Interakcije nanočestica srebra i zlata različitih veličina, oblika i površinskih struktura s proteinima različitoga glikozilacijskoga statusa

Barbir, Rinea

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:421934

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko – biokemijski fakultet

Rinea Barbir

INTERAKCIJE NANOČESTICA SREBRA I ZLATA RAZLIČITIH VELIČINA, OBLIKA I POVRŠINSKIH STRUKTURA S PROTEINIMA RAZLIČITOGA GLIKOZILACIJSKOGA STATUSA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko – biokemijski fakultet

Rinea Barbir

INTERAKCIJE NANOČESTICA SREBRA I ZLATA RAZLIČITIH VELIČINA, OBLIKA I POVRŠINSKIH STRUKTURA S PROTEINIMA RAZLIČITOGA GLIKOZILACIJSKOGA STATUSA

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Dr. sc. Ivana Vinković Vrček, znanstvena savjetnica

Izv. prof. dr. sc. Sanja Dabelić

Zagreb, 2021



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Rinea Barbir

INTERACTIONS BETWEEN SILVER AND GOLD NANOPARTICLES OF DIFFERENT SIZES, SHAPES AND SURFACE STRUCTURES WITH PROTEINS OF DIFFERENT GLYCOSYLATION STATUS

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Ivana Vinković Vrček, Scientific Advisor, PhD

Associate Professor Sanja Dabelić, PhD

Zagreb, 2021.

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

Rad je izrađen pod mentorstvom dr. sc. Ivane Vinković Vrček na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada i izv. prof. dr. sc. Sanje Dabelić, u sklopu poslijediplomskog doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Idejni koncept rada i eksperimentalni troškovi pokriveni su znanstvenim projektom HRZZ-IP-2016-06-2436 “Značaj interakcija metalnih nanočestica sa sumpornim biomolekulama za nano-bio sučelje - NanoFaceS” voditeljice dr. sc. Ivane Vinković Vrček kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost.

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Ivani Vinković Vrček na nesebičnoj pomoći, razumijevanju i podršci tijekom izrade doktorskog rada. Hvala na ukazanoj prilici i usmjeravanju u znanstveno-istraživački rad.

Veliko hvala komentorici izv. prof. dr. sc. Sanji Dabelić na svim vrijednim savjetima i pomoći u izvođenju pokusa elektroforeze i pisanju doktorskog rada.

Hvala dr. sc. Ivanu Pavičiću, dr. sc. Ani Mariji Marjanović Čermak i svim ostalim djelatnicima IMI-ja na korisnim savjetima i prenesenom znanju.

Zahvaljujem svim suradnicima iz Laboratorija za biokoloide i površinsku kemiju s IRB-a, na pomoći pri izvođenju pokusa cirkularnog dikroizma i karakterizaciji nanomaterijala.

Zahvaljujem Rafaelu Ramírezu Jiménezu, Rafaelu Martínu i Jesus M de la Fuenteu s Instituta za znanost o materijalima iz Zaragoze na prenesenom znanju i pomoći u sintezi nanomaterijala.

Hvala mojim kolegama i prijateljima Barbari, Kruni, Nikolini, Luciji i Emeriku (poznatiji kao Gost 19) na podršci i pomoći. Hvala što ste mi smijehom uljepšavali svaki dan.

Mojoj obitelji i prijateljima na podršci i strpljenju tijekom cijelog života, a posebno zadnjih godina.

SAŽETAK

Za biomedicinsku primjenu nanočestica (NP) nužno je poznavati mehanizam njihove interakcije s biološkim sustavima. Ovaj rad istražuje interakcije NP s proteinima koje dovode do stvaranja proteinskog sloja na površini NP tzv. proteinska korona, što znatno utječe i na svojstva NP i na biološki sustav. U dosadašnjim istraživanjima nano-bio interakcija zanemarena je uloga glikana, koji su prisutni u strukturi većine proteina. Cilj istraživanja bio je utvrditi kako veličina, oblik te površinska struktura NP srebra i zlata utječu na prirodu i mehanizam njihove interakcije s proteinima različitoga glikozilacijskoga statusa korištenjem modela glikoziliranog transferina (glikoTRF) iz humanog seruma i neglikoziliranog rekombinantnog humanog transferina (ne-glikoTRF). Istražen je utjecaj fizikalno-kemijskih svojstava NP na jakost vezanja s proteinima, promjene sekundarnih struktura proteina te sastav proteinske korone. Istraživanje je provedeno i na goveđem serumskom albuminu (BSA) kako bi se dobiveni rezultati mogli usporediti s drugim istraživanjima koja uglavnom koriste BSA model. Ionska jakosti i pH biološkog medija značajno su utjecali na koloidnu stabilnost NP, dok je stvaranje proteinske korone stabiliziralo NP. Utvrđeno je da su jakost vezanja proteina na NP i promjene sekundarne proteinske strukture ovisni ne samo o veličini, obliku i površinskoj funkcionalizaciji NP, nego i o prisutnosti glikana na proteinima. Struktura β-ploča značajnije se promijenila vezanjem ne-glikoTRF na NP manje specifične površine, što nije primijećeno za glikoTRF. Fizikalno-kemijska svojstva NP te glikozilacija proteina utjecali su i na sastav i koncentraciju proteinske korone na površini NP. Dobiveni rezultati ističu važnost glikozilacije proteina za nano-bio interakcije, što zajedno s potvrđenom ulogom fizikalno-kemijskih svojstava NP na te interakcije, pridonosi razumijevanju učinka NP na biološke sustave te se može koristiti u razvoju novih dijagnostičkih, prognostičkih i terapijskih nanoalata.

Ključne riječi: nanočestice srebra, nanočestice zlata, transferin, glikozilacija, proteinska korona

SUMMARY

Background and aim: Possible application of metal nanoparticles (NPs) in medicine has been challenged by numerous factors, especially regarding their biocompatibility, efficacy, and safety. Exposure of NPs to a biological medium results in their direct interaction with biological macromolecules and leads to the formation of a dynamic biomolecular layer known as the biomolecular corona. This causes the loss of so called "synthetic identity" and a new "biological identity" of NPs is created, affecting further biological response to NPs. Formation of this complex induces not only the changes in physicochemical properties of NPs, but also structural changes in proteins and possible loss of protein function. Therefore, investigating the influence of physicochemical properties of NPs on protein corona formation is important for the health risk assessment of NPs. Despite extensive research on nano-bio interactions, the role of protein glycosylation in the formation and characteristics of such nano-bio complexes is almost completely unknown. As glycans are present on the surface of most human proteins, the effect of glycosylation needs to be considered when investigating interactions of NPs with proteins.

The aim of the study was to determine how the size, shape and surface structure of silver (AgNPs) and gold (AuNPs) nanoparticles affect the nature and mechanism of their interaction with proteins of different glycosylation status. For this purpose, the model system consisted of five types of AgNPs and nine types of AuNPs of different sizes, shapes, and surface structures. The effect of glycosylation was examined on a transferrin model using glycosylated transferrin (glycoTRF) isolated from human serum and non-glycosylated recombinant human transferrin (non-glycoTRF). The study also included bovine serum albumin (BSA), one of the most studied proteins in the context of nano-bio interactions, enabling obtained results to be compared with existing scientific data.

Methods: Characterization of newly synthesized NPs included determination of size, size distribution, shape, zeta potential, and optical properties. Stability evaluation of selected NPs was performed in different model solutions by changing the pH value, ionic strength, and the presence of proteins. The following model systems were used: ultrapure water, artificial lysosomal fluid (ALF), artificial gastric fluid (AGF), and commercial cellular media (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM). Stability assessment included monitoring of

the changes in size, size distribution, zeta potential and dissolution behaviour during a set time period. These parameters were examined by transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS), electrophoretic light scattering (ELS) and spectroscopic method (UV-Vis). Release of free ions from a nanosurface over 24 hours was determined using ultrafiltration in combination with atomic absorption spectroscopy for quantification of metal ions. Prior to performing experiments with glycoTRF and non-glycoTRF, glycosylation profiles of commercially obtained glycoTRFs were determined using ultra performance liquid chromatography. Interactions between AgNPs and AuNPs with model proteins were investigated using fluorescence spectroscopy, circular dichroism (CD), DLS and ELS methods. Results were presented as logarithmic values of binding constants ($\log K_b$) and changes in size, size distribution, zeta potential and secondary protein structures. Analysis of protein corona composition was performed using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and bicinchoninic acid (BCA) assay.

Data obtained for primary size, zeta potential, binding strengths and changes in secondary protein structures were statistically analyzed using Pearson correlation. Only *p* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results: After synthesizing NPs of certain physicochemical properties and their characterization, the stability of chosen NPs in different model media was evaluated. Tested NPs were more stable in ultrapure water compared to media of higher ionic strengths, such as ALF and AGF, in which destabilization, agglomeration and dissolution of NPs occurred. Aggregation and dissolution of NPs in DMEM was prevented by the presence of BSA due to formation of a protein corona on the nanosurface. Binding of proteins on the surface of NPs caused changes in their physicochemical properties, whereby zeta potential of NPs changed toward more positive values. Protein binding led to an increase or decrease in hydrodynamic diameter depending on the type of NPs and protein.

The binding strength between proteins and NPs depended both on the physicochemical properties of NPs and on the type of protein. $\log K_b$ values differed for different proteins and were dependent on protein glycosylation status. Binding strength increased between non-glycoTRF and AgNPs stabilized with poly(vinylpyrrolidone) (PVP) with increase in AgNPs' size, while the binding of glycoTRF was not size-dependent. Additionally, binding strength for both TRFs decreased with increasing size of spherical AuNPs stabilized with citrate (CIT). Polyethylene glycol (PEG) stabilized AgNPs showed the lowest affinity for all three proteins compared to the other tested NPs. This can be explained by PEG coating which caused

electrostatic repulsion with proteins. Interaction of glycoTRF with negatively charged CIT-stabilized AuNPs was weaker compared to non-glycoTRF and BSA. Obtained results indicated a great contribution of electrostatic forces on NPs-protein interactions. Negative charge on the surface of glycoTRF, which arises from sialic acid, can cause electrostatic repulsion with negatively charged CIT, which ultimately resulted in lower binding affinity between these NPs and glycoTRF. Moreover, the shape of NPs also affected the interaction of NPs and proteins. Binding strength between proteins and rod shaped PEGAuNRs was the lowest compared to spherical and prismatic PEG-stabilized AuNPs.

Changes in the secondary structures of proteins due to their interactions with NPs depended on the shape and surface structure of NPs as well as on the glycosylation status of the protein. The most significant changes occurred after protein interaction with large CIT-stabilized AuNPs compared to other tested NPs. The smallest change was observed after their interaction with PEG-stabilized spherical AuNPs, while PEGAuNRs caused highest changes in secondary protein structure compared to spherical and prismatic PEG-stabilized AuNPs.

Statistical analysis revealed negative correlation between zeta potential of NPs and logK_b values for the interaction of glycoTRF and NPs. Positive correlation was observed between changes in α-helix structures of glycoTRF and logK_b values for the interaction of glycoTRF and NPs, which means that higher binding affinity led to more significant changes in the structure of glycoTRF. Additionally, negative correlation was found between the specific surface area (*SSA*) values of NPs and changes of β-sheets in the non-glycoTRF structure, which was not observed in the case of glycoTRF. A positive correlation was found between changes in α-helix and β-sheets structures in BSA and non-glycoTRF due to interaction with the same type of NPs, which confirmed the similar behaviour of non-glycosylated proteins.

The concentration of protein corona on the surface of NPs depended on NP surface structure, shape, and glycosylation status of proteins. The highest total protein concentration was measured on the surface of large PVP-stabilized AgNPs, and the lowest on the surface of spherical PEG-stabilized AuNPs after their incubation with the protein mixture. This low concentration agreed well with results obtained for logK_b values, as explained previously. Additionally, the highest protein concentration was measured on the AuNRs surface compared to spherical and prismatic AuNPrs. Such results can be explained by their cylindrical or two-dimensional structure, which can contribute to higher protein density. Namely, it is possible that on the curved cylindrical surface of rod-shaped AuNRs, PEG molecules have more space to "spread", which reduces electrostatic repulsions and favours protein adsorption. The

concentration of glycoTRF was lower on the surface of all CIT-stabilized AuNPs compared to non-glycoTRF, which was in agreement with results obtained for logK_b values and changes in secondary protein structures. This additionally confirmed the important role of glycans for the interactions between NPs and proteins.

Correspondingly, the proportions of glycoTRF and non-glycoTRF were different in the protein corona of individual NPs after incubation with mixture of BSA, glycoTRF and non-glycoTRF. The amount of glycoTRF increased, whereas amount of non-glycoTRF decreased with size in the corona of PVP-stabilized AgNPs. The opposite trend was observed for CIT-stabilized AuNPs. The proportion of both transferrins on the surface of large CIT-stabilized AuNPs was the lowest when the results were compared with the other types of NPs. Such results were expected since the changes in the secondary protein structure were the highest for both glycoTRF and non-glycoTRF after interaction with this type of NPs, suggesting that both transferrins must undergo a significant conformational change in order to bind to the NPs surface. When observing the influence of NPs shape, the proportion of glycoTRF increased on the surface of the prismatic NPs compared to the rods which was consistent with the logK_b values obtained. Nonetheless, proportion of non-glycoTRF was highest on spherical AuNPs.

Conclusion: The observed differences between binding strengths, changes in secondary protein structures and protein corona composition after binding of glycoTRF and non-glycoTRF to different NPs emphasize the importance of protein glycosylation and physicochemical properties of NPs on protein corona formation. Thus, this study contributes to a better understanding of the mechanisms of NPs-proteins interactions.

Key words: silver nanoparticles, gold nanoparticles, transferrin, glycosylation, protein corona

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. Glikozilacija proteina 1
1.2. Nanomaterijali i nanočestice 4
1.2.1. Metode priprave nanočestica 4
1.3. Nanočestice srebra i zlata u nanomedicini 6
1.4. Interakcije metalnih nanočestica u biološkim sustavima i nastajanje proteinske korone 7
1.5. Modelni proteini u istraživanju proteinske korone 10
2. OBRAZLOŽENJE TEME 15
3. MATERIJALI I METODE 17
3.1. Materijali korišteni za sintezu nanočestica 17
3.2. Materijali korišteni za ispitivanje stabilnosti nanočestica 17
3.3. Materijali korišteni za ispitivanje interakcija nanočestica i proteina 18
3.4. Sinteza nanočestica srebra i zlata 19
3.4.1. Postupci priprave sferičnih nanočestica srebra veličine 10 nm 21
3.4.2. Postupci priprave sferičnih nanočestica srebra veličine 50 nm 21
3.4.3. Postupci priprave sferičnih nanočestica zlata 22
3.5. Karakterizacija nanočestica 22
3.5.1. Određivanje hidrodinamičkog promjera, raspodjele veličina, zeta potencijala, primarnog promjera i optičkih svojstava nanočestica 23
3.5.2. Mjerenje koncentracije metala u suspenzijama nanočestica 25
3.6. Određivanje koncentracije i specifične površine nanočestica 26
3.7. Ispitivanje stabilnosti nanočestica u biološkim medijima 27
3.8. Ispitivanje interakcija nanočestica i proteina 28
3.9. Ispitivanje stvaranja proteinske korone 33
3.9.1. Priprema uzoraka za analizu 33
3.9.2. Postupak pripreme gela i provođenje elektroforeze 35
3.9.3. Ekstrakcija proteina iz gela 36
3.9.4. Određivanje koncentracije proteina bicinkoničnom kiselinom 36
3.10. Statistička obrada rezultata 37
4. REZULTATI I RASPRAVA 38
4.1. Karakterizacija sintetiziranih nanočestica 38

4.2. Određivanje stabilnosti odabranih nanočestica u biološkim medijima 47
4.3. Interakcije nanočestica i proteina 54
4.3.1. Glikanski profil transferina izoliranog iz humanog seruma 54
4.3.2. Promjene hidrodinamičkog promjera i zeta potencijala nanočestica nakon interakcije s proteinima 56
4.3.3. Konstante vezanja proteina nakon njihove interakcije s nanočesticama 59
4.3.4. Analiza promjena sekundarnih struktura proteina nakon interakcije s nanočesticama 69
4.3.5. Statistička analiza podataka dobivenih ispitivanjima interakcija nanočestica i proteina 76
4.4. Analiza proteinske korone nanočestica 85
5. ZAKLJUČCI 92
6. POPIS LITERATURE 93
7. DODATNI PRIKAZI REZULTATA 111
8. POPIS KRATICA 115
9. ŽIVOTOPIS 117
10. PRILOG 120
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 121
BASIC DOCUMENTATION CARD 122

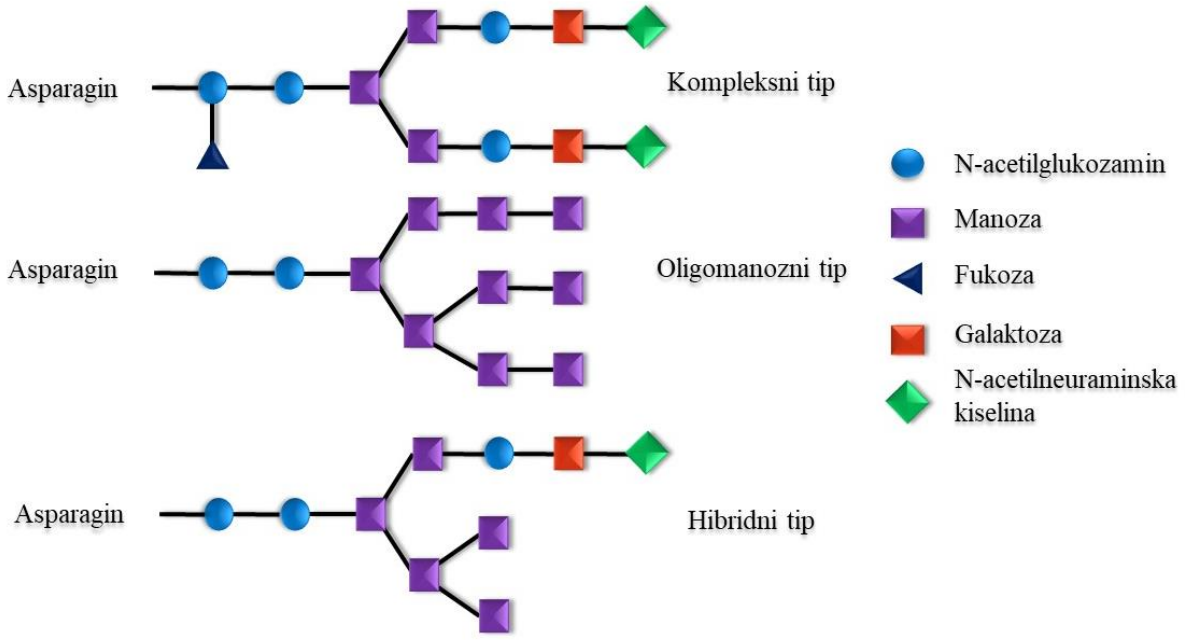
1. UVOD

1.1. Glikozilacija proteina

Glikozilacija je proces enzimatskog pripajanja ugljikohidrata (glikana), ne-ugljikohidratnom dijelu molekule, odnosno aglikonu (proteinu ili lipidu). Glikozilacija proteina je jedna od najčešćih posttranslacijskih modifikacija proteina, koja uvelike pridonosi konačnoj raznolikosti proteina. Repertoar monosaharida u glikoproteinima relativno je ograničen (čini ga desetak monosaharida), no konačni produkt glikozilacije ovisi ne samo o broju različitih monosaharida i njihovom slijedu povezivanja, već i o položaju glikozidne veze, anomernoj konfiguraciji glikozidne veze, kao i broju i položaju mjesta granjanja (1,2). Na proteinski dio molekule glikani su najčešće vezani N- ili O-glikozidnom vezom. U N-vezanim oligosaharidima N-acetilglukozamin na reducirajućem kraju lanca povezan je s asparaginom unutar slijeda Asn-X-Ser/Thr proteina preko ugljika na položaju C1, a O-glikozidna veza nastaje između položaja C1 reducirajućeg kraja monosaharida ili oligosaharida i hidroksiaminokiseline, serina ili treonina (3).

Glikani vezani na proteine N-glikozidnom vezom mogu se obzirom na svoju strukturu podijeliti u tri tipa (oligomanozni, kompleksni i hibridni tip, Slika 1) (4). Oni sadrže zajedničku osnovu srž (engl. *core*) koju čine dva N-acetilglukozamina i tri manoze, a razlikuju se u strukturi daljnjih ugljikohidrata. O-vezani glikani još su raznovrsnije strukture i mogu imati nekoliko vrsta srži. N-glikozilacija započinje kotranslacijski u endoplazmatskom retikulu (ER), prebacivanjem velike oligosaharidne strukture s lipidnog nosača dolikola na asparagin, a nastavlja se u ER pripajanjem pojedinih ugljikohidratnih struktura i kidanjem drugih, a potom i u Golgijevom aparatu (3,5). O-glikozilacija se odvija u Golgijevom aparatu (osim dodavanja prvog monosaharida što se odvija u ER), posttranslacijski, isključivo dodavanjem (ne i oduzimanjem) monosaharida (6).

Obzirom da za glikozilaciju proteina ne postoji „kalup“ kojim se određuje konačna struktura, kao što je primarna struktura proteina zapisana u „kalupu“ DNA, struktura glikana ovisi o ekspresiji enzima koji sudjeluju u glikozilaciji, specifičnosti supstrata kao i o dostupnosti preteča za sintezu glikana. Sveukupno gledajući, u proces glikozilacije uključen je veliki broj (nekoliko stotina) različitih enzima, koji dodaju pojedine ugljikohidratne jedinice (glikoziltransferaze) ili ih kidaju (glikozidaze) (7).



Slika 1. Osnovne vrste N-glikana: oligomanozni, kompleksni i hibridni tip. Preuzeto i prilagođeno prema Varki A i sur. (4).

Obzirom na navedeno, ne začuđuje činjenica da pojedini glikozilirani protein može u organizmu postojati kao smjesa različito glikoziliranih oblika istog proteina, koje nazivamo glikoforme (1). Glikoforme međusobno, a posebice u odnosu na sam polipeptidni dio glikoproteina, mogu imati drukčija fizikalna, kemijska, a posljedično i biološka svojstva. Glikanski dio molekule utječe na veličinu i naboj glikoproteina, topljivost, viskoznost, konformaciju i sklonost denaturaciji. Utječe također i na sposobnost interakcije s drugim molekulama, posebice receptorima glikoproteina koje nazivamo lektinima, a upravo se ostvarivanjem interakcija s drugim molekulama ispoljavaju biološki učinci glikoproteina. Interakcije glikoproteina i lektina temelje se na različitim vrstama ne-kovalentnih veza (mahom je riječ o vodikovim vezama), koje su malih jakosti ali su brojne (8).

Spomenute interakcije ključne su za raznovrsne procese u organizmu, ali i između različitih organizama. Virusi i bakterije stvaraju interakcije sa stanicama domaćina upravo putem interakcija između glikana i njihovih receptora, a unutar pojedinog organizma, glikani su uključeni u brojne procese – primjerice smatanje (engl. *folding*) proteina, usmjeravanje pojedinih enzima u određene stanične organele, usmjeravanje stanica u pojedina tkiva, modulaciju imunog odgovora i staničnu signalizaciju (1,2). Važnost glikanskog dijela

molekule za potpunu funkcionalnost glikoproteina vidljiva je i iz činjenice da mnogi rekombinantno proizvedeni neglikozilirani proteini, nakon apliciranja u organizam u svrhu terapije, nisu jednako učinkoviti kao njihovi glikozilirani oblici. Tako je primjerice utvrđeno da je polipeptidni dio eritropoetina, hormona koji inače sadrži 3 N-vezana i jedan O-vezani glikan, u potpunosti odgovoran za poticanje proizvodnje eritrocita u koštanoj srži, no rekombinantno proizvedeni neglikozilirani eritropoetin nakon aplikacije u ljudski organizam pokazuje značajno manju učinkovitost. Razlog je tome njegov iznimno brz klirens iz organizma, pa neglikozilirani polipeptid uopće nema priliku potaknuti proizvodnju eritrocita, za razliku od njegove glikozilirane forme koja se u organizmu usmjerava na ciljno mjesto na kojem može obaviti svoju zadaću (9).

Metabolički poremećaji uzrokovani mutacijama u genima za glikozilacijske enzime poznati su pod nazivom kongenitalni poremećaji glikozilacije (engl. *congenital disorders of glycosylation*, CDGs), obuhvaćaju više od 150 različitih bolesti čija klinička slika varira od blage do po život opasne, i pripadaju skupini rijetkih bolesti, koje su uz to često i pogrešno dijagnosticirane. Za dijagnostiku pojedinih tipova CDGs koristi se i analiza glikanskog profila transferina primjenom metoda masene spektrometrije, izoelektičnog fokusiranja (IEF) i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (10,11), kojima se utvrđuje međusoban omjer asijaliniziranog, mono-, di-, tri, tetra- i pentasijaliziranog oblika tranferina. No, promjene glikanskog profila pojedinih glikoproteina ili smjesa različitih glikoproteina (primjerice serumskih glikoproteina) uočene su i u drugim, puno češćim patološkim stanjima, kao što su akutni pankreatitis, reumatoidni artritis, šećerna bolesti tipa 2 i različite vrste tumora (12–16). Za mnoge utvrđene promjene još nije poznato pridonose li takve promjene glikanskog profila nastanku, razvoju i tijeku bolesti ili su posljedica te bolesti, ili oboje. Stoga određivanje glikanskog profila i za te bolesti ima velik dijagnostički i prognostički potencijal, a modifikacija glikanskog dijela ili primjena nekih glikanski pripravaka vjerojatno i terapijski potencijal.

1.2. Nanomaterijali i nanočestice

Nanomaterijali (engl. *nanomaterials*, NM) se prema definiciji Europske komisije definiraju kao prirodno, slučajno ili umjetno proizvedeni materijali koji sadrži čestice, u nevezanom, agregiranom ili aglomeriranom stanju, a 50% ili više tih čestica ima jednu ili više dimenzija u rasponu od 1 do 100 nm (17). Klasifikacija NM se temelji na dimenzionalnosti, porijeklu i sastavu (18).

Nanotehnologija je danas postala vrlo značajno područje istraživanja, koje se brzo razvija i širi zahvaljujući odličnim svojstvima i velikoj funkcionalnosti NM. Smanjenjem veličine materijala na nano razinu dolazi do značajne promjene njihovih osnovnih svojstava. Takve promjene mogu dovesti do poboljšanja topljivosti, promjene boje materijala te učiniti provodljivima materijale koji su prije bili električni izolatori. Njihova posebna optička, električna i kemijska svojstva, koja se razlikuju od svojstava materijala na makroskopskoj razini (engl. *bulk*) dovela su do sve veće primjene NM (19).

Ukoliko su sve tri dimenzije NM u rasponu od 1 nm do 100 nm, govorimo o nanočesticama (engl. *nanoparticle*s, NP) (20). Karakteristična fizikalna, kemijska i biološka svojstva proizlaze iz njihovih malih dimenzija te ih čine pogodnima za širok raspon primjena (21,22). Osnovna svojstva uključuju veliki omjer površine u odnosu na volumen, kemijsku reaktivnost i mehaničku čvrstoću, a ovise o vrsti, veličini i strukturi NP. Primjenom različitih metoda priprave moguće je dobiti NP točno određenih svojstava. Sintetizirane NP mogu biti različitog oblika, veličine i strukture (23,24).

Klasifikacija NP na temelju kemijskog sastava dijeli ih na (24):

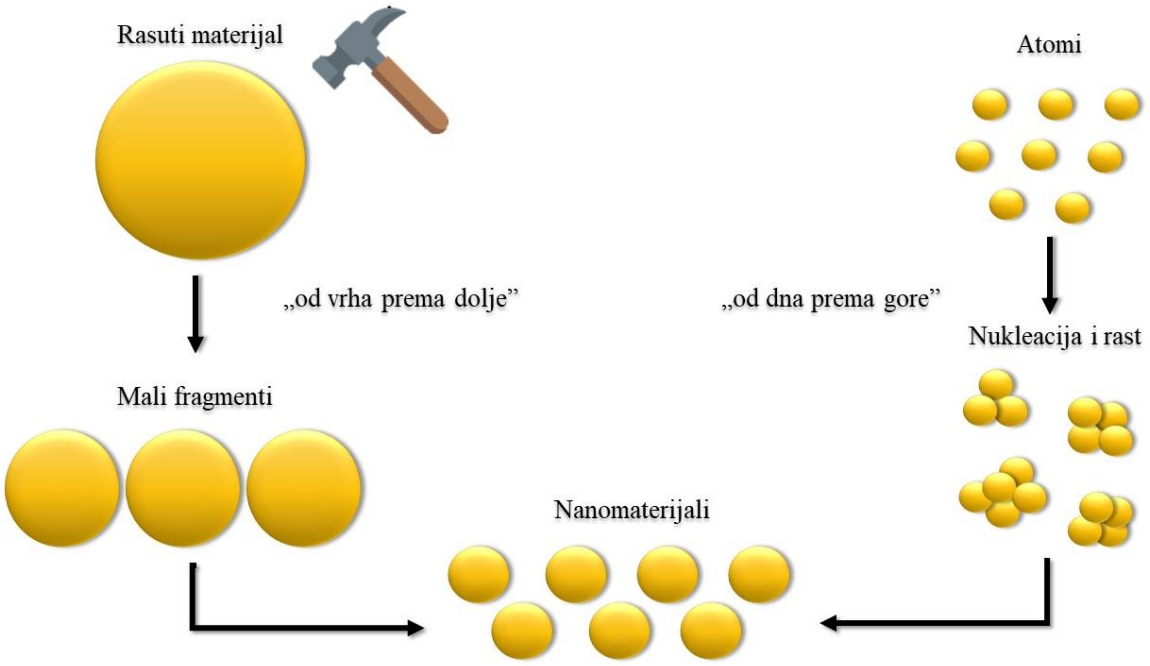
a) organske – dendrimeri, liposomi, micele,
b) anorganske - NP metala i metalnih oksida,
c) ugljikove – fuleren, grafit, nanocjevčice, nanovlakna.

1.2.1. Metode priprave nanočestica

Sintetski postupci priprave NP temelje se na dva osnovna pristupa: „od vrha prema dolje“ i „od dna prema gore“ (Slika 2). Temeljna razlika između ova dva načina priprave je u početnom materijalu. Kod pristupa od vrha prema dolje početni materijal je rasuti materijal koji se korištenjem različitih fizikalnih, kemijskih i mehaničkih metoda smanjuje do veličine

NP (12). Najčešće se koriste mehanički postupci, laserska ablacija te toplinska i litografska metoda (12,13).

Pristup od „dna prema gore“ temelji se na stvaranju NP iz prekursora koji mogu biti atomi, ioni ili molekule. Osnovne metode uključuju metode s plinovitom, čvrstom i tekućom fazom te biološke metode (12). Glavna je prednost ovog pristupa što omogućuje sintezu NP specifičnih fizikalno-kemijskih svojstava, što se postiže manipuliranjem na razini nukleacije i rasta (13). Sinteza NP u tekućoj fazi uključuje upotrebu tri ključne komponente: ionskog prekursora, redukcijskog sredstva (ili energije za pokretanje procesa razgradnje ili redukcije) i sredstva za stabiliziranje novo sintetiziranih NP. Kao prekursori se koriste anorganske soli (kloridi, nitrati) ili hlapljivi organski spojevi (acetati) (14).



Slika 2. Dva osnovna sintetska pristupa priprave NP: „od vrha prema dolje“ i „od dna prema gore“. Preuzeto i prilagođeno prema Lu H i sur. (25).

Sinteza NP metala najčešće se temelji na procesu redukcije odgovarajućeg metalnog kationa. Poznavanje mehanizma reakcije omogućava odabir odgovarajućih parametara (temperature, koncentracijskog omjera, pH vrijednosti) te kontrolu nad procesom sinteze (26,27). Redukcijom metalnog kationa nastaju atomi metala, čija se koncentracija postupno povećava te dolazi do nukleacije pri čemu nastaju jezgre, koje dalje rastu u stabilne NP (28).

Upotreba površinskih omotača presudna je za kontrolu veličine i oblika te osigurava stabilnost sintetiziranih NP. Mijenjanjem koncentracijskog omjera površinskih omotača i anorganske soli, dobivaju se NP različitih oblika i veličina, pri čemu je molarna koncentracija omotača uobičajeno veća od soli. Omotači mogu biti površinski aktivne tvari te različiti ligandi i polimeri koji sadrže funkcionalne skupine, kao što su sulfhidrilna, karboksilna ili amino skupina (29). Odabir vrste omotača bitan je jer utječe na fizikalno-kemijska svojstva nanočestica, posebno u pogledu njihove hidrofilnosti, odnosno hidrofobnosti, što dalje mijenja ponašanje NP u mediju u kojem su dispergirane (30). Optimizacijom sintetskih uvjeta moguće je dobiti NP točno određenih fizikalno-kemijskih svojstava, koje mogu imati široki spektar primjena (31–33).

1.3. Nanočestice srebra i zlata u nanomedicini

Grana medicine koja uključuje primjenu nanotehnologije u liječenju bolesti, dijagnozi, praćenju i kontroli terapijskih procesa nazvana je „nanomedicinom“. Nanomedicina obuhvaća veliko područje istraživanja koje između ostalog uključuje i NP, koje se primjenjuju kao biosenzori te u ciljanoj isporuci lijekova i dijagnostici (34,35). Prednosti primjene NP u medicini su jednostavna manipulacija njihovom veličinom i površinskim karakteristikama, mogućnost vezanja velikog broja molekula lijeka na njihovu površinu, transport lijekova na ciljano mjesto u organizmu i kontrolu otpuštanja lijekova. Usprkos brojnim prednostima, primjena NP može biti ograničena zbog njihove moguće agregacije, visoke reaktivnosti u staničnom okruženju te naglog otpuštanja lijeka, zbog čega je potrebno detaljno ispitati njihova svojstva i ponašanje prije kliničke upotrebe (36–38).

Uporaba NP srebra (AgNP) u medicini prvenstveno se temelji na njihovim antimikrobnim svojstvima koja su posljedica otpuštanja iona srebra u različitim biološkim medijima. Zbog toga se koriste u medicini kao antimikrobni premazi na oblozima za rane te za zaštitu površina medicinskih pomagala kao što su kateteri (39,40). Njihova mala veličina povećava njihovu specifičnu aktivnu površinu, kao i njihov potencijal prodiranja do ciljnog mjesta djelovanja (41). Međutim, upravo mala veličina može doprinijeti ulasku u krvožilni sustav, zbog čega je potrebno uzeti u obzir mogućnost interakcije NP s biomolekulama.

Nadalje, NP zlata (AuNP) posjeduju posebna svojstva koja uključuju biokompatibilnost, stabilnost i jednostavno površinsko moduliranje. Takva svojstva temelj su

njihove potencijalne primjene u nanomedicini, posebice u ciljanoj isporuci lijekova i fototermalnoj terapiji (42). Posebno fizikalno svojstvo AuNP je površinska plazmonska rezonancija (engl. *surface plasmon resonance* – SPR), koja omogućava primjenu AuNP u razvoju biosenzora koji se mogu imobilizirati sa specifičnim biomolekulama, kao što su protutijela te omogućiti osjetljivu detekciju antigena i biomarkera (43). SPR je fenomen koji se događa kada frekvencija titranja slobodnih elektrona na površini NP rezonira s frekvencijom dolaznog elektromagnetskog zračenja. Posebno se istražuje modifikacija površine AuNP s različitim glikanskim strukturama, pri čemu nastaju glikonanočestice koje su do sada pokazale potencijal primjene u dijagnostici Alzheimerove bolesti, karcinoma i dijagnostici bakterijskih infekcija (44–46).

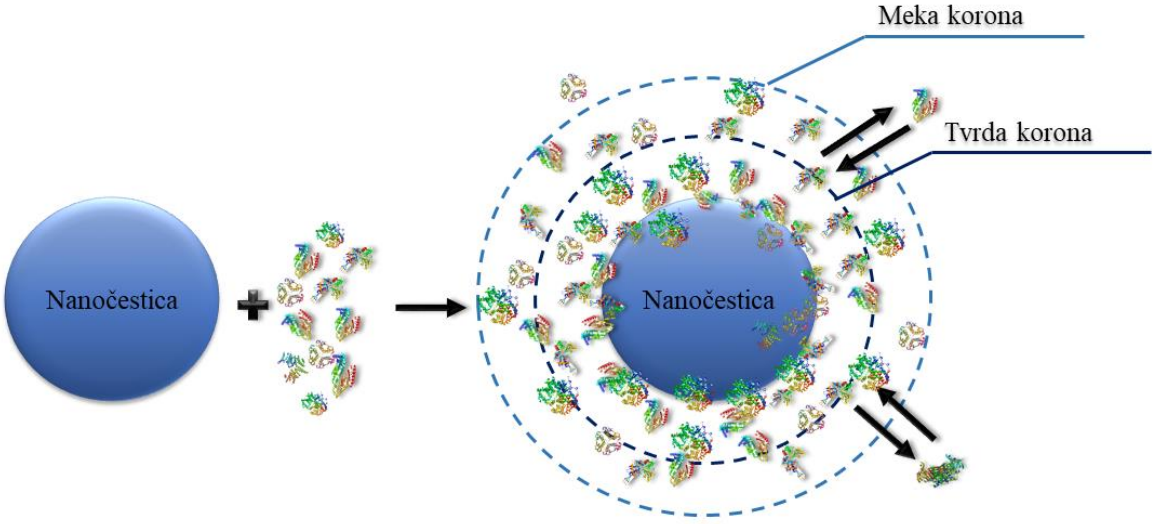
Međutim, potencijalna primjena NP u medicini nalazi se pred brojnim izazovima, ponajviše u pogledu njihove biokompatibilnosti, učinkovitosti i sigurnosti. Iako im njihova mala veličina omogućava lakši pristup ciljanom mjestu djelovanja, ona ujedno pridonosi njihovom lakšem ulasku u krvožilni sustav, što može dovesti do njihove potencijalne interakcije s proteinima u biološkom sustavu. Takve interakcije mogu poboljšati ili smanjiti adsorpciju iona i drugih molekula na njihovoj površini, dovesti do rekonstrukcije njihove površine te povećati ili smanjiti njihovo otapanje, odnosno razgradnju. Također, mogu dovesti do agregacije NP ili vezanja proteina i drugih biomolekula na njihovu površinu (47).

1.4. Interakcije metalnih nanočestica u biološkim sustavima i nastajanje proteinske korone

Izloženost NP biološkom mediju rezultira njihovom neposrednom interakcijom s biološkim makromolekulama (proteinima, lipidima, nukleinskim kiselinama) u vremenu od samo nekoliko sekundi, što uzrokuje stvaranje nano-bio kompleksa (48). S obzirom na to da su proteini u najvećoj mjeri zastupljeni u fiziološkim sustavima, češće se govori da dolazi do interakcije između NP i proteina, te formiranja kompleksa poznatog pod nazivom proteinska korona (47,48). Stvaranje tog kompleksa uzrokuje gubitak „sintetičkog identiteta“ NP i nastaje posebni „biološki identitet“ koji utječe na daljnji biološki odgovor organizma na NP (49,50). Fizikalno-kemijska svojstava NP u pogledu njihove veličine, oblika i površinske strukture utječu na sastav biomolekulske korone te posljedično mijenjaju njihovu farmakokinetiku i farmakodinamiku (51). Primjerice, vezanjem proteina kao što su opsonini na površinu NP

dolazi do njihove eliminacije iz cirkulacije putem mononuklearnog fagocitnog sustava, pri čemu se mijenja njihova farmakokinetika (52). Također, stvaranje proteinske korone ne utječe samo na fizikalno-kemijska svojstva NP, već i na promjene konformacije proteina koji se vežu na njihovu površinu. Prilikom interakcije dolazi do stvaranja novih i razaranja već postojećih intramolekulskih veza, što dovodi do promjena u nativnoj konformaciji proteina. S obzirom na to da je funkcija proteina povezana s njihovom strukturom, takve promjene u strukturi mogu biti ireverzibilne i dovesti do gubitka funkcije proteina (53). Prema tome, istraživanja nastanka proteinske korone predstavljaju važnu ulogu u sigurnoj primjeni nanočestica (54). Naime, sintezom NP određenih fizikalno-kemijskih svojstava, odnosno modifikacijom površine NP korištenjem različitih omotača, mijenja se sastav proteinske korone te shodno tome i biološki odgovor, što omogućuje manipulaciju nad njihovom sudbinom u organizmu (55).

Prilikom istraživanja interakcija proteina i NP važno je uzeti u obzir da je proteinska korona dinamičan sustav, što znači da će se sastav korone mijenjati s vremenom te će ovisiti o svojstvima biološkog sustava i NP (56). Kada govorimo o dinamičnosti proteinske korone važno je uzeti u obzir afinitete vezanja između NP i proteina. Prema Vromanovom učinku, proteini veće koncentracije u plazmi, ali niskog afiniteta za NP primarno će se vezati na površinu NP i činiti veći udio u koroni. Takvi se proteini s vremenom (nakon nekoliko minuta) zamjenjuju s proteinima manje koncentracije, ali visokog afiniteta prema NP (57). Shodno navedenom, proteinska korona se može klasificirati kao tvrda i meka korona (Slika 3).



Slika 3. Prikaz modela nano-bio sučelja: tvrda i meka korona. Preuzeto i prilagođeno prema Nguyen VH i sur. (58).

Nakon nekoliko minuta od izloženosti u biološkom sustavu dolazi do formiranja tvrde korone, koja je većinom sastavljena od proteina visokog afiniteta prema NP, dok meku koronu čine proteini slabijeg afiniteta i potrebno je i do nekoliko sati da bi se formirala (47). Nedavna istraživanja su pokazala da su proteini tvrde korone direktno u interakciji s površinom NP, dok se meka korona formira preko interakcija protein-protein s tvrdom koronom (59).

Biološki odgovor na NP je većinom povezan s proteinima koji čine sastav tvrde korone, zbog čega je analiza ovog sloja od većeg interesa. Međutim, sastav korone se mijenja s vremenom pa ne treba očekivati da struktura i sastav tvrde korone na jednostavan način odražavaju osnovne interakcije između NP i biološkog sustava (50). Također, različiti procesi utječu na koncentraciju proteina u organizmu, a proteini pak pokazuju različite afinitete vezanja za površinu NP te na druge molekule proteina koje su već vezane na površinu. Stoga je analiza proteinske korone izrazito složena.

Sastav proteinske korone, afinitet vezanja između proteina i NP, te promjene u strukturi proteina i fizikalno-kemijskim svojstvima NP u organizmu, moguće je približno odrediti analitičkim metodama (60). Tablica 1 prikazuje i opisuje najčešće primjenjivane metode u istraživanju prirode interakcija NP i proteina te analizi proteinske korone (61).

Unatoč opsežnom istraživanju i mnogobrojnim objavljenim znanstvenim radovima o interakcijama NP i proteina, uloga glikozilacije proteina u formiranju i karakteristikama takvih nano-bio kompleksa gotovo je potpuno nepoznata. S obzirom na to da su glikani prisutni na površini većine proteinskih molekula, prilikom istraživanja interakcija između NP i proteina potrebno je, osim strukture proteina i fizikalno-kemijskih svojstava NP, uzeti u obzir i glikozilacijski status proteina. Jedino poznato istraživanje utjecaja glikozilacije na stvaranje proteinske korone pokazalo je da uklanjanje glikana s površine glikoproteina, odnosno iz proteinske korone, poboljšava prianjanje NP na stanične membrane i njihov unos u stanice, ali i da istovremeno smanjuje koloidnu stabilnost takvih NP (62).

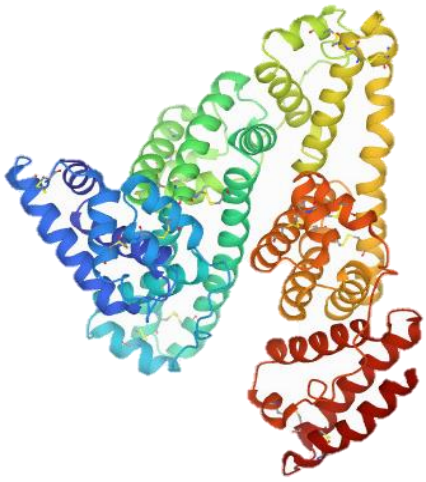
Tablica 1. Najčešće primjenjivane analitičke metode za istraživanje nano-bio interakcija (61).

promatrano svojstvo	analitička metoda	parametar
fizikalno–kemijska svojstva NP	dinamičko raspršenje svjetlosti	veličina, raspodjela veličina
	elektroforetsko raspršenje svjetlost	zeta potencijal
	ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija	optička svojstva
	transmisijska elektronska mikroskopija	veličina, raspodjela veličina, sastav, oblik
	skenirajuća elektronska mikroskopija	veličina, raspodjela veličina, oblik
	atomska mikroskopija sila	veličina, raspodjela veličina, oblik
	energetski disperzivna rentgenska spektroskopija	sastav
struktura proteina	cirkularni dikroizam	promjene u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi proteina
	nuklearna magnetska rezonancija	
interakcije	fluorescencijska spektroskopija	konstante afiniteta
	lokalizirana površinska plazmonska rezonancija	konstante adsorpcije
sastav proteinske korone	denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza	udio pojedinog proteina u proteinskoj koroni
	masena spektrometrija	

1.5. Modelni proteini u istraživanju proteinske korone

Dosadašnja ispitivanja nano-bio interakcija su najvećim dijelom provedena na modelu albumina. Albumin je protein globularnog oblika i veličine 66,5 kDa, koji čini polovicu serumskih proteina. Jedna od temeljnih funkcija albumina u tijelu je reguliranje koloidno-osmotskog tlaka, a uz to prenosi i endogene ligande, kao što su bilirubin, masne kiseline ili ioni te egzogene ligande kao što su lijekovi (63). Negativan je protein akutne faze upale zbog čega mu se koncentracija smanjuje u upalnim stanjima pod utjecajem citokina (64). S obzirom na to da se sintetizira u hepatocitima, određivanje koncentracije serumskog albumina, uz određivanje protrombinskog vremena, jedna je od ključnih pretraga za ispitivanje funkcije jetre. Određivanje koncentracije serumskog albumina se također koristi za procjenu nutritivnog statusa pacijenata, što je posebno važno u optimizaciji prehrane prije kirurškog zahvata radi smanjenja postoperativnog mortaliteta (65).

Humani albumin se sastoji od jednog polipeptidnog lanca, građenog od 585 aminokiselina i 17 disulfidnih veza, te jedne slobodne tiolne skupine (66). Trodimenzionalna struktura albumina pokazuje da se on sastoji od tri strukturno homologne domene (domene I, II i III) od kojih se svaka sastoji od dvije poddomene, nazvane A i B. Poddomene IA, IB i IIA pakiraju se čvrsto zajedno, tvoreći glavu molekule, dok poddomene IIB, HIIA i IIIB čine produženi rep (Slika 4) (66). Analiza strukture humanog (engl. *human serum albumin*, HSA) i goveđeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA) je pokazala da se oba sastoje od navedene tri domene te da su strukturno slični. Međutim, jedna od bitnih razlika je da se u strukturi HSA nalazi jedan triptofan na položaju 214, dok su u strukturi BSA prisutna dva triptofana na položajima 134 i 212, koji značajno doprinose fluorescencijskim svojstvima proteina (67,68). Budući da mu je izoelektrična točka (pI) 4,7 kod fiziološkog pH 7,4 albumin je negativno nabijen, kao i mnogi serumski proteini.



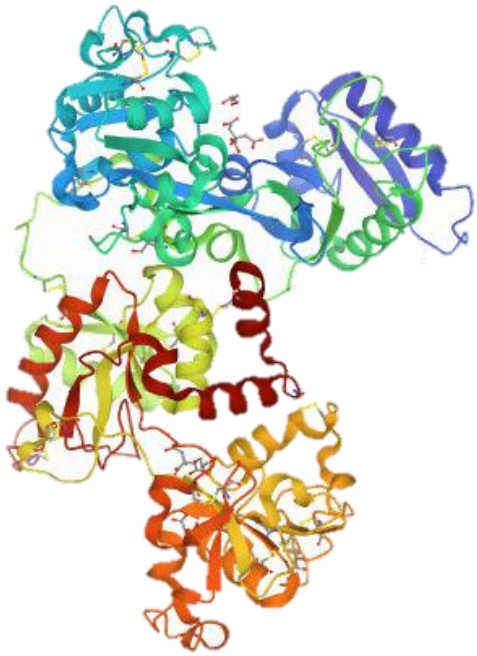
Slika 4. Kristalna struktura humanog serumskog albumina. Slika je preuzeta s web stranice RCSB Protein data bank (PDB) ID 1AO6 (69,70).

Istraživanja su pokazala da se albumin veže na NP metala, pri čemu je važno istražiti mehanizam reakcije, afinitet vezanja te konformacijske promjene do kojih dolazi u proteinskoj strukturi, što utječe na biološki odgovor na nastali kompleks NP-protein (71–73). Važno je naglasiti da rezultati opisani u literaturi značajno variraju posebno obzirom na jačinu vezanja, dok su rezultati o promjeni proteinske strukture nešto konzistentniji. Prilikom vezanja na NP, struktura albumina se mijenja u smislu gubitka struktura α-uzvojnica kod većine NP-albumin

interakcija opisanih u literaturi (74–76). S druge pak strane, rezultati za konstante vezanja su se pokazali ovisnima o veličini, površinskoj strukturi i tipu NP (77–79).

Prilikom provođenja istraživanja NP omotanih proteinima u ciljanoj isporuci lijekova, često korišten protein je transferin (80–82). Humani transferin je glikoprotein veličine 77 kDa, građen od 698 aminokiselina i stabiliziran s 19 disulfidnih veza. Glavna funkcija transferina je regulacija metabolizma željeza u tijelu. Vezanjem željeza, ograničava se koncentracija slobodnog ionskog željeza u krvi, a time se sprječava njegovo sudjelovanje u reakcijama koje dovode do stvaranja slobodnih radikala, kao što su Fentonova i Haber-Weissova reakcija (83). Slobodni radikali nastali u navedenim reakcijama mogu dovesti do oksidacije lipida, nukleinskih kiselina i oštećenja tkiva te pridonijeti razvoju bolesti srca, jetre, neurološkim bolestima i drugima. Stoga je vezanje željeza za transferin ključno za održavanje željeza u topljivom vezanom obliku, te njegov prijenos u stanice i tkiva. Prijenos željeza vezanog na transferin kroz stanične membrane je potpomognut interakcijom transferina i transferinskog receptora (TfR) koji uključuje mehanizam receptorom posredovane endocitoze (84).

Transferin se sastoji od dvije homologne domene, označene kao N i C domena, od kojih svaka sadrži jednu N-glikansku strukturu vezanu na asparagine na aminokiselinskim pozicijama 432 i 630 (Slika 5) (85). Domene su međusobno povezane kratkom sekvencom aminokiselina, a svaka sadrži niz α-heliksa, koji prekrivaju središnju okosnicu građenu od β-ploča. Između domena nalazi se hidrofilno mjesto vezanja iona metala. Vezanje željeza je posebno regulirano molekulom karbonata koja se nalazi u blizini vezanog mjesta, budući da djeluje kao donor dvije molekule kisika koje stabiliziraju vezanje željeza. U vezanju također sudjeluju i okolni bočni ogranci od kojih presudnu ulogu imaju lizini na položajima 206 i 296, koji stvaraju zatvorene vodikove veze. U kiselom pH te se vodikove veze razaraju i omogućuju domenama da prijeđu iz zatvorene u otvorenu konformaciju koja oslobađa željezo (86,87).



Slika 5. Kristalna struktura humanog transferina. Slika je preuzeta s web stranice RCSB Protein data bank (PDB) ID 3QYT (70,88).

Dijagnostički je bitno mjerenje razine zasićenja transferina željezom. Mjerenje nezasićenog kapaciteta vezanja željeza i koncentracije slobodnog željeza u serumu, omogućuje izračunavanje ukupnog kapaciteta vezanja željeza, koji uz koncentraciju topljivog TfR pomaže u diferencijalnoj dijagnostici anemija (89,90). Nadalje, promjene glikanskog profila transferina koriste se u dijagnostici kongenitalnog poremećaja glikozilacije i kroničnog alkoholizma (91,92). Kod kronične konzumacije alkohola, etanol povećava enzimatsku aktivnost sijalidaze koja uklanja sijalinsku kiselinu s glikanskih struktura u transferinu što dovodi do pojave ugljikohidratima deficijentnih formi transferina. Tetrasijalotransferin je izoforma transferina koja je u normalnom serumu prisutna u najvećoj koncentraciji, ali uz nju još mogu biti prisutne i disijalotransferinska, trisijalotransferinska, pentasijalotransferinska te heksasijalotransferinska glikozilacijska izoforma (93). Značajnija pojava asijalotransferina, monosijalotransferina i disijalotransferina ukazuje na kroničnu konzumaciju alkohola. Glikozilacijski oblici transferina se mogu razdvojiti metodom IEF. Ova metoda koristi pH gradijent u kojem se glikoforme transferina razdvajaju s obzirom na vrijednost njihove izoelektične točke (pI) u rasponu od 5,2 do 5,7, pri čemu osobe koje kronično konzumiraju alkohol imaju prisutne ugljikohidratima deficijentne forme transferina koje imaju veće pI vrijednosti, oko 5,7 ili veće ovisno o vrsti transferinske glikoforme (92,94).

TfR jedan je od rijetkih receptora koji je prisutan na krvno-moždanoj barijeri, zbog čega se transferin transportira iz krvi u cerebrospinalnu tekućinu (engl. *cerebrospinal fluid*, CSF). Važno je naglasiti da se u CSF sintetizira asijalotransferin, dok je prisutnost drugih glikoformi posljedica prijenosa preko BBB iz seruma. Potencijal primjene određivanja različitih glikoformi transferina u CSF uočen je kod demencija, Alzheimerove i Parkinsonove bolesti (95–97).

Metabolizam željeza je promijenjen u stanicama karcinoma u odnosu na ne-maligne stanice pri čemu one imaju povećanu potrebu za željezom (80). Budući da je na površini karcinoma povećana ekspresija TfR, interakcija između transferina i NP iskorištena je za sintezu mnogih transferinom omotanih nanočestica koje se sintetiziraju kao potencijalni sustavi za dostavu lijekova u antitumorskoj terapiji. Proučavane su transferinom konjugirane polimerne NP za dostavu doksorubicina kod rezistentnog karcinoma dojke, koje su pokazale toksičnost na stanice karcinoma uz minimalnu toksičnost na zdravo tkivo (81). S obzirom na to da transferin prelazi BBB, NP omotane transferinom su posebno istraživane kod terapije karcinoma mozga. Primjerice, NP omotane silicij-dioksid polimerom mliječne i glikolne kiseline i transferinom koje sadrže doksorubicin pokazale su antigliomsku aktivnost u *in vivo* eksperimentima (82). Slične vrste NP omotanih metotreksatom i transferinom su pokazale bolju antitumorsku aktivnost i biodistribuciju u *in vivo* eksperimentima te bolju citotoksičnost *in vitro* u odnosu na sami metotreksat na tumorske glioma stanice (98). Iako *in vivo* i *in vitro* istraživanja NP omotanih transferinom postoje, određivanje mehanizma vezanja i konformacijskih promjena transferina do kojih dolazi uslijed interakcije s NP su vrlo oskudna.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Proteinska korona ima važnu ulogu za ponašanje, učinke i sudbinu NP u biološkim sustavima. Stoga je razumijevanje mehanizama nastanka i svojstava proteinske korone ključno u razvoju sigurnijih i učinkovitijih NP za biomedicinsku primjenu. Brojna istraživanja su pokazala da veličina, oblik i površinska struktura NP utječu na interakcije između proteina i NP, ali je uloga glikozilacije proteina gotovo potpuno nepoznata. Obzirom da su mnogi proteini, posebice serumski, glikozilirani te da upravo glikani mogu prvi doći u kontakt s površinom NP, nužno je istražiti i njihov utjecaj na navedene interakcije.

Osnovna hipoteza ovog doktorskog istraživanja jest da je mehanizam interakcije AgNP i AuNP s proteinima određen i fizikalno-kemijskim svojstvima NP i glikozilacijskim statusom proteina.

Glavni je cilj istraživanja utvrditi na koji način veličina, oblik te površinska struktura AgNP i AuNP utječu na prirodu i mehanizam njihove interakcije s proteinima različitoga glikozilacijskoga statusa. U svrhu provođenja sustavnog istraživanja izabrani su sljedeći modelni sustavi:

a) sedam vrsta AgNP i devet vrsta AuNP različitih veličina, oblika i površinskih struktura. Navedene NP su izabrane zbog svojih posebnih svojstava koja su povoljna za primjenu u biomedicini. Ispitane su AgNP veličina 10 nm i 50 nm, stabilizirane različitim površinskim omotačima. Također, ispitane su i AuNP raspona veličina od 14 nm do 250 nm, sferičnog, štapićastog i prizmičnog oblika, stabilizirane različitim površinskim omotačima.
b) tri proteina: goveđi serumski albumin (BSA), glikozilirani transferin (glikoTRF) i neglikozilirani transferin (ne-glikoTRF). Transferin je odabran zbog svojih bitnih funkcija u organizmu, kao i zbog važnosti promjena njegovih glikozilacijskih izoformi u različitim patofiziološkim stanjima. Ispitivanja su provedena i na BSA kako bi se omogućila usporedba rezultata dobivenih ovim istraživanjem s do sada objavljenim podacima, jer je najveći broj znanstvenih istraživanja na proteinskoj koroni upravo objavljen za BSA.

Kako bi se ostvario glavni cilj, postavljeni su sljedeći specifični ciljevi:

1. dizajnirati, sintetizirati i karakterizirati AgNP i AuNP različitih veličina, oblika te površinskih struktura;
2. procijeniti stabilnost i moguće transformacije različitih AgNP i AuNP u modelnim biološkim sustavima;
3. odrediti jačinu vezanja proteina različitoga glikozilacijskoga statusa na različite AgNP i AuNP;
4. odrediti strukturne promjene proteina nakon njihovog vezanja na različite AgNP i AuNP.

Sustavna analiza prirode i mehanizma vezanja između AgNP i AuNP na proteine različitoga glikozilacijskoga statusa unaprijedit će postojeće znanje o nano-bio interakcijama. Takvo znanje može značajno unaprijediti dizajn učinkovitih i sigurnijih NP u biomedicinske svrhe.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali korišteni za sintezu nanočestica

Sljedeće kemikalije korištene su za sintezu NP: natrijev citrat dihidrat ($Na_3C_6H_5O_7$ x $2H_20$, Mr 294,10 g/mol, kat. br. 1405407), natrijev hidroksid (NaOH, Mr 40,00 g/mol, kat. br. 1452506), klorovodična kiselina (HCl, Mr 36,46 g/mol, kat. br. 182430), dušična kiselina (HNO_3, Mr 36,01 g/mol, kat. br. 452201) , octena kiselina [(CH_3COOH, Mr 60,05 g/mol, kat. br. 15067(8)] i acetonitril (ACN, Mr 41,05 g/mol, kat. br. 0163470) kupljeni su od tvrtke Kemika (Zagreb, Hrvatska), dok su polietilen glikol (PEG, Mr 6 000 g/mol, kat br. 81253), ε-poli-L-lizin (PLL) hidrobromid [$(C_6H_{12}N_2O)$n x HBr, Mr 70 000 – 150 000 g/mol, kat. br. P6407], natrijev bis (2-etilheksil) sulfosukcinat (AOT) ($C_{20}H_{37}NaO_7S$, Mr 444,56 g/mol, kat. br. 323586) i tetrakloroaurična kiselina ($HAuCl_4$ x $3H_2O$, Mr 39,83 g/mol, kat. br. 520918) kupljeni od tvrtke Sigma Aldrich Chemical Co. (Taufkirchen, Njemačka). Nadalje, poli (vinilpirolidon) (PVP) [(CH_9NO)n, Mr 40 000 g/mol, kat. br. 5295] i natrijev borhidrid ($NaBH_4$, Mr 37,83 g/mol, kat. br. 806373) kupljeni su od tvrtke Merck Suprapur (Darmstadt, Germany), dok su D-glukoza ($C_6H_{12}O_6$, Mr 180,16 g/mol, kat. br. A16828) i srebrov nitrat ($AgNO_3$, Mr 169,87 g/mol, kat. br. 11414.14) kupljeni od tvrtke Alfa Aesar (Haverhill, Massachusetts, SAD).

3.2. Materijali korišteni za ispitivanje stabilnosti nanočestica

Stabilnost NP ispitana je u sljedećim modelnim sustavima: ultračista voda, umjetna lizosomalna tekućina (engl. *artificial lysosomal fluid*, ALF), umjetna želučana tekućina (engl. *artificial gastric fluid*, AGF) i komercijalni stanični medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM) bez i uz dodatak 10% BSA. Točan sastav ALF i AGF medija naveden je u Tablici 2. DMEM medij (pH 7,2) komercijalno je pribavljen od tvrtke Sigma-Aldrich Chemical Co. (Taufkirchen, Njemačka).

Tablica 2. Podaci o sastavu i pH biološki relevantnih umjetnih medija korištenih za procjenu stabilnosti i transformacije AgNP.

kratica	vrsta medija	pH	sastav (koncentracija)
ALF	umjetna lizosomalna tekućina	4,5	NaCl (3,210 g/L) NaOH (6,000 g/L) citratna kiselina (20,800 g/L) $CaCl_2$ (0,097 g/L) NaH_2PO_4 x $7H_2O$ (0,179 g/L) Na_2SO_4 (0,039 g/L) $MgCl_2$ x H2O (0,106 g/L) glicerol (0,059 g/L) natrijev citrat dihidrat (0,077 g/L) natrijev tartarat dihidrat (0,090 g/L) natrijev laktat (0,085 g/L) natrijev piruvat (0,086 g/L) formaldehid (1,000 mL/L)
AGF	umjetna želučana tekućina	2,0	NaCl (34,2 mM) pepsin (0,1 g/L)

3.3. Materijali korišteni za ispitivanje interakcija nanočestica i proteina

Goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) (Mr 66 000 g/mol, kat. br. A2153, lot SLBS1213V) i reducirani glutation (GSH, Mr 307,32 g/mol, kat. br. 6451, lot 030M1775V) kupljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Njemačka). Glikozilirani transferin izoliran iz humanog seruma (glikoTRF) (Mr 77 000 g/mol, kat. br. pro-315-b, lot 518PHTF28) i rekombinatno sintetiziran neglikozilirani transferin (ne-glikoTRF) (Mr 76 000 g/mol, kat. br. pro-747-b, lot 418PTRANS) kupljeni su od tvrtke ProSpec Bio (Rehovot, Izrael). Za otapanje proteina korištena je puferirana fiziološka otopina (engl. *phosphate buffer saline*, PBS) koja se sastojala od 137 mM natrijeva klorida, 2,7 mM kalijeva klorida, 10 mM natrijevog hidrogenfosfata i 1,8 mM kalijevog dihidrogenfosfata otopljenih u ultračistoj vodi, tako da je konačni pH 7,4.

BSA, glikoTRF i ne-glikoTRF otopljeni su u 2 mL PBS do konačne koncentracije od 100 μM. Potom su otopine proteina alikvotirane i spremljene na -20 ºC. Prije provođenja eksperimenata u kojima su ispitivane interakcije proteina i NP, navedeni alikvoti su otopljeni i razrijeđeni s PBS do određene koncentraciju ovisno o primjenjenoj metodi.

Plastični pribor nabavljen je od tvrtke Sarstedt (Belgija), a stakleni od tvrtke Schott (Njemačka). Za sva razrjeđenja korištena je ultračista voda dobivena kao deionizirana voda električne vodljivosti od 18,2 MΩ/cm pomoću pomoću Milli-Q® IX sustava za pročišćavanje vode (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka).

Sljedeće kemikalije korištene su za elektroforezu: tetrametiletilendiamin (TEMED) ($C_6H_{16}N_2$, Mr 116,20 g/mol, kat. br. T9281), glicerol ($C_3H_8O_3$, Mr 92,09 g/mol, kat. br. G5516), 2-propanol (C_3H_8O, Mr 60,09 g/mol, kat. br. I-9516), bromfenol plavilo ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$, Mr 669,96 g/mol, kat. br. 8026), amonij persulfat (APS) [$(NH_4)_2S_2O_8$, Mr 228,18 g/mol, kat. br. A3678], trizma baza ($C_4H_{11}NO_3$, Mr 121,14 g/mol, kat. br. T1503), acetonitril (C_2H_3N, Mr 41,05 g/mol, kat. br. 34851), glicin ($C_2H_5NO_2$, Mr 75,07 g/mol, kat. br. G8898). lauril sulfat (SDS) ($NaC_{12}H_{25}SO_4$, Mr 288.37 g/mol, kat. br. L6026), trifluorooctena kiselina (TFA) ($C_2HF_3O_2$, Mr 114,02, kat. br. T6508), amonijev bikarbonat (NH_4HCO_3, Mr 79,06 g/mol, kat. br. 09830) i natrijev dodecil sulfat (SDS, Mr 288,38, kat. br. L3771) kupljeni su od tvrtke Sigma Aldrich Chemical Co. (Taufkirchen, Njemačka). Standardi za elektroforezu Bio-Safe Coomassie G-250 boja (kat. br. #161-0786) i Precision plus protein all blue standards (kat. br. #161-0373) pribavljeni su od tvrtke Bio-Rad (Hercules, Kalifornija, SAD), dok je Rotiforeza 30% otopina akrilamid/bisakrilamid (37,5:1) (kat. br. 3029.2) kupljena od tvrtke Carl Roth (Karlsruhe, Njemačka). SDS puferirana otopina za uzorke sastojala se od 250 mM pufera Tris-HCl (pH 6,8), 8% SDS, 40% glicerola, 0,02% bromofenol plavila i 8% 2-merkaptoetanola. Pufer za provođenje elektroforeze (engl. *running buffer*) sastojao se od 25 mM trizma baze, 192 mM glicina i 0,1% SDS. Ekstrakcija proteina iz gela provedena je korištenjem Tripsin Gold Mass spectrometry grade (kat. br. V5280) komercijalno pribavljenog od tvrtke Promega (Madison, Wisconsin, SAD).

3.4. Sinteza nanočestica srebra i zlata

Sve vrste NP korištene u ovom doktorskom radu, njihova veličina, oblik i površinski omotači prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Vrste AgNP i AuNP različitih veličina, oblika i površinskih omotača korištenih u doktorskom istraživanju.

vrsta NP	površinski omotači	oblik	ciljana veličina /nm	naziv NP
srebro (Ag)	polivinilpirolidon (PVP)	sfere	~ 10	sPVPAgNP
			~ 50	lPVPAgNP
	natrijev bis (2-etilheksil) sulfosukcinat (AOT)		~ 10	AOTAgNP
	ε-poli-L-lizin (PLL)		~ 10	PLLAgNP
	glutation (GSH)		~ 10	GSHAgNP
	citrat (CIT)		~ 50	CITAgNP
	polietilen glikol (PEG)		~ 50	PEGAgNP
zlato (Au)	glutation (GSH)	sfere	~ 10	GSHAuNP
	citrat (CIT)		~ 14	sCITAuNP
			~ 40	mCITAuNP
			~ 60	lCITAuNP
	polietilen glikol (PEG)		~ 40	PEGAuNP
		štapići	~ 80	PEGAuNR
		prizme	~ 125	sPEGAuNPr
			~ 150	mPEGAuNPr
			~ 200	lPEGAuNPr

Sintetske metode korištene za pripravu sferičnih AgNP i AuNP u ovom radu temeljene su na pristupu „od vrha prema dolje“. Primjenjivane su metode koje se temelje na redukciji ionskog oblika srebra i zlata, korištenjem redukcijskog sredstva uz prisutnost različitih omotača. Kao prekursori za sintezu korišteni su $AgNO_3$ i $HAuCl_4$, dok su kao redukcijska sredstva primjenjivani natrijev borhidrid ($NaBH_4$), D-glukoza ($C_6H_{12}O_6$) i natrijev citrat ($Na_3C_6H_5O_7$). Prije sinteze AgNP stakleno posuđe očišćeno je s 10% (v/v) HNO_3, dok je prije sinteze AuNP očišćeno zlatotopkom (1:3 v/v; HNO_3, 65%: HCl, 37%) i temeljito isprano ultračistom vodom. Sferične AuNP stabilizirane CIT veličina 14 nm i 40 nm te sferične AuNP stabilizirane PEG veličine 40 nm, nanoštapići zlata (AuNR) i nanoprizme zlata (AuNPr) stabilizirane s PEG dobivene su od Instituta za znanost o materijalima, Zaragoza, Španjolska.

3.4.1. Postupci priprave sferičnih nanočestica srebra veličine 10 nm

AgNP veličine 10 nm stabilizirane s PVP, AOT i PLL sintetizirane su modificiranim postupkom koji su prethodno opisali Jurašin i sur. (99). Sinteza je uključivala redukciju $AgNO_3$ koristeći $NaBH_4$ kao redukcijsko sredstvo. Otopine omotača pripremljene su otapanjem odgovarajuće količine omotača u ultračistoj vodi. Otopine su potom prebačene u dvogrle tikvice te je dodano 5 mL 90 mM otopine $AgNO_3$ uz snažno miješanje na ploči magnetne miješalice IKA RCT (IKA Werke, Njemačka) u ledenoj kupelji. Nakon toga je u mješavinu dokapavano 5 mL 320 mM $NaBH_4$ (približno 1 kap /s) i reakcijska smjesa je zaštićena od svjetlosti uz stalno miješanje tijekom 45 minuta. Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 200 mL, a konačne koncentracije omotača u reakcijskoj smjesi bile su: 0,3% (m/v) PVP, 0,5 mM AOT i 0,05% (m/v) PLL. Pripremljene suspenzije AgNP centrifugirane su na 15 000 g tijekom 45 minuta, talog AgNP je resuspendiran u ultračistoj vodi i pohranjen u mraku na 4 °C.

3.4.2. Postupci priprave sferičnih nanočestica srebra veličine 50 nm

AgNP veličine 50 nm stabilizirane s PVP i PEG veličine 50 nm sintetizirane su kemijskom redukcijom kationskog kompleksa $[Ag(NH_3)_2]^+$ s D-glukozom. Otopina omotača pripremljena je otapanjem odgovarajuće količine omotača u 193 mL ultračiste vode u dvogrloj tikvici, pri čemu su konačne koncentracije omotača iznosile PVP 0,3% (m/v) i PEG 0,1% (m/v). Reakcijska smjesa za sintezu PVPAgNP zagrijavana je na 40 °C uz konstantno miješanje. Reakcijska smjesa za PEGAgNP pripremljena je na sobnoj temperaturi. Nakon toga je u svaku smjesu dodano 2,2 mL 90 mM otopine $AgNO_3$ i 0,133 mL 15 M otopine NH_4OH te je dokapavano 4 mL 0,5 M otopine glukoze (približno 1 kap /s). Potom je dodano 0,6 mL 1 M NaOH u svrhu povećanja pH otopine na 11,5. Smjesa je ostavljena 45 minuta uz stalno miješanje, zagrijavanje i zaštićena od svjetlosti. Pripremljene suspenzije NP centrifugirane su na 15 000 g tijekom 20 minuta, resuspendirane u ultračistoj vodi i pohranjene u mraku na 4 °C.

AgNP stabilizirane citratom (lCITAgNP) sintetizirane su modificiranim protokolom već opisanim u literaturi (100). Prije dodavanja reagensa postavljena je aparatura koja se sastojala od dvogrle tikvice i Liebigovog hladila. Sinteza je započeta dodavanjem 2,22 mL 90 mM $AgNO_3$ u 195 mL ultračiste vode u dvogrlu tikvicu uz konstantno miješanje. Potom je dodano 2,27 mL $Na_3C_6H_5O_7$ (1% w/v) i smjesa je ostavljena uz neprekidno miješanje i zagrijavanje tri sata. Nakon zagrijavanja, suspenzija je ohlađena na sobnu temperaturu. Pročišćavanje je provedeno centrifugiranjem na 11 000 g tijekom 30 minuta kako bi se uklonili

ne izreagirani reagensi i nusprodukti. Nakon uklanjanja supernatanta, talog je resuspendiran u ultračistoj vodi i suspenzija je pohranjena u mraku na 4 °C.

Sinteza AgNP stabiliziranih GSH (GSHAgNP) provedena je koristeći prethodno objavljeni protokol (101). U pripremljenu vodenu otopinu GSH koncentracije 5,6 mM dodano je 3,11 mL 90 mM $AgNO_3$, a nakon toga 1 mL $NaBH_4$ do konačne koncentracije od 280 mM. Konačni volumen reakcijske smjese iznosio je 10 mL. Smjesa je ostavljena uz stalno miješanje 45 minuta i zaštićena od svjetlosti.

3.4.3. Postupci priprave sferičnih nanočestica zlata

AuNP veličine 60 nm stabilizirane citratom (lCITAuNP) sintetizirane su dodavanjem 0,5 mL 100 mM $HAuCl_4$ u 48 mL ultračiste vode u dvogrloj tikvici i otopina je zagrijavana do vrenja uz stalno miješanje. Nakon toga je dodano 1,5 mL $Na_3C_6H_5O_7$ (1% w/v) i reakcijska smjesa je ostavljena da se hladi do sobne temperature. Pročišćavanje je provedeno centrifugiranjem na 11 000 g tijekom 30 minuta kako bi se uklonili neizreagirani reagensi i nusprodukti reakcije. Nakon uklanjanja supernatanta, talog je resuspendiran u ultračistoj vodi i pohranjen u mraku na 4 °C.

Sinteza AuNP stabiliziranih GSH (GSHAuNP) provedena je koristeći modificirani prethodno objavljeni protokol Pem i sur. (101). Za sintezu je pripremljeno 7,5 mL vodene otopine GSH u dvogrloj tikvici do konačne koncentracije od 5,6 mM uz konstantno miješanje. Zatim je dodano 1,5 mL 100 mM otopine $HAuCl_4$ i 1 mL $NaBH_4$ do konačne koncentracije od 150 mM. Reakcijska smjesa ostavljena je uz stalno miješanje 45 minuta i zaštićena od svjetlosti.

3.5. Karakterizacija nanočestica

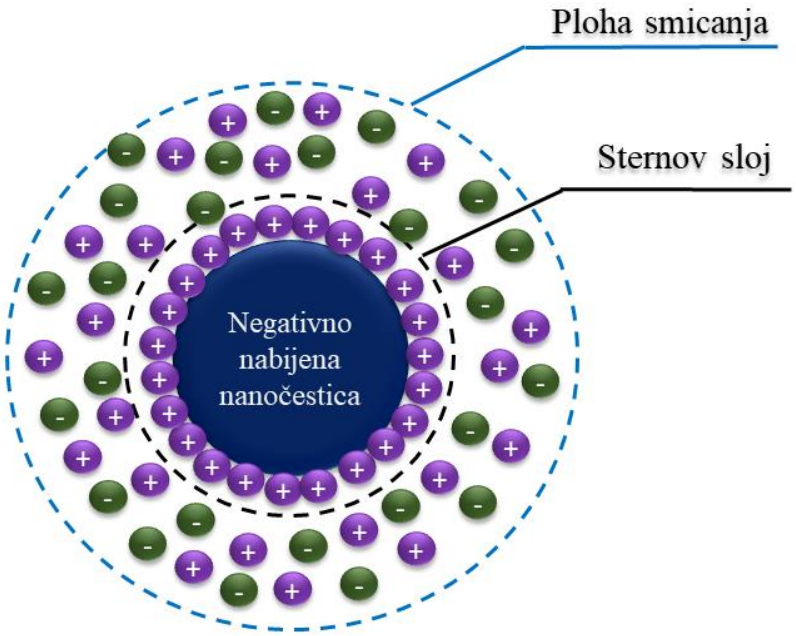
Hidrodinamički promjer (d_H) i njegova raspodjela, primarni promjer (d_{TEM}), zeta (ζ) potencijal i oblik novosintetiziranih AgNP i AuNP određeni su metodama dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS), elektroforetskog raspršenja svjetlosti (engl. e*lectrophoretic light scattering*, ELS) i transmisijskom elektronskom mikroskopijom (engl. *transmission electron microscopy*, TEM), dok su kemijski sastav i koncentracija određeni korištenjem atomske apsorpcijske spektroskopije (engl. *atomic*

absorption spectroscopy, AAS). Dodatna karakterizacija je provedena pomoću ultraljubičasto-vidljive spektroskopije (engl. *ultraviolet-visible absorption,* UV-Vis) u svrhu ispitivanja optičkih svojstava NP.

3.5.1. Određivanje hidrodinamičkog promjera, raspodjele veličina, zeta potencijala, primarnog promjera i optičkih svojstava nanočestica

DLS metoda se primjenjuje za određivanje d_H i raspodjele veličina NP suspendiranih u nekom mediju (102,103). U otopini se čestice nasumično gibaju, pri čemu se sudaraju s molekulama otapala. Takvo nasumično gibanje naziva se Brownovo gibanje i ovisi o veličini čestica. Princip rada DLS metode zasniva se na detekciji raspršene svjetlosti sa čestica u suspenziji i koreliranja fluktuacija signala s brzinom njihovog gibanja, zbog čega se još naziva fotonskom korelacijskom spektroskopijom (102,103). d_H se može definirati kao promjer koji uključuje veličinu NP i solvatacijsku ovojnicu koja se stvara oko čestice u mediju te se giba s njom kao cjelina (102). Odnosno, promjer hipotetske sfere koja difundira istom brzinom kao i čestica koja se mjeri. Iako ne odražava stvarnu veličinu NP, njegovo određivanje je bitno jer je odraz daljnjeg ponašanja NP u mediju.

ELS metodom mjeri se ζ potencijal NP, koji se može definirati kao potencijal na plohi smicanja između čestice i otopine. Kada se čestica koja nosi površinski naboj rasprši u otopini, ona privlači ione suprotnog naboja na svoju površinu, što rezultira stvaranjem električnog dvojsloja (Slika 6). Dvosloj se sastoji od Sternovog i difuzijskog sloja. Unutar difuzijskog sloja nalazi se zamišljena granica, ploha smicanja ili klizna ravnina na kojoj čestica i ioni formiraju stabilnu cjelinu. Kada se čestica giba, ioni se gibaju zajedno s njom. Potencijal na toj ravnini naziva se ζ potencijal i njegova vrijednost daje indikaciju o stabilnosti koloidnog sustava, odnosno elektrostatskoj stabilizaciji (103–105).



Slika 6. Shematski prikaz električnog dvosloja koji nastaje oko nabijene čestice u vodenom mediju. Slika je preuzeta i prilagođena od Malvern Panalytical Instruments Limited (103).

U ovom doktorskom radu za DLS i ELS mjerenja korišten je Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical Instruments, UK), koji je sadržavao zeleni laser (523 nm). Suspenzije NP su razrijeđene u ultračistoj vodi na koncentraciju od 10 mg metala (Au ili Ag) / L za obje metode. Konačni volumeni uzoraka za DLS mjerenja iznosili su 1 mL, dok su za ELS mjerenja volumeni uzoraka iznosili 5 mL. Jednokratne kivete korištene za DLS komercijalno su pribavljene od tvrtke Sarstedt Inc. (kat. br. 67.754, Nümbrecht, Njemačka), dok su kivete za ELS komercijalno pribavljene od tvrtke Malvern Panalytical Instruments Inc. (kat. br. DTS1070, UK). Uzorci su pipetirani u plastične kivete za DLS i ELS. Intenzitet raspršene svijetlosti detektiran je pod kutom od 173°. Mjerenjem raspršenja svjetlosti pod kutom od 173° povećava se osjetljivost mjerenja, budući da se izbjegava višestruko raspršenje svjetlosti do kojeg dolazi uslijed odbijanja fotona između više čestica, u slučajevima koncentriranog uzorka ili prisutnosti čestica prašine (106). Rezultati dobiveni DLS mjerenjima prikazani su kao srednja vrijednost od 10 mjerenja d_H i raspodjela veličina dobiveni iz raspodjele po intenzitetu. Rezultati ζ potencijala izračunati su iz izmjerene elektroforetske pokretljivosti prema Henryjevoj jednadžbi koristeći Smoluchowskovu aproksimaciju i prikazani su kao prosječna vrijednost 3 mjerenja. Mjerenja su provedena pri 25 °C, a dobiveni podaci su obrađeni u programskom paketu Zetasizer 7.13 (Malvern Panalytical Instruments, UK).

TEM metoda koristi se za određivanje d_{TEM} i oblika uzoraka u biološkim, medicinskim i fizikalnim znanostima. Snop elektrona fokusira se korištenjem magnetskih zavojnica, a slika se formira prolaskom elektrona kroz tanki transparentni uzorak. Dio elektrona se prilikom sudara s uzorkom rasprši, a preostali ne raspršeni elektroni čine elektronsku sliku uzorka (107). Transmisijski elektronski mikroskop (TEM, 902A; Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Njemačka) korišten je za procjenu primarne veličine i oblika sintetiziranih NP. Suspenzije NP su razrijeđene u ultračistoj vodi na koncentraciju od 10 mg/L metala (Au ili Ag). Uzorci volumena 5 µL naneseni su na bakrenu mrežicu obloženu Formvar membranom (Structure Probe, Inc. Supplies, West Chester, SAD) te su sušeni na zraku pri sobnoj temperaturi. Nakon sušenja, uzorci su snimani TEM-om koji je radio u svijetlom polju pri naponu ubrzanja od 80 kV te su slike snimljene na povećanjima od 50.000 do 140.000 puta kamerom Canon PowerShot S50 spojenom na mikroskop. d_{TEM} označava primarnu veličinu čestice bez njene solvatacijske ovojnice. Ukupno je izmjeren promjer najmanje 100 čestica za svaku pojedinu vrstu NP korištenjem programa ImageJ 1.53k (108).

UV-Vis metoda koristi se za proučavanje interakcija između elektromagnetskog zračenja i uzorka, pri čemu se dobiva podatak o optičkim svojstvima NP. Njihova optička svojstva potječu od oscilacije elektrona u vodljivoj vrpci metala. Ovise o veličini, obliku, koncentraciji, agregaciji te refraktornom indeksu u blizini njihove površine. Obasjavanje NP svjetlošću određene valne duljine dovodi do plazmonske rezonancije elektrona i ekscitacije u više energetske razine. To specifično svojstvo NP naziva se SPR, čiji signal na određenoj valnoj duljini u UV-Vis spektru ovisi o karakteristikama NP i indeksu loma medija (109–111).

UV-Vis spektri su u ovom doktorskom radu snimani su na CARY 300 spektrofotometru (Varian Inc., Australija), koristeći kvarcnu kivetu (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) duljine optičkog puta 1 cm. Uzorci suspenzija NP razrijeđeni su u ultračistoj vodi na koncentraciju metala od 100 µM te ispipetirani u kivetu. Snimanje UV-Vis spektara provedeno je u rasponu valnih duljina od 200 do 500 nm za AgNP i od 200 do 600 nm za AuNP na 25 °C.

3.5.2. Mjerenje koncentracije metala u suspenzijama nanočestica

AAS prihvaćena je kao standardna metoda za analizu metalnih i nemetalnih elemenata (112). Koncentracija metala (Au ili Ag) u AuNP i AgNP suspenzijama određena je AAS tehnikom na instrumentu AAnalyst 600 (Perkin Elmer, Shelton, SAD) s grafitnom pećnicom. Prije analize suspenzije NP su razrjeđene (100-250 tisuća puta) u 1% (v/v) HNO_3 na koncentraciju

koja je bila u području kalibracijskog pravca. Uzorci su pipetirani u polistirenske čašice volumena 1 mL. Korištene su katodne lampe za Ag i Au, na valnim duljinama apsorbirane svjetlosti 328 nm, odnosno 268 nm. Kalibracijski pravac rađen na početku svakog radnog dana upotrebom standardnih otopina Ag ili Au (1 000 mg metala/L u 5% HNO_3, Merck, Darmstadt, Njemačka) u koncentracijskom rasponu od 1 do 40 µg Ag/L za AgNP, te od 10 do 500 µg Au/L za AuNP. Kalibracijski pravac određen u programu AAnalyst Win Lab Data System korelacijom iz 6 točaka te se smatrao prihvatljivim kada je koeficijent korelacije *r* bio > 0,995 Izmjerene koncentracije metala u uzorcima korištene su za izračunavanje koncentracije NP, kako je opisano u sljedećem poglavlju.

3.6. Određivanje koncentracije i specifične površine nanočestica

Iz dobivene koncentracije metala u suspenzijama NP izračunate su molarne koncentracije NP korištenjem sljedeće jednadžbe (113):

$$c_{\mathrm{NP}} = \frac{C_{\mathrm{metala}} \times Ar}{m \times \mathrm{N_A}} \quad (1)$$

gdje je c_{metala} molarna koncentracija Au ili Ag dobivena AAS mjerenjima kako je prije opisano, *Ar* je atomska masa Au (196,97 g/mol) ili Ag (107,89 g/mol), *m* predstavlja masu jedne NP i N_A je Avogadrov broj (6,022 x 10^{23} mol^{-1}).

Masa jedne čestice NP dobivena je iz jednadžbe :

$$m = \rho \times V \quad (2)$$

gdje je ρ gustoća Au (1,93 x 10^{-20} g/nm^3) ili Ag (1,05 x 10^{-20} g/nm^3) (114), a *V* je volumen jedne čestice.

S obzirom na oblik različitih NP korištene su različite jednadžbe za izračunavanje volumena.

Volumeni za sferične, štapićaste i prizmične NP izračunati su na temelju formula za volumen kugle (3), kvadra (4) i jednakostranične prizme (5), odnosno na temelju njihovih oblika i vrijednosti primarne veličine određene iz TEM slika:

$$V = \frac{4 \times r^3 \times \pi}{3} \quad (3)$$

$$V = \frac{\pi}{4} \times a^2 \times b \quad (4)$$

$$V = \frac{\sqrt{3}}{4} \times a^2 \times b \quad (5)$$

U prethodnim jednadžbama, *r* predstavlja polumjer sferične NP izračunat kao polovica d_{TEM} vrijednosti NP. U formuli za volumen kvadra *a* i *b* predstavljaju širinu i dužinu stranica kvadra za štapićaste NP, a u formuli za volumen prizme duljinu stranice i visinu pravilne prizme.

Svi podaci dobiveni su iz TEM slika, s izuzetkom visine prizme za koju je uzeta vrijednost od 9 nm, kako je prethodno opisano u literaturi (115).

Specifična površina (engl. *specific surface area*, *SSA*) izračunata je dijeljenjem površine jedne čestice NP (*A*) s njezinom masom prema sljedećoj jednadžbi:

$$SSA = \frac{A}{m} \quad (6)$$

Površina jedne čestice NP izračunata je pomoću sljedećih formula za kuglu (7), kvadar (8) i pravilnu prizmu (9):

$$A = 4 \text{ x } r^2 \text{x } \pi \quad (7)$$

$$A = \frac{\pi}{2} \text{x } a^2 + \pi \text{ x } b \text{ x } a \quad (8)$$

$$A = 2 \text{ x } \frac{\sqrt{3}}{4} \text{x } a^2 + 3 \text{ x } a \text{ x } b \quad (9)$$

3.7. Ispitivanje stabilnosti nanočestica u biološkim medijima

Određivanje ponašanja i stabilnosti provedeno je u različitim modelnim otopinama kojima je mijenjana pH vrijednost, ionska jakost te prisutnost proteina. Za ispitivanje stabilnosti odabrane su sPVPAgNP, AOTAgNP i PLLAgNP koje su bile istog oblika i veličine, a različitih vrijednosti ζ potencijala. Naime, elektrostatske interakcije izrazito su bitne kako u biološkim sustavima, tako i za nastajanje proteinske korone pa je ispitivanje stabilnosti provedeno na tri vrste AgNP različitog naboja. Nakon pripreme ALF i AGF medija, pH je određen na Orion Star A214 pH metru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, SAD). pH-metar je korišten nakon kalibracije standardnim otopinama nabavljenim od Thermo Fisher Scientific čiji je pH bio 4,01, 7,00 i 10,01. ALF medij pripremljen je prema protokolu Stebounove i sur. (116) i uključivao je podešavanje pH na 4,5 korištenjem 1 M NaOH, dok je pH AGF medija podešen korištenjem 1M HCl.

Korištenjem DLS, ELS i UV-Vis spektroskopije pratile su se promjene u d_H, raspodjeli veličina i ζ potencijalu. Postupak mjerenja korištenjem navedenih metoda opisan je u poglavlju 3.3.1. Konačni volumeni uzoraka za DLS mjerenja iznosili su 1 mL, dok su za ELS mjerenja volumeni uzoraka iznosili 10 mL. Mjerenja su provedena odmah nakon pripreme uzoraka u navedenim medijima (nulta točka, 0 sati) te nakon 1, 4 i 24 satne inkubacije.

Ispitivanje otapanja AgNP u navedenim medijima provedeno je metodom centrifugalne ultrafiltracije uz korištenje metode AAS pri čemu je praćeno otpuštanje slobodnih metalnih iona u otopinu tijekom 24 sata. Centrifugalna ultrafiltracija je metoda za razdvajanje otopljenih iona od nanočestica, te se ioni kvantificiraju korištenjem metode AAS. Separacija se provodi filtracijom suspenzije čestica preko filter membrane s veličinom pora od 0,2 do 0,45 μm. Uzorci se centrifugiraju određenom brzinom i određeno vrijeme. Ti se parametri optimiziraju kako bi se osiguralo da većina medija prođe kroz filter. Korištenje ove metode omogućuje bolju separacija u odnosu na metodu dijalize, kod koje može doći do taloženja iona na membranu (117–119).

Određivanje otapanja AgNP provedeno je u sljedećim medijima: ultračistoj vodi, ALF, AGF i DMEM sa i bez dodatka BSA. Početna koncentracija suspenzija NP bila je 10 mg Ag/L. Uzorci su inkubirani uz konstantno miješanje na sobnoj temperaturi i zaštićeni od svjetlosti. Alikvoti od 2 mL su nakon 0, 1, 4 i 24 sata pipetirani na Amicon-4 Ultra centrifugalne filtere s propusnošću 3 kDa (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka). Uzorci su potom centrifugirani 30 min na 2 200 g kako bi se razdvojile čestice AgNP od ionskog srebra. Filtrati su potom razrijeđeni s 5% HNO_3 do konačne koncentracije 10% (v/v). Koncentracija iona srebra izmjerena je primjenom AAS metode kako je prethodno opisano. Ukoliko koncentracija bila veća od najviše točke kalibracijskog pravca, uzorci su dodatno razrijeđeni s 1% HNO_3 do odgovarajuće koncentracije. Rezultati su prikazani kao postotci otopljenog srebra u odnosu na ukupan sadržaj Ag u suspenzijama AgNP prije filtracije.

3.8. Ispitivanje interakcija nanočestica i proteina

Promjene u veličini, raspodjeli veličina i ζ potencijalu ispitane su nakon interakcija NP s pojedinačnim proteinima primjenom DLS i ELS metode. Mjerenjem navedenih parametara moguće je odrediti stvaranje proteinske korone i promjene fizikalno-kemijskih svojstava NP nakon njhove interakcije s proteinima.

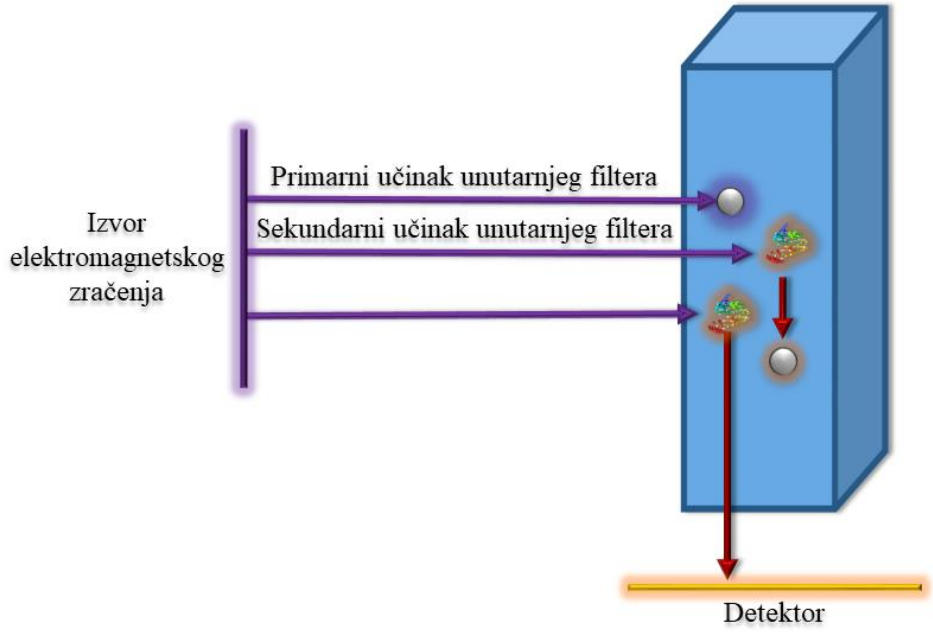
Sve vrste NP inkubirane su pri koncentracijama od 100 μM metala s pojedinačnim proteinima u koncentracijama od 1 μM u vremenu od 10 minuta u ultračistoj vodi (pH = 5,68) pri 25 °C. DLS i ELS mjerenja provedena su kako je prethodno opisano.

S obzirom na to da nano-bio interakcije ne dovode samo do promjena u fizikalno–kemijskim svojstvima NP, već utječu i na promjenu strukture samih proteina, promjene

sekundarne strukture ispitane su primjenom metode cirkularnog dikroizma. Konstante vezanja određene su metodom fluorescencijske spektroskopije primjenom Stern-Volmer modela.

Cirkularni dikroizam (engl. c*ircular dichroism*, CD) je metoda koja se koristi za ispitivanje sekundarne strukture proteina (120). U ovom doktorskom radu promjene u sekundarnim strukturama proteina nakon interakcije s NP određene su CD metodom na spektrofotometru Jasco J-810 CD (Jasco Corp., Japan). U kvarcnu kivetu (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) duljine optičkog puta 1 mm pipetirano je 5 μL uzorka. Koncentracije proteina tijekom mjerenja održavane su konstantnima na 10 μM, dok su koncentracije metala u suspenzijama NP bile 10, 50 i 100 μM. Prije svakog mjerenja, suspenzije su pomiješane s proteinima i inkubirane 10 minuta na 25 °C do postizanja dinamičke ravnoteže. Spektri su snimani pod strujom dušika u rasponu valnih duljina od 190 do 250 nm, brzinom skeniranja 100 nm/min i veličinom skeniranja 0,2 nm. Mjerenja su provedena u triplikatu, a za izračunavanje postotka pojedine proteinske strukture uzeta je srednja vrijednost svih mjerenja. Rezultati su obrađeni korištenjem BeStSel programa razvijenog od Micsonai i sur. (121).

Fluorescencijska spektroskopija vrsta je luminiscencije koja analizira fluorescencijska svojstva molekula (122). Prije određivanja konstanti vezanja između NP i proteina, provedena su preliminarna mjerenja kojima su definirani optimalni eksperimentalni uvjeti za izbjegavanje učinka unutarnjeg filtera (engl. *inner-filter effect*). Ovaj učinak podrazumjeva apsorpciju ekscitacijskog ili emisijskog zračenja od strane analita u uzorku te posljedično utječe na točnost rezultata fluorescencije. Apsorpcija ekscitacijskoga zračenja naziva se primarnim, dok se apsorpcija emisijskog zračenja naziva sekundarnim učinkom unutarnjeg filtera (123). Apsorbancija ekscitirane ili emitirane svjetlosti uzrokuje spektralna izobličenja, koja dovode do nelinearnog odnosa između intenziteta fluorescencije i koncentracije. Shematski prikaz primarnog i sekundarnog učinka unutarnjeg filtera prikazan je na Slici 7.



Slika 7. Shematski prikaz primarnog i sekundarnog učinka unutarnjeg filtera.

S obzirom na to da AgNP i AuNP apsorbiraju na određenim valnim duljinama, ustanovljen je koncentracijski raspon u kojem apsorbancija NP neće utjecati na fluorescencijska mjerenja. Ispitivanje je provedeno na način da su izmjereni ekscitacijski i emisijski spektri samih NP u koncentracijskom rasponu od 0,01 do 0,18 nM. Širine ekscitacijskog i emisijskog proreza bile su postavljene na 5,0 odnosno 10,0 nm. Uzorci samih NP ispipetirani su u kvarcnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm i ukupnog volumena 2 mL. Emisijski spektri NP snimani su nakon ekscitacije na valnoj duljini od 280 nm u rasponu valnih duljina od 290 do 450 nm. Ekscitacijski spektri NP snimani su u rasponu od 200 do 290 nm, pri čemu je valna duljina emisije bila postavljena na 350 nm. Nakon mjerenja ekscitacijskih i emisijskih spektara očitan je intenzitet fluorescencije na 280 nm (valna duljina ekscitacije proteina) i 350 nm (valna duljina maksimalnog intenziteta fluorescencije proteina) te je napravljena krivulja odnosa intenziteta fluorescencije NP na 280 nm, odnosno 350 nm i koncentracije NP. Vrijednost korelacijskog koeficijenta (r^2) veća od 0,95 bila je uvjet za potvrdu linearnosti odnosa između fluorescencije i koncentracije.

Prilikom interakcija između proteina i NP dolazi do gašenja fluorescencije proteina u ovisnosti o koncentraciji NP. Gašenje fluorescencije u ravnotežnom stanju (engl. s*teady state fluorescence quenching*) uobičajena je metoda za određivanje konstanti vezanja između molekula (124). Postoje različiti mehanizmi gašenja fluorescencije fluorofora u prisutnosti

prigušivača, među kojima su najpoznatiji statičko i dinamičko gašenje. Kod statičkog gašenja, smanjenje fluorescencije fluorofora posljedica je stvaranja nefluorescentnog kompleksa u osnovnom stanju (124). Dinamičko gašenje posljedica je prijenosa energije s fluorofora na prigušivač u ekscitiranom stanju. Pobuđivanjem fluorofora primjenom elektromagnetskog zračenja određene valne duljine, elektroni u višem energetskom stanju prenose dio energije na molekulu prigušivača. Takav prijenos energije poznat je kao fluorescencijski rezonancijski prijenos energije (engl. *fluorescence resonance energy transfer*, FRET), pri čemu molekula koja se ekscitira predaje energiju drugoj molekuli u pobuđenom stanju, koja onda emitira foton niske energije, ili gubi energiju u pobuđenom stanju kroz vibracijsku relaksaciju ili u obliku topline (122,125).

Gašenje fluorescencije može se opisati Stern-Volmerovom jednadžbom koja pruža informacije o konstantama vezanja i broju veznih mjesta (*n*), koji se naziva i Hillovim koeficijentom. Model se primjenjuje za ispitivanje interakcija između NP i proteina jer je jednostavan i osjetljiv te su principi metode dobro poznati (126).

Fluorescencijski spektri snimani su na Agilent Cary Eclipse fluorescentnom spektrofotometru (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) korištenjem kvarcne kivete (Hellma Optik GmbH, Jena, Njemačka) duljine optičkog puta 1,0 cm. Koncentracije proteina tijekom mjerenja bile su konstantne pri vrijednosti od 0,2 μM, dok su koncentracije NP bile u rasponu od 5 do 100 μM metala. Uzorci su pipetirani u tubice od 2 mL prema sljedećem redoslijedu: ultračista voda, matična otopina NP i otopina proteina te su inkubirani 10 minuta na sobnoj tempraturi. Protokol pripreme uzoraka prikazan je u Tablici 4. Širine ekscitacijskog i emisijskog proreza postavljene su na 5,0 odnosno 10,0 nm.

Tablica 4. Protokol pripreme uzoraka za mjerenje gašenja fluorescencije proteina nakon interakcije s NP. Tablica prikazuje volumen dodanog poteina (V_{PROT}) koncentracije 0,2 μM, volumen vode (V_{VODA}), početna koncentracija NP ($c_{POČ}$), konačna koncentracija NP u kiveti, volumen otopine NP (V_{NP}) te ukupni volumen (V_{UK}) smjese NP i proteina u kiveti

$c_{POČ}$/μM metala	c_{KON}/μM metala	V_{NP}/mL	V_{PROT}/mL	V_{VODA}/mL	V_{UK}/mL
0	0	0	0,02	1,98	2
500	5	0,02	0,02	1,96	2
500	10	0,04	0,02	1,94	2
500	15	0,06	0,02	1,92	2
500	20	0,08	0,02	1,90	2
500	25	0,10	0,02	1,88	2
500	40	0,16	0,02	1,82	2
500	50	0,20	0,02	1,78	2
500	60	0,24	0,02	1,74	2
500	75	0,30	0,02	1,68	2
500	100	0,40	0,02	1,58	2

Proteini su ekscitirani na valnoj duljini od 280 nm, a emisijski spektri snimani su u rasponu od 290 do 450 nm. Rezultati se obrađeni korištenjem Stern-Volmerove jednadžbe:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 c_{NP} = 1 + K_{SV} c_{NP} \quad (10)$$

gdje F i F_0 predstavljaju maksimalan intenzitet fluorescencije proteina u odsutnosti i prisutnosti NP; k_q je konstanta brzine biomolekulskog gašenja; K_{sv} je Stern-Volmerova konstanta gašenja; τ_0 je poluvrijeme fluorescencije Trp u odsutnosti prigušivača koje iznosi 5 ns; c_{NP} je molarna koncentracija NP korištenih u doktorskom radu (122,126). Koncentracija NP dobivena je iz koncentracije metala primjenom jednadžbe (1) opisane u poglavlju 3.5.

Nadalje, za određivanje logaritamske vrijednosti konstante vezanja ($\log K_b$) i broja mjesta vezanja, odnosno Hillovog koeficijenta (n) korištena je sljedeća jednadžba:

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_b + n \log c_{NP} \quad (11)$$

3.9. Ispitivanje stvaranja proteinske korone

Denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. *sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) je često primjenjivana metoda za razdvajanje proteina na osnovu njihovih molekulskih masa (127,128). Identifikacija proteina u proteinskoj koroni važna je za predviđanje biološke sudbine i ponašanja NP u biološkom mediju. Kvalitativna i kvantitativna analiza proteinske korone najčešće se provodi primjenom SDS-PAGE metode i masene spektrometrije (48,129,130). U ovom doktorskom radu identifikacija proteina u proteinskoj koroni ispitana je primjenom SDS-PAGE metode, nakon inkubacije BSA, glikoTRF i ne-glikoTRF s određenom vrstom NP i razdvajanja slobodnih proteina od proteina vezanih na površinu NP. lPEGAuNPr nisu analizirane zbog nedostatka materijala za sintezu navedenih AuNP.

3.9.1. Priprema uzoraka za analizu

NP su prije inkubacije resuspendirane u ultračistoj vodi, a proteini su otopljeni u PBS. Koncentracije svake pojedine NP odabrane su na način da se osigura podjednaka ukupna površina NP među svim uzorcima, u jednakom volumenu uzorka. Ispitivane vrste NP, njihove koncentracije u reakcijskoj smjesi, kao i konačne ukupne površine prikazane su u Tablici 5. Cilj je bio postići konstantan omjer ukupne površine NP prema volumenu dodanih proteina, budući da koncentracijski omjeri ovise o veličini i obliku NP. Konačne koncentracije svih proteina u reakcijskoj smjesi iznosile su 20 g/L. Na taj način je omogućeno vezanje proteina na površinu NP samo s obzirom na njihov afinitet za određenu vrstu NP. Osim inkubacije smjese proteina s jednom vrstom NP, određena je i koncentracija proteina u proteinskoj koroni nakon inkubacije pojedinačnih proteina s pojedinom vrstom NP. U tom su pokusu koncentracije pojedinačnih proteina iznosile 20 g/L, a korištene koncentracije NP prikazane su u Tablici 5.

Tablica 5. Površina jedne NP (A_{1NP}) te koncentracija (c_{NP}), broj (N_{NP}) i ukupna površina (A_{NP}) različitih AgNP i AuNP inkubiranih s proteinima za analizu koncentracije i sastava proteinske korone.

vrsta NP	c_{NP}/**μM metala**	A_{1NP}/**nm^2**	c_{NP}/**pM**	N_{NP} **x 10^{13}/L^{-1}**	A_{NP} **x 10^{17}/nm^{2}L^{-1}**
sPVPAgNP	16	281,15	616	37,11	1,04
lPVPAgNP	12	161,66	1052	63,36	1,02
GSHAgNP	18	383,75	435	26,18	1,00
GSHAuNP	85	7260,93	25	1,50	1,09
CITAgNP	85	7885,43	22	1,33	1,05
sCITAuNP	22	539,13	317	19,07	1,03
mCITAuNP	60	4071,50	42	2,51	1,02
lCITAuNP	100	11277,93	15	0,91	1,02
PEGAgNP	90	8718,58	20	1,21	1,05
PEGAuNP	62	4003,93	44	2,66	1,06
PEGAuNR	200	3597,31	49	2,97	1,07
sPEGAuNPr	37	16831,65	11	63,40	1,07
mPEGAuNPr	38	23445,57	8	0,45	1,06

Oba pokusa provedena su na jednak način kako je dalje opisano, s tim da proteinska korona dobivena inkubacijom pojedinačnih proteina s NP nije analizirana SDS-PAGE metodom, nego je koncentracija proteina određena primjenom testa s bicinkoničnom kiselinom (engl. *bicinchoninic acid*, BCA) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Njemačka). Uzorci su inkubirani u ukupnom volumenu od 1 mL i preneseni na NanoSep centrifugalne filtere s propusnošću 100 kDa (Pall Corporation, New York, SAD), te su centrifugirani 30 minuta na 14 000 *g*. Filtrat u kojem su se nalazili slobodni proteini je odbačen, a zaostale čestice NP s proteinskom koronom su potom isprane s 1 mL PBS i ponovno centrifugirane 30 minuta na 14 000 *g*. Filtrat je ponovno odbačen, a zaostale čestice NP s proteinskom koronom su resuspendirane u 3,5% (m/v) SDS i zagrijavane 5 minuta na 95 ºC. Uzorci su potom ponovno filtrirani, a koncentracija proteina iz proteinske korone izmjerena je u filtratu primjenom BCA testa prema uputama proizvođača. Nakon određivanja ukupne koncentracije proteina u proteinskoj koroni, uzorci proteina su preneseni na gel i analizirani metodom SDS-PAGE.

Uzorci u kojima je koncentracija ukupnih proteina bila veća od 3 g/L razrijeđeni su prije stavljanja na gel u ultračistoj vodi.

3.9.2. Postupak pripreme gela i provođenje elektroforeze

Odvajanje proteina provedeno je u razdvajajućem gelu (12% bisakrilamid) ukupnog volumena 20 mL, dok je sabijanje proteina provedeno u sabijajućem gelu (5% akrilamid) ukupnog volumena 5 mL. Sastav gela i volumeni pojedinih sastojaka prikazani su u Tablici 6. Sastojci gela su poredani prema redoslijedu dodavanja u staklenu čašu. Nakon dodavanja svih sastojaka, gel u tekućem stanju izlije se između dva stakla za elektroforezu. Prvo se izlije razdvajajući gel te se pusti da se polimerizira 20 minuta. Nakon polimerizacije razdvajajućeg gela, doda se sabijajući gel i postavi se češalj. Debljina gela je iznosila 0,75 mm. Nakon polimerizacije i sabijajućeg gela, aparatura s gelom premjesti se u hladnjak na +4 ºC tijekom noći.

Tablica 6. Postupak pripreme sabijajućeg (5%) i razdvajajućeg (12%) gela uz sastav i volumene pojedinih sastojaka. Sastojci su poredani prema redoslijedu dodavanja.

sabijajući gel	***V*/mL**	**razdvajajući gel**	***V*/mL**
destilirana voda	3,400	destilirana voda	6,600
30% akrilamid / bisakrilamid	0,830	30**%** akrilamid / bisakrilamid	8,000
0,5 M Tris pufer pH 6,8	0,630	1,5 M Tris pufer pH 8,8	5,000
10% SDS	0,050	10% SDS	0,200
10% APS	0,050	10% APS	0,200
TEMED	0,005	TEMED	0,008

Idući dan uzorci filtrata pomiješani su u volumnom omjeru 4:1 sa SDS puferiranom otopinom za uzorke. 10 µL tako pripremljenog uzorka nanosilo se u zasebne jažice na gelu. U prvu i posljednju jažicu se nanese 10 µL Precision plus protein all blue standarda, koji omogućuje praćenje elektroforeze i određivanje veličine proteinskih vrpci. Nakon dodavanja pufera za provođenje elektroforeze u kadicu započeta je elektroforeza koja je trajala 16 sati na

135 V. Nakon provođenja elektroforeze, gel se isprao s 200 mL destilirane vode 3 puta po 5 minuta. Gel se nakon ispiranja bojao dodavanjem 50 mL Comassie blue reagensa i inkubirao 60 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije boja se odbacuje, a gel je odbojan u destiliranoj vodi 60 minuta. Voda se nakon odbojavanja odbacuje, a na gelu se vide razdvojene plavo obojene vrpce proteina.

3.9.3. Ekstrakcija proteina iz gela

Proteinske vrpce iz gela izrezane su korištenjem čistog skalpela i premještene u čiste tubice prethodno isprane s 50% ACN i 0,1% TFA. Gelu je dodano 0,2 mL 100 mM amonijevog hidrogenkarbonata (NH_4HCO_3) / 50% ACN kako bi se proteinske vrpce odbojale. Ovaj postupak je ponovljen dva puta, a nakon svakog dodavanja otopine za odbojavanje uzroci su inkubirani 45 minuta na 37 °C. Nakon odbojavanja, gel je dehidriran dodavanjem 100 µL 100% ACN i inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi. Veličina gela se zbog dehidriranja smanjila, a gel je pobijelio ili postao gotovo proziran. Uzorci su potom sušeni u vakuumu tijekom 30 do 45 minuta, kako bi se uklonio ACN. Tripsin je pripremljen prema uputama proizvođača, otapanjem u 50 mM octenoj kiselini do konačne koncentracije 1 µg/µL. Alikvoti tripsina spremljeni su na -70 ºC. Prije upotrebe alikvoti su razrijeđeni s 40 mM NH_4HCO_3/10% ACN na 20 µg/mL. Uzorci gela su inkubirani s 15 µL tripsina na sobnoj temperaturi tijekom jednog sata. Nakon inkubacije doda se dovoljno pufera za digestiju (40 mM NH_4HCO_3/10% ACN) da u potpunosti pokrije gel te se inkubira tijekom noći na 37 °C. Idući dan uzorcima se dodalo 150 µL ultračiste vode te su inkubirani tijekom 10 minuta uz često vorteksiranje na sobnoj temperaturi. Ekstrahirana otopina se odvoji od gela i spremi u čistu tubicu, a na gel se doda 50 µL 50% ACN / 5% TFA i inkubira se 60 minuta na sobnoj temperaturi. Postupak se ponovi dva puta, a svi sakupljeni ekstrakti se povežu i suše u vakuumu 3 do 4 sata. Nakon sušenja proteini se nalaze u kristaliničnom obliku i skladište se na -70 °C.

3.9.4. Određivanje koncentracije proteina bicinkoničnom kiselinom

Princip određivanja koncentracije proteina s BCA temelji se na stvaranju kompleksa Cu^{2+}-protein pri lužnatim uvjetima nakon čega slijedi redukcija Cu^{2+} u Cu^{+} pomoću cisteina, cistina, triptofana, tirozina i peptidne veze (131). Nastali Cu^{+} tvori ljubičasto-plavi kompleks s BCA što omogućuje praćenje smanjenja apsorbancije Cu^{2+}-protein kompleksa.

Uzorci proteina u kristaličnom obliku su razrijeđeni s 500 µL PBS, a za određivanje koncentracije proteina u uzorcima korišten je BCA test (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka). Na pločicu je naneseno 150 µL razijeđenog uzroka i dodano 150 µL radnog reagensa pripremljenog prema uputama proizvođača te su uzorci inkubirani 60 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije apsorbancija je izmjerena na 562 nm, a koncentracija proteina dobivena je usporedbom sa kalibracijskom krivuljom. Linearnost testa prema poizvođaču je bila u rasponu od 0,5 do 30 mg/L.

3.10. Statistička obrada rezultata

Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni računanjem aritmetičke sredine kao mjere središnjice te standardne devijacije kao mjere rasapa. Rezultati dobiveni metodama TEM, ELS, fluorescencijske spektroskopije i CD obrađeni su deskriptivnim postupcima (grafički prikazi i tablice). Svi rezultati dobiveni primjenom metoda TEM, CD i fluorescencijske spektroskopije analizirani su primjenom statističke metode Pearsonove korelacije u programu Statistica Software 13.5.0.17 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, USA). Statistička značajnost korelacije dobivenih rezultata mjrenja određena je pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije (r) i razine značajnosti (p). Korelacije su se smatrale značajnima ako je razina značajnosti $p < 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Karakterizacija sintetiziranih nanočestica

Sve novosintetizirane NP karakterizirane su primjenom UV-Vis spektroskopije, te DLS, ELS, TEM metoda. Podaci o d_{TEM} i d_H vrijednostima, raspodjeli veličina, ζ potencijalu i *SSA* vrijednostima prikazani su u Tablici 7. Raspodjele veličina prema intenzitetu raspršenog zračenja AgNP i AuNP prikazane su na slikama 36 i 37. u poglavlju 7. Rezultati ζ potencijala radi lakše usporedbe između pojedinih NP, dodatno su prikazani na Slici 8. Kako je prije navedeno, oblik i d_{TEM} svih novosintetiziranih NP analizirani su primjenom TEM metode, a dobivene TEM slike različitih NP prikazane su na Slikama 9 i 10. TEM slike pokazale su da su svi ispitivani NP bili ciljanog oblika.

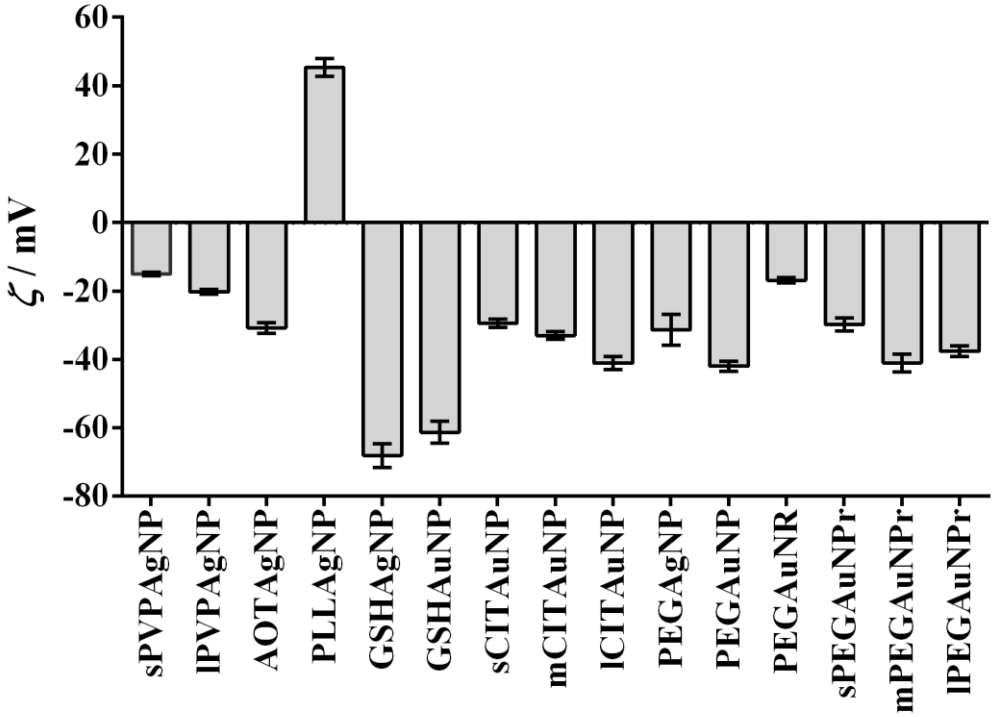
DLS mjerenja pokazala su da su d_H vrijednosti za sPVPAgNP i lPVPAgNP veće od d_{TEM} vrijednosti što je očekivano obzirom da DLS tehnika uzima u obzir i volumen omotača i solvatacijsku ljusku. Rezultati za d_{TEM} dobiveni za male AOTAgNP i PLLAgNP pokazali su da su im vrijednosti primarnog promjera bile u dobroj korelaciji s ciljanim vrijednostima i iznosili su 7,8 nm za AOTAgNP, odnosno 8,4 nm za PLLAgNP. Prema rezultatima obje vrste NP obloženih s GSH (GSHAgNP i GSHAuNP), kao i CITAgNP imale su bimodalnu raspodjelu veličina. Kod GSHAgNP i GSHAuNP suspenzija, prema DLS mjerenjima, prevladavale su male NP prosječnih d_H vrijednosti od 4,7 ± 2,3 nm, odnosno 8,4 ± 2,1 nm. AOTAgNP i PLLAgNP su bile prosječnih d_H vrijednosti od 3,4 ± 1,6 nm i 8,5 ± 4,5 nm. Analizom TEM slika potvrđeno je da je riječ o malim NP. Bimodalna raspodjela veličina dobivena je za sPVPAgNP, pri čemu je utvrđeno da je 70% NP imalo prosječnu d_H vrijednost od 48,2 ± 0,3 nm. Međutim, određivanjem d_{TEM} vrijednosti iz TEM slika ustanovljeno je da su navedene NP ipak bile manje veličine (11,1 ± 2,5 nm), što bi moglo ukazivati na agregaciju NP. Monomodalna raspodjela veličina dobivena je za male, srednje i velike CITAuNP. Veličina navedenih NP je bila približna ciljnoj vrijednosti, što je potvrđeno određivanjem njihovih d_{TEM} vrijednosti. Također, monomodalna raspodjela veličina dobivena je i za NP stabilizirane s PEG, te za AuNR i AuNPr. Prema TEM slikama najmanji prosječni d_{TEM} dobiven je za GSHAuNP (7,2 ± 1,8 nm), dok su lPEGAuNPr imale najveći prosječni d_{TEM} od 197,4 ± 55,4 nm. DLS mjerenja su pokazala da su lPEGAuNPr imale najveću veličinu, koja je bila monomodalna s prosječnom d_H vrijednosti od 240,9 ± 9,3 nm.

Tablica 7. Hidrodinamički promjer (d_H) dobiven iz raspodjele veličina po intenzitetu DLS metodom, vrijednosti zeta (ζ) potencijala dobivene ELS metodom, primarni promjer (d_{TEM}) dobiven iz TEM slika korišten za izračunavanje specifične površine (*SSA*) različitih vrsta AgNP i AuNP. Sva mjerenja su provedena pri 25 °C i koncentraciji NP od 10 mg metala/L u ultračistoj vodi (pH = 5,68).

vrsta NP	d_H**/nm (%)**	ζ**/mV**	d_{TEM}**/nm**	***SSA*/m^{2}g^{-1}**
sPVPAgNP	48,2 ± 0,3 (70) 5,3 ± 0,1 (30)	-15,0 ± 0,5	11,1 ± 2,5	51,8
lPVPAgNP	130,2 ± 1,6 (100)	-20,3 ± 0,7	48,1 ± 8,7	11,9
AOTAgNP	3,4 ± 1,6 (100)	-30,8 ± 1,6	7,8 ± 4,4	73,3
PLLAgNP	8,5 ± 4,5 (100)	45,4 ± 2,6	8,4 ± 4,7	68,1
GSHAgNP	4,7 ± 2,3 (95) 175,9 ± 29,5 (5)	-68,1 ± 3,4	9,5 ± 4,0	60,5
GSHAuNP	8,4 ± 2,1 (68) 65,1 ± 13,8 (32)	-61,3 ± 3,2	7,2 ± 1,8	43,3
CITAgNP	76,4 ± 1,5 (93) 12,1 ± 4,9 (7)	-29,4 ± 1,2	50,1 ± 7,6	11,4
sCITAuNP	46,9 ± 1,7 (100)	-44,8 ± 1,0	13,1 ± 2,7	23,7
mCITAuNP	61,5 ± 0,6 (100)	-33,0 ± 1,1	36,0 ± 7,0	8,6
lCITAuNP	82,9 ± 0,8 (100)	-41,1 ± 1,9	60,0 ± 7,4	5,2
PEGAgNP	108,8 ± 28,8 (100)	-31,3 ± 4,5	52,7 ± 6,5	10,9
PEGAuNP	64,2 ± 0,8 (100)	-42,0 ± 1,4	35,7 ± 7,3	8,7
PEGAuNR	154,9 ± 14,1 (100)	-16,9 ± 0,8	77,3 ± 17,7[a] 13,5 ± 2,7[b]	16,7
sPEGAuNPr	123,9 ± 1,4 (100)	-41,0 ± 2,6	125,0 ± 19,8	14,4
mPEGAuNPr	187,7 ± 6,8 (100)	-29,7 ± 1,9	149,5 ± 42,8	13,9
lPEGAuNPr	240,9 ± 9,3 (100)	-37,6 ± 1,5	197,4 ± 55,4	13,3

[a] duljina NR [b] širina NR

Prema navedenom možemo zaključiti da su vrijednosti d_H za većinu NP bile veće od vrijednosti primarnih veličina dobivenih pomoću TEM slika (d_{TEM}). Takvi rezultati su očekivani s obzirom na to da d_H vrijednost osim primarne veličine NP, uključuju i veličinu solvatacijske ovojnice (opisano u Materijalima i metodama). Možemo zaključiti da su sve sintetizirane NP bile približno ciljanih veličina s obzirom na njihove d_{TEM} vrijednosti.

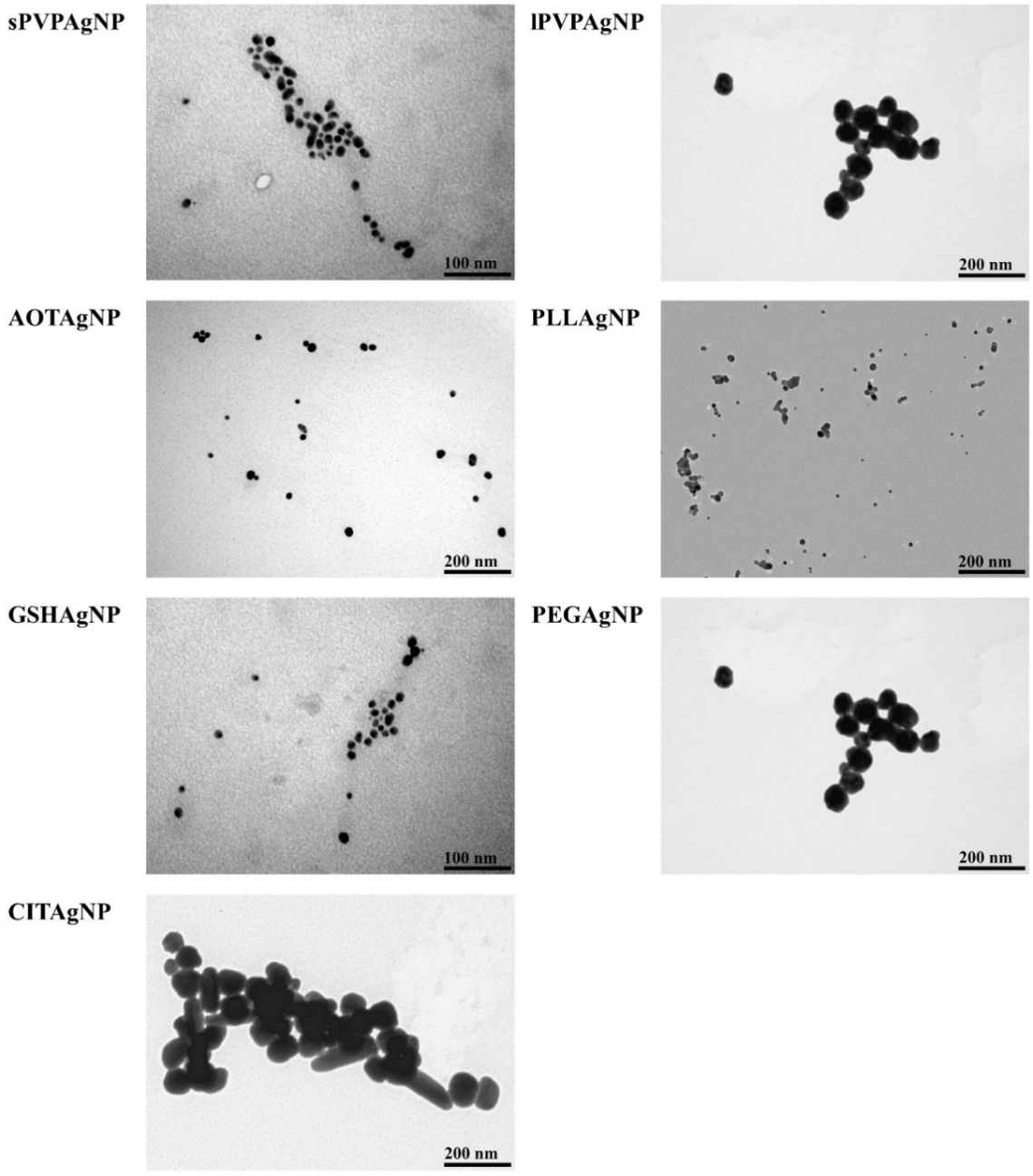


Slika 8. Vrijednosti zeta (ζ) potencijala za AgNP i AuNP dispergiranih u ultračistoj vodi (pH = 5,68) pri 25 °C i koncentraciji NP od 10 mg metala/L.

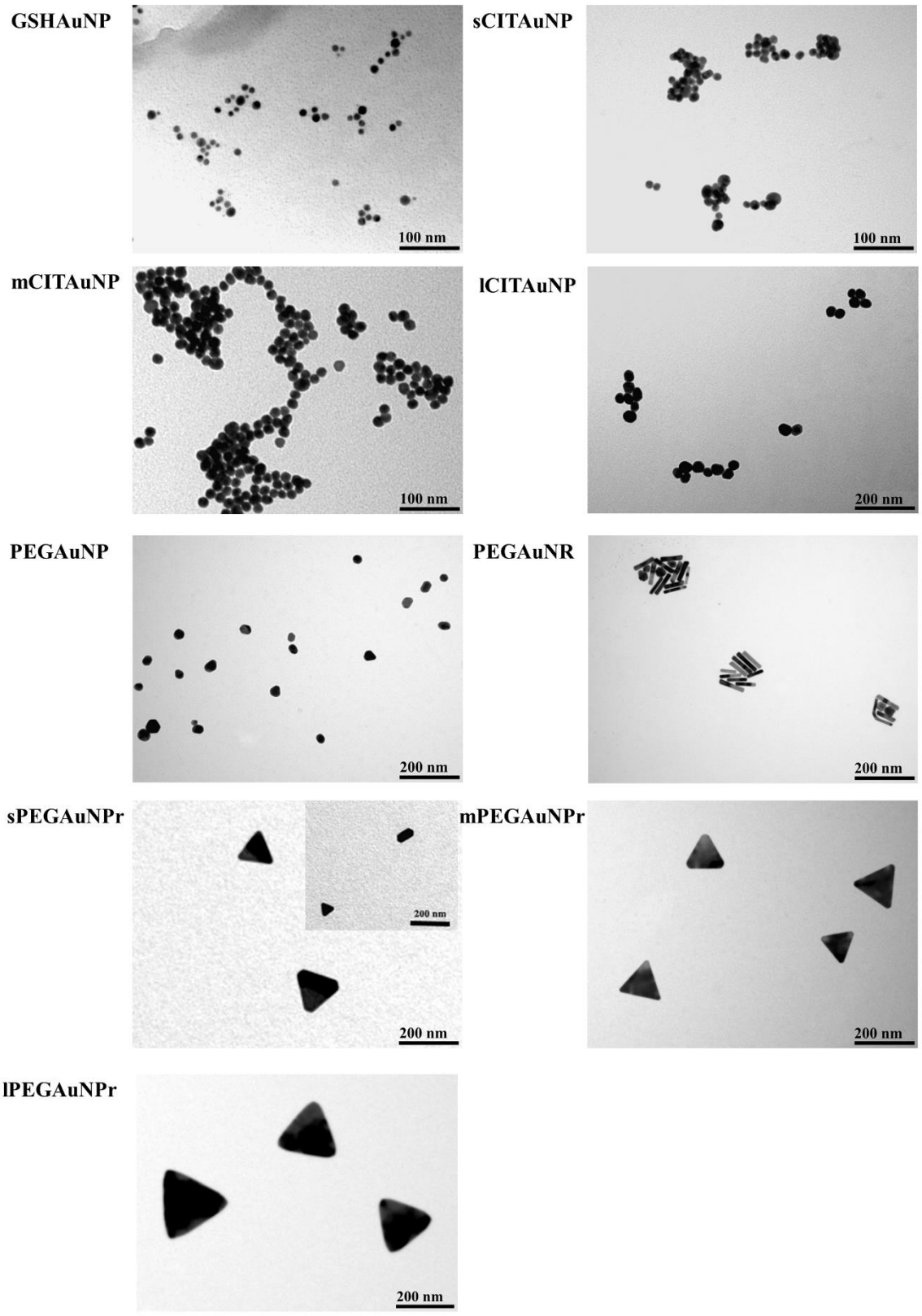
Rezultati dobiveni ELS metodom pokazali su da su sve ispitane NP, osim PLLAgNP, bile negativno nabijene s vrijednostima ζ potencijala u rasponu od -68,1 mV do -15 mV, što je bilo u skladu s prirodom omotača na njihovoj površini. Jedino za PLLAgNP je vrijednost ζ potencijala bila pozitivna i iznosila je 45,4 mV, kako je i očekivano budući da je PLL pozitivno nabijen polimer pri eksperimentalnim uvjetima (132). Nadalje, možemo primjetiti da je u slučaju GSHAgNP izmjerena manja d_H vrijednost u odnosu na $d_{TEM.}$ Naime, velika negativna vrijednost ζ potencijala, može dovesti do odbijanja NP u otopini te posljedično utjecati na brzinu njihovog gibanja, što dovodi do gubitka nasumičnog gibanja NP što utječe na DLS mjerenja.

PVP je nenabijeni polimer te njegova primjena rezultira sintezom nenabijenih AgNP. Nanočestice sa ζ potencijalom u rasponu od -10 mV do +10 mV smatraju se približno nenabijenima (133). Međutim, sPVPAgNP i lPVPAgNP imale su negativnu vrijednost ζ potencijala, što se može pripisati BH_4^- anionima vezanima na površinu AgNP. Preciznije rečeno, PVPAgNP sintetizirane su redukcijom $AgNO_3$ u prisutnosti $NaBH_4$. Moguće je da tijekom nukleacije, BH_4^- anioni pružaju dodatnu elektrostatičku stabilnost AgNP i pridonose

ukupnom ζ potencijalu NP. Očito je da PVP polimer ne može zamijeniti sve navedene anione tijekom rasta PVPAgNP.



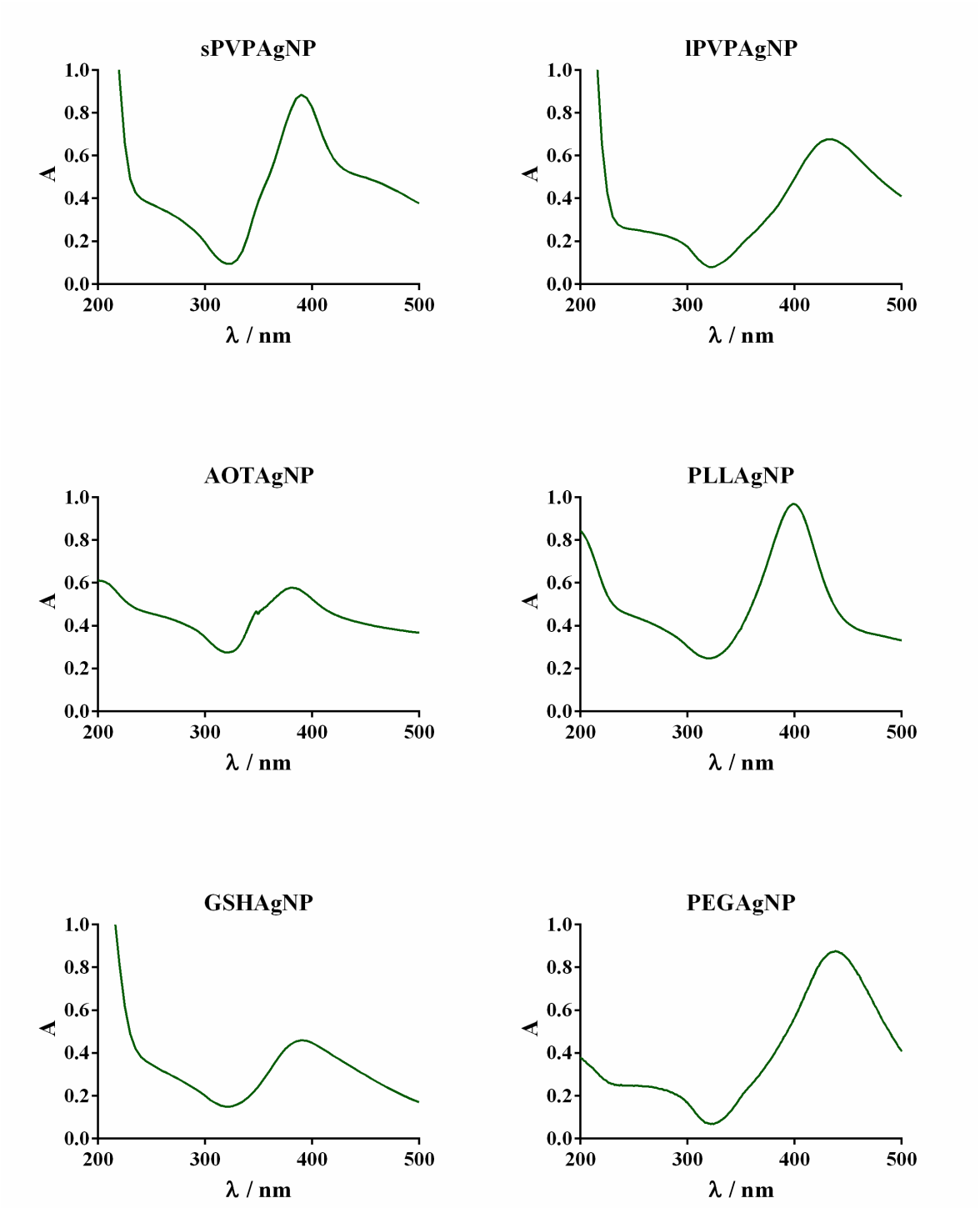
Slika 9. TEM slike različitih AgNP u ultračistoj vodi (pH = 5,68) pri 25 °C i koncentraciji od 30 mg metala/L.



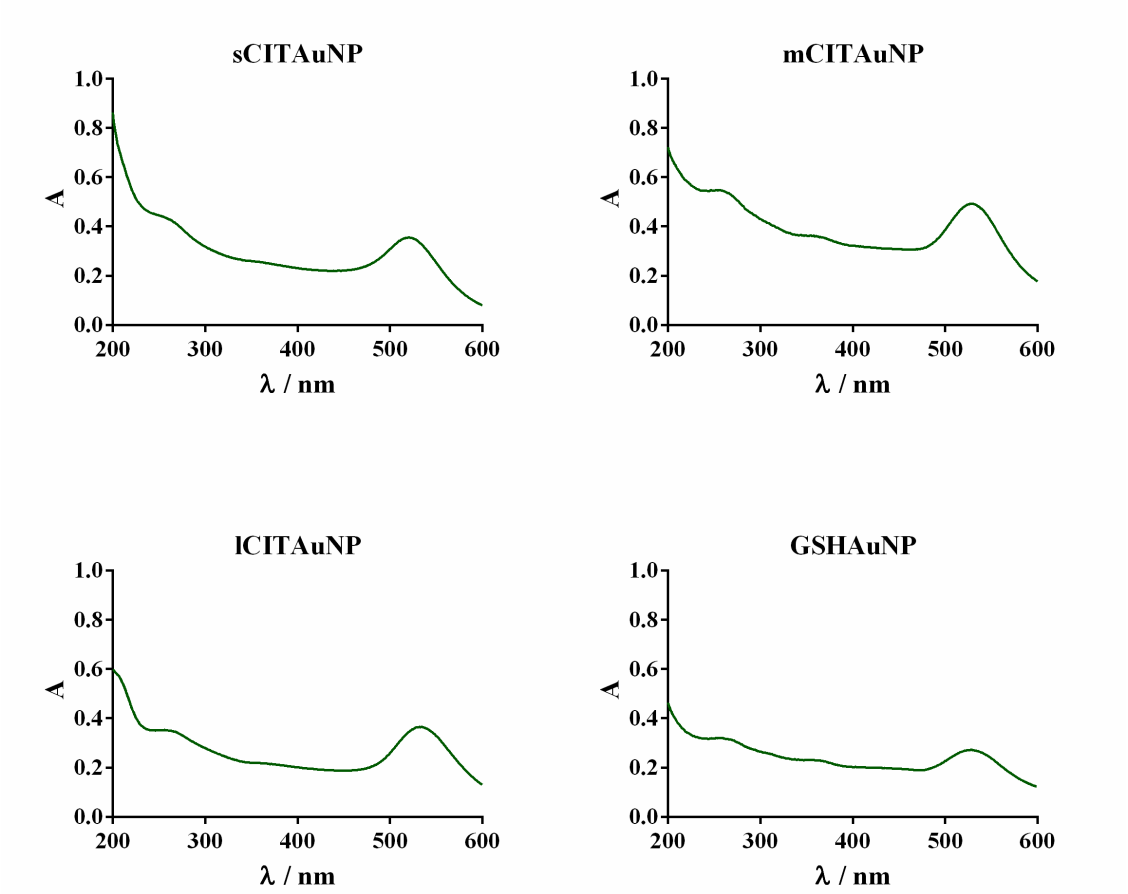
Slika 10. TEM slike različitih AuNP u ultračistoj vodi (pH = 5,68) pri 25 °C i koncentraciji od 30 mg metala/L.

Dodatna karakterizacija provedena je korištenjem UV-Vis metode, pri čemu su izmjereni spektri ispitivanih NP u rasponu valnih duljina od 200 do 500 nm za AgNP i od 200 do 600 nm za AuNP. Poznato je da se NP odlikuju karakterističnim SPR pikom u UV-Vis spektru (134). Sve analizirane NP imale su karakterističan pik apsorbancije, koji je za AgNP bio u rasponu od 390 do 440 nm, odnosno od 500 do 550 nm za AuNP, kako je prikazano na Slikama 11, 12 i 13. Položaj pika u UV-Vis spektru može ukazivati na veličinu čestica za plazmonske materijale, odnosno Ag i Au, ali to je primjenjivo samo ako su čestice monodisperzne i sferičnog oblika (135). Manje NP imaju pik na manjim valnim duljinama, budući da je potrebna veća energija za rezonanciju elektrona na njihovoj površini. Iz Slike 12 je vidljivo da je u slučaju sPVPAgNP pik apsorbancije na manjoj valnoj duljini, u odnosu na lPVPAgNP.

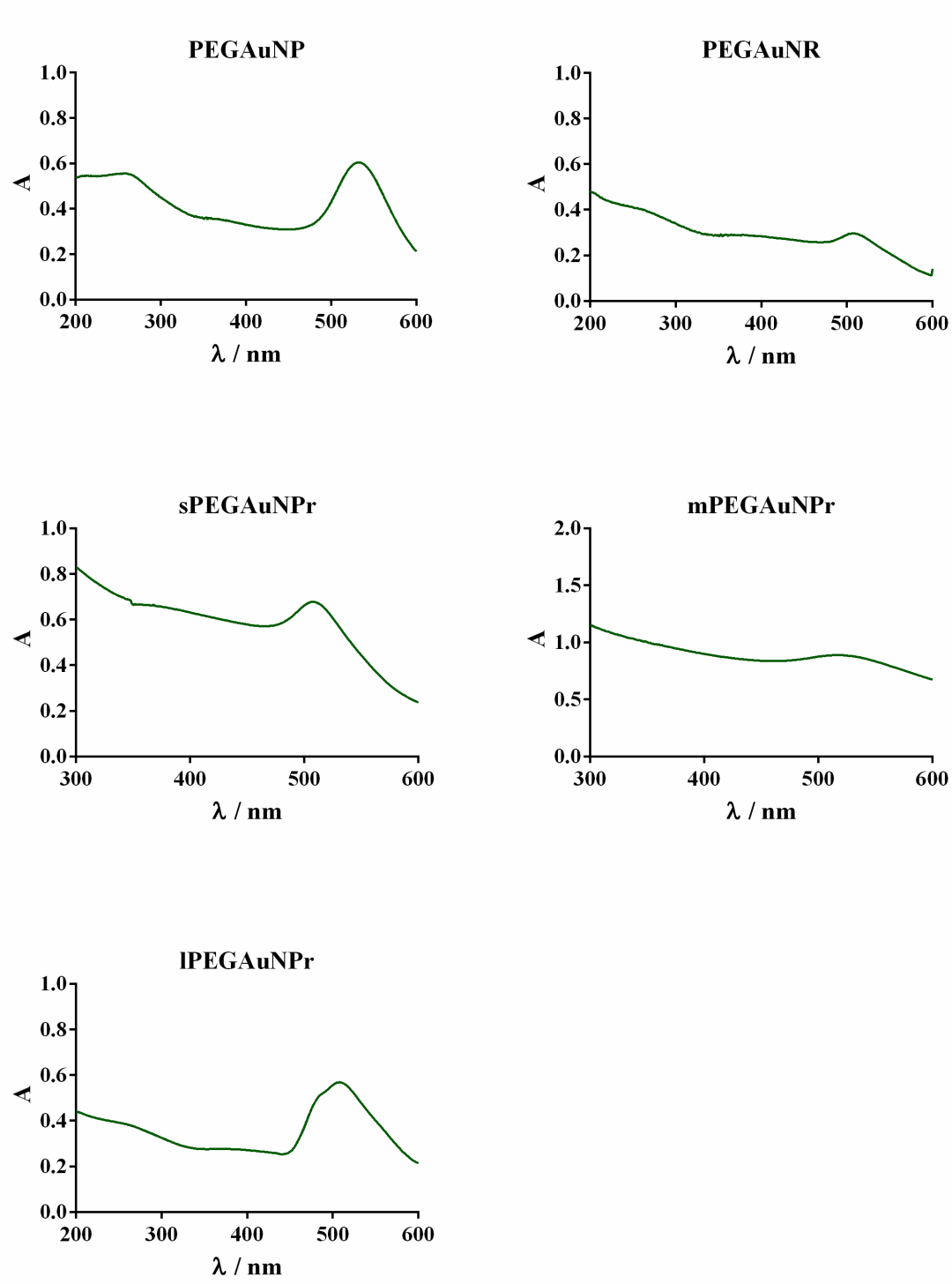
SPR signal za AuNP također ovisi o njihovoj veličini i nalazi se u rasponu valnih duljina od 500 do 600 nm (136). Sve ispitane AuNP su imale pik u navedenom rasponu, s tim da se kod sferičnih CIT stabiliziranih AuNP valna duljina SPR signala smanjivala sa smanjenjem veličine čestica (Slika 13). *SSA* vrijednost je za sferične NP izračunata kao površina sfere podijeljena s masom jedne čestice, dok je površina štapićastih i prizmičnih izračunata kao površina kvadra i pravilne trostrane prizme (opisano u odjeljku Materijali i metode). Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 7. Vrijednosti *SSA* bile su veće za sferične NP s manjim promjerom u odnosu na *SSA* vrijednosti NP s većim promjerom. Najveća vrijednost *SSA* opažena je za GSHAgNP, a najmanja za lCITAuNP. Unatoč različitoj veličini, sve prizmične AuNPr imale su vrlo slične vrijednosti *SSA*, koje su bile tek nešto manje od vrijednosti izračunate za PEGAuNR.



Slika 11. UV-Vis spektri AgNP stabiliziranih s PVP, AOT, PLL, GSH i PEG. Spektri su izmjereni u ultračistoj vodi (pH = 5,68) pri 25°C i koncentraciji metala od 100 µM u rasponu valnih duljina (λ) od 200 do 500 nm.



Slika 12. UV-Vis spektri AuNP stabiliziranih s GSH, te triju AuNP stabiliziranih sa CIT različitih veličina: malih (s), srednjih (m) i velikih (l). Spektri su izmjereni u ultračistoj vodi (pH = 5,68) pri 25°C i koncentraciji metala od 100 μM u rasponu valnih duljina (λ) od 200 do 600 nm.



Slika 13. UV-Vis spektri AuNP stabiliziranih s PEG različitih oblika i veličina: malih (s), srednjih (m) i velikih (l). Spektri su izmjereni u ultračistoj vodi (pH = 5,68) pri 25°C i koncentraciji metala od 100 µM u rasponu valnih duljina (λ) od 200 do 600 nm.

4.2. Određivanje stabilnosti odabranih nanočestica u biološkim medijima

Ispitivanje stabilnosti sPVPAgNP, AOTAgNP i PLLAgNP provedeno je u različitim modelnim otopinama. Primjena medija kao što su AGF, ALF i DMEM omogućuje procjenu stabilnosti i mogućih transformacija NP nakon njihove intravenozne ili gastrointestinalne primjene. Nadalje, ponašanje AgNP ispitivano je u DMEM mediju bez i uz dodatak BSA. Podaci o raspodijeli veličina i d_H vrijednostima različitih AgNP u ispitivanim medijima prikazani su u Tablici 8. Rezultati su pokazali da postoje razlike u ponašanju, odnosno agregaciji različitih AgNP ovisno o vrsti medija.

Porast u prosječnim d_H vrijednostima uočen je kod svih AgNP u odnosu na vrijednosti izmjerene u ultračistoj vodi, što ukazuje na moguće procese destabilizacije i agregaciji. Agregacija AOTAgNP uočena je u medijima većih ionskih jakosti, odnosno u AGF i ALF medijima. Kada je riječ o PLLAgNP moguća agregacija primijećena je u ALF mediju zbog porasta d_H vrijednosti. Međutim, navedene NP su se pokazale stabilnima u AGF mediju u kojem nije došlo do promjena d_H vrijednosti niti nakon 24 satne inkubacije. Rezultati za sPVPAgNP su pokazali da su navedene NP najstabilnije u svim medijima tijekom 24 satne inkubacije u odnosu na AOTAgNP i PLLAgNP.

Nadalje, možemo zaključiti da je primijećena agregacija i destabilizacija NP u medijima većih ionskih jakosti, kao što su AGF i ALF. Takvo ponašanje se može pripisati elektrostatskom odbijanju između NP zbog kompleksacije s protuionima prisutnima u navedenim medijima (99,137). Proces agregacije primijećen je u DMEM mediju za sve NP. Međutim, porast d_H vrijednosti nije uočen nakon dodatka BSA u DMEM, što ukazuje na to da je prisutnost proteina u ovom mediju spriječila agregaciju AgNP zbog formiranja proteinske korone na površini NP (47,99,138,139).

Izmjerene vrijednosti ζ potencijala sPVPAgNP, AOTAgNP i PLLAgNP nakon inkubacije u odabranim medijima prikazane su u Tablici 9. ELS mjerenja su potvrdila destabilizaciju različitih AgNP u ispitivanim medijima.

Tablica 8. Hidrodinamički promjer (d_H/nm) i raspodjela veličina po intenzitetu (%) za AgNP stabilizirane s PVP, AOT i PLL nakon inkubacije od 1, 4 i 24 sata (h) u odabranim medijima pri 25 ºC i koncentraciji NP od 10 mg metala/L.

vrsta NP	**vrijeme /h**	**medij**				
		ultračista voda	**DMEM**	**DMEM + BSA**	**ALF**	**AGF**
sPVP AgNP	1	5,0 ± 1,2 (100)	506,6 ± 141,2 (69) 20,7 ± 0,1 (13) 68,7 ± 11,7 (18)	5,8 ± 1,6 (93) 31,2 ± 4,2 (7)	7,4 ± 1,2 (100)	9,2 ± 2,1 (100)
	4		846,4 ± 99,8 (100)	4,9 ± 1,4 (90) 33,6 ± 2,3 (10)	7,1 ± 0,9 (100)	10,6 ± 2,0 (80)
	24		860,3 ± 262,6 (100)	5,6 ± 1,3 (95) 32,7 ± 5,4 (5)	6,8 ± 0,6 (100)	10,6 ± 2,0 (80) 3,9 ± 0,1 (13) 70,6 ± 5,9 (7)
AOT AgNP	1	3,4 ± 1,6 (100)	946,4 ± 20,3 (100)	8,6 ± 2,3 (82) 267,2 ± 43,4 (18)	748,7 ± 97,5 (100)	811,5 ± 48,7 (100)
	4		887,2 ± 152,7 (100)	9,2 ± 3,7 (88) 527,3 ± 144,5 (12)	758,7 ± 103,5 (100)	762,7 ± 140,6 (100)
	24		753,8 ± 148,4 (92) 101,1 ± 10,1 (8)	8,9 ± 3,4 (100)	356,1 ± 141,2 (100)	644,0 ± 170,3 (100)
PLL AgNP	1	8,5 ± 4,5 (100)	499,4 ± 135,0 (100)	8,9 ± 2,8 (91) 58,2 ± 4,8 (9)	978,1 ± 28,0 (100)	4,4 ± 0,6 (86) 30,7 ± 0,6 (14)
	4		907,7 ± 13,2 (100)	9,6 ± 4,2 (82) 45,4 ± 5,7 (18)	755,2 ± 120,5 (100)	4,0 ± 0,5 (33) 7,1 ± 1,7 (35) 63,6 ± 4,8 (42)
	24		635,1 ± 162,1 (100)	9,6 ± 2,2 (92) 59,2 ± 7,8 (8)	19,6 ± 0,1 (10) 47,4 ± 7,8 (13) 363,7 ± 42,1 (77)	4,8 ± 1,0 (100)

Tablica 9. Zeta (ζ) potencijal AgNP stabiliziranih s PVP, AOT i PLL nakon inkubacije od 1, 4 i 24 sata (h) u odabranim medijima pri 25 ºC i koncentraciji NP od 10 mg metala/L.

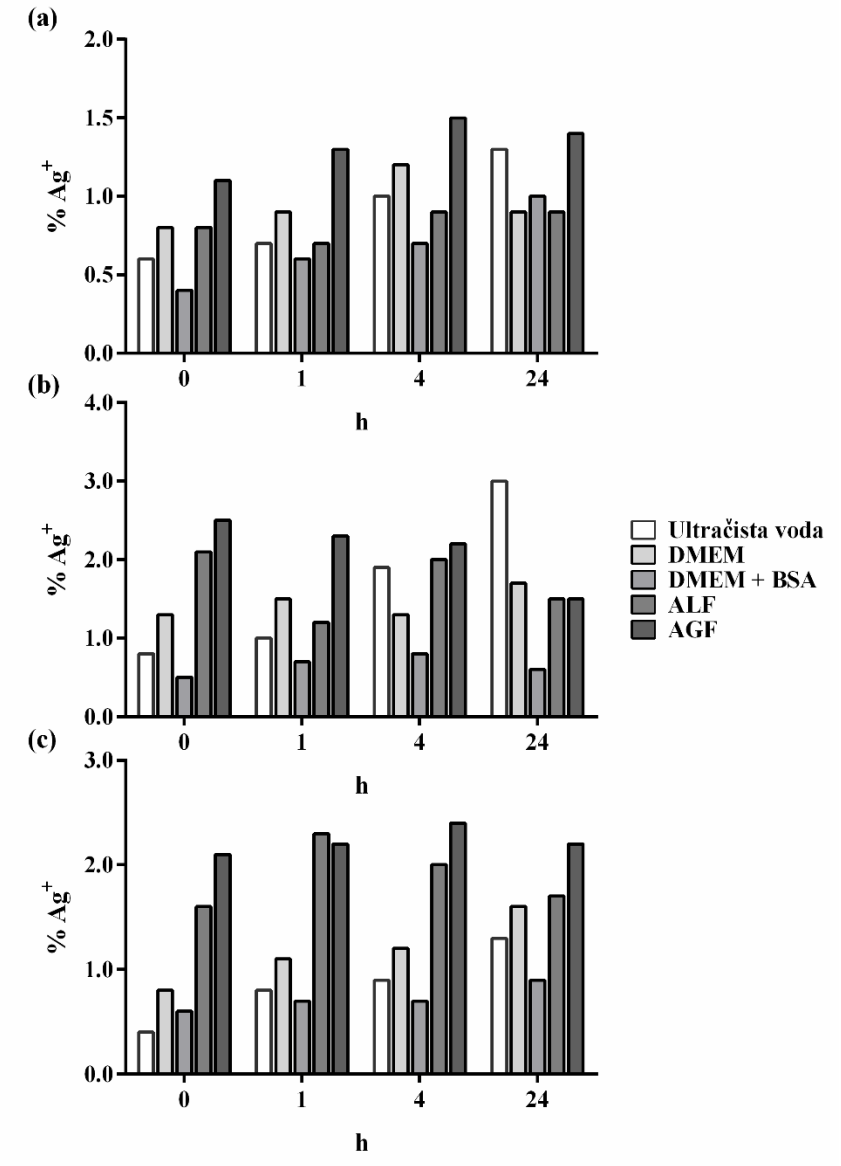
vrsta NP	vrijeme /h	medij				
		ultračista voda	DMEM	DMEM + BSA	ALF	AGF
sPVP AgNP	1	-24,3 ± 1,3	-8,2 ± 0,4	-18,2 ± 4,1	-8,6 ± 1,0	0,1 ± 0,9
	4		-21,7 ± 0,5	-17,2 ± 3,8	-10,9 ± 1,2	0,4 ± 1,5
	24		-22,2 ± 0,8	-18,1 ± 2,6	-9,2 ± 0,9	0,6 ± 0,8
AOT AgNP	1	-38,6 ± 6,1	-21,7 ± 0,6	-18,7 ± 2,4	-16,9 ± 0,9	12,9 ± 1,9
	4		-24,5 ± 0,7	-20,4 ± 3,7	-19,4 ± 1,0	12,4 ± 2,5
	24		-22,9 ± 1,1	-21,2 ± 3,2	-16,6 ± 0,5	6,7 ± 0,4
PLL AgNP	1	44,9 ± 1,4	24,8 ± 1,5	20,4 ± 4,2	-8,3 ± 0,7	22,9 ± 1,3
	4		24,4 ± 1,8	21,4 ± 1,7	-8,1 ± 0,3	30,3 ± 1,8
	24		23,3 ± 1,0	22,7 ± 2,5	-8,3 ± 0,4	25,9 ± 1,0

S obzirom na to da ALF i AGF imaju manju pH vrijednosti u odnosu na ultračistu vodu, očekivano su vrijednosti ζ potencijala postale manje negativne za sPVPAgNP i AOTAgNP. To je moguće objasniti zbog vezanja pozitivno nabijenih protona na površinu negativno nabijenih AgNP. Za PLLAgNP u navedenim medijima vrijednost ζ potencijala se snizila. Međutim, kod svih ispitivanih AgNP vrijednosti ζ potencijala su se kretale prema vrijednostima bližima nuli, što je i očekivano zbog povećanja ionske jakosti. Moguće je da prisutni protuioni zasjenjuju naboj na površini AgNP i dovode do većih vrijednosti ζ potencijala.

Vrijednosti ζ potencijala povećale su se u DMEM mediju za sPVPAgNP i AOTAgNP, dok su kod PLLAgNP izmjerene manje vrijednosti ζ potencijala u odnosu na ultračistu vodu. Važno je istaknuti da su ELS mjerenja potvrdila da su u prisutnosti BSA sve AgNP karakterizirane ζ potencijalom koji je sličan potencijalu za BSA (-7,6 mV), što ukazuje na stvaranje proteinske korone na njihovoj površini vrijednosti ζ potencijala za sve AgNP kretale su se prema vrijednostima bliže nuli, zbog veće ionske jakosti ispitivanih medija u odnosu na ultračistu vodu. Takvi rezultati bi mogli ukazivati na agregaciju AgNP. Naime, velike pozitivne ili negativne vrijednosti ζ potencijala ukazuju na dobru stabilnost nano suspenzija, zbog elektrostatskog odbijanja između čestica. U pravilu se vrijednosti ζ potencijala manje od -30

mV, odnosno veće od +30 mV smatraju dovoljnima da održavaju stabilnost unutar koloidne suspenzije (103). Takve vrijednosti ζ potencijala izmjerene su jedino u ultračistoj vodi. S druge pak strane, manje vrijednosti ζ potencijala, koje su bliske već spomenutim vrijednostima bližima nuli (od -10 mV do +10 mV) mogu dovesti do agregacije čestica. Agregacija je najčešće posljedica djelovanja privlačnih van der Waalsovih sila (140).

Otapanje AgNP u ispitivanim medijima istraženo je na temelju određivanja postotka otpuštenih Ag^+ iona tijekom 24 satne inkubacije. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 14.

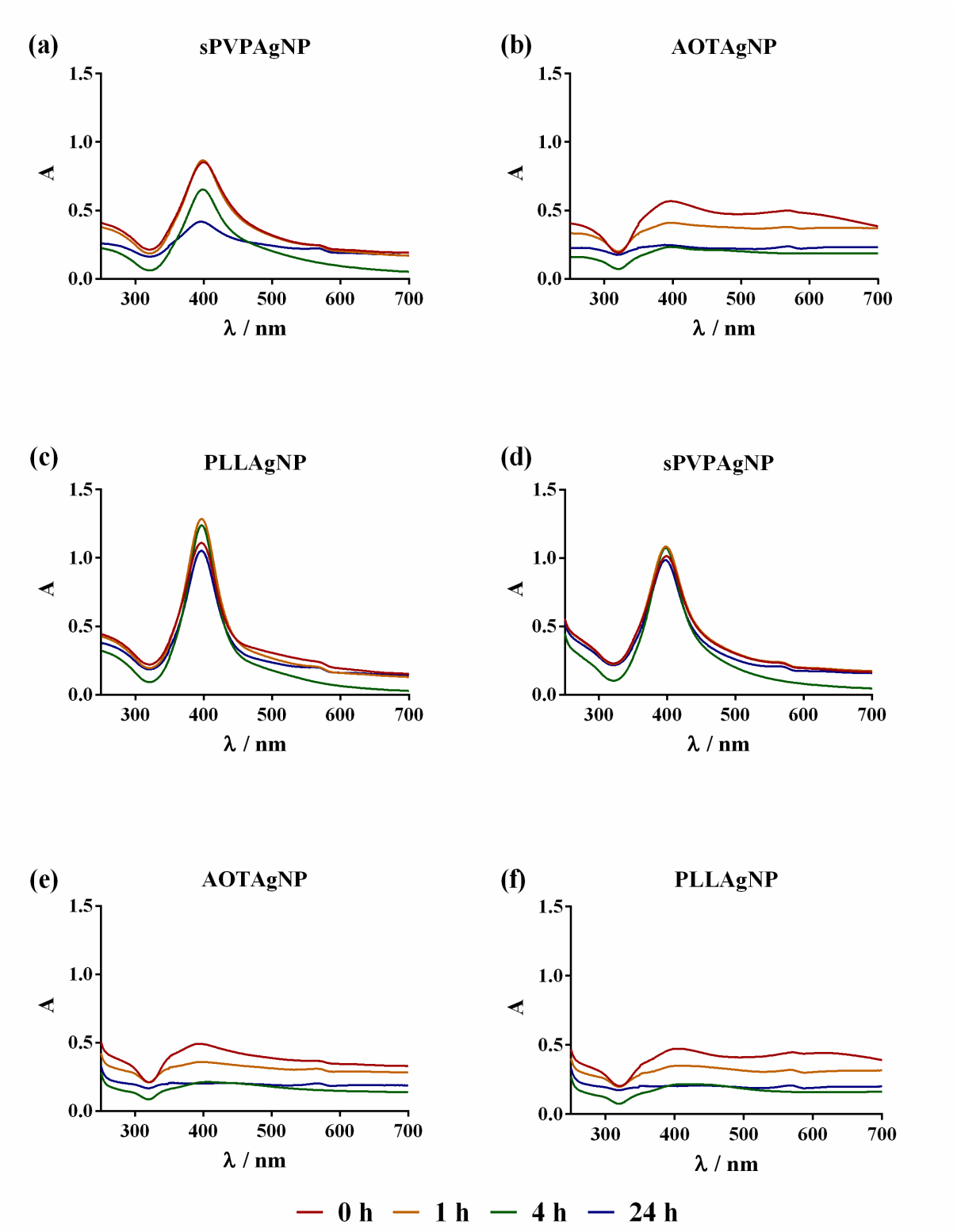


Slika 14. Udio otpuštenih iona srebra (% Ag^+) izmjerenih nakon otapanja AgNP stabiliziranih s (a) PVP, (b) AOT i (c) PLL nakon inkubacije od 1, 4 i 24 sata (h) u odabranim medijima pri 25 ºC i koncentraciji NP od 10 mg metala/L.

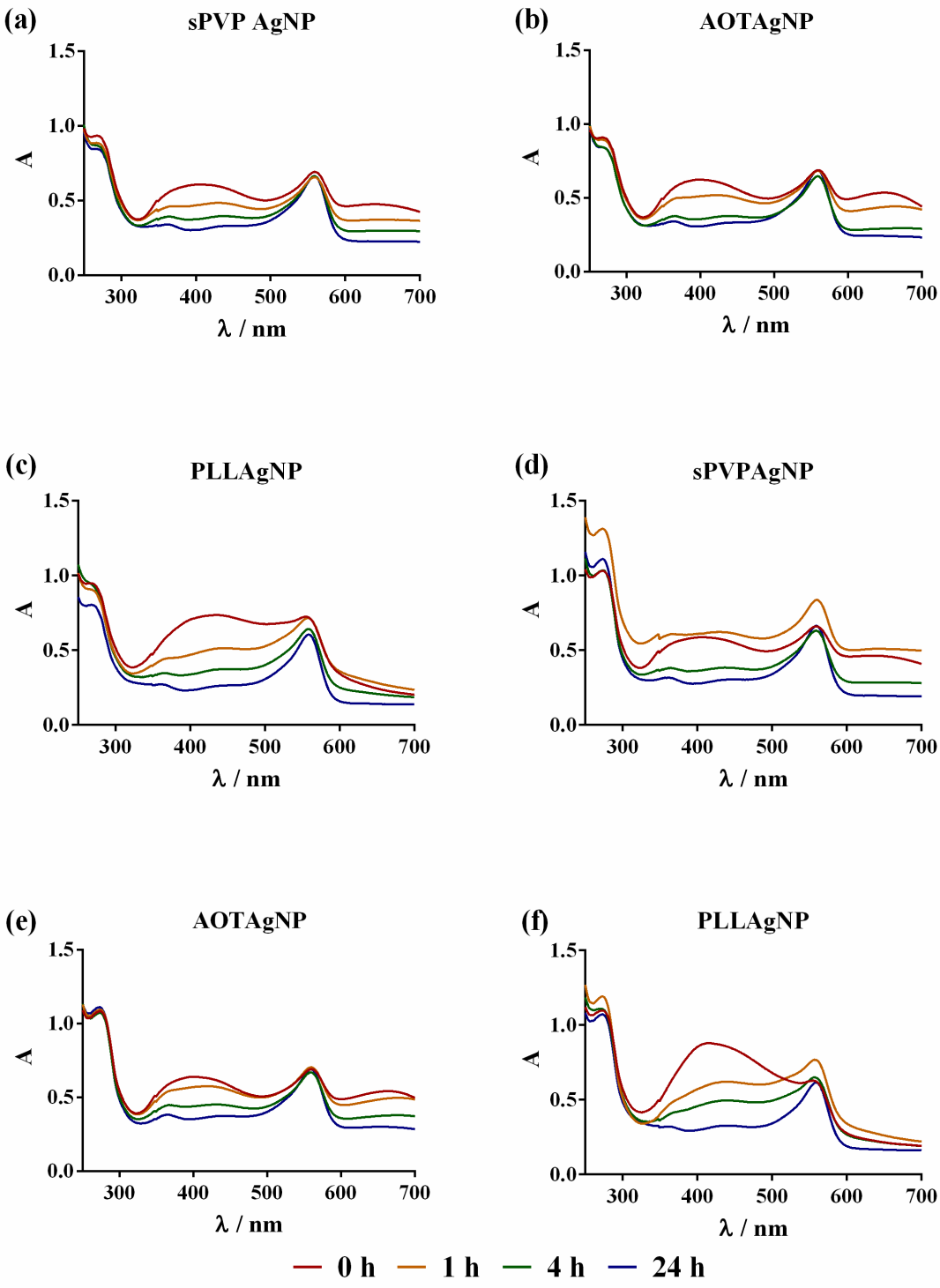
Disperzija AgNP u kiselim ili kloridnim medijima, oksidativno djelovanje na nanopovršinu posredovano reaktivnim kisikovim spojevima (engl. *reactive oxygen spcecies,* ROS) ili katalizirano biomolekulama može dovesti do oslobađanja Ag^+ (141). Štoviše, razgradnja i otapanje AgNP mogu se dogoditi nakon oralnog uzimanja u različitim biološkim odjeljcima, uključujući želučanu i lizosomsku tekućinu. Nastali Ag^+ mogu posredovati produkciju ROS-ova i djelovati toksično (142).

AgNP se bolje otapaju u medijima većih ionskih jakosti, zbog čega je koncentracija Ag^+ veća u svim ispitivanim medijima nego u ultračistoj vodi. Najmanja koncentracija Ag^+ izmjerena je u DMEM mediju uz prisutnost 10% BSA. Takvi rezultati ukazuju na smanjeno otapanje AgNP u navedenom mediju, što se može dogoditi zbog agregacije NP ili njihove stabilizacije uslijed vezanja BSA na površinu NP (139). Zanimljivo je da ni u jednom mediju za sve tri vrste AgNP nije izmjeren otpušteni udio Ag^+ iznad 2,5%. Međutim, dobiveni rezultati se ne mogu smatrati dokazom o stabilnosti AgNP. Svi modelni mediji sadrže tvari koje mogu taložiti Ag^+, pri čemu može doći do formiranja netopljivih soli poput AgCl (143). Takav talog ne može proći korišteni filter za odvajanje slobodnih iona Ag^+, što dovodi do lažno negativnog mjerenja oslobođene frakcije.

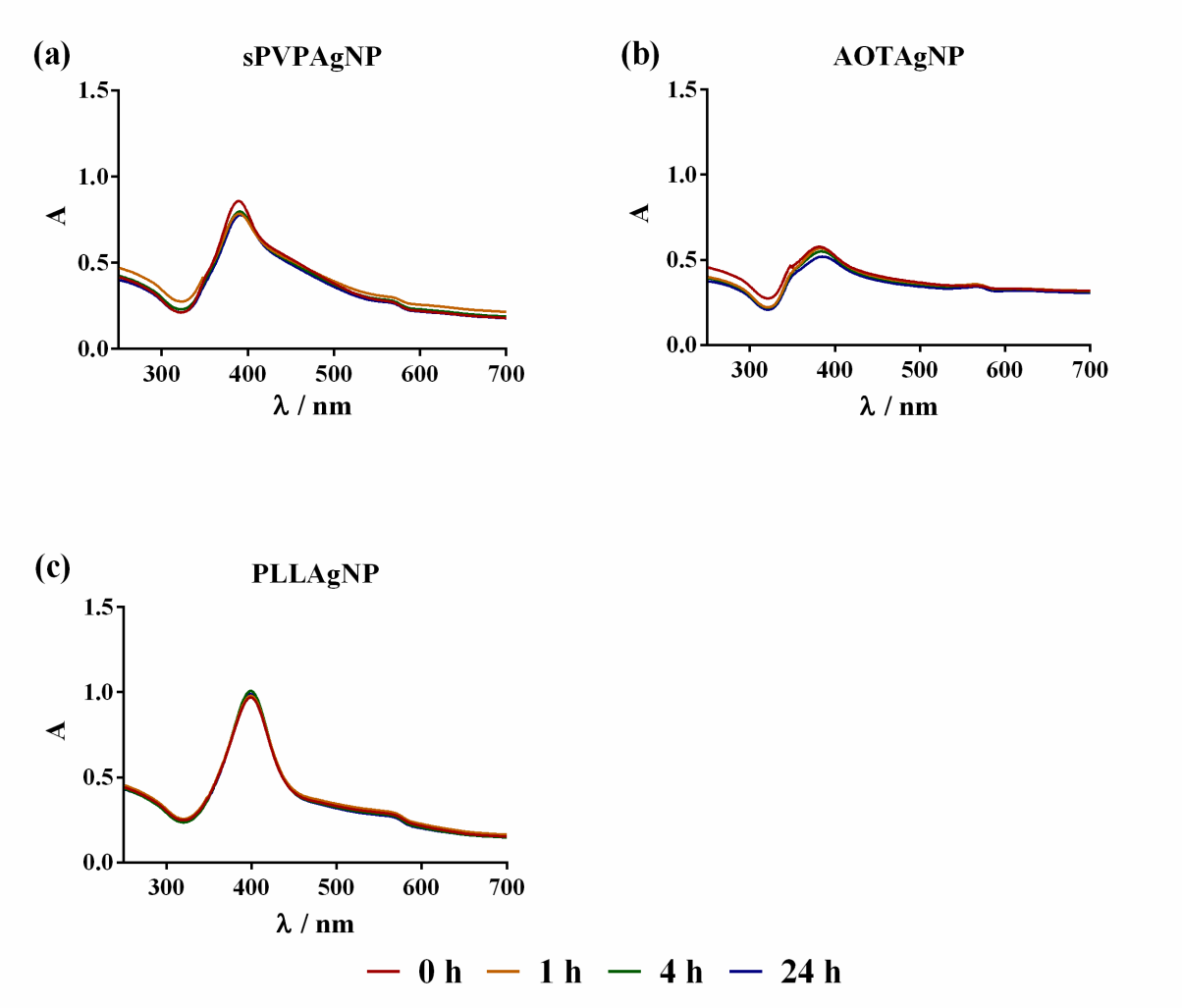
Stabilnosti AgNP su dodatno ispitane primjenom UV-Vis metode, a dobiveni spektri u različitim medijima tijekom 24 satne inkubacije prikazani su na Slikama 15, 16 i 17. Gubitak SPR signala u UV-Vis spektru ili smanjenje njegovog intenziteta ukazuje na agregaciju AgNP. Povećanje širine SPR signala u području od 500 do 700 nm posljedica je formiranja velikih agregata (144). U odnosu na druge NP, samo PVPAgNP u ALF mediju zadržavaju jednaki SPR signal u vremenu . Također, AgNP su se pokazale nestabilnima u AGF mediju. Agregacija AgNP u navedenom mediju može biti posljedica povećanja koncentracije Na^+. Naime, u visokim koncentracijama Na^+ ioni mogu zasjeniti nabijene površinske omotače (144). S druge pak strane, kod svih AgNP došlo je do gubitka intenziteta SPR signala u DMEM mediju sa i bez dodataka BSA. Pad intenziteta SPR signala na valnoj duljini oko 400 nm jasno je vidljiv u vremenu za sve NP, što ukazuje na destabilizaciju i agregaciju. Pojava pika između od 500 nm do 600 nm posljedica je prisutnosti pH indikatora fenol crveno u DMEM mediju (145). Zanimljivo je da je u DMEM mediju uz dodatak BSA također došlo do gubitka intenziteta SPR pika. Međutim, takvi rezultati se ne moraju nužno pripisati agregaciji i destabilizaciji NP u ovom mediju, budući da je smanjenje intenziteta SPR pika karakteristično za interakciju AgNP s BSA (146).



Slika 15. UV-Vis spektri sPVPAgNP, AOTAgNP i PLLAgNP u AGF (a,b,c) i ALF (d,e,f) nakon inkubacije od 1, 4 i 24 sata (h) u odabranim medijima pri 25 °C i koncentraciji AgNP od 10 μM u rasponu valnih duljina (λ) od 250 do 700 nm.



Slika 16. UV-Vis spektri sPVPAgNP, AOTAgNP i PLLAgNP u DMEM mediju (a,b,c) i DMEM mediju uz dodatak BSA (d,e,f) nakon inkubacije od 1, 4 i 24 sata (h) u odabranim medijima pri 25 °C i koncentraciji AgNP od 10 μM u rasponu valnih duljina (λ) od 250 do 700 nm.



Slika 17. UV-Vis spektri sPVPAgNP, AOTAgNP i PLLAgNP u ultračistoj vodi (pH = 5,68) (a,b,c) nakon inkubacije od 1, 4 i 24 sata (h) pri 25 °C i koncentraciji AgNP od 10 μM u rasponu valnih duljina (λ) od 250 do 700 nm.

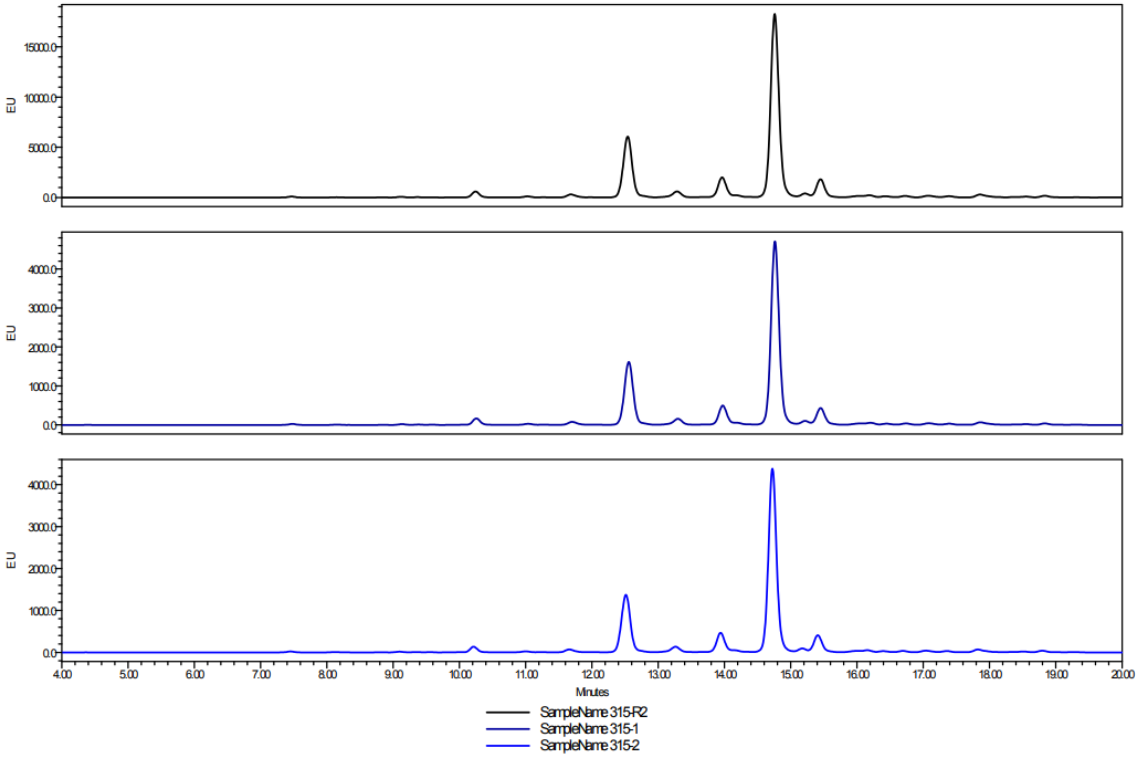
4.3. Interakcije nanočestica i proteina

Fizikalno-kemijska svojstva NP nakon interakcije s proteinima ispitana su DLS i ELS metodom, dok su konstante vezanja između NP i proteina dobivene metodom fluorescencijske spektroskopije. Ispitane su i promjene sekundarne strukture proteina primjenom CD metode.

4.3.1. Glikanski profil transferina izoliranog iz humanog seruma

Glikoproteini su prisutni u serumu u obliku različitih glikoformi, koji su posljedica različitih fizioloških i patoloških procesa (12–16). Kao što je prethodno navedeno, transferin je glikoprotein koji sadrži dva N-glikana. Većina molekula transferina u cirkulaciji zdravih

osoba glikozilirani su s dva jednostavna biantenarna glikana koji završavaju s dvije sijalinske kiseline (147). U ovom doktorskom radu su analizirani glikanski profili 3 različita lota komercijalno dobavljenog glikoziliranog transferina prije provođenja istraživanja. Glikani su uklonjeni s transferina primjenom enzima PNGaze F te su nakon fluorescentnog obilježavanja i pročišćavanja analizirani, korištenjem metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *ultra performance liquid chromatography*, UPLC) koja se zasniva na hidrofilnim interakcijama na Waters Acquity UPLC instrumentu (Watres, SAD). Dobiveni glikanski profili analiziranih transferina izoliranih iz humanog seruma prikazani su na Slici 18.



Slika 18. N-glikanski profili transferina izoliranih iz humanog seruma korištenih u izradi doktorskoga rada analizirani na Waters Acquity UPLC instrumentu.

Analizirani uzorci pokazali su glikanske profile koji su odgovarali očekivanom profilu glikozilacije zdrave osobe - najviši pik odgovara jednostavnom biantenarnom glikanu koji završava s dvije sijalinske kiseline, dok niži pik predstavlja biantenarni glikan koji završava s jednom sijalinskom kiselinom.

4.3.2. Promjene hidrodinamičkog promjera i zeta potencijala nanočestica nakon interakcije s proteinima

Nakon interakcije NP i pojedinačnih proteina dobivene su d_H vrijednosti prikazane u Tablici 10, dok su vrijednosti ζ potencijalu prikazane u Tablici 11. Kod nekih NP nakon interakcije s proteinima uočena je bimodalna raspodjela veličina pri čemu su prosječne d_H vrijednosti manje zastupljene populacije bile u rasponu od 7,8 do 18,3 nm, što se može pripisati slobodnim proteinima prisutnima u reakcijskoj smjesi. Nadalje, d_H vrijednosti i ζ potencijali samih proteina prikazani su u Tablici 12.

Povećanje prosječnih d_H vrijednosti ukazuje na to da je došlo do formiranja proteinske korone na NP (148,149). Kod svih AgNP je došlo do povećanja prosječnih d_H vrijednosti, što je ukazalo na vezanje sloja proteina na njihovoj površini. S druge pak strane, kod nekih vrsta AuNP došlo je do smanjenja d_H vrijednosti: sCITAuNP, štapićastih PEGAuNR i prizmičnih sPEGAuNPr, mPEGAuNPr i lPEGAuNPr. Međutim, DLS mjerenja se ne bi trebala raditi za one NP koje nemaju oblik sfere, budući da DLS metoda pretpostavlja sferičan oblik čestica. Prema tome, metoda će dati promjer kugle koja ima isti translacijski difuzijski koeficijent kao i čestica koja se mjeri, te se dobiveni rezultati za ne sferične NP ne mogu smatrati relevantnima (103). GSHAuNP i GSHAgNP pokazale su se nestabilnima nakon inkubacije s proteinima na što ukazuje značajno povećanje prosječnih d_H vrijednosti. Takvi rezultati bi mogli ukazivati na agregaciju ovih NP nakon interakcije s proteinima. Kod PEG stabiliziranih AuNP došlo je do povećanja prosječnih d_H vrijednosti, koje su se razlikovale ovisno o vrsti proteina. Najveća prosječna d_H vrijednost izmjerena je nakon interakcije s ne-glikoTRF (104,6 ± 1,9 nm), manja s BSA (81,3 ± 1,3 nm) i najmanja vrijednost nakon interakcije s glikoTRF (74,1 ± 1,5 nm). Nadalje, došlo je do povećanja prosječne d_H vrijednosti u slučaju mCITAuNP i lCITAuNP nakon interakcije s glikoTRF, dok je s ne-glikoTRF došlo do povećanja vrijednosti nakon interakcije s sCITAuNP i lCITAuNP, a smanjenja s mCITAuNP. Takvi rezultati ukazuju na različito ponašanje transferina s istom vrstom NP. Interakcija sve tri vrste CIT stabiliziranih AuNP s BSA nije dovela do promjena u d_H vrijednostima.

Tablica 10. Hidrodinamički promjer (d_H) i raspodjela veličina po intenzitetu različitih AgNP i AuNP koncentracije 100 μM metala nakon interakcije s govođim serumskim albuminom (BSA), glikoziliranim transferinom (glikoTRF) i neglikoziliranim transferinom (ne-glikoTRF) u koncentracijama od 1 μM u ultračistoj vodi (pH = 5,68) pri 25 ºC.

vrsta NP	**bez proteina**	**BSA**	**glikoTRF**	**ne-glikoTRF**
	d_H /nm (%)	**d_H /nm (%)**	**d_H /nm (%)**	**d_H /nm (%)**
sPVPAgNP	48,2 ± 0,3 (70) 5,3 ± 0,1 (30)	72,9 ± 4,9 (88) 685,7 ± 165,4 (12)	83,6 ± 4,1 (90) 12,0 ± 1,1 (10)	70,3 ± 3,1 (92) 11,6 ± 1,3 (8)
lPVPAgNP	130,2 ± 1,6 (100)	125,2 ± 0,6 (100)	126,9 ± 0,4 (100)	126,9 ± 1,1 (100)
GSHAgNP	4,7 ± 2,3 (95) 175,9 ± 29,5 (5)	498,3 ± 44,4 (95) 33,1 ± 9,4 (5)	403,5 ± 22,7 (90,0) 25,7 ± 3,7 (10,0)	453,2 ± 62,7 (80) 9,1 ± 2,9 (11) 45,1 ± 24,3 (9)
GSHAuNP	8,4 ± 2,1 (68) 65,1 ± 13,8 (32)	274,0 ± 38,4 (66) 45,5 ± 6,1 (34)	243,6 ± 33,5 (54) 43,2 ± 5,1 (46)	97,4 ± 32,5 (54) 11,1 ± 1,1 (46)
CITAgNP	76,4 ± 1,5 (93) 12,1 ± 4,9 (7)	100,6 ± 0,5 (100)	105,1 ± 2,2 (100)	96,3 ± 2,0 (100)
sCITAuNP	46,9 ± 1,7 (100)	49,4 ± 1,0 (100)	39,9 ± 0,3 (100)	58,4 ± 1,7 (100)
mCITAuNP	61,5 ± 0,6 (100)	60,7 ± 0,6 (100)	72,5 ± 2,1 (92) 9,0 ± 0,6 (8)	63,4 ± 1,0 (100)
lCITAuNP	82,9 ± 0,8 (100)	88,9 ± 3,3 (93) 7,8 ± 0,9 (7)	103,4 ± 0,4 (100)	159,35 ± 10,7 (100)
PEGAgNP	108,8 ± 28,8 (100)	89,2 ± 0,9 (100)	119,2 ± 1,9 (100)	128,12 ± 2,01 (100)
PEGAuNP	64,2 ± 0,8 (100)	81,3 ± 1,3 (100)	74,1 ± 1,5 (93) 8,3 ± 0,7 (7)	104,6 ± 1,9 (93) 9,4 ± 0,5 (7)
PEGAuNR	154,9 ± 14,1 (100)	142,5 ± 19,5 (89) 18,3 ± 2,7 (11)	243,2 ± 57,9 (100)	163,0 ± 20,9 (100)
sPEGAuNPr	123,9 ± 1,4 (100)	130,0 ± 4,3 (100)	130,05 ± 2,23 (100)	149,9 ± 9,7 (100)
mPEGAuNPr	187,7 ± 6,8 (100)	161,8 ± 9,4 (95) 11,4 ± 17,7 (5)	144,6 ± 5,8 (100)	129,8 ± 2,5 (100)
lPEGAuNPr	240,9 ± 9,3 (100)	137,0 ± 3,6 (100)	180,1 ± 11,7 (100)	130,1 ± 1,9 (100)

Tablica 11. Zeta (ζ) potencijal različitih AgNP i AuNP koncentracije 100 μM metala nakon interakcije s goveđim serumskim albuminom (BSA), glikoziliranim transferinom (glikoTRF) i neglikoziliranim transferinom (ne-glikoTRF) u koncentracijama od 1 μM u ultračistoj vodi (pH = 5,68) pri 25 ºC.

vrsta NP	**bez proteina**	**BSA**	**glikoTRF**	**ne-glikoTRF**
	ζ /mV	**ζ /mV**	**ζ /mV**	**ζ /mV**
sPVPAgNP	-15,0 ± 0,5	-14,32 ± 1,33	-16,02 ± 2,08	10,55 ± 1,22
lPVPAgNP	-20,3 ± 0,7	-10,37 ± 1,05	-12,23 ± 1,12	-12,70 ± 1,58
GSHAgNP	-68,1 ± 3,4	-49,67 ± 1,33	-48,42 ± 19,56	-41,60 ± 5,09
GSHAuNP	-61,3 ± 3,2	-48,05 ± 1,71	-34,47 ± 7,86	-36,78 ± 3,35
CITAgNP	-29,4 ± 1,2	-35,97 ± 2,58	-28,63 ± 3,98	-25,37 ± 2,00
sCITAuNP	-44,8 ± 1,0	-39,47 ± 3,67	-22,45 ± 2,93	-16,88 ± 2,24
mCITAuNP	-33,0 ± 1,1	-42,32 ± 5,94	-27,27 ± 13,24	-39,05 ± 9,19
lCITAuNP	-41,1 ± 1,9	-34,03 ± 0,88	-24,80 ± 0,85	-16,65 ± 0,78
PEGAgNP	-31,3 ± 4,5	-34,40 ± 1,98	-23,58 ± 1,69	-24,10 ± 1,44
PEGAuNP	-42,0 ± 1,4	-16,88 ± 2,04	-16,65 ± 0,98	-14,30 ± 1,02
PEGAuNR	-16,9 ± 0,8	-20,73 ± 1,07	-20,30 ± 1,07	-19,05 ± 1,34
sPEGAuNPr	-41,0 ± 2,6	-18,27 ± 0,65	-16,82 ± 2,02	-15,03 ± 1,99
mPEGAuNPr	-29,7 ± 1,9	-16,08 ± 1,90	-15,62 ± 4,09	-15,95 ± 1,24
lPEGAuNPr	-37,6 ± 1,5	-16,68 ± 0,89	-16,78 ± 1,67	-14,18 ± 0,71

Vrijednosti ζ potencijala su se povećale kod sPVPAgNP i lPVPAgNP nakon interakcije sa sve tri vrste proteina, pri čemu su dobivene pozitivne vrijednosti ζ potencijala nakon interakcije sPVPAgNP i ne-glikoTRF. Kod obje vrste GSH stabiliziranih NP ζ potencijal je nakon interakcije s proteinima bio veći i kretao se prema nenabijenim vrijednostima. Slični rezultati dobiveni su za sCITAuNP, lCITAuNP i PEGAuNP, kod kojih su vrijednosti ζ potencijala bile veće u odnosu na same NP. Interakcija CITAgNP i PEGAgNP, te PEGAuNR s proteinima nije uzrokovala značajnije promjene u vrijednostima ζ potencijala. Kod svih ispitanih AuNPr stabiliziranih PEG-om došlo je do smanjenja vrijednosti ζ potencijala nakon interakcije s proteinima. Vezanje proteina na površinu NP, dovelo je do promjene vrijednosti ζ potencijala prema pozitivnijim vrijednostima zbog maskiranja naboja nanopovršine.

Odnosno, vrijednost ζ potencijala općenito je porasla i kretala se prema neutralnijim vrijednostima za sve NP, pri čemu je najveći porast vrijednosti ζ potencijala izmjeren nakon interakcije NP s ne-glikoTRF. To je moguće objasniti zbog pI vrijednosti ispitivanih proteina, koja iznosi oko 4,7 u slučaju BSA, dok se za transferin ona mijenja ovisno o glikozilaciji transferina (150). März i sur. su pokazali da za tetrasijalotransferin, koji je najzastupljenija glikoforma transferina u humanom serumu, pI vrijednost iznosi 5,4 te raste s deglikozilacijom transferina (151). S obzirom na to da je pH ultračiste vode iznosio 5,68, možemo pretpostaviti da je naboj glikoTRF bio negativniji u odnosu na ne-glikoTRF te je uzrokovao manje vrijednosti ζ potencijala.

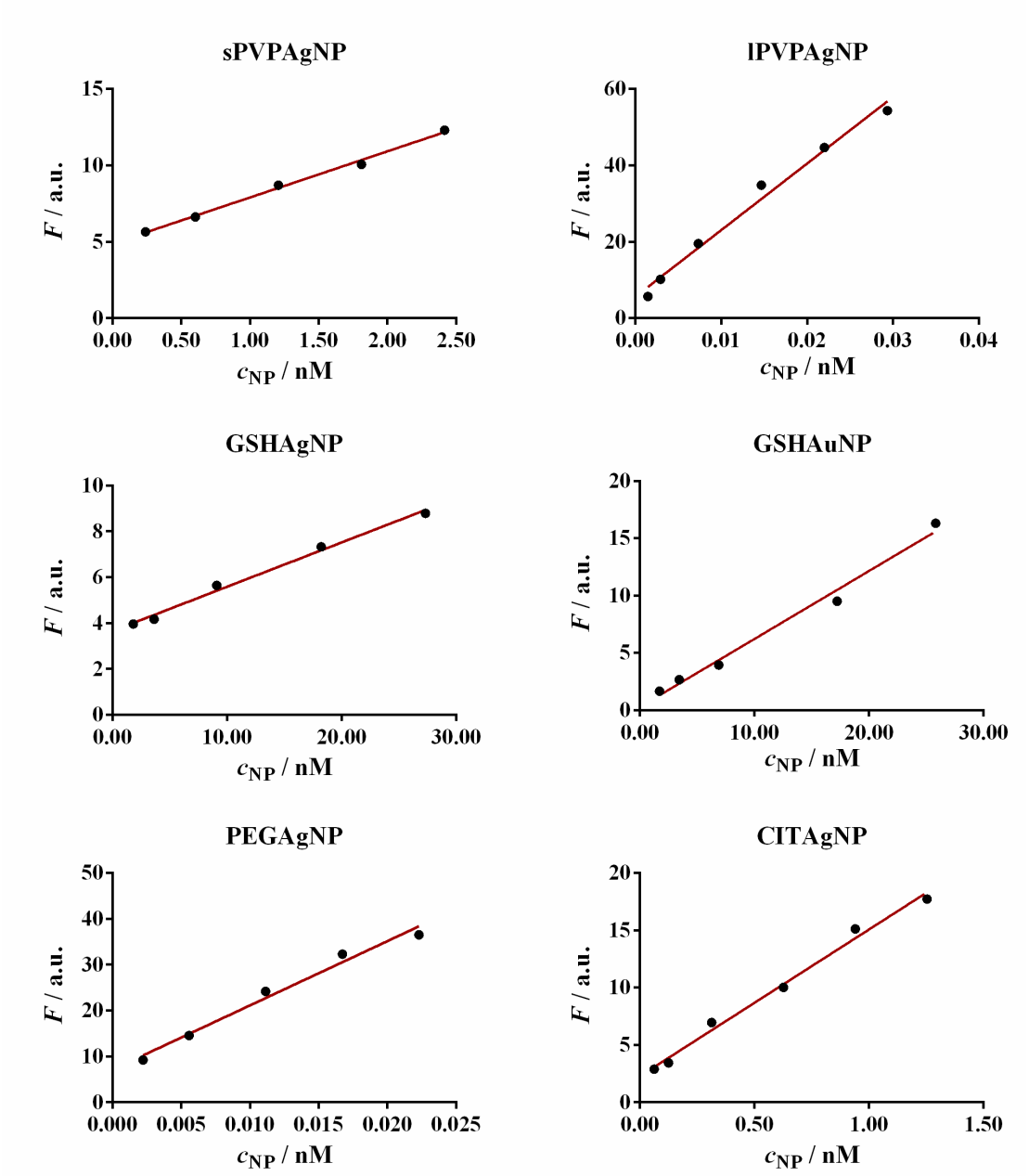
Tablica 12. Hidrodinamički promjer (d_H) dobiven iz raspodjele veličina po intenzitetu i vrijednosti zeta (ζ) potencijala za goveđi serumski albumin (BSA), glikozilirani transferin (glikoTRF) i neglikozilirani transferin (ne-glikoTRF). Svi eksperimenti izvedeni su pri 25 ° C i koncentraciji proteina od 1 μM u ultračistoj vodi (pH = 5,68).

protein	d_H **/nm (%)**	ζ **/mV**
BSA	9,9 ± 0,3 (67) 124,4 ± 15,3 (33)	-30,3 ± 2,1
glikoTRF	9,7 ± 0,5 (25) 47,6 ± 5,4 (65)	-22,3 ± 0,9
ne-glikoTRF	8,8 ± 0,6 (54) 75,2 ± 23,0 (46)	-17,7 ± 2,9

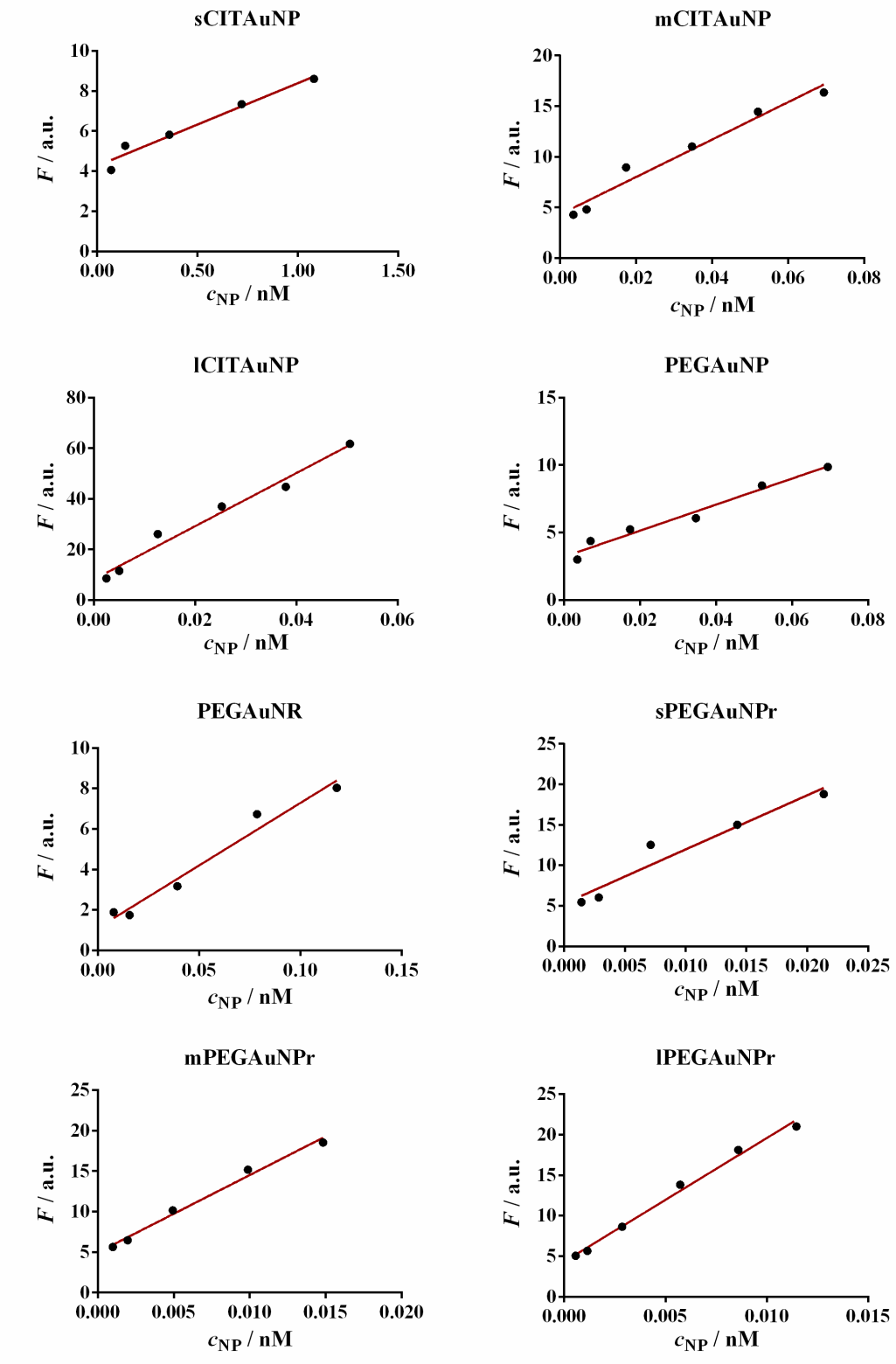
4.3.3. Konstante vezanja proteina nakon njihove interakcije s nanočesticama

Prije određivanja konstanti vezanja korištenjem metode fluorescencijske spektroskopije, bilo je potrebno utvrditi učinak unutarnjeg filtera, koji je posljedica SPR signala NP na određenoj valnoj duljini, pri čemu dolazi do apsorpcije ekscitacijskog, odnosno emisijskog zračenja. S obzirom na to da NP imaju određenu fluorescenciju, praćenjem ovisnosti fluorescencije o koncentraciji samih NP moguće je ustanoviti utjecaj apsorbancije na fluorescenciju. Ukoliko je odnos fluorescencije i koncentracije linearan, utjecaj apsorbancije je zanemariv (152).

Prema van Slageren i sur. (153), pravi linearni odnos između fluorescencije i koncentracije ne postoji zbog apsorbancije fluorofora na određenoj valnoj duljini. Shodno navedenom, ovaj učinak je uvijek prisutan u fluorescencijskim mjerenjima, ali ga je potrebno svesti na minimum. Linearni odnosi između intenziteta fluorescencije i koncentracije samih NP na valnim duljinama emisije proteina prikazani su na Slikama 19 i 20.



Slika 19. Intenziteti fluorescencije (F) različitih AgNP i GSHAuNP na 350 nm u odnosu na koncentraciju NP (c_{NP}). Fluorescencijski spektri snimani su u ultračistoj vodi (pH = 5,68) pri 25 ºC.



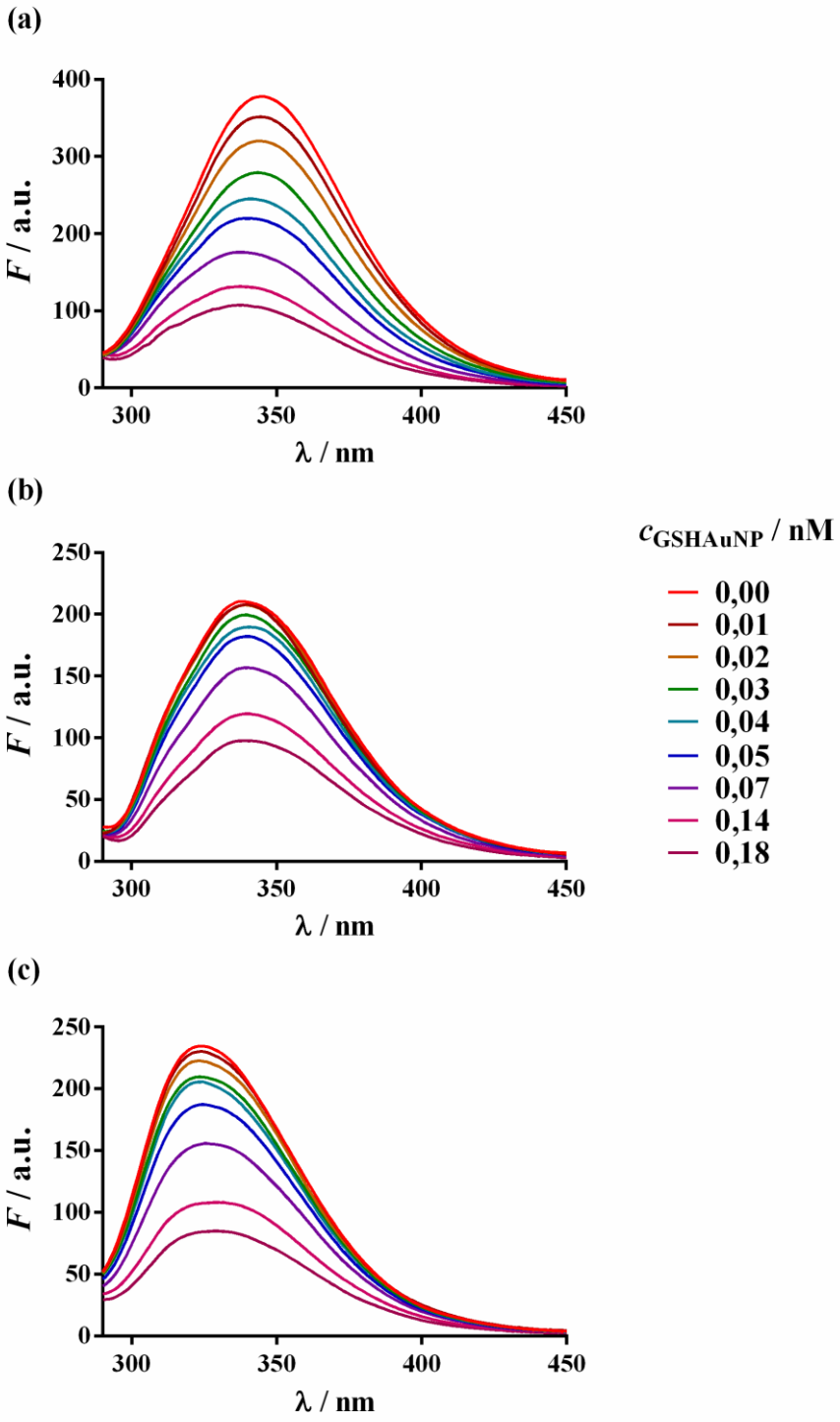
Slika 20. Intenziteti fluorescencije (*F*) različitih AuNP na 350 nm u odnosu na koncentraciju NP (c_{NP}). Fluorescencijski spektri snimani su u ultračistoj vodi (pH = 5,68) pri 25 ºC.

Linearnost je provjerena u različitim koncentracijskim rasponima ovisno o vrsti NP. Ukoliko linearnost nije potvrđena, fluorescenciju je potrebno ispraviti korištenjem prikladne jednadžbe, koja u našem slučaju nije bila potrebna (123). Prema rezultatima je utvrđeno da kod svih ispitanih NP u korištenim koncentracijskim rasponima postoji linearni odnos s fluorescencijom, budući da su vrijednost r^2 bile veće od 0,95. Nakon provođenja ovih preliminarnih mjerenja i utvrđivanja koncentracije NP na kojoj se učinak unutarnjeg filtera može svesti na minimum, ispitane su interakcije između NP i proteina.

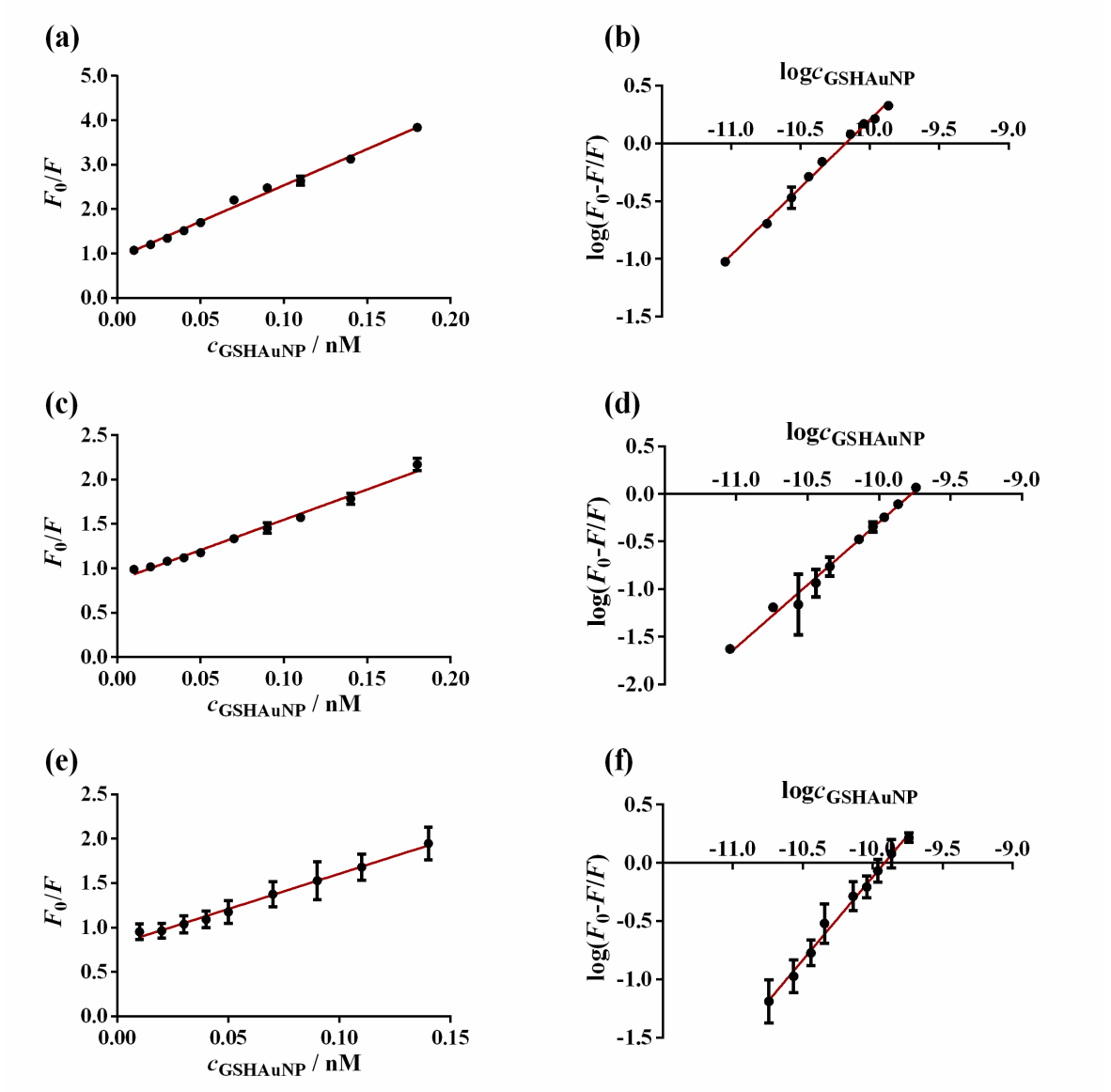
Prije provođenja svakog pokusa emisijski spektri samih proteina snimljeni su u ultračistoj vodi (pH 5,68). Korištenjem metode gašenja fluorescencije uočeno je smanjenje intenziteta fluorescencije i pomak valne duljine maksimalne fluorescencije što ukazuje da je došlo do nano-bio interakcija (154). Primjeri emisijskih spektara, kao i pomaci maksimalnog intenziteta fluorescencije prikazani su na Slici 21 za interakciju GSHAuNP s BSA, glikoTRF i ne-glikoTRF. Tijekom interakcija primijećen je plavi, odnosno crveni pomak u emisijskim spektrima. Poznato je da fluorescencija ovisi o polaritetu okruženja u kojem se nalazi Trp ostatak, koji u najvećoj mjeri doprinosi unutarnjoj fluorescenciji proteina. Plavi pomak (prema manjim valnim duljinama) je posljedica prijenosa Trp ostatka u hidrofobnije okruženje, dok su crveni pomaci (prema većim valnim duljinama) posljedica veće izloženosti otapalu, odnosno hidrofilnijem području (154,155). Takvi pomaci primijećeni su u emisijskim spektrima proteina kod svih vrsta NP.

Korištenjem Stern-Volmerove jednadžbe (jednadžba 10) izrađeni su Stern-Volmer grafovi koji prikazuju odnos primjenjene koncentracije NP i omjera intenziteta fluorescencije proteina u odsutnosti i prisutnosti NP. Primjeri Stern-Volmer grafova gašenja fluorescencije pri koncentracijama proteina od 0,2 μM prilikom interakcije s različitim koncentracijama GSHAuNP prikazani su na Slici 22. Iz nagiba Stern-Volmer pravaca određene su K_{SV} vrijednosti iz kojih su onda izračunate k_q vrijednosti korištenjem τ_0 vrijednosti od 5 ns (156).

Dinamičko i statičko gašenje mogu se razlikovati određivanjem vrijednosti k_q pri različitim temperaturama. k_q se može definirati kao suma difuzijskih koeficijenata prigušivača i fluorofora. Kod dinamičkog gašenja konstante će se povećavati s porastom temperature, jer veće temperature rezultiraju većim koeficijentima difuzije molekula. Suprotno tome, kod statičkog gašenja vrijednosti konstanti se smanjuju s porastom temperature, jer je stabilnost kompleksa koji nastaje u osnovom stanju smanjena. Osim navedenog, statičko gašenje se pripisuje onom sustavu kod kojeg je vrijednost k_q veća od 2×10^{10} $Lmol^{-1}s^{-1}$, što se smatra maksimalnom kolizijskom konstantnom brzine gašenja (157).



Slika 21. Fluorescencijski spektri (*F*) 0,2 μM (a) goveđeg serumskog albumina (BSA), (b) glikoziliranog transferina (glikoTRF) i (c) neglikoziliranog transferina (ne-glikoTRF) u rasponu valnih duljina (λ) od 0 do 450 nm, u odsutnosti i prisutnosti GSHAuNP u koncentracijama ($c_{GSHAuNP}$) od 0,01 do 0,18 nM snimani u ultračistoj vodi (pH = 5,68) pri 25 °C.



Slika 22. Prikazi Stern-Volmer grafova gašenja fluorescencije 0,2 μM (a) goveđeg serumskog albumina (BSA), (b) glikoziliranog transferina (glikoTRF) i (c) neglikoziliranog transferina (ne-glikoTRF) prilikom interakcije s GSHAuNP i odgovarajući logaritamski prikazi gašenja fluorescencije za (b) BSA (d) glikoTRF i (f) ne-glikoTRF. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti dobivene iz 3 neovisna mjerenja, a standardna devijacija prikazana je trakama pogrešaka.

Rezultati K_{SV} i k_q vrijednosti prikazani su u Tablici 13. Zanimljivo da je su rezultati pokazali da se gašenje fluorescencije u slučaju svih ispitanih interakcija između proteina i NP može pripisati statičkom gašenju, jer su izračunate k_q vrijednosti bile veće od 2,0 x 10^{10} $M^{-1}s^{-1}$

(157). Prema tome, gašenje fluorescencije proteina uslijed interakcija s ispitivanim NP je rezultat formiranja nefluorescentnog kompleksa u osnovnom stanju (124).

Tablica 13. Stern-Volmer konstante gašenja fluorescencije (K_{SV}) i konstante brzine gašenja fluorescencije (k_q) dobivene nakon interakcije različitih AgNP i AuNP s govođim serumskim albuminom (BSA), glikoziliranim transferinom (glikoTRF) i neglikoziliranim transferinom (ne-glikoTRF) u koncentracijama proteina od 0,2 μM pri 25 ºC u ultračistoj vodi (pH = 5,68). Rezultati su prezentirani kao srednje vrijednosti K_{SV} i k_q izračunate iz tri neovisna mjerenja.

vrsta NP	**BSA**		**glikoTRF**		**ne-glikoTRF**	
	K_{SV}/M^{-1}	$k_q/M^{-1}s^{-1}$	K_{SV}/M^{-1}	$k_q/M^{-1}s^{-1}$	K_{SV}/M^{-1}	$k_q/M^{-1}s^{-1}$
sPVPAgNP	$7{,}67\times10^{7}$	$1{,}53\times10^{16}$	$3{,}00\times10^{7}$	$6{,}00\times10^{15}$	$3{,}00\times10^{7}$	$6{,}00\times10^{15}$
lPVPAgNP	$2{,}67\times10^{8}$	$5{,}33\times10^{16}$	$1{,}67\times10^{8}$	$3{,}33\times10^{16}$	$9{,}33\times10^{7}$	$1{,}87\times10^{16}$
GSHAgNP	$3{,}50\times10^{7}$	$7{,}00\times10^{15}$	$3{,}00\times10^{7}$	$6{,}00\times10^{15}$	$2{,}00\times10^{7}$	$4{,}00\times10^{15}$
GSHAuNP	$8{,}67\times10^{7}$	$1{,}73\times10^{16}$	$3{,}67\times10^{7}$	$7{,}33\times10^{15}$	$4{,}33\times10^{7}$	$8{,}67\times10^{15}$
CITAgNP	$1{,}67\times10^{8}$	$3{,}33\times10^{16}$	$2{,}33\times10^{8}$	$4{,}67\times10^{16}$	$5{,}00\times10^{8}$	$1{,}00\times10^{17}$
sCITAuNP	$7{,}33\times10^{8}$	$1{,}47\times10^{17}$	$6{,}33\times10^{8}$	$1{,}27\times10^{17}$	$7{,}67\times10^{8}$	$1{,}53\times10^{17}$
mCITAuNP	$4{,}40\times10^{11}$	$8{,}80\times10^{19}$	$8{,}33\times10^{9}$	$1{,}67\times10^{18}$	$1{,}33\times10^{10}$	$2{,}67\times10^{18}$
lCITAuNP	$2{,}33\times10^{9}$	$4{,}67\times10^{17}$	$1{,}67\times10^{9}$	$3{,}33\times10^{17}$	$1{,}27\times10^{9}$	$2{,}53\times10^{17}$
PEGAgNP	$4{,}33\times10^{8}$	$8{,}67\times10^{16}$	$3{,}33\times10^{8}$	$6{,}67\times10^{16}$	$2{,}67\times10^{8}$	$5{,}33\times10^{16}$
PEGAuNP	$1{,}00\times10^{10}$	$2{,}00\times10^{18}$	$9{,}67\times10^{9}$	$1{,}93\times10^{18}$	$1{,}00\times10^{10}$	$2{,}00\times10^{18}$
PEGAuNR	$4{,}67\times10^{9}$	$9{,}33\times10^{17}$	$2{,}33\times10^{9}$	$4{,}67\times10^{17}$	$4{,}33\times10^{9}$	$8{,}67\times10^{17}$
sPEGAuNPr	$2{,}00\times10^{10}$	$4{,}00\times10^{18}$	$2{,}00\times10^{10}$	$4{,}00\times10^{18}$	$2{,}00\times10^{10}$	$4{,}00\times10^{18}$
mPEGAuNPr	$2{,}67\times10^{10}$	$5{,}33\times10^{18}$	$1{,}43\times10^{10}$	$2{,}87\times10^{18}$	$1{,}40\times10^{10}$	$2{,}80\times10^{18}$
lPEGAuNPr	$1{,}03\times10^{11}$	$2{,}07\times10^{19}$	$2{,}23\times10^{10}$	$4{,}47\times10^{18}$	$1{,}00\times10^{11}$	$2{,}00\times10^{19}$

Korištenjem jednadžbe (11) izrađeni su logaritamski grafovi gašenja fluorescencije, a primjeri navedenih grafova prikazani su na Slici 22. Iz odsječka pravaca određene su $\log K_b$ vrijednosti, dok su iz nagiba dobivene *n* vrijednosti Hillovih koeficijenata. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 14.

Hillov koeficijent opisuje stupanj kooperativnosti vezanja proteina na površinu NP. Kada je $n = 1$, vezanje proteina je neovisno, što znači da vezanje sljedeće molekule proteina na

površinu ne ovisi o prisutnosti već vezanih molekula na površini. Vrijednosti *n* iznad ili ispod 1, ukazuju na kooperativno, odnosno antikooperativno vezanje (158). Kod interakcije većine AgNP s BSA, dobivene su *n* vrijednosti ispod 1, što podrazumijeva odbojnost između vezanih i slobodnih molekula BSA. Takvi rezultati se mogu objasniti zbog sposobnosti otapanja AgNP pri čemu nastaju ioni Ag^+ koji se mogu vezati na proteine u proteinskoj koroni te na neki način otežati daljnje vezanje molekula proteina (159). Slični rezultati dobiveni su kod interakcije lPVPAgNP i CITAgNP s glikoTRF i PEGAgNP s ne-glikoTRF.

Tablica 14. Logaritamske vrijednosti konstanti vezanja (logK_b) i Hillovih koeficijenata (*n*) dobivenih nakon interakcije različitih AgNP i AuNP s s govođim serumskim albuminom (BSA), glikoziliranim transferinom (glikoTRF) i neglikoziliranim transferinom (ne-glikoTRF) u koncentracijama proteina od 0,2 μM pri 25 ºC u ultračistoj vodi (pH = 5,68). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti logK_b i *n* te odgovarajuće vrijednosti standardnih devijacija (SD) izračunate iz tri neovisna mjerenja.

vrsta NP	**BSA**		**glikoTRF**		**ne-glikoTRF**	
	logK_b ± SD	***n* ± SD**	**logK_b ± SD**	***n* ± SD**	**logK_b ± SD**	***n* ± SD**
sPVPAgNP	9,19 ± 1,32	1,2 ± 0,1	6,40 ± 0,18	1,0 ± 0,1	10,66 ± 0,37	1,4 ± 0,1
lPVPAgNP	7,47 ± 0,37	0,6 ± 0,2	6,47 ± 0,15	0,9 ± 0,7	13,63 ± 0,35	1,6 ± 0,1
GSHAgNP	5,32 ± 0,05	0,7 ± 0,1	8,49 ± 0,40	1,2 ± 0,2	11,44 ± 0,12	1,5 ± 0,1
GSHAuNP	12,10 ± 0,31	1,2 ± 0,1	13,55 ± 0,81	1,4 ± 0,1	15,16 ± 0,62	1,5 ± 0,1
CITAgNP	11,82 ± 0,05	1,3 ± 0,1	7,78 ± 0,22	0,9 ± 0,1	10,30 ± 0,38	1,2 ± 0,1
sCITAuNP	10,27 ± 0,35	1,2 ± 0,1	10,13 ± 0,37	1,2 ± 0,1	16,20 ± 0,74	1,8 ± 0,1
mCITAuNP	11,42 ± 0,23	1,2 ± 0,1	9,12 ± 0,50	1,2 ± 0,2	13,50 ± 0,24	1,3 ± 0,1
lCITAuNP	12,40 ± 0,46	1,3 ± 0,1	8,49 ± 0,18	0,9 ± 0,1	8,13 ± 0,42	0,9 ± 0,1
PEGAgNP	4,75 ± 0,21	0,5 ± 0,1	10,48 ± 0,54	1,2 ± 0,2	7,24 ± 0,31	0,9 ± 0,1
PEGAuNP	9,23 ± 0,11	1,0 ± 0,1	11,00 ± 0,01	1,1 ± 0,1	9,42 ± 0,04	1,0 ± 0,1
PEGAuNR	8,40 ± 0,50	0,9 ± 0,1	8,03 ± 0,41	0,7 ± 0,1	7,75 ± 0,98	0,8 ± 0,1
sPEGAuNPr	9,30 ± 0,32	0,9 ± 0,2	9,35 ± 0,94	1,0 ± 0,3	10,51 ± 0,40	1,1 ± 0,1
mPEGAuNPr	10,61 ± 0,01	1,0 ± 0,1	11,25 ± 0,85	1,4 ± 0,1	18,32 ± 1,33	1,8 ± 0,1
lPEGAuNPr	12,97 ± 0,35	1,2 ± 0,1	11,09 ± 0,96	1,1 ± 0,1	11,51 ± 0,22	1,0 ± 0,1

Kooperativno vezanje je uočeno kod interakcija između AuNP s BSA što je bilo u skladu s prethodnim istraživanjima (53), dok su rezultati za glikoTRF i ne-glikoTRF ukazali na antikooperativno vezanje s lCITAuNP. Zanimljivo je istaknuti da je kod interakcija PEGAuNP sa sve tri vrste proteina dobivena *n* vrijednost jednaka 1, što ukazuje da je vezanje molekula proteina na površinu ove vrste NP neovisno o već prisutnim proteinima (158).

Rezultati za logK_b jasno pokazuju da je glikozilacija transferina utjecala na afinitete vezanja za NP, osim u slučaju GSHAuNP, lCITAuNP, PEGAuNR i lPEGAuNPr. Općenito, ne-glikoTRF je pokazao veći afinitet vezanja za većinu testiranih NP, čak i u usporedbi s BSA. Usporedba logK_b vrijednosti između ne-glikoTRF i BSA nije otkrila jasan trend koji bi se mogao pripisati utjecaju sekundarne strukture proteina. Naime, ova dva proteina strukturno su potpuno različita te je zbog toga bilo očekivano da su samo 3 od 14 različitih NP pokazale sličan afinitet vezanja za ne-glikoTRF i BSA. Nadalje, navedene sličnosti u jakostima vezanja uočene su kod PEGAuNR, PEGAgNP i CITAgNP. Sinteza zadnjih dviju spomenutih NP rezultirala je ne samo sferičnim, već i štapićastim strukturama, povećavajući njihovu strukturnu sličnost s PEGAuNR. Takvi rezultati mogu se objasniti, ako uzmemo u obzir da su PEGAuNR okarakterizirane s dvije dimenzije i imaju relativno ravnu površinu duž cilindrične, odnosno uzdužne osi. Takav oblik može omogućiti veću gustoću pakiranja proteina, kao što je već raspravljeno u nedavnom radu od Visalakshan i sur., čime se smanjuje utjecaj sekundarne strukture proteina na afinitet vezanja (160).

Utjecaj metalne jezgre NP na jakost vezanja s proteinima možemo promatrati na rezultatima dobivenima za AuNP i AgNP stabiliziranih s GSH, CIT i PEG . Kada pogledamo logK_b vrijednosti dobivene za GSHAgNP i GSHAuNP možemo primijetiti da su vrijednosti bile najveće za ne-glikoTRF, a najmanje za BSA te možemo uočiti da je kod obje vrste NP dobiven isti trend vezanja. Također, isti trend primijećen je kada usporedimo CITAgNP i lCITAuNP, koje su pokazale najveći afinitet za BSA, a najmanji za glikoTRF. Nadalje, kod PEGAgNP i PEGAuNP dobivene su najveće vrijednosti logK_b u interakciji s glikoTRF i najmanje s BSA. Važno je naglasiti da su za sve AuNP dobivene veće vrijednosti logK_b s proteinima u usporedbi s AgNP iste veličine, oblika i površinske strukture.

Utjecaj veličine čestica na logK_b vrijednosti, može se uočiti usporedbom sPVPAgNP i lPVPAgNP te sCITAuNP, mCITAuNP i lCITAuNP. Rezultati su pokazali da se vrijednosti logK_b dobivene interakcijom AgNP i BSA smanjuju s povećanjem veličine NP (161). S druge strane, drugačiji trend uočen je za ne-glikoTRF, kod kojeg su se vrijednosti logK_b povećavale s veličinom AgNP, dok vrijednosti logK_b za glikoTRF nisu pokazale nikakve promjene ovisne

o veličini čestica. Kod interakcije BSA s AuNP stabiliziranih sa CIT primijećen je obrnuti trend, pri čemu se afinitet vezanja povećavao s veličinom čestica. Takva opažanja bila su u skladu s rezultatima koje su objavili Lacerda i sur., čiji su rezultati pokazali da povećanje vrijednosti logK_b prati povećanje veličine NP kod interakcija CITAuNP i BSA (77). Isti trend primijećen je i kod PEGAuNPr, što sugerira da povećanje veličine AuNP prati povećanje afiniteta vezanja s BSA. Prema navedenom, moguće je da je uočeni trend isti za sve AuNP, neovisno o njihovoj površinskoj strukturi ili obliku. S druge strane, drugačiji trend je uočen kod obje vrste transferina, pri čemu je manji afinitet vezanja dobiven interakcijom s lCITAuNP, što bi moglo ukazivati na to da povećanje veličine AuNP dovodi do smanjenja logK_b vrijednosti. Utjecaj veličine NP ispitan je i usporedbom AuNPr različitih veličina, ali iste površinske strukture i oblika. Isti trend afiniteta vezanja kao i za sferične NP dobiven je interakcijom BSA i NPr različitih veličina. Odnosno, dobiveno je povećanje logK_b vrijednosti s veličinom NPr. Nadalje, povećanje logK_b vrijednosti s veličinom čestica dobiveno je interakcijom obje vrste transferina s navedenim NPr, ako usporedimo rezultate dobivene za sPEGAuNPr i mPEGAuNPr. Međutim, usporedbom logK_b vrijednosti dobivenih interakcijom obje vrste transferina s mPEGAuNPr i lPEGAuNPr nije uočen nikakav trend. Takvi rezultati mogu se objasniti zbog različitog načina sinteze lPEGAuNPr, tijekom kojeg nije korišten GSH u pročišćavanju NP (162). Naime, dobiveni rezultati mogu se koristiti za ispitivanje utjecaja površinskih omotača na afinitete vezanja. Zanimljivo je da kada usporedimo NP iste jezgre, veličine i oblika, možemo primijetiti da je GSH kao omotač doveo do najjačeg vezanje sa sva tri proteina, pri čemu je najveća vrijednost logK_b dobivena za ne-glikoTRF, a najmanja za BSA. Prethodno objavljeno istraživanje Oha i sur. (163) sugerira da NP obložene proteinima, odnosno stvaranje proteinske korone otežava naknadnu adsorpciju proteina. Međutim, to nije bio slučaj u našem istraživanju što bi se moglo objasniti zbog većeg afiniteta BSA i transferina za NP u odnosu na GSH, što bi moglo dovesti do izmjene proteina na nanopovršini, odnosno do Vromanovog učinka (57).

Kod NP stabiliziranih sa CIT, dobiven je najmanji afinitet za glikoTRF u usporedbi s drugim NP istog oblika, veličine i jezgre. Izgleda da N-glikani na površini glikoTRF, odnosno prisutnost sijalinske kiseline, pridonose dodatnom negativnom naboju glikoTRF u usporedbi s ne-glikoTRF (164). Shodno tome, kako elektrostatičke sile doprinose nano-bio interakcijama, negativni naboj na površini glikoTRF, koji je rezultat prisustva sijalinske kiseline, može prouzročiti elektrostatičku odbojnost s negativno nabijenim CIT, što u konačnici rezultira manjim afinitetom vezanja između ovih NP i glikoTRF (165,166).

Za PEG stabilizirane AgNP najveći afinitet vezanja uočen je za glikoTRF, u odnosu na ne-glikoTRF i BSA. Slično tome, kod PEG stabiliziranih AgNP dobivene su najmanje vrijednosti logK_b za BSA i ne-glikoTRF kada ih usporedimo sa ostalim NP. Zbog svoje biokompatibilnosti PEG se često koristi kao omotač na površini lijekova i materijala. Točan mehanizam koji dovodi do obijanja proteina s površine još nije u potpunosti razjašnjen, ali prethodna istraživanja pripisuju ovaj fenomen njegovoj hidrofilnosti koja dovodi do elektrostatičke odbojnosti proteina (167,168). To svojstvo može objasniti da je najjače vezanje uočeno za glikoTRF, jer su glikozilirani proteini po svojoj prirodi hidrofilniji u odnosu na strukturno slične neglikozilirane proteine (169). Iz navedenih rezultata, možemo zaključiti da površinska struktura, odnosno odabir omotača na površini NP ima važnu ulogu u nano-bio interakcijama.

O utjecaju oblika na nano-bio interakcije može se zaključiti iz rezultata dobivenim na interakcijama proteina s PEG stabiliziranim AuNP različitih oblika. Rezultati su pokazali da PEGAuNR imaju najmanji afinitet vezanja s proteinima u usporedbi sa sferičnim i prizmičnim AuNP. Uzimajući u obzir da stanični unos i stvaranje proteinske korone na površini NP koreliraju, naši rezultati se dobro slažu s prethodnim saznanjima objavljenima od Alfranc i sur. (170) koji su pokazali da je opažen veći unos u stanice prizmičnih, u odnosu na štapićaste NP, što sugerira bolje vezanje proteina za prizmične strukture. Nadalje, bitno je naglasiti da je oblik štapićastih NR ustvari cilindričan, kao što je i prije opisano, te im je samim time površina ustvari zaobljena, u odnosu na ravnu površinu prizmičnih NP. Pojačana adsorpcija proteina na ravnim površinama već je dokazana za interakciju BSA s AuNP (171).

4.3.4. Analiza promjena sekundarnih struktura proteina nakon interakcije s nanočesticama

Stvaranje proteinske korone ne utječe samo na svojstva NP, već može značajno promjeniti strukturu proteina. Nano-bio interakcije mogu dovesti do promjene konformacije proteina uslijed stvaranja novih i razaranja ishodnih sekundarnih sila u proteinskoj strukturi. Interakcije između NP i proteina mogu biti Van der Waalsove sile, hidrofobne i elektrostatičke interakcije i vodikove veze (172).

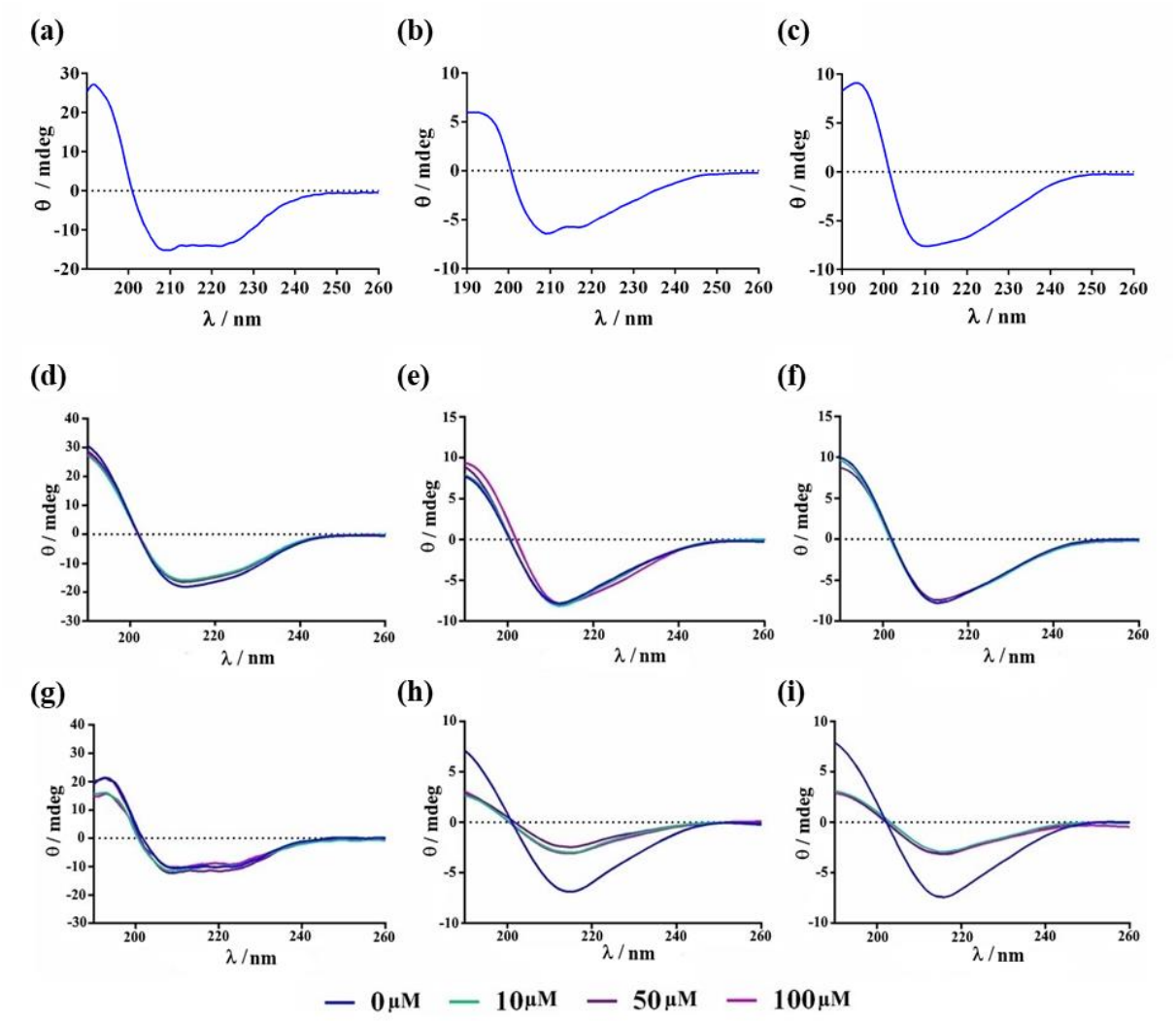
Takve promjene u konformaciji proteina većinom su ireverzibilne, što naglašava potrebu za uključivanjem konformacijske studije tijekom istraživanja proteinske korone (53). Prema tome u ovom doktorskom radu koristili smo CD spektroskopiju kao jednostavnu i jeftinu

metodu za određivanje sekundarne strukture proteina. Prije ispitivanja promjena koje nastaju interakcijom NP i proteina, ispitane su nativne konformacije proteina, pri čemu je izmjeren udio α-uzvojnica od 64,16, 15,03 i 22,52%, odnosno β-ploča od 2,50, 25,99 i 20,37% za BSA, glikoTRF i ne-glikoTRF (Slika 23) što je bilo u skladu s vrijednostima iz literature (173,174).

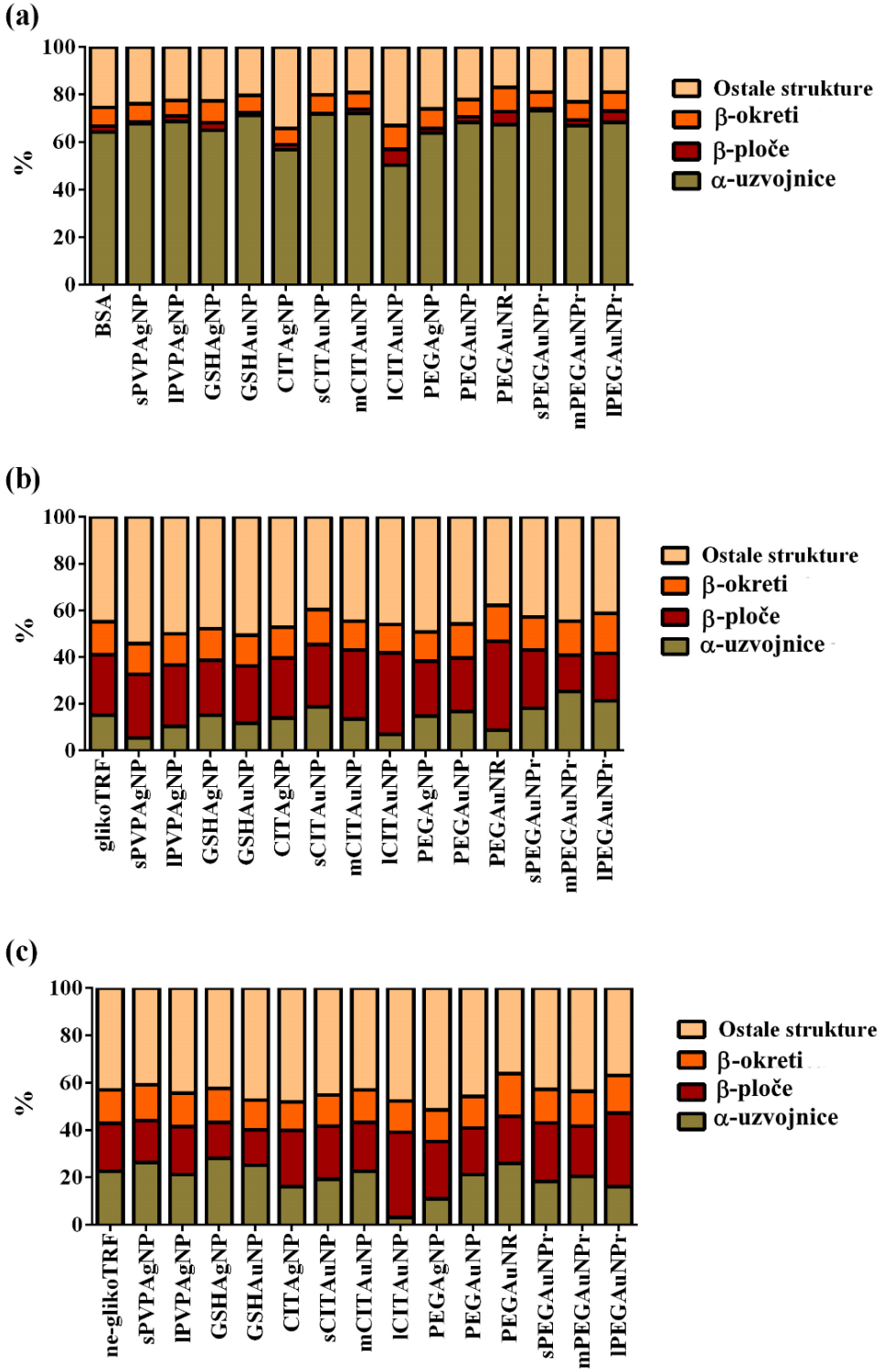
Nadalje, CD spektri proteina snimani su nakon inkubacije pojedinačnih proteina s NP kako bi se ispitale konformacijske promjene do kojih dolazi uslijed nano-bio interakcija. Primjeri CD spektara nakon interakcije BSA, glikoTRF i ne-glikoTRF s mPEGAuNPr i lCITAuNP u koncentracijama od 10, 50 i 100 μM prikazani su na Slici 23.

Analizirani CD podaci jasno su pokazali promjene u sekundarnim strukturama proteina do kojih je došlo uslijed njihove interakcije s nanopovršinom što se može vidjeti na Slici 23, dok Slike 25 i 26 prikazuju % promjena (Δ) pojedine sekundarne strukture proteina nakon njihove interakcije sa 100 μM NP. Promjene u sekundarnoj strukturi proteina nakon interakcije s 10 μM i 50 μM NP prikazani su u na Slikama 38 i 39 u poglavlju 7.

Suprotno rezultatima koje su prethodno objavili Mandal i Kraatz (175), nije primijećen trend povećanja ili smanjenja sekundarnih strukturnih komponenata proteina s obzirom na veličinu NP. Međutim, rezultati podupiru važnost utjecaja površinske strukture, odnosno odabira površinskog omotača NP na promjene proteinske strukture (73). Smanjenje struktura α-uzvojnica uz istovremeni porast β-ploča primijećen je u strukturi BSA i ne-glikoTRF nakon interakcije s sPVPAgNP i GSHAuNP. S druge pak strane, suprotan trend uočen je uslijed interakcije glikoTRF s istim NP, što sugerira da glikozilacija može imati ulogu u konformacijskim promjenama koje se javljaju zbog interakcija proteina s NP.



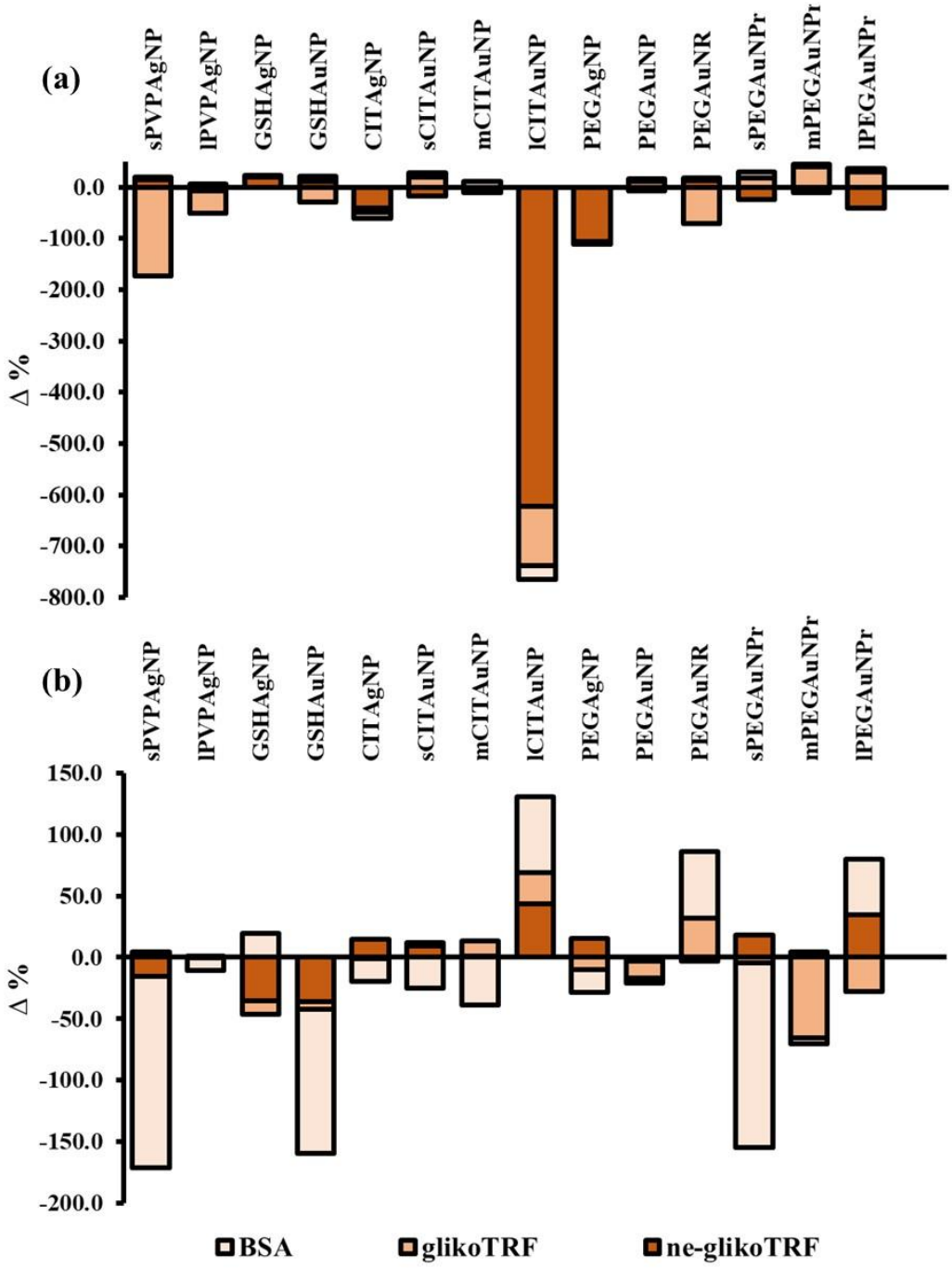
Slika 23. CD spektri nativnih struktura (a) goveđeg serumskog albumina (BSA), (b) glikoziliranog transferina (glikoTRF) i (c) neglikoziliranog transferina (ne-glikoTRF) te (d,g) BSA, (e,h) glikoTRF i (f,i) ne-glikoTRF uz dodatak mPEGAuNPr (srednji spektri) i lCITAuNP (donji spektri) u koncentracijama NP 0, 10, 50 i 100 μM i koncentracijama proteina 10 μM u ultračistoj vodi (pH = 5,68) pri 25 ºC.



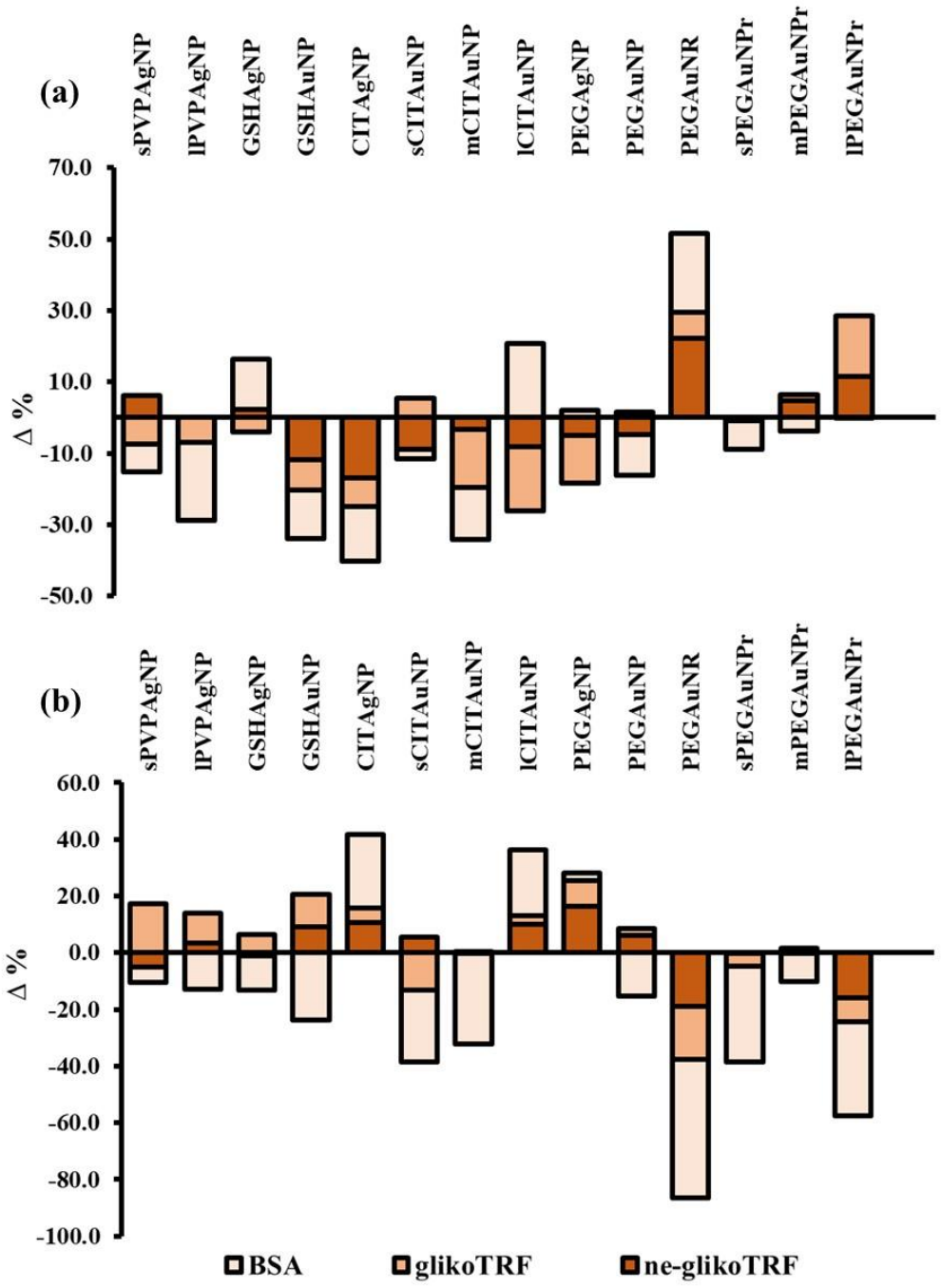
Slika 24. Promjene strukturnih značajki (a) goveđeg serumskog albumina (BSA), (b) glikoziliranog transferina (glikoTRF) i (c) neglikoziliranog transferina (ne-glikoTRF) uslijed interakcije sa AgNP i AuNP u koncentracijama od 100 µM u usporedbi s nativnom konformacijom proteina u ultačistoj vodi pri 25 ºC.

Najznačajnije konformacijske promjene u strukturama proteina primijećene su nakon njihove interakcije sa sferičnim AuNP stabiliziranih s CIT. Suprotno našim rezultatima, Zhang i sur. su objavili da AgNP stabilizirane s CIT nisu izazvale značajne strukturne promjene BSA (176). Nadalje, interakcija s CITAgNP i lCITAuNP dovela je do smanjenja strukture α-uzvojnica uz povećanje β-ploča i ostalih struktura kod svih proteina, pri čemu se najmanja promjena dogodila u strukturi glikoTRF. Kao što je opisano u prethodnom poglavlju, dodatni negativni naboj, koji je posljedica prisutnosti sijalinske kiseline, odnosno glikana na površini glikoTRF, može dovesti do elektrostatičke odbojnosti s negativno nabijenim CIT. Dobiveni rezultati upućuju na moguću denaturaciju ili agregaciju proteina, zbog značajnih promjena u njihovoj strukturi (177). Međutim, s obzirom na to da rezultati d_H vrijednosti i raspodjele veličina opisane u poglavlju 4.3.2. nisu upućivali na značajne promjene d_H vrijednosti niti na bimodalnu raspodjelu veličina nakon interakcije s CIT stabiliziranim NP, moguće je da nije došlo do agregacije proteina. Ipak, rezultati ne mogu potvrditi da nije došlo do denaturacije proteina i gubitka njegove funkcije. Sukladno rezultatima dobivenima za konstante vezanja, interakcija s PEGAuNP nije dovela do značajnih sekundarnih strukturnih promjena proteina. Takvi rezultati su bili očekivani zbog svojstva biokompatibilnosti PEG, kao što je opisano u prethodnom poglavlju (178).

Prilikom usporedbe utjecaja oblika NP na promjene u sekundarnoj strukturi proteina uočeno je da sferični NP uzrokuju veći stupanj strukturnih promjena u usporedbi s prizmičnim NP kao što je prikazano na Slikama 25 i 26. Poznato je da kovalentne Au-S veze imaju važnu ulogu u nano-bio interakcijama (179,180). Nekoordinirani Au atomi visoke energije smješteni su na zakrivljenim površinama (sfera), te su odgovorni za stvaranje većeg broja kovalentnih veza (Au-S) u usporedbi s Au atomima smještenima na ravnim površinama (prizme) i na taj način dovode do većih strukturnih promjena (181). Nakon interakcije BSA sa sPEGAuNPr možemo primijetiti značajno smanjenje struktura β-ploča. Međutim, BSA u nativnoj strukturi ima vrlo nizak udio β-ploča. S druge pak strane, budući da je udio β-ploča u strukturi transferina veći, smanjenje ili povećanje ovih struktura treba se smatrati značajnijim utjecajem. Interakcijom transferina s sPEGAuNPr došlo je do povećanja β-ploča i β-okreta u proteinskoj strukturi. Ipak, kada u analizu uvrstimo AuNR, nisu primijećeni isti rezultati kao za prizme, što se slaže s cilindričnim oblikom štapićastih struktura, koja se može smatrati zakrivljenom površinom (181).



Slika 25. Postotak promjena u (a) α-uzvojnicama i (b) β-pločama struktura goveđeg serumskog albumina (BSA), glikoziliranog transferina (glikoTRF) i neglikoziliranog transferina (ne-glikoTRF) uslijed njihove interakcije sa različitim AgNP i AuNP u koncentracijama od 100 µM. Rezultati su dobiveni na koncentracijama proteina od 10 µM u ultačistoj vodi pri 25 ºC i uspoređeni su sa strukturama nativnih proteina.



Slika 26. Postotak promjena u (a) β-okretima i (b) ostalim strukturama formi goveđeg serumskog albumina (BSA), glikoziliranog transferina (glikoTRF) i neglikoziliranog transferina (ne-glikoTRF) uslijed njihove interakcije sa različitim AgNP i AuNP u koncentracijama od 100 μM. Rezultati su dobiveni na koncentracijama proteina od 10 μM u ultačistoj vodi pri 25 ºC i uspoređeni su sa strukturama nativnih proteina.

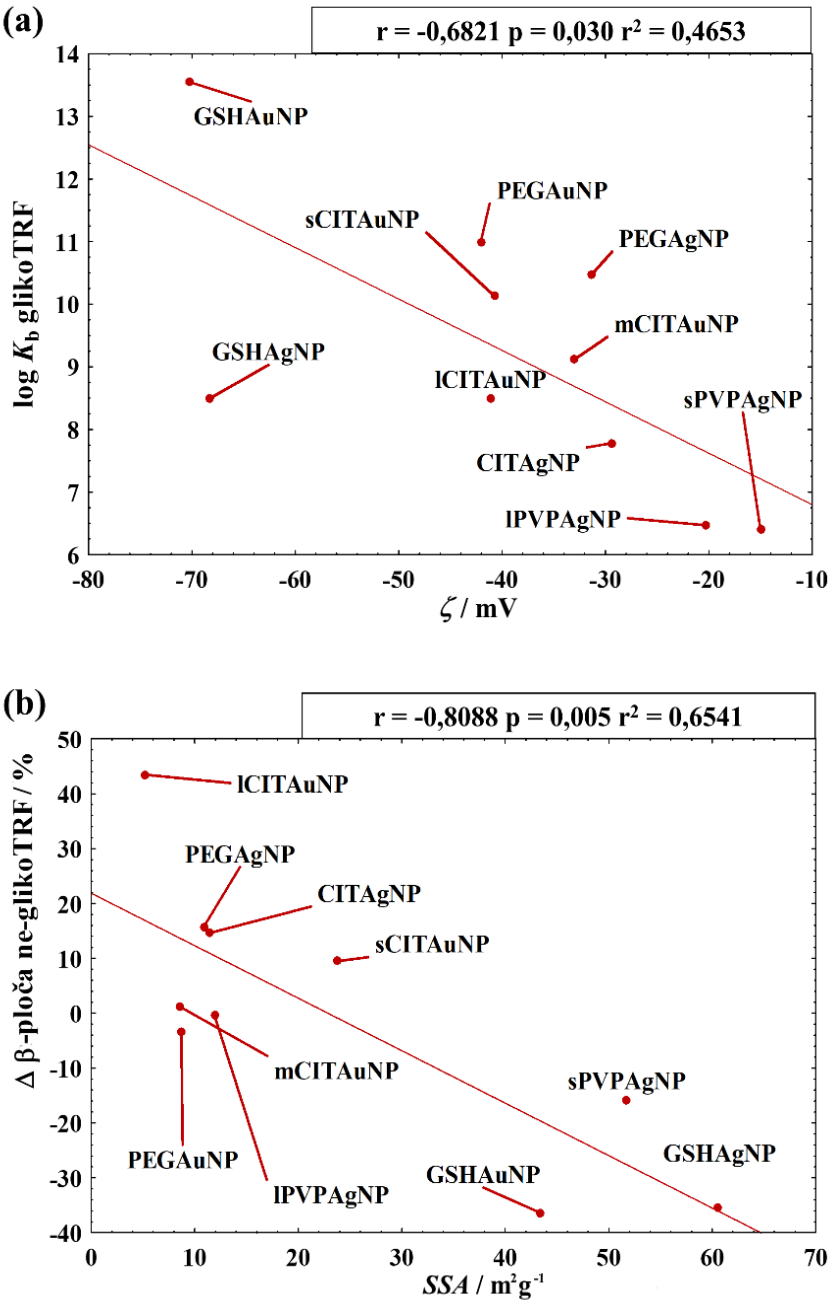
4.3.5. Statistička analiza podataka dobivenih ispitivanjima interakcija nanočestica i proteina

Statistička analiza podataka provedena je uključivanjem svih, a potom samo sferičnih NP u korelacijsku analizu. Vrijednosti logK_b i strukturne promjene proteina NP korelirane su s određenim fizikalno-kemijskim svojstvima NP te uzajamno. Statistički značajne korelacije (za koje je *p* vrijednost bila manja od 0,05) kod analize svih i sferičnih NP prikazane su u Tablici 15. Dijagrami rasipanja najznačajnijih korelacija i pripadajuće *p* i *r* vrijednosti prikazane su na Slikama 27, 28 i 29.

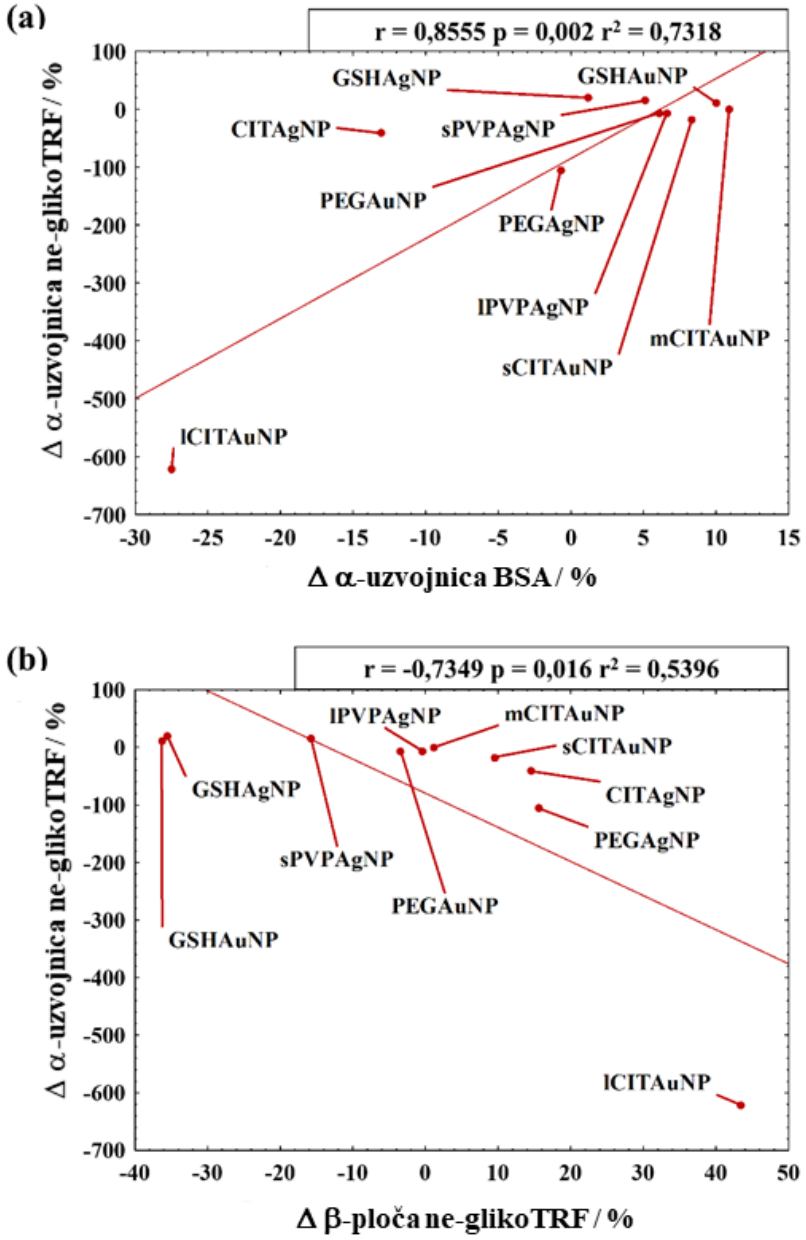
Tablica 15. Pearsonovi koeficijenti korelacije dobiveni statističkom analizom eksperimentalnih podataka uzimajući u obzir sve vrste NP i samo sferične NP. Prikazane su samo korelacije koje su bile statistički značajne, odnosno one za koje je *p* vrijednost bila manja od 0,05. To su korelacije koje su uključivale zeta (ζ) potencijal NP, specifičnu površinu NP (*SSA*), logaritamske vrijednosti konstanti vezanja (logK_b) te promjene (Δ) udjela alfa (α) uzvojnica i beta (β) ploča u strukturi goveđeg serumskog albumina (BSA), glikoziliranog (glikoTRF) i neglikoziliranog transferina (ne-glikoTRF).

korelacije	**pearsonov koeficijent (*r*)**	
	sve NP	**sferične NP**
ζ potencijal NP vs. logK_b (glikoTRF)	-0,65	-0,68
SSA NP vs. Δ (β-ploča ne-glikoTRF)	-0,78	-0,81
logK_b (glikoTRF) vs. Δ (α-uzvojnice glikoTRF)	0,58	nije značajno
Δ (α-uzvojnice BSA) vs. Δ (α-uzvojnice ne-glikoTRF)	0,84	0,86
Δ (α-uzvojnice glikoTRF) vs. Δ (β-ploče glikoTRF)	-0,61	nije značajno
Δ (α-uzvojnice ne-glikoTRF) vs. Δ (β-ploče ne-glikoTRF)	-0,62	-0,73

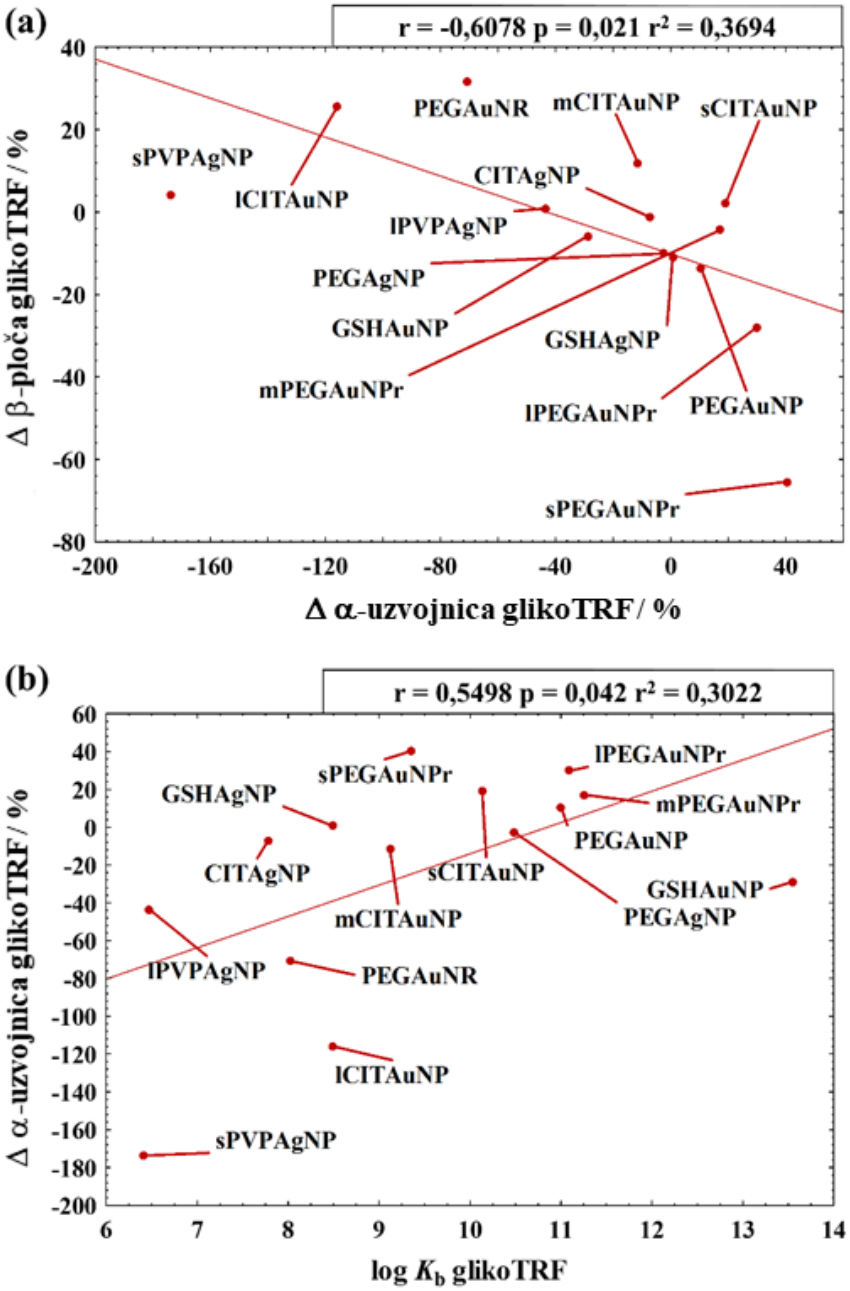
* vs. – u odnosu na



Slika 27. Dijagrami rasipanja dobiveni Pearsonovom korelacijom između ζ potencijala NP, specifične površine NP (*SSA*), logaritamske vrijednosti konstanti vezanja (logK_b) glikoziliranog transferina (glikoTRF) i promjena u sekundarnim strukturama neglikoziliranog transferina (ne-glikoTRF) dobivene analizom ispitivanih sferičnih NP i proteina. Prikazane su samo korelacije koje su bile statistički značajne ($p < 0,05$).



Slika 28. Dijagrami rasipanja dobiveni Pearsonovom korelacijom između promjena u sekundarnim strukturama goveđeg serumskog albumina (BSA) i neglikoziliranog transferina (ne-glikoTRF) dobivene analizom ispitivanih sferičnih NP i proteina. Prikazane su samo korelacije koje su bile statistički značajne ($p < 0,05$).



Slika 29. Dijagrami rasipanja dobiveni Pearsonovom korelacijom između promjena u sekundarnim strukturama glikoziliranog transferina (glikoTRF) i logaritamske vrijednosti konstanti vezanja (logK_b) dobivene analizom svih ispitivanih NP i proteina. Prikazane su samo korelacije koje su bile statistički značajne ($p < 0,05$).

Statistička analiza provedena uključivanjem svih vrsta NP u korelacijsku analizu, pokazala je statistički značajnu korelaciju između ζ potencijala NP i logK_b vrijednosti glikoTRF pri čemu je *r* vrijednost iznosila -0,65. Ova vrijednost ukazuje na umjerenu negativnu

korelaciju između afiniteta vezanja sa ζ potencijalom NP. Veća korelacija između logK_b vrijednosti glikoTRF i ζ potencijala NP dobivena je kada su u obzir uzete samo sferične NP, pri čemu je *r* vrijednost iznosila -0,68. Takav rezultat ukazuje na umjerenu negativnu korelaciju između ovih parametara. Zanimljivo je da se vrijednost afiniteta vezanja povećavala sa smanjenjem vrijednosti ζ potencijala, što bi značilo da je negativniji potencijal NP doveo do jačeg vezanja glikoTRF na njihovu površinu. Nadalje, nije uočena statistički značajna korelacija između ζ potencijala NP i logK_b vrijednosti ne-glikoTRF, što ukazuje da je vezanje ne-glikoTRF neovisno o ζ potencijalu NP. Prema tome, ova dva transferina se ne ponašaju na jednak način u interakciji s istom vrstom NP.

Korelacija je dobivena između *SSA* vrijednosti NP i Δ β-ploča u strukturi ne-glikoTRF. Vrijednosti *r* iznosile su -0,78 kod analize svih, odnosno -0,81 kod analize rezultata za sferične NP. Prema dobivenim rezultatima postoji visoka pozitivna korelacija između navedenih parametara, pri čemu povećanje *SSA* vrijednosti, dovodi do smanjenja Δ β-ploča u strukturi ne-glikoTRF. NP s većim *SSA* vrijednostima su one kod kojih je promjer bio manji, što znači da NP manjeg promjera uzrokuju veću promjenu sekundarne strukture ne-glikoTRF. Takvi rezultati su dodatno potvrdili razliku u ponašanju dvaju transferina, koja se može pripisati utjecaju glikozilacije na interakcije s NP. S obzirom na to da nije uočena statistički značajna korelacija između *SSA* vrijednosti i promjena u sekundarnoj strukturi glikoTRF. Moguće je da glikanske strukture na površini glikoTRF omogućuju bolju stabilnost proteina nakon interakcije s NP, zadržavajući protein u njegovoj nativnoj konformaciji.

Takvi rezultati statističke analize omogućuju bolju procjenu utjecaja glikozilacije na interakcije između NP i proteina. Naime, rezultati su pokazali da postoje razlike u interakciji dvaju TRF s istom vrstom NP. Glikanske strukture su prisutne na površini proteina, te kao takve prve dolaze u kontakt s nano površinom. Prema tome, statistički značajna korelacija između jakosti vezanja glikoTRF i ζ potencijala NP nije iznenađujuća i ukazuje na važnost interakcija površinskog omotača NP i glikanskih struktura.

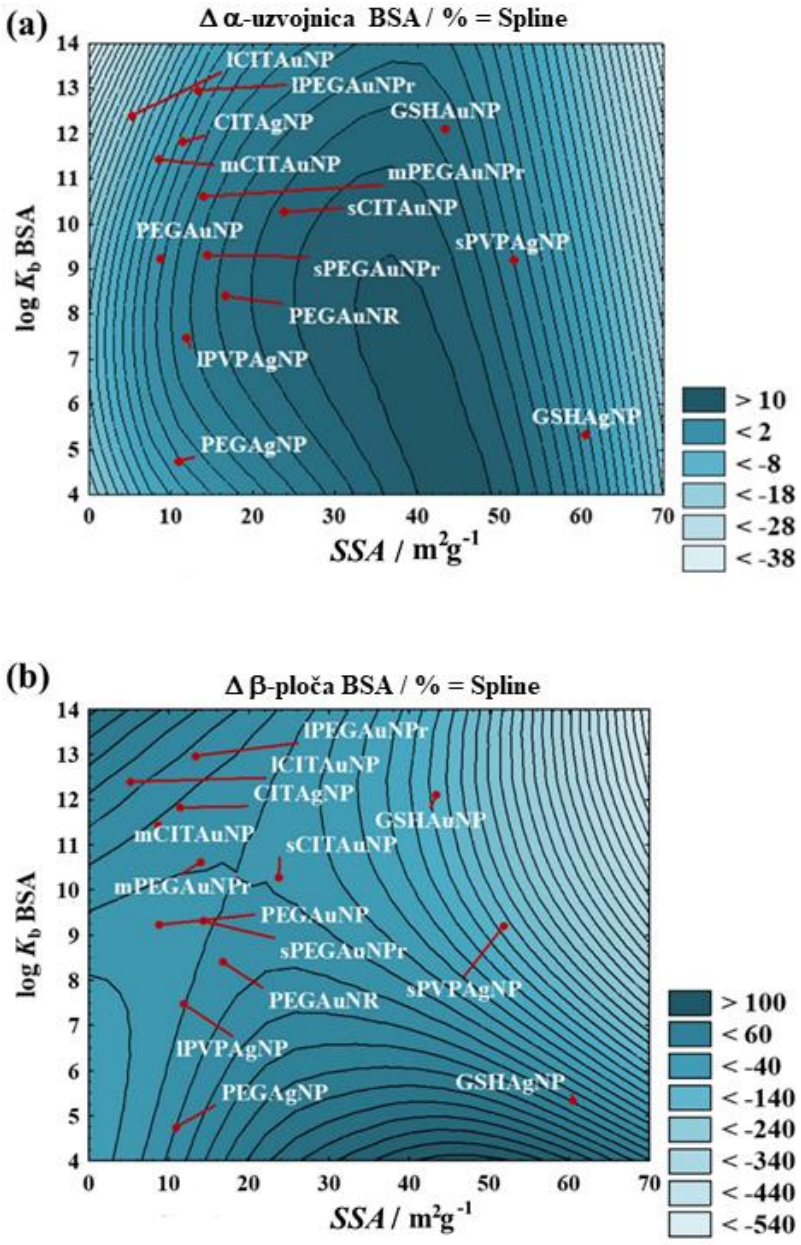
Statistička analiza provedena je između logK_b vrijednosti i strukturnih promjena proteina. Rezultati su pokazali umjerenu pozitivnu korelaciju između logK_b vrijednosti dobivene interakcijom glikoTRF i NP, te Δ α-uzvojnica glikoTRF, pri čemu je *r* vrijednost iznosila 0,58. Analiza je pokazala da uz veći afinitet vezanja dolazi do značajnijih promjena u strukturi glikoTRF. Takvi rezultati ukazuju da jače vezanje, koje je većinom posljedica

hidrofobnih interakcija, dovodi do jačeg poremećaja proteinske strukture kao što je prethodno opisano u literaturi (182).

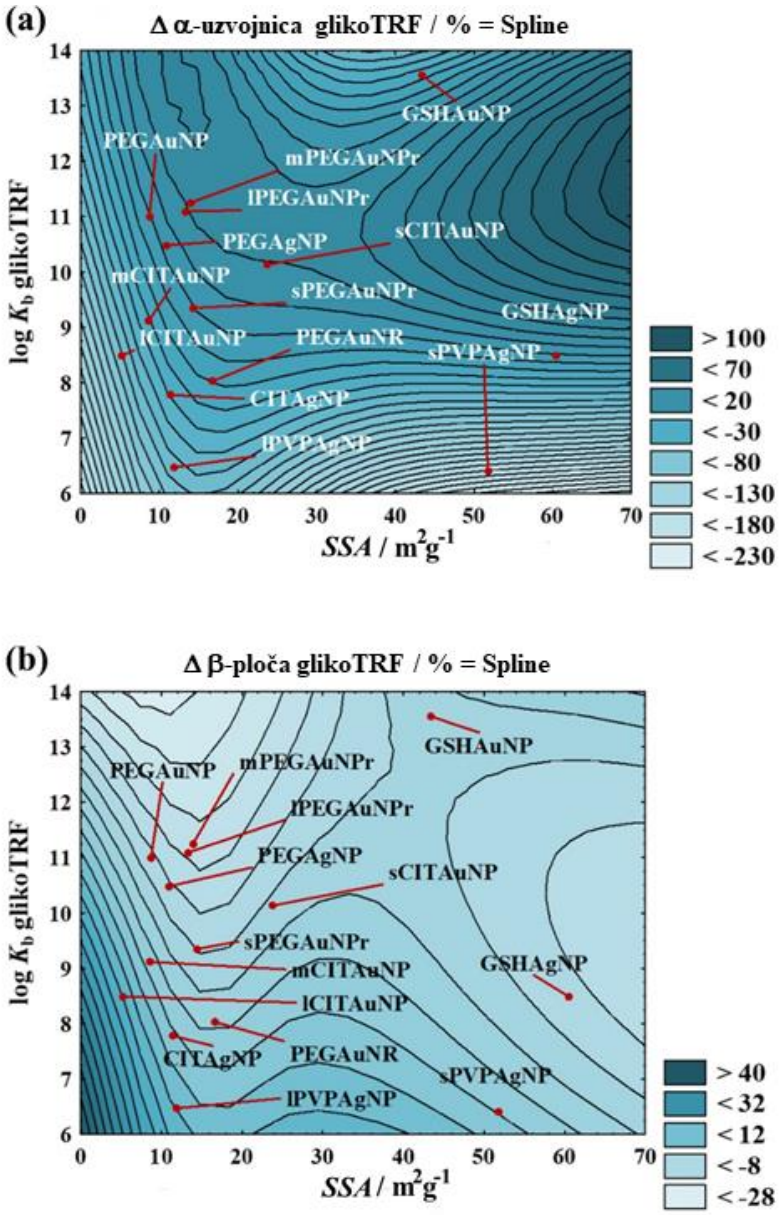
Bitno je istaknuti pozitivnu korelaciju između Δ α-uzvojnica BSA u odnosu na Δ α uzvojnice ne-glikoTRF do kojih dolazi uslijed interakcije s istom vrstom NP. Vrijednosti *r* su iznosile 0,84 i 0,86 prilikom analize svih, odnosno sferičnih NP i ukazuju na jaku pozitivnu korelaciju. S obzirom na to da su oba proteina neglikozilirana ova korelacija ukazuje na njihovo slično ponašanje, odnosno sličnu promjenu u njihovoj strukturi kod interakcije s istom vrstom NP. Naime, kod oba proteina dolazi do povećanja struktura α-uzvojnica. S druge pak strane, nije uočena statistički značajna korelacija u strukturnim promjenama između ovih neglikoziliranih proteina i glikoTRF. Dobiveni rezultati dodatno potvrđuju različito ponašanje proteina nakon interakcije s NP, a u ovisnosti u njihovom glikozilacijskom statusu.

Korelacije između Δ α-uzvojnica i Δ β-ploča su pokazale da kod obje vrste transferina prilikom njihove interakcije s NP dolazi do smanjenja α-uzvojnica u korist povećanja β-ploča i obrnuto. Vrijednosti *r* pokazuju umjerenu negativnu korelaciju između promjena ovih struktura. Takvi rezultati su očekivani budući da je već prije opisano u literaturi da u slučaju BSA, smanjenje strukture α-uzvojnica prati povećanje β-ploča (183,184).

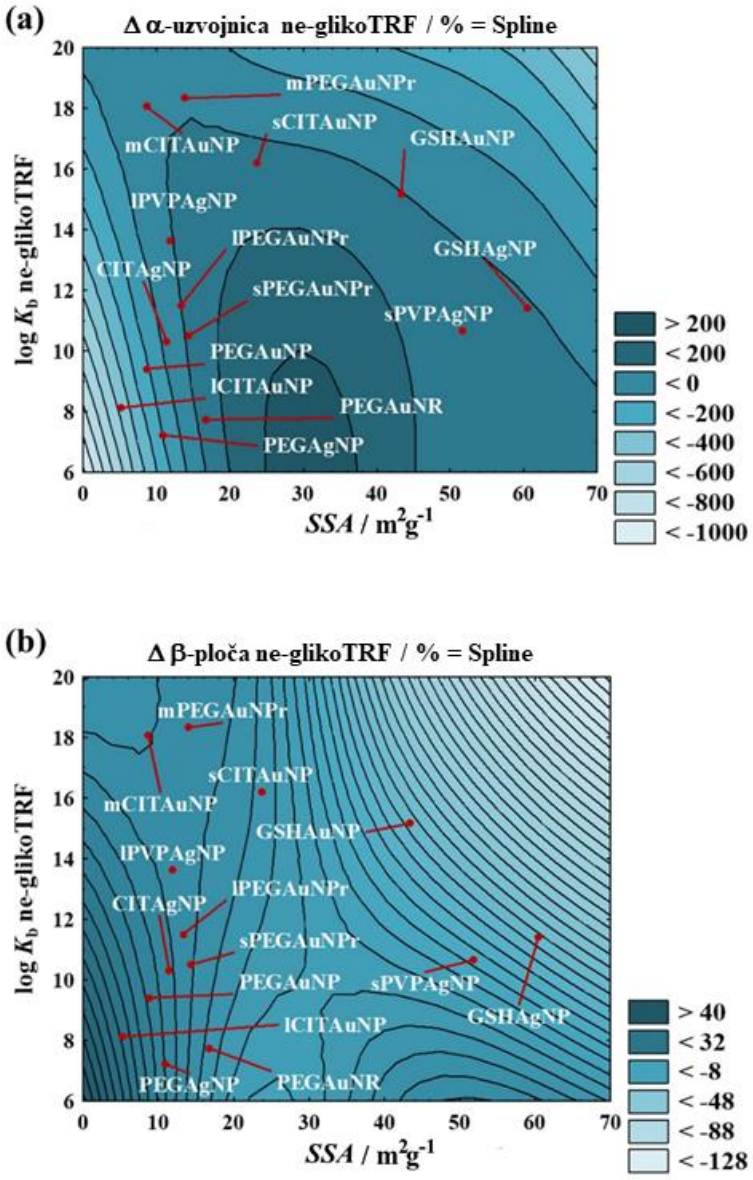
Kako bismo proučili odnos između konstanti vezanja i konformacijskih promjena proteina sa *SSA* vrijednostima NP, izvršili smo trodimenzionalnu analizu spomenutih parametara prikazano na Slikama 30,31 i 32.



Slika 30. Contour grafovi prikaza odnosa logaritamske vrijednosti konstanti vezanja (logK_b) i promjena u udjelu (a) α-uzvojnica i (b) β-ploča za goveđi serumski albumin (BSA) sa specifičnom površinom NP (*SSA*) ispitivanih AgNP i AuNP.



Slika 31. Contour grafovi prikaza odnosa logaritamske vrijednosti konstanti vezanja (logK_b) i promjena u udjelu (a) α-uzvojnica i (b) β-ploča za glikozilirani transferin (glikoTRF) sa specifičnom površinom NP (*SSA*) ispitivanih AgNP i AuNP.



Slika 32. Contour grafovi prikaza odnosa logaritamske vrijednosti konstanti vezanja (logK_b) i promjena u udjelu (a) α-uzvojnica i (b) β-ploča za neglikozilirani transferin (ne-glikoTRF) sa specifičnom površinom NP (*SSA*) ispitivanih AgNP i AuNP.

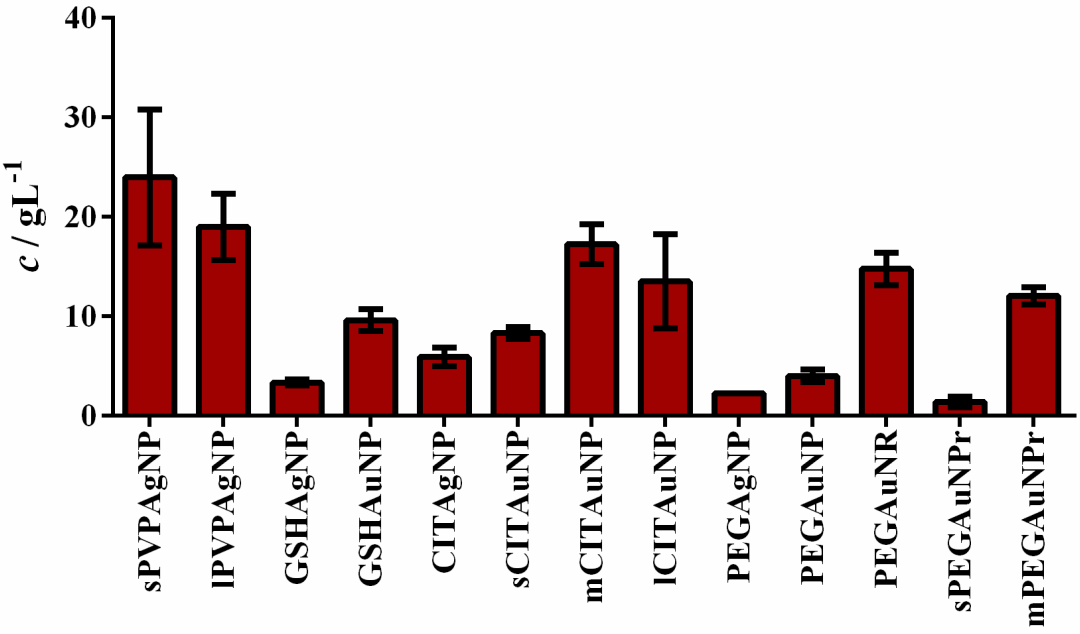
Iz contour grafova je vidljivo da je kod BSA smanjenje struktura α uzvojnica povezano s većim vrijednostima konstanti vezanja, dok je porast β-ploča bio u korelaciji s manjim vrijednostima jakosti vezanja i *SSA*. Kao što prije spomenuto, BSA se većinom sastoji od struktura α-uzvojnica, te bi takvi rezultati ukazivali na moguću denaturaciju proteina zbog njegovog jakog vezanja za površinu NP. Manje *SSA* vrijednosti ukazuju na manju aktivnu površinu NP i njihov veći promjer (kod sferičnih NP).

Kao što je prethodno spomenuto, interakcija BSA s NP može dovesti do stvaranja kovalentne Au-S veze, koje su većinom lokalizirane na rubovima i uglovima NP (179,180). Takve veze u slučaju manjih NP omogućavaju stvaranje unutar molekularnih vodikovih veza, koje pridonose stabilnosti proteinske strukture i očuvanju njihove nativne konformacije (177). S druge pak strane, oba transferina sadrže sličan udio α-uzvojnica i β-ploča. Za glikoTRF smanjenje u obje strukture povezano je s većim vrijednostima konstanti vezanja. Suprotno tome, za ne-glikoTRF možemo primijetiti da je porast α uzvojnica i smanjenje struktura β-ploča povezano s jačim vezanjem i većim *SSA* vrijednostima NP. To smanjenje u strukturi β-ploča za ne-glikoTRF koreliralo je s povećanjem *SSA* vrijednosti i pokazalo se statistički značajnim kao što je prethodno opisano (prikazano u Tablici 14).

4.4. Analiza proteinske korone nanočestica

Vezanje proteina na površinu NP mijenja njihova fizikalno-kemijska svojstva, a posljedično njihovu sistemsku cirkulaciju, biodistribuciju i bioraspoloživost (185). Prethodno objavljena istraživanja uglavnom su bila usmjerena na kvalitativnu analizu proteina u koroni nakon inkubacije NP s plazmom ili serumom. Nedavna istraživanja, pokazala su da u slučaju AuNP, najveći udio u sastavu korone nakon inkubacije sa serumom ili plazmom čine albumin i imunoglobulin G (130,160,186,187). Vezanje albumina je očekivano obzirom na njegovu koncentraciju u krvi u usporedbi s ostalim proteinima. Nadalje, rezultati analize proteinske korone koja nastaje na površini AgNP pokazali su najveći udio komponenti komplementa i kininogena-1 (188,189). Međutim, kako bi se ispitao utjecaj glikozilacije na interakcije NP i proteina, odnosno na stvaranje proteinske korone, u ovom doktorskom radu korišten je jednostavni modelni sustav u kojem su sva tri proteina pojedinačno, a potom zajedno pomiješana s jednom vrstom NP. Kako je opisano u uvodnom poglavlju, proteini visoke koncentracije u plazmi, ali niskog afiniteta, prvi će se vezati na površinu NP i činit će većinu proteinske korone prema Vromanovom učinku (57). Takvi proteini se s vremenom zamjenjuju proteinima niskih koncentracija u plazmi, odnosno serumu, ali visokog afiniteta za NP (190). Stoga je za procjenu stvarnog utjecaj glikozilacije na sastav proteinske korone ispitana ista koncentraciju svih proteina u reakcijskoj smjesi, kako bi se minimalizirao utjecaj Vromanovog učinka (190). Nadalje, korištene su one koncentracije NP, koje su osiguravale istu ukupnu površinu svih ispitivanih NP. Koncentracije svakog proteina iznosile su 20 g/L, što znači da je ukupna koncentracija proteina u reakcijskoj smjesi iznosila 60 g/L za sve NP . Takav način dizajniranja eksperimenta omogućio je preciznije određivanje ukupne koncentracije proteina

na površini NP, budući da su prethodna istraživanja pokazala da ona ovisi o početnoj koncentraciji proteina koja je inkubirana s NP (191). Koncentracija ukupnih proteina u proteinskoj koroni određena je na površini svakog pojedinačnog NP (Slika 33).



Slika 33. Ukupna koncentracija proteina (*c*) u proteinskoj koroni izoliranoj s površine različitih AgNP i AuNP nakon njihove inkubacije sa smjesom koja je sadržavala goveđi serumski albumin (BSA), glikozilirani transferin (glikoTRF) i neglikozilirani transferin (ne-glikoTRF) u koncentracijama od 20 g/L pri 25 ºC u ultračistoj vodi (pH = 5,68). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti dobivene iz 3 neovisna mjerenja, a standardna devijacija prikazana je trakama pogrešaka.

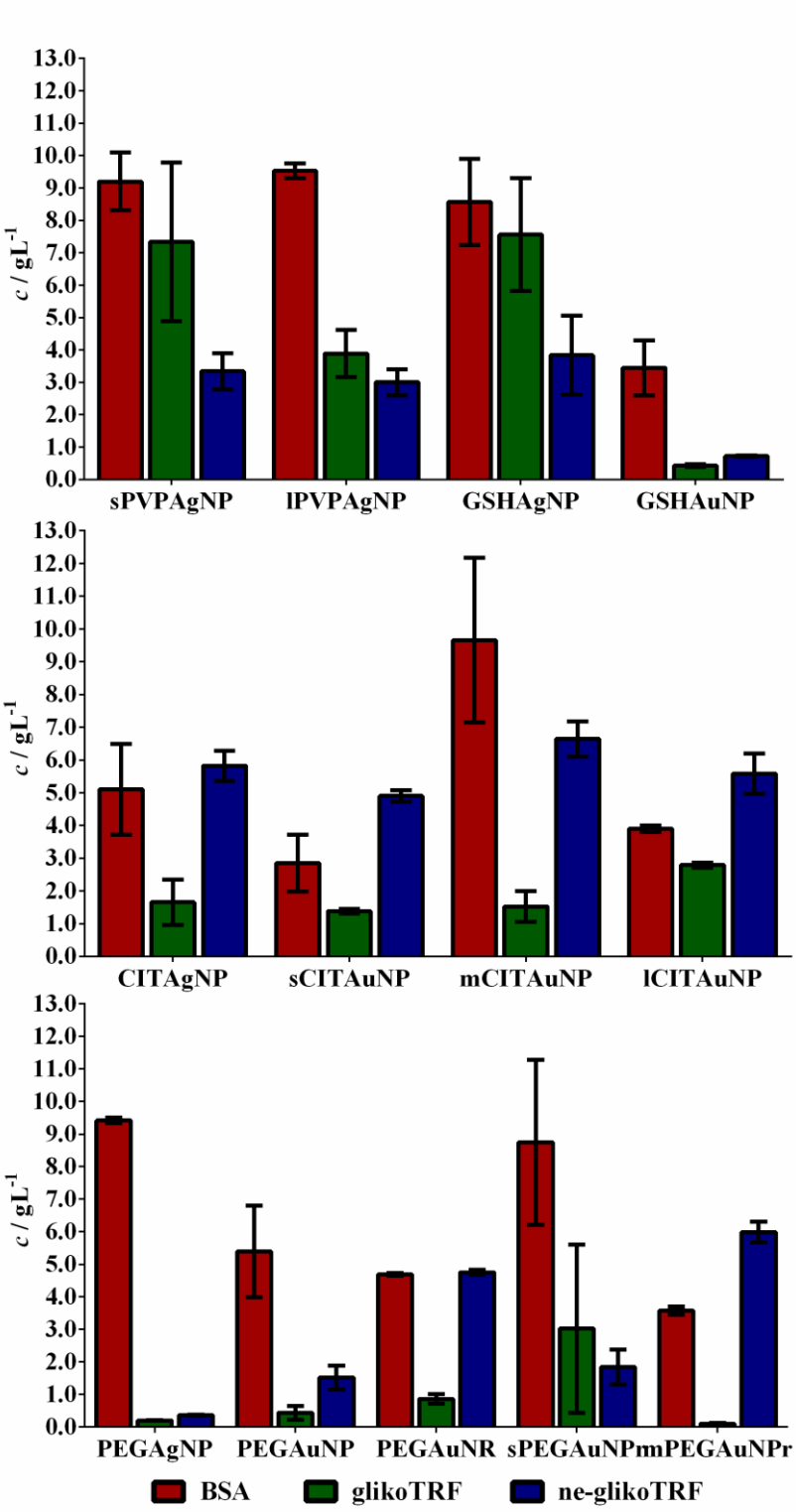
Ukupna koncentracija proteina u proteinskoj koroni je bila veća kod sferičnih AuNP, u odnosu na sferične AgNP iste površinske strukture i veličine. Takvi rezultati ukazuju na utjecaj metalne jezgre NP na stvaranje proteinske korone. Naime, zbog mogućnosti stvaranja kovalentnih Au-S veza, moguće je da su proteini na AuNP ostali jače vezani nakon ispiranja s PBS (179,180). Visoka koncentracija proteina izmjerena je na PVPAgNP koje su imale neutralniju vrijednost ζ potencijala u odnosu na ostale NP. Takvi rezultati sugeriraju da se negativno nabijeni proteini lakše vežu na površinu neutralnijih NP (148). Nadalje, ako usporedimo ukupne koncentracije proteina na sPVPAgNP i lPVPAgNP, možemo primijetiti da je veća koncentracija proteina izmjerena na površini manjih NP. Takvi rezultati dobiveni su i kod mCITAuNP i lCITAuNP, kod kojih je veća koncentracija proteina nađena na površini

manjih NP. Suprotno našim rezultatima, Dobrovolskaia i sur. su pokazali da je koncentracija proteina u koroni gotovo ako je ukupna površina NP bez obzira na to što su promjeri AuNP različiti (192). Međutim, prilikom interpretacije takvih rezultata potrebno je uzeti u obzir da na koncentraciju proteinske korone i njen sastav utječu brojni parametri kao što su temperatura, vrijeme inkubacije, pH te vrsta medija (58). Vrijeme inkubacije je u ovom istraživanju bilo kratko, svega 15 minuta te je moglo utjecati na stvaranje proteinske korone. Iako, tvrda proteinska korona nastaje brzo (u periodu od 1 minute), koncentracija proteina se mijenja s vremenom budući da je potrebno duže vrijeme da dođe do stvaranja meke korone (48). Prema tome, uzimajući u obzir da se manje čestice brže kreću u otopini u odnosu na velike zbog Brownovog gibanja, moguće je da je kinetika reakcije između proteina i malih NP bila brža, što je uzrokovalo stvaranje gušće proteinske korone u kraćem vremenskom razdoblju (193,194).

Kada promatramo utjecaj površinskog omotača, možemo primijetiti da je najmanja koncentracija proteina izmjerena na PEG stabiliziranim sferičnim NP, što se može pripisati njegovom svojstvu biokompatibilnosti. Kao što je prethodno spomenuto, hidrofilnost PEG uzrokuje elektrostatičko odbijanje proteina na površini NP (167,168). To se dobro slagalo s prethodno objavljenim rezultatima od Runa i sur. prema kojima je manja koncentracija proteina izmjerena na PEG stabiliziranim AuNP u odnosu na „gole“ AuNP (178).

Važno je istaknuti da je najveća koncentracija proteina izmjerena na površini AuNR u odnosu na sferične i prizmične AuNP iste veličine i površinske strukture. Takve rezultate moguće je objasniti zbog njihove cilindrične, odnosno dvodimenzionalne strukture, koja može omogućiti veću gustoću proteina (160). Naime, moguće je da na zakrivljenoj cilindričnoj površini štapićastih AuNR, molekule PEG imaju više prostora za „širenje“ po površini, što smanjuje elektrostatička odbijanja i pogoduje adsorpciji proteina (195). Međutim, zanimljivo je istaknuti da su konstante vezanja za sva tri proteina bili najmanje kod ove vrste NP u usporedbi sa sferičnim i prizmičnim NP, što bi moglo ukazivati da iako je u ovom slučaju afinitet vezanja slab, gustoća pakiranja proteina je bolja. Suprotno našim rezultatima, Gracia-Alvarez i sur. pokazali su da su u koroni AuNPr izmjerene veće koncentracije proteina u usporedbi sa štapićastim AuNR iste veličine (196). Također, u navedenom istraživanju dobiveno je, da je veća koncentracija proteina izmjerena na površini velikih u odnosu na male prizmične NP, što je bilo u skladu s našim rezultatima.

Koncentracija proteinske korone određena je i nakon inkubacije pojedinačnih proteina s NP, a dobiveni rezultati su prikazani na Slici 34.



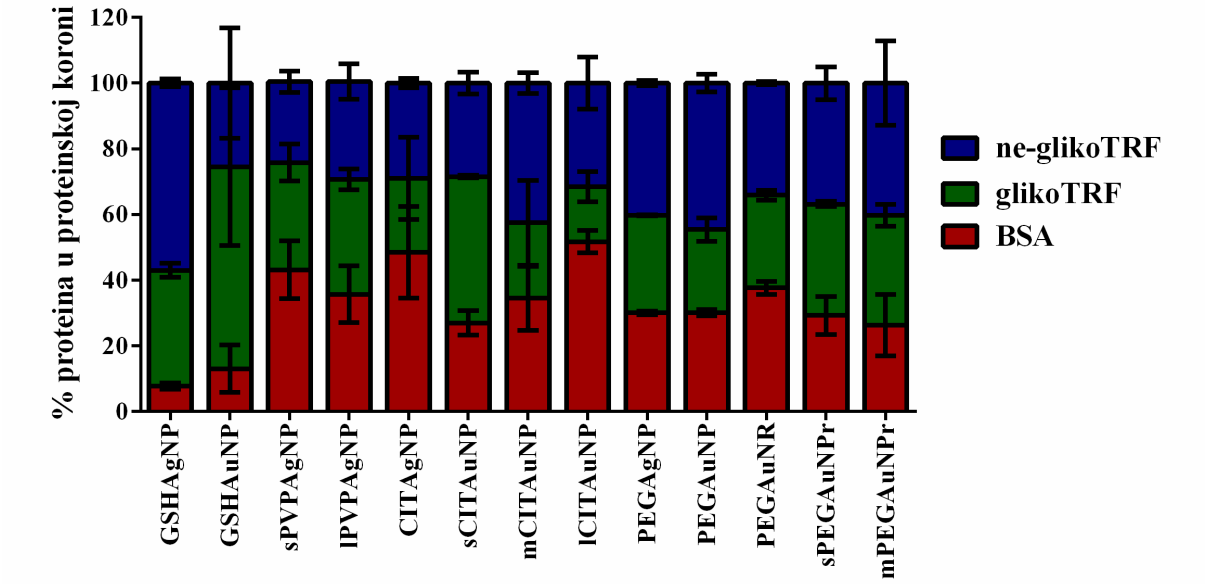
Slika 34. Koncentracija proteina (*c*) izolirana s površine različitih AgNP i AuNP nakon njihove inkubacije s govođim serumskim albuminom (BSA), glikoziliranim transferinom (glikoTRF) i neglikoziliranim transferinom (ne-glikoTRF) u koncentracijama od 20 g/L pri 25 ºC u ultračistoj vodi (pH = 5,68). Rezultati su dati kao srednje vrijednosti dobivene iz 3 neovisna mjerenja, a standardna devijacija prikazana je trakama pogrešaka.

Kada promotrimo rezultate dobivene za sPVPAgNP i lPVPAgNP, možemo primijetiti da su izmjerene slične koncentracije BSA na obje vrste NP. Isti rezultati dobiveni su i za ne-glikoTRF, dok se koncentracija glikoTRF povisila kod manjih NP, odnosno sPVPAgNP. Osim za navedene NP, utjecaj veličine se može promotriti i usporedbom CIT stabiliziranih AuNP različitih veličina. Zanimljivo je da se koncentracija proteina povisila s veličinom kod glikoTRF, dok je koncentracija ne-glikoTRF bila gotovo ista kod sve tri vrste CITAuNP kada uzmemo u obzir vrijednosti standardnih devijacija. Koncentracija glikoTRF je bila najmanja kada usporedimo s koncentracijama dobivenima za BSA i ne-glikoTRF, što je bilo u skladu s rezultatima dobivenima za udjele proteina u proteinskoj koroni, gdje je također najmanji udio dobiven za glikoTRF na površini mCITAuNP i lCITAuNP, kako je opisano dalje u ovom poglavlju. Međutim, lCITAuNP je izazvao i najveće promjene u strukturama svih proteina te su manje koncentracije proteina na površini ovih NP bile očekivane. Zanimljivo je primijetiti da je kod usporedbe AgNP i AuNP iste veličine, površinske strukture i oblika, veća koncentracija proteina određena na površini AgNP, što je bilo u suprotnosti s rezultatima dobivenima kod smjese svih proteina. Veća koncentracija izmjerena je na površini GSHAgNP, CITAgNP te PEGAgNP, u odnosu na GSHAuNP, lCITAuNP i PEGAuNP za sve vrste proteina, osim ne-glikoTRF kod kojeg je veća koncentracija pronađena na površini PEGAuNP, u odnosu na PEGAgNP. Kada se promotri utjecaj površinske strukture NP, odnosno kada se usporede rezultati između lPVPAgNP, CITAgNP i PEGAgNP, možemo primijetiti da je najmanja koncentracija glikoTRF i ne-glikoTRF izmjerena na površini PEGAgNP, što odgovara prethodnim rezultatima. Također, visoke koncentracije svih proteina dobivene su na površini GSHAgNP što je bilo u skladu s dobivenim logK_b vrijednostima. Očito je da GSH na površini NP nije spriječio daljnje vezanje proteina, što je moguće objasniti ukoliko je došlo do njegove zamjene s ispitivanim proteinom.

Uspoređujući glikoTRF i ne-glikoTRF može se primijetiti da je kod svih CIT stabiliziranih NP, koncentracija ne-glikoTRF bila veća. Takvi rezultati su bili u skladu s prethodno dobivenim rezultatima za afinitete vezanja i udjele pojedinih proteina u proteinskoj koroni, što je dodatno potvrdilo mogući utjecaj negativno nabijenih glikana na površini glikoTRF na interakciju s negativno nabijenim NP. S druge pak strane, veće koncentracije glikoTRF izmjerene su na površini neutralnih PVPAgNP u odnosu na ne-glikoTRF. Takvi rezultati su dobiveni i u slučaju GSHAgNP, iako je vrijednost logK_b dobivena interakcijom ovih NP i glikoTRF bila manja. Promatrajući koncentracije izmjerene na površini različitih oblika PEG stabiliziranih AuNP, može se primijetiti da su na površini svih NP izmjerene veće

koncentracije ne-glikoTRF u odnosu na glikoTRF, osim u slučaju sPEGAuNPr. Međutim, vrijednost standardne devijacije je bila velika u ovom slučaju za glikoTRF.

Nadalje, udio pojedinog proteina u proteinskoj koroni određen je nakon inkubacije pojedinačnog NP sa smjesom proteina, te su rezultati prikazani kao postotak pojedinog proteina u odnosu na ukupnu koncentraciju proteinske korone i prikazani su na Slici 35. Dobiveni rezultati pokazali su različiti sastav proteinske korone ovisno o vrsti NP. Bitno je naglasiti da je prilikom interpretacije rezultata potrebno uzeti u obzir rezultate afiniteta vezanja i konformacijskih promjena proteina. Budući da su koncentracije proteina u reakcijskoj smjesi bile iste, prema Vromanovom učinku, najveći udio u koroni bi trebao imati onaj protein kod kojeg su izmjerene najveće logK_b vrijednosti. Također, u obzir treba uzeti i promjene sekundarne strukture proteina (177).



Slika 35. Udio goveđeg serumskog albumina (BSA), glikoziliranog transferina (glikoTRF) i neglikoziliranog transferina (ne-glikoTRF) u proteinskoj koroni izoliranoj s površine različitih AgNP i AuNP nakon inkubacije pri 25 ºC u ultračistoj vodi (pH = 5,68). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti dobivene iz 3 neovisna mjerenja, a standardna devijacija prikazana je trakama pogrešaka.

Za procjenu utjecaja površinske strukture na stvaranje proteinske korone, potrebno je analizirati rezultate udjela proteina na površini AgNP stabiliziranih s PVP, CIT i PEG. Udio svakog proteina pronađen u koroni PEGAgNP bio je gotovo jednak. S druge pak strane, kod CIT AgNP izmjeren je najveći udio BSA, a gotovo isti udio glikoTRF i ne-glikoTRF. Najveći

udio ne-glikoTRF u odnosu na BSA i glikoTRF izmjeren je u koroni lPVPAgNP. Rezultati ukazuju na utjecaj površinskog omotača na sastav proteinske korone. U skladu s istraživanjem provedenim od strane Shannahan i sur. primjećen je porast udjela BSA u koroni s povećanjem veličine NP (197). Takav porast je primijećen kod PVPAgNP, ali i kod CITAuNP. Ipak, oba transferina pokazala su obrnuti trend na temelju veličine za iste NP. Povećao se udio glikoTRF, a smanjio ne-glikoTRF u koroni PVPAgNP s veličinom, dok je suprotan trend uočen za CITAuNP. Takav trend uočen je za glikoTRF kod prethodno opisanih rezultata za logK_b vrijednosti. Naime, afiniteti vezanja za glikoTRF su se smanjivali s povećanjem veličine CITAuNP. Udio oba transferina na površini lCITAuNP je bio najmanji kada se rezultati usporede s drugim NP. Takvi rezultati su bili očekivani, budući da su se promjene u sekundarnoj strukturi oba transferina pokazale značajnima prilikom interakcije s ovom vrstom NP, što sugerira da oba transferina moraju proći značajnu konformacijsku promjenu kako bi se vezali na površinu NP. U koroni AuNP različitog oblika izmjerene su različite koncentracije sva tri proteina. Najveći udio BSA pronađen je na površini AuNR u usporedbi sa sferičnim i prizmičnim NP. Bewersdorffu i sur. su objavili istraživanje na PEG stabiliziranim AuNP različitih oblika (186). Njihovi rezultati su pokazali da se udio humanog serumskog albumina u proteinskoj koroni povećao na NR u usporedbi sa NP i NPr, što se slagalo s rezultatima dobivenima u ovom doktorskom radu. Rezultati su pokazali da se udio glikoTRF povećao na površini PEGAuNP na temelju njihovog oblika s trendom, sfere < štapići < prizme. Udio glikoTRF povećao se na površini prizmičnih u odnosu na štapićaste NP, što je bilo u skladu s dobivenima logK_b vrijednostima kod interakcije glikoTRF i ovih vrsta NP. Udio ne-glikoTRF je bio najveći na površini sferičnih AuNP u odnosu na glikoTRF i BSA, iako je afinitet vezanja za PEGAuNP bio slabiji u odnosu na PEGAuNR i PEGAuNPr. Međutim, udio ne-glikoTRF se smanjio u proteinskoj koroni NR u odnosu na NPr, što je bilo u skladu s dobivenim logK_b vrijednostima.

Uzimajući u obzir navedene rezultate jasno je da prisustvo glikana na površini proteina značajno utječe na njihovu interakciju s NP. Rezultati također ukazuju na drugačije ponašanje pojedinačnih proteina u odnosu na smjesu proteina. Također, prilikom ispitivanja stvaranja proteinske korone, a posebno ispitivanja kompetitivnog vezanja proteina na površinu NP, potrebno je uzeti u obzir afinitete vezanja, kao i promjene strukture proteina do kojih dolazi prilikom interakcije s nanopovršinom. Prema tome, možemo zaključiti da na stvaranje proteinske korone utječe veliki broj čimbenika kao što su površinska struktura, veličina i oblik NP, te priroda proteina i status glikozilacije.

5. ZAKLJUČCI

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

- Ispitane vrste NP stabilnije su u ultračistoj vodi u odnosu na medije većih ionskih jakosti, kao što su ALF i AGF u kojima dolazi do destabilizacije, agregacije i otapanja NP. Agregacija i otapanje NP događaju se u DMEM mediju, pri čemu prisutnost proteina sprječava te procese i osigurava koloidnu stabilnost NP uslijed stvaranja proteinske korone na njihovoj površini.
- Vezanje proteina na površinu NP povećava njihov hidrodinamički promjer i ζ potencijal NP.
- Glikozilacijski status proteina i fizikalno-kemijska svojstva NP utječu na jakost vezanja proteina na nanopovršinu, kao i na promjene sekundarne strukture proteina. Statistička analize podataka pokazuje da:
    - pozitivnije vrijednosti ζ potencijala dovode do slabijeg vezanja glikoTRF na NP, dok je jakost vezanja ne-glikoTRF na NP neovisna o vrijednosti ζ potencijala;
    - neglikozilirani proteini ne-glikoTRF i BSA pokazuju slične promjene u strukturi α-uzvojnica nakon vezanja za istu vrstu NP, odnosno promjene α-uzvojnica u njihovim strukturama pozitivno koreliraju;
    - veća vrijednost specifične površine NP manje utječe na promjene u strukturi β-ploča ne-glikoTRF, dok su promjene struktura β-ploča glikoTRF neovisne o vrijednostima specifične površine NP.
- Koncentracija i sastav proteinske korone na površini NP ovise o njihovoj površinskoj strukturi i obliku te glikozilaciji proteina, odnosno prisutnosti/odsutnosti glikana na proteinu.

Dobiveni rezultati potvrdili su hipotezu da prisutnost glikana na površini transferina značajno utječe na interakcije s NP. Također, potvrđen je utjecaj fizikalno-kemijskih svojstava NP na navedene interakcije. Takvi rezultati pridonose razumijevanju mehanizama na nano-bio sučelju što je bitno u razvoju novih, sigurnijih i učinkovitijih NP u biomedicinske svrhe.

6. POPIS LITERATURE

1. Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. Cell. 2006;126(5):855–67.

2. Varki A. Biological roles of glycans. Glycobiology. 2017;27(1):3–49.

3. Schwarz F, Aebi M. Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. Curr Opin Struct Biol. 2011;21(5):576–82.

4. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. Essentials of Glycobiology. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017: 653.

5. Burda P, Aebi M. The dolichol pathway of N-linked glycosylation. Biochim Biophys Acta - Gen Subj. 1999;1426(2):239–57.

6. Steen P Van den, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1998;33(3):151–208.

7. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. Nat Rev Nephrol. 2019;15(6):346–66.

8. Kumar Kk, Reddy Gs, Reddy B, Shekar Pc, Sumanthi J, Chandra KlP. Biological role of lectins: A review. J Orofac Sci. 2012;4(1):20.

9. Delorme E, Lorenzini T, Giffin J, Martin F, Jacobsen F, Boone T, et al. Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. Biochemistry. 1992 Oct 1;31(41):9871–6.

10. Freeze HH. Understanding human glycosylation disorders: biochemistry leads the charge. J Biol Chem. 2013;288(10):6936–45.

11. Sturiale L, Barone R, Garozzo D. The impact of mass spectrometry in the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. J Inherit Metab Dis. 2011;34(4):891–9.

12. Gornik O, Royle L, Harvey DJ, Radcliffe CM, Saldova R, Dwek RA, et al. Changes of serum glycans during sepsis and acute pancreatitis. Glycobiology. 2007;17(12):1321–32.

13. Nakagawa H, Hato M, Takegawa Y, Deguchi K, Ito H, Takahata M, et al. Detection of altered N-glycan profiles in whole serum from rheumatoid arthritis patients. J Chromatogr B. 2007;853(1–2):133–7.

14. Testa R, Vanhooren V, Bonfigli AR, Boemi M, Olivieri F, Ceriello A, et al. N-Glycomic Changes in Serum Proteins in Type 2 Diabetes Mellitus Correlate with Complications and with Metabolic Syndrome Parameters. PLoS One. 2015;10(3):e0119983.

15. Miyahara K, Nouso K, Saito S, Hiraoka S, Harada K, Takahashi S, et al. Serum Glycan Markers for Evaluation of Disease Activity and Prediction of Clinical Course in Patients with Ulcerative Colitis. PLoS One. 2013;8(10):e74861.

16. Peracaula R. Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins. Glycobiology. 2003;13(6):457–70.

17. European Commission. Commission Recommendation on the definition of nanomaterial. Preuzeto s: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/txt/?uri=celex:32011h0696. (pristupljeno: 2. lipnja 2021.).

18. Jeevanandam J, Barhoum A, Chan YS, Dufresne A, Danquah MK. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. Beilstein J Nanotechnol. 2018;9:1050–74.

19. Bajwa SZ, Munawar A, Khan WS. Nanotechnology in medicine: innovation to market. Pharm Bioprocess. 2017;5(2):11–5.

20. King S, Dobson P, Jarvie H. Nanoparticle. Preuzeto s: https://www.britannica.com/science/nanoparticle. (pristupljeno: 2. lipnja 2021.).

21. Wang MD, Shin DM, Simons JW, Nie S. Nanotechnology for targeted cancer therapy. Expert Rev Anticancer Ther. 2007;7(6):833–7.

22. Emerich DF, Thanos CG. Nanotechnology and medicine. Expert Opin Biol Ther. 2003;3(4):655–63.

23. Rao R, Pint CL, Islam AE, Weatherup RS, Hofmann S, Meshot ER, et al. Carbon Nanotubes and Related Nanomaterials: Critical Advances and Challenges for Synthesis toward Mainstream Commercial Applications. ACS Nano.

2018;12(12):11756–84.

24. Anu Mary Ealia S, Saravanakumar MP. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. IOP Conf Ser Mater Sci Eng. 2017;263:032019.

25. Lu H, Tang S-Y, Yun G, Li H, Zhang Y, Qiao R, et al. Modular and Integrated Systems for Nanoparticle and Microparticle Synthesis—A Review. Biosensors. 2020;10(11):165.

26. Pacioni NL, Borsarelli CD, Rey V, Veglia A V. Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles BT - Silver Nanoparticle Applications: In the Fabrication and Design of Medical and Biosensing Devices. In: Alarcon EI, Griffith M, Udekwu KI, editors. Cham: Springer International Publishing, 2015:13–46.

27. de Oliveira PFM, Torresi RM, Emmerling F, Camargo PHC. Challenges and opportunities in the bottom-up mechanochemical synthesis of noble metal nanoparticles. J Mater Chem A. 2020;8(32):16114–41.

28. Tolaymat TM, El Badawy AM, Genaidy A, Scheckel KG, Luxton TP, Suidan M. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. Sci Total Environ. 2010;408(5):999–1006.

29. Olenin AY, Krutyakov YA, Kudrinskii AA, Lisichkin G V. Formation of surface layers on silver nanoparticles in aqueous and water-organic media. Colloid J. 2008;70(1):71–6.

30. Kharisov BI, Dias HVR, Kharissova O V., Vázquez A, Peña Y, Gómez I. Solubilization, dispersion and stabilization of magnetic nanoparticles in water and non-aqueous solvents: recent trends. RSC Adv. 2014;4(85):45354–81.

31. dos Santos CA, Ingle AP, Rai M. The emerging role of metallic nanoparticles in food. Appl Microbiol Biotechnol. 2020;104(6):2373–83.

32. Gajbhiye S, Sakharwade S. Silver nanoparticles in cosmetics. J Cosmet Dermatological Sci Appl. 2016;6(1):48–53.

33. Koo B, Xiong H, Slater MD, Prakapenka VB, Balasubramanian M, Podsiadlo P, et al. Hollow Iron Oxide Nanoparticles for Application in Lithium Ion Batteries. Nano Lett.

2012;12(5):2429–35.

34. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. FASEB J. 2005;19(3):311–30.

35. Murthy SK. Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges. Int J Nanomedicine. 2007;2(2):129–41.

36. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles-a review. Trop J Pharm Res. 2006;5(1):561–73.

37. Kalita MP. Historical Development, Preparation, Characterization, and Pharmacokinetics of Nanoparticles: A Review. Asian J Pharm Free full text Artic from Asian J Pharm. 2019;12(04):1110–8.

38. Sur S, Rathore A, Dave V, Reddy KR, Chouhan RS, Sadhu V. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. Nano-Structures & Nano-Objects. 2019;20:100397.

39. Wong KKY, Liu X. Silver nanoparticles—the real "silver bullet" in clinical medicine? Medchemcomm. 2010;1(2):125–31.

40. Durán N, Marcato PD, De Souza GIH, Alves OL, Esposito E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. J Biomed Nanotechnol. 2007;3(2):203–8.

41. Prabhu S, Poulose EK. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. Int Nano Lett. 2012;2(1):32.

42. Sztandera K, Gorzkiewicz M, Klajnert-Maculewicz B. Gold Nanoparticles in Cancer Treatment. Mol Pharm. 2019;16(1):1–23.

43. Versiani AF, Andrade LM, Martins EMN, Scalzo S, Geraldo JM, Chaves CR, et al. Gold nanoparticles and their applications in biomedicine. Future Virol. 2016;11(4):293–309.

44. Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O, Ledue TB, Craig WY. Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin, transferrin and transthyretin: a practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort. J Clin Lab Anal. 1999;13(6):273–9.

45. El-Boubbou K, Zhu DC, Vasileiou C, Borhan B, Prosperi D, Li W, et al. Magnetic

glyco-nanoparticles: a tool to detect, differentiate, and unlock the glyco-codes of cancer via magnetic resonance imaging. J Am Chem Soc. 2010;132(12):4490–9.

46. Schofield CL, Field RA, Russell DA. Glyconanoparticles for the colorimetric detection of cholera toxin. Anal Chem. 2007;79(4):1356–61.

47. Capjak I, Goreta SŠ, Jurašin DD, Vrček IV. How protein coronas determine the fate of engineered nanoparticles in biological environment. Arch Ind Hyg Toxicol. 2017;68(4):245–53.

48. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. Nat Nanotechnol. 2013;8(10):772–81.

49. Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM V, Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. Nat Mater. 2009;8(7):543–57.

50. Monopoli MP, Åberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. Nat Nanotechnol. 2012;7(12):779–86.

51. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson K. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:14265–70.

52. Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. Nat Rev Mater. 2016;1(5):16014.

53. Lynch I, Dawson KA. Protein-nanoparticle interactions. Nano Today. 2008;3(1–2):40–7.

54. Corbo C, Molinaro R, Parodi A, Toledano Furman NE, Salvatore F, Tasciotti E. The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. Nanomedicine. 2016;11(1):81–100.

55. Gao H, He Q. The interaction of nanoparticles with plasma proteins and the consequent influence on nanoparticles behavior. Expert Opin Drug Deliv. 2014;11(3):409–20.

56. Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL. Interaction of nanoparticles with proteins: relation

to bio-reactivity of the nanoparticle. J Nanobiotechnology. 2013;11(1):26.

57. Hirsh SL, McKenzie DR, Nosworthy NJ, Denman JA, Sezerman OU, Bilek MMM. The Vroman effect: Competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2013;103:395–404.

58. Nguyen VH, Lee B-J. Protein corona: a new approach for nanomedicine design. Int J Nanomedicine. 2017;12:3137–51.

59. Walkey CD, Chan WCW. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. Chem Soc Rev. 2012;41(7):2780–99.

60. Li L, Mu Q, Zhang B, Yan B. Analytical strategies for detecting nanoparticle–protein interactions. Analyst. 2010;135(7):1519–30.

61. Zeng L, Gao J, Liu Y, Gao J, Yao L, Yang X, et al. Role of protein corona in the biological effect of nanomaterials: Investigating methods. TrAC Trends Anal Chem. 2019;118:303–14.

62. Wan S, Kelly PM, Mahon E, Stöckmann H, Rudd PM, Caruso F, et al. The "sweet" Side of the protein corona: Effects of glycosylation on nanoparticle-cell interactions. ACS Nano. 2015;9(2):2157–66.

63. Bteich M. An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions. Heliyon. 2019;5(11):e02879.

64. Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O, Ledue TB, Craig WY. Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin, transferrin and transthyretin: a practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort. J Clin Lab Anal. 1999;13(6):273–9.

65. Gibbs J, Cull W, Henderson W, Daley J, Hur K, Khuri SF. Preoperative serum albumin level as a predictor of operative mortality and morbidity: results from the National VA Surgical Risk Study. Arch Surg. 1999;134(1):36–42.

66. Dugaiczyk A, Law SW, Dennison OE. Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human serum albumin mRNA. Proc Natl Acad Sci. 1982;79(1):71–5.

67. Peters T. Serum albumin. In: Sprang SR, editor. Advances in protein chemistry. Amsterdam: Elsevier, 1985:161–245.

68. Tayeh N, Rungassamy T, Albani JR. Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins. J Pharm Biomed Anal. 2009;50(2):107–16.

69. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. Protein Eng Des Sel. 1999;12(6):439–46.

70. Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. Protein data bank. Preuzeto s: https://www.rcsb.org/structure/3qyt. (pristupljeno: 2. lipnja 2021.).

71. Sen T, Mandal S, Haldar S, Chattopadhyay K, Patra A. Interaction of Gold Nanoparticle with Human Serum Albumin (HSA) Protein Using Surface Energy Transfer. J Phys Chem C. 2011;115(49):24037–44.

72. Mariam J, Dongre PM, Kothari DC. Study of Interaction of Silver Nanoparticles with Bovine Serum Albumin Using Fluorescence Spectroscopy. J Fluoresc. 2011;21(6):2193.

73. Treuel L, Malissek M, Gebauer JS, Zellner R. The Influence of Surface Composition of Nanoparticles on their Interactions with Serum Albumin. ChemPhysChem. 2010;11(14):3093–9.

74. Sen S, Konar S, Das B, Pathak A, Dhara S, Dasgupta S, et al. Inhibition of fibrillation of human serum albumin through interaction with chitosan-based biocompatible silver nanoparticles. RSC Adv. 2016;6(49):43104–15.

75. Shcharbin D, Pedziwiatr-Werbicka E, Serchenya T, Cyboran-Mikolajczyk S, Prakhira L, Abashkin V, et al. Role of cationic carbosilane dendrons and metallic core of functionalized gold nanoparticles in their interaction with human serum albumin. Int J Biol Macromol. 2018;118(B):1773–80.

76. Tsai D-H, DelRio FW, Keene AM, Tyner KM, MacCuspie RI, Cho TJ, et al. Adsorption and Conformation of Serum Albumin Protein on Gold Nanoparticles Investigated Using Dimensional Measurements and in Situ Spectroscopic Methods. Langmuir. 2011;27(6):2464–77.

77. Lacerda SHDP, Park JJ, Meuse C, Pristinski D, Becker ML, Karim A, et al. Interaction

of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins. ACS Nano. 2010;4(1):365–79.

78. Karthiga D, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Spectroscopic studies on the interactions of bovine serum albumin in presence of silver nanorods. J Mol Liq. 2017;232:251–7.

79. Kohli I, Alam S, Patel B, Mukhopadhyay A. Interaction and diffusion of gold nanoparticles in bovine serum albumin solutions. Appl Phys Lett. 2013;102(20).

80. Danhier F, Feron O, Préat V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. J Control Release. 2010;148(2):135–46.

81. Soe ZC, Kwon JB, Thapa RK, Ou W, Nguyen HT, Gautam M, et al. Transferrin-Conjugated Polymeric Nanoparticle for Receptor-Mediated Delivery of Doxorubicin in Doxorubicin-Resistant Breast Cancer Cells. Pharmaceutics. 2019;11(2):63.

82. Cui Y, Xu Q, Chow PK-H, Wang D, Wang C-H. Transferrin-conjugated magnetic silica PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin and paclitaxel for brain glioma treatment. Biomaterials. 2013;34(33):8511–20.

83. Gomme PT, McCann KB, Bertolini J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. Drug Discov Today. 2005;10(4):267–73.

84. Testa U, Pelosi E, Peschle C. The transferrin receptor. Crit Rev Oncog. 1993;4(3):241.

85. Nagae M, Morita-Matsumoto K, Arai S, Wada I, Matsumoto Y, Saito K, et al. Structural change of N-glycan exposes hydrophobic surface of human transferrin. Glycobiology. 2014;24(8):693–702.

86. He QY, Mason AB, Nguyen V, MacGillivray RT WR. The chloride effect is related to anion binding in determining the rate of iron release from the human transferrin N-lobe. Biochem J. 2000;350(3):909–15.

87. Hirose M. The structural mechanism for iron uptake and release by transferrins. Biosci Biotechnol Biochem. 2000;64(7):1328–36.

88. Yang N, Zhang H, Wang M, Hao Q, Sun H. Iron and bismuth bound human serum transferrin reveals a partially-opened conformation in the N-lobe. Sci Rep. 2012;2:999.

89. Kohgo Y, Niitsu Y, Kondo H, Kato J, Tsushima N, Sasaki K, et al. Serum Transferrin Receptor as a New Index of Erythropoiesis. Blood. 1987;70(6):1955–8.

90. Peter F, Wang S. Serum iron and total iron-binding capacity compared with serum ferritin in assessment of iron deficiency. Clin Chem. 1981;27(2):276–9.

91. Marquardt T, Denecke J. Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. Eur J Pediatr. 2003;162(6):359–79.

92. Peter J, Unverzagt C, Engel W-D, Renauer D, Seidel C, Hösel W. Identification of carbohydrate deficient transferrin forms by MALDI-TOF mass spectrometry and lectin ELISA. Biochim Biophys Acta - Gen Subj. 1998;1380(1):93–101.

93. Helander A, Husa A, Jeppsson J-O. Improved HPLC Method for Carbohydrate-deficient Transferrin in Serum. Clin Chem. 2003;49(11):1881–90.

94. Paterlini V, Porpiglia NM, De Palo EF, Tagliaro F. Asialo-transferrin: Biochemical aspects and association with alcohol abuse investigation. Alcohol. 2019;78:43–50.

95. Futakawa S, Nara K, Miyajima M, Kuno A, Ito H, Kaji H, et al. A unique N-glycan on human transferrin in CSF: a possible biomarker for iNPH. Neurobiol Aging. 2012;33(8):1807–15.

96. Yoshihara A, Fukatsu M, Hoshi K, Ito H, Nollet K, Yamaguchi Y, et al. Subgroup differences in ‘brain-type’ transferrin and α-synuclein in Parkinson’s disease and multiple system atrophy. J Biochem. 2016;160(2):87–91.

97. Taniguchi M, Okayama Y, Hashimoto Y, Kitaura M, Jimbo D, Wakutani Y, et al. Sugar Chains of Cerebrospinal Fluid Transferrin as a New Biological Marker of Alzheimer’s Disease. Dement Geriatr Cogn Disord. 2008;26(2):117–22.

98. Jain AA, Jain AA, Garg NK, Tyagi RK, Singh B, Katare OP, et al. Surface engineered polymeric nanocarriers mediate the delivery of transferrin–methotrexate conjugates for an improved understanding of brain cancer. Acta Biomater. 2015;24:140–51.

99. Jurašin DD, Ćurlin M, Capjak I, Crnković T, Lovrić M, Babič M, et al. Surface coating affects behavior of metallic nanoparticles in a biological environment. Beilstein J Nanotechnol. 2016;7:246–62.

100. Šileikaite A, Puišo J, Prosyčevas I, Tamulevičius S. Investigation of silver nanoparticles formation kinetics during reduction of silver nitrate with sodium citrate. Medziagotyra. 2009;15(1):21–7.

101. Pem B, Pongrac IM, Ulm L, Pavičić I, Vrček V, Jurašin DD, et al. Toxicity and safety study of silver and gold nanoparticles functionalized with cysteine and glutathione. Beilstein J Nanotechnol. 2019;10:1802–17.

102. Pecora R. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. J Nanoparticle Res. 2000;2(2):123–31.

103. Malvern Instruments Limited. Zetasizer Nano Series User manual. Preuzeto s: https://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/malvern zetasizer zs dls user manual.pdf. (pristupljeno: 2. lipnja 2021.).

104. Takagi T. Electrophoretic light scattering. Electrophoresis. 1993;14(1):1255–6.

105. Xu R, Scarlett B, editors. Electrophoretic Light Scattering. In: Particle Characterization: Light Scattering Methods. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002:289–343.

106. Kaszuba M, McKnight D, Connah MT, McNeil-Watson FK, Nobbmann U. Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. J Nanoparticle Res. 2008;10(5):823–9.

107. Asadi Asadabad M, Jafari Eskandari M. Transmission Electron Microscopy as Best Technique for Characterization in Nanotechnology. Synth React Inorganic, Met Nano-Metal Chem. 2015;45(3):323–6.

108. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods. 2012;9(7):671–5.

109. Hutter E, Fendler JH. Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance. Adv Mater. 2004;16(19):1685–706.

110. Iskandar F. Nanoparticle processing for optical applications–A review. Adv Powder Technol. 2009;20(4):283–92.

111. Kumbhakar P, Ray SS, Stepanov AL. Optical Properties of Nanoparticles and Nanocomposites. J Nanomater. 2014;2014:1–2.

112. Lagalante AF. Atomic Absorption Spectroscopy: A Tutorial Review. Appl Spectrosc Rev. 2004;34(3):173–89.

113. Zuber A, Purdey M, Schartner E, Forbes C, van der Hoek B, Giles D, et al. Detection of gold nanoparticles with different sizes using absorption and fluorescence based method. Sensors Actuators B Chem. 2016;227:117–27.

114. Callister WD, Rethwisch DG. Materials Science and Engineering: An Introduction, 8th Edition. Preuzeto s: Wiley, 2009:

115. Pelaz B, Grazu V, Ibarra A, Magen C, del Pino P, de la Fuente JM. Tailoring the synthesis and heating ability of gold nanoprisms for bioapplications. Langmuir. 2012 Jun;28(24):8965–70.

116. Stebounova L V., Guio E, Grassian VH. Silver nanoparticles in simulated biological media: A study of aggregation, sedimentation, and dissolution. J Nanoparticle Res. 2011;13(1):233–44.

117. Misra SK, Dybowska A, Berhanu D, Luoma SN, Valsami-Jones E. The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. Sci Total Environ. 2012;438:225–32.

118. Odzak N, Kistler D, Behra R, Sigg L. Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media. Environ Pollut. 2014;191:132–8.

119. van der Zande M, Vandebriel RJ, Van Doren E, Kramer E, Herrera Rivera Z, Serrano-Rojero CS, et al. Distribution, Elimination, and Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Rats after 28-Day Oral Exposure. ACS Nano. 2012;6(8):7427–42.

120. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. Nat Protoc. 2006;1(6):2876–90.

121. Micsonai A, Wien F, Kernya L, Lee Y-H, Goto Y, Réfrégiers M, et al. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. Proc Natl Acad Sci. 2015;112(24):3095–103.

122. Lakowicz JR, editor. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Boston: Springer US, 2006: 954.

123. Wang T, Zeng L-H, Li D-L. A review on the methods for correcting the fluorescence

inner-filter effect of fluorescence spectrum. Appl Spectrosc Rev. 2017;52(10):883–908.

124. Bano S, Mohd A, Khan AAP, Siddiqi KS. Complexation and Mechanism of Fluorescence Quenching of Telmisartan with Y(III) and Nd(III). J Chem Eng Data. 2010;55(12):5759–65.

125. Albani JR. Fluorescence Quenching. In: Albani JRBT-S and D of MA and FS, editor. Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies. Amsterdam: Elsevier, 2004:141–92.

126. Sousa AA. A Note on the use of Steady–State Fluorescence Quenching to Quantify Nanoparticle–Protein Interactions. J Fluoresc. 2015;25(6):1567–75.

127. Gooderham K. In situ Peptide Mapping of Proteins and Polypeptides Separated by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: Dunn M, editor. Gel Electrophoresis of Proteins. Amsterdam: Elsevier, 1986:312–22.

128. Mohanty AK, Yadav ML, Choudhary S. Gel Electrophoresis of Proteins and Nucleic Acids. In: Srivastava N, Pande M, editors. Protocols in Semen Biology (Comparing Assays). Singapore: Springer Singapore, 2017:233–46.

129. Lundqvist M, Augustsson C, Lilja M, Lundkvist K, Dahlbäck B, Linse S, et al. The nanoparticle protein corona formed in human blood or human blood fractions. PLoS One. 2017;12(4):e0175871.

130. Fernández-Iglesias N, Bettmer J. Complementary mass spectrometric techniques for the quantification of the protein corona: a case study on gold nanoparticles and human serum proteins. Nanoscale. 2015;7(34):14324–31.

131. Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. Anal Biochem. 1988 Nov;175(1):231–7.

132. Godbey WT. Gene Delivery. In: Godbey WT, editor. An Introduction to Biotechnology. Amsterdam: Elsevier, 2014:275–312.

133. Clogston JD, Patri AK. Zeta Potential Measurement. In: McNeil SE, editor. Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. New York: Springer, 2011:63–70.

134. Behzadi S, Ghasemi F, Ghalkhani M, Ashkarran AA, Akbari SM, Pakpour S, et al. Determination of nanoparticles using UV-Vis spectra. Nanoscale. 2015;7(12):5134–9.

135. Rasmussen K, Rauscher H, Mech A, Riego Sintes J, Gilliland D, González M, et al. Physico-chemical properties of manufactured nanomaterials - Characterisation and relevant methods. An outlook based on the OECD Testing Programme. Regul Toxicol Pharmacol. 2018;92:8–28.

136. Huang X, El-Sayed MA. Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. J Adv Res. 2010;1(1):13–28.

137. Badawy AM El, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM. Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions. Environ Sci Technol. 2010;44(4):1260–6.

138. Docter D, Westmeier D, Markiewicz M, Stolte S, Knauer SK, Stauber RH. The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned - challenge accepted? Chem Soc Rev. 2015;44(17):6094–121.

139. Liu W, Zhou Q, Liu J, Fu J, Liu S, Jiang G. Environmental and biological influences on the stability of silver nanoparticles. Chinese Sci Bull. 2011 Jul 10;56(19):2009–15.

140. Shah R, Eldridge D, Palombo E, Harding I. Optimization and Stability Assessment of Solid Lipid Nanoparticles using Particle Size and Zeta Potential. J Phys Sci. 2014;25(1):59–75.

141. Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt RH. Controlled Release of Biologically Active Silver from Nanosilver Surfaces. ACS Nano. 2010;4(11):6903–13.

142. Gaillet S, Rouanet J-M. Silver nanoparticles: Their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms – A review. Food Chem Toxicol. 2015;77:58–63.

143. Radwan IM, Gitipour A, Potter PM, Dionysiou DD, Al-Abed SR. Dissolution of silver nanoparticles in colloidal consumer products: effects of particle size and capping agent. J Nanoparticle Res. 2019;21(7):155.

144. Bélteky P, Rónavári A, Igaz N, Szerencsés B, Tóth IY, Pfeiffer I, et al. Silver nanoparticles: aggregation behavior in biorelevant conditions and its impact on

biological activity. Int J Nanomedicine. 2019;14:667–87.

145. Morgan A, Babu D, Reiz B, Whittal R, Suh LYK, Siraki AG. Caution for the routine use of phenol red – It is more than just a pH indicator. Chem Biol Interact. 2019;310:108739.

146. Ravindran A, Singh A, Raichur AM, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA). Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2010;76(1):32–7.

147. de Jong G, van Eijk HG. Microheterogeneity of human serum transferrin: a biological phenomenon studied by isoelectric focusing in immobilized pH gradients. Electrophoresis. 1988;9(9):589–98.

148. Alex SA, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Impact of gold nanorod functionalization on biocorona formation and their biological implication. J Mol Liq. 2017;248:703–12.

149. Zheng T, Cherubin P, Cilenti L, Teter K, Huo Q. A simple and fast method to study the hydrodynamic size difference of protein disulfide isomerase in oxidized and reduced form using gold nanoparticles and dynamic light scattering. Analyst. 2016;141(3):934–8.

150. Salis A, Boström M, Medda L, Cugia F, Barse B, Parsons DF, et al. Measurements and Theoretical Interpretation of Points of Zero Charge/Potential of BSA Protein. Langmuir. 2011;27(18):11597–604.

151. März, LMärz L, Hatton MW, Berry LR, Regoeczi E. The structural heterogeneity of the carbohydrate moiety of desialylated human transferrin. Can J Biochem. 1982;60(6):624–30.

152. Panigrahi SK, Mishra AK. Study on the dependence of fluorescence intensity on optical density of solutions: the use of fluorescence observation field for inner filter effect corrections. Photochem Photobiol Sci. 2019;18(2):583–91.

153. van Slageren R. The signal vs. concentration relationships in fluorimetry. Talanta. 1973;20(5):501–12.

154. Naveenraj S, Anandan S. Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs. J Photochem Photobiol C Photochem Rev. 2013;14(1):53–71.

155. Klajnert B, Stanisławska L, Bryszewska M, Pałecz B. Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin. Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics. 2003;1648(1):115–26.

156. Midoux P, Wahl P, Auchet J-C, Monsigny M. Fluorescence quenching of tryptophan by trifluoroacetamide. Biochim Biophys Acta - Gen Subj. 1984;801(1):16–25.

157. Shang L, Wang Y, Jiang J, Dong S. pH-dependent protein conformational changes in albumin:gold nanoparticle bioconjugates: a spectroscopic study. Langmuir. 2007;23(5):2714–21.

158. Stefan MI, Le Novère N. Cooperative Binding. PLoS Comput Biol. 2013;9(6):e1003106.

159. Vrček IV, Šinko G. Inactivation of cholinesterases by silver and gold ions in vitro. Cent Eur J Chem. 2013;11(6):935–44.

160. Madathiparambil Visalakshan R, González García LE, Benzigar MR, Ghazaryan A, Simon J, Mierczynska-Vasilev A, et al. The Influence of Nanoparticle Shape on Protein Corona Formation. Small. 2020;16(25):2000285.

161. Barbir R, Capjak I, Crnković T, Debeljak Ž, Domazet Jurašin D, Ćurlin M, et al. Interaction of silver nanoparticles with plasma transport proteins: A systematic study on impacts of particle size, shape and surface functionalization. Chem Biol Interact. 2021;335:109364.

162. Ramírez-Jiménez R, Artiga Á, Mitchell SG, Martín-Rapún R, de la Fuente JM. Surfactant-Free Synthesis and Scalable Purification of Triangular Gold Nanoprisms with Low Non-Specific Cellular Uptake. Nanomaterials. 2020;10(3):539.

163. Oh JY, Kim HS, Palanikumar L, Go EM, Jana B, Park SA, et al. Cloaking nanoparticles with protein corona shield for targeted drug delivery. Nat Commun. 2018;9(1):4548.

164. Clerc F, Reiding KR, Jansen BC, Kammeijer GSM, Bondt A, Wuhrer M. Human plasma protein N-glycosylation. Glycoconj J. 2016;33(3):309–43.

165. Rahman Z ur, Dong Y-L, Ren C, Zhang Z-Y, Chen X. Protein Adsorption on Citrate Modified Magnetic Nanoparticles. J Nanosci Nanotechnol. 2012;12(3):2598–606.

166. Forest V, Cottier M, Pourchez J. Electrostatic interactions favor the binding of positive nanoparticles on cells: A reductive theory. Nano Today. 2015;10(6):677–80.

167. Chan Y-HM, Schweiss R, Werner C, Grunze M. Electrokinetic Characterization of Oligo- and Poly(ethylene glycol)-Terminated Self-Assembled Monolayers on Gold and Glass Surfaces. Langmuir. 2003;19(18):7380–5.

168. Herrwerth S, Eck W, Reinhardt S, Grunze M. Factors that determine the protein resistance of oligoether self-assembled monolayers --internal hydrophilicity, terminal hydrophilicity, and lateral packing density. J Am Chem Soc. 2003;125(31):9359–66.

169. Ivatt R, editor. The biology of glycoproteins. 1st ed. New York: Springer US, 1984: 449.

170. Alfranca G, Artiga Á, Stepien G, Moros M, Mitchell SG, de la Fuente JM. Gold nanoprism–nanorod face off: comparing the heating efficiency, cellular internalization and thermoablation capacity. Nanomedicine. 2016;11(22):2903–16.

171. Villarreal E, Li GG, Zhang Q, Fu X, Wang H. Nanoscale surface curvature effects on ligand–nanoparticle interactions: a plasmon-enhanced spectroscopic study of thiolated ligand adsorption, desorption, and exchange on gold nanoparticles. Nano Lett. 2017;17(7):4443–52.

172. Shemetov AA, Nabiev I, Sukhanova A. Molecular Interaction of Proteins and Peptides with Nanoparticles. ACS Nano. 2012;6(6):4585–602.

173. Manivel A, Anandan S. Spectral interaction between silica coated silver nanoparticles and serum albumins. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp. 2012;395:38–45.

174. Mazurier J, Aubert J-P, Loucheux-Lefevre M-H, Spik G. Comparative circular dichroism studies of iron-free and iron-saturated forms of human serotransferrin and lactotransferrin. FEBS Lett. 1976;66(2):238–42.

175. Mandal HS, Kraatz H-B. Effect of the surface curvature on the secondary structure of peptides adsorbed on nanoparticles. J Am Chem Soc. 2007;129(20):6356–7.

176. Zhang W, Zhang Q, Wang F, Yuan L, Xu Z, Jiang F, et al. Comparison of interactions between human serum albumin and silver nanoparticles of different sizes using spectroscopic methods. Luminescence. 2015;30(4):397–404.

177. Park SJ. Protein-Nanoparticle Interaction: Corona Formation and Conformational Changes in Proteins on Nanoparticles. Int J Nanomedicine. 2020;15(20):5783–802.

178. Runa S, Hill A, Cochran VL, Payne CK. PEGylated nanoparticles: protein corona and secondary structure. Phys Chem Interfaces Nanomater XIII. 2014;9165:91651F.

179. Häkkinen H. The gold–sulfur interface at the nanoscale. Nat Chem. 2012;4(6):443–55.

180. Di Felice R, Selloni A. Adsorption modes of cysteine on Au(111): Thiolate, amino-thiolate, disulfide. J Chem Phys. 2004;120(10):4906–14.

181. Xia Z, Villarreal E, Wang H, Lau BLT. Nanoscale surface curvature modulates nanoparticle-protein interactions. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2020;190:110960.

182. Paul BK, Bhattacharjee K, Bose S, Guchhait N. A spectroscopic investigation on the interaction of a magnetic ferrofluid with a model plasma protein: effect on the conformation and activity of the protein. Phys Chem Chem Phys. 2012;14(44):15482.

183. Wangoo N, Bhasin KK, Mehta SK, Suri CR. Synthesis and capping of water-dispersed gold nanoparticles by an amino acid: Bioconjugation and binding studies. J Colloid Interface Sci. 2008;323(2):247–54.

184. Zheng C, Wang H, Xu W, Xu C, Liang J, Han H. Study on the interaction between histidine-capped Au nanoclusters and bovine serum albumin with spectroscopic techniques. Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc. 2014;118:897–902.

185. Rampado R, Crotti S, Caliceti P, Pucciarelli S, Agostini M. Recent Advances in Understanding the Protein Corona of Nanoparticles and in the Formulation of "Stealthy" Nanomaterials. Front Bioeng Biotechnol. 2020;8:166.

186. Bewersdorff T, Glitscher EA, Bergueiro J, Eravci M, Miceli E, Haase A, et al. The influence of shape and charge on protein corona composition in common gold nanostructures. Mater Sci Eng C. 2020;117:111270.

187. Deng ZJ, Liang M, Toth I, Monteiro M, Minchin RF. Plasma protein binding of positively and negatively charged polymer-coated gold nanoparticles elicits different biological responses. Nanotoxicology. 2012;7(3):314–22.

188. Lai W, Wang Q, Li L, Hu Z, Chen J, Fang Q. Interaction of gold and silver nanoparticles with human plasma: Analysis of protein corona reveals specific binding

patterns. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2017;152:317–25.

189. Gorshkov V, Bubis JA, Solovyeva EM, Gorshkov M V, Kjeldsen F. Protein corona formed on silver nanoparticles in blood plasma is highly selective and resistant to physicochemical changes of the solution. Environ Sci Nano. 2019;6(4):1089–98.

190. Feliu N, Docter D, Heine M, del Pino P, Ashraf S, Kolosnjaj-Tabi J, et al. In vivo degeneration and the fate of inorganic nanoparticles. Chem Soc Rev. 2016;45(9):2440–57.

191. Partikel K, Korte R, Mulac D, Humpf H-U, Langer K. Serum type and concentration both affect the protein-corona composition of PLGA nanoparticles. Beilstein J Nanotechnol. 2019;10:1002–15.

192. Dobrovolskaia MA, Patri AK, Zheng J, Clogston JD, Ayub N, Aggarwal P, et al. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med. 2009;5(2):106–17.

193. Piella J, Bastús NG, Puntes V. Size-Dependent Protein-Nanoparticle Interactions in Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles: The Emergence of the Protein Corona. Bioconjug Chem. 2017;28(1):88–97.

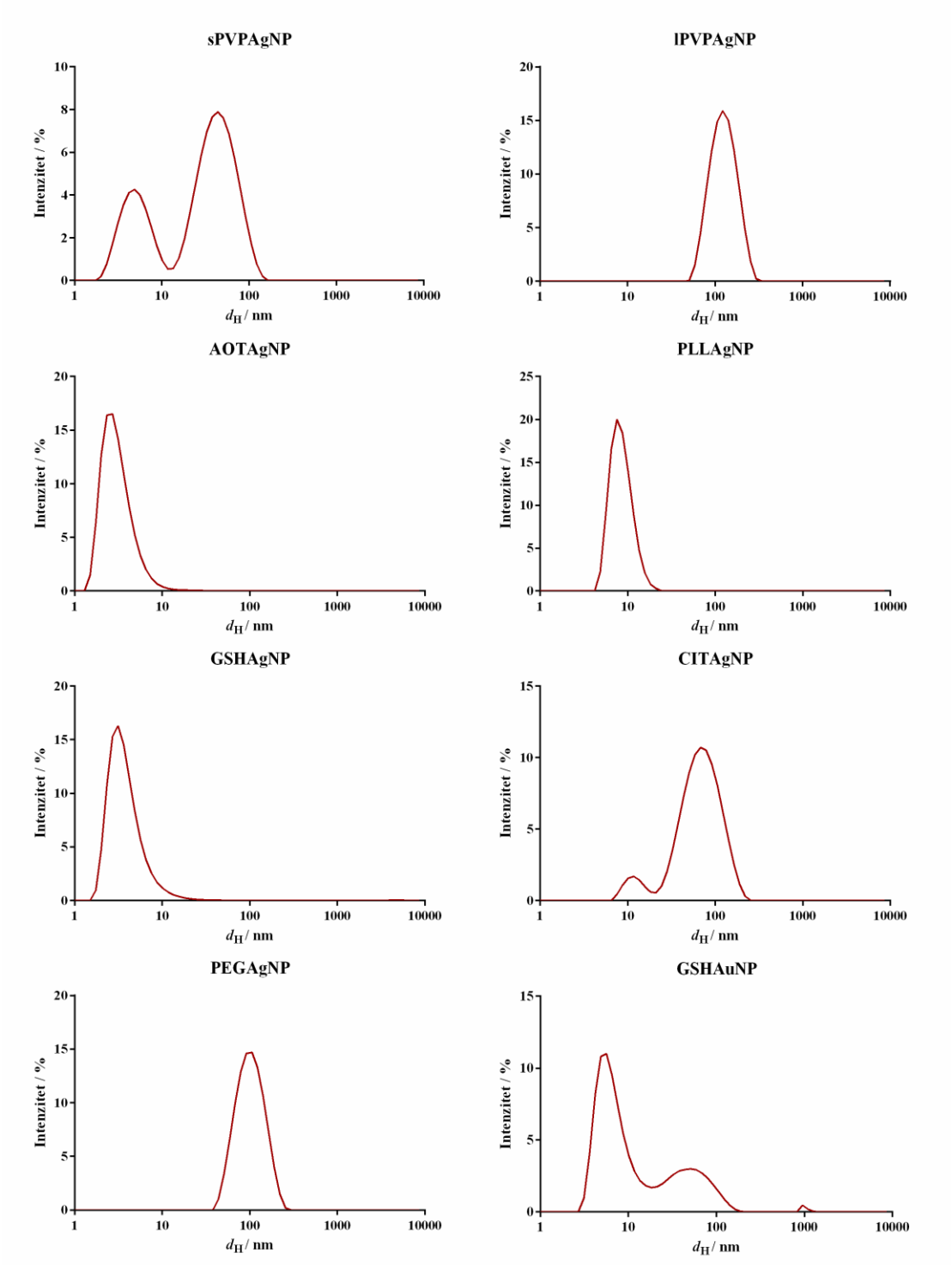
194. Ma Y, Hong J, Ding Y. Biological Behavior Regulation of Gold Nanoparticles via the Protein Corona. Adv Healthc Mater. 2020;9(6):1901448.

195. Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WCW. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. J Am Chem Soc. 2012;134(4):2139–47.

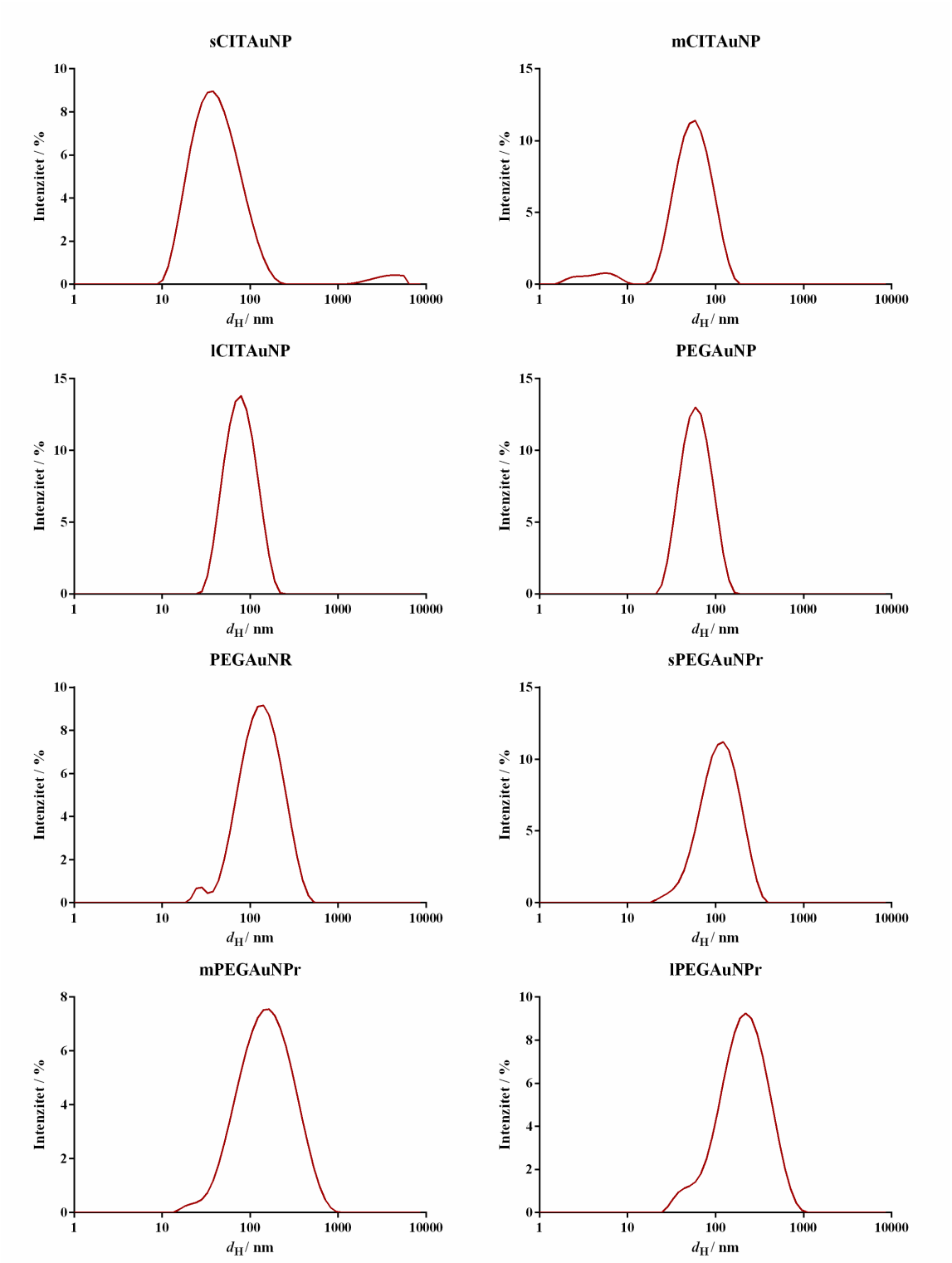
196. García-Álvarez R, Hadjidemetriou M, Sánchez-Iglesias A, Liz-Marzán LM, Kostarelos K. In vivo formation of protein corona on gold nanoparticles. The effect of their size and shape. Nanoscale. 2018;10(3):1256–64.

197. Shannahan JH, Lai X, Ke PC, Podila R, Brown JM, Witzmann FA. Silver Nanoparticle Protein Corona Composition in Cell Culture Media. PLoS One. 2013;8(9):e74001.

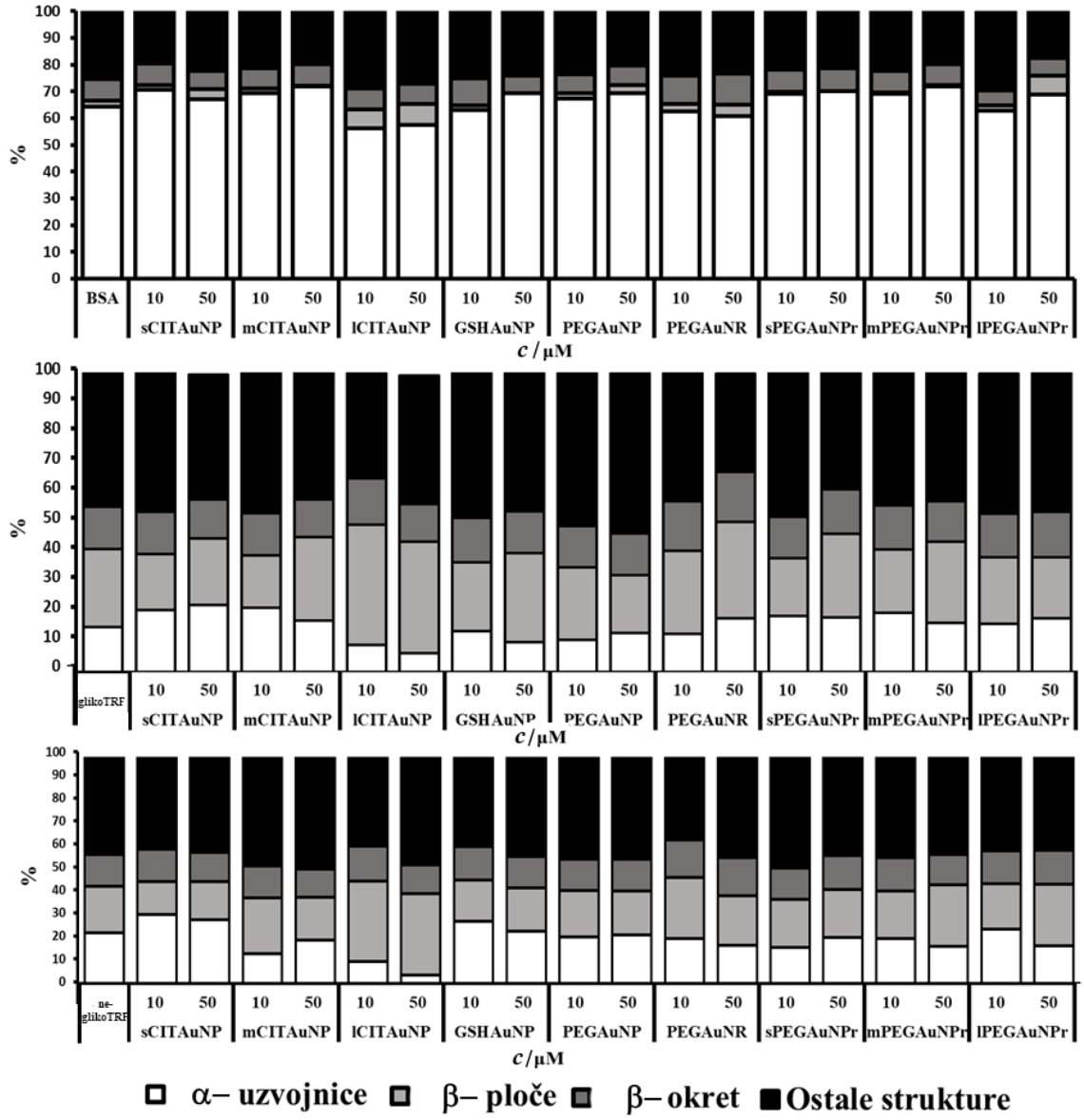
7. DODATNI PRIKAZI REZULTATA



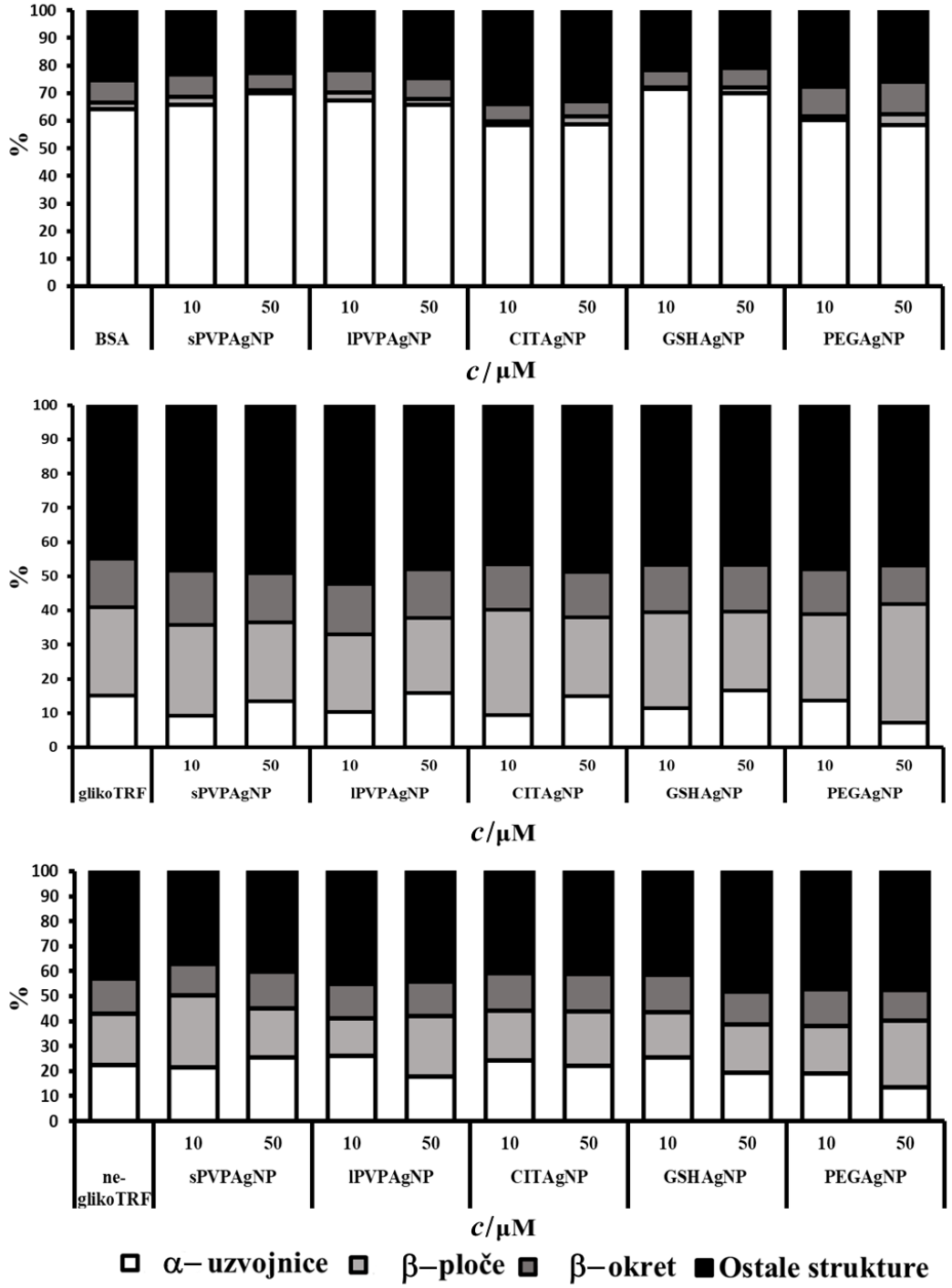
Slika 36. Raspodjela hidrodinamičkog promjera različitih AgNP i GSHAuNP prema intenzitetu raspršenog zračenja. Sva mjerenja su provedena pri 25 °C i koncentraciji NP od 10 mg metala/L u ultračistoj vodi (pH = 5,68).



Slika 37. Raspodjela hidrodinamičkog promjera različitih AuNP prema intenzitetu raspršenog zračenja. Sva mjerenja su provedena pri 25 °C i koncentraciji NP od 10 mg metala/L u ultračistoj vodi (pH = 5,68).



Slika 38. Promjene strukturnih značajki goveđeg serumskog albumina (BSA), glikoziliranog transferina (glikoTRF) i neglikoziliranog transferina (ne-glikoTRF) uslijed interakcije s različitim AuNP u koncentracijama od 10 μM i 50 μM u usporedbi s nativnom konformacijom proteina u ultračistoj vodi (pH = 5,68) pri 25 °C.



Slika 39. Promjene strukturnih značajki goveđeg serumskog albumina (BSA), glikoziliranog transferina (glikoTRF) i neglikoziliranog transferina (ne-glikoTRF) uslijed interakcije s različitim AgNP u koncentracijama od 10 μM i 50 μM u usporedbi s nativnom konformacijom proteina u ultračistoj vodi (pH = 5,68) pri 25 °C.

8. POPIS KRATICA

AAS atomska apsorpcijska spektroskopija (engl. *atomic absorption spectroscopy*)

ACN acetonitril

AGF umjetna želučana tekućina (engl. *artifical gastric fluid*)

AgNP nanočestice srebra

ALF umjetna lizosomalna tekućina (engl. *artificial lysosomal fluid)*

AOT natrijev bis (2-etilheksil) sulfosukcinat

APS amonijev persulfat

AuNP nanočestice zlata

BCA bicinkonična kiselina (engl. *bicinchoninic acid*)

BSA goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin*)

CD cirkularni dikroizam (engl. *circular dichroism*)

CDGs kongenitalni poremećaji glikozilacije (engl. *congenital disorders of glycosylation*

CIT citrat

CSF cerebrospinalna tekućina (engl. *cerebrospinal fluid*)

d_H hidrodinamički promjer

DLS dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*)

DMEM komercijalni stanični medij (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

d_{TEM} primarni promjer dobiven iz TEM slika

ELS elektroforetsko raspršenje svjetlosti (engl. e*lectrophoretic light scattering*)

ER endoplazmatski retikulum

FRET fluorescencijski rezonancijski prijenos energije (engl. *fluorescence resonance energy transfer*)

GA Golgijev aparat

glikoTRF glikozilirani transferin

GSH glutation

HSA humani serumski albumin (engl. *human serum albumin*)

IEF izoelektično fokusiranje

logK_b logaritamska vrijednost konstante vezanja

ne-glikoTRF neglikozilirani transferin

NM nanomaterijali (engl. *nanomaterials*)

NP nanočestice (engl. *nanoparticles*)

PBS puferirana fiziološka otopina (engl. *phosphate buffer solution*)

PEG polietilen glikol

PLL ε-poli-L-lizin

PVP polivinilpirolidon

ROS reaktivni kisikovi spojevi (engl. r*eactive oxygen spcecies*)

SDS natrijev dodecil sulfat

SDS-PAGE denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza (engl. *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

SPR površinska plazmonska rezonancija (engl. s*urface plasmon resonance*)

SSA specifična površina (engl. *specific surface area*)

TFA trifluorooctena kiselina

TEM transmisijska elektronska mikroskopija (engl. *transmission electron microscopy*)

TEMED tetrametiletilendiamin

TfR transferinski receptor

UPLC tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *ultra performance liquid chromatography*)

UV-Vis ultraljubičasto – vidljiva spektroskopija (engl. *ultraviolet- visible absorption*)

9. ŽIVOTOPIS

Rinea Barbir rođena je 09. kolovoza 1992. godine u Makarskoj, a osnovnu i srednju školu pohađala je u Pločama. Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu upisala je 2011. godine. Diplomirala je 2016. godine stekavši zvanje magistra medicinske biokemije. Pripravnički staž odrađivala je od 2016. do 2017. godine u Kliničkom zavodu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu Kliničke bolnice Merkur. Od srpnja 2018. godine zaposlena je u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada kao asistent-doktorand na projektu "Značaj interakcija metalnih nanočestica sa sumpornim biomolekulama za nano-bio sučelje - NanoFaceS" voditeljice dr. sc. Ivane Vinković Vrček kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost. Iste godine upisuje poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu.

Sudjelovala je na 14. međunarodnoj školi biofizike Greta Pifat Mrzljak, koja se održala u periodu od 23. kolovoza do 01. rujna 2018. godine u Splitu, Hrvatska. Dobitnica je Short Term Scientific Mission (STSM) stipendije COST akcije 17140 u sklopu koje je boravila u veljači i ožujku 2019. godine na Institutu za znanost o materijalima, Zaragoza, Španjolska. Sudjelovala je na prvoj školi nanomedicine COST akcije 17140 održanoj u periodu od 08. do 11. travnja 2019. godine u Trstu, Italija. U sklopu German Academic Exchange Service (DAAD) istraživačke stipendije boravila je u periodu od studenog 2019. do lipnja 2020. na Helmholtz Centru, München, Njemačka u grupi za analitičku biogeokemiju.

Članica je Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB) i Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM).

Popis objavljenih radova

Znanstveni radovi u časopisima indeksiranima u Current Contents (CC)

1. Ćurlin M, Barbir R, Dabelić S, Ljubojević M, Goessler W, Micek V, et al. Sex affects the response of Wistar rats to polyvinyl pyrrolidone (PVP)-coated silver nanoparticles in an oral 28 days repeated dose toxicity study. Part Fibre Toxicol. 2021 Dec 18;18(1):38.
2. Vuković B, Cvetić Ž, Bendelja K, Barbir R, Milić M, Dobrošević B, et al. In vitro

study on the immunomodulatory effects of differently functionalized silver nanoparticles on human peripheral blood mononuclear cells. JBIC J Biol Inorg Chem. 2021;26(7):817–31.

3. Pem B, Ćurlin M, Domazet Jurašin D, Vrček V, Barbir R, Micek V, Fratila R M, de la Fuente JM, Vinković Vrček I. Fate and transformation of silver nanoparticles in different biological conditions. Beilstein J. Nanotechnol. 2021;12:665–679.
4. Tariba Lovaković B, Barbir R, Pem B, Goessler W, Ćurlin M, Micek V, et al. Sex-related response in mice after sub-acute intraperitoneal exposure to silver nanoparticles. NanoImpact. 2021;23:100340.
5. Barbir R, Jiménez RR, Martín-Rapún R, Strasser V, Domazet Jurašin D, Dabelić S, et al. Interaction of Differently Sized, Shaped, and Functionalized Silver and Gold Nanoparticles with Glycosylated versus Nonglycosylated Transferrin. ACS Appl Mater Interfaces. 2021;13(23):27533–47.
6. Erceg I, Selmani A, Gajović A, Radatović B, Šegota S, Ćurlin M, et al. Precipitation at Room Temperature as a Fast and Versatile Method for Calcium Phosphate/TiO2 Nanocomposites Synthesis. Nanomaterials. 2021;11(6):1523.
7. Milić M, Vuković B, Barbir R, Pem B, Milić M, Šerić V, et al. Effect of differently coated silver nanoparticles on hemostasis. Platelets. 2021;32(5):651–61.
8. Ilić K, Hartl S, Galić E, Tetyczka C, Pem B, Barbir R, et al. Interaction of differently coated silver nanoparticles with skin and oral mucosal cells. J Pharm Sci. 2021;110(5):2250–61.
9. Barbir R, Capjak I, Crnković T, Debeljak Ž, Domazet Jurašin D, Ćurlin M, et al. Interaction of silver nanoparticles with plasma transport proteins: A systematic study on impacts of particle size, shape and surface functionalization. Chem Biol Interact. 2021;335:109364.
10. Barbir R, Pem B, Kalčec N, Kastner S, Podlesnaia K, Csáki A, et al. Application of Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy to Investigate a Nano–Bio Interface. Langmuir. 2021;37(5):1991–2000.
11. Galić E, Ilić K, Hartl S, Tetyczka C, Kasemets K, Kurvet I, et al. Impact of surface functionalization on the toxicity and antimicrobial effects of selenium nanoparticles considering different routes of entry. Food Chem Toxicol. 2020;144:111621.
12. Lucio M, Barbir R, Vučić Lovrenčić M, Canecki Varžić S, Ljubić S, Smirčić Duvnjak L, et al. Association between arsenic exposure and biomarkers of type 2 diabetes mellitus

in a Croatian population: A comparative observational pilot study. Sci Total Environ. 2020;720.

13. Selmani A, Ulm L, Kasemets K, Kurvet I, Erceg I, Barbir R, et al. Stability and toxicity of differently coated selenium nanoparticles under model environmental exposure settings. Chemosphere. 2020;250:126265.
14. Vrandečić K, Ćosić J, Ilić J, Ravnjak B, Selmani A, Galić E, et al. Antifungal activities of silver and selenium nanoparticles stabilized with different surface coating agents. Pest Manag Sci. 2020;76(6):2021–9.
15. Barbir R, Goessler W, Ćurlin M, Micek V, Milić M, Vuković B, et al. Protein Corona Modulates Distribution and Toxicological Effects of Silver Nanoparticles In Vivo. Part Part Syst Charact. 2019;36(8):1900174.

10. PRILOG

Popis znanstvenih radova objavljenih u časopisima zastupljenim u bazi Current Contents koji obrađuju tematiku sadržanu u ovom doktorskom radu:

Barbir R, Jiménez RR, Martín-Rapún R, Strasser V, Domazet Jurašin D, Dabelić S, et al. Interaction of Differently Sized, Shaped, and Functionalized Silver and Gold Nanoparticles with Glycosylated versus Nonglycosylated Transferrin. ACS Appl Mater Interfaces. 2021;13(23):27533–47.

Barbir R, Pem B, Kalčec N, Kastner S, Podlesnaia K, Csáki A, et al. Application of Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy to Investigate a Nano–Bio Interface. Langmuir. 2021;37(5):1991–2000.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Doktorski rad

INTERAKCIJE NANOČESTICA SREBRA I ZLATA RAZLIČITIH VELIČINA, OBLIKA I POVRŠINSKIH STRUKTURA S PROTEINIMA RAZLIČITOGA GLIKOZILACIJSKOGA STATUSA

RINEA BARBIR

Za biomedicinsku primjenu nanočestica (NP) nužno je poznavati mehanizam njihove interakcije s biološkim sustavima. Ovaj rad istražuje interakcije NP s proteinima koje dovode do stvaranja proteinskog sloja na površini NP tzv. proteinske korone, što znatno utječe i na svojstva NP i na biološki sustav. U dosadašnjim istraživanjima nano-bio interakcija zanemarena je uloga glikana, koji su prisutni u strukturi većine proteina. Cilj istraživanja bio je utvrditi kako veličina, oblik te površinska struktura NP srebra i zlata utječu na prirodu i mehanizam njihove interakcije s proteinima različitoga glikozilacijskoga statusa korištenjem modela glikoziliranog transferina (glikoTRF) iz humanog seruma i neglikoziliranog rekombinantnog humanog transferina (ne-glikoTRF). Istražen je utjecaj fizikalno-kemijskih svojstava NP na jakost vezanja s proteinima, promjene sekundarnih struktura proteina te sastav proteinske korone. Istraživanje je provedeno i na govođem serumskom albuminu (BSA) kako bi se dobiveni rezultati mogli usporediti s drugim istraživanjima koja uglavnom koriste BSA model. Ionska jakosti i pH biološkog medija značajno su utjecali na koloidnu stabilnost NP, dok je stvaranje proteinske korone stabiliziralo NP. Utvrđeno je da su jakost vezanja proteina na NP i promjene sekundarne proteinske strukture ovisni ne samo o veličini, obliku i površinskoj funkcionalizaciji NP, nego i o prisutnosti glikana na proteinima. Struktura β-ploča značajnije se promijenila vezanjem ne-glikoTRF na NP manje specifične površine, što nije primijećeno za glikoTRF. Fizikalno-kemijska svojstva NP te glikozilacija proteina utjecali su i na sastav i koncentraciju proteinske korone na površini NP. Dobiveni rezultati ističu važnost glikozilacije proteina za nano-bio interakcije, što zajedno s potvrđenom ulogom fizikalno-kemijskih svojstava NP na te interakcije, pridonosi razumijevanju učinka NP na biološke sustave te se može koristiti u razvoju novih dijagnostičkih, prognostičkih i terapijskih nanoalata.

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

Rad sadrži: 120 stranica, 39 slika, 15 tablica, 197 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nanočestice srebra, nanočestice zlata, transferin, glikozilacija, proteinska korona

Mentori: Dr. sc. Ivana Vinković Vrček, znanstvena savjetnica

Izv. prof. dr. sc. Sanja Dabelić

Ocjenjivači: Izv. prof. dr. sc. Tin Weitner

Prof. dr sc. Olga Gornik Kljaić

Dr. sc. Darija Domazet Jurašin, viša znanstvena suradnica

Datum prihvaćanja rada 20.10.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry Doctoral thesis

INTERACTIONS BETWEEN SILVER AND GOLD NANOPARTICLES OF DIFFERENT SIZES, SHAPES AND SURFACE STRUCTURES WITH PROTEINS OF DIFFERENT GLYCOSYLATION STATUS

RINEA BARBIR

For the biomedical application of nanoparticles (NPs) it is necessary to know the mechanism of their interaction with biological systems. This work was focused on the interactions of NPs with proteins, which lead to the formation of a protein layer on the surface of NPs so called protein corona which significantly affects both the properties of NPs and the biological system. In previous studies of nano-bio interactions, the role of glycans, which are present in the structure of most proteins, has been neglected. The aim of the study was to determine how the size, shape and surface structure of silver and gold NPs affect the nature and mechanism of their interaction with proteins of different glycosylation status using models of glycosylated transferrin (glycoTRF) from human serum and non-glycosylated recombinant human transferrin (non-glycoTRF). The influence of physicochemical properties of NPs on the strength of protein binding, changes in the secondary structures of proteins and the composition of the protein corona was investigated. The study was also performed on bovine serum albumin (BSA) so that the obtained results could be compared with other studies that mainly use the BSA model.The ionic strength and pH of the biological medium significantly affected the colloidal stability of NPs whereas the formation of the protein corona stabilized them. It was found that the strength of protein binding to NPs and changes in secondary protein structure depend not only on the size, shape and surface functionalization of NPs, but also on the presence of glycans on proteins. The structure of β-plates changed significantly by binding non-glycoTRF to NPs of less specific surface area, which was not observed for glycoTRF. Physicochemical properties of NPs and glycosylation of proteins also affected the composition and concentration of protein corona on the surface of NPs . The obtained results emphasize the importance of protein glycosylation for nano-bio interactions, which together with the confirmed role of physicochemical properties of NPs on these interactions, contributes to understanding the effect of NPs on biological systems and can be used in the development of new diagnostic, prognostic and therapeutic nanotools.

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

Thesis includes: 120 pages, 39 figures, 15 tables and 197 references. Original is in Croatian language.

Key words: silver nanoparticles, gold nanoparticles, transferrin, glycosylation, protein corona

Supervisiors: Ivana Vinković Vrček, Scientific Advisor, PhD

Associate Professor Sanja Dabelić, PhD

Reviewers: Associate Professor Tin Weitner, PhD

Full professor Olga Gornik Kljaić, PhD

Darija Domazet Jurašin, Senior Scientific Associate, PhD

Accepted: 20.10.2021.