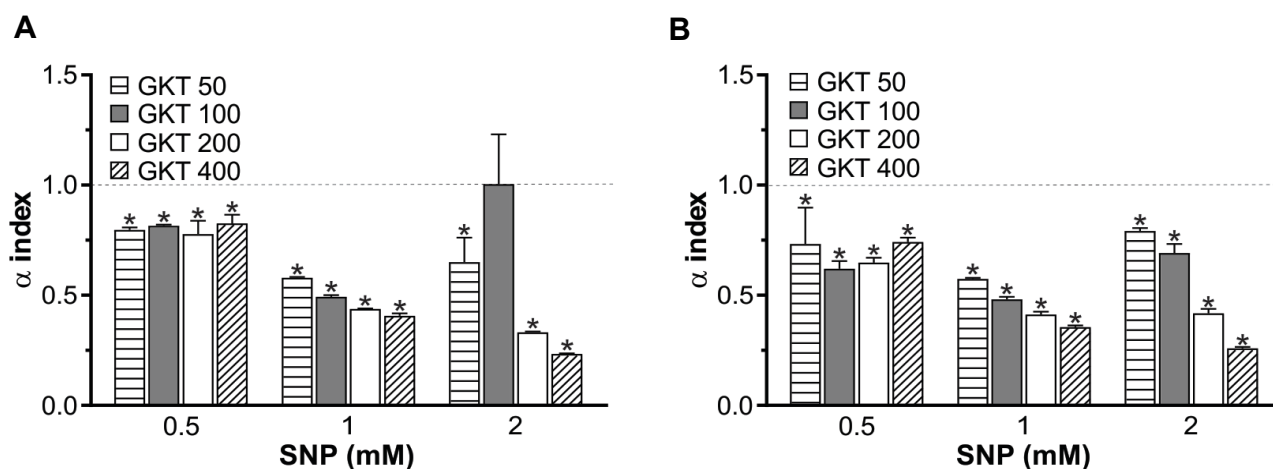
SH-SY5Y ćelije humanog neuroblastoma takođe su korišćene za ispitivanje uticaja GKT na citotoksičnost SNP. SH-SY5Y se koriste kao *in vitro* model neurona imajući u vidu njihove morfološke i biohemijske karakteristike. Naime, SH-SY5Y ćelije se, kao i kateholaminergički neuroni, karakterišu prisustvom enzima tirozin hidroksilaze i dopamin- β -hidroksilaze. Takođe, SH-SY5Y ćelije mogu se diferencirati u ćelije koje poseduju i ostale karakteristične markere neurona (Ross i sar., 1983). SH-SY5Y ćelije tretirane su različitim koncentracijama SNP (0.5-2 mM) u prisustvu ili odsustvu GKT (50-400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) tokom 24 h. Rezultati testova vijabiliteta pokazali su da GKT na dozno-zavisan način smanjuju citotoksičnost SNP u kulturi SH-SY5Y ćelija (Slika 15A i 15B).



Slika 15. GKT štite SH-SY5Y ćelije od citotoksičnosti SNP

SH-SY5Y ćelije su inkubirane 24 h sa različitim koncentracijama SNP (0.5-2 mM) i GKT (50-400 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Vijabilitet ćelija analiziran je MTT (A) i kristal violet testom (B). Rezultati reprezentativnog od tri eksperimenta prikazani su kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ triplikata (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a # $p < 0,05$ u odnosu na ćelije tretirane SNP-om).

Rezultati matematičke analize tipa zajedničkog dejstva potvrdili su antagonističko dejstvo SNP i GKT (vrednost α indeksa manja od 1) u slučaju U251 (Slika 16A), kao i SH-SY5Y ćelija (Slika 16B). Vrednost α indeksa najniža je u kombinaciji tretmana 2 mM SNP i 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ GKT, tako da su ove koncentracije korišćene u daljim eksperimentima.

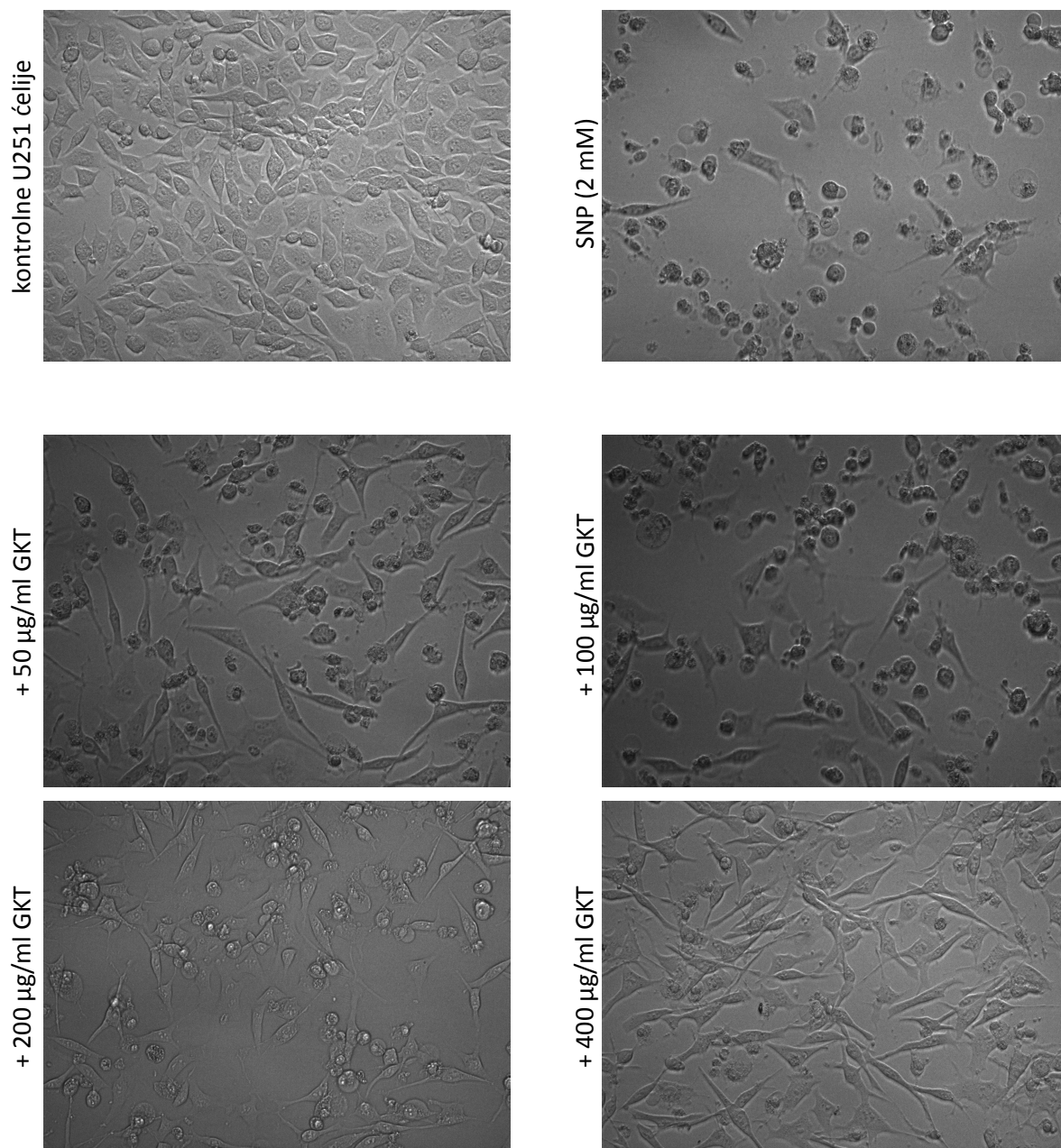


Slika 16. Matematička analiza kombinovanog dejstva SNP i GKT

Antagonistička interakcija SNP i GKT potvrđena je matematičkom analizom α indeksa na osnovu rezultata vijabiliteta dobijenih MTT (A) i kristal violet testom (B). Rezultati reprezentativnog od tri eksperimenta prikazani su kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ triplikata (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na vrednost $\alpha = 1$).

U cilju ispitivanja uticaja na gustinu i morfologiju U251 i SH-SY5Y ćelija tretiranih SNP-om korišćena je fazno-kontrastna mikroskopija 24 h nakon tretmana. U skladu sa prethodno opisanim rezultatima, uočeno je smanjenje u gustini U251 ćelija tretiranih SNP-om u odnosu na kontrolne ćelije. Takođe su primećene karakteristike ćelijske smrti, kao što su gubitak

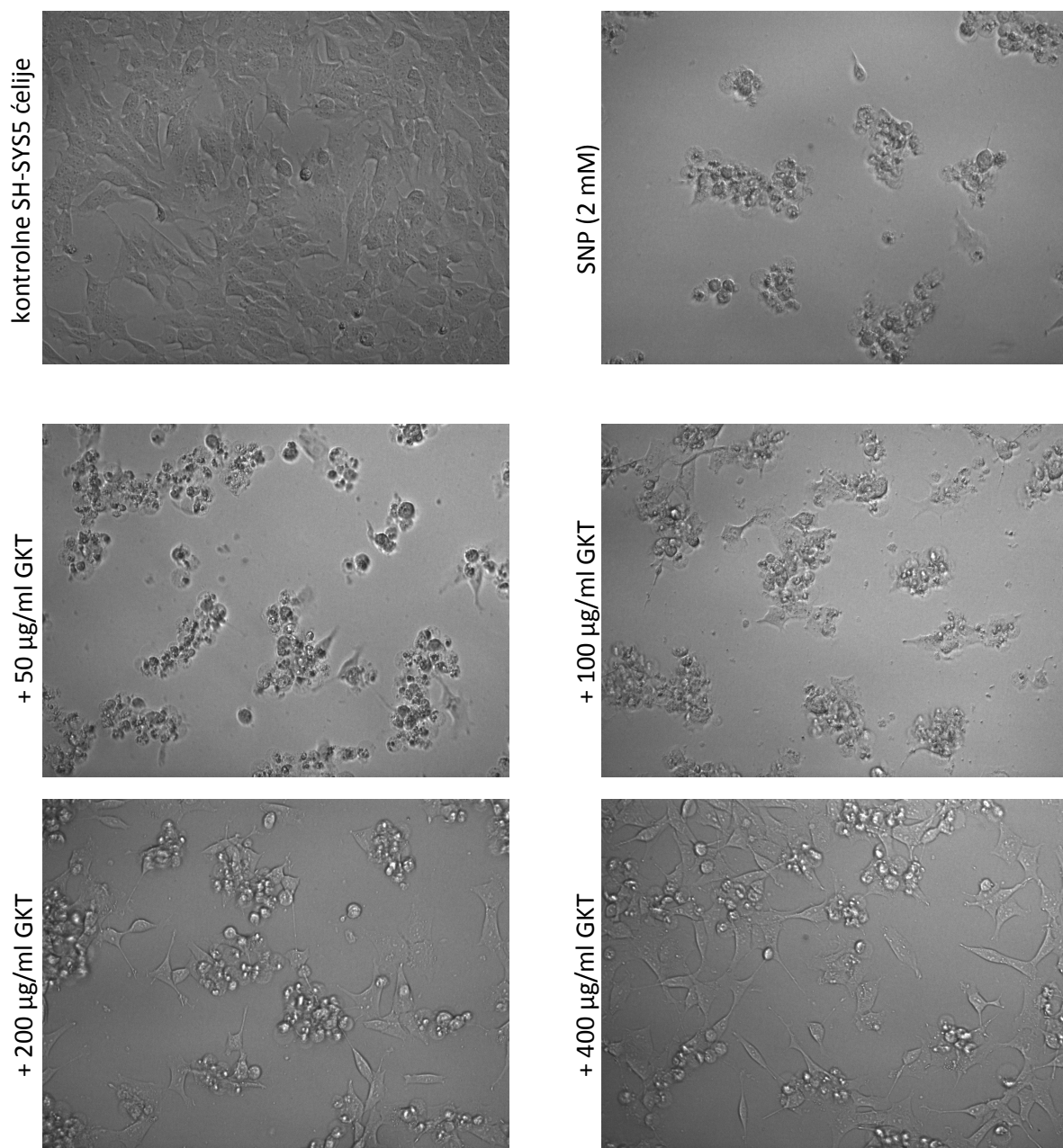
poligonalne ili vretenaste forme, smanjenje zapremine ćelija, gubitak adhezije za podlogu i zaokrugljivanje ćelija (Slika 17). Navedene karakteristike bile su slabije izražene u ćelijskim kulturama tretiranim GKT, što dodatno potvrđuje njihovu citoprotektivnu aktivnost (Slika 17).



Slika 17. Uticaj GKT na morfologiju U251 ćelija

U251 ćelije su inkubirane 24 h sa 2 mM SNP u prisustvu ili odsustvu različitih koncentracija GKT (50-400 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Morfologija ćelija analizirana je pod svetlosnim mikroskopom (uveličanje 200 x).

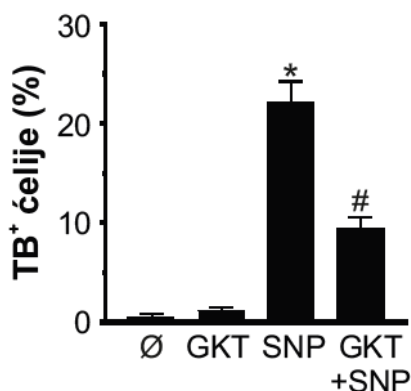
Morfologija SH-SY5Y ćelija humanog blastoma tretiranih SNP-om takođe je bila izmenjena nakon 24 h. Ćelije su izgubile karakteristični piramidalni oblik i uočen je gubitak neurita (ćelijskih nastavaka sličnih dendritima kod primarnih neuronskih ćelija). Istovremeno, ćelije su su se odlepili od podloge, izgubile volumen i postale zaokrugljene (Slika 18). Kao i u slučaju U251 ćelija, prethodno opisane promene bile su manje zastupljene nakon tretmana rastućim koncentracijama GKT (50- 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Slika 18).



Slika 18. Uticaj različitih koncentracija GKT na morfologiju ćelija humanog blastoma SH-SY5Y

SH-SY5Y ćelije inkubirane su 24 h sa 2 mM SNP u prisustvu ili odsustvu različitih koncentracija GKT ($50\text{--}400\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$). Morfologija ćelija analizirana je pod svetlosnim mikroskopom (uveličanje 200 x).

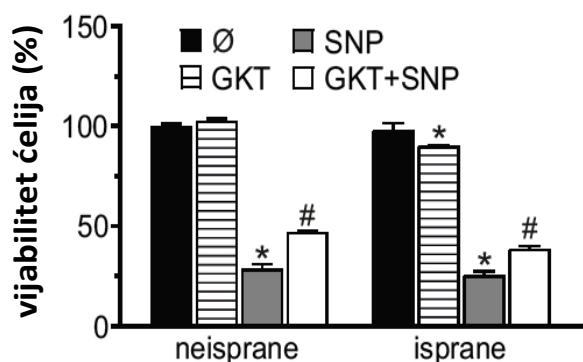
Imajući u vidu da su SH-SY5Y ćelije relevantniji *in vitro* model za ispitivanje neurotoksičnosti/neuroprotekcije, ova ćelijska linija je korišćena u daljim eksperimentima. U cilju dodatne potvrde neuroprotektivnog dejstva GKT, broj mrtvih ćelija nakon tretmana SNP-om i GKT određen je metodom bojenja ćelija tripan plavim. Usled narušenog integriteta ćelijske membrane, tripan plavo ulazi u mrtve ćelije koje se vide kao plavo obojene ćelije pod svetlosnim mikroskopom. Rezultati brojanja obojenih ćelija su pokazali da je broj mrtvih ćelija u kombinovanom tretmanu SNP i GKT značajno manji nego u tretmanu SNP (Slika 19).



Slika 19. Prisustvo GKT smanjuje broj mrtvih ćelija u tretmanu SNP

Bojenje tripan plavim korišćeno je za procenu broja mrtvih ćelija nakon tretmana ćelija SNP-om (2 mM) u prisustvu ili odsustvu GKT ($400 \mu\text{g ml}^{-1}$). Rezultati reprezentativnog od tri eksperimenta prikazani su kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ tripplikata (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane, kontrolne ćelije, a # $p < 0,05$ u odnosu na ćelije tretirane SNP-om).

Prethodni rezultati su pokazali da GKT poseduju antioksidativne i citoprotektivne karakteristike u modelu oksidativnog stresa indukovano SNP-om, pri čemu rezultati dobijeni u sistemu bez ćelija ukazuju da GKT mogu neutralisati oksidativne forme i u vanćelijskoj sredini. Kako bi se proverilo da li je citoprotektivno dejstvo GKT posledica njihove unutarćelijske lokalizacije ili vanćelijske antioksidativne aktivnosti, SH-SY5Y ćelije inkubirane su 1 h u prisustvu ili odsustvu GKT, a zatim ispirane PBS-om kako bi GKT bile uklonjene iz vanćelijske sredine. Ćelije su potom tretirane SNP-om tokom 24 h, posle čega je njihov vijabilitet određen MTT testom. Rezultati MTT testa su ukazali da je ispiranje ćelija nakon inkubacije sa GKT samo delimično smanjilo njihovo protektivno dejstvo (Slika 20), što sugerise da je ćelijska internalizacija GKT neophodna za optimalnu zaštitu od citotoksičnosti SNP.



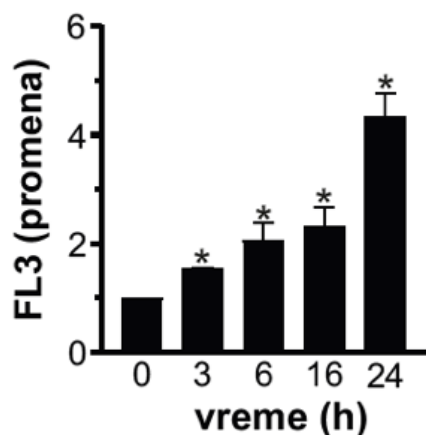
Slika 20. Unutarćelijsko prisustvo GKT neophodno je za njihovu protektivnu aktivnost

SH-SY5Y ćelije su nakon 1 h inkubacije sa $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ GKT ispirane PBS-om, a zatim 24 h tretirane SNP-om (2 mM). Vijabilitet ćelija analiziran je MTT testom. Rezultati reprezentativnog od dva eksperimenta prikazani su kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ tripplikata (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a # $p < 0,05$ u odnosu na ćelije tretirane SNP-om).

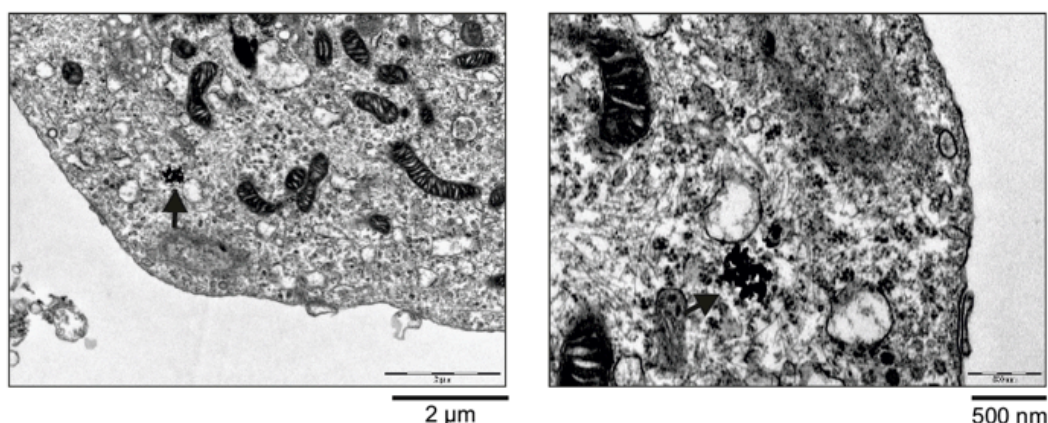
Unutarćelijska lokalizacija GKT ispitivana je i metodom protočne citofluorimetrije. SH-SY5Y ćelije tretirane su GKT u različitim vremenskim intervalima i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su pokazali vremenski zavisno povećanje granuliranosti citoplazme (SSC) kao i intenziteta crvene fluorescence (FL3). Kao što je prethodno pokazano, GKT imaju najveći intenzitet fotoluminiscencije u crvenom delu spektra, sa maksimalnom talasnom dužinom između 494-548 nm, nakon ekscitacije svetlošću talasne dužine 328 nm. Dakle, povećanje intenziteta crvene fluorescence nakon tretmana GKT ukazuje na prisustvo GKT u citosolu SH-SY5Y ćelija (Slika 21A). Unutarćelijska lokalizacija GKT potvrđena je i transmisijom elektronskom mikroskopijom. Imajući u vidu njihove male dimenzije (visina od 1-12 nm i dijametar od 10-15 nm), izuzetno je teško detektovati pojedinačne GKT čestice na TEM mikrografijama. Međutim, sporadična aglomerizacija GKT uočena je u citoplazmi SH-SY5Y ćelija nakon 24 h tretmana GKT (Slika 21B).

Na osnovu prikazanih rezultata zaključeno je da GKT ulaze u ćeliju, najverovatnije putem endocitoze, pri čemu njihovo prisustvo u citosolu SH-SY5Y ćelija ima važnu ulogu u zaštiti od citotoksičnosti SNP.

A



B

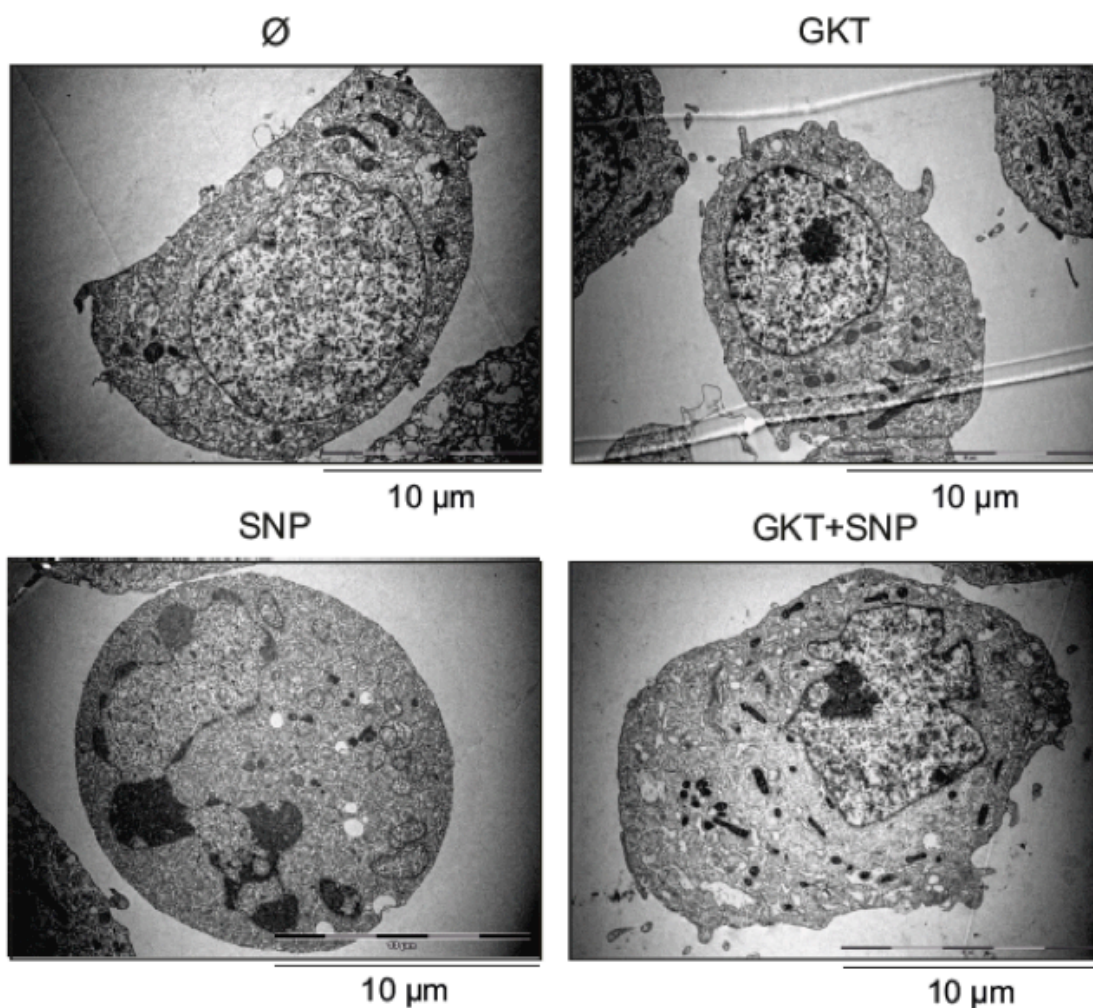


Slika 21. Ćelijska internalizacija GKT

SH-SY5Y ćelije su inkubirane sa GKT ($400 \mu\text{g ml}^{-1}$), čije je unutarćelijsko prisustvo analizirano merenjem intenziteta crvene fluorescence (FL3) protočnom citofluorimetrijom u različitim vremenskim intervalima (A) i transmisijom elektronskom mikroskopijom nakon 24 h (B). Rezultati u (A) su prikazani kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ iz tri eksperimenta pri čemu je intenzitet fluorescence uzet za jediničan na početku tj. u nultom trenutku (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije). Strelice na TEM mikrografijama označavaju citoplazmatske aglomerate GKT (B).

4.4 GKT štite SH-SY5Y ćelije od apoptoze indukovane SNP-om

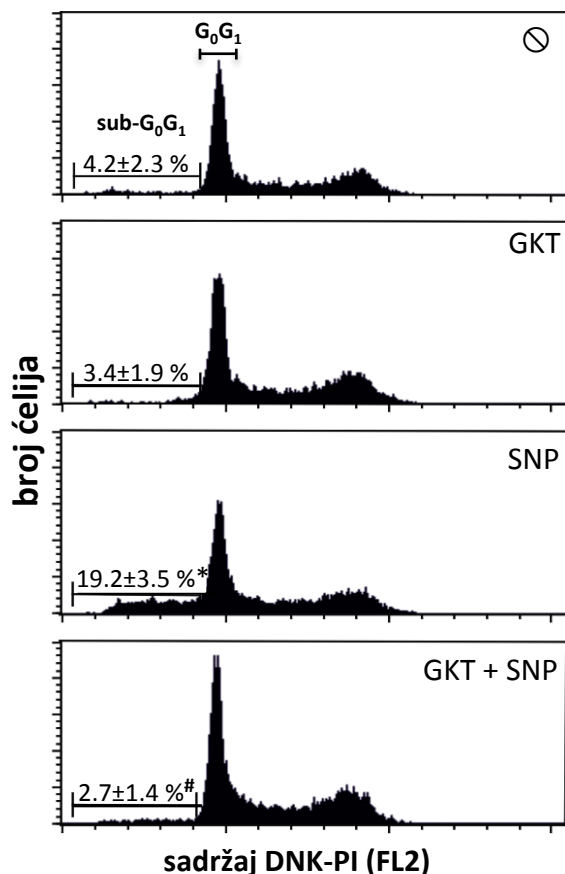
U daljem ispitivanju protektivne sposobnosti GKT u neurotoksičnosti indukovanoj SNP-om korišćena je elektronska mikroskopija za analizu tipa ćelijske smrti. Za razliku od netretiranih ćelija (Slika 22A) i ćelija inkubiranih sa GKT (Slika 22B), u tretmanu SNP-om uočene su karakteristike apoptoze: kondenzacija hromatina, nuklearna fragmentacija, zaokrugljivanje i smanjenje zapremine ćelija (Slika 22C). U kulturama inkubiranim sa SNP-om i GKT uočen je manji broj ćelija sa karakteristikama apoptoze u odnosu na pojedinačni tretman SNP-om (Slika 22D).



Slika 22. GKT štite SH-SY5Y ćelije od apoptoze indukovane SNP-om

SH-SY5Y ćelije su inkubirane 24 h sa 2 mM SNP u prisustvu ili odsustvu $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ GKT. Morfologija ćelija analizirana je elektronskom mikroskopijom.

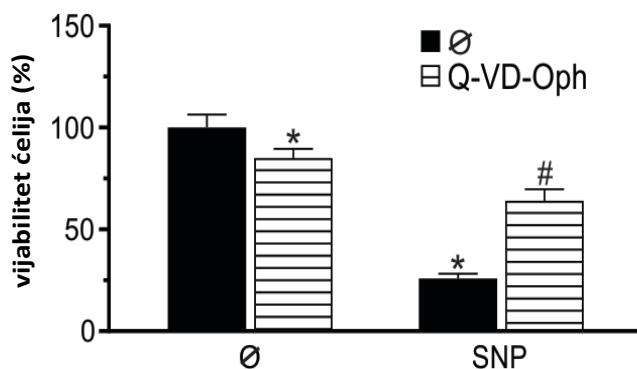
Kako bi se detaljnije objasnilo protektivno dejstvo GKT u indukciji apoptoze izazvane SNP-om, ispitivan je ćelijski ciklus nakon tretmana SNP-om i GKT. Bojenje propidijum jodidom i analiza raspodele ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa pokazala je da tretman SNP-om u trajanju od 24 h doveo do značajnog povećanja procenta hipodiploidnih apoptotičnih ćelija sa fragmentisanom DNK (sub- G_0/G_1 faza ćelijskog ciklusa) (Slika 23). Prisustvo GKT značajno je smanjilo fragmentaciju DNK izazvanu SNP-om (Slika 23), čime je dodatno potvrđeno anti-apoptotsko dejstvo GKT.



Slika 23. GKT smanjuju fragmentaciju DNK indukovanu SNP-om.

SH-SY5Y ćelije su inkubirane sa SNP (2 mM) u prisustvu ili odsustvu GKT (400 µg ml⁻¹). Procenat ćelija sa fragmentisanom DNK (sub-G₀G₁) određen je nakon 24 h tretmana metodom protočne citofluorimetrije ćelija bojenih propidijum jodidom. Procenat ćelija sa fragmentisanom DNK na reprezentativnim histogramima prikazan je kao SV ± SD iz tri eksperimenta (*p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a #p < 0,05 u odnosu na ćelije tretirane SNP-om).

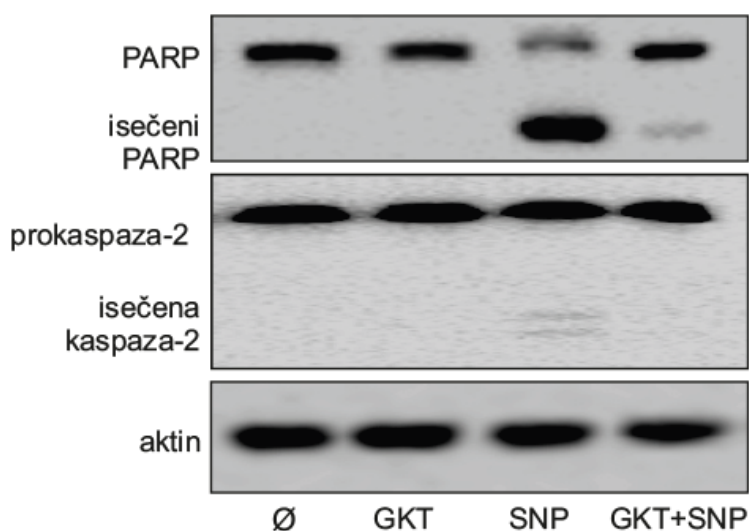
U cilju ispitivanja uloge kaspaza u apoptozi indukovanoj SNP-om, ćelije su inkubirane sa SNP-om u prisustvu ili odsustvu pan-kaspaznog inhibitora Q-VD-Oph. Rezultati MTT testa pokazali su da inhibicija kaspaza smanjuje citotoksičnost SNP-a, što potvrđuje da SNP indukuje apoptotsku ćelijsku smrt zavisnu od aktivacije kaspaza (Slika 24).



Slika 24. SNP indukuje apoptozu zavisnu od kaspaza

SH-SY5Y ćelije su inkubirane 24 h sa SNP (2 mM) u prisustvu ili odsustvu pan-kaspaznog inhibitora Q-VD-Oph (10 µM), a vijabilitet ćelija je analiziran MTT testom. Rezultati reprezentativnog od tri eksperimenta prikazani su kao SV ± SD triplikata (*p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a #p < 0,05 u odnosu na ćelije tretirane SNP-om).

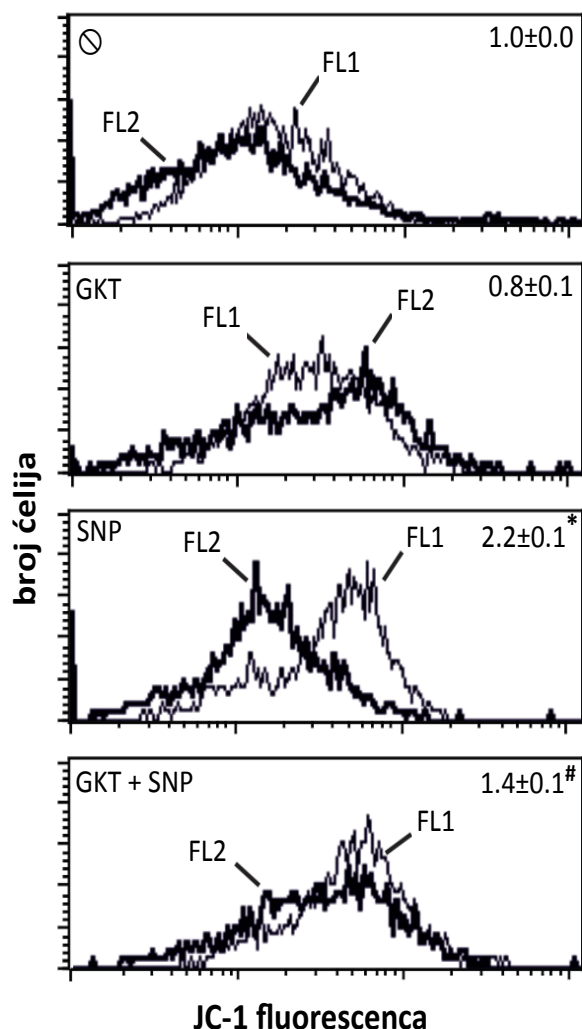
Uticaj GKT na apoptozu indukovanu SNP-om dodatno je ispitan i metodom imunoblota, kojom su analizirani nivoi aktivne forme kaspaze-2, kao i degradacija PARP-1. Kaspaza-2 je endonukleaza karakteristična za aktivaciju apoptoze oksidativnim stresom i učestvuje u povećanju permeabilizacije mitohondrijalne membrane (Bouchier-Hayes, 2010). PARP predstavlja familiju enzima koji katalizuju prenos ADP-riboze na ciljne molekule. Jedan od ključnih predstavnika familije je PARP-1, koji učestvuje u procesima reparacije DNK, transkripcije, translacije i rekombinacije (Morales i sar., 2016). PARP-1 je jedan od supstrata kaspaza, a njegova proteolitička inaktivacija je karakteristična za kasnu fazu apoptoze (Chaitanya i sar., 2010). Rezultati imunoblot analize potvrdili su da SNP indukuje apoptozu zavisnu od kaspaza. Naime, tretman SNP aktivira prokaspazu-2, na šta ukazuje prisustvo isečene, aktivne forme kaspaze-2 (~ 13 kDa), a uočeno je i nagomilavanje isečene forme proteina PARP-1 (~ 85 kDa) (Slika 25). Prisustvo GKT smanjilo je i aktivaciju kaspaze-2 i degradaciju PARP indukovanu SNP-om (Slika 25), što dodatno potvrđuje anti-apoptotsko dejstvo GKT.



Slika 25. GKT smanjuju aktivaciju kaspaze-2 i degradaciju PARP-1 indukovanu SNP-om
SH-SY5Y ćelije inkubirane su 12 h sa SNP (2 mM) u prisustvu ili odsustvu GKT (400 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Aktivacija kaspaza i degradacija PARP-1 analizirani su imunoblotom. Prikazan je reprezentativni blot koji je rezultat dva eksperimenta sa sličnim rezultatima.

Kaspaza-2 se uglavnom nalazi u mitohondrijama i učestvuje u aktivaciji mitohondrijalnog (unutrašnjeg) puta apoptoze (Lopez-Cruzan i sar., 2016). Shodno činjenici da se u mitohondrijalnom putu aktivacije apoptoze menja mitohondrijalni membranski potencijal, bilo je značajno ispitati da li prisustvo GKT utiče na promenu membranskog potencijala u tretmanu SNP-om. Analizom na protočnom citofluorimetru uočeno je povećanje odnosa intenziteta zelene (FL1) i narandžasto-crvene (FL2) fluorescence JC-1 u ćelijama tretiranim SNP-om, što ukazuje na depolarizaciju membrane mitohondrija (Slika 26). Odnos FL1 i FL2 fluorescence značajno se smanjio u prisustvu GKT, ukazujući na njihovu sposobnost da spreče depolarizaciju mitohondrijalne membrane izazvanu SNP-om.

Na osnovu prikazanih rezultata može da se zaključi da SNP indukuje apoptozu aktivirajući mitohondrijalni put aktivacije apoptoze, dok GKT smanjuju apoptozu indukovanu SNP-om inhibicijom aktivacije kaspaza i sprečavanjem depolarizacije mitohondrijalne membrane.

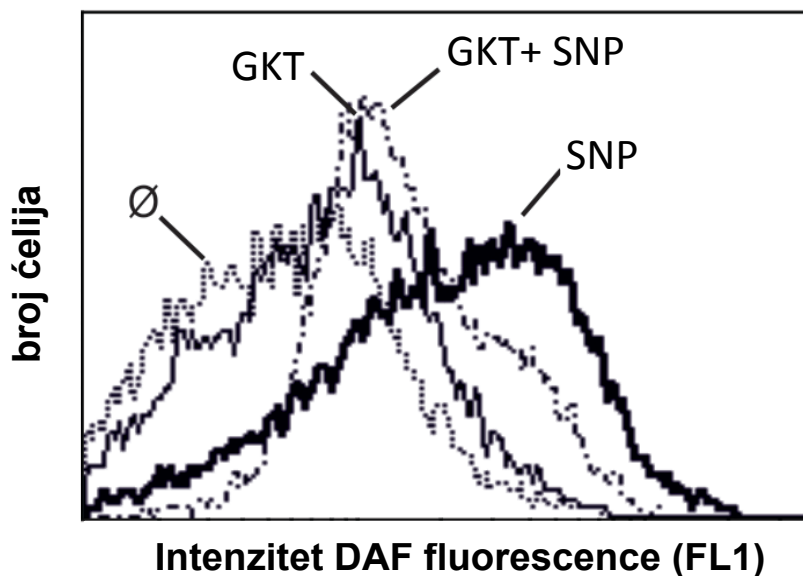


Slika 26. GKT smanjuju depolarizaciju mitohondrija indukovanu SNP-om

Protočnom citofluorimetrijom analizirane su promene u fluorescenci JC-1 nakon 24 h tretmana ćelija sa SNP (2 mM) u prisustvu ili odsustvu GKT ($400 \mu\text{g ml}^{-1}$). Vrednosti intenziteta fluorescence na reprezentativnim histogramima prikazani su kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ iz tri eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a $^{\#}p < 0,05$ u odnosu na ćelije tretirane SNP-om).

4.5 Sposobnost GKT da neutrališu $\text{NO}\cdot$ i $\text{OH}\cdot$ i štite ćelije od citotoksičnosti indukovane SNP

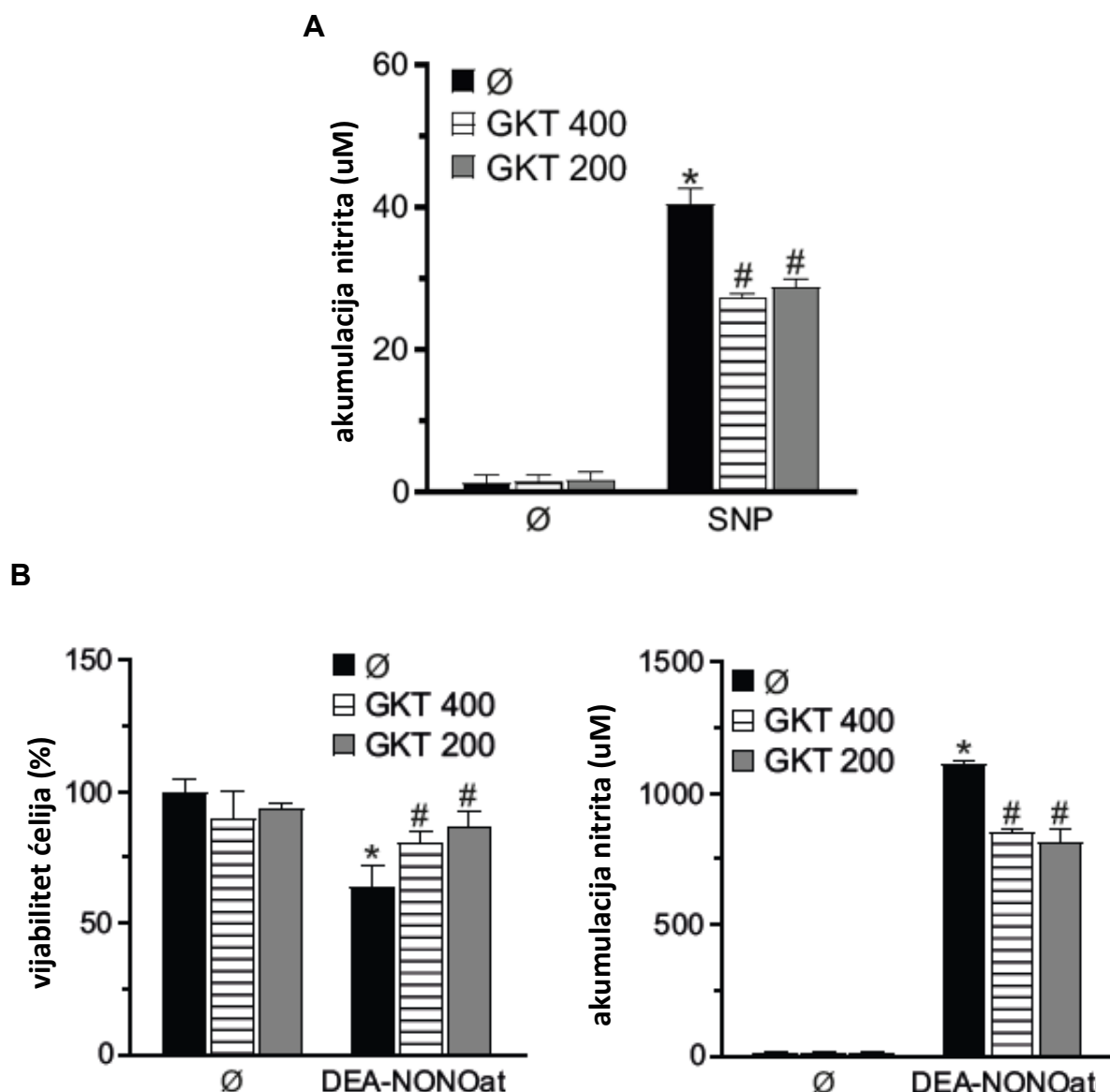
Prethodni rezultati istraživanja nedvosmisleno su pokazali da GKT poseduju sposobnost neutralizacije RKV i RAV u sistemu bez ćelija, pa je dalje ispitivana antioksidativna sposobnost GKT u prisustvu ćelija kao, i njena uloga u zaštiti od citotoksičnosti SNP. SH-SY5Y ćelije tretirane su 24 h SNP-om u prisustvu ili odsustvu GKT, a neutralizacija RKV i RAV ispitivana je metodom protočne citofluorimetrije. U cilju detekcije RAV korišćena je fluorescentna boja diaminofluorescin (DAF). Dobijeni rezultati su pokazali da SNP indukuje značajnu akumulaciju RAV u SH-SY5Y ćelijama, koja se može detektovati povećanjem zelene fluorescence (FL1) DAF. Uočeno smanjenje fluorescence DAF u prisustvu GKT ukazuje da GKT neutrališu NO/ONOO^- u ćelijama (Slika 27).



Slika 27. GKT neutrališu RAV u ćelijama tretiranim SNP-om

SH-SY5Y ćelije su inkubirane 24 h sa SNP (2 mM) u prisustvu ili odsustvu GKT (400 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Unutarćelijski nivo RAV analiziran je protočnom citofluorimetrijom nakon bojenja NO-senzitivnom fluoroformom DAF. Prikazan je reprezentativni histogram jednog od dva nezavisna eksperimenta.

$\text{NO}\bullet$ u ćelijskom supernatantu može da se detektuje indirektno merenjem nitrita (NO_2^-) kao stabilnog produkta metabolizma NO. Nakon 24 h tretmana SNP-om Griess-ovom reakcijom detektovano je značajno povećanje koncentracije NO_2^- u supernatantima SH-SY5Y ćelija, dok je koncentracija nitrita bila značajno smanjena u prisustvu GKT (Slika 28A). Sposobnost GKT da smanjuje produkciju $\text{NO}\bullet$ u ćelijskim kulturama tretiranim SNP-om dodatno je ispitana korišćenjem $\text{NO}\bullet$ donora DEA-NONOat-a (Zhang i sar., 2002). SH-SY5Y ćelije tretirane su DEA-NONOat-om i GKT tokom 24 h. Kao i u slučaju SNP, rezultati merenja nitrita Griess-ovim reagensom pokazali su da GKT smanjuju akumulaciju $\text{NO}\bullet$ u supernatantima ćelijskih kultura (Slika 28B). Takođe, GKT su smanjivale citotoksični efekat DEA-NONOat-a u tretmanu SH-SY5Y ćelija, što je potvrđeno MTT testom. Ovi rezultati, zajedno sa rezultatima merenja fluorescence DAF-a protočnom citofluorimetrijom, potvrđuju sposobnost GKT da neutrališu $\text{NO}\bullet$ u vanćelijskom i unutarćelijskom prostoru.

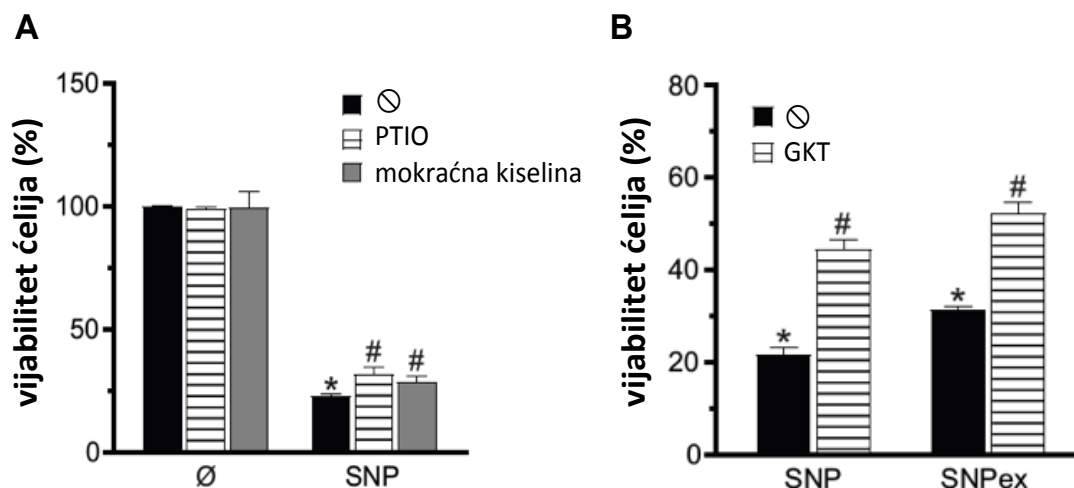


Slika 28. GKT neutrališu NO• u supernatantu ćelija tretiranih donorima NO

SH-SY5Y ćelije su inkubirane 24 h sa GKT ($400 \mu\text{g ml}^{-1}$) u prisustvu (A) 2 mM SNP i akumulacija NO• (NO_2^-) merena je spektrofotometrijski Griess-ovom reakcijom i (B). 2 mM DEA-NONOat-a pri čemu je vijabilitet ćelija analiziran MTT testom a akumulacija NO• (NO_2^-) merena je spektrofotometrijski Griess-ovom reakcijom. Rezultati reprezentativnog od tri eksperimenta prikazani su kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ triplikata (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a # $p < 0,05$ u odnosu na ćelije tretirane SNP-om).

U narednim eksperimentima ispitivana je uloga oslobođenog NO• u citotoksičnosti SNP. U tu svrhu korišćeni su karboksi-PTIO, koji neutrališe NO• (Goldstein i sar., 2003), i mokraćna kiselina, koja neutrališe ONOO^- nastao u reakciji NO• i $\text{O}_2^{\bullet -}$ (Hooper i sar., 1998). Rezultati MTT testa pokazali su da PTIO i mokraćna kiselina, u odnosu na GKT, imaju slabije protektivno dejstvo u ćelijskim kulturama tretiranim SNP-om (Slika 29A). Kako bi se potvrdilo da NO• nije ključni medijator citotoksičnosti SNP, SH-SY5Y ćelije tretirane su “istrošenim” SNP-om (engl. “*exhausted*” SNP, SNPex). Naime, prethodne studije su pokazale da višednevno izlaganje SNP svetlosti smanjuje njegovu sposobnost da oslobađa NO•, pa je u narednim eksperimentima

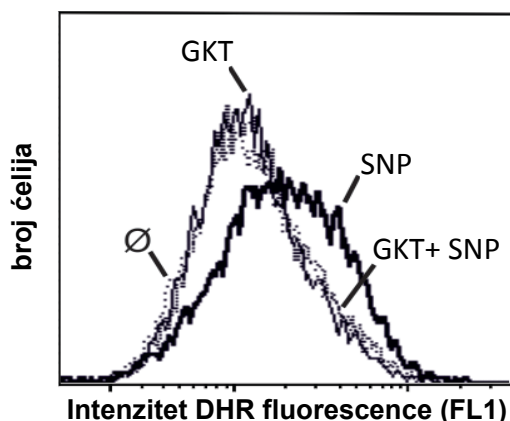
korišćen SNP (2mM) prethodno izložen svetlosti tokom 72 h (Badovinac i sar., 2000). Nakon 24 h tretmana SNP-om ili SNPex u prisustvu GKT, vijabilitet SH-SY5Y ćelija određivan je MTT testom. Dobijeni rezultati su pokazali da ne postoji značajna razlika u citotoksičnosti SNP i SNPex, kao i da prisustvo GKT podjednako štiti ćelije od citotoksičnih efekata SNP i SNPex (Slika 29B). Ovi rezultati potvrđuju da $\text{NO}\bullet$ nije glavni medijator citotoksičnosti SNP i da sposobnost GKT da neutrališu $\text{NO}\bullet$ nije osnovni mehanizam njihovog citoprotektivnog dejstva.



Slika 29. Citoprotektivno dejstvo GKT ne zavisi samo od neutralizacije $\text{NO}\bullet$

(A) SH-SY5Y ćelije su inkubirane 24 h sa 2mM SNP u prisustvu ili odsustvu PTIO ili mokraćne kiseline. (B) SH-SY5Y ćelije su tretirane 24 h sa "istrošenim" SNP-om (SNPex; 2 mM) u prisustvu ili odsustvu GKT ($400 \mu\text{g ml}^{-1}$). Vijabilitet ćelija određivan je MTT testom. Rezultati reprezentativnog od tri eksperimenta prikazani su kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ triplikata (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a # $p < 0,05$ u odnosu na ćelije tretirane SNP-om).

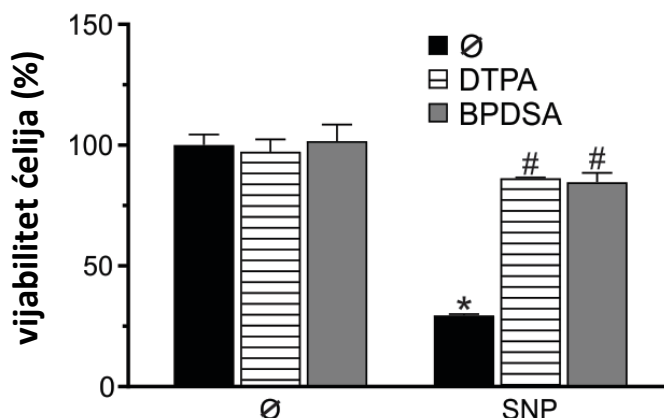
Analiza antioksidativnog profila u sistemu bez ćelija pokazala je da GKT poseduju sposobnost neutralizacije RKV. Da bi se detaljnije ispitaio antioksidativni profil GKT u ćelijama, SH-SY5Y ćelije tretirane su SNP-om u prisustvu ili odsustvu GKT. Nivo RKV određivan je protočnom citofluorimetrijom koristeći neselektivni redoks-senzitivni fluorohrom dihidrorodamin (DHR). Povećanje intenziteta zelene fluorescence (FL1) DHR u tretmanu SNP-om ukazuje na povećanu koncentraciju RKV, što je u skladu sa indukcijom oksidativnog stresa. Prisustvo GKT smanjuje fluorescencu DHR u ćelijama tretiranim SNP-om, što potvrđuje njihovu unutarćelijsku antioksidativnu aktivnost (Slika 30).



Slika 30. GKT smanjuju unutarćelijsku produkciju RKV indukovanu SNP-om

SH-SY5Y ćelije inkubirane su 6 h sa SNP (2 mM) u prisustvu ili odsustvu GKT ($400 \mu\text{g ml}^{-1}$). Unutarćelijska koncentracija RKV analizirana je merenjem fluorescence DHR protočnom citofluorimetrijom. Prikazan je reprezentativni histogram jednog od dva nezavisna eksperimenta.

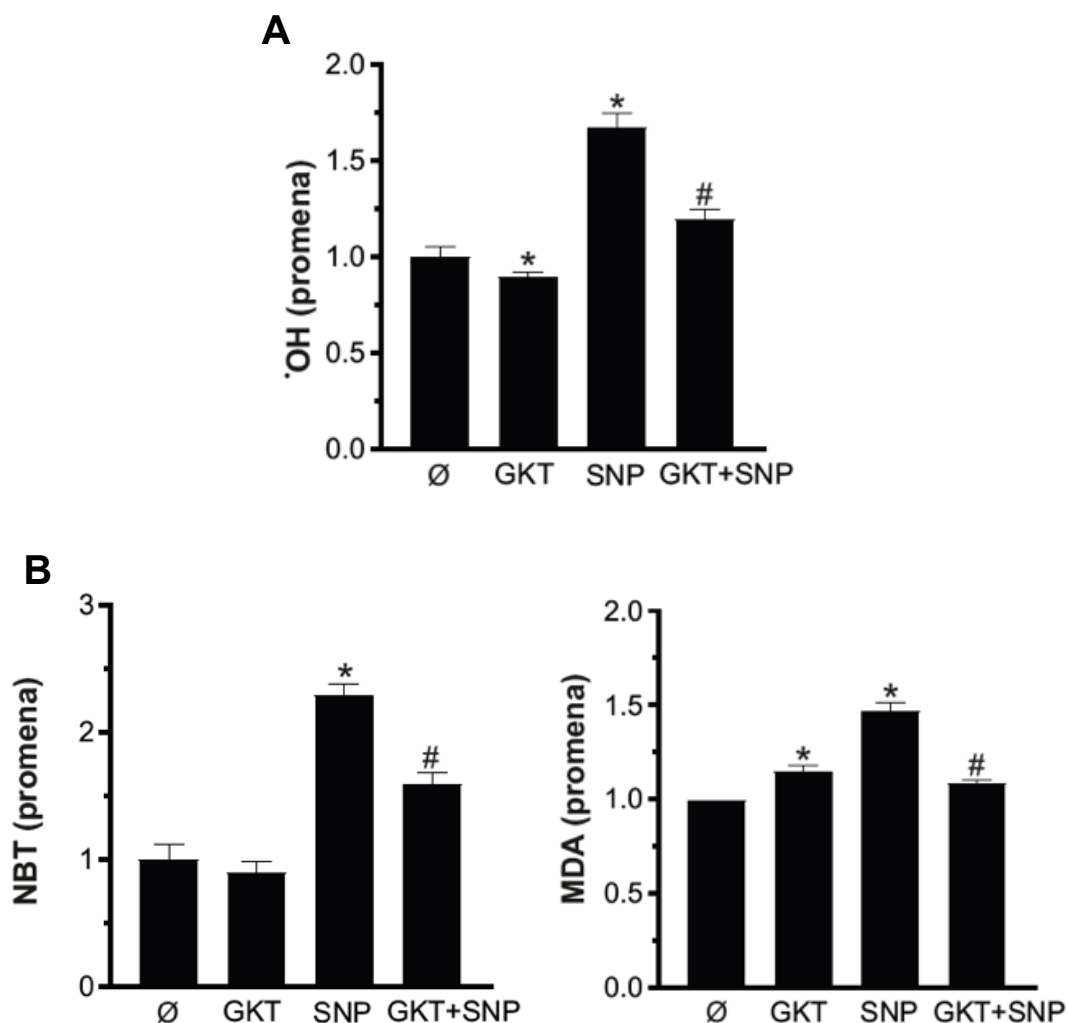
Prilikom izlaganja svetlosti, pored NO, SNP oslobađa i Fe^{2+} jon kao ključni inicijator Fentonove reakcije. U cilju ispitivanja uticaja Fe^{2+} u citotoksičnosti indukovanoj SNP-om korišćeni su helatori gvožđa, supstance koje poseduju sposobnost vezivanja jona gvožđa, batofenantrolindisulfonska kiselina (BPDSA) i dietilen triamino pentasirćetna kiselina (DTPA). Obe supstance imaju visok afinitet za vezivanje Fe^{2+} i formiraju komplekse koji blokiraju aktivnost membranskih transportera jona gvožđa (Sreenivasulu i sar., 2010). SH-SY5Y ćelije tretirane su 24 h SNP-om u kombinaciji sa helatorima BPDSA i DTPA, a vijabilitet ćelija određivan je MTT testom. Dobijeni rezultati pokazali su da helatori gvožđa smanjuju citotoksičnost SNP (Slika 31), što potvrđuje ulogu Fe^{2+} jona u ovom procesu.



Slika 31. Helatori gvožđa smanjuju citotoksičnost SNP

SH-SY5Y ćelije inkubirane su 24 h sa SNP (2 mM) u prisustvu ili odsustvu helatora gvožđa DTPA (5 μM) i BPDSA (50 μM). Vijabilitet ćelija određivan je MTT testom. Rezultati reprezentativnog od tri eksperimenta prikazani su kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ triplikata (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a # $p < 0,05$ u odnosu na ćelije tretirane SNP-om).

Pošto je pokazan unutarćelijski antioksidativni potencijal, postavlja se pitanje koje su RKV od značaja u modelu oksidativnog stresa indukovanoj SNP-om u SH-SY5Y ćelijama, kao i kakav je uticaj GKT na njihovu produkciju. Koncentracija $\text{OH}^\bullet$ kao jednog od biološki najpotentnijih kiseoničnih radikala, merena je spektrofotometrijskom metodom koristeći $\text{OH}^\bullet$ -senzitivnu fluorescentnu probu OH580. Tretman SNP-om tokom 6 h značajno je povećao intenzitet OH580 fluorescence, dok je prisustvo GKT značajno smanjilo njen nivo u ćelijama tretiranim SNP-om (Slika 32A). Ovaj rezultat potvrđuje sposobnost GKT da neutrališu unutarćelijsku produkciju $\text{OH}^\bullet$ indukovanu SNP-om. Aktivnost GKT u neutralizaciji unutarćelijskog $\text{O}_2^{\bullet-}$ merena je NBT testom. Spektrofotometrijsko merenje akumulacije formazana u ćelijama pokazalo je da prisustvo GKT smanjuje unutarćelijski nivo $\text{O}_2^{\bullet-}$ u ćelijama tretiranim SNP-om 24 h (Slika 32B). Unutarćelijska antioksidativna aktivnost GKT potvrđena je i merenjem nivoa lipidne peroksidacije. Nakon tretmana ćelija u trajanju od 24 h, spektrofotometrijsko utvrđivanje koncentracije MDA, kao proizvoda lipidne peroksidacije, pokazalo je da GKT značajno smanjuju nivo lipidne peroksidacije indukovane tretmanom SNP-om u ćelijama (Slika 32C).



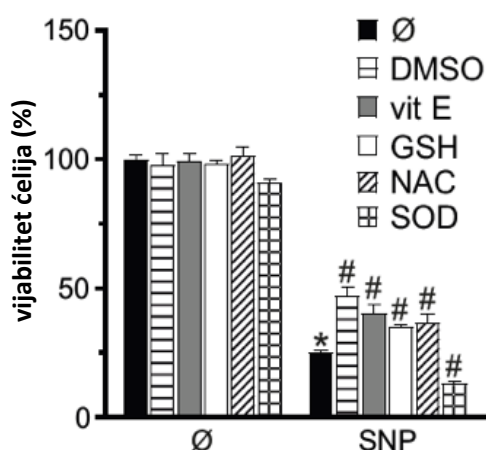
Slika 32. GKT smanjuju nivo OH•, O₂^{•-} i lipidne peroksidaciju u ćelijama tretiranim SNP-om

SH-SY5Y ćelije inkubirane su 24 h sa SNP-om (2 mM) u prisustvu ili odsustvu GKT (400 µg ml⁻¹). (A) Koncentracija OH• merena je komercijalno dostupnim kitom za detekciju OH•. (B) Koncentracija O₂^{•-} meren je NBT testom. (C) Koncentracija MDA, nusprodukta procesa lipidne peroksidacije, merena je MDA testom. Promene koncentracije merenih radikala prikazani su u odnosu na kontrolni uzorak koji je sveden na jediničnu vrednost. Rezultati reprezentativnog od tri eksperimenta prikazani su kao SV ± SD triplicate (*p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a #p < 0,05 u odnosu na ćelije tretirane SNP-om).

Prethodni rezultati nedvosmisleno potvrđuju da GKT ispoljavaju antoksidativnu aktivnost i u unutrašnjosti ćelija. U modelu oksidativnog stresa indukovano SNP-om u SH-SY5Y ćelijama, GKT smanjuju unutarćelijsku koncentraciju OH• i O₂^{•-}, kao i nivo lipidne peroksidacije.

U cilju ispitivanja uloge određenih RKV u citotoksičnosti SNP, SH-SY5Y ćelije su tretirane SNP-om u prisustvu ili odsustvu različitih antioksidativnih agenasa, kao što su neselektivni antioksidansi redukovani glutation i njegov prekursor N-acetil cistein (Polyak i sar., 2018; Tuncyurek i sar., 2006), DMSO, koji delimično selektivno neutrališe OH• radikale (DeForge i sar., 1992), vitamin E (tokoferol) kao inhibitor lipidne peroksidacije (Polyak i sar., 2018) i superoksid dismutaza koja neutrališe O₂^{•-} (Muller i sar., 2004). Rezultati MTT testa su pokazali da su svi pomenuti antioksidansi, osim SOD, imitirali citoprotektivno dejstvo GKT u ćelijskim kulturama izloženim SNP-u (Slika 33). S druge strane, prisustvo vanćelijske SOD ne samo da nije imalo citoprotektivni efekat, već je povećavalo citotoksičnost SNP (Slika 33).

Protektivno dejstvo helatora gvožđa, DMSO i tokoferola ukazuje da su neutralizacija OH• nastalog u Fentonovoj reakciji, kao i posledična inhibicija lipidne peroksidacije, osnovni mehanizmi citoprotektivnog efekta GKT u SH-SY5Y ćelijama tretiranim SNP-om. Imajući u vidu da SOD ne prolazi kroz ćelijsku membranu, kao i da ne štiti SH-SY5Y ćelije od SNP-a, može se zaključiti da je vanćelijska neutralizacija RKV nedovoljna za zaštitu ćelija od oksidativnog stresa indukovano SNP-om.

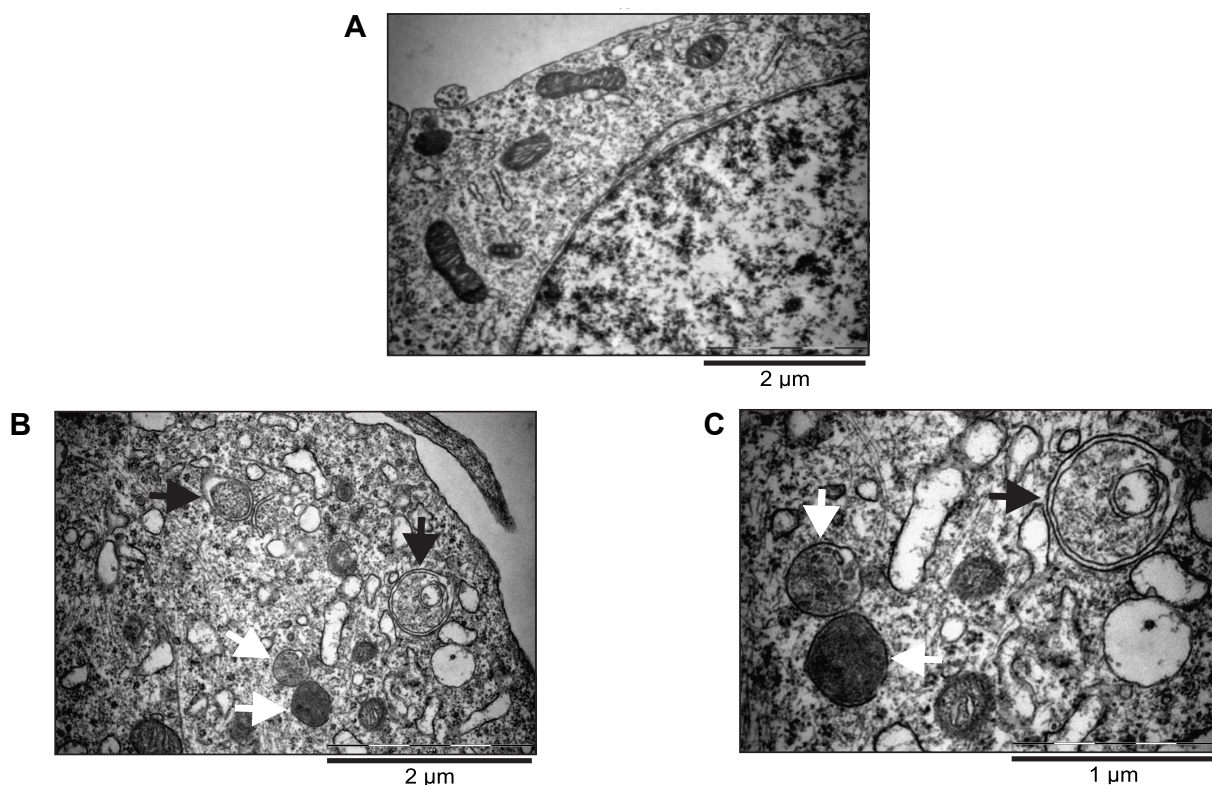


Slika 33. Citotoksičnost SNP zavisi od OH• radikala i lipidne peroksidacije

SH-SY5Y ćelije su inkubirane 24 h sa SNP (2 mM) u prisustvu ili odsustvu antioksidativnih agenasa DMSO (5%), vitamina E (100 µM), redukovano glutationa (GSH; 100 µM), N-acetil cisteina (NAC; 10 mM) i SOD (250 µg ml⁻¹). Vijabilitet ćelija meren je MTT testom. Rezultati reprezentativnog od tri eksperimenta prikazani su kao SV ± SD triplikata (*p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a #p < 0,05 u odnosu na ćelije tretirane SNP-om)).

4.6 GKT indukuju autofagiju inhibicijom Akt/mTOR signalnog puta

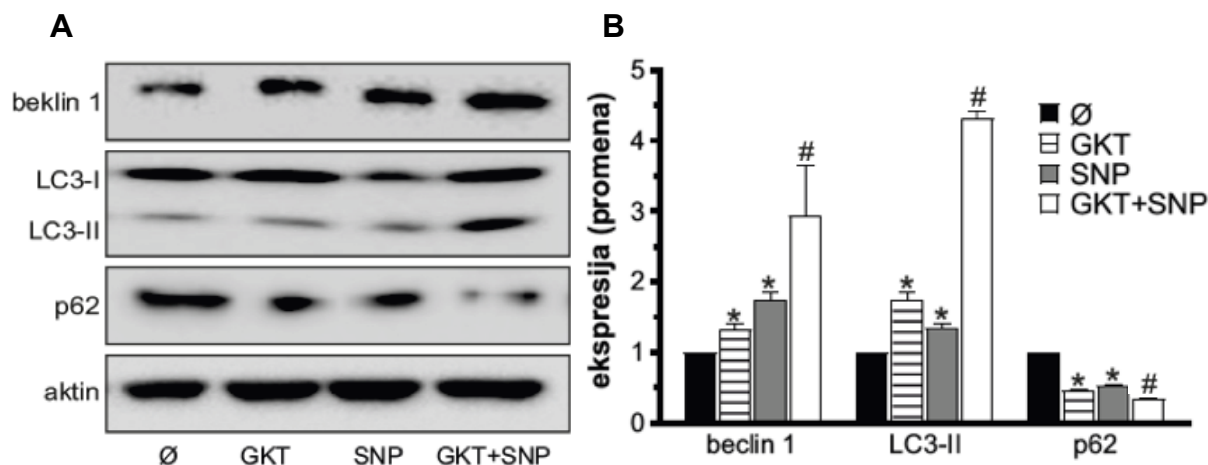
Tokom ispitivanja ćelijske lokalizacije GKT na TEM mikrografijama je uočeno da kombinovani tretman SH-SY5Y ćelija SNP-om i GKT dovodi do pojave unutarćelijskih vezikula sa jednostrukim i dvostrukim membranama u čijem lumenu je detektovan ćelijski sadržaj (Slika 34A-C). Imajući u vidu morfološku sličnost uočenih vezikula sa strukturom autofagozoma (dvoslojna membrana) i autolizozoma (jednoslojna membrana), u narednim eksperimentima je ispitivan uticaj SNP i GKT na proces autofagije.



Slika 34. Tretman SNP i GKT dovodi do vakuolizacije citoplazme SH-SY5Y ćelija

(A) Netretirane SH-SY5Y ćelije. (B, C) SH-SY5Y ćelije inkubirane 6 h sa SNP (2 mM) u prisustvu GKT ($400 \mu\text{g ml}^{-1}$). Na TEM mikrografijama, u ćelijama tretiranim SNP-om (B, C) vide se vezikule sa jednostrukom (bele strelice) i dvostrukom membranom (crne strelice).

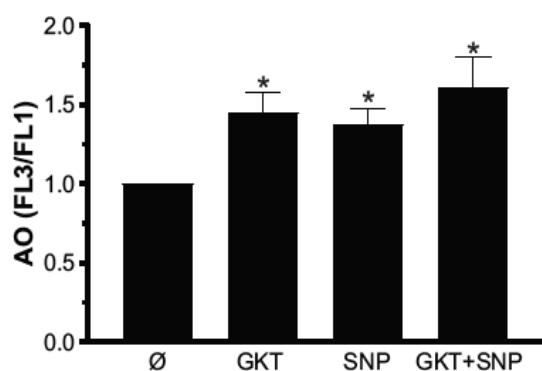
Pored nakupljanja vezikula, indukcija autofagije se odlikuje povećanjem nivoa LC3-II proteina koji ulazi u sastav membrane autofagozoma (Mizushima i Komatsu, 2011), kao i smanjenjem nivoa kargo receptora p62/SQSTM-1, koji se selektivno razgrađuje u procesu autofagije (Parzych i Klionsky, 2014). Rezultati imunoblot analize su pokazali da pojedinačni tretmani sa SNP i GKT malo, ali statistički značajno povećavaju ekspresiju proautofagnog beclin-1, kao i konverziju LC3-I u lipidovanu formu LC3-II (Slika 35). Takođe, nivo p62 nakon tretmana SNP i GKT bio je značajno snižen u odnosu na kontrolne ćelije. Uočene promene bile su značajno izraženije u kombinovanom tretmanu SNP i GKT, što potvrđuje dodatnu indukciju autofagije u prisustvu GKT (Slika 35).



Slika 35. Imunoblot analiza markera autofagije u tretmanu SNP-om i GKT

(A) Nivoi LC3-II, beklina-1 i SQSTM1/p62 u SH-SY5Y ćelijama nakon tretmana sa SNP (2 mM) u prisustvu ili odsustvu GKT (400 µg ml⁻¹) određivani su imunoblot metodom posle tretmana od 6 h. Ekspresija aktina korišćena je kao pokazatelj jednake koncentracije proteina u analiziranim uzorcima. Prikazan je reprezentativni blot koji je rezultat tri eksperimenata sa sličnim rezultatima. (B) Rezultati densitometrijske analize prikazani su u odnosu na signal β-aktina kao SV ± SD iz tri eksperimenata (*p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a #p < 0,05 u odnosu na pojedinačne tretmane SNP-om i GKT).

Sposobnost GKT da u tretmanu SNP-om indukuje autofagiju ispitivana je i metodom protočne citofluorimetrije upotrebom pH-senzitivne boje akridin oranž (AO) za detekciju promena u pH vrednosti lumena unutarćelijskih vezikula. Rezultati su ukazali da pojedinačni tretmani, kao i kombinovani tretman SNP i GKT značajno povećava odnos crvene (FL3) u odnosu na zelenu (FL1) fluorescencu (Slika 36). Povećanje crvene fluorescencije ukazuje na acidifikaciju lumena vezikula, što predstavlja jednu od karakteristika procesa autofagije.



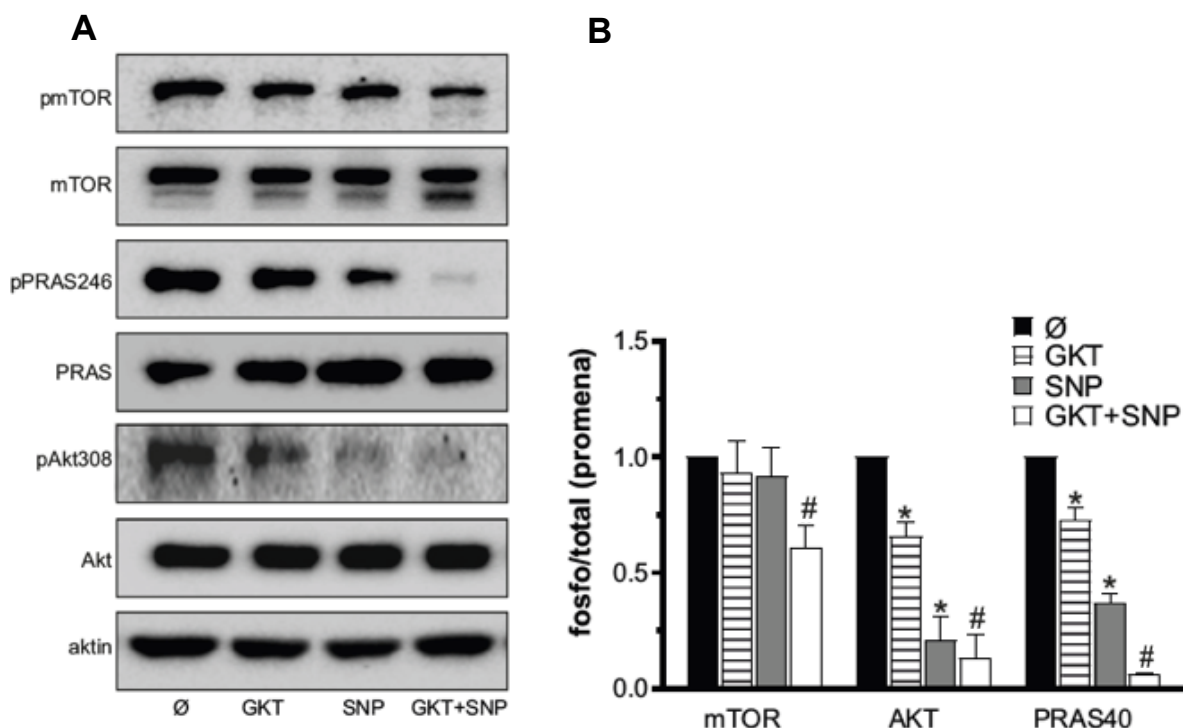
Slika 36. SNP i GKT dovode do unutarćelijske acidifikacije

SH-SY5Y ćelije tretirane su 6 h SNP-om (2 mM) u prisustvu ili odsustvu GKT (400 µg ml⁻¹), posle čega su ćelije 15 minuta inkubirane sa AO (1 µM) u cilju detekcije unutarćelijske acidifikacije protočnom citofluorimetrijom.

Rezultati reprezentativnog od dva eksperimenata prikazani su kao SV ± SD triplicate (*p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolne ćelije).

Kako bi se ustanovio mehanizam koji se nalazi u osnovi indukcije autofagije, imunoblot analizom su ispitivani nivoi fosforilacije ključnih signalnih proteina koji kontrolišu ovaj proces. Dobijeni rezultati su pokazali da kombinovani tretman SNP i GKT dovodi do smanjenja nivoa fosforilacije glavnog negativnog regulatora mTOR i njegovog ushodnog aktivatora Akt (Slika 37).

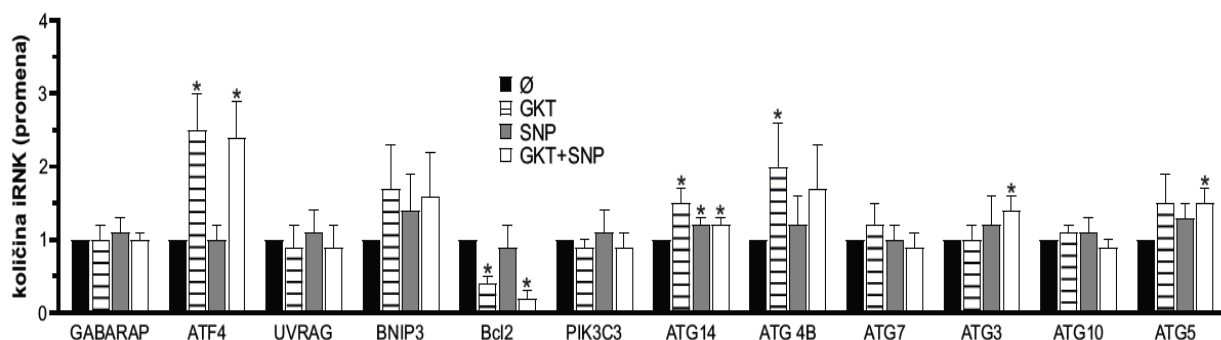
Takođe je uočeno i smanjenje nivoa fosforilisane forme mTOR-vezujućeg proteina PRAS40 (Thr246) (Slika 37). Ovakvi rezultati ukazuju da je PI3K/AKT put aktivacije mTOR inhibiran, čime je omogućena indukcija autofagije u kombinovanom tretmanu.



Slika 37. Imunoblot analiza signalnih proteina koji regulišu autofagiju u tretmanu SNP-om i GKT

(A) SH-SY5Y ćelije tretirane su 6 h SNP-om (2 mM) u prisustvu ili odsustvu GKT (400 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Nivoi fosforilacije mTOR, Akt i PRAS40 određivani su metodom imunoblota, pri čemu je ekspresija aktina korišćena kao pokazatelj jednake koncentracije proteina u analiziranim uzorcima. Prikazan je reprezentativni blot koji je rezultat tri eksperimenta sa sličnim rezultatima. (B) Rezultati denzitometrijske analize prikazani su odnosu na ukupni sadržaj totalnih formi proteina kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ iz tri eksperimenta (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a # $p < 0,05$ u odnosu na pojedinačne tretmane SNP-om i/ili GKT).

Iako je uglavnom regulisana post-translacionim modifikacijama ATG proteina, indukcija autofagije je često praćena i povećanom transkripcijom njihovih gena. Da bi se utvrdilo na kom nivou regulacije dolazi do uočenih promena, ispitivana je ekspresija ključnih autofagnih proteina metodom RT-qPCR. Tretman GKT u trajanju od 8 h povećao je nivoe iRNK koja kodira proautofagne proteine ATF4, ATG14 i ATG5 (Slika 38). Takođe, uočeno je i smanjenje nivoa iRNK koja kodira inhibitor autofagije BCL2 (Slika 38). Nakon kombinovanog tretmana SNP-om i GKT bile su očuvane primećene razlike, a uočeno je i smanjenje nivoa iRNK koja kodira autofagni aktivator ATG3 i proteina uključenog u elongaciju membrane fagofora ATG5 (Slika 38).



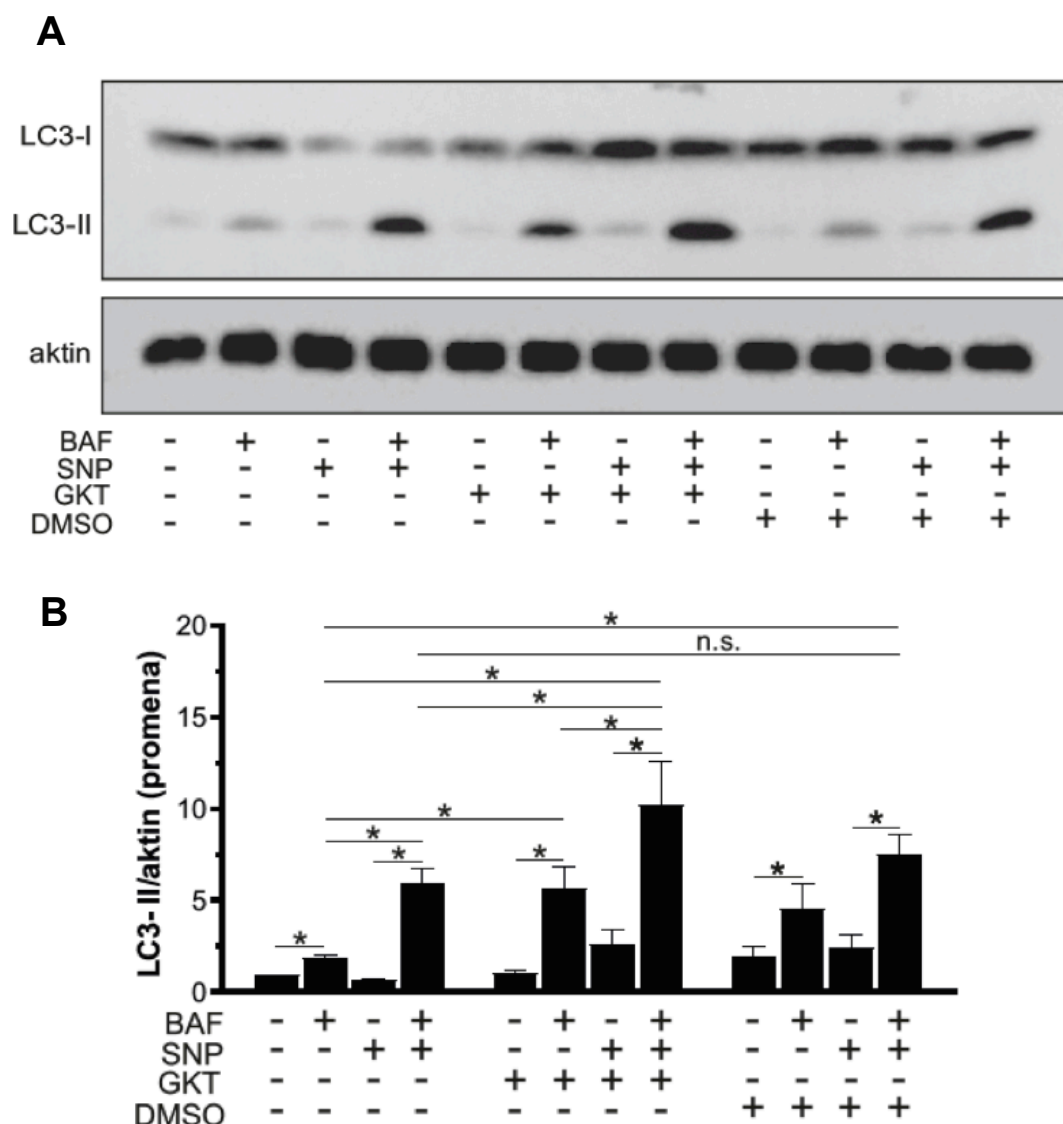
Slika 38. GKT indukuju ekspresiju gena koji regulišu autofagiju

Ekspresija iRNK za gene koji regulišu autofagiju u SH-SY5Y ćelijama tretiranim SNP-om (2 mM) u prisustvu ili odsustvu GKT (400 µg ml⁻¹). Analiza je izvršena metodom RT-qPCR nakon tretmana od 8 h. Rezultati su prikazani kao SV ± SD iz tri nezavisna eksperimenta (*p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na ekspresiju u netretiranim ćelijama koja je arbitrarno podešena na vrednost 1).

Prikazani rezultati ukazuju da kombinovani tretman SNP i GKT indukuje autofagiju inhibicijom PI3K/AKT/mTOR signalnog puta, kao i transkripcionom aktivacijom ključnih proautofagnih proteina.

4.7 GKT indukuju citoprotektivnu autofagiju nezavisno od njihove antioksidativne aktivnosti

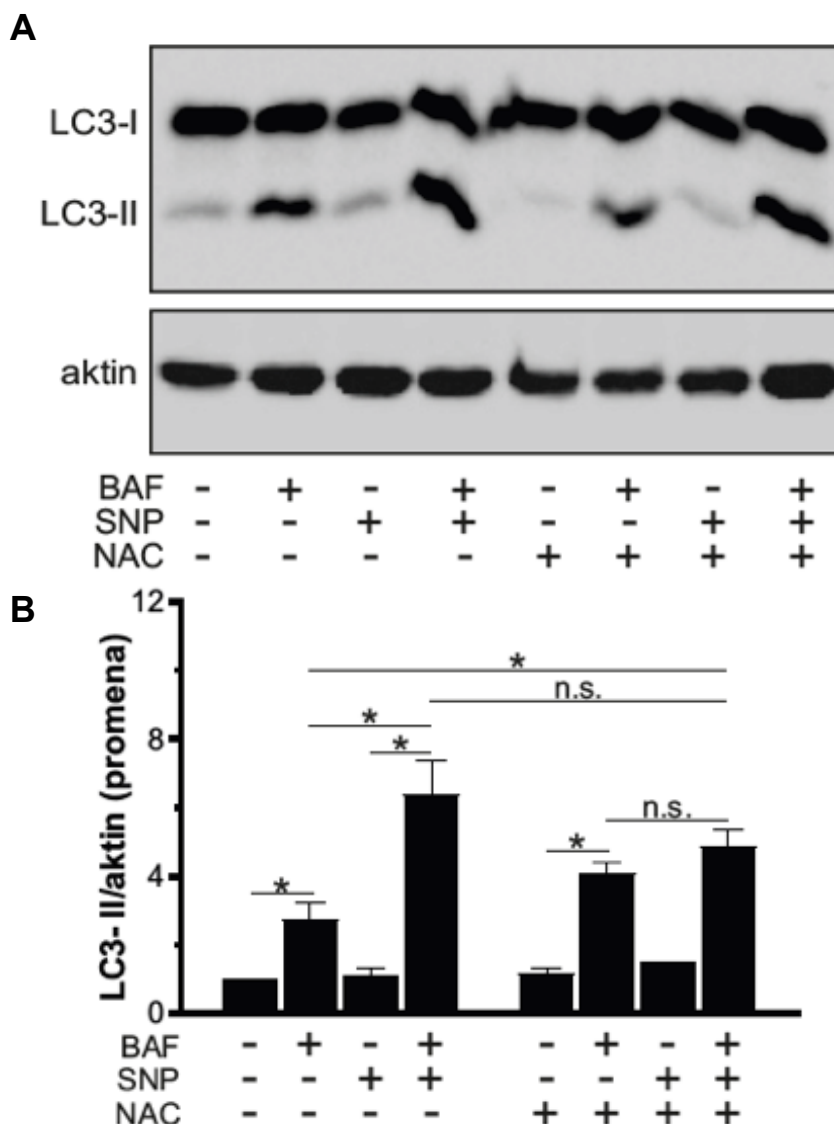
Prikazani rezultati ukazuju da GKT indukuju autofagiju, kao i da učestvuju u neutralizaciji RKV i RAV. Dakle, postavlja se pitanje koja je veza između proautofagne i antioksidativne sposobnosti GKT u smanjivanju citotoksičnosti indukovane SNP-om. Uočeno povećanje nivoa LC3-II može biti rezultat nagomilavanja autofagozoma zbog indukcije autofagije, ali i posledica njegove smanjene degradacije u autolizozomima usled blokade autofagije (Klionsky i sar., 2016). Po važećim smernicama za ispitivanje autofagije, jedan od najčešćih načina merenja njene aktivnosti predstavlja imunoblot analiza autofagnog fluksa u prisustvu proteolitičkog inhibitora bafilomicina. Bafilomicin A1, inhibitor protonске pumpe, dovodi do smanjenja lizosomalne acidifikacije i blokade autofagne proteolize, čime se inhibira razgradnja LC3-II u autolizozomima (Mauvezin i Neufeld, 2015). Imunoblot analiza ćelija tretiranih SNP-om, GKT i njihovom kombinacijom pokazala je dodatno povećanje nivoa LC3-II u prisustvu bafilomicina, što potvrđuje indukciju LC3-I/LC3-II konverzije i time ukazuje na aktivaciju autofagije, odnosno povećanje autofagnog fluksa (Slika 39A). Kako bi se utvrdilo da li neutralizacija OH• takođe povećava autofagni fluks, SH-SY5Y ćelije humanog neuroblastoma tretirane su DMSO-om (0.5 %) koji poseduje delimičnu selektivnost u neutralizaciji OH• radikala. Rezultati su pokazali da DMSO, za razliku od GKT, ne dovodi do povećanja autofagnog fluksa (Slika 39).



Slika 39. GKT stimulišu autofagni fluks u SH-SY5Y ćelijama tretiranim SNP-om

(A) SH-SY5Y ćelije tretirane su 12 h SNP-om (2 mM), GKT ($400 \mu\text{g ml}^{-1}$) ili DMSO-om (0.5 %) u prisustvu ili odsustvu bafilomicina A1 (BAF, 10 nM). Nivoi LC3-I i LC3-II ispitivani su metodom imunoblota, pri čemu je ekspresija aktina korišćena kao pokazatelj jednake koncentracije proteina u analiziranim uzorcima. Prikazan je reprezentativni blot koji je rezultat tri eksperimenta sa sličnim rezultatima. (B) Rezultati denzitometrijske analize prikazani su u odnosu na ukupni sadržaj β -aktina kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ iz tri eksperimenta (* $p < 0,05$).

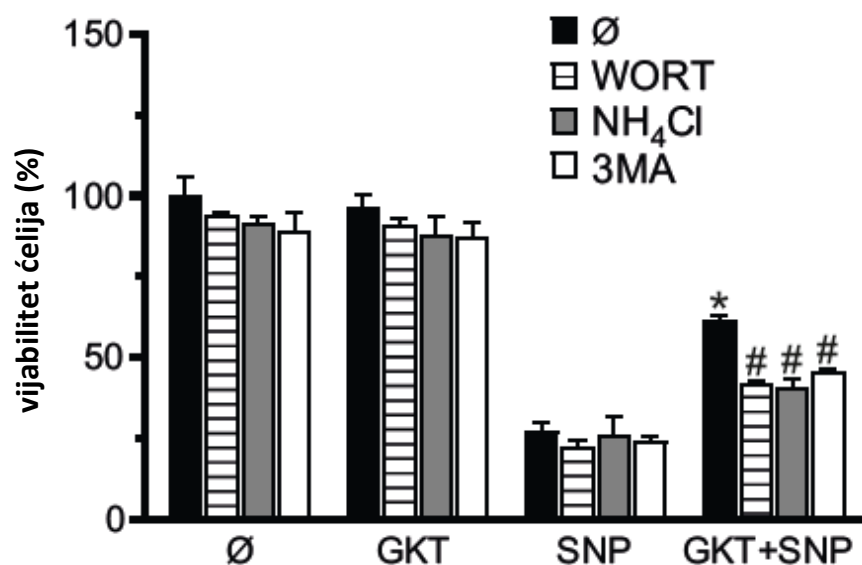
Dodatno, ćelije su tretirane antioksidantom NAC (10 mM) u prisustvu ili odsustvu SNP i BAF, a rezultati imunoblot analize su pokazali da ni prisustvo NAC nije povećalo autofagni fluks (Slika 40). Dobijeni rezultati analize autofagnog fluksa sugerišu da je uloga GKT u procesu indukcije autofagije potpuno nezavisna od njihove sposobnosti da neutrališu RKV.



Slika 40. NAC ne stimuliše autofagni fluks u SH-SY5Y ćelijama tretiranim SNP-om

(A) SH-SY5Y ćelije tretirane su 12 h SNP-om (2 mM) i NAC-om (10 mM) u prisustvu ili odsustvu bafilomicina A1 (BAF, 10 nM). Nivoi LC3-I i LC3-II ispitivani su metodom imunoblota. pri čemu je ekspresija aktina korišćena kao pokazatelj jednake koncentracije proteina u analiziranim uzorcima. Prikazan je reprezentativni blot koji je rezultat tri eksperimenta sa sličnim rezultatima. (B) Rezultati denzitometrijske analize prikazani su u odnosu na ukupni sadržaj β -aktina kao $SV \pm SD$ iz tri eksperimenta (* $p < 0,05$).

Na kraju, da bismo utvrdili ulogu autofagije u citoprotektivnom efektu GKT koristili smo inhibitore rane (vortmanin i 3-metiladenin) i kasne faze (amonijum hlorid) procesa autofagije. Rezultati su pokazali da tretman inhibitorima autofagije nije imao uticaja na vijabilitet ćelija tretiranih SNP-om i GKT pojedinačno. Međutim, pri kombinovanom tretmanu SNP i GKT, inhibitori autofagije dodatno su pojačavali citotoksične efekte SNP (Slika 41). Dakle, indukcija autofagije i antioksidativno dejstvo GKT nezavisno učestvuju u zaštiti SH-SY5Y ćelija od citotoksičnosti SNP-a.



Slika 41. Inhibitori autofagije povećavaju citotoksičnost kombinovanog tretmana SNP i GKT

SH-SY5Y ćelije su inkubirane 24 h sa SNP-om (2 mM) i/ili GKT (400 $\mu\text{g ml}^{-1}$), u prisustvu ili odsustvu inhibitora autofagije vortmanina (WORT; 200 nM), 3-metiladenina (3MA, 5 mM) i amonijum hlorida (NH₄Cl, 25 mM). Vijabilitet ćelija meren je testom mitohondrijalne dehidrogenaze (MTT test). Rezultati jednog od dva eksperimenta prikazani su kao SV $\pm$ SD triplikata (*p < 0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na netretirane ćelije, a #p < 0,05 u odnosu na ćelije tretirane SNP-om i GKT).

5. Diskusija

U istraživanjima iz kojih je proistekla ova doktorska disertacija ispitivan je uticaj GKT na citotoksičnost indukovanu SNP-om u SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma. Prvi put je pokazano da GKT dobijene elektrohemijom oksidacijom grafitu štite SH-SY5Y ćelije od oksidativnog i nitroaktivnog stresa indukovano SNP-om. Mehanizam uočene citoprotekcije zasniva se na smanjenju mitohondrijalne depolarizacije i posledičnoj blokadi apoptotske ćelijske smrti zavisne od kaspaza. Dobijeni rezultati su ukazali na sposobnosti GKT da neutrališu OH• i u manjoj meri NO. Takođe, citoprotektivno dejstvo GKT zavisilo je i od njihove sposobnosti da indukuju autofagiju inhibicijom AKT/mTOR signalnog puta, kao i aktivacijom transkripcije gena koji regulišu autofagiju. Rezultati ove disertacije pokazali su da GKT imaju citoprotektivno dejstvo u *in vitro* modelu oksidativnog stresa nervnih ćelija, s tim da je po prvi put pokazano da ne postoji direktna veza antioksidativne sposobnosti GKT i njihovog uticaja na proces indukcije autofagije.

GKT korišćene u prikazanim eksperimentima poseduju sve prethodno opisane karakteristike: stabilnu fluorescenciju (Liu i sar., 2018), rastvorljivost u vodi (Ruan i sar., 2018), nisku citotoksičnost (Nurunnabi i sar., 2013) i odličnu biokompatibilnost (Zhu i sar., 2016). Analiza UV-Vis apsorpcionih spektara ukazala je da GKT poseduju apsorpcioni maksimum u UV delu spektra, dok je dalje povećanje ekscitacione talasne dužine dovelo da pada njihove apsorpcione sposobnosti. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodno opisanim optičkim karakteristikama GKT (Ristic i sar., 2014; Jiang i sar., 2013). Analiza fotoluminiscentnih spektara GKT pokazala je da one poseduju najveći intenzitet fotoluminiscencije nakon osvetljavanja svetlošću niske talasne dužine (360 nm). Strukturna konfiguracija GKT utiče na promene u fotoluminiscentnoj emisiji. GKT mogu imati dva tipa strukturne konfiguracije: cik-cak (engl. *zigzag*) i "armchair" oblik ivice. Sk i sar. su pokazali da GKT sa cik-cak oblikom ivice emituju fotoluminiscenciju u crvenom delu spektra, dok GKT sa "armchair" oblikom ivice pomeraju fotoluminiscenciju ka plavom delu spektra (Sk i sar., 2014). Naši rezultati ukazuju da se sa povećanjem talasne dužine ekscitacione svetlosti (iznad 450 nm) emisije GKT pomera ka plavom delu spektra, što je najverovatnije posledica "armchair" oblika ivice. Veličina GKT takođe ima uticaja na njihove fotoluminiscentne karakteristike, pri čemu smanjenje prečnika GKT dovodi do povećanja intenziteta fotoluminiscencije (Liu i sar., 2021). Imajući u vidu relativnu varijabilnost u veličini uzorka GKT korišćenog u našim istraživanjima (10-15 nm), pretpostavlja se da u uočenim fotoluminiscentnim karakteristikama veći udeo imaju GKT sa manjim dijametrom (10 nm).

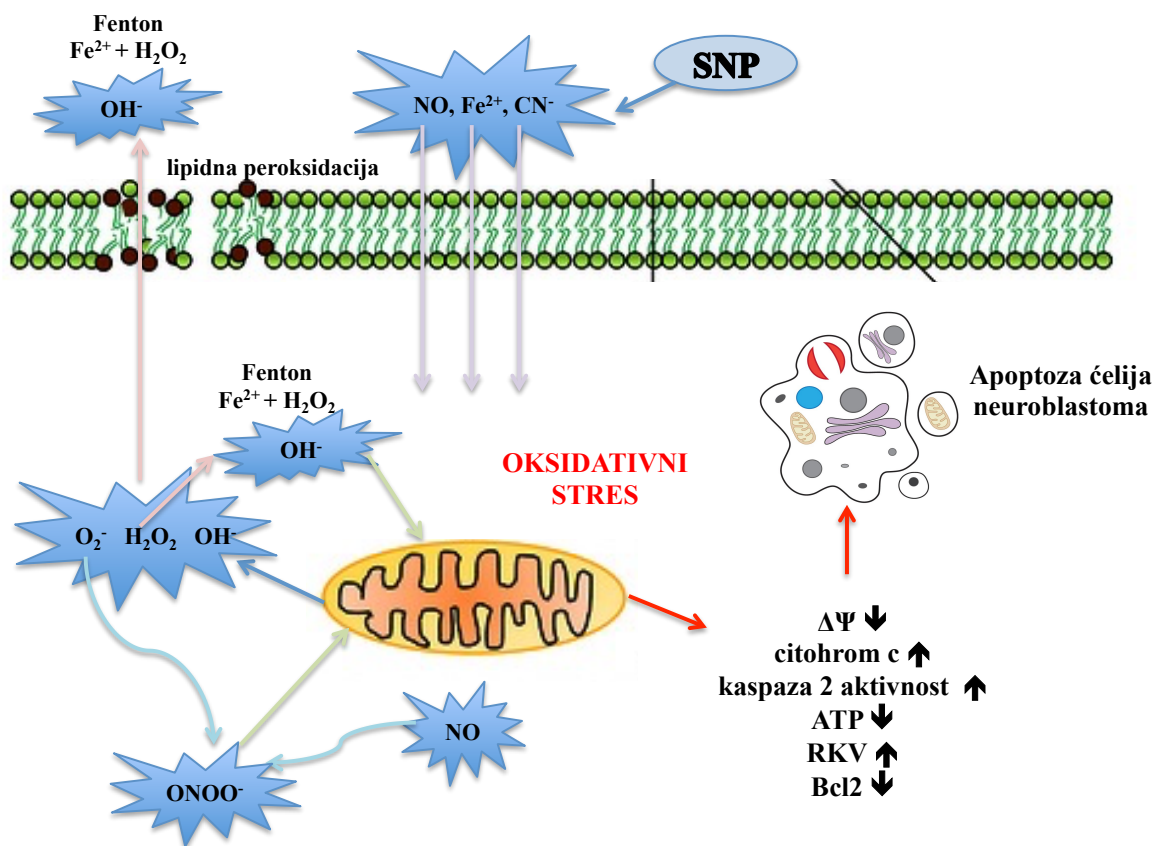
SH-SY5Y ćelije humanog neuroblastoma izabrane su kao eksperimentalni model za ispitivanje neurotoksičnih efekata SNP. Ranije studije pokazale su da je ova ćelijska linija odgovarajuća za *in vitro* ispitivanje fundamentalnih procesa u nervnim ćelijama. Naime, SH-SY5Y ćelije eksprimiraju enzime tirozin hidroksilazu i dopamin-β-hidroksilazu, koji su karakteristični za kateholaminergičke neurone. Takođe, SH-SY5Y ćelije mogu biti diferencirane u ćelije slične neuronima (engl. *neuron-like cells*) koje poseduju markere karakteristične za neurone (Ross i sar., 1983). U značajnom broju eksperimentalnih studija, SH-SY5Y ćelije su korišćene kao model za ispitivanje citotoksičnih efekata SNP (Wei i sar., 2017 ; Cardaci i sar., 2008).

Rezultati ove studije su potvrdili da tretman SNP ima citotoksično dejstvo na SH-SY5Y ćelije. Ovo je u skladu sa ranijim ispitivanjem efekata SNP na različitim ćelijskim linijama, kao što su neuronima slične PC12 ćelije (Nakamura i sar., 1997); humane ćelije vaskularnog endotela (Babich i sar., 1998) i različiti tipovi tumorskih ćelija (Quan i sar., 2017). Takođe, prikazani rezultati su pokazali da je citotoksični efekat SNP posledica povećanja nivoa RKV i RAV koji dovode do oksidativnog stresa.

Efikasnost tretmana SNP-om kao *in vitro* modela oksidativnog stresa prethodno je potvrđena na različitim tipovima ćelija u kulturi (Inoue i sar., 2003; Yanamoto i sar., 2003; Yamada i sar., 1996). Pored primene u *in vitro* ispitivanjima oksidativnog stresa, SNP je korišćen i u *in vivo* ispitivanjima (Nazari i sar., 2012).

Imajući u vidu da SNP prilikom fotoindukovanog raspada najpre oslobađa NO, od interesa je bilo utvrditi sposobnost GKT da neutrališe NO, kao i njegovu ulogu u citotoksičnosti SNP. Prethodna *in vitro* istraživanja (No i sar., 2018) kao i *in vivo* ispitivanja na mišijem modelu Alchajmerove bolesti (Tak i sar., 2020) indirektno su ukazala da GKT poseduju sposobnost neutralizacije NO. To je potvrđeno u našim istraživanjima korišćenjem EPR metode kao "zlatnog standarda" za detekciju slobodnih radikala. Blanco i sar. su prethodno predložili da je oslobođeni NO• glavni medijator u citotoksičnosti indukovanoj SNP-om u hondrocitima (Blanco i sar., 1995), što su potvrdili Cherng i sar. koristeći PTIO, supstancu koja specifično vezuje i neutrališe NO• (Cherng i sar., 2008). Međutim, naši rezultati su pokazali da PTIO, kao i mokraćna kiselina, koja neutrališe ONOO⁻ nastao u reakciji NO• i O₂, imaju značajno slabije protektivno dejstvo od GKT na vijabilitet SH-SY5Y ćelija tretiranih SNP-om. Takođe, de Andreas i sar. su pokazali da oslobađanje visokih nivoa NO• u rastvoru potentnijih NO• donora kao što su SIN-1 i SNAP, nije dodatno smanjivalo vijabilitet ćelija u kulturi u odnosu na SNP (de Andres i sar., 2013). Ovo je slično rezultatima naših eksperimentata u kojima značajno više koncentracije NO• generisane u prisustvu DEA-NONOat-a nisu prouzrokovale veću citotoksičnost SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma u odnosu na tretman SNP-om. Uz navedeno, pokazano je da "istrošeni" SNP, sa značajno smanjenom sposobnošću da proizvodi NO•, zadržava citotoksičnu aktivnost. Ovi rezultati potvrđuju da NO• i njegov produkt ONOO⁻ samo delimično učestvuju u citotoksičnosti SNP-a prema SH-SY5Y ćelijama, kao i da uočeno citoprotektivno dejstvo GKT ne zavisi samo od neutralizacije NO•.

Prethodni zaključak je u skladu sa ranijim rezultatima u kojima su RKV, koje se u tretmanu SNP-om stvaraju kao nusprodukt nezavisno od NO, zaslužni za citotoksičnost SNP (Quan i sar., 2016; Liang i sar., 2014; Cardaci i sar., 2008; Rauhala i sar., 1998). Cardaci i sar. su utvrdili da je citotoksičnost SNP posledica povećane produkcije RKV zavisne od prisustva jona gvožđa (Fe²⁺) (Cardaci i sar., 2008). Slično, studija na CHP212 ćelijama neuroblastoma ukazala je da je smrt ćelija indukovana SNP-om zavisna od Fe²⁺ jona i ćelijske internalizacije SNP, kao i da je rezultat produkcije visokih koncentracija H₂O₂ (Terwel i sar., 2000). Rezultati ove teze potvrdili su da je prisustvo jona Fe²⁺ ključno za smrt SH-SY5Y ćelija indukovanu SNP-om, koja je bila značajno smanjena u prisustvu helatora gvožđa. Takođe je uočeno i povećanje nivoa OH•, a prisustvo GKT ili supstanci sa sposobnošću vezivanja OH• (DMSO, metanol i etanol) imalo je pozitivan uticaj na vijabilitet SH-SY5Y ćelija. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima prethodnih studija u kojima je pokazano da oslobođeni Fe²⁺ iz SNP ima sposobnost katalizovanja Fentonove reakcije u *in vitro* uslovima, ali i u sistemu bez ćelija (Rauhala i sar., 1998; Ramakrishna i sar., 1996). Quan i sar. su pokazali da tretman SNP u trajanju od 30 minuta dovodi do trostrukog povećanja koncentracije H₂O₂ u ćelijskom medijumu, a uočeno je i povećanje u nivoima OH• i Fe²⁺ (Quan i sar., 2016). Rezultati ove disertacije su u skladu sa hipotezom da Fentonova reakcija inicirana SNP-om ima značajnu ulogu u inicijaciji oksidativnog stresa i posledičnog oštećenja mitohondrija koje dovode do apoptotske smrti SH-SY5Y ćelija izloženih SNP-u (Shema 1).



Shema 1. Tretman SNP Fentonovom reakcijom indukuje oksidativni stres koji dovodi do oštećenja mitohondrija i apoptotske smrti SH-SY5Y ćelija

Takođe je uočeno da SOD, koja vrši dismutaciju $\text{O}_2^{\bullet-}$ u H_2O_2 i molekulski O_2 , dovodi do dodatnog povećanja citotoksičnosti SNP. Egzogeni SOD ne prolazi ćelijsku membranu i svoje efekte isključivo ispoljava vanćelijski. Glavni izvor citosolnog $\text{O}_2^{\bullet-}$ je NADPH oksidaza, koja predstavlja kompleks I elektron transportnog lanca na unutrašnjoj membrani mitohondrija. Imajući u vidu poluvreme $\text{O}_2^{\bullet-}$ od 25 μs , jasno je da je njegova difuzija ograničena, što dovodi do relativno niskih koncentracija $\text{O}_2^{\bullet-}$ u vanćelijskoj sredini (Afanas'ev, I.B., 1991). Međutim, visoka produkcija $\text{O}_2^{\bullet-}$ u mitohondrijama oštećenim oksidativnim stresom mogla bi da poveća nivo $\text{O}_2^{\bullet-}$ u vanćelijskom prostoru, što u prisustvu SOD i SNP-a kao izvora gvožđa dovodi do nastanka H_2O_2 i stvara uslove za odvijanje Fentonove reakcije i formiranje citotoksičnog $\text{OH}^\bullet$. Novija istraživanja ukazuju da FBS iz medijuma za kultivaciju ćelija stimuliše fotoraspad SNP i oslobađanje koordinativno vezanih jona Fe^{2+} ključnih za inicijaciju Fentonove reakcije (Quan i sar., 2016), kao i za prevođenje molekularnog kiseonika u $\text{O}_2^{\bullet-}$. Dakle, uočeno povećanje citotoksičnosti SNP u prisustvu SOD moglo bi da se objasni povećanom produkcijom $\text{OH}^\bullet$ u prisustvu Fe^{2+} jona iz SNP.

Fizičko-hemijske karakteristike GKT značajne su za njihovu aktivnost. Razlike u hemijskom sastavu površinskog sloja GKT omogućavaju sredinu neophodnu za odvijanje bioloških reakcija kao što su generisanje ili neutralizacija RNV (Jachak i sar., 2012). Prisustvo defekata i nesparenih elektrona na površini GKT utiču na njihovu ulogu u neutralizaciji RNV i RAV. Uz navedeno, prisustvo π -konjugovanih veza u strukturi GKT dodatno pospešuje transfer naelektrisanja (Yoo i sar., 2009).

U cilju provere antioksidativnog i antinitrozativnog profila GKT korišćene su metode EPR, hemijski eseji za neutralizaciju slobodnih radikala i fluorimetrijska merenja promene intenziteta fluorescence redoks senzitivnih boja. Svi navedeni eksperimentalni pristupi potvrđuju sposobnost GKT da neutrališu $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ i $\text{NO}\cdot$ radikale. Rezultati predstavljenog istraživanja su u skladu sa prethodno potvrđenim antioksidativnim karakteristikama GKT (Hua i sar., 2019; Chong i sar., 2016.). Antioksidativne karakteristike GKT potvrđene su u sistemu bez ćelija, ali i u SH-SY5Y ćelijama humanog neuroblastoma. U skladu sa rezultatima Zhao i sar., koji su pokazali sposobnost GKT da neutrališu $\text{OH}\cdot$ (Zhao i sar., 2019), rezultati ove disertacije potvrdili su da je citoprotektivno dejstvo GKT u tretmanu SNP-om uglavnom posledica neutralizacije $\text{OH}\cdot$. Takođe je pokazano da GKT smanjuju lipidnu peroksidaciju indukovanu SNP-om. Povećane količine RKV vode oksidaciji biomolekula, među kojima su i lipidi, što dovodi do nastanka peroksi radikala, kao i do propagacije procesa lipidne peroksidacije (Ayala i sar., 2014). Prisustvo GKT smanjuje nivo lipidne peroksidacije najverovatnije neutralizacijom RKV i posledičnim smanjenjem oksidativnog stresa (Valko i sar., 2005). Međutim, treba imati u vidu da GKT, zavisno od njihove veličine/strukture i/ili tipa ćelija, mogu i da potenciraju lipidnu peroksidaciju i ćelijsku smrt, kao što je pokazano u RAW264.7 makrofagima tretiranim GKT veličine 5 nm (Shao i sar., 2021). Rasvetljavanje mehanizama odgovornih za ove naizgled kontradiktorne rezultate neophodno je za ostvarivanje boljeg uvida u biokompatibilnost GKT kao preduslova za njihovu eventualnu terapijsku primenu.

Rezultati ove teze pokazuju da SNP indukuje apoptozu SH-SY5Y ćelija zavisnu od kaspaza, kao i da GKT smanjuju aktivaciju kaspaza i apoptotsku ćelijsku smrt. Ovo je u skladu sa prethodnim rezultatima da SNP izaziva apoptozu neurona (Cardaci i sar., 2008; Zhang i Zhao, 2003). U cilju potvrde da se u osnovi citotoksičnosti SNP nalazi proces apoptoze, ispitivani su nivoi ključnih apoptotskih proteina, kao i količina DNK u pojedinim fazama ćelijskog ciklusa. U SH-SY5Y ćelijama tretiranim SNP-om uočeno je povećanje aktivacije kaspaze-2, kao i broja ćelija u sub-G0/G1 fazi ćelijskog ciklusa, što ukazuje na apoptotsku fragmentaciju DNK. Prethodna istraživanja su pokazala da SNP indukuje apoptozu SH-SY5Y ćelija praćenu aktivacijom inicijatorske kaspaze-3 (Lim i sar., 2009). Iako nivoi kaspaze-3 nisu direktno ispitivani u ovim istraživanjima, Swanton i sar. su pokazali da povećana aktivnost kaspaze-2 može biti posledica povećane ekspresije kaspaze-3, čija je aktivnost blokirana dejstvom anti-apoptotskog proteina BCL2 (Swanton i sar., 1999). Metodom RT-qPCR pokazali smo da je nivo iRNK koja kodira BCL2 snižen u prisustvu SNP-a, što indirektno potvrđuje da SH-SY5Y ćelije tretirane SNP-om umiru procesom apoptoze zavisne od kaspaza. Međutim, Kühn i Lotz su pokazali da SNP u koncentraciji od 2 mM, korišćenoj i u našem istraživanju, indukuje ćelijsku smrt nezavisnu od kaspaza, koja je imala karakteristike apoptoze, ali i nekroze (Kühn i Lotz, 2003). Mada nije isključeno da postoji subpopulacija ćelija koja podleže ćelijskoj smrti po tipu nekroze, protektivno dejstvo pan-kaspaznog inhibitora Q-VD-OPh potvrdilo je da su aktivacija kaspaza i posledična indukcija apoptoze bili dominantni mehanizmi smrti SH-SY5Y ćelija u našem eksperimentalnom sistemu. Oba efekta SNP-a su bila značajno smanjena u prisustvu GKT, što ukazuje na inhibiciju apoptoze zavisne od kaspaza kao osnovnog mehanizma njihovog citoprotektivnog dejstva.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji jasno ukazuju na neutralizaciju $\text{OH}\cdot$ i u manjoj meri $\text{NO}\cdot$ kao glavni mehanizam protektivnog dejstva GKT u citotoksičnosti SNP. Jedno od ključnih pitanja je da li se uočeni efekti GKT ispoljavaju unutar ćelija ili u vanćelijskoj sredini? Dok je apoptoza hondrocita indukovana SNP-om zavisila od vanćelijske Fentonove reakcije (Quan i sar., 2016), internalizacija SNP bila je neophodna za citotoksične efekte na PC12 neuronskim ćelijama i mišijim hepatocitima (Terwel i sar., 2000; Rao i sar., 1991). U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da GKT poseduju sposobnost neutralizacije $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ i NO ,

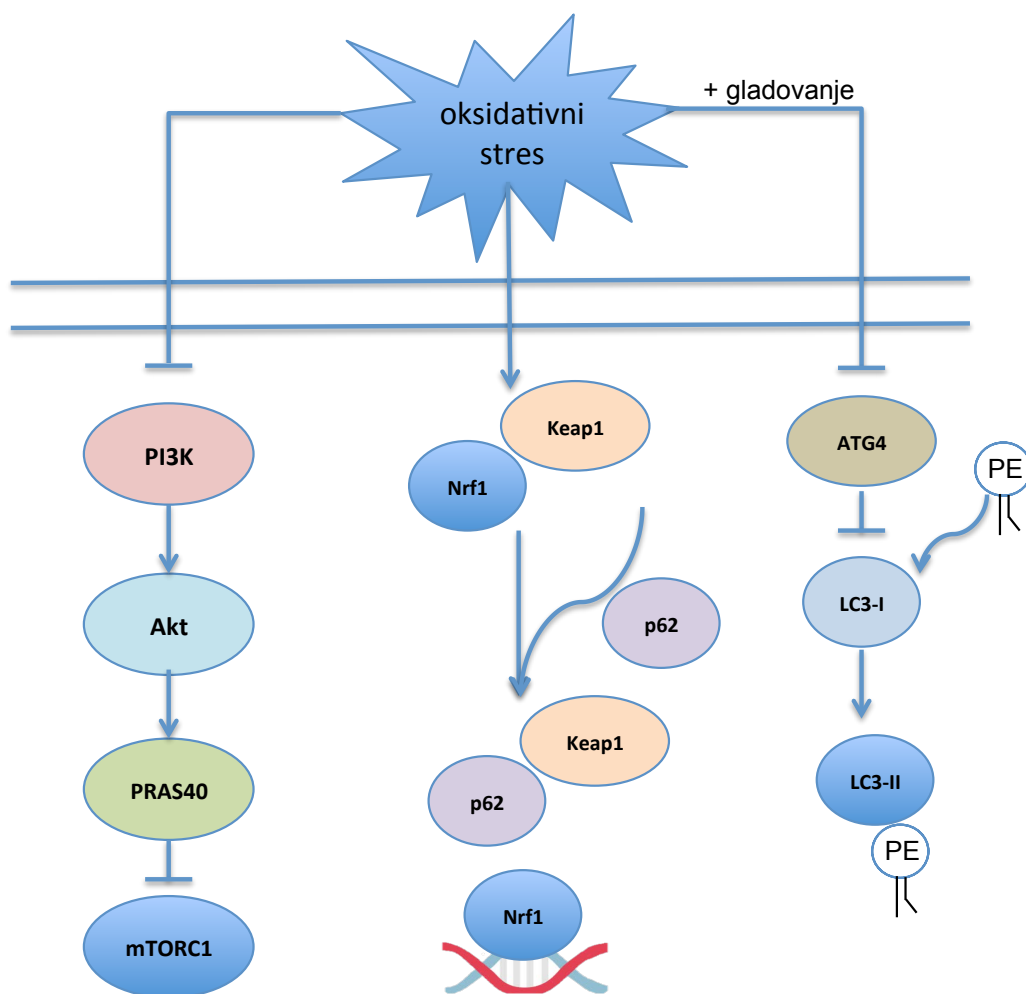
kako u sistemu bez ćelija tako i u SH-SY5Y ćelijama tretiranim SNP-om. Iako rezultati analize na protočnom citofluorimetru ukazuju na unutarćelijsku antioksidativnu aktivnost GKT, uočeno smanjenje unutarćelijskih nivoa RKV/RAV moglo bi da bude i posledica njihove vanćelijske neutralizacije i smanjenog ulaska u ćeliju. Ovo bi moglo da važi za RKV/RAV sa relativno dugačkim poluvremenima života, kao što su $\text{NO}\cdot$ ($\sim 3\text{-}6\text{ s}$) (Kelm, 1999); H_2O_2 ($\sim 1\text{ ms}$) (D'Autréaux i Toledano, 2007) i $\text{O}_2^{\cdot-}$ ($\sim 25\text{ }\mu\text{s}$) (Jaeshke, 2010), koji mogu da difunduju i do nekoliko desetina mikrometara, ali ne i za $\text{OH}\cdot$ čije je poluvreme života značajno kraće ($\sim 10^{-9}\text{ s}$) i koji ne difunduje dalje od mesta nastanka (Phaniendra i sar., 2015). Iako je moguće da prisustvo GKT dovodi do smanjenja vanćelijskih nivoa $\text{O}_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 nakon tretmana SNP-om i tako smanjuje unutarćelijsku produkciju $\text{OH}\cdot$, rezultati ove teze ukazuju na prevashodno unutarćelijsku antioksidativnu aktivnost GKT. TEM analiza, kao i povećanje unutarćelijske fluorescence, potvrdili su da GKT prolaze kroz ćelijsku membranu i ulaze u citosol SH-SY5Y ćelija. Ovo je u skladu sa prethodnim rezultatima dobijenim na neuronima i drugim tipovima ćelija (Damalakiene i sar., 2016; Wang i sar., 2015; Volarevic i sar., 2014; Markovic i sar., 2012). Šta više, višestruko ispiranje ćelija nakon tretmana GKT dovelo je do neznatnog smanjenja njihovog citoprotektivnog efekta, što jasno ukazuje da je unutarćelijska akumulacija GKT neophodna za njihovo optimalno dejstvo.

Rezultati prikazani u ovoj tezi po prvi put su ukazali na ulogu autofagije indukovane tretmanom GKT u zaštiti ćelija od oksidativnog i nitrozativnog stresa. Na osnovu prethodno uspostavljenih smernica (Klionsky i sar., 2016), korišćeni su različiti eksperimentalni pristupi u cilju provere uticaja GKT na proces autofagije. Uočeno je povećanje unutarćelijske acidifikacije, kao i pojava vezikula sa jednostrukim i dvostrukim membranama, što potvrđuje prisustvo autofagozoma i autofagolizozoma (Mizushima i Komatsu, 2011). Takođe, detektovano je i povećanje u ekspresiji proautofagnog beklina-1, degradacija SQSTM1/p62, kao i konverzija LC3-I u LC3-II u prisustvu inhibitora lizosomalne acidifikacije, što je u skladu sa povećanjem autofagnog fluksa u zajedničkom tretmanu GKT i SNP (Klionsky i sar., 2016). Ovo je u skladu sa prethodnim podacima o pro-autofagnoj aktivnosti GKT (Xie i sar., 2019; Tomic i sar., 2017; Markovic i sar., 2012; Stern i sar., 2008) i SNP (Chen i sar., 2020; Rim i sar., 2019; Park i sar., 2017). Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da GKT i SNP poseduju sinergističku proautofagnu aktivnost na modelu SH-SY5Y ćelija, kako na transkripcionom tako i na translacionom nivou.

Odnos oksidativnog stresa i autofagije je kompleksan (Shema 2). Ključni regulator procesa autofagije, mTOR kinaza, ne samo da moduliše oksidativni stres već i sama može biti modulirana aktivnošću RKV. Li i sar. su pokazali da RKV mogu doznno i vremenski zavisno da stimulišu, ali i suprimiraju aktivnosti mTOR diferencijalnom aktivacijom PI3K/Akt ili AMP-om aktivirane protein kinaze (AMPK) (Li i sar., 2010). Brojni rezultati ukazuju da oksidativni stres doprinosi indukciji autofagije inhibicijom PI3K/Akt/mTOR signalnog puta (Jain i sar., 2010) povećanjem ekspresije SQSTM1/p62 gena i aktivacijom NRF2 transkripcionog faktora (Komatsu i sar., 2010), kao i inaktivacijom ATG4 koja omogućava povećanu lipidaciju LC3-I i formiranje autofagozoma (Scherz-Shouval i sar., 2019). U skladu s tim, određene vrste kvantnih tačaka modulacijom oksidativnog stresa utiču na autofagiju, kao što je slučaj sa Fe/AuO kvantnim tačkama koje povećavaju autofagni fluks RKV-indukovanom inhibicijom mTOR (Khan i sar., 2012). S druge strane, neke studije su pokazale da supstance sa antioksidativnim sposobnostima mogu da indukuju proces autofagije (Cui i sar., 2019; Yu i sar., 2017; Song i sar., 2012), što je u skladu sa ulogom RKV u optimalnoj aktivnosti mTOR-a kao glavnog represora autofagije. Tako, Cui i sar. su pokazali da NAC, kao jak antioksidujuć agent, ima sposobnost indukcije autofagije (Cui i sar., 2019). Iako je indukcija autofagije u prisustvu GKT u ovoj disertaciji bila povezana sa inhibicijom AKT/mTOR signalnog puta, antioksidanti DMSO i NAC

nisu modulirali autofagiju u prisustvu SNP, što ukazuje da pro-autofagna sposobnost GKT u našem eksperimentalnom sistemu nije zavisila od njihovog antioksidativnog dejstva. Mogući mehanizmi kojima nanomaterijali inhibiraju aktivnost mTOR nezavisno od RKV uključuju blokadu njegovog transporta u lizosome, kao i sprečavanje regrutovanja i aktivacije PI3/AKT kinaza imobilisanih sa unutrašnje strane ćelijske membrane (Hulea i sar., 2016). Poznato je da Akt zavisna fosforilacija PRAS40 proteina na poziciji Thr246 aktivira mTORC1 kao glavni represor autofagije (Sancak i sar., 2007). Ovo je u skladu sa našim rezultatima da GKT inhibiraju fosforilaciju AKT, PRAS40 i mTOR i tako supresijom aktivnosti mTORC1 doprinose indukciji autofagije u kombinovanom tretmanu.

Pored RKV, NO• oslobođen nakon fotoraspada SNP može da utiče na proces autofagije. Sarkar i sar. pokazali su da tretman HeLa ćelija različitim donorima NO• inhibira autofagiju S-nitrozilacijom c-Jun N-terminalne kinaze 1 i IκB kinaze, koje učestvuju u regulaciji interakcije između beklina-1 i BCL2 i aktivaciji AMPK (Sarkar i sar., 2011). Takođe je pokazano i da NO• S-nitrozilacijom TSC2 aktivira mTOR kompleks 1 i inhibira autofagiju (Lopez-Rivera i sar., 2014). U našim eksperimentima, NO• poreklom od SNP nije suprimirao autofagiju, što ukazuje na mogućnost da je pro-autofagno dejstvo RKV prevagnulo nad inhibitornim dejstvom NO•. Sposobnost GKT da neutrališu NO• mogla je dodatno da spreči inhibitorno dejstvo NO• na autofagiju i tako doprinese sinergističkom pro-autofagnom dejstvu kombinovanog tretmana.



Shema 2. Potencijalni mehanizmi indukcije autofagije u prisustvu oksidativnog stresa

Tretmani SH-SY5Y ćelija GKT i kombinacijom GKT i SNP pokazali su da je autofagija aktivirana na transkripcionom nivou. Metodom RT-qPCR uočeno je povećanje u transkripcionoj aktivnosti gena koji kodira transkripcioni faktor ATF4, kao i gena ATG familije (ATG3, ATG4B, ATG5 i ATG14). ATF4 je transkripcioni regulator procesa adaptacije ćelija na stresni stimulus. Aktivnost ATF4 omogućava rezistenciju na prisustvo oksidativnog stresa preko regulacije metabolizma i transporta amino kiselina, a pod njegovom kontrolom nalaze se geni koji pripadaju takozvanom integrisanom odgovoru na stres (B'Chir i sar., 2013). ATG5 i LC3-I, ključni proteini za odvijanje procesa autofagije, takođe su pod transkripcionom kontrolom ATF4 (Harding i sar., 2003). Proteinski produkti gena za ATG3, ATG4B, ATG5 i ATG14 učestvuju u nukleaciji i elongaciji autofagozoma, kao i isecanju LC3 prekursora i njegovoj lipidaciji. ATG14 je deo kompleksa koji inicira autofagiju i omogućava njegovu lokalizaciju na mestu formiranja autofagozoma (Obara and Ohsumi, 2011). ATG5 je deo kompleksa koji omogućava konjugaciju LC3-I sa fosfatidiletanolaminom i ključan je za proces fuzije autofagozoma sa lizozomom (Ye i sar., 2018). ATG4B je proteaza koja iseca C terminalni kraj ATG8 (LC3-I) i tako omogućava njegovu lipidaciju i formiranje autofagozoma (Maruyama i Noda, 2018). ATG3 predstavlja E2 konjugacioni sistem koji zajedno sa ATG12 i ATG5 omogućava lipidaciju LC3-I, a kontroliše i transport citoplazme ka vakuolama (engl. *cytoplasm to vacuole transport*) (Tanida i sar., 2002). Takođe je uočeno da su nivoi iRNK za BCL2, koji ihibira inicijaciju autofagije vezivanjem za beclin-1 (Füllgrabe i sar., 2014) bili sniženi u prisustvu GKT. Dakle, povećanje ekspresije gena koji učestvuju u nukleaciji i elongaciji autofagozoma, kao i smanjenje ekspresije BCL2 kao negativnog regulatora autofagije, predstavljaju osnovne mehanizme transkripcione indukcije autofagije u prisustvu GKT. S druge strane, imajući u vidu anti-apoptotsku ulogu BCL2 (Pugazhenthii i sar., 2003), jasno je da protektivno dejstvo GKT u tretmanu SNP-om ne zavisi od modulacije BCL2.

Ključna uloga autofagije indukovane dejstvom GKT u zaštiti od citotoksičnosti SNP potvrđena je upotrebom inhibitora koji blokiraju različite faze autofagije. Farmakološki inhibitori mogu da deluju na fazu inicijacije (formiranja autofagozoma) ili kasnu fazu procesa autofagije (degradacija citoplazmatskog materijala u lumenu lizozoma) (Klionsky i sar., 2016). Zanimljivo je da u odsustvu GKT, inhibitori autofagije nisu uticali na citotoksičnost SNP, iako je i sam SNP indukovao autofagiju. Ovo se može objasniti činjenicom da je povećanje autofagnog fluksa u tretmanu SNP bilo znatno manje izraženo nego u kombinovanom tretmanu SNP i GKT, a ranija istraživanja ukazuju da je neophodno da autofagija dostigne odgovarajući nivo kako bi ispoljila citoprotektivno dejstvo (Bosnjak i sar., 2014). Takođe, prethodno je pokazano da autofagija indukovana različitim stimulusima može različito da utiče na vijabilitet istog tipa ćelija (Ristic i sar., 2014).

Iako su rezultati ove disertacije ukazali da antioksidativno i pro-autofagno dejstvo GKT nezavisno doprinose njihovoj citoprotektivnoj aktivnosti u tretmanu SNP-om, ne može se isključiti mogućnost da sam proces autofagije utiče na antioksidativne sposobnosti GKT. U različitim eksperimentalnim modelima je pokazano da autofagija suprimira apoptozu SH-SY5Y ćelija izazvanu oksidativnim stresom tako što u procesu mitofagije uklanja oštećene mitohondrije koje generišu povišene nivoe RKV (Di Rita i sar., 2018; Zhang i sar., 2016). Dakle, postoji mogućnost da autofagija/mitofagija indukovana dejstvom GKT može poboljšati njihove antioksidativne karakteristike.

Na kraju treba pomenuti da GKT u određenim uslovima mogu da indukuju i citotoksičnu autofagiju, koja predstavlja tip II programirane ćelijske smrti. Naime, Marković i sar. su pokazali da osvetljavanje GKT svetlošću iz plavog dela spektra (470 nm) dovodi do produkcije RKV i oksidativnog stresa, kao i autofagiji koja doprinosi apoptotskoj smrti ćelija (Marković i sar.,

2012). Za razliku od neosvetljenih GKT korišćenih u ovoj tezi, fotoekscitovane GKT podležu fizičko-hemijskim promenama koje omogućavaju generisanje RKV na njihovoj površini. Ova sposobnost GKT da ispoljavaju prooksidativnu/citotoksičnu i antioksidativnu/citoprotektivnu aktivnost mogla bi da omogući njihovu potencijalnu primenu u različitim tipovima terapija.

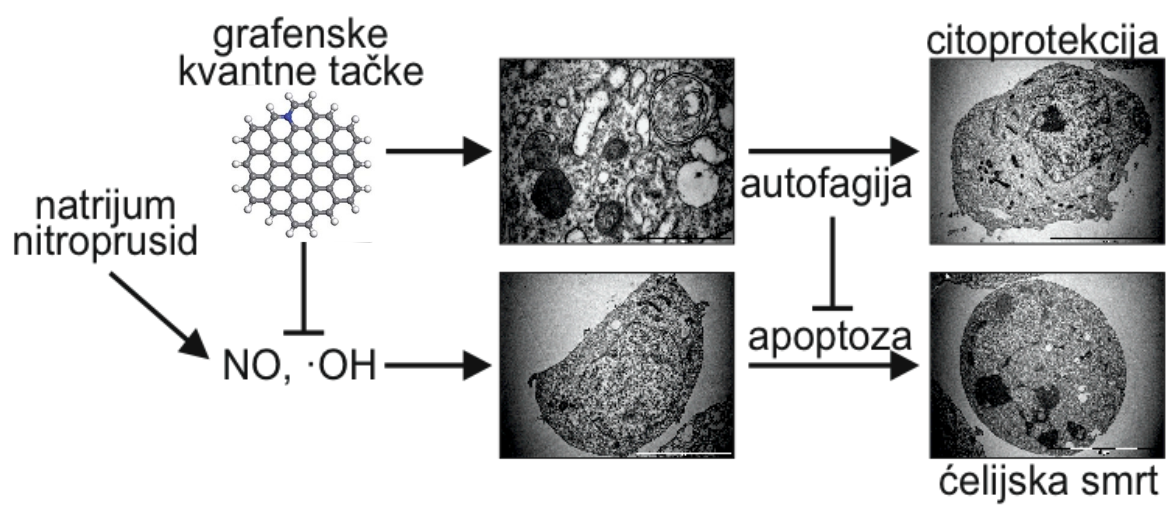
Ključna ograničenja ove studije su *in vitro* pristup i upotreba visokih koncentracija GKT ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$). Iako su pri koncentraciji SNP od 2 mM najizraženiji citoprotektivni efekti uočeni sa visokim koncentracijama GKT, pokazano je da u tretmanu manje toksičnim dozama SNP, GKT ispoljavaju citoprotektivne efekte i u koncentraciji od $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Neurodegenerativna oboljenja karakterišu se oštećenjima krvno-moždane barijere koja bi potencijalno omogućila lokalnu akumulaciju GKT u CNS (Tosic i sar., 2019). Dodatna hemijska modifikacija GKT mogla bi da poveća njihovu sposobnosti da neutrališu RKV i RAV kao i da indukuju autofagije, čime bi se takođe omogućilo korišćenje nižih koncentracija GKT.

Mogućnost terapijske primene GKT u neuroprotekciji, podržavaju brojna istraživanja upotrebe nanomaterijala u terapiji različitih oštećenja CNS u čijoj se osnovi nalazi oksidativni stres. Povreda kičmene moždine i moždani udar izazvan ishemijom dovode do lokalizovane hipoksije i redukcije molekulskog kiseonika, a oslobađanje Fe^{2+} iz hemoglobina stvara uslove za odvijanje Fentonove reakcije i nastanak $\text{OH}\cdot$. Ovakvi uslovi dovode do apoptotske smrti neurona na mestu povrede i povećane produkcije inflamatornih citokina (Li and Yang, 2016; Abramov i sar., 2007). Traumatska povreda mozga dovodi do neravnoteže jona, ekscitotoksičnosti posredovane neurotransmiterima i oslobađanja mitohondrijalnih depoa Ca^{2+} , što je praćeno povećanom produkcijom RKV i RAV (Rodriguez-Rodriguez i sar., 2014). Povišeni nivoi H_2O_2 u CNS pacijenata sa Alchajmerovom bolešću dovodi do agregacije Tau proteina i formiranje neurofibrilarnih snopova, što povećava nivo Fe^{2+} koji sa H_2O_2 gradi $\text{OH}\cdot$ u Fentonovoj reakciji. Oksidativni stres dovodi do hiperfosforilacije Tau proteina i agregacije $\text{A}\beta$ peptida, što zajedno sa oštećenjem mitohondrija i disfunkcijom autofagije prouzrokuje oštećenja i smrt neurona (Lin i sar., 2013). Poremećaji u metabolizmu dopamina u Parkinsonovoj bolesti i posledično oštećenje dopaminergičkih neurona, posledica su disfunkcije enzima monoamine oksidaze B i povećanja nivoa H_2O_2 , koji sa slobodnim Fe^{2+} gradi $\text{OH}\cdot$ u Fentonovoj reakciji (Dias i sar., 2013). Različite vrste nanomaterijala ispitivane u cilju njihove potencijalne upotrebe u terapiji oštećenja CNS pokazale su neuroprotektivnu aktivnost (Tabela 3.). S druge strane, za razliku od uloge “nosača” u kontrolisanom dopremanju različitih lekova i oligonukleotida kao i prooksidativnih agenasa u fotodinamičkoj terapiji, antioksidativna terapijska uloga GKT do sada nije detaljno ispitivana. Imajući u vidu njihovu izrazitu biokompatibilnost, nisku citotoksičnost, visoku antioksidativnu aktivnost, sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru (Henna i Pramod, 2020) i sposobnost indukcije citoprotektivne autofagije, jasno je da GKT predstavljaju dobre kandidate za terapiju neurodegenerativnih i neuroinflamatornih oboljenja u čijoj se patogenezi nalaze oksidativni i nitrozativni stres. Posebna vrednost GKT u ovom kontekstu predstavlja njihova sposobnost da, za razliku od klasičnih antioksidativnih agenasa, istovremeno inhibiraju oksidativni stres i indukuju citoprotektivnu autofagiju, što je osnovni nalaz ove doktorske disertacije (Shema 3).

Tabela 3. Korišćenje nanometarijala u terapiji oštećenja centralnog nervnog sistema (CNS)
(modifikovano, Zhen i sar., 2020)

Tip oštećenja CNS	Tip nanočestice	Tip delovanja	Efekat terapije
Povreda kičmene moždine	Cerijum oksid (CeO ₂)	Neutralizacija OH•, O ₂ ^{•-} i H ₂ O ₂	Smanjenje veličine lezije i nivoa inflamatornih citokina
	Nanočestice od seleno modifikovane polisaharidnim kompleksom i PG-6 peptidom za koji se vezan lek tetrametilpirazin	Ćelijske metaloproteinaze oslobađaju tetrametilpirazin i omogućavaju internalizaciju nanočestica	Smanjenje apoptotske smrti neurona (povećana ekspresija anti-apoptoskih proteina, inhibicija MAP kinaznog puta)
Traumatska povreda mozga	Ugljenične čestice sa enzimskim karakteristikama	Neutralizacija OH•, O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂ , NO• i ONOO ⁻	Smanjenje apoptotske smrti neurona (aktivacija SOD)
Moždani udar izazvan ishemijom	Polimeri nanočestica u kompleksu sa mTOR inhibitorom rapamicinom	Neutralizacija OH•, H ₂ O ₂	Smanjenje inflamacije, promena polarizacije mikroglije u antiinflamatorne M2
	Mangan oksid (Mn ₃ O ₄) "nanosunderi"	Neutralizacija OH•, O ₂ ^{•-}	Smanjenje hipoksije i apoptotske smrti neurona
Alchajmerova bolest	Molibden sulfid nanočestice (MoS ₂)	Neutralizacija OH• i smanjeno nakupljanje amiloidnih (Aβ ₄₂) monomera i oligomera	Smanjenje agregacije β amiloida i oksidativnog stresa
	Cerijum oksid nanočestice u kompleksu sa metilen plavim	Neutralizacija OH•, O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂ i inhibicija Tau agregacije	Smanjenje prekomerne aktivacije mikroglija i astrocita
Parkinsonova bolest	Nanočestice od polimera dopamina obogaćenog metioninom	Sprečavanje fosforilacije α-sinukleina	Smanjenje apoptotske smrti neurona i formiranja α-sinuklein oligomera
	Bakar oksid nanočestice sa enzimskom aktivnišću SOD	Povećana ekspresija tirozin hidroksilaze	

Shema 3. Potencijalni mehanizam GKT u zaštiti SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma od SNP indukovane citotoksičnosti



6. Zaključci

Na osnovu zadatih ciljeva istraživanja i dobijenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

- ✓ GKT štite SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma od SNP-om indukovane apoptotske smrti zavisne od kaspaza.
- ✓ GKT štite SH-SY5Y ćelije humanog neuroblastoma pre svega neutralizacijom citotoksičnog $\text{OH}\cdot$, dok su u pogledu neutralizacije $\text{NO}\cdot$ i $\text{O}_2^{\cdot-}$ mnogo manje efikasne.
- ✓ GKT, nezavisno od njihove antioksidativne aktivnosti, indukuju citoprotektivnu autofagiju na transkripcionom i post-translacionom nivou kroz inhibiciju AKT/PRAS40/mTORC1 signalnog puta.

7. Literatura

- Abramov, A.Y., Scorziello, A., Duchen, M.R., 2007. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci.* 27, 1129–1138.
- Afanas'ev, I.B., 1991. Superoxide Ion: Volume II (1991): Chemistry and Biological Implications (1st ed.). CRC Press.
- Ananthanarayanan, A., Wang, X., Routh, P., Sana, B., Lim, S., Kim, D.H., Lim, H.W., Li, J., Chen, P., 2014. Facile synthesis of graphene quantum dots from 3D graphene and their application for Fe³⁺ sensing. *Adv. Funct. Mater* 3021–3026.
- Article, R., Kim, G.H., Kim, J.E., Rhie, S.J., Yoon, S., 2015. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases 24, 325–340.
- Atherton, N., 1973. Electron spin resonance: theory and applications,. Ellis Horwood; Wiley Halsted Press. Chichester, New York.
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.*
- B'Chir, W., Maurin, A.C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., Bruhat, A., 2013. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* 41, 7683–7699.
- Babich, H., Zuckerbraun, H.L., Ricklis, A.S., Blau, L., 1998. In vitro toxicity of sodium nitroprusside to human endothelial ECV304 cells. *Env. Toxicol Pharmacol.* 5, 135–144.
- Badovinac, V., Trajkovic, V., Mostarica-Stojkovic, M., 2000. Nitric oxide promotes growth and major histocompatibility complex- unrestricted cytotoxicity of interleukin-2-activated rat lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 52, 62–70.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A., 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1620–1624.
- Benítez-Martínez, S., Valcárcel, M., 2015. Graphene quantum dots in analytical science. *TrAC Trends Anal Chem.* 93–113.
- Bjorkoy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Overvatn, A., Brech, A., Johansen, T., 2009. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzym.* 181–197.
- Blanco, F.J., Ochs, R.L., Schwarz, H., Lotz, M., 1995. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol.* 146, 75–85.
- Bosnjak, M., Ristic, B., Arsikin, K., Mircic, A., Suzin-Zivkovic, V., Perovic, V., Bogdanovic, A., Paunovic, V., Markovic, I., Bumbasirevic, V., Trajkovic, V., Harhaji-Trajkovic, L., 2014. Inhibition of mTOR-dependent autophagy sensitizes leukemic cells to cytarabine-induced apoptotic death. *PLoS One* 9, e94374.

- Bouchier-Hayes L., 2010. The role of caspase-2 in stress-induced apoptosis. *J Cell Mol Med* 14, 1212–1224.
- Cabal-Hierro, L., Lazo, P., 2012. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* 24, 1297–1305.
- Cardaci, S., Filomeni, G., Rotilio, G., Ciriolo, M.R., 2008. Reactive oxygen species mediate p53 activation and apoptosis induced by sodium nitroprusside in SH-SY5Y cells. *Mol. Pharmacol.* 74, 1234–1245.
- Carlson, C., Hussein, S.M., Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Hess, K.L., Jones, R.L., Schlager, J.J., 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B.* 112, 13608–13619.
- Chaitanya, V., Steven, J., Babu, P., 2010. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun. Signal.* 8, 31.
- Chen, F., Gao, W., Qiu, X., Zhang, H., Liu, L., Liao, P., Fu, W., Luo, Y., 2017. Graphene quantum dots in biomedical applications: Recent advances and future challenges. *Front. Lab. Med.* 1, 192–199.
- Cheng, X.T., Zhou, B., Lin, M.Y., Cai, Q., Sheng, Z.H., 2015. Axonal autophagosomes recruit dynein for retrograde transport through fusion with late endosomes. *J Cell Biol.* 3, 377–386.
- Cherng, Y.G., Chang, H.C., Lin, Y.L., Kuo, M.L., Chiu, W.T., Chen, R.M., 2008. Apoptotic insults to human chondrocytes induced by sodium nitroprusside are involved in sequential events, including cytoskeletal remodeling, phosphorylation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase-1/c-JunN-terminal kinase, and Bax-mitochondria-me. *J.Orthop.Res.* 26, 1018–1026.
- Chong, Y., Ge, C., Fang, G., Tian, X., Ma, X., Wen, T., Wamer, W.G., Chen, C., Chai, Z., Yin, J.J., 2016. Crossover between Anti- and Pro-oxidant Activities of Graphene Quantum Dots in the Absence or Presence of Light. *ACS Nano* 10, 8690–8699.
- Christensen, I.L., Sun, Y.P., Juzenas, P., 2011. Carbon dots as antioxidants and prooxidants. *J. Biomed. Nanotechnol.* 7, 667–676.
- Chung, S., Revia, R.A., Zhang, M., 2019. Graphene Quantum Dots and Their Applications in Bioimaging, Biosensing, and Therapy. *Adv. Mater.* 1904362, 1–26.
- Circu, M.L., Aw, T.Y., 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 749–762.
- Clo, E., Snyder, J., Ogilby, P., Gothelf, K., 2007. Control and selectivity of photosensitized singlet oxygen production: challenges in complex biological systems. *Chembiochem* 475–481.
- Cohen, G.M., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326, 1–16.

- Cui, J., Tang, L., Hong, Q., Lin, S., Sun, X., Cai, G., Bai, X.Y., Chen, X., 2019. N-Acetylcysteine Ameliorates Gentamicin-Induced Nephrotoxicity by Enhancing Autophagy and Reducing Oxidative Damage in Miniature Pigs. *Shock* 52, 622–630.
- Damalakiene, L., Karabanovas, V., Bagdonas, S., Rotomskis, R., 2016. Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy for Visualization of Quantum Dots' Endocytic Pathway. *Int J Mol Sci* 17, 473.
- de Andres, M.C., Maneiro, E., Martin, M.A., Arenas, J., Blanco, F.J., 2013. Nitric oxide compounds have different effects profiles on human articular chondrocyte metabolism, *Arthritis Res. Ther.* 15, R115.
- de Torre, M.P., Cavero, R.Y., Calvo, M.I., Vizmanos, J.L.W., 2019. A simple and a reliable method to quantify antioxidant activity in vivo. *Antioxidants* 8, 1–11.
- DeForge, L.E., Fantone, J.C., Kenney, J.S., Remick, D.G., 1992. Oxygen radical scavengers selectively inhibit interleukin 8 production in human whole blood. *J Clin Invest.* 90, 2123–2129.
- Dengjel, J., Abelliovich, H., 2017. Roles of mitophagy in cellular physiology and development. *Cell Tissue Res.* 367, 95–109.
- Di Rita, A., D'Acunzo, P., Simula, L., Campello, S., Strappazzon, F., Cecconi, F., 2018. AMBRA1-Mediated Mitophagy Counteracts Oxidative Stress and Apoptosis Induced by Neurotoxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 92.
- Dias, V., Junn, E., Mouradian, M.M., 2013. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Park. Dis.* 3, 461–491.
- Ding, H., Yu, S.B., Wei, J.S., Xiong, H.M., 2016. Full-Color Light-Emitting Carbon Dots with a Surface-State-Controlled Luminescence Mechanism. *ACS Nano* 10, 484–491.
- Dong, Y., Chen, C., Zheng, X., Gao, L., Cui, Z., Yang, H., 2012. One-step and high yield simultaneous repair of single- and multi-layer graphene quantum dots from CX-72 carbon black. *J. Mater. Chem.* 8764–8766.
- Dong, Y., Pang, H., Ren, S., Chen, C., Chi, Y., Yu, T., 2013. Etching single-wall carbon nanotubes into green and yellow single-layer graphene quantum dots. *Carbon N. Y.* 245–251.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495–516.
- Federico, A., Cardaioli, E., Da Pozzo, P., Formichi, P., Gallus, G.N., Radi, E., 2012. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci* 254–262.
- Feng, Q., Cao, Q., Li, M., Liu, F., Tang, N., Du, Y., 2013. Synthesis and photoluminescence of fluorinated graphene quantum dots. *Appl. Phys. Lett.* 13111–13114.

- Ferreira, M., de Vasconcelos, A.S., da Costa Vilhena, T., da Silva, T.L., da Silva Barbosa, A., Gomes, A.R., Dolabela, M.F., Percário, S., 2015. Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Should We Keep Trying Antioxidant Therapies? *Cell Mol Neurobiol* 595-614.
- Ferrer-Sueta, G., Radi, R., 2009. Chemical biology of peroxynitrite: Kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol* 161-177.
- Flick, D., Gifford, G., 1984. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 68, 167-175.
- Fok, H., Jiang, B., Clapp, B., Chowienczyk, P., 2012. Regulation of vascular tone and pulse wave velocity in human muscular conduit arteries: Selective effects of nitric oxide donors to dilate muscular arteries relative to resistance vessels. *Hypertension*. 60, 1220-1225.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 97-112.
- Friederich, J.A., Carolina, N., Butterworth, J.F., 1995. Sodium nitroprusside: twenty years and counting 152-162.
- Füllgrabe, J., Klionsky, D.J., Joseph, B., 2014. The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy, 15(1) (2014) 65-74. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 65-74.
- Gaschler, M.M., Stockwell, B.R., 2017. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 482, 419-425.
- Geim, A.K., 2009. Graphene: status and prospects. *Science*. 80. 1530-1534.
- Glick D., Barth S., M.K., 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221, 3-12.
- Godínez-Rubí, M., Rojas-Mayorquín, A.E., Ortuño-Sahagún, D., 2013a. Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction. *Oxid Med Cell Longev.* 297357.
- Godínez-Rubí, M., Rojas-Mayorquín, A.E., Ortuño-Sahagún, D., 2013b. Nitric oxide donors as neuroprotective agents after an ischemic stroke-related inflammatory reaction. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 297357.
- Gokhale, R., Singh, P., 2014. Blue luminescent graphene quantum dots by photochemical stitching of small aromatic molecules: fluorescent nanoprobes in cellular imaging. *Part. Part. Syst. Charact* 433-438.
- Goldstein, S., Russo, A., Samuni, A., 2003. Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with $\cdot\text{NO}$, $\cdot\text{NO}_2$, and $\text{O}_2\cdot^-$. *J Biol Chem.* 278, 50949-50955.
- Griess, P., 1879. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen." *Chem. Ber.* 12, 426-428.
- Griffiths, P., de Hasseth, J., 2007. *Fourier Transform Infrared Spectrometry* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.

- Guiney, S.J., Adlard, P.A., Bush, A.I., Finkelstein, D.I., Ayton, S., 2019. Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson's disease. *Neurochem. Int.* 34–48.
- Hall, V.A., Guest, J.M., 1992. Sodium nitroprusside-induced cyanide intoxication and prevention with sodium thiosulfate prophylaxis. *Am J Crit Care* 19–27.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M., Ron, D., 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* 11, 619–633.
- Hauser, D., Hastings, T., 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. *Neurobiol Dis* 35–42.
- Henna, T.K., Pramod, K., 2020. Graphene quantum dots redefine nanobiomedicine. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 110, 110651.
- Hooper, C., Spitsin, S., Kean, R., Champion, J., Dickson, M., Chaudhry, I., Koprowski, H., 1998. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 675–680.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J., Oshiro, N., Mizushima, N., 2009a. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20, 1981–1991.
- Hosokawa, N., Sasaki, T., Iemura, S., Natsume, T., Hara, T., Mizushima, N., 2009b. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy* 5, 973–979.
- Hottinger, D.G., Beebe, D.S., Kozhimannil, T., Prielipp, R.C., Belani K.G., 2014. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 30, 462–471.
- Hua, S., Yang, L., Gao, T., Jiang, P., Jiang, F., Liu, Y., 2019. Graphene Quantum Dots Induce Autophagy and Reveal Protection against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress Injury. *ACS Appl. Bio Mater.* 2, 5760–5768.
- Hulea, L., Markovic, Z., Topisirovic, I., Simmet, T., Trajkovic, V., 2016. Biomedical Potential of mTOR Modulation by Nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 34, 349–353.
- Hyland, K., Auclair, C., 1981. The formation of superoxide radical anions by a reaction between O₂, OH⁻ and dimethyl sulfoxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 531–537.
- Inoue, O., Yanamoto, K., Fujiwara, Y., Hosoi, R., Kobayashi, K., Tsukada, H., 2003. Sensitivities of Benzodiazepine receptor binding and muscarinic acetylcholine receptor binding for the detection of neural cell death caused by sodium nitroprusside microinjection in rat brain. *Synapse* 49, 134–141.

- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., Mizushima, N., 2012. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* 151, 1256-1269.
- Ivankovich, A.D., Braverman, B., 1983. Stephens sulfate disposition in humans: relation to toxicity. *Anesthesiology* 11–17.
- Ivankovich, A.D., Miletich, D.J., Tinker, J.H., 1978. Sodium nitroprusside: metabolism and general considerations. *Int Anesth. Clin.* 16, 1-29.
- Jachak, A.C., Creighton, M., Qiu, Y., Kane, A.B., Hurt, R.H., 2012. Biological interactions and safety of graphene materials. *Mater. Res. Soc. Bull.* 37, 1307–1313.
- Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K.B., Awuh, J.A., Overvatn, A., McMahon, M., Hayes, J.D., Johansen, T., Johansen, T., Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K.B., Awuh, J.A., Overvatn, A., McMahon, M., Hayes, J.D., Johansen, T., 2010. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem.* 285, 22576–22591.
- Jiang, F., Chen, D., Li, R., Wang, Y., Zhang, G., Li, S., Zheng, J., Huang, N., Gu, Y., Wang, C., Shu, C., 2013. Eco-friendly synthesis of size-controllable amine-functionalized graphene quantum dots with antimycoplasmal properties. *Nanoscale* 5, 1137–1142.
- Johnson, C., 1928. Mechanism of Actions and Toxicity of Nitroprusside. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 26, 102–103.
- Jovanović, S., Syrgiannis, Z., Budimir, M.D., Milivojević, D.D., Jovanovic, D.J., Pavlović, V.B., Papan, J.M., Bartenwerfer, M., Mojsin, M.M., Stevanović, M.J., Todorović Marković, B.M., 2020. Graphene quantum dots as singlet oxygen producer or radical quencher - The matter of functionalization with urea/thiourea. *Mater. Sci. Eng. C* 109, 110539.
- Kagan, V.E., Tyurin, V.A., Jiang, J., Tyurina, Y.Y., Ritov, V.B., Amoscato, A.A., Osipov, A.N., Belikova, N.A., Kapralov, A.A., Kini, V., Vlasova, I.I., Zhao, Q., Zou, M., Di, P., Svistunenko, D.A., Kurnikov, I. V., Borisenko, G.G., 2005. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol* 223–232.
- Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Walle, L.V., Louie, S., Dong, J., Newton, K., Qu, Y., Liu, J., Heldens, S., Zhang, J., 2011. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* 479, 117–121.
- Ke, F.F.S., Vanyai, H.K., Cowan, A.D., Delbridge, A.R.D., Whitehead, L., Grabow, S., Czabotar, P.E., Voss, A.K., Strasser, A., 2018. Embryogenesis and Adult Life in the Absence of Intrinsic Apoptosis Effectors BAX, BAK, and BOK. *Cell.* 2018 May. *Cell* 173, 1217–1230.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 289–257.

- Khodadadei, F., Safarian, S., N. Ghanbari, 2017. Methotrexate-loaded nitrogen-doped graphene quantum dots nanocarriers as an efficient anticancer drug delivery system. *Mater. Sci. Eng.* 79.
- Kim, S., Hwang, S.W., Kim, M.K., Shin, D.Y., Shin, D.H., Kim, C.O., Yang, S., Park, J., Hwang, E., Choi, S., Ko, G., Sim, S., Sone, C., Choi, H., Bae, S., Hong, B., 2012. Anomalous behaviors of visible luminescence from graphene quantum dots: interplay between size and shape. *ACS Nano* 8203–8208.
- Klionsky, D.J., Abdel-Aziz, A.K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M.H., Abudu, Y.P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I.E., Adeli, K., Adolph, T.E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., i sar., 2016. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy* 17, 1–382.
- Knudson, C.M., Tung, K.S., Tourtellotte, W.G., Brown, G., Korsmeyer, J., 1995. Bax- deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* (80-). 270, 96–99.
- Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K.I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., Yamamoto, M., 2010. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* 12, 213–223.
- Kotiadis, V.N., Duchon, M. R., Osellame, L.D., 2013. Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health. *Biochim. Biophys. acta.* 1840.
- Kröncke, K.D., Fehsel, K., Sommer, A., Rodriguez, M.L., Kolb-Bachofen, V., 1995. Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. 1995. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 376, 179–185.
- Kühn, K., Lotz, M., 2003. Mechanisms of sodium nitroprusside-induced death in human chondrocytes. *Rheumatol. Int.* 23, 241–247.
- Kumari, S., Sammut, I.A., Giles, G.I., 2014. The design of nitric oxide donor drugs: s-nitrosothiol tDodSNO is a superior photoactivated donor in comparison to GSNO and SNAP. *Eur. J. Pharmacol.* 168–176.
- Kundu, M., Kundu M., T.C., 2008. Autophagy: basic principles and relevance to disease. *Annu. Rev. Pathol.* 3, 427–455.
- Kwon, W., Kim, Y., Lee, C., Lee, M., Choi, H.C., Lee, T., 2014. Electroluminescence from graphene quantum dots prepared by amidative cutting of tattered graphite. *Nano Lett.* 1306–1311.
- Langston, J.W., Ballard, P., Tetrad, J.W., Irwin, I., 1983. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 80. 979–980.

- Lewerenz, J., Ates, G., Methner, A., Conrad, M., Maher, P., 2018. Oxytosis/Ferroptosis-(Re-) Emerging Roles for Oxidative Stress-Dependent Non-apoptotic Cell Death in Diseases of the Central Nervous System. *Front. Neurosci.* 214.
- Li S., Li Y., Cao J., Zhu J., Fan L., Li X., 2014. Sulfur-doped graphene quantum dots as a novel fluorescent probe for highly selective and sensitive detection of Fe^{3+} . *Anal. Chem.* 10201–10207.
- Li, W., Yang, S., 2016. Targeting oxidative stress for the treatment of ischemic stroke: Upstream and downstream therapeutic strategies. *Brain Circ.* 2, 153–163.
- Liang, Q., Wang, X.P., Chen, T.S., 2014. Resveratrol protects rabbit articular chondrocyte against sodium nitroprusside-induced apoptosis via scavenging ROS. *Apoptosis* 19, 1354–1363.
- Lim, W.B., Kim, J.H., Gook, E.B., Kim, J.S., Ko, Y.J., Kim, I.A., Kwon, H. Il, Lim, H.S., Jung, B.C., Yang, K.H., Choi, N.K., Kim, M.S., Kim, S.Y., Choi, H.R., Kim, O.J., 2009. Inhibition of mitochondria-dependent apoptosis by 635-nm irradiation in sodium nitroprusside-treated SH-SY5Y cells. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 850–857.
- Lin, L., Huang, Q.X., Yang, S.S., Chu, J., Wang, J.Z., Tian, Q., 2013. Melatonin in Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci.* 14, 14575–14593.
- Liu, W., Yang, H., Ma, C., Ding, Y., Ge, S., Yu, J., Yan, M., 2014. Graphene–palladium nanowires based electrochemical sensor using ZnFe_2O_4 –graphene quantum dots as an effective peroxidase mimic. *Anal. Chim. Acta* 181–188.
- Liu, Z., Li, F., Luo, Y., Li, M., Hu, G., Pu, X., Tang, T., Wen, J., Li, X., Li, W., 2021. Size effect of graphene quantum dots on photoluminescence. *Molecules* 26, 1–10.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2CT Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lopez-Cruzan M., Sharma R., Tiwari M., Karbach S., Holstein D., Martin R., Lechleiter J., H.B., 2016. Caspase-2 resides in the mitochondria and mediates apoptosis directly from the mitochondrial compartment. *Cell Death Discov.* 2, 16005.
- Los, M., Van de Craen, M., Penning, L.C., Schenk, H., Westendorp, M., Baeuerle, P.A., Dröge, W., Krammer, P.H., Fiers, W., Schulze-Osthoff, K., 1995. Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. *Nature* 375, 81–83.
- Marisa Repetto, JS., Boveris, A., 2012. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. *Lipid Peroxidation*. InTech, Lipid Pero. ed. In: Catala, DA.
- Markovic, Z., Ristic, B., Arsikin, K., Klisic, D., Harhaji-Trajkovic, L., Todorovic-Markovic, B., Kepic, D., Kravic-Stevovic, T., Jovanovic, S., Milenkovic, M., Milivojevic, D., Bumbasirevic, V., Dramicanin, M., Trajkovic, V., 2012. Graphene quantum dots as autophagy-inducing photodynamic agents. *Biomaterials* 33, 7084–7092.

- Maruyama, T., Noda, N., 2018. Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition. *J Antibiot.* 71, 72–78.
- Mauvezin, C., Neufeld, T.P., 2015. Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 11, 1437–1438.
- Medema, R.H., Jaattela, M., 2010. Cytosolic FoxO1: alive and killing. *Nat. Cell Biol.* 12, 642–643.
- Meyer, R., Weissert, R., Diem, R., Storch, M.K., de Graaf, K.L., Kramer, B., 2001. Acute neuronal apoptosis in a rat model of multiple sclerosis. *J Neurosci.* 21, 6214–6220.
- Mizushima, N., Komatsu, M., 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147, 728–741.
- Moncada, P.S., 2015. Nitric oxide and oxygen: Actions and interactions in health and disease. *Redox Biol.* 5, 421.
- Morales, J., Li, L., Fattah, J., Dong, Y., Bey, A., Patel, M., Gao, J., Boothman, A., 2016. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 24, 15–28.
- Muller, F., Liu, Y., Van Remmen, H., 2004. Complex III Releases Superoxide to Both Sides of the Inner Mitochondrial Membrane. *J. Biol. Chem.* 279, 49064–49073.
- Nakamura, Y., Yasuda, M., Fujimori, H., Kiyono, M., Pan-Hou, H., 1997. Cytotoxic effect of sodium nitroprusside on PC12 cells. *Chemosphere* 34, 317–324.
- Nakarada, D., Pejin, B., Tommonaro, G., Mojović, M., 2020. Liposomal integration method for assessing antioxidative activity of water insoluble compounds towards biologically relevant free radicals: example of avarol. *J Liposome Res* 30, 218–226.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y., 2009. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* 10, 458–467.
- Nascimbeni, A., Codogno, P., Morel, E., 2017. Phosphatidylinositol-3-phosphate in the regulation of autophagy membrane dynamics. *FEBS J.* 284, 1267–1278.
- Nathan, C., 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6, 3051–3064.
- Nazari, Q.A., Mizuno, K., Kume, Y., Takada-Takatori, Y., Izumi, Y., Akaike, A., 2012. In Vivo Brain Oxidative Stress Model Induced by Microinjection of Sodium Nitroprusside in Mice. *J. Pharmacol. Sci.* 120, 105–111.
- No, Y., Xie, S., Yu, Y., Zhong, Q., Zhang, Y., Zhou, Y., 2018. SnO₂/graphene quantum dots composited photocatalyst for efficient nitric oxide oxidation under visible light. *Appl. Surf. Sci.* 448, 655–661.

- Novoselov, K., Geim, V., Morozov, D., Jiang, J., Zhang, V., Dubonos, M., 2004. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*. 80. 666–669.
- Nurunnabi, M., Khatun, Z., Huh, K.M., Park, S.Y., Lee, D.Y., Cho, K.J., Lee, Y., 2013. In vivo biodistribution and toxicology of carboxylated graphene quantum dots. *ACS Nano* 7, 6858–6867.
- Obara, K., Ohsumi, Y., 2011. Atg14: A Key Player in Orchestrating Autophagy. *Int. J. Cell Biol.* 2011, 153–160.
- Orrenius, S., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., 2007. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 143–183.
- Page, I.H., Corcoran, A.C., Dustan, H.P., Koppanyi, T., 1955. Cardiovascular actions of sodium nitroprusside in animals and hypertensive patients. *Circulation* 11, 188–198.
- Parzych, K., Klionsky, D., 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism and regulation. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 460–473.
- Peng, J., Gao, W., Gupta, B.K., Liu, Z., Romero-Aburto, R., Ge, L., Song, L., Alemany, L.B., Zhan, X., Gao, G., Vithayathil, S.A., Kaiparettu, B.A., Marti, A.A., Hayashi, T., Zhu, J.J., Ajayan, P.M., 2012. Graphene quantum dots derived from carbon fibers. *Nano Lett* 12, 844–849.
- Playfair, L., 1849. “On the Nitroprussides, a New Class of Salts.” *Philos. Trans. R. Soc. London* 139, 477–518.
- Polyak, E., Ostrovsky, J., Peng, M., Dingley, S. D., Tsukikawa, M., Kwon, Y. J., McCormack, S. E., Bennett, M., Xiao, R., Seiler, C., Zhang, Z., Falk, M. J., 2018. N-acetylcysteine and vitamin E rescue animal longevity and cellular oxidative stress in pre-clinical models of mitochondrial complex I disease. *Mol. Genet. Metab.* 123, 449–462.
- Pou, S., Nguyen, S.Y., Gladwell, T., Rosen, G.M., 1995. Does peroxynitrite generate hydroxyl radical? *BBA - Gen. Subj.* 1244, 62–68.
- Pugazhenthil, S., Albina, N., Purevsuren, J., Gerald, A., Marcey, K., Leigh, C., Eva, E., Marsha, R.R., Linda, M., Boxer, J., Reusch, E.B., 2003. Oxidative stress-mediated down-regulation of bcl-2 promoter in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 5, 982–996.
- Qiu, Y., Wang, Z., Owens, A.C.E., Kulaots, I., Chen, Y., Kane, A.B., Hurt, R.H., 2014. Antioxidant chemistry of graphene-based materials and its role in oxidation protection technology. *Nanoscale* 6, 11744–11755.
- Quan, Y., Liu, Y., Lin, C., Wang, X., Chen, T., 2017. Peroxynitrite dominates sodium nitroprusside-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget* 8, 29833–29845.
- Quan, Ying Yao, Qin, Gui Qi, Huang, Hao, Liu, Yu Hong, Wang, Xiao Ping, Chen, Tong Sheng, 2016. Dominant roles of Fenton reaction in sodium nitroprusside-induced chondrocyte apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 94, 135–144.

- Radi, E., Formichi, P., Battisti, C., Federico, A., 2014. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis Suppl* 3, 125–152.
- Radi, R., 2018. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 5839–5848.
- Radi, R., 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci USA* 4003–4008.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A., 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 4244–4250.
- Raicevic, N., Mladenovic, A., Perovic, M., Harhaji, L., Miljkovic, D., Trajkovic, V., 2005. Iron protects astrocytes from 6-hydroxydopamine toxicity. *Neuropharmacology* 48, 720–731.
- Ramakrishna R.D.N., Cederbaum, A.I., 1996. Generation of reactive oxygen species by the redox cycling of nitroprusside. *Biochim. Biophys. Acta* 1289, 195–202.
- Rauhala, P., Andoh, T., Yeh, K., Chiueh, C.C., 2002. Contradictory effects of sodium nitroprusside and S-nitroso-N-acetylpenicillamine on oxidative stress in brain dopamine neurons in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 962, 60–72.
- Rauhala, P., Khaldi, A., Mohanakumar, K.P., Chiueh, C.C., 1998a. Apparent role of hydroxyl radicals in oxidative brain injury induced by sodium nitroprusside. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1065–1073.
- Rauhala, P., Khaldi, A., Mohanakumar, K.P., Chiueh, C.C., 1998b. Apparent role of hydroxyl radicals in oxidative brain injury induced by sodium nitroprusside. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 1065–1073.
- Ristic, B., Bosnjak, M., Arsikin, K., Mircic, A., Suzin-Zivkovic, V., Bogdanovic, A., Perovic, V., Martinovic, T., Kravic-Stevovic, T., Bumbasirevic, V., Trajkovic, V., Harhaji-Trajkovic, L., 2014a. Idarubicin induces mTOR-dependent cytotoxic autophagy in leukemic cells. *Exp Cell Res.* 326, 90–102.
- Ristic, B., Milenkovic, M., Dakic, I., Todorovic-Markovic, B., Milosavljevic, M., Budimir, D., Paunovic, V., Dramicanin, M., Markovic, Z., Trajkovic, V., 2014b. Photodynamic antibacterial effect of graphene quantum dots. *Biomaterials* 35, 4428–4435.
- Robert, G., Gastaldi, C., Puissant, A., Hamouda, A., Jacquiel, A., Dufies, M., Belhacene, N., Colosetti, P., Reed, J.C., Auberger, P., Luciano, F., 2012. The anti-apoptotic Bcl-B protein inhibits BECN1-dependent autophagic cell death. *Autophagy* 8, 637–649.
- Rong, Y., Liu, M., Ma, L., Du, W., Zhang, H., Tian, Y., Cao, Z., Li, Y., Ren, H., Zhang, C., Li, L., Chen, S., Xi, J., Yu, L., 2012. Clathrin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate regulate autophagic lysosome reformation. *Nat Cell Biol.* 9, 924–934.
- Ross R., Spengler B., B.J., 1983. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 71, 741–747.

- Roy, P., Periasamy, A.P., Lin, C.Y., Her, G.M., Chiu, W.J., Li, C.L., Shu, C.L., Huang, C.C., Liang, C.T., Chang, H.T., 2015. Photoluminescent graphene quantum dots for in vivo imaging of apoptotic cells. *Nanoscale* 7(6), 2504–2510.
- Ruan, J., Wang, Y., Li, F., Jia, R., Zhou, G., Shao, C., Zhu, L., Cui, M., Yang, D.P., Ge, S., 2018. Graphene Quantum Dots for Radiotherapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10, 14342–14355.
- Sabbatini, P., Han, J., Chiou, S.K., Nicholson, D.W., White, E., 1997. Interleukin 1 beta converting enzyme- like proteases are essential for p53 mediated transcriptionally dependent apoptosis. *Cell Growth Differ.* 8, 643–653.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande, W.L., van Gurp, M., van Loo, G. V, Vandenabeele, P., 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861–2874.
- Salganik, R.I., Zeisel, S.H., Vrablic, A.S., Albright, C.D., Craciunescu, C.N., 2001. Altered mitochondrial function and overgeneration of reactive oxygen species precede the induction of apoptosis by 1-O-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine in p53-defective hepatocytes. *FASEB J.* 15, 1739–1744.
- Sarkar, S., Korolchuk, V.I., Renna, M., Imarisio, S., Fleming, A., Williams, A., Garcia-Arencibia, M., Rose, C., Luo, S., Underwood, B.R., Kroemer, G., O’Kane, C.J., Rubinshtein, D.C., 2011. Complex inhibitory effects of nitric oxide on autophagy. *Mol. Cell* 43, 19–32.
- Savić, A.G., Mojović, M., 2012. Free radicals identification from the complex EPR signals by applying higher order statistics. *Anal. Chem.* 84, 3398–3402.
- Schapira A., 2008. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson’s disease. *Lancet Neurol* 97–109.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., Elazar, Z., 2019. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 38, 1749–1760.
- Shao Y, Wang L, Chen J, Hunag Y, Huang Y, Wang X, Huang Y, 2021. Increased lipid peroxidation by graphene quantum dots induces ferroptosis in macrophages. *NanoImpact.* 23, 100334.
- Shen, J., Zhu, Y., Yang, X., Zong, J., Zhang, J., Li, C., 2012. One-pot hydrothermal synthesis of graphene quantum dots surface-passivated by polyethylene glycol and their photoelectric conversion under near-infrared light. *New J. Chem.* 97–100.
- Shen, J.H., Zhu, Y.H., Chen, C., Yang, X.L., Li, C.Z., 2011. Facile preparation and upconversion luminescence of graphene quantum dots. *Chem. Commun.* 2580–2582.
- Shi, W., Fan, H., Ai, S., Zhu, L., 2015. Preparation of fluorescent graphene quantum dots from humic acid for bioimaging application. *New J. Chem.* 39, 7054–7059.

- Shinde, D.B., Pillai, V.K., 2012. Electrochemical preparation of luminescent graphene quantum dots from multiwalled carbon nanotubes,. *Chem. Eur. J.* 12522–12528.
- Shishido, S.M., De Oliveira, M.G., 2001. Photosensitivity of aqueous sodium nitroprusside solutions: Nitric oxide release versus cyanide toxicity. *Prog. React. Kinet. Mech.* 26, 239–261.
- Sies H, Berndt C, J.D., 2017. Oxidative stress. *Annu Rev Biochem* 715–748.
- Silvestrov, P.G., Efetov, K.B., 2007. Quantum dots in graphene. *Phys Rev Lett* 016802.
- Sk, M.A., Ananthanarayanan, A., Huang, L., Lim, K.H., Chen, P., 2014. Revealing the tunable photoluminescence properties of graphene quantum dots. *J. Mater. Chem. C* 6954.
- Smirnoff, N., Cumbes, Q.J., 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28, 1057–1060.
- Smith, B.C., Fernhoff, N., Marletta, M.A., 2012. Mechanism and kinetics of inducible nitric oxide synthase auto-S-nitrosation and inactivation. *Biochemistry* 5, 1028–1040.
- Song, Y.M., Song, S.O., Jung, Y.K., Kang, E.S., Cha, B.S., Lee, H.C., Lee, B.W., 2012. Dimethyl sulfoxide reduces hepatocellular lipid accumulation through autophagy induction. *Autophagy* 1085–1097.
- Sooväli, L., Rõõm, E.I., Kütt, A., Sar, I., 2006. Uncertainty sources in UV-Vis spectrophotometric measurement. *Accred Qual Assur* 11, 256–255.
- Sreenivasulu, K., Raghu Pullakhandam, K., Madhavan, N., 2010. Zinc inhibits oxidative stress-induced iron signaling and apoptosis in Caco-2 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 961–968.
- Stefánsson, B., Björnson, A., Haraldsson, B., Nilsson, U., 2005. A new method for monitoring nitric oxide production using Teflon membrane microdialysis. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 249–256.
- Stern S., Adiseshaiah P., C.R., 2012. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part. Fibre Toxicol.* 9, 20.
- Sun, F., Zhang, J., Yang, Q., Wu, W., 2021. Quantum dot biosensor combined with antibody and aptamer for tracing food-borne pathogens. *Food Qual. Saf.* 5, 1–10.
- Swanton, E., Savory, P., Cosulich, S., Clarke, P., Woodman, P., 1999. Bcl-2 regulates a caspase-3/caspase-2 apoptotic cascade in cytosolic extracts. *Oncogene* 18, 1781–1787.
- Tak, K., Sharma, R., Dave, V., Jain, S., Sharma, S., 2020. Clitoria ternatea Mediated Synthesis of Graphene Quantum Dots for the Treatment of Alzheimer's Disease. *ACS Chem. Neurosci.* 11, 3741–3748.
- Tang, L., Ji, R., Cao, X., Lin, J., Jiang, H., Li, X., Teng, K.S., Luk, C.M., Zeng, S., Hao, J., Lau, S.P., 2012. Deep ultraviolet photoluminescence of water-soluble self-passivated graphene quantum dots. *ACS Nano* 5102–5110.

- Tanida, I., Nishitani, T., Nemoto, T., Ueno, T., Kominami, E., 2002. Mammalian Apg12p, but not the Apg12p.Apg5p conjugate, facilitates LC3 processing. *Biochem Biophys Res Commun.* 296, 1164–1170.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 231–241.
- Terwel, D., Nieland, L.J.M., Schutte, B., Reutelingsperger, C.P.M., Ramaekers, F.C.S., Steinbusch, H.W.M., 2000. S-nitroso-N-acetylpenicillamine and nitroprusside induce apoptosis in a neuronal cell line by the production of different reactive molecules. *Eur. J. Pharmacol.* 400, 19–33.
- Tosic, J., Stanojevic, Z., Vidicevic, S., Isakovic, A., Ciric, D., Martinovic, T., Kravic-Stevovic, T., Bumbasirevic, V., Paunovic, V., Jovanovic, S., Todorovic-Markovic, B., Markovic, Z., Danko, M., Micusik, M., Spitalsky, Z., Trajkovic, V., 2019. Graphene quantum dots inhibit T cell-mediated neuroinflammation in rats. *Neuropharmacology* 95–108.
- Towbin H., Staehelin T., G.J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 4350–4354.
- Tuncyurek, P., Yenisey, C., Doger, F.K., Soyder, A., Bicakci, T., Cevikel, M., 2006. Nitric oxide as an independent regulatory factor in regenerating rat liver. *Acta Chir Belg* 106, 581–587.
- Volarevic V, Paunovic V, Markovic Z, Simovic Markovic B, Misirkic-Marjanovic M, Todorovic-Markovic B, Bojic S, Vucicevic L, Jovanovic S, Arsenijevic N, Holclajtner-Antunovic I, Milosavljevic M, Dramicanin M, Kravic-Stevovic T, Ciric D, Lukic ML, T. V., 2014. Large Graphene Quantum Dots Alleviate Immune- Mediated Liver Damage. *ACS nano*, 8(12), 12098–12109.
- Volkov, Y., 2015. Quantum dots in nanomedicine: recent trends, advances and unresolved issues. *Biochem Biophys Res Commun.* 419–427.
- Wang, X.Y., Lei, R, Huang, H.D. , Wang, N., Yuan, L. , Xiao, R.Y., Bai, L.D., Li, X. , Li, L.M. , Yang, X.D., 2015. The permeability and transport mechanism of graphene quantum dots (GQDs) across the biological barrier. *Nanoscale* 7, 2034–2041.
- Wang, K., Klionsky, D., 2011. Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy* 7, 297–300.
- Wang, L., Wu, B., Li, W., Wang, S., Li, Z., Li, M., Pan, D., Wu, M., 2018. Amphiphilic Graphene Quantum Dots as Self-Targeted Fluorescence Probes for Cell Nucleus Imaging. *Adv. Biosyst.* 2. 436-567.
- Wang, X., Sun, X., Lao, J., He, H., Cheng, T., Wang, M., Wang, S., Huang, F., 2014. Multifunctional graphene quantum dots for simultaneous targeted cellular imaging and drug delivery. *Colloids Surf.* 122, 638–644.
- Wang, Y., Zhang, L., Liang, R., Bai, J., Qiu, J., 2013. Using graphene quantum dots as photoluminescent probes for protein kinase sensing. *Anal. Chem.* 9148–9155.

- Wei, J., Li, Y., Jiao, Q., DU, X.X., Jiang, H., 2017. Influence of sodium nitroprusside on expressions of FBXL5 and IRP2 in SH-SY5Y cells. *Sheng Li Xue Bao* 69, 261–266.
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., Elazar, Z., 2010. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* 29, 1792–1802.
- Wilfinger, W., Mackey, K., Chomczynski, P., 1997. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *Biotechniques* 22, 474–481.
- Winterbourn, C.C., 1995. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol. Lett.* 82–83, 969–974.
- Wiseman, H., Halliwell, B., 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 17–29.
- Wu, C., Wang, C., Han, T., Zhou, X., Guo, S., Zhang, J., 2013. Insight into the Cellular Internalization and Cytotoxicity of Graphene Quantum Dots. *Adv. Healthc. Mater.* 2, 1613–1619.
- Xie, Y., Wan, B., Yang, Y., Cui, Y., Xin, Y., Guo, L.H., 2019. Cytotoxicity and autophagy induction by graphene quantum dots with different functional groups. *J. Env. Sci* 77, 198–209.
- Xu, H., Zhou, S., Xiao, L., Wang, H., Li, S., Yuan, Q., 2015. Fabrication of a nitrogen-doped graphene quantum dot from MOF-derived porous carbon and its application for highly selective fluorescence detection of Fe³⁺. *J. Mater. Chem. C* 291–297.
- Yamada, M., Momose, K., Richelson, E., Yamada, M., 1996. Sodium nitroprusside- induced apoptotic cellular death via production of hydrogen peroxide in murine neuroblastoma NIE-115 cells. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 35, 11–17.
- Yan, X., Cui, X., 2010. Large, solution-processable graphene quantum dots as light absorbers for photovoltaics. *Nano Lett.* 1869–1973.
- Yanamoto, K., Hosoi, R., Uesaka, Y., Abe, K., Tsukada, H., Inoue, O., 2003. Intrastriatal microinjection of sodium nitroprusside induces cell death and reduces binding of dopaminergic receptors. *Synapse* 50, 137–143.
- Yang, D., Wang, H.L., Sun, Z, N., Chung, N.W., Shen, J.G., 2006. A highly selective fluorescent probe for the detection and imaging of peroxynitrite in living cells. *J Am Chem Soc* 6004–6005.
- Yang, F., Zhao, M., Zheng, B., Xiao, D., Wu, L., Guo, Y., 2012. Influence of pH on the fluorescence properties of graphene quantum dots using ozonation pre-oxide hydrothermal synthesis. *J. Mater. Chem.* 25471–25479.
- Yang, Z., Klionsky, D., 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* 12, 814–822.

- Ye, R., Xiang, C.J., Lin, Z., Peng, K., Huang, Z., Yan, Z., Cook, N., Samuel, E.H., Wang, C., Ruan, G., Ceriotti, G., Raji, A., Martí, A., Tour, J., 2013. Coal as an abundant source of graphene quantum dots. *Nat. Commun.* 1–6.
- Ye, X., Zhou, X.J., Zhang, H., 2018. Exploring the Role of Autophagy-Related Gene 5 (ATG5) Yields Important Insights Into Autophagy in Autoimmune/Autoinflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2334.
- Yoo, E., Okata, T., Akita, T., Kohyama, M., Nakamura, J., Honma, I., 2009. Enhanced Electrocatalytic Activity of Pt Subnanoclusters on Graphene Nanosheet Surface. *Nano Lett.* 9, 2255–2259.
- Yu, Y., Hou, L., Song, H., Xu, P., Sun, Y., Wu, K., 2017. Akt/AMPK/mTOR pathway was involved in the autophagy induced by vitamin E succinate in human gastric cancer SGC-7901 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 173–183.
- Zhang, H.T., Mi, L., Wang, T., Yuan, L., Li, X.H., Dong, L.S., Zhao, P., Fu, J.L., Yao, B.Y., Zhou, Z.C., 2016. PINK1/Parkin-mediated mitophagy play a protective role in manganese induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Toxicol. In Vitro* 34, 212–219.
- Zhang, Q., Yang, W., Man, N., Zheng, F., Shen, Y., Sun, K., Li, Y., Wen, L.P., 2009. Autophagy-mediated chemosensitization in cancer cells by fullerene C60 nanocrystal. *Autophagy* 5, 1107–1117.
- Zhang, L., Wang, H., Ding, K., Xu, J., 2015. FTY720 induces autophagy-related apoptosis and necroptosis in human glioblastoma cells. *Toxicol Lett.* 236, 43–59.
- Zhang, L., Zhang, Z., Liang, R., Li, Y., Qiu, J., 2014. Boron-doped graphene quantum dots for selective glucose sensing based on the “abnormal” aggregation-induced photoluminescence enhancement. *Anal. Chem.* 4423–4430.
- Zhang, Q., Song, C., Zhao, T., Fu, H., Wang, H., Wang, Y., Kong, D., 2015. Photoluminescent sensing for acidic amino acids based on the disruption of graphene quantum dots/europium ions aggregates. *Biosens. Bioelectron.* 204–210.
- Zhang, X., Kim, W.S., Hatcher, N., Potgieter, K., Moroz, L.L., Gillette, R., Sweedler, J.V., 2002. Interfering with nitric oxide measurements. 4,5-diaminofluorescein reacts with dehydroascorbic acid and ascorbic acid. *J Biol Chem.* 277, 48472–48478.
- Zhao, L., Wang, Y., Li, Y., 2019. Antioxidant Activity of Graphene Quantum Dots Prepared in Different Electrolyte Environments. *Nanomater.* 9, 1708.
- Zhen, A., Jincong, Y., Zhang, Y., Pei, R., 2020. Applications of nanomaterials for scavenging reactive oxygen species in the treatment of central nervous system diseases. *J. Mater. Chem. B* 8, 8748–8767.
- Zheng, Y.T., Shahnazari, S., Brech, A., Lamark, T., Johansen, T., Brumell, J.H., 2009. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J. Immunol.* 183, 5909–5916.

- Zhu, S., Zhang, J., Tang, S., Qiao, C., Wang, L., Wang, H., Liu, X., Li, B., Li, Y., Yu, W., Wang, X., Sun, H., Yang, B., 2012a. Surface chemistry routes to modulate the photoluminescence of graphene quantum dots: from fluorescence mechanism to up-conversion bioimaging applications. *Adv. Funct. Mater.* 4732–4740.
- Zhu, S., Zhang, J., Tang, S., Qiao, C., Wang, L., Wang, H., Liu, X., Li, B., Li, Y., Yu, W., Wang, X., Sun, H., Yang, B., 2012b. Surface Chemistry Routes to Modulate the Photoluminescence of Graphene Quantum Dots: From Fluorescence Mechanism to Up-Conversion Bioimaging Applications. *Adv. Funct. Mater.* 22, 4732–4740.

Prilozi

Spisak skraćenica:

AIF - engl. *Apoptosis inducing factor*
AFM - engl. *atomic force microscopy*
ALR - engl. *autophagic lysosome reformation*
AMPK - engl. *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*
AO - engl. *acridine orange*
ATG-1 - engl. *apoptotic peptidase activating factor 1*
ATF4 - engl. *activating transcription factor 4*
Atg - engl. *autophagy related genes*
BCL2 - engl. *B-cell lymphoma 2*
BNIP-3 - engl. *BclBCL2-related BH3-only protein*
Bax - engl. *B-cell lymphoma 2 associated X protein*
BCL-xL - engl. *B-cell lymphoma extra large*
BPDSA - engl. *4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline disulfonic acid*,
cDNK - komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
cGMP - ciklični guanozin monofosfat
CNS- centralni nervni sistem
DAF - diaminofluorescein
DEA-NONOat - dietilamonijum (Z)-1-(N,N-dietilamino) diazen-1-ium-1,2-diolat
DEPMPO - 5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirolin-N-oksidi
DHE - dihidroetidijum
DHR - dihidrorodamin
DMSO - dimetilsulfoksid
DNK - deoksiribonukleinska kiselina
DPPH - engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*
DTCS - engl. *sarcosine-N-dithiocarbamate*
EPR- elektronska paramagnetna rezonanca
FADD - engl. *Fas-associated protein with death domain*
FDT- fotodinamička terapija
FTIR - engl., *Fourier Transform-Infrared*
FOXO - engl. *Forkhead Box O*
GKT- grafenske kvantne tačke
GO - grafenski oksid
Ho - Hamiltonijev spin
HOPG - visoko orijentisani pirolitički grafit
HR-TEM - engl. *high resolution transmission electron microscopy*
Hsc70 - engl. *heat shock cognate 70*
HtrA2/Omi - engl. *High temperature requirement protein A2*
iRNK- informaciona ribonukleinska kiselina
JC-1- 5,6,6-tetrahloro 1, 1,3,3-tetraetilbenzimidazilkarbocijanin jodid
LC3-I - engl. *microtubule-associated protein light chain 3*.
MAPK - engl. *Mitogen activated protein kinase*
MDA - malondialdehid
M-MuLV - engl. *Moloney Murine Leukemia Virus*
mTORC1- engl. *mechanistic target of rapamycin complex 1*
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NAC - engl. *N-acetylcysteine*
NADH- nikotin amid dinukletid

NBT- engl. *nitroblue tetrazolium*
NED- N-1-naftiletilendiamin dihidrohlorid
PARP-1 – engl. *Poly (ADP-ribose) polymerase*
PBS - engl. *phosphate buffered saline*
PI- engl. propidium iodide
PIC – koktel za inhibiciju proteaza (engl. *Protease inhibitor cocktail*)
PIK3C3- engl. *Phosphoinositid 3-kinase*
PMSF- fenil-metil-sulfonil-fluorid
PTIO- engl. *4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide*
p62/Sqstm1 – engl. *Sequestosom 1*
RAV- reaktivne azotne vrste
RB1CC1- *RB1-inducible coiled-coil 1*
RKV- reaktivne kiseonične vrste
RNK- ribonukleinska kiselina
SDS – natrijum dodecil sulfat (engl. *Sodium dodecyle sulphate*)
SMACK/DIABLO – engl. *Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct inhibitor of apoptosis binding protein with low pI*
SNARE -engl. *Soluble N-ethymale-imide-sensitive factor-attachment protein receptors*
SNP- engl. *satrium nitroprusside*
SNPex- engl. *exhausted sodium nitroprusside*
TEM- transmisionalna elektronska mikroskopija
TEMED – 3-(4,5-N,N,N',N')-tetrametiletilen-1,2-diamin
TNFR1- engl. *Tumor necrosis factor receptor 1*
ULK- engl. *Unc-51-like kinase*
UVRAG- engl. *UV irradiation resistance-associated tumor suppressor gene*)

Biografija

Matija Krunić rođen je 25.10.1991. u Beogradu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je kao redovan student školske 2010/2011. godine. Osnovne akademske studije na smeru Molekularna biologija i fiziologija završio je sa prosečnom ocenom 9,83. Master studije je upisao 2014. godine na "Max Planck" školi za Molekularnu biologiju pri Georg-August Univerzitetu u Göttingenu, Nemačka. Tokom studija radio je na većem broju projekata u laboratorijama Univerzitetske klinike u Göttingenu, "Max Planck" instituta za Eksperimentalnu medicinu, Evropskog centra za neuronauke (ENI) kao i "Max Planck" Instituta za Biofizičku hemiju. Master studije je završio 2016. godine sa prosečnom ocenom 1.3 (A). Eksperimentalni deo Master teze na temu "Merenje pH i transmembranskog potencijala klatrinskih vezikula koristeći novi esej na nivou pojedinačne vezikule" uradio je u saradnji "Max Planck" instituta za Biofizičku hemiju i Evropskog centra za neuronauke pod mentorstvom Prof. dr Reinhard Jahna. Master tezu je odbranio 03.05.2016., sa ocenom 1.3 (A). Doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna medicina, upisao je u oktobru 2016. godine. Od 2016. do juna 2018. godine, kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, bio je angažovan na projektu III41025 pod nazivom „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu unutarćelijski energetski balans u terapiji tumora i neuroimuno-endokrinih poremećaja“ kojim je rukovodio prof. dr Vladimir Trajković na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od jula 2018. do marta 2019. bio je angažovan na istom projektu u zvanju istraživača pripravnika na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Od marta 2019. do februara 2022 godine bio je zaposlen na klinici za ginekologiju sa porodilištem "Jevremova" u kojoj je obavljao posao kliničkog embriologa u postupcima *in vitro* fertilizacije. Od aprila 2022. godine zaposlen je na Univerzitetskoj klinici pri Slobodnom Flamanskom Univerzitetu u Briselu, Belgija na kojoj obavlja posao kliničkog embriologa u postupcima *in vitro* fertilizacije. Doktorant je autor i koautor 2 publikacije objavljene u celini u časopisima indeksiranim u Institute of Science index (SCI) bazi podataka. Član je Evropskog društva za humanu reprodukciju (ESHRE) i Evropskog društva za neuronauke.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: **Matija P. Krunić**

Broj indeksa: **2016/5084**

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„ Molekularni mehanizmi protektivnog dejstva grafenskih kvantnih tačaka u *in vitro* modelu oštećenja neuronskih ćelija oksidativnim stresom“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 22.12.2022. godine

Potpis doktoranda

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Matija P. Krunić**

Broj indeksa: **2016/5084**

Studijski program: **Molekularna medicina**

Naslov rada: „ **Molekularni mehanizmi protektivnog dejstva grafenskih kvantnih tačaka u *in vitro* modelu oštećenja neuronskih ćelija oksidativnim stresom**“

Mentor: **Prof. dr Vladimir Trajković**

Komentor: **naučni saradnik dr Biljana Ristić**

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 22.12.2022. godine

Potpis doktoranda

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„ Molekularni mehanizmi protektivnog dejstva grafenskih kvantnih tačaka u *in vitro* modelu oštećenja neuronskih ćelija oksidativnim stresom“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
- ③ 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

U Beogradu, 22.12.2022. godine

Potpis doktoranda
