



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ivan Mamić

Nanočestice zlata i selen a kao potencijalni nosači levodope

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ivan Mamić

Nanočestice zlata i selenas kao potencijalni nosači levodope

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Izv. prof. dr. sc. Petra Turčić, spec. klin. farm.

Naslovni izv. prof. dr. sc. Ivana Vinković Vrček, znanstveni
savjetnik u trajnom izboru

Zagreb, 2025.



Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Ivan Mamić

Gold and selenium nanoparticles as potential levodopa carriers

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Associate Professor Petra Turčić, PhD

Titular Associate Professor Ivana Vinković Vrček, Scientific

Advisor with Tenure, PhD

Zagreb, 2025.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada pod mentorstvom izv. prof. dr.sc. Petre Turčić, spec. klin. farm. i komentorstvom naslovne izv. prof. dr. sc. Ivane Vinković Vrček, znan. savj. u tr. iz. u sklopu poslijediplomskog doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Idejni koncept rada i materijalni troškovi pokriveni su projektom „Siguran pristup za razvoj nano-sustava za ciljanu isporuku lijekova u mozak“ (SENDER, HRZZ-PZS-2019-02-4323) u okviru programa „Znanstvena suradnja“ Hrvatske zaklade za znanost.

Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Petri Turčić, na pruženoj prilici i podršci tijekom izrade ove disertacije. Hvala Vam na savjetima, susretljivosti i vremenu koje ste izdvojili kako biste mi pomogli na ovom istraživačkom putu.

Želim izraziti iskrenu zahvalnost svojoj komentorici, nasl. izv. prof. dr. sc. Ivani Vinković Vrček, na pruženoj prilici da se priključim njezinoj istraživačkoj grupi i sudjelujem u njezinim projektima. Hvala Vam na podršci, korisnim savjetima i na tome što ste me od samih početaka poticali na samostalnost u radu. Posebno cijenim što ste mi omogućili suradnju s izvrsnim znanstvenicima, sudjelovanje na konferencijama te što ste uvijek stvarali poticajno i ugodno radno okruženje.

Zahvaljujem profesorici Sanji Dabelić na nesebičnoj pomoći i vrijednim savjetima tijekom provođenja qPCR pokusa.

Zahvaljujem kolegama sa Zavoda – profesorici Lidiji, Daliji, Danici, Davoru, Desi i Mihaelu – na savjetima, pomoći, jutarnjim kavama, zajedničkim gablecima te opuštenoj atmosferi i dobrom raspoloženju koji su ovaj trnovit put učinili lakšim i ugodnijim. Hvala i svim ostalim djelatnicima fakulteta koji su na bilo koji način pridonijeli ovome radu.

Želim zahvaliti i svim bivšim i sadašnjim supatnicima s Instituta – vi jedini razumijete razmjere ovog postignuća. Veliko hvala kolegama i prijateljima – Luciji, Nikolini P., Nikolini K., Anamariji, Mateu, Emeriku i Kruni. Hvala i svim ostalim zaposlenicima Instituta koji su mi na bilo koji način pomogli (ili ponekad i odmogli), a koje sam slučajno zaboravio spomenuti.

Hvala i svim moji prijateljima, osobito Luki, Jozi i Pavi, s kojima sam proveo nezaboravne životne trenutke i koji su uz mene bili i ostali tijekom svih ovih godina. Hvala vam na svim savjetima, razgovorima, pomoći i druženjima.

Veliko hvala i mojim roditeljima Mirku i Nadici na ovih prekrasnih 30+ godina života, na svemu što ste me naučili i na vrijednostima koje ste usadili u mene. Hvala i Jakovu, Mateji i Zvonimiru te svim mojim nećacima i nećakinjama.

I na kraju najveće HVALA mojoj supruzi Gloriji i mojim predivnim kćerima Divi i Marti. Vi ste vrijednije od svakog životnog postignuća i bez vas ništa od ovoga ne bi imalo smisla.

SAŽETAK

Nanotehnologija ima važnu ulogu u razvoju suvremenih terapijskih sustava jer nanočestice, zbog svojih jedinstvenih svojstava, mogu olakšati ciljanu dostavu, poboljšati farmakokinetiku, povećati topljivost i bioraspoloživost te ublažiti toksičnost lijekova. U kontekstu farmaceutske primjene, ističu se nanočestice zlata (AuNP) zbog svoje biokompatibilnosti, jednostavne sinteze i učinkovitog vezanja lijekova te nanočestice selena (SeNP) zbog protuupalnih i antioksidativnih svojstava. Obje vrste nanočestica također su pokazale i neuroprotektivne učinke u modelima neurodegenerativnih poremećaja. Levodopa je u današnje vrijeme zlatni standard u liječenju Parkinsonove bolesti, ali je njezina učinkovitost ograničena nepovoljnom farmakokinetikom te razvojem motoričkih komplikacija tijekom kronične terapije i rizikom od izazivanja oksidativnog stresa. To upućuje kako bi isporuka levodope pomoću nanonosača mogla ponuditi učinkovitiju terapijsku opciju od konvencionalnih formulacija, uz moguće neuroprotektivne učinke. U ovom radu ispitana je prikladnost četiri vrste nanočestica (PGM-AuNP, Ad-AuNP, PVP-SeNP i Tween-SeNP) kao nosača levodope. Njihova karakterizacija i priroda interakcija s levodopom detaljno su opisane u prijašnjim studijama, a u ovom je radu naglasak stavljen na njihovu toksičnost, stabilnost, kapacitet vezanja i profil oslobađanja levodope te moguće neuroprotektivne učinke. Izabrane nanočestice su sintetizirane kemijskom redukcijom i karakterizirane metodama transmisivske elektronske mikroskopije (TEM), te dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti (DLS i ELS). Njihova stabilnost testirana je u potpunom mediju za staničnu kulturu i biološki relevantnim tekućinama. Biološki učinci procijenjeni su u *in vitro* modelu dopaminergičnih neurona, dok je zaštitni potencijal ispitan primjenom 6-hidroksidopamina (6-OHDA). U provedenim ispitivanjima AuNP su pokazale izvrsnu biokompatibilnost i učinkovito vezanje levodope, ali njihovu primjenu ograničava loša stabilnost te nedostatak protektivnih učinaka. Nasuprot tome, SeNP su pokazale znatno bolju stabilnost uz složene biološke učinke: koncentracijski ovisnu citotoksičnost i genotoksičnost uz moguće neuroprotektivne učinke.

Ključne riječi: nanočestice selena, nanočestice zlata, levodopa, nosači lijekova, oksidativni stres, toksičnost, protektivni učinci, *in vitro*

SUMMARY

Background and aim

Nanomedicine exploits the unique properties of nanoparticles to improve diagnostics and therapy. In Parkinson's disease (PD), characterised by dopaminergic neuron loss and complex mechanisms with an emphasis on oxidative stress and mitochondrial dysfunction, levodopa remains the most effective symptomatic therapy. Still, poor pharmacokinetics and motor complications limit its long-term efficacy. Inorganic nanoparticles, especially gold (AuNP) and selenium nanoparticles (SeNP), offer the possibility of targeted levodopa delivery and controlled release, with potential intrinsic antioxidant and protective effects. Previous studies have shown that AuNPs can transport drugs and modulate the redox state, while SeNPs, through selenoproteins and direct scavenging, reduce oxidative stress in PD-relevant models. However, safety, therapeutic window, and translatability depend on size, coating, dose, stability, and the biological model used to evaluate their effects, which underscores the need to thoroughly assess these parameters for each nanoparticle formulation. In this work, we evaluated the potential of AuNP and SeNP as levodopa carriers by investigating their binding capacity, release profile, and stability, followed by evaluation of toxicity and protective effects in dopaminergic-like cell model.

Methods

AuNPs and SeNPs were synthesised in ultrapure water (UPW) via chemical reduction of chloroauric acid (HAuCl_4) and sodium selenite, respectively. AuNPs were stabilised with peptidoglycan monomer (PGM-AuNP) and 1-adamantylamine (Ad-AuNP), while SeNPs were stabilized with polysorbate 20 (Tween-SeNP), and poly(vinyl)pyrrolidone (PVP-SeNP). The primary size and shape of NPs were determined by transmission electron microscopy (TEM), hydrodynamic diameter with dynamic light scattering (DLS), and ζ potential with electrophoretic light scattering (ELS). Stability was assessed in complete cell culture medium and in biorelevant media simulating gastric, intestinal, lysosomal and extracellular conditions. Drug loading efficiency (DLE) was determined by incubating nanoparticles and levodopa in UPW for 10, 30, and 120 min. Afterwards, unbound levodopa was separated by centrifugation, quantified by UV–VIS spectrophotometry, and used to calculate the amount bound to the nanoparticles. Levodopa release profiles from nanosuspensions were determined with the dialysis bag method. The biological effects of NPs were evaluated in a cellular model of dopaminergic neurons, which was obtained by differentiation of SH-SY5Y cells using retinoic

acid and phorbol esters. The model was validated using quantitative polymerase chain reaction (qPCR), immunofluorescence, and morphological observations. Cytotoxicity was determined using the MTS assay, which was employed to construct viability curves. Doses below the IC₂₀ were selected for subsequent experiments. Oxidative stress was analysed with dichlorofluorescein-diacetate (DCFH₂-DA) and dihydroethidium (DHE) fluorescent probes to determine ROS production, monochlorobimane (mBCL) to measure levels of reduced glutathione (GSH), and rhodamine 123 (Rh123) to evaluate the impact on mitochondrial membrane potential (MMP). Flow cytometry was used to determine genotoxicity by detecting double-strand breaks (DSBs) using the anti- γ H2AX antibody. The cellular uptake and distribution of nanoparticles were investigated using confocal reflectance microscopy and flow cytometry. Finally, the neuroprotective potential against 6-OHDA-induced ROS production and apoptosis was assessed using the previously mentioned tests DHE, mBCL, Rh123, and Annexin V/PI assays.

Results

All NPs exhibited a spherical morphology, a negative ζ potential, and excellent stability in complete cell culture medium, which was attributed to the formation of a protein corona. In biologically relevant media, SeNPs demonstrated greater colloidal stability compared to AuNPs, which quickly aggregated due to the absence of steric stabilisation. All tested NPs demonstrated time and concentration-dependent DLE, but values varied significantly between different nanoparticles types. PGM-AuNPs demonstrated the highest binding affinity, followed by Ad-AuNPs, PVP-SeNPs and Tween-SeNPs. Despite efficient binding, the extended or altered release profile was not achieved in any biorelevant media, which was attributed to either low levodopa binding or to the instability of nanoparticles. Successful differentiation of SH-SY5Y cells was confirmed by increased expression of SLC6A3, D2R, TUBB3, and MAP-2 genes, as well as retained expression of TH gene. Along these lines, immunofluorescence demonstrated an increase in the production of key dopaminergic protein markers. At the same time, morphological analysis revealed an increase in the number and length of neurons, as well as slower proliferation and reduced cell clustering. However, a slight rise in NES expression and downregulation of VMAT2 emphasised shortcomings of the cellular model. The toxicity of AuNPs and SeNPs was tested in this model using the MTS assay. AuNPs were safe and did not affect cell survival across the applied concentration range. In contrast, SeNPs exhibited concentration-dependent cytotoxicity, with Tween-SeNP being more toxic than PVP-SeNP. Annexin V/PI assay was used to test concentrations below IC₂₀ and confirmed no significant

induction of cell death or apoptosis. All nanoparticles were internalised by SH-SY5Y cells as suggested by flow cytometry and evidenced by reflectance confocal microscopy. Uptake efficiency was greater for PGM-AuNP compared to Ad-AuNP, and for Tween-SeNP compared to PVP-SeNP. Oxidative stress assays demonstrated none of the nanoparticles induce oxidative stress after short-term incubation (4h) and even protect cells against levodopa-induced ROS formation. However, protective effect diminished after 24 hours of treatment and SeNPs markedly increased ROS production. This increase did not cause significant cell death or apoptosis, but rather activated an antioxidative defence, as evidenced by a dramatic rise in GSH levels, which could suggest a hormetic response. The effects on MMP were minimal and not statistically significant, which supports the idea of cellular adaptation to increased levels of ROS. Genotoxicity analysis also showed differences between AuNP and SeNP. AuNPs did not increase the number of γ H2AX⁺ cells, while SeNPs demonstrated an apparent concentration-dependent effect as the number of positive cells, for some SeNP concentration, surpassed the levels measured in the positive control. This represented an undesirable effect that raises safety concerns regarding their long-term safety and applicability as drug delivery systems. Protection against 6-OHDA-induced oxidative stress and apoptosis was confirmed for SeNPs and levodopa, but not for AuNPs. The protective activity is most likely related to cellular preconditioning and hormetic upregulation of antioxidant mechanisms, as suggested by the concurrent increase in GSH. Relative to levodopa, SeNPs offered higher protection, but mixtures demonstrated the highest activity.

Conclusion

This study demonstrated that AuNPs and SeNPs interact very differently with dopaminergic-like SH-SY5Y cells. AuNPs demonstrated excellent biocompatibility and efficient binding of levodopa; however, their use as nanocarriers is hindered by poor stability and a lack of protective effects against 6-OHDA induced toxicity. On the other hand, SeNPs displayed greater stability and potential protective effects, but their applicability is limited by concentration-dependent toxicity and genotoxicity. Overall, none of the tested nanoparticles in their current form can serve as effective nanocarriers of levodopa.

Keywords: selenium nanoparticles, gold nanoparticles, levodopa, drug carriers, oxidative stress, toxicity, protective effects, *in vitro*

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Nanotehnologija i nanomedicina.....	1
1.2.	Parkinsonova bolest.....	1
1.2.1.	Levodopa.....	2
1.3.	Nanolijekovi.....	4
1.3.1.	Nanolijekovi temeljeni na nanočesticama zlata i selena – naglasak na levodopi i Parkinsonovoj bolesti	5
1.4.	In vitro modeli Parkinsonove bolesti	8
2.	OBRAZLOŽENJE TEME	11
3.	MATERIJALI I METODE.....	12
3.1.	Priprema otopina i suspenzija	12
3.2.	Nanočestice	14
3.2.1.	Sinteza nanočestica	14
3.2.2.	Karakterizacija nanočestica.....	15
3.2.3.	Učinkovitost vezanja levodope za površinu nanočestica	16
3.2.4.	Stabilnost smjesa nanočestica i levodope u biološki relevantnim medijima ...	17
3.2.5.	In vitro ispitivanja oslobađanje levodope s površine nanočestica.....	19
3.3.	Stanična kultura.....	20
3.3.1.	Uzgoj, održavanje i diferencijacija stanične linije SH-SY5Y	20
3.3.2.	Uspostava i karakterizacija in vitro modela dopaminergičkih neurona	21
3.4.	Ispitivanje preživljenja stanica i pokretanja apoptoze.....	26
3.4.1.	Ispitivanje utjecaja na preživljenje stanica MTS testom.....	26
3.4.2.	Ispitivanje pokretanje apoptoze metodom protočne citometrije	27
3.5.	Ispitivanje staničnog unosa i lokalizacije nanočestica	28
3.6.	Ispitivanje utjecaja na indukciju oksidativnog stresa i mitohondrijski membranski potencija i	29
3.7.	Oštećenje DNA	30
3.8.	Ispitivanje protektivnih učinaka nanočestica primjenom 6-hidroksidopamina.....	32
3.8.1.	Protočna citometrija	32
3.8.2.	Oksidativni stres i mitohondrijski membranski potencijal.....	32
3.9.	Statistička obrada rezultata.....	33
4.	REZULTATI I RASPRAVA	36
4.1.	Fizikalno-kemijska karakterizacija nanočestica.....	36
4.2.	Učinkovitost vezanja levodope na površinu nanočestica	39

4.3.	Stabilnost smjesa nanočestica i levodope u biološki relevantnim medijima	40
4.4.	Profil oslobađanja levodope s površine nanočestica	44
4.5.	Uspostava i karakterizacija in vitro modela dopaminergičkih neurona	45
4.6.	Preživljenje stanica i pokretanje apoptoze	49
4.7.	Stanični unos i lokalizacija nanočestica	54
4.8.	Oksidativni stres i mitohondrijski membranski potencijal.....	57
4.9.	Oštećenje DNA	66
4.10.	Protektivni učinci nanočestica.....	68
5.	ZAKLJUČCI	74
6.	POPIS LITERATURE.....	75
7.	PRILOZI.....	93
8.	POPIS KRATICA.....	125
9.	ŽIVOTOPIS	127

1. UVOD

1.1. Nanotehnologija i nanomedicina

Potencijal nanotehnologije i nanomaterijala još je krajem pedesestih godina prošlog stoljeća previdio nobelovac Richard P. Feynman u znamenitom predavanju "*There's Plenty of Room at the Bottom*". Tijekom narednih desetljeća nanometrijali su pronašli široku primjenu u različitim područjima ljudskog djelovanja (1). Prema definiciji Observatorija za nanomaterijale Europske Unije (engl. *European Union observatory for nanomaterials*, EUON), nanomaterijali su prirodni, slučajno nastali ili proizvedeni materijali koji se sastoje od pojedinačnih čestica, agregata ili aglomerata, pri čemu najmanje 50 % njih ima barem jednu dimenziju u rasponu od 1 do 100 nm (2). Nanomaterijali imaju drugačija fizikalno-kemijska, optička, mehanička i magnetska svojstva od rasutog (engl. *bulk*) materijala istog kemijskog sastava (3), a upravo se na tim svojstvima razvilo novo interdisciplinarno područje nanomedicine, koje obuhvaća primjenu nanotehnologije u dijagnostici, prevenciji i liječenju bolesti (4). Unutar nanomedicine, nanofarmaceutici ili nanolijekovi (engl. *nanopharmaceutics*) predstavljaju farmaceutske pripravke temeljene na nanočesticama, a razvijene u svrhu unaprijeđena konvencionalnih lijekova (5).

Uspješna implementacija nanotehnologije u medicini započela je 1995. godine kada je Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) odobrila prvi nanolijek, lipososomalni oblik doksorubicina (Doxil®), koji je značajno poboljšao vrijeme cirkulacije, smanjio toksičnost i omogućio selektivno nakupljanje lijeka u tumoru (6). Noviji primjer koji naglašava važnost nanotehnologije u suvremenoj medicini jest primjena lipidnih nanočestica kao nosača vrlo osjetljivih mRNA molekula u razvoju cjepiva protiv bolesti COVID-19, čime su spriječeni milijuni smrtnih ishoda diljem svijeta (7). Nadalje, nanočestice se primjenjuju i u dijagnostici pa se tako nanočestice željezovog oksida koriste kao kontrastno sredstvo u oslikavanju magnetskom rezonancijom (8). Konačno, potencijal nanomedicine naglašava činjenica kako je na globalnom tržištu odobreno više od 50 nanolijekova, dok se nekoliko stotina pripravaka temeljenih na nanotehnologiji nalazi u različitim fazama kliničkih ispitivanja (9).

1.2. Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest je progresivni neurodegenerativni poremećaj obilježen selektivnim gubitkom dopaminergičkih neurona (10). Pretežno pogađa stariju populaciju, pri čemu incidencija značajno raste s dobi, a upravo je starija životna dob najveći čimbenik rizika za

razvoj bolesti. Procjenjuje se kako više od 10 milijuna ljudi globalno boluje od Parkinsonove bolesti. Invaliditet i smrtnost povezani s bolešću dramatično su porasli posljednjih godina, ponajprije zbog starenja svjetske populacije, što upućuje na to kako će Parkinsonova bolest u budućnosti imati još veći utjecaj na javnozdravstvene sustave i društvo u cjelini (11).

Parkinsonovu bolest definiraju propadanje dopaminergičnih neurona crne tvari (engl. *Substantia nigra*) i unutarstanične nakupine proteina sastavljene pretežno od α -sinukleina – Lewyjeva tjelešca (12). Gubitak dopaminergičkih neurona dovodi do nedostatak strijatalnog dopamina, što uzrokuje simptome bolesti poput bradikinezije, ukočenosti i tremora (13). U pozadini ovih promjena nalazi se nekoliko mehanizama, pri čemu oksidativni stres i oštećenje funkcije mitohondrija igraju vodeću ulogu (14), s obzirom na to da su dopaminergički neuroni vrlo osjetljivi na visoke razine oksidativnog stresa (15). Nadalje, oštećenje ubikvitin-proteasomskog sustava dovodi do nakupljanja toksičnih proteina (16), a javlja se i upala, poremećaj u prometovanju kalcija te ekscitacijska toksičnost posredovana glutamatom (17,18).

Trenutačno ne postoji lijek za Parkinsonovu bolest, a dostupna terapija je isključivo simptomatska. Levodopa, prekursor dopamina, najučinkovitija je terapija za motoričke simptome, dok druge farmakološke opcije uključuju agoniste dopamina, MAO-B inhibitore i antikolinergike (19).

1.2.1. Levodopa

Dopamin ne prolazi krvno-moždanu barijeru te njegova sistemska primjena nema terapijski učinak u Parkinsonovoj bolesti (20). Nasuprot tome, levodopa, neposredni metabolički prekursor dopamina, prelazi krvno-moždanu barijeru putem LAT1 (engl. *large neutral aminoacid transporter*), a zatim se dekarboksilira u dopamin djelovanjem dekarboksilaze aromatskih amino kiselina (engl. *Aromatic L-amino acid decarboxylase*, AADC). Konačno, nastali se dopamin pohranjuje u sinaptičke vezikule djelovanjem vezikularnog monoaminskog transportera 2 (21–23). Procjenjuje se da svega 1–3 % oralno primijenjene doze dospije u mozak, dok se ostatak metabolizira periferno, prvenstveno dekarboksilacijom (24). Stoga se levodopa uvijek primjenjuje u kombinaciji s inhibitorima njezina metabolizma, poput karbidope ili benzerazida, koji značajno povećavaju razine levodope u mozgu i smanjuju učestalost i intenzitet nuspojava (25).

Unatoč visokoj učinkovitosti, primjena levodope dovodi do motoričkih komplikacija poput fluktuacija u terapijskom odgovoru ili levodopom inducirane diskinezije (26). Fluktuacije u odgovoru na lijek uključuju reakcije gubitka učinka (engl. *wearing-off*) ili akinezije na kraju

dozirnog intervala (engl. *end-of-dose akinesia*) te fenomen prekidača (engl. *on-off phenomenon*) (27). Motoričke komplikacije se obično javljaju nakon nekoliko godina primijene levodope, a iako njihova etiologija nije u potpunosti jasna, postoje dokazi kako pulsirajuća priroda dopaminergičke terapije doprinosi navedenim komplikacijama. Kako Parkinsonova bolest napreduje, progresivno propadaju dopaminergički neuroni te se smanjuje sposobnost pohrane dopamina pa njegove razine u mozgu odražavaju razine levodope u plazmi, što dovodi do pulsatilne stimulacije receptora i konačno do prilagodbe u dopaminskim receptorima i signalnim putevima u mozgu (28,29).

Kako bi se ublažile motoričke komplikacije, razvijeni su oblici levodope s kontroliranim oslobađanjem, no njihovi su učinci u ublažavanju istih imali ograničen učinak. Veliki napredak je postignut razvojem levodopa/karbidopa gela (Duodopa®) za intestinalnu primjenu, koji omogućuje kontinuiranu dopaminergičku stimulaciju te smanjuje trajanje „off“ razdoblja i diskinezija, a produljuje trajanje „on“ razdoblja. Međutim, riječ je o invazivnoj i skupoj metodi, koja nije dostupna svim bolesnicima te zahtijeva njihovo redovito praćenje (30,31).

Izuzev motoričkih komplikacija, potencijalna toksičnost levodope prema dopaminergičkim neuronima predstavlja dodatan problem i već je dugo predmet znanstvenih rasprava. Levodopa i dopamin podložni su auto-oksidaciji, pri čemu nastaje niz reaktivnih spojeva i slobodnih radikala koji mogu uzrokovati visoke razine oksidativnog stresa. Dopaminergički neuroni crne tvari osobito su osjetljivi na oksidativno oštećenje, a visoke razine željeza u toj regiji mozga mogu dodatno doprinijeti oksidativnom oštećenju stanica (32,33). Prve *in vitro* studije jasno su pokazale kako levodopa inducira oksidativni stres i dovodi do smrti neurona (34–37). Međutim, takva su istraživanja često provedena na nezrelim kulturama neurona, uz primjenu visokih koncentracija levodope, u uvjetima atmosferskih razina kisika te bez prisutnosti astrocita u kulturi (38). Istraživanja na organotipskim kulturama pokazala su kako levodopa može izazvati toksičnost i neovisno o oksidativnom stresu. Naime, u takvom je modelu primjena levodope rezultirala je dugotrajnom stimulacijom D2 receptora, porastom unutarstaničnih razina kalcija te posljedičnom ekscitacijskom toksičnošću (39). Longitudinalna studija pod nazivom ELLDOPA trebala je pružiti konačan odgovor na pitanje toksičnosti levodopa. Međutim, rezultati su bili kontradiktorni. Pacijenti liječeni levodopom imali su manje pogoršanje motoričke funkcije u usporedbi s placeboom, što upućuje na moguće simptomatske ili čak protektivne učinke. Istodobno je slikovna analiza mozga otkrila izraženiji pad biljega nigrostrijatalne funkcije u skupini koja je primala levodopu, što pak sugerira potencijalnu toksičnost povezanu s primjenom ovog lijeka (40). Novije istraživanje Hormanna i suradnika

predložilo je i novi mehanizam toksičnosti, prema kojem levodopa narušava funkciju mitohondrija, mitohondrijski membranski potencijal, proizvodnju ATP-a te NAD^+/NADH ravnotežu (41).

Sve navedeno upućuje na to da su učinci levodope složeni i još uvijek nedovoljno razjašnjeni te da postoji stvaran rizik od njezine toksičnosti. Stoga je, do pojave novih terapijskih opcija, od velike važnosti razvijati formulacije koje bi mogle umanjiti nedostatke postojeće terapije i istodobno pružiti potencijalne protektivne učinke. U tom bi kontekstu značajnu ulogu mogla imati nanotehnologija, osobito nanolijekovi za dostavu levodope temeljeni na anorganskim AuNP i SeNP.

1.3. Nanolijekovi

Razvoj sustava za ciljanu i kontroliranu isporuku lijekova jedan je od temeljnih ciljeva nanomedicine, a nanočestice pritom predstavljaju ključan alat za njegovo ostvarivanje. Zbog velike specifične površine one mogu vezati znatne količine lijeka, čime se pospješuje apsorpcija i bioraspoloživost, dok uklapanje u šuplju unutrašnjost nanočestica štiti lijek od razgradnje (42,43). Pažljivom modifikacijom površine, primjerice vezanjem specifičnih liganada, može se postići selektivna dostava i akumulacija lijeka u ciljnim stanicama i tkivima, što smanjuje toksičnost, a povećava učinkovitost (44). U terapiji solidnih tumora, nanočestice se mogu selektivno nakupljati u ciljnom tkivu zahvaljujući učinku poboljšane permeabilnosti i retencije (engl. *enhanced permeability and retention effect*, EPR), (45). Nadalje, ciljane dostave lijekova može se upariti s kontroliranim otpuštanjem, ugradnjom elemenata osjetljivih na podražaje. Promjena pH, temperature ili primjena vanjskog magnetskog polja dovodi do pucanja kovalentne veze i oslobađanja lijeka upravo na mjestu djelovanja (46). Osim u ciljanoj dostavi, ligandi na površini nanočestica mogu pospješiti prolazak lijekova kroz biološke barijere (47). Uz to, nanočestice mogu poslužiti i u dijagnostičke svrhe, a integracijom terapijskih i dijagnostičkih svojstava u jedinstven sustav nastaju tzv. teranostici (engl. *theranostics*) (48).

Nanonosače, kao i nanočestice, možemo podijeliti u dvije glavne skupine, organske i anorganske. Organski nanonosači temelje se na polimernim nanočesticama, liposomima, micelama, dendrimerima te biološkim materijalima poput stanica, bakterija i virusa (49). Upravo su liposomi jedni najviše istraživanih nanočestica za dostavu lijekova, a ujedno su i najzastupljeniji u kliničkoj primjeni (50). Njihova uspješnost proizlazi iz izvrsne biokompatibilnosti, biorazgradivosti te sposobnosti transporta hidrofobnih i hidrofilnih

molekula. Međutim, liposomi pate od niske učinkovitosti uklapanja lijekova, fizičke nestabilnosti te podložnosti razgradnji i nekontroliranom otpuštanju lijekova (51,52).

Nasuprot organskim nanočesticama, anorganski nanonosači, napravljeni od metala ili metalnih oksida, u pravilu su hidrofilniji i stabilniji u fiziološkim uvjetima, a pored toga posjeduju i širok raspon magnetskih, optičkih i katalitičkih svojstava koja se mogu iskoristiti za pripravu multifunkcionalnih nanosustava (53). Lako se funkcionaliziraju ligandima za ciljanu dostavu ili za poboljšan prijenos kroz biološke barijere, dok njihova velika specifična površina omogućuje fizičku adsorpciju ili kovalentno vezanje znatne količine lijeka (54). Glavni nedostaci ovih sustava odnose se na slabu biorazgradivost, akumulaciju, otežanu eliminaciju i toksičnost (55,56). Funkcionalizacijom površine biokompatibilnim polimerima moguće je značajno rizik od štetnih učinaka, a prilagodbom veličine postići učinkovito uklanjanje iz stanica i organizma (57,58).

Među anorganskim nanočesticama, kao mogući nosači lijekova, osobito za neurodegenerativnim bolestima, ističu se nanočestice zlata (AuNP). One se odlikuju dobrom biokompatibilnošću, mogućnošću prilagodbe oblika i veličine te jednostavnom površinskom modifikacijom u svrhu funkcionalizacije ili vezanja lijekova (59). Također, korisne bi mogle biti i nanočestice selena (SeNP) koje posjeduju protuupalna i antioksidativna svojstva (60,61).

1.3.1. Nanolijekovi temeljeni na nanočesticama zlata i selena – naglasak na levodopi i Parkinsonovoj bolesti

Kao što je već spomenuto, zbog velike specifične površine AuNP mogu, fizičkom adsorpcijom ili konjugacijom, vezati veliku količinu lijeka. Primjerice, Kim i suradnici razvili su sferične AuNP promjera oko 12 nm, obložene hijaluronskom kiselinom, na koje je lijek vezan fizičkom adsorpcijom uz učinkovitost uklapanja od približno 70 % (62). U drugoj studiji, Marassi i suradnici su pažljivim optimiranjem svojstava AuNP postigli visoku učinkovitost uklapanja kurkumina, putem nekovalentnih interakcija, koja je iznosila gotovo 90 % (63). Slični učinci potvrđeni su i za AuNP korištene u ovom radu. U prethodnom istraživanju detaljno je opisano kako AuNP, obložene peptidoglikanskim monomerom (PGM-AuNP) i 1-adamantilaminom (Ad-AuNP), učinkovito stupaju u interakciju s levodopom i dopaminom putem nekovalentnih veza (64).

Od velike važnosti za primjenu u neurodegenerativnim bolestima je i sposobnost AuNP da prodiru kroz krvno moždanu barijeru bilo pasivno ili aktivno. Na primjer, in vitro studija na sferioidima mozga sa šest staničnih tipova pokazala je kako vrlo male AuNP (primarne veličine

oko 2 nm) vrlo učinkovito prolaze krvno-moždanu barijeru i ulaze u sferoide, i to bez narušavanja integriteta same barijere (65). Slično ponašanje opisano je i u *in vivo* studiji na štakorima kojima su intraperitonealno primijenjene AuNP (1,3 nm) te su već nakon šest sati detektirane u hipokampusu, frontalnom korteksu, hipotalamusu i cerebelumu (64). Međutim, pasivni je transport ograničen na vrlo male AuNP, čija pojedinačna površina nije dovoljno velika za učinkovito vezanje lijekova. Transport većih nanočestica zahtjeva dodavanje liganada, koji su supstrati receptora na krvno-moždanoj barijeri. Primjerice funkcionalizacija AuNP glukozom omogućava učinkovit prolazak krvno-moždane barijere i dostavu lijekova u središnji živčani sustav (67). Također, Gonzalez-Carter i suradnici sintetizirali su AuNP obložene levodopom, te pokazali njihov učinkovit unos i nakupljanje u stanicama *in vitro* modela krvno-moždane barijere, bez znakova citotoksičnosti ili upalnih reakcija (68).

Osim što mogu poslužiti kao nosači za učinkovit prijenos lijekova u mozak, AuNP mogu utjecati na redoks ravnotežu u stanicama oponašajući enzimatsku aktivnost, odnosno djelujući kao nanozimi (engl. *nanozymes*) (69). Primjerice, CNM-Au8® je eksperimentalni lijek temeljen na katalitički aktivnim nanokristalima zlata. U II. fazi kliničkih ispitivanja pokazao je sposobnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru te povoljno djelovanje na energetske metabolizam mozga. Nakon 12 tjedana primjene zabilježeno je povećanje omjera NAD^+/NADH za 10,4 % i normalizacija ATP homeostaze u bolesnika s Parkinsonovom bolešću i multiplom sklerozom. Uz to, lijek je pokazao dobru podnošljivost te nisu prijavljeni ozbiljni štetni događaji (70,71).

Nadalje, nekoliko *in vivo* studija podupire učinkovitost AuNP u liječenju Parkinsonove bolesti. Silva Córneo i suradnici pokazali su terapijski potencijal AuNP u mišjem modelu bolesti. Primjena nanočestica dovela je do poboljšanja motoričke funkcije uz smanjenja oksidativnog stresa i djelomičnu obnovu neurotrofnih čimbenika (BDNF), pri čemu nisu zabilježeni znakovi toksičnosti (72). U studiji Xue i suradnika, AuNP ublažile su oksidativni stres u kulturi stanica, a u mišjem modelu Parkinsonove bolesti smanjile su upalu u dopaminergičkim neuronima i povećale razine strijatalnog dopamina uz posljedično smanjenje motoričkih deficita (73).

AuNP su ostvarile određene uspjehe i kao nosači gena. U zanimljivom istraživanju van der Vyver i suradnici primijenili su AuNP za dostavu dvaju gena (*AADC* i *GCHI*) u mozak štakora, kojima je parkinsonizam izazvan primjenom 6-hidroksidopamina (6-OHDA). Rezultati su pokazali kako je došlo do uspješne integracije gena, pri čemu su liječeni štakori imali niže

razine upale u mozgu uz smanjen broj aktiviranih imunskih stanica te povećanu sintezu dopamina (74).

Ukupno gledano, AuNP mogu istodobno služiti kao nosači lijekova i gena te pritom ispoljavati intrinzična neuroprotektivna svojstva. Osim što poboljšavaju farmakokinetiku, olakšavaju prijenos lijekova kroz biološke barijere, uz minimalan rizik od toksičnosti.

S druge strane, SeNP nisu bile toliko istraživane u kontekstu neurodegenerativnih bolesti, već se njihova primjena prvenstveno razmatrala u liječenju malignih oboljenja (75). Ipak, interes za njihovu primjenu u neurodegenerativnim poremećajima sve je izraženiji, ponajprije zbog snažnih antioksidativnih i protuupalnih učinaka (76,77).

Selen je esencijalni mikronutrijent ključan za normalno funkcioniranje viših organizama, koji je u početku smatran toksičnim zbog opaženih štetnih učinaka na ljude (78,79). Naknadno je utvrđeno kako selen igra ključnu ulogu u raznim biološkim procesima, što je potaknulo opsežna istraživanja koja su dovela do otkrića brojnih funkcija (80,81). Selen se prvenstveno ugrađuje u selenoproteine kao aminokiselina selenocistein, a većina selenoproteina djeluju kao enzimi uključeni u redoks regulaciju. Deficijencija seleno ima nepovoljan učinak na ključne ključne antioksidativne sustave poput glutathion peroksidaze (GPx) i tioredoksin reduktaze, što može dovesti do povećanih razina oksidativnog stresa (82). U mozgu, GPx enzimi su među najzastupljenijim selenoproteinima i igraju ključnu ulogu u detoksikaciji vodikovog peroksida i lipidnih peroksida, čime se ublažavaju oksidativna oštećenja (83). Promijenjene razine seleno uočene su kod pacijenata s Parkinsonovom bolešću (82), a studije na životinjama pokazale su kako bi suplementacija selenom mogla povećati razinu antioksidativnih enzima, smanjiti gubitak dopaminergičkih neurona i poboljšati motoričku funkciju u životinjskim modelima bolesti (84,85).

SeNP iskorištavaju povoljna svojstva konvencionalnih oblika seleno uz smanjenu toksičnost, a pri tome omogućuju dodatne funkcionalnosti poput ciljane dostave lijekova (61,86). SeNP su pokazale neuroprotektivne učinke u modelima Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Primjerice, Salarmoli i suradnici primijenili su biosintetizirane naočestice seleno u liječenju štakora kojim je izazvan parkinsonizam primjenom 6-OHDA. Tretman sa SeNP smanjio je motorički deficit i povećao aktivnost antioksidativnih enzima (SOD, CAT, GPx) (87). U drugoj studiji SeNP su korištene za dostavu resveratrola u stanice i pojačavanje njegovog učinka. Resveratrolom funkcionalizirane nanočestice učinkovito su spriječile bakrom induciranu agregaciju A β ₄₂ monomera te pokazale izražene antioksidativne učinke, čime su

zaštitile PC12 stanice od apoptoze (88). Slične je rezultate pokazala studija koju su proveli Vicente-Zurdo i suradnici. Oni su primjenom SeNP obloženih kitozanom uspjeli gotovo poptuno inhibirati agregaciju A β ₄₂ monomera u kulturi stanica (89). U još jednoj studiji na modelu Alzheimerove bolesti, SeNP obložene resveratrolom smanjile su lipidnu peroksidaciju, povećale aktivnost katalaze i razine reduciranog glutationa (90). U studiji Zhao i suradnika, SeNP su uspješno spriječile 6-OHDA-om induciranu toksičnost u PC12 stanicama (91). Konačno, Xu i suradnici razvili su oralno aktivne SeNP obložene serumskim albuminom koje su uspješno prošle kroz krvno-moždanu barijeru te su u MPTP (engl. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) modelu miša smanjili motoričke deficite i usporili gubitak dopaminergičkih neurona (92).

1.4. In vitro modeli Parkinsonove bolesti

Stanični modeli važan su alat za razumijevanje Parkinsonove bolesti i razvoj potencijalnih lijekova. Velik broj staničnih kultura koristi se za istraživanje Parkinsonove bolesti, pri čemu su najčešći modeli imortalizirane stanične linije poput PC12 i SH-SY5Y (93,94). SH-SY5Y stanice trostruko je klonirana stanična linija neuroblastoma izolirana iz koštane srži četverogodišnje djevojčice (95). Jedna je od najčešće korištenih staničnih linija u istraživanju Parkinsonove bolesti, a tu popularnost duguje humanom porijeklu, brzom proliferaciji, jednostavnom uzgoju, te sposobnosti diferencijacije u stanice slične neuronima i prikladnosti za visoko-protočna ispitivanja lijekova (96–98). Upravo iz tih razlika smo ju i mi koristili u ovom istraživanju. SH-SY5Y stanična linija primarno se sastoji od adherentnih stanica uz manji udio suspenzijskih. Adherentne stanice podijeljene su u dva morfološki različita tipa stanica: N-tip (engl. *neuronal*) i S-tip (engl. *schwann-like*). N-tip stanica je dominantan i može se diferencirati dok stanice S-tipa uglavnom ne reagiraju na diferencijacijske protokole (98).

Stanična linija PC12, izvedena iz tumora nadbubrežne žlijezde štakora, može se diferencirati faktorom živčanog rasta (engl. *nerve growth factor*, NGF) u stanice slične neuronima. Uslijed diferencijacije, ove stanice razvijaju neurite, postaju električni podražljive i oslobađaju neurotransmitore. Pokazuju dobar odgovor na klasične toksine za izazivanje Parkinsonove bolesti, a brza proliferacija čini ih prikladnima za visoko-protočna ispitivanja lijekova (99).

Stanična linija LUHMES (engl. *lund human mesencephalic*), dobivena je iz mezencefalona ljudskog fetusa. Nakon diferencijacije, ove stanice poprimaju obilježja vrlo slična

dopaminergičkim neuronima crne tvari: pokazuju spontanu električnu aktivnost, otpuštaju dopamin, eksprimiraju tipične dopaminergičke biljege te razvijaju vrlo složenu i razgranatu mrežu neurita. Ove su stanice znatno osjetljivije na 6-OHDA i MPP+ te više se koriste za proučavanje mehanizama bolesti, nego li za ispitivanje lijekova. Njihov je uzgoj kompleksniji i zahtjeva veću pažnju te veću razinu stručnosti (100–102).

Još složeniji modeli od ovog uključuju primarne kulture neurona izolirane iz životinja te organotipske kulture, dobivene nasađivanjem poprečnih presjeka životinjskog mozga. Primarne kulture bolje oponašaju morfologiju i fiziologiju neurona, ne proliferiraju, jako eksprimiraju biljega neurona, daju pouzdanije rezultate te se prvenstveno koriste za otkrivanje mehanizama bolesti. Međutim, uz njih se vežu etički problemi, kratko žive u kulturi, zahtijevaju vrlo visoku razinu stručnosti, daju heterogenu populaciju stanica, nisu pogodne za visoko-protočne studije i nemaju ljudski genom (103,104).

Modeli koji najvjernije oponašaju *in vivo* uvjete jesu modeli dopaminergičkih neurona razvijeni pomoću induciranih pluripotentnih matičnih stanica (*induced pluripotent stem cells*, iPSC). Izolacijom somatskih stanica pacijenata i primjenom specifičnih protokola moguće je reprogramirati ih u pluripotentne stanice, koje se zatim mogu diferencirati u željeni stanični tip. Takvi modeli odražavaju gensku podlogu i patološke procese prisutne u stanicama oboljelih osoba, što im daje ogroman istraživački potencijal, a pritom ne otvaraju etička pitanja povezana s drugim vrstama matičnih stanica (105,106).

Najčešće korišten pristup za izazivanje parkinsonizma u staničnim kulturama je primjena kemikalija koje repoduciraju ključne aspekte patofiziologije Parkinsonove bolesti (93). Jedan od najčešćih toksina je 6-OHDA, analog dopamina koji putem dopaminskog transportera ulazi u dopaminergičke neurone, prolazi kroz autooksidaciju, stvara ROS-ove, te potiče lipidnu peroksidaciju i inhibira kompleks I u lancu prijenosa elektrona. To narušava energetska ravnotežu stanice, oštećuje mitohondrije i dovodi do apoptoze stanica (107–109). Drugi vrlo često korišten spoj, čije je otkriće bilo sasvim slučajno, ali je odgovorno za ogroman napredak u razumijevanju Parkinsonove bolesti, jest MPTP (110). Ovaj se spoj metabolizira djelovanjem monoaminoooksidaze u aktivni oblik MPP+ koji selektivno ulazi u dopaminergičke neurone putem dopaminskog transportera gdje inhibira mitohondrijski kompleks I, što dovodi do iscrpljivanja zaliha ATP-a, stvaranja ROS-ova, disfunkcije mitohondrija, autofagije i konačno stanične smrti i apoptoze. Parakvat je herbicid čija je strukturna sličnost s MPTP-om uvelike doprinijela popularnosti okolišne hipoteze Parkinsonove bolesti. Ovaj spoj prolazi kroz redoks

cikluse stvarajući ROS-ove te inducira oksidativni stres i oštećenje mitohondrija (111). Konačno insekticid rotenon, zbog svojih lipofilnih svojstava lako prolazi kroz krvno-moždanu barijeru i snažno inhibira kompleks I u lancu prijenosa elektrona. Kronična izloženost niskim dozama reproducira mnoge značajke Parkinsonove bolesti (PD), uključujući progresivnu degeneraciju dopaminergičkih neurona i stvaranje inkluzija pozitivnih na α -sinuklein (112) .

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Razvoj nanotehnologije pružio je nove mogućnosti za unaprjeđenje konvencionalnih formulacija lijekova. U tom se kontekstu ističu nanočestice kao nosači lijekova jer omogućuju ciljanu dostavu i kontrolirano oslobađanje, povećavaju topljivost i bioraspoloživost lijekova te smanjuju njihovu toksičnost. AuNP su privukle pažnju zbog svoje biokompatibilnosti, stabilnosti, sposobnosti vezanja različitih liganada, dok se SeNP ističu antioksidativnim i protuupalnim svojstvima. U ovom istraživanju cilj je ispitati potencijal AuNP i SeNP kao nosača levodope, čija je terapijska primjena ograničena nepovoljnim farmakokinetičkim profilom i razvojem motoričkih komplikacija. Ispitane su četiri vrste nanočestica – PVP-SeNP, Tween-SeNP, PGM-AuNP i Ad-AuNP – za koje je u prethodnim istraživanjima određena priroda interakcija s levodopom. Kako bi se odredila njihova prikladnost kao nosača levodope, u ovom su doktorskom radu dodatno ispitani uspješnost uklapanja levodope, profil oslobađanja s nanočesticama, unos nanočestica u stanice te njihova toksičnost i potencijalni neuroprotektivni učinak na *in vitro* modelu dopaminergičkih neurona.

Osnovna hipoteza ovog rada jest da su AuNP i SeNP prikladne kao nosači levodope te pokazuju nisku toksičnost i protektivni učinak na *in vitro* modelu dopaminergičkih neurona.

Glavni je cilj ovog rada procijeniti mogućnost primjene AuNP i SeNP kao nosača levodope u *in vitro* uvjetima.

Za postizanje glavnog cilja ovog rada, definirani su sljedeći specifični ciljevi:

1. Provesti karakterizaciju nanočestica i njihovih smjesa s levodopom.
2. Ispitati vezanje levodope za nanočestice te profil oslobađanja levodope s nanočesticama.
3. Uspostaviti i karakterizirati *in vitro* model dopaminergičkih neurona.
4. Ispitati unos nanočestica i njihovih smjesa s levodopom u stanice te procijeniti njihov učinak na preživljenje i oksidativni stres u *in vitro* modelu dopaminergičkih neurona.
5. Ispitati protektivne učinke nanočestica i njihovih smjesa s levodopom na *in vitro* modelu dopaminergičkih neurona.

Ovo istraživanje pridonijet će znanstvenim spoznajama o primjenjivosti AuNP i SeNP u razvoju nanoformulacija levodope, temeljem podataka o vezanju i oslobađanju levodope s nanopovršine, o njihovoj toksičnosti, utjecaju na oksidativni stres te potencijalnom neuroprotektivnom djelovanju.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Priprema otopina i suspenzija

Ishodne otopine (engl. *stock solution*) spojeva pripremljene su prema uputama proizvođača i dostupnoj literaturi na način koji osigurava njihovu stabilnost i kakvoću. Ishodna otopina levodope (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) pripremana je uz soniciranje (zbog sporog otapanja) kao 10 mM vodena otopina te je skladištena u mraku, na 4 °C i iskorištena unutar 5 dana. 6-OHDA (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) je otapan u dimetilsulfoksidu (DMSO, Kemika, Zagreb, Hrvatska) neposredno prije svakog eksperimenta i pripremljen kao 100 mM otopina, razrijeđen u sterilnoj vodi do radne koncentracije te iskorišten unutar 20 minuta od otapanja. *tert*-butil hidroperoksid (tBHP, Santa Cruz Biotechnology, Texas, SAD) kupljen je u obliku 70 % (m/m) otopine te je za potrebe tretmana razrijeđen u ultračistoj vodi. Fluorescentne probe korištene u eksperimentima oksidativnog stresa, pripravljene su u sljedećim otapalima: 2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetat (DCFH₂-DA, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) u metanolu, monoklorobiman (mBCL, Sigma-aldrich, Darmstadt, Njemačka) i dihidroetidij (DHE, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) u DMSO-u, a rodamin 123 (Rh123, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) u etanolu. Probe su pohranjene u alikvotama od 200 µL na -80 °C i iskorištene unutar dva mjeseca. Karbonil cijanid m-klorofenil hidrazon (CCCP, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) otopljen je u DMSO-u i pohranjen na -20 °C. Suspenzije nanočestica razrijeđene su u sterilnoj, ultračistoj vodi do koncentracija od 3000 mg Au ili Se/L i skladištene su u mraku na 4 °C. Sažeti prikaz korištenih spojeva dostupan je u Tablica 1.

Radne otopine i suspenzije, korištene za tretmane stanica, pripremane su sterilnoj destiliranoj vodi kao 10× koncentrirane, te su do konačne koncentracije razrjeđivane izravno u jažicama. Za tretmane koji su uključivali smjese levodope i nanočestica, u jednoj epruveti pripremljene su deset puta koncentrirane radne otopine, koje su inkubirane 30 minuta kako bi se omogućilo vezanje levodope na površinu nanočestica (na temelju prethodno dobivenih rezultata vezanja, Slika 2). Konačne koncentracije nanočestica korištene u staničnim eksperimentima prikazane su u Tablica 2. Konačna koncentracija levodope u svim eksperimentima bila je 50 µmol/L.

Tablica 1. Priprema i uvjeti skladištenja kemikalija, reagenasa i nanočestica.

Spoj	Otapalo	Koncentracija	Uvjeti skladištenja
------	---------	---------------	---------------------

Levodopa	Destilirana voda	10 mM	4 °C, do 5 dana
6-OHDA	DMSO	100 mM	Svježa priprema
tBHP	Destilirana voda	70 % (m/m)	4 °C
DCFH ₂ -DA	Metanol	5 mM	-80 °C, 2 mjeseca
mBCL	DMSO	5 mM	-80 °C, 2 mjeseca
DHE	DMSO	3,17 mM	-80 °C, 2 mjeseca
Rh 123	Etanol	2,63 mM	-80 °C, 2 mjeseca
CCCP	DMSO		-20 °C, 2 godine
SeNP	Sterilna destilirana voda	3000 mg Se/L	4 °C
AuNP	Sterilna destilirana voda	3000 mg Au/L	4 °C

Tablica 2. Konačne koncentracije nanočestica u staničnim eksperimentima. Koncentracija levodope u tretmanima koji su sadržavali kombinaciju nanočestica i levodope, bila je 50 µM.

	PGM-AuNP (mg Au/L)	Ad-AuNP (mg Au/L)	PVP-SeNP (mg Se/L)	Tween-SeNP (mg Se/L)
MTS	100,0	100,0	64,0	64,0
	50,0	50,0	32,0	32,0
	25,0	25,0	16,0	16,0
	12,5	12,5	8,0	8,0
	6,3	6,3	4,0	4,0
	3,1	3,1	2,0	2,0
	1,6	1,6	1,0	1,0
protočna citometrija,	50,0	50,0	11,0	5,0
oštećenje DNA,	25,0	25,0	6,0	3,0
oksidativni stres,	10,0	10,0	3,0	1,0
MMP			1,0	

U svim tretmanima konačna koncentracija organskih otapala u jažicama (etanol, DMSO, metanol i dr.) nije prelazila koncentraciju od 0,1 %. Kontrolne, netretirane stanice u svim su eksperimentima sadržavale jednaku količinu sterilne destilirane vode kao i odgovarajući tretmani, kako bi se isključio mogući utjecaj otapala na rezultate.

3.2. *Nanočestice*

3.2.1. *Sinteza nanočestica*

AuNP i SeNP korištene u ovom istraživanju sintetizirane su na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada te je njihova sinteza detaljnije opisana drugdje (64,113).

Ukratko, PGM-AuNP i Ad-AuNP sintetizirane su redukcijom tetraklorozlatne kiseline ($\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, Njemačka) primjenom natrijevog borohidrida (NaBH_4 , Alfa Aesar, Njemačka) kao redukcijskog sredstva. U 6,5 mL ultračiste vode dodana je 10 mM otopina $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ te 0,67 mM otopina 1-adamantilamin hidroklorida (Ad, Sigma-Aldrich, Njemačka) ili 0,12 mM otopina peptidoglikanskog monomera (PGM, Pliva, Hrvatska). Potom je, uz snažno miješanje, dodano 0,5 mL 15 mM NaBH_4 . Promjena boje otopine iz blijedožute u tamnocrvenu označila je nastanak nanočestica. Miješanje je zatim nastavljeno na sobnoj temperaturi tijekom 90 minuta za Ad-AuNP ili 20 minuta za PGM-AuNP. Nakon završetka reakcije, nanočestice su pročišćene centrifugiranjem pri $8.000 \times g$ tijekom 10 minuta (Megafuge ST4R Plus, Thermo Scientific, Waltham, SAD). Supernatant je uklonjen, a talog ponovno suspendiran u ultračistoj vodi. Postupak pročišćavanja ukupno je ponovljen dvaput, a konačna suspenzija pohranjena je u hladnjaku pri 4 °C.

SeNP obložene polivinilpirolidonom (PVP-SeNP) sintetizirane su redukcijom natrijevog selenita (Sigma-Aldrich, Njemačka) pomoću L-askorbinske kiseline (Alfa Aesar, Njemačka). U 23,37 mL ultračiste vode dodana su 3 mL 1 %-tne (m/m) vodene otopine polivinilpirolidona (PVP, Merck, Njemačka). Dobivena otopina miješana je pri 500 rpm-a tijekom 15 minuta, nakon čega je uz stalno miješanje kap po kap dodano 3,3 mL 100 mM L-askorbinske kiseline i 0,33 mL 0,1 M natrijevog selenita. Tijekom dodavanja natrijevog selenita boja otopine postupno se promijenila iz prozirne u crvenu, što je ukazivalo na nastanak nanočestica. Otopina je dodatno miješana 20 minuta, a zatim centrifugirana pri $13.700 \times g$ tijekom 15 minuta na Megafuge ST4R Plus centrifugi. Supernatant je uklonjen, a talog ponovno suspendiran u ultračistoj vodi. Postupak pročišćavanja ponovljen je dvaput, a konačna suspenzija pohranjena u hladnjaku pri 4 °C.

SeNP obložene polisrobatom 20 (Tween-SeNP) pripremljene su na sličan način: 1,74 mL otopine natrijevog selenita 0,1 M koncentracije dodano je u 90 mL ultračiste vode, a zatim je, uz stalno miješanje, kap po kap, dodano ukupno 10 mL 56,7 mM otopine L-askorbinske kiseline. Nakon svakog dodatka 2 mL otopine L-askorbinske kiseline, u smjesu je dodano po 10 μ L Tweena (Sigma Aldrich, Njemačka). Reakcija je trajala 20 minuta, tijekom čega se boja otopine promijenila iz prozirne u crvenkastu, što je ukazivalo na nastanak nanočestica. Nakon završetka reakcije, Tween-SeNP su centrifugirane na $19\,800 \times g$ tijekom 10 minuta minuta na Megafuge ST4R Plus centrifugi. Supernatant je uklonjen, a talog ponovno suspendiran u ultračistoj vodi. Postupak pročišćavanja ponovljen je dvaput, a konačna suspenzija pohranjena u hladnjaku pri 4 °C.

3.2.2. Karakterizacija nanočestica

Koncentracija zlata u suspenziji određena je metodom atomske apsorpcijske spektroskopije (engl. *Atomic absorption spectrometry*, AAS) na uređaju Perkin Elmer Analyst 600 (Perkin Elmer, Shelton, USA). Kalibracijska krivulja izrađena je primjenom standardne otopine zlata (1000 mg/L, Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) u 5 % (v/v) dušičnoj kiselini. Koncentracija zlata u uzorku izračunata je prema jednadžbi kalibracijske krivulje te je primjenom faktor razrjeđenja određena ukupna koncentracija zlata u AuNP suspenziji.

Koncentracija selena u SeNP suspenziji određena je metodom induktivno-spregnute plazme s tandemskom spektrometrijom masa (engl. *inductively coupled plasma – tandem mass spectrometry*, ICP-MS/MS) na uređaju Agilent 8900 ICP-QQQ (Agilent Technologies, Santa Clara, USD). SeNP suspenzija je najprije razrijeđena 10^6 puta u ultračistoj vodi, a zatim dodatno razrijeđena 10 puta u vodenoj otopini koja je sadržavala 1 % (v/v) dušične kiseline (HNO₃, Merck, Darmstadt, Njemačka) i 3 μ g/L germanija (Ge) kao unutarnjeg standarda (PlasmaCal SCP Science, Kanada). Za izradu kalibracijske krivulje korišten je Certipur® ICP standard selena (1 g/L, Merck, Darmstadt, Germany). Koncentracija selena u uzorku izračunata je prema jednadžbi kalibracijske krivulje te je primjenom faktora razrjeđenja određena ukupna koncentracija selena u SeNP suspenziji. Točnost analize potvrđena je primjenom referentnog materijala za određivanje elemenata u tragovima u vodi (SRM 1643f, National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, USA). Za pripremu i razrjeđivanje uzoraka korištene su ultračista voda i dušična kiselina pročišćena destilacijom 65 % (m/m) dušične kiseline pomoću SubPUR destilacijskog sustava (Milestone, Sorisole, Italija).

Primarni promjer (d_{TEM}) i oblik AuNP i SeNP određeni su pomoću transmisije elektronske mikroskopije (engl. *transmission electron microscopy*, TEM) kako je opisano drugdje (64,113). Ukratko, suspenzije nanočestica razrijeđene su u ultračistoj vodi do konačne koncentracije metala od 10 mg/L, te je 5 μL takve suspenzije nanoseno na bakrene mrežice obložene Formvar® polimerom (SPI Supplies, West Chester, USA). Nakon sušenja na zraku, uzorci su snimljeni TEM-om (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany) pri naponu od 80 kV. Za svaku vrstu nanočestica, analizirano je najmanje 100 pojedinačnih nanočestica u programu ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, SAD), a rezultat je izražen kao srednja vrijednost.

Hidrodinamički promjer (d_{H}) i raspodjela veličina nanočestica određeni su metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS), dok je zeta (ζ) potencijal određen metodom elektroforetskog raspršenja svjetlosti (od engl. *electrophoretic light scattering*, ELS). Oba mjerenja provedena su na uređaju, Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK), pri sobnoj temperaturi, primjenom laserskog snopa zelene svjetlosti (532 nm). Nanočestice su najprije su dobro promiješane radi postizanja homogene suspenzije, razrijeđene u ultračistoj vodi do konačne koncentracije metala od 10 mg/L te je 1 mL razrijeđene suspenzije prenesen automatskom pipetom u jednokratnu plastičnu kivetu (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka). Hidrodinamički promjer određen je iz raspodjele po intenzitetu i izražen kao srednja vrijednost šest uzastopnih mjerenja. Po završetku DLS analize, uzorak je prenesen u kivete za ELS mjerenja (Malvern Instruments, Malvern, UK) te je ζ izračunat prema Henryjevoj jednadžbi uz Smoluchowski aproksimaciju i prikazan kao srednja vrijednost šest uzastopnih mjerenja.

3.2.3. Učinkovitost vezanja levodope za površinu nanočestica

Kapacitet vezanja levodope ispitan je inkubacijom nanočestica sa svježe pripremljenom otopinom levodope (500 μM) u ultračistoj vodi. Inkubacija je provedena na sobnoj temperaturi, u mraku i uz stalno miješanje kako bi se omogućilo vezanje levodope za površinu nanočestica. Takav postupak pripreme nanonosača čest je za male hidrofilne molekule poput levodope jer je jednostavan, brz, odvija se pri normalnim uvjetima i omogućava jednostavno oslobađanje vezanog lijeka (114). Konačne koncentracije nanočestica u uzorcima bile su: 500, 250 i 100 mg Au/L za AuNP, 110, 60, 30, 10 mg Se/L za PVP-SeNP te 50, 30 i 10 mg Se/L za Tween-SeNP. Vezanje je ispitano nakon 10, 30 i 120 minuta.

Po završetku inkubacije, nevezana levodopa odvojena je ultrafiltracijom pomoću Amicon® Ultra-2 filtera s graničnom veličinom od 2 kDa (Merck, Darmstadt, Njemačka). Uzorci su centrifugirani pri $3500 \times g$ tijekom 15 minuta na MegaFuge SRT4 Plus centrifugi, nakon čega je sakupljen ultrafiltrat koji je sadržavao nevezanu levodopu. Koncentracija levodope u ultrafiltratu određena je UV-Vis spektrofotometrijom na uređaju Cary 3500 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) pri valnoj duljini od 280 nm, u kvarcnoj kiveti duljine optičkog puta 10 mm. Za svaki eksperiment izrađena je zasebna kalibracijska krivulja levodope u ultračistoj vodi.

Količina vezane levodope izražena je kao učinkovitost uklapanja lijeka i izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{UUL (\%)} = \frac{\text{ukupna količina levodope} - \text{količina slobodne levodope}}{\text{ukupna količina levodope}} \times 100$$

3.2.4. Stabilnost smjese nanočestica i levodope u biološki relevantnim medijima

Stabilnost nanočestica u biološki relevantnim medijima ispitana je DLS-om na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK), kako je ranije već opisano. Kao eksperimentalno relevantni sustavi odabrani su: fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS), umjetna lizosomalna tekućina (engl. *artificial lysosomal fluid*, ALF), umjetna želučana tekućina (engl. *artificial gastric fluid*, AGF) i umjetna intestinalna tekućina (engl. *artificial intestinal fluid*, AIF). Sastav pojedinih medija i njihove pH vrijednosti prikazani su u Tablica 3. PBS je kupljen od tvrtke Sigma-Aldrich (Darmstadt, Njemačka), recept za ALF preuzet je iz rada Midander et al. (115), dok su AGF i AIF napravljene prema uputama Farmakopeje. Svi mediji sterilno su filtrirani kako bi se uklonile sitne čestice koje bi mogle utjecati na DLS analizu.

Navedeni mediji su odabrani kako bi simulirali fiziološke uvjete kojima su nanočestice potencijalno izložene u tijelu: AGF i AIF predstavljaju uvjete prolaska kroz gastrointestinalni trakt nakon oralne primjene, ALF lizosomalne uvjete nakon unosa nanočestica u stanice, dok PBS služi kao model izvanstaničnog okruženja. Ispitivanje stabilnosti u ovim medijima omogućuje bolju interpretaciju rezultata otpuštanja levodope s površine nanočestica, budući da stabilnost nanočestica utječe na kinetiku otpuštanja i dostupnost lijeka. U navedenim sustavima

nisu korišteni proteini jer je cilj bio procijeniti isključivo utjecaj ionske jakosti i pH na stabilnost nanočestica te osigurati nesmetanu kvantifikaciju levodope spektroskopskim metodama.

Tablica 3. Sastav i pH biološki relevantnih medija korištenih u ispitivanju stabilnosti nanočestica i određivanju profila oslobađanja levodope.

Medij	pH	Sastav (koncentracija)
AGF	2,0	NaCl (34,2 mM)
		NaCl (3,210 g/L)
		NaOH (6,000 g/L)
		citratna kiselina (20,800 g/L)
		CaCl ₂ (0,097 g/L)
		NaH ₂ PO ₄ x 7H ₂ O (0,179 g/L)
		Na ₂ SO ₄ (0,039 g/L)
ALF	4,5	MgCl ₂ x H ₂ O (0,106 g/L)
		glicin (0,059 g/L)
		natrijev citrat dihidrat (0,077 g/L)
		natrijev tartarat dihidrat (0,090 g/L)
		natrijev laktat (0,085 g/L)
		natrijev piruvat (0,086 g/L)
AIF	6,8	formaldehid (1,000 mL/L)
AIF	6,8	KH ₂ PO ₄ (6,800 g)
PBS	7,4	NaCl (8,000 g)
		KCl (0,200 g)
		Na ₂ HPO ₄ (1,440 g)
		KH ₂ PO ₄ (0, 240 g)

Ispitivanja su provedena pri 37 °C i konačnim koncentracijama nanočestica od 500 mg Au/L za AuNP, 110 mg Se/L za PVP-SeNP i 50 mg Se/L za Tween-SeNP. Ove su koncentracije odabrane jer je za njih utvrđen najveći postotak vezanja levodope (Slika 2). Konačna koncentracija levodope u svim je uzorcima bila 500 µM. Sve su suspenzije pripremljene u obliku 10 puta koncentriranih radnih otopina, inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi uz miješanje kako bi se omogućilo vezanje levodope te razrijeđene do konačnih koncentracija u 2 mL odgovarajućeg medija. Tako pripremljene suspenzije inkubirane su na 37 °C u mraku, uz

neprekidno miješanje. Za svaku vremensku točku pripremljen je poseban uzorak, a vremenske točke određivanja stabilnosti bile su sljedeće: 0 i 3 sata za AGF, 0 i 6 sati za AIF, 0, 3, 6 i 24h za PBS i AIF. Rezultati su prikazani grafički pri čemu svaka točka predstavlja srednju vrijednost 6 uzastopnih mjerenja hidrodinamičkog promjera.

3.2.5. *In vitro* ispitivanja oslobađanje levodope s površine nanočestica

Oslobađanje levodope s površine nanočestica ispitano je metodom dijalize, često upotrebljavanom metodom za određivanje *in vitro* kinetike oslobađanja lijeka iz nanoformulacija (116–120). Ova metoda omogućuje odvajanje slobodne frakcije lijeka od one vezane za nanočestice kroz polupropusnu membranu. Studija je provedena u biološki relevantnim medijima prikazanim u Tablica 3. Navedeni su mediji odabrani kako bi oponašali prolazak nanočestica kroz gastrointestinalni sustav (SGF, SIF), unutarstanično (SLF) i izvanstanično okruženje (PBS).

U ovoj studiji korištene su dijalizacijske membrane veličine pora 12 – 14 kDA (Medicell Membranes, London, UK). Membrane su prethodno inkubirane u ultračistoj vodi tijekom 60 minuta radi uklanjanja glicerola, a potom su temeljito isprane i kratko inkubirane u odgovarajućem mediju prije upotrebe.

Suspenzije nanočestica homogenizirane su vrtložnim miješanjem, a potom su pripremljene smjese nanočestica i levodope u obliku 10× koncentriranih suspenzija: 500 mg Au/L za AuNP, 110 mg Se/L za PVP-SeNP i 50 mg Se/L za Tween-SeNP, uz dodatak 500 µM levodope. Smjese su inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku i uz stalno miješanje, kako bi se omogućilo vezanje levodope. Odabrane koncentracije i vrijeme inkubacije temeljeni su na eksperimentima vezanja levodope za površinu nanočestica (Slika 2), pri čemu su navedeni uvjeti rezultirali najvećim stupnjem vezanja levodope za nanočestice.

Nakon inkubacije, 2 mL smjese preneseno je u dijalizacijske membrane koje su zatvorene magnetskim kvačicama i uronjene u 40 mL prethodno zagrijanog medija (37 °C), uz miješanje magnetskom miješalicom brzinom od 100 rpm-a. Primjenom 20× većeg volumena receptorskog medija postignuti su uvjeti osigurane topljivosti. To je nužno kako bi dobiveni profil oslobađanja lijeka bio isključivo posljedica otpuštanja lijeka s površine nanočestica te difuzije kroz pore membranu.

U unaprijed određenim vremenskim točkama (Tablica 4) uzimano je po 5 mL medija izvan membrane te je isti volumen nadomješten svježim medijem zagrijanim na 37 °C kako bi se održali uvjeti osigurane topljivosti (engl. *sink conditions*). Budući da intenzitet fluorescencije levodope u AGF-u nije bio dovoljan za njezinu kvantifikaciju, koncentracija levodope u alikvotima AGF-a određena je UV-Vis spektrofotometrijom ($\lambda = 280$ nm), dok je u ostalim medijima korištena fluorescencijska spektroskopija (Ex/Em = 278/318 nm).

Tablica 4. Vremena uzorkovanja medija u eksperimentima oslobađanja levodope s površine nanočestica.

Medij	Vremena uzorkovanja (min)
AGF	0, 5, 15, 30, 60, 120, 180
AIF	0, 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360
SLF	0, 5, 15, 30, 60, 120, 240, 480
ALF	0, 5, 15, 30, 60, 120, 240, 480

Sva mjerenja su provedena na uređaju SpectraMax ID3 (Molecular Devices, California, SAD). Količina levodope izračunata je iz jednadžbi kalibracijskih krivulja (**Error! Reference source not found.**), pri čemu je nova kalibracijska krivulja pripremljena za svaki medij i za svaki eksperiment. Kao kontrola korištena je otopina levodope u istoj koncentraciji i identičnim uvjetima, ali bez nanočestica. Rezultati su prikazani kao kumulativno oslobađanje levodope (%) u odnosu na ukupnu količinu levodope u sustavu. Eksperimenti su provedeni u dva neovisna ponavljanja.

3.3. Stanična kultura

3.3.1. Uzgoj, održavanje i diferencijacija stanične linije SH-SY5Y

SH-SY5Y stanice (ECACC, Salisbury, UK) uzgajane su u kompletnom staničnom mediju, koji se sastojao od bazalnog DMEM/F12 medija uz dodatak 10 % (v/v) fetalnog goveđeg seruma (FBS, engl. *fetal bovine serum*), 1 % (v/v) penicilina i streptomcina, 1 % (v/v) L-glutamina 1 % (v/v) neesencijalnih aminokiselina. Svi sastojci kompletnog medija kupljeni su od tvrtke Sigma Aldrich (Darmstadt, Njemačka). Stanice su uzgajane u T-75 flasku za kulturu stanica (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka) u inkubatoru Heracell™ VIOS 160i (Thermo Scientific, Waltham, SAD), pri 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5 % CO₂. Medij je obnavljan svakih

3 – 4 dana, a stanice su uzgajane do postizanja konfluentnosti od 70 – 80 %, nakon čega su presađene u novi flask ili nasađene u pločice za eksperimente.

Tijekom postupka presađivanja ili nasađivanja stanica, suspenzijske stanice su centrifugirane i sjedinjene s adherentnim stanicama koje su prethodno odvojene pomoću 0,25 % otopine tripsina s EDTA (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka), a brojanje stanica provedeno je na TC20 brojaču stanica (Bio-Rad, Hercules, SAD) . U svim eksperimentima korištene su stanice između 5. i 15. pasaže.

3.3.2. *Uspostava i karakterizacija in vitro modela dopaminergičkih neurona*

Diferencijacija SH-SY5Y stanica u dopaminergički fenotip provedena je prema prethodno opisanom protokolu (97). Stanice su nasađene u pločice i ostavljene preko noći kako bi se zalijepile na podlogu. Sljedeći je dan u jažice dodan stanični medij s 10 μ M retinoičnom kiselinom te su stanice inkubirane u navedenom mediju tijekom 72 sata. Retinoična kiselina skladištena je na -80 °C, a svi postupci s istom provedeni su uz minimalno izlaganje svjetlu i sobnoj temperaturi kako bi se spriječila njezina razgradnja (121). Nakon tri dana, medij je uklonjen, stanice su isprane PBS-om te inkubirane 72 sata u mediju s 80 nM forbol 12-miristat-13-acetatom (engl. *phorbol-12-myristate-13-acetate*, PMA) (Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka). Po završetku diferencijacije, stanice su isprane PBS-om, a zatim im je dodan svježi stanični medij, nakon čega su bile spremne za provedbu eksperimenta. U svim eksperimentima korištene su diferencirane stanice, dok su i diferencirane i nediferencirane stanice korištene u eksperimentima validacije modela dopaminergičkih neurona.

3.3.2.1. *Imunofluorescencija*

Imunofluorescencija je korištena za procjenu razlika u ekspresiji biljega dopaminergičkih neurona između diferenciranih i nediferenciranih SH-SY5Y stanica. Stanice su nasađene na sterilna pokrovna stakalca, u dvije pločice s 12 jažica (Eppendorf, Njemačka), u 900 μ L kompletnog staničnog medija, pri gustoći od 12.500 stanica/cm² i potom su ostavljene preko noći u inkubatoru kako bi se stanice zalijepile za podlogu. Sljedeći je dan, u jednoj pločici, pokrenuta diferencijacija prema gore opisanom protokolu, dok je druga pločica služila kao kontrola – stanice su tretirane su na isti način, ali je umjesto diferencijacijskog medija korišten kompletni stanični medij.

Po završetku diferencijacije, stanice su fiksirane u 4 % (m/m) otopini paraformaldehida (Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka) tijekom 15 minuta. Potom je fiksativ uklonjen, stanice su isprane dvaput PBS-om i inkubirane u puferu za permeabilizaciju (Tablica 5) tijekom 10

minuta. Stanice su zatim isprane dvaput PBS-om i inkubirane 90 minuta u puferu za blokiranje (Tablica 5) pri 37 °C i 5 % CO₂, nakon čega su u jažice dodane otopine primarnih protutijela (Tablica 6) pripremljenih u puferu za bojanje (Tablica 5). Uzorci s primarnim protutijelom inkubirani su preko noći na 4 °C.

Tablica 5. Sastav i specifikacije pufera korištenih u postupku za imunofluorescenciju

Reagens	Koncentracija (% v/v)	Namjena
pufer za permeabilizaciju	0,25 % Triton X-100 u PBS-u	permeabilizacija stanica
pufer za blokiranje	10 % FBS + 0,1 % Tween-20 u PBS-u	blokiranje nespecifičnog vezanja
pufer za ispiranje protutijela	0,1 % Tween-20 + 2 % FBS u PBS-u	ispiranje nakon inkubacije protutijelom
pufer za bojanje	2 % FBS + 0,1 % Tween-20 u PBS-u	razrjeđivanje protutijela

Sljedeći dan, primarno protutijelo je uklonjeno, a stanice su triput isprane puferom za ispiranje te su inkubirane 2 sata na 37 °C, u mraku, s odgovarajućim sekundarnim protutijelima (Tablica 6):

- za TH, VMAT2 i D2R uzorke korišteno je magareće protutijelo za zečji IgG obilježeno fluorescentnom bojom Alexa Fluor® 647
- za β-tubulin uzorak korišteno je kozje protutijelo za mišji IgG obilježeno fluorescentnom bojom
- za DAT uzorak korišteno je kozje protutijelo za štakorski IgG obilježeno fluorescentnom bojom Alexa Fluor® 555

Tablica 6. Popis protutijela korištenih u postupku za imunofluorescenciju

	Ciljni protein	Razr./Konc.	Kat. broj	Proizvođač	Fluorofor
Primarna protutijela					
anti-TH	tirozin hidroksilaza	1:1000	AB152	Chemicon, SAD	–
anti-DAT	dopaminski transporter	1:5000	MAB369	Chemicon, SAD	–
anti-D2R	dopaminski receptor tipa 2	5 µg/mL	AB5084P	Abcam, SAD	–

anti-VMAT2	vezikularni monoaminski transporter 2	1:100	V9104	Sigma-Aldrich, Njemačka	–
anti- β -tubulin	β -tubulin	1:200	T4026	Sigma-Aldrich, Njemačka	–
Sekundarna protutijela					
protutijelo za zečji IgG uzgojeno u magarcu	IgG	2 μ g/mL	ab150075	Abcam, UK	Alexa Fluor® 647
protutijelo za štakorski IgG uzgojeno u kozi	IgG	2 μ g/mL	ab150158	Abcam, UK	Alexa Fluor® 555
protutijelo za mišji IgG uzgojeno u kozi	IgG	2 μ g/mL	ab150113	Abcam, UK	Alexa Fluor® 488

Nakon inkubacije sa sekundarnim protutijelima, stakalca su isprana triput puferom za ispiranje, a jezgre stanica su obojane Hoechst 33258 bojom (10 μ g/mL, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) tijekom 10 minuta. Konačno, stakalca su isprana PBS-om, uklopljena u Fluoroshield® mediju (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) na predmetnim stakalcima, te zabrtvljena prozirnim lakom kako bi se pokrovnost stakalca učvrstila te spriječilo isušivanje uzoraka, koji su pohranjeni na -20 °C do snimanja.

Kontrole bez primarnih protutijela (NPC, engl. *no primary control*) i kontrole autofluorescencije (AFC, engl. *autofluorescence control*) pripremljene su istim postupkom, uz izostavljanje primarnog, odnosno oba protutijela. Mikroskopske slike snimljene su na konfokalnom mikroskopu Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems, Njemačka).

3.3.2.2. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze (qPCR)

Analiza ekspresije dopaminergičkih i neuronskih biljega između diferenciranih i nediferenciranih stanica provedena je pomoću kvantitativne lančane reakcije (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR). Ukupna ribonukleinska kiselina (engl. *total ribonucleic acid*, RNA) izolirana je iz 500.000 diferenciranih i 500.000 nediferenciranih stanica pomoću kompleta reagensa Aurum™ Total RNA (kat. Broj: 7326820, Bio-Rad, Hercules, SAD), u

skladu s uputama proizvođača. Ukratko, iz jažica je uklonjen medij, stanice su isprane PBS-om te inkubirane u otopini tripsin-EDTA tijekom 5 minuta. Nakon što su se stanice odlijepile, dodan je kompletni medij i izmjerena je koncentracija stanica. Potom je u epruvetu od 2 mL prenesena količina suspenzije koja sadržava 500.000 stanica. Suspenzija je potom razrijeđena do 2 mL sa staničnim medijem i podvrgnuta centrifugiranju na 500 g tijekom 10 min na Megafuge ST4R Plus centrifugi. Po završetku centrifugiranja, medij je uklonjen, stanice isprane PBS-om te je u svaku epruvetu dodano 350 μ L pufera za liziranje stanica (engl. *lysis buffer*). Nakon što su stanice lizirane, dodano je 350 μ L 70 % (v/v) etanola pripremljenog iz apsolutnog etanola visoke čistoće (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) i ultračiste vode tretirane 0,1 % (v/v) dietilpirokarbonatom (u svrhu inaktivacije nukleaza). Sadržaj svake epruvete temeljito je izmiješan kako bi se dobili homogeni uzorci koji su potom automatskom pipetom preneseni u kolone za izolaciju RNA (engl. *spin-columns*). Kolone su centrifugirane u Megafuge ST4R Plus centrifugi na 12.000g tijekom 60 sekundi. Filtrat je uklonjen, a u kolonu je dodano 700 μ L otopine za ispiranje niske ionske jakosti (engl. *low stringency wash solution*), nakon čega je kolona ponovo centrifugirana pri istim uvjetima. Filtrat je ponovno uklonjen, a na membranu je dodano 80 μ L svježe pripremljene otopine DNaze I. Nakon inkubacije u trajanju od 15 minuta, u kolonu je dodano 700 μ L otopine za ispiranje visoke ionske jakosti (engl. *high stringency wash solution*) te je kolona ponovno centrifugirana pri gore navedenim uvjetima. Kolona je zatim isprana otopinom niske ionske jakosti i prenesena u PCR epruvetu s čepom (Eppendorf, Njemačka). U kolonu je dodano 40 μ L otopine za eluciju RNA (engl. *elution solution*) i nakon inkubacije od 2 minute, ukupna RNA je eluirana s kolone na 12.000g tijekom 2 minute. Konačno, uzet je alikvot ukupne RNA od 5 μ L za analizu kvalitete, a ostatak je pohranjen na -80 °C te preveden u komplementarnu DNA (cDNA engl. *complementary DNA*) unutar 2 tjedna. Eksperiment je proveden u tri neovisna ponavljanja.

Koncentracija i čistoća izolirane RNA procijenjene su pomoću spektrofotometra NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD). Vrijednosti apsorbancija, omjeri 260/280 i 260/230 te koncentracije RNA prikazani su Tablica P1, a apsorpcijski spektar na Slika P2.

Izolirana RNA prevedena je u cDNA prema uputama iz kompleta reagensa iScript™ Reverse Transcription Supermix (kat. broj 1708841, Bio-Rad, Hercules, SAD). Ukratko, u 0,5 mL epruvetama pripremljena je 20 μ L reakcijska smjesa koja se sastojala od 14 μ L vode bez nukleaza, 4 μ L 5x koncentrirane iScript reakcijske smjese i 2 μ L ukupne RNA. Kontrola bez reverzne transkriptaze (NRT kontrola, engl. *no reverse transcriptase control*) pripremljena je na isti način samo je iScript reakcijska smjesa zamijenjena NRT-Control reakcijskom

smjesom (sadrži sve sastojke reakcijske smjese osim reverzne transkriptaze). Reakcija reverzne transkripcije provedena je na uređaju Eppendorf ThermoMixer C (Eppendorf, Njemačka) pri sljedećim uvjetima: 5 minuta na 20 °C, 25 minuta na 46 °C, 1 minuta na 95 °C. Epruvete s cDNA ohlađene su do 4 °C, kratko centrifugirane i pohranjene na –20 °C te iskorištene unutar mjesec dana.

Reakcije amplifikacije cDNA provedene su pomoću kompleta reagensa iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (kat. broj 1725120, Bio-Rad, Hercules, SAD) na uređaju Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD). Reakcijske smjese pripremljene su u PCR pločicama s 96 jažica (Eppendorf, Njemačka). Izvorna cDNA je razrijeđena 20 puta vodom bez nukleaza i na dno svake jažice dodano je 5 µL tako razrijeđene cDNA uz 15 µL reakcijske smjese koja je sadržavala SYBR Green Supermix reakcijsku smjesu, pripadajuće početnice (Metabion, Njemačka) i vodu bez nukleaza. Pločice su zabrtvljene ljepljivom folijom i kratko centrifugirane kako bi se uklonili mjehurići zraka i reakcijska smjesa spustila na dno jažice. Program temperaturnog ciklusa postavljen je kako slijedi:

- faza 1 – denaturacija pri 95 °C tijekom 10 minuta
- faza 2 i 3 – 40 ciklusa: denaturacija pri 95 °C tijekom 15 sekundi praćena amplifikacijom na 60 °C tijekom 60 sekundi
- faza 4 – disocijacijska faza (krivulja taljenja), 95 °C tijekom 15 sekundi, 60 °C tijekom 60 sekundi, 95 °C tijekom 15 sekundi

Ciklus kvantifikacije (engl. *quantification cycle*, Cq) određen je automatski pomoću softvera 7500 System SDS Software (Applied Biosystems, Massachusetts, SAD). Prije analize genske ekspresije, provedena je optimizacija koncentracije svih početnica. Standardna krivulja napravljena je za svaki par početnica u nekoliko koncentracija te je iz nagiba pravca izračunata učinkovitost umnažanja (E) prema jednadžbi:

$$E (\%) = (10^{\frac{1}{\text{nagib pravca}}} - 1) \times 100$$

Za potrebe izrade standardne krivulje, izvorne cDNA razrijeđene su 5 puta (proizvoljna koncentracija - 10⁶), alikvoti iz svih uzoraka su pomiješani 1:1, a zatim su iz navedene smjese napravljena deseterostruka serijska razrijeđena cDNA (od 10⁶ do 10¹). Za analizu genske ekspresije korištene su koncentracije početnica čija je učinkovitost umnažanja bila u rasponu od 90 do 110 % uz R² > 0,98. Sljedovi početnica dostupni su u Tablica P2, standardne krivulje

početnica prikazane su na Slika P3, a koncentracije uzvodnih (engl. *forward*) i nizvodnih (engl. *reverse*) početnica te učinkovitosti umnažanja u Tablica P3.

Relativna ekspresija gena izračunata je u odnosu na referentne gen GAPDH i ACTB, metodom geometrijskog uprosječivanja (122). Eksperiment je proveden u tri neovisna ponavljanja, svako u tehničkim triplikatima.

3.4. Ispitivanje preživljenja stanica i pokretanja apoptoze

Utjecaj nanočestica, levodope, njihovih smjesa te testnih kemikalija na diferencirane SH-SY5Y stanice procijenjen je dvjema komplementarnim metodama. MTS test korišten je za određivanje preživljenja stanica u širokom rasponu koncentracija te za izračun IC_{50} i IC_{20} vrijednosti. Aneksin V/propidij jodid (PI, engl. *propidium iodide*) test proveden je protočnom citometrijom kako bi odredili utjecaj koncentracija $\leq I_{20}$ na preživljenje stanica i pokretanje apoptoze na *in vitro* modelu dopaminergičkih neurona.

3.4.1. Ispitivanje utjecaja na preživljenje stanica MTS testom

MTS test jedan je od najčešće korištenih metoda za ispitivanje preživljenja stanica i temelji se na pretvorbi tetrazolijeve soli u smeđe obojani formazan pri čemu je apsorbancija nastalog produkta na 490 nm izravno proporcionalna broju metabolički aktivnih stanica (123).

SH-SY5Y stanice nasađene su u prozirne pločice s 96 jažica (Eppendorf, Njemačka) u 100 μ L staničnog medija pri gustoći od 12.500 stanica/ cm^2 te su preko noći pohranjene u inkubator kako bi se zalijepile za podlogu. Sljedeći je dan pokrenuta diferencijacija prema ranije opisanom protokolu. Nakon diferencijacije, stanice su isprane PBS-om, a u jažice je dodan svjež stanični medij (180 μ L u jažice namijenjene tretmanu najvećom koncentracijom i 100 μ L u ostale jažice).

Radne otopine ($10\times$ koncentrirane vodene otopine najveće ispitivane koncentracije) pripremljene su iz ishodnih otopina, neposredno prije tretmana. U jažice s 180 μ L medija dodano je 20 μ L radne otopine, a zatim su napravljena dvostruka serijska razrjeđenja prijenosom 100 μ L iz jažice u jažicu višekanalnom automatskom pipetom. Ispitivani raspon koncentracija iznosio je 1,6 – 100,0 mg Au/L za AuNP, 1,0 – 64,0 mg Se/L za SeNP, 31,0 – 1000,0 μ M za levodopu, 3,1–100,0 μ M za tBHP te 25,0 – 100,0 μ M za 6-OHDA. U smjesama levodope i nanočestica, koncentracija levodopa uvijek je bila 50 μ M. Kao pozitivna kontrola korištena je 10 % (v/v) otopina DMSO-a, dok su netretirane stanice služile kao negativna kontrola. Jažice bez stanica, uz dodatak medija i reagensa, korištene su kao slijepa proba.

Nakon 24-satne inkubacije uklonjen je medij i stanice su dva puta isprane PBS-om te je u svaku jažicu dodano 100 μ L svježeg staničnog medija. MTS test proveden je pomoću kompleta reagensa CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (kat. Broj: G5440, Promega, Madison, SAD) prema uputama proizvođača. Ukratko, MTS reagens (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolija) i fenazin-metosulfat (PMS, engl. *phenazine methosulfate*) pomiješani su u omjeru 20:1 i 20 μ L te otopine dodano je u svaku jažicu (uključujući i sljijepu probu). Pločice su inkubirane 2 sata na 37 °C i 5 % CO₂ nakon čega je izmjerena apsorbancija na 490 nm pomoću čitača mikroploča Victor 3 (Perkin Elmer, Waltham, SAD).

3.4.2. Ispitivanje pokretanje apoptoze metodom protočne citometrije

Utjecaj tretmana na preživljenje i pokretanje apoptoze ispitan je protočnom citometrijom uz primjenu aneksina V obilježenog fluorescein-izotiocijanatom (FITC) i propidij jodida (PI). Aneksin V se veže za fosfatidilserin, koji se u zdravim stanicama nalazi na unutarnjoj strani plazmatske membrane, dok se tijekom apoptoze translocira na njezinu vanjsku površinu. Propidij jodid ulazi u stanice s oštećenom membranom i veže se za DNA, što omogućuje razlikovanje živih, apoptotičnih i mrtvih stanica. Na temelju kombinacije fluorescentnih signala razlikuju se četiri populacije: žive (aneksin V⁻/PI⁻), rano apoptotične (aneksin V⁺/PI⁻), kasno apoptotične (aneksin V⁺/PI⁺) i nekrotične stanice (aneksin V⁻/PI⁺) (124).

Za potrebe ovog eksperimenta, SH-SY5Y stanice nasađene su u prozirne pločice s 12 jažica (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka) u 900 μ L staničnog medija pri gustoći od 20.000 stanica/cm² i ostavljene preko noći u inkubatoru kako bi se zalijepile za podlogu. Sljedeći je dan pokrenuta diferencijacija, prema već opisanom protokolu, a po završetku iste, stanice su isprane PBS-om te je u jažice dodano 900 μ L staničnog medija. Neposredno prije tretmana napravljene su radne otopine (10x koncentrirane vodene otopine) te je po 100 μ L takve otopine dodanu u odgovarajuće jažice. Stanice su tretirane suspenzijama nanočestica kao i smjesama nanočestica i levodope. Konačne koncentracije tretmana prikazane su u Tablica 2. Netretirane stanice poslužile su kao negativna kontrola, 1 μ M staurosporin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) za pokretanje apoptoze u eksperimentu kompenzacije, a stanice inkubirane 10 min na 70 °C za izazivanje stanične smrti.

Ispitivanje preživljenja stanica i pokretanja apoptoze provedena je kompletom reagensa Annexin V-FITC Kit (kat. broj 130-092-052, Milteny, Bergisch Gladbach, Njemačka), prema uputama proizvođača. Ukratko, nakon 24-satne inkubacije, supernatanti su prikupljeni u

odgovarajuće epruvete, jažice su isprane s 200 μ L PBS-a, koji je potom spojen s već prikupljenim supernatantima. Zatim je u svaku jažicu dodano 200 μ L otopine tripsin-EDTA te su stanice inkubirane 5 minuta na 37 °C i 5 % CO₂. Nakon što su se stanice odlijepile, u svaku je jažicu dodano 400 μ L kompletnog kompletnog staničnog medija, sadržaj je promiješan automatskom pipetom i prenesen u odgovarajuće epruvete koje su potom centrifugirane 6 minuta na 800 g na centrifugi MegaFuge SRT Plus. Supernatant je potom uklonjen, a stanice su ponovno suspendirane u 1 mL pufera za vezanje (engl. *binding buffer*) i centrifugirane na pri istim uvjetima. Supernatant je uklonjen, a stanice ponovno suspendirane u 100 μ L pufera za vezanje uz dodatak 10 μ L aneksin V–FITC reagensa te inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon inkubacije, dodano je 800 μ L pufera za vezanje i uzorci su ponovno centrifugirani, a supernatant uklonjen. Stanice su ponovno suspendirane u 100 μ L pufera za vezanje te obojene s 5 μ L propidij jodida tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon bojenja, dodano je 800 μ L pufera za vezanje, uzorci su centrifugirani, supernatant uklonjen, a stanice ponovno suspendirane u 400 μ L pufera za vezanje. Analiza je provedena na uređaju Cytoflex SRT (Beckman Coulter, Brea, SAD). Fluorescencija boje FITC pobuđena je laserom valne duljine 488 nm i detektirana na detektoru s emisijskim filtrom 525/40, dok je fluorescencija propidij jodida pobuđena žuto-zelenim laserom valne duljine 561 nm te zabilježena na detektoru sa emisijskim filtrom 585/42. Dobiveni rezultati analizirani su u računalnom programu CytExpert.

3.5. Ispitivanje staničnog unosa i lokalizacije nanočestica

Unos nanočestica u diferencirane SH-SY5Y stanice procijenjen je na temelju podataka dobivenih protočnom citometrijom tijekom eksperimenta apoptoze i staničnog preživljenja. Budući da se u tim analizama istodobno mjeri i postranično raspršenje svjetlosti laserske zrake (*side scatter light*, SSC), SSC intenzitet korišten je kao pokazatelj unosa nanočestica. Kako je SSC proporcionalan unutarstaničnoj zrnatosti, a metalne nanočestice povećavaju zrnatost stanica, usporedbom medijana SSC intenziteta tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica određen je njihov relativni unos u stanice (125–127).

Budući da ovom metodom nije moguće razlikovati unos nanočestica od adsorpcije na staničnu membranu (128,129), provedena je i konfokalna mikroskopija. Zahvaljujući reflektirajućim svojstvima SeNP i AuNP, analiza na konfokalnom mikroskopu omogućila je kvalitativnu potvrdu njihova unosa u stanice (130).

Kao što je već spmenuto, lokalizacija AuNP i SeNP u diferenciranim SH-SY5Y stanicama provedena je konfokalnom mikroskopijom. Stanice su nasadene na sterilna pokrovna stakalca u pločicu s 12 jažica (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka) pri gustoći od 10.000 stanica/cm² i diferencirane prema prethodno opisanom postupku. Nakon diferencijacije stanice su tretirane suspenzijama Ad-AuNP-a i PGM-AuNP-a (10 mg Au/L) te Tween-SeNP-a i PVP-SeNP-a (1 mg Se/L). Kao što je već opisano, tretmani su pripremljeni kao 10 puta koncentrirane suspenzije u sterilnoj vodi i do konačne koncentracije razrijeđene izravno u jažicama u kompletnom staničnom mediju. Nakon 24 sata, tretmani su uklonjeni, a stanice isprane dvaput PBS-om kako bi se uklonile nanočestice koje su ostale slobodne u mediju. Stanice su potom fiksirane u 4 % (m/m) otopini paraformaldeihda tijekom 10 minuta, isprane dva puta PBS-om i inkubirane u puferu za permeabilizaciju (Tablica 5) tijekom 15 minuta. Stanice su isprane dvaput PBS-om i inkubirane u puferu za blokiranje (Tablica 5) tijekom 90 minuta na 25 °C. Nakon toga stanice su ponovno isprane PBS-om i inkubirane preko noći na 4 °C s mišjim monoklonskim primarnim protutijelom protiv β -tubulina (Tablica 6). Sljedeći su dan stanice triput isprane PBS-om i inkubirane sa sekundarnim protutijelom AlexaFluor® 488 protiv mišjeg IgG-a (Tablica 6) tijekom 2 sata na 37 °C. Potom su obojene faloidinom (Phalloidin-FITC, 1 μ g/mL; Sigma-Aldrich, Njemačka) tijekom 20 minuta, isprane PBS-om i inkubirane u boji Hoechst 33258 bojom (10 μ g/mL) tijekom 10 minuta. Nakon ispiranja PBS-om, pokrovna stakalca su uklopljena u Fluoroshieldu® mediju na predmetnim stakalcima, zabrtvljena prozirnim lakom i pohranjena na –20 °C. Snimanje je provedeno na konfokalnom mikroskopu Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems, Njemačka). Napravljene su serije fotografija duž z-osi (engl. *Z-stack*) kako bi se potvrdila lokalizacija nanočestica unutar stanica, a ne na površini pokrovnog stakalca ili membrane stanica. Fotografije snimljene na odvojenim kanalima spojene su u programu ImageJ (University of Wisconsin, Wisconsin, SAD).

3.6. Ispitivanje utjecaja na indukciju oksidativnog stresa i mitohondrijski membranski potencija i

Za procjenu utjecaja nanočestica, levodope te njihovih kombinacija na indukciju oksidativnog stresa i mitohondrijski membranski potencijal (MMP), korištene su četiri fluorescentne probe: 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH₂-DA) za kvantifikaciju vodikovog peroksida (H₂O₂) (131) , dihidroetidij (DHE) za kvantifikaciju superoksidnog aniona (O₂•⁻) (132), monoklorobiman (mBCL) za određivanje unutarstaničnog reduciranog glutationa (GSH) (133) te rodamin 123 (Rh123) za procjenu mitohondrijskog membranskog

potencijala (134). Za sve eksperimente stanice su nasadene u pločice s 96 jažica (Thermo Scientific, Waltham, SAD) pri gustoći od 12.500 stanica/cm². Za mBCL, DCFH2-DA i DHE korištene su potpuno crne pločice, a za Rh123 crne pločice s optičkim dnom. Nakon nasadivanja, pločice su inkubirane preko noći (37 °C, 5 % CO₂) radi prijanjanja stanica za podlogu, a potom je provedena diferencijacija kako je prethodno opisano. Nakon diferencijacije, stanice su isprane PBS-om te je u svaku jažicu dodano 90 µL kompletnog staničnog medija.

Nanočestice, kombinacije nanočestica s levodopom i sama levodopa pripremljene su 30 minuta prije tretiranja stanica (kako bi omogućili vezanje levodope za nanočestice) kao 10x koncentrirane vodene otopine i potom dodali 10 µL radne otopine u odgovarajuće jažice, nakon čega su stanice inkubirane tijekom 4 i 24 sata. Konačne koncentracije u jažicama prikazane su u Tablica 2. Kao pozitivna kontrola u svim eksperimentima korišten je 20 µM tBHP, a netretirane stanice služile su kao negativna kontrola. U eksperimentu Rh123 dodatno je korišten i CCCP kao pokazatelj depolarizacije mitohondrija. Slijepa proba (jažice bez stanica uz dodatak fluorescentne probe) korištena je u svim eksperimentima, izuzev Rh123 i oduzeta od izmjerenih vrijednosti prije normalizacije.

Nakon 4, odnosno 24 sata inkubacije, stanice su tripot isprane PBS-om te je u svaku jažicu dodano 100 µL odgovarajuće fluorescentne probe razrijeđene u PBS-u (koji je sadržavao Ca²⁺ i Mg²⁺). Konačne koncentracije iznosile su: Rh123 0,05 µM, mBCL 70 µM, DCFH2-DA 20 µM i DHE 30 µM. U svrhu smanjenja razgradnje i oksidacije fluorescentnih proba, ishodne otopine pripremljene su neposredno prije dodavanja u jažice te je cjelokupni postupak proveden u mraku. Nakon dodavanja proba, pločice su inkubirane 40 minuta (37 °C, 5 % CO₂, u mraku), a zatim je izmjerena fluorescencija na čitaču mikrotitarskih pločica Victor3 (Perkin Elmer, Waltham, SAD). U eksperimentu Rh123 mjerenje je provedeno odozdo (engl. *bottom read*), a u ostalim eksperimentima odozgo (engl. *top read*). Svaki test proveden je u tri neovisna eksperimenta, svaki u tehničkim triplicatima.

3.7. Oštećenje DNA

Oštećenje DNA nakon tretmana ispitano je primjenom protutijela specifičnog za γH2AX, fosforilirani oblik histona H2AX, koji nastaje unutar nekoliko sekundi od dvolančanog loma DNA. Fosforilirani H2AX sudjeluje u regrutiranju i vezanju proteina odgovornih za detekciju i popravak ovakvih oštećenja. Akumulacija γH2AX na mjestu loma širi se i do nekoliko

desetaka tisuća baza s obje strane oštećenja, stvarajući jasno vidljiva žarišta koja se mogu detektirati imunofluorescencijom ili protočnom citometrijom. Takva se žarišta smatraju specifičnim biljezima dvolančanih lomova DNA (135,136).

SH-SY5Y stanice su nasadene u prozirne pločice s 12 jažica (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka) pri gustoći od 12.500 stanica/cm² te su pločice ostavljene preko noći u inkubatoru kako bi se stanice zalijepile za podlogu. Sljedeći je dan pokrenuta diferencijacija prema već opisanom protokolu. Po završetku diferencijacije, stanice su tretirane nanočesticama, levodopom, te smjesom nanočestica i levodope. Konačne koncentracije u stanicama prikazane su u Tablica 2. 0,5 μ M doksorubicin (Pliva, Zagreb, Hrvatska) korišten je kao pozitivna kontrola, dok su netretirane stanice bile negativna kontrola.

Nakon 24-satne inkubacije, supernatanti su prikupljeni u odgovarajuće epruvete, jažice su isprane s 200 μ L PBS-a, koji je potom spojen s već prikupljenim supernatantima. Zatim je u svaku jažicu dodano 200 μ L otopine tripsin-EDTA te su stanice inkubirane 5 minuta na 37 °C i 5 % CO₂. Nakon što su se stanice odlijepile s podloge, u svaku je jažicu dodano 400 μ L kompletnog kompletnog staničnog medija, sadržaj promiješan automatskom pipetom i prenesen u odgovarajuće epruvete koje su potom centrifugirane 6 minuta na 800 g na MegaFuge STR4 centrifugi. Supernatant je uklonjen, a stanice su suspendirane u 300 μ L pufera za bojenje, koji je sadržavao 1 % (m/m) goveđeg albumina (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) i 2mM EDTA (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka) u PBS-u. Stanice su ponovno centrifugirane 6 minuta na 800 g, supernatant je uklonjen i stanice su fiksirane dodatkom 400 μ L 4 % (m/m) PFA uz inkubaciju 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ponovnog centrifugiranja pri već opisanim uvjetima, supernatant je odbačen i svaki je uzorak inkubiran u 500 μ L pufera za permeabilizaciju (Tablica 5) tijekom 10 minuta na 25 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant je uklonjen, stanice su ponovno suspendirane u 100 μ L pufera za bojanje, nakon čega je u svaki uzorak dodano 5 μ L Alexa Fluor 647 anti- γ H2AX protutijela (BD Biosciences, Franklin Lakes, SAD). Uzorci su inkubirani 60 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, u svaki uzorak dodano je 800 μ L pufera za bojenje, uzorci su centrifugirani 6 minuta na 800 g i supernatant je uklonjen. Konačno, stanice su suspendirane u 300 μ L pufera za bojanje, a uzorci su pohranjeni preko noći na 4 °C.

Tako pripremljene stanice analizirane su na protočnom citometru Attune NxT (Thermo Scientific, Waltham, SAD). Za pobuđivanje boje Alexa Fluor 647 korišten je crveni laser valne duljine 638nm, a emitirana fluorescencija zabilježena je na detektoru s emisijskim filterom

670/14. Sirovi podaci analizirani su u programu FlowJo (FlowJo LLC, SAD). Eksperiment je proveden u dva biološka ponavljanja, svaki u tehničkim duplikatima.

3.8. Ispitivanje protektivnih učinaka nanočestica primjenom 6-hidroksidopamina

Ispitivanje potencijalnih protektivnih učinaka nanočestica provedeno je na istom staničnom modelu kao i eksperimenti toksičnosti uz primjenu 6-OHDA kao neurotoksina za modeliranje Parkinsonove bolesti. Ovaj je toksin korišten jer, kao što je već opisano, reproducira neke od ključnih patoloških procesa Parkinsonove bolesti.

3.8.1. Protočna citometrija

SH-SY5Y stanice nasadene su u prozirne pločice s 12 jažica (Sarstedt, Njemačka) pri gustoći od 12.500 stanica/cm². Nakon inkubacije preko noći na 37 °C i 5 % CO₂ provedena je diferencijacija prema prethodno opisanom protokolu. Po završetku diferencijacije, stanice su isprane PBS-om, a u svaku jažicu dodano je 900 µL kompletnog staničnog medija. Tretmani nanočestica, levodope i njihovih kombinacija pripremljeni su 30 minuta prije dodavanja u jažice, kao 10× koncentrirane vodene otopine. U svaku jažicu dodano je 100 µL pripremljenog tretmana. Tretmani su izvedeni u duplikatu, pri čemu je ploča podijeljena na dva simetrična dijela (lijevi i desni), s identičnim tretmanima. Konačne koncentracije korištene u eksperimentu prikazane su u Tablica 2. Pločice su inkubirane 16 sati na 37 °C i 5 % CO₂.

Nakon inkubacije, stanice su triput isprane PBS-om te je u jažice dodano 900 µL kompletnog staničnog medija. Otopina 6-OHDA pripremljena je neposredno prije uporabe kao 10× koncentrirana vodena otopina. U lijevi dio pločice dodano je 100 µL ultračiste vode, a u desni dio 100 µL radne otopine 6-OHDA, čime je u jažicama postignuta konačna koncentracija od 56,3 µmol/L, što odgovara IC₅₀ vrijednosti izračunatoj na temelju MTS testa. Negativnu kontrolu činile su netretirane stanice (uz dodatak već spomenute vode). Nakon 24-satne inkubacije proveden je Annexin V-FITC/PI test (Miltenyi Biotec, Njemačka) prema ranije opisanom postupku. Provedena su tri neovisna eksperimenta, svaki u tehničkim duplikatima.

3.8.2. Oksidativni stres i mitohondrijski membranski potencijal

SH-SY5Y stanice nasadene su u crne pločice s 96 jažica pri gustoći od 12.500 stanica/cm². Nakon inkubacije preko noći (37 °C, 5 % CO₂) radi prijanjanja stanica na podlogu, provedena je diferencijacija prema ranije opisanom protokolu. Stanice su potom isprane PBS-om, a u svaku jažicu dodano je 90 µL kompletnog staničnog medija. Tretmani su pripremljeni

i dodani na isti način kao u eksperimentu protočne citometrije — ploča je podijeljena na dva simetrična dijela s identičnim tretmanima, a priprema radnih otopina provedena je na isti način. Nakon dodavanja tretmana, ploče su inkubirane 16 sati na 37 °C i 5 % CO₂.

Po završetku inkubacije, tretmani su uklonjeni, stanice su tripot isprane PBS-om, a u jažice je dodano 90 µL svježeg kompletnog medija. Otopina 6-OHDA pripremljena je prema gore opisanom postupku kao 10× koncentrirana otopina u ultračistoj vodi. U lijevu stranu ploče dodano je 10 µL ultračiste vode, a u desnu 10 µL radne otopine 6-OHDA, čime je postignuta 40 µmol/L koncentracija 6-OHDA u jažicama, što je ispod IC₂₀ vrijednosti određene na temelju MTS testa. Nakon četverosatne inkubacije tretman je uklonjen, a provedeni su DHE, Rh123 i mBCL testovi prema ranije opisanom protokolu. Eksperiment je proveden u dva neovisna ponavljanja, svaki u tehničkim triplikatima.

3.9. Statistička obrada rezultata

Rezultati dobiveni TEM-om, DLS-om i ELS-om te rezultati vezanja i otpuštanja levodope, izraženi su kao srednje vrijednosti uz standardna devijaciju, a prikazani su grafički i tabelarno.

U analizi rezultata Rh123, mBCL, DHE, DCFH₂-DA i MTS testova prvo je izračunata relativna promjena sirovih vrijednosti fluorescencije ili apsorbancije prema kontrolnim stanicama, za svaki pojedini uzorak i ponovljeni eksperiment, prema sljedećoj jednadžbi:

$$rel. promjena (\%) = \frac{\bar{x}_u - \bar{x}_{sp}}{\bar{x}_k - \bar{x}_{sp}} \times 100$$

gdje su:

$\bar{x}_u$ – aritmetička sredina apsorbancije/fluorescencije tehničkih replikata u uzorku

$\bar{x}_{sp}$ – aritmetička sredina apsorbancije/fluorescencije tehničkih replikata u slijepoj probi

$\bar{x}_k$ – aritmetička sredina apsorbancije/fluorescencije tehničkih replikata u kontrolnim stanicama
pri čemu za Rh 123 eksperiment vrijedi:

$$\bar{x}_{sp} = 0.$$

Potom je izračunata aritmetička sredina i standardna devijacija relativnih promjena iz triju neovisnih pokusa provedenih u triplikatima.

Rezultati eksperimenta aneksin V/PI, provedenog na protočnom citometru, prikazani su kao postoci živih, mrtvih, rano i kasno apoptotičnih stanica, od ukupnog broja analiziranih stanica

u uzorku, pri čemu su iz analize isključene nakupine stanica (dubleti, tripleti itd.) te nanočestice i dijelovi rapadnutih stanica (Slika P5). Iz tri neovisno ponovljena eksperimenta u tehničkim duplikatima, izračunata je aritmetička sredina i standardna devijacija udjela živih, mrtvih i apoptotičnih stanica za svaki pojedini tretman. Za analizu oštećenja DNA izmjeren je postotak γ H2AX pozitivnih stanica (Slika P6) i izračunata je aritmetička sredina i standardna devijacija za svaki pojedini tretman, iz dva neovisna eksperimenta u tehničkim duplikatima.

Rezultati unosa nanočestica u stanice izračunati su na temelju aneksin V/PI pokusa iz medijana intenziteta postranično raspršenog svijetla živih stanica. Vrijednosti tehničkih triplikata prvo su normalizirane na vrijednosti kontrolnih stanica, za svaki pojedini uzorak, a potom je izračunata aritmetička sredina i standardna devijacija relativnih promjena iz dvaju neovisnih pokusa provedenih u duplikatima.

Promjene ekspresije gena između diferenciranih i nediferenciranih SH-SY5Y stanica izračunate su metodom prema Vandesompeleu (122) koristeći dva referentna gena i učinkovitosti umnažanja dobivenih iz standardnih krivulja (**Error! Reference source not found.**). Račun je proveden na sljedeći način:

Izračunata je ΔC_q vrijednost za svaki gen i uzorak:

$$\Delta C_q = C_{q_{uzorak}} - C_{q_{kalibrator}}$$

Pri čemu je $C_{q_{uzorak}}$ ciklus kvantifikacije za pojedini gen u uzorku diferenciranih stanica, a $C_{q_{kalibrator}}$ ciklus kvantifikacije za pojedini gen u uzorku nediferenciranih stanica (kalibrator).

Nakon toga je izračunata relativna kvantifikacija (engl. *relative quantification*, RQ) za svaki gen i za svaki uzorak:

$$RQ = E^{-\Delta C_q}$$

pri čemu je učinkovitost umnažanja za svaki par početnica (engl. *amplification efficiency*, E) dobivena iz standardne krivulje (vidi **Error! Reference source not found.**).

Nakon toga je izračunat normalizacijski faktor (NF), odnosno geometrijski srednja vrijednost RQ vrijednosti referentnih gena:

$$NF = \sqrt{(RQ_{ACTB} \times RQ_{GAPDH})}$$

Konačno, relativna ekspresija gena izračunata je za svaki pojedini gen prema jednadžbi:

$$rel.ekspresija\ gena = \frac{RQ_{gen}}{NF}$$

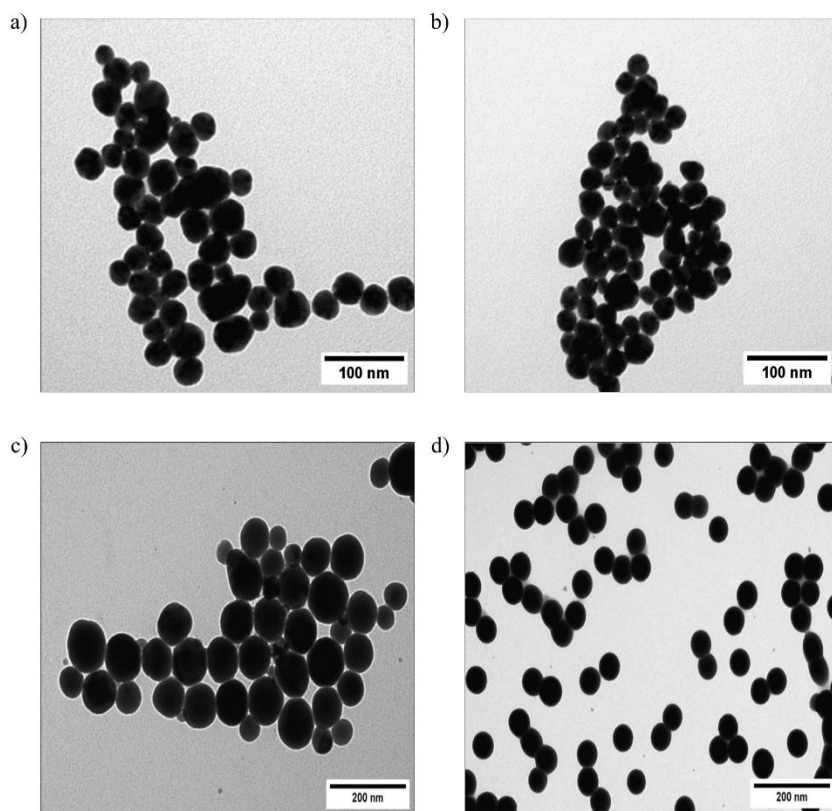
Rezultati analize ekspresije gena pretvoreni su u $\log_2$ vrijednosti kako bi se postigla normalna distribucija, a potom je provedena statistička analiza kako je opisano ispod. Rezultati su prikazani kao geometrijska sredina uz geometrijsku standardnu devijaciju relativnih promjena ekspresije gena, iz triju neovisno ponovljenih pokusa, u triplikatima. Os ordinata prikazana je u $\log_2$ skali.

Svi ostali rezultati u radu prikazani su kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju, a statistička analiza provedena je u programu GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, SAD). Statistička značajnost procijenjena je jednosmjernom analizom varijance (ANOVA), uz usporedbu parova Tukeyjevim post-hoc test, a za usporedbu s negativnom kontrolom Dunnettovim testom. Razlike su smatrane statistički značajnima pri $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Fizikalno-kemijska karakterizacija nanočestica

Primarna veličina (d_{TEM}) i oblik nanočestica određeni su transmisijском elektrоnskom mikroskopijom na temelju mjerenja najmanje 100 pojedinačnih nanočestica. Sve ispitivane nanočestice imale su relativno homogen, sferični oblik (Slika 1). Ad-AuNP i PGM-AuNP bile su usporedive veličine, s prosječnim promjerom od približno 24 nm, dok su PVP-SeNP i Tween-SeNP pokazale veće razlike: prosječna veličina PVP-SeNP iznosila je oko 84 nm, a Tween-SeNP oko 53 nm (Tablica 7). Ove razlike među nanočesticama selena vjerojatno proizlaze iz sitnih varijacija u postupku sinteze, koje utječu na kinetiku nukleacije i rasta čestica.



Slika 1. Slike a) Ad-AuNP, b) PGM-AuNP, c) PVP-SeNP, d) Tween-SeNP, dobivene transmisijском elektrоnskom mikroskopijom (TEM) u ultračistoј vodi.

Tablica 7. Fizikalno-kemijske karakteristike PGM-AuNP, Ad-AuNP, PVP-SeNP i Tween-SeNP. Primarna veličina nanočestica određena je na temelju fotografija nanočestica dobivenih TEM-om. Hidrodinamički promjer (d_H) i indeks polidisperznosti (PDI) određeni su metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti, dok je ζ potencijal izmjeren ELS-om. Mjerenja su provedena u ultračistoј vodi te u potpunom staničnom mediju neposredno nakon inkubacije (0 h), nakon

4 sata i nakon 24 sata. Koncentracije nanočestica iznosile su 10 mg metala/L. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost uz standardnu devijaciju.

d_{TEM} (nm)		d_{H} (nm)		ζ potencijal (mV)	PDI	
Ad-AuNP	$24,2 \pm 2,9$	Ultračista voda		$85,6 \pm 3,3$	$-29,3 \pm 3,8$	0,22
		Stanični medij	0h	$111,4 \pm 0,2$	$-11,2 \pm 3,9$	0,24
			4h	$124,6 \pm 0,4$	$-15,1 \pm 2,7$	0,25
			24h	$125,1 \pm 0,5$	$-13,3 \pm 2,2$	0,26
PGM-AuNP	$24,9 \pm 3,4$	Ultračista voda		$79,3 \pm 3,7$	$-31,2 \pm 1,4$	0,24
		Stanični medij	0h	$74,1 \pm 0,9$	$-9,5 \pm 1,6$	0,32
			4h	$81,9 \pm 8,4$	$-11,6 \pm 4,5$	0,34
			24h	$97,1 \pm 9,5$	$-13,6 \pm 3,0$	0,34
PVP-SeNPs	$83,9 \pm 8,0$	Ultračista voda		$86,6 \pm 0,7$	$-47,4 \pm 0,6$	0,02
		Stanični medij	0 h	$132,8 \pm 1,3$	$-7,7 \pm 1,5$	0,15
			4 sata	$133,8 \pm 3,2$	$-8,1 \pm 2,4$	0,13
			24 sata	$136,7 \pm 3,3$	$-8,5 \pm 0,6$	0,16
Tween-SeNPs	$52,9 \pm 2,7$	Ultračista voda		$63,1 \pm 0,4$	$-46,1 \pm 1,7$	0,02
		Stanični medij	0 h	$122,9 \pm 2,4$	$-11,7 \pm 1,1$	0,12
			4 sata	$138,4 \pm 5,2$	$-13,8 \pm 2,1$	0,14
			24 sata	$144,3 \pm 1,1$	$-14,1 \pm 1,4$	0,14

U ultračistoj vodi, hidrodinamički promjer svih nanočestica bio je veći od primarnog promjera određenog TEM-om. Takav nesrazmjer je očekivan jer vrijednosti dobivene DLS-om često nije moguće izravno uspoređivati s onima određenima drugim tehnikama, osim u iznimnim slučajevima savršeno sferičnih nanočestica s vrlo uskom raspodjelom veličina (137). Nadalje, hidrodinamički promjer izmjeren DLS-om temelji se na analizi raspršene svjetlosti, pri čemu veće čestice neproporcionalno više doprinose ukupnom signalu od manjih nanočestica pa i vrlo mali udio aglomerata može rezultirati pomakom izmjerenog hidrodinamičkog promjera prema znatno većim vrijednostima (138,139). Konačno, DLS mjerenja izuzev

anorganske jezgre obuhvaćaju i dodatne slojeve koji okružuju nanočesticu, poput stabilizatora i hidratacijskog omotača, što također može veličinu dispergiranih nanočestica (140–142).

PDI vrijednosti za SeNP iznosile su 0,02 što upućuje na monodisperzni sustav, dok su AuNP imale širu raspodjelu veličina uz vrijednosti oko 0,2. PDI je pokazatelj raspodjele veličine čestica unutar uzorka, pri čemu je vrijednosti 0,0 označava uniforman uzorak, a vrijednost 1,0 visoko polidisperzan sustav (143). Ipak, u literaturi stoji kako su vrijednosti PDI-a $< 0,3$ prihvatljive za farmaceutsku i biomedicinsku primjenu nanočestica (144).

ζ-potencijal u ultračistoj vodi iznosio je oko - 30 mV za AuNP, odnosno - 47mV za SeNP. Vrijednosti ζ-potencijala u rasponu od ± 30 do ± 40 mV obično se smatraju granicom umjerene stabilnosti nanočestica, dok veće apsolutne vrijednosti ukazuju na snažne odbojne sile i smanjenu sklonost aglomeraciji (145).

Neposredno nakon dispergiranja nanočestica u potpunom staničnom mediju (0h), došlo je do porasta hidrodinamičkog promjera kod Ad-AuNP-a (111,4 nm), PVP-SeNP-a (132,8 nm) i Tween-SeNP-a (122,9 nm), dok je vrijednost bila nešto manja, u odnosu na ultračistu vodu, za PGM-AuNP (74,1 nm vs 79,3 nm; Tablica 7). Nadalje, došlo je i do porasta PDI vrijednosti, ali su one bile ispod ranije spomenute vrijednosti od 0,3 (Tablica 7). Nakon 4 i 24 sata u staničnom mediju, uočen je rast hidrodinamičkog promjera za PGM-AuNP (81,9 → 97,1 nm) i Tween-SeNP (138, 4 → 144,3 nm). Kod Ad-AuNP, promjer je porastao nakon 4 sata na 124,6 nm te se nije značajno mijenjao nakon toga, dok su vrijednosti za PVP-SeNP bile stabilne u ispitivanom vremenu i iznosile oko 133 nm (Tablica 7). Nakon početnog porasta, PDI vrijednosti nanočestica nisu značajno mijenjale.

Povećanje hidrodinamičkog promjera u potpunom staničnom mediju vjerojatno je posljedica stvaranja proteinske korone (146), a u mnogo manjoj mjeri i aglomeracije nanočestica. Na to upućuje blagi porast hidrodinamičkog promjera tijekom inkubacije, uz relativno niske PDI vrijednosti i monomodalnu raspodjelu veličina. Nadalje, izmjereni ζ-potencijal bio je usporediv s vrijednostima izmjerenima za kompletni stanični medij ($-9,9 \pm 2,1$ mV) što je u skladu s prethodnim opažanjima da stvaranje proteinske korone mijenja površinska svojstva nanočestica u smjeru dominantnih proteina u mediju (147,148).

Kompletnom staničnom mediju dodan je FBS kao suplement i glavni izvor proteina, pri čemu je albumin njegov najzastupljeniji sastojak (149). Istraživanja pokazuju da upravo albumin čini velik udio u proteinskoj koroni nastaloj u mediju koji sadrži FBS (150), a poznato

je i da se koristi u protokolima za dispergiranje nanočestica zbog svoje uloge u stabilizaciji suspenzija. Stoga je razumno pretpostaviti da je u ovom slučaju proteinska korona, bogata albuminom, osigurala steričku stabilizaciju nanočestica unatoč padu ζ -potencijala ispod vrijednosti koje se inače smatraju dostatnima za elektrostatsku stabilizaciju (151,152).

Stabilnost disperzije nanočestica nužna je za točnost bioloških rezultata jer korištenje agregiranih ili aglomeriranih nanočestica mijenja prirodu njihove interakcije s biološkim sustavima i dovodi do pogrešnih zaključaka (140,153). Upravo zbog toga, vremena inkubacije u potpunom staničnom mediju (0 h, 4 sata i 24 sata), odabrana su kako bi oponašala uvjete u kojima se nanočestice nalaze tijekom staničnih eksperimenata, čime se osigurava da podaci o stabilnosti odgovaraju stvarnim uvjetima ispitivanja. Ovakav pristup omogućuje pouzdano povezivanje fizikalno-kemijskih svojstava nanočestica s njihovim biološkim učincima.

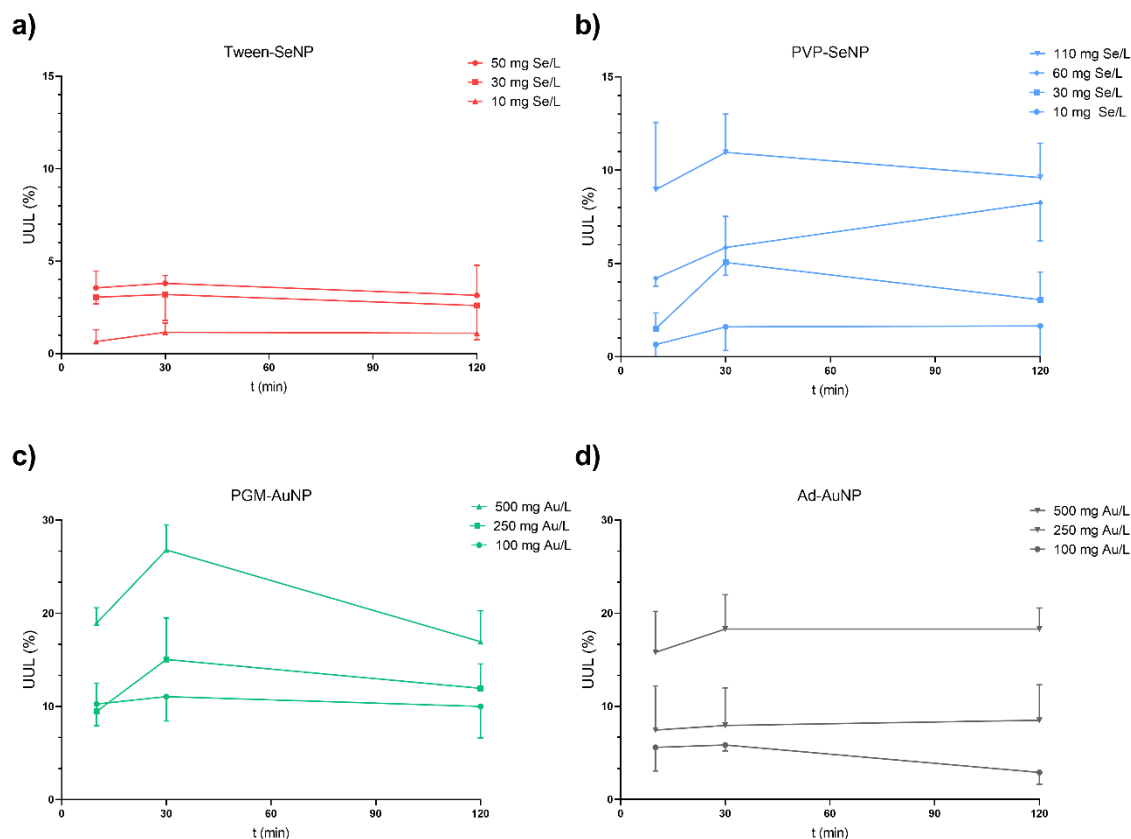
4.2. Učinkovitost vezanja levodope na površinu nanočestica

Kapacitet vezanja levodope ispitan je inkubacijom s nanočesticama, nakon čega je nevezani lijek odvojen ultrafiltracijom. Količina nevezane levodope određena je u filtratu spektrofotometrijski, a učinkovitost uklapanja lijeka (UUL, %) izračunata je iz razlike ukupne i nevezane količine lijeka.

Rezultati su pokazali kako sve ispitane nanočestice vežu određenu količinu levodope, ali uz izražene razlike među njima (Slika 2). Kapacitet vezanja bio je najveći pri najvišim koncentracijama nanočestica, što je očekivano jer veća koncentracija znači veću ukupnu površinu na koju se levodope može vezati. Vezanje levodope odvijalo se vrlo brzo, već nakon 10 minuta inkubacije. Udio vezane levodope zatim je nastavio rasti pri čemu su najveće vrijednosti UUL-a zabilježene već nakon 30 minuta i nisu se značajno mijenjale nakon 120 minuta, što ukazuje da je uspostavljena termodinamička ravnoteža. Takvi su rezultati u skladu s prirodom vezanja levodope koja se temelji na nekovalentnim, elektrostatskim interakcijama i vodikovim vezama (64,113).

AuNP su pokazale veći kapacitet vezanja nego SeNP, ali izravne usporedbe nemaju previše smisla jer UUL nije u linearnom odnosu s koncentracijom nanočestica. Nadalje, različite koncentracije, uz različitu primarnu veličinu podrazumijevaju i drugačije specifične površine, što značajno utječe na izračunate UUL vrijednosti. Među nanočesticama zlata, PGM-AuNP su bile učinkovitije u vezanju levodope od Ad-AuNP, dok su kod nanočestica selena PVP-SeNP bile učinkovitije od Tween-SeNP-a, što je u skladu s prethodno određenim konstantama vezanja levodope (64,113).

Najveće izmjerene UUL vrijednosti pri najvećim koncentracijama nanočestica iznosile su 3,8 % za Tween-SeNP, 11,0 % za PVP-SeNP, 18,3 % za Ad-AuNP te 26,8 % za PGM-AuNP. Budući da je najveće vezanje postignuto nakon 30 minuta, to je vrijeme inkubacije korišteno u svim daljnjim pokusima za pripremu smjesa nanočestica i levodope.



Slika 2. Učinkovitost uklapanja levodope (UUL, engl. *drug loading efficiency*) u različite vrste nanočestica: a) Tween-SeNP, b) PVP-SeNP, c) PGM-AuNP i d) Ad-AuNP. Koncentracija levodope u svakom uzorku bila je konstantna (500 μ M). Svaka točka na krivulji predstavlja aritmetičku sredinu dvaju neovisno ponovljenih eksperimenata uz standardnu devijaciju.

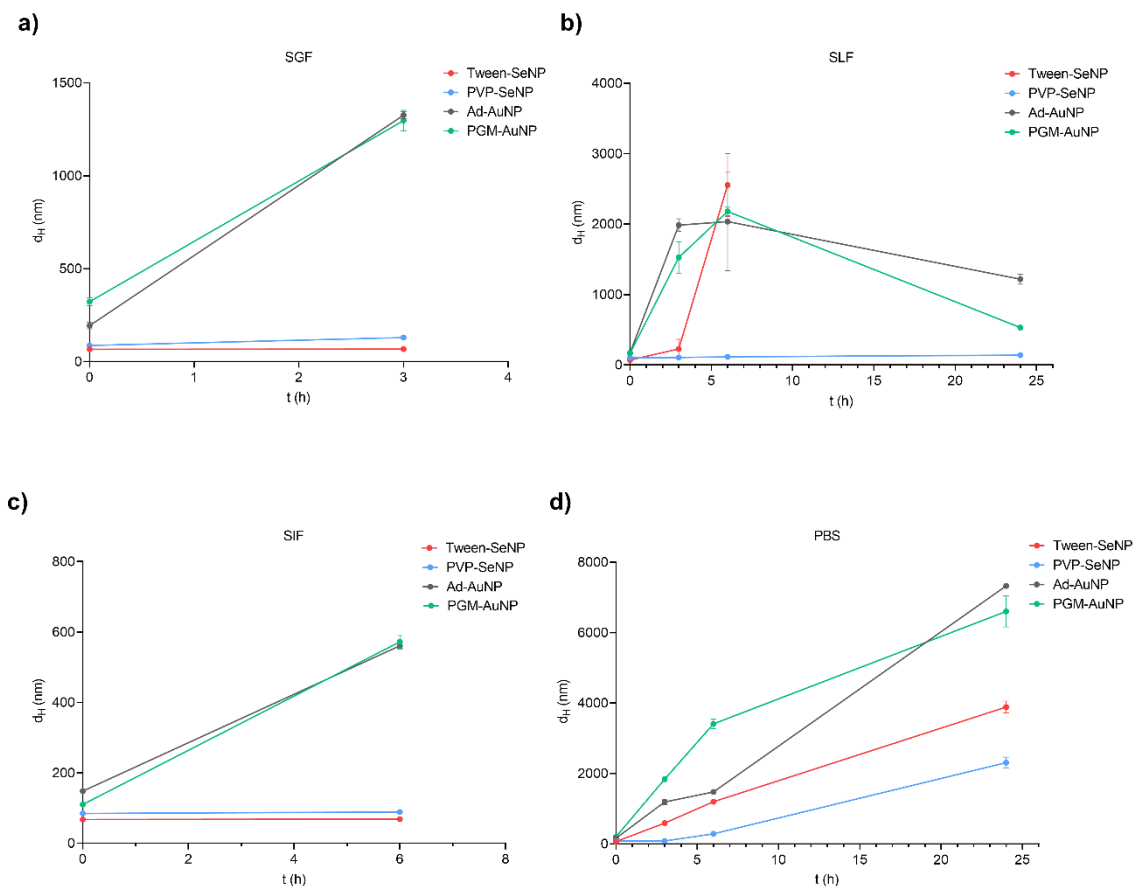
4.3. Stabilnost smjesa nanočestica i levodope u biološki relevantnim medijima

Stabilnost smjesa nanočestica i levodope ispitana je DLS-om u uvjetima koji simuliraju različita fiziološka okruženja: želučano (AGF), intestinalno (AIF), lizosomalno (ALF) i izvanstanično (PBS). U ispitivanju su korištene smjese kod kojih je uklapanje levodope bilo najveće. Cilj ovog ispitivanja bio je procijeniti utjecaj pH i ionske jakosti na hidrodinamički promjer nanočestica te time steći uvid u njihovu stabilnost u navedenim medijima. Ovi su

podaci važni s aspekta oralne primjene nanočestica kao nosača lijekova te za interpretaciju rezultata otpuštanja levodope, koji su provedeni u istim uvjetima.

Hidrodinamički promjer AuNP neposredno nakon dispergiranja u SGF-u iznosio je 322,7 nm za PGM-AuNP i 193,7 za Ad-AuNP, uz relativno niske PDI vrijednosti od 0,30 odnosno 0,21 (Slika 3a). Nakon 3h, promjer nanočestica značajno je narastao i dosegao vrijednosti u mikrometarskom rasponu uz istodobni porast PDI-a na 0,54 i 0,82. Nasuprot tome, promjer Tween-SeNP-a nije se značajno mijenjao u ispitivanom vremenu i iznosio je ~70 nm, dok su PVP-SeNP pokazale umjeren porast hidrodinamičkog promjera nakon trosatne inkubacije, s ~87,4 na 129,7 nm. U oba slučaja PDI vrijednosti bile su niske i kretale su se između 0,06 i 0,21.

Stabilnost u SLF-u ispitana je neposredno nakon dispergiranja nanočestica te nakon inkubacije u trajanju od 3, 6 i 24 sata (Slika 3b). Po dispergiranju, hidrodinamički promjer Tween-SeNP iznosio je 71,0 nm uz PDI vrijednost od 0,12 te je porastao na 227,9 nm nakon 3 sata i premašio vrijednosti od 1 μ m već nakon 6 h inkubacije, uz maksimalnu PDI vrijednost. Nakon 24 sata, hidrodinamički promjer nije bilo moguće odrediti. U slučaju PVP-SeNP vrijednosti hidrodinamičkog promjera blago su porasle unutar razdoblja od 24 sata, s početnih 103,3 na 139,6 nm nakon 24 sata, uz niske PDI vrijednosti od 0,05. Kod PGM-AuNP-a zabilježen je kontinuiran porast hidrodinamičkog promjera s početnih 167,6 nm, koji je već nakon 3 h premašio 1 μ m, uz gotovo maksimalne vrijednosti PDI-a. Nakon 24 sata promjer se smanjio na 531,1 nm, dok je PDI iznosio 0,46. Sličan trend uočen je i kod Ad-AuNP-a: početni promjer od 173,4 nm povećao se na 2037 nm nakon 6 h (PDI = 1,0), a nakon 24 sata smanjio se na 1218 nm uz PDI vrijednost 0,87. Uočen pad hidrodinamičkog promjera može biti posljedica taloženja većih agregata nanočestica.



Slika 3. Stabilnost smjesa nanočestica i levodope u biološki relevantnim medijima. Prikazana je promjena hidrodinamičkog promjera (d_H) za Ad-AuNP, PGM-AuNP, PVP-SeNPs i Tween-SeNP tijekom inkubacije u: umjetnoj želučanoj tekućini (SIF), umjetnoj lizosomalnoj tekućini (SLF), umjetnoj intestinalnoj tekućini (SIF) i fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom (PBS). Svaka točka na krivulji predstavlja srednju vrijednost dvaju neovisno ponovljenih eksperimenata uz standardnu devijaciju.

Stabilnost u SIF-u procijenjena je neposredno nakon dispergiranja nanočestica i nakon 6 sati inkubacije (Slika 3c). Kod Tween-SeNP-a i PVP-SeNP vrijednosti hidrodinamičkog promjera bile su relativno stabilne (67,5 → 68,6 nm i 84,8 → 88,9 nm) uz PDI vrijednosti između 0,10 i 0,22 za Tween-SeNP, odnosno oko 0,05 za PVP-SeNP. Suprotno tome, AuNP su pokazale izrazitu nestabilnost: hidrodinamički promjer PGM-AuNP-a porastao je s 110,2 na 572,1 nm, a Ad-AuNP s 148,1 na 561,2 nm, uz porast PDI vrijednosti na približno 0,55.

U PBS-u je stabilnost ispitana odmah po dispergiranju nanočestica te nakon 3, 6 i 24 sata (Slika 3d). Tween-SeNP pokazale su nagli porast hidrodinamičkog promjera već nakon 3 sata, s početnih 67,7 nm na 592,0. Nakon 6 sati vrijednosti su premašile 1 μm , uz daljnji porast

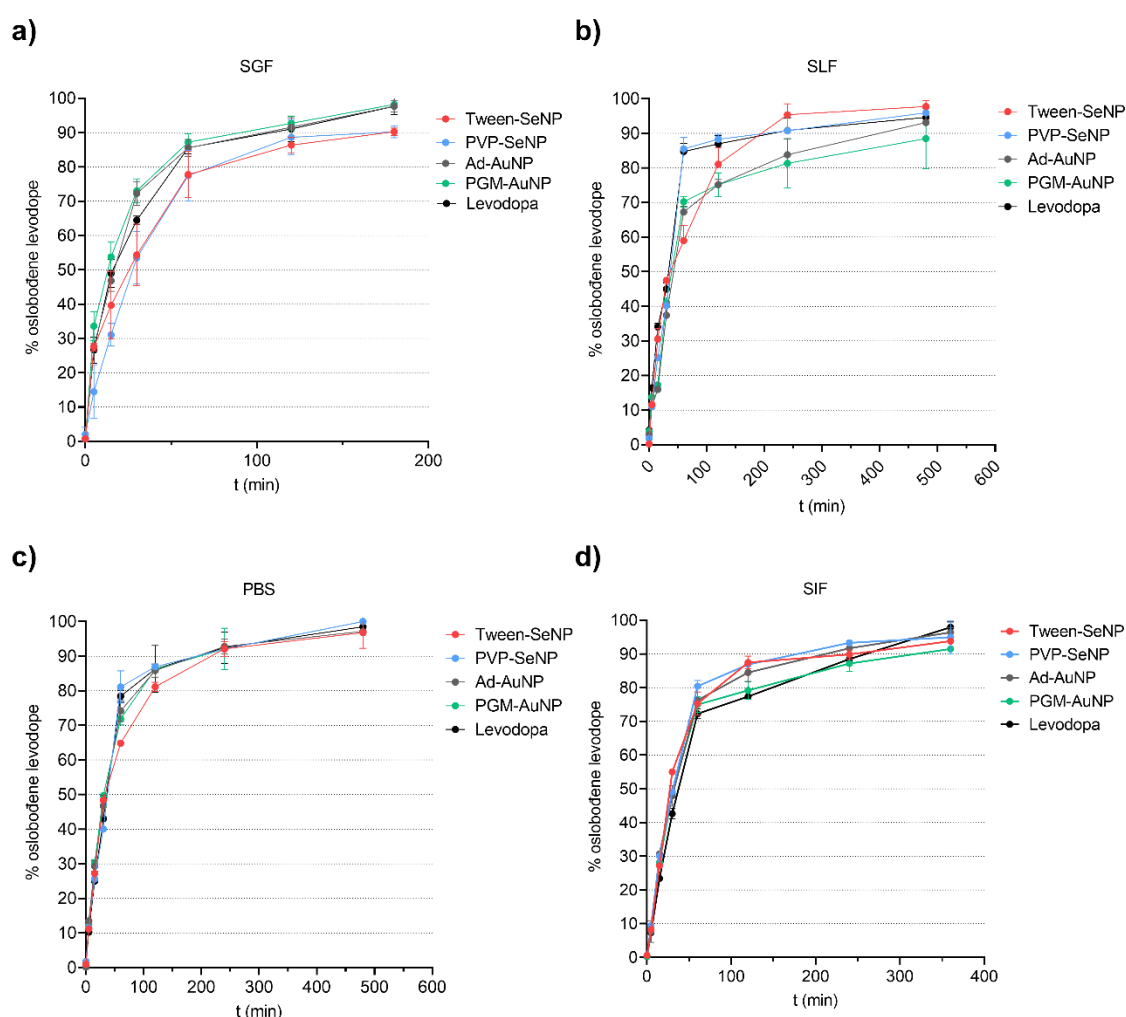
PDI-a do maksimalne vrijednosti. Kod PVP-SeNP-a početne vrijednosti hidrodinamičkog promjera i PDI-a bile su stabilne (85 nm i 0,05), ali su porasle do 285,9 nm (0,31) nakon 6 h i 2308 nm (1,0) nakon 24 sata. AuNP su bile izrazito nestabilne: početne vrijednosti hidrodinamičkog promjera dosegle su mikrometerske vrijednosti već nakon 3 sata inkubacije te su kontinuirano rasle tijekom 24-satne inkubacije uz maksimalne PDI vrijednosti.

Kod visokih PDI vrijednosti ($> 0,3$), kao što je zabilježeno u nekim analiziranim uzorcima, izmjereni hidrodinamički promjeri ne predstavljaju pouzdane ili realne vrijednosti veličine nanočestica, zbog izrazite heterogenosti sustava (139). Ipak, praćenje promjena hidrodinamičkog promjera i PDI vrijednosti tijekom vremena, pod nepromijenjenim uvjetima, može poslužiti kao pouzdan pokazatelj stabilnosti nanosuspenzija (154,155). Dobiveni DLS rezultati jasno ukazuju na razlike u ponašanju ispitanih smjesa nanočestica i levodope u biološki relevantnim medijima. Obje vrste AuNP bile su nestabilne u svim ispitanim medijima, što je potkrepljeno kontinuiranim rastom hidrodinamičkog promjera i vrlo visokim PDI vrijednostima. Nasuprot tome, SeNP su pokazale su znatno bolja svojstva: PVP-SeNP bile su stabilne u SGF-u, SLF-u i SIF-u, a Tween-SeNP u SGF-u i SIF-u.

Razlike u stabilnosti mogu se objasniti vrstom stabilizatora korištenog u sintezi. AuNP su obložene su relativno malim molekulama i njihova se stabilnost primarno temelji na elektrostatskim odbojnim silama, dok su SeNP obložene velikim polimerima koji pružaju i steričku stabilizaciju (156). Nakon dispergiranja u vodenim otopinama oko nanočestica se stvara električni dvosloj, a potencijal na razini plohe smicanja (engl. *slipping plane*) predstavlja ζ -potencijal (157). Debljina električnog dvosloja i vrijednost ζ -potencijala određuju jačinu odbojnih sila između nanočestica – porastom bilo kojeg parametra raste i jakost odbojnih sila i time stabilnost suspenzije (158,159). U uvjetima povećane ionske jakosti dolazi do kompresije električnog dvosloja i smanjenja ζ -potencijala, što smanjuje jakost odbojnih sila, omogućava približavanje nanočestica i njihovu aglomeraciju (140). Sve navedeno upućuje na nedostatak steričke stabilizacije AuNP kao glavnog uzroka nestabilnosti u usporedbi s nanočesticama selena. Važno je istaknuti da su u potpunom staničnom mediju sve ispitane nanočestice pokazale dobru stabilnost unatoč velikoj ionskoj jakosti (Tablica 7), što se može objasniti prisutnošću proteinske korone, kao što je već ranije opisano.

4.4. Profil oslobađanja levodope s površine nanočestica

Kako bi se procijenila primjenjivost AuNP i SeNP kao nosača levodope, provedena su *in vitro* ispitivanja oslobađanja lijeka. Budući da brzina i opseg oslobađanja izravno utječu na terapijsku učinkovitost i sigurnost, cilj ovih eksperimenata bio je ispitati kinetiku oslobađanja levodope s površine nanočestica u različitim fiziološki relevantnim uvjetima. Odabrani mediji oponašali su okruženja kojima bi nanočestice bile izložene nakon oralne primjene, odnosno gastrointestinalni (SGF i SIF), lizosomalni (SLF) i izvanstanični prostor (PBS). Ispitane su kombinacije nanočestica i levodope kod kojih je uklapanje lijeka bilo najbolje (Slika 2). Rezultati su prikazani kao kumulativno oslobađanje lijeka tijekom vremena.



Slika 4. Profili oslobađanja levodope s površine nanočestica u umjetnoj želučanoj tekućini (SGF), lizosomalnoj tekućini (SLF), crijevnoj tekućini (SIF) i fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom (PBS). Rezultati su dobiveni iz dva neovisno provedena eksperimenta i prikazani kao postotak oslobođene levodope u odnosu na ukupnu količinu levodope u sustavu.

Profili oslobađanja levodope u svim ispitivanim medijima pokazali su obrazac vrlo sličan onome čiste otopine levodope: naglo početno oslobađanje (engl. *burst release*) tijekom prvog sata, nakon čega je oslobađanje usporilo i postupno dostiglo plato s više od 90% oslobođenog lijeka (Slika 3). Takvo oslobađanje lijeka karakteristično je za nanoformulacije u kojima je lijek nekovalentnim interakcijama adsorbiran na površinu nanočestice (160–162).

Razlike u profilima oslobađanja između formulacija bile su minimalne. U SGF-u oslobađanje levodope bilo je nešto sporije u SeNP uzorcima, dok je u SLF-u otpuštanje bilo nešto sporije u AuNP uzorcima. Oslobađanje je bilo najbrže u SGF-u, gdje je već nakon približno 100 minuta oslobođeno gotovo 90 % levodope.

Sveukupno, rezultati su pokazali kako nanočestice nisu utjecale na kinetiku oslobađanja levodope, što znači da u vjerojatno ne bi imale utjecaja na njezina farmakokinetička svojstva. Jedno od mogućih objašnjenja za izostanak produljenog oslobađanja je relativno nizak kapacitet vezanja levodope na površinu nanočestica selena (Slika 2). Nadalje, vezanje levodope na površinu nanočestice temeljeno je na fizičkoj adsorpciji i nekovalentnim interakcijama pa promjene pH i povećana ionska jakost u korištenim medijima mogu doprinijeti brznoj desorpciji levodope (163). Poseban problem uočen je kod AuNP, koje su bile nestabilne u svim ispitivanim medijima (Slika 3). Unatoč tome što su pokazale visok UUL, izostanak produljenog oslobađanja sugerira kako uz već navedena objašnjenja, nestabilnost nanočestice ima važnu ulogu. Sve opisano ograničava primjenu ovih nanočestica kao nosača levodope te naglašava potrebu za daljnjom optimizacijom formulacija, osobito u smjeru povećanja stabilnosti i učinkovitijeg uklapanja lijeka.

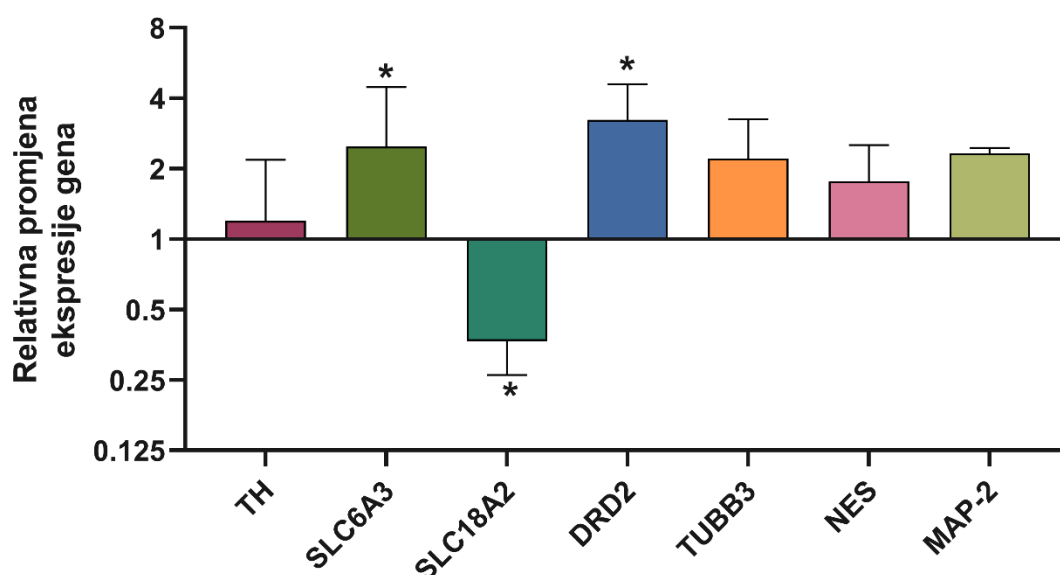
4.5. Uspostava i karakterizacija *in vitro* modela dopaminergičkih neurona

Rezultati analize genske i proteinske ekspresije ukazuju na uspješnu diferencijaciju SH-SY5Y stanica prema dopaminergičkom neuronskom fenotipu, što je u skladu s literaturnim podacima o mogućnosti diferencijacije ovih stanica u *in vitro* model stanica sličnih dopaminergičkim neuronima (96,97,164).

Statistički značajno povećanje ekspresije gena *SLC6A3* za 2,7 puta (Slika 5), važan je pokazatelj dopaminergičke diferencijacije. *SLC6A3* kodira dopaminski transporter (DAT), ključni protein za uklanjanje dopamina iz sinaptičke pukotine i njegovu ponovnu pohranu u presinaptičke završetke, čime sudjeluje u regulaciju dopaminergičku neurotransmisiju (165–167). Povećana ekspresija DAT-a važna je i iz perspektive primjene 6-OHDA, često korištenog toksina u modelima Parkinsonove bolesti. Ovaj toksin za ulazak u dopaminergičke neurone

koristi DAT, što bi moglo objasniti njegovu selektivnu toksičnost prema dopaminergičkim neuronima (109,168–170). Porast ekspresije DAT-a nakon diferencijacije potvrđen je i imunocitokemijski, iako je ukupna razina proteina ostala relativno niska diferencijacije (Slika 6, A3-B3).

Ekspresija *DRD2* se povećala 3,4 puta nakon diferencijacije (Slika 5), što je popraćeno i povećanom ekspresijom dopaminskog receptora D2 (D2R, Slika 6, A2-B2). Takav rezultat dodatno ukazuje na uspostavu dopaminergičkog fenotipa jer D2R kao autoreceptor na dopaminergičkim neuronima crne tvari (engl. substantia nigra) regulira sintezu i otpuštanje dopamina. (171,172), dok s kliničkog aspekta, D2 receptor predstavlja važnu farmakološku metu u zbrinjavanju motoričkih simptoma Parkinsonove bolesti (173).



Slika 5. Rezultati analize ekspresije gena u SH-SY5Y stanicama nakon diferencijacije. Promjene u ekspresiji gena izražene su u odnosu na nediferencirane stanice, a kvantificirane su metodom prema Vandesompeleu, na temelju dva referentna gena. Prikazane su geometrijske srednje vrijednosti i standardna devijacija iz tri neovisno ponovljena eksperimenta. Statistički značajne razlike u odnosu na nediferencirane stanice označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$). Os ordinata prikazana je u log₂ skali.

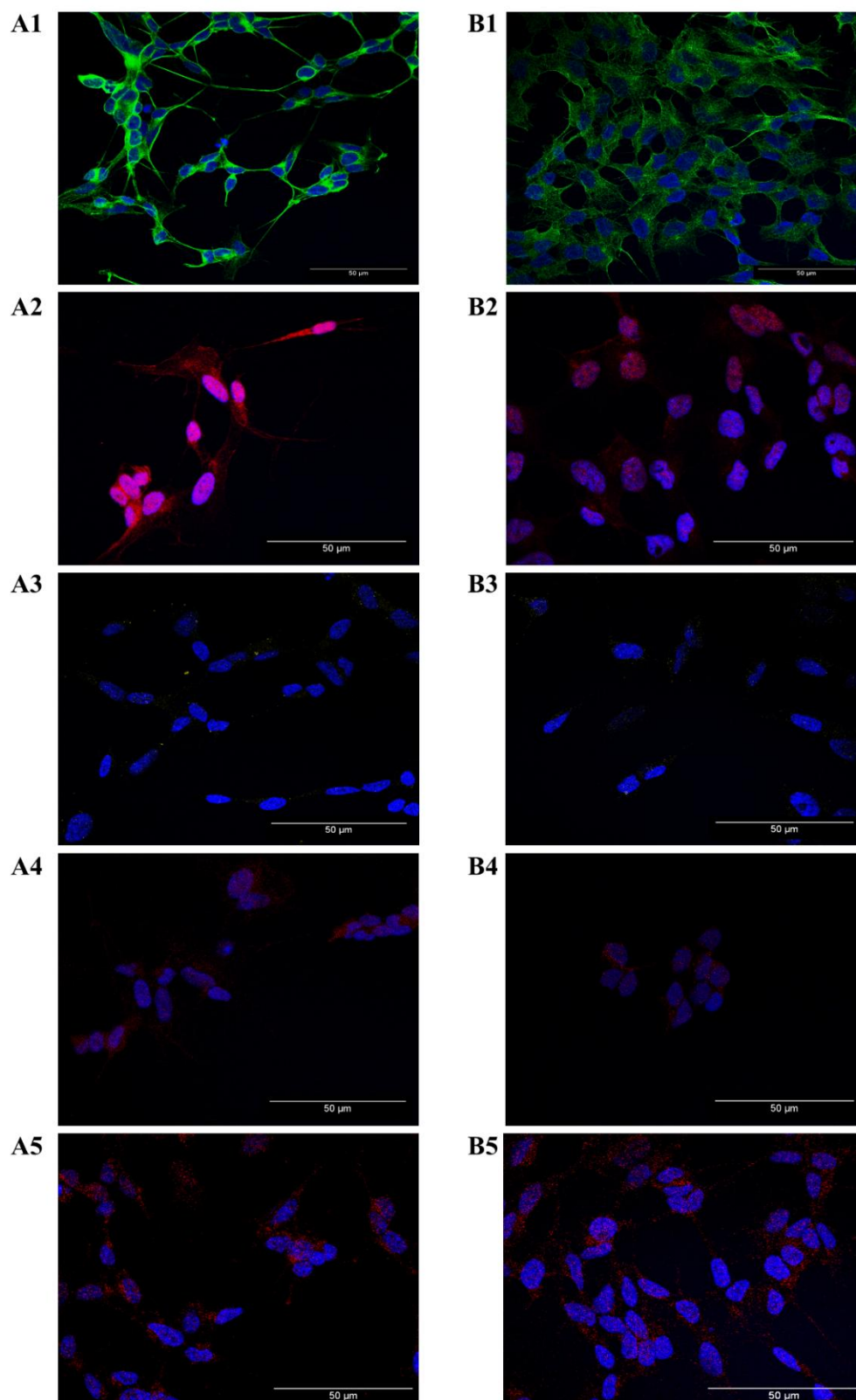
Povećanje ekspresije *TUBB3* i *MAP-2* gena za 2,3 i 2,3 puta, predstavlja važan biljeg diferencijacije (Slika 5). *TUBB3* se aktivira u ranim fazama diferencijacije progenitorskih stanica, a njegov produkt, β -III tubulin, ključan je za elongaciju aksona i gotovo je isključivo eksprimiran u neuronima, zbog čega se često koristi kao rani biljeg neuronskog fenotipa (174–

176). *MAP-2* kodira citoplazmatski protein pridružen mikrotubulima 2 (*MAP2*, engl. *microtubule associated protein 2*) koji igra ključnu ulogu u dendritima neurona stabilizirajući mikrotubule i omogućavajući njihov rast (177). Povišene vrijednosti ekspresije oba biljega ukazuju na transkripcijsku aktivaciju gena karakterističnih za neurone, što je u skladu s ranijim istraživanjima koja su pokazala da porast ekspresije *TUBB3* i *MAP2* gena označava uspješnu transformaciju matičnih stanica prema neuronskom fenotipu (178).

Ekspresija *TH* nije se značajno promijenila (Slika 5), a imunocitokemijska analiza pokazala je slične razine tirozin hidroksilaze prije i nakon diferencijacije stanica (Slika 6, A4-B4). Tirozin hidroksilaza katalizira pretvorbu tirozina u levodopu, što je ograničavajući korak (engl. *rate limiting step*) u sintezi kateholamina (179). Iako ovaj protein nije specifičan za dopaminergičke neurone jer sudjeluje i u sintezi adrenalina i noradrenalina, uz povećanu ekspresiju drugih biljega poput D2R i DAT-a, upućuje na diferencijaciju prema dopaminergičkim fenotipu (180).

Značajno smanjene ekspresije *SLC18A2* gena za 2,6 puta, (Slika 5) koji kodira vezikularni monoaminski transporter tipa 2 (*VMAT2*), nije u skladu diferencijacijom prema dopaminergičkom fenotipu jer je spomenuti protein ključan u pohrani dopamina u sinaptičke vezikule te zbog toga ima važnu ulogu u fiziologiji dopaminergičkih neurona. Smanjena ekspresija ovog proteina rezultira smanjenom pohranom dopamina u vezikule i smanjenim otpuštanjem u sinaptičku pukotinu (181). Osim toga, povećane koncentracije unutarstaničnog dopamina mogu dovesti do nastanka slobodnih radikala i toksičnih spojeva uslijed autooksidacije dopamina i doprinijeti oksidativnom stresu (182,183). Unatoč tome, imunocitokemijska analiza pokazala je sličnu razinu ekspresiju *VMAT2* proteina u obje populacije stanica (Slika 6, A5-B5), što možda upućuje na moguću post-transkripcijski prilagodbu u ekspresiji (184,185).

Minimalno povećanje ekspresije *NES* gena 1,8 puta (Slika 5) odražava složenu dinamiku proteina nestina tijekom diferencijacije neurona. Nestin je intermedijarni filament, citoplazmatski protein uključen u radijalni rast aksona i snažno eksprimiran u mitotičkim stanicama tijekom ranog razvoja središnjeg i perifernog živčanog sustava. Nakon diferencijacije, ekspresija nestina se obično smanjuje te se on zamjenjuje drugim tipovima intermedijarnih filamenata (186).



Slika 6. Imunocitokemijska usporedba ekspresije dopaminergičkih biljega i β -tubulina u SH-SY5Y stanicama. Jezgre stanica obojane su plavom bojom (Hoechst 33412). Panel A prikazuje

diferencirane, a panel B nediferencirane stanice. Slike A1–B1 prikazuju stanice obilježene protutijelom za β -tubulin, A2–B2 protutijelom za dopaminski receptor tipa 2 (D2R), A3–B3 protutijelom za dopaminski transporter (DAT), A4–B4 protutijelom za tirozin hidroksilazu (TH), a A5–B5 protutijelom za vezikularni monoaminski transporter 2 (VMAT2).

Konačno, morfološke promjene uočene tijekom diferencijacije, uključujući razvoj duljih neurita, smanjenu stopu proliferacije uz izoliran rast stanica (Slika 6, A1-B1), karakteristične su za neuronalnu diferencijaciju stanica jer odražavaju promjenu iz proliferativnog u postmitotičko stanje, karakteristično za zrele neurone. Prijašnje su studije u skladu s ovim rezultatima jer su pokazale da SH-SY5Y stanice uslijed diferencijacije poprimaju morfologiju sličnu neuronima uz povećanu duljinu i broj neurita te smanjenu stopu proliferacije (187–190). Nasuprot tome, nediferencirane stanice zadržavaju epitelni oblik tijela s vrlo kratkim izdancima, brzo se dijele i rastu u nakupinama.

Dobiveni rezultati pokazuju da diferencijacija SH-SY5Y stanica retinoičnom kiselinom i forbolnim esterima dovodi do razvoja ključnih obilježja zrelih dopaminergičkih neurona. Najvažniji pokazatelji te diferencijacije bili su povećana ekspresija gena SLC6A3, DRD2, TUBB3 i MAP2, uz morfološke promjene i smanjenu proliferaciju. Međutim, ograničenja poput smanjenja ekspresije SLC18A2 i nepotpunog smanjenja ekspresije NES-a naglašavaju da ovaj model ne reproducira u potpunosti funkcionalne dopaminergičke neurone, već predstavlja aproksimaciju pogodnu za in vitro istraživanja.

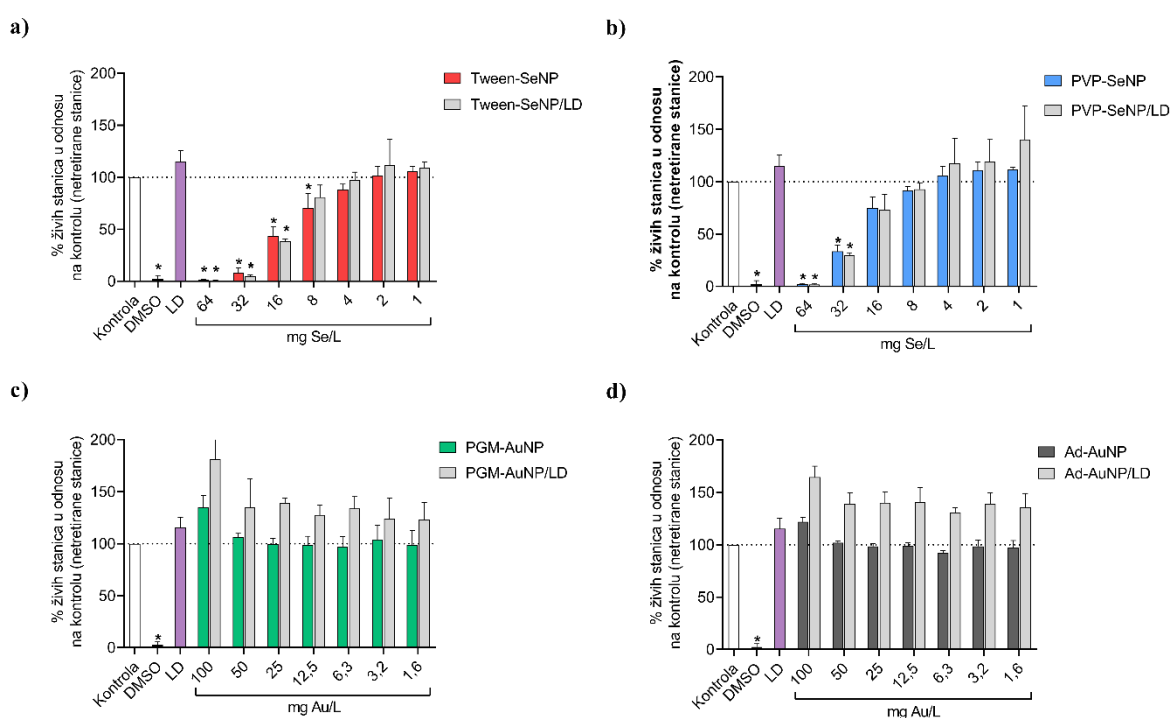
4.6. *Preživljenje stanica i pokretanje apoptoze*

Utjecaj nanočestica, njihovih smjesa s levodopom i testnih kemikalija na preživljenje diferenciranih SH-SY5Y stanica ispitan je MTS testom (Slika 7). Temeljem tih podataka, izrađene su krivulje preživljenja (Slika 8) metodom nelinearne regresije i izračunate IC_{50} i IC_{20} koncentracije (Tablica 8).

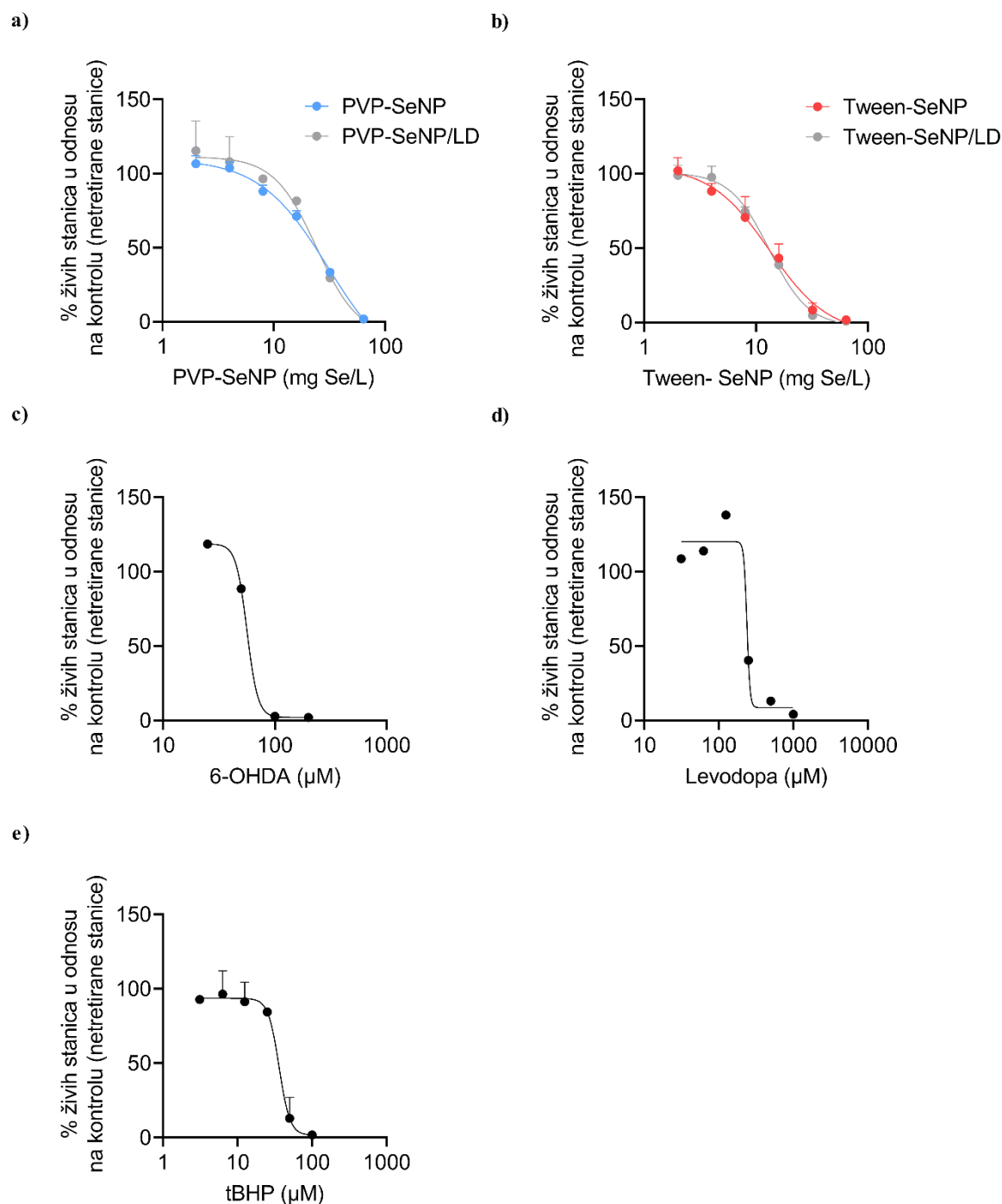
Rezultati su ukazali na značajne razlike u toksičnosti između SeNP i AuNP. SeNP su pokazale izraženu, koncentracijski ovisnu toksičnost (Slika 7a i 6b), pri čemu su Tween-SeNP ($IC_{50} = 11,7$ mg Se/L) bile toksičnije od PVP-SeNP-a ($IC_{50} = 31,8$ mg Se/L). Prisutnost levodope blago je povećala toksičnost većih koncentracija nanočestica, dok je pri nižim koncentracijama imala suprotan učinak (Slika 8a i 7b, Tablica 8).

Nasuprot tome, AuNP nisu pokazale toksičnost u ispitanom rasponu koncentracija (Slika 7c i 6d), stoga nije bilo moguće izračunati IC_{50} i IC_{20} vrijednosti. Zanimljivo, pri najvišim

koncentracijama (100 mg Au/L), vrijednosti preživljenja bile su više od kontrolnih stanica. Međutim, ovaj rezultat vjerojatno ne odražava stvarno povećanje preživljenja, već je posljedica spektrofotometrijske interferencije koju uzrokuju AuNP (191). One snažno apsorbiraju svjetlost u području oko 500 nm (192), što se preklapa s apsorpcijom formazana u MTS testu (490 nm). Nadalje, mikroskopski nisu opažene značajne razlike u broju stanica, dok su ostaci nanočestica bili jasno vidljivi na dnu jažica, unatoč temeljitom ispiranju PBS-om.



Slika 7. Rezultati MTS testa na diferenciranim SH-SY5Y stanicama nakon 24-satnog tretmana nanočesticama ili njihovim smjesama s levodopom (LD, 50 μ M). Netretirane stanice korištene su kao negativna, a stanice tretirane s 10 % DMSO-om (v/v) kao pozitivna kontrola. Rezultati su dobiveni iz tri neovisna eksperimenta provedena u tehničkim triplikatima i izraženi kao postoci u odnosu na negativnu kontrolu. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$).



Slika 8. Krivulje odnosa koncentracije i preživljenja stanica prema rezultatima MTS testa na diferenciranim SH-SY5Y stanicama nakon 24-satnog tretmana s a) PVP-SeNP, b) Tween-SeNP, c) 6-OHDA, d) levodopom i e) tBHP-om. Krivulje su nacrtane u programu Graph Pad Prism 8 te su na temelju istih, primjenom nelinearne regresije, izračunate IC_{50} i IC_{20} vrijednosti.

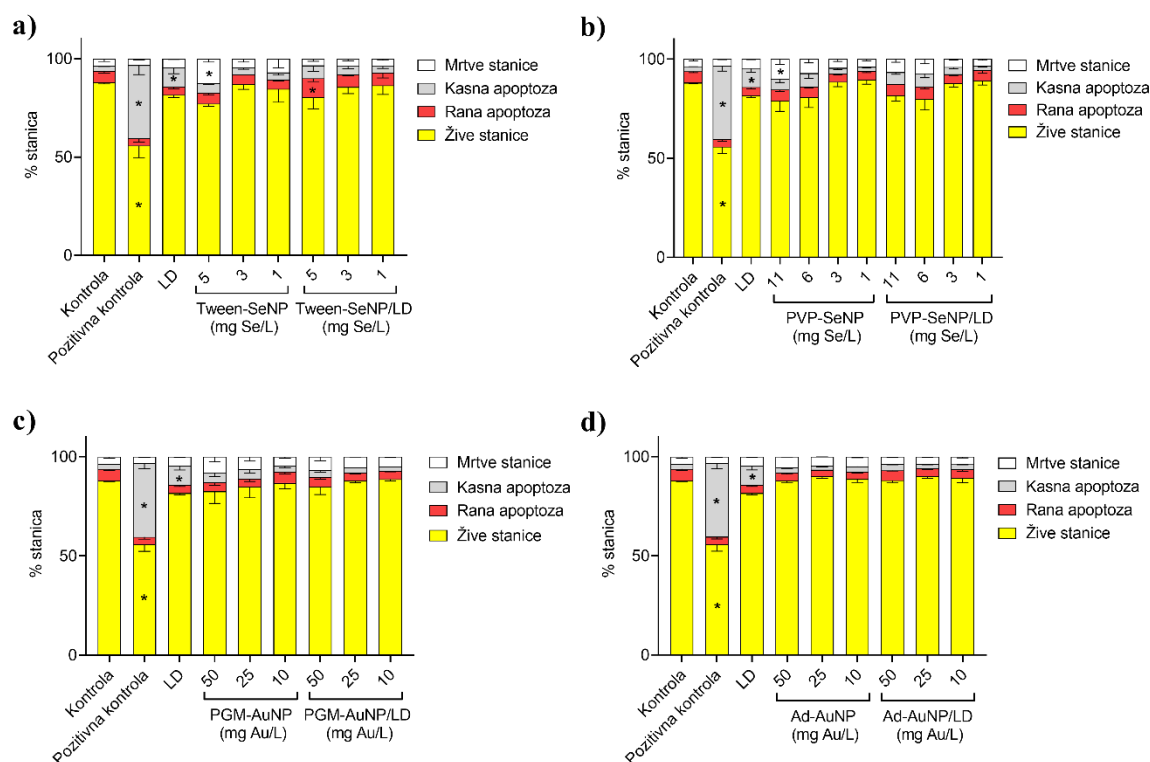
Porast signala u MTS testu, u odnosu na kontrolne, vidljiv je i u svim smjesama nanočestica zlata i levodope, a sličan fenomen uočen je i pri ispitivanju manjih koncentracija

(< 150 μ M) čiste levodope (Slika 8d). Međutim, i u ovom slučaju, mikroskopska opažanja, kao i rezultati protočne citometrije (Slika 9) nisu ukazali na razliku u broju živih stanica u odnosu kontrolu. Osim toga, do povećanja signala došlo je i kod malih koncentracija 6-OHDA (Slika 8c). Obzirom na strukturalnu sličnost s levodopom, moguće je da uočeni učinci ovih spojeva pri netoksičnim koncentracijama proizlaze iz interferencije, primjerice njihove sposobnosti izravne redukcije tetrazolijeve soli u formazan, a ne iz stvarnog povećanja broja živih stanica. Takva izravna redukcija u formazan već je zabilježena za niz spojeva te predstavljaju lažno pozitivan signal (193,194).

Tablica 8. IC₅₀ i IC₂₀ koncentracije testnih kemikalija i nanočestica. Vrijednosti su izračunate na temelju rezultata MTS testa.

Tretman (koncentracija)	IC₅₀	IC₂₀
Tween-SeNP (mg Se/L)	11,7	5,7
Tween-SeNP/L-Dopa (mg Se/L)	11,1	7,5
PVP-SeNP (mg Se/L)	31,8	11,5
PVP-SeNP/L-Dopa (mg Se/L)	24,1	13,2
L-Dopa (μ M)	241,6	224,2
6-OHDA (μ M)	55,3	48,2
tBHP (μ M)	35,1	28,6

Rezultati MTS testa poslužili su za određivanje koncentracija koji će se koristiti u daljnjim eksperimentima. Prije svega odabrane su koncentracije koje ne ubijaju značajan broj stanica, odnosno koncentracije koje su ispod IC₂₀ vrijednosti. Za AuNP, budući da nisu pokazale toksičnost, odabrane su koncentracije koje nisu interferirale s MTS testom. Za 6-OHDA, odabrane su dvije koncentracije: IC₅₀ za ispitivanje protektivnih učinaka nanočestica metodom protočne citometrije i IC₂₀ za ispitivanje protektivnih učinaka primjenom fluorescentnih proba.



Slika 9. Rezultati analize preživljenja stanica i pokretanja apoptoze na diferenciranim SH-SY5Y stanicama nakon 24-satnog tretmana nanočesticama ili njihovim smjesama s levodopom (LD, 50 μ M). Netretirane stanice korištene su kao negativna, dok su stanice inkubirane 10 minuta na 70 °C neposredno prije provođenja analize, korištene kao pozitivna kontrola. Rezultati su dobiveni iz tri neovisna eksperimenta u tehničkim duplikatima. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$).

Kako bi potvrdili rezultate MTS-a obzirom na gore spomenute interferencije te provjerili jesu li odabrane koncentracije tretmana doista sigurne, toksičnost je dodatno ispitana aneksin V/PI testom pomoću protočne citometrije. Ovaj je test puno bolji pokazatelj toksičnosti jer se ne temelji na metaboličkoj aktivnosti stanicama već na specifičnim biljezima nekroze i apoptoze.

Nakon 24-satnog tretmana, rezultati su bili u skladu s onima MTS testa te su potvrdili kako odabrane koncentracije nisu imale izražen učinak na preživljenje stanica i pokretanje apoptoze (Slika 9.) Ipak, pri najvišim koncentracijama nanočestica selena (5 mg/L za Tween-SeNP te 11 i 6 mg/L za PVP-SeNP) zabilježeno je blago, statistički neznačajno, smanjenje udjela živih stanica (77,2 % za Tween-SeNP, 79,0 % i 80,7 % za PVP-SeNP) u usporedbi s kontrolnim stanicama (88,0 %). Ovo smanjenje popraćeno je porastom udjela mrtvih i kasno apoptotičnih stanica. Pri nižim koncentracijama ($\leq 3 \mu$ g Se/mL za Tween-SeNP i $\leq 6 \mu$ g Se/mL

za PVP-SeNP) udio živih stanica bio je vrlo sličan kontroli, uz minimalne promjene u udjelima apoptotičnih i mrtvih stanica (Slika 9a i 8b). Prisutnost levodope u smjesama nije značajno utjecala na raspodjelu staničnih populacija.

AuNP i njihove smjese s levodopom nisu uzrokovale velike promjene u udjelu živih, apoptotičnih ili mrtvih stanica u odnosu na kontrolu (Slika 9c i 8d), što je u skladu s rezultatima MTS testa. Tretman levodopom doveo je do umjerenog porasta kasne apoptoze, dok se ukupan udio živih stanica nije mnogo razlikovao od kontrole.

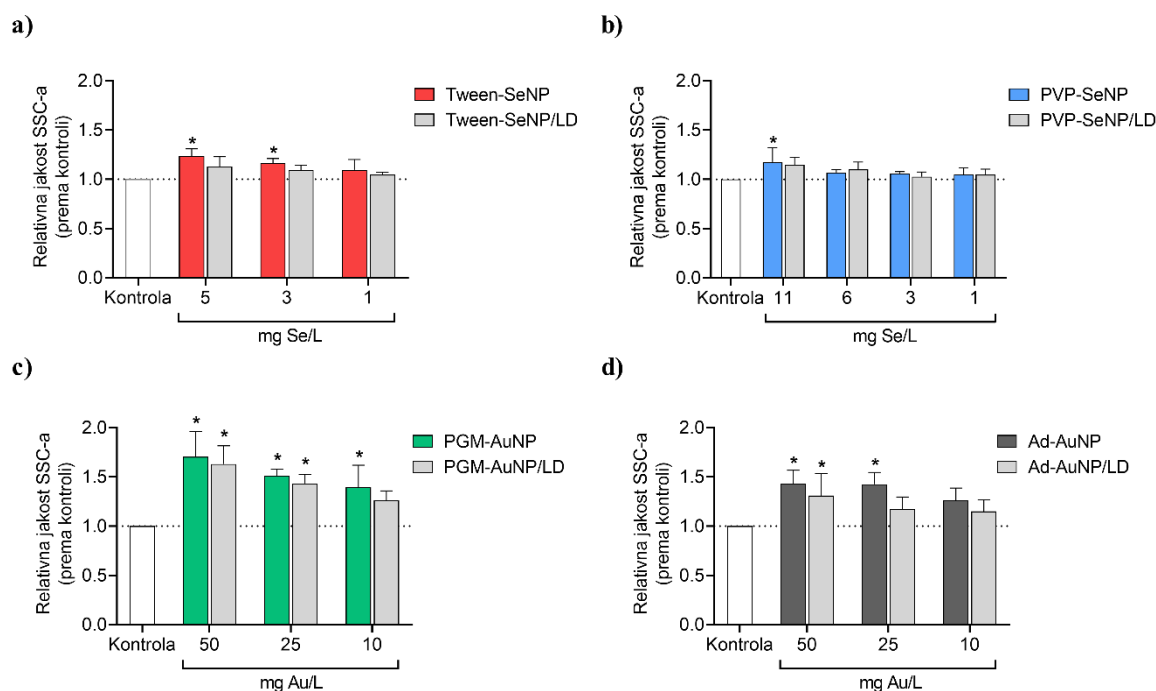
Sveukupno, rezultati za AuNP ukazuju na njihovu sigurnost u primjeni kao potencijalnih nosača lijekova, budući da pri svim ispitanim koncentracijama nisu pokazale citotoksične učinke. Ovakvi nalazi u skladu su s literaturom, koja u većini slučajeva potvrđuje dobru biokompatibilnost AuNP (195,196). Ipak, to ne isključuje mogućnost toksičnih učinaka izvan koncentracijskog raspona ispitanog u ovom radu, kao ni uslijed opetovanog doziranja, dulje inkubacije ili nakupljanja nanočestica u stanicama i tkivima (197–199).

S druge strane, SeNP su u MTS testu pokazale su koncentracijski ovisnu toksičnost prema diferenciranim SH-SY5Y stanicama, što je u skladu s nedavno objavljenim radovima (200,201). Pritom je uočena znatno veća toksičnost Tween-SeNP ($IC_{50} = 11,7$ mg Se/L) u odnosu na PVP-SeNP ($IC_{50} = 31,8$ mg Se/L). Ove razlike vjerojatno proizlaze iz kombinacije nekoliko čimbenika, iako nije moguće jednoznačno odrediti njihov relativni doprinos. Prije svega, Tween-SeNP imaju manju primarnu veličinu (Tablica 7), što podrazumijeva veću specifičnu površinu, veću kemijsku reaktivnost, vjerojatno brže oslobađanje iona selena, a time i izraženiju toksičnost (202,203). Također, veći unos Tween-SeNP u stanice (Slika 10), mogao bi objasniti veću toksičnost, dok se kao važan čimbenik ne smije isključiti niti priroda stabilizatora korištenih u sintezi. Selmani i suradnici jasno su pokazali kako SeNP sintetizirane gotovo identičnim postupkom, sličnih primarnih veličina, ali različitih stabilizatora, imaju znatno drugačije profile citotoksičnosti (204).

4.7. Stanični unos i lokalizacija nanočestica

Unos nanočestica u diferencirane SH-SY5Y stanice procijenjen je mjerenjem jakosti SSC-a signala živih stanica, metodom protočne citometrije. Rezultati pokazuju kako su sve vrste nanočestica izazvale porast SSC-a, što upućuje na njihov unos u stanice (Slika 10). Među nanočesticama selena, Tween-SeNP izazvale su izraženiji porast jakosti SSC-a pri manjoj koncentraciji (1,24 pri 5 μ g/mL) u usporedbi s PVP-SeNP (1,17 pri 11 μ g/mL). Povećanje je

bilo koncentracijski ovisno, a smjese s levodopom pokazale su sličan obrazac kao i same nanočestice, što sugerira da interakcija s levodopom ne utječe znatno na njihov unos.



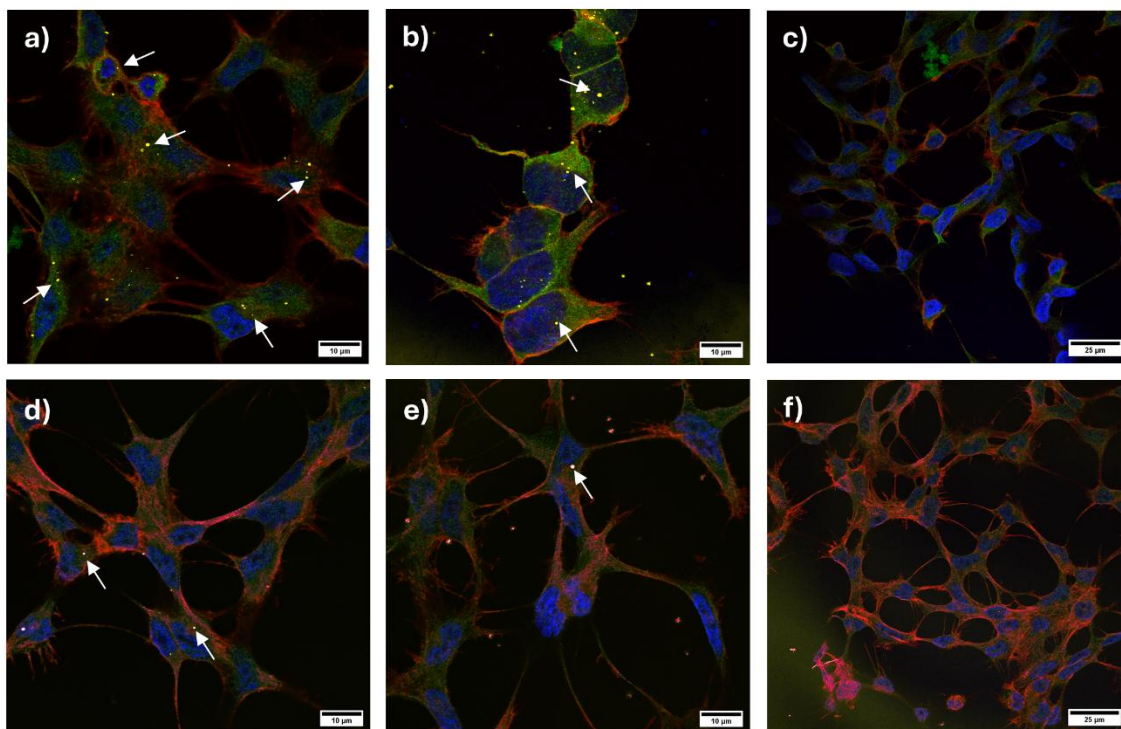
Slika 10. Unos nanočestica u diferencirane SH-SY5Y stanice utvrđen metodom protočne citometrije. Vrijednosti intenziteta postranično raspršenog svjetla (engl. *side scatter light*, SSC) dobiveni su iz tri neovisna eksperimenta provedenih u triplicatima te su izraženi kao omjer u odnosu na kontrolu. Statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$).

AuNP su također izazvale porast SSC signala u odnosu na kontrolne stanice, ali su promjene bile izraženije (Slika 10c i 9d). Primjerice, pri najvišim koncentracijama PGM-AuNP i Ad-AuNP od 50 mg Au/mL, SSC signal je bio 1,71 i 1,43 puta veći u odnosu na kontrolu. Dodatak levodope u smjesu rezultirao je manjim vrijednostima SSC signala u odnosu na same nanočestice, iako je i dalje bio značajno veći od signala kontrolnih stanica.

Važno je naglasiti da nije moguće izravno uspoređivati intenzitet SSC signala između SeNP i AuNP kako bi se procijenio relativni stupanj internalizacije. Naime, AuNP zbog površinske plazmonske rezonancije (engl. *surface plasmon resonance*) pokazuju snažnije raspršenje svjetlosti u vidljivom području, što rezultira većim SSC signalom neovisno o stvarnom broju nanočestica (205). Stoga se SSC signal može koristiti za praćenje unosa unutar iste vrste nanočestica, ali ne i za međusobnu usporedbu različitih materijala.

Iako je jakost SSC signala često u pozitivnoj korelaciji s unosom nanočestica, ona sama po sebi ne daje jasnu informaciju o tome jesu li nanočestice doista unutar stanice ili su vezane za staničnu membranu. Kao što je već ranije spomenuto, vezanje nanočestica za membranu ne podrazumijeva nužno i njihov unos u stanicu (206) pa samo iz rezultata protočne citometrije nije moguće pouzdano zaključiti o staničnom unosu. Stoga je za potvrdu potrebna komplementarna metoda i u tu je svrhu primijenjena konfokalna mikroskopija u refleksijskom načinu rada. Ova metoda temelji se na činjenici da razlika u indeksu loma između nanočestica i stanice predstavlja primarni izvor kontrasta, pri čemu SeNP i AuNP imaju dovoljno visoki indeks loma da budu vidljive u refleksijskom kanalu (207). Kako bi se razlikovalo nalaze li se nanočestice unutar stanice ili na njenoj površini, za svaki je uzorak snimljeno više slika u različitim optičkim ravninama (engl. *z-stack*), a odabrane su one iz središnjeg dijela koje prikazuju presjek kroz stanice. Ipak, treba naglasiti da signal zabilježen konfokalnom mikroskopijom potječe od nakupina, a ne od pojedinačnih nanočestica, budući da lateralna rezolucija metode iznosi > 200 nm (208).

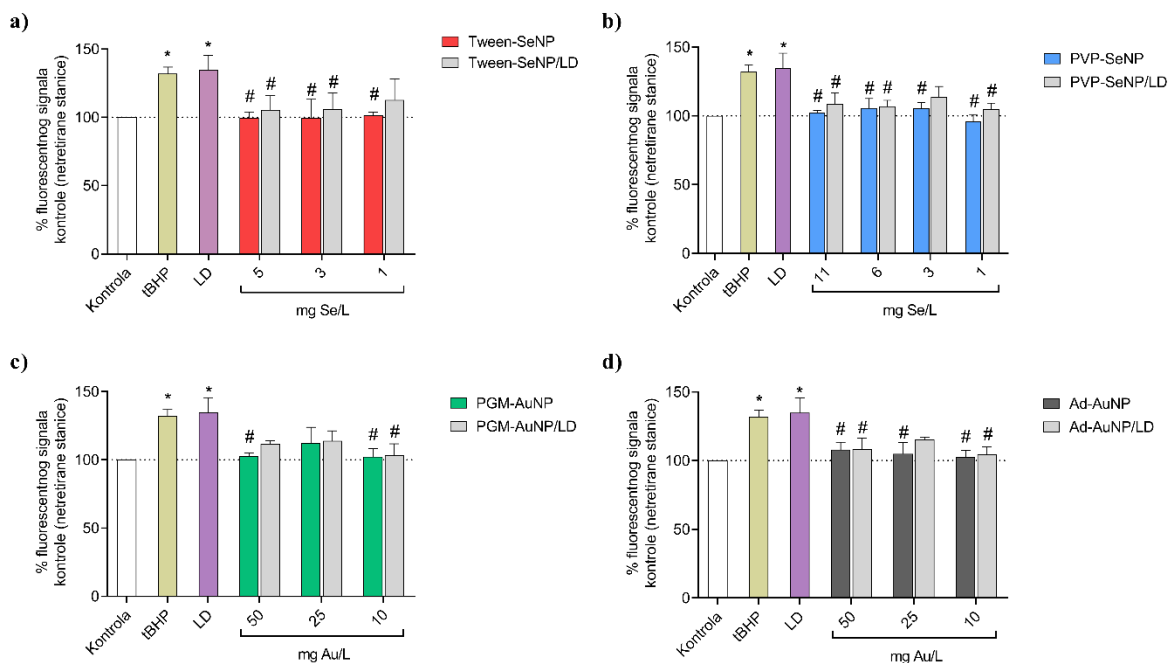
Fotografije s konfokalnog mikroskopa potvrdile su prisutnost AuNP i SeNP u stanicama, pri čemu je broj unesenih AuNP bio veći (Slika 11), što je prvenstveno posljedica veće primijenjene koncentracije. Većina nanočestica nalazila se u citosolu, ali na temelju konfokalne mikroskopije nije bilo moguće razlikovati citosomalnu od lizosomalne lokalizacije. Mali broj AuNP primijećen je i u području stanične jezgre, dok za SeNP takvi signali nisu uočeni (Slika 11a i 10b), što je u skladu s literaturnim spoznajama da samo vrlo male nanočestice (<10 nm), učinkovito ulaze u jezgru (209).



Slika 11. Konfokalne mikroskopske slike diferenciranih SH-SY5Y stanica: a) stanice tretirane s Ad-AuNP, b) stanice tretirane s PGM-AuNP, d) stanice tretirane s Tween-SeNP, e) stanice tretirane s PVP-SeNP i kontrolne stanice (e, f). Primijenjena koncentracija AuNP bila je 10 mg Au/L, a SeNP 1 mg Se/L. Jezgre stanica obojane su plave, aktin crveno i β -tubulin zeleno. Bijele strelice označavaju nanočestice unutar stanica.

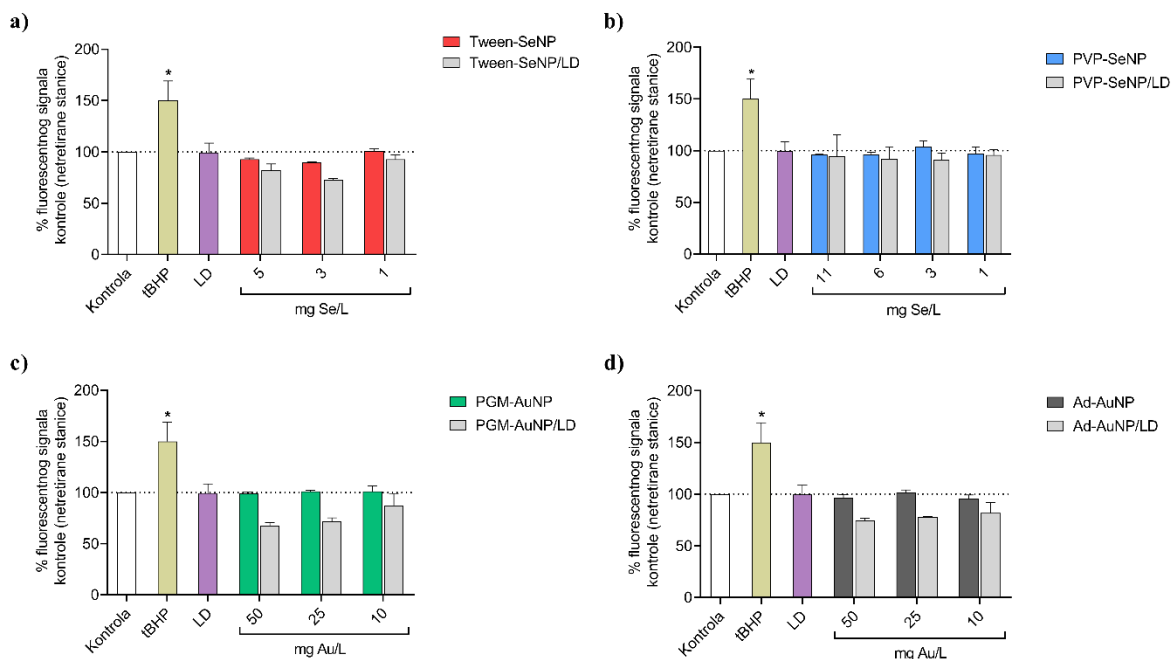
4.8. *Oksidativni stres i mitohondrijski membranski potencijal*

Učinak tretmana na stvaranje ROS-ova procijenjen dvjema fluorescentnim probama, DHE i DCFH₂-DA. Kao što je opisano u poglavlju Materijali i metode, one se koriste za određivanje superoksidnog aniona (O_2^-) i vodikovog peroksida (H_2O_2). Međutim, obzirom da u manjoj mjeri reagiraju i s drugim reaktivnim kisikovim i dušikovim vrstama (210–212), koriste se i kao pokazatelj ukupnih razina ROS-ova u stanici (212). Uz navedeno, ispitan je i učinak tretmana na razine reduciranog glutationa (GSH) primjenom mBCL testa te na MMP primjenom Rh123 testa.



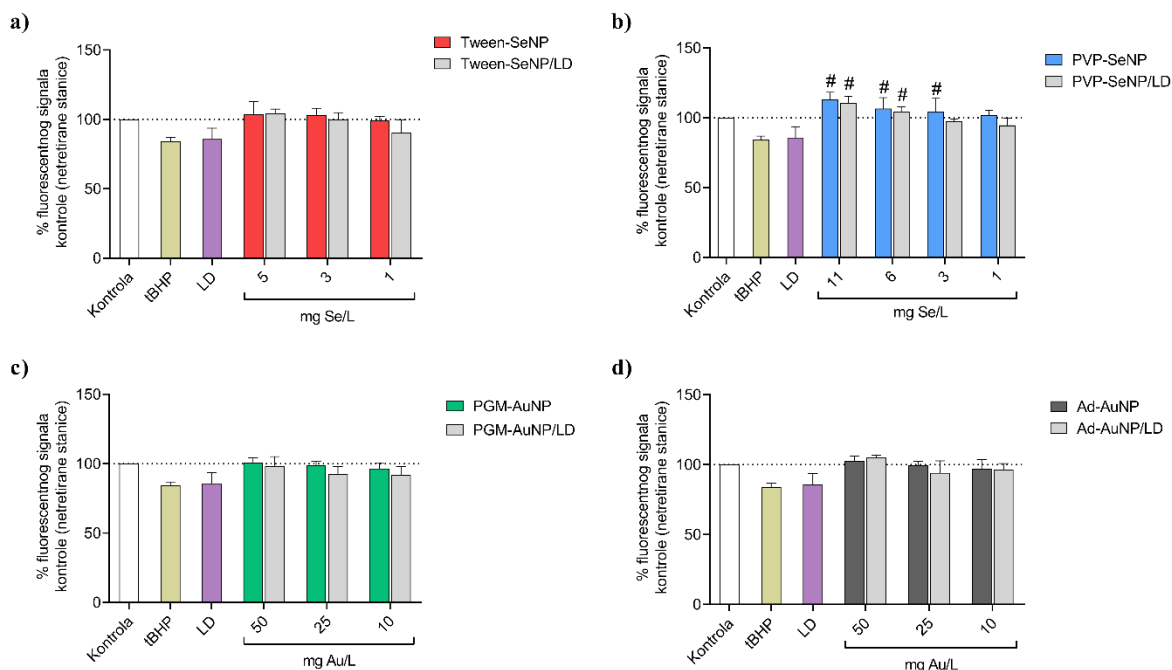
Slika 12. Rezultati DHE testa na diferenciranim SH-SY5Y stanicama nakon 4-satnog tretmana nanočesticama ili njihovim smjesama s levodopom (LD, 50 μ M). Netretirane stanice korištene su kao negativna, a stanice tretirane s 20 μ M tBHP-om kao pozitivna kontrola. Rezultati su dobiveni iz tri neovisna eksperimenta provedena u triplikatima i izraženi kao postoci u odnosu na negativnu kontrolu. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$), a u odnosu na LD ljestvama (#, $p < 0,05$).

Nakon izloženosti u trajanju od 4 sata, DHE test jasno je pokazao kako levodopa potiče stvaranje ROS-ova na razini usporedivoj s pozitivnom kontrolom, pri čemu je intenzitet fluorescencije iznosio 134,8 % vrijednosti kontrolnih stanica (Slika 12). Samostalno, SeNP i AuNP nisu pokazale takve učine uz vrijednosti fluorescencije usporedive s kontrolom. Međutim, uspjele su smanjiti levodopom potaknuto stvaranje ROS-ova jer su vrijednosti signala bile niže u smjesama u odnosu na tretman čistom levodopom. Ovaj učinak podudara se s rezultatima mBCL testa, gdje je nakon četverosatnog tretmana levodopa smanjila unutarstanične zalihe GSH (85,8 % vrijednosti kontrole), dok su one u smjesama s nanočesticama ostale očuvane (Slika 14). Takav učinak levodope, na razine GSH, posredovan stvaranjem superoksidnog aniona već je opisan u literaturi (213). Dodatno, PVP-SeNP su pri koncentraciji od 11 i 6 mg Se/L blago povisile vrijednosti GSH u odnosu na negativnu kontrolu.



Slika 13. Rezultati DCFH₂-DA testa na diferenciranim SH-SY5Y stanicama nakon 4-satnog tretmana nanočesticama ili njihovim smjesama s levodopom (LD, 50 μ M). Netretirane stanice korištene su kao negativna, a stanice tretirane s 20 μ M tBHP-om kao pozitivna kontrola. Rezultati su dobiveni iz tri neovisna eksperimenta provedena u triplikatima i izraženi kao postoci u odnosu na negativnu kontrolu. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$), a u odnosu na LD ljestvama (#, $p < 0,05$).

Slični obrasci primijećeni su i u Rh123 testu, kojim je ispitan utjecaj tretmana na MMP. Nakon inkubacije u trajanju od četiri sata, levodopa je uzrokovala depolarizaciju mitohondrijske membrane (91,7 % vrijednosti kontrole), dok su SeNP te PGM-AuNP taj učinak ublažili, iako on nije bio statistički značajan (Slika 15). Ad-AuNP su uzrokovale depolarizaciju mitohondrija pri koncentracijama od 50 i 25 mg Au/L, uz vrijednosti intenziteta fluorescencije od 96,1 i 96,6 % kontrolnih stanica. Depolarizacija je bila izraženija uz dodatak levodope, a izmjerene vrijednosti iznosile su 94,7 % i 92,4 % (Slika 15d). tBHP je kao pozitivna kontrola smanjio intenzitet signala, što je očekivan učinak povećanih razina oksidativnog stresa (214), a da je takva promjena u signalu doista povezana s depolarizacijom mitohondrija, potvrdio je rezultat CCCP-a (134).



Slika 14. Rezultati mBCL testa na diferenciranim SH-SY5Y stanicama nakon 4-satnog tretmana nanočesticama ili njihovim smjesama s levodopom (LD, 50 μ M). Netretirane stanice korištene su kao negativna, a stanice tretirane s 20 μ M tBHP-om kao pozitivna kontrola. Rezultati su dobiveni iz tri neovisna eksperimenta provedena u triplicatima i izraženi kao postoci u odnosu na negativnu kontrolu. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$), a u odnosu na LD ljestvama (#, $p < 0,05$).

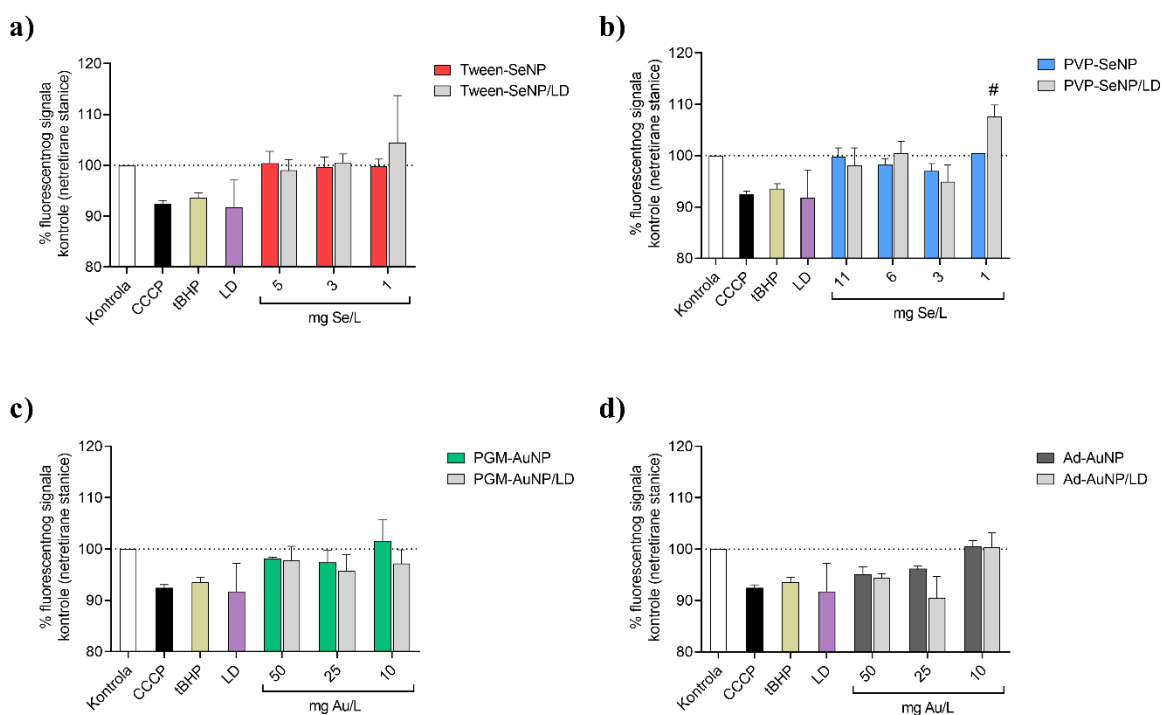
Iznenadjujuće, DCFH₂-DA test nije ukazao na porast razina ROS-ova nakon 4-satnog tretmana levodopom, pri čemu su vrijednosti intenziteta fluorescencije bile jednake kontrolnim stanicama (Slika 13). AuNP i SeNP također nisu izazvale promjene, a jedino je pozitivna kontrola dovela do očekivanog povećanja intenziteta fluorescencije, koje je iznosilo 150,0 % vrijednosti kontrole. Smjese nanočestica i levodope rezultirale su čak i manjim vrijednostima fluorescencije u usporedbi sa samostalno primijenjenim nanočesticama.

Promatrajući rezultate u cjelini, niti jedna vrsta nanočestica nije uzrokovala povećano stvaranje ROS-ova, uz tek blagu i statistički neznačajnu depolarizaciju mitohondrija, zabilježenu pri određenim koncentracijama PVP-SeNP-a i Ad-AuNP-a. Štoviše, nanočestice su smanjile levodopom inducirano stvaranje ROS-ova, što je potvrđeno mBCL i DHE testovima. U slučaju AuNP-a i PVP-SeNP-a ovaj se učinak može objasniti smanjenjem količine slobodne levodope uslijed njezina vezanja na površinu nanočestica, pod uvjetom da ne dolazi do naglog

otpuštanja u staničnom mediju. Za Tween-SeNP takav je mehanizam malo vjerojatan zbog niske razine vezane levodope.

Dodatno, protektivni se učinak može pripisati tzv. nanozimima (engl. *nanozymes*) (215). Poznato je kako AuNP mogu izravno reagirati s ROS-ovima putem površinskih redoks reakcija, pri čemu pokazuju katalaznu i superoksid dismutaznu aktivnost (216–219). Slična svojstva opisana su i za SeNP, koji iskazuju aktivnost sličnu glutathion peroksidazi (220,221). Ipak, takva aktivnost nanočestica mnogo ovisi o veličini, površinskoj funkcionalizaciji i biološkom kontekstu te ju na temelju korištenih testova nije moguće potvrditi.

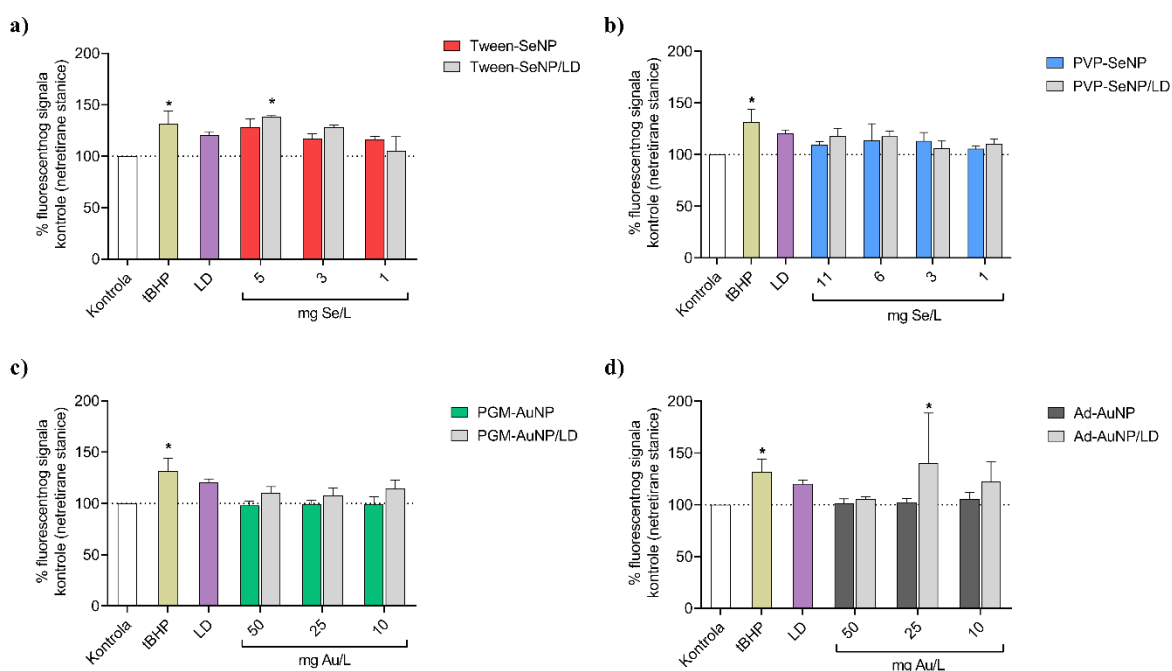
Konačno, SeNP mogu potaknuti i sintezu selenoproteina, poput glutathion peroksidaza i tioredoksin reduktaza te selenopeptida GSH, koji imaju ključnu ulogu u obrani stanica od oksidativnog stresa (222,223). Međutim, s obzirom na kratko vrijeme inkubacije u opisanim pokusima, ovaj je mehanizam malo vjerojatan.



Slika 15. Rezultati Rh 123 testa na diferenciranim SH-SY5Y stanicama nakon 4-satnog tretmana nanočesticama ili njihovim smjesama s levodopom (LD, 50 μ M). Netretirane stanice korištene su kao negativna, a stanice tretirane s 20 μ M tBHP-om kao pozitivna kontrola. CCCP je korišten kao kontrola depolarizacije mitohondrija. Rezultati su dobiveni iz tri neovisna eksperimenta provedena u triplikatima i izraženi kao postoci u odnosu na negativnu kontrolu.

Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$), a u odnosu na LD ljestvama (#, $p < 0,05$).

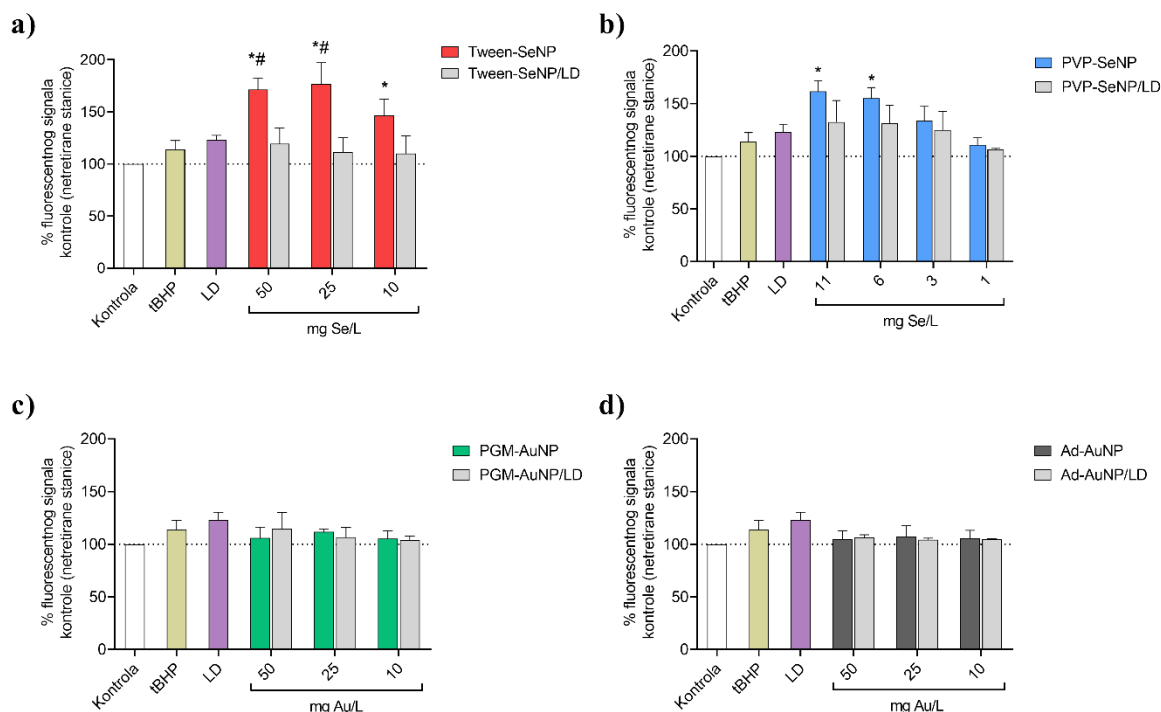
Nakon 24-satnog tretmana, rezultati su bili znatno drugačiji. DCFH₂-DA i DHE testovi pokazali su snažan, koncentracijski ovisan porast ROS-ova u stanicama sa SeNP. Izmjerene vrijednosti za Tween-SeNP, pri koncentracijama od 5, 3 i 1 mg Se/L iznosile 138,4 %, 125,6 % i 120,0 % u DHE (Slika 16a), odnosno 171,4 %, 176,7 % i 146,3 % u DCFH₂-DA testu (Slika 17a). PVP-SeNP su pokazale nešto manji prooksidativni potencijal, pa su pri koncentracijama od 11, 6 i 3 mg Se/L izmjerene vrijednosti iznosile 109,6 %, 113,5 % i 113,3 % u DHE (Slika 16b), odnosno 161,8 %, 155,1 % i 134,0 % u DCFH₂-DA testu (Slika 17b). Dodatkom levodope u sustav, u DHE testu je došlo do porasta fluorescencije u odnosu na same nanočestice, dok je u DCFH₂-DA testu došlo da smanjenja.



Slika 16. Rezultati DHE testa na diferenciranim SH-SY5Y stanicama nakon 24-satnog tretmana nanočesticama ili njihovim smjesama s levodopom (LD, 50 μ M). Netretirane stanice korištene su kao negativna, a stanice tretirane s 20 μ M tBHP-om kao pozitivna kontrola. Rezultati su dobiveni iz tri neovisna eksperimenta provedena u triplikatima i izraženi kao postoci u odnosu na negativnu kontrolu. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$), a u odnosu na LD ljestvama (#, $p < 0,05$).

Samostalno primijenjena levodopa zadržala je umjereni prooksidativni učinak nakon 24-satnog tretmana te je u oba testa uzrokovala porast intenziteta fluorescencije na približno

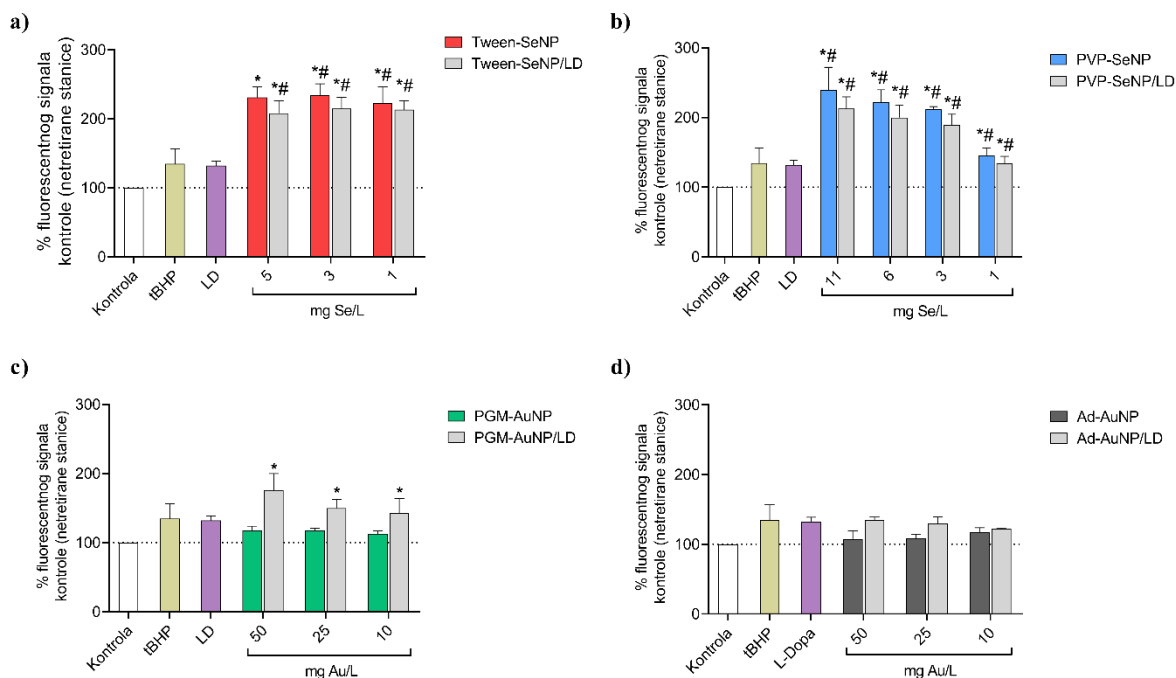
120 % vrijednosti kontrolnih stanica. Rezultati za AuNP nisu ukazali na povećano stvaranje ROS-ova u diferenciranim SH-SY5Y stanicama, a izmjerene vrijednosti bile su usporedive s kontrolom (Slika 16c i 15d; Slika 17c i 16d).



Slika 17. Rezultati DCFH₂-DA testa na diferenciranim SH-SY5Y stanicama nakon 24-satnog tretmana nanočesticama ili njihovim smjesama s levodopom (LD, 50 μ M). Netretirane stanice korištene su kao negativna, a stanice tretirane s 20 μ M tbHP-om kao pozitivna kontrola. Rezultati su dobiveni iz tri neovisna eksperimenta provedena u triplikatima i izraženi kao postoci u odnosu na negativnu kontrolu. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$), a u odnosu na LD ljestvama (#, $p < 0,05$).

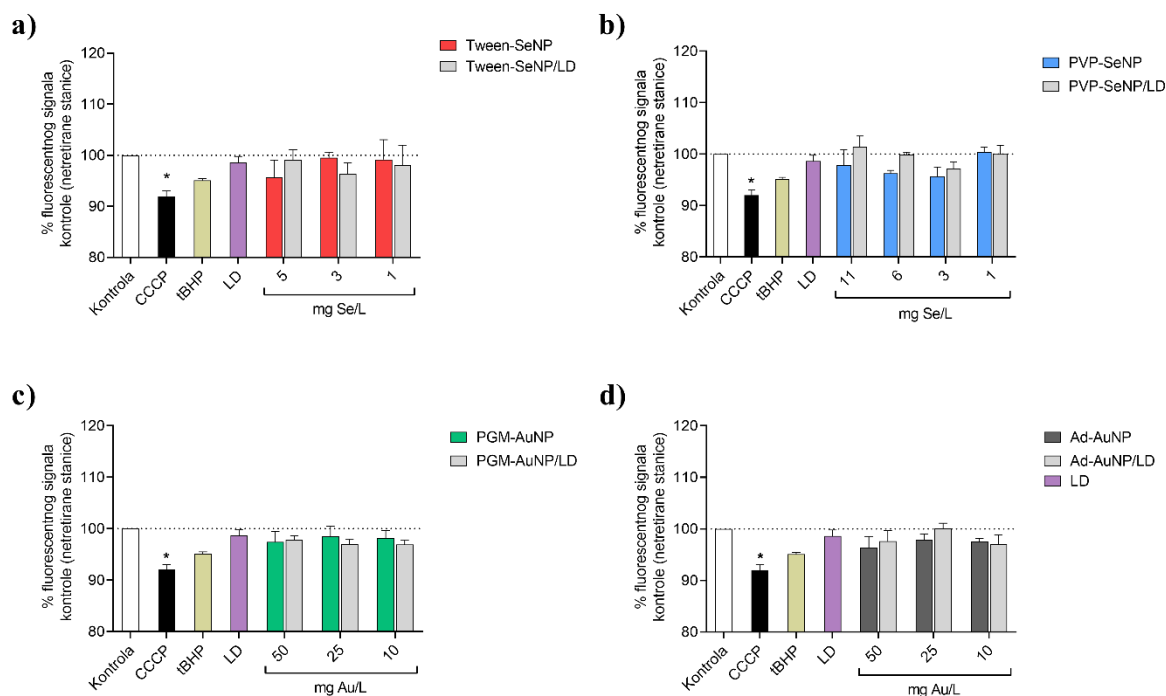
Unatoč povećanom stvaranju ROS-ova, stanice tretirane sa SeNP nisu smanjile, već su značajno povećale unutarstanične razine GSH (Slika 18). Učinak PVP-SeNP-a bio je koncentracijski ovisan: intenzitet fluorescentnog signala pri koncentracijama od 11, 6, 3 i 1 mg Se/L iznosio je redom 239,4 %, 222,3 %, 212,1 % i 145,7 % kontrole (Slika 18b). Kod Tween-SeNP sve su koncentracije dale usporedive rezultate, s vrijednostima oko 230 % (Slika 18a). Dodatak levodope nanočesticama blago je smanjio intenzitet fluorescentnog signala, dok su sama levodopa i tbHP povisili razine GSH na približno 130 % vrijednosti kontrolnih stanica.

Za AuNP nije zabilježena značajna promjena, iako su PGM-AuNP u kombinaciji s levodopom pokazale umjereno povećanje razina GSH, uz porast intenziteta fluorescencije na 176,1 %, 150,0 % i 142,4 % za koncentracije od 50, 25 i 10 mg Au/L (Slika 18c i 17d).



Slika 18. Rezultati mBCL testa na diferenciranim SH-SY5Y stanicama nakon 24-satnog tretmana nanočesticama ili njihovim smjesama s levodopom (LD, 50 μ M). Netretirane stanice korištene su kao negativna, a stanice tretirane s 20 μ M tbHP-om kao pozitivna kontrola. Rezultati su dobiveni iz tri neovisna eksperimenta provedena u triplicatima i izraženi kao postoci u odnosu na negativnu kontrolu. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$), a u odnosu na LD ljestvama (#, $p < 0,05$).

Tween-SeNP su dovele do blage depolarizacije mitohondrija pri koncentraciji od 5 mg Se/L, pri čemu je intenzitet fluorescencije iznosio 94,7 % kontrole (Slika 19a). Sličan učinak uočen je i kod PVP-SeNP pri koncentracijama od 11, 6 i 3 mg Se/L, uz izmjerene vrijednosti od 96,9 %, 95,2 % i 94,7 % (Slika 19b). Sama levodopa minimalno je smanjila intenzitet signala (98,4 %), dok PGM-AuNP nisu dovele značajnije depolarizacije mitohondrija (Slika 19). Ad-AuNP su pri koncentraciji 50 mg Au/L, smanjile intenzitet signala na vrijednost od 96,3 % kontrole (Slika 19d). CCCP je jedini uzrokovao statistički značajnu promjenu, pri čemu je intenzitet fluorescencije pao na 92,0 % kontrole, čime je potvrđeno da smanjenje signala i u ovom slučaju odražava depolarizaciju mitohondrija.



Slika 19. Rezultati Rh 123 testa na diferenciranim SH-SY5Y stanicama nakon 24-satnog tretmana nanočesticama ili njihovim smjesama s levodopom (LD, 50 μ M). Netretirane stanice korištene su kao negativna, a stanice tretirane s 20 μ M tBHP-om kao pozitivna kontrola. CCCP je korišten kao kontrola depolarizacije mitohondrija. Rezultati su dobiveni iz tri neovisna eksperimenta provedena u triplikatima i izraženi kao postoci u odnosu na negativnu kontrolu. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$), a u odnosu na LD ljestvama (#, $p < 0,05$).

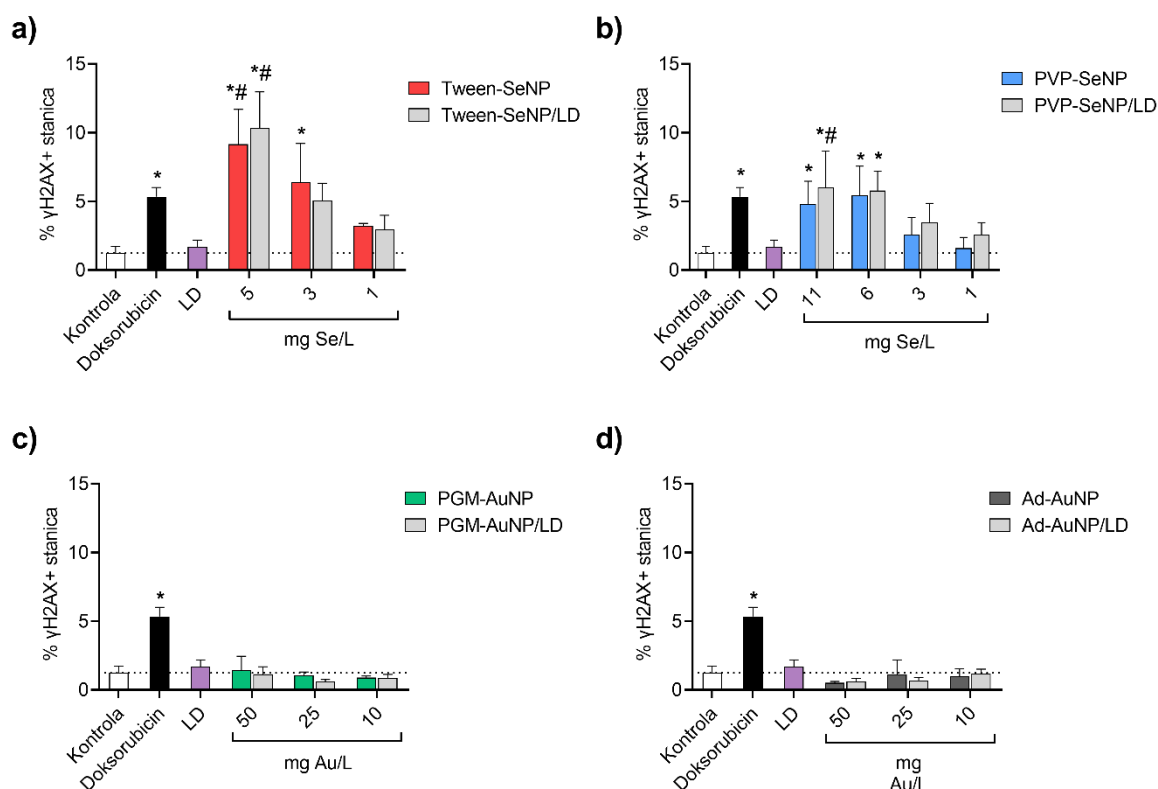
Sveukupno, rezultati ukazuju na dvojako djelovanje SeNP: nakon 4-satnog tretmana, one su kratkotrajno ublažile prooksidativne učinke levodope, dok je 24-satna izloženost dovela do akumulacije ROS-ova. Ovakva razlika u učincima mogla bi biti posljedica oslobađanja i nakupljanja iona selena unutar stanica, koji su često toksičniji od samih nanočestica (86,224). Učinci Tween-SeNP ponovno su bili izraženiji u odnosu na PVP-SeNP, kako je već zabilježeno u testovima preživljenja stanica. Međutim, stvaranje ROS-ova dovelo je do neočekivanog porasta unutarstaničnih razina GSH. Obzirom da su pri navedenim koncentracijama učinci na MMP bili minimalni, moguće je kako se radi o hormetičkom odgovoru na SeNP, prema kojem subcitotoksične razine oksidativnog stresa mogu aktivirati adaptivne mehanizme i pojačati antioksidativnu obranu stanica (225,226).

Nasuprot tome, AuNP su u većini testova bile inertne, bez izraženih prooksidativnih ili protektivnih učinaka, a razlike između pojedinih tipova AuNP bile su minimalne. To sugerira

visoku biokompatibilnost AuNP, u skladu s prethodnim rezultatima te upućuje na to da vrsta stabilizatora u ovom slučaju nema presudnu ulogu u njihovim biološkim učincima.

4.9. Oštećenje DNA

Oštećenje DNA nakon tretmana ispitano je primjenom protočne citometrije. Za detekciju dvolančanih lomova koiršteno je protutijelo usmjereno na γ H2AX, konjugirano fluorescentnom bojom Alexa Fluor 647. Nakon 24-satnog tretmana diferenciranih SH-SY5Y stanica, SeNP uzrokovale su značajno povećanje broja γ H2AX pozitivnih stanica, pri čemu je učinak bio ovisan o koncentraciji (Slika 20a i 19b).



Slika 20. Rezultati analize dvolančanih lomova DNA nakon 24-satnog tretmana diferenciranih SH-SY5Y stanica nanočesticama i njihovim smjesama s levodopom (LD, 50 μ M). Netretirane stanice korištene su kao negativna, a stanice tretirane 0,5 μ M doksorubicinom kao pozitivna kontrola. Rezultati su dobiveni iz dva neovisna eksperimenta provedena u duplikatima i prikazani kao postotak stanica pozitivnih na anti- γ H2AX protutijelo. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$), a u odnosu na LD, ljestvama (#, $p < 0,05$).

Kod Tween-SeNP broj γ H2AX pozitivnih stanica iznosio je oko 10 %, što je više od vrijednosti u pozitivnoj kontroli (5,4 %). PVP-SeNP pokazale su znatno manju genotoksičnost, s 6,0 % i 5,8 % pozitivnih stanica pri koncentracijama od 11 i 5 mg Se/L. Pri manjim koncentracijama obje vrste nanočestica, udio stanica s dvolančanim lomovima bio je neznajčajno veći od kontrolnih stanica, gdje je uočeno 1,2 % pozitivnih stanica. Smjese s levodopom u većini su slučajeva rezultirale nešto većim vrijednostima u usporedbi sa samostalno primijenjenim SeNP. Ovdje, kao i u eksperimentima preživljenja i oksidativnog stresa, Tween-SeNP su pokazale izraženije učinke.

AuNP, kao i njihove smjese s levodopom, nisu dovele do porasta broja γ H2AX pozitivnih stanica, što je i u skladu s dosad prikazanim rezultatima te literaturnim navodima o biokompatibilnosti AuNP. Vrijednosti su bile usporedive ili manje od kontrole, a najveće zabilježene iznosile su 1,1 % za Ad-AuNP i 1,0 % za PGM-AuNP (Slika 20c i 19d). Također, sama levodopa nije značajno povećala broj pozitivnih stanica u odnosu na kontrolu.

Dvolančani lomovi DNA predstavljaju najteži oblik genomskog oštećenja, koji može rezultirati kromosomskim aberacijama, gubitkom genetskog materijala i staničnom smrću (227,228). Njihova je prisutnost nakon tretmana stoga važan pokazatelj potencijalne toksičnosti primijenjenih nanočestica. Uobičajeno, dvolančani lomovi nastaju djelovanjem ionizirajućeg zračenja, genotoksičnih kemikalija ili radiomimetika, ali dostupna literatura jasno pokazuje kako i nanočestice mogu uzrokovati oštećenja DNA, pri čemu se mehanizmi njihove genotoksičnosti mogu svrstati u primarne i sekundarne (229–231). Primarni uključuju izravne interakcije s DNA i pridruženim proteinima te neizravne interakcije posredovane stvaranjem ROS-ova i oksidativnim stresom. Izravna interakcija podrazumijeva ulazak nanočestica u jezgru te vezanje na DNA ili pridružene proteinske komplekse. Obzirom kako analiza konfokalnih slika nije ukazala na prisutnost SeNP u jezgri stanica (Slika 11), možemo zaključiti kako ovaj mehanizam vjerojatno nema vodeću ulogu u opaženim učincima. Taj zaključak dodatno podupiru rezultati za AuNP, koje, unatoč sporadičnoj prisutnosti u jezgri stanica, nisu izazvale oštećenja DNA, čak ni pri najvećim ispitivanim koncentracijama. To upućuje na povećano stvaranje ROS-ova i nastanak oksidativnog stresa kao uzroka dvolančanih lomova. Štoviše, rezultati prikazani u ovome radu jasno pokazuju kako SeNP uzrokuju koncentracijski ovisno povećanje razina ROS-ova, dok AuNP ostaju potpuno inertne nakon 24-satnog tretmana (Slika 16 i Slika 17). Vidljivo je i kako su Tween-SeNP uzrokovale veći porast ROS-ova u odnosu na PVP-SeNP, što se podudara s razinom nastalih DNA oštećenja. Budući da je poticanje oksidativnog stresa jedan od glavnih mehanizama toksičnosti nanočestica (232,233),

a SeNP mogu posjedovati prooksidativna svojstva ovisno o koncentraciji i biološkom kontekstu (234), ovaj mehanizam čini se najvjerojatnijim. Iako su rezultati istraživanja o genotoksičnim učincima SeNP često kontradiktorni, u prilog spomenutoj hipotezi idu i studije koje pokazuju kako spojevi selena i SeNP, te druge vrste nanočestica poput kobalta i titanij dioksida, mogu uzrokovati oštećenja genoma posredovana povećanim stvaranjem ROS-ova, pri čemu je učinak opažen i u subtoksičnim koncentracijama (235–240).

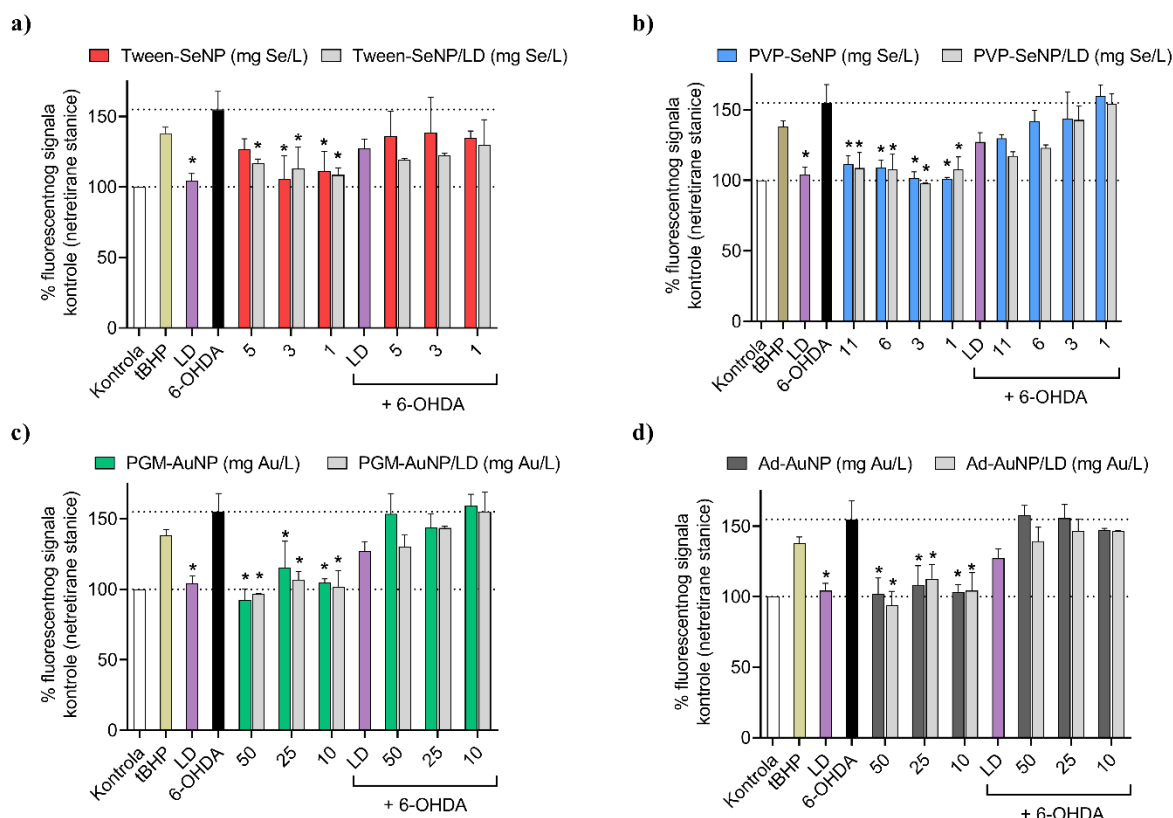
Sveukupno, dobiveni rezultati sugeriraju da oštećenje DNA može prethoditi aktivaciji apoptoze ili nekroze, pri čemu je moguće da bi dulja izloženost “netoksičnim” koncentracijama naposljetku dovela do stanične smrti. Pored toga, moguće je kako su oštećenja DNA nastala prije nego su stanice uspjele aktivirati zaštitne mehanizme potaknute stresom, u skladu s opisanom hormetičkom hipotezom. U tom slučaju, razina nastalih oštećenja mogla bi biti nedovoljna da samostalno izazove smrt stanica, budući da ih mehanizmi popravka DNA uspijevaju učinkovito popraviti (241). Ipak, pojavnost dvolančanih lomova predstavlja ozbiljan i nepoželjan učinak koji dovodi u pitanje dugoročnu sigurnost i potencijalnu primjenjivost ispitivanih SeNP, kao sustava za dostavu lijekova.

4.10. *Protektivni učinci nanočestica*

Kako bi se ispitao mogući protektivni učinak na 6-OHDA-inducirano stvaranje ROS-ova, diferencirane SH-SY5Y stanice su najprije bile predtretirane levodopom, nanočesticama ili njihovim smjesama s levodopom tijekom 16 sati, nakon čega je tretman uklonjen, a stanice su dodatno izložene 40 μ M 6-OHDA tijekom 4 sata, nakon čega je stvaranje ROS-ova procijenjeno DHE testom, vrijednosti unutarstaničnog glutationa mBCL testom, a MMP Rh 123 testom.

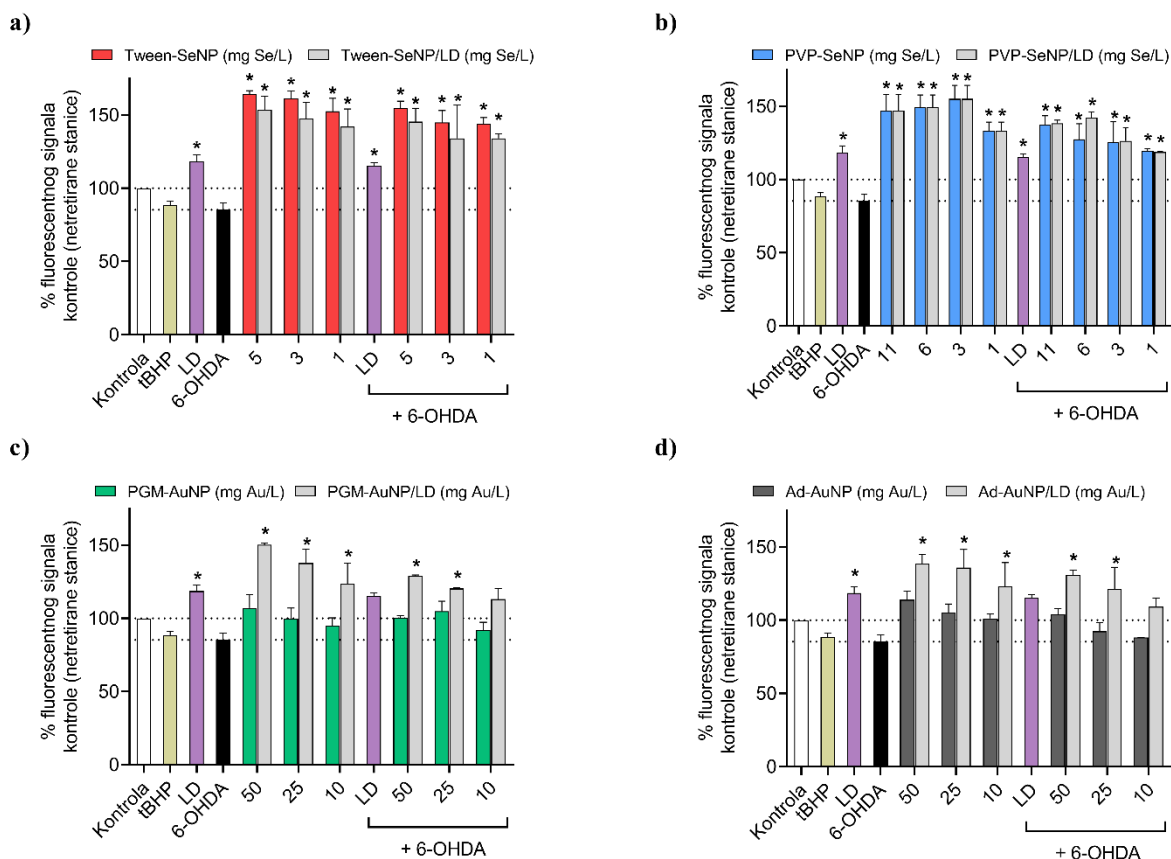
U DHE testu, predtretman levodopom djelomično je ublažio 6-OHDA-om potaknuto stvaranje ROS-ova pri čemu se intenzitet signala smanjio sa 155 % na 127,2 % (Slika 21). SeNP su pokazale sličan obrazac, osobito u kombinaciji s levodopom. Tween-SeNP primijenjene samostalno smanjile su intenzitet fluorescencije na 135 – 138 % negativne kontrole, a u kombinaciji s levodopom vrijednosti su se kretale u rasponu od 119 – 129 % (Slika 21a.) PVP-SeNP su pokazale sličan, koncentracijski ovisan trend (Slika 21b). Međutim, u oba slučaja, rezultati nisu bili statistički značajni.

AuNP samostalno nisu pružile zaštitu od 6-OHDA - intenzitet fluorescencije nije se promijenio u odnosu na tretman 6-OHDA, dok je kombinacija nanočestica i levodope skromno smanjila oksidativni stres potaknut primjenom 6-OHDA (Slika 21c i 20d).



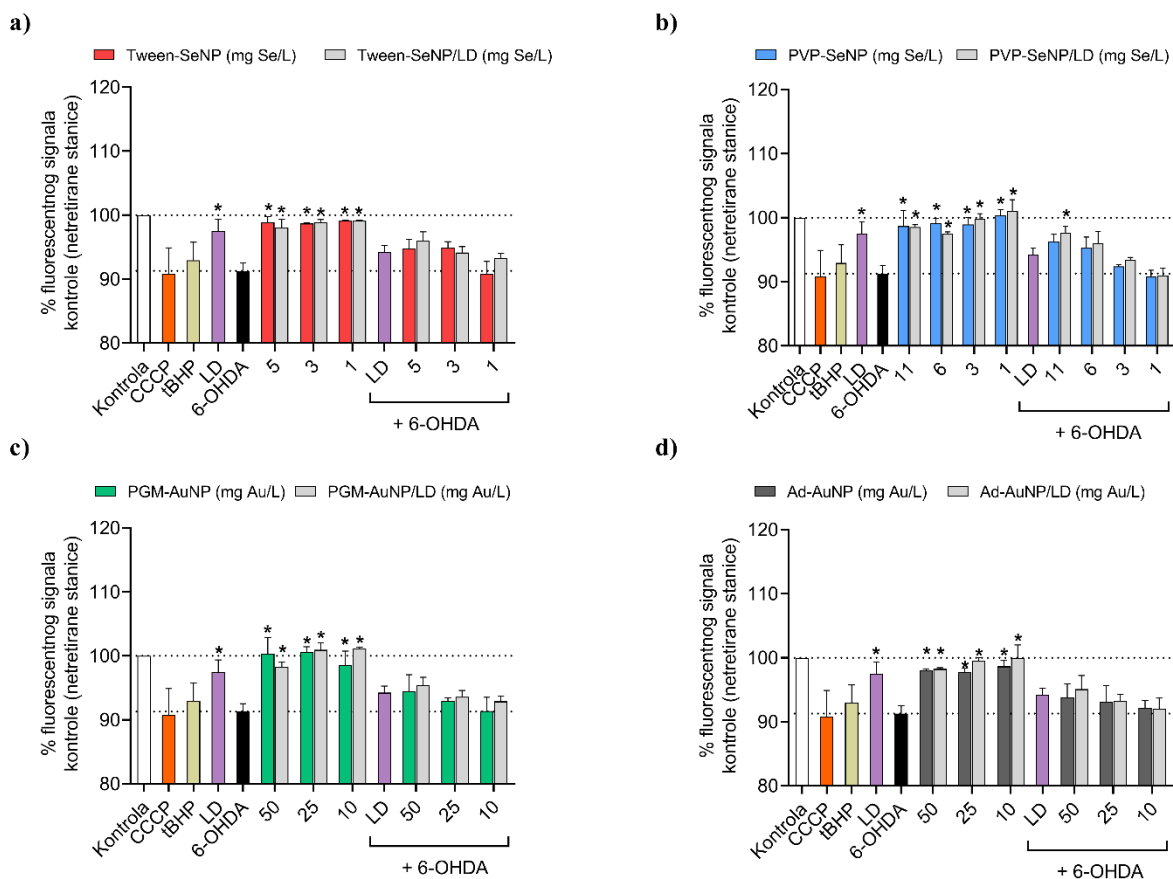
Slika 21. Protektivni učinci nanočestica ili njihovih smjesa s levodopom (LD, 50 μ M), ispitani mjerenjem razina ROS-ova DHE testom, u diferenciranim SH-SY5Y stanicama. Stanice su predtretirane nanočesticama ili njihovim smjesama s levodopom tijekom 16 sati, nakon čega je tretman uklonjen, a dio je stanica dodatno izložen 40 μ M 6-OHDA tijekom 4 sata. Netretirane stanice korištene su kao negativna kontrola. Rezultati su dobiveni iz tri neovisna eksperimenta provedena u duplikatima, a statistički značajne razlike u odnosu na 6-OHDA označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$).

U mBCL testu, izlaganje 6-OHDA-u rezultiralo je smanjenjem unutarstaničnih razina GSH, pri čemu je intenzitet fluorescencije pao na 85,3 % vrijednosti kontrolnih stanica (Slika 22). Predtretman sa SeNP ili levodopom povećao je unutarstanične razine GSH, što je u skladu s prethodno opisanim rezultatima (Slika 18). Nakon dodatnog tretmana sa 6-OHDA zabilježen je pad razina GSH, no vrijednosti su i dalje ostale značajno više u usporedbi s tretmanom čistim 6-OHDA. AuNP samostalno nisu povisile razine GSH, dok je u kombinaciji s levodopom zabilježen izraženiji porast. Nakon tretmana 6-OHDA-om, smjese su pružile određenu razinu zaštite, dok same nanočestice nisu imale zapažen učinak



Slika 22. Protektivni učinci nanočestica ili njihovih smjesa s levodopom (LD, 50 μ M), ispitani mjerenjem razina reduciranog glutationa (GSH) mBCL testom, u diferenciranim SH-SY5Y stanicama, izloženima 6-OHDA-u. Stanice su predtretirane nanočesticama ili njihovim smjesama s levodopom tijekom 16 sati, nakon čega je tretman uklonjen, a dio je stanica dodatno izložen 40 μ M 6-OHDA tijekom 4 sata. Netretirane stanice korištene su kao negativna kontrola. Rezultati su dobiveni iz tri neovisna eksperimenta provedena u duplikatima, a statistički značajne razlike u odnosu na 6-OHDA označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$).

Konačno, u Rh123 testu pokazano je da 4-satni tretman sa 6-OHDA uzrokuje značajnu depolarizaciju mitohondrija, slično kao i kontrole CCCP i tBHP (Slika 23). Samostalni tretmani nanočesticama ili levodopom nisu značajno utjecali na mitohondrijski membranski potencijal. Dodatkom 6-OHDA u stanice predtretirane nanočesticama ili levodopom, došlo je do depolarizacije mitohondrija pri čemu su vrijednosti bile nešto više nego za stanice tretirane sa 6-OHDA. Međutim, statistički značajna razlika uočena je samo za smjesu levodope i PVP-SeNP pri koncentraciji od 11 mg Se/L.

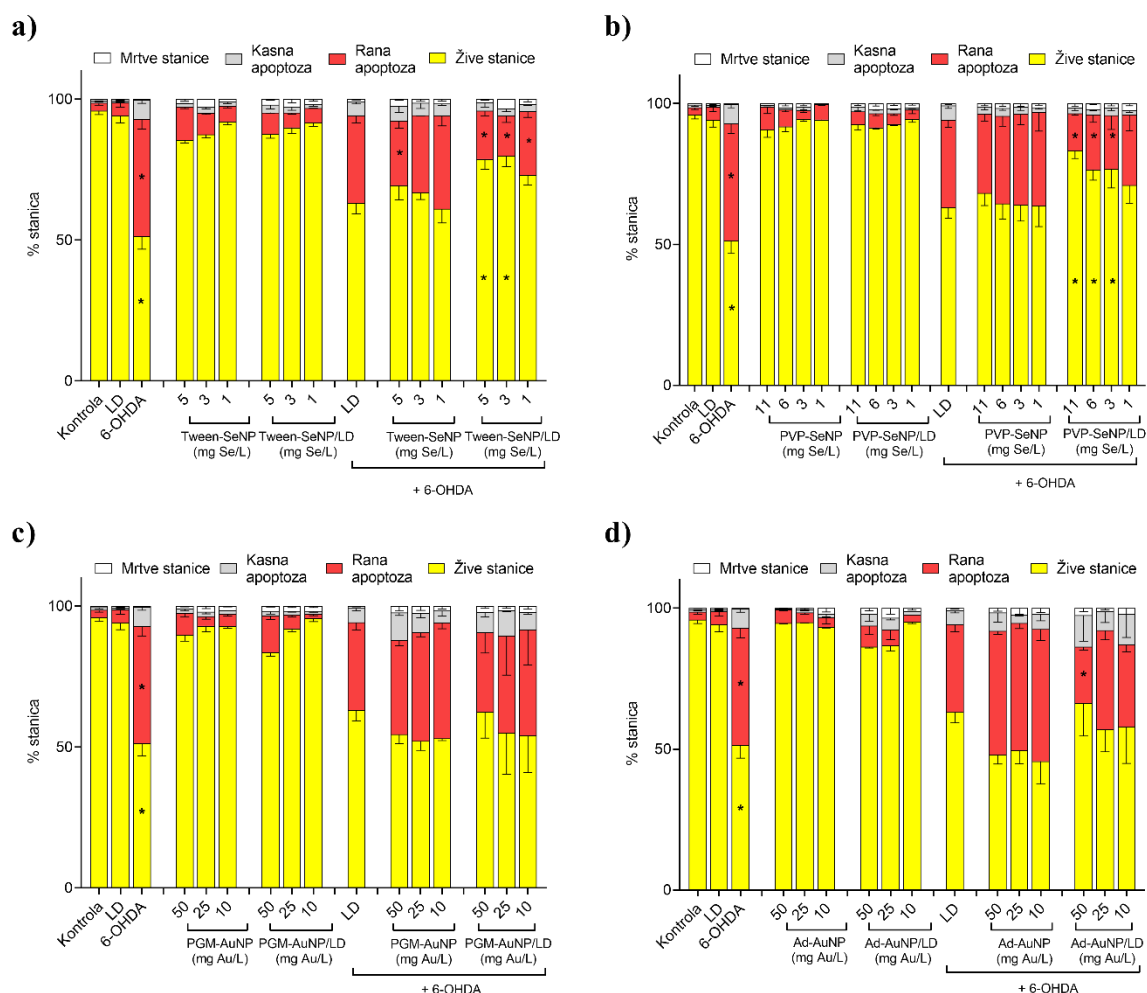


Slika 23. Protektivni učinci nanočestica ili njihovih smjesa s levodopom (LD, 50 μ M), ispitani mjerenjem mitohondrijskog membranskog potencijala Rh 123 testom, u diferenciranim SH-SY5Y stanicama, izloženima 6-OHDA-u. Stanice su predtretirane nanočesticama ili njihovim smjesama s levodopom tijekom 16 sati, nakon čega je tretman uklonjen, a dio je stanica dodatno izložen 40 μ M 6-OHDA tijekom 4 sata. Netretirane stanice korištene su kao negativna kontrola. Rezultati su dobiveni iz tri neovisna eksperimenta provedena u duplikatima, a statistički značajne razlike u odnosu na 6-OHDA označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$).

Kako bi se ispitalo prenose li se uočeni učinci i na najvažniji ishod – preživljenje stanica, protektivni potencijal nanočestica i njihovih smjesa s levodopom dodatno je procijenjen analizom apoptoze i stanične smrti tehnikom protočne citometrije (Slika 24). Diferencirane SH-SY5Y stanice predtretirane su levodopom, nanočesticama ili njihovim smjesama tijekom 16 sati, nakon čega je tretman uklonjen, a stanice su isprane PBS-om i potom izložene LD₅₀ koncentraciji 6-OHDA tijekom 24 sata.

Očekivano, 6-OHDA je pri IC₅₀ koncentraciji značajno smanjio preživljenje stanica: udio živih stanica iznosio je 51,3 %, a rano i kasno apoptotičnih 41,5 % odnosno 6,9 % (Slika 24).

U kontroli, udio živih stanica bio je 95,9 %, uz svega 2,8 % rane i 0,9 % kasne apoptoze. Sama levodopa (50 μ M) nije pokazala toksične učinke uz udio živih stanica od 94,1 %, dok je predtretman levodopom ublažio toksičnost 6-OHDA-a, povećavši udio živih stanica za otprilike 12 % te smanjivši udio rano apoptotičnih stanica za 10 % u odnosu na 6-OHDA.



Slika 24. Protektivni učinci nanočestica i njihovih smjesa s levodopom (LD, 50 μ M) na staničnu smrt i apoptozu diferenciranih SH-SY5Y stanica tretiranih s 6-OHDA-om. Diferencirane SH-SY5Y stanice predtretirane su nanočesticama i smjesama s levodopom tijekom 16 sati, nakon čega je tretman ispran, a dio stanica dodatno je izložen 55 μ M 6-OHDA tijekom 24 sata. Netretirane stanice korištene su kao negativna kontrola. Rezultati su dobiveni iz tri neovisna eksperimenta provedena u duplikatima, a statistički značajne razlike u odnosu na 6-OHDA označene su zvjezdicom (*, $p < 0,05$).

Zaštitu od 6-OHDA pružio je i predtretman sa SeNP, pri čemu je učinak bio izraženiji nego kod levodope. Tween-SeNP povećale su udio živih stanica za 15–18 % i smanjile udio stanica

u ranoj apoptozi za 13–19 %, a statistički značajan učinak zabilježen je pri najvišoj koncentraciji od 5 mg Se/L (Slika 24a). PVP-SeNP pokazale su sličan obrazac – povećale su udio živih stanica za 17–19 % i smanjile udio rano apoptotičnih stanica za 12–15 %, ali bez statističke značajnosti (Slika 24b). Predtretman smjesama nanočestica i levodopom rezultirao je još izraženijim protektivnim učincima u odnosu na pojedinačne tretmane. Tween-SeNP su u kombinaciji s levodopom povećale udio živih stanica za 27–29 %, uz smanjenje rane apoptoze za 20–24 %, dok je smjesa PVP-SeNP i levodope pokazala najsnažniji učinak – povećanje preživljavanja za 30–32 % i smanjenje rane apoptoze za 25–28 % u usporedbi s 6-OHDA.

PGM-AuNP samostalno nisu pokazale protektivne učinke, dok je smjesa s levodopom, pri koncentraciji of 50 mg Au/L, povećala udio živih stanica za 10 – 12 % i smanjila udio apoptotičnih za 8 – 10 %, u odnosu na 6-OHDA (Slika 24c). Ad-AuNP također nisu bile učinkovite kada su primijenjene samostalno, no u kombinaciji s levodopom povećale su udio živih stanica za oko 15 % i smanjile udio apoptotičnih za 13 % u usporedbi s 6-OHDA (Slika 24d). Međutim, ovi učinci bili su varijabilni, statistički neznčajni i usporedivi s onima postignutima samom levodopom pa možemo zaključiti da AuNP nisu uspjele zaštititi diferencirane SH-SY5Y stanice od 6-OHDA.

S druge strane, rezultati jasno ukazuju na potencijal SeNP da zaštite diferencirane SH-SY5Y stanice od toksičnih učinaka 6-OHDA. Protektivni učinci bili su vidljivi u testovima oksidativnog stresa, a dodatno potvrđeni analizom preživljenja stanica. Kao što je već prethodno obrazloženo, oni bi mogli biti posljedica hormetičkog odgovora stanica na SeNP, budući da je i u eksperimentima sa 6-OHDA zabilježen porast razina ROS-ova praćen povećanim razinama GSH. Moguće je kako su SeNP „pripremile“ SH-SY5Y stanice, aktivacijom antioksidativnih mehanizama, čime su stanice postale otpornije na štetna učinke 6-OHDA. Zanimljivo, i sama levodopa je pokazala određene protektivne učinke, dok je njihova kombinacija s nanočesticama rezultirala najizraženijim učinkom, što upućuje na moguće sinergističke ili aditivne učinke. Takav učinak levodope moga bi također biti posljedica adaptivnog odgovora stanica na nisku razinu oštećenja uzrokovanu levodopom, obzirom da je imala slične učinke kao i SeNP u pokusima oksidativnog stresa (242).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

- diferencijacija SH-SY5Y stanica primjenom retinoične kiseline i forbolnih estera rezultirala je fenotipom nalik dopaminergičkim neuronima;
- sve ispitivane nanočestice bile su sferičnog oblika, imale negativan ζ potencijal i bile stabilne u kompletnom staničnom mediju;
- sve ispitivane nanočestice pokazale su sposobnost vezanja levodope, pri čemu je kapacitet vezanja slijedio redoslijed: PGM-AuNP > Ad-AuNP > PVP-SeNP > Tween-SeNP;
- smjese AuNP i levodope bile su nestabilne u ispitanim biološki relevantnim medijima, dok su smjese s SeNP pokazale znatno bolju stabilnost, što je posljedica steričke stabilizacije;
- AuNP i SeNP nisu utjecale na brzinu oslobađanja levodope, odnosno profili oslobađanja bili su jednaki onome čiste otopine levodope;
- AuNP nisu utjecale na preživljenje diferenciranih SH-SY5Y stanica, dok su SeNP pokazale su koncentracijski ovisnu citotoksičnost, pri čemu su Tween-SeNP bile toksičnije od PVP-SeNP;
- pri koncentracijama manjima od IC_{20} vrijednosti, AuNP i SeNP, kao i njihove smjese s levodopom, nisu uzrokovale značajan porast broja apoptotičnih ili nekrotičnih stanica;
- sve vrste nanočestica detektirane su u stanicama, pri čemu je učinkovitost unosa bila veća za PGM-AuNP u odnosu na Ad-AuNP te za Tween-SeNP u odnosu na PVP-SeNP;
- SeNP i njihove smjese s levodopom uzrokovale su koncentracijski ovisan porast ROS-ova uz istodobno povećanje razina GSH, dok su AuNP kao i njihove smjese s levodopom bile inertne;
- AuNP nisu imale genotoksične učinke, dok su SeNP izazvale koncentracijski ovisan porast broja $\gamma H2AX$ pozitivnih stanica;
- u 6-OHDA modelu Parkinsonove bolesti, SeNP su pokazale protektivni učinak, vjerojatno putem hormetičkog odgovora stanica, dok AuNP nisu imale slične učinke;
- kombinacija nanočestica i levodope rezultirala je izraženijim protektivnim učinkom nego pojedinačni tretmani.

6. POPIS LITERATURE

1. El-Kady MM, Ansari I, Arora C, Rai N, Soni S, Verma DK, et al. Nanomaterials: A comprehensive review of applications, toxicity, impact, and fate to environment. *J Mol Liq* 2023;370:121046.
2. Definition of nanomaterial - ECHA, <https://europa.eu/europa/en/definition-of-nanomaterial> (accessed 4 October 2025).
3. Joudeh N, Linke D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *J Nanobiotechnology* 2022;20:262.
4. Domingues C, Santos A, Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A, Jarak I, Veiga F, et al. Where Is Nano Today and Where Is It Headed? A Review of Nanomedicine and the Dilemma of Nanotoxicology. *ACS Nano* 2022;16:9994–10041.
5. Bisso S, Leroux J-C. Nanopharmaceuticals: A focus on their clinical translatability. *Int J Pharm* 2020;578:119098.
6. Barenholz Y. Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release* 2012;160:117–134.
7. Lives saved by COVID-19 vaccines. *J Paediatr Child Health* 2022;:10.1111/jpc.16213.
8. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres M del P, Acosta-Torres LS, et al. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnology* 2018;16:71.
9. Liu Q, Zou J, Chen Z, He W, Wu W. Current research trends of nanomedicines. *Acta Pharm Sin B* 2023;13:4391–4416.
10. Kalia LV, Lang AE. Parkinson's disease. *The Lancet* 2015;386:896–912.
11. Luo Y, Qiao L, Li M, Wen X, Zhang W, Li X. Global, regional, national epidemiology and trends of Parkinson's disease from 1990 to 2021: findings from the Global Burden of Disease Study 2021. *Front Aging Neurosci* 2025;16: Epub ahead of print 10 January 2025. DOI: 10.3389/fnagi.2024.1498756.
12. Antony PMA, Diederich NJ, Krüger R, Balling R. The hallmarks of Parkinson's disease. *FEBS J* 2013;280:5981–5993.
13. Sveinbjornsdottir S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2016;139 Suppl 1:318–324.
14. Schapira AHV, Gegg M. Mitochondrial contribution to Parkinson's disease pathogenesis. *Parkinsons Dis* 2011;2011:159160.
15. Haddad D, Nakamura K. Understanding the susceptibility of dopamine neurons to mitochondrial stressors in Parkinson's disease. *FEBS Lett* 2015;589:3702–3713.

16. Lim K-L, Tan JM. Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease. *BMC Biochem* 2007;8:S13.
17. Zhang Z, Zhang S, Fu P, Zhang Z, Lin K, Ko JK-S, et al. Roles of Glutamate Receptors in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 2019;20:4391.
18. Surmeier DJ, Schumacker PT. Calcium, bioenergetics, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J Biol Chem* 2013;288:10736–10741.
19. Alotaibi S, Alfayez L, Alkhudhair M. Parkinson's Disease: Current Treatment Modalities and Emerging Therapies. *Cureus* 2024;16:e75647.
20. Banks WA, Rhea EM, Reed MJ, Erickson MA. The penetration of therapeutics across the blood-brain barrier: Classic case studies and clinical implications. *Cell Rep Med* 2024;5:101760.
21. Nishijima H, Tomiyama M. What Mechanisms Are Responsible for the Reuptake of Levodopa-Derived Dopamine in Parkinsonian Striatum? *Front Neurosci* 2016;10:575.
22. Oldendorf WH, Szabo J. Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers. *Am J Physiol* 1976;230:94–98.
23. Lopez A, Muñoz A, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. Mechanisms of the effects of exogenous levodopa on the dopamine-denervated striatum. *Neuroscience* 2001;103:639–651.
24. Nutt JG, Fellman JH. Pharmacokinetics of levodopa. *Clin Neuropharmacol* 1984;7:35–49.
25. Xu D, Fang Y, Hu M, Shen Y, Li H, Wei L, et al. The efficacy of levodopa/carbidopa/entacapone on cognitive function in moderate to advanced Parkinson's disease and its relationship with peripheral inflammatory cytokines. *BMC Neurol* 2025;25:116.
26. Freitas ME, Hess CW, Fox SH. Motor Complications of Dopaminergic Medications in Parkinson's Disease. *Semin Neurol* 2017;37:147–157.
27. Weiner WJ. Motor fluctuations in Parkinson's disease. *Rev Neurol Dis* 2006;3:101–108.
28. Manson A, Stirpe P, Schrag A. Levodopa-induced-dyskinesias clinical features, incidence, risk factors, management and impact on quality of life. *J Parkinsons Dis* 2012;2:189–198.
29. Khor S-P, Hsu A. The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Levodopa in the Treatment of Parkinsons Disease. *CCP* 2007;2:234–243.
30. Antonini A, Marano P, Gusmaroli G, Modugno N, Pacchetti C, Sensi M, et al. Long-term effectiveness of levodopa-carbidopa intestinal gel on motor and non-motor symptoms in advanced Parkinson's disease: results of the Italian GLORIA patient population. *Neurol Sci* 2020;41:2929–2937.

31. Fernandez HH, Boyd JT, Fung VSC, Lew MF, Rodriguez RL, Slevin JT, et al. Long-term safety and efficacy of levodopa-carbidopa intestinal gel in advanced Parkinson's disease. *Mov Disord* 2018;33:928–936.
32. Li C-L, Werner P, Cohen G. Lipid Peroxidation in Brain: Interactions of L-DOPA/Dopamine with Ascorbate and Iron. *Neurodegeneration* 1995;4:147–154.
33. Olanow CW, Agid Y, Mizuno Y, Albanese A, Bonucelli U, Damier P, et al. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: Current controversies. *Mov Disord* 2004;19:997–1005.
34. Alexander T, Sortwell CE, Sladek CD, Roth RH, Steece-Collier K. Comparison of Neurotoxicity following Repeated Administration of L-Dopa, D-Dopa, and Dopamine to Embryonic Mesencephalic Dopamine Neurons in Cultures Derived from Fisher 344 and Sprague-Dawley Donors. *Cell Transplant* 1997;6:309–315.
35. Lai C-T, Yu PH. Dopamine- and l- β -3,4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride (l-Dopa)-induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Biochem Pharmacol* 1997;53:363–372.
36. Nakao N, Nakai K, Itakura T. Metabolic inhibition enhances selective toxicity of l-DOPA toward mesencephalic dopamine neurons in vitro. *Brain Research* 1997;777:202–209.
37. Ziv I, Zilkha-Falb R, Offen D, Shirvan A, Barzilai A, Melamed E. Levodopa induces apoptosis in cultured neuronal cells—A possible accelerator of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease? *Movement Disorders* 1997;12:17–23.
38. Mena MA, Casarejos MJ, Carazo A, Paíno CL, de Yébenes JG. Glia protect fetal midbrain dopamine neurons in culture from L-DOPA toxicity through multiple mechanisms. *J Neural Transmission* 1997;104:317–328.
39. Guatteo E, Yee A, McKearney J, Cucchiaroni ML, Armogida M, Berretta N, et al. Dual effects of l-DOPA on nigral dopaminergic neurons. *Exp Neurol* 2013;247:582–594.
40. The Parkinson Study Group null. Levodopa and the Progression of Parkinson's Disease. *N Engl J Med* 2004;351:2498–2508.
41. Hörmann P, Delcambre S, Hanke J, Geffers R, Leist M, Hiller K. Impairment of neuronal mitochondrial function by L-DOPA in the absence of oxygen-dependent auto-oxidation and oxidative cell damage. *Cell Death Discov* 2021;7:1–10.
42. Banerjee A, Qi J, Gogoi R, Wong J, Mitragotri S. Role of Nanoparticle Size, Shape and Surface Chemistry in Oral Drug Delivery. *J Control Release* 2016;238:176–185.
43. Cahyani DM, Mubarak AS, Hariawan BS, Amalina I, Drake P, Parumasivam T, et al. Nanoparticle tools for maximizing oral drug delivery. *Braz J Med Biol Res* ;58:e14459.
44. YU B, TAI HC, XUE W, LEE LJ, LEE RJ. Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. *Mol Membr Biol* 2010;27:286–298.

45. Wu J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *J Pers Med* 2021;11:771.
46. Ahmadi S, Rabiee N, Bagherzadeh M, Elmi F, Fatahi Y, Farjadian F, et al. Stimulus-Responsive Sequential Release Systems for Drug and Gene Delivery. *Nano Today* 2020;34:100914.
47. Hersh AM, Alomari S, Tyler BM. Crossing the Blood-Brain Barrier: Advances in Nanoparticle Technology for Drug Delivery in Neuro-Oncology. *Int J Mol Sci* 2022;23:4153.
48. Gawne PJ, Ferreira M, Papaluca M, Grimm J, Decuzzi P. New opportunities and old challenges in the clinical translation of nanotheranostics. *Nat Rev Mater* 2023;8:783–798.
49. Gressler S, Hipfinger C, Part F, Pavlicek A, Zafiu C, Giese B. A systematic review of nanocarriers used in medicine and beyond — definition and categorization framework. *J Nanobiotechnology* 2025;23:90.
50. Giordani S, Marassi V, Zattoni A, Roda B, Reschiglian P. Liposomes characterization for market approval as pharmaceutical products: Analytical methods, guidelines and standardized protocols. *J Pharm Biomed Anal* 2023;236:115751.
51. Peng Y, Bariwal J, Kumar V, Tan C, Mahato RI. Organic Nanocarriers for Delivery and Targeting of Therapeutic Agents for Cancer Treatment. *Adv Ther (Weinh)* 2020;3:1900136.
52. Agrawal SS, Baliga V, Londhe VY. Liposomal Formulations: A Recent Update. *Pharmaceutics* 2024;17:36.
53. Unnikrishnan G, Joy A, Megha M, Kolanthai E, Senthilkumar M. Exploration of inorganic nanoparticles for revolutionary drug delivery applications: a critical review. *Discov Nano* 2023;18:157.
54. Bhattacharjee K, Prasad BLV. Surface functionalization of inorganic nanoparticles with ligands: a necessary step for their utility. *Chem Soc Rev* 2023;52:2573–2595.
55. De Matteis V. Exposure to Inorganic Nanoparticles: Routes of Entry, Immune Response, Biodistribution and In Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation. *Toxics* 2017;5:29.
56. Poon W, Zhang Y-N, Ouyang B, Kingston BR, Wu JLY, Wilhelm S, et al. Elimination Pathways of Nanoparticles. *ACS Nano* 2019;13:5785–5798.
57. Komsthöft T, Bovone G, Bernhard S, Tibbitt MW. Polymer functionalization of inorganic nanoparticles for biomedical applications. *Curr Opin Chem Eng* 2022;37:100849.
58. Brandenberger C, Mühlfeld C, Ali Z, Lenz A-G, Schmid O, Parak WJ, et al. Quantitative evaluation of cellular uptake and trafficking of plain and polyethylene glycol-coated gold nanoparticles. *Small* 2010;6:1669–1678.

59. Kong F-Y, Zhang J-W, Li R-F, Wang Z-X, Wang W-J, Wang W. Unique Roles of Gold Nanoparticles in Drug Delivery, Targeting and Imaging Applications. *Molecules* 2017;22:1445.
60. Khurana A, Tekula S, Saifi MA, Venkatesh P, Godugu C. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomed Pharmacother* 2019;111:802–812.
61. Waqar MA. A comprehensive review on recent advancements in drug delivery via selenium nanoparticles. *Journal of Drug Targeting* 2025;33:157–170.
62. Kim H-M, Park JH, Choi YJ, Oh J-M, Park J. Hyaluronic acid-coated gold nanoparticles as a controlled drug delivery system for poorly water-soluble drugs. *RSC Adv* 2023;13:5529–5537.
63. Marassi V, Wang J, Giordani S, Placci A, Roda B, Reschiglian P, et al. A direct, real-time, size-resolved analytical strategy to follow drug loading and release from biocompatible gold nanoparticles. *Anal Chim Acta* 2025;1365:344246.
64. Kalčec N, Peranić N, Barbir R, Hall CR, Smith TA, Sani MA, et al. Spectroscopic study of L-DOPA and dopamine binding on novel gold nanoparticles towards more efficient drug-delivery system for Parkinson's disease. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2022;268:120707.
65. Sokolova V, Mekky G, van der Meer SB, Seeds MC, Atala AJ, Epple M. Transport of ultrasmall gold nanoparticles (2 nm) across the blood–brain barrier in a six-cell brain spheroid model. *Sci Rep* 2020;10:18033.
66. Sela H, Cohen H, Elia P, Zach R, Karpas Z, Zeiri Y. Spontaneous penetration of gold nanoparticles through the blood brain barrier (BBB). *J Nanobiotechnol* 2015;13:71.
67. Gromnicova R, Davies HA, Sreekanthreddy P, Romero IA, Lund T, Roitt IM, et al. Glucose-Coated Gold Nanoparticles Transfer across Human Brain Endothelium and Enter Astrocytes In Vitro. *PLoS One* 2013;8:e81043.
68. Gonzalez-Carter DA, Ong ZY, McGilvery CM, Dunlop IE, Dexter DT, Porter AE. L-DOPA functionalized, multi-branched gold nanoparticles as brain-targeted nano-vehicles. *Nanomedicine* 2019;15:1–11.
69. Sharifi M, Faryabi K, Talaei AJ, Shekha MS, Ale-Ebrahim M, Salihi A, et al. Antioxidant properties of gold nanozyme: A review. *J Mol Liq* 2020;297:112004.
70. Vucic S, Kiernan MC. Nanocrystalline gold (CNM-Au8): a novel bioenergetic treatment for ALS. *Expert Opin Investig Drugs* 2023;32:783–785.
71. Ren J, Dewey RB, Rynders A, Evan J, Evan J, Ligozio S, et al. Evidence of brain target engagement in Parkinson's disease and multiple sclerosis by the investigational nanomedicine, CNM-Au8, in the REPAIR phase 2 clinical trials. *J Nanobiotechnology* 2023;21:478.
72. da Silva Córneo E, de Bem Silveira G, Scussel R, Correa MEAB, da Silva Abel J, Luiz GP, et al. Effects of gold nanoparticles administration through behavioral and oxidative

- parameters in animal model of Parkinson's disease. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2020;196:111302.
73. Xue J, Liu T, Liu Y, Jiang Y, Seshadri VDD, Mohan SK, et al. Neuroprotective effect of biosynthesised gold nanoparticles synthesised from root extract of *Paeonia moutan* against Parkinson disease - In vitro & In vivo model. *J Photochem Photobiol B* 2019;200:111635.
 74. van der Vyver S, Mabandla MV, Msibi ZNP. The long-term effects of gold nanoparticles as gene vectors in a 6 hydroxydopamine-induced parkinsonian rat model. *Brain Disord* 2025;17:100195.
 75. Anjum S, Hashim M, Imran M, Babur S, Adnan S, Hano C, et al. Selenium Nanoparticles in Cancer Therapy: Unveiling Cytotoxic Mechanisms and Therapeutic Potential. *Cancer Rep (Hoboken)* 2025;8:e70210.
 76. Vicente-Zurdo D, Rosales-Conrado N, León-González ME. Unravelling the *in vitro* and *in vivo* potential of selenium nanoparticles in Alzheimer's disease: A bioanalytical review. *Talanta* 2024;269:125519.
 77. Umapathy S, Pan I, Issac PK, Kumar MSK, Giri J, Guru A, et al. Selenium Nanoparticles as Neuroprotective Agents: Insights into Molecular Mechanisms for Parkinson's Disease Treatment. *Mol Neurobiol* 2024;: Epub ahead of print 5 June 2024. DOI: 10.1007/s12035-024-04253-x.
 78. Kieliszek M, Bano I, Zare H. A Comprehensive Review on Selenium and Its Effects on Human Health and Distribution in Middle Eastern Countries. *Biol Trace Elem Res* 2022;200:971–987.
 79. Bano I, Skalickova S, Arbab S, Urbankova L, Horky P. Toxicological effects of nanoselenium in animals. *J Anim Sci Biotechnol* 2022;13:72.
 80. Lenz M, Lens PNL. The essential toxin: the changing perception of selenium in environmental sciences. *Sci Total Environ* 2009;407:3620–3633.
 81. Avery JC, Hoffmann PR. Selenium, Selenoproteins, and Immunity. *Nutrients* 2018;10:1203.
 82. Chen J, Berry MJ. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem* 2003;86:1–12.
 83. Tu X, Wu N, Wan Y, Gan J, Liu Z, Song L. Association of dietary selenium intake and all-cause mortality of Parkinson's disease and its interaction with blood cadmium level: a retrospective cohort study. *BMC Geriatrics* 2024;24:415.
 84. Zafar KS, Siddiqui A, Sayeed I, Ahmad M, Salim S, Islam F. Dose-dependent protective effect of selenium in rat model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidences. *J Neurochem* 2003;84:438–446.
 85. Khan HA. Selenium partially reverses the depletion of striatal dopamine and its metabolites in MPTP-treated C57BL mice. *Neurochem Int* 2010;57:489–491.

86. Bhattacharjee A, Basu A, Bhattacharya S. Selenium nanoparticles are less toxic than inorganic and organic selenium to mice in vivo. *Nucleus* 2019;62:259–268.
87. Salaramoli S, Amiri H, Joshaghani HR, Hosseini M, Hashemy SI. Bio-synthesized selenium nanoparticles ameliorate Brain oxidative stress in Parkinson disease rat models. *Metab Brain Dis* 2023;38:2055–2064.
88. Yang L, Wang W, Chen J, Wang N, Zheng G. A comparative study of resveratrol and resveratrol-functional selenium nanoparticles: Inhibiting amyloid β aggregation and reactive oxygen species formation properties. *J Biomed Mater Res A* 2018;106:3034–3041.
89. Vicente-Zurdo D, Rodríguez-Blázquez S, Gómez-Mejía E, Rosales-Conrado N, León-González ME, Madrid Y. Neuroprotective activity of selenium nanoparticles against the effect of amino acid enantiomers in Alzheimer's disease. *Anal Bioanal Chem* 2022;414:7573–7584.
90. Abozaid OAR, Sallam MW, El-Sonbaty S, Aziza S, Emad B, Ahmed ESA. Resveratrol-Selenium Nanoparticles Alleviate Neuroinflammation and Neurotoxicity in a Rat Model of Alzheimer's Disease by Regulating Sirt1/miRNA-134/GSK3 β Expression. *Biol Trace Elem Res* 2022;200:5104–5114.
91. Chen Y, Zhu F, Ou J, Chen J, Liu X, Li R, et al. Mitochondrion-targeted selenium nanoparticles stabilized by *Sargassum fusiforme* polysaccharides increase reactive oxygen species-mediated antitumour activity. *Int J Biol Macromol* 2024;281:136545.
92. Xu K, Huang P, Wu Y, Liu T, Shao N, Zhao L, et al. Engineered Selenium/Human Serum Albumin Nanoparticles for Efficient Targeted Treatment of Parkinson's Disease via Oral Gavage. *ACS Nano* 2023;17:19961–19980.
93. Lopes FM, Bristot IJ, da Motta LL, Parsons RB, Klamt F. Mimicking Parkinson's Disease in a Dish: Merits and Pitfalls of the Most Commonly used Dopaminergic In Vitro Models. *Neuromol Med* 2017;19:241–255.
94. Falkenburger BH, Saridaki T, Dinter E. Cellular models for Parkinson's disease. *J Neurochem* 2016;139:121–130.
95. Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Res* 1978;38:3751–3757.
96. Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegeneration* 2017;12:10.
97. Presgraves SP, Ahmed T, Borwege S, Joyce JN. Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox Res* 2003;5:579–598.
98. Kovalevich J, Santerre M, Langford D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods Mol Biol* 2021;2311:9–23.

99. Wiatrak B, Kubis-Kubiak A, Piwowar A, Barg E. PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells* 2020;9:958.
100. Harris G, Hogberg H, Hartung T, Smirnova L. 3D Differentiation of LUHMES Cell Line to Study Recovery and Delayed Neurotoxic Effects. *Curr Protoc Toxicol* 2017;73: Epub ahead of print August 2017. DOI: 10.1002/cptx.29.
101. Zhang X, Yin M, Zhang M. Cell-based assays for Parkinson's disease using differentiated human LUHMES cells. *Acta Pharmacol Sin* 2014;35:945–956.
102. Scholz D, Pörtl D, Genewsky A, Weng M, Waldmann T, Schildknecht S, et al. Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line. *J Neurochem* 2011;119:957–971.
103. Humpel C. Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience* 2015;305:86–98.
104. Zhang J, Yang H, Wu J, Zhang D, Wang Y, Zhai J. Recent progresses in novel in vitro models of primary neurons: A biomaterial perspective. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10: Epub ahead of print 17 August 2022. DOI: 10.3389/fbioe.2022.953031.
105. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663–676.
106. Valadez-Barba V, Cota-Coronado A, Hernández-Pérez OR, Lugo-Fabres PH, Padilla-Camberos E, Díaz NF, et al. iPSC for modeling neurodegenerative disorders. *Regen Ther* 2020;15:332–339.
107. Chotibut T, Apple DM, Jefferis R, Salvatore MF. Dopamine transporter loss in 6-OHDA Parkinson's model is unmet by parallel reduction in dopamine uptake. *PLoS One* 2012;7:e52322.
108. Latchoumycandane C, Anantharam V, Jin H, Kanthasamy A, Kanthasamy A. Dopaminergic Neurotoxicant 6-OHDA Induces Oxidative Damage through Proteolytic Activation of PKC δ in Cell Culture and Animal Models of Parkinson's Disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;256:314–323.
109. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001;65:135–172.
110. Langston JW. The MPTP Story. *JPD* 2017;7:S11–S19.
111. Sharma P, Mittal P. Paraquat (herbicide) as a cause of Parkinson's Disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2024;119:105932.
112. Ibarra-Gutiérrez MT, Serrano-García N, Orozco-Ibarra M. Rotenone-Induced Model of Parkinson's Disease: Beyond Mitochondrial Complex I Inhibition. *Mol Neurobiol* 2023;60:1929–1948.
113. Kalčec N, Peranić N, Mamić I, Beus M, Hall CR, Smith TA, et al. Selenium Nanoparticles as Potential Drug-Delivery Systems for the Treatment of Parkinson's Disease. *ACS Appl Nano Mater* 2023;6:17581–17592.

114. Li Q, Li X, Zhao C. Strategies to Obtain Encapsulation and Controlled Release of Small Hydrophilic Molecules. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8: Epub ahead of print 13 May 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00437.
115. Midander K, Pan J, Wallinder IO, Leygraf C. Metal release from stainless steel particles in vitro—influence of particle size. *J Environ Monit* 2007;9:74–81.
116. Gómez-Lázaro L, Martín-Sabroso C, Aparicio-Blanco J, Torres-Suárez AI. Assessment of In Vitro Release Testing Methods for Colloidal Drug Carriers: The Lack of Standardized Protocols. *Pharmaceutics* 2024;16:103.
117. Shen J, Burgess DJ. In Vitro Dissolution Testing Strategies for Nanoparticulate Drug Delivery Systems: Recent Developments and Challenges. *Drug Deliv Transl Res* 2013;3:409–415.
118. Yu M, Yuan W, Li D, Schwendeman A, Schwendeman SP. Predicting drug release kinetics from nanocarriers inside dialysis bags. *J Control Release* 2019;315:23–30.
119. Gupta R, Chen Y, Xie H. In vitro dissolution considerations associated with nano drug delivery systems. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2021;13:e1732.
120. Zambito Y, Pedreschi E, Di Colo G. Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems?—A case study. *Int J Pharm* 2012;434:28–34.
121. Sharow KA, Temkin B, Asson-Batres MA. Retinoic acid stability in stem cell cultures. *Int J Dev Biol* 2012;56:273–278.
122. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:research0034.1.
123. Adan A, Kiraz Y, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol* 2016;17:1213–1221.
124. Pietkiewicz S, Schmidt JH, Lavrik IN. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *J Immunol Methods* 2015;423:99–103.
125. Suzuki H, Toyooka T, Ibuki Y. Simple and Easy Method to Evaluate Uptake Potential of Nanoparticles in Mammalian Cells Using a Flow Cytometric Light Scatter Analysis. *Environ Sci Technol* 2007;41:3018–3024.
126. Zucker RM, Massaro EJ, Sanders KM, Degn LL, Boyes WK. Detection of TiO₂ nanoparticles in cells by flow cytometry. *Cytometry A* 2010;77A:677–685.
127. Shin HJ, Kwak M, Kwon IH, Kim SH, Lee JY. Quantification of cellular uptake of gold nanoparticles via scattering intensity changes in flow cytometry. *Nanoscale Adv* 2025;7:3558–3567.
128. Vranic S, Boggetto N, Contremoulins V, Mornet S, Reinhardt N, Marano F, et al. Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate

- evaluation of internalization using imaging flow cytometry. *Particle and Fibre Toxicology* 2013;10:2.
129. FitzGerald LI, Johnston APR. It's what's on the inside that counts: Techniques for investigating the uptake and recycling of nanoparticles and proteins in cells. *J Colloid Interface Sci* 2021;587:64–78.
 130. Cakir-Aktas C, Erdener SE, Teke B, Bozdog Pehlivan S, Zeybek ND, Taskiran-Sag A, et al. Confocal reflectance microscopy for metal and lipid nanoparticle visualization in the brain. *Nanomedicine (Lond)* 2022;17:447–460.
 131. Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med* 1999;27:146–159.
 132. Chen J, Rogers SC, Kavdia M. Analysis of Kinetics of Dihydroethidium Fluorescence with Superoxide Using Xanthine Oxidase and Hypoxanthine Assay. *Ann Biomed Eng* 2013;41:327–337.
 133. Cook JA, Iype SN, Mitchell JB. Differential specificity of monochlorobimane for isozymes of human and rodent glutathione S-transferases. *Cancer Res* 1991;51:1606–1612.
 134. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 2011;50:98–115.
 135. Mah L-J, El-Osta A, Karagiannis TC. gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 2010;24:679–686.
 136. Valdiglesias V, Giunta S, Fenech M, Neri M, Bonassi S. γ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat Res* 2013;753:24–40.
 137. Lim J, Yeap SP, Che HX, Low SC. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Res Lett* 2013;8:381.
 138. Dabbousi BO, Rodriguez-Viejo J, Mikulec FV, Heine JR, Mattoussi H, Ober R, et al. (CdSe)ZnS Core–Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites. *J Phys Chem B* 1997;101:9463–9475.
 139. Eaton P, Quaresma P, Soares C, Neves C, de Almeida MP, Pereira E, et al. A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. *Ultramicroscopy* 2017;182:179–190.
 140. Jiang J, Oberdörster G, Biswas P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J Nanopart Res* 2009;11:77–89.

141. Buford MC, Hamilton RF, Holian A. A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. *Part Fibre Toxicol* 2007;4:6.
142. Sager TM, Porter DW, Robinson VA, Lindsley WG, Schwegler-Berry DE, Castranova V. Improved method to disperse nanoparticles for in vitro and in vivo investigation of toxicity. *Nanotoxicology* 2007;1:118–129.
143. Hughes JM, Budd PM, Grieve A, Dutta P, Tiede K, Lewis J. Highly monodisperse, lanthanide-containing polystyrene nanoparticles as potential standard reference materials for environmental “nano” fate analysis. *Journal of Applied Polymer Science* 2015;132: Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1002/app.42061.
144. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* 2018;10:57.
145. Pochapski DJ, Carvalho dos Santos C, Leite GW, Pulcinelli SH, Santilli CV. Zeta Potential and Colloidal Stability Predictions for Inorganic Nanoparticle Dispersions: Effects of Experimental Conditions and Electrokinetic Models on the Interpretation of Results. *Langmuir* 2021;37:13379–13389.
146. Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnol* 2013;11:26.
147. Gräfe C, Weidner A, Lühe M v. d., Bergemann C, Schacher FH, Clement JH, et al. Intentional formation of a protein corona on nanoparticles: Serum concentration affects protein corona mass, surface charge, and nanoparticle–cell interaction. *Int J Biochem Cell Biol* 2016;75:196–202.
148. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature Nanotech* 2013;8:772–781.
149. Zheng X, Baker H, Hancock WS, Fawaz F, McCaman M, Pungor Jr. E. Proteomic Analysis for the Assessment of Different Lots of Fetal Bovine Serum as a Raw Material for Cell Culture. Part IV. Application of Proteomics to the Manufacture of Biological Drugs. *Biotechnol Prog* 2006;22:1294–1300.
150. Pisani C, Rascol E, Dorandeu C, Gaillard J-C, Charnay C, Guari Y, et al. The species origin of the serum in the culture medium influences the in vitro toxicity of silica nanoparticles to HepG2 cells. *PLoS One* 2017;12:e0182906.
151. Sharaf OZ, Taylor RA, Abu-Nada E. On the colloidal and chemical stability of solar nanofluids: From nanoscale interactions to recent advances. *Phys Rep* 2020;867:1–84.
152. Casals E, Pfaller T, Duschl A, Oostingh GJ, Puentes V. Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona. *ACS Nano* 2010;4:3623–3632.
153. Powers KW, Brown SC, Krishna VB, Wasdo SC, Moudgil BM, Roberts SM. Research Strategies for Safety Evaluation of Nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation. *Toxicol Sci* 2006;90:296–303.

154. OECD. *Guidance Document for the Testing of Dissolution and Dispersion Stability of Nanomaterials, and the Use of the Data for Further Environmental Testing and Assessment*. OECD. Epub ahead of print 20 July 2020. DOI: 10.1787/f0539ec5-en.
155. Phan HT, Haes AJ. What Does Nanoparticle Stability Mean? *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* 2019;123:16495–16507.
156. Lourenco C, Teixeira M, Simões S, Gaspar R. Steric stabilization of nanoparticles: Size and surface properties. *Int J Pharm* 1996;138:1–12.
157. Brown MA, Abbas Z, Kleibert A, Green RG, Goel A, May S, et al. Determination of Surface Potential and Electrical Double-Layer Structure at the Aqueous Electrolyte-Nanoparticle Interface. *Phys Rev X* 2016;6:011007.
158. Morrison ID, Ross S. *Colloidal dispersions : suspensions, emulsions, and foams*. Wiley, <https://cir.nii.ac.jp/crid/1970586434933200140> (2002, accessed 4 September 2025).
159. Hierrezuelo J, Sadeghpour A, Szilagyi I, Vaccaro A, Borkovec M. Electrostatic Stabilization of Charged Colloidal Particles with Adsorbed Polyelectrolytes of Opposite Charge. *Langmuir* 2010;26:15109–15111.
160. Yu M, Xue Y, Ma PX, Mao C, Lei B. Intrinsic Ultrahigh Drug/miRNA Loading Capacity of Biodegradable Bioactive Glass Nanoparticles toward Highly Efficient Pharmaceutical Delivery. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017;9:8460–8470.
161. Xiong W, Li L, Wang Y, Yu Y, Wang S, Gao Y, et al. Design and evaluation of a novel potential carrier for a hydrophilic antitumor drug: Auricularia auricular polysaccharide-chitosan nanoparticles as a delivery system for doxorubicin hydrochloride. *International Journal of Pharmaceutics* 2016;511:267–275.
162. Magenheimer B, Levy MY, Benita S. A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers - ultrafiltration technique at low pressure. *International Journal of Pharmaceutics* 1993;94:115–123.
163. Fu Y, Kao WJ. Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non-degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems. *Expert Opin Drug Deliv* 2010;7:429–444.
164. Avola R, Graziano ACE, Pannuzzo G, Albouchi F, Cardile V. New insights on Parkinson's disease from differentiation of SH-SY5Y into dopaminergic neurons: An involvement of aquaporin4 and 9. *Mol Cell Neurosci* 2018;88:212–221.
165. Coyle JT, Snyder SH. Antiparkinsonian drugs: inhibition of dopamine uptake in the corpus striatum as a possible mechanism of action. *Science* 1969;166:899–901.
166. Ryan RM, Ingram SL, Scimemi A. Regulation of Glutamate, GABA and Dopamine Transporter Uptake, Surface Mobility and Expression. *Front Cell Neurosci* 2021;15: Epub ahead of print 13 April 2021. DOI: 10.3389/fncel.2021.670346.
167. German CL, Baladi MG, McFadden LM, Hanson GR, Fleckenstein AE. Regulation of the Dopamine and Vesicular Monoamine Transporters: Pharmacological Targets and Implications for Disease. *Pharmacol Rev* 2015;67:1005–1024.

168. Redman PT, Jefferson BS, Ziegler CB, Mortensen OV, Torres GE, Levitan ES, et al. A vital role for voltage-dependent potassium channels in dopamine transporter-mediated 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Neuroscience* 2006;143:1–6.
169. Van Kampen JM, McGeer EG, Stoessl AJ. Dopamine transporter function assessed by antisense knockdown in the rat: protection from dopamine neurotoxicity. *Synapse* 2000;37:171–178.
170. Luthman J, Fredriksson A, Sundström E, Jonsson G, Archer T. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res* 1989;33:267–277.
171. Reyes S, Cottam V, Kirik D, Double KL, Halliday GM. Variability in neuronal expression of dopamine receptors and transporters in the substantia nigra. *Mov Disord* 2013;28:1351–1359.
172. Adell A, Artigas F. The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci Biobehav Rev* 2004;28:415–431.
173. Hisahara S, Shimohama S. Dopamine Receptors and Parkinson's Disease. *Int J Med Chem* 2011;2011:403039.
174. Radwitz J, Hausrat TJ, Heisler FF, Janiesch PC, Pechmann Y, Rübhausen M, et al. Tubb3 expression levels are sensitive to neuronal activity changes and determine microtubule growth and kinesin-mediated transport. *Cell Mol Life Sci* 2022;79:575.
175. Lee MK, Tuttle JB, Rebhun LI, Cleveland DW, Frankfurter A. The expression and posttranslational modification of a neuron-specific β -tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motil* 1990;17:118–132.
176. Ferreira A, Caceres A. Expression of the class III beta-tubulin isotype in developing neurons in culture. *J Neurosci Res* 1992;32:516–529.
177. Korzhevskii DE, Karpenko MN, Kirik OV. Microtubule-Associated Proteins as Indicators of Differentiation and the Functional State of Nerve Cells. *Neurosci Behav Physi* 2012;42:215–222.
178. Marei HES, El-Gamal A, Althani A, Afifi N, Abd-Elmaksoud A, Farag A, et al. Cholinergic and dopaminergic neuronal differentiation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2018;233:936–945.
179. Kaushik P, Gorin F, Vali S. Dynamics of tyrosine hydroxylase mediated regulation of dopamine synthesis. *J Comput Neurosci* 2007;22:147–160.
180. Yang H, Wang J, Wang F, Liu X, Chen H, Duan W, et al. Dopaminergic Neuronal Differentiation from the Forebrain-Derived Human Neural Stem Cells Induced in Cultures by Using a Combination of BMP-7 and Pramipexole with Growth Factors. *Front Neural Circuits* 2016;10:29.
181. Lohr KM, Bernstein AI, Stout KA, Dunn AR, Lazo CR, Alter SP, et al. Increased vesicular monoamine transporter enhances dopamine release and opposes Parkinson

- disease-related neurodegeneration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:9977–9982.
182. Sakano D, Uefune F, Tokuma H, Sonoda Y, Matsuura K, Takeda N, et al. VMAT2 Safeguards β -Cells Against Dopamine Cytotoxicity Under High-Fat Diet–Induced Stress. *Diabetes* 2020;69:2377–2391.
 183. Weng M, Xie X, Liu C, Lim K-L, Zhang C, Li L. The Sources of Reactive Oxygen Species and Its Possible Role in the Pathogenesis of Parkinson’s Disease. *Parkinsons Dis* 2018;2018:9163040.
 184. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 2012;13:227–232.
 185. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 2011;473:337–342.
 186. Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol* 2005;20:665–671.
 187. Lopes FM, Schröder R, Júnior MLCDF, Zanotto-Filho A, Müller CB, Pires AS, et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Research* 2010;1337:85–94.
 188. Teppola H, Sarkanen J-R, Jalonon TO, Linne M-L. Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. *Neurochem Res* 2016;41:731–747.
 189. Dravid A, Raos B, Svirskis D, O’Carroll SJ. Optimised techniques for high-throughput screening of differentiated SH-SY5Y cells and application for neurite outgrowth assays. *Sci Rep* 2021;11:23935.
 190. Fang J, Kuwamoto W, Miranda G, Rajagopalan V, Elul T. Quantifying Morphology of a Differentiating Neuroblastoma Cell Line. *MicroPubl Biol* ;2024:10.17912/micropub.biology.001099.
 191. Andraos C, Yu IJ, Gulumian M. Interference: A Much-Neglected Aspect in High-Throughput Screening of Nanoparticles. *Int J Toxicol* 2020;39:397–421.
 192. Kalčec N, Peranić N, Barbir R, Hall CR, Smith TA, Sani MA, et al. Spectroscopic study of L-DOPA and dopamine binding on novel gold nanoparticles towards more efficient drug-delivery system for Parkinson’s disease. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2022;268:120707.
 193. Karakaş D, Ari F, Ulukaya E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turk J Biol* 2017;41:919–925.
 194. Lim S-W, Loh H-S, Ting K-N, Bradshaw TD, Allaudin ZN. Reduction of MTT to Purple Formazan by Vitamin E Isomers in the Absence of Cells. *Trop Life Sci Res* 2015;26:111–120.

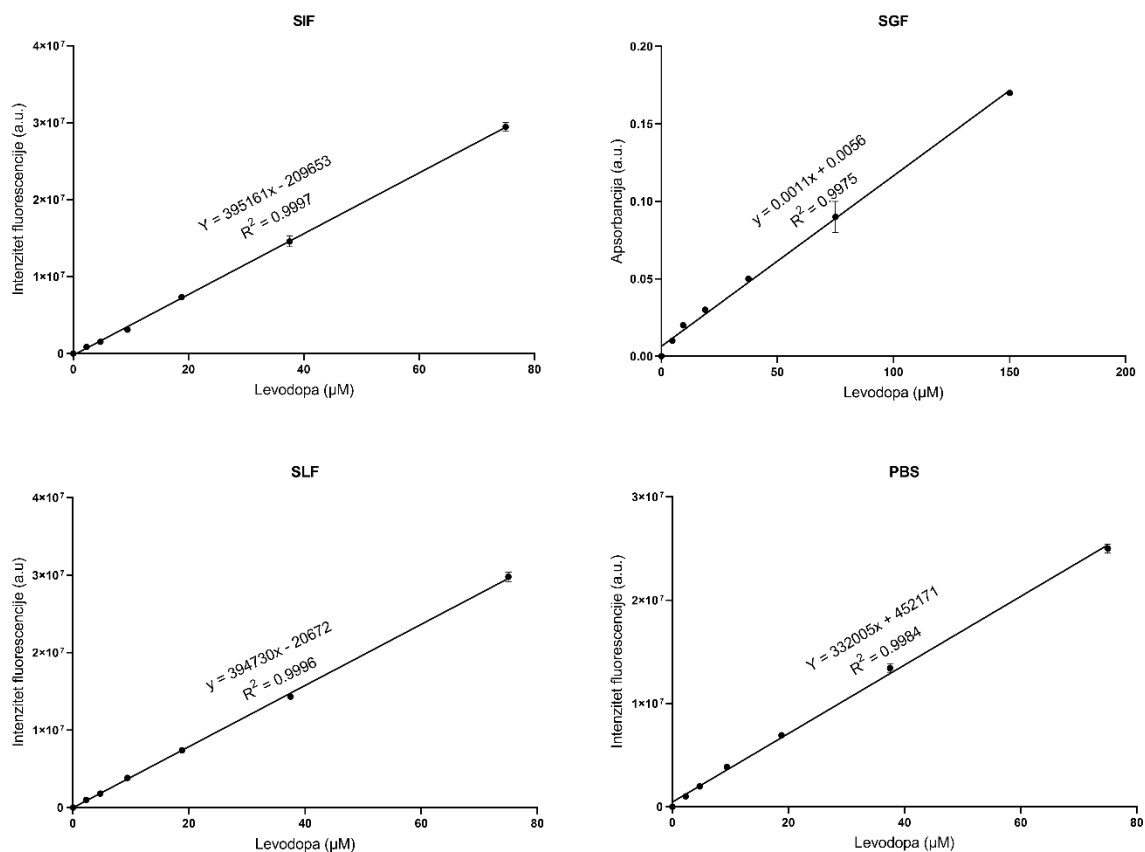
195. Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res* 2010;12:2313–2333.
196. Alkilany AM, Murphy CJ. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res* 2010;12:2313–2333.
197. Jakic K, Selc M, Razga F, Nemethova V, Mazancova P, Havel F, et al. Long-Term Accumulation, Biological Effects and Toxicity of BSA-Coated Gold Nanoparticles in the Mouse Liver, Spleen, and Kidneys. *IJN* 2024;19:4103–4120.
198. Liu Y, Li X, Xiao S, Liu X, Chen X, Xia Q, et al. The Effects of Gold Nanoparticles on Leydig Cells and Male Reproductive Function in Mice. *Int J Nanomedicine* 2020;15:9499–9514.
199. Chen Y-S, Hung Y-C, Liao I, Huang GS. Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* 2009;4:858.
200. Vicente-Zurdo D, Gómez-Gómez B, Romero-Sánchez I, Rosales-Conrado N, León-González ME, Madrid Y. Cytotoxicity, uptake and accumulation of selenium nanoparticles and other selenium species in neuroblastoma cell lines related to Alzheimer's disease by using cytotoxicity assays, TEM and single cell-ICP-MS. *Anal Chim Acta* 2023;1249:340949.
201. Varlamova EG, Goltyaev MV, Mal'tseva VN, Turovsky EA, Sarimov RM, Simakin AV, et al. Mechanisms of the Cytotoxic Effect of Selenium Nanoparticles in Different Human Cancer Cell Lines. *Int J Mol Sci* 2021;22:7798.
202. Abbasi R, Shineh G, Mobaraki M, Doughty S, Tayebi L. Structural parameters of nanoparticles affecting their toxicity for biomedical applications: a review. *J Nanopart Res* 2023;25:43.
203. Chen Y, Stoll S, Sun H, Liu X, Liu W, Leng X. Stability and surface properties of selenium nanoparticles coated with chitosan and sodium carboxymethyl cellulose. *Carbohydr Polym* 2022;278:118859.
204. Selmani A, Ulm L, Kasemets K, Kurvet I, Erceg I, Barbir R, et al. Stability and toxicity of differently coated selenium nanoparticles under model environmental exposure settings. *Chemosphere* 2020;250:126265.
205. Navarro JRG, Werts MHV. Resonant light scattering spectroscopy of gold, silver and gold–silver alloy nanoparticles and optical detection in microfluidic channels. *Analyst* 2012;138:583–592.
206. Johnston APR. Life Under the Microscope: Quantifying Live Cell Interactions to Improve Nanoscale Drug Delivery. *ACS Sens* 2017;2:4–9.
207. Dunn AK, Smithpeter C, Welch AJ, Richards-Kortum R. Sources of contrast in confocal reflectance imaging. *Appl Opt* 1996;35:3441–3446.
208. Guggenheim EJ, Lynch I, Rappoport JZ. Imaging In focus: Reflected light imaging: Techniques and applications. *Int J Biochem* 2017;83:65–70.

209. Huo S, Jin S, Ma X, Xue X, Yang K, Kumar A, et al. Ultrasmall Gold Nanoparticles as Carriers for Nucleus-Based Gene Therapy Due to Size-Dependent Nuclear Entry. *ACS Nano* 2014;8:5852–5862.
210. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med* 2007;43:995–1022.
211. Tarpey MM, Fridovich I. Methods of Detection of Vascular Reactive Species. *Circ Res* 2001;89:224–236.
212. Yazdani M. Concerns in the application of fluorescent probes DCDHF-DA, DHR 123 and DHE to measure reactive oxygen species *in vitro*. *Toxicol In Vitro* 2015;30:578–582.
213. Spencer JP, Jenner P, Halliwell B. Superoxide-dependent depletion of reduced glutathione by L-DOPA and dopamine. Relevance to Parkinson's disease. *Neuroreport* 1995;6:1480–1484.
214. Brady NR, Elmore SP, Beek JJHGM van, Krab K, Courtoy PJ, Hue L, et al. Coordinated Behavior of Mitochondria in Both Space and Time: A Reactive Oxygen Species-Activated Wave of Mitochondrial Depolarization. *Biophys J* 2004;87:2022–2034.
215. Lou-Franco J, Das B, Elliott C, Cao C. Gold Nanozymes: From Concept to Biomedical Applications. *Nano-Micro Lett* 2020;13:10.
216. Lee H-L, Chuang YC, Tsai J-T, Chen Y-C, Wu P-H, Lo L-W, et al. Gold Nanodandelions as Nanozymes and Reactive Oxygen Species Scavengers in Tumor Microenvironment Components. *ACS Appl Nano Mater* 2023;6:21359–21370.
217. He W, Zhou Y-T, Wamer WG, Hu X, Wu X, Zheng Z, et al. Intrinsic catalytic activity of Au nanoparticles with respect to hydrogen peroxide decomposition and superoxide scavenging. *Biomaterials* 2013;34:765–773.
218. Liu C-P, Wu T-H, Lin Y-L, Liu C-Y, Wang S, Lin S-Y. Tailoring Enzyme-Like Activities of Gold Nanoclusters by Polymeric Tertiary Amines for Protecting Neurons Against Oxidative Stress. *Small* 2016;12:4127–4135.
219. Robinson AP, Zhang JZ, Titus HE, Karl M, Merzliakov M, Dorfman AR, et al. Nanocatalytic activity of clean-surfaced, faceted nanocrystalline gold enhances remyelination in animal models of multiple sclerosis. *Sci Rep* 2020;10:1936.
220. Chen X, Zhu X, Gong Y, Yuan G, Cen J, Lie Q, et al. Porous selenium nanozymes targeted scavenging ROS synchronize therapy local inflammation and sepsis injury. *Appl Mater Today* 2021;22:100929.
221. Grudniak A, Folcik J, Szmytke J, Sentkowska A. Mechanism of Antioxidant Activity of Selenium Nanoparticles Obtained by Green and Chemical Synthesis. *Int J Nanomedicine* 2025;20:2797–2811.

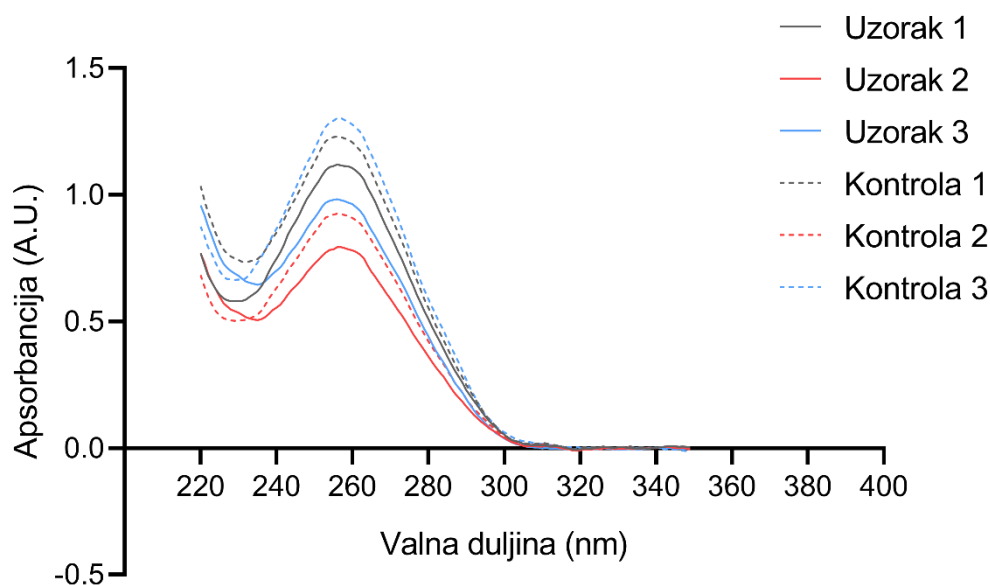
222. Gu W-J, Zhao F-Z, Huang W, Zhu M-G, Huang H-Y, Yin H-Y, et al. Selenium nanoparticles activate selenoproteins to mitigate septic lung injury through miR-20b-mediated ROR γ t/STAT3/Th17 axis inhibition and enhanced mitochondrial transfer in BMSCs. *J Nanobiotechnology* 2025;23:226.
223. Zhang J-S, Gao X-Y, Zhang L-D, Bao Y-P. Biological effects of a nano red elemental selenium. *BioFactors* 2001;15:27–38.
224. Wang H, Zhang J, Yu H. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: Comparison with selenomethionine in mice. *Free Radic Biol Med* 2007;42:1524–1533.
225. Mattson MP. Hormesis Defined. *Ageing Res Rev* 2008;7:1–7.
226. Iavicoli I, Leso V, Fontana L, Calabrese EJ. Nanoparticle Exposure and Hormetic Dose–Responses: An Update. *Int J Mol Sci* 2018;19:805.
227. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001;27:247–254.
228. Bassing CH, Alt FW. The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:781–796.
229. Shukla RK, Badiye A, Vajpayee K, Kapoor N. Genotoxic Potential of Nanoparticles: Structural and Functional Modifications in DNA. *Front Genet* 2021;12:728250.
230. Gonzalez L, Lison D, Kirsch-Volders M. Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. *Nanotoxicology* 2008;2:252–273.
231. Schins RPF, Knaapen AM. Genotoxicity of Poorly Soluble Particles. *Inhal Toxicol* 2007;19:189–198.
232. Fu PP, Xia Q, Hwang H-M, Ray PC, Yu H. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *J Food Drug Anal* ;22:64–75.
233. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Biomed Res Int* 2013;2013:942916.
234. Zhao G, Wu X, Chen P, Zhang L, Yang CS, Zhang J. Selenium nanoparticles are more efficient than sodium selenite in producing reactive oxygen species and hyper-accumulation of selenium nanoparticles in cancer cells generates potent therapeutic effects. *Free Radic Biol Med* 2018;126:55–66.
235. Wan R, Mo Y, Feng L, Chien S, Tollerud DJ, Zhang Q. DNA Damage Caused by Metal Nanoparticles: the Involvement of Oxidative Stress and Activation of ATM. *Chem Res Toxicol* 2012;25:1402–1411.
236. Naz S, Bibi G, Nadeem R, A. Alhidary I, Dai S, Israr M, et al. Evaluation of biological selenium nanoparticles on growth performance, histopathology of vital organs and genotoxicity in Japanese quails (*coturnix coturnix japonica*). *Vet Q* 2024;44:1–10.

237. Wu M, Kang MM, Schoene NW, Cheng W-H. Selenium compounds activate early barriers of tumorigenesis. *J Biol Chem* 2010;285:12055–12062.
238. Kansara K, Patel P, Shah D, Shukla RK, Singh S, Kumar A, et al. TiO₂ nanoparticles induce DNA double strand breaks and cell cycle arrest in human alveolar cells. *Environ Mol Mutagen* 2015;56:204–217.
239. Poier N, Hochstöger J, Hackenberg S, Scherzad A, Bregenzer M, Schopper D, et al. Effects of Zinc Oxide Nanoparticles in HUVEC: Cyto- and Genotoxicity and Functional Impairment After Long-Term and Repetitive Exposure in vitro. *Int J Nanomedicine* 2020;15:4441–4452.
240. Shamberger RJ. The genotoxicity of selenium. *Mutat Res Rev Mutat Res* 1985;154:29–48.
241. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009;461:1071–1078.
242. Han SK, Mytilineou C, Cohen G. L-DOPA up-regulates glutathione and protects mesencephalic cultures against oxidative stress. *J Neurochem* 1996;66:501–510.

7. PRILOZI



Slika P1. Standardne krivulje levodope u umjetnoj intestinalnoj tekućini (SIF), umjetnoj želučanoj tekućini (SGF), umjetnoj lizosomalnoj tekućini (SLF) i fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom (PBS) korištene. Iznad svakog grafičkog prikaza naznačen je medij, dok su iznad regresijskih pravaca navedene njihove jednadžbe.



Slika P2. Apsorpcijski spektar ukupne RNA izolirane iz diferenciranih (uzorak) i nediferenciranih (kalibrator) SH-SY5Y stanica, snimljen na uređaju NanoDrop 8000.

Tablica P1. Koncentracija i čistoća ukupne RNA izolirane iz diferenciranih (uzorak) i nediferenciranih (kalibrator) stanica, određena NanoDrop 8000 spektrofotometrom.

Naziv uzorka	Koncentracija (ng/μL)	A260	A280	A230	260/280	260/230
Uzorak 1	44,5	1,111	0,542	0,58	2,05	1,92
Kalibrator1	48,6	1,216	0,587	0,749	2,07	1,62
Uzorak 2	31,4	0,784	0,386	0,541	2,03	1,45
Kalibrator 2	36,6	0,914	0,449	0,503	2,04	1,82
Uzorak 3	38,7	0,967	0,47	0,689	2,06	1,40
Kalibrator 3	51,5	1,287	0,624	0,664	2,06	1,94

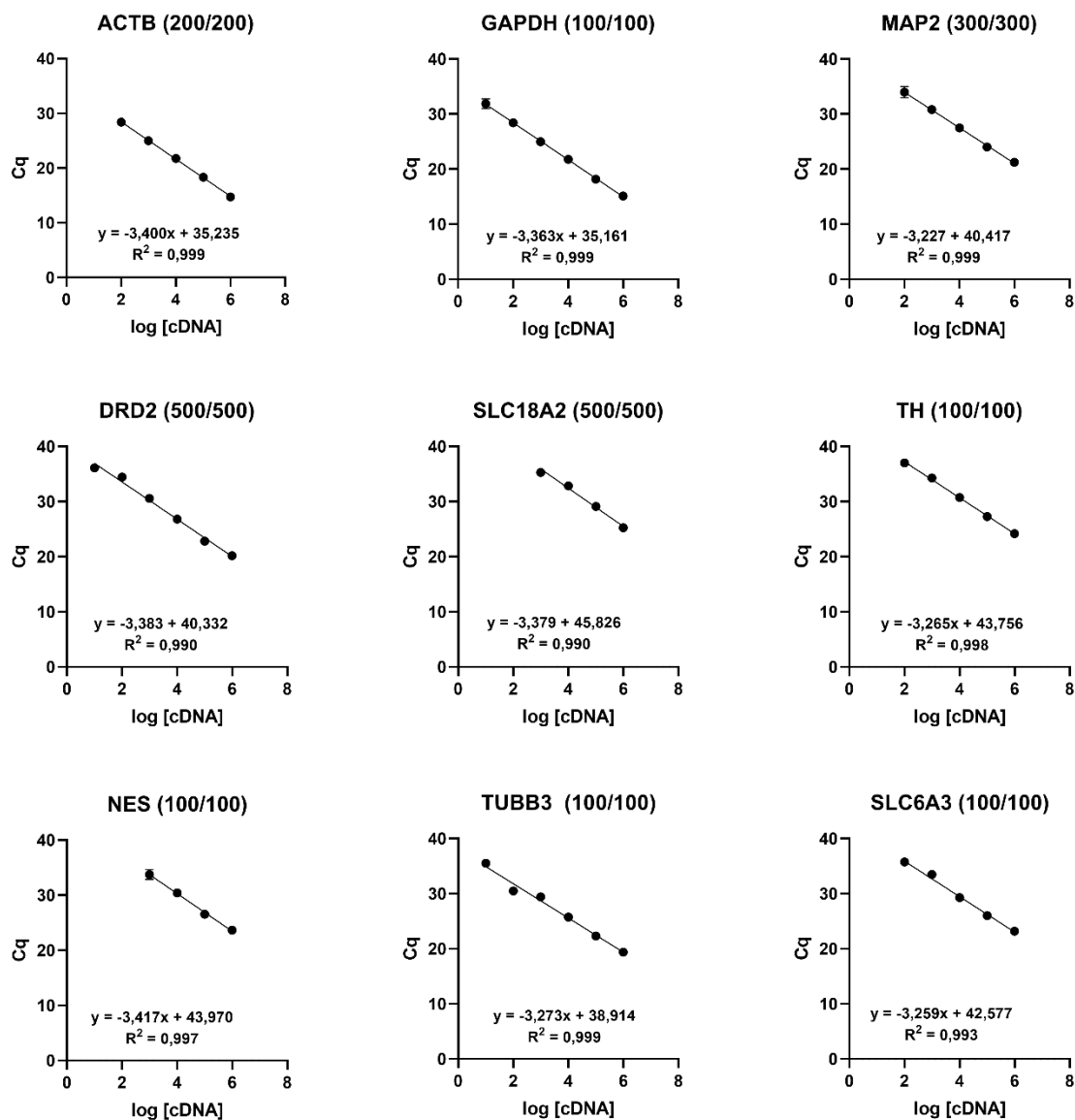
Tablica P2. Sljedovi početnica korišteni u qPCR analizi.

Gen		Slijed početnice (5' - 3')
<i>GAPDH</i>	Uzvodna	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC
	Nizvodna	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA
<i>ACTB</i>	Uzvodna	CACTCTTCCAGCCTTCCTTCC
	Nizvodna	AGGTCTTTGCGGATGTCCAC
<i>SLC18A2</i>	Uzvodna	CGGAAGCTCATCCTGTTCATC
	Nizvodna	ACGACAGTGAGCAGCATGTTG
<i>SLC6A3</i>	Uzvodna	GCCTGCTTGCTGATATTGCAGT
	Nizvodna	TGGCCAACATCCTTCACTCA
<i>DRD2</i>	Uzvodna	GGAAATTCAGCAGGATTCAGT

	Nizvodna	ATGCTGATGGCACACAAGTTC
<i>TH</i>	Uzvodna	GTGAGGTTGTGCTGCCTGT
	Nizvodna	CTTTTATTGTGACGGTGATTGG
<i>MAP-2</i>	Uzvodna	AGGCTGTAGCAGTCCTGAAAGG
	Nizvodna	CTTCCTCCACTGTGACAGTCTG
<i>TUBB3</i>	Uzvodna	CCCAGCGGCAACTACGTGGG
	Nizvodna	GTTGTTGCCGGCCCCACTCT
<i>NES</i>	Uzvodna	CTCAGGTCCTGGAAGGTCG
	Nizvodna	AAAGCTGAGGGAAGTCTTGGAG

Tablica P3. Koncentracije početnica, nagib standardne krivulje i učinkovitost umnažanja za sve ispitane gene. E – učinkovitost umnažanja (engl. *amplification efficiency*).

Gen	U/N (nM)	Nagib	R ²	E	
				%	
<i>DRD2</i>	500/500	-3,383	0,990	1,98	97,5
<i>SLC18A2</i>	500/500	-3,379	0,990	1,98	97,7
<i>SLC6A3</i>	100/100	-3,259	0,993	2,03	102,7
<i>TH</i>	100/100	-3,265	0,999	2,02	102,5
<i>NES</i>	100/100	-3,417	0,997	1,96	96,2
<i>TUBB3</i>	100/100	-3,273	0,999	2,02	102,1
<i>MAP-2</i>	300/300	-3,227	0,999	2,04	104,1
<i>GAPDH</i>	100/100	-3,363	0,999	1,98	98,3
<i>ACTB</i>	200/200	-3,400	0,999	1,97	96,8

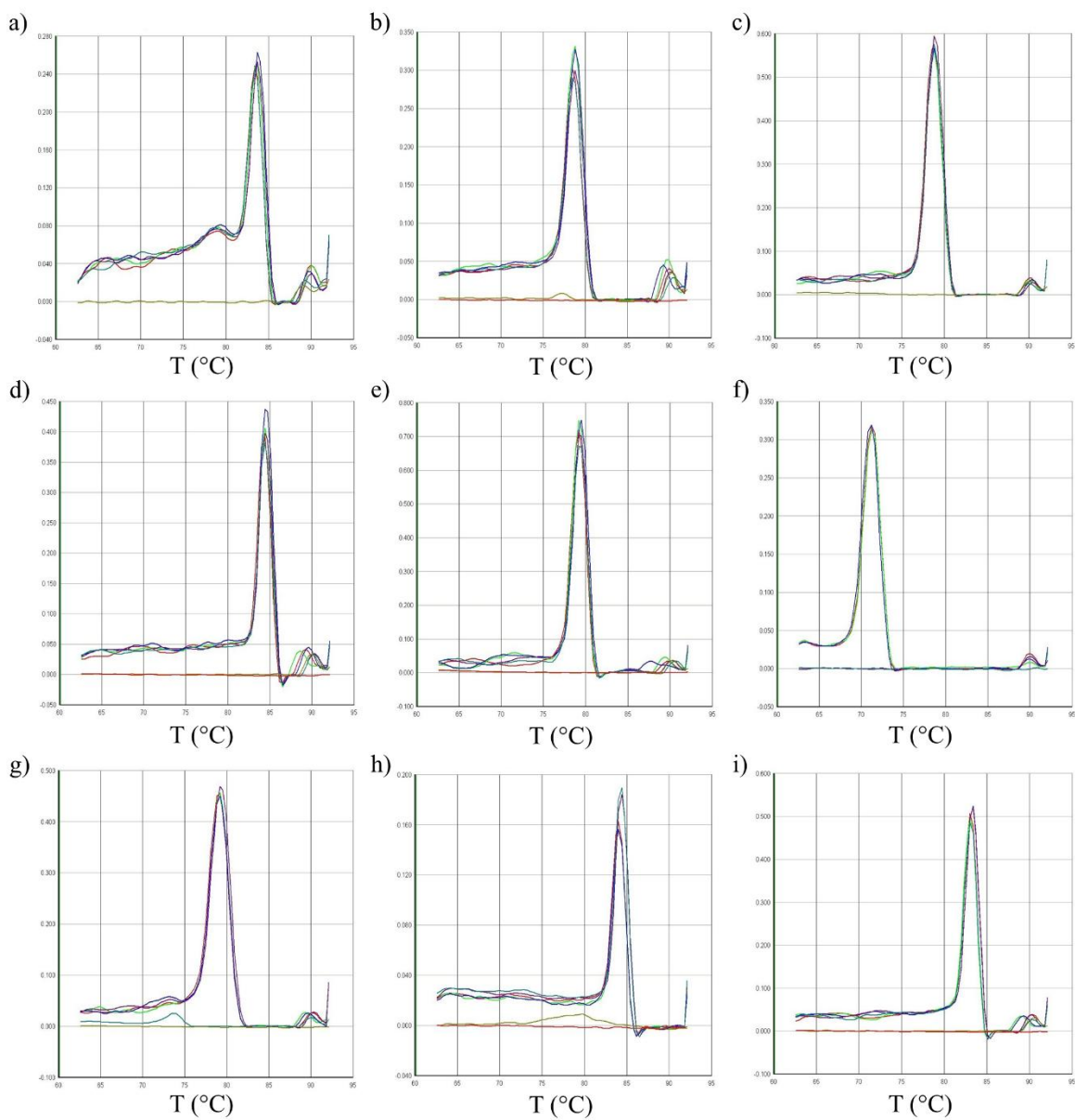


Slika P3. Standardne krivulje za parove početnica korištene u qPCR eksperimentu. Na Y-osi prikazane su Cq vrijednosti, a na X-osi $\log_{10}$ transformirane koncentracije cDNA. Ispod pravaca prikazane su pripadajuće jednačbe i koeficijent korelacije.

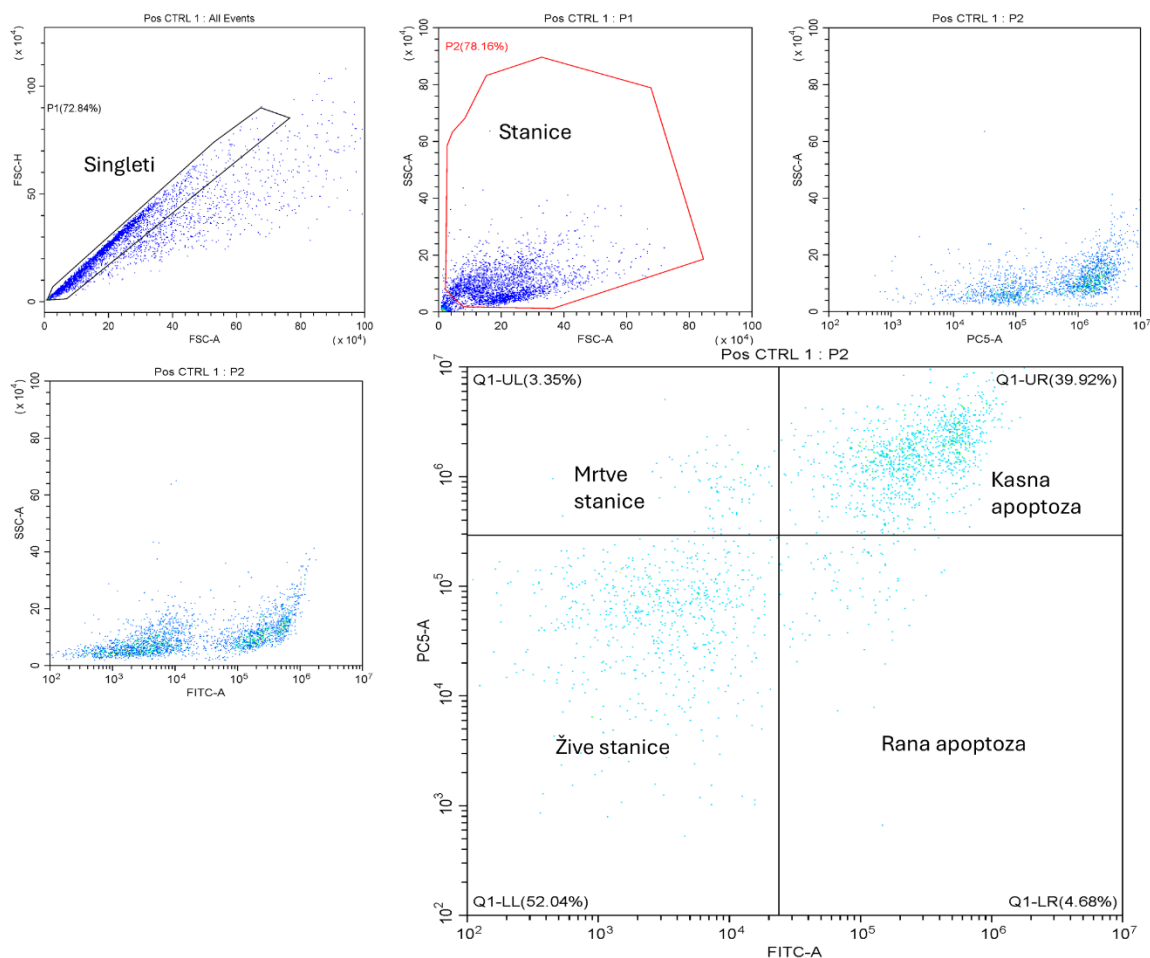
Tablica P4. Vrijednosti temperature taljenja (engl. melting temperature, Tm) za qPCR produkte dobivene analizom krivulje taljenja (engl. melting curve). Prikazane su prosječne Tm vrijednosti uzorka i kalibratora u tri neovisna eksperimenta.

Gen	Eksperiment 1		Eksperiment 2		Eksperiment 3	
	$\bar{X}_{\text{uzorak}}$	$\bar{X}_{\text{kontrola}}$	$\bar{X}_{\text{uzorak}}$	$\bar{X}_{\text{kontrola}}$	$\bar{X}_{\text{uzorak}}$	$\bar{X}_{\text{kontrola}}$
DRD2	78,8	78,8	79,3	78,9	79,1	78,8

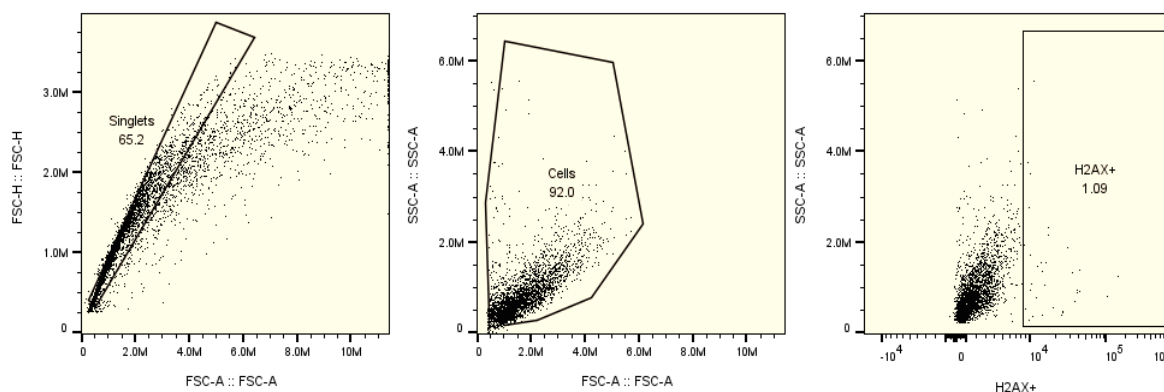
<i>SLC18A2</i>	79,2	79,2	78,9	79,3	79,1	78,8
<i>SLC6A3</i>	70,8	71,2	71,3	71,5	71,4	71,4
<i>TH</i>	84,4	84,0	84,0	83,9	84,6	84,4
<i>NES</i>	84,0	84,0	84,6	84,3	84,7	84,4
<i>TUBB3</i>	83,4	83,0	83,6	83,3	83,4	83,3
<i>MAP-2</i>	79,3	79,2	79,4	79,3	79,4	79,3
<i>GAPDH</i>	78,8	78,6	79,0	78,7	79,0	78,6
<i>ACTB</i>	83,6	83,7	83,9	83,7	83,9	83,6



Slika P4. Krivulje taljenja qPCR produkata: a) *ACTB*, b) *GAPDH*, c) *DRD2*, d) *MAP-2*, e) *NES*, f) *SLC6A3*, g) *SLC18A2*, h) *TH* te i) *TUBB3*. Prikazane su NTC (engl. *no template control*) te NRT (engl. *no reverse transcriptase control*) krivulje.



Slika P5. Primjer strategije odabira populacija stanica (engl. *gating*) u eksperimentu kvantifikacije apoptoze i nekroze protočnom citometrijom na uzorku pozitivne kontrole. Analiza je započela isključivanjem staničnih nakupina (dupleta, tripleta itd.) na temelju svojstava raspršenja svjetlosti (P1). U sljedećem je koraku tako odabrana populacija stanica odvojena od raspadnutih stanica i nanočestica (P2), nakon čega su definirane sljedeće populacije: žive stanice (Annexin V⁻/PI⁻, Q1-LL), rana apoptoza (Annexin V⁺/PI⁻, Q1-LR), kasna apoptoza (Annexin V⁺/PI⁺, Q1-UR) i mrtve stanice/nekroza (Annexin V⁻/PI⁺, Q1-UL).



Slika P6. Primjer strategije odabira populacija stanica (engl. *gating*) u eksperimentu protočne citometrije za određivanje udjela γ H2AX pozitivnih stanica na uzorku kontrolnih stanica. Analiza je započela isključivanjem staničnih nakupina (dupleta, tripleta itd.) na temelju svojstava raspršenja svjetlosti. U sljedećem je koraku tako odabrana populacija stanica odvojena od raspadnutih stanica i nanočestica. Konačno, na uzorku negativne kontrole postavljen je prozor koji definira populaciju stanica pozitivnih na γ H2AX.

Radu prilažem i izvorne znanstvene radove objavljene u časopisima zastupljenim u bazi Web of Science Core Collection, pri čemu prvi navedeni rad obrađuje problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu, dok drugi obrađuje šire područje istraživanja:

Mamić I, Beus M, Kalčec N, Peranić N, Frkanec R, Turčić P, et al. Gold Nanoparticles Functionalized with Peptidoglycan Monomer and 1-Adamantylamine Protect Dopaminergic Neurons Against Oxidative Damages Induced by L-Dopa. *Croatica Chemica Acta* 2025;98:P1–P12.

Kalčec N, Peranić N, **Mamić I**, Beus M, Hall CR, Smith TA, et al. Selenium Nanoparticles as Potential Drug-Delivery Systems for the Treatment of Parkinson's Disease. *ACS Appl Nano Mater* 2023;6:17581–17592

Gold Nanoparticles Functionalized with Peptidoglycan Monomer and 1-Adamantylamine Protect Dopaminergic Neurons Against Oxidative Damages Induced by L-Dopa

Ivan Mamić,¹ Maja Beus,² Nikolina Kalčec,² Nikolina Peranić,² Ruža Frkanec,³ Petra Turčić,^{1,*}
Ivana Vinković Vrček^{2,#}

¹ University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

² Institute for Medical Research and Occupational Health, Ksaverska cesta 2, 10000 Zagreb, Croatia

³ University of Zagreb, Centre for Research and Knowledge Transfer in Biotechnology, Rockefellerova 10, 10000 Zagreb, Croatia

* Corresponding author's e-mail address: pturcic@pharma.hr

Corresponding author's e-mail address: ivinkovic@imi.hr

RECEIVED: April 1, 2025 ★ REVISED: June 24, 2025 ★ ACCEPTED: June 25, 2025

PROCEEDING OF THE SOLUTIONS IN CHEMISTRY 2024, 11–15 NOVEMBER 2024, SVETI MARTIN NA MURI, CROATIA

Abstract: Parkinson's disease (PD) is progressive neurodegenerative disorder marked by a loss of dopaminergic neurons, inflammation and oxidative stress and most commonly treated with L-Dopa. Long-term use of L-Dopa is associated with motor complications and side effects, highlighting the need for improved formulations. Gold nanoparticles (AuNPs) represent promising nanocarriers for improving drug delivery and reducing drug-induced toxicity. Building upon our previous work, where we demonstrated reversible binding of L-Dopa by AuNPs functionalized with peptidoglycan monomer (PGM-AuNPs) or 1-adamantylamine (Ad-AuNPs), we present here the intracellular uptake, biocompatibility, and antioxidative potential of such nanoformulations in vitro, using SH-SY5Y cells differentiated in dopaminergic neurons. Both AuNPs showed good biocompatibility, and no cytotoxicity at the tested concentrations. Intracellular uptake of AuNPs was confirmed using flow cytometry and confocal microscopy, with greater internalization seen for PGM-AuNPs compared to Ad-AuNPs. Finally, both AuNPs demonstrated the antioxidative effect under L-Dopa induced stress. These findings suggest that PGM- and Ad-AuNPs hold potential as effective nanocarriers while reducing L-Dopa induced oxidative stress.

Keywords: Parkinson's disease, gold nanoparticles, nanocarriers, L-Dopa, SH-SY5Y.

INTRODUCTION

PARKINSON'S disease (PD) is the world's second most common neurodegenerative disorder, affecting roughly 1 % of people over the age of 60.^[1] Despite significant scientific efforts, current pharmacological treatment is exclusively symptomatic. Despite being the most effective treatment for PD, chronic L-Dopa therapy is associated with debilitating motor complications leaving patient without effective treatment options.^[2] Mechanism behind L-Dopa induced dyskinesias are poorly understood, but involve dopaminergic cell loss and consequential dopamine depletion, which remodels synapses in a way that pulsatile L-Dopa stimulation produces abnormal ganglia output.^[3] In addition, some studies suggest that L-Dopa can contribute

to oxidative stress,^[4–6] excitotoxicity,^[7] impairment of mitochondrial function,^[8] thereby contributing to dopaminergic neuron degeneration. This emphasises the need for novel formulations that may minimize drug fluctuations and toxicity.

Nano-enabled drug delivery systems hold promises to address the limitations of conventional L-Dopa therapy.^[9] Nanocarriers can be engineered to improve the pharmacokinetic profiles of the drugs, increase transport across biological barriers, protect the drug from peripheral metabolism and to enable targeted delivery. Among many nanomaterials, gold nanoparticles (AuNPs) are interesting due to their chemical inertness, biocompatibility, and simple synthesis.^[10] They can be easily functionalized with targeting or transport-enhancing ligands, or loaded with

drugs.^[11] AuNPs also exhibit intrinsic “nanozyme” activity that can either generate or scavenge reactive oxygen species (ROS): by carefully optimising their size, shape, and surface coating, these properties can be engineered to promote ROS formation for cancer therapy or to scavenge ROS and alleviate oxidative stress.^[12] Aligned to their nanozyme properties, some studies even suggest AuNPs can restore impaired NAD⁺/NADH ratio in the brain of PD patients.^[13] Finally, several clinical trials are currently evaluating AuNPs for therapeutic and diagnostic applications.^[14] All of this makes AuNPs a promising platform for the treatment of Parkinson’s disease.

In this study, we build upon our previous findings demonstrating that gold nanoparticles (AuNPs) functionalized with peptidoglycan monomer (PGM-AuNPs) or 1-adamantylamine (Ad-AuNPs) reversibly bind L-Dopa.^[15] Here, we further investigate these AuNP-based formulations by assessing their intracellular uptake, effects on cell viability and oxidative stress, as well as evaluating their potential protective properties against L-Dopa-induced cytotoxicity under *in vitro* settings.

EXPERIMENTAL

AuNP Synthesis

PGM-AuNPs and Ad-AuNPs were synthesized using a reduction method as previously described.^[15] Briefly, to obtain Ad-AuNP and PGM-AuNP, 10 mM HAuCl₄·3H₂O (Sigma-Aldrich, Chemie, GmbH) and 0.67 mM 1-adamantylamine hydrochloride (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) or 0.12 mM PGM (Pliva, Chemical and Pharmaceutical Works, Zagreb, Croatia) were added to 6.5 mL of ultrapure water (UPW), followed by the addition of 15 mM NaBH₄ (Alfa Aesar, Kandel, Germany) under rigorous stirring. When the colour of the mixture turned from pale yellow to wine red it was stirred at room temperature for an additional 1.5 hours in the case of Ad-AuNPs and 20 minutes in the case of PGM-AuNPs. AuNPs were then purified by centrifugation at 8 000 × *g* 2 times for 10 min, respectively. The supernatant was removed, the pellet was resuspended in UPW and stored in the dark at 4 °C.

AuNPs Characterization

Detailed characterization of prepared AuNPs has been described in our previously published paper^[15] and includes various spectroscopic, light scattering and microscopic techniques. Briefly, the elemental gold (Au) concentration of AuNP in stock suspension was determined using a graphite furnace atomic absorption spectrometer (GFAAS) (Perkin Elmer AAnalyst 600, Perkin Elmer, Shelton, USA) calibrated with a standard Au solution (1000 mg L⁻¹ in 5 % HNO₃; Darmstadt, Germany) Method details along with

calibration curves are available as supporting information (Figure S5, Table S1). Working concentrations for all biological experiments were prepared by diluting characterized stock suspension to desired final concentrations. The hydrodynamic diameter (*d_H*) and zeta (ζ) potential of AuNPs were determined from by dynamic (DLS) and electrophoretic light scattering (ELS) methods, respectively, using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) equipped with a “green” laser (532 nm). DLS results were reported from the size-intensity distribution function as a mean value of six measurements with standard deviation, while ζ potential was calculated using Henry’s equation with the Smoluchowski approximation and was expressed as the average value of six consecutive measurements with SD. Further characterization was performed using transmission electron microscopy (TEM, 902A; Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany) in a bright-field mode with an acceleration voltage of 80 kV to determine the primary size (*d_{TEM}*) and shape of AuNPs. Additionally, AuNPs colloidal stability was assessed in UPW and complete cell culture medium using DLS and ELS techniques.

Calculation of Effective AuNP Exposure Concentrations

Besides reporting the nominal AuNPs concentrations (e.g., $\mu\text{g Au mL}^{-1}$) used in our experiments, we also estimated the actual dose delivered to the cell surface using the freely available “*in vitro* dosimetry” web application, which implements the distorted-grid model, as described by Cheimarios et al.^[16] nanoparticles tend to agglomerate and sediment under standard cell culture conditions, the true concentration reaching cells can be substantially different than the nominal dose, which makes it difficult to accurately compare effects of two or more nanoparticle types, even when they have similar physicochemical properties. To calculate effective concentrations, we entered the nominal dose, DLS-derived volume-weighted size distributions, solvent properties, liquid height, effective density, and ran simulations for 4 h (related to oxidative stress assays) or 24 h (related to viability and uptake assays). We extracted the predicted particle concentration in the bottom 0.005 mm compartment — which accounts for sedimentation and diffusion — and used these effective doses alongside nominal concentrations when presenting our results. Effective concentrations are expressed as number of AuNPs per volume in the bottom compartment [N cm^{-3}].

Drug Loading Efficiency

To determine drug loading efficiency (DLE), AuNPs were incubated with L-Dopa in UPW for 10, 30, and 120 minutes. After incubation, free L-Dopa was separated from AuNPs on Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Unit (cut-off size 2 kDa, Merck, Darmstadt, Germany) at 3500 × *g* for 15 minutes.

The concentration of free L-Dopa in the ultrafiltrate was measured using a CARY 3500 UV-Vis spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) at a wavelength of 280 nm in a quartz cuvette with a 10 mm optical path length. A fresh standard calibration curve of L-Dopa (Figure S4) in UPW was prepared for each experiment and used to calculate the concentration of L-Dopa in the ultrafiltrate. DLE was calculated with the following equation:

$$DLE / \% = \left(\frac{\text{total amount of L-Dopa}}{\text{total amount of drug}} - \frac{\text{amount of free L-Dopa}}{\text{total amount of drug}} \right) * 100 \quad (1)$$

Cell Culture

SH-SY5Y cells (ECACC, Salisbury, UK) were grown in complete cell culture medium (CCM) composed of Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12), with 10 % fetal bovine serum (FBS), 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % non-essential-amino-acids, and 1 % L-glutamine (all purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany). Cells were kept in T-75 culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) under humidified conditions at 37 °C and 5 % CO₂. The medium was changed every four days and cells were subcultured when 70–80 % confluent. During subculturing, non-adherent cells were spun down and combined with adherent cells that were detached using 0.25 % Trypsin-EDTA solution (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH). Cells were counted on TC20 Cell Counter (Bio-Rad, Hercules, USA). In all experiments cells between 5th and 15th passage were used. SH-SY5Y cells were differentiated towards dopaminergic-like phenotype according to protocol described elsewhere.^[17,18] After seeding in the complete culture medium, cells were allowed to attach overnight. Next day, culture medium was removed, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated in culture medium with 10 µM retinoic acid (RA; Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Germany) for 3 days. Retinoic acid was handled in the dark and kept minimum time at the room temperature to prevent degradation.^[19] After 3 days the medium was removed, cells were rinsed with PBS, and incubated in cell culture medium with 80 nM 12-O-tetradecanoyl-13-acetate (TPA; Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Germany) for 3 additional days.

MTS Assay

Effect of PGM-AuNPs and Ad-AuNPs on cell viability in differentiated SH-SY5Y cells was assessed using CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA) following manufacturer instructions. SH-SY5Y cells were seeded clear in 96-well

plate (Eppendorf, Hamburg, Germany) at a density of 12.5×10^4 cells cm⁻², differentiated according to the protocol described above, and exposed to 2-fold serial dilution of Ad-AuNPs and PGM-AuNPs suspensions at 37 °C and 5 % CO₂. Treatments were prepared as 10× working concentration in UPW and diluted directly in the well to 1× final concentration. AuNPs were vortexed for 30 seconds before preparing solutions and before cell treatment. For negative control, cells were incubated in complete cell culture medium with the addition of sterile UPW. 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as positive control. After 24 h cells were washed three times with PBS and 100 µL of phenol red-free complete cell culture medium was added to each well followed by 20 µL of MTS / PMS solution (20 : 1). Plate was incubated for 2 h at 37 °C and 5 % CO₂. Following incubation, absorbance was measured at 490 nm using Victor 3 microplate reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Results are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM) relative to the negative control. At least three independent experiments were performed in triplicate, and blank values were subtracted from all absorbance measurements.

Flow Cytometry Experiments

Since AuNPs can interfere with conventional spectrophotometric assays such as MTS,^[20] cell viability results were confirmed using an Annexin V-FITC/propidium iodide (PI) kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) on a CytoFLEX SRT Benchtop Cell Sorter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). This method also allowed us to investigate the AuNPs toxicity mechanism and their relative uptake into differentiated SH-SY5Y cells. Cells were seeded in 24-well plates (Eppendorf, Hamburg, Germany) at a density of 15×10^4 cells cm⁻² and left to attach overnight at 37 °C and 5 % CO₂. Cells were differentiated according to the protocol described above. All treatments were prepared as 10× working solutions in sterile UPW and diluted to 1× final concentration directly in the well. For negative control cells were incubated in CCM with addition of sterile UPW. AuNPs were vortexed for 30 seconds before preparing solutions and before cell treatment. 10 % DMSO was used as positive control. Treatments were added to CCM, and plates were incubated for 24 h at 37 °C and 5 % CO₂. After incubation supernatants were collected in designated tubes, cells were rinsed with sterile PBS, and detached from plate with 0.25 % Trypsin-EDTA solution. CCM was added to inhibit trypsin activity and cell suspension was mixed with corresponding supernatants and PBS washes. Finally, cells were stained according to instructions in Annexin V Assay Kit (Biorad, Hercules, California, USA) to determine relative amounts of live, late apoptotic/dead and early apoptotic cells. Additionally, side scattered light intensity (SSC) of live cells, measured by flow cytometry, was used as an indicator

of AuNPs uptake because it correlates with cellular granularity, which increases when metallic NPs are internalized. By comparing the median SSC intensity between treated and untreated cells, we quantified relative uptake of AuNPs.^[21,22] Samples were analysed on a CytoFLEX SRT Benchtop Cell Sorter device (Beckman Coulter, Crea, CA, USA). Results are expressed as the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) relative to the negative control. Three independent experiments were performed in triplicate, and blank values were subtracted from all absorbance measurements.

Visualization of AuNPs in cells

Differentiated SH-SY5Y cells (12.5×10^4 cells cm^{-2}) seeded onto coverslips in 24-well plates (Eppendorf, Hamburg, Germany) were treated for 24 h with freshly prepared suspensions of Ad-AuNP or PGM-AuNP (final concentration: $10 \mu\text{g Au mL}^{-1}$). After three PBS washes, cells were fixed (4 % paraformaldehyde, 10 min), permeabilized (0.25 % Triton X-100, 15 min), blocked (10 % FBS with 0.1 % Tween-20, 90 min at 37 °C), and incubated with mouse monoclonal anti- β -tubulin antibody (1 : 200, Sigma-Aldrich) overnight at 4 °C. Next, cells were incubated with AlexaFluor®488 secondary antibody ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$, Abcam, 2 h), and stained with phalloidin-FITC ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). Finally, nuclei were labeled with Hoechst 33258 ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). Coverslips were mounted with Fluoroshield (Sigma-Aldrich) and stored at -20 °C until imaging. Confocal microscopy (Leica TCS SP8 X) with reflectance contrast mode was used to confirm nanoparticle internalization through Z-stack images (4–7 per sample), processed with ImageJ software (University of Wisconsin, USA).

Oxidative Stress and Mitochondrial Membrane Potential Measurements

SH-SY5Y cells were seeded in black 96-well plates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at a density of 12.5×10^4 cells/well and incubated overnight at 37 °C in a 5 % CO_2 atmosphere to allow attachment. Following differentiation as previously described, cells were washed with PBS and treated with AuNPs and/or L-Dopa. All treatments were freshly prepared in UPW at $10\times$ working concentrations, 30 min prior to cell exposure. Nanoparticle solutions were vortexed for 30 s before dilution and application to cells. Final well concentrations were: AuNPs, $10 \mu\text{g Au mL}^{-1}$; L-Dopa, 50 μM ; and AuNPs loaded with L-Dopa, 50 μM L-Dopa / $10 \mu\text{g Au mL}^{-1}$ AuNPs. These concentrations were selected based on preliminary oxidative stress and flow cytometry experiments, aiming to induce oxidative stress without significant cytotoxicity and to maintain physiologically relevant L-Dopa concentrations.^[23] Negative control cells were incubated in CCM supplemented with

sterile UPW, while positive control cells were exposed to 20 μM tert-butyl hydroperoxide (t-BHP).

To measure oxidative stress parameters, AuNPs were removed, cells washed three times with PBS and incubated (40 min, room temperature) with fluorescent probes diluted in PBS (containing Ca^{2+} and Mg^{2+} to prevent cell detachment): 20 μM 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) for general ROS detection; 20 μM dihydroethidium (DHE, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) for superoxide radicals; 50 μM monochlorobimane (mBCl, Fluka) for reduced glutathione; and 0.1 μM rhodamine 123 (Rh123, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) for mitochondrial membrane potential measurement. After incubation, the culture medium was carefully aspirated, cells rinsed twice with PBS, and fluorescence was immediately measured on a Victor3 microplate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Excitation/emission wavelengths were set at 485/535 nm for DCFH-DA, 380/460 nm for mBCl, 507/529 nm for Rh123, and 480/567 nm for DHE. Background fluorescence (blank) values were subtracted from all measurements. Results are expressed as mean $\pm$ SEM relative to negative controls from at three independent experiments performed in triplicate.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data were analyzed for statistical significance by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test, comparing all groups to the control. Tukey's test was applied for comparisons between multiple groups. A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

AuNP Characterization

The primary size and shape of AuNPs were determined using TEM. Both Ad-AuNPs and PGM-AuNPs present homogeneous spherical structures with similar primary diameters of approximately 24 nm. (Figure 1). The d_H and ζ potential values were measured using DLS and ELS, respectively, in both UPW and CCM (Table 1). The d_H for both AuNPs were larger than their primary sizes determined by TEM (d_{TEM}), which can be attributed to the formation of hydration shell.^[24,25] The polydispersity indexes (PDI) in UPW were above 0.1, a threshold for monodisperse systems.^[26] ζ potential values in UPW were similar for both AuNPs, around to -30 mV, indicating good colloidal stability.^[27] In the CCM, d_H of Ad-AuNPs increased significantly at 0 h, with further increase at 4 h, and remained stable up to 24 h. The initial d_H of PGM-AuNPs in

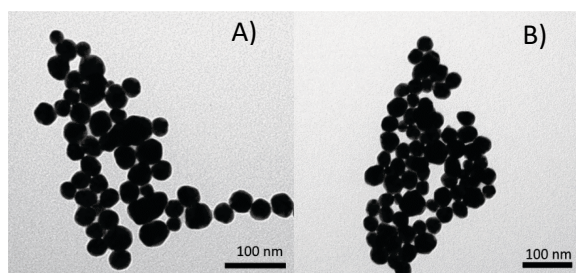


Figure 1. Transmission electron micrographs of gold nanoparticles (AuNPs) coated with A) 1-adamantylamine (Ad-AuNPs) and B) peptidoglycan monomer (PGM-AuNPs). Scale bars are 100 nm.

CCM was slightly smaller compared to UPW, but increased substantially at 4 h and 24 h. The observed increase in d_H is likely due to the protein corona formation, rather than agglomeration, evidenced by stable PDI, monomodal intensity-weighted size distribution, and ζ potential values similar to those of serum proteins.^[26,28,29] Protein corona likely stabilized the AuNPs in the CCM, despite ζ potential values not sufficient for electrostatic stabilization of nanoparticles.^[27,30]

Drug Loading Efficiency

DLE analysis showed differences between Ad-AuNPs and PGM-AuNPs formulations (Table 2). PGM-AuNPs demonstrated higher DLE than Ad-AuNPs at both tested concentrations (10 and 100 mg Au L⁻¹). At 100 mg Au L⁻¹ and 500 μ mol L⁻¹ of L-Dopa, DLE for PGM-AuNPs was 10.3 $\pm$ 3.6 % after 10 min, increased to 11.1 $\pm$ 2.0 % after 30 min, and dropped slightly at 10.0 $\pm$ 2.0 % after 120 min. Under the same conditions, Ad-AuNPs performed poorer with 5.6 $\pm$ 3.1 % after 10 min, 5.9 $\pm$ 1.7 % after 30 min, and 3.9 $\pm$ 1.3 % after 120 min. At lower AuNPs and L-Dopa concentrations (10 mg Au L⁻¹ and 50 μ mol L⁻¹), results were similar, with PGM-AuNPs demonstrating better DLE. Since

Table 1. Primary size (d_{TEM} , $n = 100$), hydrodynamic diameter (d_H), polydispersity index (PDI), and zeta potential (ζ) of gold nanoparticles (AuNPs) coated with 1-adamantylamine (Ad-AuNPs) and peptidoglycan monomer (PGM-AuNPs) in ultrapure water (UPW) and cell culture medium (CCM). Results are reported as mean values $\pm$ standard deviation.

AUNPs	d_{TEM} / nm		d_H / nm	ζ / mV	PDI
Ad-AuNPs	24.2 $\pm$ 2.9	UPW	85.6 $\pm$ 3.3	-29.3 $\pm$ 3.8	0.22
		0 h	111.4 $\pm$ 0.2	-11.2 $\pm$ 3.9	0.24
		CCM 4 h	124.6 $\pm$ 0.4	-15.1 $\pm$ 2.7	0.25
		24 h	125.1 $\pm$ 0.5	-13.3 $\pm$ 2.2	0.26
PGM-AuNPs	24.9 $\pm$ 3.4	UPW	79.3 $\pm$ 3.7	-31.2 $\pm$ 1.4	0.24
		0 h	74.1 $\pm$ 0.9	-9.5 $\pm$ 1.6	0.32
		CCM 4 h	81.9 $\pm$ 8.4	-11.6 $\pm$ 4.5	0.34
		24 h	97.1 $\pm$ 9.5	-13.6 $\pm$ 3.0	0.34

both of AuNPs have similar size, shape, surface charge, and total surface area, higher DLE exhibited by PGM-AuNPs is likely due to the more favorable surface chemistry.^[31] DLE results were similar to our previously published work,^[15] and aligned with usually reported DLE for nanoparticulate systems.^[32] Since the highest DLE was observed after 30 min of incubation, this incubation time was selected for subsequent experiments involving L-Dopa-loaded AuNPs.

Cytotoxicity of AuNPs

MTS results showing cytotoxicity of PGM-AuNPs and Ad-AuNPs towards differentiated SH-SY5Y cells are given in Figure 2. After 24 h, none of the tested AuNPs concentrations showed significant cytotoxicity. Interestingly, at the highest AuNPs concentrations (100 and 200 μ g Au mL⁻¹), viability values were significantly higher than negative

Table 2. Drug loading efficiency (DLE) of L-Dopa onto gold nanoparticles (AuNPs) functionalized with 1-adamantylamine (Ad-AuNPs) and peptidoglycan monomer (PGM-AuNPs). The AuNPs suspensions (10 and 100 mg Au/L) were incubated with L-Dopa (50 and 500 μ mol L⁻¹, respectively), and samples were analyzed after 10, 30, and 120 min. DLE (%) is presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) ($n = 3$). The table also includes AuNPs concentration given as number of nanoparticles per liter (N_{AuNP}/L), total nanoparticle surface area (SA, nm² L⁻¹), mass concentration (C_{Au} in mg Au L⁻¹), and L-Dopa molar concentration (C_{L-Dopa} in μ mol L⁻¹).

NP	$C_{Au} / \text{mg L}^{-1}$	$C_{Au} / \mu\text{mol L}^{-1}$	$C_{L-Dopa} / \mu\text{mol L}^{-1}$	N_{AuNP} / L	total SA / nm ² L ⁻¹	10 min		30 min		120 min	
						DLE / %	SD	DLE / %	SD	DLE / %	SD
Ad-AuNP	100	507.7	500	6.98×10^{14}	1.28×10^{18}	5.6	3.1	5.9	1.7	3.9	1.3
	10	50.8	50	6.98×10^{13}	1.28×10^{17}	5.5	2.2	8.6	1.9	7.5	1.8
PGM-AuNP	100	507.7	500	6.4×10^{14}	1.24×10^{18}	10.3	3.6	11.1	2.0	10.0	2.0
	10	50.8	50	6.4×10^{13}	1.24×10^{17}	14.9	1.6	19.9	6.1	15.5	4.9

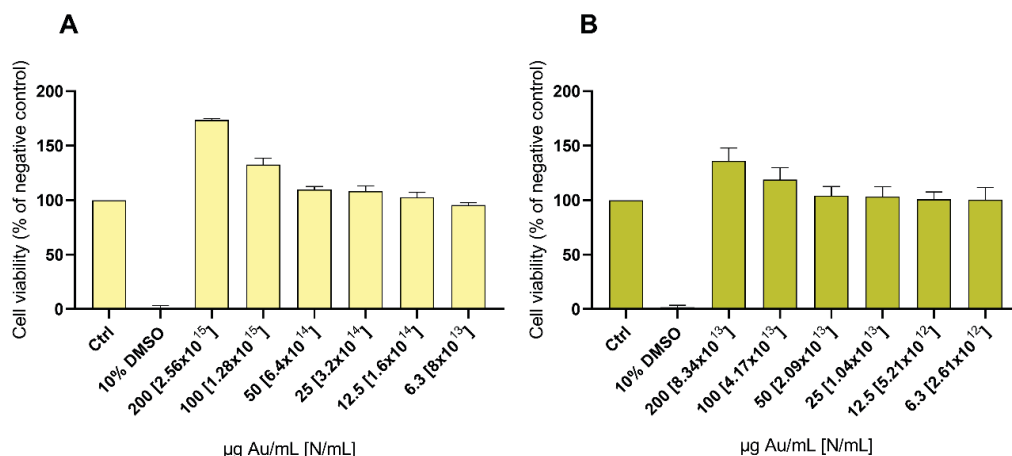


Figure 2. MTS assay results for peptidoglycan monomer (PGM-AuNPs, A) and 1-adamantylamine functionalized gold nanoparticles (Ad-AuNPs, B) after 24 h of treatment at 37 °C and 5 % CO₂. Untreated cells served as the negative control (Ctrl), while cells treated with 10 % dimethyl sulfoxide (10% DMSO) were used as the positive control. Data are presented as the mean percentage of control $\pm$ SEM ($n = 4$). Effective nanoparticle concentrations are indicated in the brackets.

control (Ctrl), which was probably caused by spectrophotometric interference induced by AuNPs,^[33] since microscopic observations did not indicate toxicity, and AuNPs residues were clearly visible on the bottom of the wells even after extensive washing with PBS. Also, these AuNPs strongly absorb light around 500 nm,^[15] which overlaps with detection wavelength of formazan. PGM-AuNPs seem to interfere more strongly, which may be due to 30-fold higher effective concentrations of PGM-AuNPs. Additionally, flow cytometry results did not demonstrate such artifact.

To confirm biocompatibility of AuNPs and evaluate their effect on induction of apoptosis, we employed Annexin V-FITC/PI assay using flow cytometry (Figure 3). Annexin V is protein that binds phosphatidyl serin,^[34] which is translocated from inner to outer membrane in early apoptosis.^[35] PI is membrane-impermeable dye that binds DNA, which happens upon membrane damage in late apoptotic cells or cells that undergo necrosis.^[36] Based on this, it is possible to distinguish four different population of the cells: live (Annexin V-/PI-), dead (Annexin V-/PI+), early apoptotic (Annexin V+/PI-), and late apoptotic (Annexin V+/PI+).

At doses from 1 to 200 $\mu\text{g Au mL}^{-1}$, none of the AuNPs significantly affected number of live cells with all values above 80 % and comparable with the negative control (Figure 3A). Percentage of early apoptotic (Figure 3B), late apoptotic (Figure 3D), and dead cells (Figure 3C) also did not differ from negative control, while 10 % DMSO decreased the number of live cells to about 30 %. The same assays were used to evaluate L-Dopa toxicity (results presented in Figures S2 and S3 of Supporting Information).

Together, the MTS and flow cytometry results indicate no cytotoxicity at the tested AuNPs concentrations, confirming their biocompatibility.

The toxicity of AuNPs remains a subject of ongoing debate. While numerous studies report minimal or no toxicity at low-to-moderate concentrations, others found evidences of significant adverse effects.^[37] For example, study by Valdiglesias et al.^[38] demonstrated that negatively charged AuNPs (~ 5 nm) did not induce cell death in SH-SY5Y cells at concentrations up to 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ after 24 hours. Similarly, a study on gold nanostars functionalized with polyethylene glycol (PEG) found no toxicity in SH-SY5Y cells at concentrations as high as 100 $\mu\text{g Au mL}^{-1}$. In contrast, gold nanostars functionalized with polyallylamine hydrochloride and PEG exhibited higher cellular uptake and clear dose-dependent cytotoxicity. Such findings highlight that AuNPs toxicity does not depend solely on nanoparticle composition but is strongly influenced by factors such as particle size, shape, and surface functionalization.^[39–41] Therefore, it is wrong to just presume biocompatibility of AuNPs, but extensive toxicity screening is required to confirm it.

Although we tested a wide range of AuNPs concentrations and found no evidence of cytotoxicity, which is in line with most *in vitro* studies, possible adverse effects on human health outside this concentration range should be also considered. As mentioned above, the toxicological profile depends not only on dose but also on size, shape, surface modifications, route of administration, etc. This makes cross-study comparisons based solely on dose misleading.^[42] Recent data suggest that concentrations below 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ are generally well tolerated.^[43–45] However, depending on the shape, size or surface charge AuNPs can

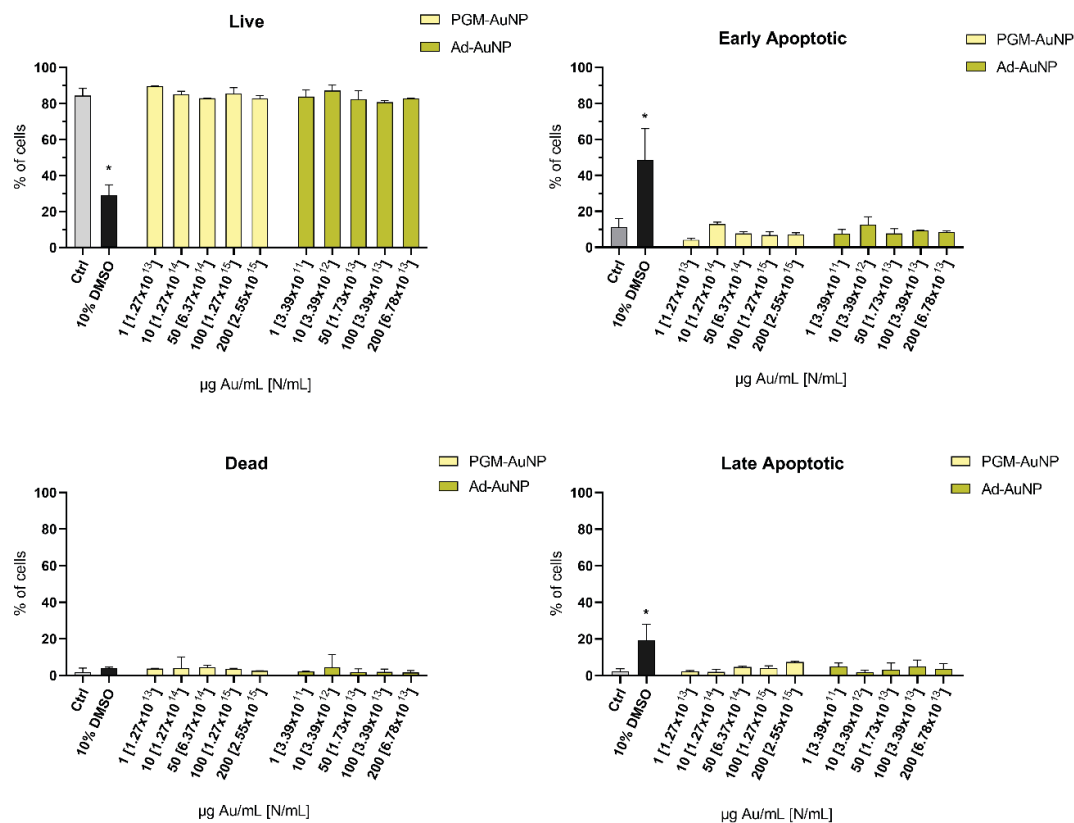


Figure 3. Effects of gold nanoparticles (AuNPs) functionalized with peptidoglycan monomer (PGM-AuNPs) and 1- adamantylamine (Ad-AuNPs) on differentiated SH-SY5Y cells. Cells were treated for 24 h at 37 °C and 5 % CO₂. Live cells; FITC-/PI-, early apoptotic: FITC+/PI-, late apoptotic FITC+/PI+, dead FITC-/PI+. Untreated cells served as the negative (Ctrl), while cells treated with 10 % DMSO were used as the positive control. Data were analyzed using one-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons test against the control group. Results are expressed as mean ± SEM (*n* = 3). Asterisks (*) indicate statistically significant differences (*p* < 0.05). Effective AuNPs concentrations (*N*_{AuNPs}/mL) are given in the brackets.

exert toxicity even at doses below 1 µg mL⁻¹.^[38,46,47] With increasing AuNP concentration, the classical “higher-dose → higher-risk” trend often holds, but even at doses above 100 µg mL⁻¹, outcomes remain formulation-specific: some NPs remain non-toxic.^[48,49] and others induce nearly complete cell death.^[50] Based on observed results, we may assume that toxicity with doses below tested is unlikely, while exposure to higher doses is also unlikely.

Besides short-term *in vitro* toxicity, a critical aspect of AuNPs' biocompatibility is the ability of AuNPs to accumulate inside the cells and organs. Such accumulation may lead to delayed or cumulative toxicity of non-toxic AuNPs doses and must be considered when developing Au-based nanodelivery systems. For example, the study by Liu Y et al.^[51] demonstrated AuNPs accumulation and cytotoxicity in TM3 cells in time- and concentration-dependent manner, with the most pronounced toxicity after 96 h incubation. The same study authors reported

time-dependent accumulation of AuNPs inside the Leydig cells of BALB/c mice following 14-day intravenous injections. A study on BSA-coated AuNPs in mice revealed that AuNPs were still detectable in liver and spleen 120 days after a single intravenous injection accompanied by tissue inflammation and fibrosis.^[52] Another *in vivo* study on AuNPs of various sizes clearly demonstrated that AuNPs between 8 and 37 nm in diameter induced toxicity with significant reduction in mice lifespan and signs of damage in the liver, lungs, and spleen.^[53] These and similar studies underscore the limitations of short-term *in vitro* biocompatibility testing of AuNPs and confirm that *in vitro* results can not be translated to *in vivo*. Future work should focus on long-term, repeated dosing of AuNPs in animal models to determine AuNPs accumulation, biodistribution, and long-term safety profile of PGM- and Ad-AuNPs as potential L-Dopa delivery system.

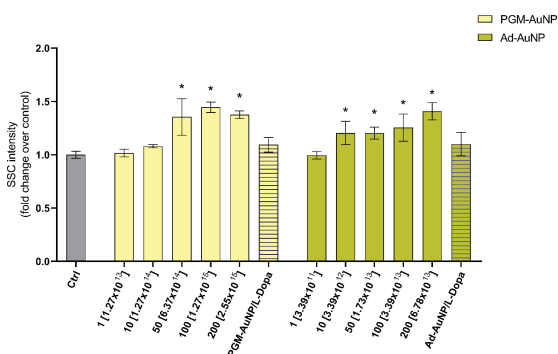


Figure 4. Uptake of Ad-AuNPs and PGM-AuNPs in dopaminergic neurons obtained from differentiated SH-SY5Y cells as determined by side scatter light (SSC) intensity on flow cytometer. Cells were treated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Untreated cells served as the control. For the combination group, L-Dopa (50 μM) was incubated with nanoparticles (10 μg Au mL⁻¹) for 30 min, followed by cell exposure. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test versus control. Results are presented as mean ± SEM. Asterisks (*) indicate statistically significant difference ($p < 0.05$). Effective AuNPs concentrations are indicated in the brackets.

Our results clearly show that Ad-AuNPs and PGM-AuNPs are not toxic to *in vitro* model of the dopaminergic neurons at any tested concentration, indicating their good biocompatibility.

Nanoparticle Uptake by Dopaminergic Neurons

SSC intensity of the live cell population (PI-/Annexin V-FITC-) revealed a dose dependant uptake of AuNPs (Figure 4). At

dose of 10 mg Au L⁻¹, uptake was poor for both AuNPs, and only slightly higher for Ad-AuNPs compared to PGM-AuNPs (1.15 vs 1.11). At doses above 10 μg Au mL⁻¹ PGM-AuNPs were internalized more readily compared with Ad-AuNPs. This higher internalization could be due to the an order of magnitude higher effective concentration of PGM-AuNPs compared with Ad-AuNPs. Loading AuNPs with L-Dopa did not alter their uptake significantly.

Since flow cytometry cannot distinguish between internalized nanoparticles and those adsorbed on the cell surface,^[54] confocal microscopy in reflectance mode was used to accurately determine AuNPs internalization.^[55] Confocal images (Figures 5 and S1 in Supporting Information) and Z-stack videos (see Supporting Information) confirmed that AuNPs are present inside the dopaminergic neurons, with only rare instances of nuclear localization. This findings is expected since only very small AuNPs, with size usually below 10 nm, demonstrate efficient nuclear uptake.^[56]

Oxidative Stress Response

One of the main mechanism behind AuNPs toxicity include oxidative stress, and inflammation, although pathways involved are usually complex.^[37,57] Many studies link AuNPs to elevated ROS levels in cells. For example, a study by Zhang et al.^[58] found that 4.5 nm PEG-coated AuNPs induced 6-fold increase in ROS levels in SH-SY5Y cells. This was accompanied by doubling of MDA, lipid peroxidation and mitochondrial damage. In PC12 cells, AuNPs induced high levels of ROS along with the cell death. The same study demonstrated coated AuNPs were more toxic compared to uncoated ones. However, comprehensive review on AuNP toxicity clearly stated that these response are dependent on physicochemical characteristics of AuNPs and that

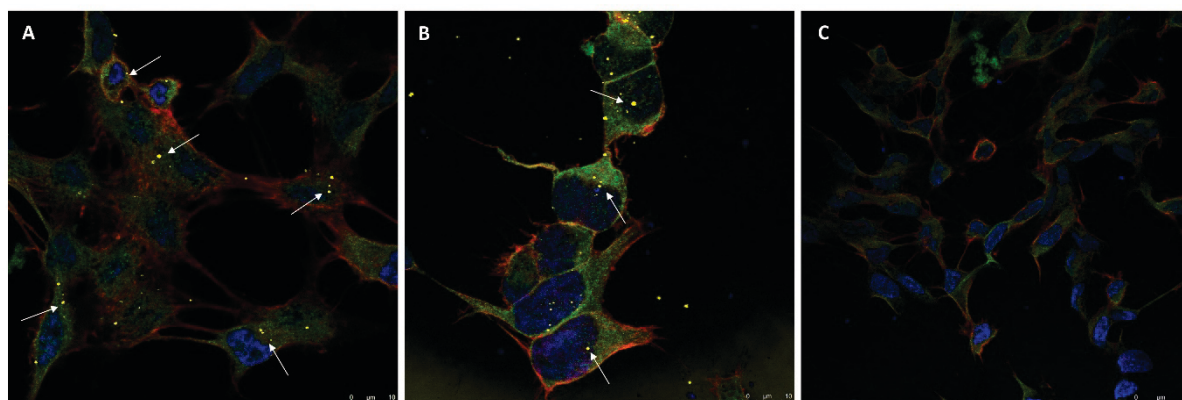


Figure 5. Confocal microscopy images of differentiated SH-SY5Y cells treated with Ad-AuNPs (A) and PGM-AuNPs (B) and non-treated control cells (C). All AuNPs were applied at a dose of 10 μg Au mL⁻¹ and were visualized as yellow dots in the contrast reflectance channel of confocal microscope. Cell nuclei are stained blue, actin fibres red, and β-tubulin green (as shown in the composites of individual channels). White arrows indicate AuNPs inside the cell.

responses range from minimal to significant toxicity,^[37] emphasizing once again the need for thorough safety assessment of AuNPs, despite existing body of literature supports their biocompatibility.

We evaluated oxidative stress response in dopaminergic neurons by means of mitochondrial membrane potential, ROS and GSH levels. ROS levels in differentiated SH-SY5Y cells were quantified with 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and dihydroethidium (DHE) assays (Figures 6A and B). After 4 h of treatment, t-BHP and L-Dopa increased DHE fluorescence intensity relative to control by 1.12 and 1.29, respectively, indicating production of ROS. AuNPs alone did not induce ROS production and more importantly attenuated effects of L-Dopa as evidenced by

decrease in fluorescence intensity from 1.29 to 0.91 for L-Dopa loaded to PGM-AuNPs and 0.96 for L-Dopa loaded to Ad-AuNPs.

GSH levels were assessed using mBCL assay (Figure 6C). L-Dopa reduced GSH levels to 0.79 relative to control, while none of the AuNPs alone had significant effect on GSH levels at a dose of $10 \mu\text{g Au mL}^{-1}$. When combined with L-Dopa, PGM-AuNP and Ad-AuNP were able to maintain higher levels of GSH compared with L-Dopa treatment alone (0.86 and 0.97), but none of the results are statistically significant.

Mitochondrial membrane potential was evaluated using Rh123 staining (Figure 6D). L-Dopa reduced mitochondrial membrane potential as evidenced by decrease in

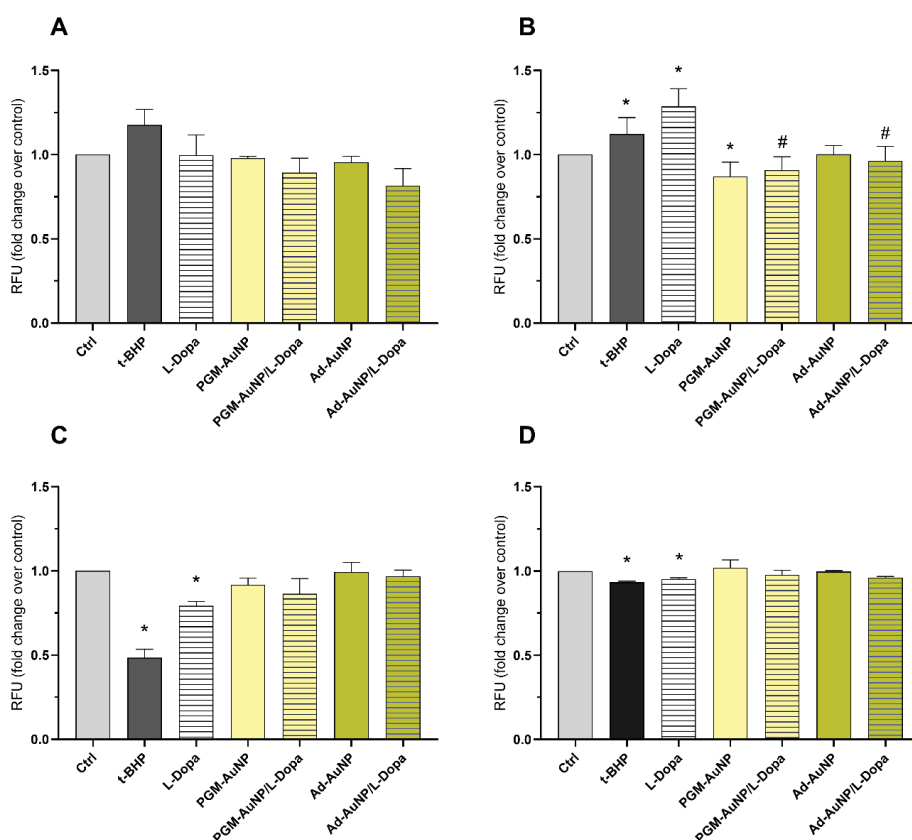


Figure 6. Effects of gold nanoparticles (AuNPs) on the generation of reactive oxygen species (A; DCFH2-DA assay), superoxide radicals (B; DHE assay), intracellular reduced glutathione levels (C; mBCL assay), and mitochondrial membrane potential (D; Rh123 assay) in differentiated SH-SY5Y cells after a 4-hour treatment at 37 °C and 5 % CO₂. Cells were treated with either peptidoglycan monomer-functionalized AuNPs (PGM-AuNPs) or 1-adamantylamine-functionalized AuNPs (Ad-AuNPs) at $10 \mu\text{g Au mL}^{-1}$, or with AuNPs pre-loaded with L-Dopa ($50 \mu\text{M L-Dopa} / 10 \mu\text{g Au mL}^{-1}$). Corresponding AuNPs effective concentrations were 1.27×10^{14} and 2.98×10^{12} . Untreated cells served as the negative control (Ctrl), whereas cells exposed to $20 \mu\text{M}$ tert-butyl hydroperoxide (tBHP) were used as the positive control. Results are presented as mean fold-change relative to control $\pm$ SEM ($n = 3$). Statistical analysis was conducted using one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Significant differences ($p < 0.05$) are indicated with an asterisk (*) versus the vehicle control (VC) and a hash (#) versus the L-Dopa-treated group (LD).

Rh123 dye fluorescence. PGM-AuNP and Ad-AuNP had negligible effects on mitochondrial membrane potential with relative fluorescence values of 1.02 and 1.00, respectively. When combined with L-Dopa, AuNPs increased Rh123 fluorescence compared to L-Dopa alone, suggesting protective effects, but the results were not statistically significant.

These results indicate that PGM-AuNPs and Ad-AuNPs did not impair mitochondrial function or increased ROS levels at selected concentrations. Furthermore, they effectively attenuated L-Dopa-induced ROS production, GSH depletion, and mitochondrial membrane potential reduction in differentiated SH-SY5Y cells, although not all results were statistically significant.

The protective effects observed in this study could be due to reduction in free L-Dopa concentration, AuNPs "nanozyme" activity, or free radical scavenging ability of AuNPs.^[59,60] Other mechanisms may also play a role; but the assays used in this study do not allow for their identification. Further research should therefore focus more on elucidating underlying antioxidative pathways as this is essential for the design of more effective nano-enabled drug carriers.

Finally, when interpreting the results, the potential for AuNP interferences with conventional assays should be considered as they represent a great challenge in nanotoxicology research and often lead to data misinterpretation.^[61,62] The AuNPs used in this study have absorption peak around 500 nm, which may overlap with the emission wavelengths of fluorescent probes and cause signal attenuation. AuNPs can also scatter visible light and due to their surface plasmon resonance properties they can either enhance or quench fluorescent signals from assays like mBCL, Rh123, and DHE. In our study, we used relatively low AuNPs concentrations along with multiple washing steps to remove unbound particles prior to dye incubation and fluorescence measurement. Furthermore, consistency across different assays suggests that obtained results reflect true biological response rather than artifacts arising from nanoparticle-induced interferences.

Taken together, the results presented in this study demonstrate the potential of PGM- and Ad-AuNPs as L-Dopa carriers, but validation in *in vivo* models is necessary not only to confirm these findings, but also to expand on important aspects like pharmacokinetics, which cannot be tested *in vitro*. Such next studies require careful planning and execution, since *in vivo* testing is complex, costly and time consuming, requires trained personnel, long-term dosing regimens, and must comply with high ethical standards. *In vivo* testing of nanomaterials comes with some specific challenges like lack of standardised assays and protocols, difficulties in scaling up nanoparticle production, and batch to batch variability.^[63] On the end note, results obtained on animal models can be difficult to

translate to humans due to the species-related differences in physiology.

CONCLUSION

This study provides evidence that PGM-AuNPs or Ad-AuNP are biocompatible carriers of L-Dopa and reduce L-Dopa-induced oxidative damage in an *in vitro* model of dopaminergic neurons. None of AuNPs showed cytotoxicity at the tested concentrations, assessed by MTS and flow cytometry assays. Cellular uptake studies suggest higher internalization of PGM-AuNPs compared to Ad-AuNPs, which may be due to their greater effective concentrations. Interestingly, both AuNP formulations were able to alleviate L-Dopa-induced oxidative stress. The results suggest that functionalized AuNPs can serve as carriers of L-Dopa and simultaneously exert protective effects against drug-induced toxicity in the model of dopaminergic neurons. Future studies should focus on more advanced models to validate these results.

Acknowledgment. This study was financially supported by the "Research Cooperability" Program of the Croatian Science Foundation funded by the European Union from the European Social Fund under the Operational Programme Efficient Human Resources 2014 – 2020 (grant HRZZ-PZS-2019-02-4323), by the European Regional Development Fund project KK.01.1.1.02.0007 "Research and Education – Reconstruction and Expansion of the Institute for Medical Research and Occupational Health" and the European Union – Next Generation EU programme (contract document designation 643-02/23-01/00016).

Supplementary Information. Supporting information to the paper is attached to the electronic version of the article at: <https://doi.org/10.5562/cca4172>.

PDF files with attached documents are best viewed with Adobe Acrobat Reader which is free and can be downloaded from [Adobe's web site](https://www.adobe.com/acrobat/).

REFERENCES

- [1] O.-B. Tysnes, A. Storstein, *J. Neural Transm.* **2017**, *124*, 901–905. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>
- [2] J. E. Ahlskog, M. D. Muentner, *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **2001**, *16*, 448–458.
- [3] P. Jenner, *Nat. Rev. Neurosci.* **2008**, *9*, 665–678. <https://doi.org/10.1038/nrn2471>
- [4] T. Alexander, C. E. Sortwell, C. D. Sladek, R. H. Roth, K. Steece-Collier, *Cell Transplant.* **1997**, *6*, 309–317. <https://doi.org/10.1177/096368979700600313>
- [5] C. T. Lai, P. H. Yu, *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 363–368. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(96\)00731-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(96)00731-9)

- [6] N. Nakao, K. Nakai, T. Itakura, *Brain Res.* **1997**, 777, 202–210.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01116-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01116-5)
- [7] E. Guatteo, A. Yee, J. McKearney, M. L. Cucchiaroni, M. Armogida, N. Berretta, N. B. Mercuri, J. Lipski, *Exp. Neurol.* **2013**, 247, 582–590.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.02.009>
- [8] P. Hörmann, S. Delcambre, J. Hanke, R. Geffers, M. Leist, K. Hiller, *Cell Death Discov.* **2021**, 7, 151.
<https://doi.org/10.1038/s41420-021-00547-4>
- [9] T. M. Sim, D. Tarini, S. T. Dheen, B. H. Bay, D. K. Srinivasan, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 6070.
<https://doi.org/10.3390/ijms21176070>
- [10] M. Kus-Liśkiewicz, P. Fickers, I. Ben Tahar, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 10952.
<https://doi.org/10.3390/ijms222010952>
- [11] S. J. Amina, B. Guo, *Int. J. Nanomedicine* **2020**, 15, 9823–9836.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S279094>
- [12] J. Lou-Franco, B. Das, C. Elliott, C. Cao, *Nano-Micro Lett.* **2020**, 13, 10.
<https://doi.org/10.1007/s40820-020-00532-z>
- [13] J. Ren, R. B. Dewey, A. Rynders, J. Evan, J. Evan, S. Ligozio, K. S. Ho, P. V. Sguigna, R. Glanzman, M. T. Hotchkin, R. B. Dewey, B. M. Greenberg, *J. Nanobiotechnology* **2023**, 21, 478.
<https://doi.org/10.1186/s12951-023-02236-z>
- [14] L. Yao, D. Bojic, M. Liu, *J. Pharm. Anal.* **2023**, 13, 960–968.
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2023.06.001>
- [15] N. Kalčec, N. Peranić, R. Barbir, C. R. Hall, T. A. Smith, M. A. Sani, R. Frkanec, F. Separovic, I. Vinković Vrček, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2022**, 268, 120707.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120707>
- [16] N. Cheimarios, B. Pem, A. Tsoumanis, K. Ilić, I. V. Vrček, G. Melagraki, D. Bitounis, P. Isgonis, M. Dusinska, I. Lynch, P. Demokritou, A. Afantitis, *Nanomaterials* **2022**, 12, 3935.
<https://doi.org/10.3390/nano12223935>
- [17] S. P. Presgraves, T. Ahmed, S. Borwege, J. N. Joyce, *Neurotox. Res.* **2003**, 5, 579–586.
<https://doi.org/10.1007/BF03033178>
- [18] S. Pålman, A.-I. Ruusala, L. Abrahamsson, M. E. K. Mattsson, T. Esscher, *Cell Differ.* **1984**, 14, 135–144.
[https://doi.org/10.1016/0045-6039\(84\)90038-1](https://doi.org/10.1016/0045-6039(84)90038-1)
- [19] K. A. Sharow, B. Temkin, M. A. Asson-Batres, *Int. J. Dev. Biol.* **2012**, 56, 273–281.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.113378ks>
- [20] I. V. Vrček, I. Pavičić, T. Crnković, D. Jurašin, M. Babić, D. Horák, M. Lovrić, L. Ferhatović, M. Ćurlin, S. Gajović, *RSC Adv.* **2015**, 5, 70787–70798.
<https://doi.org/10.1039/C5RA14100A>
- [21] H. Suzuki, T. Toyooka, Y. Ibuki, *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41, 3018–3023.
<https://doi.org/10.1021/es0625632>
- [22] R. M. Zucker, K. M. Daniel, E. J. Massaro, S. J. Karafas, L. L. Degn, W. K. Boyes, *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **2013**, 83, 962–970.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.22342>
- [23] J. Lipski, R. Nistico, N. Berretta, E. Guatteo, G. Bernardi, N. B. Mercuri, *Prog. Neurobiol.* **2011**, 94, 389–404.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.06.005>
- [24] R. Pecora, *J. Nanoparticle Res.* **2000**, 2, 123–130.
<https://doi.org/10.1023/A:1010067107182>
- [25] J. Jiang, G. Oberdörster, P. Biswas, *J. Nanoparticle Res.* **2009**, 11, 77–89.
<https://doi.org/10.1007/s11051-008-9446-4>
- [26] P. Eaton, P. Quaresma, C. Soares, C. Neves, M. P. de Almeida, E. Pereira, P. West, *Ultramicroscopy* **2017**, 182, 179–186.
<https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2017.07.001>
- [27] O. Z. Sharaf, R. A. Taylor, E. Abu-Nada, *Phys. Rep.* **2020**, 867, 1–57.
<https://doi.org/10.1016/j.physrep.2020.04.005>
- [28] I. Capjak, S. Š. Goreta, D. D. Jurašin, I. V. Vrček, *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **2017**, 68, 245–253.
<https://doi.org/10.1515/aiht-2017-68-3054>
- [29] S. R. Saptarshi, A. Duschl, A. L. Lopata, *J. Nanobiotechnology* **2013**, 11, 26.
<https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-26>
- [30] A. A. Cohen, K. Shemesh, R. Gur, *Front. Cell. Neurosci.* **2021**, 15, 715449.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2021.715449>
- [31] M. Nouri, M. E. Rezayat, M. G. H. Nouri, M. M. Pashaei, S. R. Abbasi, *Mol. Neurobiol.* **2017**, 54, 1745–1756. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9784-0>
- [32] R. M. Pinho, D. R. Paiva, L. B. Menezes, S. J. Monteiro, *Biochimie* **2021**, 186, 101–110.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.08.002>
- [33] G. Salama, A. G. Morsi, A. M. Ibrahim, S. M. Abdel-Rahman, *J. Mol. Neurosci.* **2019**, 69, 553–559.
<https://doi.org/10.1007/s12031-019-01423-1>
- [34] G. G. Tiwari, P. D. Kumar, P. S. Singh, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2013**, 346, 200–207.
<https://doi.org/10.1124/jpet.113.205007>
- [35] M. P. Hejazi, A. Sadeghi, S. A. Darvish, *Neurotox. Res.* **2018**, 33, 548–559.
<https://doi.org/10.1007/s12640-018-9885-5>
- [36] S. Zhu, L. Zhang, Y. Zhou, Z. Liu, H. Zhao, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 4826.
<https://doi.org/10.3390/ijms21144826>
- [37] C. Gao, Z. Cao, Y. Zhao, J. Zhou, X. Wang, H. Wei, *Nanomaterials* **2022**, 12, 1144.
<https://doi.org/10.3390/nano12071144>

- [38] F. I. Senthilkumar, M. Y. Jeong, J. H. Kim, S. S. Lee, *Toxicol. Res.* **2020**, *36*, 381–390. <https://doi.org/10.1039/D0TX00018E>
- [39] Y. Wu, W. Wang, F. Chen, M. Sun, *J. Pharm. Sci.* **2021**, *110*, 3133–3141. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.07.018>
- [40] M. Magro, D. Sgambato, A. Ingrassia, F. Di Salvo, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2016**, *37*, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.05.009>
- [41] M. Wang, H. Qiu, H. Li, *J. Environ. Sci. (China)* **2018**, *67*, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.07.009>
- [42] M. A. M. Silva, M. A. Camargo, *J. Appl. Toxicol.* **2019**, *39*, 763–771. <https://doi.org/10.1002/jat.3757>
- [43] R. R. de Oliveira, G. C. R. de Oliveira, *Toxicol. Lett.* **2020**, *332*, 128–135. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.06.009>
- [44] P. Q. Nguyen, T. V. Hoang, *Nanotoxicology* **2021**, *15*, 1354–1365. <https://doi.org/10.1080/17435390.2021.1921359>
- [45] M. A. Zaki, N. S. Mohamed, *J. Hazard. Mater.* **2022**, *429*, 128376. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128376>
- [46] C. F. Dias, M. V. Tavares, M. R. de Lima, A. P. C. Campos, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, *171*, 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.040>
- [47] Y. Wang, J. Zhang, X. Liu, *J. Controlled Release* **2017**, *261*, 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.020>
- [48] H. A. Hassan, F. M. Salem, *J. Pharm. Sci.* **2018**, *107*, 3447–3454. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.05.022>
- [49] L. B. Al-Abd, A. M. Hegazy, M. H. Ibrahim, *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *112*, 108703. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108703>
- [50] J. J. Zhang, L. L. Wang, *J. Nanobiotechnology* **2020**, *18*, 153. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00681-7>
- [51] M. H. Al-Saleh, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1274. <https://doi.org/10.3390/ijms22031274>
- [52] R. J. Nelson, C. J. Beuhler, *J. Environ. Sci. Health Part A* **2019**, *54*, 102–108. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1524193>
- [53] K. Zhang, J. Xu, F. Liao, *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 5441–5452. <https://doi.org/10.2147/IJN.S141410>
- [54] S. K. Singh, A. Kumar, R. Meena, *J. Toxicol. Sci.* **2020**, *45*, 33–41. <https://doi.org/10.2131/jts.45.33>
- [55] Y. Y. Liu, H. B. Wu, *Sci. Total Environ.* **2021**, *755*, 143695. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143695>
- [56] J. M. Smith, R. C. Johnson, *Neurochem. Int.* **2018**, *117*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.11.002>
- [57] P. R. Williams, L. M. Lee, *J. Neurosci. Methods* **2016**, *267*, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.06.012>
- [58] S. Y. Kim, H. S. Lee, *Brain Res. Bull.* **2019**, *147*, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.03.008>
- [59] D. P. Garcia, L. R. Torres, *Mol. Cell. Neurosci.* **2020**, *104*, 103468. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103468>
- [60] M. L. Gonzalez, S. R. Perez, *J. Neurochem.* **2017**, *141*, 724–732. <https://doi.org/10.1111/jnc.14034>
- [61] F. T. Martin, A. G. Brown, *Neurosci. Lett.* **2015**, *594*, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.02.008>
- [62] R. J. Thompson, K. A. Hall, *J. Neurol. Sci.* **2019**, *406*, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.05.017>
- [63] L. M. King, D. E. Walters, *Front. Neurosci.* **2023**, *17*, 1234. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.01234>

Selenium Nanoparticles as Potential Drug-Delivery Systems for the Treatment of Parkinson's Disease

Nikolina Kalčec, Nikolina Peranić, Ivan Mamić, Maja Beus, Christopher R. Hall, Trevor A. Smith, Marc Antoine Sani, Petra Turčić, Frances Separovic, and Ivana Vinković Vršek*



Cite This: *ACS Appl. Nano Mater.* 2023, 6, 17581–17592



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



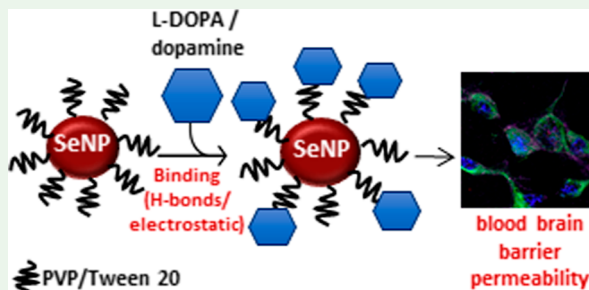
Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: The development of efficient drug formulations for Parkinson's disease (PD) treatment is challenged by achieving pharmacokinetic profiles, reduced side effects, and better permeability through the blood–brain barrier (BBB). As nanoparticles may facilitate the delivery of drugs in the brain due to their high-loading capacity and ability to cross biological barriers, we designed two different types of selenium nanoparticles (SeNPs) that may increase the transport of drugs across the BBB and may act as antioxidants at the site of action. The SeNPs were functionalized with polyvinylpyrrolidone (PVP) and polysorbate 20 (Tween) and characterized in terms of their size, size distribution, shape, surface charge, and colloidal stability in relevant biological media. Their drug-loading capacity was tested using dopamine and L-DOPA as therapeutically active agents for PD. Thermodynamic analysis revealed that binding processes occurred spontaneously through hydrogen bond/van der Waals interactions or electrostatic interactions. The strongest interaction was observed between PVP-SeNPs and L-DOPA or dopamine, which was characterized by a binding constant several orders of magnitude higher than for Tween-SeNPs. However, the addition of human transferrin as a model plasma protein significantly reduced this difference, which indicates the crucial role of protein corona formation in the design of drug nanodelivery systems. *In vitro* evaluation by cell-free and cellular transwell models showed efficient internalization of SeNP-loaded L-DOPA/dopamine by human endothelial brain cells, while facilitated BBB permeability for L-DOPA, and dopamine was achieved using PVP-SeNPs. Overall, the high potential of SeNPs as drug-delivery vehicles in PD treatment was demonstrated.

KEYWORDS: selenium nanoparticles, drug delivery, drug binding, BBB permeability, PAMPA, membrane permeability, transwell



1. INTRODUCTION

Neurological disorders represent a growing global public health challenge, the leading cause of disability and the second most prevalent cause of death as reported by the World Health Organization (WHO).¹ Based on the *Global Burden of Disease, Injuries, and Risk Factors Study* from 2015, Parkinson's disease (PD) is the fastest-growing neurological disease in terms of the number of patients, extent of their disability, and cause of death.² Main PD symptoms include bradykinesia, rigidity, tremor, and other motor disturbances, as well as cognitive manifestations. On the cellular level, PD is distinguished by the degeneration of dopaminergic neurons resulting in diminished dopamine levels and abnormal accumulation and aggregation of α -synuclein in the shape of Lewy bodies and Lewy neurites.³ Therefore, the main PD treatment is based on increasing dopamine levels in the brain. However, the direct use of dopamine for PD treatment is unfeasible due to its nature as a small hydrophilic molecule incapable of crossing the blood–brain barrier (BBB),⁴ while its direct precursor L-DOPA can penetrate the BBB through recognition by the large neutral amino acid transporter 1 (LAT-1).⁵ L-DOPA is, therefore, still

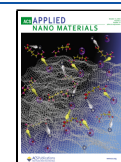
used as the gold standard for PD treatment. However, prolonged therapy with L-DOPA can result in severe side effects including motor fluctuations and dyskinesia due to overburdening of human metabolism and increased oxidative stress.^{6,7} Hence, the formation of alternative therapeutic options remains a challenge considering that traditional methods for treating PD exhibit limited effectiveness alongside numerous side effects.

Recently, the utilization of nanotechnology in the context of neurodegenerative disorders has captivated remarkable attention. Due to limited therapeutic choices and inadequate diagnostic tools, the primary goal is to develop novel formulations that can precisely transport drugs to targeted sites and generate biocompatible materials. These advance-

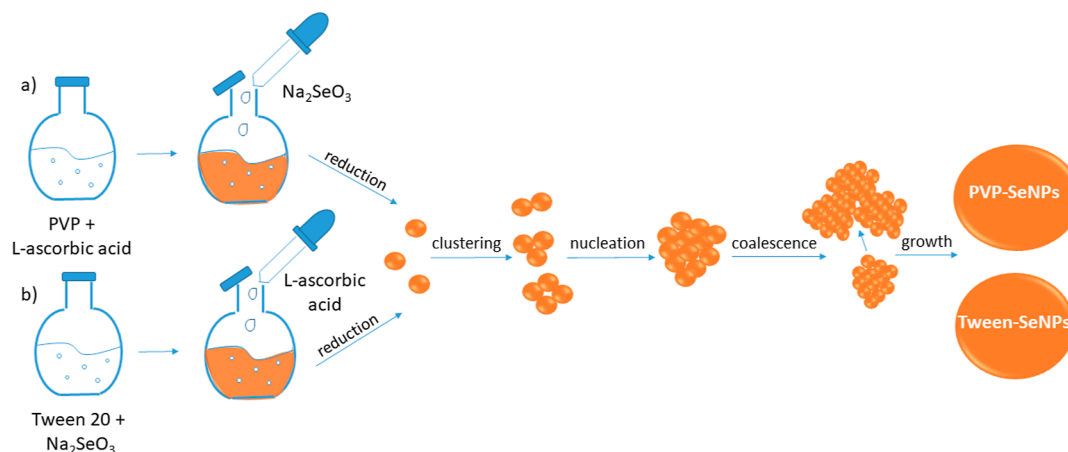
Received: June 17, 2023

Accepted: September 1, 2023

Published: September 20, 2023



Scheme 1. Schematic Representation of Synthetic Procedures for SeNPs Functionalized with (a) PVP and (b) Tween 20



ments aim to facilitate early diagnosis and effective treatment. Nanoparticles (NPs) exhibited remarkable properties that hold promise for their use in nanomedicine. Currently, many NPs have been investigated for the potential therapy of neurodegenerative diseases.⁸ Among organic NPs, polymeric NPs,⁹ liposomes,¹⁰ liquid crystalline NPs,^{11,12} and solid-lipid NPs¹³ have attracted the most attention due to their biocompatibility, biodegradability, and minimal toxicity.¹⁴ However, their effectiveness is hindered by challenges related to specificity and stability. Conversely, inorganic NPs are interesting due to their distinctive physicochemical properties, small size, and surface plasmon characteristics. These characteristics not only render them suitable for therapeutic and diagnostic purposes but also give them potential in sensor and optical device development.⁸

This study is focused on selenium NPs (SeNPs) owing to their photoreactive, anticancer, and biocidal properties that provide them great potential in biomedicine.¹⁵ Moreover, their small size, biocompatibility, low toxicity, simple preparation, and *in vivo* degradability constitute SeNPs as a remarkable tool in targeted drug delivery.¹⁶ When used as a carrier for conventional chemotherapeutic drugs, SeNPs can diminish their systemic toxicities while working synergistically to improve their efficiency.¹⁷ In the context of neurodegenerative disorders, the transportation of drugs into the brain is impeded by the existence of the BBB. To overcome poor penetration through the BBB, SeNPs can serve as a promising carrier platform ensuring enhanced drug delivery or selectivity when targeting specific cells and even facilitating crossing the BBB.¹⁸ Additionally, oxidative stress can be inhibited by the administration of SeNPs due to their exceptional antioxidant and consequently neuroprotective properties.¹⁹

The majority of published studies on SeNP-based drug-delivery systems are focused on anticancer therapy,^{20,21} while in the context of neurodegenerative disorders, Alzheimer's disease has gained the most attention.^{22,23} Hence, the main goal of this study was to synthesize differently functionalized SeNPs in order to design multifunctional nanoplateforms that can potentially transport L-DOPA, dopamine, or human serum transferrin (hTF) and deliver them to target sites to improve conventional therapy for PD. Moreover, this study employed the BBB permeability assessment, a crucial parameter used to unveil the efficacy of these systems in advancing potential drug candidates targeting the central nervous system (CNS).

The evaluation of interactions between SeNPs and catechols (L-DOPA and dopamine) and the impact of hTF on these interactions were performed using fluorescence spectroscopy and thermodynamic analysis, while the efficacy of SeNPs to transport L-DOPA and dopamine across the BBB was assessed by *in vitro* tools, *i.e.*, the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) and transwell assay.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals and Reagents. Sodium selenite (Na_2SeO_3), L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), dopamine hydrochloride, and polysorbate 20 (Tween 20) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Munich, Germany). Poly(vinylpyrrolidone) (PVP, 40000) was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), while L-(+)-ascorbic acid (LAA) was obtained from Alfa Aesar (Kandel, Germany). The hTF isolated from human serum (product number pro-315-b) was purchased from ProSpec Bio (Rehovot, Israel). All chemicals were utilized without additional purification, while all glassware were subjected to cleaning with 10% (v/v) HNO_3 (Merck Suprapur, Darmstadt, Germany), followed by rinsing with ultrapure water (UPW) prior to usage.

2.2. Synthesis of SeNPs. PVP-functionalized SeNPs were synthesized using a previously published procedure²⁴ with some adjustments, as illustrated in Scheme 1a. The first step was the addition of a solution containing 10 mL of 1 wt % PVP to 77.9 mL of UPW followed by stirring at 500 rpm for 15 min. Subsequently, a mixture comprising 11 mL of 0.1 M LAA and 1.1 mL of 0.1 M sodium selenite was introduced with constant stirring. As sodium selenite was added dropwise, the mixture's color transitioned gradually from transparent to clear orange. After a 20 min stirring period, centrifugation of the mixture was performed twice at 10,000 rpm for 15 min each time. The resulting pellet was resuspended in UPW and stored at 4 °C.

The synthesis of Tween-functionalized SeNPs was carried out according to an already established procedure,²⁵ as presented in Scheme 1b. First, 1.74 mL of a 0.1 M sodium selenite solution was introduced into 90 mL of UPW. Then, 10 mL of 56.7 mM LAA was added dropwise to the selenite solution under continuous stirring. The addition of each 2 mL of the LAA solution was followed by the addition of 10 μL of the Tween 20 solution. The reaction mixture's color turned from transparent to a clear orange within 20 min. Subsequently, the synthesized SeNPs were purified by centrifugation at 12,000g for 10 min twice. The resulting pellet was then resuspended in UPW and stored at 4 °C.

2.3. Characterization of SeNPs. Determination of the total Se concentration in SeNPs dispersions was done using a graphite furnace atomic absorption spectrometer (GFAAS) (PerkinElmer AAnalyst 600, PerkinElmer, Shelton, USA) after acidification to 1–2% (v/v) HNO_3 . The Se standard solution [1000 mg/L in 5% (v/v) HNO_3]

purchased from Merck (Darmstadt, Germany) was used to prepare the calibration standards.

The primary size and morphology of SeNPs were examined using transmission electron microscopy (TEM, Carl Zeiss Meditec AG 902A, Jena, Germany) equipped with a Canon PowerShot S50 camera. Prior to TEM analysis, 5 μL of each SeNP dispersion was carefully deposited onto a copper grid coated with carbon, allowing it to naturally dry. Subsequent image processing was performed using ImageJ software (National Institutes of Health). The differentiation between primary particles and aggregates was carried out manually. A minimum of 100 particles was included in the analysis.

The hydrodynamic diameter (d_{H}) and polydispersity index (PDI) were obtained by dynamic light scattering (DLS) measurements from an average of six measurements. The size-intensity distribution function was used to present the outcomes of the DLS analysis. The electrophoretic light scattering (ELS) method was used to determine the zeta (ζ) potential values as an average of three measurements. To determine the ζ potential, the Henry equation was employed using the Smoluchowski approximation. Data analysis was performed using ZS Explorer Zetasizer software (Malvern Instruments, Malvern, UK). The DLS and ELS experiments were conducted using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) incorporating a 532 nm laser, with the measurement of scattered light intensity taking place at an angle of 173° .

Additionally, UV–vis absorption measurements were conducted on a CARY 300 spectrophotometer (Varian Inc., Australia) with a 10 mm cell path length. UV–vis spectra of SeNPs were recorded within the wavelength range of 200–800 nm at 298 K.

2.4. Calculation of SeNP Concentrations. The molar concentration of SeNPs was determined using the equation as described previously³²

$$[\text{SeNPs}](\text{mol L}^{-1}) = \frac{[\text{Se}](\text{mol L}^{-1}) \times M_{\text{Se}}(\text{g mol}^{-1})}{\rho_{\text{Se}}(\text{g nm}^{-3}) \times V(\text{nm}^3) \times N_{\text{A}}(\text{mol}^{-1})} \quad (1)$$

where $[\text{SeNPs}]$ represents the molar concentration of SeNPs given in mol SeNPs/L, $[\text{Se}]$ stands for the molar concentration of Se as determined by GFAAS, and M_{Se} denotes the molecular weight of Se (78.96 g mol^{-1}). The variable ρ_{Se} corresponds to the density of Se ($4.82 \times 10^{-21} \text{ g nm}^{-3}$), N_{A} represents the Avogadro constant ($6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), and V signifies the volume of a single SeNP.

As both SeNPs types were spherical, their volume was calculated based on the formula for the sphere

$$V(\text{nm}^3) = \frac{4 \times r^3 \times \pi}{3} = \frac{d(\text{nm})^3 \times \pi}{6} \quad (2)$$

where d is the diameter of the SeNPs obtained from TEM images.

2.5. Steady-State Fluorescence Measurements and Thermodynamic Analysis. An Agilent Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) was used for steady-state fluorescence measurements. Measurements were done at three distinct temperatures (288, 298, and 308 K) using a quartz cuvette (Hellma Optik GmbH, Jena, Germany) with a path length of 10 mm. For the excitation and emission, the slit bandwidths were configured at 5.0 and 10.0 nm, respectively. The excitation wavelength of 280 nm was used, and emission was monitored in the range of 300–450 nm. Preliminary experiments were performed to determine the optimal concentrations of SeNPs and fluorophores for further investigation to avoid the inner-filter effect (IFE). Thus, the IFE correction was not necessary for our study as appropriate dilution of samples was used.²⁶

Intrinsic fluorescence of the fluorophores, which were maintained at constant concentrations throughout the measurements (25 μM dopamine, 15 μM L-DOPA, and 2.5 μM hTF), was quenched by the addition of different concentrations of PVP-SeNPs (0.21–2.60 pM) and Tween-SeNPs (0.72–9.04 pM) at three different temperature (288, 298, and 308 K). The effect of hTF on the interactions between dopamine/L-DOPA and differently functionalized SeNPs was tested by adding 0.5 μM hTF. Reaction mixtures were incubated for 10 min before recording, and all measurements were performed in triplicate.

The obtained results were evaluated using the Stern–Volmer equation

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_{\text{q}}\tau_0[\text{SeNPs}] = 1 + K_{\text{SV}}[\text{SeNPs}] \quad (3)$$

where F_0 represents the steady-state fluorescence intensity of fluorophores in the absence of SeNPs and F stands for the corresponding intensity in their presence. The quenching constant, denoted as k_{q} , signifies the extent of quenching efficiency, while τ_0 indicates the fluorescence lifetime of the fluorophore when SeNPs are not present. The Stern–Volmer constant is K_{SV} .

Moreover, the Hill equation

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K + n\log[\text{SeNPs}] \quad (4)$$

was used to determine the value of the binding constant (K) and the number of binding sites (n) for the interactions between SeNPs and fluorophores (L-DOPA, dopamine, and/or hTF).

The binding constants (K) acquired at temperature T (K) were subsequently applied in the calculation of the enthalpy change (ΔH°), entropy change (ΔS°), and free energy change (ΔG°) using the van't Hoff's expression (eq 5) and the Gibbs–Helmholtz eq (eq 6)

$$\ln K = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (5)$$

$$\Delta H^\circ = \Delta G^\circ - T\Delta S^\circ \quad (6)$$

where R denotes the universal gas constant with a value of $8.31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.

2.6. Time-Resolved Fluorescence Measurements. A conventional time-correlated single-photon counting (TCSPC) system incorporating an imaging spectrometer (Andor Kymera 193i spectrograph) and a single-photon hybrid detector (Becker and Hickl HPM-100-07-C) was used for time-resolved fluorescence measurements. In addition to the monochromator to select the emission wavelength, a WG305 high-pass optical filter was used prior to the monochromator to further reject any possible scattered excitation light. Temporally precise photon events were captured through standard timing electronics comprising an Ortec model 457 time-to-amplitude converter, an Ortec 9307 Picotiming constant fraction discriminator, and a FAST Comtec MCA-3 multichannel analyzer.

The excitation source was derived from the frequency tripled output (280 nm) of a cavity-dumped, modelocked Ti:sapphire laser oscillator. This excitation source produced *ca.* 100 fs duration pulses at a 5.4 MHz repetition rate (Coherent Mira 900 with an APE PulseSwitch cavity dumper). The fluorescence decay of the fluorophores was recorded at an emission wavelength of 310 nm and a temperature of 298 K, with and without the addition of SeNPs. Fluorophore concentration (25 μM dopamine; 15 μM L-DOPA, and 2.5 μM hTF) was kept constant, while the concentrations of PVP-SeNPs and Tween-SeNPs were modulated in the ranges of 0.21–2.60 and 0.72–9.04 pM, respectively. Analysis of spectroscopic data was performed through iterative reconvolution software (FAST, Edinburgh Instruments Ltd.) utilizing a nonlinear least squares method.

2.7. Acellular BBB-Specific PAMPA Assay. The BBB-PAMPA assay used a 96-well plate system in which a polycarbonate membrane (PCTE) of a pore size of 0.4 μm (MultiScreen Permeability Filter Plate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) separated the donor and acceptor plates. BBB was modeled by coating the membrane with Porcine Polar Brain Lipid Extract (PBLE, Avanti Polar Lipids Inc., USA).

Two SeNP concentrations (20 and 200 mg of Se/L) were tested without or with the addition of L-DOPA and dopamine (200 μM). For positive control, carbamazepine was used at a concentration of 500 μM . Test compound solutions were added to the donor plate in triplicate in a volume of 150 μL and covered with a lid to avoid evaporation during the 4 h incubation period at room temperature. The acceptor plate was filled with 270 μL of UPW. After incubation, the samples were collected from both donor and acceptor wells and

analyzed for the total Se concentration by GFAAS or the concentrations of carbamazepine, L-DOPA, and dopamine by UV–vis spectroscopy using the SpectraMax iD3 plate (Molecular Devices, LLC, San Jose, USA). The apparent permeability (P_{app}) of test compounds capable of passive diffusion was calculated using eqs 7 and 8

$$P_{app} = \frac{-\ln\left(1 - \frac{c_A}{c_{eq}}\right)}{A \times \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A}\right) \times t} \quad (7)$$

$$c_{eq} = \left[\frac{c_D(t) \times V_D + c_A(t) \times V_A}{V_D + V_A} \right] \quad (8)$$

where V_D and V_A represent the volumes of the donor and acceptor chambers, respectively, A denotes the membrane's surface area multiplied by its porosity, t denotes the incubation duration, $c_D(t)$ and $c_A(t)$ stand for the concentration (in mol cm⁻³) of the compound in donor compartment and acceptor compartment, respectively, at time t .

2.8. Cell Culture. The cerebral microvascular endothelial cell line hBEC-Si was used for cellular experiments and cultivated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere using T75 flasks (Eppendorf, Hamburg, Germany) coated with a 0.1% (w/v) Gelatin solution (Merck Millipore, Burlington, USA). DMEM/F-12 supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 1% (v/v) Pen-Strep, and 40 g L⁻¹ of endothelial cell growth supplement (ECGS) was used as cell culture media. When cells reached 80–90% confluence, they were detached using a 0.25% Trypsin–EDTA solution (Sigma-Aldrich, USA), incubated for 3 min at 37 °C with 5% CO₂, transferred into a sterile 50 mL tube (Eppendorf, Germany), and finally seeded into 12-well plates or 96-well plates (Eppendorf, Hamburg, Germany) at a density of 100,000 cells/mL or 20,000 cells/well, respectively. Plates were coated with a 0.1% (w/v) Gelatin solution. Cells were ready for use after overnight incubation at 37 °C with 5% CO₂ to facilitate cell attachment.

2.9. Visualization of SeNP Cellular Uptake. The uptake and localization of SeNPs inside the hBEC-Si cells were evaluated by treating the cells with SeNPs at the concentration of 1 mg of Se/L. Negative control was cells treated with UPW to account for the solvent volume in the NP stock dispersions. Sterile microscopy coverslips were used for these experiments by placing them on a 12-well plate. Prior to cell seeding, they were coated with a 0.1% (w/v) Gelatin solution (Merck Millipore, USA). The cell seeding density was set at 10⁴ cells/well. Cells were treated during a 2 h incubation at 37 °C and 5% CO₂. Then, cells were washed with PBS (1 mL/well) and fixed by the addition of cold methanol (–20 °C) for 5 min, followed by another PBS wash. Membrane denaturation was achieved by the treatment with a 0.1% (v/v) solution of Triton X-100 in PBS during 15 min incubation at room temperature and another PBS wash. The cells were then incubated overnight at 4 °C in a diluted solution (1:200) of mouse monoclonal antivimentin primary antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), then washed with PBS, incubated with a secondary antimouse antibody solution labeled with AlexaFluor488 dye (Abcam, UK) at a concentration of 2 μg/mL for 2 h at 37 °C, and washed again. Phalloidin–tetramethyl rhodamine B isothiocyanate (TRITC, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) solution (prepared at 1 μg/mL in PBS with the addition of 0.1% v/v Triton X-100) was used to stain filamentous actin in the cells, and the Hoechst dye (10 μg/mL in PBS, Thermo Fisher Scientific, USA) was used to visualize nuclei. Coverslips with stained cells were covered with Fluoroshield (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and placed onto microscopy slides, which were stored at –20 °C until image acquisition. Visualization was performed using a Leica TCS SP8 X microscope (Leica Microsystems, Germany) by employing the excitation wavelength and detection bands of 405 and 430–550 nm, respectively, for Hoechst, 543 and 570–700 nm, respectively, for TRITC, and 495 and 525 nm, respectively, for Phalloidin-TRITC. Unlabeled SeNPs were seen in the reflectance mode channel, and

acquired images were superimposed upon images obtained from fluorescence channels. Z-stack images were captured to differentiate particles localized within cells from those attached to the cell or glass surface. The separate channels were combined using the ImageJ editor (University of Wisconsin, USA).

2.10. In Vitro Cellular BBB Permeability Assay. Cellular BBB permeability measurements were performed only for nontoxic SeNPs as tested by cell viability experiments. For this purpose, a transwell assay consisting of Corning transwell inserts in a transparent 24-well acceptor plate (acquired from Merck Millipore, USA) was used, in which hBEC-Si cells were seeded at a density of 20,000 cells/well, following incubation for 3 days at 37 °C and 5% CO₂. Upon achieving full cell confluence, checked daily with an Epithelial Volt/Ohm Meter 3 (EVOM3, World Precision Instruments, Sarasota, USA), the cell culture media in both donor and acceptor compartments were replaced with PB solution, and cells were treated with SeNPs at a concentration of 1 mg Se/L without or with the addition of L-DOPA or dopamine (10 μM) for 3 h at 37 °C and 5% CO₂. After treatment, the amount of SeNPs, L-DOPA, or dopamine remaining in the cells was determined by lysis cells with UPW and removing them. Trypsin–EDTA solution (Sigma-Aldrich, USA) was used to dissolve the gelatin coating on inserts to collect SeNPs that had traversed the cell layer but not entered the acceptor compartment. Determination of total Se concentrations in four compartments (donor, acceptor, cell, and gelatin fraction) was conducted using GFAAS, while concentrations of L-DOPA and dopamine were determined by commercial ELISA assays (MyBioSource, Inc., San Diego, USA).

2.11. Statistical Analysis. GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, USA) was used for all statistical analyses. One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test was used to obtain statistical significance between treated cells and negative controls, which was set at the significance threshold of $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Synthesis and Physicochemical Characterization of SeNPs. PVP- and Tween-SeNPs were prepared by a reduction method using LAA as a reducing agent and PVP and Tween 20 for surface stabilization. All reaction parameters including temperature, duration and speed of mixing, and reactant concentration were optimized within this study for the preparation of PVP-SeNPs, whereas Tween-SeNPs were prepared according to Vahdati and Tohid Moghadam²⁵ without further optimization. DLS and ELS measurements of SeNPs in UPW provided d_H and ζ potential values, respectively (Table 1). The d_H of all SeNPs, ranging from

Table 1. Hydrodynamic Diameter (d_H) and Polydispersity Index (PDI) Derived from the Size Intensity-Weighted Distribution ($n = 6$) Utilizing the Dynamic Light Scattering (DLS) Technique^a

NPs type	d_H /nm (% mean volume)	PDI	ζ /mV	d_{TEM} /nm
PVP-SeNPs	82.9 ± 0.5 (100)	0.04	–28.0 ± 1.9	79.4 ± 6.9
Tween-SeNPs	71.5 ± 0.4 (100)	0.05	–28.4 ± 1.0	52.4 ± 6.7

^aThe ζ potential ($n = 3$) is acquired by electrophoretic light scattering (ELS), and the primary diameter is determined from TEM images (d_{TEM} , $n = 100$) of SeNPs in UPW.

71.5 to 82.9 nm, was larger than their primary size obtained by TEM. This discrepancy may result from the inability of TEM analysis to observe the functionalizing agents on the nanosurface, while DLS reflects the behavior of NPs in the medium and includes not only the size of NPs but also the hydration shell on the surface of NPs.²⁷ Observed PDI values were near

zero for both SeNPs, indicating the formation of monodisperse SeNPs.²⁸ According to the ELS evaluation, both SeNPs types were characterized by a negative ζ potential value (Table 1) indicating good colloidal stability.²⁸ The morphology of SeNPs characterized by TEM (Figure 1) was in agreement with DLS measurements and evidence of monodisperse and homogeneous spherical PVP-SeNPs and Tween-SeNPs with primary diameters of 79.4 and 52.4 nm, respectively.

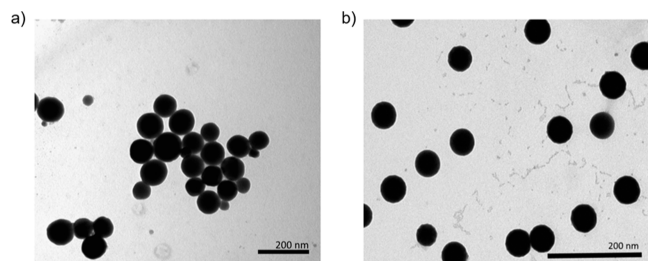


Figure 1. Transmission electron micrographs of (a) PVP-SeNPs and (b) Tween-SeNPs.

An additional analysis of the SeNPs along with UV–vis spectroscopy revealed distinctive maximum absorbance peaks at 260 nm for both Tween-SeNPs and PVP-SeNPs (Figure S1 in the Supporting Information) as already reported in earlier studies which also used LAA-based synthesis of SeNPs.^{25,29} The peak at 260 nm was ascribed to the activation of localized surface plasmons, inducing intense light scattering through the electric field (resonance).³⁰ The observed red color of the reaction mixture is another evidence of the stimulation of

surface plasmon oscillations within the SeNPs, offering a beneficial spectroscopic indicator of their creation.³⁰

Previous studies^{31,32} reported that the chemical reduction mostly yields amorphous nanospheres. When LAA was used as a reducing agent, SeNPs were a mixture of amorphous and monoclinic Se with the prevalence of the amorphous one.³¹ SeNPs can also adopt a trigonal crystalline structure using different synthesis protocols in which amorphous SeNPs are generated and trigonal SeNPs seed in the second phase driven by processes such as ultrasonication, rapid cooling, or aging. Ultimately, these seeds act as templates for directing anisotropic crystal growth, enabling the creation of diverse SeNP shapes.³³ Se nanowires may be prepared by the reduction of selenium selenite with hydrazine at 100 °C followed by growth along the [001] direction, while Se nanobelts have a [101] preferred growth direction.^{34,35} Se nanotubes may be obtained by crystal growth along the *c*-axis without any templates or surfactants due to the exceptional anisotropy feature of Se,³⁶ while bacterial synthesis usually leads to Se trigonal nanorods.³⁰ Besides bacteria, plants (olive leaves, ...) and other microorganisms such as fungi and algae have been used as reducing and stabilizing agents in environment-friendly synthesis methods.^{30,37,38} Such methods usually yield SeNPs with antibacterial, antifungal, anticancer, antioxidant, antidiabetic, and antiparasitic activities³⁹ but also SeNPs for biosensing applications.⁴⁰ Physical methods for SeNPs preparation include microwave irradiation, pulsed laser ablation (PLA), hydrothermal methods, physical evaporation, and ultrasonication. Although these methods are not widely popular for the preparation of SeNPs with biological properties, the PLA method generated SeNPs with anti-

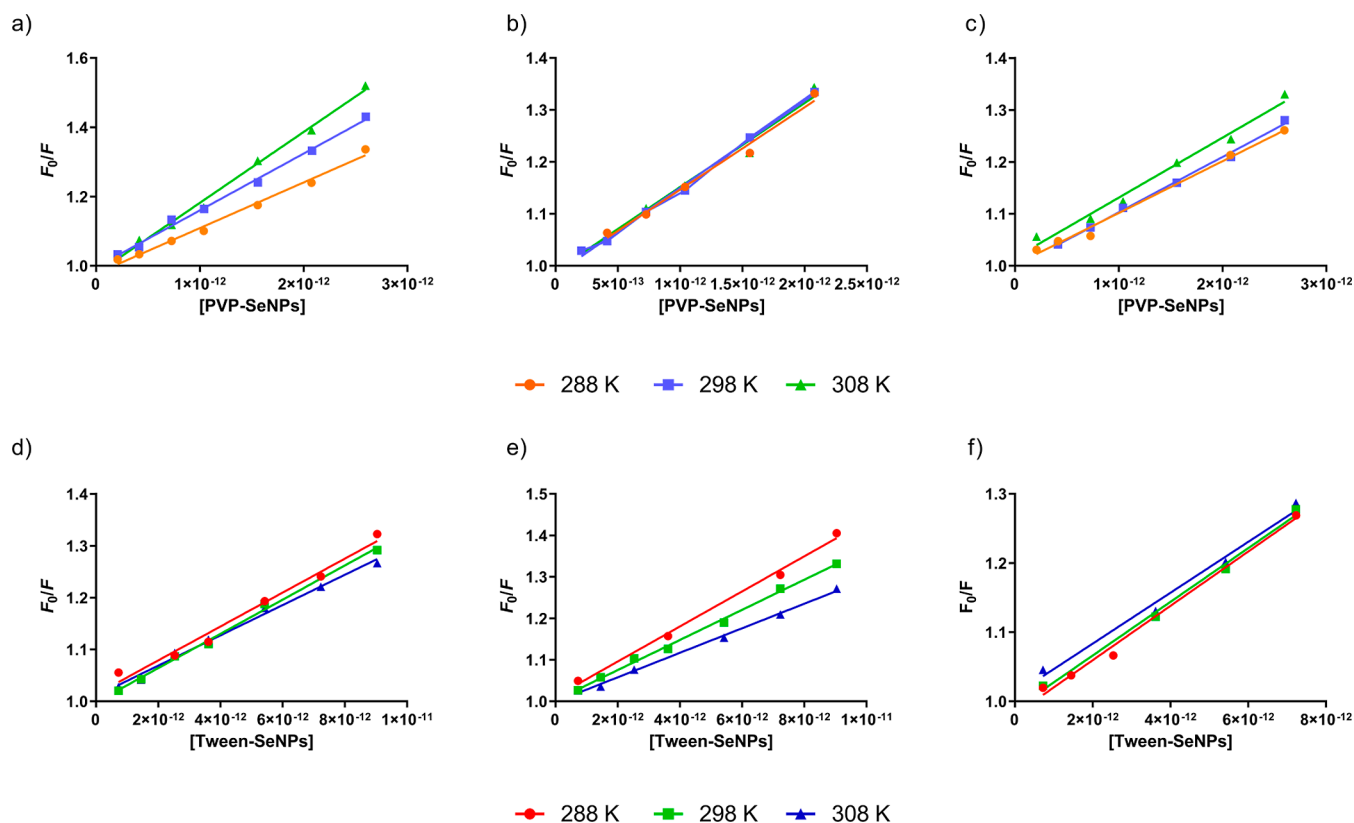
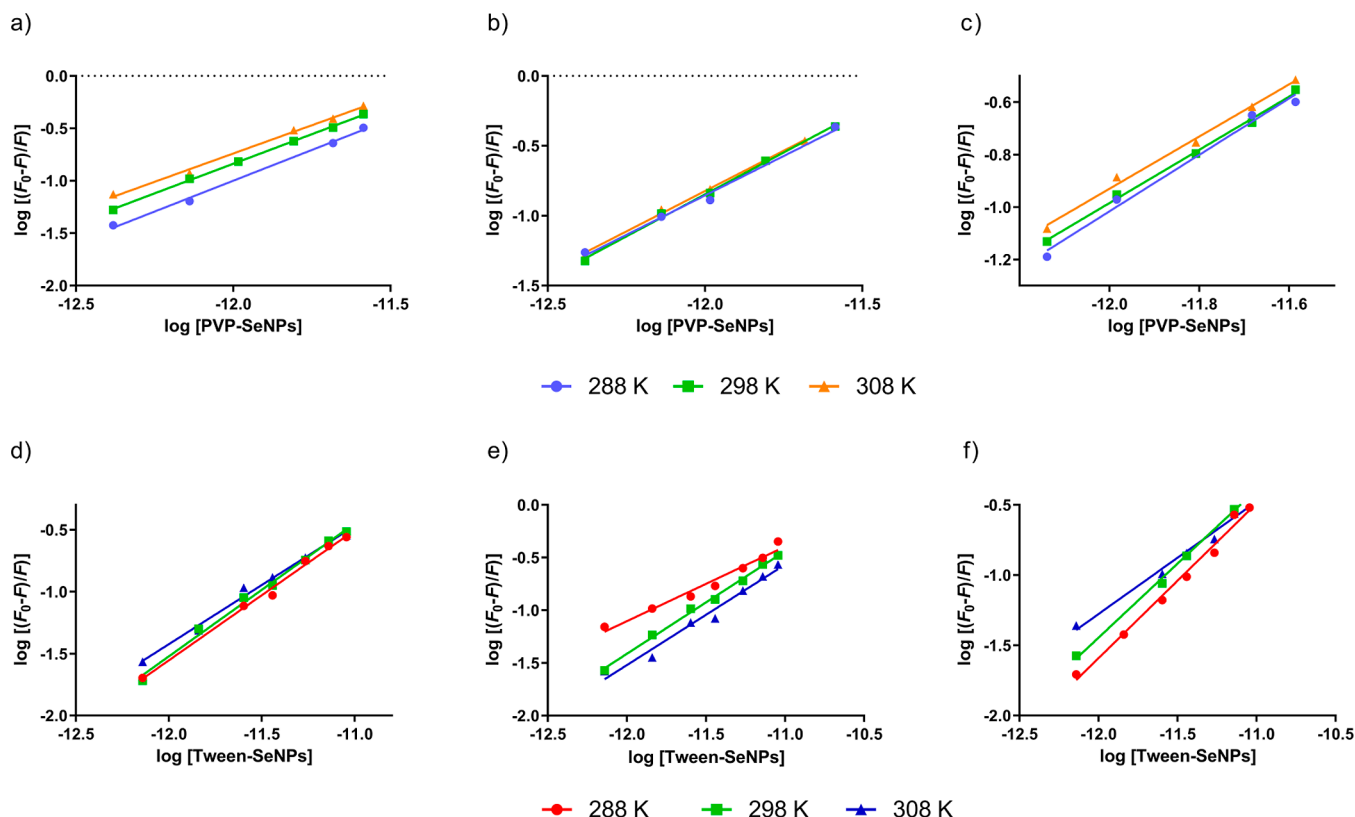


Figure 2. Stern–Volmer plots for fluorescence quenching of (a) L-DOPA, (b) dopamine, and (c) hTF by PVP-SeNPs, as well as of (d) L-DOPA, (e) dopamine, and (f) hTF by Tween-SeNPs, at different temperatures (288, 298, and 308 K).

Table 2. Stern–Volmer Quenching Constants (K_{SV}) for the Interactions of L-DOPA, Dopamine, or hTF with PVP-SeNPs and Tween-SeNPs at 308, 298, and 288 K^a

T (K)	$K_{SV} \times 10^{10} (M^{-1})$					
	L-DOPA		dopamine		hTF	
	PVP-SeNPs	Tween-SeNPs	PVP-SeNPs	Tween-SeNPs	PVP-SeNPs	Tween-SeNPs
288	13.3 ± 0.3	3.4 ± 0.2	17.5 ± 0.4	4.5 ± 0.3	12.5 ± 0.4	4.1 ± 0.1
298	16.4 ± 0.2	3.3 ± 0.1	17.1 ± 0.5	3.7 ± 0.1	11.1 ± 0.2	3.9 ± 0.0
308	20.3 ± 0.4	3.2 ± 0.1	16.2 ± 0.1	2.9 ± 0.0	10.4 ± 0.1	3.6 ± 0.1

^aThe results are presented as average values of three independent measurements.**Figure 3.** Hill plots for the temperature-dependent fluorescence quenching induced by PVP-SeNPs for (a) L-DOPA, (b) dopamine, and (c) hTF and by Tween-SeNPs for (d) L-DOPA, (e) dopamine, and (f) hTF.

bacterial activity.⁴¹ Anyhow, chemical reduction is still a method of choice due to its simplicity, cost-effectiveness, efficiency, and capacity to regulate structural properties by fine-tuning synthesis conditions.⁴² According to previous studies,^{31,32} we may consider PVP- and Tween-functionalized SeNPs prepared here as a mixture of amorphous and monoclinic crystal structures.

3.2. Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Measurements. Steady-state fluorescence spectroscopy is widely employed to study the interactions of biomolecules and NPs, providing information on fluorescence quenching mechanisms.⁴³ Hence, we used it to evaluate binding affinities of L-DOPA, dopamine, and hTF to differently coated SeNPs. To date, data on the molecular interactions of L-DOPA and dopamine with SeNPs are not available. Here, we present insights into these interactions to improve current knowledge about SeNPs as potential delivery systems of L-DOPA and dopamine. Additionally, interactions between SeNPs and hTF were investigated to estimate the impact of serum proteins (hTF) on the interaction mechanisms between dopamine or L-

DOPA and functionalized SeNPs. Limited research has been conducted on the interaction between SeNPs and serum albumin,^{44,45} while their interactions with hTF remain unexplored.

The fluorescence spectral properties of L-DOPA and dopamine were based on the contribution from phenylalanine,²⁴ while tryptophan (Trp) and tyrosine (Tyr) predominantly contributed to the intrinsic fluorescence of hTF.^{46,47} When excited at 280 nm, L-DOPA and dopamine exhibited fluorescence emissions at 317 nm and hTF displayed emission at 350 nm. Increasing concentrations of PVP-SeNPs and Tween-SeNPs reduced the intrinsic fluorescence of the fluorophores at each tested temperature (288, 298, or 308 K). These fluorescence quenching results (as presented in Figure S2 of the Supporting Information) evidenced the binding interaction of L-DOPA, dopamine, and hTF with the nanosurface.

The Stern–Volmer plots were used to study the quenching mechanism (Figure 2). A single quenching mechanism, either dynamic or static, was evidenced by the successful fitting of

Table 3. Binding Constants (K) for the Interaction of L-DOPA, Dopamine, or hTF with PVP- and Tween-SeNPs at Three Different Temperatures, Obtained from Three Independent Measurements

T (K)	$K \times 10^{10} (\text{M}^{-1})$					
	L-DOPA		dopamine		hTF	
	PVP-SeNPs	Tween-SeNPs	PVP-SeNPs	Tween-SeNPs	PVP-SeNPs	Tween-SeNPs
288	1110.0 $\pm$ 79.4	8.2 $\pm$ 4.0	515.0 $\pm$ 86.4	7.0 $\pm$ 0.9	73.2 $\pm$ 11.4	294.0 $\pm$ 47.6
298	480.0 $\pm$ 102.0	3.8 $\pm$ 0.2	250.0 $\pm$ 51.6	1.2 $\pm$ 0.1	23.2 $\pm$ 2.3	16.5 $\pm$ 0.5
308	178.0 $\pm$ 16.2	2.0 $\pm$ 0.1	144.0 $\pm$ 3.7	0.4 $\pm$ 0.0	10.3 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 0.0

Table 4. Enthalpy Change (ΔH^0), Entropy Change (ΔS^0), and Gibbs Free Energy Change (ΔG^0) for the Interaction of L-DOPA, Dopamine, or hTF with PVP- and Tween-SeNPs

SeNPs type	fluorophore	$\Delta H^0 \times 10^4 (\text{kJ mol}^{-1})$	$\Delta S^0 (\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1})$	$\Delta G^0 \times 10^4 (\text{kJ mol}^{-1})$		
				288 K	298 K	308 K
PVP-SeNPs	L-DOPA	−6.8	15.5	−7.20	−7.22	−7.23
Tween-SeNPs	L-DOPA	−5.2	29.5	−6.88	−6.38	−5.88
PVP-SeNPs	dopamine	−4.7	80.0	−7.00	−7.08	−7.16
Tween-SeNPs	dopamine	−11.1	−177.0	−5.96	−5.79	−5.61
PVP-SeNPs	hTF	−7.2	−24.5	−6.53	−6.51	−6.48
Tween-SeNPs	hTF	−21.3	−500.0	−6.88	−6.38	−5.88

Stern–Volmer plots with a linear Stern–Volmer equation across three distinct temperatures (308, 298, and 288 K).

Stern–Volmer quenching constants (K_{sv}) were determined according to linear regression of eq 3, as presented in Table 2. For each tested combination, a decline in K_{sv} values with the increase in temperature was observed, except for the L-DOPA/PVP–SeNP combination. Such a result shows a static quenching mechanism, wherein the fluorophore and quencher create a complex in their ground state. Therefore, higher temperatures could disturb this groundstate complex formation due to the destabilization of a weak bond between them.⁴⁸

Time-resolved fluorescence measurements at 298 K enabled the determination of bimolecular quenching constants (k_q), as listed in Table S1 of the Supporting Information. Notably, the calculated k_q values exceeded the upper limit anticipated for collision-controlled quenching constants ($1.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), which implies that the primary fluorescence quenching of the fluorophores interacting with SeNPs was not initiated by dynamic collisions but rather originated from a static quenching mechanism.⁴⁹

Time-resolved measurements were also employed to investigate the intrinsic nature of the quenching mechanism by evaluating the fluorescence decay of L-DOPA, dopamine, and hTF in the presence and absence of differently functionalized SeNPs.⁵⁰

It was observed that L-DOPA and dopamine fluorescence decay curves were single-exponential, while biexponential decay was observed in the case of hTF. The amplitude-averaged lifetimes of the biexponential decay of hTF fluorescence (with or without the addition of SeNPs) were obtained using eq 9

$$\langle \tau \rangle = \frac{(\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2)}{(\alpha_1 + \alpha_2)} \quad (9)$$

where τ_1 and τ_2 are lifetimes and α_1 and α_2 are pre-exponential factors.

The amplitude average fluorescence lifetimes of each fluorophore did not significantly decrease with the addition of PVP- and Tween-SeNPs, demonstrating that fluorescence quenching occurred by a static mechanism. The Stern–Volmer

plots using time-resolved (τ_0/τ) and steady-state emission data (F_0/F) are shown in Figure S3. The Stern–Volmer plots derived from time-resolved emission for all SeNP–fluorophore complexes are flat lines ($\tau_0 = \tau$) unlike those obtained using the steady-state emission data. These observations support previously reported results and are clear evidence of a static quenching mechanism.⁵¹

3.3. Mechanism of Binding and Characteristics of Binding Forces. Binding affinities (K) of PVP- and Tween-SeNPs with L-DOPA, dopamine, or hTF, as well as the number of binding sites (n), were obtained from the double logarithmic regression curves (Figure 3) based on the modified Stern–Volmer eq (eq 4).

The K (Table 3) and n values (Table S2 in the Supporting Information) were determined at three distinct temperatures (288, 298, and 308 K) by analyzing the intercept and the slope (the antilog of the y-intercept) of the Hill plots ($\log(F_0 - F)/F$ vs $\log[\text{SeNPs}]$). These results showed the highest affinity for L-DOPA and the lowest for dopamine. Considering the influence of surface coatings of SeNPs on binding constants, PVP-SeNPs showed stronger binding affinities to L-DOPA and dopamine. However, the lower K values observed for the interaction of L-DOPA and dopamine with Tween-SeNPs compared to that for PVP-SeNPs may be explained by the differences in the size of these to SeNPs as reported for the interaction of AuNPs with different biomolecules, although AgNPs exhibited opposite behavior.^{52,53} Thus, the scientific literature does not provide unambiguous evidence of the correlation between binding affinities and NP size. Furthermore, even if a **tendency of increase in binding constant with NPs size were to exist, it becomes negligible when NPs have a diameter larger than about 60 nm.**⁵² Contrarily, Tween-SeNPs showed greater binding strength to hTF than SeNPs coated with PVP.

Protein cooperativity in binding processes was estimated from the Hill coefficients (Table S2 in the Supporting Information). These results show that the protein's affinity for the nanosurface was independent of the presence of other protein molecules already bound to the surface as n values for all tested interactions are near 1.⁵⁴

As can be seen in Table 3, the temperature increase led to lower K values suggesting noncovalent interactions as the main

driver of bonding of fluorophores to the SeNP surface. Unlike covalent interactions, weak noncovalent interactions tend to weaken at higher temperatures leading to the destabilization of SeNP–fluorophore complexes.⁵⁵ Thermodynamic parameters (ΔH^0 , ΔS^0 , and ΔG^0 given in Table 4) divulged the forces operating between SeNPs and fluorophores during their interaction.

Values of $\Delta S^0 > 0$ and $\Delta H^0 < 0$ for the interaction of L-DOPA with both types of SeNPs evidence the electrostatic interactions as dominant forces that could also explain the highest binding constants. As reactions occurred in samples with pH close to 5, L-DOPA had both positive and negative charges akin to zwitterions.⁵⁶ Such molecules show a high tendency to bind on metal surfaces through electrostatic interactions.⁵⁷ Binding of dopamine to PVP-SeNPs may be explained by a similar mechanism as this interaction is characterized by attractive forces between the positively charged amino group of dopamine (which becomes N-protonated in an acidic environment) and the negatively charged SeNP surface.⁵⁸ Hydrogen bonds and van der Waals interactions were observed for the binding of hTF with both types of SeNPs and dopamine with Tween-SeNPs as ΔS^0 and ΔH^0 showed negative values. Tween- and PVP-functionalized SeNPs present carbonyl oxygen at the surface and, thus, allowed hydrogen bonding with hTF and dopamine.⁵⁹ Such bonding between biomolecules and other types of NPs is reported in the literature.^{49,60} Hydrophobic interactions were not a factor in the binding of L-DOPA and dopamine with SeNPs, which is in accordance with previously published results for AuNPs.⁶⁰ ΔG^0 values, obtained according to eq 6, showed negative values (Table 4) which indicate that the binding processes occurred spontaneously.⁶¹

Additionally, it was crucial to assess the impact of proteins existing within biological media on the binding process. As interactions of NPs with serum proteins might cause a protein corona on the nanosurface and considerably affect the drug-binding efficiency, the effect of protein corona formation on the binding process was assessed using hTF as a representative model of serum proteins characterized by its prolonged presence in the bloodstream.⁶² Polymers used for functionalization, PVP and Tween 20, were selected to improve stability, biocompatibility, selective uptake, biodistribution, and increase in circulation time of SeNPs in the biological system, which are critical parameters for acquiring a suitable nanodrug-delivery system.⁶³

To evaluate the influence of transferrin on binding of L-DOPA and dopamine to SeNPs, fluorescence titration measurements were repeated but with the addition of hTF. Results obtained here were compared with binding affinities obtained in the absence of hTF (Figure S5a,b) with the aim of calculating the reduction in binding constants (Figure S5c). A reduction in binding constant occurred for both surface coatings. However, there were differences in the percentage of reduction depending on the functionalizing agents. In our previous paper on AuNPs, the impact of bovine serum protein (BSA) was investigated, and the lowest reduction in K values was observed for the NPs that had the strongest binding affinity to L-DOPA and dopamine.⁶⁰ Interestingly, the results obtained here showed the opposite effect. Despite significantly weaker binding of L-DOPA and dopamine to Tween-SeNPs compared to PVP-SeNPs in the absence of hTF, the addition of hTF decreased K values to a higher extent for PVP-SeNPs than for Tween-SeNPs, causing similar K values for both

SeNPs (Figure S5 in the Supporting Information). On the other hand, hTF had a slightly greater affinity for PVP-SeNPs in comparison with Tween-SeNPs under the conditions where the effect of hTF was investigated ($T = 298$ K). This may disrupt the binding of L-DOPA/dopamine and consequently cause a reduction in binding constants. Hence, Tween-SeNPs might offer a more favorable choice as a drug-delivery system owing to their enhanced resilience against proteins in biological media. It is known that the protein corona formation relies on the interactions between NPs and proteins, as well as the interactions among proteins themselves. This process can lead to an enlargement of the NPs' core dimensions and also cause alterations in their inherent surface charge, resulting in shifts in ζ potential.⁶² Therefore, DLS and ELS measurements were performed after the interactions of SeNPs with hTF, and the results are presented in Figure S6 (in the Supporting Information). hTF adsorption on PVP- and Tween-SeNPs increased the d_H values in both cases, but the increase in ζ potential was more obvious for the binding of hTF on PVP-SeNPs, which indicated the formation of a protein corona.⁶⁴ On the other hand, the ζ potential value of Tween-SeNPs showed minimal changes upon exposure to hTF. This result additionally confirmed that hTF did not affect Tween-SeNP greatly. Thus, Tween stabilization may improve L-DOPA- and dopamine-specific delivery to the brain by increasing their blood circulation lifetime. This finding indicates that the systems with greater binding affinity are not always the best options for drug delivery and the importance of providing a comprehensive analysis.

3.4. BBB Permeability. BBB permeability of PVP- and Tween-SeNPs alone and their efficacy in the transfer of L-DOPA and dopamine across the BBB were evaluated by acellular and cellular models.

PAMPA-BBB acellular assay has been considered a suitable model for the prediction of passive BBB permeability.⁶⁵ In this assay, the donor wells were filled with PVP- or Tween-SeNPs alone and in combination with L-DOPA or dopamine, while the acceptor wells were separated by PCTE coated with polar brain lipid extract to mimic BBB. As a benchmark, a widely accepted FDA standard, carbamazepine, was employed to ensure the reliability of the results, given its established capability to permeate cell membranes and passively diffuse into the acceptor wells.⁶⁶ Loaded donor compartments were incubated for 4 h, and the content of each compartment was explored by UV–vis spectroscopy for carbamazepine, L-DOPA, and dopamine recording spectra at 280 nm (the wavelength where catechols and carbamazepine exhibit their highest absorbance), while GFAAS measurements were carried out for PVP- and Tween-SeNPs. After 4 h incubation, a very low amount of SeNPs was discerned in the acceptor compartment (Table S3). This observation was in accordance with the published results of AuNPs,⁶⁷ which allows us to conclude that the passive diffusion is not the BBB transport route for SeNPs. Additionally, no catechols were found in the acceptor plate. Even when bound to SeNPs, they could not pass the BBB passively. In contrast, carbamazepine was the only compound that successfully permeated the artificial membrane. According to eq 7, the $\log(P_{app})$ for carbamazepine was calculated, and the value of -4.46 was in accordance with the previously reported value of -4.54 .⁶⁸

The transwell assay with HBEC-Si cells exhibiting cell-specific protein expressions⁶⁹ was used as an *in vitro* BBB model as it may better predict BBB permeability compared to

the PAMPA assay. It accounts not only for passive diffusion but also for active transport mechanisms, thereby yielding more reliable results.⁶⁷

Before cellular BBB permeability experiments, the effects of different doses of SeNPs with or without L-DOPA or dopamine on cellular viability and oxidative stress response in hBEC-Si cells were investigated to determine a safe SeNP dose. Results and methodology are presented in [Supporting Information](#). Following this initial assessment, cellular BBB permeability experiments were carried out with nontoxic doses of SeNPs (1 mg Se/L) and in combination with L-DOPA or dopamine using hBEC-Si cells cultured on a permeable membrane pretreated with a 0.1% w/v gelatin solution. This monoculture configuration separates two donor and acceptor plates that were analyzed for the total SeNPs content of GFAAS ([Figure 4](#)). After an incubation period of 3 h, the

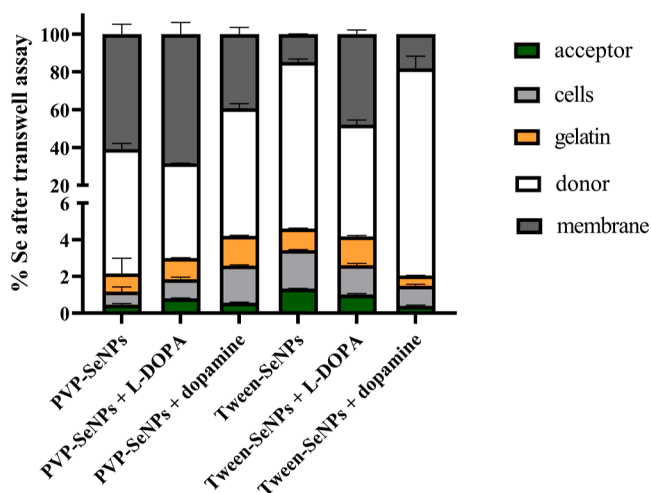


Figure 4. Percentages of Se in four different compartments (acceptor, cells, gelatin, donor, and membrane) calculated from GFAAS measurements after transwell assay.

highest amount of SeNPs remained within the donor compartment or SeNPs adsorbed to the membrane, while less than 10% of Se was detected within the acceptor plate, gelatin layer, and cellular fraction altogether.

In the case of treatment of cells only with SeNPs, only 1% of Se was found in the acceptor compartment. Interestingly, an increase in Se concentration emerged in all the three compartments—acceptor, gelatin, and cells—when cells were treated with a combination of PVP-SeNPs with L-DOPA or dopamine, while the same combinations with Tween-SeNPs yielded an inverse trend ([Figure 4](#)). Moreover, the presence of L-DOPA enhanced the adherence of both PVP-SeNPs and Tween-SeNPs to the membrane. Comparable results were observed when dopamine was combined with Tween-SeNPs, but it reduced the attachment of PVP-SeNPs to the membrane by 20%, compared to PVP-SeNPs alone. The presence of Se was also found in the gelatin compartment, and this could be evidence that all tested compounds penetrated the cells to certain degrees. Indeed, the presence of both SeNPs inside the treated hBEC-Si cells was confirmed using confocal microscopy ([Figure 5](#) and [Movies S1](#) and [S2](#)). As both PVP- and Tween-SeNPs were found in hBEC-Si cells, they hold great potential to become delivery systems for dopamine and enable its transport through the BBB ([Figure 5](#)). For the SeNP-based delivery system, additional features can be expected. They

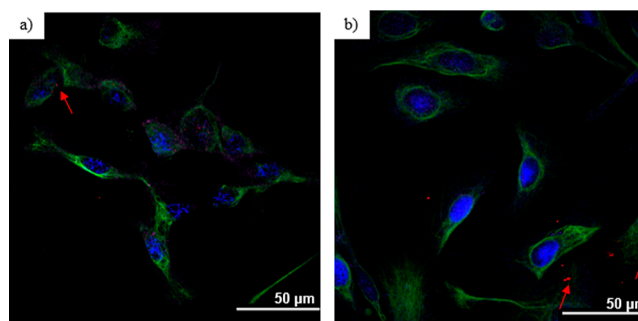


Figure 5. Confocal images displaying hBEC-Si cells subjected to treatment with (a) Tween-SeNPs and (b) PVP-SeNPs at a concentration of 1 mg Se/L for 2 h. Visualization of the SeNPs utilized the contrast reflection mode. Vimentin fibers are depicted in green, actin fibers in magenta, SeNPs as red points within the reflectance channel, and cell nuclei in blue. Red arrows indicate internalized SeNPs. The provided images are compilations of distinct channels. The scale bar is established at 50 μm .

could potentially protect L-DOPA from degradation in peripheral tissues and enhance its amount in the brain. As PD is primarily manifested in decreased levels of dopamine caused by the degeneration and loss of dopaminergic neurons, dopamine concentrations might be substituted in this way more efficiently.

Although the BBB transwell model is often employed as a rapid screening technique for drug permeability, our results revealed its limitations for evaluating the BBB permeability of NPs. We observed several technical difficulties in gaining reliable results including NP self-agglomeration and adherence to the transwell membrane.⁶⁹ The results obtained from DLS experiments showed that PVP- and Tween-SeNPs agglomerated in PBS (used during cellular BBB experiments) with d_H values of 132.2 ± 11.5 and 101.9 ± 7.1 nm, respectively, in comparison with UPW (see [Table 1](#)). These agglomerates could exceed the membrane's size limits, compromising the reliability of such an assay compared to *in vivo* conditions.

On the other hand, the possible adsorption of SeNPs to the membrane of transwell inserts was further investigated using the cell-free system whereby the impact of a gelatin coating was tested. Results are presented in [Table S4](#) (in the Supporting Information). Se concentrations in donor and acceptor wells or in the gelatin layer were monitored using GFAAS. We found that 50% of PVP-SeNPs adsorbed to the membrane when no gelatin coating was used, while no attachment to and no permeation across the membrane were observed for Tween-SeNPs. When the membrane was coated with gelatin, significant adsorption of both SeNPs types to the membrane was observed (approximately 80% of the total amount). These findings are similar to those acquired from the cellular transwell assay, where a similar SeNP quantity was entrapped within the gelatin compartment. Thus, the applicability of such an *in vitro* model is questionable for SeNPs and similar NPs.

The ability of SeNPs to transport dopamine or L-DOPA across the BBB was evaluated by measuring the concentrations of these catechols in each compartment using commercial ELISA kits and strictly following instructions given by the manufacturer (MyBioSource, Inc., San Diego, USA). However, despite the values given for the sensitivity and specificity of the kit, it was not possible to precisely determine the concentration of either dopamine or L-DOPA. We observed severe interference with both the cellular matrix and SeNPs. Due to

the previously described problems of SeNP agglomeration in media used for transwell experiments as well as adsorption of SeNPs to the membranes of transwell inserts, no further efforts were made to validate the analytical approach for quantification of L-DOPA and dopamine. Instead, further development of cellular *in vitro* models for BBB permeability of drugs loaded on SeNPs and similar NPs is needed.

4. CONCLUSIONS

Two different SeNPs, coated with PVP or Tween 20, were investigated as potential delivery systems for L-DOPA and dopamine, aiming to facilitate BBB passage. First, steady-state and time-resolved fluorescence measurements revealed that the binding of L-DOPA and dopamine to SeNPs quenched their fluorescence *via* a static quenching mechanism. Binding affinity was larger for the interaction between L-DOPA/dopamine and PVP-SeNPs compared with the Tween-SeNPs. By contrast, the reduction in binding constants of L-DOPA/dopamine-SeNPs systems was much lower for Tween-SeNPs. Thermodynamic analysis revealed that the interactions occurred spontaneously and primarily due to hydrogen bonding, van der Waals, or electrostatic interactions. The permeability of these potential drug-delivery systems was further investigated using acellular and cellular *in vitro* models of the BBB using nontoxic doses of SeNPs or their nontoxic complexes with L-DOPA or dopamine. Despite observed internalization of SeNPs by the endothelial brain cells and an increase in the translocation of L-DOPA and dopamine across the BBB when bound to SeNPs, these *in vitro* models lack the complexity to mimic appropriately the human BBB. Moreover, SeNPs interfere with these models due to their agglomeration and adsorption behavior, which significantly hamper the applicability and reliability of such models for use with SeNPs and similar NPs. Therefore, future studies should employ *in vivo* investigation and cutting-edge technologies based on stem cells in order to obtain physiologically relevant results, which will enable a better test as to whether these systems have the potential to deliver therapeutics into the brain.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsanm.3c02749>.

UV–vis absorption spectra of SeNPs, fluorescence emission spectra and binding affinities of fluorophores to SeNPs in the absence and presence of hTF, Hill coefficients, values of the fluorescence lifetime of fluorophores and quenching constants, Van't Hoff plots and plots of F_0/F and τ_0/τ vs nanoparticle concentration, SeNPs cytotoxicity assessment including methods and results, and PAMPA-BBB assay (PDF)

Confocal images displaying hBEC-5i cells subjected to treatment with Tween-SeNPs (MP4)

Confocal images displaying hBEC-5i cells subjected to treatment with PVP-SeNPs (MP4)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Ivana Vinković Vrček – Institute for Medical Research and Occupational Health, 10000 Zagreb, Croatia; orcid.org/0000-0003-1382-5581; Email: ivinkovic@imi.hr

Authors

Nikolina Kalčec – Institute for Medical Research and Occupational Health, 10000 Zagreb, Croatia

Nikolina Peranić – Institute for Medical Research and Occupational Health, 10000 Zagreb, Croatia

Ivan Mamić – Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

Maja Beus – Institute for Medical Research and Occupational Health, 10000 Zagreb, Croatia

Christopher R. Hall – Australian Research Council Centre of Excellence in Exciton Science, School of Chemistry, University of Melbourne, Melbourne, Victoria 3010, Australia;

orcid.org/0000-0003-1267-1277

Trevor A. Smith – Australian Research Council Centre of Excellence in Exciton Science, School of Chemistry, University of Melbourne, Melbourne, Victoria 3010, Australia;

orcid.org/0000-0003-4453-9713

Marc Antoine Sani – School of Chemistry, Bio21 Institute, University of Melbourne, Melbourne, Victoria 3010, Australia; orcid.org/0000-0003-3284-2176

Petra Turčić – Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

Frances Separovic – School of Chemistry, Bio21 Institute, University of Melbourne, Melbourne, Victoria 3010, Australia; orcid.org/0000-0002-6484-2763

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsanm.3c02749>

Author Contributions

The manuscript was written through the contributions of all authors. All authors have approved the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by the “Research Cooperability” Program of the Croatian Science Foundation funded by the European Union from the European Social Fund under the Operational Programme Efficient Human Resources 2014–2020 (grant HRZZ-PZS-2019-02-4323). We would also like to gratefully acknowledge the support from the Australian Research Council Centre of Excellence in Exciton Science (CE170100026). Results presented in this manuscript originate from the doctoral dissertation of Nikolina Kalčec entitled “Design and characterization of gold and selenium nanoparticles as potential delivery systems of levodopa and dopamine”.⁷⁰

■ REFERENCES

- (1) WHO. The Top 10 Causes of Death <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed May 17, 2023).
- (2) Dorsey, E. R.; Elbaz, A.; Nichols, E.; Abbasi, N.; Abd-Allah, F.; Abdelalim, A.; Adsuar, J. C.; Ansha, M. G.; Brayne, C.; Choi, J. Y. J.; Collado-Mateo, D.; Dahodwala, N.; Do, H. P.; Edessa, D.; Endres, M.; Fereshtehnejad, S. M.; Foreman, K. J.; Gankpe, F. G.; Gupta, R.; Hamidi, S.; Hankey, G. J.; Hay, S. I.; Hegazy, M. I.; Hibstu, D. T.; Kasaeian, A.; Khader, Y.; Khalil, I.; Khang, Y. H.; Kim, Y. J.; Kokubo, Y.; Logroscino, G.; Massano, J.; Mohamed Ibrahim, N.; Mohammed, M. A.; Mohammadi, A.; Moradi-Lakeh, M.; Naghavi, M.; Nguyen, B. T.; Nirayo, Y. L.; Ogbo, F. A.; Owolabi, M. O.; Pereira, D. M.; Postma, M. J.; Qorbani, M.; Rahman, M. A.; Roba, K. T.; Safari, H.;

- Safiri, S.; Satpathy, M.; Sawhney, M.; Shafieesabet, A.; Shiferaw, M. S.; Smith, M.; Szoce, C. E. I.; Tabarés-Seisdedos, R.; Truong, N. T.; Ukwa, K. N.; Venketasubramanian, N.; Villafaina, S.; weldegwegers, K. g.; Westernman, R.; Wijeratne, T.; Winkler, A. S.; Xuan, B. T.; Yonemoto, N.; Feigin, V. L.; et al. Global, Regional, and National Burden of Parkinson's Disease, 1990–2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 939–953.
- (3) Yasuda, T.; Nakata, Y.; Mochizuki, H. α -Synuclein and Neuronal Cell Death. *Mol. Neurobiol.* **2013**, *47*, 466–483.
- (4) Haddad, F.; Sawalha, M.; Khawaja, Y.; Najjar, A.; Karaman, R. Dopamine and Levodopa Prodrugs for the Treatment of Parkinson's Disease. *Molecules* **2017**, *23*, 40.
- (5) Kalčec, N.; Ljulić, A.; Božičević, L.; Vrčec, V.; Marson, D.; Pril, S.; Separovic, F.; Vinković Vrčec, I. Transformation of L-DOPA and Dopamine on the Surface of Gold Nanoparticles: An NMR and Computational Study. *Inorg. Chem.* **2022**, *61*, 10781–10791.
- (6) Müller, T. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Levodopa/Carbidopa Cotherapies for Parkinson's Disease. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2020**, *16*, 403–414.
- (7) Dorszewska, J.; Kowalska, M.; Predecki, M.; Piekut, T.; Kozłowska, J.; Kozubski, W. Oxidative Stress Factors in Parkinson's Disease. *Neural Regener. Res.* **2021**, *16*, 1383.
- (8) Spuch, C.; Saida, O.; Navarro, C. Advances in the Treatment of Neurodegenerative Disorders Employing Nanoparticles. *Recent Pat. Drug Delivery Formulation* **2012**, *6*, 2–18.
- (9) Pahuja, R.; Seth, K.; Shukla, A.; Shukla, R. K.; Bhatnagar, P.; Chauhan, L. K. S.; Saxena, P. N.; Arun, J.; Chaudhari, B. P.; Patel, D. K.; Singh, S. P.; Shukla, R.; Khanna, V. K.; Kumar, P.; Chaturvedi, R. K.; Gupta, K. C. Trans-Blood Brain Barrier Delivery of Dopamine-Loaded Nanoparticles Reverses Functional Deficits in Parkinsonian Rats. *ACS Nano* **2015**, *9*, 4850–4871.
- (10) Loureiro, J. A.; Gomes, B.; Coelho, M. A.; do Carmo Pereira, M.; Rocha, S. Immunoliposomes Doubly Targeted to Transferrin Receptor and to α -Synuclein. *Futur. Sci. OA* **2015**, *1*, FSO71.
- (11) Rakotoarisoa, M.; Angelov, B.; Drechsler, M.; Nicolas, V.; Bizien, T.; Gorshkova, Y. E.; Deng, Y.; Angelova, A. Liquid Crystalline Lipid Nanoparticles for Combined Delivery of Curcumin, Fish Oil and BDNF: In Vitro Neuroprotective Potential in a Cellular Model of Tunicamycin-Induced Endoplasmic Reticulum Stress. *Smart Mater. Med.* **2022**, *3*, 274–288.
- (12) Rakotoarisoa, M.; Angelov, B.; Espinoza, S.; Khakurel, K.; Bizien, T.; Angelova, A. Cubic Liquid Crystalline Nanostructures Involving Catalase and Curcumin: BioSAXS Study and Catalase Peroxidatic Function after Cytosomal Nanoparticle Treatment of Differentiated SH-SY5Y Cells. *Molecules* **2019**, *24*, 3058.
- (13) Margari, A.; Monteduro, A. G.; Rizzato, S.; Capobianco, L.; Crestini, A.; Rivabene, R.; Piscopo, P.; D'Onofrio, M.; Manzini, V.; Trapani, G.; Quarta, A.; Maruccio, G.; Ventra, C.; Lieto, L.; Trapani, A. The Encapsulation of Citicoline within Solid Lipid Nanoparticles Enhances Its Capability to Counteract the 6-Hydroxydopamine-Induced Cytotoxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1827.
- (14) Poovaiah, N.; Davoudi, Z.; Peng, H.; Schlichtmann, B.; Mallapragada, S.; Narasimhan, B.; Wang, Q. Treatment of Neurodegenerative Disorders through the Blood-Brain Barrier Using Nanocarriers. *Nanoscale* **2018**, *10*, 16962–16983.
- (15) Rehman, A.; John, P.; Bhatti, A. Biogenic Selenium Nanoparticles: Potential Solution to Oxidative Stress Mediated Inflammation in Rheumatoid Arthritis and Associated Complications. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 2005.
- (16) Vinković Vrčec, I. Selenium. In *Selenium*; Michalke, B., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp 393–413. Molecular and Integrative Toxicology
- (17) Maiyo, F.; Singh, M. Selenium Nanoparticles: Potential in Cancer Gene and Drug Delivery. *Nanomedicine* **2017**, *12*, 1075–1089.
- (18) Rai, M.; Yadav, A. In *Nanobiotechnology in Neurodegenerative Diseases*; Rai, M., Yadav, A., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2019.
- (19) Percário, S.; da Silva Barbosa, A.; Varella, E. L. P.; Gomes, A. R. Q.; Ferreira, M. E. S.; de Nazaré Araújo Moreira, T.; Dolabela, M. F. Oxidative Stress in Parkinson's Disease: Potential Benefits of Antioxidant Supplementation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2020**, *2020*, 1–23.
- (20) Xia, Y.; Chen, Y.; Hua, L.; Zhao, M.; Xu, T.; Wang, C.; Li, Y.; Zhu, B. Functionalized Selenium Nanoparticles for Targeted Delivery of Doxorubicin to Improve Non-Small-Cell Lung Cancer Therapy. *Int. J. Nanomed.* **2018**, *13*, 6929–6939.
- (21) Jalalian, S. H.; Ramezani, M.; Abnous, K.; Taghdisi, S. M. Targeted Co-Delivery of Epirubicin and NAS-24 Aptamer to Cancer Cells Using Selenium Nanoparticles for Enhancing Tumor Response in Vitro and in Vivo. *Cancer Lett.* **2018**, *416*, 87–93.
- (22) Huo, X.; Zhang, Y.; Jin, X.; Li, Y.; Zhang, L. A Novel Synthesis of Selenium Nanoparticles Encapsulated PLGA Nanospheres with Curcumin Molecules for the Inhibition of Amyloid β Aggregation in Alzheimer's Disease. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2019**, *190*, 98–102.
- (23) Qi, Y.; Yi, P.; He, T.; Song, X.; Liu, Y.; Li, Q.; Zheng, J.; Song, R.; Liu, C.; Zhang, Z.; Peng, W.; Zhang, Y. Quercetin-Loaded Selenium Nanoparticles Inhibit Amyloid- β Aggregation and Exhibit Antioxidant Activity. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2020**, *602*, 125058.
- (24) Galić, E.; Radić, K.; Golub, N.; Vitali Čepo, D.; Kalčec, N.; Vrčec, E.; Vinković, T. Utilization of Olive Pomace in Green Synthesis of Selenium Nanoparticles: Physico-Chemical Characterization, Bioaccessibility and Biocompatibility. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 9128.
- (25) Vahdati, M.; Tohidi Moghadam, T. Synthesis and Characterization of Selenium Nanoparticles-Lysozyme Nanohybrid System with Synergistic Antibacterial Properties. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 510.
- (26) Panigrahi, S. K.; Mishra, A. K. Study on the Dependence of Fluorescence Intensity on Optical Density of Solutions: The Use of Fluorescence Observation Field for Inner Filter Effect Corrections. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2019**, *18*, 583–591.
- (27) Pecora, R. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *J. Nanoparticle Res.* **2000**, *2*, 123–131.
- (28) Joseph, E.; Singhvi, G. Multifunctional Nanocrystals for Cancer Therapy: A Potential Nanocarrier. In *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*; Grumezescu, A. M., Ed.; Elsevier, 2019; pp 91–116.
- (29) Hernández-Díaz, J. A.; Garza-García, J. J.; León-Morales, J. M.; Zamudio-Ojeda, A.; Arratia-Quijada, J.; Velázquez-Juárez, G.; López-Velázquez, J. C.; García-Morales, S. Antibacterial Activity of Biosynthesized Selenium Nanoparticles Using Extracts of Calendula Officinalis against Potentially Clinical Bacterial Strains. *Molecules* **2021**, *26*, 5929.
- (30) Srivastava, N.; Mukhopadhyay, M. Green Synthesis and Structural Characterization of Selenium Nanoparticles and Assessment of Their Antimicrobial Property. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2015**, *38*, 1723–1730.
- (31) Gangadool, S.; Stanley, D.; Hughes, R. J.; Moore, R. J.; Chapman, J. The Synthesis and Characterisation of Highly Stable and Reproducible Selenium Nanoparticles. *Inorg. Nano-Metal Chem.* **2017**, *47*, 1568–1576.
- (32) Dwivedi, C.; Shah, C. P.; Singh, K.; Kumar, M.; Bajaj, P. N. An Organic Acid-Induced Synthesis and Characterization of Selenium Nanoparticles. *J. Nanotechnol.* **2011**, *2011*, 1–6.
- (33) Chiou, Y. D.; Hsu, Y. J. Room-Temperature Synthesis of Single-Crystalline Se Nanorods with Remarkable Photocatalytic Properties. *Appl. Catal. B Environ.* **2011**, *105*, 211–219.
- (34) Lu, Q.; Gao, F.; Komarneni, S. Cellulose-Directed Growth of Selenium Nanobelts in Solution. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 159–163.
- (35) Gates, B.; Mayers, B.; Cattle, B.; Xia, Y. Synthesis and Characterization of Uniform Nanowires of Trigonal Selenium. *Adv. Funct. Mater.* **2002**, *12*, 219–227.
- (36) Huang, W.; Wang, M.; Hu, L.; Wang, C.; Xie, Z.; Zhang, H. Recent Advances in Semiconducting Monoelemental Selenium

Nanostructures for Device Applications. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30*, 2003301.

(37) Sidorowicz, A.; Fais, G.; Casula, M.; Borselli, M.; Giannaccare, G.; Locci, A. M.; Lai, N.; Orrù, R.; Cao, G.; Concas, A. Nanoparticles from Microalgae and Their Biomedical Applications. *Mar. Drugs* **2023**, *21*, 352.

(38) Maqbool, Q.; Yigit, N.; Stöger-Pollach, M.; Ruello, M. L.; Tittarelli, F.; Rupprechter, G. Operando Monitoring of a Room Temperature Nanocomposite Methanol Sensor. *Catal. Sci. Technol.* **2023**, *13*, 624–636.

(39) Bisht, N.; Phalswal, P.; Khanna, P. K. Selenium Nanoparticles: A Review on Synthesis and Biomedical Applications. *Mater. Adv.* **2022**, *3*, 1415–1431.

(40) Dwivedi, S.; AlKhedhairi, A. A.; Ahamed, M.; Musarrat, J. Biomimetic Synthesis of Selenium Nanospheres by Bacterial Strain JS-11 and Its Role as a Biosensor for Nanotoxicity Assessment: A Novel Se-Bioassay. *PLoS One* **2013**, *8*, e57404–e57410.

(41) Ferro, C.; Florindo, H. F.; Santos, H. A. Selenium Nanoparticles for Biomedical Applications: From Development and Characterization to Therapeutics. *Adv. Healthcare Mater.* **2021**, *10*, 1–50.

(42) Szczyglewska, P.; Feliczak-Guzik, A.; Nowak, I. Nanotechnology-General Aspects: A Chemical Reduction Approach to the Synthesis of Nanoparticles. *Molecules* **2023**, *28*, 4932.

(43) Rout, J.; Swain, B. C.; Mishra, P. P.; Tripathy, U. Spectroscopic Insight into the Interaction of Dopamine with Spherical Gold Nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2020**, *203*, 111770.

(44) Pansare, A. V.; Shedge, A. A.; Patil, V. R. Discrete SeNPs-Macromolecule Binding Manipulated by Hydrophilic Interaction. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *107*, 1982–1987.

(45) Shahabadi, N.; Zendehcheshm, S.; Khademi, F. Selenium Nanoparticles: Synthesis, in-Vitro Cytotoxicity, Antioxidant Activity and Interaction Studies with Ct-DNA and HSA, Hb and Cyt c Serum Proteins. *Biotechnol. Rep.* **2021**, *30*, No. e00615.

(46) D'Andrea, G.; Maurizi, G.; D'Alessandro, A. M.; Salucci, M. L.; Impagnatiello, A.; Saletti, M. A.; Oratore, A. Structural Analysis of Seminal and Serum Human Transferrin by Second Derivative Spectrometry and Fluorescence Measurements. *J. Protein Chem.* **1992**, *11*, 165–169.

(47) Śliwińska-Hill, U. Interaction of Imatinib Mesylate with Human Serum Transferrin: The Comparative Spectroscopic Studies. *Spectrochim. Acta, Part A* **2017**, *173*, 468–475.

(48) Phopin, K.; Ruankham, W.; Prachayasittikul, S.; Prachayasittikul, V.; Tantimongkolwat, T. Insight into the Molecular Interaction of Cloxyquin (5-Chloro-8-Hydroxyquinoline) with Bovine Serum Albumin: Biophysical Analysis and Computational Simulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *21*, 249.

(49) Chilom, C. G.; Sandu, N.; Iftimie, S.; Bălăsoiu, M.; Rogachev, A.; Orelovich, O.; Stolyar, S. Interactions of Chemically Synthesized Ferrihydrite Nanoparticles with Human Serum Transferrin: Insights from Fluorescence Spectroscopic Studies. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7034.

(50) Omidvar, Z.; Asoodeh, A.; Chamani, J. Studies on the Antagonistic Behavior Between Cyclophosphamide Hydrochloride and Aspirin with Human Serum Albumin: Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy and Isothermal Titration Calorimetry. *J. Solution Chem.* **2013**, *42*, 1005–1017.

(51) Arias-Rotondo, D. M.; McCusker, J. K. The Photophysics of Photoredox Catalysis: A Roadmap for Catalyst Design. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 5803–5820.

(52) Lacerda, S. H. D. P.; Park, J. J.; Meuse, C.; Pristinski, D.; Becker, M. L.; Karim, A.; Douglas, J. F. Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins. *ACS Nano* **2010**, *4*, 365–379.

(53) Barbir, R.; Jiménez, R. R.; Martín-Rapún, R.; Strasser, V.; Domazet Jurašin, D.; Dabelić, S.; de la Fuente, J. M.; Vinković Vrček, I. Interaction of Differently Sized, Shaped, and Functionalized Silver and Gold Nanoparticles with Glycosylated versus Nonglycosylated Transferrin. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 27533–27547.

(54) Cattoni, D. I.; Chara, O.; Kaufman, S. B.; González Flecha, F. L. Cooperativity in Binding Processes: New Insights from Phenomenological Modeling. *PLoS One* **2015**, *10*, No. e0146043.

(55) Özdemir, S.; Bicer, E. Temperature Effect on Binding Affinity and Stoichiometry between Some Steroids and Human Serum Albumin. *J. Chil. Chem. Soc.* **2016**, *61*, 2809–2815.

(56) Chen, X.; Zhang, J.; Zhai, H.; Chen, X.; Hu, Z. Determination of Levodopa by Capillary Zone Electrophoresis Using an Acidic Phosphate Buffer and Its Application in the Analysis of Beans. *Food Chem.* **2005**, *92*, 381–386.

(57) Schwaminger, S. P.; García, P. F.; Merck, G. K.; Bodensteiner, F. A.; Heissler, S.; Günther, S.; Berensmeier, S. Nature of Interactions of Amino Acids with Bare Magnetite Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 23032–23041.

(58) Bu, Y.; Lee, S. W. The Characteristic Agcore Aushell Nanoparticles as Sens Substrates in Detecting Dopamine Molecules at Various PH Ranges. *Int. J. Nanomed.* **2015**, *10*, 47–54.

(59) Yang, H. C.; Waldman, R. Z.; Wu, M. B.; Hou, J.; Chen, L.; Darling, S. B.; Xu, Z. K. Dopamine: Just the Right Medicine for Membranes. *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1705327.

(60) Kalčec, N.; Peranić, N.; Barbir, R.; Hall, C. R.; Smith, T. A.; Sani, M. A.; Frkanec, R.; Separovic, F.; Vinković Vrček, I. Spectroscopic Study of L-DOPA and Dopamine Binding on Novel Gold Nanoparticles towards More Efficient Drug-Delivery System for Parkinson's Disease. *Spectrochim. Acta, Part A* **2022**, *268*, 120707.

(61) Du, X.; Li, Y.; Xia, Y.-L.; Ai, S.-M.; Liang, J.; Sang, P.; Ji, X.-L.; Liu, S.-Q. Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 144.

(62) Chakraborty, D.; Chauhan, P.; Alex, S. A.; Chaudhary, S.; Ethiraj, K. R.; Chandrasekaran, N.; Mukherjee, A. Comprehensive Study on Biocorona Formation on Functionalized Selenium Nanoparticle and Its Biological Implications. *J. Mol. Liq.* **2018**, *268*, 335–342.

(63) Guerrini, L.; Alvarez-Puebla, R.; Pazos-Perez, N. Surface Modifications of Nanoparticles for Stability in Biological Fluids. *Materials* **2018**, *11*, 1154.

(64) Meesaragandla, B.; García, I.; Biedenweg, D.; Toro-Mendoza, J.; Coluzza, I.; Liz-Marzán, L. M.; Delcea, M. H-Bonding-Mediated Binding and Charge Reorganization of Proteins on Gold Nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2020**, *22*, 4490–4500.

(65) Bennion, B. J.; Be, N. A.; McNerney, M. W.; Lao, V.; Carlson, E. M.; Valdez, C. A.; Malfatti, M. A.; Enright, H. A.; Nguyen, T. H.; Lightstone, F. C.; Carpenter, T. S. Predicting a Drug's Membrane Permeability: A Computational Model Validated With in Vitro Permeability Assay Data. *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 5228–5237.

(66) Mensch, J.; Melis, A.; Mackie, C.; Verreck, G.; Brewster, M. E.; Augustijns, P. Evaluation of Various PAMPA Models to Identify the Most Discriminating Method for the Prediction of BBB Permeability. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, *74*, 495–502.

(67) Prades, R.; Guerrero, S.; Araya, E.; Molina, C.; Salas, E.; Zurita, E.; Selva, J.; Egea, G.; López-Iglesias, C.; Teixidó, M.; Kogan, M. J.; Giral, E. Delivery of Gold Nanoparticles to the Brain by Conjugation with a Peptide That Recognizes the Transferrin Receptor. *Biomaterials* **2012**, *33*, 7194–7205.

(68) Tsinman, O.; Tsinman, K.; Sun, N.; Avdeef, A. Physicochemical Selectivity of the BBB Microenvironment Governing Passive Diffusion—Matching with a Porcine Brain Lipid Extract Artificial Membrane Permeability Model. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 337–363.

(69) Hajal, C.; Campisi, M.; Mattu, C.; Chiono, V.; Kamm, R. D. In Vitro Models of Molecular and Nano-Particle Transport across the Blood-Brain Barrier. *Biomicrofluidics* **2018**, *12*, 042213.

(70) Kalčec, N. Design and Characterization of Gold and Selenium Nanoparticles as Potential Delivery Systems of Levodopa and Dopamine <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:400256> (accessed Aug 15, 2023).

8. POPIS KRATICA

6-OHDA	6-hidroksidopamin
AAS	atomska apsorpcijska spektroskopija
Ad	1-adamantilamin hidroklorid
AFC	kontrola autofluorescencije (engl. autofluorescence control)
AGF	umjetna želučana tekućina (engl. artificial gastric fluid)
AIF	umjetna intestinalna tekućina (engl. artificial intestinal fluid)
ALF	umjetna lizosomalna tekućina (engl. artificial lysosomal fluid)
AuNP	nanočestice zlata
CCCP	karbonil cijanid m-klorofenil hidrazon (od engl. carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone)
cDNA	komplementarna DNA (engl. complementary DNA)
Cq	ciklus kvantifikacije (od engl. quantification cycle)
D2R	dopaminski receptor tipa 2
DAT	dopaminski transporter
DCFH2-DA	2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat
DHE	dihidroetidij
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. dynamic light scattering)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ELS	elektroforetsko raspršenje svjetlosti (engl. electrophoretic light scattering)
IC ₁₀	koncentracija tretmana koja smanjuje broj živih stanica za 10 %
IC ₅₀	koncentracija tretmana koja smanjuje broj živih stanica za 50 %
mBCL	monoklorobiman
mRNA	glasnička RNA (engl. messenger RNA)
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij
NPC	kontrola bez primarnog protutijela (od engl. no primary antibody control)
PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (engl. phosphate buffered saline)
PGM	peptidoglikanski monomer

PMA	forbol 12-miristat 13-acetat (od engl. phorbol 12-myristate 13-acetat)
PVP	polivinilpirolidon
Rh 123	rodamin 123
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. reactive oxygen species)
RPM	okretaja u minuti (engl. rounds per minute)
SeNP	nanočestice selena
SSC	postranično raspršena svjetlost (engl. side-scatter light)
tBHP	<i>tert</i> -butil hidroperoksid
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija
TH	tirozin hidroksilaza
Tween	polisorbat 20
VMAT2	vezikularni monoaminski transporter tipa 2

9. ŽIVOTOPIS

Ivan Mamić rođen je 9. rujna 1994. godine u Zagrebu, gdje je završio osnovnu i srednju školu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisao je 2013., a titulu magistra farmacije stekao je 2019. godine. Tijekom studija bio je uključen u nekoliko znanstvenih istraživanja te je aktivno sudjelovao u radu Sportske udruge Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Nagrađen je Rektorovom nagradom za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici.

Nakon završetka studija farmacije, zaposlio se u ljekarnama Prima Pharme, gdje je radio od studenog 2019. do veljače 2020. godine. Od veljače 2020. godine zaposlen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za farmakologiju, gdje radi i danas kao asistent te sudjeluje u izvođenju nastave iz kolegija Farmakologija. Od lipnja 2020. godine pridružio se istraživačkoj grupi nasl. izv. prof. dr. sc. Ivane Vinković Vrček, znanstvene savjetnice u trajnom izboru, kao suradnik na projektu Hrvatske zaklade za znanost „*Safe-by-Design Approach for Development of Nano-Enabled Delivery Systems*“ (SENDER, HRZZ-PZS-2019-02-4323). U sklopu navedenog projekta izrađuje i svoju doktorsku disertaciju, usmjerenu na sintezu, karakterizaciju i biološku evaluaciju nanočestica zlata i selena kao potencijalnih nosača levodope u liječenju Parkinsonove bolesti. Tijekom rada na fakultetu objavio je pet (5) znanstvenih radova te je sudjelovao na više domaćih i međunarodnih konferencija. Član je Hrvatske ljekarničke komore (HLJK) i Hrvatskog društva farmakologa.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

NANOČESTICE ZLATA I SELENA KAO POTENCIJALNI NOSAČI LEVODOPE

Ivan Mamić

SAŽETAK

Nanotehnologija ima važnu ulogu u razvoju suvremenih terapijskih sustava jer nanočestice, zbog svojih jedinstvenih svojstava, mogu olakšati ciljanu dostavu, poboljšati farmakokinetiku, povećati topljivost i bioraspoloživost te ublažiti toksičnost lijekova. U kontekstu farmaceutske primjene, ističu se nanočestice zlata (AuNP) zbog svoje biokompatibilnosti, jednostavne sinteze i učinkovitog vezanja lijekova te nanočestice selena (SeNP) zbog protuupalnih i antioksidativnih svojstava. Obje vrste nanočestica također su pokazale i neuroprotektivne učinke u modelima neurodegenerativnih poremećaja. Levodopa je u današnje vrijeme zlatni standard u liječenju Parkinsonove bolesti, ali je njezina učinkovitost ograničena nepovoljnom farmakokinetikom te razvojem motoričkih komplikacija tijekom kronične terapije i rizikom od izazivanja oksidativnog stresa. To upućuje kako bi isporuka levodope pomoću nanonosača mogla ponuditi učinkovitiju terapijsku opciju od konvencionalnih formulacija, uz moguće neuroprotektivne učinke. U ovom radu ispitana je prikladnost četiri vrste nanočestica (PGM-AuNP, Ad-AuNP, PVP-SeNP i Tween-SeNP) kao nosača levodope. Njihova karakterizacija i priroda interakcija s levodopom detaljno su opisane u prijašnjim studijama, a u ovom je radu naglasak stavljen na njihovu toksičnost, stabilnost, kapacitet vezanja i profil oslobađanja levodope te moguće neuroprotektivne učinke. Izabrane nanočestice su sintetizirane kemijskom redukcijom i karakterizirane metodama transmisivne elektronske mikroskopije (TEM), te dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti (DLS i ELS). Njihova stabilnost testirana je u kompletnom mediju za staničnu kulturu i biološki relevantnim tekućinama. Biološki učinci procijenjeni su u *in vitro* modelu dopaminergičnih neurona, dok je zaštitni potencijal ispitan primjenom 6-hidroksidopamina (6-OHDA). U provedenim ispitivanjima AuNP su pokazale izvrsnu biokompatibilnost i učinkovito vezanje levodope, ali njihovu primjenu ograničava loša stabilnost te nedostatak protektivnih učinaka. Nasuprot tome, SeNP su pokazale znatno bolju stabilnost uz složene biološke učinke: koncentracijski ovisnu citotoksičnost i genotoksičnost uz moguće neuroprotektivne učinke.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 127 stranica, 30 slika, 12 tablica i 242 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nanočestice selena, nanočestice zlata, levodopa, nosači lijekova, oksidativni stres, toksičnost, protektivni učinci, *in vitro*

Mentori: **Dr. Sc. Petra Turčić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. Sc. Ivana Vinković Vrček, *naslovna izvanredna profesorica Sveučilišta u Rijeci Medicinskog fakulteta*

Ocjenjivači:

Rad prihvaćen:

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doctoral thesis

GOLD AND SELENIUM NANOPARTICLES AS POTENTIAL LEVODOPA CARRIERS Ivan Mamić

SUMMARY

Nanotechnology plays an important role in the development of modern therapeutic systems because nanoparticles, due to their unique properties, can facilitate targeted delivery, improve pharmacokinetics, increase solubility and bioavailability, and mitigate the toxicity of many drugs. In the context of pharmaceutical applications, gold nanoparticles (AuNPs) stand out due to their biocompatibility, simple synthesis, and efficient drug binding, and selenium nanoparticles (SeNPs) due to their anti-inflammatory and antioxidant properties. Both types of nanoparticles have also shown neuroprotective effects in models of neurodegenerative disorders. Levodopa is currently the gold standard in the treatment of Parkinson's disease, but its effectiveness is limited by unfavorable pharmacokinetics, the development of motor complications during chronic therapy, and the risk of inducing oxidative stress. This suggests that the delivery of levodopa using nanocarriers could offer a more effective therapeutic option than conventional formulations, with possible neuroprotective effects. In this work, the suitability of four types of nanoparticles (PGM-AuNP, Ad-AuNP, PVP-SeNP, and Tween-SeNP) as levodopa carriers was examined. Their characterization and the nature of their interactions with levodopa have been described in detail in previous studies, and in this work, emphasis is placed on their toxicity, stability, binding capacity and levodopa release profile, and possible neuroprotective effects. Selected nanoparticles were synthesized by chemical reduction and characterized by transmission electron microscopy (TEM), dynamic and electrophoretic light scattering methods (DLS and ELS). Their stability was tested in complete cell culture medium and biologically relevant fluids. Biological effects were assessed in an *in vitro* model of dopaminergic neurons, while the protective potential was tested using 6-hydroxydopamine (6-OHDA). In the conducted studies, AuNPs showed excellent biocompatibility and efficient levodopa binding, but their application is limited by poor stability and lack of protective effects. In contrast, SeNPs showed significantly better stability with complex biological effects: concentration-dependent cytotoxicity and genotoxicity with possible neuroprotective effects.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 127 pages, 30 figures, 12 tables and 242 references. Original is in Croatian language

Keywords: selenium nanoparticles, gold nanoparticles, levodopa, drug carriers, oxidative stress, toxicity, protective effects, *in vitro*

Mentors: **Petra Turčić, Ph.D.** *Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Ivana Vinković Vrček, Ph.D. *Titular Associate Professor University of Rijeka Faculty of Medicine*

Reviewers:

Thesis Accepted: