UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena Lj. Pejić

Uticaj kofeina, taurina i etanola, kao komponenti energetskih i alkoholnih pića, na diferencijaciju, morfološke i funkcijske karakteristike neurona i astrocita u model-sistemu humane neurogeneze *in vitro*

doktorska disertacija

Beograd, 2026

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena Lj. Pejić

Effects of caffeine, taurine, and ethanol, as components of energy and alcoholic beverages, on the differentiation, morphological, and functional characteristics of neurons and astrocytes in an *in vitro* model system of human neurogenesis

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

Mentori:

dr Marija Mojsin, naučni savetnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu

akademik Milena Stevanović, Srpska akademija nauka i umetnosti

Članovi komisije:

dr Milena Milivojević, viši naučni saradnik, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu

dr Jasmina Stojkovska, naučni savetnik, Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu

dr Jovan Pešović, docent, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane _____

Zahvalnica

„Put nastaje hodanjem.”

— *Antonio Machado*

Svaka životna odluka vodi nas putem kojim nam otvara nove horizonte. Jedna od takvih odluka — i promišljena i spontana — bila je odluka da upišem doktorat. Završetkom tog burnog i živopisnog poglavlja zatvara se jedno razdoblje mladalačke snage, naivne vere i uporne želje, a otvaraju se vrata novih životnih mogućnosti.

Ovom prilikom želim da se zahvalim svima koji su utkali deo sebe u ovu tezu i ostavili lični pečat na tom putu.

Pre svega, zahvaljujem osobi bez koje ovaj doktorat ne bi imao ni svoj početak ni svoj završetak — mom mentoru, logičaru i praktičaru, osobi koja uvek pronađe rešenje i vidi svetlo na kraju tunela čak i onda kada ga mi ostali ne naslućujemo. Hvala Mariji Mojsin na strpljenju, znanju, veri i podršci tokom svakog koraka ovog puta.

Zahvaljujem se i laboratorijskom komentoru, eksperimentalnom vodiču i lisabonskom saputniku Mileni Milivojević na svim sugestijama i velikoj podršci tokom pisanja i izrade doktorata.

Veliku zahvalnost dugujem akademiku Mileni Stevanović, na pruženoj prilici da postanem deo ove laboratorije i započnem svoje dugo naučno putovanje, kao i na svim sugestijama i komentarima koji su doprineli izradi ove teze.

Hvala profesoru Goranu Brajuškoviću na prepoznavanju i pruženoj ruci onda kada sam najviše sumnjala u sebe. Profesore, iskreno hvala.

Zahvalila bih se Jasmini Stojkovskoj na komentarima i sugestijama pri pisanju doktorske teze, na svim postavljenim bioreaktorima i na nezaboravnim eksperimentalnim uspomenama.

Zahvaljujem se i dr Jovanu Pešoviću na dragocenim komentarima i smernicama koje su doprinele konačnom oblikovanju ove teze.

Zahvaljujem se i svim mojim dragim kolegama iz laboratorije — mlađim i starijim — na pomoći, savetima, razgovorima i trenucima koji su nauku činili i ozbiljnom i lepom.

Posebnu zahvalnost dugujem mom Marku. Hvala ti na ljubavi, podršci i kilometrima koje si prešao zajedno sa mnom tokom ovog puta. Petogodišnja ljubav i sedmogodišnji doktorat stoje kao simbol istrajnosti, strpljenja i neodustajanja uprkos svemu.

Na kraju, posebno mesto pripada onima bez kojih čitavo putovanje ne bi imalo smisla — mojoj porodici. Mom Mesecu koji nikada nije zašao, da bi moj put, i u najtežim trenucima, ostao obasjan i svetao. Mojoj majci Ljiljani, babi Mileni, tetki Biljani i braći Aleksandru i Mihailu — hvala vam što ste moj temelj, moja sigurna luka i moja snaga.

„Jednog dana sve će biti dobro, u tom je naša nada.“

— Ivo Andrić

Posvećujem ovaj doktorat mom deki, Živku Strahinjiću, koji više nije sa nama – njemu od koga je sve počelo i koji me i dalje vodi.

Uticaj kofeina, taurina i etanola, kao komponenti energetskih i alkoholnih pića, na diferencijaciju, morfološke i funkcijske karakteristike neurona i astrocita u model-sistemu humane neurogeneze *in vitro*

Sažetak

Česta konzumacija energetskih pića i rastući trend njihove upotrebe sa alkoholom među decom, adolescentima i mladim osobama predstavljaju značajan javnozdravstveni problem zbog nedovoljno razjašnjenih efekata na zdravlje. Cilj ove doktorske teze bio je ispitivanje uticaja energetskih pića i njihovih glavnih komponenti, kofeina i taurina, samih ili u kombinaciji sa alkoholom, na različite faze humane neuralne diferencijacije. Kao *in vitro* model-sistem humane neurogeneze korišćena je NT2/D1 ćelijska linija, čija je neuralna diferencijacija indukovana retinoinskom kiselinom. Uspostavljen je trodimenzionalni (3D) model-sistem NT2/D1 ćelija imobilisanih u alginatna mikrovlakna, koji omogućava propagaciju pluripotentnih ćelija i neuralnu diferencijaciju do stadijuma ranih neuralnih progenitora. Paralelno je propagacija i neuralna diferencijacija ovih ćelija sprovedena u standardnim dvodimenzionalnim (2D) uslovima ćelijske kulture. Ispitivani tretmani nisu značajno uticali na vijabilnost ćelija u 3D model-sistemu, dok je u 2D model-sistemu kofein doveo do smanjenja vijabilnosti pluripotentnih ćelija, a svi ispitivani tretmani, izuzev kofeina, doveli su do smanjenja vijabilnosti ranih neuralnih progenitora, ukazujući na potencijalno neuroprotektivno dejstvo 3D mikrosredine. Tretmani nisu uticali na ekspresiju markera OCT4 i PAX6 u ovim ćelijama. Terminalno diferencirane ćelije (NT2-neuroni i NT2-astrociti) ispoljile su različit odgovor na tretmane. Kod NT2-neurona je uočena smanjena vijabilnost, promene redoks statusa i pad ekspresije βIII-tubulina u tretmanima koji su sadržali kofein. NT2-astrociti, nakon tretmana ispitivanim komponentama, zadržali su vijabilnost i stabilnu ekspresiju GFAP-a, ali su ispoljili promenu redoks statusa i smanjenu ekspresiju glutamatnih transportera EAAT1 i EAAT2. Rezultati ukazuju da efekti komponenti energetskih pića zavise od stadijuma neuralne diferencijacije, uslova gajenja ćelija i kompleksnosti ispitivanih smeša.

Ključne reči: energetska pića, energetska pića sa alkoholom, kofein, taurin, NT2/D1, 3D model-sistem, NT2/D1 rani neuralni progenitori, NT2-neuroni, NT2-astrociti

Naučna oblast: Biologija
Uža naučna oblast: Molekularna biologija

Effects of caffeine, taurine, and ethanol, as components of energy and alcoholic beverages, on the differentiation, morphological, and functional characteristics of neurons and astrocytes in an *in vitro* model system of human neurogenesis

Abstract

Frequent consumption of energy drinks and their increasing use with alcohol among children, adolescents, and young adults represent a growing public health concern due to insufficiently understood health effects. This doctoral thesis aimed to investigate the effects of energy drinks and their main components, caffeine and taurine, alone or combined with alcohol, on different stages of human neural differentiation. NT2/D1 cell line was used as an *in vitro* model system of human neurogenesis induced by retinoic acid. A three-dimensional (3D) model system of NT2/D1 cells immobilized in alginate microfibers was established, enabling propagation of pluripotent cells and neural differentiation into NT2/D1 early neural progenitors. In parallel, cell propagation and neural differentiation were performed under standard two-dimensional (2D) cell culture conditions. The treatments did not significantly affect cell viability in the 3D model system, whereas caffeine reduced viability of pluripotent cells, and all other tested treatments, except caffeine, reduced the viability of early neural progenitor cells in the 2D model system, suggesting a potential neuroprotective effect of the 3D microenvironment. The treatments did not alter OCT4 and PAX6 expression in these cells. Terminally differentiated cells (NT2-N and NT2-A) responded differently to the treatments. NT2-neurons exhibited reduced viability, altered redox status, and decreased βIII-tubulin expression in caffeine-containing treatments. After all tested treatments, NT2-astrocytes maintained viability and stable GFAP expression, but showed changes in redox status and reduced EAAT1 and EAAT2 expression. The results presented in this thesis indicate that the effects of energy drink components depend on the stage of neural differentiation, cell culture conditions, and the complexity of the tested mixtures.

Key words: energy drinks, energy drinks combined with alcohol, caffeine, taurine, NT2/D1 cells, 3D model system, NT2/D1 early neural progenitors, NT2-derived neurons, NT2-derived astrocytes

Scientific field: Biology
Scientific subfield: Molecular biology

Spisak skraćenica

2D – dvodimenzionalni
3D – trodimenzionalni
β3 tubulin – engl. Tubulin Beta 3 Class III
BSA – albumin iz seruma govečeta, engl. Bovine Serum Albumin
CAT – engl. Catalase
CCND1 – engl. Cyclin D1
cDNK – komplementarni lanac molekula DNK
CNS – centralni nervni sistem
č – čas/časova
DCF – dihlorofluorescein esej
DCF-DA – 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat
DMEM – Dulbeko modifikovani medijum, engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO – dimetil sulfoksid
DNKaza I – Dezoksiribonukleaza I
EAAT1 – engl. Excitatory Amino Acid Transporter 1
EAAT2 – engl. Excitatory Amino Acid Transporter 2
EFSA – engl. The European Food Safety Authority
EP – energetsko piće
EtOH – etanol
FBS – engl. Fetal Bovine Serum
GAPDH – engl. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GFAP – engl. Glial Fibrillary Acidic Protein
HP1α – heterohromatinski protein 1 alfa
ICH – imunocitohemija
iRNK – informaciona RNK
K – kvercetin
Ki67 – engl. marker of proliferation Ki-67
KOF – kofein
LPS – lipopolisaharid
miRNK – mikro RNK
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid
NANOG – engl. Nanog Homeobox
NGS – engl. Normal goat serum
NT2/D1 – NTERA2 klon D1
NT2-A – NT2-astrociti dobijeni diferencijacijom NT2/D1 ćelija
NT2-N – NT2-neuroni dobijeni diferencijacijom NT2/D1 ćelija
OCT4 – engl. Octamer-binding transcription factor 4
PAX6 – engl. Paired Box 6
PBS – fosfatni pufer, engl. Phosphate-Buffered Saline
PCNA – engl. Proliferating Cell Nuclear Antigen
PFA – paraformaldehid
PVDF – poliviniliden fluorid
qPCR – kvantitativni PCR u realnom vremenu
RK – retinoinska kiselina
ROS – reaktivne vrste kiseonika, engl. reactive oxygen species
SOX2 – engl. SRY-related HMG-box gene 2
SOX3 – engl. SRY-box transcription factor 3

SDS – natrijum dodecil sulfat
SDS-PAGE – elektroforeza u gelu od poliakrilamidnom sa natrijum dodecil sulfatom, engl. Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SOD – engl. Superoxide Dismutase 1
TAU – taurin
TBST – Tris pufer soli sa 0.1% Tween-20
VĆM – vanćelijski matriks
WB – western blot

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Energetska pića 1

1.1.1. Definicija i opšte karakteristike 1

1.1.2. Sastav i bioaktivne komponente energetskih pića 1

1.1.2.1. Kofein 2

1.1.2.1.1. Efekti povećanog unosa kofeina tokom trudnoće na razvoj ploda 3

1.1.2.1.2. Farmakokinetika kofeina i individualna osetljivost 3

1.1.2.1.3. Uticaj kofeina na CNS 4

1.1.2.1.4. Mehanizmi delovanja kofeina u CNS-u 4

1.1.2.1.5. Efekti kofeina na kognitivne funkcije i fizičke performanse 5

1.1.2.2. Taurin 5

1.1.2.2.1. Uloga taurina u CNS-u tokom razvića 6

1.1.2.2.2 Uloga taurina u adultnom mozgu 6

1.1.2.2.3. Uloga taurina u astrocitima i održavanju homeostaze CNS-a 7

1.1.2.3. D-glukuronolakton 7

1.1.2.4. Vitamini B-kompleksa i inozitol 7

1.2. Energetska pića i fizičke performanse 8

1.3. Epidemiologija i prevalenca konzumacije 8

1.3.1. Konzumiranje energetskih pića među adolescentima u Srbiji: prevalenca, obrasci i javni značaj 8

1.4. Regulatorni i zakonodavni okvir 9

1.5. Uticaj konzumiranja energetskih pića na fiziološke procese u organizmu čoveka 10

1.5.1. Uticaj na CNS 10

1.5.2. Uticaj na kardiovaskularni sistem 10

1.5.3. Uticaj na metabolički i endokrini sistem 10

1.5.4. Uticaj na jetru i bubrege 11

1.5.5. Uticaj na gastrointestinalni sistem 11

1.5.6. Uticaj na mišićni sistem i fizičku performansu 11

1.6. Interakcije sa alkoholom i lekovima 12

1.7. Adolescenti kao ciljna grupa i uloga marketinga 13

1.7.1. Globalni uticaj energetskih pića na adolescente: epidemiološki podaci i uticaj na zdravlje 13
1.8. Konzumacija energetskih pića u trudnoći ... 14
1.9. Dvodimenzionalni (2D) i trodimenzionalni (3D) model-sistemi u proučavanju neuralne diferencijacije ... 14
1.9.1. Ograničenja dvodimenzionalnih (2D) model-sistema za propagaciju ćelija ... 14
1.9.2. Trodimenzionalni (3D) model-sistemi kao fiziološki relevantniji model-sistem u proučavanju neuralne diferencijacije ... 15
1.9.3. Tipovi 3D ćelijskih model-sistema ... 16
1.9.3.1. Sistemi bez nosača ... 16
1.9.3.2. Sistemi sa nosačima ... 16
1.9.3.2.1. Alginat kao 3D nosač za ćelijsku kulturu ... 17
1.9.4. Značaj 3D model-sistema u savremenim istraživanjima ... 18
1.10. Razvoj CNS-a i uloga neuralnih matičnih ćelija ... 18
1.11. *In vitro* model-sistemi neurogeneze ... 19
1.11.1. NT2/D1 ćelije kao *in vitro* model-sistem neurogeneze čoveka ... 20
1.11.2. NT2/D1 ćelije u 2D i 3D model-sistemima ... 21
1.11.3. NT2/D1 ćelije kao *in vitro* model-sistem za testiranje neurotoksičnosti ... 21
2. Ciljevi istraživanja ... 24
3. Materijal i metode ... 25
3.1. Materijal ... 25
3.1.1. Tabelarni prikaz hemikalija korišćenih u eksperimentima ... 26
3.1.2. Tabelarni prikaz kitova korišćenih u u eksperimentima ... 27
3.1.3. Tabelarni prikaz sekvenci ushodnih i nishodnih oligonukleotida (prajmera) korišćenih u eksperimentima kvantitativnog PCR-a (qPCR) ... 27
3.1.4. Tabelarni prikaz primarnih antitela korišćenih u imunocitohemijskim (ICH) i Western blot (WB) eksperimentima ... 28
3.1.5. Tabelarni prikaz sekundarnih antitela korišćenih u imunocitohemijskim (ICH) i Western blot (WB) eksperimentima ... 28
3.2. Ćelijska kultura ... 29
3.2.1. Gajenje pluripotentnih NT2/D1 ćelija i njihova neuralna diferencijacija u monosloju – 2D model-sistemu humane neurogeneze *in vitro* ... 29
3.2.2. Gajenje NT2/D1 ćelija u 3D model-sistemima ... 29
3.2.2.1. Gajenje i diferencijacija NT2/D1 ćelija u sferama ... 29

3.2.2.2. Gajenje pluripotentnih NT2/D1 ćelija i njihova neuralna diferencijacija u alginatnim mikrovlaknima 30
3.3. Test bojenja tripan plavom bojom 31
3.4. Tretmani 31
3.5. Eseji vijabilnosti 32
3.5.1. MTT esej 32
3.5.2. LIVE/DEAD esej 32
3.6. Analiza ćelijskog ciklusa 33
3.7. Fiksacija NT2/D1 ćelija u alginatnim mikrovlaknima 33
3.8. Oporavak NT2/D1 ćelija nakom oslobađanja iz alginatnih mikrovlakana 33
3.9. Izolacija ukupne RNK 33
3.10. Oslobađanje ukupne RNK od ostataka genomske DNK 33
3.11. Sinteza komplementarne DNK (cDNK) 34
3.12. Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qPCR) 34
3.13. TaqMan–miRNK esej 34
3.14. Izolacija ukupnih proteina 34
3.15. Analiza ekspresije proteina metodom Western blot (imunoblot) 35
3.16. Imunocitohemija (ICH) 35
3.17. Detekcija intracelularnog glutamata u ćelijskom lizatu 36
3.18. DCF esej (dihlorofluorescein esej) 36
3.19. Statistička analiza 36
4. Rezultati 38
4.1. Uticaj ispitivanih tretmana na NT2/D1 pluripotentne ćelije i NT2/D1 rane neuralne progenitore gajene u 3D model-sistemima 39
4.1.1. Uticaj ispitivanih tretmana na NT2/D1 rane neuralne progenitore u 3D model-sistemima bez nosača 39
4.1.2. Efekti ispitivanih tretmana na pluripotentne NT2/D1 ćelije imobilisane u alginatnim mikrovlaknima 42
4.1.2.1. Imobilizacija pluripotentnih NT2/D1 ćelija u alginatna mikrovlakna 42
4.1.2.2. Matematičko modelovanje prenosa mase kofeina, taurina i etanola kroz alginatna mikrovlakna sa imobilisanim pluripotentnim NT2/D1 ćelijama 45
4.1.2.3. Uticaj ispitivanih tretmana na vijabilnost pluripotentnih NT2/D1 ćelija u 3D model-sistemu alginatnih mikrovlakana 48

4.1.3. Uticaj komponenti energetskog pića, kofeina i taurina u kombinaciji sa etanolom na NT2/D1 rane neuralne progenitore u alginatnim mikrovlaknima u statičkim uslovima kulture i protočnom bioreaktoru 52

4.1.4. Uticaj ispitivanih tretmana na NT2/D1 rane neuralne progenitore imobilisane u alginatnim mikrovlaknima 59

4.1.4.1. Inicijacija neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija u 3D model-sistemu alginatnih mikrovlakana..... 59

4.1.4.2. Analiza vijabilnost NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u alginatnim mikrovlaknima.... 60

4.1.4.3. Analiza ćelijskog ciklusa NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u alginatnim mikrovlaknima 63

4.1.4.4. Analiza ekspresije markera pluripotentnosti, markera rane faze neuralne diferencijacije i markera proliferacije NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u alginatnim mikrovlaknima 63

4.1.4.5. Analiza efekata tretmana komponentama energetskog pića, kofeina i taurina, u kombinaciji sa etanolom na NT2/D1 rane neuralne progenitore u alginatnim mikrovlaknima..... 65

4.2. Efekti akutnog tretmana energetskim pićem i njegovim komponentama, kofeinom i taurinom, sa i bez alkohola na NT2-N i NT2-A 69

4.2.1. Diferencijacija NT2/D1 ćelija do NT2-N i NT2-A..... 69

4.2.2. Uticaj ispitivanih tretmana na vijabilnost NT2-N i NT2-A dobijenih diferencijacijom NT2/D1 ćelija..... 70

4.2.3. Uticaj ispitivanih tretmana na ekspresiju markera neuralne diferencijacije NT2-N..... 71

4.2.4. Uticaj ispitivanih tretmana na dužinu neurita NT2-N..... 73

4.2.5. Uticaj ispitivanih tretmana na ekspresiju markera neuralne diferencijacije NT2-A..... 74

4.2.6. Uticaj ispitivanih tretmana na produkciju reaktivnih oblika kiseonika (ROS) i ekspresiju superoksid-dismutaze (SOD) u NT2-N i NT2-A 76

4.2.7. Uticaj tretmana na ekspresiju glutamatnih transportera i količinu intracelularnog glutamata u NT2-A 77

5. Diskusija 80

5.1. Optimizacija uslova za propagaciju pluripotentnih NT2/D1 ćelija u 3D model-sistemu na bazi alginatnih mikrovlakana..... 80

5.1.1. Uticaj ispitivanih tretmana na vijabilnost pluripotentnih NT2/D1 ćelija u 2D i 3D model-sistemima 81

5.1.2. Matematičko modelovanje prenosa mase ispitivanih supstanci kroz alginatno mikrovlakno sa imobilisanim ćelijama..... 82

5.2. Uticaj ispitivanih tretmana na NT2/D1 rane neuralne progenitore u sferama formiranim u suspenziji i u visećim kapima („hanging drop“)..... 82

5.3. Prednosti alginatnih mikrovlakana kao 3D nosača ćelija 83

5.3.1. Vijabilnost i proliferacija NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u 3D model-sistemu alginatnih mikrovlakana ... 83
5.3.2. Ekspresija markera pluripotentnosti i markera rane faze neuralne diferencijacije u NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima imobilisanim u alginatnim mikrovlaknima ... 83
5.3.3. Ekspresija markera ćelijskog ciklusa u NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima imobilisanim u alginatnim mikrovlaknima ... 84
5.4. Uticaj ispitivanih tretmana na imobilisane NT2/D1 rane neuralne progenitore u alginatnim mikrovlaknima ... 84
5.4.1. Uticaj ispitivanih tretmana na vijabilnost ranih neuralnih progenitora u 2D model-sistemu humane neurogeneze *in vitro* i 3D model-sistemu alginatnih mikrovlakana ... 85
5.4.2. Potencijalni neuroprotektivni efekti kotretmana kvercetinom u 2D model-sistemu humane neurogeneze *in vitro* ... 85
5.4.3. Ekspresija markera OCT4 i PAX6 nakon primene tretmana na NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima u 2D model-sistemu humane neurogeneze *in vitro* i 3D model-sistemu alginatnih mikrovlakana ... 86
5.4.4. Primena 3D model-sistema sa imobilisanim NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima ... 86
5.5. Gajenje imobilisanih NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u alginatnim mikrovlaknima u protočnom bioreaktoru ... 87
5.6. NT2-neuroni i NT2-astrociti kao model-sistem za proučavanje neurotoksičnosti ... 88
5.6.1. Uticaj ispitivanih tretmana na vijabilnost NT2-neurona i NT2-astrocita ... 88
5.6.2. Uticaj ispitivanih tretmana na dužinu neurita NT2-neurona i ekspresiju markera neuralne diferencijacije βIII-tubulina ... 89
5.6.3. Uticaj ispitivanih tretmana na ekspresiju GFAP u NT2-A astrocitima ... 89
5.6.4. Uticaj ispitivanih tretmana na oksidativni status NT2-N i NT2-A ... 90
5.6.5. Uloga astrocita u regulaciji glutamata: efekti tretmana i kompenzatorni mehanizmi ... 90
5.6.6. Neurobiološki efekti konzumacije energetskih pića ... 91
6. Zaključci ... 92
7. Literatura ... 93
Biografija ... 114

1. Uvod

Poslednjih decenija među mladima se beleži zabrinjavajući porast konzumacije energetskih pića (EP-a), kako samih, tako i u kombinaciji sa alkoholom. Brojne studije ukazuju na štetne posledice konzumacije EP na funkcije centralnog nervnog sistema (CNS-a), poput nesanice, sklonosti rizičnom ponašanju, anksioznosti i slično, (sumirano u Dobrek, 2025; Arria et al., 2014), koji udruženi sa efektima na kardiovaskularni sistem, povišen krvi pritisak i aritmije, (sumirano u Medrano-Sanchez et al., 2026), mogu dovesti i do letalnog ishoda (Avcı et al., 2013). U cilju proučavanja efekata EP-a i njegovih glavnih bioaktivnih komponenti, kofeina i taurina, pojedinačno i u kombinaciji sa alkoholom, na neuralnu diferencijaciju čoveka, u ovom radu korišćen je *in vitro* model-sistem humane neurogeneze – pluripotentne NT2/D1 ćelije čija je neuralna diferencijacija indukovana retinoinskom kiselinom (RK). Efekti su ispitivani na stadijumima neindukovanih, pluripotentnih NT2/D1 ćelija, ranih neuralnih progenitora (nakon 48 č. indukcije NT2/D1 ćelija RK-om) i na stadijumima zrelih neurona (NT2-N) i astrocita (NT2-A) (nakon 4 nedelje indukcije RK-om).

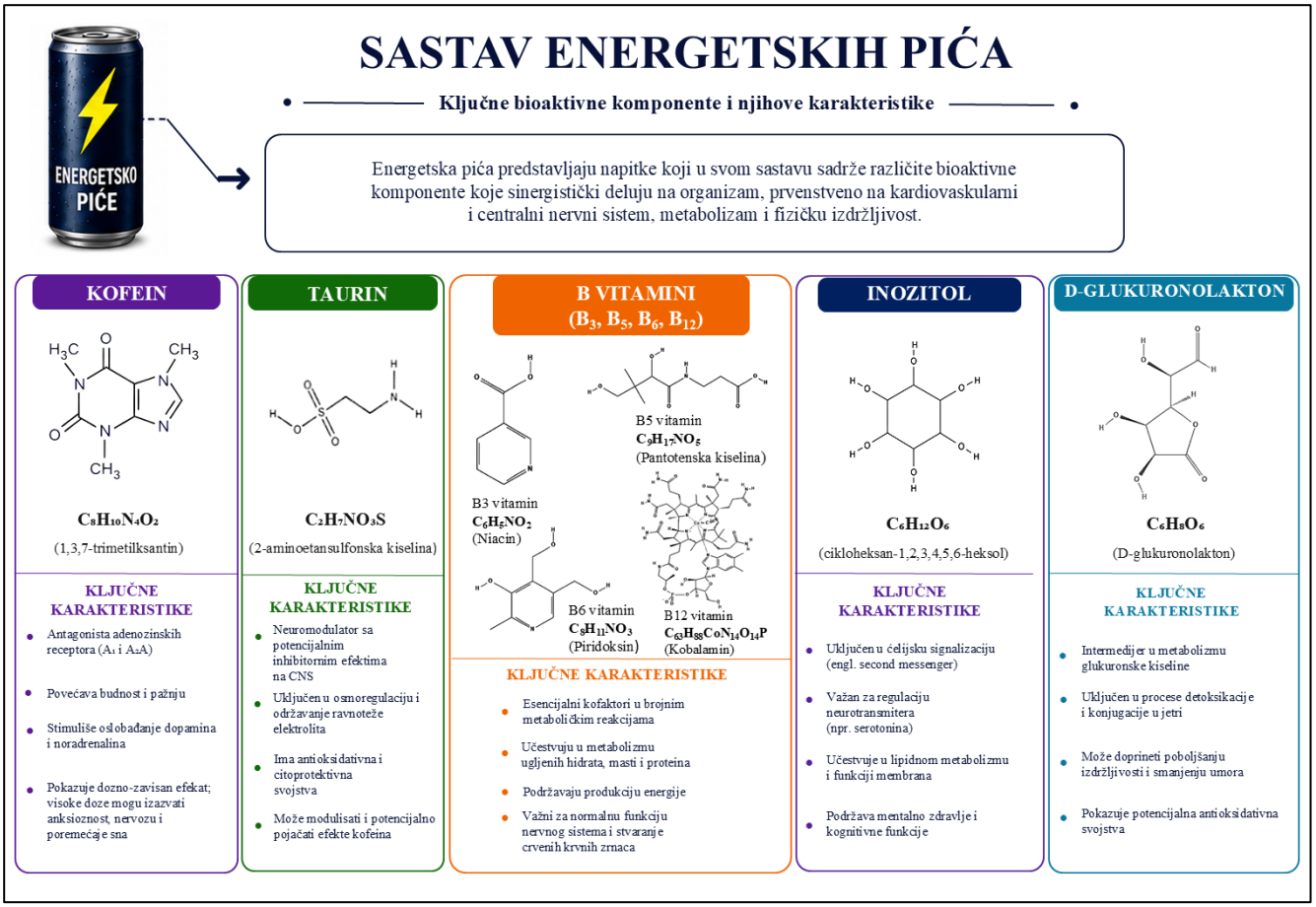
1.1. Energetska pića

1.1.1. Definicija i opšte karakteristike

Energetska pića (EP) predstavljaju bezalkoholne napitke sa visokim sadržajem kofeina i taurina, koji u svom sastavu mogu sadržati i druga bioaktivna jedinjenja uključujući D-glukuronolakton, inozitol, guaranu, ženšen (*Panax ginseng*), vitamine B-kompleksa i ginko (*Ginkgo biloba*), (Al-Shaar et al., 2017; Aonso-Diego et al., 2024). Proizvođači ih reklamiraju kao proizvode namenjene trenutnom povećanju energije, smanjenju osećaja umora i poboljšanju kognitivnih sposobnosti i fizičkih performansi (Al-Shaar et al., 2017; Aonso-Diego et al., 2024).
Prvi put su se pojavila na tržištu 1960. godine u Japanu (Górka et al., 2025), dok su u Evropi dostupna od 1987. godine, a u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) od 1997. godine (Zucconi et al., 2013). Od njihovog pojavljivanja krajem osamdesetih godina prošlog veka na tržištu u Evropi, zabeležen je značajan globalni porast kupovine ovih napitaka, uz sve veći broj proizvoda dostupnih na tržištu (Zucconi et al., 2013; Breda et al., 2014). Poseban razlog za zabrinutost predstavlja visoka zastupljenost dece, adolescenata i mladih među konzumentima ovih proizvoda (Nowak & Jasionowski, 2015).

1.1.2. Sastav i bioaktivne komponente energetskih pića

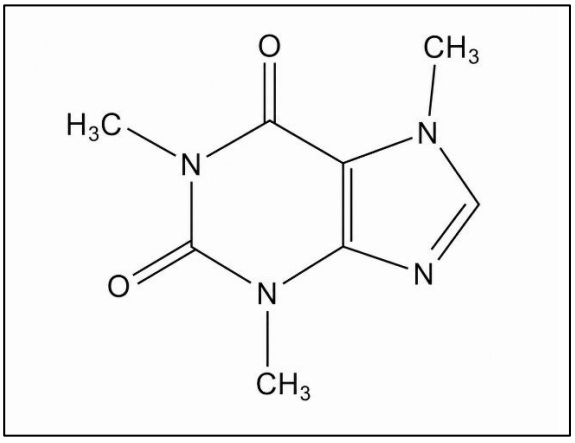
Energetska pića predstavljaju kompleksne formulacije više bioaktivnih jedinjenja (Slika 1) koja mogu ispoljavati sinergističko delovanje na fiziološke procese u ljudskom telu (Dobrek, 2025). Komponente energetskih pića mogu se grupisati u sledeće kategorije:
1) kofein i njegovi prirodni analozi (guarana, mate, mača),
2) vitamini B-kompleksa,
3) aminokiseline i njihovi derivati (taurin, karnitin),
4) šećeri i zaslađivači (šećer, glukuronolakton, veštački zaslađivači) i
5) biljni ekstrakti i druge dodatne bioaktivne supstance (ginko, ženšen, zeleni čaj; Nowak & Jasionowski, 2015; Dobrek, 2025).
Analizom 75 najprodavanijih energetskih pića u SAD pokazano je da je kofein najzastupljeniji sastojak, sa prosečnom količinom od 174 mg po pojedinačnom pakovanju energetskog pića, što je ekvivalentno količini u približno jednoj i po do dve šoljice kafe i ispod je maksimalne preporučene dnevne granice od 400 mg za zdrave odrasle osobe (Jagim et al., 2022). Šećer je prisutan u približno 45% proizvoda, dok su vitamini B-kompleksa i elektroliti zastupljeni u 35–75% energetskih pića (Jagim et al., 2022).



Slika 1. Glavne komponente energetskih pića i njihove karakteristike. Prikazane su hemijske strukture i osnovne biološke funkcije glavnih komponenti energetskih pića, kofeina, taurina, vitamina B kompleksa, inozitola i D-glukuronolaktona. Strukturne formule preuzete iz radova: Heckman et al., 2010; Dobrek, 2025.

1.1.2.1. Kofein

Kofein je prirodni alkaloid iz grupe purina (Slika 2), po svojoj strukturi sličan biohemijskoj suspstanci adenozinu a dobija se iz lišća, semenki i plodova preko 100 biljnih vrsta (Lin et al., 2023).



Slika 2. Hemijska struktura kofeina (1,3,7-trimetilksantin). Ilustracija kreirana pomoću BioRender.com platforme.

Kofein predstavlja dominantnu farmakološki aktivnu komponentu energetskih pića i dovodi do većine akutnih i hroničnih efekata povezanih sa njihovom kozumacijom (sumirano u Al-Shaar et al., 2017; Richards & Smith 2016; Seifert et al., 2011; Shah et al., 2016). Tipično pakovanje (limenka) energetskog pića, zapremine 250 mL, sadrži oko 80 mg kofeina, dok veća pakovanja (500 mL) mogu sadržati i do 160 mg kofeina (Dobrek, 2025; Higgins et al., 2018; Rubio et al., 2022). Prema preporukama Europske agencije za sigurnost hrane – EFSA (engl. The European Food Safety Authority), bezbedan dnevni unos kofeina iznosi do 400 mg kod zdravih odraslih osoba, odnosno 150 mg kod dece i adolescenata (Regulation (EU) No 1169/2011, 2014; Ehlers et al., 2019). Imajući u vidu dodatni unos kofeina putem kafe, čaja i drugih prehrambenih proizvoda, ukupni dnevni unos često premašuje količine koje predstavljaju maksimalno dozvoljen dnevni unos od 400 mg (Dobrek, 2025, Rubio et al., 2022).
Kofein deluje kao antagonista adenozinskih A1 i A2A receptora, izazivajući vazokonstrikciju i povećanje adrenergičke aktivnosti (Baldwin & File, 1989; Reddy et al., 2024; Roshan et al., 2016). Ovo dovodi do porasta srčane frekvencije (tahikardija), krvnog pritiska i kontraktilnosti miokarda, kao i do stimulacije CNS-a (Reddy et al., 2024, Nehlig et al., 1992). Dugotrajno ili prekomerno konzumiranje povezuje se sa razvojem tolerancije i poremećajima srčanog ritma (Cao et al., 2021; Wassef et al., 2017).
U CNS-u, kofein pojačava dopaminergičku i glutamatergičku neurotransmisiju, smanjuje osećaj umora i pospanosti, ali pri visokim dozama može dovesti do neželjenih efekata po zdravlje i nastanka anksioznosti, nesanice, tremora i konvulzija (Reddy et al., 2024; Uddin et al., 2017).

1.1.2.1.1. Efekti povećanog unosa kofeina tokom trudnoće na razvoj ploda

Kofein je mali, lipofilan molekul koji se rastvara u vodi i lako prolazi krvno-moždanu barijeru i placentu (sumirano u Temple et al., 2017; Willson, 2018). Tokom trudnoće njegov poluživot je produžen, naročito u trećem trimestru kada je i metabolizam kofeina najsporiji (sumirano u Chen et al., 2014). Preporučeni maksimalni unos tokom trudnoće iznosi 200 mg/dan (American College of Obstetricians and Gynecologists [ACOG], 2010). Prekomeran unos povezan je sa povećanom srčanom frekvencijom fetusa, nižom porođajnom težinom i spontanim pobačajima (sumirano u Chen et al., 2014; Lakin et al., 2023; Temple et al., 2017). Studije ukazuju i da prekomerna prenatalna izloženost kofeinu može biti povezana sa nižim količnikom inteligencije - IQ (engl. Intelligence Quotient) kod dece (Galéra et al., 2016).

1.1.2.1.2. Farmakokinetika kofeina i individualna osetljivost

Kofein je najčešće konzumirana psihoaktivna supstanca na svetu, čija farmakokinetika pokazuje značajnu individualnu varijabilnost (sumirano u Nehlig, 2018). Nakon oralne primene, kofein se brzo i gotovo u potpunosti resorbuje iz gastrointestinalnog trakta, pri čemu maksimalne koncentracije u plazmi dostiže u roku od 15–120 minuta (sumirano u Fredholm et al., 1999; Nehlig, 1999). Zbog svoje lipofilnosti i male molekulske mase, lako prolazi kroz biološke membrane čime ostvaruje sistemske efekte u organizmu (sumirano u Reddy et al., 2024).
Metabolizam kofeina odvija se primarno u jetri, pri čemu ključnu ulogu ima enzim citohrom P450 1A2 (CYP1A2) (sumirano u Arnaud, 2011; Temple et al., 2017). Ovaj enzim predominantno je odgovoran za metabolizam kofeina (90–95%) putem demetilacije u aktivne metabolite kao što su paraksantin, teobromin i teofilin (sumirano u Arnaud, 2011). Aktivnost CYP1A2 značajno varira među ljudima, a na nju utiču genetički i faktori spoljašnje sredine (sumirano u Arnaud, 2011,,; Sachse et al., 1999; Temple et al., 2017). Polimorfizmi u genu CYP1A2 predstavljaju jednu od najvažnijih determinanti brzine metabolizma kofeina (Guest et al., 2018). Na osnovu genetičkog profila, razlikujemo osobe koje brzo i sporo metabolišu kofein (sumirano u Nehlig, 2018; Yang et al., 2010). Osobe sa brzim metabolizmom kofeina imaju povećanu enzimsku aktivnost koja skraćuje poluživot kofeina, dok osobe sa sporim metabolizmom kofeina zadržavaju više koncentracije kofeina u plazmi tokom dužeg vremenskog

perioda, što može povećati rizik od neželjenih efekata, uključujući tahikardiju, poremećaje sna i anksioznost (sumirano u Nehlig, 2018; Temple et al., 2017; Yang et al., 2010). Pored CYP1A2, značajnu regulatornu ulogu ima i aril-hidrokarbonski receptor (AHR)**,** transkripcioni faktor koji reguliše ekspresiju gena iz porodice citohroma P450, uključujući CYP1A2, čime indirektno utiče na farmakokinetiku kofeina (sumirano u Nehlig, 2018).

Osim genetičkih faktora, na metabolizam kofeina utiču i pol, starost, hormonski status, pušenje i upotreba određenih lekova (sumirano u Nehlig, 1999; Temple et al., 2017). Na primer, pušenje indukuje aktivnost CYP1A2, ubrzavajući eliminaciju kofeina, dok oralni kontraceptivi i trudnoća mogu produžiti njegov poluživot (Arnaud, 2011; Temple et al., 2017). Tokom trudnoće dolazi do progresivnog smanjenja aktivnosti CYP1A2, posebno u trećem trimestru, što rezultira značajnim produženjem poluživota kofeina i povećanoj izloženosti fetusa istom (Arnaud, 2011; Nehlig, 1999).

Varijabilnost u metabolizmu kofeina ima klinički i javno-zdravstveni značaj. Individualne razlike u farmakokinetici i farmakodinamici kofeina, uključujući i genetički uslovljene, mogu doprineti heterogenosti odgovora na kofein u pogledu kardiovaskularnih i neuropsihijatrijskih efekata, kao i njegovog uticaja na sportske performanse (Southward et al., 2018; Temple et al., 2017; Yang et al., 2010). Dok kod nekih osoba kofein ispoljava poželjne stimulativne efekte, kod drugih iste ili slične doze mogu dovesti do neželjenih efekata, uključujući anksioznost, poremećaje sna i nepovoljne kardiovaskularne odgovore (Yang et al., 2010; Temple et al., 2017).

Savremeni pristupi naglašavaju značaj personalizovanog pristupa u proceni bezbednog unosa kofeina, uzimajući u obzir genetički profil, životne navike i fiziološko stanje pojedinca (Guest et al., 2018; Nehlig, 2018). Razumevanje interakcije između genetičkih polimorfizama, regulacije enzimske aktivnosti i spoljašnjih faktora predstavlja ključni korak ka preciznijem definisanju preporuka o bezbednom unosu kofeina, naročito u osetljivim grupama poput dece, adolescenata i trudnica (Temple et al., 2017).

1.1.2.1.3. Uticaj kofeina na CNS

Dejstvo kofeina na CNS se ostvaruje putem nekoliko mehanizama, iako je primarni način delovanja pri fiziološki relevantnim koncentracijama antagonizam adenozinskih receptora (A1 i A2 podtip), (Fredholm et al., 1999; Nehlig et al., 1992). Pored antagonizma adenozinskih receptora, kofein utiče na neuralnu aktivnost mobilizacijom intracelularnog kalcijuma, inhibicijom fosfodiesteraza i interakcijom sa vezujućim mestoom benzodiazepina (Nehlig et al., 1992). Mobilizacija intracelularnog kalcijuma i inhibicija fosfodiestaraze se dešavaju pri primeni većih koncentracija kofeina, stoga se ovi mehanizmi smatraju manje važnim pri standardnim fiziološkim uslovima (Nehlig et al., 1992).

1.1.2.1.4. Mehanizmi delovanja kofeina u CNS-u

Kofein ostvaruje svoje efekte u CNS-u putem više molekularnih mehanizama, pri čemu njihov značaj zavisi od koncentracije i uslova izlaganja (Nehlig et al., 1992).

1. **Antagonizam adenozinskih receptora**
   Predstavlja ključni i najznačajniji mehanizam delovanja kofeina u fiziološkim uslovima (Fredholm et al., 1999; Nehlig et al., 1992). Adenozin deluje kao inhibitorni neuromodulator, smanjujući ekscitabilnost neurona i oslobađanje neurotransmitera (Fredholm et al., 1999). Blokiranjem A1 i A2A receptora, kofein uklanja ovaj inhibitorni uticaj, čime pospešuje neuralnu aktivnost i sinaptičku transmisiju (Fredholm et al., 1999; Nehlig et al., 1992).
2. **Mobilizacija intracelularnog kalcijuma**
   Pri višim koncentracijama, kofein može povećati oslobađanje kalcijuma iz intracelularnih depoa, utičući na različite signalne puteve i ćelijske funkcije (Nehlig et al., 1992).
3. **Inhibicija fosfodiesteraza**
   Kofein može inhibirati fosfodiesteraze, što dovodi do povećanja intracelularnog nivoa cikličnih nukleotida (npr. cAMP), i promena u signalizaciji unutar ćelije (Nehlig et al., 1992).

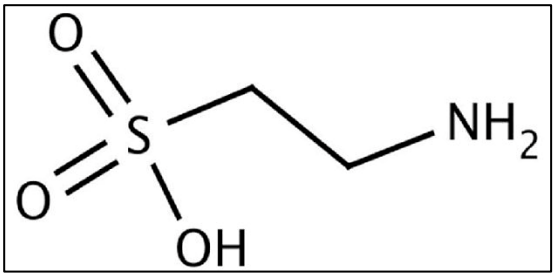
4. **Interakcije sa benzodiazepinskim receptorima**
   Ovaj mehanizam može doprineti promenama u neuralnoj signalizaciji, ali se smatra sekundarnim u odnosu na antagonizam adenozinskih receptora (Nehlig et al., 1992).

1.1.2.1.5. Efekti kofeina na kognitivne funkcije i fizičke performanse

Antagonizam adenozinskih receptora predstavlja osnovu stimulativnog dejstva kofeina na CNS (Fredholm et al., 1999; Nehlig et al., 1992). Blokiranjem inhibitornog efekta adenozina, kofein povećava ekscitabilnost neurona i podstiče oslobađanje neurotransmitera, uključujući dopamin, glutamat i noradrenalin (Fiani et al., 2021; Fredholm et al., 1999). Kao posledica toga dolazi do povećanja budnosti, poboljšanja pažnje, pamćenja i opšte kognitivne funkcije (Fiani et al., 2021; McLellan et al., 2016).
Kofein se smatra efikasnim ergogenim i neurostimulišućim agensom koji utiče na kognitivne funkcije i fizičku izdržljivost (sumirano u McLellan et al., 2016). Njegovo dejstvo ogleda se u poboljšanju kognitivnih sposobnosti, smanjenju osećaja umora, kao i poboljšanju pažnje i vremena reakcije, naročito u uslovima nedostatka sna ili povećanog mentalnog napora (sumirano u McLellan et al., 2016). Ovi efekti su najizraženiji kod zadataka koji zahtevaju dugotrajnu koncentraciju i brzu obradu informacija (sumirano u McLellan et al., 2016). Važno je naglasiti da su pozitivni efekti kofeina izraženiji kod osoba koje su umorne, dok su kod odmornih ispitanika ovi efekti uglavnom manje izraženi (sumirano u McLellan et al., 2016).
Pored uticaja na kognitivne funkcije, kofein značajno utiče i na raspoloženje i subjektivni osećaj napora (sumirano u McLellan et al., 2016). Pokazano je da smanjuje osećaj umora, povećava motivaciju i doprinosi boljem subjektivnom osećaju opšteg stanja (sumirano u McLellan et al., 2016). Ovi efekti povezani su sa njegovim delovanjem na dopaminergičke i noradrenergičke puteve, koji doprinose povećanju budnosti i boljem angažovanju u izvršavanju zadataka (sumirano u Fredholm et al., 1999; McLellan et al., 2016).
Istovremeno, kofein utiče i na fizičke performanse, povećavajući izdržljivost i poboljšavajući rezultate u aerobnim i anaerobnim aktivnostima (sumirano u McLellan et al., 2016). Ovi efekti su posledica kombinacije perifernih faktora, poput povećane mobilizacije masnih kiselina i dostupnosti kalcijuma u mišićima, kao i mehanizama CNS-a koji smanjuju subjektivni osećaj napora i omogućavaju održavanje motoričke aktivnosti (sumirano u McLellan et al., 2016).
Osim toga, kofein doprinosi poboljšanju performansi u zadacima koji zahtevaju kontinuiranu pažnju, donošenje odluka i psihomotornu koordinaciju (sumirano u McLellan et al., 2016). Ovo je naročito značajno u profesijama sa visokim zahtevima, kao što su vojna služba, transport i rad u smenama, gde umor može ozbiljno ugroziti efikasnost rada i bezbednost pojedinca (sumirano u McLellan et al., 2016). U tim uslovima, konzumacija kofeina povezuje se sa većom preciznošću, bržim reakcijama i manjim brojem grešaka (sumirano u McLellan et al., 2016).
Ipak, efekti kofeina su izraženo dozno-zavisni i podložni individualnim razlikama (Fiani et al., 2021; Fredholm et al., 1999). Umerene doze najčešće imaju povoljne efekte, dok veće doze mogu izazvati neželjene reakcije, uključujući anksioznost, nemir, smanjenu finu motoriku i poremećaje sna (Fiani et al., 2021; Juliano & Griffiths, 2004). Dugotrajna konzumacija kofeina može dovesti do razvoja tolerancije, naročito u odnosu na njegove efekte na san i kardiovaskularni sistem (Fiani et al., 2021; Grant et al., 2018). Takođe, nagli prekid unosa kofeina može izazvati različite simptome, poput glavobolje, umora i smanjene budnosti (Juliano & Griffiths, 2004).

1.1.2.2. Taurin

Taurin je neesencijalna 2-aminoetansulfonska kiselina (Slika 3), derivat cisteina, koja učestvuje u stabilizaciji ekscitabilnih mebrana u srcu, mozgu, belim krvnim zrncima i skeletnim mišićima (Ellermann et al., 2022; Ripps & Shen, 2012).



Slika 3. Hemijska struktura taurina (2-aminoetansulfonska kiselina). Preuzeto iz: Uyanga et al., 2022.

Predstavlja drugu ključnu komponentu u energetskim pićima i često je prisutan u koncentracijama koje prevazilaze uobičajen unos putem ishrane (4000 mg/L) (Dobrek, 2025). Taurin učestvuje u neuromodulaciji i regulaciji ćelijske homeostaze, kalcijumskoj signalizaciji i antioksidativnoj zaštiti (Higgins et al., 2010; Ripps & Shen, 2012; Jong et al., 2012).
Iako pokazuje hipotenzivna i kardioprotektivna svojstva (Santulli et al., 2023), taurin može uticati na kontraktilnost miokarda modulacijom kalcijumske signalizacije u kardiomiocitima (Baum & Weiss, 2001; Ellermann et al., 2022; Franks et al., 2012). Dugoročni efekti unosa taurina sa visokim dozama kofeina prisutnih u energetskim pićima ostaju nedovoljno razjašnjeni (Seifert et al., 2011).

1.1.2.2.1. Uloga taurina u CNS-u tokom razvića

Taurin predstavlja jednu od najzastupljenijih slobodnih aminokiselina u mozgu tokom embrionalnog i ranog postnatalnog perioda, pri čemu su njegove koncentracije u tim fazama značajno više nego u adultnom CNS-u (sumirano u Kilb, 2017). Ovakva distribucija ukazuje na njegovu fundamentalnu ulogu u procesima razvića nervnog sistema, koja prevazilazi metabolički značaj i uključuje regulatorne funkcije u formiranju i sazrevanju neuronskih mreža (sumirano u Kilb, 2017).
U CNS-u, taurin deluje kao neuromodulator preko interakcija sa $GABA_A$ (gama-aminobuterna kiselina), $GABA_B$ i glicinskim receptorima, regulišući ekscitabilnost neurona i modulaciju sinaptičke transmisije (sumirano u Kilb, 2017). Dok kod odraslih osoba taurin ispoljava inhibitorno dejstvo u CNS-u jer dovodi do hiperpolarizacije membrane, u nezrelim neuronima visoka intracelularna koncentracija Cl^-, uslovljena dominantnom aktivnošću NKCC1 transportera (engl. Sodium-Potassium-Chloride Cotransporter 1) koji omogućava ulazak Cl^- u ćeliju, i niskom ekspresijom KCC2 (engl. Potassium-chloride cotransporter 2) koji pospešuje izbacivanje Cl^- iz ćelije, dovodi do toga da aktivacija $GABA_A$ i glicinskih receptora izaziva depolarizaciju membrane. Ovakva depolarizujuća signalizacija ima ključnu ulogu u regulaciji neurogeneze, migracije i sinaptogeneze tokom razvoja nervnog sistema (sumirano u Furukawa & Fukuda, 2023; Kilb & Fukuda, 2017). Na taj način, taurin doprinosi pravilnoj organizaciji kortikalnih slojeva i uspostavljanju funkcionalnih neuralnih mreža (sumirano u Furukawa & Fukuda, 2023; Kilb & Fukuda, 2017). S obzirom na navedene mehanizme, taurin se može posmatrati kao važan modulator razvića CNS-a (sumirano u Kilb, 2017).

1.1.2.2.2 Uloga taurina u adultnom mozgu

Dosadašnja istraživanja na animalnim model-sistemima su pokazala da uloga taurina nije ograničena isključivo na rane stadijume razvoja nervnog sistema, već obuhvata i procese adultne neurogeneze u hipokampusu, gde je pokazano da stimuliše proliferaciju neuralnih progenitorskih ćelija (Gebara et al., 2015; Hernández-Benítez et al., 2012). Takođe, eksperimentalni model-sistemi oštećenja mozga pacova izazvanog alkoholom pokazali su da suplementacija taurinom dovodi do povećanog preživljavanja neurona i stimulacije proliferacije ćelija u dentatnom girusu, uz restauraciju neurogeneze narušene toksičnim dejstvom alkohola (Rodella et al., 2024). Neuroprotektivni efekti taurina pripisuju se njegovoj sposobnosti da stabilizuje intracelularnu koncentraciju kalcijuma, redukuje oksidativni stres i moduliše inflamatorne signalne puteve (sumirano u El Idrissi & Trenkner, 2004; Rodella et al., 2024). Stabilizacija

mitohondrijalne funkcije i smanjenje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta predstavljaju ključne mehanizme putem kojih taurin ograničava sekundarna oštećenja neurona koja mogu nastati kao posledica oksidativnog stresa, neuroinflamacije i prekomernog nakupljanja kalcijuma u ćelijama (sumirano u Jong et al., 2021). Ovi rezultati imaju poseban značaj u slučajevima izloženosti različitim agensima, budući da poremećaji kalcijumske homeostaze i pojačana produkcija slobodnih radikala predstavljaju osnovne mehanizme neurotoksičnosti (sumirano u El Idrissi & Trenkner, 2004; Rodella et al., 2024).

1.1.2.2.3. Uloga taurina u astrocitima i održavanju homeostaze CNS-a

Pored efekata na neurone, taurin ima značajnu ulogu i u funkciji glijalnih ćelija, naročito astrocita, koje predstavljaju važan rezervoar ovih molekula u CNS-u (sumirano u Ramírez-Guerrero et al., 2022). Astrociti učestvuju u regulaciji koncentracije taurina u ekstracelularnom prostoru, naročito u uslovima osmotskog stresa i pojačane neuralne aktivnosti (sumirano u Ramírez-Guerrero et al., 2022). Taurin doprinosi održavanju volumena ćelije, inhibiciji unutarćelijskog oslobođanja kalcijuma i očuvanju redoks ravnoteže u astrocitima (sumirano u Ramírez-Guerrero et al., 2022). Takođe je pokazano da redukuje produkciju proinflamatornih citokina i ograničava posledice oksidativnog stresa, čime doprinosi suzbijanju neuroinflamatornih procesa (sumirano u Ramírez-Guerrero et al., 2022). Modulacijom glutamatergičke transmisije i interakcijom sa inhibitornim receptorima, taurin doprinosi održavanju ravnoteže između ekscitatornih i inhibitornih signala, što je ključno za stabilnost neuralnih mreža (sumirano u Ramírez-Guerrero et al., 2022). U patološkim stanjima, uključujući ishemiju i neurodegenerativne poremećaje, taurin ispoljava citoprotektivne efekte kroz regulaciju funkcije mitohondrija, modulaciju intracelularne homeostaze kalcijuma i smanjenje aktivacije apoptotskih signalnih puteva (sumirano u Ramírez-Guerrero et al., 2022).
Ovakvo istovremeno delovanje na nivou neurona i astrocita ukazuje na važnu ulogu taurina kao centralnog modulatora homeostaze u CNS-u (sumirano u Ramírez-Guerrero et al., 2022).

1.1.2.3. D-glukuronolakton

D-glukuronolakton je intermedijer u metabolizmu ugljenih hidrata i učestvuje u procesima detoksikacije u jetri (sumirano u Dobrek, 2025). Tipično pakovanje (limenka od 250 ml) energetskog pića sadrži oko 600 mg ovog jedinjenja (sumirano u Dobrek, 2025). Iako dosadašnja istraživanja nisu pokazala značajnu toksičnost ove komponente, njegov efekat treba posmatrati u kontekstu kombinovanog delovanja sa ostalim komponentama energetskih pića (sumirano u Dobrek, 2025; Higgins et al., 2010).

1.1.2.4. Vitamini B-kompleksa i inozitol

Vitamini B-kompleksa (B3, B5, B6, B12) prisutni su u energetskim pićima u količinama koje često premašuju preporučeni dnevni unos (Jagim et al., 2022). Vitamin B3 (niacin) učestvuje u formiranju koenzima NAD^+ i $NADP^+$ koji su ključni za oksidaciono-redukcione reakcije i produkciju energije u ćeliji (Kirkland, 2009), dok je vitamin B5 (pantotenska kiselina) sastavni deo koenzima A i uključen je u metabolizam ugljenih hidrata, lipida i proteina (sumirano u Czumaj et al., 2020). Vitamin B6 (piridoksin) deluje kao koenzim u metabolizmu aminokiselina i sintezi neurotransmitera, uključujući serotonin, epinefrin i GABA (Stover & Field, 2015), dok vitamin B12 (kobalamin) učestvuje u sintezi DNK, nastanku eritrocita i održavanju funkcije nervnog sistema (sumirano u O'Leary & Samman, 2010). Iako imaju važnu ulogu u energetskom metabolizmu i sintezi neurotransmitera, njihova suplementacija putem energetskih pića nije neophodna kod osoba sa adekvatnom i uravnoteženom ishranom (sumirano u Heckman et al., 2010; Institute of Medicine (US), 1998).
Inozitol učestvuje u signalnim putevima CNS-a i ima ulogu u intracelularnoj signalizaciji, ali količine prisutne u energetskim pićima obično ne predstavljaju značajan zdravstveni rizik (sumirano u Dobrek, 2025). Osim toga, inozitol ima antiinflamatorne i antioksidativne efekte i pospešuje osetljivost perifernih tkiva na insulin (sumirano u Dobrek, 2025).

Zdravstveni efekti energetskih pića ne mogu se posmatrati kroz prizmu pojedinačnih komponenti, već kao rezultat njihovog kombinovanog i potencijalno sinergističkog delovanja (sumirano u Higgins et al., 2010).

1.2. Energetska pića i fizičke performanse

Brojne studije ukazuju da energetska pića, prvenstveno zbog kofeina, mogu povećati aerobne performanse, naročito u sportovima izdržljivosti (Guest et al., 2021). Najizraženiji efekti uočeni su pri dozama ≥ 3 mg/kg telesne mase, konzumiranim ~ 60 minuta pre vežbanja (Burke, 2008; Guest et al., 2021; Spriet, 2014). Ipak, rezultati mogu varirati zbog individualnih razlika u metabolizmu kofeina i potencijalnih interakcija sastojaka različitih energetskih pica (Guest et al., 2021).

1.3. Epidemiologija i prevalenca konzumacije

Konzumacija energetskih pića rasprostranjena je širom sveta, ali su podaci o učestalosti konzumacije metodološki heterogeni (Aonso-Diego et al., 2024). Meta-analiza 192 studije koja je obuhvatila 50 zemalja i oko 1,1 milion ispitanika pokazala je da je prevalenca konzumacije veća od 50% (ispitanici koji su bar jednom tokom života probali energetsko piće), pri čemu je najizraženija u adolescentskoj grupi (Aonso-Diego et al., 2024). Geografski posmatrano, najviša učestalost zabeležena je u Severnoj Americi (62,1%), zatim u Evropi (55,5%), Aziji (49,1%) i Okeaniji (48,3%), dok su niže stope registrovane u Centralnoj i Južnoj Americi (39,1%) (Aonso-Diego et al., 2024).
Prema podacima Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA), 68% adolescenata u Evropskoj uniji konzumira energetska pića, dok je prevalenca kod odraslih 30% i 18% kod dece mlađe od 10 godina (Zucconi et al., 2013). Analize Verkamen i saradnika ukazuju na kontinuirani porast konzumacije energetskih pića u Sjedinjenim Američkim Državama u periodu 2003–2016. godine (Vercammen et al., 2019), dok noviji podaci potvrđuju da se trend rasta nastavlja, naročito među decom, adolescentima i mladim odraslim osobama (Ajibo et al., 2024).

1.3.1. Konzumiranje energetskih pića među adolescentima u Srbiji: prevalenca, obrasci i javni značaj

Konzumiranje EP među adolescentima predstavlja rastući zdravstveni problem u mnogim zemljama, uključujući i Srbiju (Al-Shaar et al., 2017; Gudelj-Rakic et al., 2024; Parezanović & Prkosovački, 2016). Ova pića, bogata kofeinom, taurinim, šećerima i drugim bioaktivnim supstancama, često se promovišu kao sredstva za povećanje budnosti i fizičke izdržljivosti, ali njihova upotreba među mlađim stanovništvom stvara posebnu zabrinutost zbog potencijalnih neurobioloških, kardiovaskularnih i psiholoških efekata (Al-Shaar et al., 2017; Alsunni, 2015; Babu et al., 2008). Podaci prikupljeni na nacionalnom nivou i u lokalnim školskim sredinama u Srbiji ukazuju na značajnu rasprostranjenost konzumiranja, kao i na povezanost konzumiranja sa rizičnim ponašanjima (Gudelj-Rakic et al., 2024; Parezanović & Prkosovački, 2016).
Prema rezultatima nacionalnog istraživanja sprovedenog u okviru HBSC studije (engl. Health Behaviour in School-aged Children) u Srbiji 2022. godine, koje je obuhvatilo 3962 učenika uzrasta 11, 13 i 15 godina, 15,6% adolescenata konzumira energetska pića više od jednom nedeljno (Gudelj-Rakic et al., 2024). Učestalost konzumacije raste sa uzrastom, pri čemu je najveća među petnaestogodišnjacima (20,3%) (Gudelj-Rakic et al., 2024). Istraživanje je pokazalo da je redovno konzumiranje energetskih pića značajno češće kod adolescenata nižeg porodičnog socioekonomskog statusa, kao i kod onih koji svakodnevno konzumiraju zaslađena gazirana pića (Gudelj-Rakic et al., 2024). Posebno je značajna povezanost upotrebe energetskih pića i rizičnih obrazaca ponašanja, uključujući nedeljnu konzumaciju alkohola, pri čemu je skoro polovina adolescenata koji piju alkohol na nedeljnom nivou istovremeno i redovni konzument energetskih pića (Gudelj-Rakic et al., 2024). Ovi rezultati ukazuju da se energetska

pića često uklapaju u širi obrazac nezdravih životnih navika i potencijalno rizičnih ponašanja (Gudelj-Rakic et al., 2024).
Slični trendovi zabeleženi su i u lokalnoj studiji sprovedenoj među učenicima srednje medicinske škole u Novom Sadu, koja je obuhvatila 258 adolescenata (Parezanović & Prkosovački, 2016). Gotovo polovina ispitanika navela je da konzumira energetska pića, dok je manji procenat učesnika prijavio svakodnevnu upotrebu (Parezanović & Prkosovački, 2016). Uočene su razlike između polova u učestalosti konzumacije, pri čemu su dečaci češće prijavljivali redovnu konzumaciju (Parezanović & Prkosovački, 2016). Posebno je zabrinjavajući podatak da je 28% konzumenata navelo da kombinuje energetska pića sa alkoholom, čime se dodatno povećava rizik od akutnih i hroničnih neželjenih efekata, uključujući poremećaje ponašanja, kardiovaskularne probleme i posledice neurotoksičnih efekata (Parezanović & Prkosovački, 2016).
Dostupni podaci iz Srbije potvrđuju da je konzumacija energetskih pića među adolescentima relativno česta kao i da se često konzumiraju u kombinaciji sa alkoholom (Gudelj-Rakic et al., 2024; Parezanović & Prkosovački, 2016). Razumevanje načina na koji adolescenti koriste energetska pića važno je za pravilno postavljanje eksperimentalnih uslova pri ispitivanju njihovih efekata i za tumačenje rezultata dobijenih u *in vitro* model-sistemima neurotoksičnosti. Ovi podaci pružaju uvid u stvarne obrasce konzumacije energetskih pića, uključujući i njihovu kombinovanu upotrebu sa alkoholom, kao i u moguće posledice takve konzumacije (Gudelj-Rakic et al., 2024; Parezanović & Prkosovački, 2016). Stoga, integracija epidemioloških podataka sa eksperimentalnim model-sistemima predstavlja važan korak ka sveobuhvatnom sagledavanju uticaja energetskih pića na razvoj i funkcije CNS-a.

1.4. Regulatorni i zakonodavni okvir

Termin *energetsko piće* nije precizno definisan u zakonodavnom okviru Evropske Unije (EU), već se ova kategorija proizvoda reguliše kroz opšte propise o hrani (Katsarova, 2025). Iako na nivou EU ne postoji specifična regulativa koja se odnosi isključivo na energetska pića, obavezno je označavanje proizvoda sa visokim sadržajem kofeina, propisano Uredbom (EU) br. 1169/2011 (Regulation (EU) No 1169/2011, 2011). Napici koji sadrže više od 150 mg kofeina po litru (15 mg/100 mL) moraju imati jasno istaknuto upozorenje o visokom sadržaju kofeina, uz navođenje njegove količine (Katsarova, 2025).
Prema podacima Evropske agencije za bezbednost hrane (engl. The European Food Safety Authority, EFSA), adolescenti predstavljaju grupu sa visokom učestalošću konzumacije energetskih pića, pri čemu se kod određenog broja beleži i povećan unos kofeina (European Food Safety Authority (EFSA), 2015). EFSA preporučuje maksimalan dnevni unos kofeina od 3 mg/kg telesne mase za decu i adolescente, što se smatra bezbednim nivoom izloženosti (European Food Safety Authority (EFSA), 2015).
Regulacija konzumacije energetskih pića u državama članicama EU značajno varira i obuhvata različite pristupe, od potpune zabrane prodaje maloletnicima do dobrovoljnih ograničenja (Katsarova, 2025). Litvanija je prva uvela zabranu prodaje energetskih pića osobama mlađim od 18 godina još 2014. godine, dok je Letonija sledila ovaj primer i uvela zabranu 2016. godine (Katsarova, 2025). Poljska i Rumunija su ove mere uvele 2024. godine, a Mađarska i Bugarska tokom 2025. godine, čime su sve ove zemlje uspostavile zakonsku zabranu prodaje energetskih pića maloletnicima (Katsarova, 2025). U Španiji ne postoji jedinstvena nacionalna zabrana, ali su pojedini regioni (npr. Galicija) uveli ograničenja, dok su dodatne mere i dalje u postupku razmatranja (Katsarova, 2025). Slično tome, u Češkoj se razmatra uvođenje zabrane prodaje mlađima od 15 godina (Katsarova, 2025). U Švedskoj ne postoji zakonska zabrana, ali su trgovinski lanci uveli dobrovoljna ograničenja prodaje mlađima od 15 godina (Katsarova, 2025). Specifičan primer predstavlja Francuska, gde je ranija zabrana određenih energetskih pića ukinuta, ali je zadržano obavezno označavanje proizvoda sa visokim sadržajem kofeina (Katsarova, 2025). Ovi podaci ukazuju na neujednačen regulatorni okvir na nivou EU i rastući trend uvođenja restriktivnih mera u cilju zaštite zdravlja mladih (Katsarova, 2025). Ovakav regulatorni pristup ukazuje na sve veću zabrinutost javnosti zbog potencijalnih zdravstvenih efekata energetskih pića kod mladih i naglašava

potrebu za daljim unapređenjem regulatornog okvira na evropskom nivou (European Food Safety Authority (EFSA), 2015; Katsarova, 2025).
U Sjedinjenim Američkim Državama energetska pića ne pripadaju jedinstveno definisanoj regulatornoj kategoriji. Ovi proizvodi su plasirani na tržište kao bezalkoholni napici ili kao dijetetski suplementi, što dovodi do primene različitih regulatornih okvira i standarda kontrole (Heckman et al., 2010). U Republici Srbiji energetska pića nisu obuhvaćena posebnom regulatornom kategorijom, već se njihova proizvodnja, sastav i označavanje regulišu u okviru opštih propisa koji se odnose na bezalkoholna pića i bezbednost hrane (*Правилник о декларисању, означавању и рекламирању хране, 2017*). Ovi propisi definišu dozvoljeni sadržaj kofeina i obavezne informacije koje moraju biti navedene na deklaraciji proizvoda (*Правилник о декларисању, означавању и рекламирању хране, 2017*).

1.5. Uticaj konzumiranja energetskih pića na fiziološke procese u organizmu čoveka

1.5.1. Uticaj na CNS

Energetska pića primarno deluju na CNS putem kofeina, koji antagonizuje adenozinske receptore (A1 i A2A), čime dolazi do povećanja neuronalne ekscitabilnosti i oslobađanja neurotransmitera poput dopamina, adrenalina i noradrenalina (sumirano u Costantino et al., 2023; Matondo et al., 2026). Ovaj mehanizam dovodi do povećanja pažnje, budnosti i kognitivnih performansi (sumirano Costantino et al., 2023; Matondo et al., 2026). Efekti kofeina su dozno-zavisni, pri čemu niže doze imaju stimulativan efekat, dok više doze mogu izazvati neželjene neurološke simptome, uključujući anksioznost, nervozu i poremećaje sna (sumirano u Nehlig, 2010), (Slika 4). Pored toga, kombinacija kofeina sa drugim komponentama energetskih pića, poput taurina, može modifikovati ove efekte. Taurin deluje kao neuromodulator sa potencijalnim inhibitornim efektima na CNS, ali u kombinaciji sa kofeinom može doprineti kompleksnom, ponekad i nepredvidivom odgovoru nervnog sistema (sumirano u Costantino et al., 2023). Dodatno, dugotrajna konzumacija energetskih pića povezana je sa promenama u ponašanju, uključujući povećanu impulsivnost i poremećaje cirkadijalnog ritma (sumirano u Burke et al., 2015), (Slika 4).

1.5.2. Uticaj na kardiovaskularni sistem

Kardiovaskularni sistem je najosetljiviji na dejstvo energetskih pića. Akutna konzumacija dovodi do povećanja srčane frekvencije i krvnog pritiska, što je posledica stimulacije simpatičkog nervnog sistema i povećanog oslobađanja kateholamina (sumirano u Costantino et al., 2023; Gualberto et al., 2024). Sistematske analize pokazuju da energetska pića mogu izazvati i promene u elektrofiziologiji srca, uključujući produženje QT intervala, što može povećati rizik od aritmija (sumirano u Mandato et al., 2025; Shah et al., 2019). Kombinacija kofeina i taurina može dodatno pojačati kardiovaskularni odgovor, uprkos potencijalnim vazodilatatornim efektima taurina (sumorano u Schaffer et al., 2014). Dugoročno konzumiranje povezuje se sa povećanim rizikom od hipertenzije i drugih kardiovaskularnih poremećaja (Mandato et al., 2025).

1.5.3. Uticaj na metabolički i endokrini sistem

Energetska pića imaju značajan uticaj na metaboličku homeostazu, pre svega zbog visokog sadržaja šećera i kofeina (sumirano u Costantino et al., 2023; Malik et al., 2010). Akutna konzumacija ovih napitaka dovodi do brzog porasta glukoze u krvi i stimulacije insulinske sekrecije, dok hronična izloženost može doprineti razvoju insulinske rezistencije i metaboličkog sindroma (sumirano u Malik et al., 2010). Kofein prisutan u EP može stimulisati oslobađanje hormona stresa, poput kortizola, čime utiče na regulaciju energetskog metabolizma (sumirano u Sabt et al., 2025). Pored toga, energetska pića u kombinaciji sa alkoholom mogu povećati produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), što može doprineti oksidativnom stresu i oštećenju ćelija (sumirano u Costantino et al., 2023; Díaz et al., 2016).

Ovaj mehanizam je posebno relevantan u kontekstu neurotoksičnosti i metaboličkih poremećaja. Dodatno, poremećaji apetita i energetskog balansa koji mogu dovesti do gojaznosti i dijabetesa povezani su sa hroničnom konzumacijom ovih napitaka (sumirano u Matondo et al., 2026).

1.5.4. Uticaj na jetru i bubrege

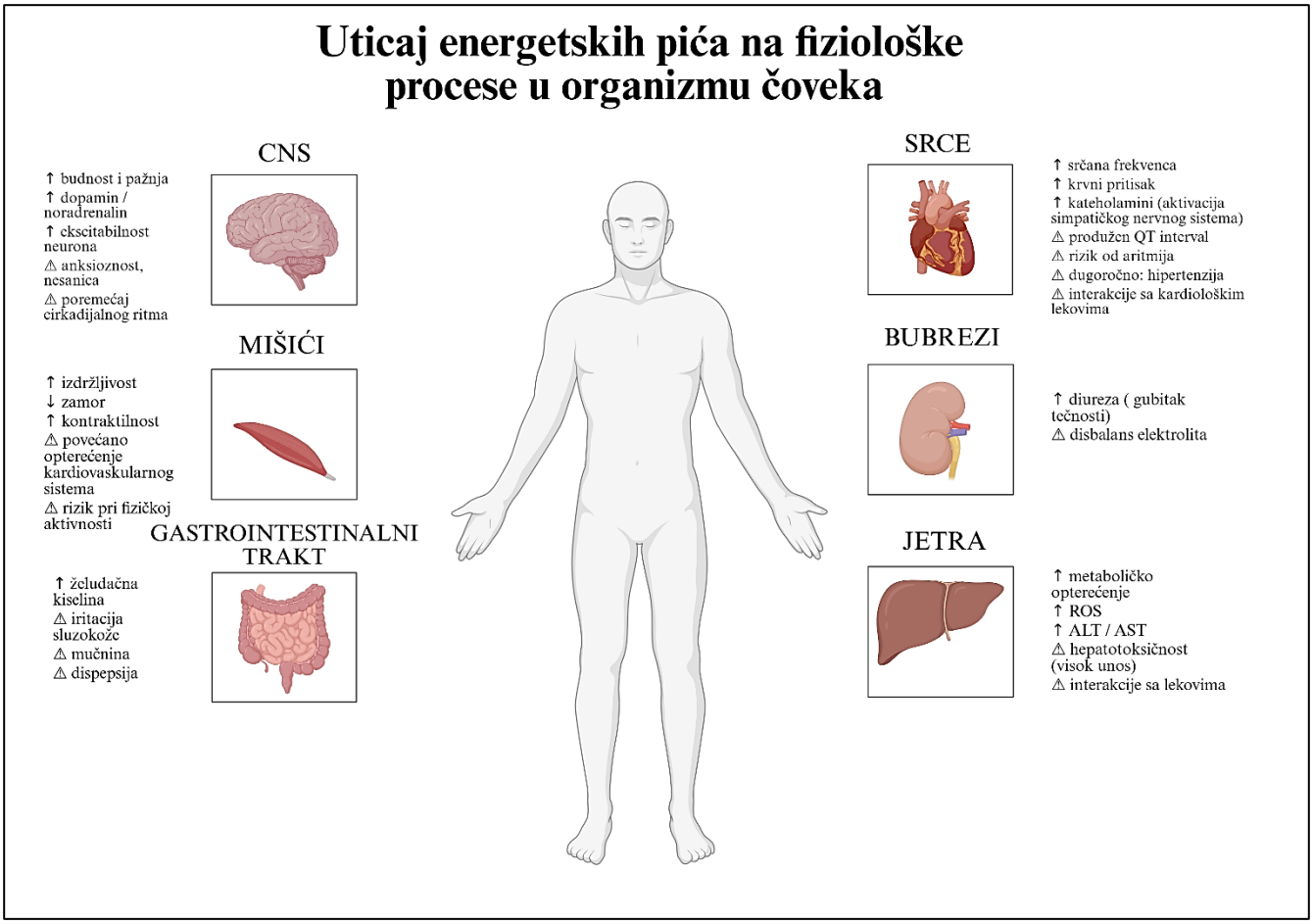
Prema dostupnim preglednim radovima, dugotrajno i prekomerno konzumiranje energetskih pića može imati negativne efekte na funkciju jetre i bubrega. Povećanje nivoa enzima jetre (ALT, AST) i potencijalna hepatotoksičnost povezani su sa visokim unosom energetskih pića (sumirano u Costantino et al., 2023). Ovi efekti se dovode u vezu sa inflamacijom i metaboličkim opterećenjem jetre (sumirano u Costantino et al., 2023). Manje doze kofeina (~3 mg/kg) uglavnom ne narušavaju ravnotežu tečnosti kod zdravih osoba, dok veće doze (~6 mg/kg) mogu izazvati akutni diuretički efekat i povećano izlučivanje urina (Seal et al., 2017). U studiji Dobrek i saradnici (sumirano u Dobrek, 2025) je dodatno naglašeno da komponente energetskih pića mogu uticati na farmakokinetiku lekova koji se metabolišu u jetri, čime se povećava rizik od neželjenih efekata (Slika 4).

1.5.5. Uticaj na gastrointestinalni sistem

Energetska pića mogu izazvati različite gastrointestinalne simptome, uključujući mučninu, iritaciju želuca i povećanu sekreciju želudačne kiseline (sumirano u Dobrek, 2025). Ovi efekti su posledica kombinacije kofeina, visokog sadržaja šećera i kiselosti napitaka. Osim toga, navodi se i povezanost sa dispepsijom i gastrointestinalnim problemima (sumirano u Dobrek, 2025), (Slika 4).

1.5.6. Uticaj na mišićni sistem i fizičku performansu

Kofein i taurin, pojedinačno i u kombinaciji, mogu poboljšati fizičku sposobnost i performanse, pri čemu kombinacija kofeina i taurina pokazuje najizraženije efekte, naročito tokom anaerobnih aktivnosti visokog intenziteta (sumirano u Deng et al., 2025). Smatra se da kofein povećava stimulaciju CNS-a i produkciju energije putem glikolize, dok taurin doprinosi stabilizaciji intracelularnog kalcijuma, poboljšanju kontraktilnosti mišića i smanjenju oksidativnog stresa (sumirano u Deng et al., 2025). Njihovo zajedničko delovanje može povećati mišićnu snagu tokom intenzivnog fizičkog napora. Međutim, efekti na aerobnu izdržljivost pokazuju individualnu varijabilnost koja zavisi od uslova sredine, nivoa utreniranosti i individualnih karakteristika ispitanika (sumirano u Deng et al., 2025). Taurinu se pripisuje sposobnost povećanja kontraktilnosti skeletnih mišića, tolerancija na napor i doprinos povoljnim efektima kofeina na fizičke performanse i izdržljivost. Međutim, sinergistički efekti kofeina i taurina još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni (sumirano u Dobrek, 2025).
Takođe, kombinacija energetskih pića sa fizičkom aktivnošću može povećati rizik od neželjenih efekata na kardiovaskularni sistem (hipertenzija, tahikardija, aritmija), posebno kod osoba koje konzumiraju veće količine kofeina (sumirano u Gutiérrez-Hellín & Varillas-Delgado, 2021). Dosadašnji rezultati ukazuju na potrebu za oprezom pri upotrebi energetskih pića tokom sportskih aktivnosti (sumirano u Gutiérrez-Hellín & Varillas-Delgado, 2021), (Slika 4).



Slika 4. Grafički prikaz sistemskih efekata energetskih pića. Prikazani su potencijalni efekti energetskih pića na mozak, srce, bubrege, jetru, gastrointestinalni trakt i mišićni sistem, uključujući stimulativne (↑) i inhibitorne (↓) efekte kao i neželjene posledice konzumacije (⚠). Ilustracija kreirana pomoću BioRender.com platforme.

1.6. Interakcije sa alkoholom i lekovima

Poseban aspekt delovanja energetskih pića odnosi se na njihovu interakciju sa alkoholom i lekovima (sumirano u Dobrek, 2025; Marczinski, 2011). Kofein može maskirati sedativne efekte alkohola, što dovodi do povećanog unosa alkohola i posledičnog povećanja rizika od rizičnog ponašanja (Marczinski, 2011).

Etanol ispoljava efekte u CNS-u kroz kompleksnu interakciju sa više signalnih puteva neurotransmitera (sumirano u Allgaier, 2002; Koob & Volkow, 2010; Kumar et al., 2009). Njegovo dejstvo se u velikoj meri zasniva na aktivaciji inhibitorne GABA-ergičke neurotransmisije, pre svega modulacijom GABA_A receptora, kao i na inhibiciji ekscitatornih glutamatergičkih puteva, naročito preko NMDA receptora (sumirano u Allgaier, 2002; Kumar et al., 2009). Ovakva kombinacija efekata dovodi do smanjenja neuronalne ekscitabilnosti, izmene kognitivnih funkcija i sedativnog dejstva (sumirano u Valenzuela, 1997). Pored toga, etanol utiče i na dopaminergički sistem dovodeći do povećanog oslobađanja dopamina, što je povezano sa osećajem nagrade i razvojem zavisnosti (sumirano u Valenzuela, 1997). Ujedno, uključeni su i drugi neurotransmiterski putevi, uključujući serotonergički i endogeni opioidni sistem, čime se dodatno usložnjava njegov ukupni neurofarmakološki profil (Spanagel, 2009; Valenzuela, 1997).

Metabolizam etanola odvija se primarno u jetri putem enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) i aldehid dehidrogenaze (ALDH), pri čemu nastaje acetaldehid kao toksični intermedijer, a zatim acetat kao finalni produkt koji se u perifernim tkivima prevodi u acetil koenzim A (skraćeno acetil-CoA) i razlaže na CO_2 i H_20 tokom Krebsovog ciklusa (sumirano u Cederbaum, 2012). Tokom ovog procesa dolazi do povećanog stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta i narušavanja redoks ravnoteže, što može doprineti oksidativnom stresu i potencijalnom oštećenju ćelija (sumirano u Wu & Cederbaum, 2003).
Kombinovana konzumacija alkohola i energetskih pića (engl. alcohol mixed with energy drinks, AmED) predstavlja poseban javnozdravstveni problem (sumirano u Marczinski, 2011). Iako kofein može ublažiti subjektivni osećaj pospanosti izazvan alkoholom, on ne smanjuje stvarni stepen kognitivnog i motornog oštećenja, što može dovesti do pogrešne procene sopstvene sposobnosti i povećanog rizika od povreda i rizičnih ponašanja (Curry & Stasio, 2009). Takođe, studije ukazuju da konzumacija alkohola i energetskih pića može dodatno uticati na neurohemijske procese, uključujući i povećan oksidativni stres, što potencijalno doprinosi dugoročnim neurotoksičnim efektima (Díaz et al., 2016).
U radu Dobrek i saradnici (sumirano u Dobrek, 2025) su istakli da energetska pića mogu uticati na metabolizam lekova, posebno onih koji deluju na CNS i kardiovaskularni sistem, menjajući njihovu efikasnost i bezbednost. Ove interakcije imaju značajan klinički značaj i dodatno usložnjavaju procenu bezbednosti konzumacije energetskih pića (sumirano u Dobrek, 2025).

1.7. Adolescenti kao ciljna grupa i uloga marketinga

Adolescenti predstavljaju posebno osetljivu grupu, jer razvoj mozga koji još uvek traje u ovom periodu razvića doprinosi povećanoj podložnosti dugoročnim neurobiološkim promenama (sumirano u Cadoni & Peana, 2023; Spear, 2000, 2013). Marketinške strategije aktivno oblikuju percepciju mladih osoba predstavljajući energetska pića kao moderne, atraktivne proizvode koji povećavaju fizičku i mentalnu izdržljivost, čime se podstiče njihova učestala konzumacija među mladima (sumirano u Alsunni, 2015; Hammond & Reid, 2018; Visram et al., 2016). U skladu sa tim, proizvođači energetskih pića često sponzorišu sportske i muzičke manifestacije, a promocija proizvoda dodatno se ostvaruje putem televizije, interneta, novina što doprinosi njihovoj popularizaciji i normalizaciji njihove upotrebe u svakodnevici adolescenata (sumirano u Hammond & Reid, 2018). Kao rezultat toga, energetska pića predstavljaju značajan javno-zdravstveni izazov, naročito kada se konzumiraju prekomerno ili u kombinaciji sa drugim supstancama poput alkohola (sumirano u Ajibo et al., 2024; Seifert et al., 2011).

1.7.1. Globalni uticaj energetskih pića na adolescente: epidemiološki podaci i uticaj na zdravlje

Neki od prvih radova u kome su prikazani efekti energetskih pića na zdravlje dece, adolescenata i mladih ljudi ukazali su na potencijalne kardiovaskularne, neurološke i metaboličke posledice njihove konzumacije (sumirano u Alsunni, 2015). Posebno su istaknuti poremećaji srčanog ritma, porast arterijskog pritiska, anksioznost, nervoza, poremećaji sna i gastrointestinalne tegobe, naročito u slučajevima visokog unosa kofeina ili kod osetljivih pojedinaca (sumirano u Alsunni, 2015). Posebno je naglašeno da adolescenti predstavljaju posebno osetljivu grupu, imajući u vidu da se njihov CNS i dalje razvija, te da izloženost visokim dozama stimulansa može imati dugoročne posledice na procese u CNS-u (sumirano u Cadoni & Peana, 2023; Spear, 2000, 2013).
Novija istraživanja dodatno potvrđuju da je konzumacija energetskih pića u adolescentskoj grupi povezana sa nizom posledica po zdravlje, uključujući poremećaje sna, povećan rizik od anksioznih simptoma, glavobolju, kao i rizična ponašanja (sumirano u Ajibo et al., 2024). Pored direktnih fizioloških efekata, ističe se i povezanost sa obrascima ponašanja kao što su konzumacija alkohola, pušenje i visok unos zaslađenih napitaka (sumirano u Ajibo et al., 2024). Posebno je zabrinjavajuće često kombinovanje energetskih pića sa alkoholom, koje može povećati rizik od neželjenih ishoda po zdravlje (sumirano u Ajibo et al., 2024; Sefen et al., 2022).

Pregledi zasnovani na prikazima pojedinačnih slučajeva (engl. case reports) ukazuju i na ozbiljnije, iako retke, neželjene događaje kod dece i adolescenata, uključujući aritmije, hipertenziju i neurološke simptome, kao i druge akutne kardiovaskularne poremećaje, naročito u situacijama prekomerne konzumacije energetskih pića ili njihove kombinacije sa alkoholom (sumirano Li et al., 2023). Iako su ovakvi događaji relativno retki, njihovo postojanje ukazuje na potrebu za oprezom i daljim istraživanjima bioloških mehanizama putem kojih kofein i druge komponente energetskih pića deluju na organizam u razvoju (sumirano u Li et al., 2023).

Uprkos rastućem broju epidemioloških i kliničkih podataka, molekularni i ćelijski mehanizmi potencijalnog neurotoksičnog dejstva komponenti energetskih pića i dalje nisu u potpunosti razjašnjeni. Stoga eksperimentalni *in vitro* model-sistemi koji omogućavaju kontrolisanu analizu efekata na humane neuralne progenitorske ćelije, neurone i astrocite predstavljaju važan translacioni most između epidemioloških podataka i razumevanja potencijalnih neurobioloških posledica konzumacije energetskih pića u adolescentskom uzrastu.

1.8. Konzumacija energetskih pića u trudnoći

Trudnoća predstavlja osetljiv period u kojem je preporučeno ograničiti unos kofeina na ≤200 mg/dan (American College of Obstetricians and Gynecologists [ACOG], 2010). Većina energetskih pića sadrži 80–150 mg kofeina po limenci, ali prisustvo drugih bioaktivnih komponenti dodatno usložnjava procenu bezbednosti (sumirano u Alsunni, 2015). Iako je broj studija ograničen, pojedini podaci ukazuju na potencijalnu povezanost konzumacije energetskih pića ili visokog unosa kofeina sa komplikacijama u trudnoći, uključujući smanjenu telesnu masu, ograničenja rasta ploda i gestacijsku hipertenziju (sumirano u Chen et al., 2014; Ding et al., 2023). Svetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization, WHO) preporučuje smanjenje unosa kofeina kod trudnica koje dnevno konzumiraju više od 300 mg, kako bi se smanjio rizik od gubitka trudnoće i rađanja deteta sa niskom porođajnom masom (WHO, 2023). Stoga, na osnovu literaturnih podataka, energetska pića se ne preporučuju tokom trudnoće zbog visokog sadržaja kofeina i prisustva drugih biološki aktivnih sastojaka čija bezbednost nije dovoljno ispitana (sumirano u Antonio et al., 2025).

1.9. Dvodimenzionalni (2D) i trodimenzionalni (3D) model-sistemi u proučavanju neuralne diferencijacije

1.9.1. Ograničenja dvodimenzionalnih (2D) model-sistema za propagaciju ćelija

Dvodimenzionalne (2D) ćelijske kulture predstavljaju široko korišćen i decenijama unazad standardizovan model-sistem za proučavanje fundamentalnih aspekata ćelijske biologije, uključujući osnovne ćelijske procese, signalne puteve, odgovor ćelije na unutrašnje i spoljašnje stimuluse (sumirano u Kapałczyńska et al., 2018). U ovim sistemima ćelije se gaje kao adherentni monosloj (zalepljene za dno sudova za kultivaciju) ili kao ćelijska suspenzija u hemijski definisanim medijumima za gajenje ćelija u kontrolisanim spoljašnjim uslovima u inkubatorima za gajenje ćelija (sumirano u Kapałczyńska et al., 2018). Takav pristup omogućava smanjenje eksperimentalne varijabilnosti i jednostavnu primenu funkcionalnih testova (sumirano u Kapałczyńska et al., 2018).

Međutim, 2D model-sistemi predstavljaju pojednostavljen i redukovan model-sistem koji ne odražava složenu trodimenzionalnu arhitekturu tkiva (sumirano u Edmondson et al., 2014). U ovim uslovima značajno su ograničene međućelijske interakcije, kao i interakcije ćelija sa vanćelijskim matriksom (VĆM), koji u fiziološkim uslovima sadrži faktore rasta, adhezivne molekule i brojne regulatorne komponente (sumirano u Breslin & O'Driscoll, 2013; Edmondson et al., 2014). Odsustvo adekvatne tkivne arhitekture utiče na ključne biološke procese, uključujući proliferaciju, diferencijaciju i ekspresiju gena (sumirano u Breslin & O'Driscoll, 2013).

Nakon izolacije ćelija iz tkiva i prelaska u 2D kulturu, ćelije često gube svoju karakterističnu morfologiju, polaritet i asimetričan način deobe (sumirano u Kapałczyńska et al., 2018). U odsustvu trodimenzionalnog mikrookruženja i signala ćelijske niše, dolazi do poremećaja orijentacije deobnog vretena i gubitka apikalno-bazalne polarizacije, što rezultira pretežno simetričnom deobom i ujednačavanjem ćelijskog fenotipa, uz smanjenje funkcionalne heterogenosti što dovodi do ujednačavanja fenotipa i gubitka fiziološke heterogenosti (sumirano u Kapałczyńska et al., 2018). Promene u morfologiji odražavaju se na reorganizaciju citoskeleta, signalne puteve i sekretorne procese (sumirano u Kapałczyńska et al., 2018). Dodatno, ćelije u 2D kulturama imaju ujednačenu i neograničenu dostupnost nutrijenata, kiseonika i signalnih molekula, što ne odražava gradijente ovih supstanci prisutne u tkivima *in vivo* (sumirano u Kapałczyńska et al., 2018). Ovakvi uslovi dovode do promena u genskoj ekspresiji, metaboličkom profilu i ćelijskom odgovoru na spoljašnje faktore (sumirano u Kapałczyńska et al., 2018).
Ova ograničenja su naročito značajna u proučavanju neuralne diferencijacije, budući da razvoj i sazrevanje neurona i glijalnih ćelija zavise od složene trodimenzionalne organizacije, migracije, prostorne signalizacije i interakcija sa mikrosredinom (sumirano u Urzì et al., 2023)**.**

1.9.2. Trodimenzionalni (3D) model-sistemi kao fiziološki relevantniji model-sistem u proučavanju neuralne diferencijacije

Razvoj trodimenzionalnih (3D) ćelijskih model-sistema proistekao je iz potrebe da se prevaziđu ograničenja 2D model-sistema i obezbedi platforma koja bolje oponaša arhitekturu i funkcionalnu organizaciju tkiva *in vivo* (sumirano u Griffith & Swartz, 2006; Kapałczyńska et al., 2018; Lee et al., 2008). U 3D model-sistemima ćelije rastu u prostorno organizovanim strukturama, uspostavljajući brojne međućelijske kontakte i interakcije sa VĆM, čime se promovišu osnovni ćelijski procesi karakteristični za fiziološke uslove (sumirano u Griffith & Swartz, 2006; Kapałczyńska et al., 2018; Lee et al., 2008).
Jedna od ključnih razlika između 2D i 3D ćelijskih model-sistema jeste raspodela nutrijenata i kiseonika (sumirano u Fang & Eglen, 2017). Dok je u 2D model-sistemima njihova dostupnost uniformna, u 3D model-sistemima spontano se formiraju gradijenti, pri čemu ćelije u centralnim zonama imaju smanjenu dostupnost kiseonika i nutrijenata (sumirano u Fang & Eglen, 2017). Ovakva heterogenost dovodi do formiranja različitih proliferativnih i metaboličkih zona unutar 3D model-sistema. Ćelije u perifernim delovima 3D model-sistema pokazuju veću proliferativnu aktivnost, dok je u centralnim regionima, usled slabije dostupnosti kiseonika i hranljivih materija, proliferacija smanjena, a apoptoza izraženija, što može dovesti do nastanka nekrotičnih zona (sumirano u Edmondson et al., 2014).
Ćelije u 3D model-sistemima zadržavaju morfologiju i polaritet, a njihova genska ekspresija, aktivnost signalnih puteva i metabolički profili pokazuju veću sličnost sa ćelijama *in vivo* (sumirano u Kapałczyńska et al., 2018). U kontekstu neuralne diferencijacije, 3D model-sistemi omogućavaju realističnije proučavanje neurogeneze, organizaciju neuronskih mreža i interakciju neurona i glijalnih ćelija (Lancaster et al., 2013; Pamies et al., 2014; Quadrato et al., 2017). Takođe, zabeležene su promene u epigenetičkoj organizaciji, uključujući formiranje heterohromatina i ekspresiju proteina poput heterohromatinskog proteina 1 alfa (HP1α), što može doprineti izmenjenom odgovoru na stres i oštećenja DNK (Storch et al., 2010).
Sa razvojem savremenih eksperimentalnih pristupa, poseban značaj dobijaju visokopropusni (engl. high-throughput) eseji zasnovani na 3D model-sistemima, koji omogućavaju paralelnu analizu većeg broja parametara uz očuvanje fiziološke relevantnosti model-sistema (sumirano u Fang & Eglen, 2017; Tung et al., 2011). Ovakvi sistemi su naročito pogodni za proučavanje efekata bioaktivnih jedinjenja i nalaze veliku primenu u ispitivanjima novih lekova (Tung et al., 2011). U 3D model-sistemima ćelije spontano agregiraju i formiraju ćelijske klastere – sfere (Dingle et al., 2015). Međutim, jedan od ključnih izazova u primeni 3D sfernih kultura jeste varijabilnost u veličini sfera, što direktno utiče na difuziju kiseonika, nutrijenata i testiranih supstanci, a time i na reproducibilnost i pouzdanost dobijenih rezultata (sumirano

u Hirschhaeuser et al., 2010). U cilju prevazilaženja ovog problema, razvijeni su sistemi zasnovani na formiranju sfera u kontrolisanim mikrookruženjima, kao što su mikrobunarići definisane geometrije, koji omogućavaju dobijanje sfera uniformne veličine (Kelm et al., 2003; Patra et al., 2016; Ungrin et al., 2008). Ovakav pristup doprinosi smanjenju eksperimentalne varijabilnosti i omogućava precizniju kvantifikaciju efekata ispitivanih jedinjenja, što je od posebnog značaja u visokopropusnim esejima neurotoksičnosti (Dingle et al., 2015). 3D model-sistemi humanih ćelija se stoga smatraju prelaznim model-sistemima između 2D model-sistema i animalnih model-sistema (sumirano u Kapałczyńska et al., 2018). Iako ne omogućavaju uvid u sistemske odgovore organizma kao celine, 3D model-sistemi humanih ćelija smanjuju upotrebu animalnih model-sistema i omogućavaju precizniju translaciju rezultata u kliničkim ispitivanjima (sumirano u Kapałczyńska et al., 2018; Yamada & Cukierman, 2007).

1.9.3. Tipovi 3D ćelijskih model-sistema

3D ćelijski model-sistem sistemi mogu se podeliti na model-sisteme u kojima se ćelije gaje u uslovima koji favorizuju 3D organizaciju ćelija bez prisustva nosača (engl. scaffold-free) i model-sisteme koji podrazumevaju upotrebu prirodnih ili veštačkih nosača koji daju potporu ćelijama u 3D model-sistemima (engl. scaffold-based), (sumirano u Urzì et al., 2023).

1.9.3.1. Sistemi bez nosača

Ovi sistemi se zasnivaju na sposobnosti ćelija da spontano agregiraju u uslovima smanjene adhezije za podlogu i uključuju različite metodološke pristupe koji promovišu formiranje ćelijskih agregata (Foty, 2011). Ovi pristupi obuhvataju grupisanje ćelija centrifugiranjem, kontinuirano mešanje ćelija u posudama za kultivaciju, gajenje ćelija u posudama sa neadherentnim podlogama, gajenje ćelija u visećim kapima (engl. hanging drop metoda) gde površinski napon i sila gravitacije sprečavaju adheziju ćelija, metodu magnetne levitacije i druge (Buentello et al., 2022; Urzì et al., 2023).
Metoda spontane agregacije ćelija formiranjem ćelijskog taloga centrifugiranjem, i gajenjem ćelija u posudama sa neadherentnim dnom radi formiranja sferoida (sumirano u Achilli et al., 2012), primenjuje se u kulturama kostne srži, endotelnih ćelija i zubne pulpe (Inglis et al., 2019; Zhang et al., 2018).
Gajenje ćelija u suspenziji na podlogama obloženim hidrofilnim ili negativno naelektrisanim polimerima, poput agara ili agaroze (Urzì et al., 2023), promoviše formiranje agregata a rezultujuće sfere, prečnika 50–150 μm, primenjuju se u formiranju neuralnih organoida, fibroblastnih i karcinomskih sferoida (Buentello et al., 2022; Kubouchi & Mukai, 2021; Sirenko et al., 2015).
Jedna od glavnih prednosti metode visećih kapi (Foty, 2011; Ohnuki & Kurosawa, 2013) je mogućnost precizne kontrole početnog broja ćelija, čime se može regulisati veličina i uniformnost formiranih sferoida. Zbog svoje jednostavnosti i reproducibilnosti, ova metoda se često koristi u istraživanjima diferencijacije matičnih ćelija i formiranja tumorskih sferoida (Foty, 2011, Ohnuki & Kurosawa, 2013).
Metoda magnetne levitacije, u kojoj ćelije obložene magnetnim nanočesticama primenom magnetnog polja bivaju podignute sa dna posude za kultivaciju i grupisane u 3D model-sisteme, jedna je od najbržih metoda za formiranje 3D sferoida uniformne veličine i strukture (Urzì et al., 2023; Gaitán-Salvatella et al., 2021; Kim et al., 2013; Mary et al., 2022; Miyamoto et al., 2013; Palzer et al., 2021).

1.9.3.2. Sistemi sa nosačima

Ubrzan razvoj novih biomaterijala, zbog rastućih potreba na polju regenerativne medicine, doveo je do razvoja brojnih 3D model-sistema humanih ćelija zasnovanih na različitim prirodnim i sintetičkim nosačima koji omogućavaju formiranje struktura nalik tkivu (sumirano u Geevarghese et al., 2022; Urzì et al., 2023). Tkivno inženjerstvo podrazumeva upotrebu biomaterijala kao nosača ćelija koji imitiraju pripodni vanćelijski matriks. Glavne karakteristike biomaterijala su: biokompatibilnost, biodegradabilnost, bioaktivnost, elastičnost, čvrstoća, poroznost, topografija, bubrenje, kvašenje (sumirano u Lee et al., 2008). Tako se kao nosači u 3D model-sistemima koriste materijali koji se

međusobno veoma razlikuju – polimeri, metali, keramika, kompoziti i slični materijali (sumirano u Nikolova & Chavali, 2019). Nosači mogu biti prirodni i veštački materijali (sumirano u O'Brien, 2011). Najčešće korišćeni prirodni biomaterijali su polimeri kao što su kolagen, želatin, hijaluronska kiselina, agaroza, laminin, alginat i fibrin (Augst et al., 2006; Brigo et al., 2017; Geevarghese et al., 2022; Li & Kumacheva, 2018; Pradhan et al., 2017). Prirodni biomaterijali kao nosači ćelija su veoma često u formi hidrogelova i koriste se za imitiranje vanćelijskog matriksa mekih tkiva. Međutim, zbog slabih mehaničkih karakteristika često ne pružaju dovoljnu mehaničku potporu za održavanje željene 3D strukture (Brigo et al., 2017; Geevarghese et al., 2022). Stoga se zbog boljih mehaničkih karakteristika koriste sintetski polimeri poput poliestara, polietilen glikola (PEG), poliakrilamida, polilaktonske kiseline (PLA), u formi hidrogelova. Međutim, sintetski polimeri su uglavnom hidrofobni, pa ćelije pokazuju slab afinitet za njihovo vezivanje (sumirano u Place et al., 2009). Da bi se prevazišao ovaj problem sintetski polimeri se često funkcionalizuju ili se mešaju sa prirodnim polimerima. Najčešće korišćeni nepolimerni biomaterijali su biokeramika, i bioaktivno staklo, kao i metali npr. titanijum (Ti) i tantal (Ta), (Fernandes et al., 2018; Kaur et al., 2014; Kokubo et al., 2003; Oliver et al., 2019; Qu et al., 2019; Rubio et al., 2014). Nosači na bazi biokeramike i bioaktivnog stakla su rigidnije strukture od polimernih nosača, pa se česće koriste kao nosači ćelija za koštano tkivo (sumirano u Hutmacher, 2000).

1.9.3.2.1. Alginat kao 3D nosač za ćelijsku kulturu

Razvoj 3D model-sistema ćelijske kulture značajno je unapredio mogućnost imitiranja *in vivo* mikrookruženja u kontrolisanim laboratorijskim uslovima (sumirano u Edmondson et al., 2014). U tom kontekstu, alginat se izdvojio kao jedan od najčešće korišćenih prirodnih polimera za nosače ćelija u formi hidrogela jer je pogodan za imobilizaciju i propagaciju različitih tipova sisarskih ćelija (sumirano u Lee & Mooney, 2012). Alginat je linearni anjonski polisaharid izolovan iz smeđih algi, sastavljen od β-D-manuronske (M) i α-L-guluronske kiselina (G) kiseline, međusobno povezanih glikozidnom vezom čiji raspored i odnos određuju fizičko-hemijske osobine gela (sumirano u Lee & Mooney, 2012). Sposobnost vodenog rastvora Na-alginata da jonski interaguje sa dvovalentnim katjonima, najčešće kalcijuma (Ca^{2+}), omogućava brzo i blago formiranje hidrogelne mreže u uslovima kompatibilnim sa živim ćelijama, bez upotrebe toksičnih rastvarača ili visokih temperatura (sumirano u Lee & Mooney, 2012).

Jedna od ključnih prednosti alginatnih hidrogelova u 3D ćelijskoj kulturi jeste njihova biokompatibilnost i relativna bioinertnost, kao i odsustvo toksičnosti, što omogućava održavanje ćelijske vijabilnosti tokom dužeg vremenskog perioda (sumirano u Lee & Mooney, 2012; Melvik & Dornish, 2004). Alginatni hidrogelovi kao nosači ćelija obezbeđuju stabilnu trodimenzionalnu strukturu koja omogućava difuziju kiseonika, nutrijenata i metaboličkih produkata kroz sistem, čime se sprečava akumulacija toksičnih supstanci i obezbeđuju uslovi za dugoročno preživljavanje ćelija (sumirano u Kavand et al., 2024). Ova difuziona svojstva posebno su značajna u sistemima gde se ispituju proliferacija, diferencijacija ili odgovor na farmakološke agense (sumirano u Kavand et al., 2024).

Mehaničke osobine alginatnih hidrogelova mogu se fino podešavati variranjem koncentracije rastvora Na-alginata, odnosa M i G blokova, koncentracije jona za geliranje, kao i promenom gelirajućeg jona (afinitet alginata prema gelirajućim jonima opada sledećim redosledom: $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} = Ni^{2+} = Zn^{2+} > Mn^{2+}$), (sumirano u Smidsrød & Skja˚k-Br˙k, 1990), što omogućava kontrolu krutosti i poroznosti materijala (Enobakhare et al., 2006). Pokazano je da krutost materijala može direktno uticati na fiziološke procese u ćeliji, uključujući proliferaciju, migraciju i diferencijaciju, što alginat čini pogodnim sistemom za proučavanje mehaničkih i bioloških aspekata regulacije ćelijskih procesa (Caliari & Burdick, 2016; Enobakhare et al., 2006). Pored toga, alginat se može hemijski modifikovati (npr. vezivanjem RGD (Arg–Gly–Asp) peptidnih sekvenci koji omogućavaju vezivanje ćelija za alginat preko integrinskih receptora) kako bi se poboljšala ćelijska adhezija i omogućila preciznija kontrola interakcija ćelija sa alginatom (sumirano u Lee & Mooney, 2012). Takođe,

kombinovanjem alginata sa drugim prirodnim polimerima (želatin, kolagen, hijaluronska kiselina) mogu se prevazići ograničenja alginata i značajno unaprediti karakteristike materijala (Lee & Mooney, 2012; Serafin et al., 2023).
Za modelovanje neuralnog tkiva najčešće su korišćeni alginatni hidrogelovi u koncentracijama od 1.5–3%, koji obezbeđuju mehaničke osobine slične mekim tkivima, poput mozga (Liu et al., 2023). U ovom opsegu koncentracija moguće je postići odgovarajuću krutost i poroznost materijala, što omogućava održavanje vijabilnosti, proliferacije i diferencijacije neuralnih ćelija u 3D uslovima (Liu et al., 2023).
U poređenju sa tradicionalnim 2D model-sistemima gajenja ćelija u monosloju, 3D model-sistemi zasnovani na alginatu bolje reprodukuju prostornu organizaciju ćelija, interakcije između ćelija i gradijente rastvorenih faktora karakteristične za *in vivo* sisteme – tkiva (sumirano u Kavand et al., 2024). Pokazano je da prirodni hidrogelovi, uključujući alginatne hidrogelove, omogućavaju relevantnije modelovanje mikrookruženja, čime se povećava prediktivna vrednost *in vitro* eksperimenata, naročito u oblastima kao što su regenerativna medicina, onkologija i neurobiologija (sumirano u Kavand et al., 2024; Caliari & Burdick, 2016).
Zahvaljujući kombinaciji biokompatibilnosti, jednostavnom geliranju u blagim uslovima, kontrolisanim mehaničkim osobinama i mogućnošću imobilizacije različitih ćelija u mikrokapsulama ili mikrovlaknima, alginatni hidrogelovi predstavljaju pouzdan i reproducibilan nosač za 3D ćelijsku kulturu (sumirano u Lee & Mooney, 2012). Ove karakteristike ga čine posebno pogodnim za modelovanje kompleksnih bioloških procesa, poput neuralne diferencijacije, i ispitivanje produženog ili odloženog dejstva različitih agenasa u eksperimentima procene citotoksičnosti (sumirano u Lee & Mooney, 2012). Ovo je veoma važan aspekt upotrebe 3D model-sistema, jer je u 2D model-sistemima najčešće nije moguće modelovati dugotrajne eksperimente izlaganja koji su neophodni za sveobuhvatnu procenu odgovora ćelije na različite stimuluse (sumirano u Antoni et al., 2015; Breslin & O'Driscoll, 2013).

1.9.4. Značaj 3D model-sistema u savremenim istraživanjima

Iako 3D model-sistemi imaju određene nedostatke, uključujući tehničku zahtevnost, izazove u primeni analitičkih metoda u ovom sistemu (npr. difuzija agenasa kroz 3D strukturu) i varijabilnost, njihova primena je u porastu zahvaljujući naporima za standardizaciju metoda za 3D model-sisteme i sve većoj automatizaciji njihove primene u eksperimentima testiranja novih lekova (Antoni et al., 2015; Breslin & O'Driscoll, 2013; Jensen & Teng, 2020; Langhans, 2018; Park et al., 2024).
U kontekstu proučavanja neuralne diferencijacije i neurotoksičnosti, 3D model-sistemi predstavljaju značajno unapređenje u odnosu na 2D kulture, jer omogućavaju modelovanje fiziološki relevantnih međućelijskih interakcija, mikrosredine i gradijenata faktora rasta (sumirano u Jorfi et al., 2018). Iako univerzalni „idealni" 3D model-sistem ne postoji, pravilno odabran sistem može značajno uticati na validnost i translacioni potencijal dobijenih rezultata (sumirano u Hopkins et al., 2015; Jorfi et al., 2018).

1.10. Razvoj CNS-a i uloga neuralnih matičnih ćelija

Razvoj CNS-a predstavlja strogo regulisan, višestepeni proces tokom koga iz neuralnih matičnih ćelija nastaju različite populacije neuronalnih i glijalnih ćelija mozga (sumirano u Akula et al., 2023; Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009; Taverna et al., 2014; Zhao & Moore, 2018). Tokom rane embriogeneze, neuroepitelijalne ćelije nervne cevi predstavljaju početnu grupu neuralnih matičnih i progenitorskih ćelija. U početnim fazama ove ćelije se dele pretežno simetrično, čime povećavaju grupu progenitorskih ćelija a zatim se diferenciraju u ćelije radijalne glije. Sa početkom neurogeneze, ćelije radijalne glije počinju da se dele asimetrično, pri čemu zadržavaju sposobnost samoobnavljanja i istovremeno stvaraju neurone direktno ili indirektno, preko intermedijarnih progenitora (sumirano u Akula et al., 2023). Pored intermedijarnih progenitora, apikalne ćelije radijalne glije stvaraju i bazalne radijalne glijalne ćelije, koje predstavljaju važnu grupu progenitorskih ćelija u neokorteksu čoveka. Proliferacija intermedijarnih

progenitora i bazalnih radijalnih glijalnih ćelija omogućava povećanje broja novonastalih neurona uz očuvanje grupe progenitorskih ćelija i doprinosi ekspanziji neokorteksa čoveka (sumirano u Akula et al., 2023; Florio & Huttner, 2014). Pored progenitorske uloge, ćelije radijalne glije imaju važnu ulogu u prostornoj organizaciji CNS-a u razviću. Njihovi nastavci formiraju migracionu potporu duž koje novonastali neuroni dospevaju do odgovarajućih položaja u kortikalnoj ploči. Koordinacija proliferacije progenitora, produkcije neurona i njihove migracije omogućava uspostavljanje pravilne slojevite organizacije moždane kore (sumirano u Akula et al., 2023; Nowakowski et al., 2016).
Funkcije neuralnih matičnih ćelija regulisane su aktivacijom specifičnih signalnih puteva i interakcijama sa komponentama mikrosredine (sumirano u Bond et al., 2015). Nakon završetka glavne faze neurogeneze, deo ćelija radijalne glije prolazi kroz promenu razvojnog usmerenja ka astrogenezi i diferencira se u astrocite (Holst et al., 2019).
Ovi mehanizmi obezbeđuju ravnotežu između proliferacije i diferencijacije, čime se održava adekvatna veličina i sastav ćelija u mozgu (sumirano u Bond et al., 2015). Narušavanje ovih regulatornih sistema može dovesti do poremećaja neurogeneze i povećane predispozicije ka neurološkim oboljenjima (sumirano Bond et al., 2002).
Određivanje ćelijske sudbine i diferencijacija do zrelih ćelijskih tipova precizno je prostorno i vremenski regulisana tokom razvića (sumirano u Miller & Gauthier, 2007). Neurogeneza se odvija u ranim fazama razvića, kada se formiraju inicijalne neuronalne mreže (Miller & Gauthier, 2007). Kako razviće napreduje, dolazi do prelaza ka gliogenezi, pri čemu se progenitorske ćelije diferenciraju do stadijuma zrelih astrocita i oligodendrocita (sumirano u Miller & Gauthier, 2007). Ova vremenska tranzicija predstavlja fundamentalnu karakteristiku sazrevanja CNS-a i rezultat je koordinisanog delovanja intrinzičnih transkripcionih programa i signalnih faktora spoljašnje sredine (sumirano u Urbán & Guillemot, 2014).

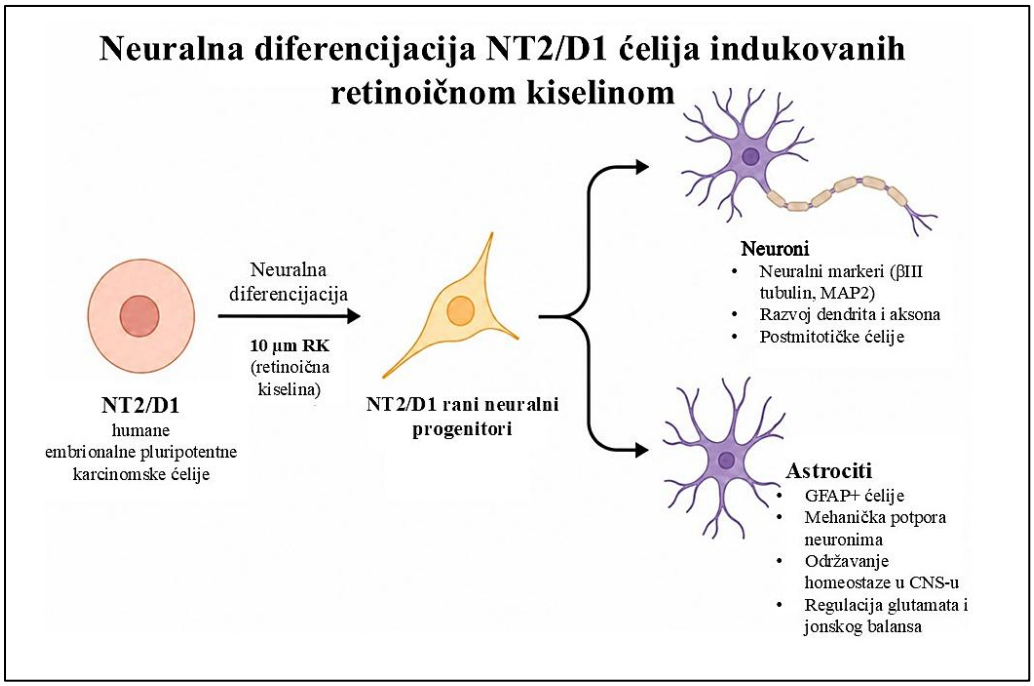
1.11. *In vitro* model-sistemi neurogeneze

Zbog ograničene dostupnosti embrionalnog moždanog tkiva i etičkih ograničenja *in vivo* studija, sistemi *in vitro* ćelijske kulture postali su ključni za proučavanje ćelijskih i molekularnih mehanizama neurogeneze (sumirano u Kelava & Lancaster, 2016; Vassal et al., 2026). Ovi model-sistemi reprodukuju progresiju humanih ćelija opredeljenih za neuralnu diferencijaciju od pluripotentnih ćelija ka neuralnim progenitorima, a zatim ka diferenciranim neuronima i glijalnim ćelijama (sumirano u Kelava & Lancaster, 2016; Vassal et al., 2026).
Primarne kulture neuralnih ćelija zadržavaju mnoga fiziološka svojstva nativnog tkiva, ali su ograničene dostupnošću, genetičkom varijabilnošću i kratkim životnim vekom. Nasuprot tome, sistemi zasnovani na pluripotentnim matičnim ćelijama, uključujući embrionalne matične ćelije i indukovane pluripotentne matične ćelije (engl. Induced pluripotent stem cells iPSCs), omogućavaju dugotrajnu ekspanziju, kontrolisanu diferencijaciju u specifične neuralne linije i personalizovan pristup u istraživanjuma (Chambers et al., 2009; Shi et al., 2012). Iako superiorni, ovi model-sistemi nose brojne izazove – etička ograničenja, tehnički veoma zahtevnu metodologiju, dugotrajnu ekspanziju i velike troškove istraživanja što ih čini nedostupnim za mnoge istraživačke grupe (Lo & Parham, 2009).
Imortalizovane ćelijske linije predstavljaju *in vitro* model-sisteme koji, iako inferiorni u odnosu na fiziološki relevantnije kulture primarnih ćelija, embrionalnih matičnih ćelija i indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija, obezbeđuju robusne, visoko reproducibilne, tehnički i finansijski dostupnije sisteme koji nalaze široku primenu u molekularno biološkim i farmakološkim istraživanjima (sumirano u Chalak et al., 2024; Voloshin et al., 2023).
Tradicionalno, 2D kulture imortalizovanih ćelija su bile dominantno zastupljene u neurobiološkim istraživanjima zbog jednostavnosti manipulacije, standardizovanih metoda analize, brzini i malim troškovima. Međutim, odsustvo trodimenzionalne arhitekture i kompleksnih međućelijskih interakcija ograničavaju njihovu fiziološku relevantnost (sumirano u Kapałczyńska et al., 2018).

Razvoj 3D model-sistema, uključujući sfere, 3D model-sisteme bazirane na nosačima i organoide, omogućio je bolju rekapitulaciju prostorne organizacije i difuzionih gradijenata prisutnih *in vivo* (sumirano u Edmondson et al., 2014; Lancaster & Knoblich, 2014). Ovi sistemi pokazuju izmenjene obrasce genske ekspresije i diferencijacije u poređenju sa 2D kulturama, što ih čini posebno značajnim za modelovanje neurogeneze i ispitivanje neurotoksičnosti (sumirano u Edmondson et al., 2014; Hogberg & Smirnova, 2022; Lancaster & Knoblich, 2014).

1.11.1. NT2/D1 ćelije kao *in vitro* model-sistem neurogeneze čoveka

Humana NT2/D1 ćelijska linija predstavlja dobro okarakterisan model-sistem pluripotentnih embrionalnih karcinomskih ćelija, koje po brojnim karakteristikama odgovaraju embrionalnim matičnim ćelijama čoveka (Andrews, 1984, 2002; Coyle et al., 2011). NT2/D1 ćelije potiču od humane embrionalne teratokarcinomske ćelijske linije NTERA-2, izolovane iz metastatskog tumora pluća poreklom od testikularnog karcinoma (Andrews, 1984). Klon NT2/D1 predstavlja dobro okarakterisan i često korišćen model-sistem humane neurogeneze *in vitro* jer indukcijom retinoinskom kiselinom ove ćelije ulaze u ireverzibilan proces neuralne diferencijacije koji se završava na stadijumu zrelih neurona i astrocita (Andrews, 1984; Lee & Andrews, 1986; Pleasure et al., 1992; Hill et al., 2012), (Slika 5). Nediferencirane NT2/D1 ćelije eksprimiraju ključne faktore pluripotentnosti OCT4 (engl. Octamer-binding transcription factor 4), NANOG (engl. Nanog homeobox) i SOX2 (engl. SRY-box transcription factor 2), koji održavaju njihov kapacitet za samoobnavljanje i pluripotentnost (Boyer et al., 2005; Topalovic & Schwirtlich, 2017). Nakon 48 č. indukcije RK-om, NT2/D1 ćelije postaju opredeljene za neuralnu diferencijaciju – dolazi do progresivnog smanjenja ekspresije markera pluripiotentnosti OCT4, SOX2 i NANOG, uz istovremeno povećanje ekspresije markera rane faze neuralne diferencijacije – SOX3 (engl. SRY-box transcription factor 3) i PAX6 (engl. Paired box 6), koji označavaju prelaz ka neuroektodermalnoj liniji (Topalovic & Krstic et al., 2017; Topalovic & Schwirtlich et al., 2017; Stevanovic, 2003; Zhang et al., 2010).



Slika 5. Šematski prikaz neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija. NT2/D1 humane pluripotentne ćelije, nakon tretmana RK-om (10 µM RK), prolaze kroz fazu NT2/D1 ranih neuralnih progenitora i diferenciraju se u neurone (NT2-N) i astrocite (NT2-A). Ilustracija kreirana pomoću platforme BioRender.com i dodatno modifikovana.

Početak neuralne diferencijacije takođe je praćen promenama u epigenomu (Topalovic, Krstic, et al., 2017; Topalovic, Schwirtlich, et al., 2017). Tako, mikroRNK-219 (miR-219) predstavlja marker rane faze neuralne diferencijacije jer je uključena u regulaciju progresije duž neuralne linije i modulaciju glijalne diferencijacije, predstavljajući važan post-transkripcioni regulator neurogeneze (Stanisavljevic et al., 2019).

Retinoinska kiselina, morfogen neophodan za neurogenezu tokom embrionalnog razvića, indukuje neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelija aktivacijom ciljnih gena signalnog puta retinoinske kiseline (Koshy & Mendoza-Parra, 2023; Mojsin et al., 2006). Neuralna diferencijacija je praćena brojnim morfološkim i funkcionalnim promenama na ćelijskom nivou. Morfološke promene, u koje spadaju promene oblika i veličine ćelija i produženje neurita, nastaju kao posledica promene ekspresije citoskeletnih proteina poput βIII-tubulina (engl. Tubulin Beta 3 Class 3), (González-Burguera et al., 2016). Istovremeno indukcija RK-om dovodi do izlaska iz ćelijskog ciklusa, ulaska u G_0 fazu, što je praćeno smanjenjem ekspresije markera proliferacije PCNA (engl. Proliferating Cell Nuclear Antigen) i Ki-67 (engl. Marker of proliferation Ki-67), (Pejić et al., 2026), kao i regulatora G1 faze – Ciklina D1 (Pejić et al., 2026; Sherr, 1995). Ove promene označavaju prelaz iz proliferativnog pluripotentnog stanja ka post-mitotičkom neuralnom fenotipu (Pleasure et al., 1992).

Neuroni nastali neuralnom diferencijacijom NT2/D1 ćelija pokazuju regionalno specifičan obrazac genske ekspresije koji odražava molekularne karakteristike neurona prednjeg mozga, zadnjeg mozga i kičmene moždine, čime NT2/D1 model-sistem delimično rekapitulira rane obrasce neurogeneze čoveka (Coyle et al., 2011).

1.11.2. NT2/D1 ćelije u 2D i 3D model-sistemima

NT2/D1 ćelije predstavljaju pogodnu ćelijsku liniju za proučavanje humane neurogeneze u 2D i 3D uslovima gajenja ćelija (Hill et al., 2008; Kapałczyńska et al., 2016; Pejić et al., 2025, 2026, Rosca et al., 2020; Stern et al., 2014). Jedna od ključnih prednosti ovog model-sistema je sposobnost diferencijacije NT2/D1 ćelija u funkcionalne neurone i astrocite i formiranje mešovite kulture koja podražava situaciju *in vivo* (Hill et al., 2012; Lee & Andrews, 1986; Pleasure et al., 1992; Sandhu et al., 2002). NT2-N eksprimiraju MAP2 (engl. Microtubule-associated protein 2) i βIII-tubulin (Coyle et al., 2011), dok NT2-A astrociti eksprimiraju GFAP (engl. Glial fibrillary acidic protein), (Coyle et al., 2011) i uspostavljaju funkcionalne interakcije sa neuronima, uključujući metaboličku podršku neuronima u mešovitoj kulturi neurona i astrocita (Hartley et al., 1999). Zbog navedenih karakteristika neurogeneza NT2/D1 ćelija indukovana retinoinskom kiselinom predstavlja pouzdanu i reproducibilnu platformu za proučavanje molekularnih mehanizama neurogeneze čoveka, regulacije ćelijskog ciklusa i interakcija između neurona i glije u 2D i 3D model-sistemima, sa značajnom primenom u modelovanju neurorazvojnih procesa i ispitivanju neurotoksičnosti (Kedracka-Krok et al., 2025; Stern et al., 2014, Pejić et al., 2025, 2026).

1.11.3. NT2/D1 ćelije kao *in vitro* model-sistem za testiranje neurotoksičnosti

Brojne studije su pokazale da NT2/D1 ćelijska linija predstavlja pouzdan, brz, robustan, tehnički i finansijski široko dostupan *in vitro* model-sistem sistem za testiranje neurotoksičnost (Hill et al., 2008; Stern et al., 2014, 2024). Ova ćelijska linija humanog embrionalnog karcinoma, zadržava karakteristike pluripotentnih ćelija tokom propagacije a nakon indukcije retinoinskom kiselinom ulazi u ireverzibilan proces neuralne diferencijacije koji se završava na stadijumu mešovite culture NT2-neurona i astrocita (Andrews, 1984; Pleasure et al., 1992; Hill et al., 2012; Sandhu et al, 2002). Zbog ove sposobnosti, NT2/D1 ćelijska linija predstavlja dobar *in vitro* model-sistem za praćenje različitih faza neurogeneze u kontrolisanim uslovima.

U standardnim dvodimenzionalnim (2D) uslovima kulture, ćelije rastu u monosloju pričvršćene za podlogu, što olakšava ispitivanje neurotoksičnosti (Pejić et al., 2025, 2026; Rosca et al., 2020). Ovakav

pristup je korišćen u studijama koje ispituju efekte potencijalno neurotoksičnih agenasa na ćelijsku vijabilnost, proliferaciju i ekspresiju markera neuralne diferencijacije (Pejić et al., 2026; Rosca et al., 2020; Stern et al., 2014). U radu Taylor i saradnika (Taylor et al., 2019) prikazan je test zasnovan na indukovanoj diferencijaciji NT2 ćelija RK-om, gde se promena ekspresije neuralnog markera, βIII-tubulina, koristi se kao indikator toksičnog efekta ispitivanih jedinjenja.
U radu Stern i saradnika (Stern et al., 2014) korišćene su neurosfere koje odgovaraju ranim fazama neuralne diferencijacije (stadijum neuralnih progenitora), što je omogućilo detekciju promena, u ekspresiji neuralnih markera i migraciji. Analizom migracije neuralnih prekursora, neuronalne diferencijacije i ekspresije neuronalnog markera βIII-tubulina, autori su pokazali da NT2/D1 ćelije mogu predstavljati koristan *in vitro* model-sistem za procenu razvojne neurotoksičnosti i efekata supstanci na rane faze razvoja nervnog sistema (Stern et al., 2014). Posebno je istaknuta prednost korišćenja ćelijskog model-sistema poreklom od čoveka, čime se smanjuju razlike između vrsta karakteristične za animalne model-sisteme i povećava translacioni značaj dobijenih rezultata (Marshall et al., 2023; Stern et al., 2014).
Hill i saradnici su pokazali da diferencirane NT2/D1 ćelije organizovane u neurosfere mogu da se koriste kao trodimenzionalni (3D) model-sistem za ispitivanje razvojne neurotoksičnosti (Hill et al., 2008). U ovoj studiji, neurotoksična jedinjenja ispitivana su u diferencirajućim NT2/D1 neurosferama koje su sadržale ćelije na različitim stadijumima neuralne diferencijacije, uključujući proliferišuće progenitore i zrele neurone (Hill et al., 2008). U ovoj studiji neurosfere su izlagane poznatim neurotoksičnim agensima, uključujući valproičnu kiselinu**,** litijum, hidroksiureu i akrilamid koja su ranije identifikovana kao supstance sa potencijalnim razvojnim neurotoksičnim efektima (Hill et al., 2008). Rezultati su pokazali da različita jedinjenja različito utiču na ćelije u neurosferama, pri čemu je valproična kiselina ispoljila najizraženiji efekat na neurogenezu, praćen smanjenjem preživljavanja ćelija i ekspresije neuronalnih markera, uključujući βIII-tubulin. Hidroksiurea i akrilamid su prvenstveno uticali na preživljavanje ćelija, bez značajnih promena u ekspresiji neuronalnih proteinskih markera, dok je litijum pokazao minimalan uticaj na preživljavanje i neuronalnu diferencijaciju. Ovakav obrazac odgovora ukazuje na potencijal NT2/D1 model-sistema neurosfera za procenu razvojne neurotoksičnosti različitih hemijskih agenasa *in vitro* (Hill et al., 2008).
Unapređenje koncepta 3D model-sistema predstavili su Terrasso i saradnici, razvijanjem sistema zasnovanog na diferenciranim humanim neurosferama uz kombinaciju molekularnih i funkcionalnih parametara (Terrasso et al., 2015). Integracijom analize genske ekspresije sa funkcionalnim promenama, ovaj model-sistem omogućava sveobuhvatniju procenu efekata testiranih jedinjenja na proces neurogeneze, a koji pritom omogućavaju paralelnu analizu većeg broja jedinjenja na većem broju sfera, uz očuvanje složenosti i fiziološke relevantnosti 3D model-sistema (Terrasso et al., 2015).
Dalje unapređenje 3D model-sistema baziranih na sferama predstavljeno je u radu Kitano i sar., gde je razvijen pristup formiranja sfera u ograničenom prostoru (čip sa cirkularnih 195 bunarića) (Kitano & Nakazawa, 2021). Ovakav sistem omogućava kontrolu veličine formiranih sferoida, čime se prevazilazi jedan od ključnih nedostataka klasičnih 3D sfernih kultura, a to je varijabilnost u dimenzijama i posledični nastanak gradijenata kiseonika, nutrijenata i testiranih supstanci unutar sfere (Kitano & Nakazawa, 2021). Ograničavanjem prostora za rast ćelija postiže se formiranje uniformnih sfera definisanog prečnika, što doprinosi većoj reproducibilnosti eksperimentalnih rezultata i preciznijoj interpretaciji efekata ispitivanih jedinjenja. Na taj način, ovaj pristup predstavlja sledeći nivo unapređenja u razvoju fiziološki relevantnih *in vitro* model-sistema za testiranje neurotoksičnosti (Kitano & Nakazawa, 2021).
U radu Cacciotti i saradnici, opisan je 3D model-sistem zasnovan na alginatnim mikrokuglicama, koji predstavlja značajno unapređenje NT2/D1 model-sistem sistema u odnosu na konvencionalne 2D kulture (Cacciotti et al., 2017). U ovom istraživanju pokazano je da imobilizacija NT2/D1 ćelija u alginatune mikrokuglice stvara pogodno mikrookruženje koje podržava njihovu spontanu neuralnu diferencijaciju

u odsustvu RK (Cacciotti et al., 2017). Iako je efikasnost diferencijacije bila niža u poređenju sa neuralnom diferencijacijom indukovanom RK, diferencirane ćelije su imale karakteristike neurona, uključujući i sposobnost produkcije dopamina (Cacciotti et al., 2017).

Rezultati predstavljenih studija potvrđuju da NT2/D1 ćelije, naročito u trodimenzionalnoj sredini, predstavljaju robustan i translaciono značajan model-sistem za ispitivanje razvojne neurotoksičnosti (Hill et al., 2008; Stern et al., 2014, 2024; Woehrling et al., 2007). Mogućnost indukcije neurogeneze RK-om, senzitivnost na neurotoksične agense i široka paleta morfoloških, biohemijskih, genetičkih i funkcionalnih analiza čine ih pogodnom platformom za inicijalnu analizu neurotoksičnosti (Pleasure et al., 1992; Stern et al., 2014; Terrasso et al., 2015). Iako svaki *in vitro* sistem ima svoje prednosti i nedostatke i ne može u potpunosti reprodukovati složenost procesa razvića CNS-a *in vivo*, NT2/D1 model-sistemi pružaju važan korak ka razvoju standardizovanih, relevantnih pristupa u proceni bezbednosti različitih supstanci za zdravlje čoveka.

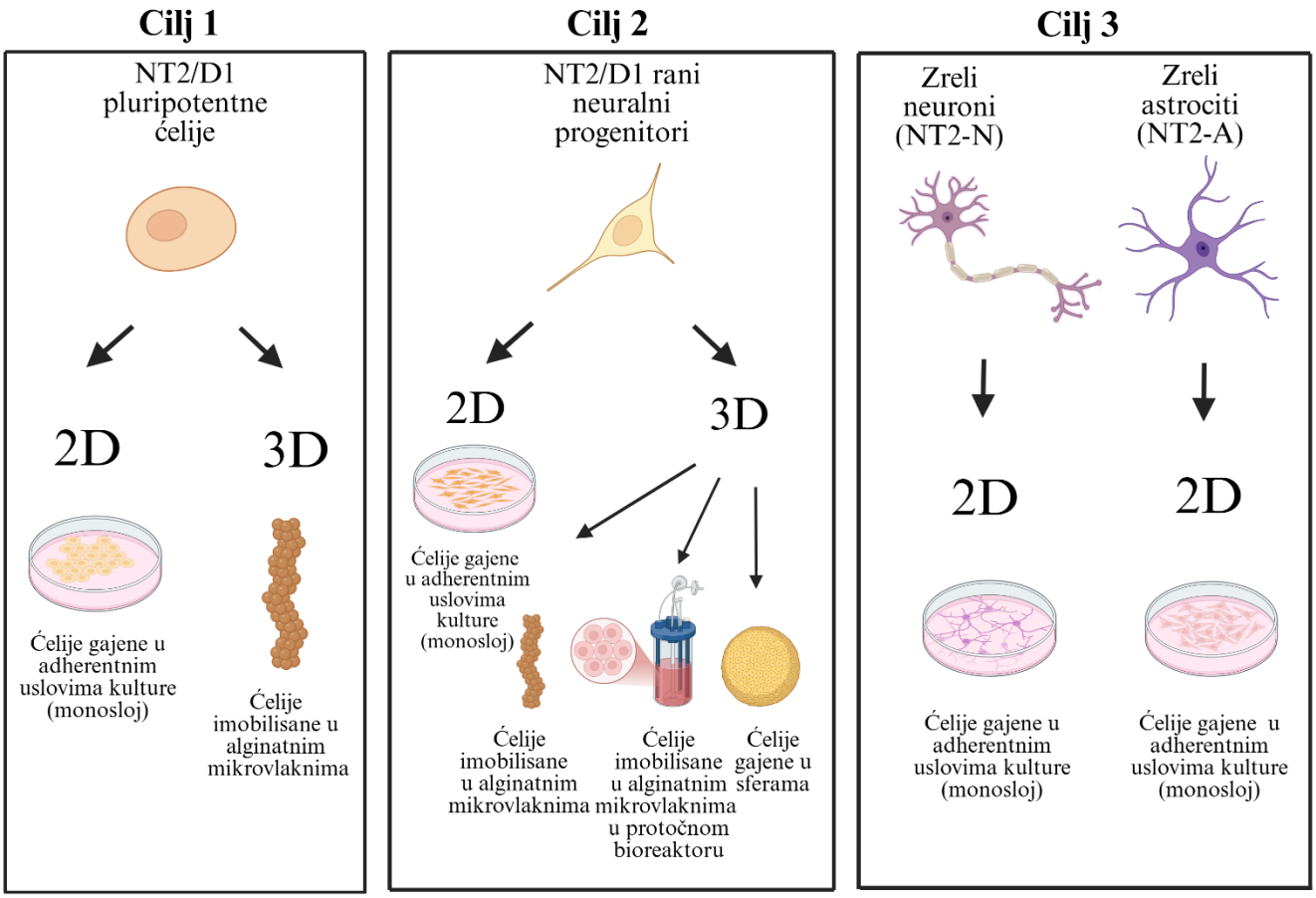
2. Ciljevi istraživanja

U cilju ispitivanja i analize potencijalnog uticaja kofeina, taurina i etanola, kao komponenti energetskih i alkoholnih pića, na diferencijaciju, morfološke i funkcijske karakteristike neurona i astrocita u model-sistemu humane neurogeneze *in vitro*, u okviru ove doktorske teze je definisano nekoliko ciljeva (Slika 6):

Cilj 1: Ispitivanje uticaja komponenti energetskih i alkoholnih pića, kofeina, taurina i etanola na NT2/D1 pluripotentne ćelije gajene u 2D i 3D model-sistemima humane neurogeneze *in vitro.*

Cilj 2: Ispitivanje uticaja komponenti energetskih i alkoholnih pića, kofeina, taurina i etanola na rane faze neuralne diferencijacije u 2D i 3D model-sistemima humane neurogeneze *in vitro*, na NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima.

Cilj 3: Ispitivanje uticaja komponenti energetskih i alkoholnih pića, kofeina, taurina i etanola na zrele neurone i astrocite nastale neuralnom diferencijacijom NT2/D1 ćelija u 2D model-sistemu humane neurogeneze *in vitro*.



Slika 6. Grafički prikaz ciljeva doktorske disertacije. Ilustracija kreirana korišćenjem platforme BioRender.com.

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

Materijal korišćen u eksperimentima kategorisan je prema primeni i prikazan u tabelama 3.1.1. do 3.1.5.

3.1.1. Tabelarni prikaz hemikalija korišćenih u eksperimentima

NAZIV HEMIKALIJE	PRIMENA	PROIZVOĐAČ
DMEM – Dulbekov modifikovani Eagle medijum Antibiotik-antimikotik FBS – fetalni goveđi serum Geltrex™ Tripsin	Ćelijska kultura	Gibco, ThermoFisher Scientific, SAD
$NaHCO_3$ NaCl KCl Na_2HPO_4 KH_2PO_4 d-glukoza *all-trans* retinoinska kiselina $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ (Na-citrat) 5-fluoro-5-deoksiuridin citozin arabinozid uridin etidijum bromid MTT-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid	Ćelijska kultura, Elektroforeza	Sigma-Aldrich, SAD
Agaroza	Ćelijska kultura, Elektroforeza	AppliChem, Nemačka
Metanol SDS – natrijum dodecil sulfat Tween 20 Triton X-100 Akrilamid TEMED – N,N,N′,N′tetrametiletilendiamin APS – amonijum persulfat Ponceau-S	Western blot	Sigma-Aldrich, SAD
PFA – paraformaldehid Etanol TBS – Tris-puferski rastvor soli BSA – albumin iz seruma govečeta Tripsin NGS – Normalni kozji serum Triton X-100 Mowiol	Imunocitohemija	Gibco,ThermoFisher Scientific, SAD
DCFH-DA – (2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat)	Detekcija ROS-ova	TCI (Tokyo Chemical Industry Co.), Japan

3.1.2. Tabelarni prikaz kitova korišćenih u u eksperimentima

NAZIV	ANALIZA	PROIZVOĐAČ
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Određivanje koncentracije proteina	Thermo Scientific, SAD
LIVE/DEAD™ Cell Imaging Kit (488/570)	Diferencijalno bojenje živih i mrtvih ćelija	Invitrogen, ThermoFisher Scientific, SAD
DNA-free Kit	Oslobađanje totalne RNK od ostataka genomske DNK	Ambion, Invitrogen, SAD
High-Capacity cDNA Reverse Transcription® kit	Sinteza cDNK molekula	Applied Biosystems, SAD
Glutamate-Glo™ Assay	Detekcija intracelularnog glutamata u ćelijskom lizatu	Promega, SAD
ECL detection Kit	Detekcija proteina (Western blot, hemiluminiscencija)	Bio-Rad, SAD
Luna® Universal qPCR Master Mix	Kvantifikacija relativne ekspresije gena (qPCR analiza)	New England Biolabs (NEB), SAD

3.1.3. Tabelarni prikaz sekvenci ushodnih i nishodnih oligonukleotida (prajmera) korišćenih u eksperimentima kvantitativnog PCR-a (qPCR)

Gen	Ushodni prajmer	Nishodni prajmer
OCT4	5'-GCTTTGAGGCTCTGCAGCTT-3'	5'-TCTCCAGGTTGCCTCTCACT-3'
SOX2	5'-CCCCTGGCATGGCTCTTGGC-3'	5'-TCGGCGCCGGGGAGATACAT-3'
NANOG	5'-GGTCCCGGTCAAGAAACAGA-3'	5'-TCTGGAACCAGGTCTTCACC-3'
SOX3	5'-GGGACGCCTTGTTTAGCTTTG-3'	5'-TAACACAGCGATTCCCAGCCT-3'
PAX6	5'-TGGGCAGGTATTACGAGACTG-3'	5'-ACTCCCGCTTATACTGGGCTA-3'
CYCLIN D1	5'-CCGTCCATGCGGAAGATC-3'	5'-GAAGACCTCCTCCTCGCACT-3'
PCNA	5'-GCGTGAACCTCACCAGTATGT-3'	5'-TCTTCGGCCCTTAGTGTAATGAT-3'
Ki-67	5'-GCCTGCTCGACCCTACAGA-3'	5'-GCTTGTCAACTGCGGTTGC-3'
βIII-tubulin	5'-CATGGACAGTGTCCGCTCAG-3'	5'-CAGGCAGTCGCAGTTTTCAC-3'
GFAP	5'-GTCCCCCACCTAGTTTGCAG-3'	5'-TAGTCGTTGGCTTCGTGCTT-3'

EAAT1	5'-GGTTGCTGCAAGCACTCATCAC-3'	5'-CACGCCATTGTTCTCTTCCAGG-3'
EAAT2	5'-TGCCAACAGAGGACATCAGCCT-3'	5'-CAGCTCAGACTTGGAGAGGTGA-3'
SOD	5'-ACAAAGATGGTGTGGCCGAT-3'	5'-AACGACTTCCAGCGTTTCCT-3'
CAT	5'-AGTGATCGGGGGATTCCAGA-3'	5'-AAGTCTCGCCGCATCTTCA-3'
GAPDH	5'-GCCTCAAGATCATCAGCAATGC-3'	5'-CCACGATACCAAAGTTGTCATGG-3'

3.1.4. Tabelarni prikaz primarnih antitela korišćenih u imunocitohemijskim (ICH) i Western blot (WB) eksperimentima

Primarno antitelo	**Razblaženje**	**Kataloški broj**	**Proizvođač**
mišje anti-Oct3/4	WB 1:200	sc5279	Santa Cruz Biotechnology, SAD
zečje anti-PAX6	WB 1:1000	ab195045	Abcam, Ujedinjeno Kraljevstvo (UK)
mišje βIII-tubulin	ICH 1:500	T8660	Sigma-Aldrich, SAD
zečje anti-GFAP	ICH 1:200	ZO334	Agilent Technologies, Danska
mišje anti-α-tubulin	ICH 1:500	ab56676	Abcam, Ujedinjeno Kraljevstvo (UK)
GAPDH	WB 1:15000	NBP2-27103SS	Novus Biological, SAD

3.1.5. Tabelarni prikaz sekundarnih antitela korišćenih u imunocitohemijskim (ICH) i Western blot (WB) eksperimentima

Sekundarno antitelo	**Razblaženje**	**Kataloški broj**	**Proizvođač**
magareće anti-mišje antitelo konjugovano sa peroksidazom rena	1:10000 WB	15014	Active Motif, SAD
magareće anti-zečje antitelo konjugovano sa peroksidazom rena	1:10000 WB	A16023	ThermoFisher Scientific, SAD
kozje anti-mišje antitelo lgG (H+L) Alexa Fluor™ 594	1:500 ICH	A-11032	Invitrogen, SAD

kozje anti-zečije IgG (H+L) Alexa Fluor 488	1:500 ICH	A-11034	Invitrogen, SAD

3.2. Ćelijska kultura

U eksperimentalnom radu je korišćena permanentna pluripotentna ćelijska linija NT2/D1 poreklom od humanog embrionalnog teratokarcinoma, dobijena ljubaznošću prof. Peter W. Andrews-a (Univerzitet u Šefildu, UK). NT2/D1 ćelije predstavljaju najčešće korišćen *in vitro* model-sistem humane neurogeneze. Za potrebe ovog rada NT2/D1 ćelije su gajene u 2D i 3D model-sistemima.

3.2.1. Gajenje pluripotentnih NT2/D1 ćelija i njihova neuralna diferencijacija u monosloju – 2D model-sistemu humane neurogeneze *in vitro*

U 2D model-sistemu humane neurogeneze *in vitro*, NT2/D1 ćelije su gajene u standardnim uslovima, u Dulbekovom Modifikovanom Eagle medijumu sa 4,5 g/L glukoze (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM high glucose, Thermo Fisher Scientific, SAD), uz dodatak 10% fetalnog goveđeg seruma (engl. Fetal Bovine Serum, FBS, Thermo Fisher Scientific, SAD), i rastvora antibiotika i antimikotika (10,000 jedinica/ml penicilina, 10,000 μg/ml streptomicina) i 25 μg/ml amfotericina B (Thermo Fisher Scientific, SAD) u ćelijskom inkubatoru na 37˚C u uslovima visoke vlažnosti sa 10% CO_2 (Topalovic, Krstic, et al., 2017). U ovim uslovima NT2/D1 ćelijska linija je održavana u kulturi na stadijumu pluripotentnih ćelija.
Neuralna diferencijacija NT2/D1 ćelija indukovana je dodavanjem *all-trans* retinoinske kiseline u koncentraciji 10 μmol/L (Sigma-Aldrich, SAD) u medijum za gajenje ćelija. Nakon 48 časova diferencijacije NT2/D1 ćelije se nalaze na stadijumu ranih neuralnih progenitora.
Tokom naredne četiri nedelje indukcije ćelije prolaze kroz kasnije stadijume neuralnih progenitora i diferenciraju se do stadijuma zrelih NT2-neurona (NT2-N) i NT2-astrocita (NT2-A) koji se nalaze u mešovitoj kulturi. Tokom ovog perioda medijum za gajenje ćelija koji sadrži 10 μmol/L *all-trans* retinoinsku kiselinu (RK) menjan je na 48 časova. Nakon 4 nedelje, ćelije u mešovitoj kulturi su zasejane u odnosu 1:6 iz inicijalnog suda u kome su gajene u nove sudove. NT2-neuroni su mehaničkim putem odvojeni od adherentnih NT2-astrocita, zasejani u sudove obložene Geltrex® reagensom (Gibco, ThermoFisher Scientific, SAD) i propagirani dodatnih 5-7 dana u medijumu sa inhibitorima mitoze (1 mmol/L citozin arabinozid, 10 mmol/L uridin i 10 mmol/L 5-fluoro-5-deoksiuridin), (Sigma-Aldrich, SAD) u cilju dobijanja prečišćene kulture NT2-N. NT2-A su propagirani i presađivani nakon dostizanja konfluentnosti naredne tri nedelje u cilju dostizanja zrelosti (Andrews, 1984; Pleasure, 1992; Sandhu et al., 2002).

3.2.2. Gajenje NT2/D1 ćelija u 3D model-sistemima

3.2.2.1. Gajenje i diferencijacija NT2/D1 ćelija u sferama

Gajenjem NT2/D1 ćelija u suspenziji, bez mogućnosti da se ćelije zalepe za dno suda, formiraju se NT2 sfere (Hill et al., 2008). Za formiranje NT2 sfera korišćene su mikrotitar ploče sa 48 bunarića. Dno bunarića je obloženo agarozom dodavanjem 150 μl 1,5 mas. % (masenog procenta) rastvora agaroze i izlaganjem UV zračenju u laminarnoj komori 2 sata. U svaki bunarić je zasejano $2{,}1 \times 10^4$ ćelija u maloj zapremini (20-30 μl) a zatim je dodato još 500 μl medijuma za gajenje ćelija. Nakon zasejavanja ćelija, mikrotitar ploča je 15 minuta postavljena na orbitalni šejker radi ujednačavanja veličine i kompaktnosti sferoida. Polovina medijuma menjana je na svaka 2–3 dana, vodeći računa da se sferama ne naruši struktura. Neuralna diferencijacija NT2 sfera indukovana je, kao i kod 2D model-sistema, dodavanjem 10 μmol/L *all-trans* retinoinske kiseline (RK) u medijum za gajenje ćelija. Ćelije su diferencirane u sferama do ranih neuralnih progenitora tokom 48 sati indukcije (Kitano & Nakazawa, 2021).

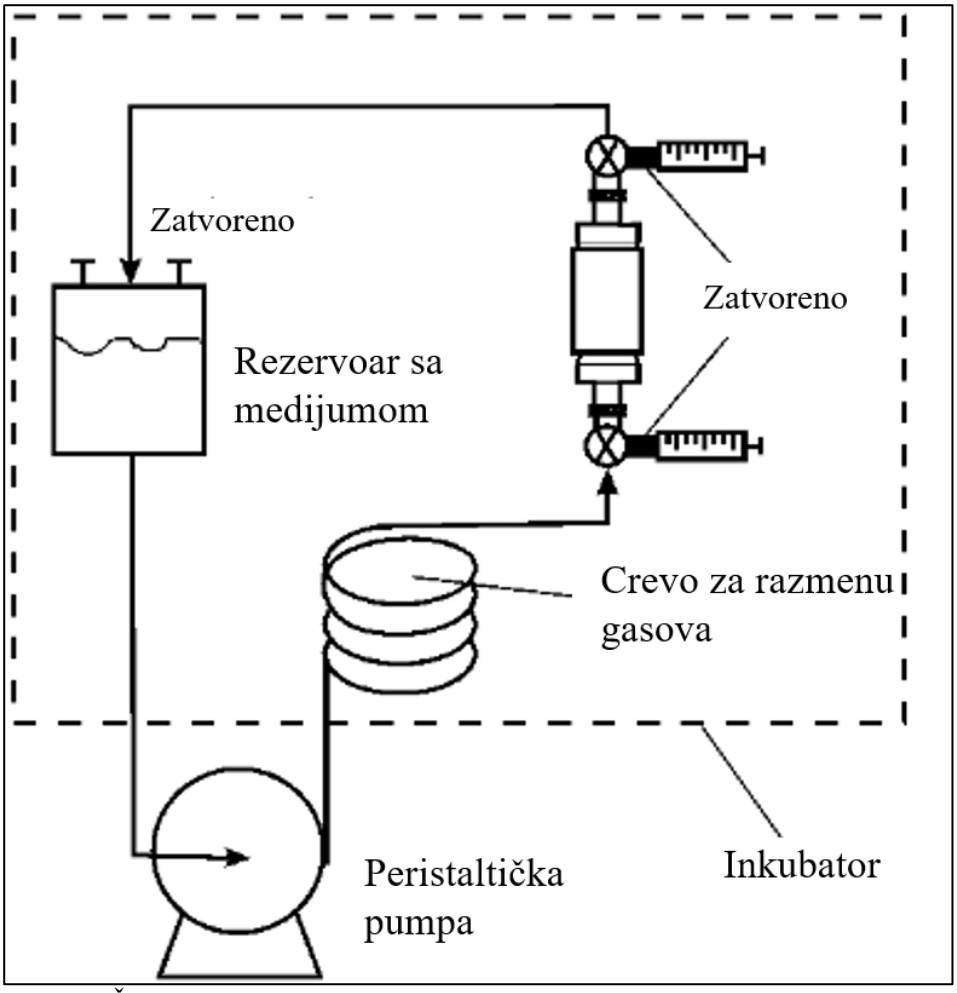
3.2.2.2. Gajenje pluripotentnih NT2/D1 ćelija i njihova neuralna diferencijacija u alginatnim mikrovlaknima

NT2/D1 ćelije su imobilisane u alginatna mikrovlakna manuelnom ekstruzijom. Ukratko, prah Na-alginata je rastvoren u destilovanoj vodi da bi se dobio 2,5 mas. % rastvor alginata. Rastvor je sterilisan zagrevanjem do ključanja uz mešanje na magnetnoj mešalici 30 minuta. Suspenzija ćelija je pomešana sa ohlađnim rastvorom Na-alginata tako da je dobijena finalna koncentracija alginata od 1,5 mas. % i ćelija 5×10^6 ćelija/mL. Suspenzija ćelija u rastvoru alginata je zatim istiskivana kroz igle veličine 25 i 26 G, u rastvor za geliranje koji sadrži 0.18 M kalcijumove jone ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$, Sigma-Aldrich, SAD). Nakon 15 minuta u rastvoru za geliranje mikrovlakna su isprana medijumom i gajena u standardnim uslovima u ćelijskoj kulturi (u ćelijskom inkubatoru na 37˚C u atmosferi visoke vlažnosti sa 10% CO_2). Dobijena alginatna mikrovlakna sa imobilisanim ćelijama su izmerena i podeljena na osnovu mase – 0.5 g ili 1 g mikrovlakana u Petri šolje prečnika 10 cm sa 15 ml medijuma.

NT2/D1 ćelije imobilisane u alginatnim mikrovlaknima su propagirane kao pluripotentne ćelije a neuralna diferencijacije je indukovana, kao i u 2D model-sistemu, inkubacijom u medijumu sa 10 μmol/L *all-trans* RK-om 48 č. do stadijuma ranih neuralnih progenitora. Neuralna diferencijacija NT2/D1 ćelija je započeta 24 č. nakon imobilizacije ćelija u alginatna mikrovlakna.

3.2.2.3. Neuralna diferencijacija NT2/D1 ćelija imobilisanih u alginatna mikrovlakna u protočnom bioreaktoru

Nakon imobilizacije NT2/D1 ćelija u alginatna mikrovlakna, ćelije su inkubirane 24 č. u statičkim uslovima, u Petri šolji, a zatim prebačene u protočni bioreaktor (*3D Perfuse*, Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta u Beogradu, Srbija) prema proceduri opisanoj u radu Stojkovske i autora (Stojkovska et al., 2020). Sistem bioreaktora (Slika 7) se sastoji od komore za smeštanje ćelija, rezervoara za medijum i sistema creva za recirkulaciju medijuma. Komora bioreaktora sastoji se iz dva dela izrađena od poliamida sa perforiranim površinama spojena silikonskim crevom tako da obrazuju komoru u koju se smeštaju mikrovlakna. Unutrašnji prečnik komore bioreaktora iznosio je 0,8 cm, a visina komore je iznosila 4 cm. Na ulazu i izlazu iz komore nalaze se trokraki ventili, na koje se postavlja po jedan špric. Sistem creva za recirkulaciju medijuma sadrži i crevo za razmenu gasova. Prema proceduri, 0,5 g alginatnih mikrovlakana sa imobilizovanim NT2/D1 ćelijama postavljeno je u komoru bioreaktora, nakon čega je komora zatvorena izlaznim delom komore. Špric sa medijumom je postavljen na ulazni ventil, koji je zatim otvoren ka komori bioreaktora, omogućavajući punjenje komore medijumom. Nakon toga, ulazni ventil je otvoren ka crevu i rezervoaru koji su napunjeni medijumom. Tokom tog procesa, jedan otvor na rezervoaru sa medijumom je bio blago otvoren da obezbedi izlazak vazduha iz sistema. Na kraju, crevo između izlaza iz komore i rezervoara sa medijumom napunjeno je pomoću šprica postavljenog na izlazni ventil. Ukupan zapremina medijuma u sistemu iznosila je približno 15 ml. Tri protočna bioreaktora su postavljena u ćelijski inkubator na 37˚ C u atmosferi visoke vlažnosti sa 10% CO_2. Pomoću višekanalne peristaltičke pumpe (LabN1, Baoding Shenchen Precision Pump Co., China) postavljene izvan inkubatora ostvarena je kontinualna recirkulacija medijuma protokom od 0,12 $cm^3\ min^{-1}$ (površinska brzina 40 $\mu m\ s^{-1}$). Kao kontrolni sistem, korišćena su alginatna mikrovlakna sa imobilisanim NT2/D1 ćelijama inkubirana u statičkim uslovima (0,5 g mikrovlakana u 15 ml medijuma) u Petri posudama.



Slika 7. Šematski prikaz sistema protočnog bioreaktora. Preuzeto i modifikovano iz: Stojkovska et al., 2020.

3.3. Test bojenja tripan plavom bojom

Broj vijabilnih NT2/D1 ćelija određivan je primenom testa bojenja tripan plavom bojom. Zasniva se na principu selektivnog bojenja ćelija, pri čemu vijabilne ćelije sa očuvanom membranom ne propuštaju tripan plavu boju, dok mrtve ćelije usvajaju boju i postaju plave. Nakon inkubacije sa bojom u trajanju od 5 minuta, ćelije su brojane u komori za brojanje ćelija.

3.4. Tretmani

Pojedinačne komponente energetskih pića, kofein i taurin, rastvorene su u ćelijskom medijumu, kofein (Sigma-Aldrich, SAD) u koncentraciji 0,32 mg/ml, a taurin (Sigma-Aldrich, SAD) u koncentraciji 4 mg/ml, što odgovara koncentracijama ovih jedinjenja u energetskom piću. Energetsko piće je upareno do suvog ostatka korišćenjem vakuum uparivača (Concentrator 5301, Eppendorf, Nemačka) i potom rastvoreno u inicijalnoj zapremini u medijumu za gajenje ćelija, u cilju postizanja originalne koncentracije. Vrednost pH svih uzoraka je podešena na 7.4 (Luo et al., 2021).
Pripremljeni rastvori su potom razblaženi deset puta u odnosu na njihovu prvobitnu koncentraciju u energetskim pićima kako bi se postigla fiziološki relevantna koncentracija u primenjenim tretmanima (Luo et al., 2021). U cilju simulacije konzumacije energetskog pića sa alkoholom, etanol je primenjen u finalnoj koncentraciji od 20 mM u kombinaciji sa kofeinom i taurinom (KOF+TAU+EtOH) ili sa

energetskim pićem (EP+EtOH) (Mead et al., 2023). Ova količina etanola odgovara fiziološki relevantnoj količini alkohola u krvi nakon konzumacije nekoliko alkoholnih pića (Jung & Namkoong, 2014).
Ćelije su tretirane 24 č., period koji se u literaturi navodi kao akutni tretman (Serdar et al., 2019), glavnim komponentama energetskih pića, kofeinom (KOF) i taurinom (TAU), pojedinačno, kombinovanim tretmanom kofeina i taurina (KOF+TAU) ili u kombinaciji sa alkoholom (KOF+TAU+EtOH). Dodatno, ćelije su tretirane energetskim pićem (EP) i energetskim pićem sa alkoholom (EP+EtOH), (Doyle et al., 2012).

3.5. Eseji vijabilnosti

3.5.1. MTT esej

MTT esej za određivanje citotoksičnosti bazira se na konverziji MTT agensa (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium-bromid) u kristale formazana u metabolički aktivnim, živim ćelijama. Nakon dodatka dimetil sulfoksida (DMSO), kristali formazana se rastvaraju, pri čemu nastaje ljubičasto obojen rastvor čija se absorbanca meri spektrofotometrijski. Viša vrednost apsorbance, ukazuje na veću ćelijsku vijabilnost.
U 2D model-sistemu, ćelije su zasejane u monosloju u ploče sa 96 bunarića i nakon završenih akutnih tretmana inkubirane u rastvoru MTT agensa u DMEM-u (0,5 mg/ml) tokom 2 č., dok su u 3D model-sistemu alginatna mikrovlakna sa imobilisanim ćelijama isečena na fragmente dužine 1 cm, prebačena u ploče sa 96 bunarića i inkubirana u rastvoru MTT agensa u DMEM-u (0,5 mg/ml) tokom 2 č. Nakon formiranja kristala formazana u ćelijama, dodat je DMSO i potom je izmerena apsorbanca na čitaču mikroploča - Tecan Infinite 200 PRO (Tecan Group Ltd., Švajcarska).
Tokom 7 dana propagacije ćelija u mikrovlaknima, u različitim vremenskim intervalima (nakon jednog, dva, tri i sedam dana), pluripotentne NT2/D1 ćelije su inkubirane nekoliko sati u rastvoru MTT-a (MTT rastvoren u ćelijskom medijumu u koncentraciji 0,5 mg/ml). Alginatna mikrovlakna sa ćelijama su vizuelizovana korišćrnjrm Leica DM IL LED invertnog mikroskopa (Leica Microsystems, Leica Microsystems GmbH, Nemačka).
Pluripotentne NT2/D1 ćelije i NT2/D1 ćelije u različitim stadijumima neuralne diferencijacije (rani neuralni progenitori u sferama i alginatnim mikrovlaknima, NT2-neuroni i NT2-astrociti) nakon završenih akutnih tretmana su u prisustvu MTT rastvora inkubirane 2 č. na 37°C u ćelijskom inkubatoru (Mosmann, 1983; Stojkovska et al., 2020). Nakon inkubacije, rastvor MTT-a je uklonjen i nastali kristali formazana su rastvoreni dodavanjem DMSO-a i naknadnom agitacijom 5 minuta na sobnoj temperaturi. Rastvaranje kristala formazana je praćeno na svetlosnom mikroskopu. Absorbanca rastvorenog formazana, merena je na 550 nm na Tecan Infinite 200 PRO (Tecan Group Ltd., Švajcarska).

3.5.2. LIVE/DEAD esej

LIVE/DEAD esej (ŽIVO/MRTVO bojenje) se zasniva na dve osnovne karakteristike živih ćelija – integritetu ćelijske membrane i aktivnosti intracelularnih esteraza. U ovom eseju, ćelije se simultano boje zeleno obeleženim kalceinom-AM (kalcein-acetoksimetil ester, boji žive ćelije sa intracelularnom esteraznom aktivnošću) i crveno obeleženim BOBO-3 jodidom (boji nukleinske kiseline dostupne zbog narušenog integriteta membrane). Esej je korišćen za procenu ćelijske vijabilnosti NT2/D1 ćelija imobilisanih u alginatnim mikrovlaknima i u sferama na osnovu diferencijalnog fluorescentnog bojenja živih i mrtvih ćelija. Žive ćelije se detektuju emisijom zelenog fluorescentnog signala (~488 nm), dok mrtve ćelije emituju crveni fluorescentni signal (~570 nm), što omogućava njihovu jasnu vizualizaciju i kvantifikaciju primenom fluorescentne ili konfokalne mikroskopije. Mikrografije ćelija u alginatnim mikrovlaknima su dobijene na Leica TCS SP7 konfokalnom laserskom mikroskopu (Leica Microsystems CMS GmbH, Nemačka). Analizirana je serija od 40 uzastopnih poprečnih preseka mikrovlakana debljine 5 μm. Z-stack slike su preklopljene pomoću alata za obradu slike „Maximal intensity" u LAS AF softveru

(Leica Microsystems, Nemačka). Kvantitivna analiza vijabilnosti živih i mrtvih ćelija je određena na osnovu 300 prebrojanih ćelija u svakoj testiranoj grupi. Mikrografije sfera su dobijene na Carl Zeiss AxioVision mikroskopu (Zeiss, Nemačka).

3.6. Analiza ćelijskog ciklusa

NT2/D1 pluripotentne ćelije i rani neuralni progenitori poreklom od NT2/D1 ćelija su tripsinizovani i talozi su sakupljeni centrifugiranjem na 850 x g, 5 minuta na sobnoj temperaturi. Talog ćelija je tri puta opran fosfatnim puferom (engl. Phosphate buffer saline-PBS). Ćelije su fiksirane u 1 ml hladnog 70% etanola (-20°C), dodajući kap po kap etanola uz kontinuirano mešanje na vorteks mešalici i fiksirane su minimalno 2 č. na 4°C. Nakon fiksacije, ćelije su isprane dva puta PBS-om i finalno inkubirane 15 minuta u mraku na sobnoj temperaturi sa propidijum jodidom (PI, finalna koncentracija 1 mg/ml), (P4170, Sigma-Aldrich, SAD). Procenat ćelija u G1, S i G2/M fazama je određen korišćenjem CyFlow Space citometra i FlowMax softvera (Partec, Nemačka).

3.7. Fiksacija NT2/D1 ćelija u alginatnim mikrovlaknima

Alginatna mikrovlakana sa imobilisanim NT2/D1 ćelijama su isprana u fosfatnom puferu (PBS) i inkubirana u rastvoru fiksativa (20% formaldehida i 2% glutaraldehida u PBS-u), (Cell Signaling Technology, Inc., SAD) 15 minuta na sobnoj temperaturi. Po završenoj inkubaciji, ćelije su dva puta isprane PBS-om što je dovelo do rastvaranja alginatnih mikrovlakana i oslobađanja pojedinačnih ćelija i ćelijskih klastera. Fiksirane ćelije vizuelizovane su upotrebom invertnog fazno-kontrastnog svetlosnog mikroskopa Leica DM IL LED (Leica Microsystems, Leica Microsystems GmbH, Nemačka).

3.8. Oporavak NT2/D1 ćelija nakom oslobađanja iz alginatnih mikrovlakana

Imobilisane ćelije su oslobođene iz alginatnih mikrovlakana rastvaranjem u 2 mas. % rastvoru natrijum-citrata ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, Sigma-Aldrich, SAD), (0,1 g mikrovlakana na 1 ml rastvora) tokom 10 minuta na 37°C. Ćelijska suspenzija je zatim centrifugirana na 1300 rpm, 5 minuta na sobnoj temperaturi. Supernatant je odbačen, a talog ćelija je dva puta opran medijumom za gajenje ćelija. Broj ćelija je određen upotrebom testa bojenja tripan plavom bojom. Oslobođene ćelije su gajene u adherentnim posudama za ćelijsku kulturu tokom 72 č. u ćelijskom inkubatoru na 37˚C u atmosferi visoke vlažnosti sa 10% CO_2.

3.9. Izolacija ukupne RNK

Ukupna RNK iz NT2/D1 ćelija gajenih u 2D i 3D model-sistemima izolovana je korišćenjem TRIzol reagens-a (Ambion®, Invitrogen, SAD) prema uputstvima proizvođača. Ćelije su staložene centrifugiranjem na 1300 rpm, 5 minuta na sobnoj temperaturi a zatim je na taloge dodat TRIzol reagens da bi se narušio integritet membrana i oslobodio ćelijski sadržaj. Potom je u sve uzorke dodat hloroform u odnosu 1:5. Uzorci su centrifugirani na 12000 x g, 15 minuta na 4°C. Nakon centrifugiranja fomirana su tri sloja: donja faza koju čine fenol/hloroform i proteini, međufaza, u vidu belog prstena u kojoj su molekuli DNK i gornja faza u kojoj se nalazi ukupna RNK. Gornja faza je izdvojena i u nju je dodat izopropanol u zapremini koja odgovora jednoj polovini inicijalne količine dodatog TRIzol reagensa. Staložena RNK je isprana 75% etanolom nakon čega su uzorci centrifugirani na 7500 g, 5 minuta na 4°C. Izolovana RNK je rastvorena u vodi.

3.10. Oslobađanje ukupne RNK od ostataka genomske DNK

Ukupna RNK je oslobođena od ostataka genomske DNK kitom – DNA-free Kit (Ambion, Invitrogen, SAD), prema uputstvima proizvođača. U ukupnoj zapremini od 20 µl, 2 µg izolovane RNK tretirano je enzimom DNKazom I (dezoksiribonukleaza I) u DNKaza I puferu na 37 °C 30 minuta. Nakon inkubacije,

reakcinoj smeši je dodat reagens za inaktivaciju DNKaze koji nakon 2 minuta inkubacije na sobnoj temperature zaustavlja enzimsku reakciju. Reakciona smeša je potom staložena centrifugiranjem na 12000 x g, 90 sekundi na sobnoj temperaturi. Supernatant sa prečišćenom RNK je nadalje korišćen za sintezu cDNK molekula.

3.11. Sinteza komplementarne DNK (cDNK)

Ukupna RNK prečišćena od genomske DNK korišćena je za sintezu cDNK molekula. Reakciona smeša u kojoj se odvijala reverzna transkripcija sadržala je: 125 ng oligonukleotida (Random hexamers, Applied Biosystems, SAD), 2.5 U reverzne transkriptaze (MuLV, Applied Biosystems, SAD), 10 U inhibitora RNKaza (Applied Biosystems, SAD), 1.5 mM smeše nukleotida (dNTP mix, Applied Biosystems, SAD) i 0.5 µg RNK tretirane DNKazom i ddH_20 do finalne zapremine od 10 µl. Reakcija sinteze cDNK je rađena u PCR aparatu (Applied Biosystems, SAD) prema programu: 10 min na 25 °C, 40 min na 40 °C, 5 min na 99 °C i 5 min na 5 °C.

3.12. Kvantitativni PCR u realnom vremenu (qPCR)

Kvantitativna lančana reakcija polimerizacije/umnožavanja (qPCR) je metoda koja omogućava istovremeno umnožavanje i kvantifikaciju ciljnih DNK sekvenci. U ovoj metodi se koristi SYBR Green boja koja se specifično vezuje za dvolančanu DNK, pri čemu emituje fluorescentni signal nakon ekscitacije svetlošću određene talasne dužine. Tokom amplifikacije PCR produkata, signal fluorescencije raste proporcionalno njihovoj količini, što omogućava praćenje količine formiranog produkta u realnom vremenu.

Ukupna zapremina reakcione smeše qPCR-a sadržala je 10 µl: 5 µl SYBR smeše, 1 µl ushodnog prajmera (engl. forward primer), 1 µl nishodnog prajmera (engl. reverse primer), 2 µl ddH_2O i 1 µl cDNK. Relativna ekspresija gena je izračunata korišćenjem ΔΔCt metode, kojom se određuje relativna promena nivoa ekspresije ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) u testiranom uzorku u odnosu na kontrolne uzorke (Topalovic, Krstic, et al., 2017). Nivo genske ekspresije je normalizovan u odnosu na ekspresiju *GAPDH* (engl. *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*). Reakcija qPCR je urađena na aparatu BioRad prema programu: inicijalna denaturacija 95 °C, 1 min; zatim 39 ciklusa: denaturacija 95 °C, 15 s; hibridizacija prajmera/elongacija 60 °C, 30 s; kriva topljenja: 65–95 °C.

3.13. TaqMan–miRNK esej

TaqMan PCR predstavlja tip kvantitativne PCR metode (qPCR) koji se bazira na upotrebi Taqman-ove probe komplementarne segmentu ciljnog molekula DNK. Proba je oligonuleotidna sekvenca obeležena na svojim krajevima sa dve fluorescentne boje (reporter i utišivač). Emisioni spektar jedne preklapa se sa ekscitacionim spektrom druge, što doprinosi utišavanju jedne fluorofore drugom zbog transfera fluorescentne rezonantne energije (engl. Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET). Tokom PCR reakcije i sinteze produkata, 5′-nukleazna aktivnost Taq polimeraze dovodi do degradacije probe pri čemu se dve fluorofore razdvajaju što sprečava njihovu međusobnu inhibiciju i povećava intenzitet emitovanog signala – fluorescencije, čiji intenzitet je proprocionalan količini amplifikovanog produkta. Ekspresija miR-219 analizirana je korišćenjem TaqMan Universal PCR Master Miks-a (Applied Biosystems, SAD), prema uputstvima proizvođača. Relativni nivo ekspresije ciljne miRNK (miR-219) određen je primenom $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metode, pri čemu je normalizacija rezultata izvršena na osnovu ekspresije RNU44 (mala jedarna RNK U44, endogena kontrola za miRNK).

3.14. Izolacija ukupnih proteina

U cilju ispitivanja ekspresije proteina, ukupni ćelijski proteini su izolovani prema ranije opisanom protokolu (Xu et al., 2003). NT2/D1 ćelije su najpre odlepljene od podloge suda u kom su gajene

inkubacijom sa tripsinom u ćelijskom inkubatoru na 37˚C u atmosferi visoke vlažnosti sa 10% CO_2. Nakon odvajanja ćelija od podloge enzim je inaktivisan medijumom za gajenje ćelija. Ćelije su zatim centrifugirane 5 minuta na 1300 rpm, na sobnoj temperaturi a dobijeni ćelijski talog je dva puta ispran PBS-om. Potom su ćelije lizirane inkubacijom 15 min na +4 °C uz kontinuirano mešanje u TD puferu (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 250 mM NaCl i 5 mM EDTA (pH 8) uz dodatak inhibitora proteaza (1 µg/µl aprotinin, 1 µg/µl leupeptin i 1 µg/µl pepstatin A; Roche Diagnostics, Švajcarska). Nakon lize uzorci su centrifugirani 15 minuta na 14 000 rpm na +4 °C. Dobijeni supernatant, koji sadrži ukupne proteine čuvan je na –80 °C do analize. Koncentracije proteina ćelijskih lizata su određene korišćenjem PierceTM BCA Protein Assay Kit-a prema uputstvu proizvođača (Thermo Scientific, SAD).

3.15. Analiza ekspresije proteina metodom Western blot (imunoblot)

Ukupni ćelijski proteini (30 µg) izolovani iz NT2/D1 ćelija razdvojeni su u denaturišućim uslovima elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijum dodecil sulfata (engl. sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) na 12% akrilamidnom gelu (12% akrilamid, 0,01% APS, 0,001% TEMED, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 1% SDS-a), u puferu (28,75 mM Tris, 0,19 M glicin, 0,1% SDS) u aparatu BioRad Protein Mini sistem (BioRad, SAD). Uzorci proteina su denaturisani u puferu za nanošenje uzoraka (engl. loading buffer) koji sadrži 60mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS (natrijum dodecil sulfat), 5% β-merkaptoetanol, 0,01% bromfenol plavo tokom 5 minuta na 95 °C. Nakon razdvajanja na gelu, proteini su preneti na 0,2 µm PVDF (polivinilidenfluorid) membranu, (Merck-KgaA, Nemačka) koja je prethodno aktivirana inkubacijom u metanolu u trajanju od 5 min, korišćenjem polusuvog sistema za transfer proteina (Biometra Fastblot, Nemačka). Efikasnost transfera je proverena bojenjem membrane Ponceau S bojom (Sigma, SAD). Membrana je najpre blokirana, da bi se sprečila nespecifična vezivanja antitela, inkubacijom u 5% nemasnom mleku (Nestle, SAD) u TBST-u (Tris pufer soli sa 0.05% Tween-20) tokom 1h na sobnoj temperaturi. Nakon blokade, membrana je inkubirana sa primarnim antitelima rastvorenim u 5% nemasnom mleku u TBST-u tokom noći na 4°C (prikaz antitela korišćenih razblaženja se nalaze u Tabeli 3.1.4.). Nakon inkubacije sa primarnim antitelom membrana je oprana tri puta u TBST puferu. Nakon pranja, membrana je inkubirana sa sekundarnim antitelom rastvorenim u 5 % rastvoru nemasnog mleka u TBST-u, 1 č. na sobnoj temperaturi. Proteinske trake su detektovane upotrebom ECL-a reagensa (Bio-Rad, SAD) i vizuelizovane korišćenjem ChemiDoc sistema za vizuelizaciju (Bio-Rad, SAD). U eksperimentima je korišćen marker molekulskih težina Thermo Scientific PageRuler^{TM} Prestained Protein Ladder 26616 (Thermo Scientific, SAD). Intenziteti traka detektovanih Western blot analizom kvantifikovani su korišćenjem ImageJ softvera 1.53t (NIH, SAD).

3.16. Imunocitohemija (ICH)

NT2/D1 rani neuralni progenitori imobilisani u alginatnim mikrovlaknima su fiksirani u 70% etanolu, 20 minuta na sobnoj temperaturi, i permeabilizovani 0,2% rastvorom Triton X-100 u Tris puferisanom fiziološkom rastvoru (TBS) 15 minuta. Nakon blokiranja u 1% BSA (albumin iz seruma govečeta, engl. Bovine Serum Albumin), 10% NGS (normalni kozji serum, engl. normal goat serum) u TBS 1h na sobnoj temperaturi, ćelije su inkubirane 1 č. na +4°C u primarnom mišjem anti-tubulin antitelu (podaci o antitelu se nalaze u tabeli 3.1.4) razblaženom 1:500 u TBS-u koji sadrži 1% BSA i 0,1% Triton. Preparati su zatim inkubirani sa sekundarnim antitelom – kozji poliklonski anti mišji IgG (H+L) Alexa Fluor™ 594 A-11032, (Invitrogen, SAD) rastvorenim u TBS-u sa 1% BSA i 0,1% Triton, 1h na sobnoj temperaturi. Jedra ćelija su obojena korišćenjem boje DAPI (D9542, razblaženje 1:2000) (Sigma-Aldrich, SAD). Slike su snimljene na konfokalnom mikroskopu Leica TCS SP7 (Leica Microsystems CMS GmbH, Nemačka). 3D rekonstrukcija NT2/D1 ćelija imobilisanih u alginatnim mikrovlaknima u visokoj rezoluciji generisana je korišćenjem LAS AF programa (Leica Microsystems, Nemačka).

NT2-neuroni (nakon 7 dana sazrevanja) i NT2-astrociti (nakon 3 nedelje sazrevanja) su fiksirani na sobnoj temparaturi u 4% rastvoru PFA (paraformaldehid) tokom 20 minuta, isprani 3 x 10 min PBS-om a zatim permeabilizovani 0,2% rastvorom Triton X-100 u PBS-u 20 minuta. Ćelije su potom inkubirane u rastvoru koji sadrži 1% BSA i 10% NGS u PBS-u tokom sat vremena na sobnoj temperaturi, u cilju blokade nespecifičnog vezivanja. Inkubacija sa primarnim antitelima (mišje βIII-tubulin/zečje anti-GFAP) rastvorenim u PBS-u sa 1% BSA i 0,1% Triton je trajala tokom noći na +4°C, dok je inkubacija sa sekundarnim antitelima (kozje anti-mišje antitelo lgG (H+L) Alexa FluorTM 594; kozje anti-zečije IgG (H+L) Alexa Fluor 488) rastvorenim u PBS-u sa 1% BSA i 0,1% Tritona trajala 1 č. na sobnoj temperaturi. Nukleusi ćelija su obojeni DAPI bojom (D9542, razblaženje 1:2000; Sigma-Aldrich, SAD). Preparati su snimljeni na Carl Zeiss AxioVision mikroskopu (Zeiss, Nemačka) i analizirani u ImageJ programu 1.53t (NIH, SAD).
Kako bi se analizirao rast neurita preparati NT2-neurona su obojeni βIII-tubulinom, snimljeni Carl Zeiss AxioVision mikroskopom, nakon čega je izmerena dužina neurita u ImageJ programu 1.53t (NIH, SAD).

3.17. Detekcija intracelularnog glutamata u ćelijskom lizatu

Količina intracelularnog glutamata u NT2-astrocitima određena je primenom Glutamate-Glo™ eseja (Promega, SAD), prema uputstvu proizvođača. Ovaj enzimski bioluminiscentni test omogućava kvantitativno određivanje glutamata u biološkim uzorcima. Metoda se zasniva na oksidaciji glutamata glutamat-dehidrogenazom, pri čemu u prisustvu NAD^+ nastaju α-ketoglutarat i NADH. Nastali NADH pokreće lančanu luminescentnu reakciju u kojoj reduktaza konvertuje pro-luciferinski supstrat u luciferin. Zatim rekombinantna Ultra-Glo™ luciferaza koristi luciferin za generisanje svetlosnog signala čiji je intenzitet direktno proporcionalan koncentraciji glutamata u uzorku. Nakon dodavanja reagensa za detekciju glutamata (engl. Glutamate Detection Reagent), sve enzimski spregnute reakcije započinju istovremeno i odvijaju se do potpune potrošnje glutamata, nakon čega se uspostavlja stabilan luminescentni signal.
NT2-A ćelije su isprane hladnim PBS-om, a zatim lizirane 0,6 N HCl-om. Reagens za liziranje je neutralisan 1M Tris puferom. Nakon inkubacije sa reagensom za detekciju glutamata, intenzitet luminiscencije meren je na TECAN čitaču mikroploča (Tecan Group Ltd., Švajcarska). Koncentracija glutamata u uzorcima izračunata je sa standardne krive napravljene korišćenjem vrednosti luminiscencije izmerenim za referentne koncentracije glutamata, pripremljene prema uputstvu proizvođača.

3.18. DCF esej (dihlorofluorescein esej)

DCF esej se koristi za kvantifikaciju reaktivnih vrsta kiseonika u ćelijama (engl. ROS, reactive oxygen species). DCF-DA (2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat, TCI, Japan) nefluorescentni prekursor prelazi u DCF (2',7'-dihlorofluorescein) oblik nakon oksidacije u prisustvu reaktivnih vrsta kiseonika, pri čemu se generiše fluorescencija čiji intenzitet je jednak nivou njihove produkcije u ćelijama. U ploče sa 96 bunarića je zasejano $3x10^4$ NT2-N ili $1x10^4$ NT2-A. Na dan analize, ćelije u svakom bunariću su isprane rastvorom 1xPBS-a a zatim su inkubirane u 100 μM rastvoru DCFH-DA u PBS-u, 30 minuta u ćelijskom inkubatoru na 37 °C i 10% CO_2. Nakon ispiranja 1xPBS-om, ćelije su tretirane 2 č. akutnim tretmanima – KOF, TAU, KOF+TAU, KOF+TAU+EtOH, EP i EP+EtOH. Fluorescencija je izmerena na TECAN čitaču mikroploča (Tecan Group Ltd., Švajcarska) neposredno nakon dodavanja tretmana. Merena je kinetika fluorescencije sa eksitacijom na 485 nm i emisijom na 530 nm tokom 120 min, sa ciklusima od 5 min. Vodonik peroksid (H_20_2, 1mM) je korišćen kao pozitivna kontrola.

3.19. Statistička analiza

Dobijeni rezultati analizirani su Studentovim *t*-testom u programu Microsoft Excel 2019 i SPSS statističkom softverskom paketu (SPSS Inc. Released 1999. SPSS for Windows, Version 10.0. Chicago,

SPSS Inc.). Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± standardna devijacija (engl. standard deviation, SD) iz najmanje tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti verovatnoće manje od 0,05 smatrane su statistički značajnim.

4. Rezultati

U ovom doktoratu je korišćena NT2/D1 ćelijska linija − standardizovan *in vitro* model-sistem humane neurogeneze za testiranje efekata bioaktivnih jedinjenja na različite stadijume neuralne diferencijacije (Andrews, 1984; Pleasure et al., 1992; Hill et al., 2008; Stern et al., 2014,2024; Terrasso et al., 2015). Indukcijom RK-om, ove ćelije ulaze u ireverzibilan proces neuralne diferencijacije, od stadijuma pluripotentnih ćelija preko stadijuma neuralnih progenitora do zrelih neurona (NT2-N) i astrocita (NT2-A) (Andrews, 1984; Haile et al., 2014; Pleasure et al., 1992; Sandhu et al., 2002).

Dosadašnja istraživanja neurotoksičnosti u ovom model-sistemu uglavnom su bila usmerena na analizu ćelijskog odgovora na različite agense u standardnoj dvodimenzionalnoj (2D) kulturi (Stern et al., 2014; Taylor et al., 2019). Međutim, ograničenja 2D kulture u pogledu nemogućnosti da se reprodukuju procesi karakteristični za neurogenezu *in vivo*, predstavljala su osnov za razvoj i primenu trodimenzionalnih (3D) model-sistema (Hill et al., 2008; Jensen & Teng, 2020; Lancaster & Knoblich, 2014). U ovom doktoratu uspostavljeni su i testirani različiti 3D model-sistemi za propagaciju NT2/D1 ćelija i njihovu neuralnu diferencijaciju do stadijuma neuralnih progenitora. Ovi 3D model-sistemi su dalje korišćeni za ispitivanje efekata bioaktivnih komponenti prisutnih u energetskim pićima (EP), kofeina i taurina, pojedinačno ili u kombinaciji sa alkoholom, na osobine pluripotentnih NT2/D1 ćelija i ranih neuralnih progenitora u 3D mikrookruženju. Tretmani čiji su efekti ispitivani na svim stadijumima neuralne diferencijacije su: kofein, taurin, kofein sa taurinom, kofein sa taurinom i etanolom, energetsko piće i energetsko piće sa etanolom. Eksperimentalna postavka, trajanje tretmana i koncentracije testiranih jedinjenja u skladu su sa fiziološki relevantnim parametrima i dostupnim literaturnim podacima (Doyle et al., 2012; Luo, 2021; Serdar et al., 2019). Akutni tretman u trajanju od 24 č. odabran je sa ciljem ispitivanja ranih efekata pojedinačnih komponenti energetskih pića i njihovih kombinacija na ćelije tokom neuralne diferencijacije, u skladu sa pristupom Serdar i sar. (Serdar et al., 2019), koji su takođe primenili 24-časovni tretman kofeinom i taurinom na razvojne oligodendrocite i neurone i pokazali da već kratkotrajna izloženost može izazvati značajne promene u ćelijskoj vijabilnosti, proliferaciji i neuronalnoj morfologiji. Izbor akutnog umesto tretmana koji bi simulirao hroničnu konzumaciju ovih pića omogućava procenu ranih ćelijskih odgovora na izlaganje komponentama energetskih pića, što je posebno relevantno za proučavanje njihove potencijalne neurotoksičnosti tokom razvoja nervnog sistema.

Za analizu efekata navedenih komponenti na NT2-N i NT2-A korišćen je 2D model-sistem neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija (Andrews, 1984; Haile et al., 2014; Pleasure et al., 1992; Sandhu et al., 2002). Nakon indukovane diferencijacije, dobijene su čiste populacije NT2-N i NT2-A koje su tretirane ispitivanim komponentama, a njihov uticaj na ćelijsku morfologiju, vijabilnost i funkcijske karakteristike je analiziran odgovarajućim eksperimentalnim metodama. Ovakav eksperimentalni pristup odabran je jer još uvek ne postoje tehnička rešenja za diferencijaciju NT2/D1 ćelija do stadijuma mešovite kulture NT2-neurona i NT2-astrocita u 3D model-sistemima i njihovu izolaciju iz 3D sistema u formi prečišćenih kultura zrelih NT2-N i NT2-A. Postoji samo nekoliko studija koje su ispitivale efikasnost neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija u 3D model-sistemima (Cacciotti et al., 2017; Kitano & Nakazawa, 2021; Terrasso et al., 2015). S druge strane, protokol za neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelija i izolaciju prečišćenih zrelih NT2-N i NT2-A u 2D model-sistemu je standardizovan, široko korišćen i omogućava efikasnu izolaciju ovih ćelijskih grupa i pouzdanu interpretaciju dobijenih rezultata (Andrews, 1984; Haile et al., 2014; Pleasure et al., 1992; Sandhu et al., 2002).

4.1. Uticaj ispitivanih tretmana na NT2/D1 pluripotentne ćelije i NT2/D1 rane neuralne progenitore gajene u 3D model-sistemima

U cilju izbora najefikasnijeg 3D model-sistema za propagaciju pluripotentnih NT2/D1 ćelija i inicijaciju njihove neuralne diferencijacije indukcijom RK-om u trajanju od 48 č., ćelije su gajene u dva tipa 3D model-sistema:

1. **3D model-sistemi bez nosača** u kojima su ćelije propagirane u neadherentnim uslovima u suspenziji. U uslovima kada je onemogućena adhezija ćelija za podlogu, NT2/D1 ćelije agregiraju i formiraju sfere koje podsećaju na embrioidna tela (Pal & Ravindran, 2006).
2. **3D model-sistemi u alginatnim nosačima** u kojoj su NT2/D1 ćelije imobilisane u alginatnim mikrovlaknima.

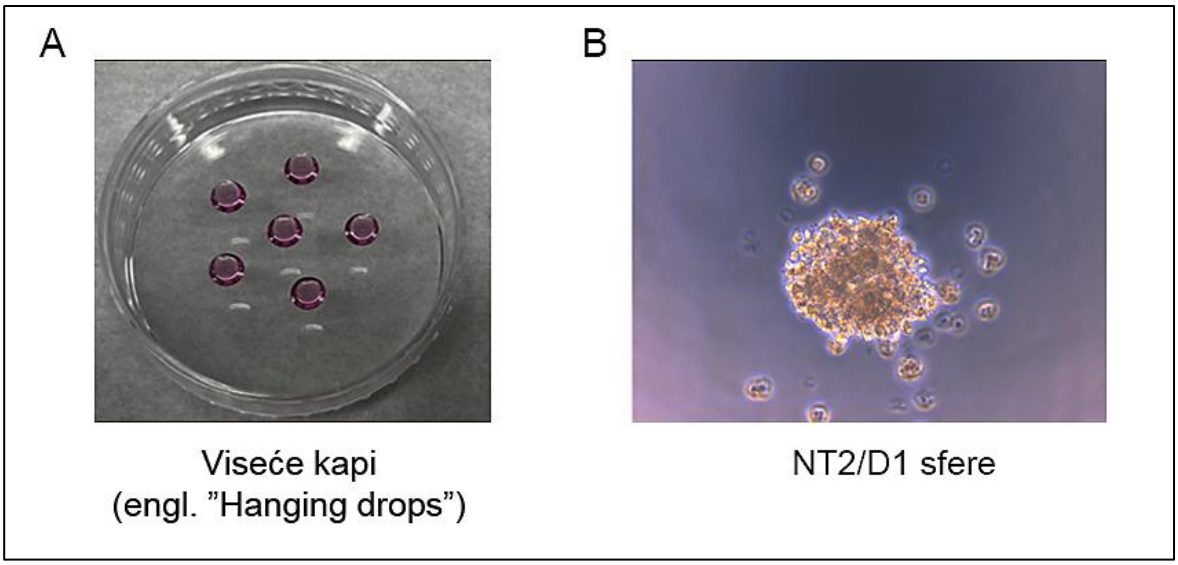
4.1.1. Uticaj ispitivanih tretmana na NT2/D1 rane neuralne progenitore u 3D model-sistemima bez nosača

Za propagaciju NT2/D1 ćelija u 3D model-sistemima bez nosača korišćena su dva metodološka pristupa za formiranje NT2/D1 sfera na neadherentnoj podlozi:

1. Formiranje sfera metodom „Viseće kapi“ (engl. “hanging drop“)
2. Formiranje sfera na agarozi

4.1.1.1. Formiranje NT2/D1 sfera metodom „Viseće kapi“ (engl. “hanging drop“)

U cilju formiranja NT2/D1 sfera i njihove neuralne diferencijacije do stadijuma neuralnih progenitora, NT2/D1 ćelije su gajene po metodologiji „viseće kapi“ (engl. “hanging drop“). U ovom metodu ćelije se gaje u kapljicama medijuma (zapremine 20-40 µl) koje vise sa poklopca Petri šolje i pod uticajem gravitacije i površinskog napona, grupišu se na dnu kapljice formirajući sferne agregate (Slika 8A). Kao što je prikazano na slici 8B, NT2/D1 ćelije su agregirale i formirale sfere. Međutim, rad u ovakvom sistemu je doneo nekoliko tehničkih ograničenja – otežanu manipulaciju sferama formiranim u maloj zapremini bez narušavanja strukture sfere, tehnički zahtevno dodavanje testiranih komponenti u kapljicu, nepravilan oblik sfera (Slika 8B), i nedovoljan broj ćelija dobijenih ovom tehnikom za dalje analize. Ovo su bili preveliki tehnički izazovi za realizaciju eksperimenata pa je u nastavku rada primenjena metodologija formiranja sfera na agaroznoj podlozi.

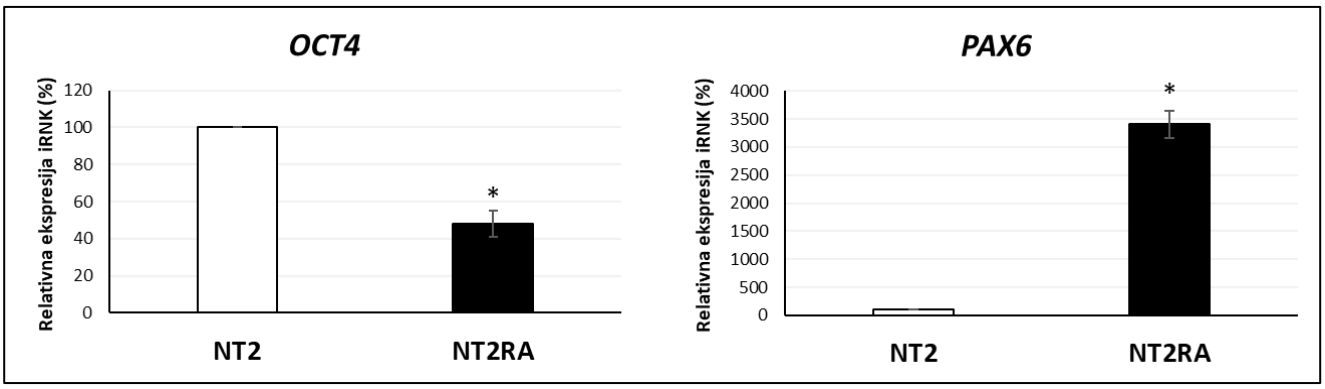


Slika 8. NT2/D1 sfere formirane metodologijom „Viseće kapi“ (engl. “hanging drop“). A) Viseće kapi formirane na poklopcu Petri posude, B) Svetlosna mikroskopija NT2/D1 sfera formiranih u visećim kapima.

4.1.1.2. Efekti ispitivanih tretmana na NT2/D1 rane neuralne progenitore u sferama formiranim na neadherentnoj agaroznoj podlozi

Korišćenjem metodologije formiranja sfera gajenjem ćelija na neadherentnoj podlozi, NT2/D1 ćelije su propagirane u mikroploči sa 48 bunarčića na agaroznoj podlozi koja promoviše formiranje ćelijskih agregata. Sfere (prosečna veličina 453 μm) su formirane 24 č. nakon zasejavanja ćelija a neuralna diferencijacija je indukovana RK-om tokom narednih 48 č.

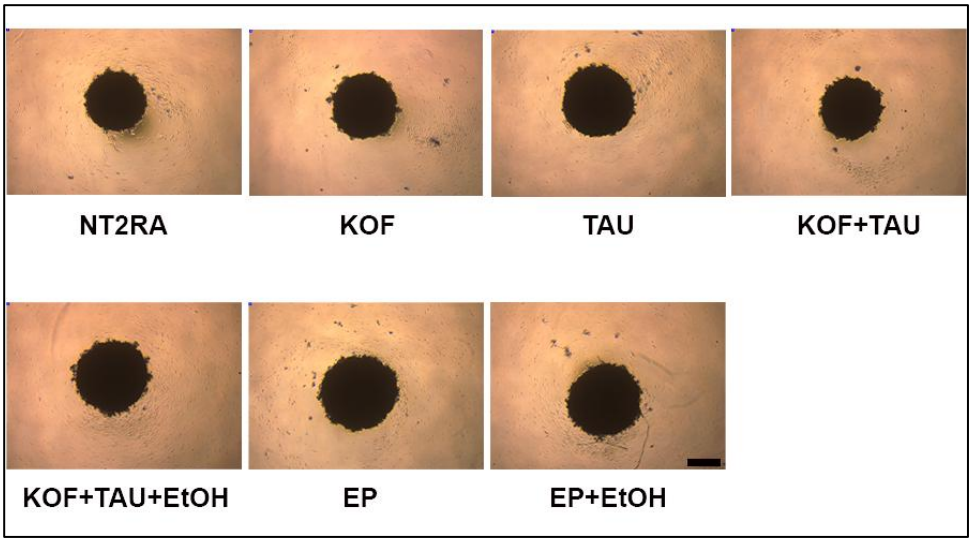
Inicijacija neurogeneze NT2/D1 ćelija i neuralna diferencijacija do stadijuma NT2/D1 ranih neuralnih progenitora proverena je qPCR analizom ekspresije markera pluripotentnosti *OCT4* i markera ranih faza neuralne diferencijacije *PAX6* u ovim ćelijama. Istovremeno praćenje ekspresije *OCT4* i *PAX6* markera omogućava procenu uspešnosti opredeljivanja NT2/D1 ćelija za proces neuralne diferencijacije. OCT4 je ključni marker pluripotentnosti i njegova visoka ekspresija karakteristična je za nediferencirane ćelije sa sposobnošću samoobnavljanja (Topalovic, Schwirtlich, et al., 2017). Tokom inicijacije neuralne diferencijacije dolazi do smanjenja ekspresije markera OCT4, što ukazuje na gubitak pluripotentnog fenotipa i prelazak ćelija ka specijalizovanijim linijama (Topalovic, Schwirtlich, et al., 2017). Nasuprot tome, PAX6 predstavlja marker rane faze neuralne diferencijacije i učestvuje u određivanju neuroektodermalnog identiteta ćelija i formiranju neuralnih progenitora, pa njegovo povećanje ukazuje na usmeravanje ćelija ka neuralnoj diferencijaciji (Zhang et al., 2010). Rezultati analize (Slika 9) su pokazali da su se nakon 48 č. indukcije RK-om ćelije u sferama diferencirale do stadijuma NT2/D1 ranih neuralnih progenitora što je praćeno padom ekspresije markera pluripotentnosti *OCT4* (Slika 9A) i povećanjem ekspresije markera rane faze neuralne diferencijacije *PAX6* (Slika 9B).



Slika 9. Analiza relativne ekspresije A) markera pluripotentnosti *OCT4* i B) markera rane faze neuralne diferencijacije *PAX6* nakon 48 č. indukcije RK-om u NT2/D1 sferama. Eksperimentalni podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD (n=3). NT2 – neindukovane NT2/D1 ćelije. NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

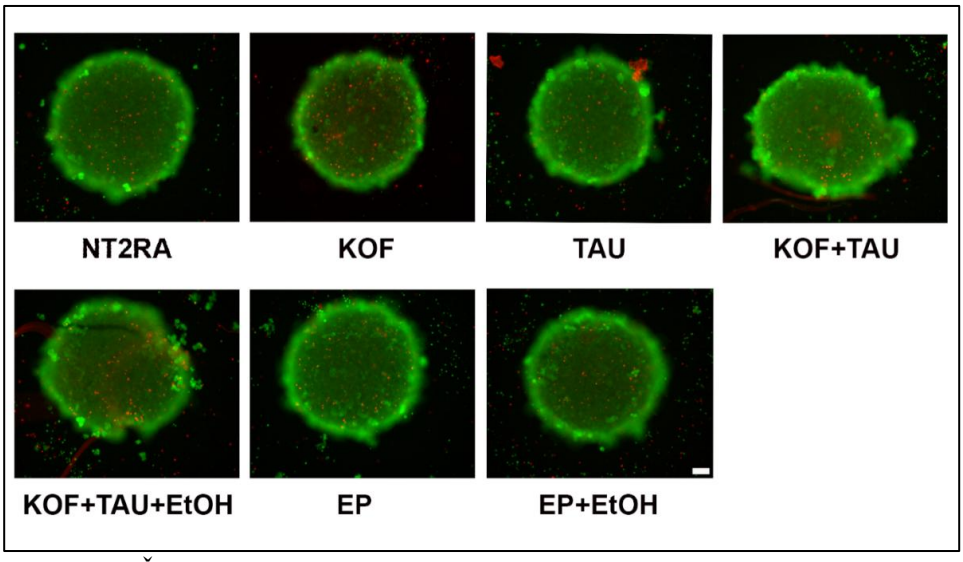
Nakon potvrde ulaska NT2/D1 ćelija u iraverzibilan proces neuralne diferencijacije i prisustva karakteristika ranih neuralnih progenitora u sferama nakon 48 č. indukcije RK-om, analiziran je efekat energetskog pića i energetskog pića sa alkoholom, kao i njihovih komponenti – kofeina, taurina i etanola na ove ćelije. Akutni tretmani NT2/D1 sfera trajali su 24 č. i obuhvatili su sledeće eksperimentalne grupe: KOF – kofein, TAU – taurin, KOF+TAU – kofein+taurin, KOF+TAU+EtOH – kofein+taurin+alkohol, EP – energetsko piće, EP+EtOH – energetsko piće+alkohol. Netretirane NT2/D1 sfere indukovane RK-om 48 č. bile su kontrola.

Uticaj akutnih tretmana na vijabilnost NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u sferama, analiziran je bojenjem sfera MTT agensom koji se u metabolički aktivnim, živim ćelijama redukuje u tamno ljubičasti formazan. Rezultati su pokazali da nakon ispitivanih tretmana ćelije u sferama ostaju vijabilne i veličina sfera ostaje nepromenjena (prosečna veličina 453 μm), (Slika 10).



Slika 10. Bojenje sfera MTT agensom, redukovanim u formazan u vijabilnim ćelijama, nakon 24 č. akutnih tretmana: KOF – kofein, TAU – taurin, KOF+TAU – kofein+taurin, KOF+TAU+EtOH – kofein+taurin+alkohol, EP – energetsko piće, EP+EtOH – energetsko piće+alkohol. Skala: 200 µm. NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

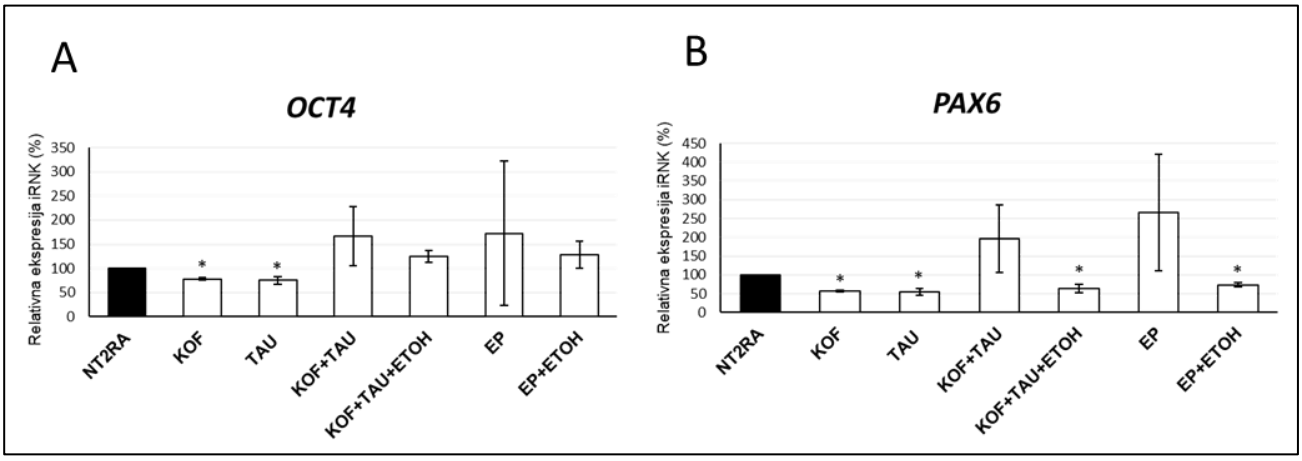
Dobijeni rezultati su potvrđeni korišćenjem ŽIVO/MRTVO eseja u kom su sfere istovremeno obojene fluorescentno zelenim kalceinom koji boji žive ćelije i crvenim BOBO-3 jodidom koji boji mrtve ćelije (Slika 11). Rezultati ukazuju da akutni tremani navedenim komponentama ne utiču na vijabilnost ranih neuralnih progenitora u sferama (malo mrtvih ćelija se uočava u sferama nakon tretmana u odnosu na zastupljenost živih ćelija), (Slika 11).



Slika 11. ŽIVO/MRTVO esej NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u sferama nakon 24 č. akutnih tretmana: KOF – kofein, TAU – taurin, KOF+TAU – kofein+taurin, KOF+TAU+EtOH – kofein+taurin+alkohol, EP – energetsko piće, EP+EtOH – energetsko piće+alkohol. Skala: 50 µm. NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

Analiza uticaja primenjenih tretmana na NT2/D1 rane neuralne progenitore (Slike 10 i 11) pokazala je da nijedan od primenjenih tretmana nije izazvao značajniji pad vijabilnosti ovih ćelija.

U narednom eksperimentu ispitan je efekat primenjenih tretmana na ekspresiju *OCT4* i *PAX6* u NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima u sferama (Slika 12). Nakon tretmana kofeinom i taurinom, kao pojedinačnim komponentama, uočeno je značajno smanjenje ekspresije *OCT4* (Slika 12A), dok se kod većine ostalih tretmana izuzev tretmana energetskim pićem (EP) može uočiti trend povećanja ekspresije ovog gena. Ekspresija gena *PAX6* je značajno smanjena kod većine tretmana osim kombinovanog tretmana kofeinom i taurinom, kao i energetskim pićem, gde je prisutan trend povećanja ekspresije gena (Slika 12B).



Slika 12. Analiza relativne ekspresije A) markera pluripotentnosti *OCT4* i B) markera rane faze neuralne diferencijacije *PAX6* kod NT2/D1 ranih neuralnih progenitora nakon 24 č. akutnih tretmana: KOF – kofein, TAU – taurin, KOF+TAU – kofein+taurin, KOF+TAU+EtOH – kofein+taurin+alkohol, EP – energetsko piće, EP+EtOH – energetsko piće+alkohol. Eksperimentalni podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD (n=3). NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

Prikazani rezultati pokazuju da je metod formiranja sfera na neadherentnoj podlozi efikasniji u odnosu na metodu „viseće kapi“ (engl. “hanging drop“). Međutim i ova metoda nosi nekoliko tehničkih izazova. Razlike u veličini i obliku sfera uslovljavaju nejednak transport materija kroz površinske i unutrašnje delove sfere a zahtevna mehanička manipulacija može dovesti do destrukcije sfera, Naročito je teško pratiti fluorescentna bojenja sfera jer ćelije na površini brzo preuzimaju i metabolišu boju pre nego što dospe do ćelija u dubljim delovima sfere, fenomen poznat kao proces ograničene potrošnje (Achilli et al., 2014). Ovi faktori značajno utiču na konzistentnost i ponovljivost eksperimenata i pravilno tumačenje dobijenih rezultata.
Zbog navedenih izazova u tehničkoj realizaciji eksperimenta i pojave nekonzistentnih i nereproducibilnih rezultata razvijen je 3D model-sistem NT2/D1 ćelija imobilisanih u alginatna mikrovlakna.

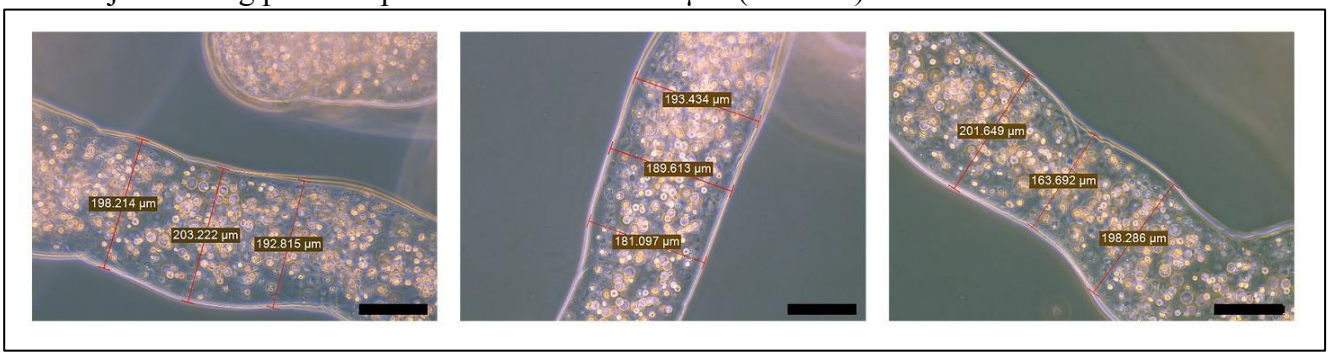
4.1.2. Efekti ispitivanih tretmana na pluripotentne NT2/D1 ćelije imobilisane u alginatnim mikrovlaknima

U cilju ispitivanja efekata energetskih pića (EP) i njihove kombinacije sa alkoholom (EP+EtOH) na NT2/D1 pluripotentne ćelije, najpre su optimizovani uslovi za imobilizaciju i propagaciju NT2/D1 ćelija u 3D model-sistemu alginatnih mikrovlakana. Nakon optimizacije, u ovom sistemu je ispitan uticaj testiranih komponenti na pluripotentne NT2/D1 ćelije.

4.1.2.1. Imobilizacija pluripotentnih NT2/D1 ćelija u alginatna mikrovlakna

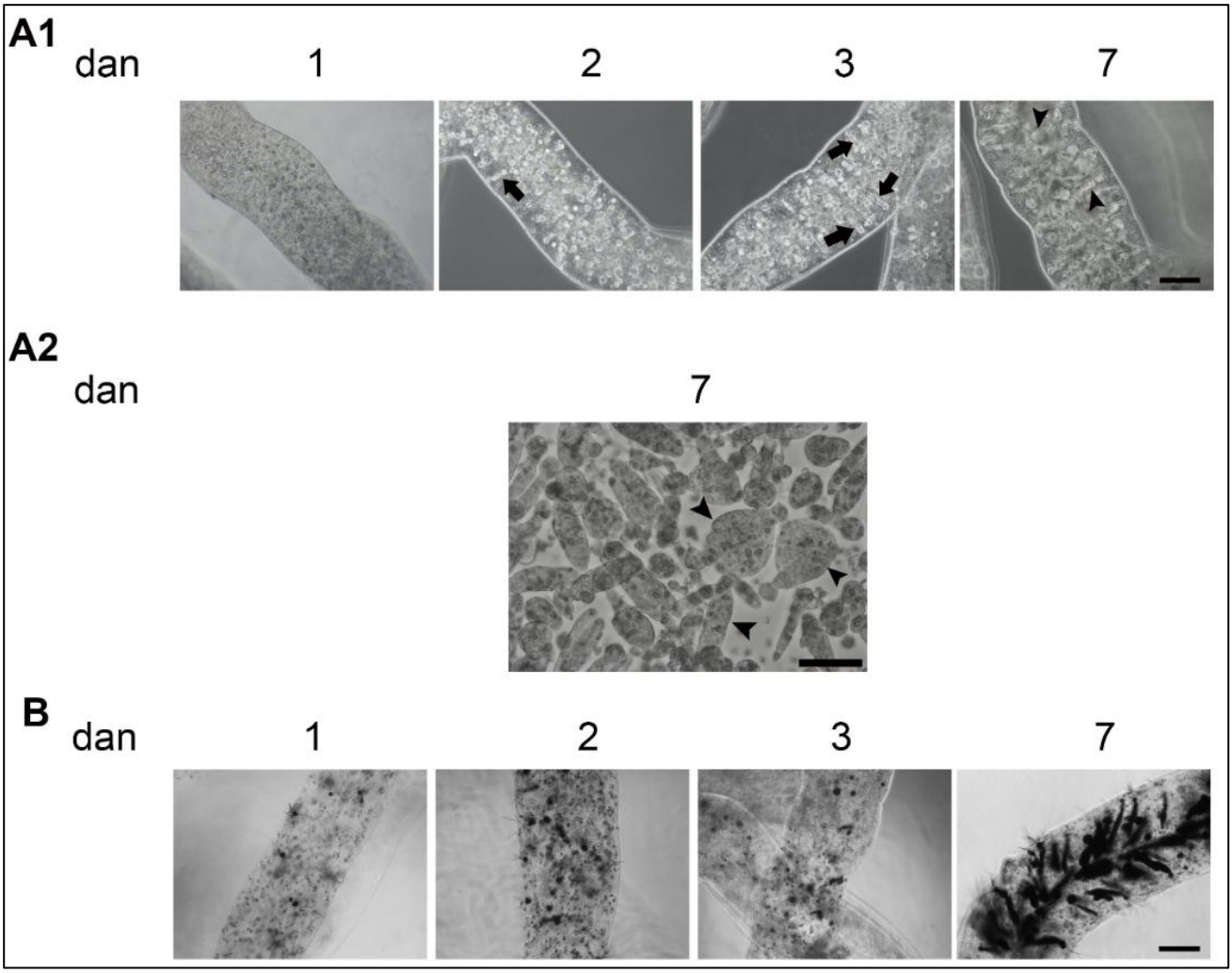
U cilju dobijanja 3D model-sistema sa imobilisanim NT2/D1 ćelijama u alginatnim nosačima, NT2/D1 pluripotentne ćelije su imobilisane u alginatna mikrovlakna manuelnom ekstruzijom suspenzije ćelija u

alginatu (5×10^6 ćelija/ml, 1,5 mas. % alginata) kroz čeličnu iglu dijametra 25G sa tupom ivicom (Small Parts Inc., SAD) u rastvor koji sadrži Ca^{2+} jone (0.18 M $CaCl_2x2H_20$). Formirana alginatna mikrovlakna su bila ujednačenog prečnika prosečne vrednosti 190 µm (Slika 13).



Slika 13. Reprezentativne svetlosne mikrografije alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim NT2/D1 pluripotentnim ćelijama 24 č. nakon imobilizacije. Prečnik vlakana je određen u programu Leica LAS v4.12 Software. Skala: 100 µm.

Alginatna mikrovlakna sa imobilisanim ćelijama su kultivisana u standardnim uslovima ćelijske kulture sedam dana. Tokom tog perioda svetlosnom mikroskopijom su praćeni morfologija, proliferacija i agregacija pluripotentnih NT2/D1 ćelija (Slika 14A1 i A2). Uočena je ravnomerna distribucija i povećanje broja NT2/D1 ćelija tokom sedam dana propagacije u alginatnim mikrovlaknima pri čemu je 3D okruženje dovelo do promene ćelijske morfologije – okrugli oblik karakterističan za ćelije u 3D kulturi posledica je odsustva adhezije ćelija za dno posude u kojima se gaje ćelije u 2D kulturi. Takođe, uočena je agregacija ćelija i formiranja ćelijskih klastera unutar vlakana (Slika 14A1 i 14A2).

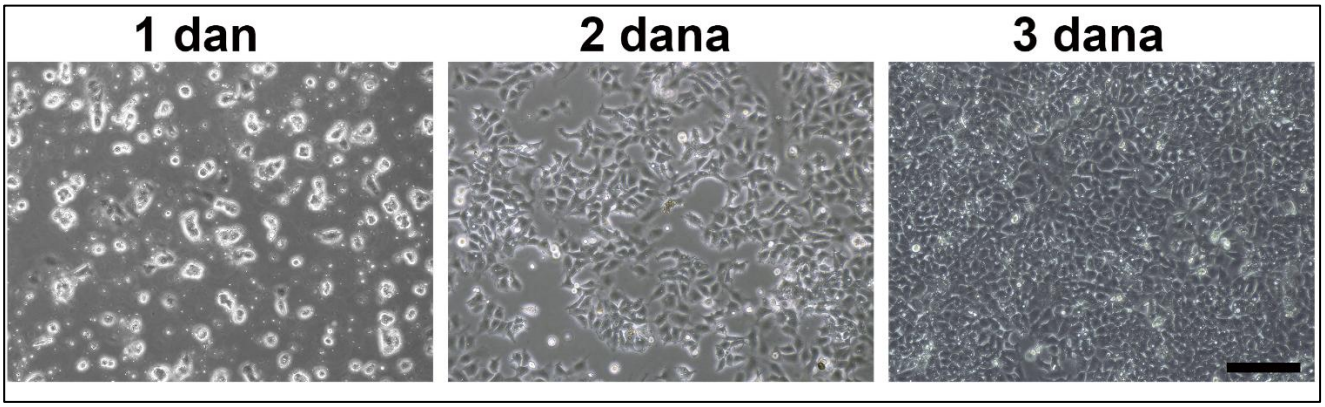


Slika 14. Reprezentativne slike alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim pluripotentnim NT2/D1 ćelijama tokom sedam dana propagacije u alginatnim mikrovlaknima. A1) Svetlosna mikroskopija pluripotentnih NT2/D1 ćelija u alginatnim mikrovlaknima u naznačenim vremenskim intervalima. Crne strelice na slikama na panelu A1 označavaju mesta početka agregacije ćelija drugog i trećeg dana i ćelijske klastere formirane sedmog dana propagacije. Skala: 100 μm. A2) NT2/D1 ćelije oslobođene nakon sedam dana propagacije iz alginatnih mikrovlakana. Crni vrhovi strelica pokazuju ćelijske klastere u kojima su ćelije ostale agregirane i nakon rastvaranja alginatnih mikrovlakana u postupku fiksacije. Skala: 50 μm. B) NT2/D1 ćelije obojene formazanom u alginatnim mikrovlaknima u naznačenim vremenskim intervalima. Skala: 100 μm.

Kako bi potvrdili da su NT2/D1 ćelije unutar alginatnih mikrovlakana vijabilne, urađen je MTT esej. Rezultati ovog eksperimenta su pokazali da se količina formazana, nastalog redukcijom MTT-a u metabolički aktivnim, živim ćelijama, povećava tokom sedam dana propagacije ćelija u alginatnim mikrovlaknima (Slika 14B). Takođe, ovim bojenjem je potvrđeno ono što smo uočili svetlosnom mikroskopijom, da se nakon jednog dana u vlaknima uočavaju pojedinačne, okrugle ćelije, dok drugog i trećeg dana dolazi do ćelijske agregacije koja se sedmog dana manifestuje formiranjem ćelijskih klastera (Slika 14B).

S obzirom na to da se za oslobađanje ćelija iz alginatnih mikrovlakana koristi natrijum-citrat (Na-citrat), za koji je pokazano da pri višim koncentracijama može ispoljiti citotoksične efekte na pojedine ćelijske tipove (Vo et al., 2020; Wu et al., 2024), kao i da NT2/D1 ćelije pokazuju senzitivnost na citoredukcione

agense (Burger et al., 1998), ispitivan je uticaj procedure oslobađanja ćelija iz alginatnih mikrovlakana na njihovo preživljavanje i na sposobnost adhezije i proliferacije u 2D kulturi nakon oslobađanja. Broj preživelih NT2/D1 ćelija nakon oslobađanja iz alginatnih mikrovlakana je bio 1,5 × 10^6 ćelija/ml alginata. Inicijalno u alginatna mikrovlakna je imobilisano 5 × 10^6 ćelija/ml alginata. Dobijeni rezultati ukazuju da je u procesu oslobađanja NT2/D1 ćelija iz alginata došlo do gubitka 70% ćelija. Ovakvo smanjenje broja preživelih NT2/D1 ćelija ukazuje na to da Na-citrat doprinosi smanjenju ćelijske vijabilnosti tokom postupka oslobađanja i u skladu su sa prethodno opisanim studijama (Pejic et al., 2025; Rodriguez et al., 2020) u kojima je pokazano značajno smanjenje broja ćelija prilikom oslobađanja iz alginatnih mikrokuglica ovom metodom.
NT2/D1 ćelije oslobođene iz alginatnih mikrovlakana zasejane su u Petri posude i propagirane u 2D uslovima. Kao što je prikazano na slici 15, nakon zasejavanja i propagacije ćelije su zadržale sposobnost adhezije za dno suda u kome se gaje i proliferativni kapacitet da formiraju konfluentan sloj tri dana nakon oslobađanja (Slika 15, 1 dan, 2 dana i 3 dana).



Slika 15. Svetlosna mikroskopija NT2/D1 ćelija nakon oslobađanja iz alginatnih mikrovlakana tokom tri dana propagacije u 2D uslovima. Skala: 100 μm.

4.1.2.2. Matematičko modelovanje prenosa mase kofeina, taurina i etanola kroz alginatna mikrovlakna sa imobilisanim pluripotentnim NT2/D1 ćelijama

U cilju procene efikasnosti transporta komponenti prisutnih u energetskom piću i energetskom piću sa alkoholom, kofeina i taurina i etanola, kroz alginatna mikrovlakna, u koja su imobilisane pluripotentne NT2/D1 ćelije, primenjeno je matematičko modelovanje prenosa mase kroz jedno mikrovlakno u statičnim uslovima. Da bi se procenilo da li svojstva alginatnog hidrogela nameću ograničenja prenosa mase, usvojen je prethodno razvijen model-sistem prenosa mase (Radonjić et al., 2022), kako bi se predvideli profili koncentracije kofeina, taurina i etanola unutar alginatnog mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama. Ukratko, model-sistem je zasnovan na pretpostavci da se spoljašnji otpor prenosa mase na površini mikrovlakana može zanemariti i da je prenos mase unutar mikrovlakana faktor koji ograničava brzinu. Definisane su sledeće pretpostavke (Radonjić et al., 2022): 1) mikrovlakno je cilindrično; 2) prečnik mikrovlakana je konstantan; 3) supstanca čiji se prenos mase modeluje se troši konstantnom brzinom po ćeliji, nakon hemijske reakcije nultog reda; 4) koncentracija modelujuće supstance u medijumu, a samim tim i na površini mikrovlakana, je konstantna; 5) prenos mase se odvija isključivo u radijalnom smeru. Unutrašnji transport mase kroz alginatno mikrovlakno opisan je sledećom jednačinom difuzione reakcije (Radonjić et al., 2022):

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{D}{r}\frac{\partial}{\partial r}\left(r\frac{\partial c}{\partial r}\right) - \rho q \qquad (1)$$

D predstavlja koeficijent difuzije supstance koja se modeluje; **r** označava radijalnu koordinatu od centra mikrovlakana; **q** je brzina potrošnje supstance po ćeliji; **ρ** označava broj ćelija po jedinici zapremine mikrovlakana.
Rešenje parcijalne diferencijalne jednačine (1) postignuto je numerički, korišćenjem funkcije „pdepe“ u programu MATLAB R2018a (MathWorks Inc., SAD).

4.1.2.2.1. Početni i granični uslovi

Za sve tri modelujuće supstance (kofein, taurin i etanol), početna koncentracija u mikrovlaknu bila je jednaka nuli, što daje sledeći početni uslov:

$$t = 0 \qquad 0 \leq r \leq R \qquad c = 0$$

gde je **R** poluprečnik alginatnog mikrovlakna.
U skladu sa pretpostavkom o cilindričnoj geometriji mikrovlakna, granični uslov simetrije je postavljen duž ose mikrovlakna:

$$r = 0 \qquad \frac{\partial c}{\partial r} = 0$$

Na spoljašnjoj granici mikrovlakna pretpostavljena je konstantna koncentracija, jednaka onoj u medijumu (c_m):

$$r = R \qquad c = c_m$$

4.1.2.2.2. Parametri model-sistema

Za prečnik mikrovlakana je uzeta vrednost od 190 μm, na osnovu prosečne vrednosti dobijene iz najmanje 15 merenja. Koncentracija ćelija po jedinici zapremine je definisana kao 5×10^6 ćelija/cm^3, na osnovu početnog broja ćelija.

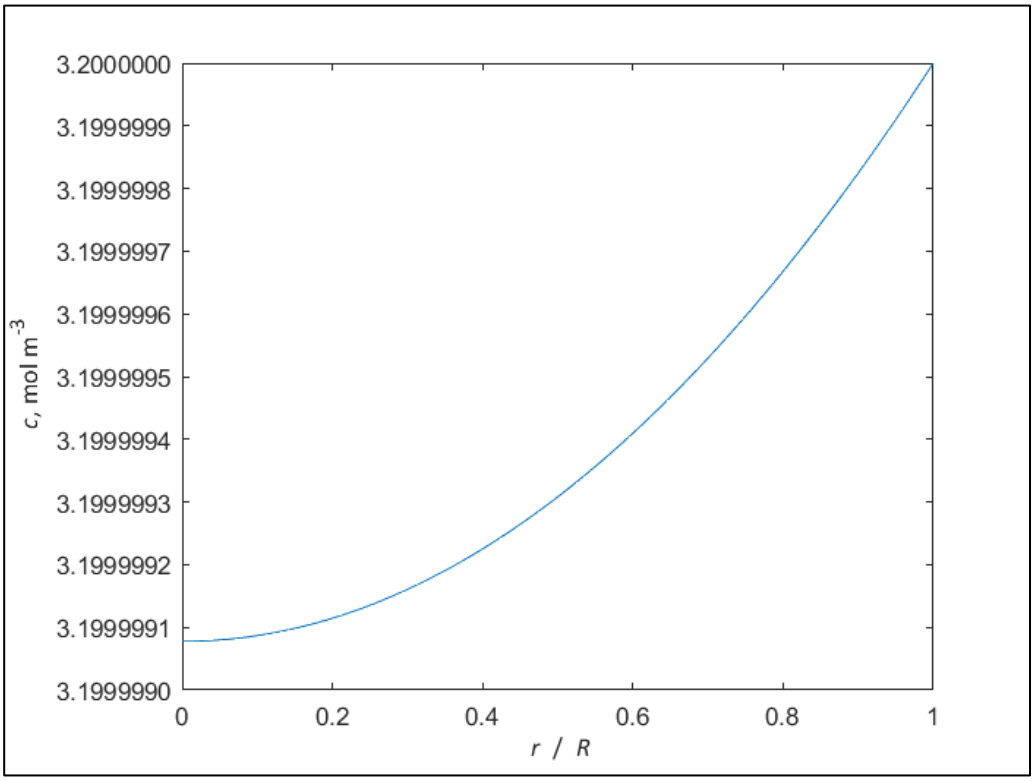
4.1.2.2.3. Modelovanje transporta kofeina

Koeficijent difuzije kofeina usvojen je kao $5{,}01\times10^{-7}$ cm^2/s, kako je navedeno u literaturi za difuziju kofeina u anjonskim hidrogelovima (Chern et al., 2004), dok je koncentracija kofeina u medijumu za kultivaciju bila 0,16 mM nakon tretmana čistim kofeinom ili energetskim pićem. Iz literature je poznato da kofein u fiziološki relevantnim koncentracijama ne ulazi u pluripotentne ni neuralne ćelije već deluje preko adenozinskih receptora (Reddy et al., 2024), te je stoga član potrošnje u jednačini (1) izostavljen. Matematički model-sistem je rešen korišćenjem prostornog koraka veličine $\Delta r = 0.96$ μm i vremenskog koraka od $\Delta t = 0.25$ s.
Rezultati modelovanja su pokazali da je stacionarno stanje dostignuto nakon 343 s, kada je koncentracija kofeina u središtu mikrovlakana dostigla koncentraciju u medijumu za kultivaciju ćelija. Ovaj rezultat implicira efikasan prenos mase kofeina kroz celo mikrovlakno pri standardnim uslovima 3D ćelijske kulture.

4.1.2.2.4. Modelovanje transporta taurina

Koeficijent difuzije taurina usvojen je kao $5{,}1\times10^{-6}$ cm^2/s, prema literaturnim podacima za glukozu (M=180,16 g/mol) (Estapé et al., 1992) koja je mali, polarni molekul, sa sličnom molekulskom masom kao taurin (MW=125,14 g/mol). Koncentracija taurina u medijumu za kultivaciju bila je 3,2 mM nakon tretmana čistim taurinom ili energetskim pićem. U literaturi ne postoje dostupni podaci o potrošnji taurina od strane pluripotentnih ćelija. Jedini dostupni literaturni podaci o brzini potrošnje taurina po ćeliji u slučaju neuralnih ćelija odnose se na ćelijsku liniju glioblastoma čoveka SF-295 i iznosi 0,150 fmol ćelija^{-1} h^{-1} (srednja vrednost dva merenja: 0,097 i 0,203 fmol ćelija^{-1} h^{-1}, preuzeto iz Supplement Database_S1, Jain et al., 2012) (Jain et al., 2012). Ovi parametri su usvojeni za modelovanje transporta taurina u alginatnom mikrovlaknu. Takođe je važno napomenuti da je pretpostavka o konstantnoj koncentraciji taurina u medijumu zasnovana na proračunima koji pokazuju da je vreme potrebno za potpunu potrošnju taurina od strane ćelija znatno duže od trajanja eksperimenta, i stoga zanemarljivo u okviru eksperimentalnog vremenskog okvira. Matematički model-sistem je rešen korišćenjem

prostornog koraka veličine Δr= 0,96 μm i vremenskog koraka veličine Δt= 0,25 s. Profil koncentracije taurina je prikazan kao funkcija normalizovane radijalne udaljenosti (Slika 16).



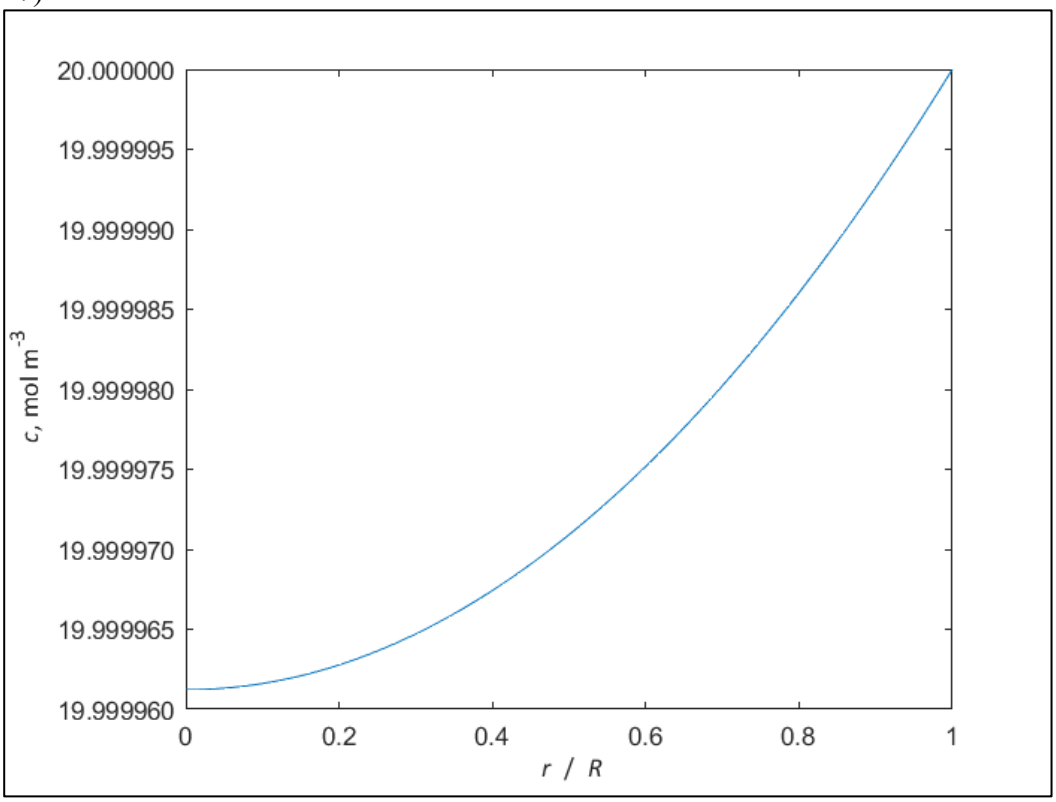
Slika 16. Profil koncentracije taurina u alginatnom mikrovlaknu. Koncentracija taurina je predstavljena u odnosu na normalizovanu radijalnu udaljenost unutar mikrovlakna (r/R) u stacionarnom stanju (R predstavlja poluprečnik mikrovlakna, r/R=0 označava centralnu osu mikrovlakna, a r/R=1 označava njegovu spoljašnju površinu).

Simulacijom prenosa taurina je pokazano da se stabilno stanje dostiže nakon 33 sekunde, kada je koncentracija taurina u centru mikrovlakana dostigla vrednost koncentracije medijumu za kultivaciju. Daljim modelovanjem prenosa taurina, uzimajući u obzir eksperimentalnu postavku i period izlaganja od 24 č., pokazano je da je nakon 24 č. koncentracija taurina u celom mikrovlakanu ostala jednaka onoj u okolnom medijumu.

4.1.2.2.5. Modelovanje transporta etanola

Za modelovanje transporta etanola kroz alginatna mikrovlakna, koeficijent difuzije je definisan kao $9{,}6\times10^{-6}$ cm²/s, prema literaturnim podacima za koeficijent difuzije etanola u 2 mas. % alginatnom hidrogelu (Estapé et al., 1992). Koncentracija etanola bila je 20 mM u medijumu za kultivaciju nakon dodavanja etanola u kombinaciji sa kofeinom i taurinom, kao i u kombinaciji sa energetskim pićem. Kao i u slučaju taurina, u nedostatku literaturnih podataka o potrošnji etanola u pluripotentnim ćelijama usvojena je najviša izračunata vrednost brzine potrošnje kiseonika u humanim mezenhimskim matičnim ćelijama (engl. hMSC–human Mesenchymal Stem Cells) od 0,012 μmol 10^{-6} ćelija^{-1} h^{-1} (Zhao et al., 2005). Brzina potrošnje kiseonika korišćena je kao aproksimacija metaboličke aktivnosti ćelija, zbog nedostatka podataka o potrošnji etanola u ispitivanom model-sistemu, pri čemu je dodatno uzeto u obzir da kiseonik i etanol, kao mali molekuli, dimenzija istog reda veličine, mogu imati uporedive difuzione karakteristike u sistemima hidrogelova. Takođe, kao u slučaju taurina, pretpostavka o konstantnoj koncentraciji etanola u medijumu zasnovana je na proračunima koji pokazuju da je vreme potrebno za

potpunu potrošnju od strane ćelija znatno duže od trajanja eksperimenta. Matematički model je rešen korišćenjem prostornog intervala veličine Δr= 0,96 μm i vremenskog koraka od Δt = 0,25 s. Profil koncentracije etanola u mikrovlaknu je prikazan kao funkcija normalizovane radijalne udaljenosti (Slika 17).



Slika 17. Profil koncentracije etanola je predstavljen u odnosu na normalizovanu radijalnu udaljenost unutar mikrovlakana (r/R) u stacionarnom stanju (R predstavlja poluprečnik mikrovlakana, r/R=0 označava centralnu osu mikrovlakana, a r/R=1 označava njegovu spoljašnju površinu).

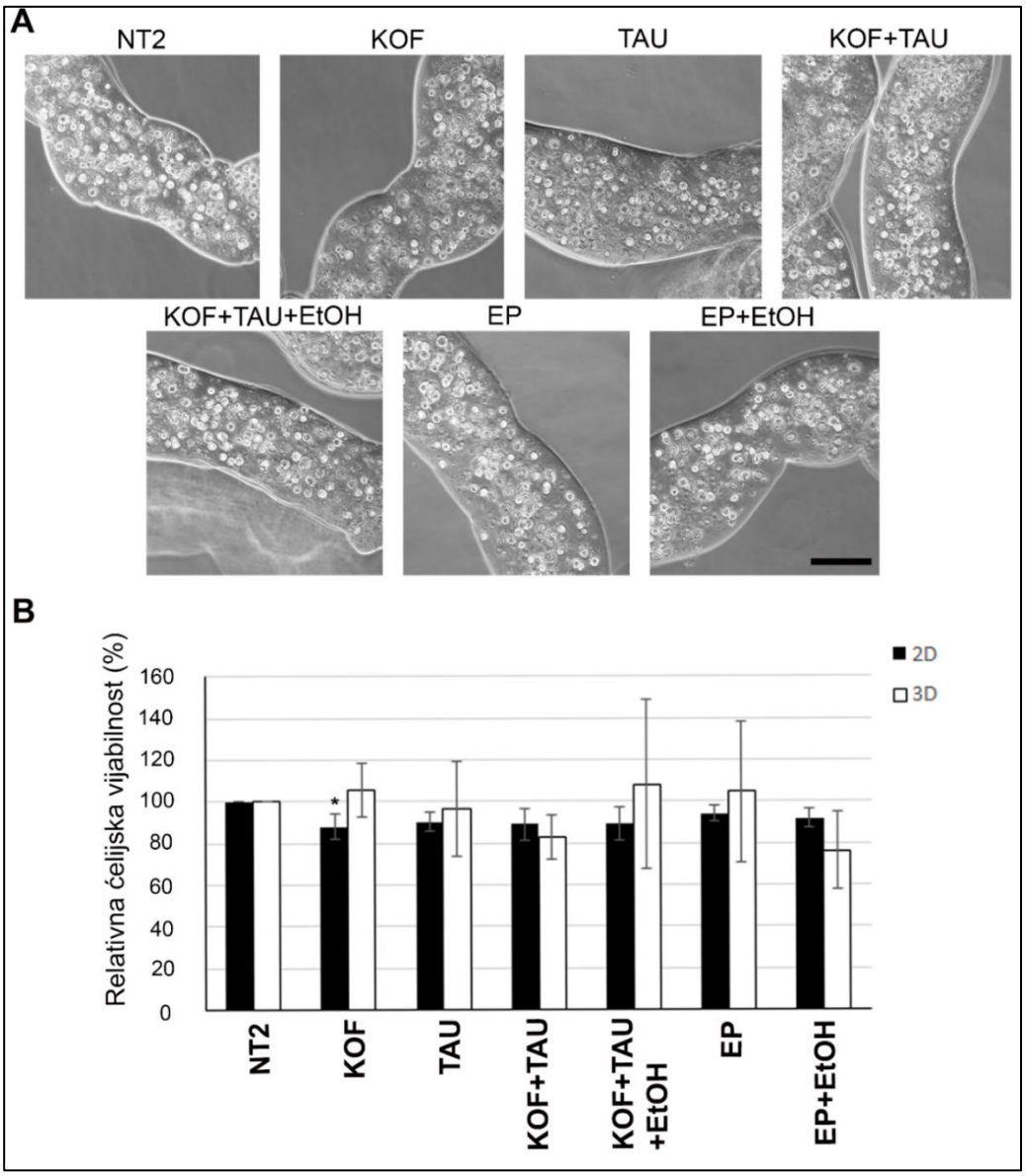
Koncentracija etanola u centru mikrovlakna dostiže koncentraciju etanola u medijumu za samo 22 sekunde, što pokazuje visoko efikasan prenos etanola kroz celo vlakno. Modelovanjem prenosa etanola za period od 24 č., utvrđeno je da je koncentracija etanola unutar mikrovlakna ostala istovetna kao i koncentracija etanola u okolnom medijumu.
Rezultati modelovanja su pokazali efikasan prenos mase sve tri ispitivane supstance, kofeina, taurina i etanola, unutar 3D model-sistema NT2/D1 ćelija imobilisanih u alginatna mikrovlakna u standardnim uslovima ćelijske kulture.

4.1.2.3. Uticaj ispitivanih tretmana na vijabilnost pluripotentnih NT2/D1 ćelija u 3D model-sistemu alginatnih mikrovlakana

NT2/D1 ćelije su imobilisane u alginatna mikrovlakna i tretirane 24 č. nakon imobilizacije sledećim komponentama i njihovim kombinacijama: kofein (KOF); taurin (TAU); kofein i taurin zajedno (KOF+TAU); kofein i taurin u kombinaciji sa alkoholom (KOF+TAU+EtOH); energetsko piće (EP); energetsko piće u kombinaciji sa alkoholom (EP+EtOH) tokom 24 č. (akutni tretman).
Najpre je provereno da li tretmani utiču na integritet alginatnih mikrovlakana i morfologiju imobilisanih ćelija u njima korišćenjem svetlosne mikroskopije. Rezultati prikazani na Slici 18A pokazuju da su struktura i integritet alginatnih mikrovlakana ostali očuvani nakon tretmana, i da su NT2/D1 ćelije

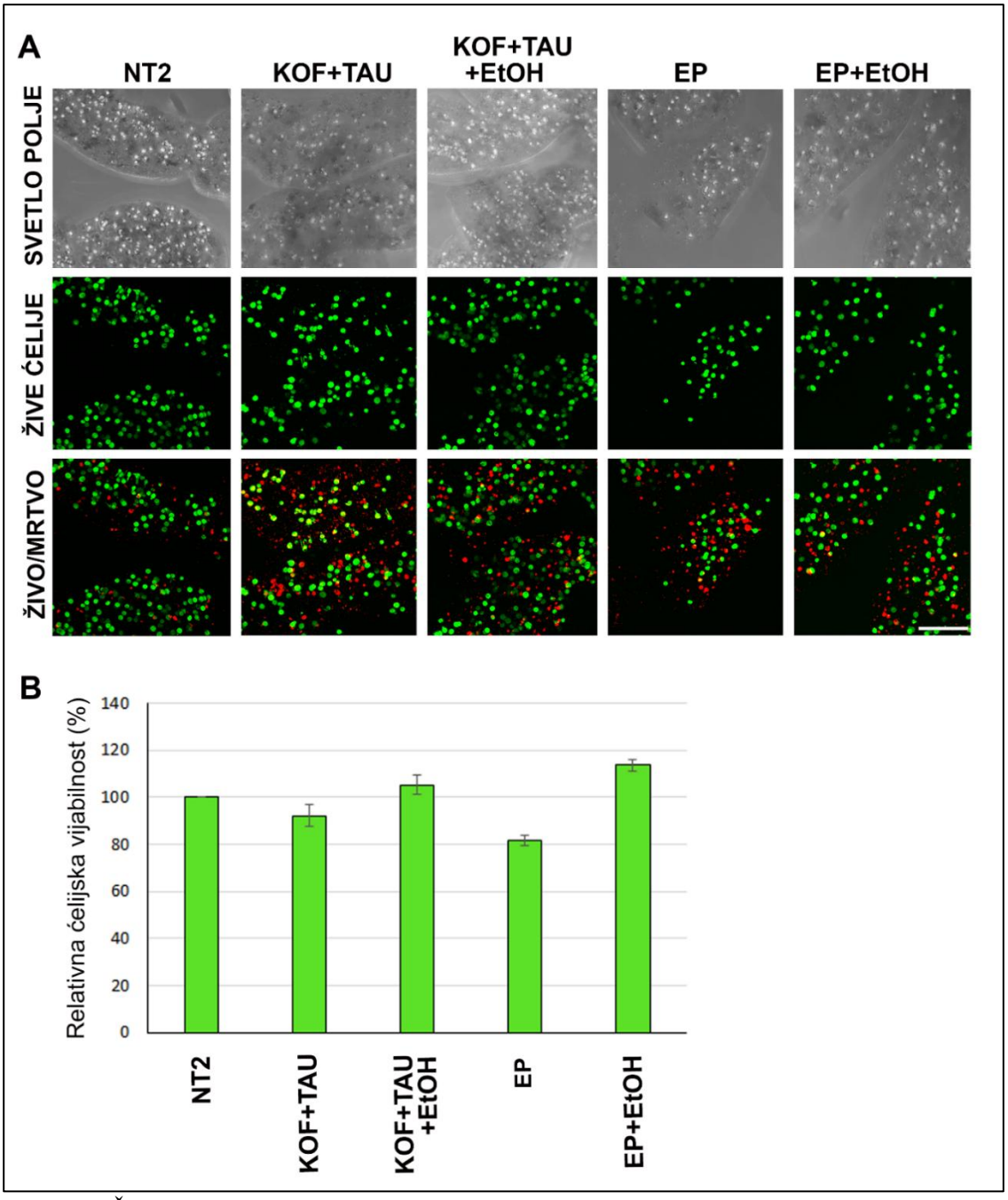
sačuvale morfologiju i uniformnu distribuciju u mikrovlaknu u poređenju sa netretiranom kontrolom (NT2).

Za praćenje efekata tretmana na preživljavanje pluripotentnih NT2/D1 ćelija u alginatnim mikrovlaknima korišćen je MTT esej (Slika 18B). Paralelno sa eksperimentima u alginatnim mikrovlaknima (3D model-sistem), svi tretmani, u istoj eksperimentalnoj postavci, su urađeni na ćelijama gajenim u adherentnim uslovima (2D model-sistem), (Slika 18B).



Slika 18. Pluripotentne NT2/D1 ćelije imobilisane u alginatnim mikrovlaknima i tretirane 24 č. naznačenim tretmanima: KOF – kofein; TAU – taurin; KOF+TAU – kofein+taurin; KOF+TAU+EtOH – kofein+taurin+alkohol; EP – energetsko piće; EP + EtOH – energetsko piće+alkohol. A) Svetlosna mikroskopija pluripotentnih NT2/D1 ćelija u alginatnim mikrovlaknima nakon naznačenih tretmana. NT2 – kontrolne netretirane ćelije. Skala: 100 μm. B) Vijabilnost NT2/D1 ćelija gajenih 24 č. u monosloju (2D) ili u alginatnim mikrovlaknima (3D) nakon 24 č. tretmana određena upotrebom MTT testa. Vrednosti uzoraka su normalizovane u odnosu na vrednosti odgovarajućih kontrola, 2D NT2/D1 ili 3D NT2/D1, kojima je dodeljena vrednost 100%. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti ± SD tri nezavisna eksperimenta. Zvezdica (*) označava $p < 0,05$. NT2 – NT2/D1 kontrolne netretirane ćelije.

Dobijeni rezultati ukazuju da u 3D model-sistemu nijedan od tretmana ne utiče na vijabilnost pluripotentnih NT2/D1 ćelija (Slika 18B). Blagi trend smanjenja vijabilnosti ćelija u 2D model-sistemu uočava se kod svih tretmana osim u slučaju kofeina gde je detektovan statistički značajan pad vijabilnost (~12%), (Slika 18B). Ovi rezultati ukazuju na različit ćelijski odgovor na tretmane u uslovima gajenja ćelija u 2D i 3D model-sistemima. Podaci iz literature ukazuju da je 3D okruženje protektivnije za gajenje ćelija u poređenju sa 2D okruženjem. Ovaj protektivni efekat nastaje usled stvaranja vanćelijskog matriksa i njegove interakcije sa ćelijama kao i zbog uspostavljanja fiziološki relevantnijih međućelijskih interakcija karakterističnih za 3D mikrosredinu (Kapałczyńska et al., 2018).
U nastavku analize, vijabilnost pluripotentnih NT2/D1 ćelija u 3D model-sistemu nakon kombinovanih tretmana – KOF+TAU, KOF+TAU+EtOH, EP i EP+EtOH, analizirana je pomoću ŽIVO/MRTVO eseja. Kao što je prikazano na Slici 19A, vijabilne ćelije, obojene zeleno, bile su uniformno raspoređene unutar mikrovlakana (Slika 19A), a kvantifikacija ŽIVO/MRTVO eseja je pokazala da nije došlo do statistički značajnog pada vijabilnosti nakon tretmana (Slika 19B).

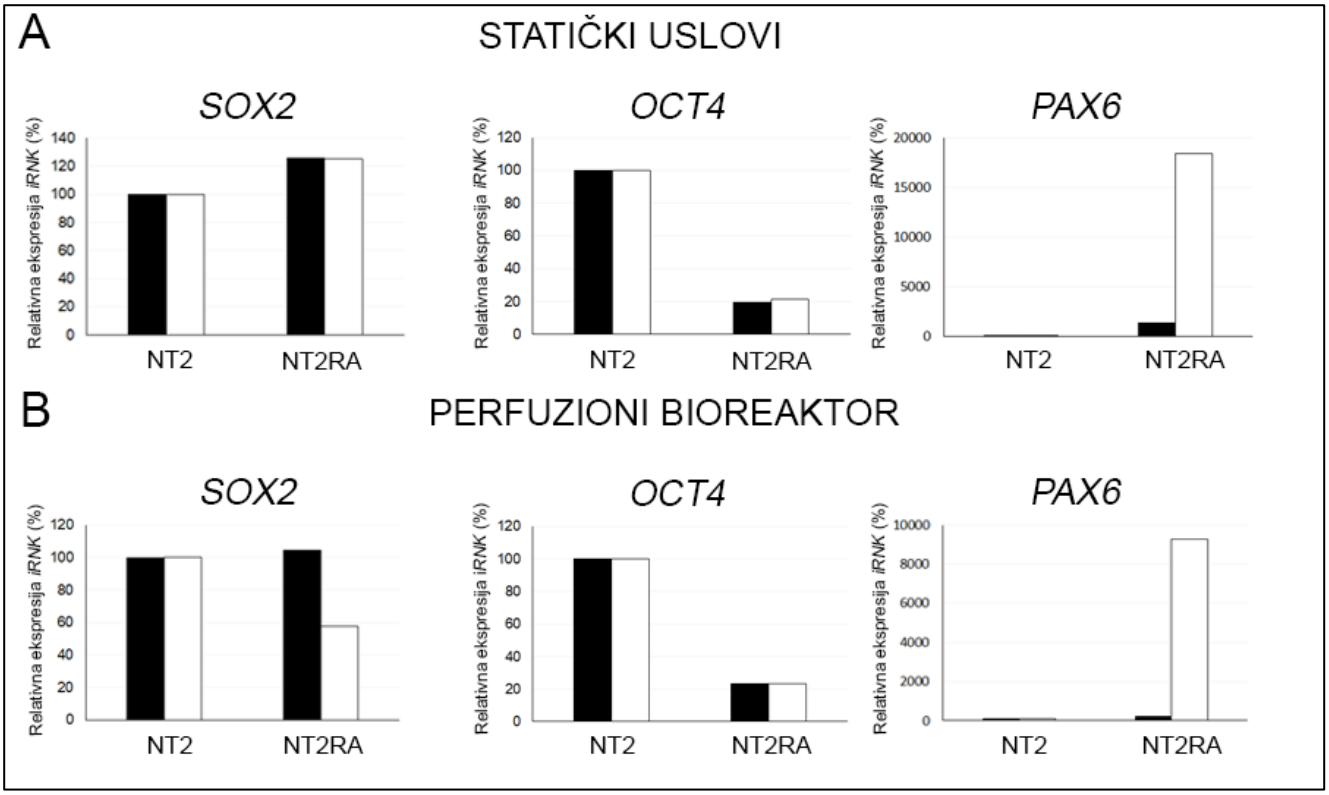


Slika 19. ŽIVO/MRTVO bojenje NT2/D1 ćelija u alginatnim mikrovlaknima nakon označenih tretmana: KOF – kofein; TAU – taurin; KOF+TAU – kofein+taurin; KOF+TAU+EtOH – kofein+taurin+alkohol; EP – energetsko piće; EP + EtOH – energetsko piće+alkohol. A) Reprezentativne slike pluripotentnih NT2/D1 ćelija u alginatnim mikrovlaknima nakon 24 č. naznačenih tretmana. Reprezentativni Z-stack svetlog polja (engl. Bright field-BF), zelene fluorescencije (žive ćelije) i spojene fluorescencije (žive i mrtve ćelije zajedno) 40 poprečnih preseka, slikanih na 5 µm pomoću alata Maximal intensity u Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF) softveru na konfokalnom mikroskopu Leica DM IL LED (Leica Microsystems GmbH, Nemačka). Skala: 200 µm. B) Kvantifikacija vijabilnosti ćelija korišćenjem LAS AF softvera (Leica Microsystems, Nemačka). Vrednosti su predstavljene kao relativna vijabilnost ćelija u odnosu na kontrolne, netretirane NT2/D1 ćelije (NT2) kojima je dodeljena vrednost 100%. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD tri eksperimenta. Zvezdica (*) označava $p < 0,05$. SD – standardna devijacija.

4.1.3. Uticaj komponenti energetskog pića, kofeina i taurina u kombinaciji sa etanolom na NT2/D1 rane neuralne progenitore u alginatnim mikrovlaknima u statičkim uslovima kulture i protočnom bioreaktoru

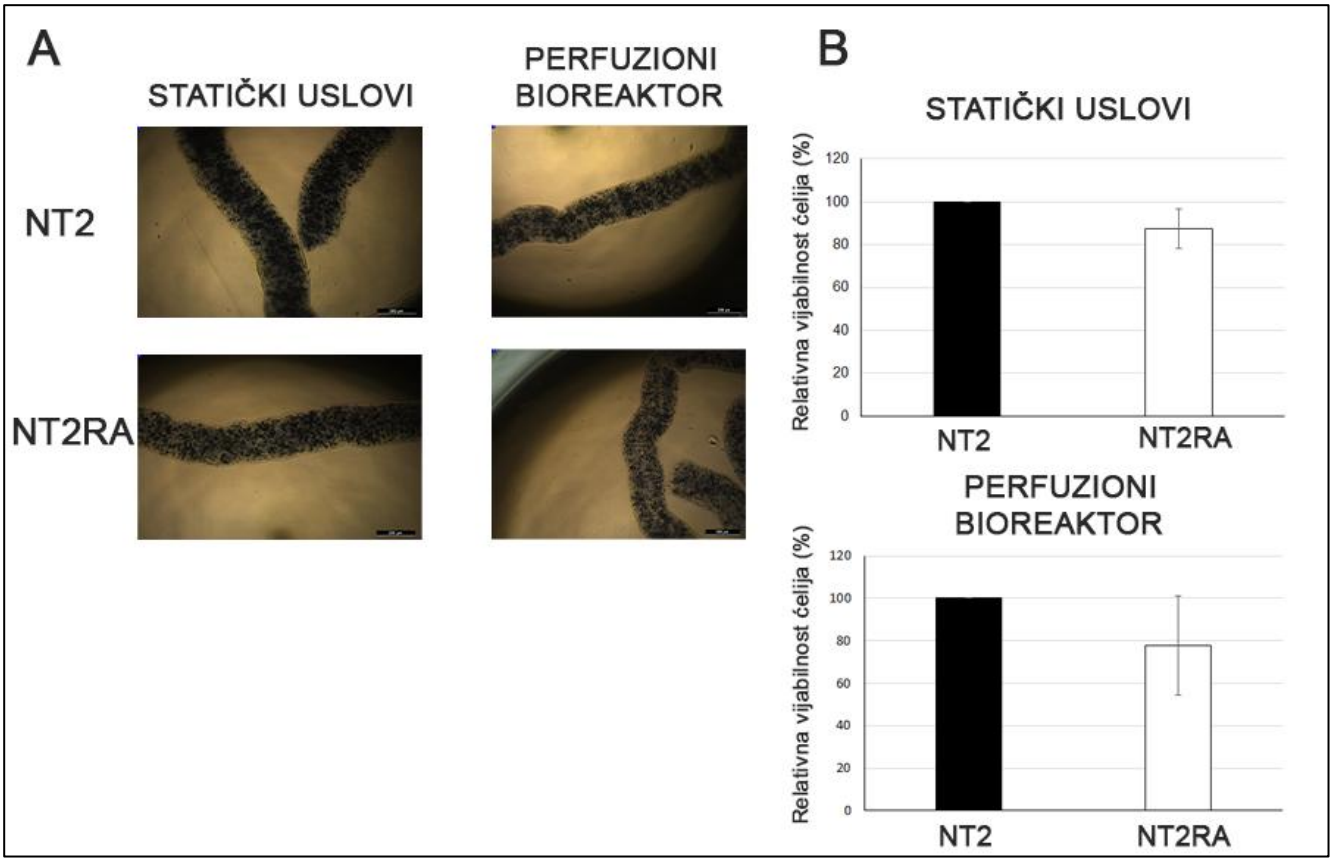
Ćelije imobilisane u alginatnim mikrovlaknima mogu biti propagirane u statičkim uslovima (gore opisani 3D model-sistem) i u uslovima biomimetičkog protočnog bioreaktora (Stojkovska et al., 2020). 3D model-sistem sa ćelijama imobilisanim u alginatna mikrovlakna u ovom radu predstavlja statički sistem i korišćen je kao referentni model-sistem za poređenje sa uslovima gajenja i diferencijacije ovih ćelija u sistemu bioreaktora. Protočni bioreaktor obezbeđuje stalni protok medijuma kroz komoru bioreaktora sa alginatnim mikrovlaknima sa imobilisanim ćelijama i na taj način omogućava efikasan prenos mase supstanci, nutrijenata i kiseonika, i smicajne napone tečnosti, kao i uklanjanje nepotrebnih produkata metabolizma (Di Lisa et al., 2024, Martin et al., 2004). Smicajni napon odgovara mehaničkoj sili koja se javlja kao posledica protoka krvi kroz krvne sudove i deluje na okolne ćelije (Roux et al, 2020). Ovaj stimulus može imati dvojako dejstvo na ćelije. Preveliki smicajni napon dovodi do oštećenja i smrti ćelija, dok fiziološki smicajni napon predstavlja neophodan stimulus koji promoviše ćelijsku diferencijaciju *in vivo* (Di Lisa et al., 2024). Pored neospornih prednosti bioreaktora u odnosu na statičke uslove, njihova upotreba u svakodnevnoj laboratorijskoj praksi ograničena je većom cenom, vremenski i tehnički zahtevnom procedurom i neophodnošću tehničke obuke istraživača za postavljanje sistema (Martin et al., 2004). Zbog svega navedenog urađen je „pilot“ eksperiment u kom smo uporedili vijabilnost i inicijaciju neuralne diferencijacije NT2/D1 ranih neuralnih progenitora, i uticaj jednog kombinovanog tretmana na ove ćelije u statičkim uslovima i u uslovima protočnog bioreaktora. Cilj ovog eksperimenta bio je da utvrdimo da li protočni bioreaktor pruža bolje uslove za propagaciju i neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelija i da li se odgovor ranih neuralnih progenitora na kombinovani tretman kofeinom, taurinom i alkoholom razlikuje u odnosu na statičke uslove gajenja.

Inicijacija neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija nakon 48 č. indukcije RK-om u alginatnim mikrovlaknima u perfuzionom bioreaktoru potvrđena je smanjenjem ekspresije markera pluripotentnosti *SOX2* i *OCT4*, kao i povećanjem ekspresije markera rane faze neuralne diferencijacije *PAX6* (Slika 20). Zbog tehničkih ograničenja eksperiment je izveden u biološkom duplikatu, a na slici su prikazani pojedinačni rezultati dva nezavisna eksperimenta.



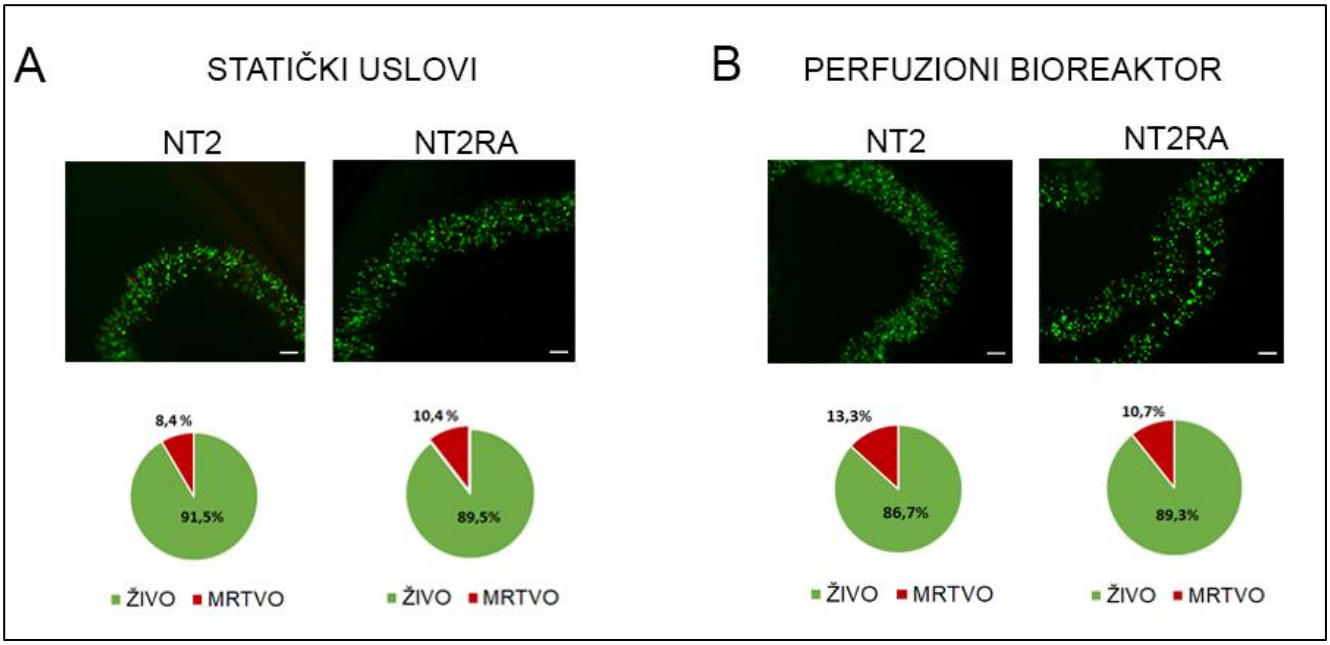
Slika 20. Relativna ekspresija markera pluripotentnosti (*SOX2 i OCT4*) i markera ranih neuralnih progenitora *PAX6* nakon 48 č. indukcije u alginatnim mikrovlaknima u statičkim uslovima i u uslovima protočnog bioreaktora. Eksperimentalni podaci prikazani su kao relativne vrednosti predstavljene u odnosu na neindukovane NT2/D1 kontrolne ćelije (NT2), dobijene u dva nezavisna eksperimenta (prikazani kao crni i beli stubići). NT2 – neindukovane NT2/D1 ćelije i NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

Vijabilnost i proliferativni kapacitet neuralnih progenitora NT2/D1 ćelija generisanih nakon 48 sati indukcije RK-om, u alginatnim mikrovlaknima u protočnom bioreaktoru, ispitani su MTT testom i bojenjem ćelija upotrebom ŽIVO/MRTVO eseja, (Slika 21 i Slika 22).



Slika 21. Vijabilnost ćelija u alginatnim mikrovlaknima nakon 48 č. indukcije RK-om (NT2RA) u statičkim uslovima i uslovima protočnog bioreaktora u poređenju sa kontrolnim ćelijama (NT2), nakon MTT eseja A) svetlosna mikroskopija formiranih kristala formazana nakon bojenja MTT agensom i B) kvantifikacija relativne ćelijske vijabilnosti upotrebom MTT eseja nakon rastvaranja kristala formazana DMSO-om. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD dva nezavisna eksperimenta. Skala: 200 μm. NT2 – neindukovane NT2/D1 ćelije i NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

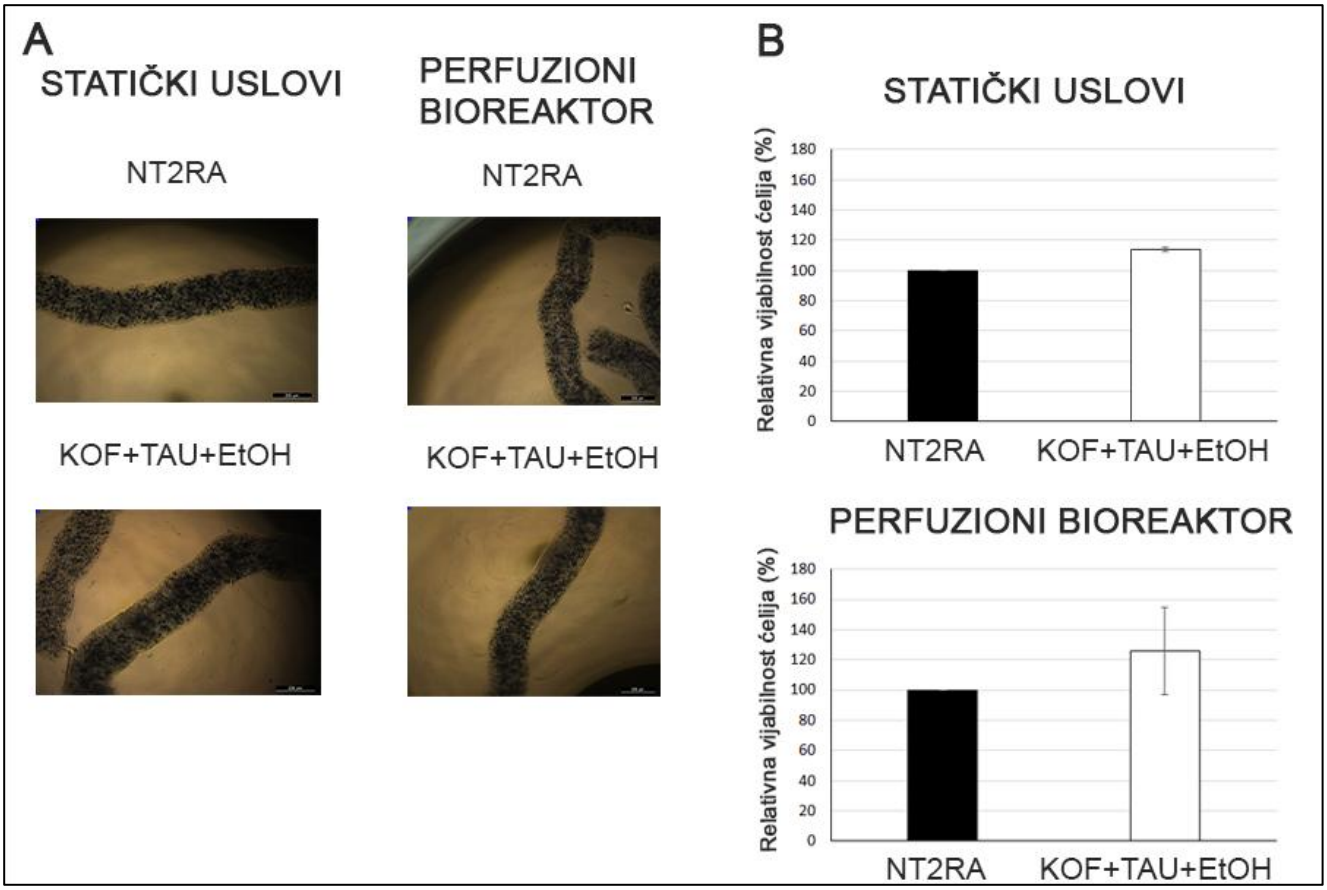
Analiza rezultata MTT eseja ukazuje da su NT2/D1 ćelije nakon 48 č. indukcije RK-om zadržale vijabilnost u oba 3D model-sistema – u alginatnim mikrovlaknima u statičkim uslovima i u alginatnim mikrovlaknima u perfuzionom bioreaktoru (Slika 21).



Slika 22. Vijabilnost ćelija u alginatnim mikrovlaknima nakon 48 č. indukcije RK-om (NT2RA) u odnosu na kontrolne ćelije (NT2) u A) statičkim uslovima i B) uslovima protočnog bioreaktora. Slike NT2/D1 ćelija nakon ŽIVO/MRTVO eseja dobijene su fluorescentnom mikroskopijom a rezultati su kvantifikovani određivanjem relativnog odnosa živih i mrtvih ćelija i predstavljeni kružnim dijagramom. Skala: 200 μm. NT2 – neindukovane NT2/D1 ćelije i NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

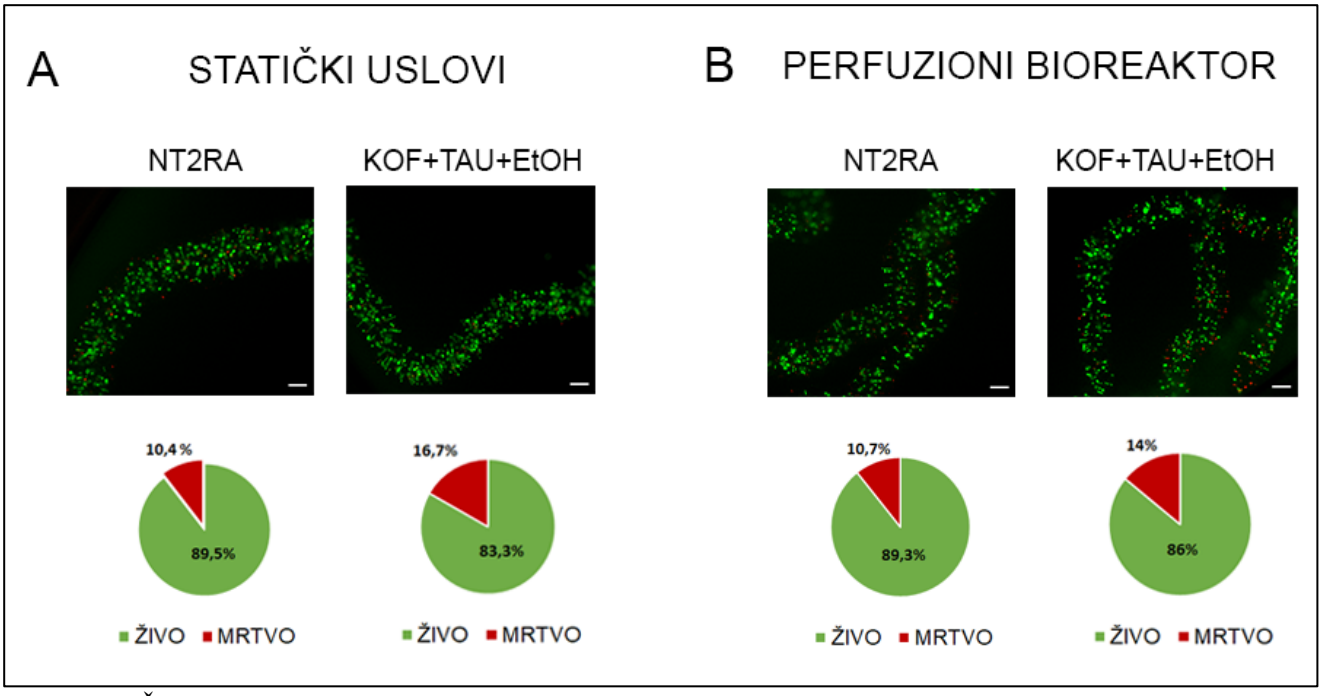
Rezultati dobijeni u eseju ŽIVO/MRTVO (Slika 22) u korelaciji su sa zaključcima donetim nakon MTT testa. U oba 3D model-sistema vijabilnost NT2 i NT2RA ćelija bila je u sličnom opsegu (u statičkim uslovima: NT2 – 91,5% živih i 8,4% mrtvih ćelija; NT2RA – 89,5% živih i 10,4% mrtvih ćelija; u perfuzionom bioreaktoru: NT2 – 86,7% živih i 13,3% mrtvih ćelija; NT2RA – 89,3% živih i 10,7% mrtvih ćelija) (Slika 22).

Na kraju pilot eksperimenta ispitano je da li su efekti kombinovanog tretmana kofeinom, taurinom i etanolom (KOF+TAU+EtOH), koji simulira konzumaciju energetskog pića sa alkoholom, identični u oba 3D sistema. Najpre je ispitan uticaj ovog tretmana na vijabilnost i proliferativni kapacitet NT2/D1 ranih neuralnih progenitora, u statickim uslovima i uslovima stalnog protoka medijuma, korišćenjem MTT i ŽIVO/MRTVO eseja (Slika 23 i Slika 24).



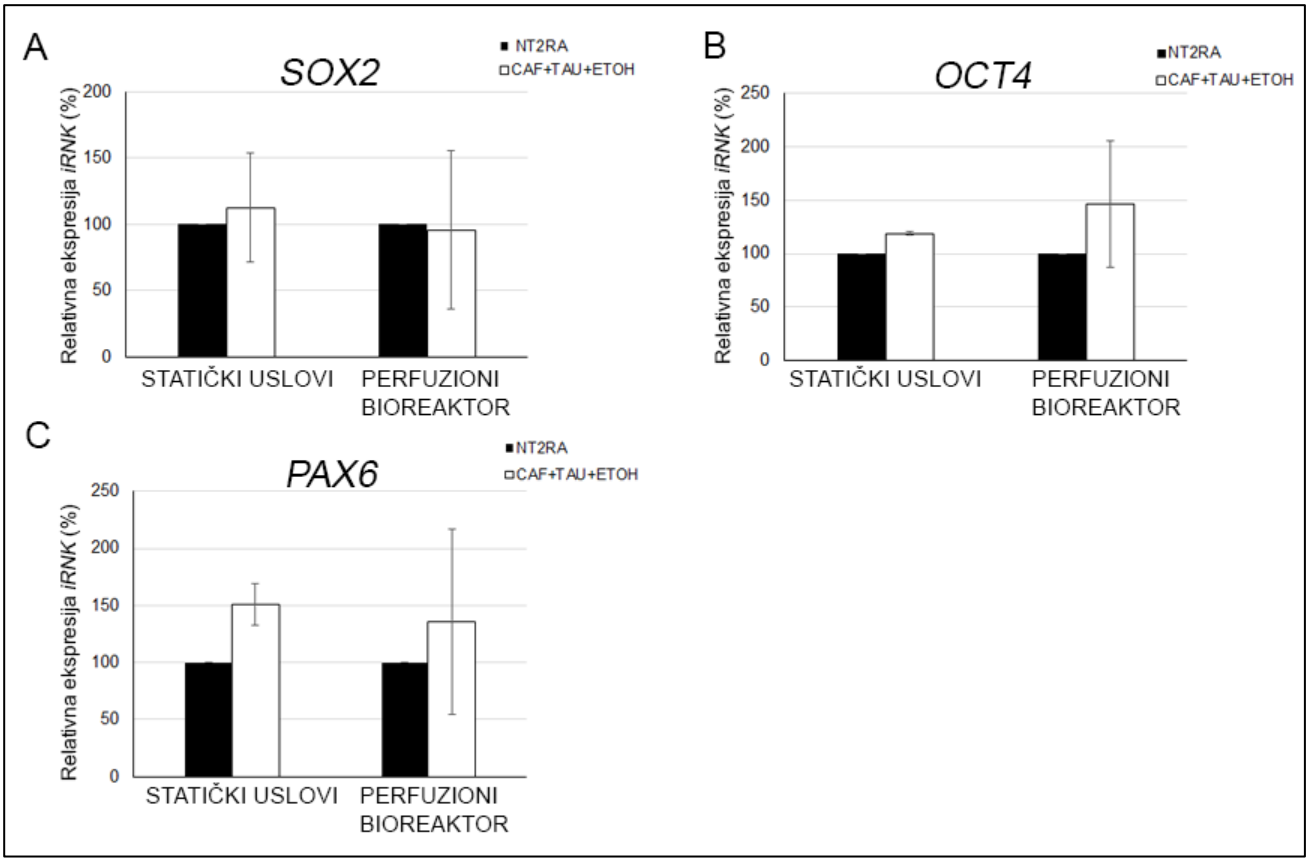
Slika 23. Vijabilnost ćelija u alginatnim mikrovlaknima nakon 24 č. akutnog kombinovanog tretmana kofeinom, taurinom i etanolom (KOF+TAU+EtOH) u statičkim uslovima i uslovima protočnog bioreaktora, određena primenom MTT eseja. A) Svetlosna mikroskopija formiranih kristala formazana nakon bojenja MTT agensom i B) Kvantifikacija relativne ćelijske vijabilnosti upotrebom MTT eseja nakon rastvaranja kristala formazana DMSO-om. Skala: 200 μm. NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om; KOF+TAU+EtOH – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om i tretirane kofeinom, taurinom i etanolom.

Rezultati MTT eseja (Slika 23) pokazuju da odabrani tretman nije doveo do promene vijabilnosti NT2/D1 ćelija indukovanih RK-om 48 č. ni u jednom od ispitivanih 3D sistema (Slika 23). Ovi rezultati potvrđeni su i ŽIVO/MRTVO bojenjem koje je pokazalo da se nakon tretmana odnosi brojeva živih i mrtvih ćelija kreću u sličnim okvirima u oba ispitivana sistema (Slika 24). Takođe, tretman nije uticao na integritet alginatnih mikrovlakana i uniformnu distribuciju ćelija u njima (Slika 24).



Slika 24. ŽIVO/MRTVO bojenje NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u alginatnim mikrovlaknima nakon 24 č. akutnog kombinovanog tretmana kofeinom, taurinom i etanolom (KOF+TAU+EtOH) u A) statičkim uslovima i B) protočnom bioreaktoru. NT2/D1 rani neuralni progenitori (NT2RA) tretirani RK-om korišćeni su kao kontrola prilikom određivanja relativnog odnosa živih i mrtvih ćelija u alginatnim mikrovlaknima. Skala: 200 μm. NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om i KOF+TAU+EtOH – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om i tretirane kofeinom, taurinom i etanolom.

Poređenje ova dva sistema završeno je ispitivanjem potencijalnog uticaja akutnog tretmana kofeinom, taurinom i alkoholom, na markere pluripotentnosti (*OCT4* i *SOX2*) i marker rane faze neuralne diferencijacije (*PAX6*) kod NT2/D1 ranih neuralnih progenitora (Slika 25). Sa grafikona relativne ekspresije sva tri ispitivana gena (Slika 25) uočava se sličan trend u oba ispitivana 3D sistema, s tim što su rezultati u protočnom bioreaktoru sa većom standardnom devijacijom (Slika 25). Varijabilnost dobijenih rezultata posledica je biološke kompleksnosti, nehomogenosti sredine i osetljivosti sistema na promene parametara, pri čemu su efekti ovih faktora posebno izraženi u protočnom bioreaktoru.



Slika 25. Relativna ekspresija gena markera pluripotentnosti (*SOX2* i *OCT4*) i markera ranih neuralnih progenitora *PAX6* u NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima nakon kombinovanog tretmana, CAF+TAU+ETOH, u alginatnim mikrovlaknima u protočnom bioreaktoru i u statičkim uslovima kulture. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD dva eksperimenta. NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om i KOF+TAU+EtOH – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om i tretirane kofeinom, taurinom i etanolom.

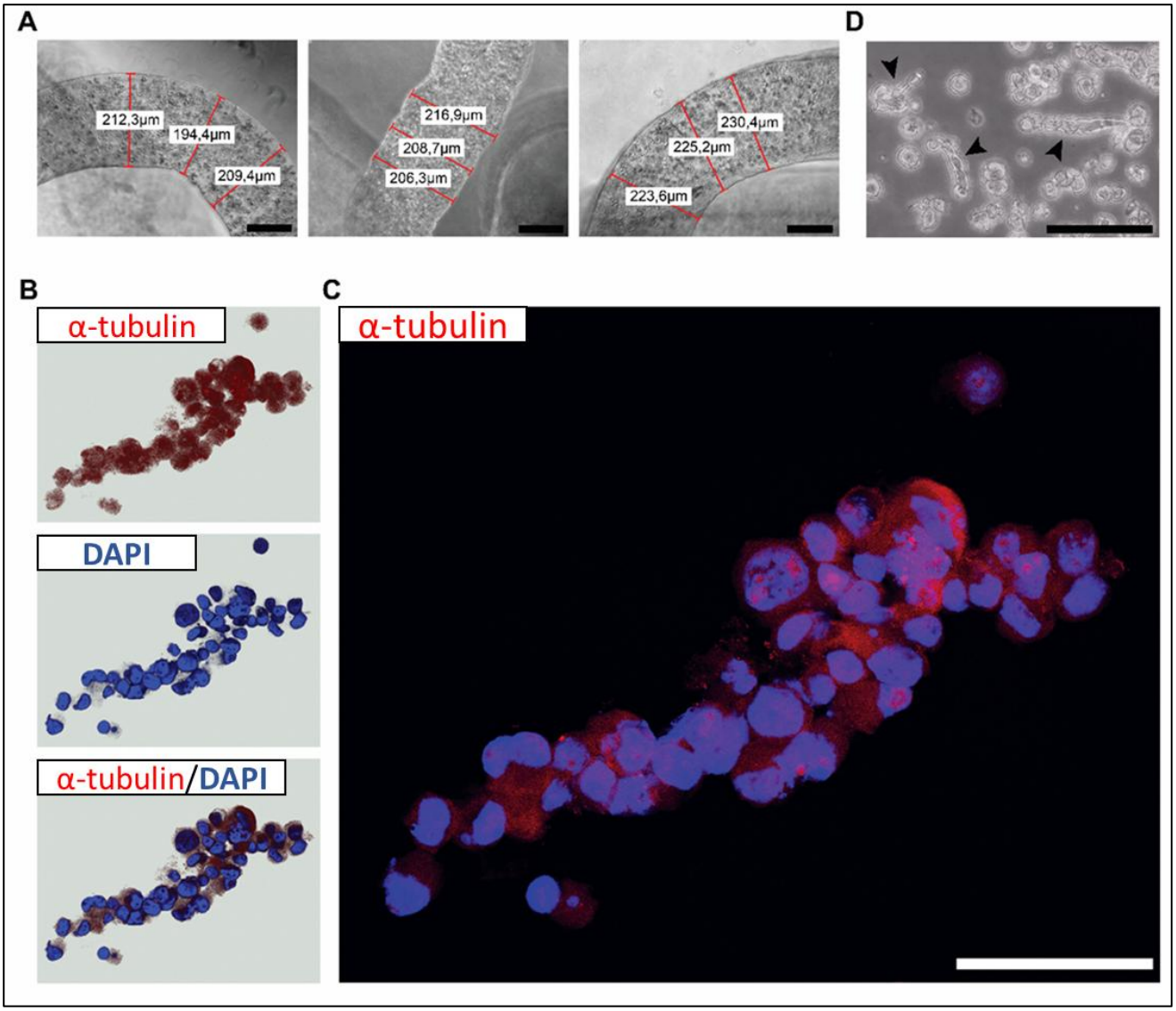
Na osnovu rezultata dobijenih u pilot eksperimentu može se zaključiti da se propagacija pluripotentnih NT2/D1 ćelija, njihovo opredeljivanje i neuralna diferencijacija do stadijuma NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u alginatnim mikrovlaknima odvija istom dinamikom u statičkim uslovima i u protočnom bioreaktoru. Ćelijska vijabilnost, proliferativni kapacitet, ekspresija markera pluripotentnosti i neuralne diferencijacije kao i osetljivost ćelija na primenjeni tretman ne razlikuju se u značajnoj meri u ispitivanim 3D sistemima.

Eksperimenti u statičkom sistemu alginatnih mikrovlakana su tehnički, prostorno, vremenski i finansijski manje zahtevni. Takođe, zbog manje varijabilnosti unutar statičkih sistema dobijeni rezultati su homogeniji, reproducibilniji i lakši za tumačenje. Zbog svega navedenog, za dalju analizu uticaja ispitivanih tretmana u ovoj doktorskoj tezi odabran je 3D model-sistem NT2/D1 ranih neuralnih progenitora imobilisanih u alginatnim mikrovlaknima u statičkim uslovima kulture. U narednim eksperimentima ovaj sistem je detaljno opisan i okarakterisan kao nova platforma za ispitivanje efekata bioaktivnih jedinjenja na najranije stadijume neuralne diferencijacije čoveka.

4.1.4. Uticaj ispitivanih tretmana na NT2/D1 rane neuralne progenitore imobilisane u alginatnim mikrovlaknima

4.1.4.1. Inicijacija neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija u 3D model-sistemu alginatnih mikrovlakana

U eksperimentima indukcije neuralne diferencijacije u 3D kulturi, NT2/D1 ćelije su imobilisane u alginatna mikrovlakna po ranije opisanoj proceduri (Radonjić et al., 2022). Indukcija neuralne diferencijacije RK-om je započeta 24 č. nakon imobilizacije ćelija u alginatnim mikrovlakanima, kako bi se ćelije prilagodile 3D okruženju. Ćelije su indukovane 48 č. do stadijuma ranih neuralnih progenitora. Struktura mikrovlakana i morfologija imobilisanih ćelija okarakterisani su upotrebom svetlosne i konfokalne mikroskopije (Slika 26). Mikrovlakna su imala uniformnu strukturu prosečnog prečnika 214 μm (Slika 26A). Uočena je ravnomerna distribucija ćelija u mikrovlaknima i sferični oblik ćelija što predstavlja karakterističnu morfologiju ćelija u neadherentnom 3D okruženju (Slika 26A). Korišćenjem konfokalne mikroskopije urađena je 3D rekonstrukcija visoke rezolucije ranih neuralnih NT2/D1 progenitora u alginatnim mikrovlaknima nakon fluorescentnog bojenja antitelima na α-tubulin (crvena) i bojenjem jedara bojom DAPI (plava) (Slika 26B i 26C). Prikazani rezultati potvrđuju okrugli oblik ćelija u 3D model-sistemu i pokazuju početak ćelijske agregacije i formiranje klastera ranih neuralnih NT2/D1 progenitora tipičnih za organizaciju NT2/D1 ćelija u 3D kulturi (Slika 26B i 26C). Takođe, svetlosna mikroskopija ranih neuralnih NT2/D1 progenitora nakon fiksacije ćelija, postupak tokom kog se mikrovlakna dezintegrišu ali ćelijski klasteri zadržavaju svoju strukturu, potvrdila je prethodna zapažanja (Slika 26D).

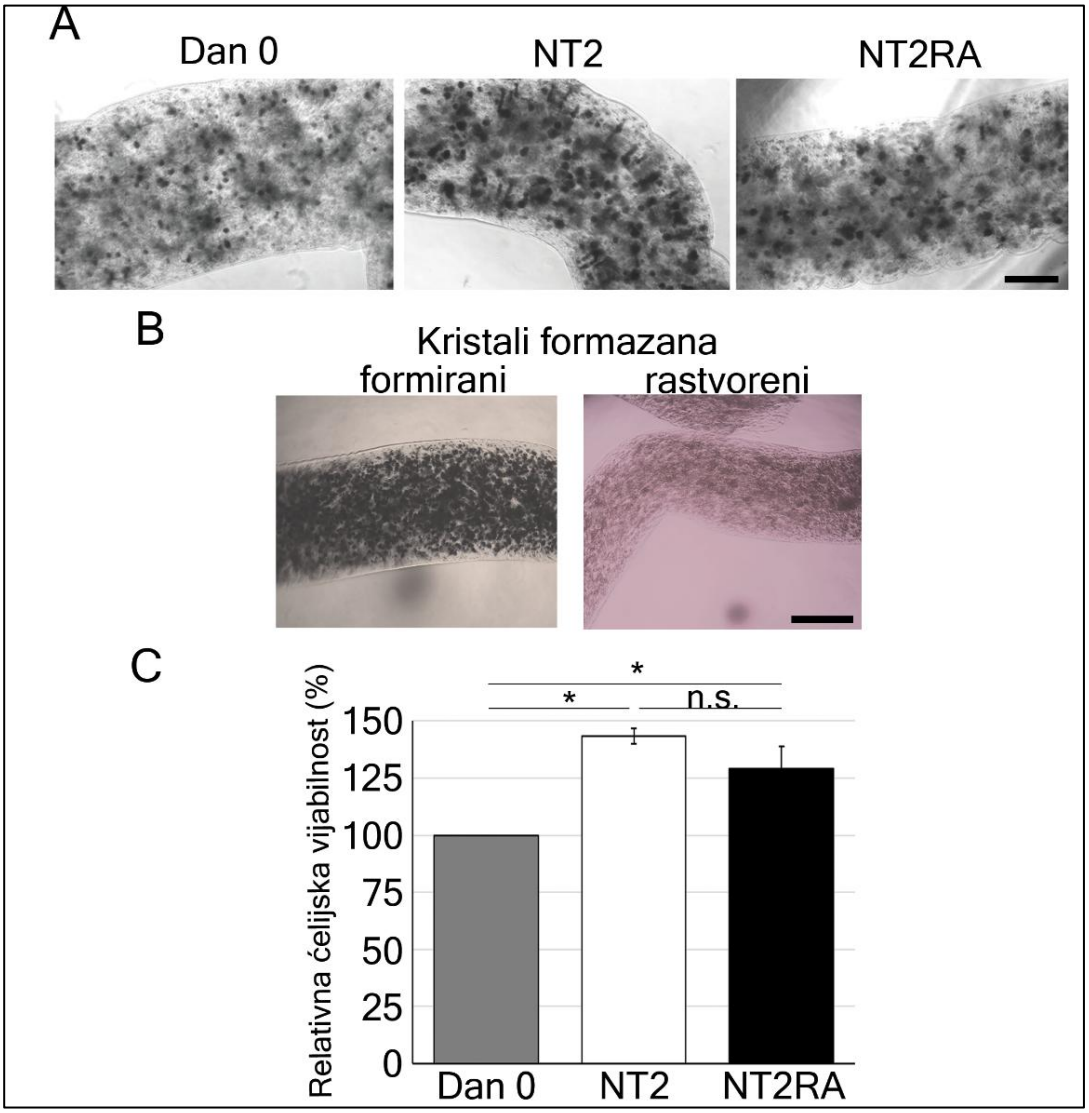


Slika 26. NT2/D1 rani neuralni progenitori (NT2RA) u alginatnim mikrovlaknima. A) Reprezentativne slike NT2/D1 ranih neuralnih progenitora, u alginatnim mikrovlaknima, dobijene primenom svetlosne mikroskopije. Prečnici mikrovlakana određeni su korišćenjem Leica LAS v4.12 softvera. Skala: 100 μm. B) i C) 3D rekonstrukcija visoke rezolucije ranih neuralnih NT2/D1 progenitora u alginatnim mikrovlaknima nakon fluorescentnog bojenja antitelima na α-tubulin (crvena) i bojenjem jedara bojom DAPI (plava) korišćenjem konfokalne mikroskopije. C) Konfokalna mikroskopija fluorescentnog bojenja ranih neuralnih NT2/D1 progenitora u alginatnim mikrovlaknima. α-tubulin (crvena) i DAPI (plava). D) Svetlosna mikroskopija ranih neuralnih NT2/D1 progenitora oslobođenih nakon fiksacije alginatnih mikrovlakana. Crni vrhovi strelica pokazuju ćelijske klastere. Skala: 100 μm (A); 50μm (C, D).

4.1.4.2. Analiza vijabilnost NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u alginatnim mikrovlaknima

Vijabilnost NT2/D1 ranih neuralnih progenitora (NT2RA) imobilisanih u alginatnim mikrovlaknima analizirana je korišćenjem MTT testa (Slika 27). Kao kontrole korišćene su NT2/D1 ćelije 24 č. nakon imobilizacije u alginatna mikrovlakna (Dan 0) i NT2/D1 ćelije propagirane u alginatnim mikrovlaknima 48 č. bez indukcije RK-om (NT2). Potpuno rastvaranje kristala formazana formiranih u alginatnim

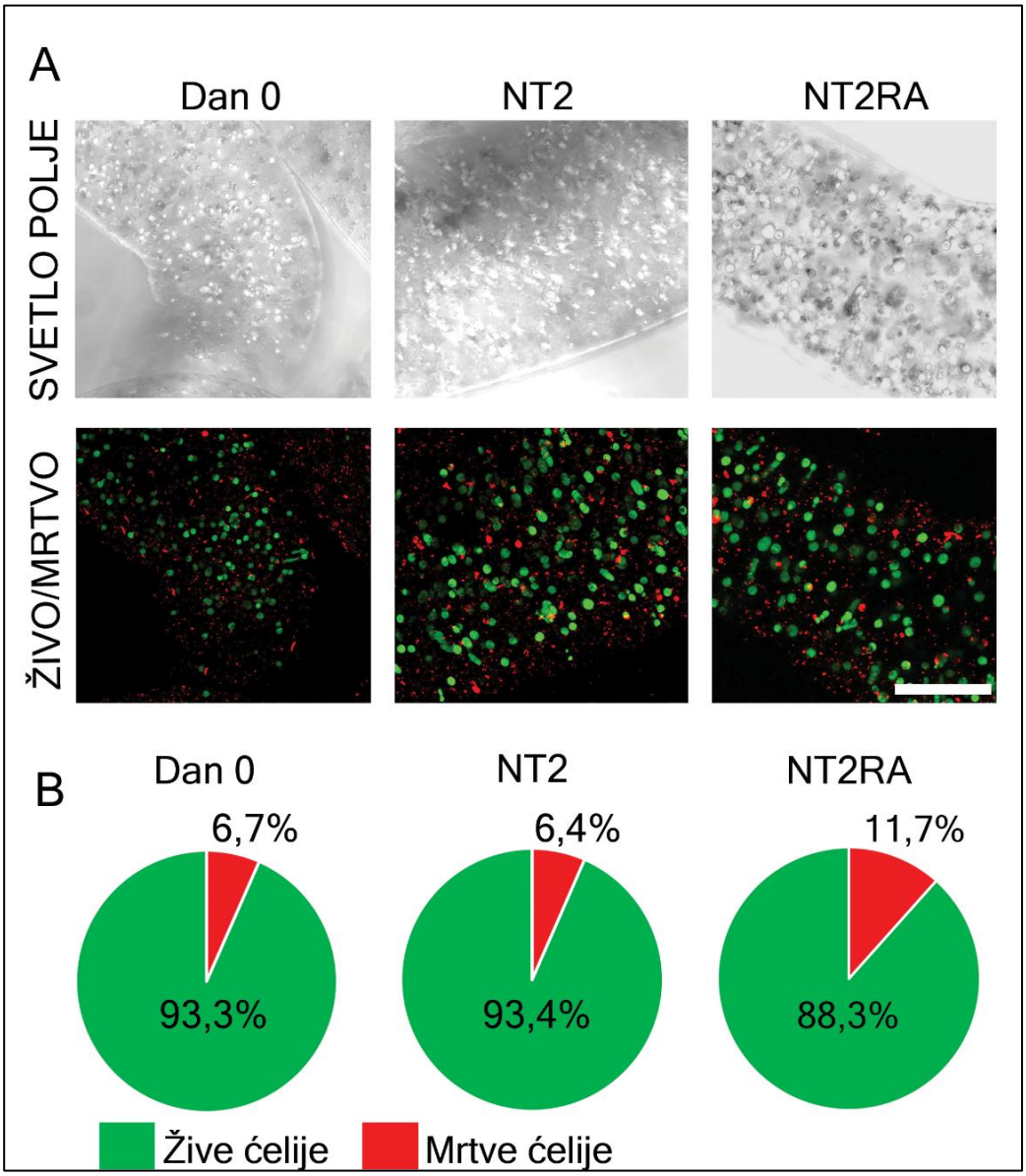
mikrovlaknima nakon redukcije MTT agensa, upotrebom DMSO-a, praćeno je vizuelno korišćenjem svetlosne mikroskopije (Slika 27B).



Slika 27. Vijabilnost neindukovanih NT2/D1 ćelija (NT2) i ćelija indukovanih RK-om (NT2RA) imobilisanih u alginatnim mikrovlaknima. A) Reprezentativne slike formiranih kristala formazana u alginatnim mikrovlaknima dobijene svetlosnom mikroskopijom. Skala: 100 μm. B) Svetlosna mikrografija aginatnih mikrovlakana pre i posle rastvaranja kristala formazana u DMSO-u. Skala: 200 μm. C) Relativna vijabilnost NT2 i NT2RA imobilisanih u alginatnim mikrovlaknima. Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatu i vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD tri nezavisna eksperimenta. Zvezdicom (*) su označene vrednosti koje se statistički značajno razlikuju od kontrolnih uzoraka ($p < 0,05$). Dan 0 – NT2/D1 ćelije nakon 24 č. imobilizacije u alginatna mikrovlakna, NT2 – neindukovane NT2/D1 ćelije i NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

Rezultati su pokazali da se broj vijabilnih netretiranih NT2/D1 ćelija (NT2) povećao za ~40% tokom 48 č. propagacije u 3D model-sistemu alginatnih mikrovlakana (uporediti NT2 i Dan 0), dok je 48 č. indukcije neuralne diferencijacije RK-om dovelo do povećanja broja vijabilnih ćelija za ~30% (uporediti NT2RA i Dan 0) (Slika 27C). Takođe, nije uočena značajna razlika u vijabilnosti između uzoraka NT2 i NT2RA (Slika 27C).

Vijabilnost NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u alginatnim mikrovlaknima analizirana je i upotrebom ŽIVO/MRTVO eseja (Slika 28A i 28B).

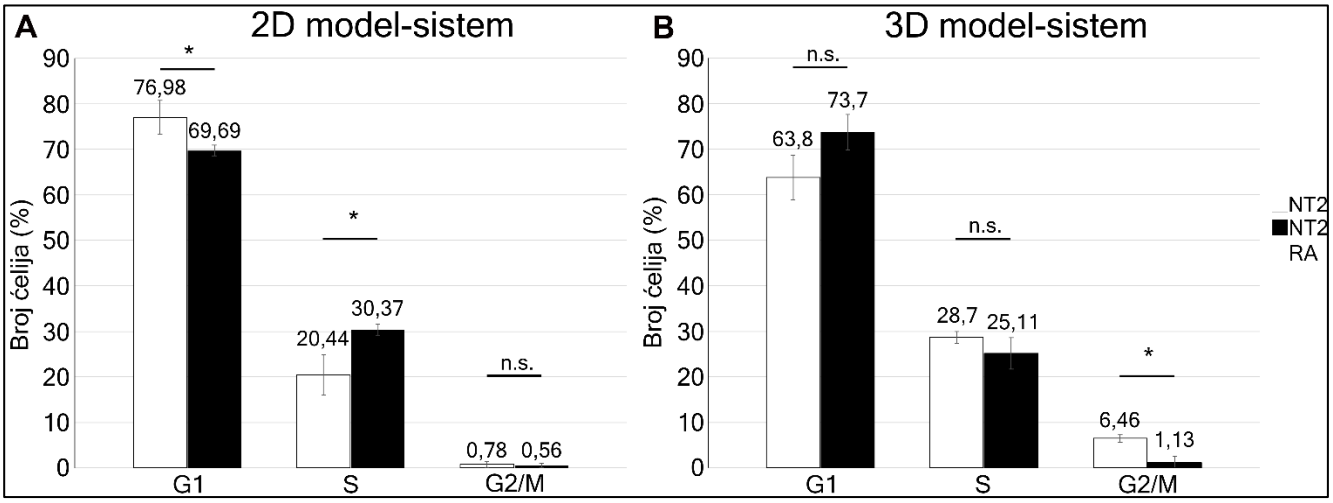


Slika 28. Vijabilnost NT2/D1 ranih neuralnih progenitora imobilisanih u alginatnim mikrovlaknima dobijena upotrebom ŽIVO/MRTVO eseja. A) Konfokalna mikroskopija živih (zelenih) i mrtvih (crvenih) NT2/D1 ćelija. Reprezentativne slike su dobijene spajanjem slika poprečnih preseka svetlosnog polja (engl. Brightfield-BF) i fluorescentnih slika obojenih živih i mrtvih NT2/D1 ćelija u alginatnim mikrovlaknima. Skala: 250 µm. B) Kružni dijagrami prikazuju procentualni odnos živih i mrtvih NT2/D1 ćelija izbrojanih na slikama poprečnih preseka. Eksperimenti su urađeni u triplikatu. Dan 0 – NT2/D1 ćelije nakon 24 č. imobilizacije u alginatna mikrovlakna, NT2 – neindukovane NT2/D1 ćelije i NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

Rezultati eksperimenata pokazuju da je vijabilnost NT2/D1 ćelija nakon 48 č. propagacije u alginatnim mikrovlaknima ostala nepromenjena (~93% živih ćelija) dok je indukcija RK-om od 48 č. dovela do pada vijabilnosti na ~88% (Slika 28B).

4.1.4.3. Analiza ćelijskog ciklusa NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u alginatnim mikrovlaknima

U cilju ispitivanja distribucije NT2/D1 ranih neuralnih progenitora imobilisanih u alginatnim mikrovlaknima u različitim fazama ćelijskog ciklusa i korelacije sa ćelijskim ciklusom NT2/D1 ćelija gajenih u 2D model-sistemu, urađena je analiza na protočnom citometru. Kao što je prikazano na Slici 29, distribucija NT2/D1 ranih neuralnih progenitora, gajenih u 3D model-sistemu, u različitim fazama ćelijskog ciklusa u korelaciji je sa distribucijom ćelija gajenim u 2D model-sistemu. Međutim, statistički značajna razlika u broju NT2 i NT2RA ćelija se mogla uočiti u G1 i S fazi u 2D model-sistemu, dok je u 3D model-sistemu značajna razlika u broju između NT2 i NT2RA ćelija bila prisutna u G2/M fazi. Rezultati eksperimenata su pokazali da se većina ćelija u oba model-sistema nalazi u G1 fazi ćelijskog ciklusa, približno jedna trećina ćelija u S fazi i u malom procentu u G2/M fazi.

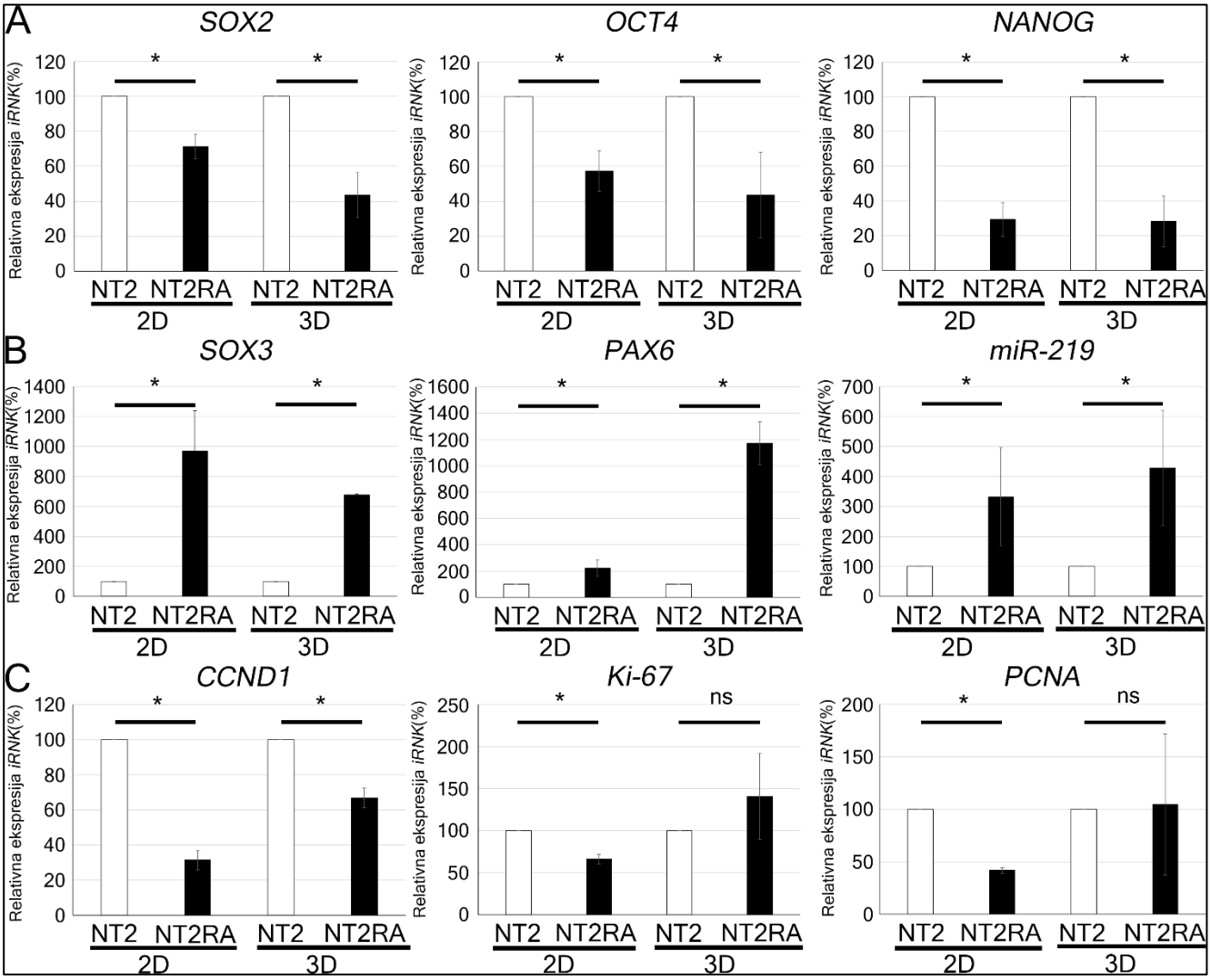


Slika 29. Distribucija pluripotentnih NT2/D1 (NT2) ćelija i NT2/D1 ranih neuralnih progenitora (NT2RA) u različitim fazama ćelijskog ciklusa (G1, S i G2/M) A) 2D i B) 3D model-sistemima. Podaci predstavljaju srednju vrednost ± SD tri nezavisna eksperimenta, p-vrednosti su izračunate korišćenjem Studentovog t-testa. p-vrednosti <0,05 su smatrane značajnim. NT2 – neindukovane NT2/D1 ćelije i NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

4.1.4.4. Analiza ekspresije markera pluripotentnosti, markera rane faze neuralne diferencijacije i markera proliferacije NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u alginatnim mikrovlaknima

Neuralna diferencijacija NT2/D1 ćelija do stadijuma ranih neuralnih progenitora u 3D model-sistemu ispitana je qPCR analizom profila ekspresije gena markera pluripotentnosti, neuralne diferencijacije i ćelijske proliferacije. Rezultati su u korelaciji sa ekspresijom ovih markera u NT2/D1 ćelijama gajenim u 2D model-sistemu humane neurogeneze *in vitro*.

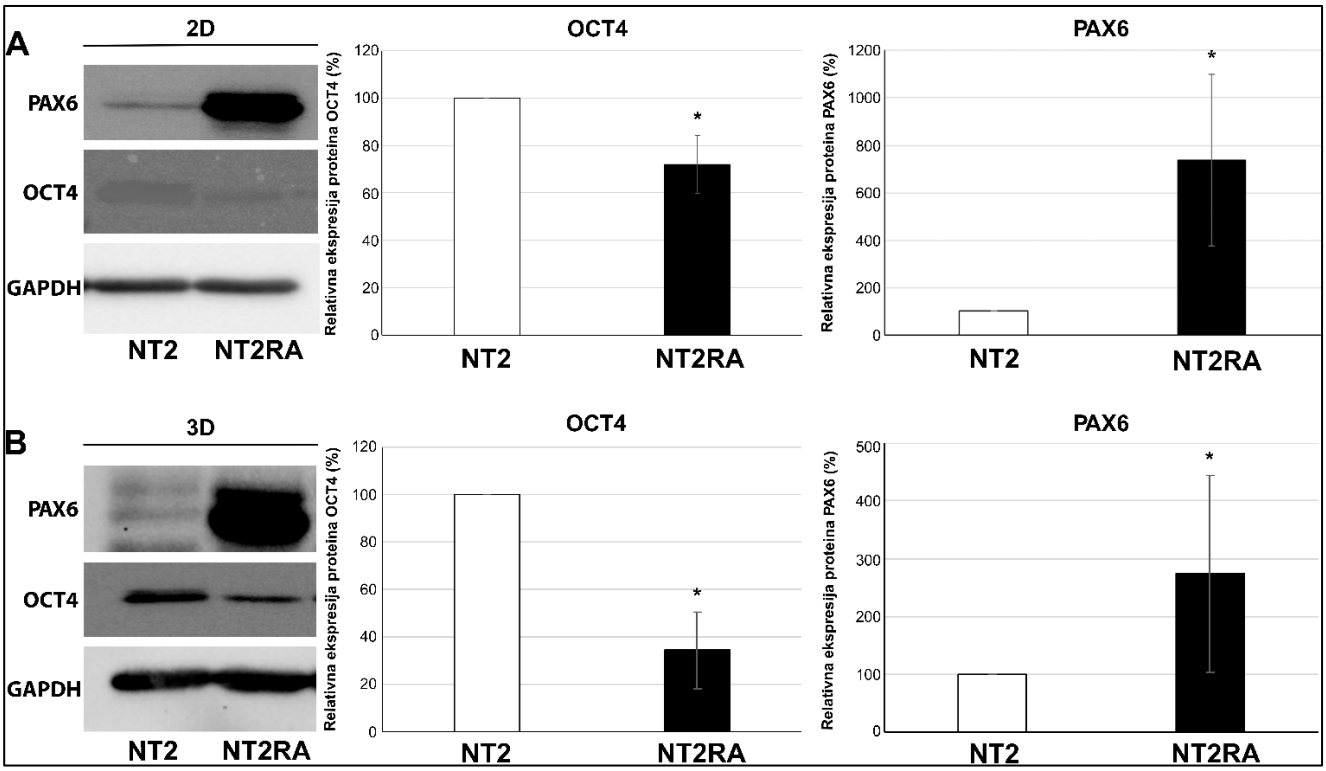
Najpre je analizirana relativna ekspresija gena regulatora pluripotentnosti, *SOX2, OCT4 i NANOG* (Sundberg et al., 2011; Takahashi & Yamanaka, 2006). Kao što je prikazano na slici 30A, uočeno je značajno smanjenje ekspresije svih ispitivanih markera pluripotentnosti kod NT2/D1 ranih neuralnih progenitora (NT2RA) imobilisanih u alginatnim mikrovlaknima u poređenju sa neindukovanim ćelijama gajenim 48 č. (NT2), (Slika 30A).



Slika 30. Analiza ekspresije markera pluripotentnosti, markera rane faze neuralne diferencijacije i markera proliferacije u NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima u 2D i 3D model-sistemima. Ekspresija A) gena faktora pluripotentnosti, *SOX2, OCT4* i *NANOG*, B) ranih neuralnih markera *SOX3, PAX6* i *miR-219* i (C) markera proliferacije *CCND1, Ki-67 i PCNA*, u NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima u 2D i 3D model-sistemima. Sve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD tri eksperimenta. p vrednosti <0,05 su smatrane značajnim. NT2 – neindukovane NT2/D1 ćelije i NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

U 3D model-sistemu, nakon 48 č. indukcije RK-om (NT2RA) ekspresije gena *SOX2* i *OCT4* su statistički značajno smanjene na 44%, dok je ekspresija *NANOG* opala na 28%, u poređenju sa neindukovanim ćelijama (NT2), (Slika 30A). U poređenju sa rezultatima dobijenim u 2D model-sistemu, indukcija NT2/D1 ćelija RK-om u 3D model-sistemu dovela je do izraženijeg smanjenja ekspresije gena *SOX2 i OCT4*, dok je ekspresija gena *NANOG* smanjena u sličnoj meri u oba sistema.
Zatim je analizirana ekspresija markera rane faze neuralne diferencijacije, *SOX3, PAX6* i miR-219 kako bi se potvrdila inicijacija neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija do stadijuma ranih neuralnih progenitora (Thakurela et al., 2016; Topalovic, Krstic, et al., 2017; Wu et al., 2017; Stanisavljevic et al., 2019). Kao što je prikazano na slici 30B, u 3D model-sistemu, 48 č. indukcije RK-om dovelo je do značajnog povećanja ekspresije gena *SOX3* (678%), gena *PAX6* (1173%) i *miR-219* (429%) u poređenju sa netretiranim kontrolnim ćelijama. U poređenju sa 2D model-sistemom, ekspresija gena *SOX3* je bila

manje izražena u 3D model-sistemu nakon indukcije RK-om, dok je ekspresija gena *PAX6 i* miR-219 bila veća u 3D model-sistemu (slika 30B). Takođe, analizirana je i ekspresija markera proliferacije – *CCND1* (engl. *Cyclin D1), Ki-67* (engl. *Marker of proliferation Ki-67*) i *PCNA* (*engl. Proliferating Cell Nuclear Antigen*) u NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima gajenim u 2D i 3D model-sistemima (Slika 30C). Rezultati eksperimenata su pokazali da su ćelije gajene u 2D model-sistemu imale smanjenu ekspresiju sva tri markera proliferacije. Kod ćelija gajenih u alginatnim mikrovlaknima u 3D model-sistemu, ekspresija gena *CCND1* je bila smanjena, dok je ekspresija gena *PCNA* i *Ki-67* ostala nepromenjena (Slika 30C) u poredjenju sa neindukovanom kontrolom.
Kako bi se utvrdilo da li su uočene promene u ekspresiji ispitivanih gena praćene promenama na nivou proteina, analizirana je ekspresija proteina OCT4 i PAX6 (Slika 31A i 31B).



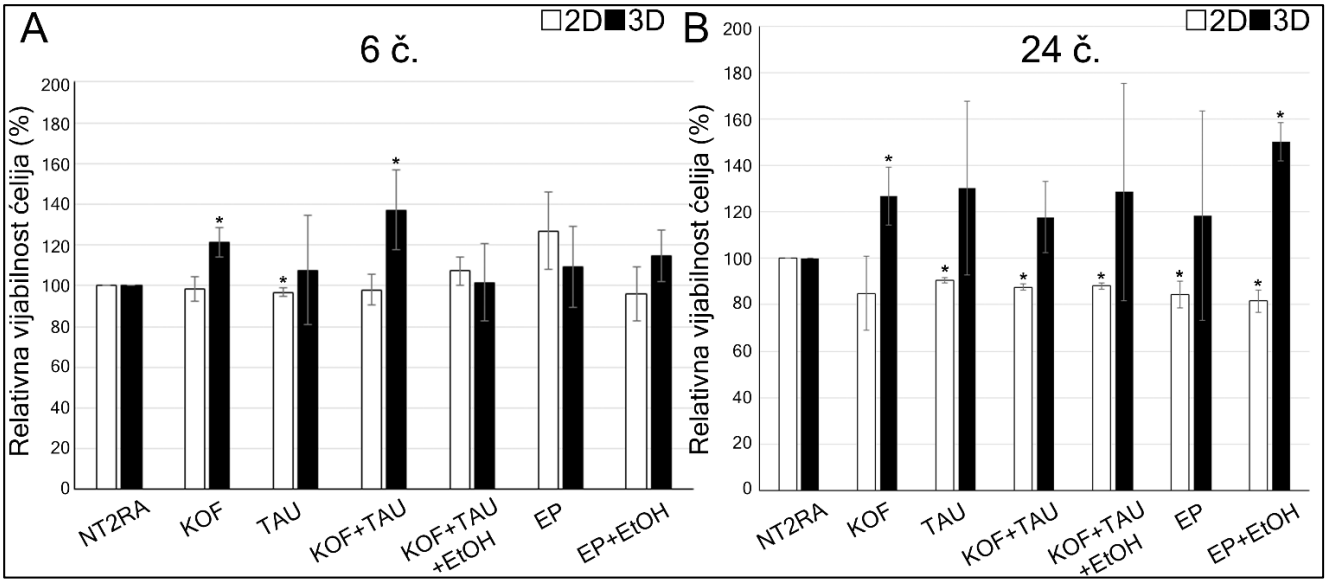
Slika 31. Western blot analiza ekspresije proteina OCT4 i PAX6 u NT2/D1 pluripotentnim ćelijama (NT2) i NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima (NT2RA) u A) 2D i B) 3D model-sistemima. Prikazane su reprezentativne slike Western blot analize i kvantifikacija OCT4, PAX6 i GAPDH proteinskih traka. Kvantitativni rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD. p vrednosti <0,05 su smatrane značajnim. NT2 – neindukovane NT2/D1 ćelije i NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

Rezultati, takođe, pokazuju da je došlo do izraženijeg, statistički značajnog smanjenja nivoa OCT4 proteina u ćelijama gajenim u 3D model-sistemu, u poređenju sa nivoom ovog proteina u ćelijama gajenim u standardnom 2D model-sistemu. Suprotno ovom rezultatu, statistički značajno povećanje ekspresije PAX6 proteina je izraženije u ćelijama gajenim u adherentnim uslovima (2D) u poređenju sa ekspresijom istog proteina analiziranog u 3D model-sistemu (Slika 31A i 31B).

4.1.4.5. Analiza efekata tretmana komponentama energetskog pića, kofeina i taurina, u kombinaciji sa etanolom na NT2/D1 rane neuralne progenitore u alginatnim mikrovlaknima

U cilju ispitivanja potencijalnih efekata energetskog pića i energetskog pića sa alkoholom i njihovih komponenti na vijabilnost NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u 3D model-sistemu, ćelije su tretirane

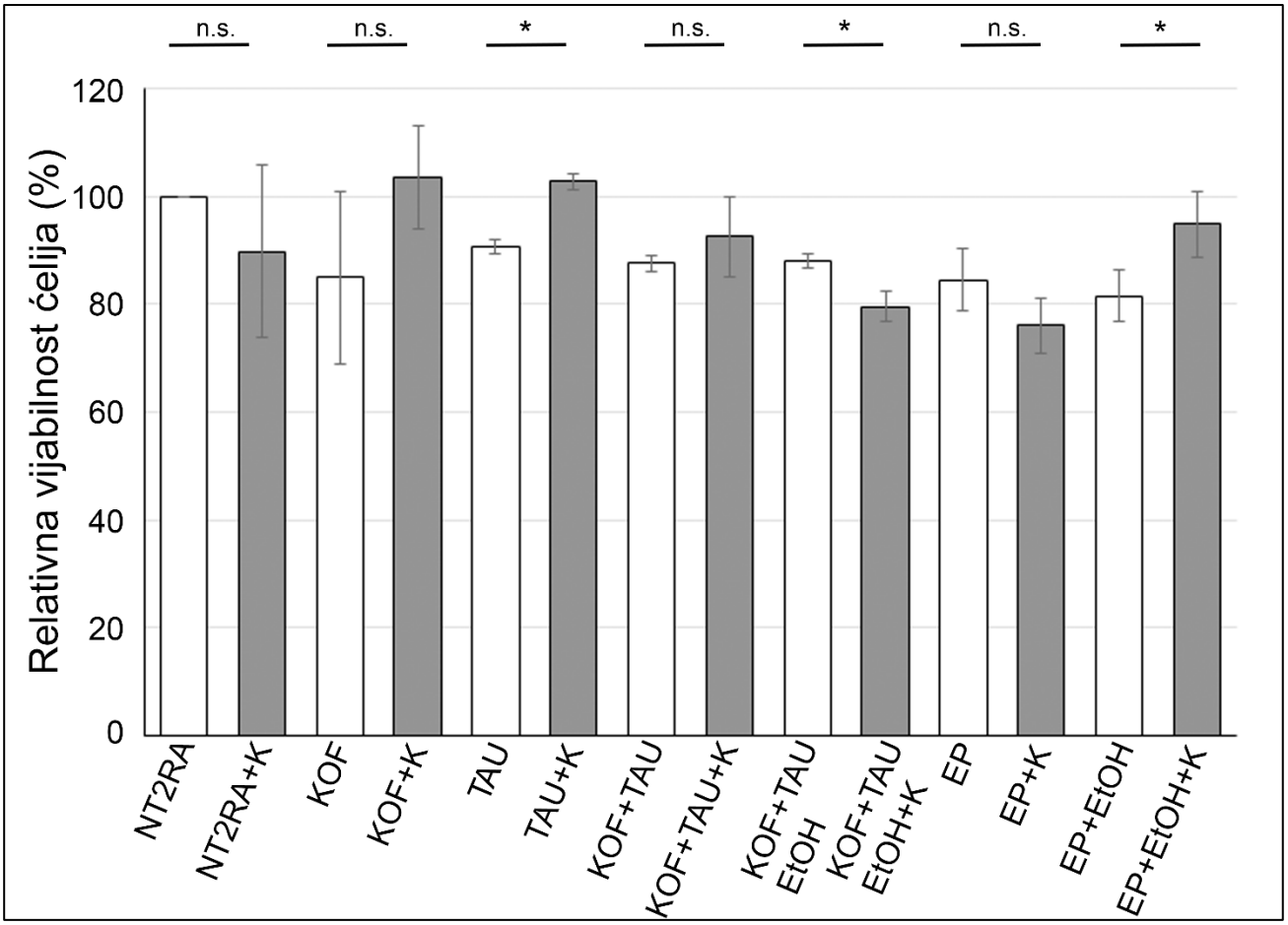
akutno u dva vremenska intervala: tretman u trajanju od 6 č. i tretman od 24 č. U istim eksperimentalnim uslovima analizirana je i vijabilnost NT2/D1 ranih neuralnih progenitora gajenih u 2D model-sistemu zbog poređenja i interpretacije rezultata dobijenih u 3D model-sistemima. Dobijeni rezultati prikazani su na slici 32.



Slika 32. Vijabilnost ranih neuralnih NT2/D1 progenitora nakon naznačenih tretmana u 2D i 3D model-sistemima, analizirana MTT testom. Efekti akutnih tretmana u trajanju od A) 6 č. i B) 24 č. Relativna vijabilnost tretiranih ćelija izražena je kao procenat vijabilnosti netretiranih ćelija kojima je dodeljena vrednost 100%. Sve vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD. p vrednosti <0,05 su smatrane značajnim i obeležene zvezdicom (*). Svi eksperimenti su izvedeni u triplikatu. KOF – kofein; TAU – taurin; KOF+TAU – kofein+taurin; KOF+TAU+EtOH – kofein+taurin+alkohol; EP – energetsko piće; EP + EtOH – energetsko piće+alkohol. NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

Kao što je prikazano na slici 32A, tretman u trajanju od 6 sati kod ćelija gajenih u 3D model-sistemu doveo je do statistički značajnog povećanja vijabilnosti ćelija samo u tretmanu kofeinom (21%) i kombinovanom tretmanu kofeinom i taurinom (37%). Sa druge strane kod ćelija gajenih u 2D model-sistemu tretman taurinom indukovao je mali ali statistički značajan pad vijabilnosti ćelija (Slika 32A).
U slučaju tretmana u trajanju od 24 č., kod svih ćelija gajenih u 2D model-sistemu svi tretmani, izuzev kofeina, doveli su do malog (10-20%), ali statistički značajnog smanjenja vijabilnosti ćelija u poređenju sa kontrolnim ćelijama (Slika 32B). Nasuprot tome kod ćelija gajenih u 3D model-sistemu, uočava se trend povećanja vijabilnosti ćelija nakon svih tretmana, a statistički značajne promene su detektovane nakon tretmana kofeinom (~26%) i kombinovanog tretmana energetskim pićem sa alkoholom (~50%) u poređenju sa kontrolom (Slika 32B).
Na osnovu ovih rezultata, koji su pokazali da je akutni tretman u trajanju od 24 č. ostvario značajniji efekat na vijabilnost ranih neuralnih NT2/D1 progenitora, ovi eksperimentalni uslovi su odabrani za dalju procenu efekata naznačenih tretmana na NT2/D1 rane neuralne progenitore.
Iako tretmani u trajanju od 24 č. nisu pokazali neurotoksične efekte na ćelije imobilisane unutar alginatnih mikrovlakana, kod ćelija gajenih u 2D model-sistemu uočeno je značajno smanjenje vijabilnosti nakon većine tretmana. Stoga, u paralelnoj eksperimentalnoj liniji, analizirana je potencijalna reverzija neurotoksičnosti u 2D model-sistemu. U studiji na model-sistemu pacova je prethodno pokazano da je kvercetin indukovao reverziju neurotoksičnosti izazvanu dugotrajnom konzumacijom energetskog pića (Sayed, 2021). Da bi ispitali potencijal kvercetina da indukuje reverziju

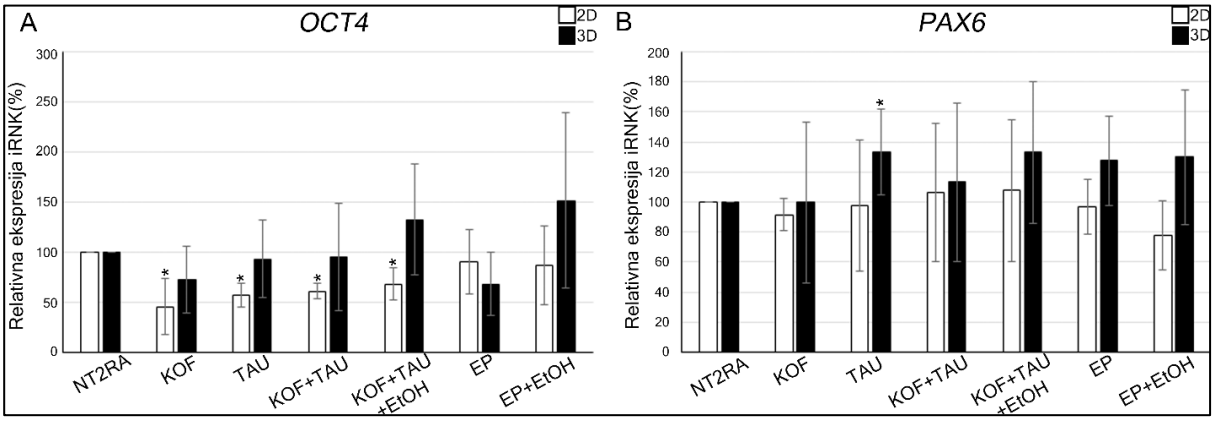
neurotoksičnosti u našoj eksperimentalnoj postavci u 2D model-sistemu, NT2/D1 rani neuralni progenitori izloženi su akutnim kotretmanima (24 č.) – ispitivani tretmani sa dodatkom kvercetina, i njihova vijabilnost je merena MTT esejem. Kao što je prikazano na slici 33, kvercetin je indukovao statistički značajnu reverziju neurotoksičnosti u kotretmanu sa taurinom i kotretmanu sa energetskim pićem i alkoholom. Nasuprot očekivanjima, kvercetin je u kotretmanu sa kofeinom, taurinom i alkoholom indukovao statistički značajno povećanje neurotoksičnosti (Slika 33).



Slika 33. Relativna vijabilnost ćelija, nakon akutnih tretmana u trajanju od 24 č. i kotretmana sa kvercetinom, izražena je kao procenat vijabilnosti odgovarajućih kontrola – netretiranih ćelija ili ćelija tretiranih kvercetinom, kojima je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD tri nezavisna eksperimenta. p vrednosti <0,05 su smatrane značajnim i označene su zvezdicom (*). KOF – kofein; TAU – taurin; KOF+TAU – kofein+taurin; KOF+TAU+EtOH – kofein+taurin+alkohol; EP – energetsko piće; EP + EtOH – energetsko piće+alkohol; K – kvercetin. NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

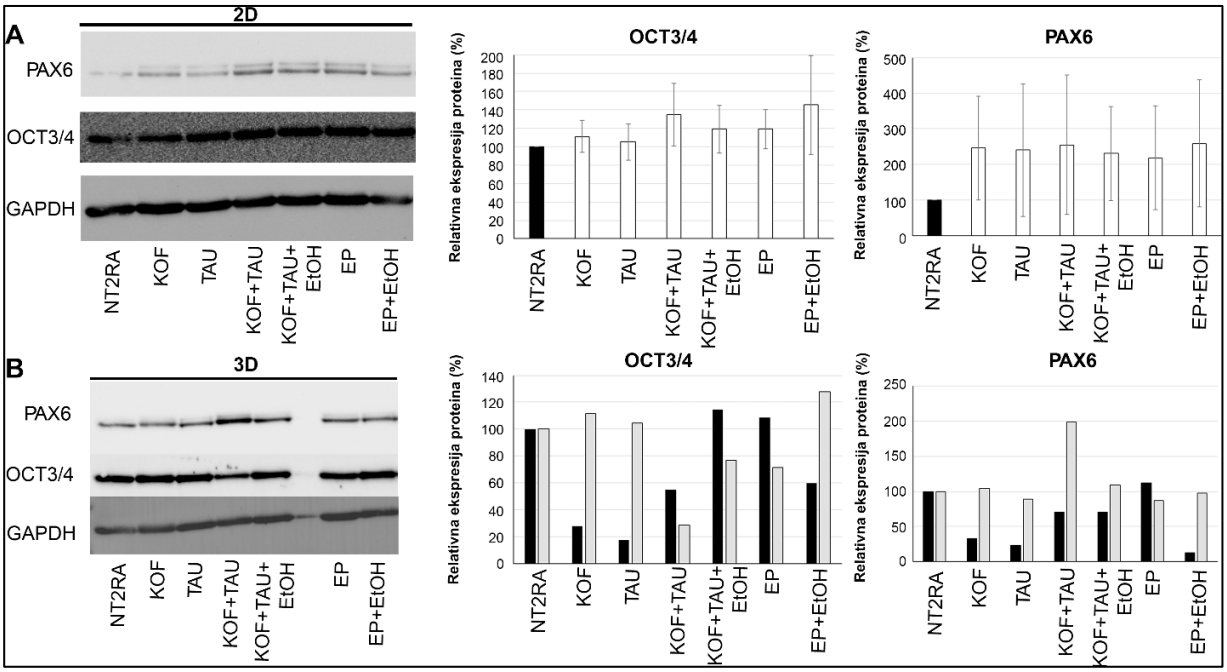
U nastavku proučavanja efekata akutnih tretmana u trajanju od 24 č. na NT2/D1 rane neuralne progenitore, ispitan je njihov uticaj na ekspresiju pluripotentnog markera *OCT4* i markera rane faze neuralne diferencijacije *PAX6* u ovim ćelijama gajenim u 2D i 3D model-sistemima. Kao što je prikazano na slici 34A u 2D model-sistemu tretmani kofeinom i taurinom pojedinačno, zajedno ili u kombinaciji sa alkoholom doveli su do statistički značajnog smanjenja ekspresije gena *OCT4* na 45%, 57%, 61% i 68%, redom. U ćelijama gajenim u 3D model-sistemu, nijedan od akutnih tretmana nije uticao na ekspresiju gena *OCT4* (Slika 34A). Sa druge strane, nijedan tretman nije uticao na ekspresiju markera rane faze neuralne diferencijacije *PAX6* u ćelijama gajenim u 2D model-sistemu (Slika 34B), dok je kod ćelija

gajenih u 3D model-sistemu, tretman taurinom doveo je do statistički značajnog povećanja (~30%) ekspresije *PAX6* (Slika 34B).



Slika 34. Efekti akutnih tretmana na relativnu ekspresiju A) markera pluripotentnosti *OCT4* i B) markera rane faze neuralne diferencijacije *PAX6* u NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima gajenim u 2D i 3D model-sistemima. Relativna ekspresija nakon tretmana izražena je kao procenat ekspresije u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije kojima je dodeljena vrednost 100%. Vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD. p vrednosti <0,05 su smatrane značajnim i označene su zvezdicom (*). Svi eksperimenti su urađeni u triplikatu. KOF – kofein; TAU – taurin; KOF+TAU – kofein+taurin; KOF+TAU+EtOH – kofein+taurin+alkohol; EP – energetsko piće; EP + EtOH – energetsko piće+alkohol. NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

Dodatno, ekspresija OCT4 i PAX6 nakon akutnih tretmana NT2/D1 ranih neuralnih progenitora gajenih u 2D i 3D model-sistemima analizirana je i na proteinskom nivou. NT2/D1 ćelije indukovane RK-om korišćene su kao kontrola.



Slika 35. Western blot analiza ekspresije OCT4 i PAX6 proteina u netretiranim NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima (NT2RA) i progenitorima nakon akutnog tretmana naznačenim komponentama.

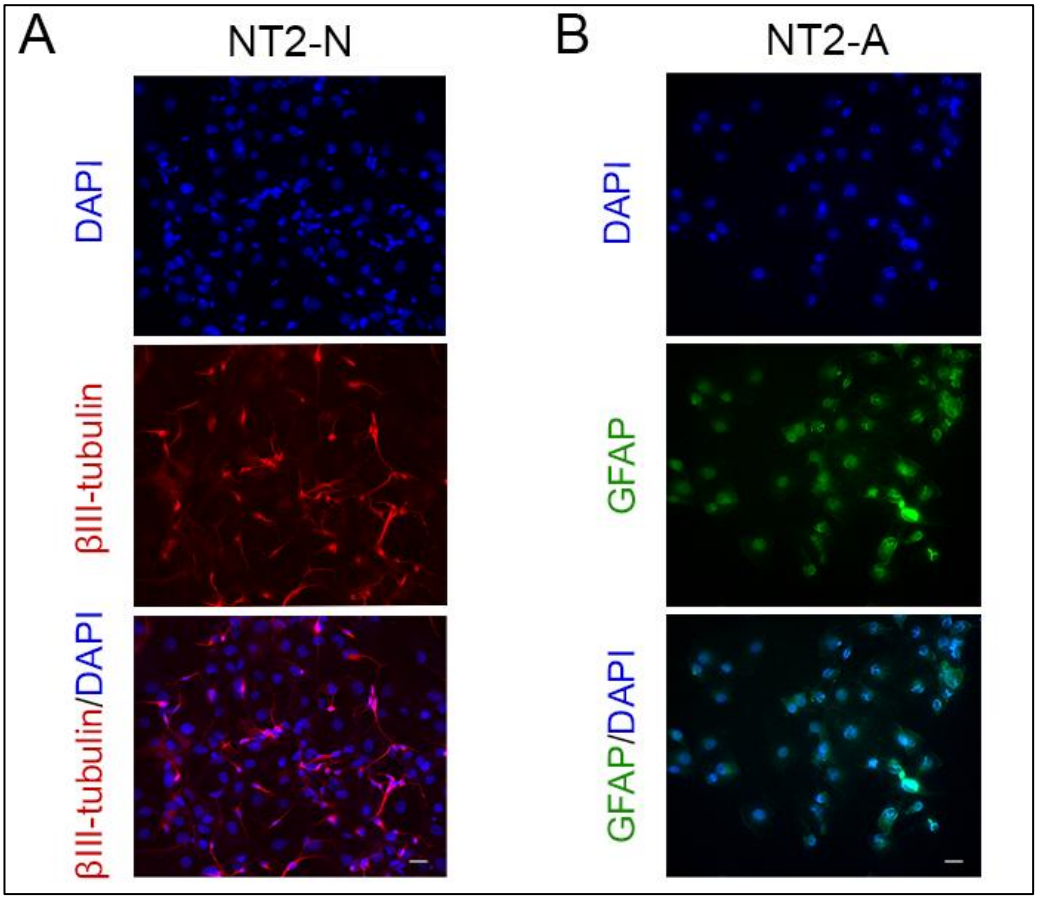
A) Reprezentativne slike Western blot analize i kvantifikacije OCT4, PAX6 i GAPDH proteinskih traka u A) 2D i B) 3D model-sistemima. Kvantitativni rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD tri eksperimenta u 2D model-sistemu, dok su rezultati ekspresije proteina u 3D model-sistemu prikazani kao pojedinačne vrednosti bioloških duplikata (n = 2) za svaki tretman. KOF – kofein; TAU – taurin; KOF+TAU – kofein+taurin; KOF+TAU+EtOH – kofein+taurin+alkohol; EP – energetsko piće; EP + EtOH – energetsko piće+alkohol. NT2RA – NT2/D1 ćelije indukovane RK-om.

Akutni tretmani na ćelijama gajenim u 2D model-sistemu nisu indukovali statistički značajne promene na nivou ekspresije OCT4 i PAX6 proteina (Slika 35A). Eksperimenti u 3D model-sistemu izvedeni su u duplikatu i predstavljeni kao vrednosti dva nezavisna eksperimenta (Slika 35B). Kao što je prikazano, ekspresija OCT4 i PAX6 pokazala je značajnu varijabilnost između replikata i samo nekoliko tretmana je dovelo do konzistentnih promena u ekspresiji OCT4 i PAX6. Na nivou ekspresije OCT4 proteina, kombinovani tretman kofeinom i taurinom doveo je do smanjenja ekspresije proteina u oba replikata. Svi ostali tretmani su indukovali suprotne promene ekspresije u dva eksperimenta (Slika 35B). Ekspresija PAX6 proteina je smanjena u oba replikata nakon tretmana taurinom (TAU) i kombinovanog tretmana energetskim pićem i etanolom (EP+EtOH). Ostali tretmani su proizveli suprotne efekte na ekspresiju PAX6 u oba ponavljanja (Slika 35B). Osim već opisane varijabilnosti koja karakteriše 3D sisteme, standardna metodologija kvantifikacije traka nakon Western blot analize nije dovoljno precizno okarakterisala razlike u ekspresiji proteina. Zbog svega navedenog, dodatna istraživanja su neophodna da bi se sa sigurnošću doneo zaključak o efektima primenjenih tretmana na ekspresiju proteina OCT4 i PAX6 u ispitivanim model-sistemima.

4.2. Efekti akutnog tretmana energetskim pićem i njegovim komponentama, kofeinom i taurinom, sa i bez alkohola na NT2-N i NT2-A

4.2.1. Diferencijacija NT2/D1 ćelija do NT2-N i NT2-A

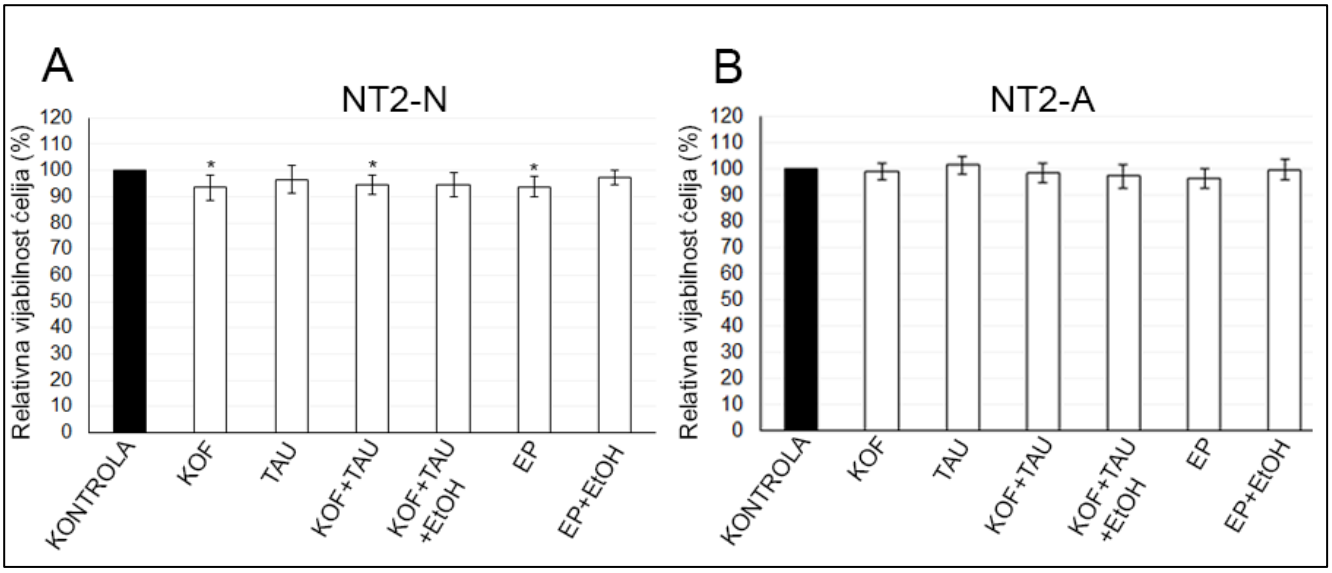
Efekti akutnog tretmana energetskim pićem i njegovim komponentama, kofeinom i taurinom, sa i bez alkohola na zrele NT2-neurone (NT2-N) i NT2-astrocite (NT2-A), ispitivani su u uslovima gajenja ćelija u monosloju – 2D kulturi. NT2/D1 ćelije su indukovane RK-om tokom 4 nedelje u 2D model-sistemu humane neurogeneze *in vitro* (Andrews, 1984; Pleasure et al., 1992), pri čemu je dobijena mešovita kultura neurona (NT2-N) i astrocita (NT2-A). Za dostizanje finalnih stadijuma maturacije NT2-N su propagirani još sedam dana u kulturi a NT2-A još tri nedelje.
Efikasnost neuralne diferencijacije potvrđena je imunocitohemijskom analizom (Slika 36). Prisustvo NT2-N u kulturi potvrđeno je na osnovu imunicitohemijske detekcije βIII-tubulina. βIII-tubulin predstavlja jedan od najranijih i najpouzdanijih markera neuralne diferencijacije i morfološkog sazrevanja neurona (Coyle et al., 2011, Podrygajlo et al., 2009). βIII-tubulin je marker neuronalnog identiteta od ranih faza neurogeneze preko diferencijacije do završnih stadijuma maturacije neurona (Slika 36A). Prisustvo NT2-A u kulturi je potvrđeno imunocitohemijskom detekcijom proteina GFAP (Slika 36B). Ekspresija proteina GFAP odražava stepen diferencijacije i funkcionalne zrelosti astrocita, s obzirom na njegovu ulogu u održavanju morfologije, mehaničke stabilnosti i reaktivnog odgovora astrocita (Kedracka-Krok et al., 2025).



Slika 36. Karakterizacija A) NT2-N i B) NT2-A dobijenih neuralnom diferencijacijom pluripotentnih NT2/D1 ćelija. Imunofluorescentno obeležavanje NT2-N anti-β3 tubulin antitelom (crveni signal) i NT2-A anti-GFAP antitelom (zeleni signal). Jedra su vizuelizovana DAPI bojenjem. Skala: 50 μm

4.2.2. Uticaj ispitivanih tretmana na vijabilnost NT2-N i NT2-A dobijenih diferencijacijom NT2/D1 ćelija

Kako bi ispitali efekat akutnih tretmana energetskim pićem i njegovim komponentama, kofeinom i taurinom, sa i bez alkohola, na vijabilnost NT2-N i NT2-A, korišćen je MTT test.

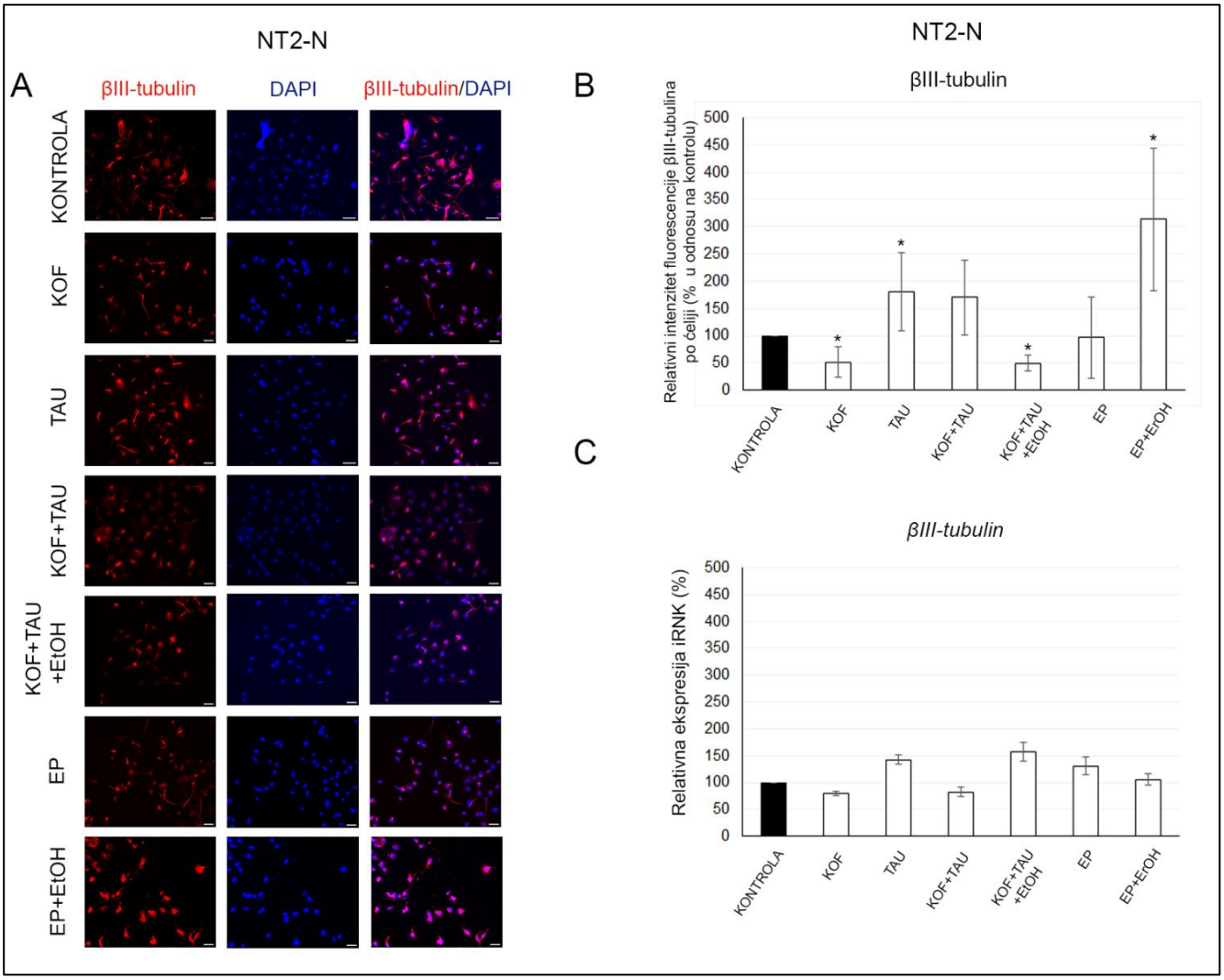


Slika 37. Vijabilnost (A) NT2-N i (B) NT2-A nakon 24 č. tretmana naznačenim komponentama. Eksperimentalni podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD tri nezavisna eksperimenta. Vrednost $p<0,05$ je smatrana značajnom i obeležena zvezdicom (*). Kontrola – netretirane ćelije (NT2-N ili NT2-A). Naznačeni tretmani: KOF – kofein; TAU – taurin; KOF+TAU – kofein+taurin; KOF+TAU+EtOH – kofein+taurin+alkohol; EP – energetsko piće; EP + EtOH – energetsko piće+alkohol.

Dobijeni rezultati pokazuju da su isptivani akutni tretmani u trajanju od 24 č. imali različit uticaj na vijabilnost NT2-N i NT2-A (Slika 37). Kod NT2-N je uočeno malo ali statistički značajno smanjenje vijabilnosti nakon tretmana kofeinom (KOF), kofeinom sa taurinom (KOF+TAU) i kod tretmana energetskim pićam (EP), (slika 37A), dok kod NT2-A tretmani nisu imali uticaja na ćelijsku vijabilnost u poređenju sa netretiranim neuronima i astrocitima (kontrola NT2-N ili NT2-A), (slika 37B).

4.2.3. Uticaj ispitivanih tretmana na ekspresiju markera neuralne diferencijacije NT2-N

Ekspresija neuronalnog markera βIII-tubulina u NT2-N nakon primene akutnih tretmana energetskim pićem i njegovim komponentama, kofeinom i taurinom, sa i bez alkohola analizirana je imunocitohemijskim bojenjem (Slika 38). S obzirom na njegovu ulogu u organizaciji mikrotubula i formiranju neurita (Katsetos et al., 2003), promene u njegovoj ekspresiji odražavaju promene u neuralnom integritetu i omogućavaju procenu potencijalnih neurotoksičnih ili neuroprotektivnih efekata ispitivanih komponenti energetskog pića, sa i bez alkohola.



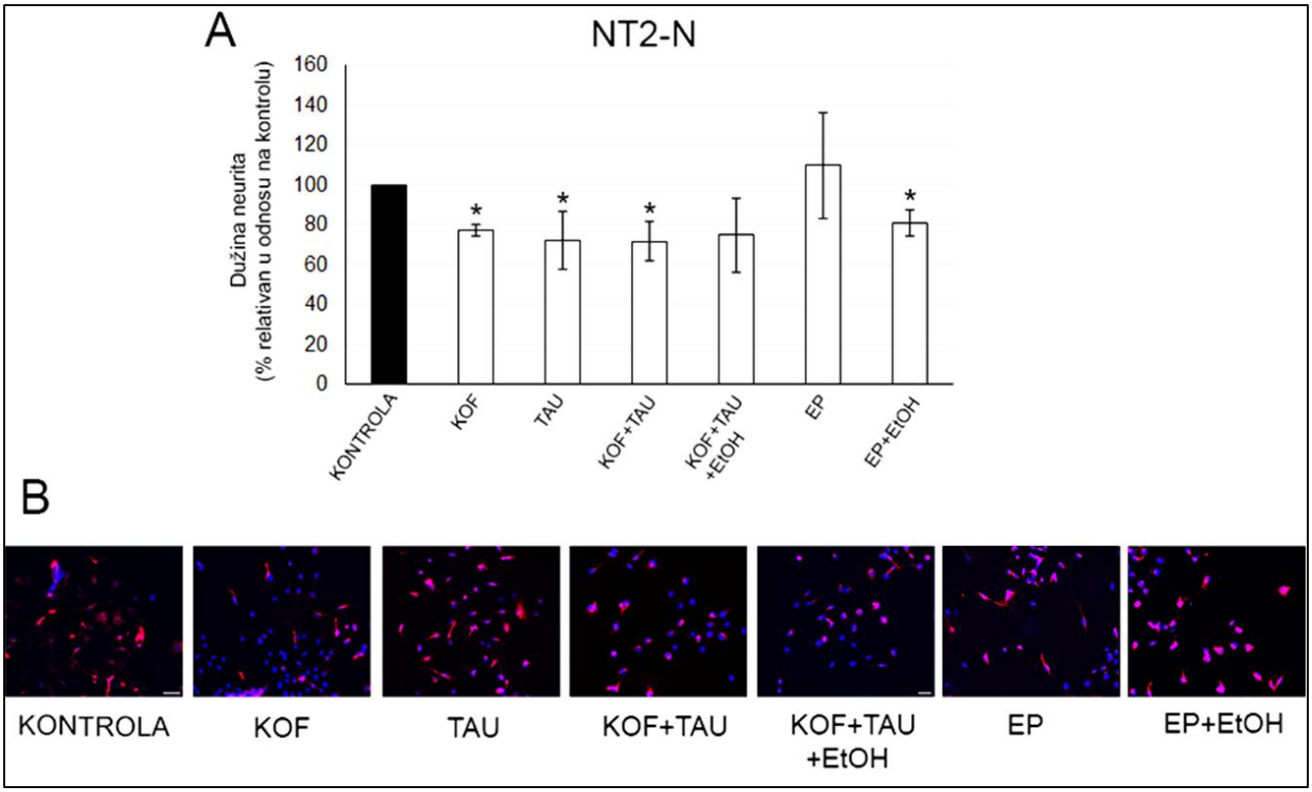
Slika 38. Efekat tretmana energetskim pićem i njegovim komponentama, kofeinom i taurinom, sa i bez alkohola na ekspresiju neuronalnog markera βIII-tubulina u NT2-N. A) Reprezentativne mikrografije NT2-N imunofluorescentno obeleženih βIII-tubulinom (crveno) i DAPI-jem (plavo) kod netretiranih ćelija (kontrola) i nakon tretmana: kofeinom (KOF), taurinom (TAU), kofeinom sa taurinom (KOF+TAU), kofeinom sa taurinom i etanolom (KOF+TAU+EtOH), energetskim pićem (EP) i energetskim pićem sa alkoholom (EP+EtOH). Preklopljene slike prikazuju kolokalizaciju signala. Skala: 50 μm. B) Kvantifikacija imunocitohemijske analize βIII-tubulina po ćeliji predstavljena relativno u odnosu na kontrolu kojoj je dodeljena vrednost 100%. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD (n=3). C) Relativna ekspresija iRNK za βIII-tubulin određena qPCR analizom i prikazana kao relativna vrednost u odnosu na kontrolu kojoj je dodeljena vrednost 100%. Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD (n=2).

Kod kontrolnih, netretiranih ćelija uočava se izražena ekspresija βIII-tubulina duž ćelijskih tela i izduženih neurita, što odgovara fenotipu diferenciranih neurona (Lee et al., 1990). Nakon tretmana kofeinom (KOF) primećeno je smanjenje intenziteta signala i redukovana razgranatost neurita, dok je u prisustvu taurina (TAU) signal bio povećan i morfologija ćelija slična kontrolnoj (Slika 38A). Kombinacija tretmana kofeina i taurina (KOF+TAU) i tretman energetskim pićem (EP), nisu doveli do dodatnog smanjenja signala (Slika 38A). Tretman kofeinom sa taurinom i etanolom (KOF+TAU+EtOH) doveo je do smanjenja intenziteta fluorescentnog signala βIII-tubulina i manjeg broja jasno izraženih

neurita. Nasuprot tome, nakon tretmana energetskim pićem sa alkoholom (EP+EtOH), uočena je izraženija ekspresija βIII-tubulina (Slika 38A).
Očekivano, rezultati kvantifikacije fluorescentnog signala odražavaju vizuelna zapažanja sa panela A. Tretman kofeinom doveo je do smanjenja fluorescentnog signala u odnosu na kontrolu, dok su vrednosti nakon tretmana kofeina sa taurinom (KOF+TAU) i energetskim pićem (EP), bile približno jednake kontrolnoj (Slika 38B). Najniže vrednosti zabeležene su nakon tretmana kofeinom i kod kombinovanog tretmana – KOF+TAU+EtOH, dok su sa druge strane, taurin (TAU) i energetsko piće sa alkoholom (EP+EtOH) doveli do povećanja relativnog intenziteta fluorescencije βIII-tubulina (Slika 38B).
Analiza relativne ekspresije iRNK za *βIII-tubulin* određena je upotrebom qPCR analize (Slika 38C). Primenom tretmana KOF primećen je trend smanjenja ekspresije iRNK za *βIII-tubulin*. Nasuprot tome, nakon tretmana TAU primećen je trend povećanja ekspresije (slika 38C). Kombinacija KOF+TAU imala je vrednost blisku kontrolnoj, dok je dodatak etanola uz kombinovani tretman, KOF+TAU, doveo do trenda porasta ekspresije iRNK za *βIII-tubulin* (Slika 38C). Energetsko piće samo, kao i u kombinaciji sa etanolom, povećalo je ekspresiju βIII-tubulina, pri čemu je efekat tretmana EP+EtOH bio izraženiji na proteinskom nego na iRNK nivou (Slika 38C). Uporednom analizom ekspresije βIII-tubulina na nivou iRNK i proteina (uporediti sliku 38B i 38C) primećen je isti trend promene ekspresije nakon pojedinačnih tretmana KOF, TAU i kombinovanog tretmana EP+EtOH.

4.2.4. Uticaj ispitivanih tretmana na dužinu neurita NT2-N

U cilju utvrđivanja efekata primenjenih tretmana na efikasnost neuralne diferencijacije i morfološko sazrevanje neurona analizirana je dužina neurita NT2-neurona. U literaturi je pokazano da promene u dužini neurita odražavaju funkcionalni status i integritet neuronalnih ćelija (Podrygajlo et al., 2009). NT2-N ćelije su nakon tretmana obojene neuronalnim markerom – βIII-tubulinom, i dužina neurita je određena kvantitativnom analizom u programu ImageJ (Slika 39).



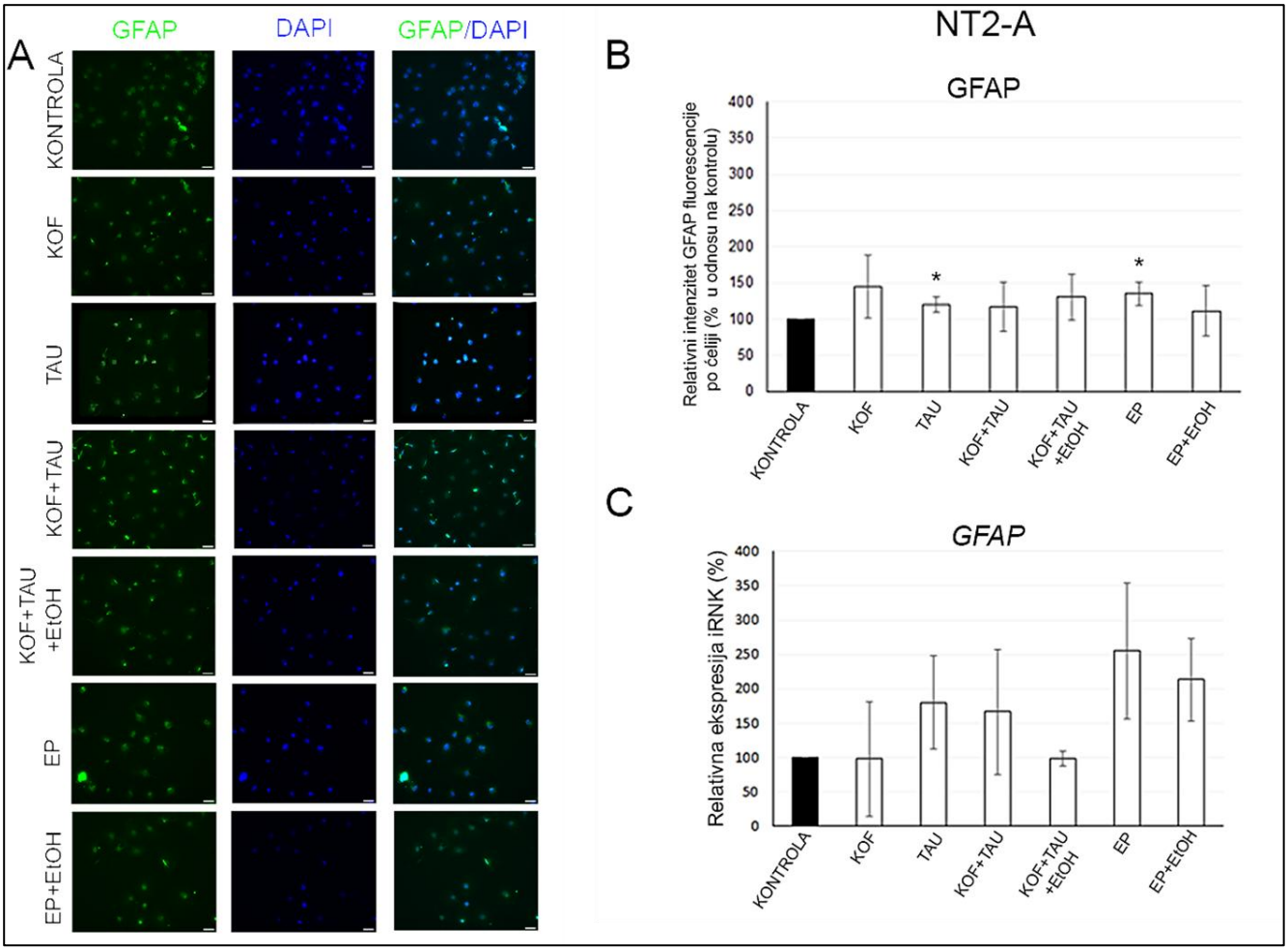
Slika 39. Dužina neurita NT2-N ćelija nakon tretmana kofeinom (KOF), taurinom (TAU), kofeinom sa taurinom (KOF+TAU), kofeinom sa taurinom i etanolom (KOF+TAU+EtOH), energetskim pićem (EP)

i energetskim pićem sa alkoholom (EP+EtOH). A) Dužina neurita je kvantifikovana korišćenjem ImageJ programa i predstavljene vrednosti su relativne u odnosu na kontrolu (netretirane NT2-N) koja je definisana kao 100%, B) Imunocitohemijska analiza neurita obojenih βIII-tubulinom (crveno). Eksperimentalni podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD, pri čemu je u svakom eksperimentu analizirano 10 neurita po tretmanu (n = 3).

U odnosu na kontrolne ćelije (netretirani NT2-N), kraći neuriti uočeni su u NT2-N tretiranim kofeinom (KOF), taurinom (TAU) i njihovom kombinacijom (KOF+TAU) (slika 39A). Sličan obrazac primećen je i nakon tretmana energetskim pićem u kombinaciji sa etanolom (EP+EtOH), dok vrednosti u grupi ćelija tretiranih kofeinom sa taurinom i etanolom (KOF+TAU+EtOH), kao i energetskim pićem (EP) nisu bile statistički značajne (slika 39A).
Imunofluorescentne mikrografije, prikazane na slici 39B, potvrđuju kvantitativnu analizu dužine neurita. Pored toga, na prikazanim mikrografijama, vide se razlike u morfologiji ćelijskih nastavaka između kontrolnih neurona i neurona nakon ispitivanih tretmana (slika 39B). U kontrolnoj grupi prisutni su brojni duži neuriti, dok su nakon pojedinih tretmana (KOF, KOF+TAU, EP+EtOH) uočavaju kraći nastavci (slika 39A).

4.2.5. Uticaj ispitivanih tretmana na ekspresiju markera neuralne diferencijacije NT2-A

U cilju ispitavanja uticaja energetskih pića i njihovih komponenti, kofeina i taurina, u kombinaciji sa alkoholom na NT2-A, analizirana je ekspresija markera GFAP (Slika 40).

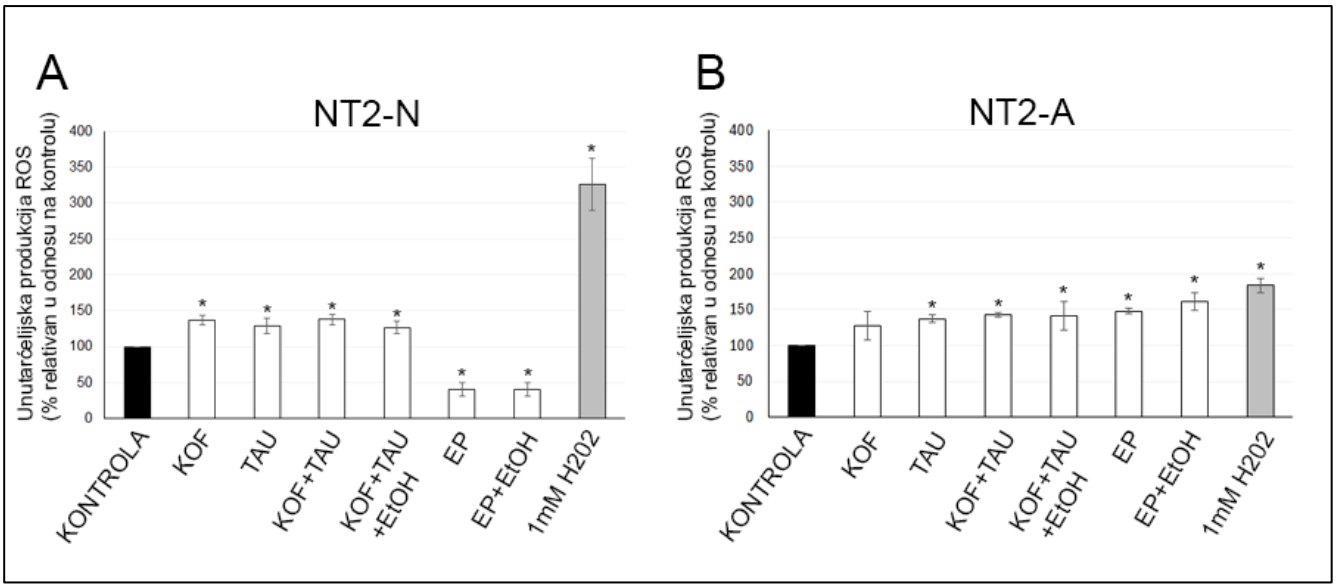


Slika 40. Efekti tretmana energetskim pićem i njegovim komponentama, kofeinom i taurinom, sa i bez alkohola na ekspresiju markera zrelih astrocita, GFAP-a, u NT2-A. A) Reprezentativne imunocitohistohemijske mikrografije, GFAP (zeleno), DAPI (plavo) i spojeni prikaz kontrolnih NT2-A i NT2-A nakon 24 č. primene navedenih tretmana: kofein (KOF), taurin (TAU), kofein+taurin (KOF+TAU), kofein+taurin+etanol (KOF+TAU+EtOH), energetsko piće (EP) i energetsko piće+etanol (EP+EtOH). Skala: 50 μm B) Kvantifikacija imunocitohemijske analize ekspresije GFAP-a, predstavljena kao relativna fluorescencija GFAP-a po ćeliji u odnosu na kontrolu kojoj je dodeljena vrednost 100%. C) Relativna ekspresija iRNK za GFAP analizirana qPCR metodom (predstavljena u odnosu na kontrolu kojoj je dodeljena vrednost 100%). Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD (n=2).

Vizuelnim pregledom reprezentativnih mikrografija uočava se očuvana ekspresija GFAP-a u svim eksperimentalnim grupama, bez uočljivih promena u morfologiji ćelija (Slika 40A). Međutim, kvantifikacija imunocitohistohemijske analize je pokazala da dva od svih ispitivanih tretmana, taurin (TAU) i energetsko piće (EP), povećavaju ekspresiju GFAP u NT2-A dok preostali tretmani ne utiču na ekspresiju ovog proteina u NT2-A (Slika 40B). Takodje, analiza ekspresije *GFAP* iRNK pokazuje trend sličan profilu ekspresije GFAP proteina, sa povećanjem u tretmanima TAU, EP i EP+EtOH (slika 40C).

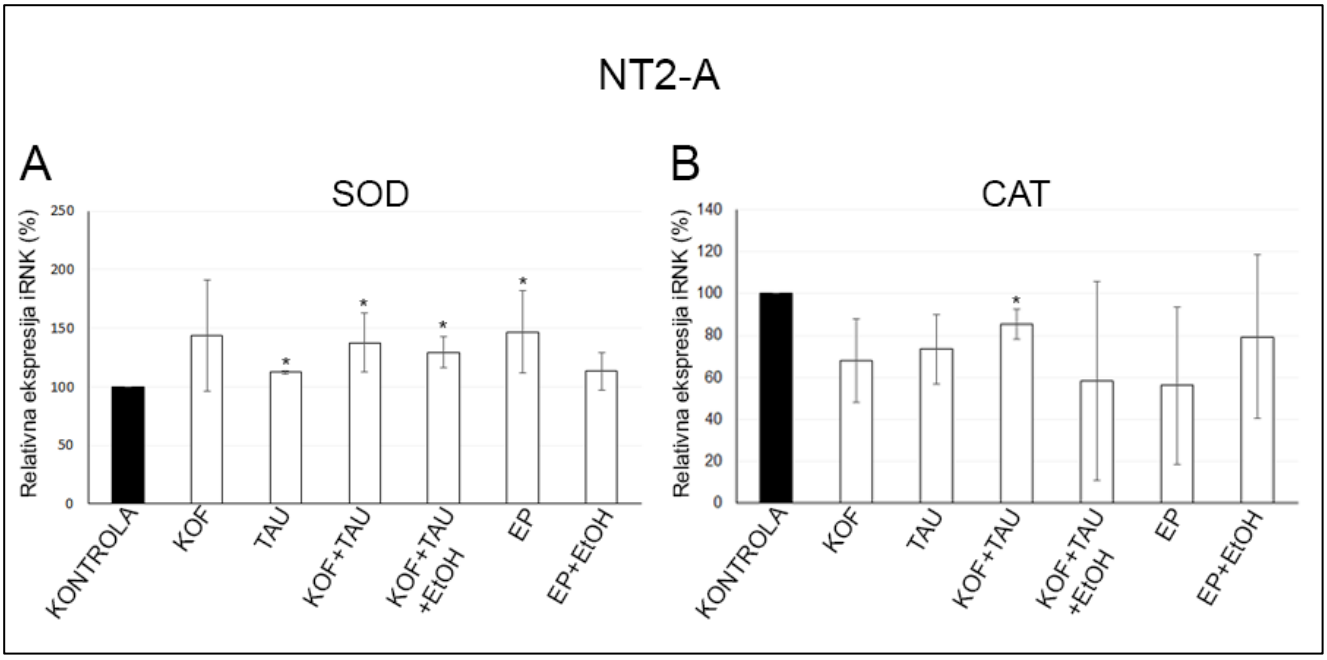
4.2.6. Uticaj ispitivanih tretmana na produkciju reaktivnih oblika kiseonika (ROS) i ekspresiju superoksid-dismutaze (SOD) u NT2-N i NT2-A

Uticaj ispitivanih tretmana na redoks status NT2-N i NT2-A je praćen upotrebom DCF-DA (2′-7′-dihlorodihidrofluorescein diacetat) agensa – fluorescentnog indikatora statusa reaktivnih vrsta kiseonika (engl. Reactive oxygen species – ROS) u ćeliji.
Rezultati analize redoks statusa NT2-N nakon ispitivanih tretmana su pokazali različit odgovor nakon tretmana pojedinačnim komponentama u odnosu na tretmane energetskim pićem (sa ili bez alkohola), (Slika 41A). Kod NT2-N tretiranih pojedinačnim ili kombinovanim komponentama, došlo je do statistički značajnog povećanja produkcije ROS, dok je kod tretmana istih ćelija energetskim pićem sa i bez alkohola produkcija ROS smanjena na ~40%, slika 41A. U slučaju NT2-A svi tretmani izuzev kofeina su doveli do statistički značajnog povećanja produkcije ROS (slika 41B)
.



Slika 41. DCF esej: Produkcija ROS (reaktivnih oblika kiseonika) u NT2-N (A) i NT2-A (B) nakon ispitivanih tretmana – kofein (KOF), taurin (TAU), kofein sa taurinom (KOF+TAU), kofein sa taurinom i etanolom (KOF+TAU+EtOH), energetsko piće (EP) i energetsko piće sa alkoholom (EP+EtOH). Eksperimentalni podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD tri nezavisna eksperimenta. Vrednost $p<0,05$ je smatrana značajnom i obeležena je zvezdicom (*).

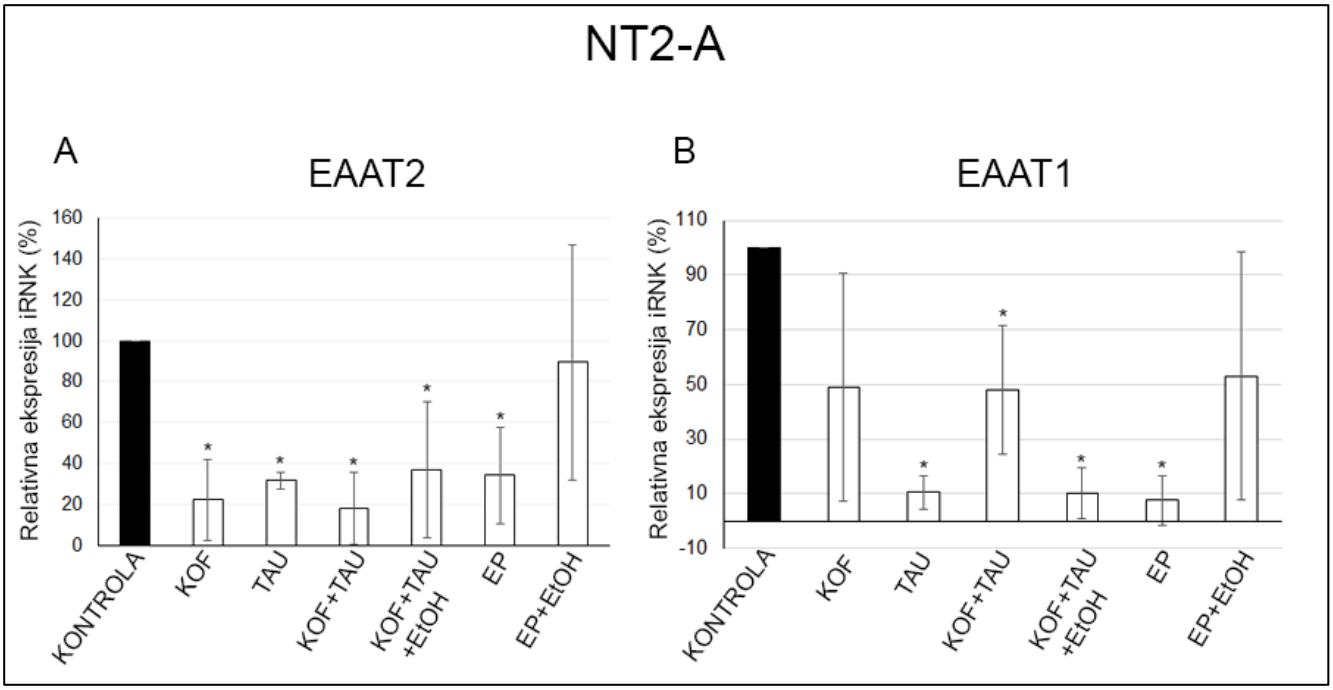
Nakon detekcije promena u nivou intracelularnih reaktivnih kiseoničnih vrsta primenom DCF testa, analizirana je ekspresija enzima superoksid dismutaze (engl. Superoxide-dismutase 1, SOD) i katalaze (engl. Catalase, CAT) u cilju procene kapaciteta antioksidativnog sistema NT2-A i mehanizama odbrane od oksidativnog stresa (Slika 42). Kako astrociti igraju centralnu ulogu u regulaciji oksidativnog stresa i antioksidativnih mehanizama u CNS-u (Chen et al., 2020; Zakrzewski & Boczek, 2025), dalje analize su sprovedene na NT2-A. Ekspresija antioksidativnih enzima superoksid-dismutaze (SOD) i katalaze (CAT) analizirana je kao pokazatelj ćelijskog odgovora na oksidativni stres, pri čemu se u uslovima povećanog nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) dešava povećanje njihove ekspresije kao deo adaptivnog zaštitnog mehanizma ćelije (Ulloa et al., 2024). Analiza ekspresije antioksidativnog enzima superoksid dismutaze pokazala je da u NT2-A većina tretmana dovodi do značajnog povećanja ekspresije ovog enzima izuzev tretmana kofeinom (KOF) i energetskim pićem sa alkoholom (ED+EtOH), dok su se na niovu ekspresije katalaze (CAT) kod NT2/A mogle uočiti statistički značajne promene samo nakon kombinovanog tretmana kofeina sa taurinom (KOF+TAU), Slika 42.



Slika 42. Relativna ekspresija A) superoksid dismutaze (SOD) i B) katalaze (CAT) u NT2/A nakon 24 č. akutnih tretmana kofeinom (KOF), taurinom (TAU), kofeinom sa taurinom (KOF+TAU), kofeinom sa taurinom i etanolom (KOF+TAU+EtOH), energetskim pićem (EP) i energetskim pićem sa alkoholom (EP+EtOH). Eksperimentalni podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD tri eksperimenta. Vrednost $p<0,05$ je smatrana značajnom i označena je zvezdicom (*).

4.2.7. Uticaj tretmana na ekspresiju glutamatnih transportera i količinu intracelularnog glutamata u NT2-A

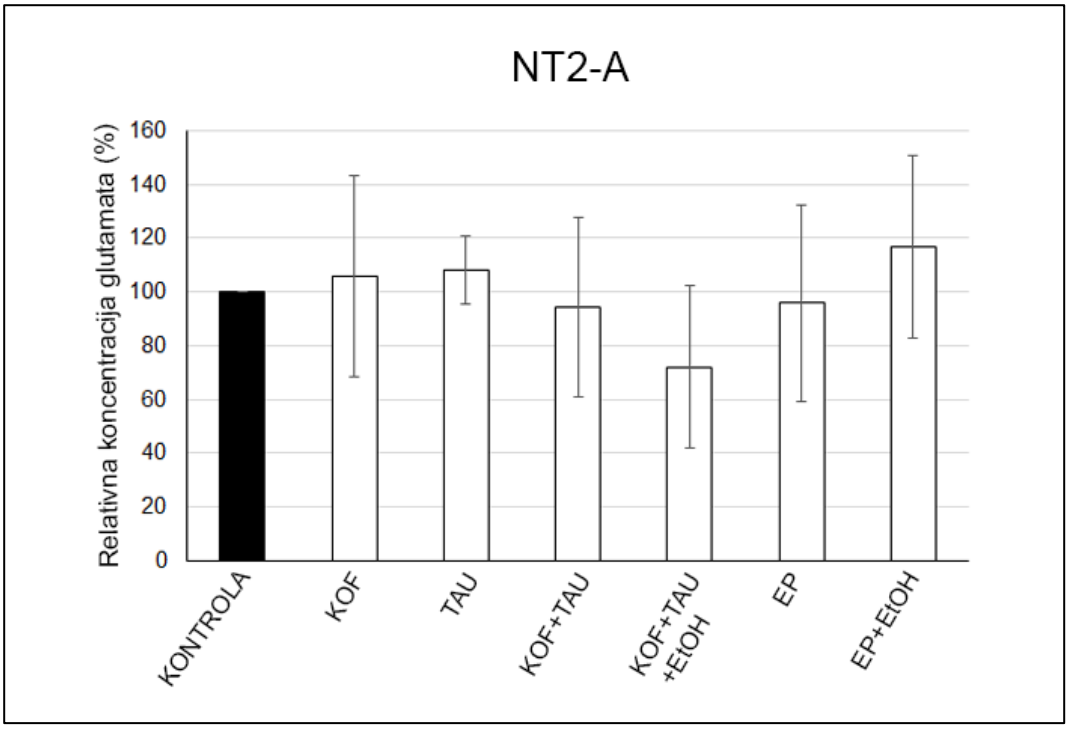
Astrociti imaju ključnu ulogu u održavanju glutamatne homeostaze u CNS-u, prvenstveno putem membranskih transportera ekscitatornih aminokiselina tip 2 (engl. Excitatory Amino Acid Transporter 2, EAAT2) i tip 1 (engl. Excitatory Amino Acid Transporter 1, EAAT1), koji omogućavaju preuzimanje viška glutamata iz ekstracelularnog prostora uključujući i sinaptičku pukotinu (Todd & Hardingham, 2020). Pri tom, većina ekstracelularnog glutamata u CNS-u (80-90%) biva uklonjena od strane EAAT2 transportera (Kim et al., 2011; Takahashi et al., 2015). S obzirom na to da poremećaj njihove funkcije može dovesti do nakupljanja glutamata i pojave ekscitotoksičnosti, nakon primene tretmana analizirana je ekspresija ovih transportera u NT2-astrocitima qPCR metodom.



Slika 43. Ekspresija glutamatnih transportera A) EAAT2 i B) EAAT1 analizirana qPCR-om nakon ispitivanih tretmana: kofeinom (KOF), taurinom (TAU), kofeinom sa taurinom (KOF+TAU), kofeinom sa taurinom i etanolom (KOF+TAU+EtOH), energetskim pićem (EP) i energetskim pićem sa alkoholom (EP+EtOH). Eksperimentalni podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD tri nezavisna eksperimenta. Vrednosti $p<0,05$ su smatrane značajnim i označene su zvezdicom (*).

Rezultati analize ekspresije glutamatnih transportera pokazali su da je većina primenjenih tretmana dovela do statistički značajnog smanjenja ekspresije oba transportera (Slika 43A i B). Izuzetak je zabeležen kada je analizirana relativna ekspresija *EAAT2* nakon tretmana NT2-A energetskim pićem sa alkoholom (Slika 43A) i ekspresija *EAAT1* nakon tretmana NT2-A kofeinom i energetskim pićem sa alkoholom (Slika 43B) gde nije uočena statistički značajna promena u odnosu na netretirane kontrolne ćelije.

Kako bi se utvrdilo da li promene u ekspresiji transportera prate i promene u nivou glutamata unutar NT2-A ćelija, određivana je količina intracelularnog glutamata luminiscentnim testom – Glutamate-Glo assay (Slika 44). Ova analiza omogućava kvantitativno određivanje koncentracije glutamata nezavisno od ekspresije transportera i pruža uvid u potencijalno narušavanje balansa u količini glutamata unutar ćelija (Lecoutre et al., 2024).



Slika 44. Relativna koncentracija intracelularnog glutamata u NT2-A nakon ispitivanih tretmana: kofeinom (KOF), taurinom (TAU), kofeinom sa taurinom (KOF+TAU), kofeinom sa taurinom i etanolom (KOF+TAU+EtOH), energetskim pićem (EP) i energetskim pićem sa alkoholom (EP+EtOH), dobijena upotrebom glutamatnog eseja (engl. Glutamate-Glo Assay). Eksperimentalni podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD (n=3).

Dobijeni rezultati pokazali su da, uprkos promenama u ekspresiji EAAT1 i EAAT2 transportera, koncentracija intracelularnog glutamata nije bila značajno izmenjena nakon primene naznačenih tretmana (Slika 44). Ovakav rezultat može ukazivati na složenu i višeslojnu regulaciju glutamatnog metabolizma, koja uključuje ne samo transport, već i sintezu, skladištenje i metabolizam glutamata u ćelijama u CNS-u.

5. Diskusija

U ovom doktoratu analiziran je uticaj energetskog pića i njegovih glavnih bioaktivnih komponenti, kofeina i taurina, pojedinačno i u kombinaciji sa etanolom, na različite stadijume neuralne diferencijacije u *in vitro* model-sistemu neurogeneze čoveka – NT2/D1 ćelijama indukovanim RK-om. Optimizovan je 3D model-sistem za propagaciju pluripotentnih NT2/D1 ćelija i njihovu neuralnu diferencijaciju do stadijuma NT2/D1 ranih neuralnih progenitora, koji predstavlja relevantnu platformu za proučavanje efekata bioaktivnih jedinjenja na pluripotentne ćelije i rane neuralne progenitore čoveka. Rezultati analiza efekata ispitivanih komponenti na različitim stadijumima neuralne diferencije, ukazali su da energetska pića i njihove komponente ostvaruju značajne efekte na osnovne ćelijske procese tokom neurogeneze. Utvrđeno je da uticaj ispitivanih komponenti zavisi od stadijuma neuralne diferencijacije i tipa zrelih neuralnih ćelija, koji u najvećoj meri određuju vrstu i intenzitet promena koje nastaju kao posledica delovanja primenjenih tretmana. Dobijeni rezultati ukazuju i na kompleksnost istraživanja efekata složenih smeša čije se dejstvo ne može analizirati isključivo ispitivanjem efekata pojedinačnih komponenti. Razlike koje su uočene u 2D i 3D model-sistemima pokazuju da interpretacija rezultata i poređenje sa podacima iz ranijih studija u ovom polju istraživanja predstavljaju izazov usled nestandardizovanih eksperimentalnih uslova, primene različitih model-sistema (2D, 3D i animalnih model-sistema), velikih varijacija u primenjenim koncentracijama ispitivanih komponenti, dužini tretmana i upotrebi različitih energetskih pića i njihovih komponenti u ispitivanjima.

5.1. Optimizacija uslova za propagaciju pluripotentnih NT2/D1 ćelija u 3D model-sistemu na bazi alginatnih mikrovlakana

Literaturni podaci pokazuju da su NT2/D1 ćelije uspešno propagirane i diferencirane kako u 2D (Andrews, 1984; Coyle et al., 2011; Haile et al., 2014; Pleasure et al., 1992), tako i u 3D model-sistemima bez nosača (Hill et al., 2008; Kitano & Nakazawa, 2021). U jednoj studiji (Kitano & Nakazawa, 2021) je pokazano da NT2/D1 ćelije ispoljavaju približno pet puta veći proliferativni kapacitet u 2D kulturi, gde rastu u monosloju, u poređenju sa 3D model-sistemima u kojima formiraju sfere. Smanjena proliferacija u sferama može se objasniti postepenim opadanjem koncentracije kiseonika od periferije ka centru sfera, usled čega dolazi do uspostavljanja hipoksičnih uslova koji predstavljaju ograničavajući faktor za ćelijsku proliferaciju (Kitano & Nakazawa, 2021). Pored toga, ograničena difuzija nutrijenata ka unutrašnjosti sfera dodatno doprinosi smanjenju metaboličke aktivnosti i deobi ćelija u nekrotičnom centru sfere (Hirschhaeuser et al., 2010; Kitano & Nakazawa, 2021). Ova ograničenja karakteristična za sferoidne kulture podstakla su razvoj alternativnih 3D model-sistema sa nosačima, uključujući i nosače na bazi alginatnih hidrogelova (Augst et al., 2006; Lee & Mooney, 2012; Rowley et al., 1999).

U ovom radu pluripotentne NT2/D1 ćelije imobilisane su manuelnom ekstruzijom u alginatna mikrovlakna u kojima je procentualna zastupljenost alginata bila 1,5 mas. %. Ova koncentracija je odabrana na osnovu literaturnih podataka prema kojima je za 3D modelovanje mehaničkih karakteristika tkiva mozga, koje je veoma meko, sa Jangovim (Young) modulom elastičnosti od ~1–10 kPa, optimalna koncentracija alginata 0,5 mas. % do 1,5 mas. % (Distler et al., 2020; Tejo-Otero et al., 2022). Koncentracije alginata veće od 2 mas. % stvaraju hidrogelove čija čvrstoća prevazilazi strukturu tkiva mozga (Distler et al., 2020; Tejo-Otero et al., 2022). Takođe, koncentracija jona kalcijuma od 0,1 M, koja je neophodna za umrežavanje alginata i formiranje gela, je u opsegu preporučenih koncentracija za postizanje željene čvrstine alginatnih mikrovlakana (Cuadros et al., 2012).

Tako napravljena alginatna mikrovlakna su kultivisana do sedmog dana. Tokom sedmodnevne kultivacije u 3D model-sistemu alginatnih mikrovlakana, ćelije su očuvale vijabilnost i proliferativni kapacitet. Već nakon drugog dana uočeno je njihovo udruživanje i formiranje ćelijskih agregata, što ukazuje na to da alginatna mikrovlakna obezbeđuju pogodnu mikrosredinu za normalnu funkciju ćelija i

uspostavljanje međućelijskih veza. Prilikom oslobađanja ćelija iz alginatnih mikrovlakana korišćenjem 2 mas. % rastvora Na-citrata došlo je do značajnog smanjenja broja vijabilnih ćelija, što je u skladu sa literaturnim podacima o citotoksičnom dejstvu Na-citrata (Pejic et al., 2025; Rodriguez et al., 2020; Vo et al., 2020). Takođe, NT2/D1 ćelije pokazuju povećanu osetljivost na agense koji utiču na preživljavanje ćelija (Burger et al., 1998). Uprkos smanjenju broja ćelija nakon oslobađanja iz alginatnih vlakana, ćelije su zadržale adhezioni potencijal i uspešno adherirale na površinu suda u kome su gajene. Takođe, sačuvan je proliferativni kapacitet ćelija, jer su nakon oslobađanja gajene dodatnih 72 h tokom kojih su formirale konfluentni sloj na površini Petri posude. Uočene razlike u morfologiji između ćelija propagiranih u 2D i 3D model-sistemima u skladu su sa navodima iz literature, prema kojima ćelije u 3D model-sistemima poprimaju zaobljen oblik usled prostorno usmerenog rasta i odsustva adhezije za podlogu suda u kom se gaje (Breslin & O'Driscoll, 2013; Kitano & Nakazawa, 2021; Pampaloni et al., 2007).

Dosadašnja istraživanja pokazuju da se NT2/D1 ćelije mogu uspešno imobilisati u alginatne hidrogelove (Cacciotti et al., 2017; Radonjić et al., 2022). U studiji Cacciotti i saradnika, inkapsulacija NT2/D1 ćelija u alginatne mikročestice obezbedila je pogodno mikrookruženje koje podržava spontanu neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelija i funkcionalno sazrevanje dopaminergičkih neurona (Cacciotti et al., 2017). Iako je efikasnost neuralne diferencijacije u ovoj studiji niska, Cacciotti i saradnici su pokazali da ovaj sistem podržava neurogenezu NT2/D1 ćelija koja traje 4 nedelje. Ovi rezultati potvrđuju da alginatni hidrogelovi, zahvaljujući svojoj biokompatibilnosti, niskoj imunogenosti i odsustvu toksičnosti (Augst et al., 2006; Lee & Mooney, 2012), predstavljaju pogodnu platformu za propagaciju humanih pluripotentnih NT2/D1 ćelija u 3D okruženju.

5.1.1. Uticaj ispitivanih tretmana na vijabilnost pluripotentnih NT2/D1 ćelija u 2D i 3D model-sistemima

Rezultati ispitivanja efekata primenjenih tretmana u trajanju od 24 č. na vijabilnost pluripotentnih NT2/D1 ćelija u 3D model-sistemu alginatnih mikrovlakana pokazala su da nije došlo do promene u vijabilnosti ćelija. U kontrolnom 2D model-sistemu dobijeni su slični rezultati izuzev tretmana kofeinom, gde je uočeno malo ali statistički značajno smanjenje vijabilnosti. Ovi rezultati ukazuju da 3D okruženje može imati protektivnu ulogu i predstavljati povoljniju mikrosredinu za očuvanje vijabilnosti pluripotentnih ćelija u odnosu na 2D kulturu. U skladu sa tim, prethodne studije su pokazale da alginat poseduje antioksidativna i neuroprotektivna svojstva (Eftekharzadeh et al., 2010; Feng et al., 2024). Ovi efekti potvrđeni su i kod NT2-neurona izloženih vodonik-peroksidu, koji izaziva oksidativni stres (Eftekharzadeh et al., 2010), kao i u uslovima oksidativne senescencije indukovane vodonik-peroksidom u H9C2 kardiomiocitima (Feng et al., 2024). Zajedno, ovi rezultati ukazuju da imobilizacija ćelija u 3D model-sisteme na bazi alginatnih hidrogelova može ublažiti negativne efekte stresnih i toksičnih uslova, doprinoseći očuvanju ćelijske funkcije.

Dosadašnja istraživanja su uglavnom bila usmerena na ispitivanje uticaja konzumiranja energetskih pića i njihovih kombinacija sa alkoholom na mentalno zdravlje i ponašanje ljudi (Richards & Smith, 2016), kao i na efekte u različitim animalnim model-sistemima (Graneri et al., 2021; Krahe et al., 2017; Petribu et al., 2022). Imajući u vidu da energetska pića i njihova kombinacija sa alkoholom primarno deluju na CNS i kardiovaskularni sistem, njihovi fiziološki efekti najčešće su proučavani u bihevioralnim studijama (Goldfarb et al., 2014; Richards & Smith, 2016) i na animalnim model-sistemima (Graneri et al., 2021; Krahe et al., 2017; Petribu et al., 2022), primarnim ćelijskim kulturama i diferenciranim ćelijama dobijenim iz ovih sistema (Serdar et al., 2019, Zeidán-Chuliá et al., 2013). Međutim, podaci o njihovom uticaju na pluripotentne matične ćelije, uključujući i indukovane pluripotentne matične ćelije (iPSCs) su malobrojni. U skladu sa tim, u okviru ove doktorske disertacije razvijen je i predstavljen novi 3D *in vitro* model-sistem, zasnovan na imobilisanim pluripotentnim NT2/D1 ćelijama, koji omogućava

ispitivanje potencijalnih citotoksičnih efekata bioaktivnih supstanci prisutnih u hrani i piću na pluripotentne ćelije čoveka.

5.1.2. Matematičko modelovanje prenosa mase ispitivanih supstanci kroz alginatno mikrovlakno sa imobilisanim ćelijama

U cilju procene efikasnosti prenosa mase kofeina, taurina i etanola kroz alginatno mikrovlakno sa imobilisanim ćelijama, iz okolnog medijuma, i ravnomerne distribucije primenjenih tretmana među ćelijama unutar mikrovlakna, sprovedeno je matematičko modelovanje prenosa mase u statičkim uslovima. Dobijeni rezultati potvrdili su efikasan prenos mase za sve tri supstance unutar alginatnog mikrovlakna, pri čemu su uočene razlike u brzini njihove difuzije. Najbrže izjednačavanje koncentracije unutar mikrovlakana zabeleženo je za etanol, zatim za taurin, dok je najsporija difuzija uočena u slučaju kofeina, što se može dovesti u vezu sa razlikama u njihovoj molekulskoj masi i fizičko-hemijskim osobinama.

Prethodna istraživanja pokazala su da alginatni hidrogelovi omogućavaju efikasnu difuziju kiseonika i drugih malih molekula, čime se obezbeđuju povoljni uslovi za održavanje vijabilnosti inkapsuliranih ćelija (Andersen et al., 2015; Lee & Mooney, 2012; Zhao et al., 2005). Međutim, efikasnost transporta kiseonika zavisi od dimenzija hidrogela, pri čemu konstrukti prečnika većeg od 500 μm mogu razviti centralne hipoksične regione usled ograničene difuzije, dok konstrukti manjeg prečnika omogućavaju efikasniji transport kiseonika i nutrijenata do inkapsuliranih ćelija (Read et al., 2018). Literaturni podaci su takođe pokazali da se ćelije mogu uspešno propagirati i ostati vijabilne četiri nedelje u sistemu alginatnih mikrovlakana (Dragoj et al., 2021).

U skladu sa tim, odabran je 3D model-sistem alginatnih mikrovlakana za propagaciju NT2/D1 ćelija koji je omogućio proliferaciju pluripotentnih NT2/D1 ćelija i njihovu trodimenzionalnu organizaciju, čime je stvoreno mikrookruženje koje vernije odražava uslove prisutne *in vivo*. U početnim fazama kultivacije bile su prisutne pojedinačne, zaobljene ćelije, koje vremenom, u 3D okruženju, su formirale agregate. Time je stvorena mogućnost praćenja efekata ispitivanih supstanci u različitim fazama organizacije sistema, od pojedinačnih ćelija na početku kultivacije, preko ranih agregata, do višeslojnih ćelijskih struktura koje se formiraju tokom dužeg perioda propagacije ćelija u 3D model-sistemu.

Budući da se ćelijski odgovori na bioaktivna jedinjenja mogu razlikovati u zavisnosti od prostorne organizacije ćelija i njihovih međusobnih interakcija (Duval et al., 2017), dobijeni rezultati dodatno potvrđuju značaj primene 3D model-sistema u interpretaciji efekata ispitivanih supstanci.

5.2. Uticaj ispitivanih tretmana na NT2/D1 rane neuralne progenitore u sferama formiranim u suspenziji i u visećim kapima („hanging drop“)

Prethodna istraživanja pokazala su da 3D model-sistem NT2/D1 sfera predstavljaju relevantan i validan *in vitro* model-sistem za ispitivanje neurotoksičnih efekata različitih supstanci (Hill et al., 2008; Kitano & Nakazawa, 2021; Terrasso et al., 2015). U studiji Hill i saradnika (Hill et al., 2008), NT2/D1 ćelije organizovane u sfere korišćene su za ispitivanje efekata neurotoksičnih jedinjenja na neuralnu diferencijaciju i ćelijsku vijabilnost. Izlaganje supstancama kao što su valproična kiselina, litijum, hidroksiurea i akrilamid dovelo je do promena u ćelijskoj vijabilnosti i, u slučaju valproične kiseline, do smanjene ekspresije neuralnih markera, potvrđujući osetljivost ovog model-sistema za detekciju razvojne neurotoksičnosti (Hill et al., 2008). Pored toga, pokazano je da NT2/D1 ćelije organizovane u 3D neurosfere ulaze u stabilan proces neuralne diferencijacije i ispoljavaju specifične obrasce genske ekspresije u poređenju sa 2D kulturom, što ukazuje na veću fiziološku relevantnost ovog model-sistema (Kitano & Nakazawa, 2021; Terrasso et al., 2015).

U našoj studiji, ćelije su uspešno propagirane u 3D model-sistemima i formirale su sfere koje se sastoje od ranih neuralnih progenitora, što je potvrđeno analizom markera pluripotentnosti *OCT4* i markera rane

faze neuralne diferencijacije *PAX6*. Analiza ćelijske vijabilnosti pokazala je da neuralni progenitori u sferama ostaju vijabilni nakon primene svih ispitivanih tretmana. Istovremeno, analiza ekspresije markera *OCT4* i *PAX6* ukazala je na različite obrasce odgovora u zavisnosti od primenjenog tretmana. Zabeleženo je statistički značajno smanjenje ekspresije *OCT4* nakon zasebnih tretmana kofeinom i taurinom, dok je u ostalim eksperimentalnim uslovima uočen trend povećanja njegove ekspresije. Nasuprot tome, ekspresija *PAX6* bila je smanjena nakon većine tretmana, izuzev kombinacije kofeina i taurina, kao i tretmana energetskim pićem, gde je zabeležen porast ekspresije.
Mikrosredina u 3D kulturi ima ključnu ulogu u regulaciji ćelijskog odgovora na hemijske supstance (Antoni et al., 2015). Ipak, iako sfere predstavljaju napredniji model-sistem u odnosu na 2D sisteme, njihova primena je povezana sa određenim ograničenjima (Antoni et al., 2015; Kapałczyńska et al., 2018). U sferama i neurosferama dolazi do formiranja gradijenata nutrijenata, kiseonika i signalnih molekula, koji utiču na proliferaciju, diferencijaciju i osetljivost ćelija na toksične supstance (Antoni et al., 2015). Prostorna organizacija ćelija doprinosi razlikama u odgovoru na ispitivane agense u odnosu na 2D kulturu, zbog čega se 3D neuralni model-sistemi smatraju fiziološki relevantnijom platformom za ispitivanje efekata različitih supstanci (Antoni et al., 2015; Hill et al., 2008; Edmondson et al., 2014; Kapałczyńska et al., 2018).

5.3. Prednosti alginatnih mikrovlakana kao 3D nosača ćelija

Istraživanja zasnovana na alginatima kao ćelijskom nosaču su prvobitno rađena na alginatnim mikrokuglicama, čije formiranje je podrazumevalo primenu specijalizovane opreme – generator konstantnog napona i određeni nivo tehničke obučenosti, s obzirom na to da se mikrokuglice dobijanju procesom elektrostatičke ekstruzije, i preciznom optimizacijom uslova ekstruzije (Radonjić et al., 2022). Međutim, u cilju razvoja pristupačnijeg i jednostavnijeg model-sistem sistema, koji ne zahteva rad na kompleksnoj i skupoj opremi, razvijena su alginatna mikrovlakna. Njihovo formiranje zasniva se na manuelnom istiskivanju suspenzije ćelija u alginatnom rastvoru kroz špric i iglu određenog promera (G) u rastvor za geliranje, čime se omogućava lakša primena i veća reproducibilnost metode, uz zadržavanje ključnih karakteristika trodimenzionalnog okruženja pogodnog za gajenje ćelija (Radonjić et al., 2022).

5.3.1. Vijabilnost i proliferacija NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u 3D model-sistemu alginatnih mikrovlakana

Neuralna diferencijacija predstavlja proces koji podrazumeva postepeno smanjenje proliferativnog kapaciteta ćelija, njihov prelazak iz stadijuma pluripotentnosti u rane neuralne progenitore, kao i ireverzibilno usmeravanje ka neuronalnom i glijalnom fenotipu (Andrews, 1984; Pleasure et al., 1992, Langlois & Duval, 1997). Brojne studije su opisale ove promene u adherentnim uslovima, gde dolazi do jasno definisanih promena u proliferaciji i ekspresiji specifičnih markera (Stern et al., 2014; Topalovic, Krstic, et al., 2017; Topalovic, Schwirtlich, et al., 2017).
U ovom radu analiza vijabilnosti nakon 48 č. indukcije RK-om pokazala je da su ćelije ostale vijabilne i zadržale proliferativni kapacitet u odnosu na početni vremenski trenutak (24 č. nakon imobilizacije u alginatna mikrovlakna), pri čemu je zabeleženo povećanje broja ćelija za približno 30%, sa preko 90% vijabilnih ćelija u mikrovlaknima, što ukazuje na protektivnu sredinu alginatnih mikrovlakana kao 3D model-sistema za propagaciju ćelija.

5.3.2. Ekspresija markera pluripotentnosti i markera rane faze neuralne diferencijacije u NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima imobilisanim u alginatnim mikrovlaknima

Neuralna diferencijacija NT2/D1 ćelija u alginatnim mikrovlaknima analizirana je praćenjem ekspresije markera pluripotentnosti i markera rane faze neuralne diferencijacije, pri čemu je utvrđeno da obrazac njihove promene u velikoj meri odgovara onom uočenom u standardnim 2D uslovima diferencijacije

(Stevanovic et al., 2003; Topalovic, Krstic, et al., 2017; Topalovic, Schwirtlich, et al., 2017). Naime, značajno smanjenje ekspresije markera pluripotentnosti, *SOX2, OCT4* i *NANOG*, nakon indukcije RK-om predstavlja deo procesa izlaska ćelija iz pluripotentnog stanja i ulaska u ireverzibilan process neuralne diferencijacije, što je potvrđeno u studijama na NT2/D1 model-sistemu (Stevanovic et al., 2003; Sundberg et al., 2011; Topalovic, Schwirtlich, et al., 2017). Paralelno sa tim, povećanje ekspresije markera rane faze neuralne diferencijacije, posebno *PAX6* i *SOX3*, ključnih regulatora neuralnog opredeljenja i rane neurogeneze, kao i *miR-219* koji učestvuje u regulaciji neuralne diferencijacije, takođe je u skladu sa prethodnim nalazima u 2D sistemima (Stevanovic et al., 2003; Stanisavljevic et al., 2019; Topalovic, Krstic, et al., 2017; Wu et al., 2017). Dodatno, analiza ekspresije proteina OCT4 i PAX6 ukazala je na sličan trend promene ekspresije i na funkcijskom nivou. Dobijeni rezultati ukazuju da 3D alginatni sistem verno reprodukuje ključne molekularne događaje karakteristične za rane faze neurogeneze u NT2/D1 model-sistemu, bez narušavanja toka neuralne diferencijacije i formiranja ranih neuralnih progenitora.

5.3.3. Ekspresija markera ćelijskog ciklusa u NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima imobilisanim u alginatnim mikrovlaknima

Raspodela ćelija po fazama ćelijskog ciklusa pokazala je sličnost između dva sistema, 2D i 3D model-sistema. Međutim, analiza markera proliferacije (*CCND1, PCNA i Ki-67*) ukazala je na određene razlike između 2D i 3D model-sistema. U 2D model-sistemu zabeleženo je značajno smanjenje ekspresije svih ispitivanih markera proliferacije, dok je u 3D sistemu sličan trend promene uočen samo za *CCND1*, dok su ekspresije *PCNA* i *Ki-67* ostale relativno nepromenjene. Literaturni podaci pokazuju da su PCNA i Ki-67 proteini eksprimirani tokom većine faza ćelijskog ciklusa, pri čemu je nivo PCNA najviši tokom S faze, dok Ciklin D1 predstavlja ključni regulator prelaska iz G1 u S fazu (Moldovan et al., 2007; Pellarin et al., 2025; Scholzen & Gerdes, 2000). Smanjenje ekspresije Ciklina D1 tokom neuralne diferencijacije smatra se jednim od ključnih događaja koji omogućava izlazak ćelija iz ćelijskog ciklusa i njihovo usmeravanje ka diferenciranom neuralnom fenotipu (Spinella et al., 1999). U tom kontekstu, dužina G1 faze prepoznata je kao važan regulator diferencijacije, budući da omogućava akumulaciju faktora koji određuju sudbinu ćelije i prelazak ka diferenciranom stanju (Calegari & Huttner, 2003). Različit profil ekspresije *PCNA* i *Ki-67* u 3D model-sistemu u odnosu na 2D model-sistem može se objasniti većim udelom pluripotentnih ćelija i ranih neuralnih progenitora u 3D okruženju, koji i dalje aktivno eksprimiraju ove markere. Kako diferencijacija napreduje, ćelije izlaze iz ćelijskog ciklusa i prelaze postepeno u stadijum diferenciranih ćelija, što je praćeno smanjenjem ekspresije markera proliferacije. Relativno stabilna ekspresija *PCNA* i *Ki-67* nakon indukcije u 3D model-sistemu verovatno ukazuje na sporiji ulazak ćelija u proces diferencijacije u poređenju sa 2D model-sistemom. Iako diferencijacija u 3D uslovima može započeti kasnije, literaturni podaci ukazuju da ovakvo okruženje dugoročno može doprineti efikasnijoj neuralnoj diferencijaciji i ubrzanom sazrevanju ćelija (Chandrasekaran et al., 2017). Odloženi ulazak u diferencijaciju može predstavljati i prednost razvijenog 3D model-sistema, jer omogućava povećanje broja neuralnih progenitora, što potencijalno vodi ka većoj produkciji neurona i astrocita i efikasnijoj neurogenezi.

5.4. Uticaj ispitivanih tretmana na imobilisane NT2/D1 rane neuralne progenitore u alginatnim mikrovlaknima

Efekti primenjenih tretmana (kofein, taurin, kofein+taurin, kofein+taurin+etanol, energetsko piće i energetsko piće+etanol) procenjeni su na osnovu analize ćelijske vijabilnosti, proliferativnog kapaciteta, kao i promena u ekspresiji markera pluripotentnosti OCT4 i markera rane faze neuralne diferencijacije PAX6.

5.4.1. Uticaj ispitivanih tretmana na vijabilnost ranih neuralnih progenitora u 2D model-sistemu humane neurogeneze *in vitro* i 3D model-sistemu alginatnih mikrovlakana

Analizom uticaja ispitivanih tretmana u trajanju od 24 č. na vijabilnost ranih neuralnih progenitora uočene su razlike između 2D i 3D model-sistema ćelijske kulture. U 2D uslovima zabeležen je blagi pad vijabilnosti nakon svih tretmana, izuzev kofeina, dok su ćelije u 3D sistemu alginatnih mikrovlakana zadržale vijabilnost nakon svih tretmana. Osim toga, u ovom sistemu je uočen i značajan porast vijabilnosti nakon tretmana kofeinom i kombinacije etanola sa energetskim pićem. Ovi nalazi ukazuju da 3D mikrookruženje može imati potencijalne neuroprotektivne efekte na NT2/D1 rane neuralne progenitore. Dobijeni rezultati dodatno sugerišu da uslovi ćelijske kulture značajno utiču na odgovor ćelija na spoljašnje stimulanse. Dok kofein nije pokazao efekat na vijabilnost u 2D model-sistemu, u 3D model-sistemu je doveo do njenog povećanja, što ukazuje na to da prostorna organizacija ćelija i prisustvo kompleksnijih međućelijskih interakcija i njihova prostorna organizacija mogu izmeniti biološki odgovor na tretman.

Podaci iz literature o efektima kofeina na neuralne ćelije su heterogeni. Pojedine studije ukazuju na njegova neuroprotektivna svojstva, naročito u kontekstu model-sistema neurodegenerativnih bolesti i povrede mozga izazvane hiperoksijom (Endesfelder et al., 2014, 2017). U model-sistemima neonatalne hiperoksije pokazano je da hiperoksični uslovi dovode do povećane apoptoze ćelija, smanjene proliferacije neuralnih progenitora i smanjene ekspresije markera pluripotentnosti i markera neuralne diferencijacije, uključujući PAX6 i SOX2, dok je primena neuroprotektivnih agenasa, poput kofeina, ublažila ove promene (Endesfelder et al., 2014).

Sa druge strane, postoje i istraživanja koja su pokazala negativne efekte kofeina na neuralne ćelije, uključujući nezrele oligodendrocite i neurone hipokampusa pacova (Serdar et al., 2019) i SH-SY5Y neuroblastoma ćelije čoveka (Zeidán-Chuliá et al., 2013). Ipak, Houghton i saradnici su pokazali da kratkotrajno (24 č.) izlaganje niskim koncentracijama kofeina, uključujući i koncentraciju od 0,1 mM, ne utiče značajno na vijabilnost i proliferaciju progenitorske ćelijske linije fetalnog hipokampusa čoveka, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim u ovoj studiji (Houghton et al., 2020).

Razlike između rezultata različitih istraživanja najverovatnije proizilaze iz varijacija u eksperimentalnim pristupima: razlike između *in vitro* i *in vivo* model-sistema, različiti tipovi neuralnih ćelija, upotreba animalnih u odnosu na humane ćelijske sisteme kao i razlike u primenjenim koncentracijama i dužini izlaganja kofeinu. U tom kontekstu, rezultati ove studije dodatno naglašavaju značaj izbora model-sistema, pri čemu 3D kulture ćelija poreklom od čoveka mogu pružiti fiziološki relevantniji uvid u ćelijski odgovor na bioaktivne supstance. U poređenju sa animalnim model-sistemima, humani *in vitro* model-sistemi omogućavaju ispitivanje odgovora na tretmane specifičnih za CNS čoveka, uzimajući u obzir razlike između vrsta u ćelijskoj signalizaciji, ekspresiji gena, metabolizmu i osetljivosti na različita jedinjenja (Pamies et al, 2017; Jensen & Teng, 2020). Pored toga, 3D organizacija ćelija u odnosu na 2D kulturu bolje oponaša kompleksnost mikrookruženja nervnog tkiva, uključujući prostorne interakcije između ćelija i ekstracelularnog matriksa, što može uticati na neurotoksične i neuroprotektivne efekte ispitivanih supstanci (Pamies et al, 2017; Jensen & Teng, 2020). Zbog toga se 3D humani model-sistemi smatraju relevantnim model-sistemima za proučavanje efekata bioaktivnih jedinjenja na CNS, kao i za translaciona istraživanja usmerena ka predviđanju odgovora na ispitivane tretmane (Pamies et al, 2017; Jensen & Teng, 2020).

5.4.2. Potencijalni neuroprotektivni efekti kotretmana kvercetinom u 2D model-sistemu humane neurogeneze *in vitro*

U cilju ispitivanja mogućnosti ublažavanja potencijalnih neurotoksičnih efekata ispitivanih akutnih tretmana u 2D model-sistemu, sprovedeni su eksperimenti kotretmana sa kvercetinom, flavonoidom za koga je u brojnim studijama pokazano da poseduje neuroprotektivna svojstva u uslovima *in vitro* i *in vivo*

(Heo & Lee, 2004; Sayed, 2021). Rezultati su pokazali da kvercetin može imati potencijalni zaštitni efekat u slučaju izlaganja taurinu, kao i energetskom piću u kombinaciji sa alkoholom. Međutim, pri izlaganju ranih neuralnih progenitora u 2D model-sistemu kombinovanom tretmanu kofeina sa taurinom, alkoholom i kvercetinom zabeleženo je statistički značajno povećanje neurotoksičnih efekata. Ovakav rezultat može ukazivati na to da i druge komponente energetskih pića, osim kofeina i taurina, mogu doprineti uočenom protektivnom efektu kvercetina. Stoga je neophodno sprovesti dodatna istraživanja usmerena na razumevanje potencijalne uloge kvercetina u ublažavanju neurotoksičnosti izazvane energetskim pićima i njihovim komponentama, pojedinačno, i u kombinaciji sa alkoholom.

5.4.3. Ekspresija markera OCT4 i PAX6 nakon primene tretmana na NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima u 2D model-sistemu humane neurogeneze *in vitro* i 3D model-sistemu alginatnih mikrovlakana

U cilju sagledavanja uticaja ispitivanih tretmana na ekspresiju markera pluripotentnosti i markera rane faze neuralne diferencijacije analizirana je ekspresija markera pluripotentnosti OCT4 i ranog neuralnog markera PAX6, kako na nivou iRNK, tako i na nivou proteina. Uočene su razlike u ekspresiji markera na nivou gena i proteina u oba sistema. U 2D model-sistemu, tretmani kofeinom i taurinom — primenjeni pojedinačno, zajedno, kao i u kombinaciji sa alkoholom — doveli su do statistički značajnog smanjenja ekspresije *OCT4* gena ali ove promene nisu bile praćene odgovarajućim smanjenjem na proteinskom nivou, što ukazuje na moguću regulaciju ekspresije na posttranskripcionom nivou.
Kod ćelija u 3D kulturi alginatnih mikrovlakana nije uočen značajan uticaj tretmana na ekspresiju *OCT4* gena. Međutim, analiza na proteinskom nivou pokazala je izraženu varijabilnost između bioloških replikata, što je onemogućilo formulisanje jasnih zaključaka o obrascima promena u ekspresiji ovog markera.
Ekspresija *PAX6* gena i proteina u većini tretmana nije bila značajno promenjena u oba model-sistema. Izuzetak je uočen pri tretmanu taurinom u 3D sistemu, gde je registrovano povećanje ekspresije *PAX6* gena, iako ovaj rezultat nije potvrđen na proteinskom nivou usled velike varijabilnosti dobijenih rezultata.
Uočene razlike između ekspresije na nivou iRNK i proteina mogu se objasniti složenim regulatornim mehanizmima koji uključuju posttranskripcione i posttranslacione modifikacije, kao i razlike u stabilnosti iRNK i proteina (Liu et al., 2016). Ovi procesi predstavljaju važan mehanizam regulacije genske ekspresije i ukazuju na potrebu za njihovim detaljnijim proučavanjem u budućim istraživanjima.

5.4.4. Primena 3D model-sistema sa imobilisanim NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima

Pored primene u proceni akutnih neurotoksičnih efekata različitih jedinjenja, razvijeni 3D model-sistem na bazi alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima ima značajan potencijal za širu primenu u osnovnim i primenjenim biomedicinskim istraživanjima, sa mogućim kliničkim implikacijama. Ovaj model-sistem pruža mogućnost ne samo za analizu akutne neurotoksičnosti, već i za proučavanje dugoročnih efekata hronične izloženosti, uključujući obrasce konzumacije poput epizodnog prekomernog opijanja (engl. binge drinking), kako na diferencirane neurone i astrocite, tako i na njihove kokulture.
Rezultati prikazani u radu Cacciotti i saradnika pokazali su da alginatne mikrokuglice mogu obezbediti adekvatno mikrookruženje za spontanu neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelija u dopaminergične neurone, bez primene RK (Cacciotti et al., 2017). Iako je u tim uslovima efikasnost diferencijacije bila ograničena, alginatna mikrovlakna i mikrokuglice predstavljaju dobru platformu za optimizaciju uslova za gajenje ćelija, uključujući produženu kultivaciju i kontrolisanu indukciju diferencijacije, kao i za ispitivanje efekata različitih jedinjenja na kasnije faze neuralne diferencijacije.
Dodatno, 3D sistemi ćelijske kulture obezbeđuju mikrookruženje koje bolje oponaša *in vivo* uslove, čime se podržava kako neurogeneza, tako i razvoj funkcionalno zrelih neurona i kompleksnih neuronskih

mreža (Moxon et al., 2019). Time se ovaj model-sistem pozicionira kao relevantna i pouzdana platforma za proučavanje kompleksnih interakcija između neurona i glijalnih ćelija i funkcionalnih aspekata nervnog sistema u *in vitro* uslovima.

5.5. Gajenje imobilisanih NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u alginatnim mikrovlaknima u protočnom bioreaktoru

U ovoj doktorskoj disertaciji, ćelije imobilisane u alginatnim mikrovlaknima gajene su u statičkim uslovima i u uslovima biomimičnog protočnog bioreaktora. Statički 3D sistem korišćen je kao referentni sistem za poređenje sa dinamičkim uslovima kultivacije u bioreaktoru. Protočni bioreaktor obezbeđuje kontinuiran protok medijuma, smicajni napon (engl. shear stress) koji predstavlja silu sličnu onoj kojoj su ćelije izložene usled protoka krvi kroz krvne sudove *in vivo*, kao i efikasno uklanjanje metaboličkih produkata (Martin et al., 2004; McCoy & O'Brien, 2010). Iako umeren smicajni napon može doprineti regulaciji diferencijacije i funkcije ćelija, njegov intenzitet mora biti pažljivo kontrolisan, jer prekomerno mehaničko opterećenje može dovesti do smanjenja vijabilnosti ćelija (Di Lisa et al., 2024; McCoy & O'Brien, 2010).

U cilju procene potencijalnih prednosti 3D model-sistema na bazi alginatnih mikrovlakana sa imobilisanim ćelijama u protočnom bioreaktoru u odnosu na statički model-sistem, upoređena je vijabilnost, inicijacija neuralne diferencijacije i odgovor na kombinovani tretman (CAF+TAU+EtOH) kod NT2/D1 ranih neuralnih progenitora. Dobijeni rezultati povtrdili su inicijaciju neuralne diferencijacije nakon 48 č. indukcije RK-om u bioreaktoru. U poređenju sa statičkim uslovima, diferencijacija u bioreaktoru bila je praćena izraženijim padom nivoa *SOX2*, sličnim smanjenjem nivoa *OCT4* i nešto manjim porastom nivoa *PAX6*, što ukazuje na sličan obrazac inicijacije rane neuralne diferencijacije u oba sistema.

Analiza vijabilnosti i proliferativnog kapaciteta pokazala je da su ćelije u bioreaktoru ostale vijabilne nakon indukcije i nakon primene kombinovanog tretmana, pri čemu su dobijeni rezultati bili u skladu sa rezultatima dobijenim u statičkom 3D sistemu. Takođe, profili ekspresije markera nakon tretmana pokazali su podudarnost između dva sistema, što dodatno potvrđuje da dinamički uslovi bioreaktora nisu značajno promenili odgovor ćelija na ispitivani tretman.

Literaturni podaci o propagaciji i neuralnoj diferencijaciji NT2/D1 ćelija u bioreaktoru su malobrojni i variraju u eksperimentalnim postavkama – tipu 3D kulture, koncentraciji ćelija, vremenu propagacije i neuralne diferencijacije i tipu statičkih kultura sa kojima su poređene (Saporta et al., 2004; Serra et al., 2009). U radu Serra i saradnika opisana je propagacija i neuralna diferencijacija NT2/D1 ćelija u 3D model-sistemu sfera gajenih u bocama sa magnetom koji sprečavaju spajanje ćelijskih agregata i omogućavaju kontrolu veličine sfera (engl. spinner bottles) (Serra et al., 2009). Autori su uporedili proliferaciju i efikasnost neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija u ovom sistemu i u sistemu u kom je boca sa magnetom integrisana u protočni bioreaktor sa kontrolom svih relevantnih parametara (Serra et al., 2009). Pokazano je da pluripotentne NT2/D1 ćelije ostvaruju isti nivo proliferacije u oba sistema tokom 7 dana kultivacije. Takođe, u oba sistema ekspresija markera pluripotentnosti ostaje nepromenjena tokom 6 dana propagacije. Najznačajniji rezultat ove studije je da je neuronalna diferencijacija NT2/D1 ćelija indukovanih retinoinskom kiselinom 23 dana postignuta za 30% kraće vreme i da je bila deset puta efikasnija (Serra et al., 2009). Veoma je zanimljiva studija Saporta i saradnika koji su pokazali da u 3D kokulturi NT2/D1 ćelija i Sertolijevih ćelija, gajenih u sudovima sa visokim odnosom širine i visine u rotirajućem bioreaktoru (Saporta et al., 2004), nakon 3 dana kultivacije u ovim uslovima NT2/D1 i Sertolijeve ćelije formiraju sferoide u kojima dolazi do spontane diferencijacije NT2/D1 ćelija u dopaminergičke NT2-neurone (Saporta et al., 2004). Autori spekulišu da Sertolijeve ćelije luče neurotrofičke faktore koji imaju parakrino dejstvo na pluripotentne NT2/D1 ćelije, jer ovakav efekat nije zabeležen u pojedinačnim ćelijskim sferama (NT2/D1 ili Sertolijeve ćelije) (Saporta et al., 2004). Diskutovati rezultate ove teze u kontekstu prethodno opisanih studija nije jednostavno zbog specifičnosti

eksperimentalnog dizajna – tipa bioreaktora, površinske i intersticijalne brzine protoka medijuma, različitog vremena propagacije u bioreaktoru, tipa 3D kulture (sa ili bez nosača), različitih mehaničkih stimulusa, prisustva drugih tipova ćelija u kulturi. U našem model-sistemu nisu detektovane razlike koje ukazale na značajnu prednost bioreaktora u odnosu na statičke uslove propagacije NT2/D1 ćelija imobilisanih u alginatna mikrovlakna i njihove neuralne diferencijacije, indukovane 48 č. retinoinskom kiselinom, do stadijuma NT2/D1 ranih neuralnih progenitora. Iz svega navedenog možemo pretpostaviti da se propagacija pluripotentnih NT2/D1 ćelija i najraniji stadijumi neuralne diferencijacije odvijaju sličnom dinamikom u statičkim 3D model-sistemima i bioreaktorima. Kasniji stadijumi neuralne diferencijacije odvijaju se brže i efikasnije u bioreaktorima. Ovo ukazuje da se testiranje rane razvojne neurotoksičnosti može vršiti u 3D statičkim sistemima koji su tehnički, vremenski, finansijski i prostorno značajno jednostavniji, od gajenja ćelija u uslovima bioreaktora.

5.6. NT2-neuroni i NT2-astrociti kao model-sistem za proučavanje neurotoksičnosti

NT2/D1 ćelijska linija predstavlja dobro okarakterisan humani *in vitro* model-sistem za proučavanje neuralne diferencijacije i neurotoksičnih efekata različitih supstanci (Hill et al., 2008; Stern et al., 2014). Nakon indukcije RK-om, NT2/D1 ćelije ireverzibilno diferenciraju u postmitotičke NT2-neurone koji eksprimiraju βIII-tubulin, i u NT2-astrocite koji eksprimiraju glijalni marker GFAP (Andrews, 1984; González-Burguera et al., 2016; Haile et al., 2014; Hill et al., 2008; Kedracka-Krok et al., 2025; Pleasure et al., 1992). Stoga, ovaj model-sistem omogućava ispitivanje odgovora neurona i astrocita na različite supstance pod kontrolisanim eksperimentalnim uslovima.
U ovoj studiji, NT2/D1 ćelije su diferencirane do zrelih NT2-neurona i NT2-astrocita, koji su korišćeni za ispitivanje efekata akutnog izlaganja (24 č.) energetskim pićima i njihovim komponentama, kofeinu i taurinu, sa i bez etanola na morfološke i funkcionalne karakteristike ovih ćelija. Ispitivanje efekata komponenti iz hrane i pića na humanim neuralnim ćelijama pruža određene prednosti u odnosu na ispitivanja na animalnim model-sistemima jer omogućava ispitivanje mehanizama koji su relevantniji za razumevanje fiziologije nervnog sistema čoveka i procenu neurotoksičnosti (Bal-Price et al., 2010; Hartung, 2009; Pamies et al., 2017).

5.6.1. Uticaj ispitivanih tretmana na vijabilnost NT2-neurona i NT2-astrocita

Nakon primene ispitivanih akutnih tretmana uočena je razlika u senzitivnosti NT2-neurona i NT2-astrocita na testirane komponente. Značajno smanjenje vijabilnosti uočeno je kod NT2-neurona nakon tretmana kofeinom, kofeinom sa taurinom i tretmana energetskim pićem, dok kod NT2-astrocita tretmani nisu imali značajnog uticaja na ćelijsku vijabilnost. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim studijama u kojima neuroni pokazuju povećanu osetljivost na metabolički i oksidativni stres, što se dovodi u vezu sa njihovim visokim energetskim zahtevima i relativno ograničenim antioksidativnim kapacitetom u poređenju sa astrocitima (Angelova & Abramov, 2018; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Suprotno, astrociti imaju robusniji antioksidativni sistem što je u skladu sa njihovom centralnom ulogom u održavanju metaboličke homeostaze i obezbeđivanju protektivne sredine za neurone u CNS-u (Dringen, 2000; Verkhratsky & Nedergaard, 2018).
Odustvo uticaja tretmana na vijabilnost astrocita koja se uočava u ovoj studiji oslikava njihovu fiziološku ulogu kao regulatora mikrosredine neurona u CNS-u. Astrociti učestvuju u uklanjanju slobodnih radikala, regulaciji koncentracije ekstracelularnih jona i pružaju metaboličku podrške neuronima, što zajedno doprinosi njihovoj većoj toleranciji na primenjene tretmane (Dringen, 2000).
Smanjenje vijabilnosti neurona nakon tretmana kofeinom može biti povezano sa farmakološkim efektom kofeina kao neselektivnog antagoniste adenozinskih receptora. Blokiranjem adenozinskih receptora A1 i A2A, kofein pospešuje ekscitabilnost neurona i sinaptičku aktivnost (Fredholm et al., 1999; Kerkhofs et al., 2017) što može doprineti povećanoj metaboličkoj aktivnosti i posledično može dovesti do ćelijskog stresa. Eksperimentalne studije na neuralnim model-sistemima su pokazale da kofein može izazvati

citotoksične efekte zavisno od koncentracije i dužine izloženosti (Houghton et al., 2020; Zeidán-Chuliá et al., 2013). Takođe je pokazano da kofein može da pojača neurotoksičnost etanola preko inhibicije mTOR signalnog puta, ukazujući na to da kombinacija kofeina sa alkoholom može imati sinergističko dejstvo na neuralne ćelije (Sangaunchom & Dharmasaroja, 2020).

5.6.2. Uticaj ispitivanih tretmana na dužinu neurita NT2-neurona i ekspresiju markera neuralne diferencijacije βIII-tubulina

Nivo ekspresije βIII-tubulina u neuronima koristi se kao marker neuralne diferencijacije i organizacije citoskeleta, a promene u njegovoj ekspresiji najčešće odražavaju promene u strukturnom integritetu neurona i ekstenziji neurita (Haile et al., 2014). U ovom doktoratu imunocitohemijska analiza ekspresije βIII-tubulina u NT2-neuronima korišćena je za analizu uticaja ispitivanih tretmana na strukturni integritet NT2-neurona. Smanjenje ekspresije ovog markera je uočena nakon tretmana kofeinom i kombinovanog tretmana kofeina sa taurinom i etanolom, dok je povećana ekspresija βIII-tubulina uočena nakon tretmana taurinom i energetskim pićem sa etanolom. Dužina neurita je bila manja u kulturama tretiranim kofeinom, taurinom i njihovom kombinacijom, kao i nakon tretmana energetskim pićem sa alkoholom. Za taurin je pokazano da ima brojne neuroprotektivne efekte uključujući regulaciju unutarćelijskog nivoa kalcijuma, stabilizaciju ćelijskih membrana i antioksidativnu aktivnost (Ripps & Shen, 2012). Ova svojstva mogu objasniti povećanu ekspresiju ovog markera, koja se uočava nakon zasebnog tretmana taurinom u ovoj studiji. Energetsko piće nije imalo značajnog uticaja na ekspresiju markera, ni na dužinu neurita u poređenju sa kontrolnim ćelijama, dok je kombinacija energetskog pića sa etanolom dovela do povećanja ekspresije βIII-tubulina, ali je istovremeno dovela do smanjenja dužine neurita. Prethodna istraživanja ukazuju da komponente energetskih pića mogu značajno uticati na strukturu neurona i organizaciju citoskeleta. U studiji Zeidán-Chuliá i saradnika, sprovedenoj na SH-SY5Y ćelijama neuroblastoma čoveka, tretmani kofeinom, taurinom i guaranom doveli su do izraženih morfoloških promena, pri čemu su najizraženiji efekti uočeni nakon tretmana guaranom i u kombinaciji sa kofeinom, dok je prisustvo taurina ublažilo ove promene, ukazujući na promene u organizaciji citoskeleta i degeneraciju neurita (Zeidán-Chuliá et al., 2013). S obzirom na ključnu strukturnu ulogu βIII-tubulina u mikrotubularnoj mreži neurona, ovi rezultati mogu ukazivati na narušavanje stabilnosti mikrotubula i integriteta neurona. Slično tome, u radu Doyle i saradnika je pokazano da tretmani energetskim pićima dovode do dozno-zavisnog smanjenja dužine neurita (Doyle et al., 2012). Takođe, studije na primarnim neuronima ukazuju da komponente energetskih pića, poput kofeina i taurina, mogu uticati na razgranatost dendrita i aksonalnu morfologiju, što dodatno potvrđuje njihov uticaj na citoskeletnu organizaciju neurona (Serdar et al., 2019). Različitost rezultata prikazanih u više studija je verovatno posledica različitih eksperimentalnih postavki – korišćenje različitih energetskih pića čiji sastav varira u sadržaju i količini bioaktivnih komponenti, uključujući kofein i taurin, koje mogu međusobno interagovati i uticati na aktivnost signalnih puteva i metabolički status neurona.

5.6.3. Uticaj ispitivanih tretmana na ekspresiju GFAP u NT2-A astrocitima

Imunocitohemijska analiza ekspresije markera astrocita GFAP-a u NT2-astrocitima je pokazala značajne promene u nivou ekspresije proteina GFAP kod ćelija tretiranih taurinom i energetskim pićem u odnosu na kontrolne ćelije, što je potvrđeno i na nivou ekspresije iRNK za GFAP, gde se uočava povećanje nakon tretmana TAU, EP i EP+EtOH.

Prethodne studije ukazuju da taurin može modulisati ekspresiju GFAP, pri čemu smer ovog efekta zavisi od eksperimentalnog model-sistema i fiziološkog odnosno patofiziološkog konteksta. U model-sistemu Alchajmerove bolesti, oralna suplementacija taurinom dovela je do povećanja GFAP ekspresije i povećanog udela reaktivnih astrocita u hipokampusu i korteksu, što ukazuje da taurin može uticati na odgovor astrocita i regulaciju GFAP ekspresije (Kim et al., 2014). Nasuprot tome, u model-sistemu hronične neuroinflamacije izazvane lipopolisaharidom (LPS) kod pacova, taurin je samostalno smanjio

ekspresiju GFAP-a, dok je istovremeno ublažio LPS-indukovano smanjenje GFAP-a, pri čemu je efekat zavisio od doze i ispitivane moždane regije (Silva et al., 2021). Ovi nalazi ukazuju da efekat taurina na ekspresiju GFAP-a nije jednoznačan, već da može zavisiti od ćelijskog okruženja, kao i uslova i trajanja izlaganja tretmanu. U tom kontekstu, povećanje GFAP ekspresije nakon tretmana taurinom u NT2-A ćelijama u ovom istraživanju predstavlja rezultat koji je u skladu sa prethodno opisanim povećanjem GFAP-a nakon izlaganja taurinu, iako se korišćeni model-sistem i eksperimentalni uslovi razlikuju od prethodnih *in vivo* studija.

Odsustvo promena u ekspresiji GFAP proteina nakon primene ostalih tretmana (KOF, KOF+TAU, KOF+TAU+EtOH, EP+EtOH) može ukazivati na očuvanje astrocitnog fenotipa. Prethodne studije su pokazale da astrociti poseduju izražen kapacitet za održavanje homeostaze i otpornost na različite stresne uslove, što može objasniti relativno stabilan nivo GFAP proteina nakon ispitivanih tretmana (Schreiner et al., 2015; Tiwari et al., 2025).

5.6.4. Uticaj ispitivanih tretmana na oksidativni status NT2-N i NT2-A

Analizom oksidativnog stresa NT2-N i NT2-A nalon ispitivanih tretmana uočen je različit odgovor između ova dva ćelijska tipa. Kod neurona tretmani pojedinačnim komponentama doveli su do povećane produkcije reaktivnih vrsta kiseonika, dok je izlaganje energetskom piću, sa i bez etanola, dovelo do smanjenog nivoa produkcije reaktivnih vrsta kiseonika. Reaktivne vrste kiseonika imaju dvostruku ulogu u neuralnim ćelijama, imaju funkciju signalnih molekula, ali i medijatora oksidativnog stresa. Umereno povećanje reaktivnih oblika kiseonika može aktivirati signalne puteve, dok njihova prekomerna produkcija može dovesti do oksidativnog stresa i ćelijske disfunkcije (Sies, 2015). Povećanje produkcije reaktivnih oblika kiseonika uočeno nakon tretmana pojedinačnim komponentama može ukazivati na oksidativni stres koji ove supstance izazivaju usled odsustva astrocita u kulturama NT2-neurona.

U astrocitima svi tretmani izuzev kofeina dovode do povećanja produkcije reaktivnih vrsta kiseonika koja je praćena povećanom ekspresijom antioksidativnog enzima superoksid dismutaze. Astrociti poseduju efikasan antioksidativni sistem i imaju ključnu ulogu u zaštiti neurona od oksidativnog stresa (Dringen, 2000). Povećanje antioksidativnih enzima u našoj studiji verovatno predstavlja adaptivni odgovor koji doprinosi očuvanju redoks statusa ćelije i sprečavanju oksidativnog oštećenja. U literaturi je pokazano da taurin ispoljava izražene antioksidativne efekte, uključujući zaštitu fiziološke funkcije mitohondrija i smanjenje produkcije reaktivnih vrsta kiseonika, dok kofein može modulisati oksidativni status i, u zavisnosti od koncentracije i eksperimentalnih uslova, doprineti smanjenju oksidativnog stresa u CNS-u (Baliou et al., 2021; Barcelos et al., 2020; Kolahdouzan & Hamadeh, 2017; Seneff & Kyriakopoulos, 2025). Promene u produkciji reaktivnih vrsta kiseonika praćene su promenama u aktivnosti antioksidativnih enzima, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima koja pokazuju da komponente energetskih pića, poput kofeina i taurina, mogu izmeniti oksidativni status ćelije i aktivirati antioksidativne mehanizme u neuralnim ćelijama (Zeidán-Chuliá et al., 2013).

5.6.5. Uloga astrocita u regulaciji glutamata: efekti tretmana i kompenzatorni mehanizmi

Astrociti imaju ključnu ulogu u regulaciji homeostaze glutamata u CNS-u. Putem transportera EAAT1 i EAAT2 oni uklanjaju glutamat iz vanćelijskog prostora i sprečavaju nastanak ekscitotoksičnosti u sinapsi (Danbolt, 2001). U ovom radu ekspresija navedenih transportera korišćena je za analizu uticaja ispitivanih tretmana na regulaciju preuzimanja i koncentracije glutamata u astrocitima. Većina ispitivanih tretmana dovela je do smanjenja ekspresije glutamatnih transportera u NT2-astrocitma. Literaturni podaci pokazuju da kofein može izmeniti mehanizam transporta glutamata u CNS-u (de Freitas et al., 2016). Na modelu mrežnjače pacova je pokazano da izlaganje kofeinu može izmeniti ekspresiju glijalnih glutamatnih transportera, putem signalizacije povezane sa adenozinskim receptorima (de Freitas et al., 2016). Smanjena ekspresija glutamatnih transportera može otežati uklanjanje glutamata iz sinaptičke pukotine i doprineti poremećaju ekscitatorne neurotransmisije. Međutim, naše istraživanje je pokazalo

da uprkos promenama u ekspresiji EAAT1 i EAAT2 transportera, koncentracija intracelularnog glutamata je ostala nepromenjena nakon primene akutnih tretmana. Astrociti poseduju više mehanizama koji doprinose održavanju intracelularne homeostaze glutamata, uključujući njegov transport i konverziju u glutamin, stoga promene u ekspresiji glutamatnih transportera ne moraju nužno biti praćene brzim promenama intracelularne koncentracije glutamata usled postojanja kompenzatornih regulatornih mehanizama (Andersen, 2025; Danbolt, 2001). Taurin ima važnu ulogu u održavanju homeostaze CNS-a, i ispoljava neuroprotektivne efekte putem modulacije aktivnosti astrocita i sprečavanja nastanka glutamatom izazvane ekscitotoksičnosti (Ramírez-Guerrero et al., 2022). Ovakvi kompenzatorni mehanizmi mogu objasniti stabilne intracelularne nivoe glutamata uprkos smanjenoj ekspresiji glutamatnih transportera.

5.6.6. Neurobiološki efekti konzumacije energetskih pića

Prethodni rezultati ukazuju na različit odgovor NT2-neurona i NT2-astrocita posle akutnog izlaganja energetskim pićima i njegovim komponentama, sa i bez alkohola. Pokazano je da su neuroni osetljiviji na uticaj primenjenih akutnih tretmana, što se uočava kroz smanjenu vijabilnost, promene u ekspresiji neuronalnog markera βIII-tubulina i promene u dužini neurita. Za razliku od neurona, astrociti su manje osetljivi na tretmane zahvaljujući kompenzatornim mehanizmima koji im omogućavaju centralnu ulogu u održavanju homeostaze u CNS-u. Uzimajući u obzir široku upotrebu energetskih pića, posebno u mlađoj populaciji, ovi rezultati ukazuju na značaj ispitivanja njihovog uticaja na funkciju neurona i astrocita, posebno u kombinaciji sa alkoholom. Buduća istraživanja bi trebalo da budu usmerena na proučavanje dugotrajnih efekata konzumacije ovih pića (engl. “binge drinking”), kao i na njihov potencijalni uticaj na sinaptičku aktivnost i razvoj neuralnih mreža u mešovitim kulturama neurona i astrocita.

6. Zaključci

Na osnovu sprovedenih istraživanja i analize dobijenih rezultata mogu se formulisati sledeći zaključci:

1. Uspostavljen je 3D model-sistem NT2/D1 pluripotentnih ćelija imobilisanih u alginatna mikrovlakna. Tokom sedam dana kultivacije imobilisane ćelije zadržavaju vijabilnost, uz sposobnost proliferacije i formiranja ćelijskih agregata, a nakon oslobađanja iz mikrovlakana zadržavaju sposobnost adhezije i proliferacije u uslovima propagacije u 2D model-sistemu.
2. Tretmani energetskim pićem (EP) i energetskim pićem sa alkoholom (EP+EtOH), kao i njegovim komponentama, kofeinom i taurinom, pojedinačno, zajedno i u kombinaciji sa etanolom, ne dovode do značajnih promena u vijabilnosti pluripotentnih NT2/D1 ćelija u 3D sistemu. U kontrolnom 2D model-sistemu, tretman kofeinom dovodi do malog, ali statistički značajnog pada vijabilnosti.
3. Uspostavljeni 3D sistem podržava neuralnu diferencijaciju NT2/D1 ćelija indukovanu RK-om do stadijuma ranih neuralnih progenitora koji zadržavaju vijabilnost i pokazuju profil ekspresije gena markera pluripotentnosti i markera rane faze neuralne diferencijacije karakterističan za ovaj stadijum neuralne diferencijacije NT2/D1 ćelija.
4. Ispitivani tretmani ne dovode do pada vijabilnosti NT2/D1 ranih neuralnih progenitora u 3D model-sistemu, dok u 2D model-sistemu dolazi do smanjenja vijabilnosti nakon svih ispitivanih tretmana (TAU, KOF+TAU, KOF+TAU+EtOH, EP i EP+EtOH) izuzev kofeina.
5. Ispitivani tretmani ne dovode do promene ekspresije OCT4 i PAX6 proteina u NT2/D1 ranim neuralnim progenitorima, što ukazuje da ispitivani tretmani ne ostvaruju statistički značajne efekte na ekspresiju gena markera pluripotentnosti i markera ranih neuralnih progenitora ni u 3D, ni u 2D model-sistemu.
6. NT2/D1 rani neuralni progenitori kultivisani u biomimičnom protočnom reaktoru pokazuju slične karakteristike sa ćelijama održavanim u statičkim 3D uslovima alginatnih mikrovlakana, u pogledu vijabilnosti i ekspresije markera pluripotentnosti i markera rane faze neuralne diferencijacije, ali je kompleksnost sistema veća u odnosu na statičke uslove gajenja u 3D model-sistemu.
7. Ispitivani tretmani dovode do smanjenja vijabilnosti terminalno diferenciranih NT2-neurona, dok kod NT2-astrocita nije uočen značajan uticaj na ćelijsku vijabilnost, što ukazuje na veću senzitivnost neurona u odnosu na astrocite.
8. Tretmani su pokazali da kofein, posebno u kombinaciji sa etanolom, negativno utiče na morfologiju i ekspresiju βIII-tubulina u neuronima, dok u kombinaciji sa taurinom se ublažavaju ili delimično kompenzuju ovi efekti. Tretmani taurinom i energetskim piće sa alkoholom dovode do povećanja ekspresije ovog markera.
9. Iako pojedini tretmani dovode do malog povećanja ekspresije GFAP iRNK (taurin i energetsko piće), sveobuhvatna analiza fenotipa NT2-A ukazuje da ovi efekti najverovatnije nemaju značajan funkcijski ili fiziološki uticaj na astrocite.
10. Većina ispitivanih tretmana dovodi do promena u redoks sistemu NT2-astrocita.
11. Ispitivani tretmani dovode do smanjenja ekspresije glutamatnih transportera EAAT1 i EAAT2 ali te promene ne utiču na unutarćelijsku koncentraciji glutamata što ukazuje na postojanje kompenzatornih mehanizama u astrocitima koji održavaju glutamatnu homeostazu uprkos promenama u ekspresiji transportera.

7. Literatura

Achilli, T.-M., McCalla, S., Meyer, J., Tripathi, A., & Morgan, J. R. (2014). Multilayer spheroids to quantify drug uptake and diffusion in 3D. *Molecular Pharmaceutics*, *11*(7), 2071–2081. https://doi.org/10.1021/mp500002y

Achilli, T.-M., Meyer, J., & Morgan, J. R. (2012). Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *12*(10), 1347–1360. https://doi.org/10.1517/14712598.2012.707181

American College of Obstetricians and Gynecologists. (2010). ACOG Committee Opinion No. 462: Moderate caffeine consumption during pregnancy. *Obstetrics & Gynecology, 116*(2 Pt 1), 467–468. https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3181eeb2a1

Ajibo, C., Van Griethuysen, A., Visram, S., & Lake, A. A. (2024). Consumption of energy drinks by children and young people: A systematic review examining evidence of physical effects and consumer attitudes. *Public Health*, *227*, 274–281. https://doi.org/10.1016/j.puhe.2023.08.024

Akula, S. K., Exposito-Alonso, D., & Walsh, C. A. (2023). Shaping the brain: The emergence of cortical structure and folding. Developmental Cell, 58(24), 2836–2849. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2023.11.004

Allgaier, C. (2002). Ethanol sensitivity of NMDA receptors. *Neurochemistry International*, *41*(6), 377–382. https://doi.org/10.1016/S0197-0186(02)00046-3

Al-Shaar, L., Vercammen, K., Lu, C., Richardson, S., Tamez, M., & Mattei, J. (2017). Health Effects and Public Health Concerns of Energy Drink Consumption in the United States: A Mini-Review. *Frontiers in Public Health*, *5*, 225. https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00225

Alsunni, A. A. (2015). Energy Drink Consumption: Beneficial and Adverse Health Effects. *International Journal of Health Sciences*, *9*(4), 468–474.

Andersen, J. V. (2025). The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle: Insights, Updates, and Advances. *Journal of Neurochemistry*, *169*(3), e70029. https://doi.org/10.1111/jnc.70029

Andersen, T., Auk-Emblem, P., & Dornish, M. (2015). 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays*, *4*(2), 133–161. https://doi.org/10.3390/microarrays4020133

Andrews, P. W. (1984). Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Developmental Biology*, *103*(2), 285–293. https://doi.org/10.1016/0012-1606(84)90316-6

Andrews, P. W. (2002). From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *357*(1420), 405–417. https://doi.org/10.1098/rstb.2002.1058

Angelova, P. R., & Abramov, A. Y. (2018). Role of mitochondrial ROS in the brain: From physiology to neurodegeneration. *FEBS Letters*, *592*(5), 692–702. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12964

Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., & Noel, G. (2015). Three-dimensional cell culture: A breakthrough in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(3), 5517–5527. https://doi.org/10.3390/ijms16035517

Aonso-Diego, G., Krotter, A., & García-Pérez, Á. (2024). Prevalence of energy drink consumption world-wide: A systematic review and meta-analysis. *Addiction*, *119*(3), 438–463. https://doi.org/10.1111/add.16390

Arnaud, M. J. (2011). Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (200), 33–91. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13443-2_3

Arria, A. M., Bugbee, B. A., Caldeira, K. M., & Vincent, K. B. (2014). Energy drink use and high-risk behaviors: Research evidence and knowledge gaps. *Nutrition Reviews*, *72*(0 1), 87–97. https://doi.org/10.1111/nure.12129

Augst, A. D., Kong, H. J., & Mooney, D. J. (2006). Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, *6*(8), 623–633. https://doi.org/10.1002/mabi.200600069

Avcı, S., Sarıkaya, R., & Büyükcam, F. (2013). Death of a young man after overuse of energy drink. The American Journal of Emergency Medicine, 31(11), 1624.e3-4. https://doi.org/10.1016/j.ajem.2013.06.031

Babu, K. M., Church, R. J., & Lewander, W. (2008). Energy Drinks: The New Eye-Opener For Adolescents. *Toxicology Update*, *9*(1), 35–42. https://doi.org/10.1016/j.cpem.2007.12.002

Baliou, S., Adamaki, M., Ioannou, P., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., Spandidos, D. A., Christodoulou, I., Kyriakopoulos, A. M., & Zoumpourlis, V. (2021). Protective role of taurine against oxidative stress (Review). *Molecular Medicine Reports*, *24*(2), 605. https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12242

Bal-Price, A. K., Hogberg, H. T., Buzanska, L., Lenas, P., van Vliet, E., & Hartung, T. (2010). In vitro developmental neurotoxicity (DNT) testing: Relevant models and endpoints. *Neurotoxicology*, *31*(5), 545–554. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.11.006

Baldwin, H. A., & File, S. E. (1989). *Caffeine-induced anxiogenesis: The role of adenosine, benzodiazepine and noradrenergic receptors*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior, 32*(1), 181–186. https://doi.org/10.1016/0091-3057(89)90230-X

Barcelos, R. P., Lima, F. D., Carvalho, N. R., Bresciani, G., & Royes, L. F. (2020). Caffeine effects on systemic metabolism, oxidative-inflammatory pathways, and exercise performance. *Nutrition Research*, *80*, 1–17. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2020.05.005

Baum, M., & Weiss, M. (2001). The influence of a taurine containing drink on cardiac parameters before and after exercise measured by echocardiography. *Amino Acids*, *20*(1), 75–82. https://doi.org/10.1007/s007260170067

Bond, A. M., Ming, G., & Song, H. (2015). Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell*, *17*(4), 385–395. https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.003

Bond, J., Roberts, E., Mochida, G. H., Hampshire, D. J., Scott, S., Askham, J. M., Springell, K., Mahadevan, M., Crow, Y. J., Markham, A. F., Walsh, C. A., & Woods, C. G. (2002). ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nature Genetics*, *32*(2), 316–320. https://doi.org/10.1038/ng995

Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, *122*(6), 947–956. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020

Breda, J. J., Whiting, S. H., Encarnação, R., Norberg, S., Jones, R., Reinap, M., & Jewell, J. (2014). Energy drink consumption in europe: A review of the risks, adverse health effects, and policy options to respond. *Frontiers in Public Health*, *2*, 134. https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00134

Breslin, S., & O'Driscoll, L. (2013). Three-dimensional cell culture: The missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, *18*(5–6), 240–249. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003

Brigo, L., Urciuolo, A., Giulitti, S., Della Giustina, G., Tromayer, M., Liska, R., Elvassore, N., & Brusatin, G. (2017). 3D high-resolution two-photon crosslinked hydrogel structures for biological studies. *Acta Biomaterialia*, *55*, 373–384. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.03.036

Buentello, D. C., Koch, L. S., Santiago, G. T., Alvarez, M. M., & Broersen, K. (2022). Use of standard U-bottom and V-bottom well plates to generate neuroepithelial embryoid bodies. PLOS ONE, 17(5), e0262062. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262062

Burger, H., Nooter, K., Boersma, A. W., Kortland, C. J., & Stoter, G. (1998). Expression of p53, Bcl-2 and Bax in cisplatin-induced apoptosis in testicular germ cell tumour cell lines. *British Journal of Cancer*, *77*(10), 1562–1567. https://doi.org/10.1038/bjc.1998.257

Burke, L. M. (2008). Caffeine and sports performance. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme*, *33*(6), 1319–1334. https://doi.org/10.1139/H08-130

Burke, T. M., Markwald, R. R., McHill, A. W., Chinoy, E. D., Snider, J. A., Bessman, S. C., Jung, C. M., O'Neill, J. S., & Wright, K. P. Jr. (2015). Effects of caffeine on the human circadian clock in vivo and in vitro. *Science Translational Medicine, 7*(305), 305ra146. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac5125

Cacciotti, I., Ceci, C., Bianco, A., & Pistritto, G. (2017). Neuro-differentiated Ntera2 cancer stem cells encapsulated in alginate beads: First evidence of biological functionality. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, *81*, 32–38. https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.033

Cadoni, C., & Peana, A. T. (2023). Energy drinks at adolescence: Awareness or unawareness? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *17*, 1080963. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2023.1080963

Calegari, F., & Huttner, W. B. (2003). An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *Journal of Cell Science*, *116*(Pt 24), 4947–4955. https://doi.org/10.1242/jcs.00825

Caliari, S. R., & Burdick, J. A. (2016). A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature Methods*, *13*(5), 405–414. https://doi.org/10.1038/nmeth.3839

Cao, D. X., Maiton, K., Nasir, J. M., Estes, N. A. M., & Shah, S. A. (2021). Energy drink-associated electrophysiological and ischemic abnormalities: A narrative review. *Frontiers in Cardiovascular Medicine, 8*, Article 679105. https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.679105

Cederbaum, A. I. (2012). Alcohol Metabolism. *Clinics in Liver Disease*, *16*(4), 667–685. https://doi.org/10.1016/j.cld.2012.08.002

Cell interactions with polymers. (2020). In *Principles of Tissue Engineering* (pp. 275–293). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818422-6.00017-4

Chalak, M., Hesaraki, M., Mirbahari, S. N., Yeganeh, M., Abdi, S., Rajabi, S., & Hemmatzadeh, F. (2024). Cell Immortality: In Vitro Effective Techniques to Achieve and Investigate Its Applications and Challenges. *Life*, *14*(3), 417. https://doi.org/10.3390/life14030417

Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., & Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature Biotechnology*, *27*(3), 275–280. https://doi.org/10.1038/nbt.1529

Chandrasekaran, A., Avci, H. X., Ochalek, A., Rösingh, L. N., Molnár, K., László, L., Bellák, T., Téglási, A., Pesti, K., Mike, A., Phanthong, P., Bíró, O., Hall, V., Kitiyanant, N., Krause, K.-H., Kobolák, J., & Dinnyés, A. (2017). Comparison of 2D and 3D neural induction methods for the generation of neural progenitor cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research*, *25*, 139–151. https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.10.010

Chen, L.-W., Wu, Y., Neelakantan, N., Chong, M. F.-F., Pan, A., & van Dam, R. M. (2014). Maternal caffeine intake during pregnancy is associated with risk of low birth weight: A systematic review and dose-response meta-analysis. *BMC Medicine*, *12*, 174. https://doi.org/10.1186/s12916-014-0174-6

Chen, Y., Qin, C., Huang, J., Tang, X., Liu, C., Huang, K., Xu, J., Guo, G., Tong, A., & Zhou, L. (2020). The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Proliferation*, *53*(3), e12781. https://doi.org/10.1111/cpr.12781

Chern, J.-M., Lee, W.-F., & Hsieh, M.-Y. (2004). Absorption Isotherm of Caffeine and Release Kinetics from Swollen NIPAAm Hydrogels: Experiments and Modeling. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *43*(19), 6150–6156. https://doi.org/10.1021/ie049616d

Costantino, A., Maiese, A., Lazzari, J., Casula, C., Turillazzi, E., Frati, P., & Fineschi, V. (2023). The Dark Side of Energy Drinks: A Comprehensive Review of Their Impact on the Human Body. *Nutrients*, *15*(18), 3922. https://doi.org/10.3390/nu15183922

Coyle, D. E., Li, J., & Baccei, M. (2011). Regional differentiation of retinoic acid-induced human pluripotent embryonic carcinoma stem cell neurons. *PloS One*, *6*(1), e16174. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016174

Cuadros, T. R., Skurtys, O., & Aguilera, J. M. (2012). Mechanical properties of calcium alginate fibers produced with a microfluidic device. *Carbohydrate Polymers*, *89*(4), 1198–1206. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.094

Curry, K., & Stasio, M. J. (2009). The effects of energy drinks alone and with alcohol on neuropsychological functioning. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental, 24*(6), 473–481. https://doi.org/10.1002/hup.1045

Czumaj, A., Szrok-Jurga, S., Hebanowska, A., Turyn, J., Swierczynski, J., Sledzinski, T., & Stelmanska, E. (2020). The pathophysiological role of CoA. *International Journal of Molecular Sciences, 21*(23), 9057. https://doi.org/10.3390/ijms21239057

Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, *65*(1), 1–105. https://doi.org/10.1016/s0301-0082(00)00067-8

Deng, H., Wang, L., Liu, P., Bin Naharudin, M. N., & Fan, X. (2025). Caffeine and taurine: A systematic review and network meta-analysis of their individual and combined effects on physical capacity, cognitive function, and physiological markers. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, *22*(1), 2566371. https://doi.org/10.1080/15502783.2025.2566371

de Freitas, A. P., Ferreira, D. D. P., Fernandes, A., Martins, R. S., Borges-Martins, V. P. P., Sathler, M. F., Dos-Santos-Pereira, M., Paes-de-Carvalho, R., Giestal-de-Araujo, E., de Melo Reis, R. A., & Kubrusly, R. C. C. (2016). Caffeine alters glutamate-aspartate transporter function and expression in rat retina. *Neuroscience*, *337*, 285–294. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.09.028

Di Lisa, D., Andolfi, A., Masi, G., Uras, G., Ferrari, P. F., Martinoia, S., & Pastorino, L. (2024). Impact of perfusion on neuronal development in human derived neuronal networks. *APL Bioengineering*, *8*(4), 046102. https://doi.org/10.1063/5.0221911

Díaz, A., Treviño, S., Guevara, J., Muñoz-Arenas, G., Brambila, E., Espinosa, B., Moreno-Rodríguez, A., Lopez-Lopez, G., Peña-Rosas, U., Venegas, B., Handal-Silva, A., Morán-Perales, J. L., Flores, G., & Aguilar-Alonso, P. (2016). Energy Drink Administration in Combination with Alcohol Causes an Inflammatory Response and Oxidative Stress in the Hippocampus and Temporal Cortex of Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*(1), 8725354. https://doi.org/10.1155/2016/8725354

Ding, M., Markon, A. O., Jones-Dominic, O. E., Purdue-Smithe, A. C., Rich-Edwards, J. W., Wolpert, B. J., & Chavarro, J. E. (2023). Intake of Energy Drinks Before and During Pregnancy and Adverse Pregnancy Outcomes. JAMA Network Open, 6(11), e2344023. https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.44023

Dingle, Y.-T. L., Boutin, M. E., Chirila, A. M., Livi, L. L., Labriola, N. R., Jakubek, L. M., Morgan, J. R., Darling, E. M., Kauer, J. A., & Hoffman-Kim, D. (2015). Three-Dimensional Neural Spheroid Culture: An In Vitro Model for Cortical Studies. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, *21*(12), 1274–1283. https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0135

Distler, T., Schaller, E., Steinmann, P., Boccaccini, A. R., & Budday, S. (2020). Alginate-based hydrogels show the same complex mechanical behavior as brain tissue. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *111*, 103979. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103979

Dobrek, L. (2025). The Review on Adverse Effects of Energy Drinks and Their Potential Drug Interactions. *Nutrients*, *17*(15), 2435. https://doi.org/10.3390/nu17152435

Doyle, W., Shide, E., Thapa, S., & Chandrasekaran, V. (2012). The effects of energy beverages on cultured cells. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *50*(10), 3759–3768. https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.008

Dragoj, M., Stojkovska, J., Stanković, T., Dinić, J., Podolski-Renić, A., Obradović, B., & Pešić, M. (2021). Development and Validation of a Long-Term 3D Glioblastoma Cell Culture in Alginate Microfibers as a Novel Bio-Mimicking Model System for Preclinical Drug Testing. *Brain Sciences*, *11*(8), 1025. https://doi.org/10.3390/brainsci11081025

Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, *62*(6), 649–671. https://doi.org/10.1016/s0301-0082(99)00060-x

Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*, *32*(4), 266–277. https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016

Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and Drug Development Technologies*, *12*(4), 207–218. https://doi.org/10.1089/adt.2014.573

Eftekharzadeh, B., Khodagholi, F., Abdi, A., & Maghsoudi, N. (2010). Alginate protects NT2 neurons against H2O2-induced neurotoxicity. *Carbohydrate Polymers*, *79*, 1063–1072. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.040

Ehlers, A., Marakis, G., Lampen, A., & Hirsch-Ernst, K. I. (2019). Risk assessment of energy drinks with focus on cardiovascular parameters and energy drink consumption in Europe. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *130*, 109–121. https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.05.028

El Idrissi, A., & Trenkner, E. (2004). Taurine as a modulator of excitatory and inhibitory neurotransmission. *Neurochemical Research*, *29*(1), 189–197. https://doi.org/10.1023/b:nere.0000010448.17740.6e

Ellermann, C., Hakenes, T., Wolfes, J., & Wegner, F. K. (2022). Cardiovascular risk of energy drinks: Caffeine and taurine facilitate ventricular arrhythmias in a sensitive whole-heart model. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology, 33*(4), 749–758. https://doi.org/10.1111/jce.15458

Endesfelder, S., Weichelt, U., Strauß, E., Schlör, A., Sifringer, M., Scheuer, T., Bührer, C., & Schmitz, T. (2017). Neuroprotection by Caffeine in Hyperoxia-Induced Neonatal Brain Injury. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(1), 187. https://doi.org/10.3390/ijms18010187

Endesfelder, S., Zaak, I., Weichelt, U., Bührer, C., & Schmitz, T. (2014). Caffeine protects neuronal cells against injury caused by hyperoxia in the immature brain. *Free Radical Biology & Medicine*, *67*, 221–234. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.026

Enobakhare, B., Bader, D. L., & Lee, D. A. (2006). Concentration and M/G ratio influence the physiochemical and mechanical properties of alginate constructs for tissue engineering. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics: JABB*, *4*(2), 87–96.

Estapé, D., Gòdia, F., & Solà, C. (1992). Determination of glucose and ethanol effective diffusion coefficients in Ca-alginate gel. *Enzyme and Microbial Technology*, *14*(5), 396–401. https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90009-d

European Food Safety Authority (EFSA). (2015). *Scientific Opinion on the safety of caffeine*. *13*(5), 4102.

Fang, Y., & Eglen, R. M. (2017). Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discovery: Advancing Life Sciences R & D*, *22*(5), 456–472. https://doi.org/10.1177/1087057117696795

Feng, W.-J., Mou, J., Liao, P.-P., Zhou, J., Zhang, N.-N., Hu, T., Wang, S., Zhang, S.-Y., & Mao, Y.-J. (2024). Alginate oligosaccharides exert protective effects on hydrogen peroxide-induced senescence in H9C2 cardiomyocytes by regulating the redox state of cells. *Food Science and Biotechnology*, *33*(12), 2835–2844. https://doi.org/10.1007/s10068-024-01534-y

Fernandes, H. R., Gaddam, A., Rebelo, A., Brazete, D., Stan, G. E., & Ferreira, J. M. F. (2018). Bioactive Glasses and Glass-Ceramics for Healthcare Applications in Bone Regeneration and Tissue Engineering. *Materials*, *11*(12), 2530. https://doi.org/10.3390/ma11122530

Fiani, B., Zhu, L., Musch, B. L., Briceno, S., Andel, R., Sadeq, N., & Ansari, A. Z. (2021). The Neurophysiology of Caffeine as a Central Nervous System Stimulant and the Resultant Effects on Cognitive Function. *Cureus*, *13*(5), e15032. https://doi.org/10.7759/cureus.15032

Florio, M., & Huttner, W. B. (2014). Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex. *Development*, *141*(11), 2182–2194. https://doi.org/10.1242/dev.090571

Foty, R. (2011). A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (51), 2720. https://doi.org/10.3791/2720

Franks, A. M., Schmidt, J. M., McCain, K. R., & Fraer, M. (2012). Comparison of the effects of energy drink versus caffeine supplementation on indices of 24-hour ambulatory blood pressure. *The Annals of Pharmacotherapy*, *46*(2), 192–199. https://doi.org/10.1345/aph.1Q555

Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., & Zvartau, E. E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, *51*(1), 83–133.

Furukawa, T., & Fukuda, A. (2023). Maternal taurine as a modulator of Cl- homeostasis as well as of glycine/GABAA receptors for neocortical development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *17*, 1221441. https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1221441

Gaitán-Salvatella, I., López-Villegas, E. O., González-Alva, P., Susate-Olmos, F., & Álvarez-Pérez, M. A. (2021). Case Report: Formation of 3D Osteoblast Spheroid Under Magnetic Levitation for Bone Tissue Engineering. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *8*, 672518. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.672518

Galéra, C., Bernard, J. Y., van der Waerden, J., Bouvard, M.-P., Lioret, S., Forhan, A., De Agostini, M., Melchior, M., Heude, B., & EDEN Mother-Child Cohort Study Group. (2016). Prenatal Caffeine Exposure and Child IQ at Age 5.5 Years: The EDEN Mother-Child Cohort. *Biological Psychiatry*, *80*(9), 720–726. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.08.034

Gebara, E., Udry, F., Sultan, S., & Toni, N. (2015). Taurine increases hippocampal neurogenesis in aging mice. *Stem Cell Research*, *14*(3), 369–379. https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.04.001

Geevarghese, R., Sajjadi, S. S., Hudecki, A., Sajjadi, S., Jalal, N. R., Madrakian, T., Ahmadi, M., Włodarczyk-Biegun, M. K., Ghavami, S., Likus, W., Siemianowicz, K., & Łos, M. J. (2022). Biodegradable and Non-Biodegradable Biomaterials and Their Effect on Cell Differentiation. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(24), 16185. https://doi.org/10.3390/ijms232416185

Goldfarb, M., Tellier, C., & Thanassoulis, G. (2014). Review of published cases of adverse cardiovascular events after ingestion of energy drinks. *The American Journal of Cardiology, 113*(1), 168–172. https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2013.08.058

González-Burguera, I., Ricobaraza, A., Aretxabala, X., Barrondo, S., García del Caño, G., López de Jesús, M., & Sallés, J. (2016). Data for the morphometric characterization of NT2-derived postmitotic neurons. Data in Brief, 7, 1349–1354. https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.04.021

Górka, K., Kruczyńska, A., Lenard, T., Banach, A., Sochaczewska, A., Mencfel, R., Kuźniar, A., & Czarnek, K. (2025). Energy Drinks-Trend or Awareness Choice? A Mini-Review. *The Journal of Nutrition*, S0022-3166(25)00422-5. https://doi.org/10.1016/j.tjnut.2025.06.033

Graneri, L., Lam, V., D'Alonzo, Z., Nesbit, M., Mamo, J. C. L., & Takechi, R. (2021). The Consumption of Energy Drinks Induces Blood-Brain Barrier Dysfunction in Wild-Type Mice. *Frontiers in Nutrition*, *8*, 668514. https://doi.org/10.3389/fnut.2021.668514

Grant, S. S., Magruder, K. P., & Friedman, B. H. (2018). Controlling for caffeine in cardiovascular research: A critical review. *International Journal of Psychophysiology, 133*, 193–201. https://doi.org/10.1016/j.ijpsycho.2018.07.001

Griffith, L. G., & Swartz, M. A. (2006). Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*(3), 211–224. https://doi.org/10.1038/nrm1858

Gualberto, P. I. B., Benvindo, V. V., Waclawovsky, G., & Deresz, L. F. (2024). Acute effects of energy drink consumption on cardiovascular parameters in healthy adults: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Nutrition Reviews*, *82*(8), 1028–1045. https://doi.org/10.1093/nutrit/nuad112

Gudelj-Rakic, J., Kilibarda, B., Vasic, M., & Jovanovic, V. (2024). Sociodemographic and lifestyle correlates of energy drinks consumption in Serbian adolescents. *European Journal of Public Health*, *34*(Supplement_3), ckae144.2016. https://doi.org/10.1093/eurpub/ckae144.2016

Guest, N., Corey, P., Vescovi, J., & El-Sohemy, A. (2018). Caffeine, CYP1A2 Genotype, and Endurance Performance in Athletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *50*(8), 1570–1578. https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000001596

Guest, N. S., VanDusseldorp, T. A., Nelson, M. T., Grgic, J., Schoenfeld, B. J., Jenkins, N. D. M., Arent, S. M., Antonio, J., Stout, J. R., Trexler, E. T., Smith-Ryan, A. E., Goldstein, E. R., Kalman, D. S., & Campbell, B. I. (2021). International society of sports nutrition position stand: Caffeine and exercise performance. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, *18*(1), 1. https://doi.org/10.1186/s12970-020-00383-4

Gutiérrez-Hellín, J., & Varillas-Delgado, D. (2021). Energy Drinks and Sports Performance, Cardiovascular Risk, and Genetic Associations; Future Prospects. *Nutrients*, *13*(3), 715. https://doi.org/10.3390/nu13030715

Haile, Y., Fu, W., Shi, B., Westaway, D., Baker, G., Jhamandas, J., & Giuliani, F. (2014). Characterization of the NT2-derived neuronal and astrocytic cell lines as alternative in vitro models for primary human neurons and astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, *92*(9), 1187–1198. https://doi.org/10.1002/jnr.23399

Hammond, D., & Reid, J. L. (2018). Exposure and perceptions of marketing for caffeinated energy drinks among young Canadians. *Public Health Nutrition*, *21*(3), 535–542. https://doi.org/10.1017/S1368980017002890

Hartley, R. S., Margulis, M., Fishman, P. S., Lee, V. M.-Y., & Tang, C.-M. (1999). Functional synapses are formed between human NTera2 (NT2N, hNT) neurons grown on astrocytes. Journal of Comparative Neurology, 407(1), 1–10. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19990428)407:1%3C1::AID-CNE1%3E3.0.CO;2-I

Hartung, T. (2009). Toxicology for the twenty-first century. *Nature*, *460*(7252), 208–212. https://doi.org/10.1038/460208a

Heckman, M. A., Sherry, K., & De Mejia, E. G. (2010). Energy Drinks: An Assessment of Their Market Size, Consumer Demographics, Ingredient Profile, Functionality, and Regulations in the United States. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(3), 303–317. https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00111.x

Heo, H. J., & Lee, C. Y. (2004). Protective effects of quercetin and vitamin C against oxidative stress-induced neurodegeneration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(25), 7514–7517. https://doi.org/10.1021/jf049243r

Hernández-Benítez, R., Ramos-Mandujano, G., & Pasantes-Morales, H. (2012). Taurine stimulates proliferation and promotes neurogenesis of mouse adult cultured neural stem/progenitor cells. *Stem Cell Research*, *9*(1), 24–34. https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.02.004

Higgins, J. P., Babu, K., Deuster, P. A., & Shearer, J. (2018). Energy Drinks: A Contemporary Issues Paper. *Current Sports Medicine Reports*, *17*(2), 65–72. https://doi.org/10.1249/JSR.0000000000000454

Higgins, J. P., Liras, G. N., & Liras, I. N. (2018). Some Popular Energy Shots and Their Ingredients: Are They Safe and Should They Be Used? A Literature Review. *Beverages*, *4*(1), 20. https://doi.org/10.3390/beverages4010020

Higgins, J. P., Tuttle, T. D., & Higgins, C. L. (2010). Energy beverages: Content and safety. *Mayo Clinic Proceedings*, *85*(11), 1033–1041. https://doi.org/10.4065/mcp.2010.0381

Hill, E. J., Jiménez-González, C., Tarczyluk, M., Nagel, D. A., Coleman, M. D., & Parri, H. R. (2012). NT2 Derived Neuronal and Astrocytic Network Signalling. *PLoS ONE*, *7*(5), e36098. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036098

Hill, E. J., Woehrling, E. K., Prince, M., & Coleman, M. D. (2008). Differentiating human NT2/D1 neurospheres as a versatile in vitro 3D model system for developmental neurotoxicity testing. *Toxicology*, *249*(2–3), 243–250. https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.05.014

Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., & Kunz-Schughart, L. A. (2010). Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology*, *148*(1), 3–15. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.012

Hogberg, H. T., & Smirnova, L. (2022). The Future of 3D Brain Cultures in Developmental Neurotoxicity Testing. Frontiers in Toxicology, 4, 808620. https://doi.org/10.3389/ftox.2022.808620

Holst, C. B., Brøchner, C. B., Vitting-Seerup, K., & Møllgård, K. (2019). Astrogliogenesis in human fetal brain: Complex spatiotemporal immunoreactivity patterns of GFAP, S100, AQP4 and YKL-40. Journal of Anatomy, 235(3), 590–615. https://doi.org/10.1111/joa.12948

Hopkins, A. M., DeSimone, E., Chwalek, K., & Kaplan, D. L. (2015). 3D in vitro modeling of the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, *125*, 1–25. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.11.003

Houghton, V., Du Preez, A., Lefèvre-Arbogast, S., de Lucia, C., Low, D. Y., Urpi-Sarda, M., Ruigrok, S. R., Altendorfer, B., González-Domínguez, R., Andres-Lacueva, C., Aigner, L., Lucassen, P. J., Korosi, A., Samieri, C., Manach, C., & Thuret, S. (2020). Caffeine Compromises Proliferation of Human Hippocampal Progenitor Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 806. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00806

Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, *21*(24), 2529–2543. https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00121-6

Inglis, S., Kanczler, J. M., & Oreffo, R. O. C. (2019). 3D human bone marrow stromal and endothelial cell spheres promote bone healing in an osteogenic niche. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *33*(3), 3279–3290. https://doi.org/10.1096/fj.201801114R

Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline. (1998). *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. National Academies Press (US). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114310/

Jagim, A. R., Harty, P. S., Barakat, A. R., Erickson, J. L., Carvalho, V., Khurelbaatar, C., Camic, C. L., & Kerksick, C. M. (2022). Prevalence and Amounts of Common Ingredients Found in Energy Drinks and Shots. *Nutrients*, *14*(2), 314. https://doi.org/10.3390/nu14020314

Jain, M., Nilsson, R., Sharma, S., Madhusudhan, N., Kitami, T., Souza, A. L., Kafri, R., Kirschner, M. W., Clish, C. B., & Mootha, V. K. (2012). Metabolite profiling identifies a key role for glycine in rapid cancer cell proliferation. *Science*, *336*(6084), 1040–1044. https://doi.org/10.1126/science.1218595

Jensen, C., & Teng, Y. (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*. https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033

Jong, C. J., Azuma, J., & Schaffer, S. (2012). Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: Prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids, 42*(6), 2223–2232. https://doi.org/10.1007/s00726-011-0962-7

Jorfi, M., D'Avanzo, C., Kim, D. Y., & Irimia, D. (2018). Three-Dimensional Models of the Human Brain Development and Diseases. *Advanced Healthcare Materials*, *7*(1), 10.1002/adhm.201700723. https://doi.org/10.1002/adhm.201700723

Juliano, L. M., & Griffiths, R. R. (2004). A critical review of caffeine withdrawal: Empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features. *Psychopharmacology, 176*(1), 1–29. https://doi.org/10.1007/s00213-004-2000-x

Jung, Y.-C., & Namkoong, K. (2014). Alcohol: Intoxication and poisoning - diagnosis and treatment. *Handbook of Clinical Neurology*, *125*, 115–121. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62619-6.00007-0

Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures—A comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science: AMS*, *14*(4), 910–919. https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743

Katsarova, I. (2025). *Energy drinks consumption in minors: EU and national approaches*. European Parliamentary Research Service. https://www.europarl.europa.eu/thinktank/en/document/EPRS_BRI(2025)779236

Katsetos, C. D., Legido, A., Perentes, E., & Mörk, S. J. (2003). Class III beta-tubulin isotype: A key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *Journal of Child Neurology*, *18*(12), 851–866; discussion 867. https://doi.org/10.1177/088307380301801205

Kaur, G., Pandey, O. P., Singh, K., Homa, D., Scott, B., & Pickrell, G. (2014). A review of bioactive glasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, *102*(1), 254–274. https://doi.org/10.1002/jbm.a.34690

Kavand, A., Noverraz, F., & Gerber-Lemaire, S. (2024). Recent Advances in Alginate-Based Hydrogels for Cell Transplantation Applications. *Pharmaceutics*, *16*(4), 469. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16040469

Kedracka-Krok, S., Fic, E., Cepil, Z., Rybczyński, P., Szlaga, A., Cacała, R., Lasota, S., Blasiak, A., & Dziedzicka-Wasylewska, M. (2025). NT2-derived astrocyte–neuron co-culture reflects physiological relevance and offers research validity. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *30*(1), 90. https://doi.org/10.1186/s11658-025-00765-z

Kelava, I., & Lancaster, M. A. (2016). Stem Cell Models of Human Brain Development. *Cell Stem Cell*, *18*(6), 736–748. https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.05.022

Kelm, J. M., Timmins, N. E., Brown, C. J., Fussenegger, M., & Nielsen, L. K. (2003). Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering*, *83*(2), 173–180. https://doi.org/10.1002/bit.10655

Kerkhofs, A., Xavier, A. C., da Silva, B. S., Canas, P. M., Idema, S., Baayen, J. C., Ferreira, S. G., Cunha, R. A., & Mansvelder, H. D. (2017). Caffeine Controls Glutamatergic Synaptic Transmission and Pyramidal Neuron Excitability in Human Neocortex. *Frontiers in Pharmacology*, *8*, 899. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00899

Kilb, W. (2017). Putative Role of Taurine as Neurotransmitter During Perinatal Cortical Development. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *975 Pt 1*, 281–292. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1079-2_25

Kilb, W., & Fukuda, A. (2017). Taurine as an Essential Neuromodulator during Perinatal Cortical Development. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*, 328. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00328

Kim, H. Y., Kim, H. V., Yoon, J. H., Kang, B. R., Cho, S. M., Lee, S., Kim, J. Y., Kim, J. W., Cho, Y., Woo, J., & Kim, Y. S. (2014). Taurine in drinking water recovers learning and memory in the adult APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports, 4*, 7467. https://doi.org/10.1038/srep07467

Kim, J. A., Choi, J.-H., Kim, M., Rhee, W. J., Son, B., Jung, H.-K., & Park, T. H. (2013). High-throughput generation of spheroids using magnetic nanoparticles for three-dimensional cell culture. *Biomaterials*, *34*(34), 8555–8563. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.056

Kim, K., Lee, S.-G., Kegelman, T. P., Su, Z.-Z., Das, S. K., Dash, R., Dasgupta, S., Barral, P. M., Hedvat, M., Diaz, P., Reed, J. C., Stebbins, J. L., Pellecchia, M., Sarkar, D., & Fisher, P. B. (2011). Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: Opportunities for developing novel therapeutics. *Journal of Cellular Physiology*, *226*(10), 2484–2493. https://doi.org/10.1002/jcp.22609

Kirkland, J. B. (2009). Niacin status, NAD distribution and ADP-ribose metabolism. *Current Pharmaceutical Design*, *15*(1), 3–11. https://doi.org/10.2174/138161209787185823

Kitano, O., & Nakazawa, K. (2021). Neuronal Differentiation of NT2 Cells in Monolayer and Spheroid Cultures. *MATEC Web of Conferences*, *333*, 07008. https://doi.org/10.1051/matecconf/202133307008

Kokubo, T., Kim, H.-M., & Kawashita, M. (2003). Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, *24*(13), 2161–2175. https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00044-9

Kolahdouzan, M., & Hamadeh, M. J. (2017). The neuroprotective effects of caffeine in neurodegenerative diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *23*(4), 272–290. https://doi.org/10.1111/cns.12684

Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 217–238. https://doi.org/10.1038/npp.2009.110

Koshy, A. M., & Mendoza-Parra, M. A. (2023). Retinoids: Mechanisms of Action in Neuronal Cell Fate Acquisition. *Life*, *13*(12), 2279. https://doi.org/10.3390/life13122279

Krahe, T. E., Filgueiras, C. C., da Silva Quaresma, R., Schibuola, H. G., Abreu-Villaça, Y., Manhães, A. C., & Ribeiro-Carvalho, A. (2017). Energy drink enhances the behavioral effects of alcohol in adolescent mice. *Neuroscience Letters*, *651*, 102–108. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.04.050

Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Review of Neuroscience*, *32*, 149–184. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600

Kubouchi, K., & Mukai, H. (2021). PKN2 is involved in aggregation and spheroid formation of fibroblasts in suspension culture by regulating cell motility and N-cadherin expression. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *25*, 100895. https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100895

Kumar, S., Porcu, P., Werner, D. F., Matthews, D. B., Diaz-Granados, J. L., Helfand, R. S., & Morrow, A. L. (2009). The role of GABA(A) receptors in the acute and chronic effects of ethanol: A decade of progress. *Psychopharmacology*, *205*(4), 529–564. https://doi.org/10.1007/s00213-009-1562-z

Lakin, H., Sheehan, P., & Soti, V. (2023). Maternal Caffeine Consumption and Its Impact on the Fetus: A Review. *Cureus*, *15*(11), e48266. https://doi.org/10.7759/cureus.48266

Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, *9*(10), 2329–2340. https://doi.org/10.1038/nprot.2014.158

Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P., & Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, *501*(7467), 373–379. https://doi.org/10.1038/nature12517

Langhans, S. A. (2018). Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Frontiers in Pharmacology*, *9*, 6. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006

Langlois, A., & Duval, D. (1997). Differentiation of the human NT2 cells into neurons and glia. *Methods in Cell Science, 19*(3), 213–219. https://doi.org/10.1023/A:1009731707443

Lecoutre, S., Maqdasy, S., Rizo-Roca, D., Renzi, G., Vlassakev, I., Alaeddine, L. M., Higos, R., Jalkanen, J., Zhong, J., Zareifi, D. S., Frendo-Cumbo, S., Massier, L., Hodek, O., Juvany, M., Moritz, T., de Castro Barbosa, T., Omar-Hmeadi, M., López-Yus, M., Merabtene, F., … Rydén, M. (2024). Reduced adipocyte glutaminase activity promotes energy expenditure and metabolic health. *Nature Metabolism*, *6*(7), 1329–1346. https://doi.org/10.1038/s42255-024-01083-y

Lee, J., Cuddihy, M. J., & Kotov, N. A. (2008). Three-dimensional cell culture matrices: State of the art. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, *14*(1), 61–86. https://doi.org/10.1089/teb.2007.0150

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, *37*(1), 106–126. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003

Lee, M. K., Tuttle, J. B., Rebhun, L. I., Cleveland, D. W., & Frankfurter, A. (1990). The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *17*(2), 118–132. https://doi.org/10.1002/cm.970170207

Lee, V. M., & Andrews, P. W. (1986). Differentiation of NTERA-2 clonal human embryonal carcinoma cells into neurons involves the induction of all three neurofilament proteins. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *6*(2), 514–521. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.06-02-00514.1986

Li, P., Haas, N. A., Dalla-Pozza, R., Jakob, A., Oberhoffer, F. S., & Mandilaras, G. (2023). Energy Drinks and Adverse Health Events in Children and Adolescents: A Literature Review. *Nutrients*, *15*(11), 2537. https://doi.org/10.3390/nu15112537

Li, Y., & Kumacheva, E. (2018). Hydrogel microenvironments for cancer spheroid growth and drug screening. *Science Advances*, *4*(4), eaas8998. https://doi.org/10.1126/sciadv.aas8998

Lin, Z., Wei, J., Hu, Y., Pi, D., Jiang, M., & Lang, T. (2023). Caffeine Synthesis and Its Mechanism and Application by Microbial Degradation, A Review. *Foods*, *12*(14), 2721. https://doi.org/10.3390/foods12142721

Liu, Y., Beyer, A., & Aebersold, R. (2016). On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*, *165*(3), 535–550. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014

Liu, Z., Mao, S., Hu, Y., Liu, F., & Shao, X. (2023). Hydrogel platform facilitating astrocytic differentiation through cell mechanosensing and YAP-mediated transcription. *Materials Today. Bio*, *22*, 100735. https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100735

Lo, B., & Parham, L. (2009). Ethical issues in stem cell research. *Endocrine Reviews*, *30*(3), 204–213. https://doi.org/10.1210/er.2008-0031

Luo, Y.-S., Chen, Z., Blanchette, A. D., Zhou, Y.-H., Wright, F. A., Baker, E. S., Chiu, W. A., & Rusyn, I. (2021). Relationships between constituents of energy drinks and beating parameters in human induced pluripotent stem cell (iPSC)-Derived cardiomyocytes. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *149*, 111979. https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.111979

Malik, V. S., Popkin, B. M., Bray, G. A., Després, J.-P., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2010). Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Care*, *33*(11), 2477–2483. https://doi.org/10.2337/dc10-1079

Mandato, J., Kola, R., Tyson, T., Laffin, L., & Bales, R. (2025). The Effects of Energy Drinks on the Cardiovascular System: A Systematic Review. *Current Cardiology Reports*, *27*(1), 156. https://doi.org/10.1007/s11886-025-02293-w

Marczinski, C. A. (2011). Alcohol mixed with energy drinks: Consumption patterns and motivations for use in U.S. college students. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *8*(8), 3232–3245. https://doi.org/10.3390/ijerph8083232

Marshall, L. J., Bailey, J., Cassotta, M., Herrmann, K., & Pistollato, F. (2023). Poor Translatability of Biomedical Research Using Animals—A Narrative Review. *Alternatives to Laboratory Animals: ATLA*, *51*(2), 102–135. https://doi.org/10.1177/02611929231157756

Martin, I., Wendt, D., & Heberer, M. (2004). The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, *22*(2), 80–86. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2003.12.001

Mary, G., Malgras, B., Perez, J. E., Nagle, I., Luciani, N., Pimpie, C., Asnacios, A., Pocard, M., Reffay, M., & Wilhelm, C. (2022). Magnetic Compression of Tumor Spheroids Increases Cell Proliferation In Vitro and Cancer Progression In Vivo. *Cancers*, *14*(2), 366. https://doi.org/10.3390/cancers14020366

Matondo, J. D., Suleiman, R., & Issa-Zacharia, A. (2026). A narrative review of energy drinks: From real-time energy boost to long-term health decline. *Cogent Food & Agriculture*, *12*(1), 2631199. https://doi.org/10.1080/23311932.2026.2631199

Medrano-Sanchez, E. J., Gutierrez-Berrocal, C. A., Gonzales-Aguilar, L. C., Huaman, M. A., Monteza, K. C., & Ayllon, M. L. (2026). Energy Drinks and Cardiovascular Health: A Critical Review of Recent Evidence. *Beverages*, *12*(1), 4. https://doi.org/10.3390/beverages12010004

McCoy, R. J., & O'Brien, F. J. (2010). Influence of shear stress in perfusion bioreactor cultures for the development of three-dimensional bone tissue constructs: A review. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, *16*(6), 587–601. https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2010.0370

McLellan, T. M., Caldwell, J. A., & Lieberman, H. R. (2016). A review of caffeine's effects on cognitive, physical and occupational performance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *71*, 294–312. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.09.001

Mead, E. A., Wang, Y., Patel, S., Thekkumthala, A. P., Kepich, R., Benn-Hirsch, E., Lee, V., Basaly, A., Bergeson, S., Siegelmann, H. T., & Pietrzykowski, A. Z. (2023). miR-9 utilizes precursor pathways in adaptation to alcohol in mouse striatal neurons. *Advances in Drug and Alcohol Research*, *3*, 11323. https://doi.org/10.3389/adar.2023.11323

Melvik, J. E., & Dornish, M. (2004). *Alginate as a Carrier for Cell Immobilisation* (pp. 33–51). https://doi.org/10.1007/978-94-017-1638-3_2

Miller, F. D., & Gauthier, A. S. (2007). Timing is everything: Making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron*, *54*(3), 357–369. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.019

Miyamoto, Y., Koshidaka, Y., Noguchi, H., Oishi, K., Saito, H., Yukawa, H., Kaji, N., Ikeya, T., Suzuki, S., Iwata, H., Baba, Y., Murase, K., & Hayashi, S. (2013). Observation of Positively Charged Magnetic Nanoparticles Inside HepG2 Spheroids Using Electron Microscopy. *Cell Medicine*, *5*(2–3), 89–96. https://doi.org/10.3727/215517913X666530

Mojsin, M., Grujičić, N. K., Nikčević, G., Krstić, A., Savić, T., & Stevanović, M. (2006). Mapping of the RXRα binding elements involved in retinoic acid induced transcriptional activation of the human *SOX3* gene. *Neuroscience Research*, *56*(4), 409–418. https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.08.010

Moldovan, G.-L., Pfander, B., & Jentsch, S. (2007). PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell*, *129*(4), 665–679. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.003

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, *65*(1–2), 55–63. https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4

Moxon, S. R., Corbett, N. J., Fisher, K., Potjewyd, G., Domingos, M., & Hooper, N. M. (2019). Blended alginate/collagen hydrogels promote neurogenesis and neuronal maturation. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, *104*, 109904. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109904

Nehlig, A. (1999). Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *23*(4), 563–576. https://doi.org/10.1016/s0149-7634(98)00050-5

Nehlig, A. (2010). Is caffeine a cognitive enhancer? *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *20 Suppl 1*, S85-94. https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091315

Nehlig, A. (2018). Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption. *Pharmacological Reviews, 70*(2), 384–411. https://doi.org/10.1124/pr.117.014407

Nehlig, A., Daval, J. L., & Debry, G. (1992). Caffeine and the central nervous system: Mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *17*(2), 139–170. https://doi.org/10.1016/0165-0173(92)90012-b

Nikolova, M. P., & Chavali, M. S. (2019). Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. Bioactive Materials, 4, 271–292. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.005

Nowak, D., & Jasionowski, A. (2015). Analysis of the Consumption of Caffeinated Energy Drinks among Polish Adolescents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *12*(7), 7910–7921. https://doi.org/10.3390/ijerph120707910

Nowakowski, T. J., Pollen, A. A., Sandoval-Espinosa, C., & Kriegstein, A. R. (2016). Transformation of the radial glia scaffold demarcates two stages of human cerebral cortex development. Neuron, 91(6), 1219–1227. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.005

O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, *14*(3), 88–95. https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X

Ohnuki, Y., & Kurosawa, H. (2013). Effects of hanging drop culture conditions on embryoid body formation and neuronal cell differentiation using mouse embryonic stem cells: Optimization of culture conditions for the formation of well-controlled embryoid bodies. Journal of Bioscience and Bioengineering, 115(5), 571–574. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.11.016

O'Leary, F., & Samman, S. (2010). Vitamin B12 in health and disease. *Nutrients*, *2*(3), 299–316. https://doi.org/10.3390/nu2030299

Oliver, J.-A. N., Su, Y., Lu, X., Kuo, P.-H., Du, J., & Zhu, D. (2019). Bioactive glass coatings on metallic implants for biomedical applications. *Bioactive Materials*, *4*, 261–270. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.09.002

Pal, R., & Ravindran, G. (2006). Assessment of pluripotency and multilineage differentiation potential of NTERA-2 cells as a model for studying human embryonic stem cells. *Cell Proliferation*, *39*(6), 585–598. https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2006.00400.x

Palzer, J., Mues, B., Goerg, R., Aberle, M., Rensen, S. S., Olde Damink, S. W. M., Vaes, R. D. W., Cramer, T., Schmitz-Rode, T., Neumann, U. P., Slabu, I., & Roeth, A. A. (2021). Magnetic Fluid Hyperthermia as Treatment Option for Pancreatic Cancer Cells and Pancreatic Cancer Organoids. *International Journal of Nanomedicine*, *16*, 2965–2981. https://doi.org/10.2147/IJN.S288379

Pamies, D., Barreras, P., Block, K., Makri, G., Kumar, A., Wiersma, D., Smirnova, L., Zang, C., Bressler, J., Christian, K. M., Harris, G., Ming, G.-L., Berlinicke, C. J., Kyro, K., Song, H., Pardo, C. A., Hartung, T., & Hogberg, H. T. (2017). A human brain microphysiological system derived from

induced pluripotent stem cells to study neurological diseases and toxicity. *ALTEX*, *34*(3), 362–376. https://doi.org/10.14573/altex.1609122

Pamies, D., Hartung, T., & Hogberg, H. T. (2014). Biological and medical applications of a brain-on-a-chip. *Experimental Biology and Medicine*, *239*(9), 1096–1107. https://doi.org/10.1177/1535370214537738

Pampaloni, F., Reynaud, E. G., & Stelzer, E. H. K. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *8*(10), 839–845. https://doi.org/10.1038/nrm2236

Parezanović, G. Š., & Prkosovački, B. P. (2016). Energy drink consumption among medical high school students in Serbia. *Paediatria Croatica*, *60*(3), 85–90. https://doi.org/10.13112/PC.2016.13

Park, C. H., Park, J. H., & Suh, Y. J. (2024). Perspective of 3D culture in medicine: Transforming disease research and therapeutic applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1491669

Patra, B., Peng, C.-C., Liao, W.-H., Lee, C.-H., & Tung, Y.-C. (2016). Drug testing and flow cytometry analysis on a large number of uniform sized tumor spheroids using a microfluidic device. *Scientific Reports*, *6*, 21061. https://doi.org/10.1038/srep21061

Pejic, J., Milivojevic, M., Schwirtlich, M., Petrovic, J., Stojkovska, J., Stevanovic, M., & Mojsin, M. (2025). Human pluripotent NT2/D1 cells immobilized in alginate microfibers: A 3D system for testing the effects of bioactive compounds. *Hemijska Industrija*, *79*(3), 141–155. https://doi.org/10.2298/HEMIND240724011P

Pejić, J., Milivojevic, M., Schwirtlich, M., Bojic, L., Stojkovska, J., Petrovic, I., Stevanovic, M., & Mojsin, M. (2026). Human NT2/D1-derived early neural progenitor cells immobilised in alginate microfibres as an in vitro 3D system for neurotoxicity testing. *Alternatives to Laboratory Animals*, *54*(2), 67–84. https://doi.org/10.1177/02611929261428700

Pellarin, I., Dall'Acqua, A., Favero, A., Segatto, I., Rossi, V., Crestan, N., Karimbayli, J., Belletti, B., & Baldassarre, G. (2025). Cyclin-dependent protein kinases and cell cycle regulation in biology and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *10*(1), 11. https://doi.org/10.1038/s41392-024-02080-z

Petribu, B. N., Abrahao, K. P., & Souza-Formigoni, M. L. O. (2022). Ethanol combined with energy drinks: Two decades of research in rodents. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *16*, 1100608. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1100608

Place, E. S., Evans, N. D., & Stevens, M. M. (2009). Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature Materials*, *8*(6), 457–470. https://doi.org/10.1038/nmat2441

Pleasure, S. J., Page, C., & Lee, V. M. (1992). Pure, postmitotic, polarized human neurons derived from NTera 2 cells provide a system for expressing exogenous proteins in terminally differentiated neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *12*(5), 1802–1815. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-05-01802.1992

Podrygajlo, G., Tegenge, M. A., Gierse, A., Paquet-Durand, F., Tan, S., Bicker, G., & Stern, M. (2009). Cellular phenotypes of human model neurons (NT2) after differentiation in aggregate culture. *Cell and Tissue Research*, *336*(3), 439–452. https://doi.org/10.1007/s00441-009-0783-0

Pradhan, S., Clary, J. M., Seliktar, D., & Lipke, E. A. (2017). A three-dimensional spheroidal cancer model based on PEG-fibrinogen hydrogel microspheres. *Biomaterials*, *115*, 141–154. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.10.052

Qu, H., Fu, H., Han, Z., & Sun, Y. (2019). Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review. *RSC Advances*, *9*(45), 26252–26262. https://doi.org/10.1039/c9ra05214c

Quadrato, G., Nguyen, T., Macosko, E. Z., Sherwood, J. L., Min Yang, S., Berger, D. R., Maria, N., Scholvin, J., Goldman, M., Kinney, J. P., Boyden, E. S., Lichtman, J. W., Williams, Z. M.,

McCarroll, S. A., & Arlotta, P. (2017). Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature*, *545*(7652), 48–53. https://doi.org/10.1038/nature22047

Radonjić, M., Petrović, J., Milivojević, M., Stevanović, M., Stojkovska, J., & Obradović, B. (2022). CHEMICAL ENGINEERING METHODS IN ANALYSES OF 3D CANCER CELL CULTURES: HYDRODYNAMIC AND MASS TRANSPORT CONSIDERATIONS: Scientific paper. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, *28*(3), 211–223. https://doi.org/10.2298/CICEQ210607033R

Ramírez-Guerrero, S., Guardo-Maya, S., Medina-Rincón, G. J., Orrego-González, E. E., Cabezas-Pérez, R., & González-Reyes, R. E. (2022). Taurine and Astrocytes: A Homeostatic and Neuroprotective Relationship. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *15*, 937789. https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.937789

Read, G. H., Miura, N., Carter, J. L., Kines, K. T., Yamamoto, K., Devasahayam, N., Cheng, J. Y., Camphausen, K. A., Krishna, M. C., & Kesarwala, A. H. (2018). Three-dimensional alginate hydrogels for radiobiological and metabolic studies of cancer cells. Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces, 171, 197–204. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.018

Reddy, V. S., Shiva, S., Manikantan, S., & Ramakrishna, S. (2024a). Pharmacology of caffeine and its effects on the human body. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, *10*, 100138. https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2024.100138

Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers. (2011). *Official Journal of the European Union*, L 304, 18–63. https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2011/1169/oj

Richards, G., & Smith, A. P. (2016). A Review of Energy Drinks and Mental Health, with a Focus on Stress, Anxiety, and Depression. *Journal of Caffeine Research*, *6*(2), 49–63. https://doi.org/10.1089/jcr.2015.0033

Ripps, H., & Shen, W. (2012). Review: Taurine: a 'very essential' amino acid. *Molecular Vision*, *18*, 2673–2686.

Rodella, P., Boreski, D., Luz, M. A. M., Gabriel, E. A., Takase, L. F., & Chin, C. M. (2024). Taurine Neuroprotection and Neurogenesis Effect in Chronic Ethanol-Induced Rats. *Nutrients*, *16*(12), 1973. https://doi.org/10.3390/nu16121973

Rodriguez, S., Lau, H., Corrales, N., Heng, J., Lee, S., Stiner, R., Alexander, M., & Lakey, J. R. T. (2020). Characterization of chelator-mediated recovery of pancreatic islets from barium-stabilized alginate microcapsules. *Xenotransplantation*, *27*(1), e12554. https://doi.org/10.1111/xen.12554

Rosca, A., Coronel, R., Moreno, M., González, R., Oniga, A., Martín, A., López, V., González, M. del C., & Liste, I. (2020). Impact of environmental neurotoxic: Current methods and usefulness of human stem cells. *Heliyon*, *6*(12), e05773. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05773

Roshan, M. H. K., Tambo, A., & Pace, N. P. (2016). Potential role of caffeine in the treatment of Parkinson's disease. The Open Neurology Journal, 10(1), 42–58. https://doi.org/10.2174/1874205X01610010042

Roux, E., Bougaran, P., Dufourcq, P., & Couffinhal, T. (2020). Fluid Shear Stress Sensing by the Endothelial Layer. Frontiers in Physiology, 11. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00861

Rowley, J. A., Madlambayan, G., & Mooney, D. J. (1999). Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, *20*(1), 45–53. https://doi.org/10.1016/s0142-9612(98)00107-0

Rubio, C., Cámara, M., Giner, R. M., González-Muñoz, M. J., López-García, E., Morales, F. J., Moreno-Arribas, M. V., Portillo, M. P., & Bethencourt, E. (2022). Caffeine, D-glucuronolactone and Taurine Content in Energy Drinks: Exposure and Risk Assessment. *Nutrients*, *14*(23), 5103. https://doi.org/10.3390/nu14235103

Rubio, R., Abarrategi, A., Garcia-Castro, J., Martinez-Cruzado, L., Suarez, C., Tornin, J., Santos, L., Astudillo, A., Colmenero, I., Mulero, F., Rosu-Myles, M., Menendez, P., & Rodriguez, R. (2014).

Bone environment is essential for osteosarcoma development from transformed mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, *32*(5), 1136–1148. https://doi.org/10.1002/stem.1647

Sachse, C., Brockmöller, J., Bauer, S., & Roots, I. (1999). Functional significance of a C-->A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *47*(4), 445–449. https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1999.00898.x

Sandhu, J. K., Sikorska, M., & Walker, P. R. (2002). Characterization of astrocytes derived from human NTera-2/D1 embryonal carcinoma cells. *Journal of Neuroscience Research*, *68*(5), 604–614. https://doi.org/10.1002/jnr.10236

Sangaunchom, P., & Dharmasaroja, P. (2020). Caffeine Potentiates Ethanol-Induced Neurotoxicity Through mTOR/p70S6K/4E-BP1 Inhibition in SH-SY5Y Cells. *International Journal of Toxicology*, *39*(2), 131–140. https://doi.org/10.1177/1091581819900150

Santulli, G., Kansakar, U., Varzideh, F., Mone, P., Jankauskas, S. S., & Lombardi, A. (2023). Functional role of taurine in aging and cardiovascular health: An updated overview. *Nutrients, 15*(19), 4236. https://doi.org/10.3390/nu15194236

Saporta, S., Willing, A. E., Shamekh, R., Bickford, P., Paredes, D., & Cameron, D. F. (2004). Rapid differentiation of NT2 cells in Sertoli-NT2 cell tissue constructs grown in the rotating wall bioreactor. *Brain Research Bulletin*, *64*(4), 347–356. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2004.09.003

Sayed, W. M. (2021). Quercetin Alleviates Red Bull Energy Drink-Induced Cerebral Cortex Neurotoxicity via Modulation of Nrf2 and HO-1. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2021*, 9482529. https://doi.org/10.1155/2021/9482529

Schaffer, S. W., Jong, C. J., Ito, T., & Azuma, J. (2014). Role of taurine in the pathologies of MELAS and MERRF. *Amino Acids*, *46*(1), 47–56. https://doi.org/10.1007/s00726-012-1414-8

Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, *182*(3), 311–322. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3%3C311::AID-JCP1%3E3.0.CO;2-9

Schaffer, S. W., Shimada, K., Jong, C. J., Ito, T., Azuma, J., & Takahashi, K. (2014). Effect of taurine and potential interactions with caffeine on cardiovascular function. *Amino Acids, 46*(5–6), 1147–1157. https://doi.org/10.1007/s00726-013-1664-6

Schreiner, B., Romanelli, E., Liberski, P., Ingold-Heppner, B., Sobottka-Brillout, B., Hartwig, T., Chandrasekar, V., Johannssen, H., Zeilhofer, H. U., Aguzzi, A., Heppner, F., Kerschensteiner, M., & Becher, B. (2015). Astrocyte Depletion Impairs Redox Homeostasis and Triggers Neuronal Loss in the Adult CNS. *Cell Reports*, *12*(9), 1377–1384. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.051

Seal, A. D., Bardis, C. N., Gavrieli, A., Grigorakis, P., Adams, J. D., Arnaoutis, G., Yannakoulia, M., & Kavouras, S. A. (2017). Coffee with High but Not Low Caffeine Content Augments Fluid and Electrolyte Excretion at Rest. Frontiers in Nutrition, 4. https://doi.org/10.3389/fnut.2017.00040

Sefen, J. A. N., Patil, J. D., & Cooper, H. (2022). The implications of alcohol mixed with energy drinks from medical and socio-legal standpoints. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *16*, 968889. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.968889

Seifert, S. M., Schaechter, J. L., Hershorin, E. R., & Lipshultz, S. E. (2011). Health effects of energy drinks on children, adolescents, and young adults. *Pediatrics*, *127*(3), 511–528. https://doi.org/10.1542/peds.2009-3592

Seneff, S., & Kyriakopoulos, A. M. (2025). Taurine prevents mitochondrial dysfunction and protects mitochondria from reactive oxygen species and deuterium toxicity. *Amino Acids*, *57*(1), 6. https://doi.org/10.1007/s00726-024-03440-3

Serafin, A., Culebras, M., & Collins, M. N. (2023). Synthesis and evaluation of alginate, gelatin, and hyaluronic acid hybrid hydrogels for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *233*, 123438. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123438

Serdar, M., Mordelt, A., Müser, K., Kempe, K., Felderhoff-Müser, U., Herz, J., & Bendix, I. (2019). Detrimental Impact of Energy Drink Compounds on Developing Oligodendrocytes and Neurons. *Cells*, *8*(11), 1381. https://doi.org/10.3390/cells8111381

Serra, M., Brito, C., Costa, E. M., Sousa, M. F. Q., & Alves, P. M. (2009). Integrating human stem cell expansion and neuronal differentiation in bioreactors. *BMC Biotechnology*, *9*, 82. https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-82

Shah, S. A., Szeto, A. H., Farewell, R., Shek, A., Fan, D., Quach, K. N., Bhattacharyya, M., Elmiari, J., Chan, W., O'Dell, K., Nguyen, N., McGaughey, T. J., Nasir, J. M., & Kaul, S. (2019). Impact of High Volume Energy Drink Consumption on Electrocardiographic and Blood Pressure Parameters: A Randomized Trial. *Journal of the American Heart Association*, *8*(11), e011318. https://doi.org/10.1161/JAHA.118.011318

Sherr, C. J. (1995). D-type cyclins. *Trends in Biochemical Sciences*, *20*(5), 187–190. https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)89005-2

Shi, Y., Kirwan, P., & Livesey, F. J. (2012). Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nature Protocols*, *7*(10), 1836–1846. https://doi.org/10.1038/nprot.2012.116

Sies, H. (2015). Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, *4*, 180–183. https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002

Silva, S. P., Zago, A. M., Carvalho, F. B., Germann, L., Colombo, G. de M., Rahmeier, F. L., Gutierres, J. M., Reschke, C. R., Bagatini, M. D., Assmann, C. E., & Fernandes, M. da C. (2021). Neuroprotective Effect of Taurine against Cell Death, Glial Changes, and Neuronal Loss in the Cerebellum of Rats Exposed to Chronic-Recurrent Neuroinflammation Induced by LPS. *Journal of Immunology Research*, *2021*, 7497185. https://doi.org/10.1155/2021/7497185

Sirenko, O., Mitlo, T., Hesley, J., Luke, S., Owens, W., & Cromwell, E. F. (2015). High-content assays for characterizing the viability and morphology of 3D cancer spheroid cultures. *Assay and Drug Development Technologies*, *13*(7), 402–414. https://doi.org/10.1089/adt.2015.655

Smidsrød, O., & Skja˚k-Br˙k, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. Trends in Biotechnology, 8, 71–78. https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90139-O

Southward, K., Rutherfurd-Markwick, K., Badenhorst, C., & Ali, A. (2018). The Role of Genetics in Moderating the Inter-Individual Differences in the Ergogenicity of Caffeine. *Nutrients*, *10*(10), 1352. https://doi.org/10.3390/nu10101352

Spanagel, R. (2009). Alcoholism: A Systems Approach From Molecular Physiology to Addictive Behavior. *Physiological Reviews*, *89*(2), 649–705. https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2008

Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *24*(4), 417–463. https://doi.org/10.1016/s0149-7634(00)00014-2

Spear, L. P. (2013). Adolescent neurodevelopment. *The Journal of Adolescent Health: Official Publication of the Society for Adolescent Medicine*, *52*(2 Suppl 2), S7-13. https://doi.org/10.1016/j.jadohealth.2012.05.006

Spinella, M. J., Freemantle, S. J., Sekula, D., Chang, J. H., Christie, A. J., & Dmitrovsky, E. (1999). Retinoic acid promotes ubiquitination and proteolysis of cyclin D1 during induced tumor cell differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(31), 22013–22018. https://doi.org/10.1074/jbc.274.31.22013

Spriet, L. L. (2014). Exercise and sport performance with low doses of caffeine. *Sports Medicine*, *44 Suppl 2*(Suppl 2), S175-184. https://doi.org/10.1007/s40279-014-0257-8

Stanisavljevic, D., Popovic, J., Petrovic, I., Davidovic, S., Atkinson, M. J., Anastasov, N., & Stevanovic, M. (2019). Radiation effects on early phase of NT2/D1 neural differentiation in vitro. *International Journal of Radiation Biology, 95*(12), 1627–1639. https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1665207

Stern, M., Botha, N., Cloete, K. J., Maaza, M., Tan, S., & Bicker, G. (2024). Neurotoxicity and Developmental Neurotoxicity of Copper Sulfide Nanoparticles on a Human Neuronal In-Vitro Test System. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(11), 5650. https://doi.org/10.3390/ijms25115650

Stern, M., Gierse, A., Tan, S., & Bicker, G. (2014). Human Ntera2 cells as a predictive in vitro test system for developmental neurotoxicity. *Archives of Toxicology*, *88*(1), 127–136. https://doi.org/10.1007/s00204-013-1098-1

Stevanovic, M. (2003). Modulation of SOX2 and SOX3 gene expression during differentiation of human neuronal precursor cell line NTERA2. Molecular Biology Reports, 30(2), 127–132. https://doi.org/10.1023/A:1023961009869

Stojkovska, J., Zvicer, J., Milivojević, M., Petrović, I., Stevanović, M., & Obradović, B. (2020). Validation of a novel perfusion bioreactor system in cancer research. *Hemijska Industrija*, *74*(3), 187–196. https://doi.org/10.2298/HEMIND200329015S

Storch, K., Eke, I., Borgmann, K., Krause, M., Richter, C., Becker, K., Schröck, E., & Cordes, N. (2010). Three-dimensional cell growth confers radioresistance by chromatin density modification. *Cancer Research*, *70*(10), 3925–3934. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3848

Stover, P. J., & Field, M. S. (2015). Vitamin B-61. *Advances in Nutrition*, *6*(1), 132–133. https://doi.org/10.3945/an.113.005207

Sundberg, M., Andersson, P.-H., Åkesson, E., Odeberg, J., Holmberg, L., Inzunza, J., Falci, S., Öhman, J., Suuronen, R., Skottman, H., Lehtimäki, K., Hovatta, O., Narkilahti, S., & Sundström, E. (2011). Markers of pluripotency and differentiation in human neural precursor cells derived from embryonic stem cells and CNS tissue. *Cell Transplantation*, *20*(2), 177–191. https://doi.org/10.3727/096368910X527266

Takahashi, K., Foster, J. B., & Lin, C.-L. G. (2015). Glutamate transporter EAAT2: Regulation, function, and potential as a therapeutic target for neurological and psychiatric disease. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *72*(18), 3489–3506. https://doi.org/10.1007/s00018-015-1937-8

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663–676. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024

Taverna, E., Götz, M., & Huttner, W. B. (2014). The cell biology of neurogenesis: Toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *30*, 465–502. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155801

Taylor, M. A., Kan, H. L., Gollapudi, B. B., & Marty, M. S. (2019). An in vitro developmental neurotoxicity screening assay for retinoic acid-induced neuronal differentiation using the human NT2/D1 cell line. *Neurotoxicology*, *73*, 258–264. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2019.04.005

Tejo-Otero, A., Fenollosa-Artés, F., Achaerandio, I., Rey-Vinolas, S., Buj-Corral, I., Mateos-Timoneda, M. Á., & Engel, E. (2022). Soft-Tissue-Mimicking Using Hydrogels for the Development of Phantoms. *Gels*, *8*(1), 40. https://doi.org/10.3390/gels8010040

Temple, J. L., Bernard, C., Lipshultz, S. E., Czachor, J. D., Westphal, J. A., & Mestre, M. A. (2017). The Safety of Ingested Caffeine: A Comprehensive Review. *Frontiers in Psychiatry*, *8*, 80. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2017.00080

Terrasso, A. P., Pinto, C., Serra, M., Filipe, A., Almeida, S., Ferreira, A. L., Pedroso, P., Brito, C., & Alves, P. M. (2015). Novel scalable 3D cell based model for in vitro neurotoxicity testing:

Combining human differentiated neurospheres with gene expression and functional endpoints. *Journal of Biotechnology*, *205*, 82–92. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.12.011

Thakurela, S., Tiwari, N., Schick, S., Garding, A., Ivanek, R., Berninger, B., & Tiwari, V. K. (2016). Mapping gene regulatory circuitry of Pax6 during neurogenesis. *Cell Discovery*, *2*, 15045. https://doi.org/10.1038/celldisc.2015.45

Tiwari, A., Rout, S., Deep, P., Sahu, C., & Samal, P. K. (2025). The Dual Role of Astrocytes in CNS Homeostasis and Dysfunction. *Neuroglia*, *6*(4), 38. https://doi.org/10.3390/neuroglia6040038

Todd, A. C., & Hardingham, G. E. (2020). The Regulation of Astrocytic Glutamate Transporters in Health and Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(24), 9607. https://doi.org/10.3390/ijms21249607

Topalovic, V., Krstic, A., Schwirtlich, M., Dolfini, D., Mantovani, R., Stevanovic, M., & Mojsin, M. (2017). Epigenetic regulation of human SOX3 gene expression during early phases of neural differentiation of NT2/D1 cells. *PloS One*, *12*(9), e0184099. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184099

Topalovic, V., Schwirtlich, M., Stevanovic, M., & Mojsin, M. (2017). Histone Modifications on the Promoters of Human OCT4 and NANOG Genes at the Onset of Neural Differentiation of NT2/D1 Cells. *Biochemistry. Biokhimiia*, *82*(6), 715–722. https://doi.org/10.1134/S0006297917060086

Tung, Y.-C., Hsiao, A. Y., Allen, S. G., Torisawa, Y., Ho, M., & Takayama, S. (2011). High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *The Analyst*, *136*(3), 473–478. https://doi.org/10.1039/c0an00609b

Uddin, M. S., Sufian, M. A., Hossain, M. F., Kabir, M. T., Islam, M. T., Rahman, M. M., & Rafe, M. R. (2017). Neuropsychological effects of caffeine: Is caffeine addictive? Journal of Psychology & Psychotherapy, 7(2), Article 295. https://doi.org/10.4172/2161-0487.1000295

Ulloa, M., Macías, F., Clapp, C., Martínez de la Escalera, G., & Arnold, E. (2024). Prolactin is an Endogenous Antioxidant Factor in Astrocytes That Limits Oxidative Stress-Induced Astrocytic Cell Death via the STAT3/NRF2 Signaling Pathway. *Neurochemical Research*, *49*(7), 1879–1901. https://doi.org/10.1007/s11064-024-04147-3

Ungrin, M. D., Joshi, C., Nica, A., Bauwens, C., & Zandstra, P. W. (2008). Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates. *PloS One*, *3*(2), e1565. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001565

Urbán, N., & Guillemot, F. (2014). Neurogenesis in the embryonic and adult brain: Same regulators, different roles. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*, 396. https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00396

Urzì, O., Gasparro, R., Costanzo, E., De Luca, A., Giavaresi, G., Fontana, S., & Alessandro, R. (2023). Three-Dimensional Cell Cultures: The Bridge between In Vitro and In Vivo Models. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(15), 12046. https://doi.org/10.3390/ijms241512046

Uyanga, V., Oke, O. E., Amevor, F., Zhao, J., Wang, X., Jiao, H., Onagbesan, O. M., & Lin, H. (2022). Functional roles of taurine, L-theanine, L-citrulline, and betaine during heat stress in poultry. Journal of Animal Science and Biotechnology, 13. https://doi.org/10.1186/s40104-022-00675-6

Vassal, M., Cruz, A. C., Rebelo, S., & Martins, F. (2026). Neurons in a Dish: A Review of In Vitro Cell Models for Studying Neurogenesis. *Journal of Neurochemistry*, *170*(1), e70344. https://doi.org/10.1111/jnc.70344

Vercammen, K. A., Koma, J. W., & Bleich, S. N. (2019). Trends in Energy Drink Consumption Among U.S. Adolescents and Adults, 2003-2016. *American Journal of Preventive Medicine*, *56*(6), 827–833. https://doi.org/10.1016/j.amepre.2018.12.007

Verkhratsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiological Reviews*, *98*(1), 239–389. https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016

Visram, S., Cheetham, M., Riby, D. M., Crossley, S. J., & Lake, A. A. (2016). Consumption of energy drinks by children and young people: A rapid review examining evidence of physical effects and consumer attitudes. *BMJ Open*, *6*(10), e010380. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-010380

Vo, P. H., Nguyen, S. T., Do, N. M., Truong, K. D., & Pham, P. V. (2020). Sodium citrate inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Biomedical Research and Therapy*, *7*(3), 3659–3666. https://doi.org/10.15419/bmrat.v7i3.592

Voloshin, N., Tyurin-Kuzmin, P., Karagyaur, M., Akopyan, Z., & Kulebyakin, K. (2023). Practical Use of Immortalized Cells in Medicine: Current Advances and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(16), 12716. https://doi.org/10.3390/ijms241612716

Wassef, B., Kohansieh, M., & Makaryus, A. N. (2017). Effects of energy drinks on the cardiovascular system. *World Journal of Cardiology*, 9(11), 796–806. https://doi.org/10.4330/wjc.v9.i11.796

Willson, C. (2018). The clinical toxicology of caffeine: A review and case study. *Toxicology Reports*, *5*, 1140–1152. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.11.002

World Health Organization. (2023). Restricting caffeine intake during pregnancy. https://www.who.int/tools/elena/interventions/caffeine-pregnancy

Woehrling, E. K., Hill, E. J., & Coleman, M. D. (2007). Development of a neurotoxicity test-system, using human post-mitotic, astrocytic and neuronal cell lines in co-culture. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, *21*(7), 1241–1246. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.04.011

Wu, D., & Cederbaum, A. I. (2003). Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. *Alcohol Research & Health*, *27*(4), 277–284.

Wu, H., Zhao, J., Fu, B., Yin, S., Song, C., Zhang, J., Zhao, S., & Zhang, Y. (2017). Retinoic acid-induced upregulation of miR-219 promotes the differentiation of embryonic stem cells into neural cells. *Cell Death & Disease*, *8*(7), e2953. https://doi.org/10.1038/cddis.2017.336

Wu, Y., Jia, C., Liu, W., Zhan, W., Chen, Y., Lu, J., Bao, Y., Wang, S., Yu, C., Zheng, L., Sun, L., & Song, Z. (2024). Sodium citrate targeting Ca2+/CAMKK2 pathway exhibits anti-tumor activity through inducing apoptosis and ferroptosis in ovarian cancer. *Journal of Advanced Research*, *65*, 89–104. https://doi.org/10.1016/j.jare.2024.04.033

Xu, L., Lui, F., Luo, H., & Diosady, L. L. (2003). Production of protein isolates from yellow mustard meals by membrane processes. *Food Research International, 36*(8), 849–856. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00082-6

Yamada, K. M., & Cukierman, E. (2007). Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*, *130*(4), 601–610. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.006

Yang, A., Palmer, A. A., & de Wit, H. (2010). Genetics of caffeine consumption and responses to caffeine. *Psychopharmacology*, *211*(3), 245–257. https://doi.org/10.1007/s00213-010-1900-1

Zakrzewski, P. K., & Boczek, T. (2025). Neuron–Glia Crosstalk in the Regulation of Astrocytic Antioxidative Mechanisms Following CNS Injury. *Antioxidants*, *14*(12), 1415. https://doi.org/10.3390/antiox14121415

Zeidán-Chuliá, F., Gelain, D. P., Kolling, E. A., Rybarczyk-Filho, J. L., Ambrosi, P., Terra, S. R., Pires, A. S., da Rocha, J. B. T., Behr, G. A., & Moreira, J. C. F. (2013). Major components of energy drinks (caffeine, taurine, and guarana) exert cytotoxic effects on human neuronal SH-SY5Y cells by decreasing reactive oxygen species production. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2013*, 791795. https://doi.org/10.1155/2013/791795

Zhang, S., Buttler-Buecher, P., Denecke, B., Arana-Chavez, V. E., & Apel, C. (2018). A comprehensive analysis of human dental pulp cell spheroids in a three-dimensional pellet culture system. *Archives of Oral Biology*, *91*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.02.008

Zhang, X., Huang, C. T., Chen, J., Pankratz, M. T., Xi, J., Li, J., Yang, Y., Lavaute, T. M., Li, X.-J., Ayala, M., Bondarenko, G. I., Du, Z.-W., Jin, Y., Golos, T. G., & Zhang, S.-C. (2010). Pax6 is a human neuroectoderm cell fate determinant. *Cell Stem Cell*, *7*(1), 90–100. https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.017

Zhao, F., Pathi, P., Grayson, W., Xing, Q., Locke, B. R., & Ma, T. (2005). Effects of oxygen transport on 3-d human mesenchymal stem cell metabolic activity in perfusion and static cultures: Experiments and mathematical model. *Biotechnology Progress*, *21*(4), 1269–1280. https://doi.org/10.1021/bp0500664

Zhao, X., & Moore, D. L. (2018). Neural stem cells: Developmental mechanisms and disease modeling. *Cell and Tissue Research*, *371*(1), 1–6. https://doi.org/10.1007/s00441-017-2738-1

Zucconi, S., Volpato, C., Adinolfi, F., Gandini, E., Gentile, E., Loi, A., & Fioriti, L. (2013). Gathering consumption data on specific consumer groups of energy drinks. *EFSA Supporting Publications*, *10*(3), 394E. https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2013.EN-394

Правилник о декларисању, означавању и рекламирању хране. (2017). *Службени гласник РС*, бр. 19/2017, 16/2018, 17/2020, 118/2020, 17/2022, 23/2022, 30/2022, 61/2024 – др. правилник, 21/2026 и 48/2026. https://pravno-informacioni-sistem.rs/eli/rep/sgrs/ministarstva/pravilnik/2017/19/3/reg

Biografija

Jelena Pejić rođena je 13. oktobra 1995. godine u Lazarevcu, Republika Srbija. Osnovno obrazovanje stekla je u OŠ „Diša Đurđević“ u Vreocima, nakon čega je završila Gimnaziju u Lazarevcu kao učenik generacije. Diplomirala je 2018. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na smeru Molekularna biologija i fiziologija, dok je master studije završila 2019. godine na istom fakultetu, na programu Molekularna biologija, modul Imunobiologija. Iste godine upisala je doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na programu Molekularna biologija, modul Molekularna biologija eukariota. Eksperimentalni deo doktorske disertacije realizovala je u Grupi za humanu molekularnu genetiku na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Tokom dosadašnjeg rada bila je angažovana na više nacionalnih i dva međunarodna projekta i u okviru jednog od njih je boravila na naučnom usavršavanju u Solunu, Grčka. Dobitnica je Vidovdanske nagrade za stvaralaštvo mladih, dodeljene 2019. godine u Lazarevcu, kao i nagrade za najbolji naučni poster na Drugom kongresu molekularnih biologa Srbije (CoMBoS2), održanom 2023. godine. U okviru doktorske disertacije objavila je dva naučna rada, a autor je i koautor ukupno četiri naučne publikacije i 16 naučnih saopštenja. Van naučne laboratorije, svoju radoznalost neguje učenjem stranih jezika i otkrivanjem kultura koje se kroz njih upoznaju.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јелена Љ. Пејић

Број индекса М3003/2019

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај кофеина, таурина и етанола, као компоненти енергетских и алкохолних пића, на диференцијацију, морфолошке и функцијске карактеристике неурона и астроцита у модел-систему хумане неурогенезе *in vitro*

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину другихлица.

Потпис аутора

У Београду, _____

_____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Љ. Пејић

Број индекса М3003/2019

Студијски програм Биологија

Наслов рада Утицај кофеина, таурина и етанола, као компоненти енергетских и алкохолних пића, на диференцијацију, морфолошке и функцијске карактеристике неурона и астроцита у модел-систему хумане неурогенезе *in vitro*

Ментори др Марија Мојсин

академик Милена Стевановић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

_____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај кофеина, таурина и етанола, као компоненти енергетских и алкохолних пића, на диференцијацију, морфолошке и функцијске карактеристике неурона и астроцита у модел-систему хумане неурогенезе *in vitro*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

_____

1. **Ауторство**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима**. Дозвољаватеумножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољавакомерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима**. Дозвољавате умножавање, дистрибуцијуи јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.