

Procjena zajedničkog djelovanja nanočestica srebra i polistirena na modelne stanične linije imunosnog sustava

Ilić, Krunoslav

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:163:466335>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

KRUNOSLAV ILIĆ

**PROCJENA ZAJEDNIČKOG DJELOVANJA
NANOČESTICA SREBRA I POLISTIRENA NA
MODELNE STANIČNE LINIJE IMUNOSNOG
SUSTAVA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

KRUNOSLAV ILIĆ

**EVALUATION OF COMBINED EFFECTS OF
SILVER AND POLYSTYRENE
NANOPARTICLES ON MODEL IMMUNE
CELLS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

KRUNOSLAV ILIĆ

**PROCJENA ZAJEDNIČKOG DJELOVANJA
NANOČESTICA SREBRA I POLISTIRENA NA
MODELNE STANIČNE LINIJE IMUNOSNOG
SUSTAVA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

dr. sc. Ivan Pavičić, znanstveni savjetnik

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

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

KRUNOSLAV ILIĆ

**EVALUATION OF COMBINED EFFECTS OF
SILVER AND POLYSTYRENE
NANOPARTICLES ON MODEL IMMUNE
CELLS**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Ivan Pavičić, Scientific Adviser, PhD

Associate Professor Petra Turčić, PhD

Zagreb, 2022

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

Ovaj je doktorski rad izrađen pod mentorstvom dr. sc. Ivana Pavičića na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada i dr. sc. Petre Turčić, izv. prof. u sklopu poslijediplomskog dokorskog studija Farmaceutsko-biokemijske znanosti Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Rezultati prikazani u ovom radu nastali su u okviru znanstvene suradnje Vlade RH i Vlade Narodne Republike Kine, uz sufinanciranje Ministarstva znanosti i obrazovanja RH temeljem međunarodnog znanstveno-istraživačkog projekta "Endocrine disrupting mechanism of typical environmental pollutants - EmergeTox" i projekta HRZZ-IP-2016-06-2436 "Značaj interakcija metalnih nanočestica sa sumpornim biomolekulama za nano-bio sučelje – NanoFaceS" voditeljice dr. sc. Ivane Vinković Vrček.

Zahvaljujem mentoru dr. sc. Ivanu Pavičiću na neprestanoj i nesebičnoj podršci tijekom zadnjih pet godina, na velikom znanstvenom i životnom iskustvu te na nezamjenjivoj logističkoj podršci bez koje ova disertacija ne bi bila izrađena.

Veliko hvala komentorici izv. prof. dr. sc. Petri Turčić, spec. klin. farm. na svim vrijednim savjetima, znanju i susretljivosti tijekom studija i izrade disertacije.

Zahvaljujem dr. sc. Ivani Vinković Vrček na idejnom nacrtu disertacije, osiguranim sredstvima za provedbu pokusa, uključivanju u brojne znanstveno-istraživačke projekte i publikacije te na omogućenim studijskim boravcima i suradnjama u Hrvatskoj i inozemstvu.

Hvala kolega i suradnicima s Instituta dr. sc. Mirti Milić, dr. vet. med. Vedranu Miceku, dr. sc. Blanki Taribi Lovaković, i svima ostalima na nesebičnoj pomoći i suradnji kroz proteklih pet godina.

Zahvaljujem suradnicima iz Laboratorija za biokoloide i površinsku kemiju s IRB-a, dr. sc. Maji Dutour Sikirić i dr. sc. Dariji Domazet Jurašin, na pomoći pri karakterizaciji nanomaterijala i suradnjama koje su urodile publikacijama.

Srdačno zahvaljujem kolegama sa Zavoda za farmaceutsku tehnologiju Sveučilišta u Grazu Karl Franzens, prof. dr. sc. Evi Roblegg, Sonji Hartl i Carolin Tetyczka na omogućenom studijskom boravku te zajedničkim pokusima i publikacijama.

Veliko hvala suradnicima s Odsjeka za fiziku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu, prof. dr. sc. Ivici Avianiju i dr. sc. Luciji Krce, na izvanrednom trudu i pomoći kod AFM pokusa, te izv. prof. dr. sc. Vedrani Čikeš Čulić s Medicinskog fakulteta u Splitu na ustupanju laboratorija za uzgoj staničnih kultura.

Posebno se zahvaljujem suradnicima sa Sveučilišta u Marseilleu, dr. sc. Felixu Ricu i dr. sc. Jorgeu Rodriguezu Ramosu, na vrhunskoj edukaciji i velikoj pomoći pri interpretaciji rezultata.

Zahvaljujem također i kolegama s Instituta za kemijsku fiziku i biofiziku u Tallinnu, prof. dr. sc. Anne Kahru, Merilin Rosenberg i dr. sc. Katre Juganson, na sjajnoj publikaciji i nezaboravnom iskustvu.

Posebna zahvala suradnicima s Instituta za fotoničku tehnologiju Sveučilišta u Jeni Friedrich Schiller, prof. dr. sc. Wolfgangu Fritzscheu i dr. sc. Andrei Csaki, na izuzetno ugodnom i produktivnom boravku u Jeni.

I jedno veliko hvala kolegama i prijateljima (abecednim redom) Ana Mariji, Barbari, Emeriku, Luciji, Nikolini, Nikolini i Rinei.

SAŽETAK

Nanotehnologija danas ima ulogu rastuće važnosti u razvoju novih industrijskih i medicinskih proizvoda. Nanočestice srebra (nanoAg) jedne su od najviše istraživanih tipova nanomaterijala za potencijalnu primjenu u medicini zbog svojih izraženih antimikrobnih svojstava. Njihova uporaba u medicinskom kontekstu ograničena je zbog štetnog utjecaja kojeg mogu imati na ljudske stanice i tkiva. Iako je toksičnost nanočestica srebra dobro poznata i istražena, manjkaju informacije o kombiniranim biološkim učincima nanoAg i drugih materijala ili nanomaterijala. Za razvoj novih, sigurnih uređaja i pomagala u kojima se koristi nanoAg, nužno je ispitati zdravstvene rizike koji mogu nastati međudjelovanjem nanoAg i materijala koji se primjenjuju u tim proizvodima. Polistiren je biološki inertan materijal široke industrijske i medicinske primjene, te su zbog toga nanočestice polistirena (nanoPS) odabrane za ispitivanje učinka mješavina nanočestica na modelne stanice ljudskog imunosnog sustava, Jurkat i THP-1. Nanočestice su karakterizirane metodama atomske mikroskopije sila te dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti. Analiziran je utjecaj nanoAg i nanoPS na preživljenje stanica, pokretanje apoptoze, parametre oksidativnog stresa, oštećenje DNA, pokretanje upalnog odgovora te promjene mehaničkih svojstava stanica. Unos nanočestica vizualiziran je konfokalnim mikroskopom i kvantificiran protočnim citometrom. Pokazano je da nanoAg i nanoPS ne stupaju u interakcije u vodenoj suspenziji ili u staničnom mediju, te da su mješavine nanoAg i nanoPS imale štetniji učinak na stanice Jurkat i THP-1 nego pojedinačne vrste nanomaterijala. Ovi rezultati važan su doprinos razumijevanju učinaka nanomaterijala na ljudsko zdravlje i razvoju novih i sigurnih primjena nanotehnologije u medicini.

Ključne riječi: *nanočestice srebra, nanočestice polistirena, stanična biologija, upalni odgovor, oksidativni stres, nanomehanika*

SUMMARY

Background and aim: Nanotechnology has a role of growing importance in development of novel industrial and medical applications. Silver nanoparticles (nanoAg) are some of the most commercialized types of nanoparticles due to their excellent antimicrobial properties. However, their use in medical applications is limited by their toxicity to human cells and tissue. While potential dangers to human health posed by nanoAg are relatively well researched, far less information is available on combined effects of nanoAg with other types of materials or nanomaterials. In order to develop novel and safe nanoAg-enabled medical devices, it is crucial to understand whether their interactions with other types of nanoparticles pose an additional health hazard compared to nanoAg alone. Polystyrene is a widely used, material with various medical applications, and polystyrene nanoparticles (nanoPS) were used to test the effect of nanomaterial mixtures (nanoAg and nanoPS) on two human cell lines, Jurkat and THP-1.

Methods: Silver nanoparticles were synthesized by reduction of silver nitrate in the presence of polyvinylpyrrolidone (PVP) as surface stabilizing agent. Nanoparticle size, shape and ζ potential were characterized by Dynamic (DLS) and Electrophoretic Light Scattering (ELS) techniques, and by Atomic force microscopy. Nanoparticle effects on Jurkat and THP-1 cells were assessed from perspectives of cell viability, oxidative stress cascade, immune response and mechanical properties. Flow cytometry was used to determine nanoAg and nanoPS influence on cell viability and induction of apoptosis as well as nanoparticle-induced DNA damage, and to quantify nanoparticle uptake in cells. Fluorescence-based assays were used to assess several parameters of oxidative stress – production of reactive oxygen species, changes in intracellular glutathione content and changes in mitochondrial membrane potential. Nanoparticle-induced immune response was determined by qPCR analysis of IL-6, IL-8, TNF α , and IL-1 β mRNA expression in treated cells. Changes in mechanical properties of nanoparticle-treated cells were assessed by Force spectroscopy measurements on an Atomic force microscope. Additionally, uptake and localization of nanoparticles was visualized on a confocal microscope.

Results: nanoAg and nanoPS formed stable suspensions in cell culture media and did not interact or form agglomerates. Consequently, nanoparticles applied to cells exerted their biological effects independently and did not co-localize within Jurkat or THP-1 cells. Nanoparticle mixtures of non-

toxic nanoAg and nanoPS concentrations significantly reduced cell viability compared to individual nanoparticle treatments. Likewise, induction of oxidative stress and inflammatory cytokine expression was significantly elevated for combined nanoAg/nanoPS treatments. Significant DNA damage was determined for nanoAg treatment of both Jurkat and THP-1 cells, but the extent of DNA breakage was not increased by addition of nanoPS to nanoAg treatments. On the other hand, reduction in cell stiffness, which is indicative of changes in cytoskeletal structure, was evident for both Jurkat and THP-1 treatment with nanoAg and nanoPS, and the effect was exacerbated in combined nanoAg/nanoPS treatments.

Conclusions: Combined nanoAg/nanoPS treatment of Jurkat and THP-1 cells resulted in augmented cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in both cell types compared to individual treatments with either nanoAg or nanoPS. As the two nanoparticle types did not agglomerate or otherwise interact in suspension, and entered cells independently, their biological impact on Jurkat and THP-1 cells can be understood as additive effects of nanoparticle-induced oxidative stress, immune response, and downstream damage to cellular structures including DNA. These results present important considerations for development and use of nanoAg-enabled products, particularly in contexts where they can result in direct human exposure.

Keywords: *silver nanoparticles, polystyrene nanoparticles, cell biology, immune response, oxidative stress, nanomechanics*

SADRŽAJ

1.1 Nanočestice srebra i polistirena.....	1
1.2 Osnove ljudskog imunskog sustava	3
1.3 Urođena imunost	3
1.4 Stečena imunost	4
1.5 Monociti i makrofazi	6
1.6 T stanice	7
1.7 Citokini	8
1.8 Interakcije nanočestica i imunskog sustava	12
1.9 Oksidativni stres	13
1.10 Modelne stanične linije Jurkat i THP-1	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1 Sinteza i karakterizacija nanočestica	19
3.2 Stanična kultura i diferencijacija stanica THP-1 iz monocita u makrofage	20
3.3 Stanično preživljenje i pokretanje apoptoze – protočna citometrija	21
3.4 Kvantifikacija unosa nanočestica – protočna citometrija	23
3.5 Oksidativni stres	24
3.6 Oštećenje DNA	26
3.7 Unos i lokalizacija nanočestica – konfokalna mikroskopija	27
3.8 Ekspresija pro-upalnih citokina – kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (qRT-PCR).....	29
3.9 Analiza mehaničkih svojstava stanica – atomska mikroskopija sila (AFM).....	32
3.10 Statistička obrada rezultata.....	34
4. REZULTATI	36
4.1 Sinteza i karakterizacija nanočestica	36
4.2 Stanična kultura i diferencijacija stanica THP-1 iz monocita u makrofage	38
4.3 Stanično preživljenje i pokretanje apoptoze – protočna citometrija	40
4.4 Kvantifikacija unosa nanočestica – protočna citometrija	44
4.5 Oksidativni stres	46
4.6 Oštećenje DNA	49
4.7 Unos i lokalizacija nanočestica – konfokalna mikroskopija	51

4.8 Ekspresija pro-upalnih citokina – kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (qRT-PCR).....	53
4.9 Analiza mehaničkih svojstava stanica – atomska mikroskopija sila (AFM).....	60
5. RASPRAVA	64
6. ZAKLJUČCI	74
7. POPIS LITERATURE	75
8. POPIS KRATICA	91
9. ŽIVOTOPIS	93
10. PRILOG	95

1. UVOD

1.1 Nanočestice srebra i polistirena

Nanomaterijali (engl. *nanomaterials*, NM) su prirodno ili umjetno proizvedeni materijali koji sadrže čestice, pojedinačne ili agregirane, kojima je jedna ili više dimenzija u rasponu između 1 i 100 nm (1). Ova definicija obuhvaća velik broj materijala koji se razlikuju kemijskim sastavom, morfologijom i fizikalno-kemijskim svojstvima. Nanotehnologija je područje velikog istraživačkog interesa zbog posebnih svojstava NM kojim se razlikuju od rasutog (engl. *bulk*) materijala istog kemijskog sastava (2). Razvoj NM omogućio je velik napredak u raznim područjima istraživanja (3) i otvorio nove mogućnosti za industrijsku primjenu (4–6). Jedno od važnih područja primjene NM je medicina, te se danas već na tržištu i u kliničkoj uporabi nalaze različiti dijagnostički i terapijski sustavi koji sadrže NM (7–9). Neki od primjera su lipidne nanočestice s doksorubicinom kao antitumorska terapija (10, 11), nano-hidroksiapatit kao nadomjestak za koštano tkivo (12), i nanočestice željezovog oksida kao kontrastni agensi za ultrazvuk (13).

Nanočestice srebra (nanoAg) jedne su od najviše komercijalno korištenih NM, sa širokom i raznolikom uporabom, primjerice kod pakiranja hrane, u antimikrobnim tekstilima, za uklanjanje plijesni, dezinfekciju vode i više (14). Medicina i zdravstvo predstavlja važno područje njihove primjene, posebice u suzbijanju jatrogenih infekcija u bolnicama (engl. *hospital-acquired infections*, HAI) (15–17). Osim toga, nanočestice srebra pokazuju potencijal za uporabu u medicinskim pomagalima kao što su zubni umetci i proteze, kateteri, endotrahealne tube i obloge za cijeljenje rana (18). Unatoč potencijalu nanoAg, primjena im je ograničena zbog njihove toksičnosti, koju treba uzeti u obzir pri razvoju novih aplikacija (19). Uzrok toksičnosti nanoAg su srebrni ioni koji se otpuštaju s površine nanočestica te uzrokuju stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i posljedično oštećenje staničnih membrana, proteina i nukleinskih kiselina (20). Toksičnost nanoAg ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su veličina, oblik, ζ potencijal, funkcionalne skupine vezane za površinu i stupanj agregacije, te zbog toga različiti oblici nanoAg mogu imati različit profil toksičnosti (21, 22). Iako je toksičnost nanoAg dobro poznata prepreka razvoju sigurnih medicinskih proizvoda, posebna kategorija rizika su ponašanje i učinci nanoAg u kontaktu s različitim tipovima materijala, kao što su polimerni

materijali u medicinskim pomagalicama, tekstili, metali i sl. Kao i za različite vrste samih nanoAg, njihovo međudjelovanje s drugim vrstama materijala i potencijalnu toksičnost smjesa potrebno je ispitati za svaku pojedinu primjenu pomoću relevantnih *in vitro* i *in vivo* modela.

Polistiren je bezbojna, kruta plastika sa širokom primjenom u industrijskim i komercijalnim proizvodima (23). Zbog svoje izdržljivosti i biokompatibilnosti, koristi se u istraživačke i medicinske svrhe u laboratorijskom priboru i dijagnostičkim instrumentima (23, 24). Također se koristi za izradu obloga za cijeljenje rana i umjetnih organa, npr. umjetne jetre (25, 26). Iako je otpornost polistirena na degradaciju dobro opisana (27), pokazano je da se površina polistirenskih materijala razgrađuje i otpušta čestice nanometarske veličine čak i pri blagim uvjetima (30° C u demineraliziranoj vodi) (28). Otpuštanje nanočestica s površine polistirena može predstavljati opasnost za ljudsko zdravlje jer je dokazano kako polistirenske nanočestice (nanoPS) u doticaju s leukocitima, posebno monocitima i makrofazima, utječu na njihovu enzimatsku aktivnost i stvaranje kisikovih radikala (29, 30). Za nanoPS također je pokazano da mogu uzrokovati oštećenja DNA, upalu, neurotoksičnost i karcinogenezu u drugim vrstama stanica (31, 32). Ovi podaci upozoravaju na potencijalnu degradaciju dugotrajnih implantata i drugih medicinskih pomagala koji sadržavaju polistiren unutar ljudskog tijela te potencijalne dugoročne opasnosti koju takvi materijali predstavljaju.

Unatoč različitom sastavu i kemijskim svojstvima, nanoAg i nanoPS pokazuju sličnosti u svojim učincima na staničnoj razini. Kao što je opisano gore, oba tipa nanočestica mogu katalizirati proizvodnju slobodnih kisikovih radikala: nanočestice srebra i ioni otpušteni s njihove površine mogu sudjelovati u Fenton reakcijama ili redoks reakcijama kojima se katalizira stvaranje ROS-ova (33, 34), dok polistirenske nanočestice uzrokuju stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta procesom foto-oksidacije (35). Međutim, za stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta uzrokovano polistirenom važniji je proces pokretanja upalnog odgovora koji uključuje stvaranje superoksidnih radikala i vodikovog peroksida kao staničnog obrambenog mehanizma (32, 36). Za cjelovitu analizu učinaka nanoAg i nanoPS na stanice stoga je potrebno ispitati ne samo stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta i posljedično oštećenje membrana i DNA, već i aktivaciju upalnog odgovora, napose u stanicama izravno uključenima u imunosni odgovor na unos nanočestica. Ovakav pristup, u kojem se oksidativni stres i upalni odgovor razmatraju kao međusobno isprepleteni procesi uzrokovani nanoAg i nanoPS, a ne kao neovisni parametri staničnog metabolizma, daje potpuniju sliku

interakcija nanočestica sa stanicama i neophodan je za primjenu NM u medicinskim pomagalicama (37).

1.2 Osnove ljudskog imunskog sustava

Ljudski imunski sustav složen je skup organa, tkiva, stanica i proteina različitog podrijetla i funkcija čija je glavna zadaća zaštita organizma od patogena, parazita i drugih stranih tijela (38). Dijeli se na dvije velike sastavnice, urođenu i stečenu imunost, koje zajedničkim djelovanjem prepoznaju opasnosti za organizam, uklanjaju ih u kratkom roku i stvaraju protutijela koja osiguravaju još bržu i učinkovitiju reakciju u slučaju ponovljene izloženosti nekom patogenu (38–40). Imunosni odgovor je sveobuhvatan pojam kojim se opisuje odgovor imunskog sustava na izlaganje i prepoznavanje raznih patogena (bakterija, virusa, gljiva, parazita) te njihovo uklanjanje iz organizma. Pokretanje imunskog odgovora uključuje različite vrste stanica, ne samo specijalizirane imunosne stanice kao što su neutrofili i limfociti, već i epitelne stanice na mjestu oštećenja tkiva ili ulaska patogena (41). U procesu odgovora organizma na sve vrste patogena i parazita, ključne uloge obavljaju makrofazi, kao jedna osnovnih sastavnica stanične imunosti, i T stanice, koje su svojim funkcijama većinom povezane sa stečenom imunošću (38). Međutim, stanična i stečena imunost višestruko su isprepletene i međusobno koordinirane, te se trebaju gledati kao jedna složena cjelina (42).

1.3 Urođena imunost

Urođena imunost evolucijski je stariji oblik imunosti, koji se zasniva na sposobnosti specijaliziranih stanica da prepoznaju molekularne obrasce karakteristične za raznolike patogene i pokrenu proces njihova uklanjanja, poglavito putem fagocitnih stanica (43). Karakteristične biomolekule za patogene nazivaju se molekulski obrasci povezani s patogenima (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) koje prepoznaju receptori za prepoznavanje obrazaca (engl. *pattern recognition receptor*, PRR) prisutni na površini stanica imunskog sustava kao što su makrofazi, ali i na drugim stanicama poput fibroblasta i epitelnih stanica (44, 45). S druge strane, signali oštećenja tkiva (engl. *damage-associated molecular patterns*, DAMP) su endogeni signali koje luče različiti tipovi stanica kao odgovor na oštećenja tkiva, koji također mogu pokrenuti imunosni odgovor, neovisno o prisutnosti patogena (45). Ove komponente urođene imunosti –

PAMP, DAMP i PRR – pokazuju velik stupanj evolucijske konzerviranosti i sličnosti u strukturi i funkciji kod velikog broja različitih vrsta (43). Jedna od najvažnijih obitelji PRR koje sudjeluju u imunosnom odgovoru su receptori nalik Toll-proteinu (engl. *toll-like receptors*, TLR) (46). TLR su membranski glikoproteini za koje je karakterističan strukturni motiv bogat leucinima (engl. *leucine-reach-repeat*, LRR) na ekstracelularnoj strani. Svaki od 12 članova proteinske obitelji TLR opisanih kod sisavaca specijaliziran je za određenu strukturu PAMP koje pokrivaju širok spektar izvanstaničnih i unutarstaničnih infekata, parazita i praživotinja (43). Vezanje liganda na ove receptore pokreće imunosni odgovor koji aktivira fagocitne stanice – lokalne tkivne makrofage, neutrofile te monocite koji krvotokom dolaze do mjesta upale i diferenciraju se u makrofage – što rezultira fagocitozom i uništenjem uzročnike upale (47).

Važna odrednica urođene imunosti je sposobnost da vezanjem različitih patogena aktivira isti signalni put. Primjerice, pokazano je da se prepoznavanje bakterijskog lipopolisaharida (LPS) i dvolančane RNA (dsRNA) vrši preko različitih proteina TLR, ali da posljedična aktivacija signalnih puteva konvergira aktivacijom interferona tipa I koji rezultira transkripcijom istih gena u slučaju bakterijske (LPS), odnosno virusne infekcije (dsRNA) (48). Na taj je način urođena imunost kod ljudi, ali i kod drugih životinja i biljaka, prilagođena kako bi malim repertoarom proteina prepoznala i neutralizirala velik broj različitih patogena putem tkivnih fagocita (49).

1.4 Stečena imunost

Paralelno s evolucijom urođene imunosti, kod kralježnjaka je tijekom posljednjih 400 milijuna godina evoluirao sustav stečene imunosti. Stečena imunost temelji se na specijaliziranim T i B stanicama, koje u tijeku svog sazrijevanja prolaze proces genske rekombinacije koja rezultira ogromnim brojem raznovrsnih površinskih receptora i proizvodnjom širokog spektra različitih protutijela (50). Za razliku od urođene imunosti gdje jedan TLR može prepoznati strukturne motive prisutne kod više različitih patogena, T i B stanice sposobne su prepoznati strukturne motive specifične za samo jednu vrstu patogena te proizvesti velik broj protutijela koja pospješuju njegovo uklanjanje. Osim toga, sustav stečene imunosti omogućuje tzv. imunosno pamćenje (engl. *immunologic memory*) koje omogućuje brz i efikasan odgovor organizma u slučaju ponovnog izlaganja nekoj vrsti patogena (38). Ove dvije značajke – izuzetno velik i fleksibilan repertoar receptora za prepoznavanje opasnih mikroorganizama te dugotrajna sposobnost pamćenja

prethodnih infekcija – nadopunjuju i unaprijeđuju odgovor urođene imunosti (42) te smanjuju oštećenja tkiva uzrokovana fagocitnim stanicama urođene imunosti kod teških i dugotrajnih infekcija (49).

T i B stanice s jedinstvenim receptorima za prepoznavanje patogena (engl. *T cell receptor*, TCR, odnosno *B cell receptor*, BCR) migriraju tijelom kroz krvotok i limfni sustav, sve dok stanice sustava urođene imunosti ne signaliziraju prisutnost upale putem citokina (51). Po izlasku iz krvotoka i dolasku u tkivo iz kojeg se luče upalni signali, receptori na T stanicama prepoznaju i vežu peptidne fragmente patogena, koje na površini izlažu antigen-prezentirajuće stanice (makrofazi, dendritičke stanice) (38). S druge strane, B stanice sposobne su vezati nativne antigene koji sadrže i peptidne sljedove i ugljikohidratne domene (50). Osim navedenih receptora, brojne druge molekule na površini T i B stanica, kao i na površini antigen-prezentirajućih stanica, sudjeluju u pokretanju i regulaciji imunskog odgovora. T i B stanice koje su putem svojih receptora prepoznale i vezale antigen aktiviraju se te preuzimaju uloge regulacije aktivnosti drugih stanica imunskog sustava (CD4 pozitivne T stanice), direktnog inaktiviranja patogena (CD8 pozitivne T stanice) te proizvodnje i lučenja protutijela (B stanice) (38, 50). Protutijela imaju nekoliko uloga u procesu upale: neutraliziranje patogena vezanjem na njihovu površinu, aktivacija proteina komplementa nakon vezanja patogena što dovodi do uništenja njihovih membrana, te olakšana fagocitoza patogena i pospješena prezentacija njihovih antigena na makrofazima i dendritičkim stanicama (42).

Osim T i B stanica, brojne su druge stanice uključene u proces aktivacije stečene imunosti, kao i velik broj različitih proteina i drugih molekula, te čak i kratak pregled bitnih sastavnica stečene imunosti uključuje čitav spektar složenih i međusobno ovisnih interakcija koji uvjetuju uspješnost i brzinu imunskog odgovora (38). Ipak, pokretanje upalnih reakcija oslanja se na mehanizme urođene imunosti koji potom aktiviraju T i B limfocite (42), te se potencijalna opasnost materijala i nanočestica u kontekstu upale može promatrati kroz aktivnost prvih efektor upalne kaskade – epitelne stanice na mjestu upale, makrofazi, neutrofili te cirkulirajući monociti koji se diferenciraju u makrofage. S druge strane, učinak stranih materijala i NM na T stanice može dati vrijedan uvid u promjene na razini regulacije i intenziteta imunskog odgovora.

1.5 Monociti i makrofazi

Monociti i makrofazi u ljudskom organizmu dijele zajedničko porijeklo, odnosno mijeloidne prekursorske stanice koje se nalaze u žumanjčanoj vreći (52). Tijekom embrionalnog razvoja, ove prekursorske stanice diferenciraju se u različite populacije tkivnih makrofaga u mozgu (mikroglija stanice), koži (Langerhansove stanice) i jetri (Kupfferove stanice) (52, 53). U međuvremenu, mijeloidne prekursorske stanice se u jetri diferenciraju u hematopoetske matične stanice te daljnjom diferencijacijom utemeljuju populacije tkivnih makrofaga u probavnom sustavu (makrofazi lamine proprie) i plućima (alveolarni makrofazi) (52, 53). Hematopoetske matične stanice tijekom daljnjeg razvoja koloniziraju koštanu srž i postavljaju temelje za hematopoezu tijekom ostatka života, koja uključuje održavanje populacije monocita koji cirkuliraju kroz krvožilni sustav (52, 54). Cirkulirajući monociti reagiraju na pro-upalne signale te iz krvotoka prelaze u upaljeno tkivo (53, 55, 56), gdje se diferenciraju u makrofage ili dendritičke stanice, ili zadržavaju monocitni fenotip uz preuzimanje uloge antigen-prezentirajućih stanica (54, 57). Monociti koji se diferenciraju u makrofage nakon ulaska u tkivo pridružuju se aktivnosti već prisutnih tkivnih makrofaga u uklanjanju uzročnika upale (53, 56).

Makrofazi su jedna od najvažnijih komponenti urođene imunosti sa širokim rasponom uloga te imaju ključnu ulogu u razrješenju upale (58, 59) i cijeljenju rana (47). Njihova je osnovna zadaća fagocitoza izvanstaničnih i unutarstaničnih patogena, a sudjeluju u mobilizaciji, aktivaciji i regulaciji velikog broja drugih stanica imunskog sustava (38). Iako je dugo prevladavalo mišljenje kako su makrofazi samo efektori imunskog odgovora kojim upravljaju T i B stanice, novija istraživanja dala su uvid u mnoštvo uloga koje obavljaju u zdravom i upaljenom tkivu, te tkivu koje zacjeljuje (60, 61), kao njihovu izuzetnu plastičnost (62), sposobnost daljnje diferencijacije i specijalizacije (60), te čak i rudimentarni oblik imunskog pamćenja (63). Populacije makrofaga u različitim tkivima ekspimiraju različite površinske biljege, koji prilagođavaju njihove funkcije ovisno o lokalnom mikrookolišu (38, 64). Međutim, neovisno o lokalizaciji u tkivu, svi makrofazi na svojoj površini ekspimiraju receptore TLR za prepoznavanje struktura patogena. (44). Aktivacija tih receptora potiče lučenje brojnih pro-upalnih citokina koji uključuju IL-1 β , TNF α , IL-6 i IL-8, koji dalje potiču aktivaciju limfocita i neutrofila te pospješuju uklanjanje štetnih mikroorganizama (65, 66).

1.6 T stanice

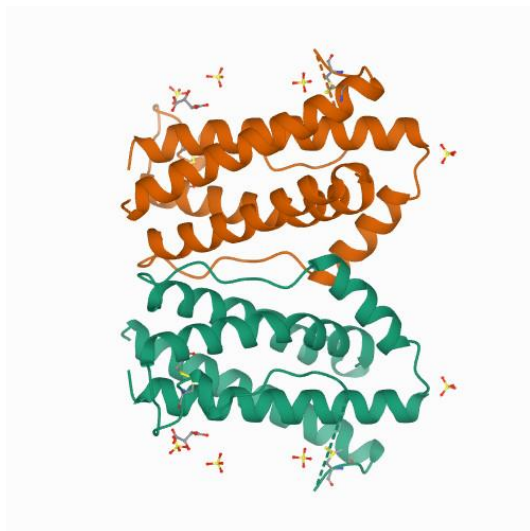
T stanice su ključna sastavnica stečenog imunosnog odgovora koje imaju sposobnost prepoznati gotovo neograničen broj antigena zahvaljujući rekombinaciji genetskih elemenata tijekom njihova sazrijevanja (38). Nastaju iz hematopoetskih matičnih stanica koštane srži koje migriraju u timus, gdje prolaze procese diferencijacije i selekcije, čija je svrha eliminacija T stanica koje reagiraju na antigene prisutne u tijelu (engl. *self-reactive T cells*) te pozitivna selekcija stanica koja osigurava da su sposobne vezati MHC kompleks za prezentaciju antigena (67). Tijekom njihova sazrijevanja u timusu također se odvija i rekombinacija genetskih elemenata receptora T stanica, pomoću koje T stanice dobivaju sposobnost ekspresije jedinstvenih receptora za izuzetno velik broj različitih antigena, što je neophodan preduvjet za stečenu imunost (68). Diferencijacijom u timusu nastaju dvije populacije T limfocita s različitim ulogama: CD4 pozitivne stanice, poznate i kao Th stanice (pomagačke T stanice, engl. *T helper cells*) i CD8 pozitivne stanice (citotoksične T stanice) (67). Th stanice reguliraju imunosni odgovor izlučivanjem širokog spektra citokina – $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13 – kojima potiču druge stanice na uklanjanje unutar-staničnih patogena i izvan-staničnih parazita (69). U Th stanice također se ubrajaju i regulatorne T stanice (Treg stanice) čija je specifična uloga utišavanje imunosnog odgovora kako bi se ograničio njegov opseg i uklonila upala nakon uspješne eliminacije patogena (69). Osim toga, njihova je uloga i utišavanje auto-reaktivnih T stanica koje su izmakle selekciji u timusu te mogu doprinijeti autoimunim bolestima (38, 69). CD8 pozitivne stanice izvršavaju puno izravniju ulogu u upalnom odgovoru u odnosu na CD4 stanice, budući da je njihova primarna zadaća uništavanje stanica zaraženih virusnim, bakterijskim i praživotinjskim (lat. *Protozoa*) patogenima (70). Njihova je glavna zadaća pokretanje apoptoze u inficiranim stanicama putem dvaju mehanizama: i) izlučivanje perforina i granzima kojima stvaraju oštećenja u membranama inficiranih stanica i fragmentaciju njihove DNA, čime aktiviraju proces njihove apoptoze (71, 72) te vezanje receptora CD95 na membranama ciljnih stanica, što također pokreće programiranu staničnu smrt (70, 73). Nakon interakcije s antigen-prezentirajućim stanicama (engl. *antigen-presenting cells*, APC) koji potiče njihovu aktivaciju i proliferaciju, broj CD8 pozitivnih limfocita naglo raste i pomaže u uklanjanju patogena, a nakon završenog upalnog odgovora dio aktiviranih CD8 pozitivnih limfocita prelazi u memorijske stanice koje pospješuju novi odgovor u slučaju infekcije istim patogenom (70). Zbog svojih sveobuhvatnih uloga u funkcioniranju imunosnog

sustava i utišavanju karcinogeneze, T stanice su i dalje aktualno područje istraživanja za razvoj novih terapija (74, 75).

1.7 Citokini

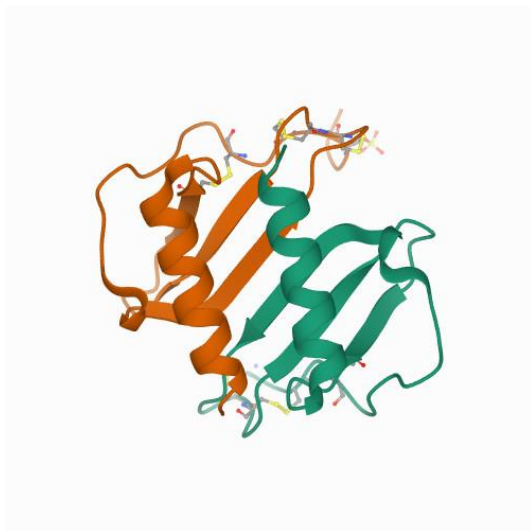
Komunikaciju i koordinaciju među različitim tipovima stanica tijekom upalnog procesa omogućuju citokini, regulatorni proteini različitih veličina i oblika koje izlučuju brojne vrste stanica kao što su neutrofili, monociti, makrofazi, B i T stanice, mastociti, epitelne stanice i druge (76, 77). Njihove uloge uključuju aktivaciju signalnih puteva i genske ekspresije, regulaciju razvoja i diferencijacije stanica imunskog sustava, međustaničnu komunikaciju, i više (76). Učinci citokina su pleiotropni, što znači da njihovo vezanje na površinske receptore stanica može imati raznolike učinke, ovisno o vrsti stanica, koncentraciji citokina te prisutnosti i koncentraciji drugih citokina u istom mikrookolišu (76, 78). Zastupljenost različitih citokina u procesu upale nije jednaka, te neki citokini imaju više uloga i utječu na veći broj procesa u odnosu na druge. Među ključne citokine zadužene za provođenje i koordinaciju upalnog odgovora ubrajaju se interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), čimbenik nekroze tumora alfa (engl. *tumor necrosis factor α* , TNF α) i interleukin-1 β (IL-1 β) (79–82).

IL-6 (Slika 1) je glikoprotein od 212 aminokiselina s mnogobrojnim ulogama u regulaciji upale, što je očito iz brojnih dodijeljenih imena prije nego je utvrđeno da su raznolike funkcije objedinjene u jednoj molekuli: naziv stimulacijski čimbenik B stanica 2 (engl. *B-cell stimulatory factor 2*, BSF-2) odnosio se na njegovu sposobnost diferencijacije aktiviranih B stanica, ime stimulacijski čimbenik hepatocita (od engl. *hepatocyte-stimulating factor*, HSF) dodijeljen je zbog poticanja sinteze proteina u jetri, a zbog antivirusnog učinka nalik interferonima nazvan je i interferon β 2 (IFN- β 2) (79, 83). Sinteza IL-6 pokreće se na mjestu lezije kao jedan od glavnih signala za pokretanje upalnog odgovora, nakon čega se transportira u jetru gdje pokreće sintezu širokog spektra proteina, uključujući C-reaktivni protein, fibrinogen, haptoglobin i α 1-antikimotripsin (83, 84). Daljnji učinci IL-6 su stimulacija T i B stanica, kao i fibroblasta i stanica koštane srži (83, 85, 86). Obzirom na brojne i raznolike funkcije u upalnom procesu, ekspresija IL-6 često se analizira kao jedan od glavnih biljega pokretanja upalnog odgovora.



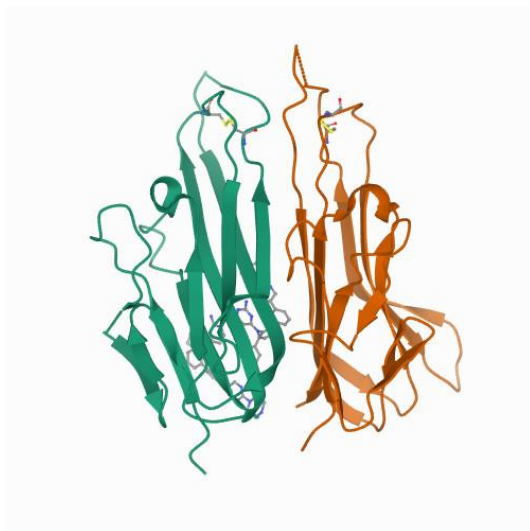
Slika 1. Kristalna struktura interleukina 6. Slika je preuzeta s web stranice RCSB Protein data bank (PDB) ID 1ALU (87).

Kao i IL-6, IL-8 (Slika 2) je citokin kojeg izlučuju različite vrste stanica (limfociti, monociti, fibroblasti, epitelne stanice i druge) kao odgovor na bakterijske ili virusne infekcije, stanični stres, signale oštećenja tkiva (DAMP) ili na stimulaciju drugim pro-upalnim citokinima (80). Njegova je glavna uloga signalizacija cirkulirajućim neutrofilima kako bi prepoznali mjesto upale i otpustili lizosomalne enzime koji oštećuju bakterijske stanice i viruse, ali i okolno zdravo tkivo (88, 89). Osim neutrofila, IL-8 djeluje kao kemoatraktant i za makrofage, mastocyte i dendritičke stanice, te potiče proliferaciju endotelnih stanica i angiogenezu (90, 91). Specifičnost IL-8 je velika promjena u razini ekspresije uslijed pokretanja upalnog odgovora. Dok je u zdravom tkivu vrlo teško detektirati njegovu prisutnost, njegova ekspresija može narasti i do 100 puta nakon stimulacije stanica drugim pro-upalnim citokinima (80). Također, IL-8 je prilagođen za dugotrajnu aktivnost tijekom upalnog procesa, obzirom na strukturu od samo 72 aminokiseline i relativnu otpornost na temperaturu, nizak pH i enzimatsku razgradnju, te je *in vivo* prisutan i aktivan nekoliko dana u području upale (92).



Slika 2. Kristalna struktura interleukina 8. Slika je preuzeta s web stranice RCSB Protein data bank (PDB) ID 1QE6 (93).

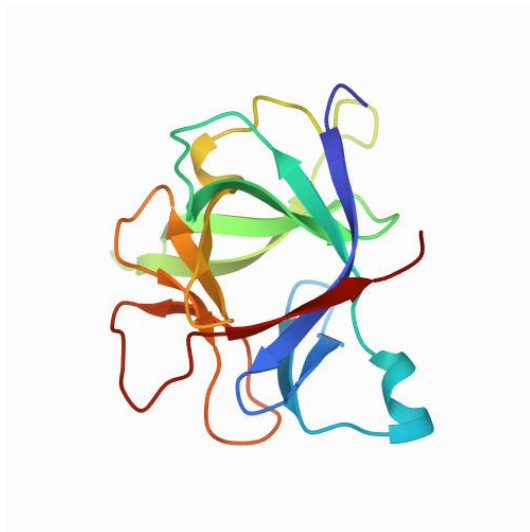
TNF α (Slika 3) je citokin sa širokim spektrom djelovanja kojeg izlučuju monociti, makrofazi, T i B stanice, fibroblasti, astrociti te epitelne stanice (94, 95). Ime je dobio prema sposobnosti izazivanja nekroze transplantiranih tumora u miševa (96), a njegova poveznica sa upalom zabilježena je kod ljudi već u 19. stoljeću, kad je William Coley zamijetio smanjenje tumora kod pacijenata izloženih bakterijskoj infekciji (97). Danas je poznata njegova ključna uloga u regulaciji urođene i stečene imunosti preko regulacije ekspresije drugih pro-upalnih citokina, kao što su IL-1, IL-6 i IL-8 (94, 98). Osim toga, TNF α je jedna od prvih i najvažnijih signalnih molekula na mjestu upale te osim ekspresije citokina regulira i signalizaciju preko prostaglandina i čimbenika aktivacije trombocita (99, 100). Važnost ovog citokina za upalni odgovor također je očita iz evolucijske očuvanosti njegove strukture i funkcije, koja je ustanovljena otkrićem i analizom TNF homologa kod drugih kralježnjaka i beskrležnjaka (38).



Slika 3. Kristalna struktura čimbenika nekroze tumora α . Slika je preuzeta s web stranice RCSB Protein data bank (PDB) ID 5MU8 (101).

Interleukin-1 (IL-1) opisan je 1940.-ih godina kao supstanca koju luče aktivirani limfociti i koja izaziva simptome vrućice, te je tada nazvan pireksin ili endogeni pirogen (102). Daljnja su istraživanja pokazala da se ustvari radi o dva blisko povezana citokina, IL-1 α i IL-1 β (Slika 4), koji vežu iste receptore i aktiviraju slične signalne puteve (82, 103). Iako njihove aminokiselinski slijedovi imaju tek 27 % homologije, oba imaju vrlo sličnu trodimenzionalnu strukturu sačinjenu od 12 β -ploča, što također objašnjava velike sličnosti u biološkoj aktivnosti (104). Kao i kod TNF α , zbog širokog raspona bioloških učinaka dodijeljena su mu različita imena, ovisno o kontekstu u kojem je opisana njegova aktivnost: čimbenik aktivacije limfocita, endogeni leukocitni medijator, čimbenik mononuklearnih stanica, čimbenik aktivacije osteoklasta, katabolin i hemopoetin-1 (105). Primarni proizvođači IL-1 citokina su monociti i makrofazi, a u manjoj mjeri luče ga i neutrofili, keratinociti, limfociti, fibroblasti, epitelne stanice te stanice glatkog mišićnog tkiva (105). Unatoč sličnostima u strukturi i funkciji IL-1 α i IL-1 β , ključna je razlika u raspodjeli ekspresije ova dva proteina u tijelu: dok IL-1 α prvenstveno izlučuju stanice mezenhimalnog podrijetla kao keratinociti te endotelne i epitelne stanice pluća i bubrega, ekspresija IL-1 β najznačajnija je u monocitima i makrofazima (105). Također, IL-1 α je stalno eksprimiran u zdravim stanicama, iako se izlučuje samo u slučaju oštećenja stanica ili odgovora na vezanje pro-upalnih citokina, dok je ekspresija IL-1 β u zdravim makrofazima vrlo niska i značajno se podiže

samo u slučaju upale (105). IL-1 β je stoga bolji pokazatelj pokretanja upalne kaskade u makrofazima u odnosu na IL-1 α , te je odabran kao jedan od upalnih biljega u ovom radu.



Slika 4. Kristalna struktura interleukina 1 β . Slika je preuzeta s web stranice RCSB Protein data bank (PDB) ID 9ILB (106).

1.8 Interakcije nanočestica i imunskog sustava

Nanočestice unesene u tijelo koje dođu u kontakt sa imunskim sustavom mogu uzrokovati čitav niz različitih učinaka koje nije moguće utvrditi *a priori*, a mogu se ugrubo svrstati u pro-upalne ili protuupalne promjene (107). Ključan korak koji određuje kakav će odgovor nanočestice izazvati je vezanje i aktivacija PRR na stanicama zaduženima za odgovor urođene imunosti, prvenstveno makrofazima (45). Kao i kod ostalih aspekata biološkog odgovora na nanočestice, njihova veličina, oblik i površinska svojstva utječu na prirodu i intenzitet imunskog odgovora (107). Veličina nanočestica važan je parametar koji određuje njihov unos u stanice, interakcije sa sastavnicama imunskog sustava i biodistribuciju *in vivo*, ali jačina staničnog odgovora na nanočestice nije u linearnoj ovisnosti o njihovoj veličini (108). Za oblik nanočestica pokazano je da utječe ne samo na kinetiku njihova unosa i ekskrecije, već i na lokalizaciju u tkivima (109). Svojstva površina nanočestica kao što su naboj i hidrofobnost također imaju značajan utjecaj na

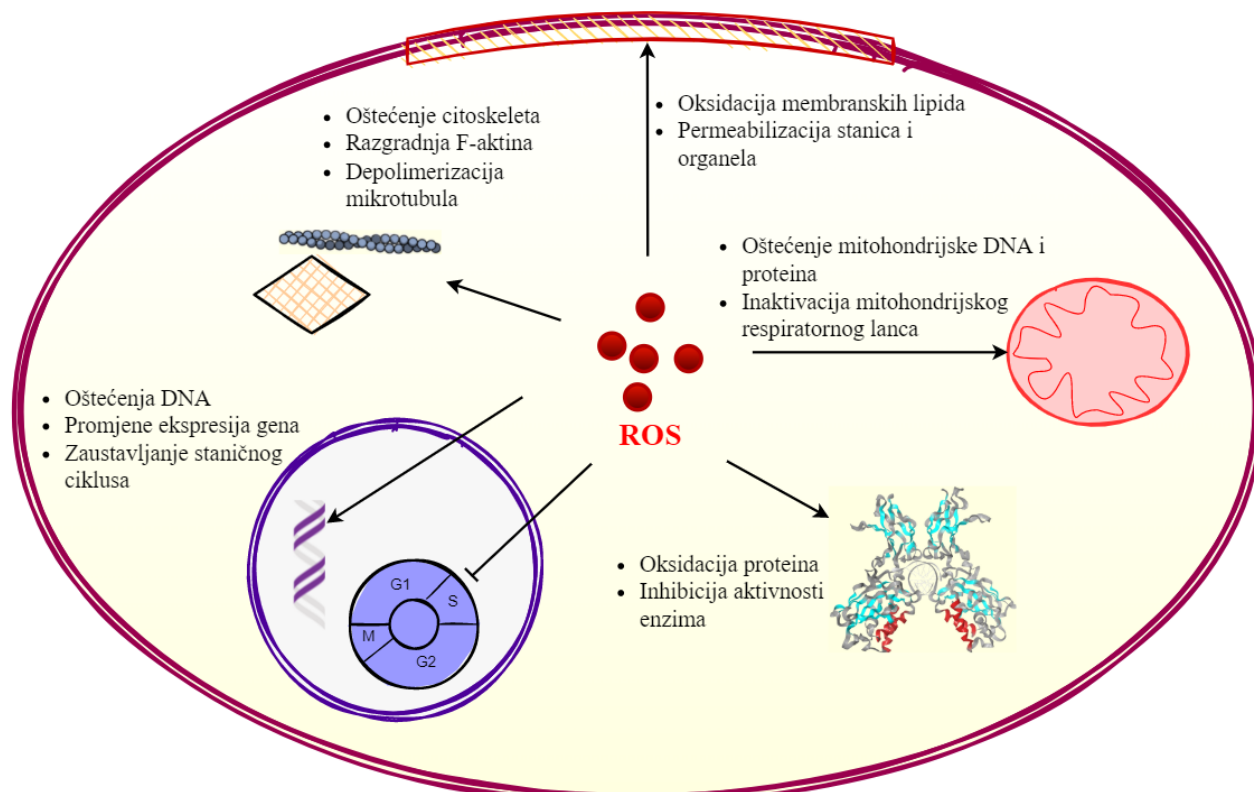
unos nanočestica i njihove interakcije s komponentama imunskog sustava prvenstveno zbog utjecaja na biomolekulsku koronu nanočestica (110). Biomolekulska korona, također poznata i kao proteinska korona, je sloj raznolikih biomolekula (poglavito proteina) koje nanočestice adsorbiraju na površinu tijekom cirkulacije u organizmu i ima presudan utjecaj na biološki identitet nanočestica i sve njihove interakcije u organizmu (111). Pokazano je da hidrofobnost površine nanočestica izravno utječe na sastav proteina koji se adsorbiraju, što posljedično može povećati ili smanjiti stanični unos nanočestica i posredno modulirati upalni odgovor (112). Zbog teškoće u predviđanjima sastava proteina i drugih biomolekula koje će se adsorbirati na površinu nanočestica pri njihovom ulasku u organizam, posljedični odgovor imunskog sustava potrebno je analizirati zasebno za svaki tip NM ili njihovih smjesa.

1.9 Oksidativni stres

Kao što je gore navedeno za nanoPS, upalni odgovor usko je povezan s oksidativnim stresom: reaktivne kisikove vrste povećava ekspresiju transkripcijskog faktora NF κ B koji zatim potiče ekspresiju pro-upalnih gena (113), a upalni odgovor uključuje proizvodnju reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta koje mogu pridonijeti oksidativnom stresu (36). Kvantifikacijom proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta, kao i staničnih parametara odgovora na oksidativni stres, moguće je upotpuniti analizu interakcija nanočestica sa stanicama i potencijalnu opasnost po ljudsko zdravlje koju mogu prouzročiti.

Oksidativni stres naziv je za stanje neravnoteže u oksidativnim (npr. reaktivne vrste kisika i dušika) i antioksidativnim staničnim mehanizmima (npr. superoksid dismutaza, glutation) u kojem prevladavaju oksidirajući faktori i uzrokuju oštećenje biomolekula i staničnih struktura (114). Reaktivne kisikove vrste zajednički je naziv za nusprodukte aerobnog staničnog mehanizma koji nastaju u mitohondrijima tijekom redukcije O_2 u molekulu vode, a uključuju superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikal ($OH^{\cdot}$) (115). Štetne posljedice njihova stvaranja i reakcija s biomolekulama dobro su poznate i opisane u kontekstu raznih bolesti (116). Međutim, ROS-ovi igraju važnu ulogu i u normalnom staničnom metabolizmu kao prijenosnici signala i sastavnice regulatornih mehanizama (115). Osim toga, pokazano je da su ROS-ovi ključne komponente uništavanja patogena putem fagocita kao što su makrofazi i neutrofili, koji nakon fagocitiranja bakterijskih stanica proizvode H_2O_2 kako bi ih neutralizirali (117, 118). Stoga

normalni stanični metabolizam uključuje i regulaciju koncentracije reaktivnih vrsta kisika i dušika kako bi sudjelovale u funkcijama organizma, za što su zaduženi enzimi (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, katalaza) i druge molekule kao što su glutation, urična kiselina, askorbinska kiselina i α -tokoferol (115, 119). Poremećaj u ravnoteži oksidativnih i anti-oksidativnih mehanizama zbog stvaranja ROS-ova može imati različite štetne učinke na stanični metabolizam i funkciju (Slika 5).



Slika 5. Oštećenja staničnih struktura i promjene u funkciji stanica uzrokovane reaktivnim kisikovim vrstama.

1.10 Modelne stanične linije Jurkat i THP-1

Stanice Jurkat vrlo su često korišten model za istraživanje upalnog odgovora ljudskih T stanica i jedne su od ključnih staničnih linija na kojima je opisan proces aktivacije limfocita putem TCR (120). Glavni je motiv za uspostavljanje ove stanične linije bila potreba za stanicama koje pouzdano proizvode IL-2, kako bi se taj citokin mogao koristiti za održavanje kultura T stanica izoliranih iz ljudskog tkiva (120, 121). Međutim, stanice Jurkat dobivene ovom selekcijom

pokazale su se kao izuzetan model za proučavanje mehanizama provođenja izvanstaničnih signala putem površinskih receptora i posljedičnih aktivacija nizvodnih enzima (120). Iako postoje bitne razlike između stanične linije Jurkat i T stanica izoliranih iz ljudskog tkiva (122), stanice Jurkat pokazale su se kao prikladan model za proučavanje raznih aspekata biologije limfocita te su u ovom radu korištene za analizu toksičnosti NM.

Stanice THP-1 dobivene su iz pacijenta s akutnom monocitnom leukemijom i koriste se kao model ljudskih cirkulirajućih monocita (123). Kao i primarni monociti iz kojih su nastale, stanice THP-1 posjeduju sposobnost diferencijacije u makrofage nakon stimulacije forbol 12-miristat 13-acetatom (engl. *phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA) (124). Usporedba stanica THP-1 sa primarnim monocitima pokazala je kako su THP-1 pogodan model za proučavanje funkcija makrofaga, obzirom na odgovor na podražaj agensa kao što je LPS, aktivaciju signalnih puteva uključenih u upalni odgovor i ekspresiju biljega na površini stanica (125, 126). Makrofazi su primarni stanični tip zadužen za uklanjanje patogena, apoptotičnih stanica, staničnih ostataka i raznih vrsta stranih čestica (127, 128). Poznato je da se oko 95 % intravenozno primijenjenog NM nakuplja u jetri, slezeni ili bubrezima (129, 130), gdje su različite populacije makrofaga zadužene za njihovo uklanjanje iz organizma (131). Shodno tome, od velike je važnosti utvrditi odgovor makrofaga na izlaganje NM kako bi se shvatio njihov učinak na razini stanica i predvidjelo njihovo ponašanje na razini tkiva i organizma.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nanomaterijali omogućuju veliki napredak u području medicine, te su danas u kliničkoj uporabi različiti dijagnostički i terapijski sustavi koji sadrže takve materijale. Najviše korištene su nanočestice srebra (nanoAg), posebice u suzbijanju infekcija, te su sastavni dio brojnih medicinskih pomagala. Osim nanoAg u medicini se vrlo često koristi i polistiren, plastični polimerni materijal, zbog svoje izdržljivosti i biokompatibilnosti pri izradi dijagnostičkih instrumenata, obloga za cijeljenje rana te umjetnih organa. Uz svoje pozitivne karakteristike, bitno je napomenuti da je primjena ovakvih materijala ograničena radi mogućih toksičnih učinaka. Unatoč različitom sastavu i kemijskim svojstvima, nanočestice Ag i polistirena pokazuju sličnosti u učincima na staničnoj razini, budući da oba tipa nanočestica mogu katalizirati proizvodnju slobodnih kisikovih radikala. Obzirom na raširenost uporabe i dug životni vijek plastičnih materijala, te rastuću važnost nanoAg u medicini, moguća je njihova zajednička primjena u medicinskim pomagalima što bi dovelo do rizika izlaganja mješavini mikro- i nanočestica polistirena (nanoPS) i nanoAg otpuštenih s površine pomagala. Utjecaj nanoAg i nanoPS na stanice ljudskog imunskog sustava slabo je istražen, a dosad u literaturi nije opisana interakcija smjese nanoAg i nanoPS na modelne stanične linije imunskog sustava kao ni usporedba učinaka smjese s pojedinačnim tipom nanočestica.

Svrha ovog rada je istražiti učinke kombinirane primjene nanoAg i nanoPS na stanice humanog podrijetla.

Osnovna hipoteza ovog rada je da se kombinirano djelovanje nanoAg i nanoPS na Jurkat i THP-1 stanične linije značajno razlikuje od bioloških učinaka pojedinačne primjene nanoAg i nanoPS. Stoga je glavni cilj ove disertacije bio opisati djelovanje nanoAg, nanoPS i njihove smjese na modelne stanične linije za ljudski imunski sustav, Jurkat i THP-1.

Primjenom pojedinačnih nanoAg, nanoPS i njihovih kombinacija na odabrane stanične linije, ispitano je njihove djelovanje na različite aspekte staničnog metabolizma:

1. Stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta i posljedični oksidativni stres u stanicama,
2. Pokretanje upalnog odgovora i ekspresija povezanih citokina,
3. Oštećenje staničnih i mitohondrijskih membrana,
4. Lomovi molekula DNA,

5. Promjene u svojstvima citoskeleta i čvrstoći stanica.

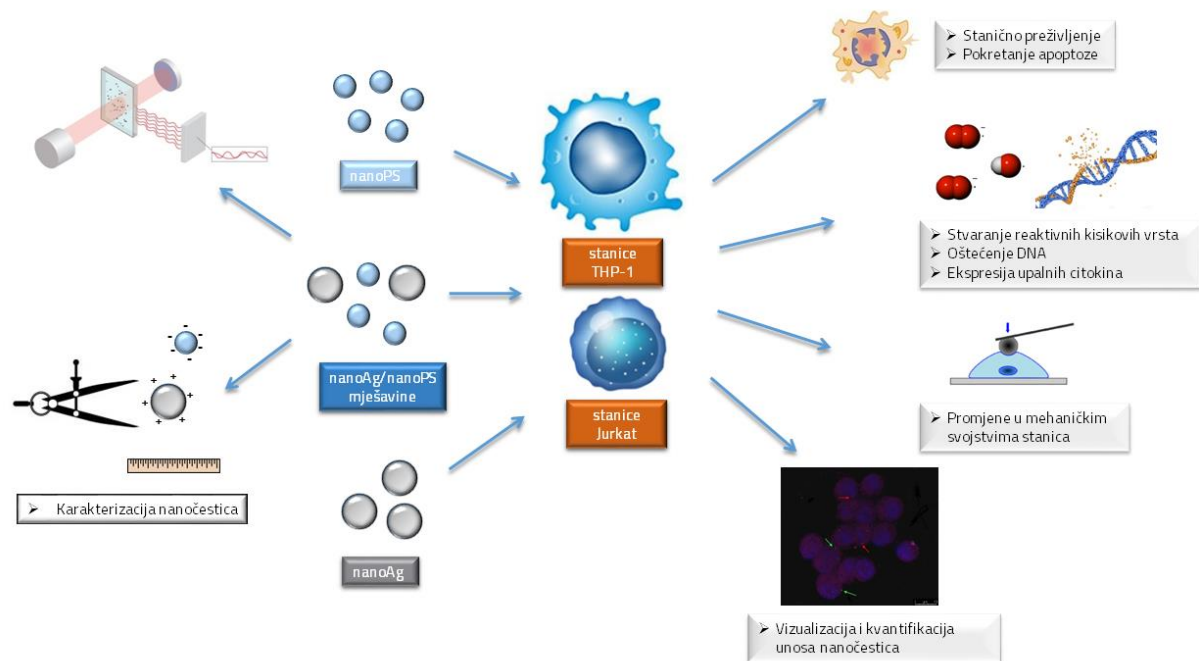
Ovi aspekti staničnih promjena objedinjeni su analizom apoptoze, odnosno programirane stanične smrti, i nekroze kao posljedica prevelikog opterećenja staničnih mehanizama za kompenzaciju oksidativnog stresa i oštećenja DNA. Također, kako bi se pobliže opisao utjecaj nanočestica na stanične funkcije i metabolizam i odredila njihova lokalizacija u stanici, unos nanočestica je vizualiziran te kvantificiran u usporedbi s negativnom kontrolom (netretiranim stanicama).

Prije samog tretmana stanica Jurkat i THP-1 nanočesticama, analizirane su veličina, oblik i ζ potencijal nanoAg i nanoPS, te je ispitana njihova agregacija u čistoj vodi i staničnom mediju.

Za ispunjavanje ovih ciljeva korištene su:

1. Protočna citometrija (za analizu apoptoze, stanične smrti, oštećenja DNA i kvantifikaciju unosa nanočestica)
2. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze (za kvantifikaciju ekspresije gena povezanih s upalnim odgovorom)
3. Eseji na mikrotitarskim pločicama za analizu biljega oksidativnog stresa
4. Atomska mikroskopija sila (za analizu promjena citoskeleta)

Ključan čimbenik u odabiru metoda za ovu disertaciju bio je problem interferencija nanočestica sa uobičajenim testovima koji se koriste u staničnoj biologiji (132, 133). Odabrane metode i tehnike smanjuju utjecaj nanočestica na očitavanje eseja isključivanjem signala nanoAg i nanoPS na temelju veličine (protočna citometrija) ili provođenjem pokusa bez biljega koji bi mogli stupiti u interakciju s nanočesticama (atomska mikroskopija sila). Metode korištene u ovoj disertaciji koje koriste fluorescentne biljege prilagođene su na način da smanji doticaj nanočestica sa biljezima na najmanju moguću mjeru, kako bi rezultati pružili vjerodostojnu sliku staničnih procesa. Navedena prilagodba eseja prvenstveno uključuje smanjenje koncentracije nanočestica za provođenje tretmana (za eseje oksidativnog stresa) te korištenje minimalne količine uzorka kako bi se smanjila prisutnost nanočestica u postupku njegove obrade i analize (za kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze).



Slika 6. Shematski prikaz provedbe pokusa disertacije. Pojedinačne nanočestice i njihove mješavine karakterizirane su obzirom na veličinu, oblik i ζ potencijal čestica. Stanice Jurkat i THP-1 su zatim tretirane s nanoAg i nanoPS u rasponu koncentracija te su analizirani njihovi biološki učinci.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Sinteza i karakterizacija nanočestica

Brojne metode za sintezu različitih tipova nanočestica razvijene su u istraživačkim laboratorijima koje se ugrubo mogu podijeliti u dva različita pristupa: sinteza „odozgo prema dolje“ (engl. *top-down*) kojom se makroskopske količine materijala smanjuju do veličine nanočestica, te sinteza „odozdo prema gore“ (engl. *bottom-up*) kojom se atomi, ili molekule grupiraju u nanočestice kemijskim ili fizikalnim procesima (134, 135). Prilikom sinteze nanočestica *bottom-up* pristupom, koriste se razne površinski aktivne tvari ili polimeri čija je svrha održavanje stabilnosti nanočestica u suspenziji (136).

NanoAg promjera 50 nm sintetizirane su redukcijom srebrovog nitrata (AgNO_3 , Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka) pomoću glukoze (Kemika, Zagreb, Hrvatska) u lužnatom mediju, uz korištenje agensa za stabilizaciju poli(vinilpirolidona) (PVP, Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka). PVP je otopljen u 192 mL ultračiste vode u masenom udjelu od 0,3 %. Otopina je postavljena u vodenu kupelj, na IKA RCT magnetsku miješalicu s grijačem (IKA Werke, Staufen im Breisgau, Njemačka). Temperatura otopine održavana je između 30 i 40°C te je otopina miješana na 500–600 okretaja u minuti. Potom je u otopinu dodano 2,22 mL 90 mM AgNO_3 i 0,133 mL 35 % amonijaka (NH_3 , Kemika, Zagreb, Hrvatska). Nakon nekoliko minuta, u otopinu je dodano 4 mL 0,5 M glukoze i 0,6 mL 1 M natrijevog hidroksida (NaOH , Kemika, Zagreb, Hrvatska). Tako pripremljena reakcijska smjesa ostavljena je na konstantnom miješanju 30 min, zaštićena od svjetlosti. Sintetizirane nanočestice pročišćene su centrifugiranjem 20 min na $3\,500 \times g$, u centrifugi Eppendorf 5810R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Precipitat je re-suspendiran u ultra-čistoj vodi, nakon čega je pročišćavanje ponovljeno. Suspenzija nanočestica pohranjena je u mraku na 4°C. Koncentracija srebra u suspenziji nanočestica određena je metodom atomske apsorpcijske spektroskopije (AAS) na uređaju Perkin Elmer AAnalyst 600 (Perkin Elmer, Waltham, SAD). Kalibracija uređaja napravljena je pomoću standardne otopine srebra (1000 mg/L u 5 % HNO_3) (Merck, Njemačka).

Hidrodinamički promjer i zeta (ζ) potencijal nanočestica određeni su metodama dinamičkog i elektroforetičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering* – DLS,

electrophoretic light scattering – ELS). Obje metode provedene su na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo) korištenjem laserskog snopa svjetlosti valne duljine 532 nm. Mjerenja su provedena na 25°C. Za mjerenja DLS uzorci su razrijeđeni u ultračistoj vodi do koncentracije 10 mg/L i pipetirani u jednokratnu plastičnu kivetu (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka). Detekcija raspršenog zračenja provodila se pod kutom od 173°, te je hidrodinamički promjer dobiven iz volumne distribucije kao prosječna vrijednost 10 uzastopnih mjerenja. Za mjerenja ELS uzorci su razrijeđeni u ultračistoj vodi do koncentracije 10 mg/L i pipetirani u kivete za ELS mjerenja (Malvern Instruments, Malvern, UK). Za računanje ζ potencijala korištena je Henryjeva jednadžba sa Smoluchowskovom aproksimacijom, te je konačna vrijednost izražena kao prosječna vrijednost 3 uzastopna mjerenja. Rezultati su obrađeni pomoću Zetasizer softvera, verzija 6.32 (Malvern Instruments, Malvern, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Polistirenske nanočestice (nanoPS) promjera 20 nm s i bez fluorescentnog biljega nabavljene su od tvrtke Phosphorex (Hopkinton, SAD). Raspodjela veličina i ζ potencijal polistirenskih nanočestica kvantificirani su kako je opisano za nanoAg.

3.2 Stanična kultura i diferencijacija stanica THP-1 iz monocita u makrofage

Kao modelni sustav stanica imunskog sustava korištene su komercijalno dostupne stanične linije nabavljene od tvrtke ATCC (Manssas, SAD): Jurkat (ATCC oznaka TIB-152) i THP-1 (ATCC oznaka TIB-202). Stanične su linije uzgajane u flasku T75 (Eppendorf, Njemačka), u mediju za stanične kulture RPMI 1640 (Sigma Aldrich, SAD) s 10 % volumnog udjela fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS, Sigma Aldrich, SAD) i 1 % volumnog udjela Anti/anti (mješavina antibiotika i antimikotika - 10,000 U/mL penicilina, 10 mg/mL streptomycina and 25 µg/mL amfotericina B, Sigma Aldrich, SAD), na 37°C i 5 % CO₂. Gustoća stanične suspenzije i postotak vijabilnih stanica bilježen je u razmacima od tri dana pomoću automatskog brojača stanica TC20 (BioRad, Hercules, SAD). Stanice su uzgajane dok nije postignuta gustoća stanica od 1×10^6 st/mL, nakon čega su nasađene u mikrotitarske pločice za pokus. Stanice Jurkat su nakon nasađivanja odmah bile spremne za pokus, dok su stanice THP-1 tretirane sa 100 nM otopinom forbol-12-miristat-13-acetata (engl. *Phorbol-12-myristate-13-acetate*, PMA) u staničnom mediju te inkubirane 3 dana na 37°C i 5 % CO₂. Uspješna diferencijacija stanica potvrđena je vizualnom inspekcijom na invertnom mikroskopu Olympus

CKX41 (Olympus, Tokyo, Japan), obzirom da stanice THP-1 tretirane sa PMA iz suspenzijskih prelaze u adherentni tip stanica.

3.3 Stanično preživljenje i pokretanje apoptoze – protočna citometrija

Protočna citometrija široko je rasprostranjena metoda kojom je moguće analizirati prisutnost površinskih ili unutarstaničnih proteina kod živih ili fiksiranih stanica. Odabirom prikladnih proteina za analizu moguće je ispitati velik broj parametara staničnog metabolizma i njihove promjene. U ovoj disertaciji, protočna citometrija korištena je za utvrđivanje stanične smrti, apoptoze i oštećenja genomske DNA. Kvantifikacija mrtvih stanica postignuta je obilježavanjem propidij jodidom, a apoptotične stanice identificirane su biljekom aneksin V-fluorescein izotiocijanata (FITC). Propidij jodid veže DNA nekrotičnih stanica koje imaju propusne membrane, ali ne može proći kroz cjelovite membrane živih stanica te one ostaju neobilježene. Rekombinantni protein aneksin V koji na sebi nosi FITC veže fosfatidilserin koji je u zdravim stanicama prisutan na unutarnjoj strani stanične membrane, a njegova translokacija na vanjsku stranu stanične membrane koristi se kao biljeg apoptoze (137). Obzirom da aneksin V-FITC ne može proći kroz cjelovitu staničnu membranu, njime se obilježavaju samo apoptotične stanice.

Stanice Jurkat i THP-1 nasađene su u pločice sa 12 jažica (Eppendorf, Njemačka), u 900 μL stanične suspenzije koncentracije $1,1 \times 10^5$ st/mL, u RPMI 1640 mediju s 10 % volumnog udjela fetalnog goveđeg seruma i 1 % volumnog udjela Anti/anti mješavine. Jurkat stanice su potom tretirane suspenzijama nanoPS u PBS-u i nanoAg u sterilnoj vodi. Koncentracije suspenzija nanočestica korištenih za tretman stanica navedene su u Tablici 1. Kontrolne stanice tretirane su sa 100 μL sterilne H_2O . Pločice su inkubirane 24 h na 37°C i 5 % CO_2 , nakon čega su pripremljene za analizu na protočnom citometru koristeći kit Annexin V Assay (BioRad, SAD). Nakon inkubacije, stanice u suspenziji sakupljene su u tubice Eppendorf (Eppendorf, Njemačka) od 2 mL. Stanice su centrifugirane 5 min na $800 \times g$, nakon čega je supernatant uklonjen te su stanice re-suspendirane u 1 mL puferirane fiziološke otopine (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS). Zatim je ponovljen korak centrifugiranja, uklonjen je supernatant, te su stanice re-suspendirane u 195 μL pufera za bojanje (engl. *staining buffer*) iz kita Annexin V Assay. U uzorke je dodano 5 μL Annexin V-FITC reagensa, nakon čega su inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi u mraku. Poslije inkubacije, uzorcima je dodano 1 mL pufera za bojanje te su centrifugirani 5 min na $800 \times g$. Nakon

centrifuge, stanice su re-suspendirane u 190 μ L pufera za bojanje te im je dodano 10 μ L propidij jodida iz kita Annexin V Assay. Stanice su inkubirane 10 min na sobnoj temperaturi u mraku, nakon čega su odmah analizirane na protočnom citometru Attune NxT (Thermo Fisher Scientific, SAD). Fluorescencija boje Annexin V-FITC pobuđena je laserom valne duljine 488 nm, a zabilježena na detektoru s emisijskim filterom 530/30 nm. Fluorescencija propidij jodida pobuđena je istim laserom, a zabilježena na detektoru s emisijskim filterom 695/40 nm. Bojanje sa Annexin V-FITC i propidij jodidom omogućilo je razlikovanje tri različite populacije stanica: žive stanice (negativne na obje boje), apoptotične stanice (pozitivne na Annexin V-FITC), te mrtve stanice u ili stanice u kasnoj apoptozi (pozitivne na obje boje).

Stanice THP-1 su nakon završene diferencijacije tretirane s nanoPS, nanoAg i mješavinama NM u istim koncentracijama kao stanice Jurkat. Nakon 24-satne inkubacije sa nanočesticama, stanični medij iz jažica sakupljen je u Eppendorf tubice od 2 mL. Stanice su potom isprane sa PBS-om (1 mL po jažici) te tretirane Trypsin-etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA) otopinom (500 μ L po jažici) (Sigma Aldrich, SAD). Pločice su inkubirane 5 min na 37°C i 5 % CO₂ kako bi se djelovanjem Trypsin-EDTA otopine stanice odvojile od podloge. Nakon inkubacije, u jažice je dodano po 500 μ L staničnog medija (RPMI 1640 s 10 % v/v FBS i 1 % v/v Anti/anti), te je 1 mL stanične suspenzije sakupljeno iz jažica u Eppendorf tubice koje su sadržavale supernatante istih uzoraka. Stanice su obojane propidij jodidom i Annexin V-FITC reagensom te analizirane kako je opisano gore. Dobiveni rezultati analizirani su u programu FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, SAD).

Tablica 1. Koncentracije suspenzija nanočestica kojima su tretirane stanice Jurkat i THP-1 za pokuse protočne citometrije. n.p. – nanočestice nisu primjenjene u uzorku.

Uzorak	Završne koncentracije suspenzija nanočestica u jažicama	
	nanoPS (mg/L)	nanoAg (mg/L)
1	1	n.p.
2	10	n.p.
3	50	n.p.
4	100	n.p.
5	250	n.p.
6	500	n.p.
7	n.p.	0,1
8	n.p.	1
9	n.p.	10
10	n.p.	25
11	n.p.	50
12	n.p.	100
13	1	1
14	1	10
15	1	50
16	10	1
17	10	10
18	10	50
19	100	1
20	100	10
21	100	50

3.4 Kvantifikacija unosa nanočestica – protočna citometrija

Unos nanočestica u stanice kvantificiran je metodom protočne citometrije, kojom se unos nanoAg može pratiti preko intenziteta postranično raspršene svjetlosti (engl. *side-scatter light*, SSC) u stanicama (138), a unos nanoPS preko intenziteta fluorescencije stanica. Stanice Jurkat i THP-1 nasadene su u pločice sa 12 jažica (Eppendorf, Njemačka), u 900 μ L stanične suspenzije koncentracije $1,1 \times 10^5$ st/mL, u RPMI 1640 mediju s 10 % volumnog udjela fetalnog goveđeg seruma i 1 % volumnog udjela Anti/anti mješavine antibiotika i antimikotika. Stanice Jurkat potom su tretirane suspenzijama fluorescentno obilježenih nanoPS u PBS-u i nanoAg u sterilnoj vodi. Koncentracije suspenzija korištenih za tretman stanica navedene su u Tablici 1. Kontrolne stanice tretirane su sa 100 μ L sterilne H₂O. Pločice su inkubirane 24 h na 37°C i 5 % CO₂, nakon čega su

pripremljene za analizu na protočnom citometru bez bojanja Annexin V-FITC kitom, kako fluorescentni signal nanoPS ne bi bio maskiran drugim fluorescentnim biljezima. Stanice Jurkat sakupljene su u tubice Eppendorf od 2 mL i centrifugirane 5 min na $800 \times g$, nakon čega je supernatant uklonjen te su stanice re-suspendirane u 1 mL PBS-a. Zatim je ponovljen korak centrifugiranja, uklonjen je supernatant, te su stanice re-suspendirane u 400 μ L PBS-a i analizirane na protočnom citometru. Fluorescencija obilježenih nanoPS pobuđena je laserom valne duljine 488 nm, a zabilježena na detektoru s emisijskim filterom 530/30 nm. Za analizu intenziteta postranično raspršene svjetlosti korišten je laser valne duljine 488 nm za upadnu svjetlost te detektori bez emisijskih filtera postavljeni okomito na smjer zrake za sakupljanje signala. Intenzitet fluorescencije tretiranih stanica te intenzitet postranično raspršene svjetlosti uspoređeni su sa intenzitetima fluorescencije, odnosno raspršene svjetlosti netretiranih kontrola kako bi se postigla relativna kvantifikacija unosa nanoPS i nanoAg.

Stanice THP-1 su nakon završene diferencijacije tretirane s nanoPS, nanoAg i mješavinama NM u istim koncentracijama kao stanice Jurkat. Nakon 24-satne inkubacije sa nanočesticama, stanični medij iz jažica sakupljen je u Eppendorf tubice od 2 mL. Stanice su potom isprane sa PBS-om (1 mL po jažici) te tretirane Trypsin-EDTA otopinom (500 μ L po jažici) (Sigma Aldrich, SAD). Pločice su inkubirane 5 min na 37°C i 5 % CO₂ kako bi se djelovanjem Trypsin-EDTA otopine stanice odvojile od podloge. Nakon inkubacije, u jažice je dodano po 500 μ L staničnog medija (RPMI 1640 s 10 % v/v FBS i 1 % v/v Anti/anti), te je 1 mL stanične suspenzije sakupljeno iz jažica u Eppendorf tubice koje su sadržavale supernatante istih uzoraka. Uzorci su analizirani na protočno citometru Attune Nxt kako je opisano za stanice Jurkat. Dobiveni rezultati analizirani su u programu FlowJo (FlowJo LLC, SAD).

3.5 Oksidativni stres

Kako bi se utvrdilo stvaranje ROS-ova uzrokovano tretmanom s nanoPS i nanoAg te posljedičnih staničnih oštećenja, korištena su tri različita eseja: esej 2',7'-diklorofluorescein diacetat (DCFH-DA) korišten je kako bi se kvantificiralo stvaranje ROS-ova, esej monoklorobiman (mBCL) za analizu staničnog glutationa, pomoću eseja rodamin 123 (Rh123) utvrđen je integritet mitohondrijskih membrana stanica Jurkat i THP-1. Stanice Jurkat nasadene su u crne pločice sa 96 jažica (Corning, Glendale, SAD) u 100 μ L stanične suspenzije koncentracije

$1,0 \times 10^5$ st/mL, u RPMI 1640 mediju s 10 % volumnog udjela fetalnog goveđeg seruma i 1 % volumnog udjela Anti/anti. Pločice su inkubirane 24 h na 37°C i 5 % CO_2 , nakon čega su centrifugirane 5 min na $800 \times g$. Nakon centrifugiranja, supernatant je uklonjen iz jažica i na stanice su dodane otopine fluorescentnih boja u PBS-u (100 μL po jažici): 20 μM diklorofluorescein diacetat (Sigma Aldrich, Njemačka), 50 μM monoklorobiman (Fluka, Buchs, Švicarska) ili 0,1 μM rodamin 123 (Sigma Aldrich, Njemačka). Boje su inkubirane 30 min na 37°C i 5 % CO_2 , nakon čega je ponovljen korak centrifugiranja od 5 min na $800 \times g$. Supernatanti su uklonjeni iz jažica i stanicama je dodan svježi stanični medij (RPMI 1640 s 10 % volumnog udjela fetalnog goveđeg seruma i 1 % volumnog udjela Anti/anti, 90 μL po jažici), nakon čega su dodane suspenzije nanočestica. Suspenzije nanoAg su pripremljene u čistoj vodi, a suspenzije nanoPS u sterilnom PBS-u. Koncentracije suspenzija nanočestica kojima su tretirane stanice navedene su u Tablici 2. Za pozitivnu kontrolu titriran je tert-butil hidroksid (tbOH, Sigma Aldrich, Njemačka) u rasponu koncentracija od 50 μM do 0,1 μM tako da su pripremljene 10x koncentrirane vodene otopine tbOH (raspon koncentracija od 500 do 1 μM), te je 10 μL svake otopine dodano u jažice u triplicatu kako bi se postigla završna koncentracija. Stanice su tretirane 2 h na 37°C i 5 % CO_2 , nakon čega su centrifugirane 5 min na $800 \times g$ te isprane dodavanjem 100 μL sterilnog PBS-a po jažici. Nakon ponovljenog koraka centrifugiranja, stanicama je dodan svježi PBS te je fluorescencija pri ekscitacijskoj valnoj duljini od 485 nm i emisijskoj valnoj duljini od 535 nm snimljena na čitaču pločica Victor3 (Perkin Elmer, SAD).

Stanice THP-1 nasadene su u crne pločice sa 96 jažica (Corning, Glendale, SAD) u koncentraciji $1,0 \times 10^5$ st/mL, u RPMI 1640 mediju s 10 % volumnog udjela fetalnog goveđeg seruma i 1 % volumnog udjela Anti/anti, nakon čega su tretirane sa 100 nM otopinom PMA u PBS-u te inkubirane 3 dana na 37°C i 5 % CO_2 . Nakon završene diferencijacije, stanični medij je uklonjen, stanicama je dodan svježi stanični medij te su inkubirane sa otopinama fluorescentnih boja u PBS-u i tretirane nanočesticama i tbOH kako je opisano gore za stanice Jurkat. Intenzitet fluorescencije određen je pri ekscitacijskoj valnoj duljini od 485 nm i emisijskoj valnoj duljini od 535 nm na čitaču pločica Victor3 (Perkin Elmer, SAD).

Tablica 2. Koncentracije suspenzija nanočestica kojima su tretirane stanice Jurkat i THP-1 za pokuse protočne citometrije. n.p. – nanočestice nisu primjenjene u uzorku.

Uzorak	Završne koncentracije suspenzija nanočestica u jažicama (mg/L)	
	nanoPS (mg/L)	nanoAg (mg/L)
1	10	n.p.
2	100	n.p.
3	n.p.	1
4	n.p.	10
5	1	1
6	1	10
7	10	1
8	10	10

3.6 Oštećenje DNA

Kako bi se utvrdila oštećenja staničnog genoma uzrokovanog tretmanom s nanoPS i nanoAg, korišteno je protutijelo specifično za γ H2AX konjugirano sa fluorescentnom bojom Alexa Fluor 647. Esej se temelji na staničnom odgovoru na dvolančane lomove DNA, koji predstavljaju ozbiljnu opasnost za preživljenje i metabolizam stanica. Nakon stvaranja dvolančanog loma, fosforilacijom histona H2AX na Ser-139 stvara se γ H2AX koji se koristi kao osjetljiv i specifičan biljeg ovakvog oštećenja DNA (139). Stanice Jurkat i THP-1 posađene su u pločice s 12 jažica i tretirane s nanoAg, nanoPS te mješavinama nanočestica kako je opisano gore. U negativne kontrole dodano je 100 μ L sterilne vode i 100 μ L sterilnog PBS-a, a u pozitivne kontrole dodano je 100 μ L vodene otopine doksorubicina u koncentraciji 6 μ M (završna koncentracija u jažici – 0,6 μ M). Nakon inkubacije od 24 h, Jurkat stanice sakupljene su u tubice Eppendorf te centrifugirane 5 min na $800 \times g$. Supernatant sa staničnim medijem i nanočesticama je uklonjen, te su stanice re-suspendirane u 1 mL PBS-a. Nakon još jednog koraka centrifugiranja od 5 min na $800 \times g$, na stanice je dodano 200 μ L 4 % otopine formaldehida (Sigma Aldrich, Njemačka) u PBS-u te su uzorci inkubirani 10 min na sobnoj temperaturi za potpunu fiksaciju stanica. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani 5 min na $1000 \times g$ te je stanicama dodan pufer za permeabilizaciju (0,1 % Triton X-100 u PBS-u, 200 μ L po uzorku; Triton X-100 nabavljen je od Sigma Aldrich, Njemačka). Uzorci su inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi. Pripremljen je pufer za bojanje, koji se

sastojao od 0,5 % otopine albumina iz goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*, BSA, kupljeno od Sigm Aldrich, Njemačka) i 2 mM EDTA (Sigma Aldrich, Njemačka) u PBS-u. Nakon inkubacije, u svaku je tubicu dodano 1 mL pufera za bojanje, nakon čega su uzorci centrifugirani 5 min na $1000 \times g$. Supernatant je nakon centrifugiranja uklonjen, a uzorci su re-suspendirani u 100 μ L pufera za bojanje, nakon čega je u svaki uzorak dodano 5 μ L Alexa Fluor 647 anti-H2AX protutijela (BD Biosciences, Franklin Lakes, SAD). Uzorci su inkubirani 60 min u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, uzorcima je dodano 500 μ L pufera za bojanje, nakon čega su analizirani na protočnom citometru Attune NxT (Thermo Fisher Scientific, SAD). Fluorescencija boje Alexa Fluor 647 pobuđena je laserskom zrakom valne duljine 638 nm, a zabilježena na detektoru s emisijskim filterom 670/14 nm. Dobiveni rezultati analizirani su u programu FlowJo (FlowJo LLC, SAD).

3.7 Unos i lokalizacija nanočestica – konfokalna mikroskopija

Konfokalna mikroskopija korištena je kako bi se vizualizirao unos nanočestica u stanice i njihova lokalizacija. Unos nanoAg vizualiziran je tehnikom reflektirajućeg kontrastiranja, kod koje su vidljive čestice koje intenzivno reflektiraju upadnu svjetlost (140). Stanične strukture obilježene su fluorescentnim biljezima – Hoechst za bojanje jezgre i tetrametilrodamin (TRITC) kovalentno vezan na protutijelo za aktin za obilježavanje citoskeleta. Ovi su fluorofori odabrani kako ne bi ometali fluorescentni signal nanoPS. U pločice sa 12 jažica postavljena su pokrovna stakalca prethodno sterilizirana 2 h na 120 °C. U pločice predviđene za stanice Jurkat u jažice sa pokrovnim stakalcima dodano je 1 mL 1 %-tne otopine poli-L-lizina (Sigma Aldrich, Njemačka) u sterilnom PBS-u. Te su pločice inkubirane 2 h na 37°C i 5 % CO₂, nakon čega su jažice isprane 2 puta sa 1 mL sterilnog PBS-a. Nakon ispiranja, jažice i stakalca osušena su na zraku. Stanice Jurkat nasadene su u pripremljene pločice u staničnom mediju RPMI 1640 sa 10 %-tnim volumnim udjelom FBS-a i 1 %-tnim volumnim udjelom Anti/anti. U svaku jažicu nasadeno je 10 000 stanica. Stanice su inkubirane 24 h na 37°C i 5 % CO₂. Nakon inkubacije, medij je uklonjen iz petrijevih posuda te je dodano 1,8 mL svježeg staničnog medija. Suspenzije nanoAg pripremljene su u sterilnoj vodi, a suspenzije fluorescentno obilježenih nanoPS u sterilnom PBS-u. Testirane su koncentracije 1 mg/L za nanoAg, 10 mg/L za nanoPS, te kombinacija tih dvaju koncentracija. Pločice su inkubirane 24 h na 37°C i 5 % CO₂, nakon čega je stanični medij uklonjen iz pločica, a jažice su isprane 2 puta sa 1 mL sterilnog PBS-a. Nakon ispiranja, stanice su tretirane 5 min sa 500 μ L hladnog metanola

(-20 °C, Kemika, Hrvatska). Metanol je zatim uklonjen, stanice su ponovno isprane sa 1 mL sterilnog PBS-a, nakon čega je u jažice dodano 500 µL 0,1 %-tne otopine Triton X-100 u sterilnom PBS-u. Pločice su inkubirane 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, postupak ispiranja je ponovljen te je u jažice dodano 100 µL otopine faloidin-tetrametil rodamin B izotiocijanata (faloidin-TRITC, Sigma Aldrich, SAD) koncentracije 1 µg/mL, pripremljene u 0,1 %-tnoj otopini Tritona X-100 u PBS-u. Pločice su inkubirane s bojom 20 min na sobnoj temperaturi te je nakon inkubacije ponovljen postupak ispiranja PBS-om. Zatim je na stanice dodana otopina boje Hoechst (Thermo Fisher Scientific, SAD) pripremljena u PBS-u (koncentracija 10 µg/mL) te su pločice inkubirane 15 min na sobnoj temperaturi. U sljedećem koraku, jažice su ponovno isprane PBS-om, pokrovna stakalca u jažicama su osušena na zraku te su prebačena na predmetna stakalca. Uzorci su snimljeni na konfokalnom mikroskopu Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems, Wetzlar, Njemačka). Za detekciju fluorescentno obilježenih nanoPS korištena je ekscitacijska valna duljina od 488 nm sa detekcijskim filterom raspona 500 do 550 nm, za detekciju boje Hoechst korištena je ekscitacija na 405 nm i detekcija u rasponu 430 do 550 nm, a za detekciju fluorescencije boje TRITC korištena je ekscitacija na valnoj duljini od 543 nm te detekcijski raspon od 570 do 700 nm. Za vizualizaciju nanoAg korišten je refleksijski način rada konfokalnog mikroskopa (engl. *reflectance mode*) koji omogućuje detekciju svjetlosti raspršene na uzorku. Ova je metoda posebno prikladna za uzorke koji jako raspršuju upadnu svjetlost kao što su nanočestice metala (141).

Stanice THP-1 nasađene su u pločice sa 12 jažica u kojima su postavljena pokrovna stakalca prethodno sterilizirana 2 h na 120 °C. Stanice su nasađene u staničnom mediju RPMI 1640 sa 10 %-tnim volumnim udjelom FBS-a i 1 %-tnim volumnim udjelom Anti/anti. U svaku jažicu nasađeno je 10 000 stanica. Stanice su inkubirane 24 h na 37°C i 5 % CO₂. Nakon inkubacije, medij je uklonjen iz petrijevih posuda te je dodano 1,8 mL svježeg staničnog medija. Stanice su zatim tretirane nanočesticama i pripremljene za analizu na konfokalnom mikroskopu kako je opisano za stanice Jurkat.

3.8 Ekspresija pro-upalnih citokina – kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Ekspresija gena povezanih sa upalnim odgovorom utvrđena je kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *quantitative real time polymerase chain reaction*, qRT-PCR). Ovom metodom moguće je utvrditi promjene u razini ekspresije gena putem ekstrakcije glasničke RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA), prepisivanjem RNA u DNA pomoću reverzne transkriptaze, te umnažanjem ciljnih molekula DNA pomoću specifičnih početnica. Odabirom prikladnih početnica moguće je analizirati promjene u ekspresiji ciljnih gena, što su u ovoj disertaciji bili geni za citokine IL-6, IL-8, IL-1 β , IL-2, TNF α , CD11b i GAPDH kao referentni gen. Stanice Jurkat nasadene su u pločice sa 96 jažica (Eppendorf, Njemačka) u staničnom mediju (RPMI 1640 sa 10 % volumnog udjela FBS-a i 1 % volumnog udjela Anti/anti) u koncentraciji od $1,1 \times 10^5$ st/mL (90 μ L stanične suspenzije po jažici). Stanice su tretirane pojedinačnim nanočesticama ili mješavinama nanoAg i nanoPS. Koncentracije suspenzija nanočestica korištenih za tretman stanica navedene su u Tablici 3. Stanicama negativne kontrole dodano je 10 μ L sterilne vode i 10 μ L sterilnog PBS-a. U pozitivnu kontrolu za stanice Jurkat dodano je 10 μ L vodene otopine fitohemaglutinina (PHA, Sigma Aldrich, Njemačka) u koncentraciji od 50 mg/L tako da je postignuta završna koncentracija od 5 mg/L, dok je u pozitivnu kontrolu za stanice THP-1 dodano 10 μ L vodene otopine LPS-a (Sigma Aldrich, Njemačka) u koncentraciji od 10 mg/L za završnu koncentraciju 1 mg/L. Pločice su inkubirane 2 h na 37°C i 5 % CO₂. Nakon inkubacije, pločice su centrifugirane 5 min na 800 x g, supernatanti su uklonjeni te je u jažice dodano 200 μ L PBS-a i ponovljen je postupak centrifugiranja. Zatim je PBS uklonjen iz jažica, a ukupna stanična RNA izolirana je pomoću Aurum Total RNA Mini kita (BioRad, SAD) prema uputama proizvođača. U jažice je dodano 100 μ L pufera za razgradnju stanica (engl. *lysis solution*, komponenta Total RNA Mini kita), nakon čega je dodano 100 μ L 70 %-tnog etanola (Kemika, Hrvatska). Nakon temeljitog miješanja, dobivenih 300 μ L je prebačeno iz jažica na kolone za izolaciju RNA (komponente kita). Kolone su centrifugirane 1 min na 12 000 x g, nakon čega je u svaku kolonu dodano 700 μ L otopine za ispiranje (engl. *low stringency wash solution*, komponenta kita). Uzorci su ponovno centrifugirani 1 min na 12 000 x g. Nakon centrifugiranja, na kolone je dodana otopina DNaze I (komponenta kita) te su uzorci inkubirani 15 min na sobnoj temperaturi kako bi se uklonili zaostaci genomske DNA. Na kolone je zatim dodano 700 μ L druge otopine za ispiranje (engl. *high*

stringency wash solution, komponenta kita) te su uzorci centrifugirani 1 min na $12\,000 \times g$. Kolone su zatim ponovno isprane prvom otopinom za ispiranje (*low stringency*) i centrifugirane 3 min na $12\,000 \times g$. RNA je naposljetku eluirana s kolona dodavanjem 50 μL sterilne vode tretirane dietil pirokarbonatom (DEPC, Sigma Aldrich, SAD) i centrifugiranjem 1 min na $12\,000 \times g$. Izolirane RNA iz uzoraka pohranjene su na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Stanice THP-1 nasadene su u pločice sa 96-jažica u 90 μL stanične suspenzije (koncentracija stanica $1,1 \times 10^5$ st/mL) u RPMI 1640 mediju sa 10 % volumnog udjela fetalnog goveđeg seruma i 1 % volumnog udjela Anti/anti. U jažice je zatim dodano 10 μL otopine PMA koncentracije 1 μM u staničnom mediju (završna koncentracija na stanicama – 100 nM), nakon čega su inkubirane 3 dana na 37°C i 5 % CO_2 . Nakon diferencijacije, medij je uklonjen iz jažica, dodan je svjež stanični medij te su stanice tretirane kako je opisano za stanice Jurkat.

Tablica 3. Koncentracije suspenzija nanočestica kojima su tretirane stanice Jurkat i THP-1 za pokuse protočne citometrije. n.p. – nanočestice nisu primjenjene u uzorku.

Uzorak	Završne koncentracije suspenzija nanočestica u jažicama (mg/L)	
	nanoPS (mg/L)	nanoAg (mg/L)
1	1	n.p.
2	5	n.p.
3	10	n.p.
4	n.p.	1
5	n.p.	5
6	n.p.	10
7	1	1
8	1	5
9	1	10
10	5	1
11	5	5
12	5	10
13	10	1
14	10	5
15	10	10

Uzorci RNA prepisani su u komplementarnu DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) pomoću High Capacity cDNA Reverse Transcription kita (Applied Biosystems, Waltham, SAD). Za svaku reakciju reverzne transkripcije u tubice Eppendorf od 1,5 mL (Eppendorf, Njemačka) dodano je 2 µL RT Buffer otopine, 2 µL RT Random primers otopine, 0,8 µL dNTP Mix otopine, 1 µL MultiScribe reverzne transkriptaze, 5 µL uzorka RNA i 9,2 µL vode tretirane DEPC-om. Za negativnu kontrolu korištena je reakcijska smjesa u kojoj su dodane sve komponente osim uzorka RNA (volumen vode je povećan sa 9,2 µL na 14,2 µL kako bi reakcijski volumen ostao isti). Reakcija je provedena u 3 koraka: inkubacija uzoraka 10 min na 25°C, inkubacija 120 min na 37°C, te inkubacija 5 min na 85°C, nakon čega su dobivene cDNA pohranjene na +4°C.

Uzorci cDNA razrijeđeni su dodavanjem 100 µL sterilne vode. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) provedena je na uređaju Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD) korištenjem SYBR Green kao fluorescentne boje za kvantifikaciju umnažanja ciljnih gena. Reakcijske smjese pripremljene su u Eppendorf twin.tec PCR pločicama (Eppendorf, Njemačka) dodavanjem 0,4 µL *forward* početnice, 0,4 µL *reverse* početnice, 10 µL iTaq Universal SYBR Green Supermix reagensa (BioRad, SAD), 5 µL uzorka cDNA i 4,2 µL sterilne vode. Kao negativna kontrola korištena je reakcijska smjesa sa svim komponentama osim uzorka cDNA (volumen vode je povećan sa 4,2 µL na 9,2 µL kako bi reakcijski volumen ostao isti). Također, negativna kontrola reverzne transkripcije korištena je u qPCR reakciji kako bi se potvrdilo da RNA uzorci nisu bili kontaminirani zaostalom genomskom DNA. Sljedovi korištenih početnica prikazane su u Tablici 4. Kao referentni gen korišten je gen za gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH). Reakcija je provedena korištenjem sljedećeg programa: 10 min na 95 °C te 40 ciklusa amplifikacije sastavljeni od 15 s na 95 °C i 60 s na 60 °C.

Tablica 4. Sljedovi početnica korištene za qPCR analizu ekspresije gena

GAPDH	uzvodna	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC
	nizvodna	CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA
IL-6	uzvodna	CCCCCAGGAGAAGATTCCA
	nizvodna	TCAATTCGTTCTGAAGAGGTGAGT
IL-8	uzvodna	CTGGCCGTGGCTCTCTTG
	nizvodna	CCTTGGCAAAACTGCACCTT
IL-2	uzvodna	GAATGGAATTAATAATTACAAGAATC
	nizvodna	ATGTTGTTTCAGATCCCTTTAGTTCCAGA
TNF α	uzvodna	GGAGAAGGGTGACCGACTCA
	nizvodna	TGCCCAGACTCGGCAAAG
IL-1 β	uzvodna	CACGATGCACCTGTACGATCA
	nizvodna	CAGACATCACCAAGCTTTTTTGC
CD11b	uzvodna	AGATTGTGTTTTGAGGTTTC
	nizvodna	TGTGTATGTGTGGTGTGTGT

3.9 Analiza mehaničkih svojstava stanica – atomska mikroskopija sila (AFM)

Atomska mikroskopija sila (engl. *Atomic force microscopy*, AFM) korištena je za vizualizaciju nanočestica i analizu razdiobe njihovih veličina, te za analizu mehaničkih svojstava stanica, prvenstveno Youngova modula, koji služi za kvantifikaciju čvrstoće i elastičnosti materijala. Metoda se zasniva na pretraživanju površine stanica pomoću kemijski inertnog vrška pričvršćenog na vrlo osjetljivu polugu. Pomoću laserskog snopa usmjerenog na polugu i detektora za reflektiranu zraku, prate se pomaci vrška koji prelazi površinu na koju su vezane nanočestice, ili površinu stanica. Ovom metodom mogu se utvrditi karakteristike vanjske strane stanične membrane i kvantificirati jakost interakcija između AFM vrška i membrane te na taj način pratiti promjene citoskeleta uzrokovanih nanočesticama bez specifičnog obilježavanja staničnih komponenti.

Za vizualizaciju nanoAg i nanoPS, pripremljena je površina za adheziju nanočestica tako da je na tinjac dodano 1 mL otopine poli-L-lizina (Sigma Aldrich, Njemačka) u vodi (0,1 % maseni

udio poli-L-lizina) koja je potom inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi. Otopina poli-L-lizina je zatim uklonjena, tinjac je ispran s destiliranom vodom i osušen na zraku na sobnoj temperaturi. Suspenzije oba tipa nanočestica u koncentraciji od 1 mg/L nanosene su na tinjac i inkubirane 10 minuta na zraku na sobnoj temperaturi. Topografija površine s nanočesticama analizirana je na Nanowizard IV sustavu (JPK/Bruker, Berlin, Njemačka) postavljenom na invertni optički fluorescentni mikroskop IX73 (Olympus, Tokyo, Japan), korištenjem prethodno kalibrirane TSPA-V2 sonde (JPK/Bruker, Njemačka). Snimljena je površina veličine $4 \times 4 \mu\text{m}$ rezolucije 1024 piksela po liniji.

U petrijeve posude Fluorodish promjera 35 mm (World Precision Instruments, SAD) dodano je 1 mL 1 %-tne otopine poli-L-lizina u sterilnom PBS-u. Petrijeve posude inkubirane su 2 h na 37 °C i 5 % CO₂, nakon čega su isprane 2 puta sterilnim PBS-om i osušene na zraku. Stanice Jurkat nasadene su u pripremljene Fluorodish posude u staničnom mediju RPMI 1640 sa 10 %-tnim volumnim udjelom FBS-a i 1 %-tnim volumnim udjelom Anti/anti. U svaku petrijevu posudu nasadeno je 100 000 stanica. Stanice su inkubirane 24 h na 37°C i 5 % CO₂. Nakon inkubacije, medij je uklonjen iz petrijevih posuda te je dodano 1,8 mL svježeg staničnog medija. Pripremljene su suspenzije nanoAg u sterilnoj vodi, i nanoPS u sterilnom PBS-u te mješavina nanoAg/nanoPS. Stanice su tretirane s 1 mg/L nanoAg, 10 mg/L nanoPS, te mješavinom istih koncentracija. U negativne kontrole dodano je 100 µL sterilne vode i 100 µL sterilnog PBS-a. Stanice su inkubirane 24 h na 37°C i 5 % CO₂. Nakon inkubacije, medij s nanočesticama uklonjen je iz petrijevih posuda te su stanice isprane 4 puta sterilnim PBS-om. 2 mL PBS-a je zatim dodano u petrijeve posude kao medij za AFM analizu. Pokusi spektroskopije sile napravljeni su na 37°C unutar 2 h nakon što su stanice izvađene iz inkubatora. AFM sonda PFQNM-LC-A-CAL (Bruker, Billerica, SAD) inkubirane su 30 min u 0,01 % vodenoj otopini polimera Pluronic F-127 (Sigma Aldrich, SAD), nakon čega je dvaput isprana sterilnom vodom i osušena na zraku. Spektroskopska mjerenja sile provedena su na Nanowizard IV sustavu (JPK/Bruker, Berlin, Njemačka) postavljenom na invertni optički fluorescentni mikroskop IX73 (Olympus, Tokyo, Japan). Krivulje sile prikupljene su iznad jezgri 25 različitih stanica u svakom uzorku te je Young modul (E) izračunat iz dobivenih krivulja pomoću Hertzovog modela.

Stanice THP-1 nasadene su u petrijeve posude promjera 35 mm (Fluorodish, WPI, SAD) u staničnom mediju RPMI 1640 sa 10 %-tnim volumnim udjelom FBS-a i 1 %-tnim volumnim

udjelom Anti/anti. U svaku petrijevu posudu nasadeno je 100 000 stanica. Stanice su diferencirane tri dana tretmanom sa 100 nM PMA i inkubacijom na 37°C i 5 % CO₂, kako je opisano gore. Nakon diferencijacije, medij je uklonjen iz petrijevih posuda te je dodano 1,8 mL svježeg staničnog medija. Stanice su zatim tretirane nanočesticama kako je opisano za stanice Jurkat te su analizirane pomoću Nanowizard IV sustava kako je opisano gore.

3.10 Statistička obrada rezultata

Udjeli živih i mrtvih stanica te stanica u apoptozi utvrđenih analizom na protočnom citometru izraženi su kao postotci od ukupnog broja stanica u uzorku. Iz tri neovisna ponovljena pokusa izračunata je aritmetička sredina i standardna devijacija postotaka mrtvih, živih i apoptotičnih stanica za svaki pojedini tretman. Za analizu DNA oštećenja dobiven je postotak γ H2AX+ stanica, te je također izračunata srednja vrijednost i standardna devijacija za svaki tretman iz tri neovisna pokusa. Te su vrijednosti korištene za analizu varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA) s Dunnettovim post-testom, kako bi se utvrdilo postoje li značajne razlike između kontrolnih stanica i stanica tretiranih nanočesticama (određen je prag statističke značajnosti $p < 0,05$).

Za analizu rezultata eseja oksidativnog stresa, vrijednosti fluorescencije slijepih proba oduzete su od očitane fluorescencije za stanične uzorke. Zatim, fluorescentni signal uzoraka tretiranih nanočesticama izražen je u odnosu na netretirane kontrolne stanice koristeći jednadžbu: relativna fluorescencija = (vrijednost fluorescencije uzorka/srednja vrijednost fluorescencije kontrolnih stanica)*100 %. Izračunata je aritmetička sredina i standardna devijacija relativnih fluorescencija triplikata za svaki pojedini tretman. Te su vrijednosti korištene za daljnju statističku analizu pomoću testa ANOVA i Dunnettovog post-testa ($p < 0,05$).

Promjene u razini ekspresije gena analizirane metodom qRT-PCR kvantificirane su $2^{\Delta\Delta C_q}$ metodom (142). Prvi korak je računanje ΔC_q vrijednosti pomoću jednadžbe $\Delta C_q = C_q \text{ vrijednost ciljnog gena} - C_q \text{ vrijednost referentnog gena}$ u istom uzorku. Zatim je izračunata srednja vrijednost ΔC_q za kontrolne uzorke, nakon čega je dobivena $\Delta\Delta C_q$ vrijednost uzoraka pomoću jednadžbe $\Delta\Delta C_q = \Delta C_q \text{ vrijednost uzorka} - \text{srednja } \Delta C_q \text{ vrijednost kontrolnih stanica}$. Naposljetku, izračunata je vrijednost $2^{-\Delta\Delta C_q}$ za sve uzorke pomoću koje su se promjene u ekspresiji ciljnih gena izrazile u odnosu na kontrolne stanice ($2^{-\Delta\Delta C_q} = 1$ – nema promjene u ekspresiji gena u odnosu na

kontrole; $2^{-\Delta\Delta Cq} > 1$ – ekspresija gena je povećana u odnosu na kontrole; $2^{-\Delta\Delta Cq} < 1$ – ekspresija gena je smanjena u odnosu na kontrole).

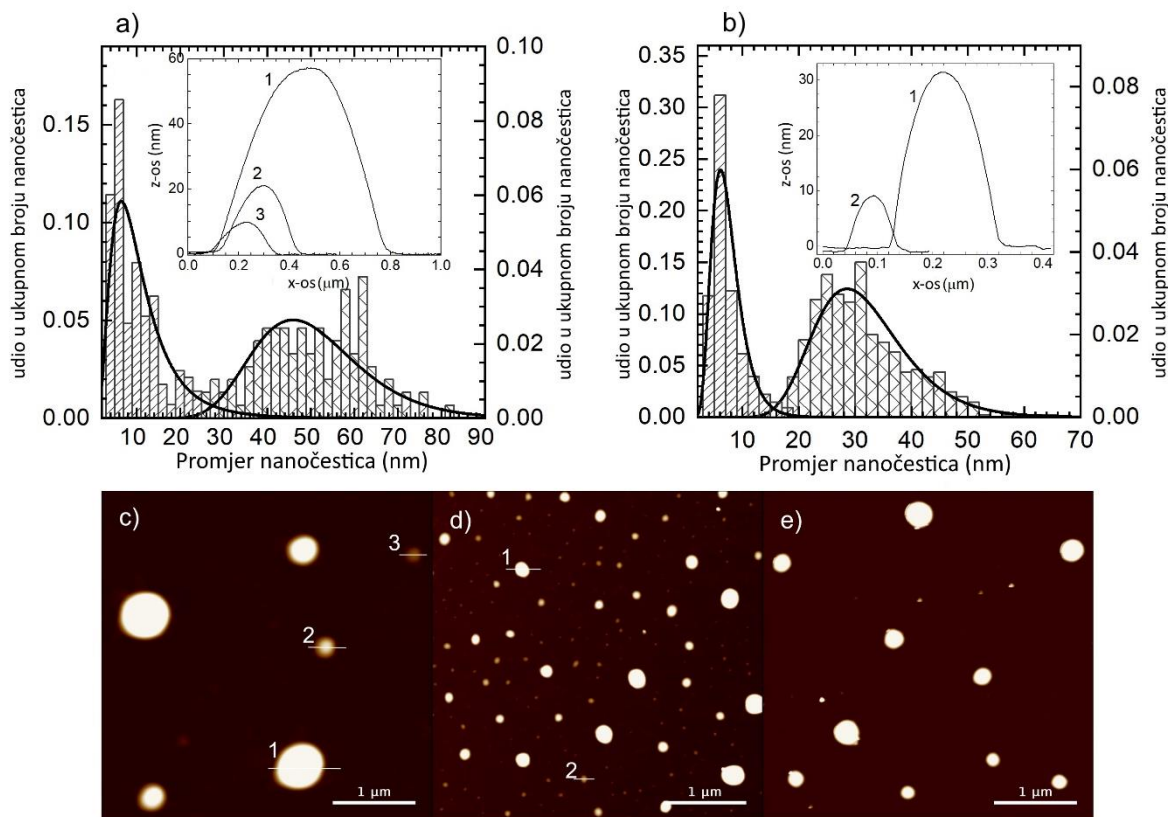
Izračunata je aritmetička sredina i standardna devijacija $2^{-\Delta\Delta Cq}$ vrijednosti triplikata za svaki pojedini tretman za provedbu daljnje statističke analize. Rezultati tretmana stanica nanočesticama uspoređeni su s kontrolnim stanicama pomoću testa ANOVA i Dunnettovog post-testa ($p < 0,05$).

Za metodu atomske mikroskopije sila, vrijednosti Youngovog modula (E) dobivene su iz krivulja sila primjenom Hertzovog modela. Distribucija vrijednosti E ispitana je D'Agostino-Pearson testom, nakon čega su izračunate vrijednosti $\log E$ kako bi se postigla normalna distribucija rezultata koja je podobna za ANOVA analizu s Dunnettovim post-testom ($p < 0,05$).

4. REZULTATI

4.1 Sinteza i karakterizacija nanočestica

Oblik i veličina nanoAg i nanoPS utvrđeni su metodom AFM, a hidrodinamički promjer i ζ potencijal nanoAg i nanoPS analizirani su metodama DLS i ELS (Slika 7, Tablica 5). Za oba tipa nanočestica utvrđen je sferičan oblik, a analiza veličine nanočestica pokazala je široku razdiobu promjera nanoAg i nanoPS (Slika 7). Također je pokazano da nanočestice nisu stupale u međusobne interakcije niti stvarale agregate (Slika 7). Hidrodinamički promjer nanočestica u čistoj vodi bio je $72,1 \pm 7,3$ nm za nanoAg te $19,4 \pm 0,5$ nm za nanoPS (Tablica 5). Utvrđen je sličan, negativan ζ potencijal za oba tipa nanočestica u vodi: $-35,9 \pm 4,5$ mV za nanoAg i $-39,7 \pm 10,8$ mV za nanoPS (Tablica 5). Stanični medij RPMI 1640 promijenio je stupanj agregacije nanočestica te je za nanoAg u RPMI 1640 mediju utvrđeno postojanje agregata veličine $881,5 \pm 130,4$ nm, u kojima su sadržane ukupne nanočestice uzorka. Za nanoPS u istom mediju dokazano je postojanje tri različite populacije agregata (Tablica 5). Oba tipa nanočestica pokazala su smanjenu apsolutnu vrijednost ζ potencijala u RPMI 1640 mediju – potencijal nanoAg smanjen je na $-9,3 \pm 0,3$ mV, a potencijal nanoPS na $-22,9 \pm 2,3$ mV. U mediju RPMI 1640 dopunjenom sa 10 % volumnog udjela FBS-a, zabilježen je manji stupanj agregacije nanoAg i nanoPS zbog stvaranja proteinske korone koja je stabilizirala pojedinačne nanočestice (Tablica 5). Također, u uzorku mješavine nanočestica utvrđene su dvije populacije koje hidrodinamičkim promjerom odgovaraju nanoAg, odnosno nanoPS (Tablica 5). Izmjereni ζ potencijal za sva tri uzorka – nanoAg, nanoPS i njihovu mješavinu – bio je između $-9,7$ i $-9,2$ mV (Tablica 5). Ovaj rezultat potvrđuje stvaranje proteinske korone oko nanoAg i nanoPS koja je bila vrlo slična sastavom i nabojem, obzirom na proteinske komponente prisutne u FBS-u.



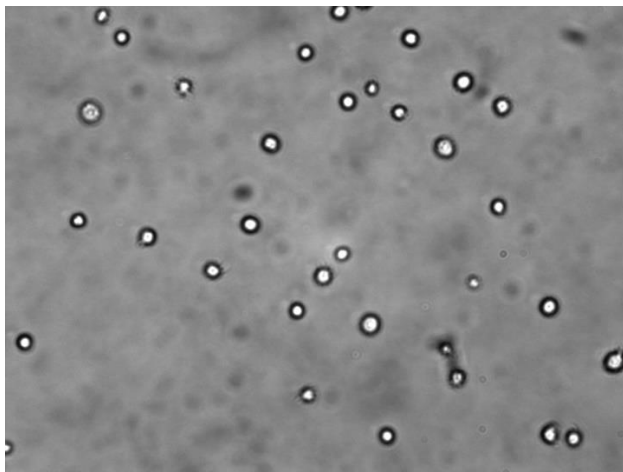
Slika 7. Distribucija veličina nanoAg i nanoPS dobivenih AFM analizom. Veličina nanočestica prikazana je u nanometrima, a broj nanočestica s određenim promjerom prikazan je preko njihovog udjela u ukupnom broju analiziranih nanočestica. Gornji red - a) distribucija veličina nanoAg; b) distribucija veličina nanoPS. Donji red – AFM slike nanočestica: c) nanoAg, d) nanoPS, e) mješavina nanoPS i nanoAg.

Tablica 5. Hidrodinamički promjer (d_H) i ζ potencijal za 10 mg/L nanoAg, 10 mg/L nanoPS i 1:1 mješavinu oba tipa nanočestica (koncentracija nanoAg i nanoPS – 10 mg/L). Mjerenja su provedena nakon 24-satne inkubacije na 37°C u različitim medijima – vodi, RPMI 1640 i RPMI 1640 dopunjen sa FBS-om u 10 %-tnom volumnom udjelu. Svi podaci prikazani su kao srednje vrijednosti $\pm$ standardna devijacija.

Tip nanočestice	Parametar	Medij		
		Voda	RPMI 1640	RPMI 1640 + 10% FBS
nanoAg	d_H (nm)	72,1 $\pm$ 7,3 (100 %)	881,5 $\pm$ 130,4	119,2 $\pm$ 4,0
	(% populacije)		(100 %)	(100 %)
	ζ potencijal (mV)	-35,9 $\pm$ 4,5	-9,3 $\pm$ 0,3	-9,7 $\pm$ 0,2
nanoPS	d_H (nm)	19,4 $\pm$ 0,5 (100 %)	46,5 $\pm$ 29,5 (45 %)	18,5 $\pm$ 3,5 (100 %)
	(% populacije)		162,4 $\pm$ 51,8 (21 %) 674,3 $\pm$ 183,4 (34 %)	
	ζ potencijal (mV)	-39,7 $\pm$ 10,8	-22,9 $\pm$ 2,3	-9,3 $\pm$ 0,9
nanoAg/ nanoPS	d_H (nm)	65,7 $\pm$ 7,8 (88 %)	912,7 $\pm$ 86,6 (80 %)	119,5 $\pm$ 1,4
	(% populacije)	18,9 $\pm$ 4,0 (12 %)	139,7 $\pm$ 0,0 (20 %)	(82 %) 21,0 $\pm$ 2,4 (18 %)
	ζ potencijal (mV)	-29,0 $\pm$ 0,5	-13,1 $\pm$ 0,7	-9,2 $\pm$ 0,5

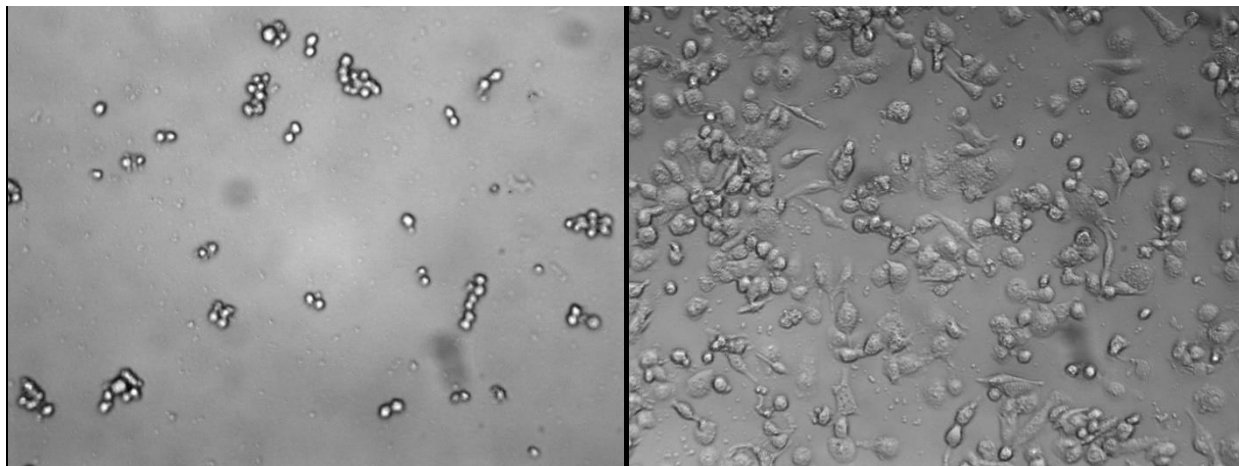
4.2 Stanična kultura i diferencijacija stanica THP-1 iz monocita u makrofage

Stanice Jurkat (Slika 8) pokazale su dobru vijabilnost u odabranom staničnom mediju i mjerljivu promjenu biljega vijabilnosti, oksidativnog stresa i upale nakon tretmana nanoAg i nanoPS.



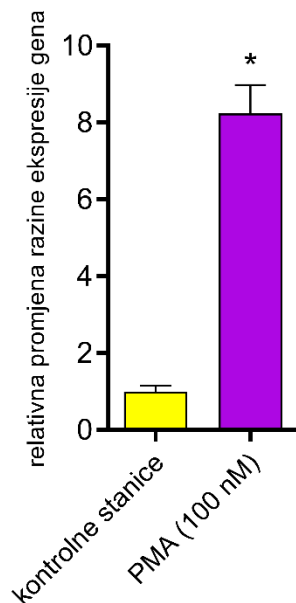
Slika 8. Stanice Jurkat snimljene na Olympus CXK41 mikroskopu pod povećanjem od 200×.

Stanice THP-1 su prije tretmana nanoAg i nanoPS inkubirane 3 dana u staničnom mediju s 100 nM PMA na 37°C i 5 % CO₂, te nakon toga dodatnih 5 dana u staničnom mediju bez PMA, također na 37°C i 5 % CO₂, kako bi se potaknula diferencijacija stanica iz monocita u makrofage. Uspješnost diferencijacije potvrđena je na invertnom mikroskopu, obzirom da stanice THP-1 diferencirane u makrofage prelaze iz suspenzijskog tipa stanica u adherentni tip stanica (Slika 9).



Slika 9. Stanice THP-1 snimljene na Olympus CXK41 mikroskopu pod povećanjem od 200x. Lijevo – nediferencirane stanice THP-1 monocitnog fenotipa. Desno – stanice THP-1 diferencirane u makrofage pomoću 100 nM PMA.

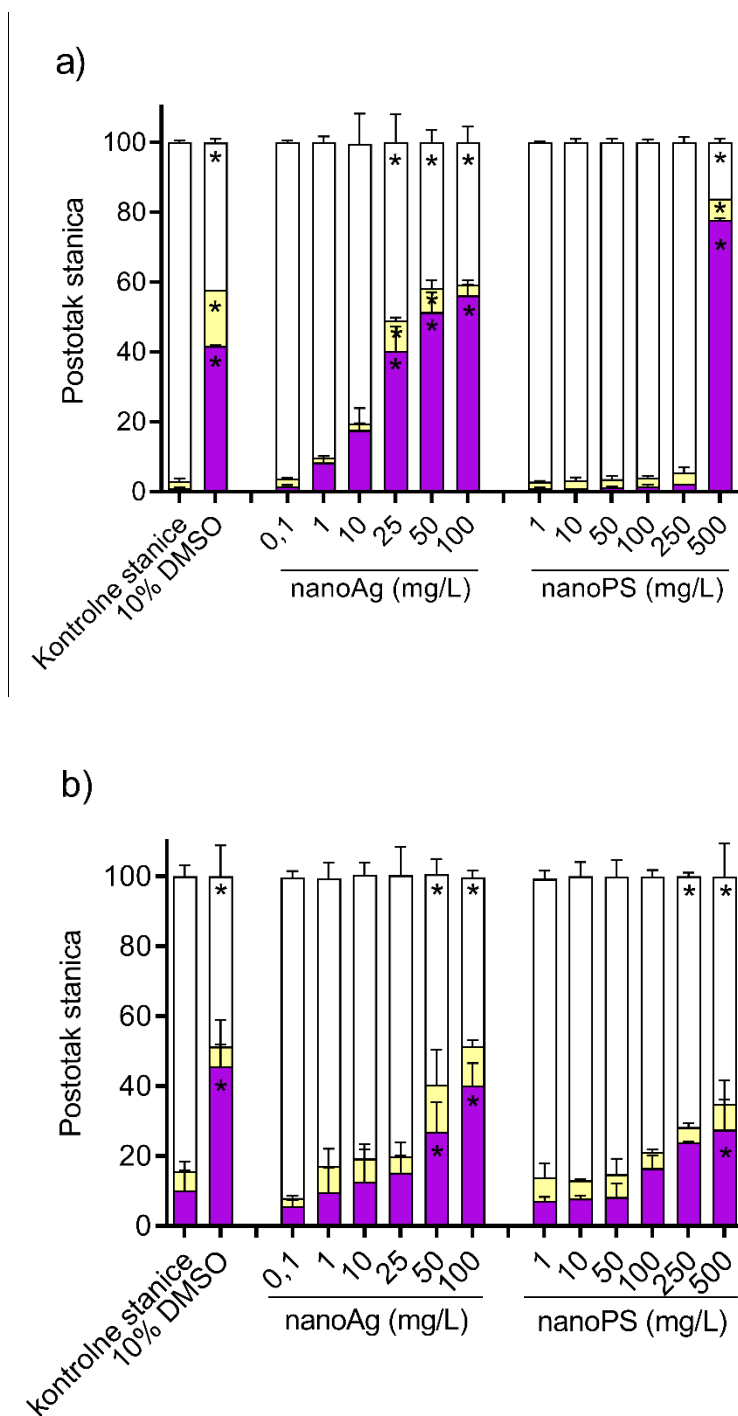
Uspješnost diferencijacije stanica THP-1 u makrofage dodatno je potvrđena analizom ekspresije površinskog biljega CD11b metodom qRT-PCR, koji je specifičan za staničnu membranu makrofaga (Slika 10).



Slika 10. Rezultati analize ekspresije CD11b u stanicama THP-1 nakon tretmana 100 nM PMA tijekom 3 dana na 37°C i 5 % CO₂. Promjena u ekspresiji gena izražena je u odnosu na kontrolne stanice, a kvantificirana je metodom $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

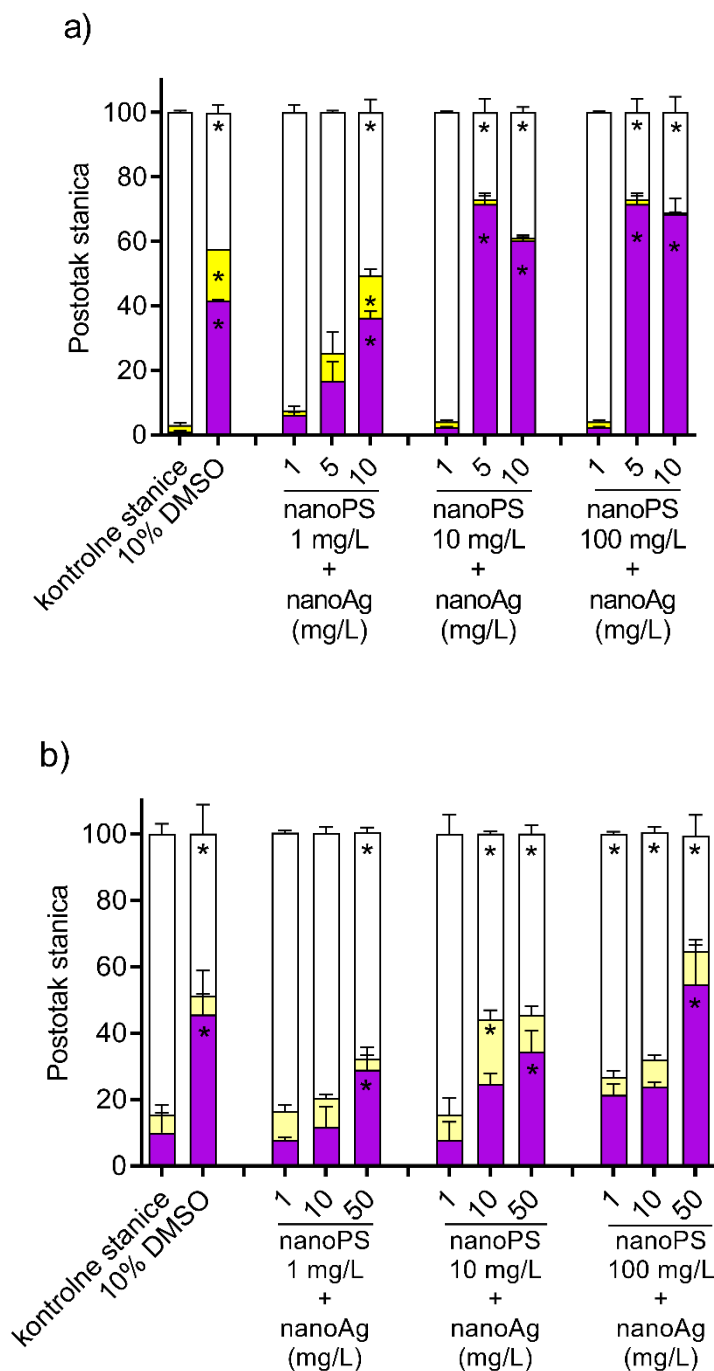
4.3 Stanično preživljenje i pokretanje apoptoze – protočna citometrija

Tretman stanica Jurkat i THP-1 nanočesticama srebra i polistirena proveden je kroz 24 h kako bi se utvrdio njihov utjecaj na stanično preživljenje i pokretanje apoptoze. Nanočestice srebra značajno su smanjile postotak živih stanica i povećale postotak nekrotičnih (mrtvih) stanica već pri koncentraciji od 25 mg/L za stanice Jurkat (40,2 %) i 50 mg/L za stanice THP-1 (27,0 %). S druge strane, nanoPS su značajno smanjile stanično preživljenje tek pri koncentraciji od 500 mg/L (77,7 % nekrotičnih stanica za stanice Jurkat, 27,5 % nekrotičnih za stanice THP-1) (Slika 11).



Slika 11. Rezultati protočne citometrije za analizu staničnog preživljenja i pokretanja apoptoze a) stanica Jurkat i b) stanica THP-1 nakon tretmana nanoAg i nanoPS tijekom 24 h na 37°C i 5 % CO₂. Ljubičasto – stanice u kasnoj apoptozi/nekrotične stanice, žuto – stanice u ranoj apoptozi, bijelo – žive stanice. Rezultati koji se statistički značajno razlikuju od kontrolnih stanica ($p < 0,05$) označeni su zvjezdicom (*).

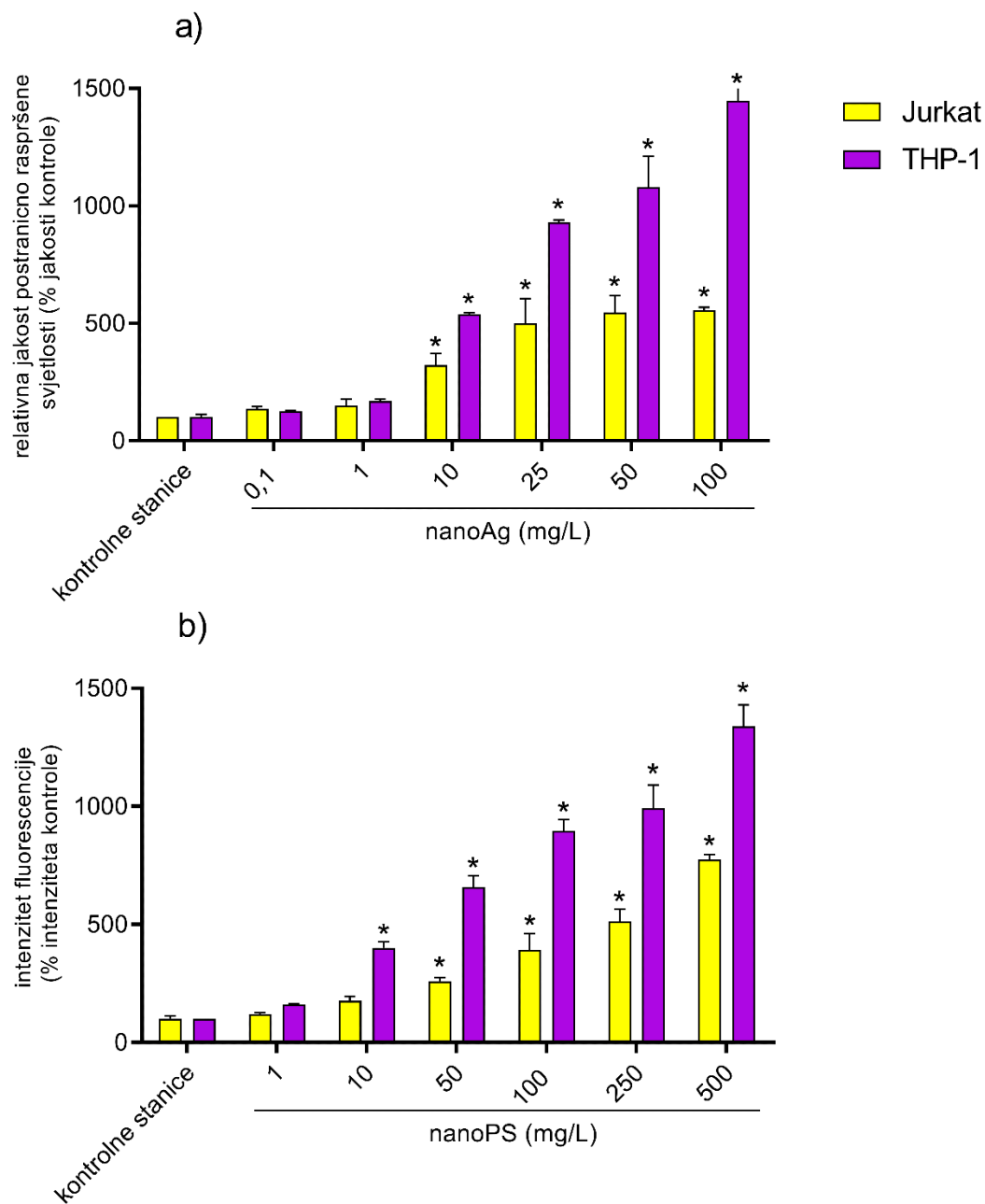
Nakon utvrđivanja toksičnih koncentracija nanoAg i nanoPS, odabrane su koncentracije NM za pripremu njihovih mješavina, kako bi se utvrdilo je li njihov zajednički učinak različit u odnosu na primjenu pojedinačnog tipa nanočestica. Postotak mrtvih stanica nakon miješanog tretmana stanica Jurkat bio je veći nego što bi se moglo pripisati individualnom učinku svakog tipa nanočestica. Tretman s nanoAg u koncentraciji 10 mg/L rezultirao je sa 17,6 % nekrotičnih stanica (79,9 % živih stanica), tretman sa 10 mg/L nanoPS izazvalo je staničnu smrt 1,1 % stanica (96,8 % živih stanica), dok je nakon tretmana mješavinom nanočestica u ovim koncentracijama u uzorku bilo 71,5 % mrtvih stanica (26,8 % živih stanica) (Slika 12). Slično uvećanje postotka mrtvih stanica nakon miješanog tretmana u odnosu na pojedinačne nanočestice dobiveno je i za ostale miješane tretmane većim koncentracijama nanočestica. Tretman stanica Jurkat mješavinom 10 mg/L nanoAg sa 100 mg/L nanoPS rezultirao je s 71,5 % nekrotičnih stanica (26,8 % vijabilnih stanica u istom uzorku), a tretman mješavinom 50 mg/L nanoAg i 100 mg/L nanoPS uzrokovao je smrt 68,3 % stanica (31,1 % vijabilnih stanica) (Slika 12). Vijabilnost stanica THP-1 značajno je smanjena nakon 24-satnog tretmana mješavinama nanočestica u koncentracijama koje su bile netoksične primijenjene zasebno. Mješavina 10 mg/L nanoAg s 10 mg/L nanoPS smanjila je postotak živih stanica na 55,9 % (postotak mrtvih stanica bio je 24,7 %), a mješavine 1 i 10 mg/L nanoAg sa 100 mg/L nanoPS smanjile su postotak živih stanica na 73,2 % (21,4 % mrtvih), odnosno 68,4 % (23,8 % mrtvih) u usporedbi sa 84,4 % živih stanica u kontrolnom uzorku (Slika 12).



Slika 12. Rezultati protočne citometrije za analizu staničnog preživljenja i pokretanja apoptoze a) stanica Jurkat i b) stanica THP-1 nakon tretmana različitim mješavinama nanoAg i nanoPS tijekom 24 h na 37°C i 5 % CO₂. Ljubičasto – stanice u kasnoj apoptozi/nekrotične stanice, žuto – stanice u ranoj apoptozi, bijelo – žive stanice. Rezultati koji se statistički značajno razlikuju od kontrolnih stanica ($p < 0,05$) označeni su zvjezdicom (*).

4.4 Kvantifikacija unosa nanočestica – protočna citometrija

Unos nanočestica u stanice kvantificiran je metodom protočne citometrije, kojom se unos nanoAg može pratiti preko intenziteta postranično raspršene svjetlosti (engl. *side scatter*, SSC), a unos nanoPS preko intenziteta njihove fluorescencije. Analizom ova dva parametra dobivena je relativna količina unosa nanočestica u usporedbi sa kontrolnim stanicama (Slika 13). Unosom nanoAg u stanice Jurkat postignut je signal SSC jakosti 550 % signala kontrole za tretman od 25 mg/L, a signal se nije znatno pojačao u tretmanima većom koncentracijom nanoAg (50 i 100 mg/L) (Slika 13). Kod stanica THP-1, jakost SSC signala povećavala se s primijenjenom koncentracijom bez vidljivog zasićenja unosa nanoAg kao kod stanica Jurkat, a za koncentraciju 100 mg/L signal je iznosio 1338 % signala kontrolnih stanica (Slika 13). Kod unosa nanoPS, nije zamijećen fenomen zasićenja unosom nanočestica ni za Jurkat ni za THP-1 stanice. Međutim, vidljiv je veći unos nanoPS u stanice THP-1 te je za koncentraciju 500 mg/L postignut fluorescentni signal jakosti 1436 % jakosti kontrole dok je za stanice Jurkat tretirane istom koncentracijom nanoPS signal iznosio 774 % vrijednosti kontrole (Slika 13).

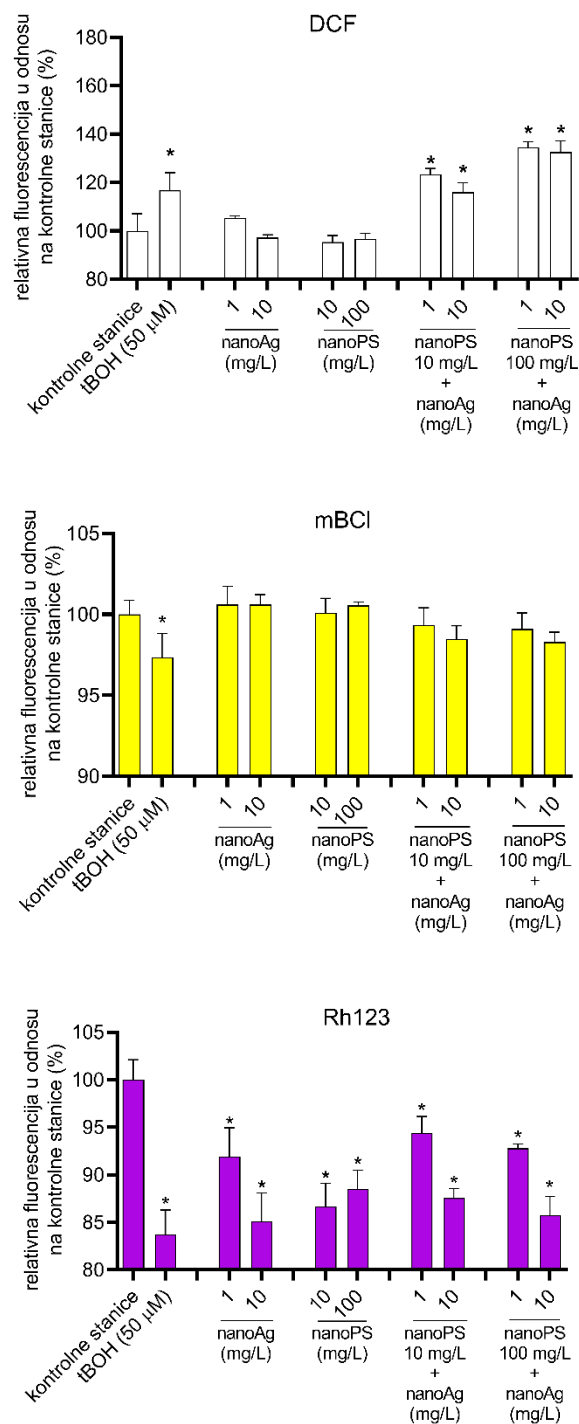


Slika 13. Unos a) nanoAg i b) nanoPS u stanice Jurkat i THP-1 utvrđen analizom protočnim citometrom. Unos nanoAg utvrđen je analizom jakosti postranično raspršene svjetlosti, a unos nanoPS utvrđen je analizom fluorescencije na odgovarajućem detektoru. Vrijednosti raspršene svjetlosti odnosno fluorescencije izražene su kao postoci u odnosu na kontrolne stanice. Rezultati koji se statistički značajno razlikuju od kontrolnih stanica ($p < 0,05$) označeni su zvjezdicom (*).

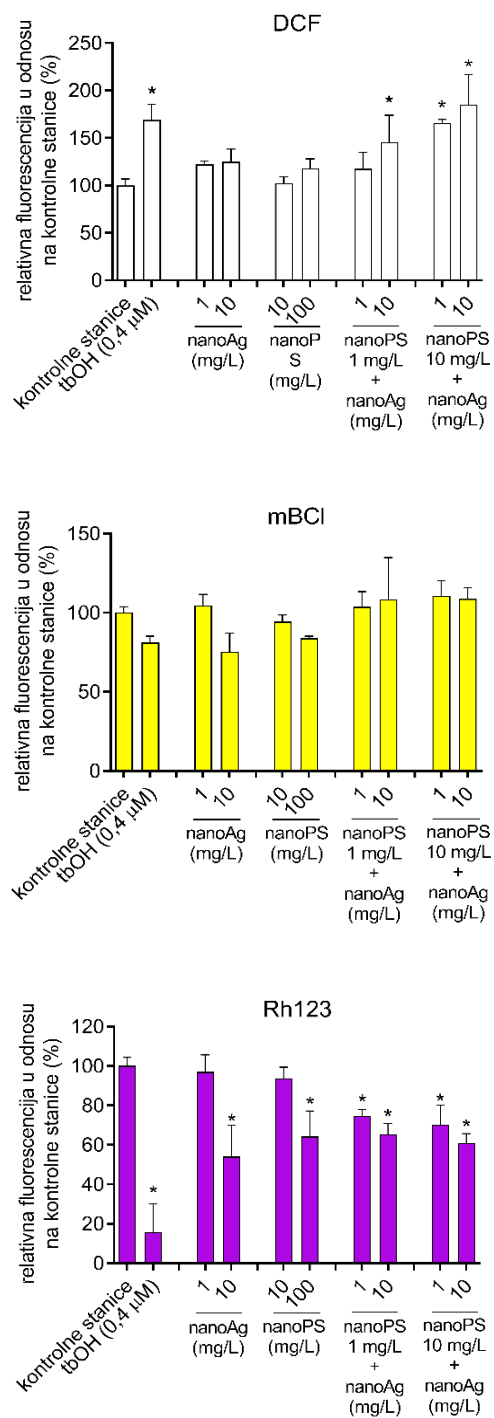
4.5 Oksidativni stres

Za detaljniji uvid u mehanizam djelovanja nanoAg i nanoPS na stanice Jurkat i THP-1, primijenjene pojedinačno i zajedno, analizirani su sljedeći parametri oksidativnog stresa: stvaranje ROS-ova analizirano je esejom DCF, razina staničnog glutaciona esejom mBCl, a promjene mitohondrijskog membranskog potencijala pomoću eseja Rh123. Rezultati eseja DCF pokazali su malen porast u produkciji ROS-ova u stanicama Jurkat i THP-1 u uzorcima tretiranim pojedinačnim tipovima nanočestica (Slike 14 i 15). Međutim, tretmani mješavinom nanoAg i nanoPS dali su značajno jači fluorescentni signal, u usporedbi sa kontrolnim stanicama, kod stanica Jurkat (Slika 14). Tretman s 1 i 10 mg/L nanoAg u kombinaciji sa 10 mg/L nanoPS dali su signal jačine 123,4 %, odnosno 116,1 % jakosti signala negativne kontrole. Kod tretmana mješavinom 1 i 10 nanoAg sa 100 mg/L nanoPS učinak je bio još jači, te je zabilježen fluorescentni signal DCF-a jakosti 134,5 % (za 1 mg/L nanoAg + 100 mg/L nanoPS) odnosno 132,6 % (za 10 mg/L nanoAg + 100 mg/L nanoPS) u odnosu na kontrolne stanice (Slika 14).

Sličan je učinak zabilježen kod stanica THP-1 za sljedeće miješane tretmane: poslije tretmana nanoAg 10 mg/L + nanoPS 1 mg/L, fluorescentni signal DCF-a iznosio je 159,7 % signala kontrolnih stanica, poslije tretmana nanoAg 1 mg/L + nanoPS 10 mg/L jakost signala bila je 165,5 %, a nakon tretmana s nanoAg 10 mg/L + nanoPS 10 mg/L jakost signala iznosila je 203,3 % u odnosu na fluorescentni signal kontrole (Slika 15). Rezultati eseja mBCl nisu pokazali značajnu razliku u fluorescenciji nakon tretmana oba tipa stanica nanočesticama, što ukazuje da razina unutarstaničnog glutaciona nije bitno promijenjena tretmanom (Slike 14 i 15). S druge strane, esejem Rh123 zabilježene su promjene u mitohondrijskom membranskom potencijalu uzrokovane nanočesticama za oba tipa stanica (Slike 14 i 15). Značajno smanjenje fluorescencije Rh123 zabilježeno je u stanicama Jurkat kod svih testiranih koncentracija nanočestica (Slika 14), a kod stanica THP-1 u svim tretmanima osim 1 mg/L nanoAg i 10 mg/L nanoPS (Slika 15). Kod stanica Jurkat najmanji zabilježeni intenzitet fluorescencije iznosio je 83,7 % signala kontrolnih stanica, a postignut je tretmanom s 50 μ M tBOH (pozitivna kontrola), dok su tretmani nanočesticama uzrokovali manju promjenu fluorescencije Rh123 od pozitivne kontrole. S druge strane, kod stanica THP-1 zabilježen je puno veći pad intenziteta fluorescencije u odnosu na kontrolne stanice kod pozitivne kontrole i kod svih tretmana (sve statistički značajne vrijednosti za smanjenje fluorescencije nakon tretmana su ispod 75 % signala kontrole) (Slika 15).



Slika 14. Rezultati eseja DCF, mBCL i Rh123 na stanicama Jurkat nakon tretmana s nanoAg, nanoPS i mješavinama oba tipa nanočestica tijekom 2 h na 37°C i 5 % CO₂. Netretirane stanice korištene su kao negativna kontrola, a stanice tretirane s 50 μ M tBOOH kao pozitivna kontrola. Rezultati koji se statistički značajno razlikuju od kontrolnih stanica ($p < 0,05$) označeni su zvjezdicom (*).

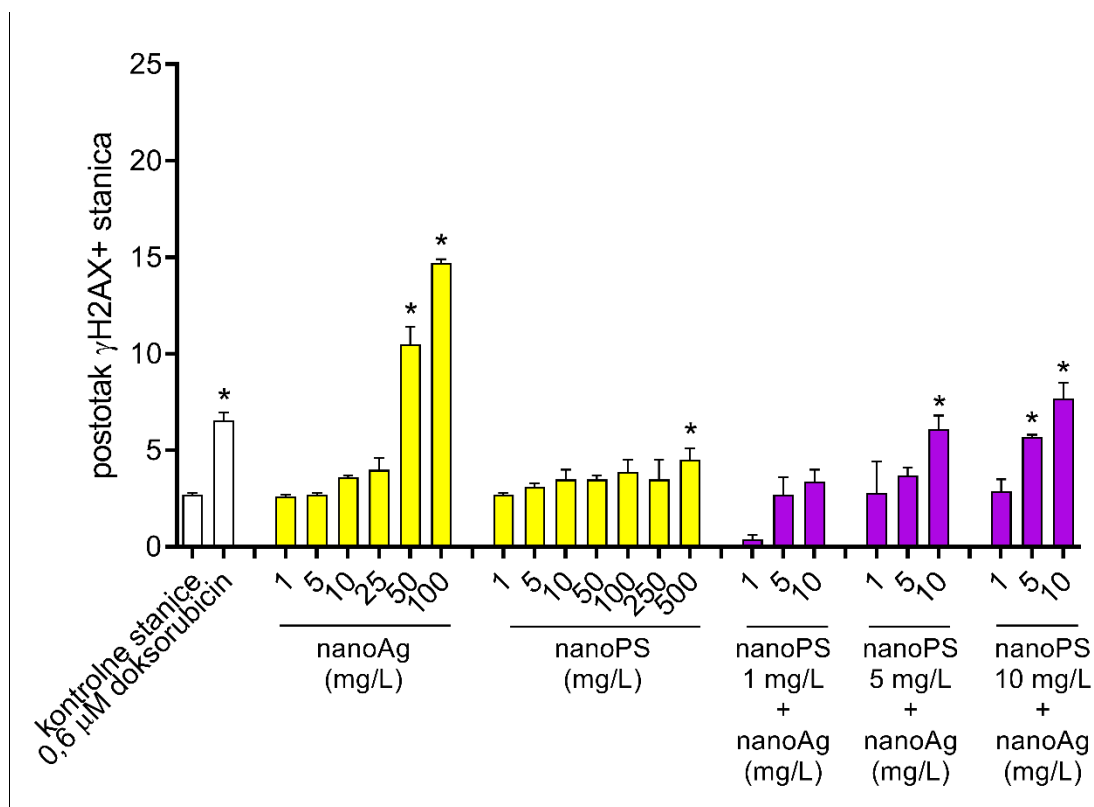


Slika 15. Rezultati eseja DCF, mBCl i Rh123 na stanicama THP-1 nakon tretmana s nanoAg, nanoPS i mješavinama oba tipa nanočestica tijekom 2 h na 37°C i 5 % CO₂. Netretirane stanice korištene su kao negativna kontrola, a stanice tretirane s 0,4 μ M tBOOH kao pozitivna kontrola. Rezultati koji se statistički značajno razlikuju od kontrolnih stanica ($p < 0,05$) označeni su zvjezdicom (*).

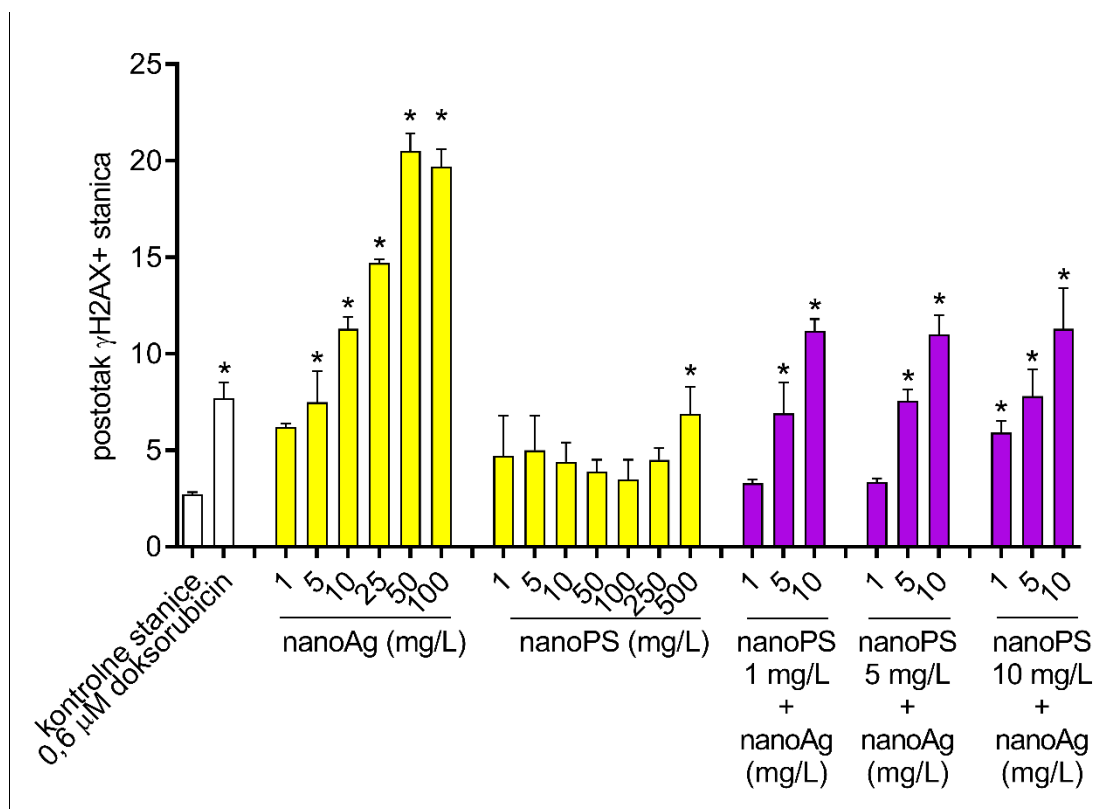
4.6 Oštećenje DNA

Oštećenje DNA uzrokovane tretmanom stanica nanočesticama utvrđeno je analizom dvolančanih lomova, specifično obilježenih protutijelom anti- γ H2AX konjugiranog s fluorescentnom bojom Alexa Fluor 647. Nakon 24-satnog tretmana stanica na 37°C i 5 % CO₂, značajno povećanje broja dvolančanih lomova utvrđeno je kod tretmana stanica Jurkat s 50 i 100 mg/L nanoAg (10,5 % odnosno 14,7 % γ H2AX+ stanica) i 500 mg/L nanoPS (4,5 % γ H2AX+ stanica) (Slika 16). Stanice THP-1 pokazale su veću osjetljivost za lomove DNA te je značajno povećanje oštećenja DNA utvrđeno za sve nanoAg koncentracije u rasponu od 5 do 100 mg/L (od 7,5 do 19,7 % γ H2AX+ stanica) te za tretman 500 mg/L nanoPS (6,9 % γ H2AX+ stanica) (Slika 17).

Tretman stanica Jurkat mješavinom nanoAg i nanoPS uzrokovalo je povećani broj dvolančanih lomova u odnosu na tretmane pojedinačnim tipovima nanočestica te je značajna razlika u oštećenju DNA u odnosu na kontrolne stanice utvrđena za tretmane 10 mg/L nanoAg/5 mg/L nanoPS (6,1 % γ H2AX+ stanica) te za tretmane 5 i 10 mg/L nanoAg sa 10 mg/L nanoPS (5,7 odnosno 7,7 % γ H2AX+ stanica) (Slika 16). Kod stanica THP-1, povećan broj dvolančanih lomova utvrđen je za mješavine 5 i 10 mg/L nanoAg sa sve tri koncentracije nanoPS (6,9 do 7,8 γ H2AX+ stanica za mješavine s 5 mg/L nanoAg, 11,0 do 11,3 % γ H2AX+ stanica za mješavine s 10 mg/L nanoAg) (Slika 17). Međutim, kako je samo nanoAg u koncentracijama 5 i 10 mg/L uzrokovalo sličnu razinu DNA oštećenja u THP-1 stanicama (7,5 % γ H2AX+ stanica za 5 mg/L nanoAg, 11,3 % γ H2AX+ stanica za 10 mg/L nanoAg), učinak povećanog broja oštećenja DNA za miješane tretmane nije utvrđen ovim pokusima.



Slika 16. Rezultati analize dvolančanih lomova DNA uzrokovanih tretmanom nanoAg i nanoPS u stanicama Jurkat tijekom 24 h inkubacije na 37°C i 5 % CO₂. Netretirane stanice korištene su kao negativna kontrola, a stanice tretirane 0,6 mM doksorubicinom kao pozitivna kontrola. Dvolančani lomovi obilježeni su anti- γ H2AX-AF647 protutijelom, a fluorescencija je analizirana na protočnom citometru. Rezultati koji se statistički značajno razlikuju od kontrolnih stanica ($p < 0,05$) označeni su zvjezdicom (*).

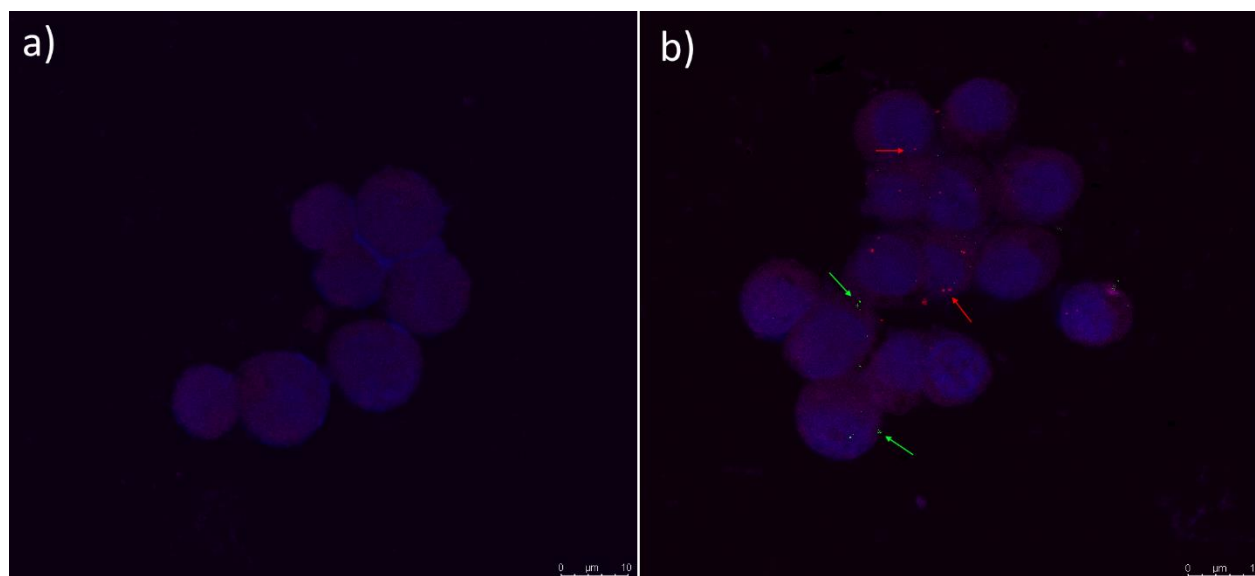


Slika 17. Rezultati analize dvolančanih lomova DNA uzrokovanih tretmanom nanoAg i nanoPS u stanicama THP-1 tijekom 24 h inkubacije na 37°C i 5 % CO₂. Netretirane stanice korištene su kao negativna kontrola, a stanice tretirane 0,6 mM doksorubicinom kao pozitivna kontrola. Dvolančani lomovi obilježeni su anti- γ H2AX-AF647 protutijelom, a fluorescencija je analizirana na protočnom citometru. Rezultati koji se statistički značajno razlikuju od kontrolnih stanica ($p < 0,05$) označeni su zvjezdicom (*).

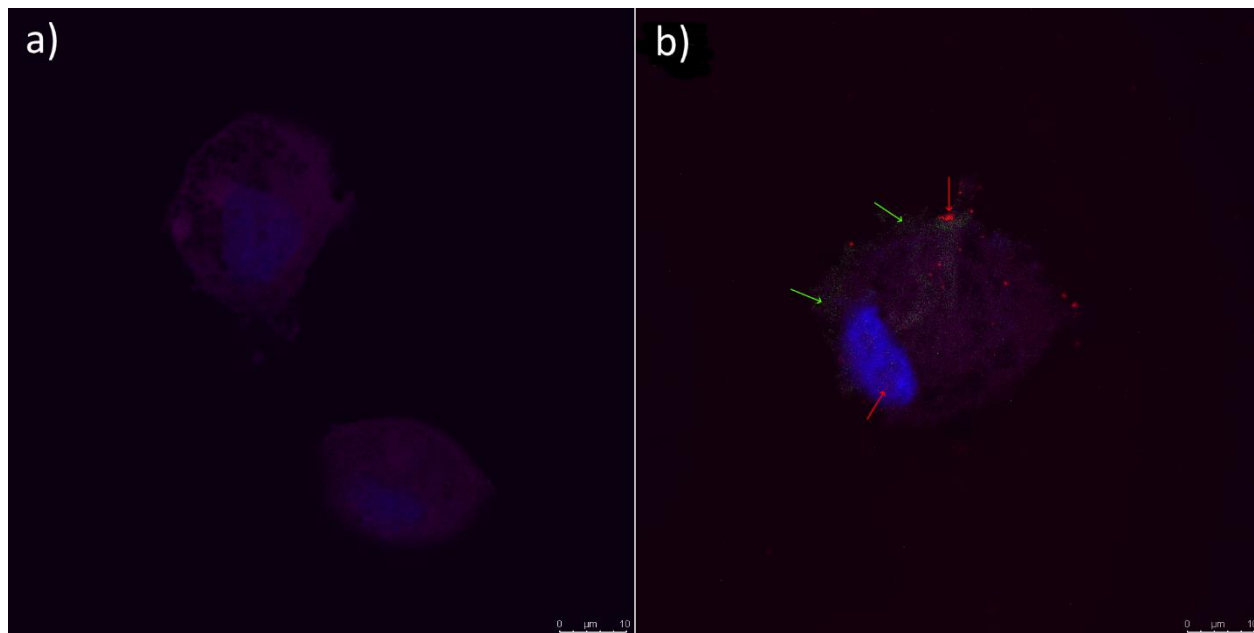
4.7 Unos i lokalizacija nanočestica – konfokalna mikroskopija

Unos i lokalizacija nanoAg i nanoPS u stanicama Jurkat i THP-1 utvrđena je konfokalnim mikroskopom nakon 24-satne inkubacije stanica s nanočesticama na 37°C i 5 % CO₂. Stanice su tretirane s 1 mg/L nanoAg, 10 mg/L nanoPS i mješavinom tih dvaju koncentracija kako bi se lokalizacija NM utvrdila bez pokretanja procesa stanične smrti koji bi mogli utjecati na rezultat. Također, da bi se utvrdilo prisustvo nanočestica unutar stanica, a ne na njihovoj površini, snimljeno je nekoliko slika za svaki uzorak koje se razlikuju u udaljenosti žarišne daljine od podloge (engl.

z-stack). Odabrane su slike iz sredine *z-stacka* koje pokazuju presjek kroz stanice (Slike 18 i 19). Za oba tipa stanica, lokalizacija nanoAg i nanoPS utvrđena je većinom u citoplazmi, a manjim dijelom u jezgri stanica. U stanicama THP-1 primjetno je veći broj nanočestica unutar stanice u odnosu na stanice Jurkat, a u oba stanična tipa nanočestice nisu jednoliko raspoređene kroz citoplazmu već se nalaze grupirane (Slike 18 i 19). Važno je primijetiti da se signali nanoAg i nanoPS većinom ne preklapaju, nego su nanočestice unesene u stanice zasebno.



Slika 18. Slike sa konfokalnog mikroskopa stanica Jurkat: a) kontrolne stanice, b) stanice tretirane s 1 mg/L nanoAg i 10 mg/L nanoPS tijekom 24 h na 37°C i 5 % CO₂. Stanične jezgre prikazane su plavom bojom, aktin je prikazan ljubičasto, nanoAg prikazane su crveno, a nanoPS prikazane su zelenom bojom. Skala veličine prikazuje 10 µm.



Slika 19. Slike sa konfokalnog mikroskopa stanica THP-1: a) kontrolne stanice, b) stanice tretirane s 1 mg/L nanoAg i 10 mg/L nanoPS tijekom 24 h na 37°C i 5 % CO₂. Stanične jezgre prikazane su plavom bojom, aktin je prikazan ljubičasto, nanoAg prikazane su crveno, a nanoPS prikazane su zelenom bojom. Skala veličine prikazuje 10 μm.

4.8 Ekspresija pro-upalnih citokina – kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Sljedeći dio istraživanja utjecaja nanoAg i nanoPS na stanice Jurkat i THP-1 bio je analiza promjena u ekspresiji gena povezanih sa upalnim odgovorom, odnosno ekspresije citokina IL-6, IL-8 i TNFα za oba tipa stanica, te ekspresija citokina IL-2 za stanice Jurkat. Također, analizirana je ekspresija gena CD11b u stanicama THP-1 tretirane s 100 nM PMA kako bi se na genskoj ekspresiji potvrdila diferencijacija stanica iz monocita u makrofage (Slike 10, 20 - 23, Tablica 6).

Tablica 6. Promjene u ekspresiji citokina u stanicama Jurkat i THP-1 nakon tretmana nanoAg i nanoPS tijekom 2 sata na 37°C i 5 % CO₂, utvrđenih qPCR analizom. Rezultati su izračunati metodom $2^{-\Delta\Delta C_q}$ i izraženi kao porast ekspresije u odnosu na kontrolne stanice (engl. *fold change in gene expression*). Tretmani koji se statistički značajno razlikuju od kontrolnih stanica označeni su crvenom bojom (p<0,05).

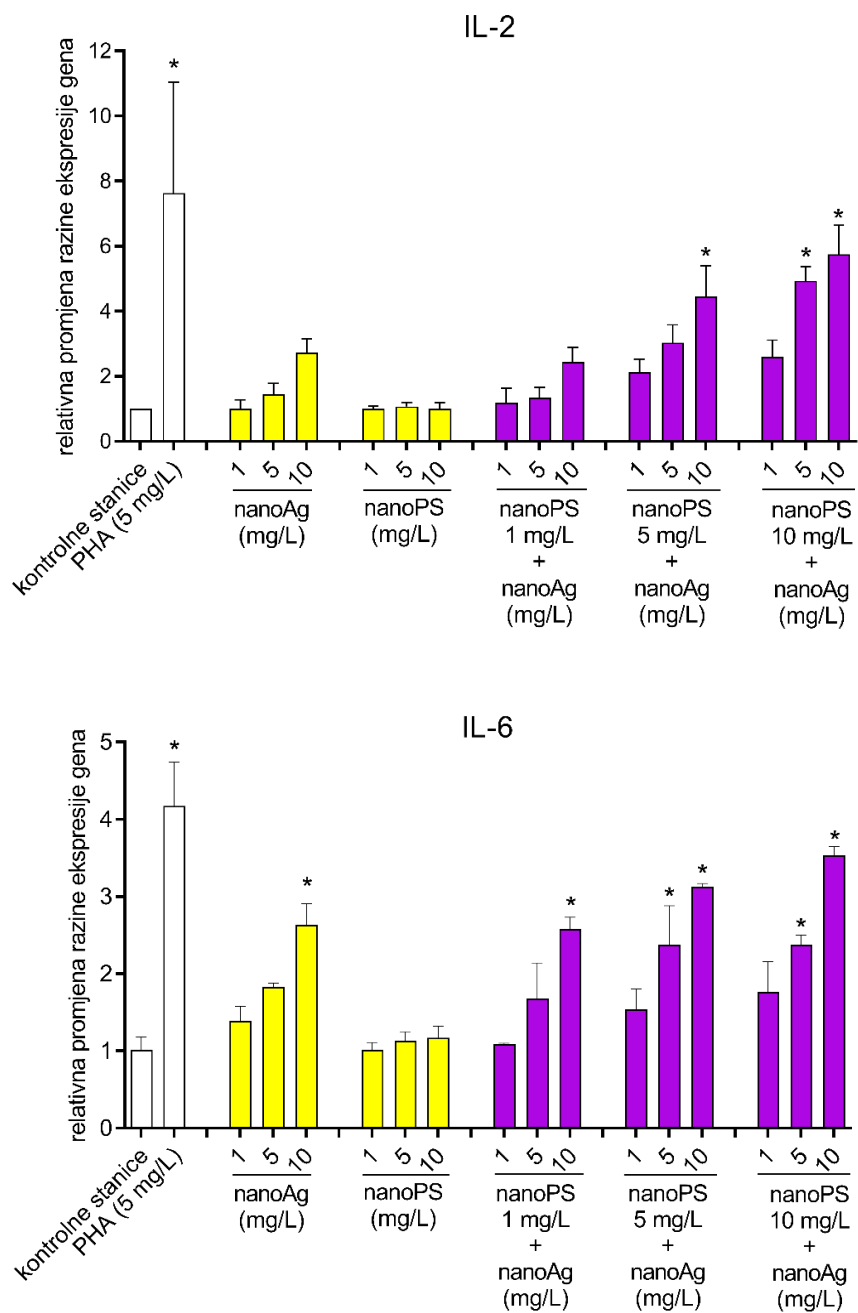
		Jurkat				THP-1			
		IL-2	IL-6	IL-8	TNF α	IL-6	IL-8	TNF α	IL-1 β
kontrolne stanice		1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
pozitivna kontrola (Jurkat - 5 mg/L PHA, THP-1 - 1 mg/L LPS)		7,6	4,2	5,5	2,4	8,2	3,7	8,2	2,6
nanoAg (mg/L)	1	1,0	1,4	1,0	1,1	1,4	1,3	0,5	1,2
	5	1,5	1,8	1,3	1,4	1,8	1,8	2,6	1,5
	10	2,7	2,6	2,5	2,3	2,6	2,9	5,6	1,7
nanoPS (mg/L)	1	1,0	1,0	0,9	1,0	1,2	1,2	0,6	1,3
	5	1,1	1,1	1,0	1,2	1,6	1,8	2,3	1,8
	10	1,0	1,2	1,2	1,4	1,8	2,2	3,5	1,9
nanoPS (1 mg/L) + nanoAg (mg/L)	1	1,2	1,1	1,3	1,5	1,1	1,6	0,5	1,2
	5	1,3	1,7	1,7	2,1	2,2	1,8	2,9	1,4
	10	2,4	2,6	3,1	2,3	3,0	2,8	3,6	1,8
nanoPS (5 mg/L) + nanoAg (mg/L)	1	2,1	1,5	1,1	1,6	1,8	1,8	1,6	1,4
	5	3,0	2,4	2,5	1,9	2,4	2,4	3,0	1,7
	10	4,5	3,1	3,3	2,4	3,1	3,5	4,6	2,1
nanoPS (10 mg/L) + nanoAg (mg/L)	1	2,6	1,8	1,7	1,8	2,1	2,2	2,5	1,4
	5	4,9	2,4	2,5	2,3	3,1	3,7	6,1	1,7
	10	5,8	3,5	4,4	4,2	4,1	5,7	7,6	2,1

Stanice Jurkat tretirane nanoAg pokazale su značajno veću ekspresiju IL-6 u odnosu na netretirane stanice pri koncentraciji 10 mg/L i značajno veću ekspresiju IL-8 nakon tretmana 10 mg/L nanoAg, dok porast ekspresije TNF α i IL-2 nakon tretmana nanoAg nije bio statistički značajan (Tablica 6, Slike 20 i 21). Tretman stanica Jurkat nanoPS nije značajno promijenio razinu ekspresije testiranih gena u usporedbi s kontrolnim stanicama (Tablica 6, Slike 20 i 21). S druge strane, tretman stanica Jurkat mješavinama nanočestica povisio je ekspresiju svih testiranih gena: ekspresija IL-6 povišena je nakon tretmana s 5 i 10 mg/L nanoAg u kombinaciji sa sve tri koncentracije nanoPS, ekspresija IL-8 povišena je nakon tretmana 10 mg/L nanoAg + 1 mg/L nanoPS, te mješavinama 5 i 10 mg/L nanoAg s 5 i 10 mg/L nanoPS, a ekspresija TNF α povišena je nakon tretmana mješavinom 10 mg/L nanoAg s 5 i 10 mg/L nanoPS (Tablica 6, Slike 20 i 21). Ekspresija IL-2 nije značajno promijenjena tretmanima sa zasebnim nanočesticama, ali je povišena nakon tretmana s 10 mg/L nanoAg u kombinaciji s 5 mg/L nanoPS, te nakon tretmana s 5 i 10 mg/L nanoAg pomiješane sa 10 mg/L nanoPS (Tablica 6, Slika 20).

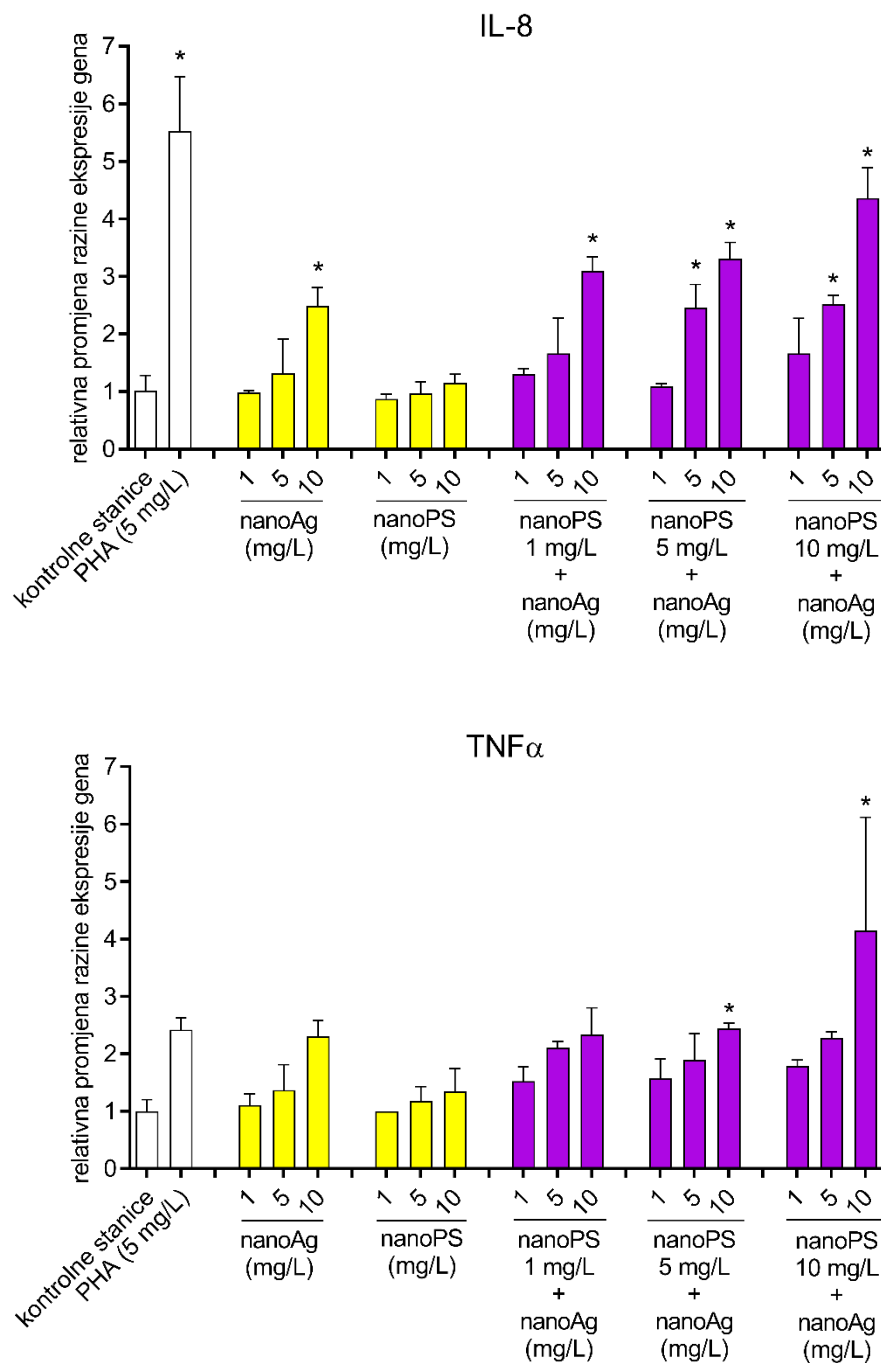
Prije analize pokretanja upalnog odgovora stanica THP-1, utvrđena je ekspresija CD11b na površini stanica tretiranih 3 dana sa 100 nM PMA. Ekspresija CD11b povećana je 8,24 puta u odnosu na netretirane stanice, što zajedno sa promjenom iz suspenzijskog u adherentni tip stanica potvrđuje uspješnu diferencijaciju stanica THP-1 iz monocita u makrofage (Slika 10).

Diferencirane THP-1 stanice izložene pojedinačnim nanočesticama i njihovim smjesama tijekom 2 h na 37°C i 5 % CO₂ pokazale su značajne pro-upalne promjene u ekspresiji gena (Tablica 6, Slike 22 i 23). Tretman stanica s 10 mg/L nanoAg povisio je ekspresiju IL-6, IL-8, TNF α i IL-1 β . Značajan porast ekspresije TNF α i IL-1 β zabilježen je i kod tretmana s 10 mg/L nanoPS (Tablica 6, Slike 22 i 23). Također je uočeno povećanje ekspresije IL-6 i IL-8 u ovisnosti o primijenjenoj dozi nanoPS, iako te promjene nisu dosegle prag statističke značajnosti. S druge strane, tretman stanica s 5 i 10 mg/L nanoPS postigao je maleno ali statistički značajno povećanje ekspresije IL-1 β (Slika 22). Mješavine nanoAg i nanoPS postigle su još veći učinak u podizanju razine ekspresije svih navedenih gena u odnosu na tretman pojedinačnim tipom nanočestica. Tretman s 10 mg/L nanoAg u kombinaciji sa sve tri koncentracije nanoPS (1, 5 i 10 mg/L) povisio je ekspresiju IL-6, IL-8, TNF α i IL-1 β , a tretman mješavinom 10 mg/L nanoAg i 10 mg/L nanoPS postigao je znatno veći učinak u odnosu na tretman samim 10 mg/L nanoAg (Tablica 6, Slike 22 i 23). Također, tretman s 5 mg/L nanoAg, koji zasebno nije značajno povisio ekspresiju testiranih

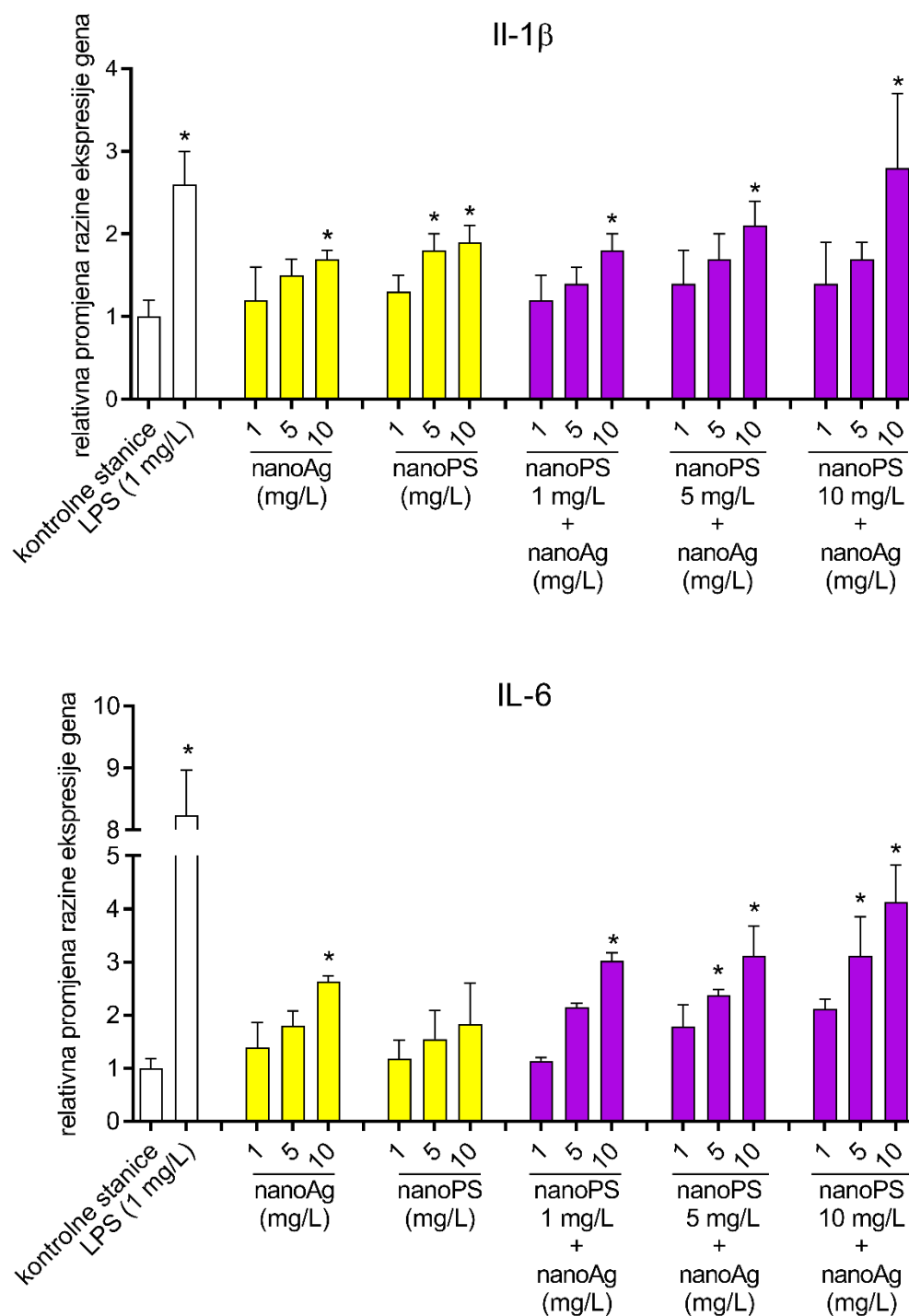
gena, u mješavini s 5 i 10 mg/L potaknuo je ekspresiju IL-6, IL-8 i TNF α iznad praga statističke značajnosti (Tablica 6, Slike 22 i 23).



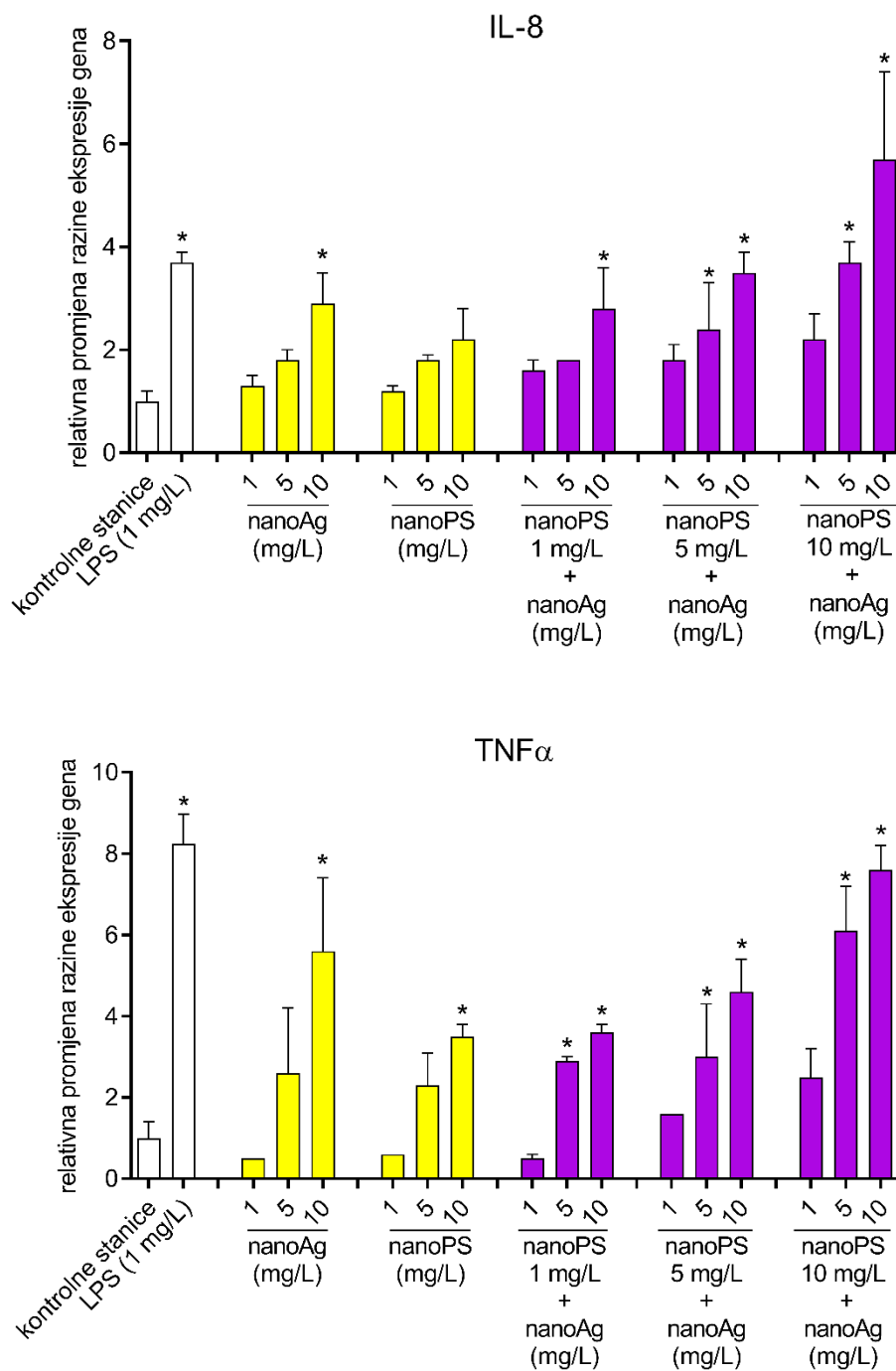
Slika 20. Rezultati analize ekspresije citokina IL-2 i IL-6 u stanicama Jurkat nakon tretmana nanoAg i nanoPS tijekom 2 h na 37°C i 5 % CO₂. Promjene u ekspresiji gena izražene su u odnosu na kontrolne stanice, a kvantificirane su metodom $2^{-\Delta\Delta C_q}$. Rezultati koji se statistički značajno razlikuju od kontrolnih stanica ($p < 0,05$) označeni su zvjezdicom (*).



Slika 21. Rezultati analize ekspresije citokina IL-8 i TNF α u stanicama Jurkat nakon tretmana nanoAg i nanoPS tijekom 2 h na 37°C i 5 % CO₂. Promjene u ekspresiji gena izražene su u odnosu na kontrolne stanice, a kvantificirane su metodom 2^{-ΔΔC_q}. Rezultati koji se statistički značajno razlikuju od kontrolnih stanica (p<0,05) označeni su zvjezdicom (*).



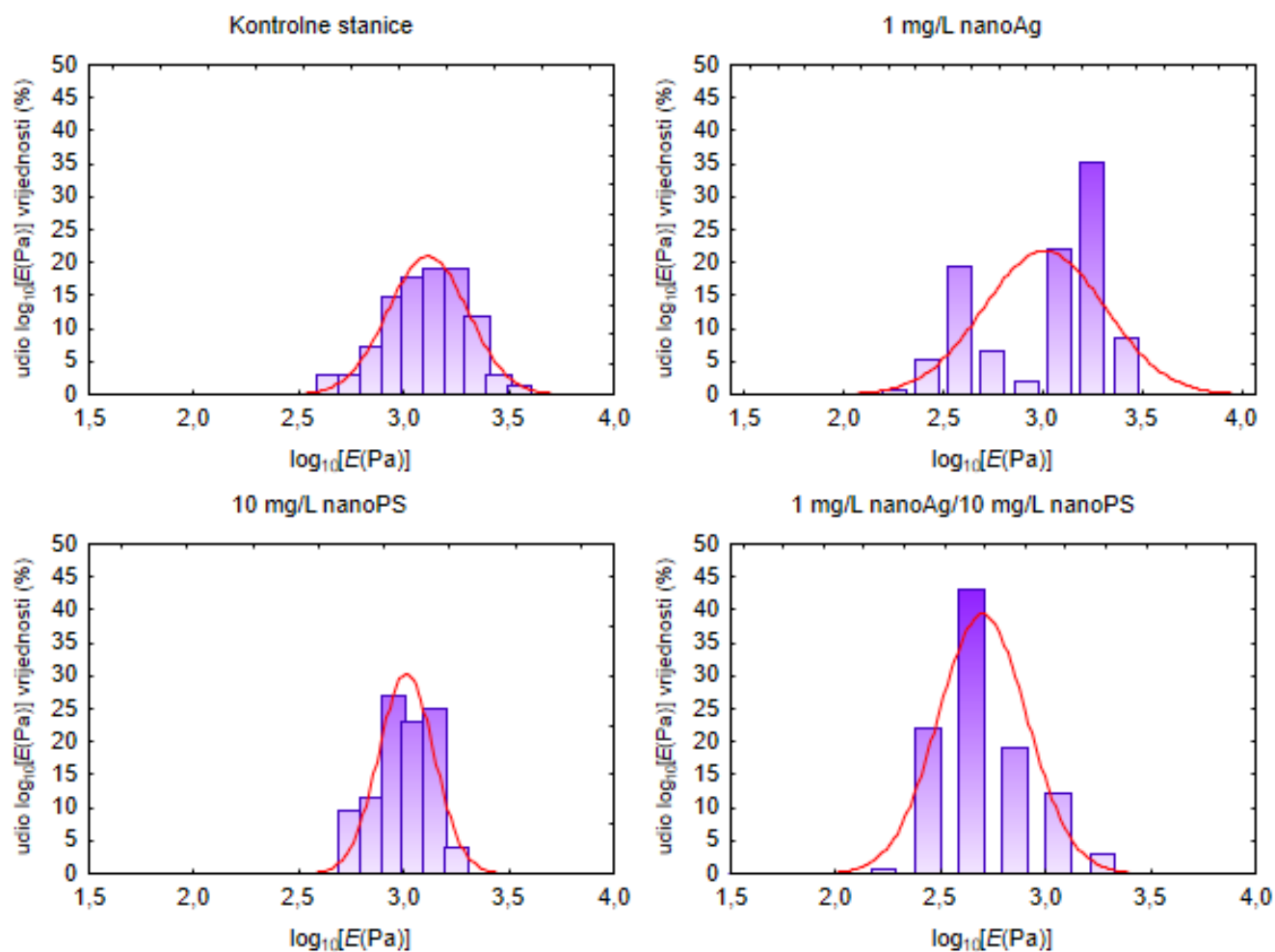
Slika 22. Rezultati analize ekspresije IL-1 β i IL-6 u stanicama THP-1 nakon tretmana nanoAg i nanoPS tijekom 2 h na 37°C i 5 % CO₂. Promjene u ekspresiji gena izražene su u odnosu na kontrolne stanice, a kvantificirane su metodom 2^{- $\Delta\Delta C_q$} . Rezultati koji se statistički značajno razlikuju od kontrolnih stanica (p<0,05) označeni su zvjezdicom (*).



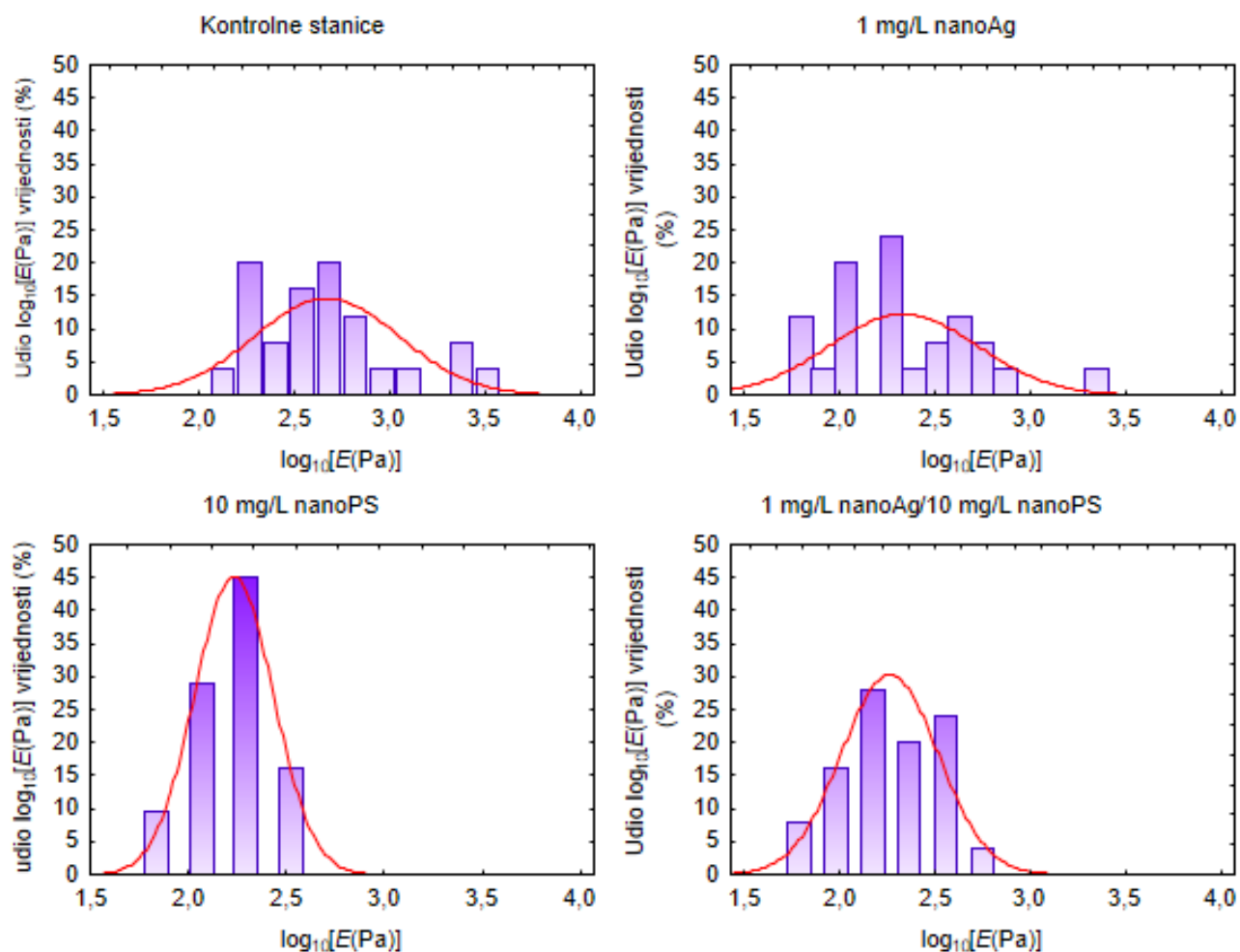
Slika 23. Rezultati analize ekspresije IL-8 i TNF α u stanicama THP-1 nakon tretmana nanoAg i nanoPS tijekom 2 h na 37°C i 5 % CO₂. Promjene u ekspresiji gena izražene su u odnosu na kontrolne stanice, a kvantificirane su metodom 2^{- $\Delta\Delta C_q$} . Rezultati koji se statistički značajno razlikuju od kontrolnih stanica (p<0,05) označeni su zvjezdicom (*).

4.9 Analiza mehaničkih svojstava stanica – atomska mikroskopija sila (AFM)

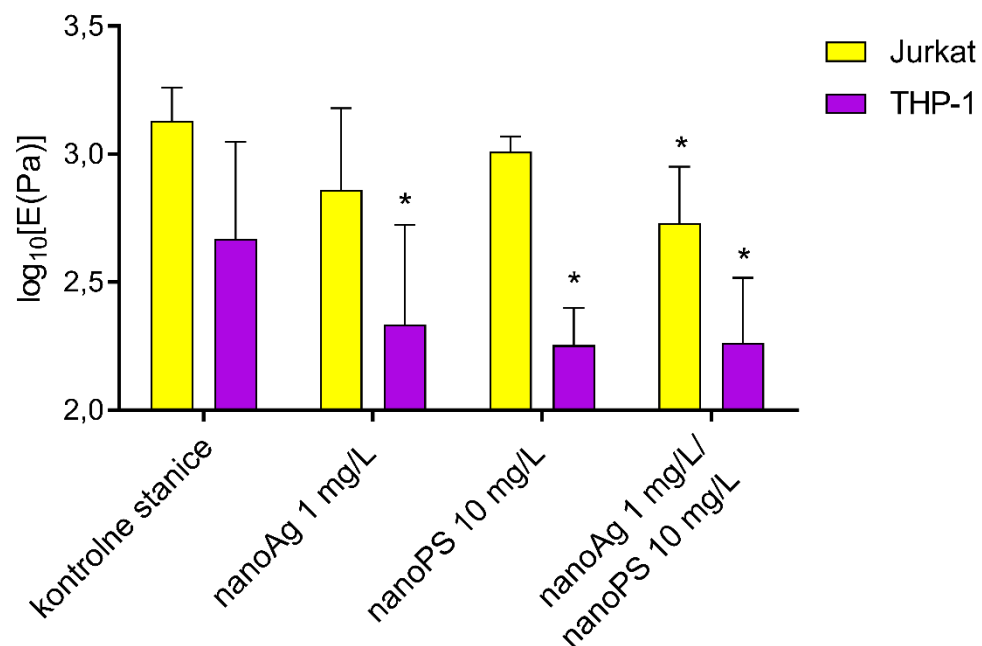
Utjecaj tretmana nanočesticama na mehanička svojstva stanica Jurkat i THP-1 ispitani su metodom AFM. Za ispitivanje promjena mehaničkih svojstava, stanice su tretirane s 1 mg/L nanoAg, 10 mg/L nanoPS i mješavinom nanočestica u istim koncentracijama tijekom 24 h na 37°C i 5 % CO₂. U svakom uzorku ispitana je čvrstoća 25 točaka na stanicama, a rezultati ispitivanja prikazani su kao distribucija vrijednosti izraženu preko Youngova modula (E), odnosno njihovih logaritama ($\log_{10}[E(\text{Pa})]$) (Slike 24 i 25), te kao srednja vrijednost izračunatih $\log_{10}[E(\text{Pa})]$ vrijednosti (Slika 26). Rezultati na stanicama Jurkat pokazali su da su nanočestice obje vrste smanjile čvrstoću citoskeleta, međutim zabilježeno smanjenje nije bilo statistički značajno (Slika 26). S druge strane, tretman mješavinom nanočestica umanjio je čvrstoću citoskeleta više od pojedinačnih tretmana te je vrijednost $\log(E)$ iznosila 2,73, u odnosu na $\log(E)$ vrijednost 3,13 kod kontrolnih stanica (Slika 26). Kod stanica THP-1, utjecaj nanočestica na čvrstoću stanica bio je više izražen te su tretmani nanoAg i nanoPS, primijenjeni zasebno, značajno smanjili vrijednost logaritma Youngova modula stanica – $\log(E)$ vrijednost iznosila je 2,33 za nanoAg i 2,25 za nanoPS, u odnosu na 2,67 kontrolnih stanica (Slika 26). Miješani tretman stanica s nanoAg/nanoPS također je značajno smanjio vrijednost Youngova modula ($\log(E) = 2,26$), iako se zabilježeno smanjenje nije bitno razlikovalo od tretmana zasebnim nanočesticama (Slika 26).



Slika 24. Distribucija vrijednosti Youngova modula (E) stanica Jurkat, dobivena analizom krivulja sila za svaku analiziranu točku na površini stanica (25 točaka po uzorku). Za sve vrijednosti $E(\text{Pa})$ izračunate su vrijednosti $\log_{10}[E(\text{Pa})]$ te su prikazani njihovi udjeli u ukupnom broju analiziranih točaka.



Slika 25. Distribucija vrijednosti Youngova modula (E) stanica THP-1, dobivena analizom krivulja sila za svaku analiziranu točku na površini stanica (25 točaka po uzorku). Za sve vrijednosti $E(\text{Pa})$ izračunate su vrijednosti $\log_{10}[E(\text{Pa})]$ te su prikazani njihovi udjeli u ukupnom broju analiziranih točaka.



Slika 26. Logaritmi vrijednosti Youngova modula ($\log_{10}[E(\text{Pa})]$) dobiveni za stanice Jurkat i THP-1 tretirane s 1 mg/L nanoAg, 10 mg/L nanoPS i mješavinom nanoAg i nanoPS u istim koncentracijama, te vrijednost $\log_{10}[E(\text{Pa})]$ za kontrolne stanice. Stanice su tretirane tijekom 24 h na 37°C i 5 % CO₂. Rezultati koji se statistički značajno razlikuju od kontrolnih stanica ($p < 0,05$) označeni su zvjezdicom (*).

5. RASPRAVA

Nanočestice srebra važan su alat u suzbijanju bakterijskih infekcija u bolničkom okruženju zbog svojih izuzetnih antimikrobnih svojstava (20), a zbog rastuće važnosti i rasprostranjenosti nanoAg u medicinskoj i industrijskoj primjeni postoji veća mogućnost ljudske izloženosti i opasnosti po zdravlje. Dok su u literaturi opisani razni aspekti moguće štetnosti nanoAg za ljudski organizam (143), posebna kategorija rizika koja je dosad slabo istražena je moguće međudjelovanje nanoAg s drugim materijalima, koje može uzrokovati štetne učinke različite od samih nanoAg. Međudjelovanje nanoAg s drugim materijalima može dovesti do pojačanih toksičnih učinaka, ali može uzrokovati i smanjenje toksičnosti samih nanoAg, ovisno o tipu materijala s kojima su u doticaju. U ovom istraživanju, ispitano je zajedničko djelovanje nanoAg i nanoPS, obzirom na raznoliku primjenu polistirena u medicinskom kontekstu i njegovu prisutnost u okolišu.

Oblik, veličina i ζ potencijal nanoAg i nanoPS ispitane su metodama AFM i DLS/ELS, koje su pokazale da su oba tipa nanočestica sferičnog oblika i negativnog ζ potencijala. Dok su u staničnom mediju RPMI 1640 nanoAg i nanoPS tvorili agregate različitih veličina, dodatak FBS-a u medij bitno je promijenio svojstva njihovih suspenzija. Za oba tipa nanočestica postignuta je jednolika raspodjela veličina bez većih agregata. Taj se učinak FBS-a može pripisati stvaranju proteinske korone, koja stabilizira pojedinačne nanočestice i sprječava njihovu agregaciju do stupnja kakav je zabilježen u RPMI 1640 bez FBS-a. Dodatan dokaz stvaranja korone je promjena ζ potencijala nanoAg i nanoPS, koji je u mediju sa FBS-om bio približno jednak za pojedinačne tipove nanočestica, kao i za nanočestice u smjesi, što je uzrokovano vezanjem proteina FBS-a koji su maskirali ζ potencijal samih nanočestica. Važan rezultat ove analize je detekcija dvaju populacija u smjesi nanoAg/nanoPS koje raspodjelom veličina odgovaraju zasebnim tipovima nanočestica, što pokazuje da u smjesi nije došlo do značajnih interakcija između nanoAg i nanoPS te da su nanočestice neovisno djelovale na stanice u tretmanima gdje su primijenjene zajedno. Rezultati AFM analize nanočestica pokazali su drugačiju razdiobu veličina nanoAg i nanoPS u odnosu na DLS rezultate. Postoji nekoliko razloga zašto je promjer nanočestica dobiven AFM analizom manji od promjera izračunat metodom DLS: i) veličina čestica dobivena DLS-om izražena je kao hidrodinamički promjer, odnosno promjer koji uključuje ne samo nanočestice nego i solvacijsku ljusku koja se oko njih stvara, te je dobiveni promjer nužno veći od promjera same čestice; ii) nanočestice analizirane metodom AFM snimane su na površini prekrivenoj poli-L-

lizinom, te su nanočestice pod pritiskom AFM vrška utonule u polimerni supstrat, čime je dobivena manja vrijednost za promjer čestica; iii) nanočestice analizirane metodom AFM nisu bile u kontaktu s proteinima, te nisu stvorile proteinsku koronu koja bi povećala njihov promjer (agregacija nanočestica u nedostatku proteina, kakva je zabilježena DLS analizom, izbjegnuta je sušenjem uzorka nanočestica i snimanjem na zraku). Obzirom na snimanje pojedinačnih nanočestica, u odnosu na analizu svojstava otopine, razdioba veličina dobivena metodom AFM vjernije prikazuje raspon promjera nanoAg i nanoPS nego metoda DLS. Međutim, treba uzeti u obzir veličinu analiziranog uzorka, odnosno broj analiziranih nanočestica. Dok je metoda DLS dala rezultat reprezentativan za velik broj nanočestica u uzorku koncentracije 1 mg/L, metodom AFM izmjerena je veličina relativno malog broja čestica te razdioba njihovih veličina nije nužno reprezentativna za cijeli uzorak. S druge strane, AFM analiza potvrdila je ključan rezultat DLS mjerenja koji pokazuje kako nanoAg i nanoPS nisu stupili u interakciju i tvorili miješane agregate nanočestica. Mješavina ovih nanočestica stoga nije dobila zasebna svojstva različita od samih nanoAg i nanoPS, već su nanočestice u smjesi zasebno stupale u interakcije sa staničnom površinom te se njihovi učinci na mjerene stanične parametre mogu shvatiti kao aditivni.

Stanična vijabilnost i pokretanje apoptoze nakon tretmana nanoAg i nanoPS ispitana je metodom protočne citometrije, kojom je moguće razlikovati žive stanice od apoptotičnih i mrtvih stanica u istom uzorku. Ova metoda također ima prednost pred drugim esejima stanične vijabilnosti, kao MTS i LDH, za koje je poznat fenomen interferencije nanočestica s očitanjem apsorbancije i posljedično nepouzdan rezultate (133). Za razliku od navedenih eseja, u analizi rezultata protočne citometrije moguće je isključiti signal samih nanočestica na temelju veličine zabilježenih događaja na detektoru (engl. *events*, zajednički naziv za sve sakupljene signale tijekom analize uzorka na citometru, koji osim pojedinačnih stanica mogu uključivati nakupine stanica, dijelove raspadnutih stanica, nanočestice i sl.). Utvrđena je citotoksičnost nanoAg za stanice Jurkat i THP-1 u koncentracijama 25, odnosno 50 mg/L, a nanoPS su značajno smanjile staničnu vijabilnost tek kod koncentracije 500 mg/L za obje stanične linije. Dosad publicirani rezultati toksičnosti nanoAg za stanice Jurkat i THP-1 dokazali su ovisnost učinka nanoAg o veličini nanočestica, uz vrlo malo smanjenje vijabilnosti nakon tretmana oba tipa stanica s nanoAg promjera 50 nm stabilizirane citratom (144). Međutim, u ovom radu korištene su nanoAg stabilizirane PVP-om umjesto citrata te, uzevši u obzir utjecaj površinskih agensa na biološki karakter i citotoksičnost nanoAg (145, 146), publicirani rezultati dobiveni s drukčijim tipom

nanoAg nisu nužno usporedivi sa rezultatima prikazanim u ovoj disertaciji. S druge strane, nanoPS su smanjile vijabilnost stanica Jurkat i THP-1 tek u visokoj koncentraciji od 500 mg/L. Ovaj rad stoga daje važan uvid u škodljive učinke nanoAg promjera 50 nm, sintetizirane s PVP-om kao površinskim agensom za stabilizaciju, i nanoPS promjera 20 nm bez površinskih modifikacija, na modelne stanice imunosnog sustava.

Iako je razumijevanje zasebnog učinka nanoAg i nanoPS na stanice imunosnog sustava važan korak za procjenu rizika koje ovi NM predstavljaju po ljudsko zdravlje, njihova mješavina predstavlja posebnu kategoriju štetnosti koja može biti različita u odnosu na pojedinačne tretmane. Rezultati su pokazali da mješavine netoksičnih koncentracija nanoAg i nanoPS značajno smanjuju vijabilnost stanica Jurkat, u odnosu na zasebno primijenjene nanočestice, nakon tretmana u istim uvjetima. Sličan učinak mješavine nanoAg i nanoPS, ali slabije izražen, zabilježen je i za stanice THP-1. Ovaj rezultat pokazuje važnost ispitivanja smjese NM i njihove temeljite karakterizacije u relevantnim sustavima prije potencijalne primjene kojom bi došli u doticaj s ljudskim organizmom.

Za detaljniji uvid u međudjelovanje nanoAg i nanoPS i njihov utjecaj na ljudske stanice, pobliže su ispitani mehanizmi kojim nanoAg i nanoPS utječu na staničnu vijabilnost i metabolizam. Poznato je da nanoAg i nanoPS postižu svoj toksični učinak na stanice preko stvaranja ROS-ova i posljedičnog uzrokovanja oksidativnog stresa u stanicama (32, 147). Kako bi utvrdili razlikuje li se djelovanje smjese nanočestica od djelovanja pojedinačnog tipa, provedeni su eseji za analizu oksidativnog stresa: esej DCFH-DA, kojim se kvantificira količina stvorenih ROS-ova, esej monoklorobiman (mBCL) kojim se analizira razina unutarstaničnog glutationa (stanični antioksidans) i esej rodamin 123 (Rh123) kojim je moguće utvrditi promjene mitohondrijskog membranskog potencijala. Za analizu pokretanja oksidativnog stresa korištene su niske koncentracije NM (1 i 10 mg/L nanoAg i nanoPS) kako bi se umanjila mogućnost lažnih signala uzrokovanih međudjelovanjem nanočestica i fluorescentnih boja (132). Eseg DCF pokazao je da tretman pojedinačnim nanočesticama uzrokuje stvaranje neznatno veće količine ROS-ova u stanicama Jurkat i THP-1 u odnosu na kontrolne stanice. S druge strane, tretman mješavinom nanočestica značajno je povišio količinu ROS-ova u odnosu na same nanoAg ili nanoPS. To ukazuje da neovisni procesi stvaranja ROS-ova na površini nanoAg i nanoPS rezultiraju zajedničkim učinkom čija je posljedica oksidativni stres u stanicama Jurkat i THP-1. Za bolji uvid u oksidativni status stanica nakon tretmana, proveden je i mBCL esej kako bi se kvantificirala

količina staničnog glutationa. Međutim, rezultati eseja nisu pokazali razliku u razini glutaciona između kontrolnih i tretiranih stanica. Mogući uzrok male promjene mBCL signala je relativno slaba osjetljivost eseja, obzirom na manji afinitet monoklorobimana za ljudske izozime glutation-S-tranferaze u odnosu na izozime prisutne u štakorskim i mišjim staničnim linijama, na kojima je esej prvotno razvijen (148). Esaj Rh123, s druge strane, temelji se na vrlo specifičnom bojanju živih mitohondrija i omogućuje osjetljivu detekciju depolarizacije mitohondrijske membrane (149). Ovisno o korištenoj koncentraciji rodamina 123 i uvjetima pokusa, esej je moguće provesti na način da se prati porast ili smanjenje intenziteta fluorescencije kao odgovor na depolarizaciju membrane (150). Koncentracija rodamina 123 korištena u ovom radu (100 nM) odgovara uvjetima u kojima depolarizacija membrane dovodi do smanjenja fluorescentnog signala (engl. *non-quenching mode*) te je zabilježen smanjenje intenziteta fluorescencije u oba stanična tipa nakon tretmana nanočesticama. Bitno je primijetiti da je značajan učinak nanoAg i nanoPS zabilježen kod zasebnih tretmana nanočestica, kao i kod miješanih tretmana. Ovo smanjenje signala uzrokovano je delokalizacijom boje izvan mitohondrija, koje se dogodilo uslijed depolarizacije mitohondrijske membrane. Mogući uzroci depolarizacije su i) nespecifična oštećenja membrane uzrokovana ROS-ovima ili Ag^+ ionima otpuštenima s površine nanoAg te ii) početne reakcije procesa apoptoze, koji uključuju promjenu mitohondrijskog transmembranskog potencijala (151). Na temelju rezultata Rh123, može se zaključiti da je riječ o osjetljivom esaju koji omogućuje analizu staničnih promjena povezanih sa oksidativnim stresom i pokretanjem apoptoze čak i kod tretmana niskim koncentracijama NM.

Bitno je zamijetiti da je kod stanica THP-1 zabilježena veća promjena fluorescentnog signala u esejima DCF i Rh123, iako su za oba stanična tipa korištene iste koncentracije boja DCFH-DA, odnosno rodamina 123. Taj rezultat ukazuje na više stvaranja ROS-ova i jaču depolarizaciju mitohondrijskih membrana kod stanica THP-1 u odnosu na stanice Jurkat, što znači da su stanice izložene jačem oksidativnom stresu. Kako je mehanizam toksičnosti nanoAg i nanoPS jednak za oba stanična tipa, objašnjenje ovog fenomena leži u različitoj količini unesenog NM u stanice Jurkat odnosno THP-1, što je ispitano daljnjim pokusima.

Za daljnje ispitivanje učinaka nanoAg i nanoPS na stanice analizirana je razina oštećenja DNA uzrokovana tretmanom nanočesticama tijekom 24 h. Odabran je esej γH2AX kojim je moguće detektirati dvolančane lomove DNA, potencijalno najopasnija oštećenja stanične DNA

koje mogu dovesti do stanične smrti ili kromosomskih translokacija (152). Iako oksidativni stres najčešće rezultira kemijskom modifikacijom nukleobaza i jednolančanim lomovima (153), dokazano je da oksidativni stres može dovesti i do većih oštećenja DNA koja uključuju dvolančane lomove (154). Obzirom na osjetljivost eseja γ H2AX (139), njime je moguće razlikovati relativno malen porast u broju dvolančanih lomova koji mogu rezultirati ozbiljnim staničnim oštećenjima i staničnom smrću.

Tretman stanica Jurkat i THP-1 s nanoAg i nanoPS uzrokovao je značajan porast u postotku γ H2AX+ stanica, nakon zasebne primjene oba tipa nanočestica, kao i nakon zajedničke primjene smjese nanoAg i nanoPS. Kod tretmana stanica Jurkat sa zasebnim tipovima nanočestica, statistički značajan porast postotka γ H2AX+ stanica zabilježen je samo kod tretmana 50 i 100 mg/L nanoAg i te 500 mg/L nanoPS. Kod tretmana mješavinama nanočestica, porast je zabilježen kod 5 i 10 mg/L nanoAg kombiniranih sa 5 i 10 mg/L nanoPS. Ovi rezultati ukazuju da su se dvolančani lomovi DNA kod stanica Jurkat pojavili kod tretmana koji su bitno smanjili staničnu vijabilnost, te da stanice nisu imale kapacitet popraviti sva oštećenja DNA uzrokovana oksidativnim stresom. Moguće je pretpostaviti da bi esej za analizu jednolančanih lomova DNA ili stvaranje 8-oksogvanina pokazao nakupljanje manjih oštećenja DNA pri nižim koncentracijama nanočestica (155), koje bi na kraju dovelo do velikih oštećenja kakva su detektirana u ovom radu. Eom i sur. (2010) pokazali su da je tretman stanica Jurkat nanočesticama srebra značajno povisio količinu proteina γ H2AX nakon 24 h te da je, uz pojavu ovog biljega dvolančanih lomova DNA, zaustavljen stanični ciklus i pokrenuta apoptotična smrt stanica (156). Kako je postotak γ H2AX+ stanica nakon mješovitog tretmana s 5 i 10 mg/L nanoAg i 10 mg/L nanoPS veći nego kod tretmana samim 5 i 10 mg/L nanoAg, ovaj se učinak ne može pripisati samim nanoAg, već i oksidativnom stresu uzrokovanog nanoPS, što dodatno ukazuje na citotoksični potencijal smjese NM u odnosu na pojedini tip nanočestica.

Oštećenja DNA kod stanica THP-1 zabilježena su za niže koncentracije nanoAg nego kod stanica Jurkat te je statistički značajan porast γ H2AX+ uočen nakon tretmana s 5 mg/L nanoAg, odnosno u koncentraciji nanoAg koja nije rezultirala značajnim porastom postotka mrtvih stanica THP-1. Također, za tretmane mješavinama oba tipa nanočestica zabilježen je značajno veći postotak γ H2AX+ nego kod kontrolnih stanica. Ti rezultati pokazuju da su nanoAg i nanoPS, primijenjene zasebno ili zajedno, uzrokovale relativno velik broj dvolančanih lomova DNA.

Zanimljivo je primijetiti da je kod stanica THP-1 zabilježen manji pad u postotku vijabilnih stanica nakon tretmana nanočesticama, u odnosu na stanice Jurkat, unatoč većem broju dvolančanih lomova DNA kod istog tretmana. Taj podatak ukazuje na važnost mehanizama popravka DNA, za koje je poznato da su pojačano aktivirani u THP-1 stanicama nakon tretmana NM. Primjerice, kod stanica THP-1 izloženima nanočesticama grafen oksida zabilježena je pojačana ekspresija gena uključenih u popravak DNA izrezivanjem baza (engl. *base-excision repair*): 8-oksogvanin glikozilaze (OGG1), DNA liaze (APEX1), uracil-DNA glikozilaze (UNG), i DNA polimeraze β (POLB) (157). Sličan odgovor stanica THP-1 zabilježen je nakon izlaganja nanočesticama platine, uz dodatno pojačanje ekspresije proteina induciranog zaustavljanjem rasta i oštećenjem DNA (engl. *growth arrest and DNA damage inducible alpha*, GADD45A) (158). Osim popravka DNA izrezivanjem baza, Khatri i sur. (2013) dokazali su pojačanu ekspresiju proteina za popravak dvolančanih lomova putem ne-homolognog spajanja krajeva (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ) Ku70 i Rad51, kod stanica THP-1 izloženih nanomaterijalima (159). Ova osjetljivost stanica THP-1 na oštećenja DNA nakon tretmana nanočesticama, u odnosu na stanice Jurkat tretirane na isti način, ukazuje na razlike u staničnom odgovoru između ove dvije stanične linije koje su pobliže ispitane analizom unosa nanočestica pomoću protočne citometrije i konfokalne mikroskopije.

Slike dobivene konfokalnim mikroskopom pokazale su da je većina nanočestica unesenih u stanice lokalizirana u citoplazmi, a manji udio u jezgrama stanica. Shodno tome, oštećenja DNA zabilježena esejem γ H2AX se većim dijelom mogu pripisati učincima oksidativnog stresa, a manje izravnom vezanju nanočestica na kromosome. Iz slika s konfokalnog mikroskopa također se može vidjeti da nije bilo značajnih interakcija između nanočestica unesenih u stanice, obzirom da je zabilježeno vrlo malo preklapanja signala raspršene svjetlosti (koji su pripisani nanoAg) i fluorescentnog signala nanoPS. Osim toga, dokazano je da nanočestice nisu unesene pojedinačno nego u manjim ili većim nakupinama, što je u skladu sa stupnjem agregacije kakav je utvrđen DLS/ELS analizom.

Slike s konfokalnog mikroskopa dopunjene su rezultatima protočne citometrije, odnosno relativnom kvantifikacijom unosa nanočestica u oba tipa stanica. Iako se protočnim citometrom ne mogu jasno odvojiti stanice koje su unijele nanočestice od stanica s nanočesticama vezanima na staničnu membranu, ova metoda ipak omogućuje usporedbu tretiranih i kontrolnih stanica prema

unosu nanoAg i nanoPS. Dva promatrana parametra su intenzitet postranično raspršene svjetlosti, kojim je moguće pratiti unesenu količinu nanoAg, i intenzitet fluorescentnog signala nanoPS. Za oba tipa nanočestica, dobiven je znatno veći signal u tretiranim stanicama THP-1 u odnosu na tretirane stanice Jurkat, što je pokazalo veći unos nanoAg i nanoPS kod stanica THP-1. Ovaj rezultat bio je očekivan obzirom na funkciju makrofaga u organizmu kao stanica prvenstveno zaduženih za fagocitozu. Veći unos nanočestica također može objasniti i jači intenzitet oksidativnog stresa i veći opseg oštećenja DNA zamijećen kod stanica THP-1 u odnosu na stanice Jurkat.

Važan aspekt interakcije nanočestica sa stanicama imunskog sustava i staničnim linijama dobivenih od leukocita je njihov upalni odgovor, odnosno pokretanje upalne kaskade uzrokovano NM. Za upotrebu NM u medicinske svrhe, neophodno je istražiti njihov potencijal za stvaranje upalne reakcije koja bi mogla oštetiti ljudski organizam ili smanjiti učinkovitost njihove primjene. U stanicama Jurkat i THP-1 tretirane s nanoAg dokazan je porast ekspresije pro-upalnih citokina IL-6, IL-8 i TNF α na razini mRNA. Za stanice Jurkat dodatno je pokazan porast ekspresije IL-2, jednog od ključnih regulatora upalnih procesa u limfocitima, u ovisnosti o dozi primijenjenog nanoAg. Za THP-1 stanice također je pokazan porast ekspresije IL-1 β , jednog od ključnih biljega upale kod makrofaga, nakon tretmana nanoAg i nanoPS. S druge strane, utjecaj nanoPS primijenjenih u istim koncentracijama na ekspresiju IL-6, IL-8 i TNF α bio je puno slabiji. Miješani tretmani, naprotiv, rezultirali su jačom aktivacijom ekspresije citokina nego pojedinačni tretman s nanoAg ili nanoPS, kod oba tipa stanica. Za sve testirane gene kod oba stanična tipa, ovaj fenomen pojačanog upalnog odgovora najizraženiji je bio kod tretmana s 10 mg/L nanoAg i 10 mg/L nanoPS, odnosno kod najveće primijenjene doze nanočestica koje zasebno nisu značajno smanjile vijabilnost stanica.

Utjecaj nanoAg i nanoPS na pokretanje staničnog upalnog odgovora dobro je opisan u literaturi, te je poznato da oba tipa nanočestica pojačavaju ekspresiju pro-upalnih citokina IL-6 i TNF α , na genskoj i proteinskoj razini, u ljudskim stanicama (160, 161). Također, za nanoAg je pokazano da pojačavaju ekspresiju IL-1 β , uz druge pro-upalne citokine, u stanicama THP-1 (162). Učinak nanoAg na pokretanje upalnog odgovora postiže se preko aktivacije jezgrinog faktora κB (engl. *nuclear factor κB* , NF κB) kao odgovor na stvaranje ROS-ova (163). Aktivacija upalnog odgovora identificirana je kao ključna posljedica oksidativnog stresa uzrokovano plastičnim

nanomaterijalima, uključujući nanoPS (32). Ovi rezultati pokazuju da nanoAg i nanoPS primijenjeni zajedno u smjesi mogu potencirati upalnu kaskadu u limfocitima i makrofazima, u usporedbi s pojedinačnim tipom NM, što treba uzeti u obzir prije potencijalne primjene mješavine nanoAg i nanoPS u medicinskom kontekstu.

Posljednji dio istraživanja uključivao je analizu promjena u mehaničkim svojstvima stanica, prvenstveno stanične čvrstoće, kao posljedice tretmana nanočesticama. Kao i za eseje oksidativnog stresa i aktivacije upalnog odgovora, odabrane su koncentracije nanoAg i nanoPS koje nisu značajno smanjile vijabilnost stanica, primijenjene zasebno ili zajedno. Čvrstoća stanica, odnosno citoskeleta, izražena je preko Youngova modula elastičnosti koji predstavlja mjeru krutosti materijala (164, 165). Utjecaj tretmana nanočesticama na funkciju i integritet citoskeleta nije u potpunosti razjašnjen zbog manjka eksperimentalnih podataka o mehanizmima potencijalnih interakcija stanica i NM (166). Xu i sur. (2015) pokazali su da nanoAg smanjuju funkciju čvrstih spojeva (engl. *tight junctions*) i ekspresiju proteina koji ih tvore (167), dok su Setyawati i sur. (2013) dokazali sličan učinak titanskih nanočestica na pukotinske spojeve (engl. *gap junctions*) (168). Također, pokazano je da tretman stanica nanočesticama titan (IV) oksida i željeza može izravno promijeniti strukturu aktinskog citoskeleta i ekspresiju proteina ključnih za staničnu adheziju (169–171). Međutim, navedene promjene u ekspresiji i funkciji sastavnica citoskeleta uzrokovane NM nisu opisane mehanistički, te nisu detaljno razmatrane u kontekstu staničnih promjena uzrokovanih oksidativnim stresom. Kako je upravo oksidativni stres jedan od glavnih procesa kojim su nanoAg i nanoPS smanjile vijabilnost stanica Jurkat i THP-1, izravan utjecaj ROS-ova na stanične makromolekule i posljedične promjene u ekspresiji proteina i regulaciji staničnog ciklusa nužne su za razumijevanje promjena u mehaničkim parametrima stanica. Ova sprega između oksidativnog stresa i svojstava citoskeleta već je pokazana za različite stanične tipove nakon tretmana nanočesticama (172, 173), te su ovdje prikazani rezultati analize AFM-om interpretirani u kontekstu ostalih proučenih parametara – stvaranja ROS-ova, unosa nanočestica, oštećenja staničnih struktura i pokretanja apoptoze.

Tretman stanica Jurkat mješavinom nanoAg/nanoPS značajno je smanjio vrijednost Youngova modula, za razliku od pojedinačnih nanoAg i nanoPS tretmana. Kao i za ostale promatrane parametre stanične vijabilnosti i metabolizma, smjesa NM pokazala je aditivan učinak u odnosu na pojedinačne komponente. Kod stanica THP-1, zasebni tretmani nanoAg i nanoPS

također su značajno smanjili staničnu čvrstoću, kao i tretman smjesom nanoAg/nanoPS. Smanjenje vrijednosti Youngova modula nakon tretmana nanočesticama dokaz je značajnih promjena u strukturi citoskeleta koji dodatno potvrđuje povećanu toksičnost smjese NM u odnosu na njezine sastavnice. Međutim, samo na temelju ovdje prikazanih rezultata nije moguće definitivno zaključiti radi li se o promjenama koje su posljedice oksidativnog stresa i oštećenja DNA ili izravne interakcije nanoAg i nanoPS s proteinima citoskeleta. Uzimajući u obzir da ROS-ovi mogu uzrokovati oksidativno oštećenje aktina, mikrotubula, mikrofilamenata i vimentina (174, 175), te da je vrijednost Youngova modula negativno korelirana s apoptozom (176), smanjena čvrstoća stanica Jurkat i THP-1 očita je posljedica oksidativnog stresa i pokretanjem apoptoze koja je njime uzrokovana. Međutim, podaci konfokalne mikroskopije upućuju na lokalizaciju nanoAg i nanoPS u citoplazmi i jezgri stanica, što otvara mogućnost izravnog vezanja nanočestica za proteine citoskeleta ili za DNA čime bi se mogla mijenjati njihova konformacija i onemogućiti normalna funkcija. Promjene u mehaničkim parametrima stanica stoga nisu jednoznačan dokaz mehanizma interakcije NM i stanica, ali su izuzetno koristan i osjetljiv pokazatelj potencijalnih citopatoloških promjena koji sabire raznolike učinke NM – u ovom slučaju, promjena svojstava citoskeleta može se shvatiti kao posljedica oksidativnog stresa, oštećenja DNA, upalnog odgovora i apoptoze. Na ovaj se način jedan osjetljiv i reproducibilan biljeg može koristiti kao pokazatelj širokog spektra staničnih promjena, što olakšava probir štetnih NM ili njihovih smjesa. Također, dodatne su prednosti ove metode što i) omogućuje analizu živih stanica bez posebne pripreme i obilježavanja uzoraka te ii) nanočestice ne interferiraju s očitanjem rezultata obzirom da se rad uređaja temelji na izravnoj interakciji AFM sonde i stanične površine, bez posredovanja fluorofora.

Važan aspekt ove disertacije, osim štetnih učinaka smjesa NM primijenjenih čak i u malim koncentracijama, je i razlika između dva stanična tipa, Jurkat i THP-1, u odgovoru na tretman nanoAg, nanoPS i njihovim mješavinama. Kod stanica THP-1 pokazan je jači oksidativni stres, veći unos nanočestica, više oštećenja DNA, jači upalni odgovor i veći opseg promjena citoskeleta. S druge strane, sve opisane promjene uzrokovale su manji postotak nekrotičnih i apoptotičnih stanica u usporedbi sa tretmanom stanica Jurkat istim koncentracijama nanočestica. Ove razlike u staničnom odgovoru mogu se pripisati različitim funkcijama stanica Jurkat i THP-1, odnosno imunskih stanica iz kojih su izvorno potekle. Stanice Jurkat modelne su stanice limfocita, dok su stanice THP-1 podrijetlom monociti koji se tretmanom s PMA diferenciraju u makrofage. Veći unos nanočestica u stanice THP-1 se stoga može pripisati fagocitozi, što je prirodna funkcija

makrofaga kada se stanice nađu u kontaktu sa stranim materijalom ili patogenima (131). Posljedično, stanice THP-1 izložene su većoj koncentraciji ROS-ova što dovodi do upalnog odgovora, oštećenja DNA i promjena u mehaničkim svojstvima citoskeleta. Međutim, makrofazi posjeduju nekoliko mehanizama za podnošenje oksidativnog stresa kako bi mogli obavljati svoju funkciju u uvjetima gdje su prisutni oksidansi i pro-upalne signalne molekule (177–179). Uz već spomenute mehanizme popravka DNA koji se pojačano aktiviraju nakon tretmana stanica nanočesticama (157–159), stanice THP-1 bolje su prilagođene od stanica Jurkat na štetan učinak NM i njihovih smjesa, u skladu s ulogama makrofaga u organizmu. Treba naglasiti da, u skladu s ovdje prikazanim rezultatima, treba primijeniti oprez kod interpretacije promjena u biološkim parametrima uzrokovanih tretmanom NM. Iako je za stanice THP-1 zabilježen jači oksidativni stres, veći opseg oštećenja DNA i izraženije smanjenje stanične čvrstoće, zabilježene promjene nisu nepovratno dovele do stanične smrti, kako je pokazano analizom stanica na protočnom citometru. Stanice Jurkat, s druge strane, nisu u jednakoj mjeri neutralizirale posljedice oksidativnog stresa te je zabilježen puno veći postotak mrtvih stanica u usporedbi sa istim tretmanom stanica THP-1. Ovaj rad također ukazuje na važnost testiranja NM i njihovih smjesa na većem broju različitih staničnih linija, kako bi se dobio potpuniji uvid u njihove potencijalne učinke na ljudski organizam prije kliničkih ispitivanja ili šire medicinske primjene.

6. ZAKLJUČCI

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

- nanoAg i nanoPS nisu agregirale u mediju za stanične kulture u kojem je prisutan FBS, te nisu stvorile međusobne interakcije nakon unosa u stanice
- Izlaganje stanica Jurkat i stanica THP-1 nanoAg i nanoPS uzrokovalo je stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta i oksidativni stres u stanicama
- Stanice Jurkat i THP-1 također su pokrenule upalni odgovor i transkripciju pro-upalnih citokina kao rezultat tretmanom nanoAg i nanoPS
- nanoAg i nanoPS uzrokovali su oštećenja staničnih i mitohondrijskih membrana te oštećenja DNA i promjene svojstava citoskeleta u stanicama Jurkat i THP-1
- nanoAg uzrokovala su oštećenja staničnih struktura, apoptozu i nekrozu u većem opsegu nego nanoPS iste koncentracije, kod obje vrste stanica
- stanice Jurkat pokazale su veću osjetljivost, odnosno veći udio mrtvih i apoptotičnih stanica, u odnosu na stanice THP-1 tretirane istim koncentracijama nanoAg i nanoPS
- zajednička primjena nanoAg i nanoPS postigla je značajan aditivan učinak na razini oksidativnog stresa, transkripcije pro-upalnih citokina, promjene citoskeleta, apoptoze i nekroze u odnosu na pojedinačne tipove nanočestica
- koncentracije nanoAg i nanoPS koje su neškodljive kod zasebne primjene uzrokovala su značajne toksične učinke kod oba tipa stanica

7. POPIS LITERATURE

1. European Commission. Commission Recommendation on the definition of nanomaterial. Preuzeto s: https://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm. (pristupljeno: 3. srpnja 2021.).
2. Gleiter H. Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. *Acta Mater* 2000;48:1–29.
3. Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF, Hull DR. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol* 2015;6:1769–80.
4. Zhao Q, Li X, Zhou Q, Wang D, Xu H. Nanomaterials Developed for Removing Air Pollutants. In: Zhao Q, editor. *Advanced Nanomaterials for Pollutant Sensing and Environmental Catalysis*. Elsevier, 2019:203–47.
5. Santhosh C, Velmurugan V, Jacob G, Jeong SK, Grace AN, Bhatnagar A. Role of nanomaterials in water treatment applications: A review. *Chem Eng J* 2016;306:1116–37.
6. Mackevica A, Revilla P, Brinch A, Hansen SF. Current uses of nanomaterials in biocidal products and treated articles in the EU. *Environ Sci Nano* 2016;3:1195–205.
7. Burduşel AC, Gherasim O, Grumezescu AM, Mogoantă L, Fica A, Andronescu E. Biomedical applications of silver nanoparticles: An up-to-date overview. *Nanomaterials* 2018;8:1–25.
8. Huang H, Lovell JF. Advanced Functional Nanomaterials for Theranostics. *Adv Funct Mater* 2017;27:1603524.
9. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm Res* 2016;33:2373–87.
10. Dell’Olio M, Potito Scalzulli R, Sanpaolo G, Nobile M, Saverio Mantuano F, La Sala A, et al. Non-pegylated liposomal doxorubicin (Myocet) in patients with poor-risk aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2011;52:1222–9.

11. Eitan R, Fishman A, Meirovitz M, Goldenberg H, Amit A, Koren C, et al. Liposome-encapsulated doxorubicin citrate (Myocet) for treatment of recurrent epithelial ovarian cancer: A retrospective analysis. *Anticancer Drugs* 2014;25:101–5.
12. Timothy J, Wilson J, Rice E, Hall R. Nanocrystalline hydroxyapatite intervertebral cages induce fusion after anterior cervical discectomy and may be a safe alternative to PEEK or carbon fiber intervertebral cages. *Br J Neurosurg* 2016;30:654–7.
13. Wang Z, Qiao R, Tang N, Lu Z, Wang H, Zhang Z, et al. Active targeting theranostic iron oxide nanoparticles for MRI and magnetic resonance-guided focused ultrasound ablation of lung cancer. *Biomaterials* 2017;127:25–35.
14. Rosenberg M, Ilic K, Juganson K, Ivask A, Ahonen M, Vršek IV, et al. Potential ecotoxicological effects of antimicrobial surface coatings: A literature survey backed up by analysis of market reports. *PeerJ* 2019;2:e6315.
15. Syed MA, Babar S, Bhatti AS, Bokhari H. Antibacterial effects of silver nanoparticles on the bacterial strains isolated from catheterized urinary tract infection cases. *J Biomed Nanotechnol* 2009;5:209–14.
16. Panáček A, Kolář M, Večeřová R, Pruček R, Soukupová J, Kryštof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 2009;30:6333–40.
17. Kasithevar M, Periakaruppan P, Muthupandian S, Mohan M. Antibacterial efficacy of silver nanoparticles against multi-drug resistant clinical isolates from post-surgical wound infections. *Microb Pathog* 2017;107:327–34.
18. Nakamura S, Sato M, Sato Y, Ando N, Takayama T, Fujita M, et al. Synthesis and application of silver nanoparticles (Ag nps) for the prevention of infection in healthcare workers. *Int J Mol Sci* 2019;20:3620.
19. Tran QH, Nguyen VQ, Le AT. Silver nanoparticles: Synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol* 2018;9:049501.
20. Marassi V, Di Cristo L, Smith SGJ, Ortelli S, Blosi M, Costa AL, et al. Silver nanoparticles as a medical device in healthcare settings: A five-step approach for candidate screening of coating agents. *R Soc Open Sci* 2018;5:171113.

21. Akter M, Sikder MT, Rahman MM, Ullah AKMA, Hossain KFB, Banik S, et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *J Adv Res* 2018;9:1–16.
22. Natsuki J. A Review of Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Properties and Applications. *Int J Mater Sci Appl* 2015;4:325.
23. McKeen LW. Plastics Used in Medical Devices. In: Modjarrad K, editor. *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices*. William Andrew Publishing, 2014:21–53.
24. Smirnov AV., Atkin VS, Gorbachev IA, Grebennikov AI, Sinev IV., Simakov VV. Surface Modification of Polystyrene Thin Films by RF Plasma Treatment. *Bionanoscience* 2017;7:680–5.
25. Vachon D, Wnek GE, inventors; Aegis Biosciences LLC, assignee. Medical uses of styrene sulfonate polymers. United States patent US 6,306,419. 2001.
26. Pavithra D, Doble M. Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants - Issues and prevention. *Biomed Mater* 2008;3:034003.
27. Ho BT, Roberts TK, Lucas S. An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach. *Crit Rev Biotechnol* 2018;38:308–20.
28. Lambert S, Wagner M. Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. *Chemosphere* 2016;145:265–8.
29. Labow RS, Meek E, Santerre JP. Hydrolytic degradation of poly(carbonate)-urethanes by monocyte-derived macrophages. *Biomaterials* 2001;22:3025–33.
30. Santerre JP, Woodhouse K, Laroche G, Labow RS. Understanding the biodegradation of polyurethanes: From classical implants to tissue engineering materials. *Biomaterials* 2005;26:7457–70.
31. Jeong J, Choi J. Development of AOP relevant to microplastics based on toxicity mechanisms of chemical additives using ToxCast and deep learning models combined approach. *Environ Int* 2020;137:105557.

32. Hu M, Palić D. Micro- and nano-plastics activation of oxidative and inflammatory adverse outcome pathways. *Redox Biol* 2020;37:101620.
33. Ahlberg S, Meinke MC, Werner L, Epple M, Diendorf J, Blume-Peytavi U, et al. Comparison of silver nanoparticles stored under air or argon with respect to the induction of intracellular free radicals and toxic effects toward keratinocytes. *Eur J Pharm Biopharm* 2014;88:651–7.
34. He W, Zhou YT, Wamer WG, Boudreau MD, Yin JJ. Mechanisms of the pH dependent generation of hydroxyl radicals and oxygen induced by Ag nanoparticles. *Biomaterials* 2012;33:7547–55.
35. Zhu K, Jia H, Sun Y, Dai Y, Zhang C, Guo X, et al. Long-term phototransformation of microplastics under simulated sunlight irradiation in aquatic environments: Roles of reactive oxygen species. *Water Res* 2020;173:115564.
36. Wink DA, Hines HB, Cheng RYS, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol* 2011;89:873–91.
37. Khanna P, Ong C, Bay BH, Baeg GH. Nanotoxicity: An interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. *Nanomaterials* 2015;5:1163–80.
38. Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*, 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2013:953.
39. Gabrielli S, Ortolani C, Del Zotto G, Luchetti F, Canonico B, Buccella F, et al. The Memories of NK Cells: Innate-Adaptive Immune Intrinsic Crosstalk. *J Immunol Res* 2016;2016:1-14.
40. Sun L, Wang X, Saredy J, Yuan Z, Yang X, Wang H. Innate-adaptive immunity interplay and redox regulation in immune response. *Redox Biol* 2020;37:101759.
41. Vroeling AB, Fokkens WJ, Van Drunen CM. How epithelial cells detect danger: Aiding the immune response. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2008;63:1110–23.
42. Clark R, Kupper T. Old meets new: The interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 2005;125:629–37.

43. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783–801.
44. Raza S, McDerment N, Lacaze PA, Robertson K, Watterson S, Chen Y, et al. Construction of a large scale integrated map of macrophage pathogen recognition and effector systems. *BMC Syst Biol* 2010;4:1-8.
45. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 2012;249:158–75.
46. Moresco EMY, LaVine D, Beutler B. Toll-like receptors. *Curr Biol* 2011;21:488–93.
47. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med* 2011 Jul 11;13:e23.
48. Hoebe K, Janssen EM, Kim SO, Alexopoulou L, Flavell RA, Han J, et al. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat Immunol* 2003;4:1223–9.
49. Beutler B. Innate immunity: An overview. *Mol Immunol* 2004;40:845–59.
50. Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell* 2006;124:815–22.
51. Hunter MC, Teijeira A, Halin C. T cell trafficking through lymphatic vessels. *Front Immunol* 2016;7:613.
52. De Kleer I, Willems F, Lambrecht B, Goriely S. Ontogeny of myeloid cells. *Front Immunol* 2014;5:1-11.
53. Italiani P, Boraschi D. Development and functional differentiation of tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in inflammatory reactions. *Results Probl Cell Differ* 2017;62:23–43.
54. Jakubzick C V., Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol* 2017;17:349–62.
55. Auffray C, Fogg D, Garfa M, Elain G, Join-Lambert O, Kayal S, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*

2007;317:666–70.

56. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010;327:656–61.
57. Jakubzick C, Gautier EL, Gibbings SL, Sojka DK, Schlitzer A, Johnson TE, et al. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 2013;39:599–610.
58. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Léone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, et al. Macrophage activation switching: An asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* 2005;142:481–9.
59. Watanabe S, Alexander M, Misharin A V., Budinger GRS. The role of macrophages in the resolution of inflammation. *J Clin Invest* 2019;129:2619–28.
60. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:953–64.
61. Gordon S, Plüddemann A, Martinez Estrada F. Macrophage heterogeneity in tissues: Phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev* 2014;262:36–55.
62. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010;11:889–96.
63. Netea MG, Latz E, Mills KHG, O'Neill LAJ. Innate immune memory: A paradigm shift in understanding host defense. *Nat Immunol* 2015;16:675–9.
64. Lichtnekert J, Kawakami T, Parks WC, Duffield JS. Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves. *Curr Opin Pharmacol* 2013;4:555–64.
65. Martinez FO. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008;13:453–461.
66. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto KI, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: Roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther* 2003;100:171–94.
67. Starr TK, Jameson SC, Hogquist KA. Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:139–76.

68. Krangel MS. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol* 2009;21:133–9.
69. Wan YY. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* 2010;130:166–71.
70. Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8⁺ T Cell Effector Mechanisms in Resistance to Infection. *Annu Rev Immunol* 2000;18:275–308.
71. Osińska I, Popko K, Demkow U. Perforin: An important player in immune response. *Cent Eur J Immunol* 2014;39:109–15.
72. Gulzar N, Copeland K. CD8⁺ T-Cells: Function and Response to HIV Infection. *Curr HIV Res* 2005;2:23–37.
73. Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell* 1995;81:9–12.
74. van der Leun AM, Thommen DS, Schumacher TN. CD8⁺ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. *Nat Rev Cancer* 2020;20:218–32.
75. Savage PA, Klawon DEJ, Miller CH. Regulatory T Cell Development. *Annu Rev Immunol* 2020;38:421–53.
76. Stenken JA, Poschenrieder AJ. Bioanalytical chemistry of cytokines – A review. *Anal Chim Acta* 2015;853:95–115.
77. Vilček J, Feldmann M. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:201–9.
78. Schmitz ML, Weber A, Roxlau T, Gaestel M, Kracht M. Signal integration, crosstalk mechanisms and networks in the function of inflammatory cytokines. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2011;1813:2165–75.
79. Kaur S, Bansal Y, Kumar R, Bansal G. A panoramic review of IL-6: Structure, pathophysiological roles and inhibitors. *Bioorganic Med Chem* 2020;28:115327.
80. Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 2002;72:847–55.
81. Idriss HT, Naismith JH. TNF α and the TNF receptor superfamily: Structure-function

- relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000;50:184–95.
82. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:232–41.
 83. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2014;6:1–16.
 84. Asokanathan N, Graham PT, Fink J, Knight DA, Bakker AJ, McWilliam AS, et al. Activation of Protease-Activated Receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 Stimulates IL-6, IL-8, and Prostaglandin E₂ Release from Human Respiratory Epithelial Cells. *J Immunol* 2002;168:3577–85.
 85. Dienz O, Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clin Immunol* 2009;130:27–33.
 86. Muraguchi AT, Hirano TO, Tang BO, Matsuda T, Horii Y, et al. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *The Journal of experimental medicine* 1988;167:332–44..
 87. Somers W, Stahl M, Seehra JS. 1.9 Å crystal structure of interleukin 6: Implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J* 1997;16:989–97.
 88. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 1994;56:559–64.
 89. Haslett C, Savill JS, Meagher L. The neutrophil. *Curr Opin Immunol* 1989;2:10–8.
 90. Alfaro C, Sanmamed MF, Rodríguez-Ruiz ME, Teijeira Á, Oñate C, González Á, et al. Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up. *Cancer Treat Rev* 2017;60:24–31.
 91. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 Directly Enhanced Endothelial Cell Survival, Proliferation, and Matrix Metalloproteinases Production and Regulated Angiogenesis. *J Immunol* 2003;170:3369–76.
 92. Remick DG. Interleukin-8. *Crit Care Med* 2005;33:466–7.
 93. Gerber N, Lowman H, Artis DR, Eigenbrot C. Receptor-binding conformation of the

- “ELR” motif of IL-8: X-ray structure of the L5C/H33C variant at 2.35 Å resolution. *Proteins Struct Funct Genet* 2000;38:361–7.
94. Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G. Role of tumor necrosis factor- α in rheumatoid arthritis: A review. *APLAR J Rheumatol* 2007;10:270–4.
 95. Savard CE, Blinman TA, Choi HS, Lee SK, Pandol SJ, Lee SP. Expression of cytokine and chemokine mRNA and secretion of tumor necrosis factor- α by gallbladder epithelial cells: Response to bacterial lipopolysaccharides. *BMC Gastroenterol* 2002;2:1–7.
 96. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors (activated macrophage). *Immunology* 1975;72:3666–70.
 97. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 1893;105:487–516.
 98. Clark IA. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18:335–43.
 99. Vassalli P. The Pathophysiology Of Tumor Necrosis Factors. *Annu Rev Immunol* 1992;10:411–52.
 100. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2010;20:87–103.
 101. Blevitt JM, Hack MD, Herman KL, Jackson PF, Krawczuk PJ, Lebsack AD, et al. Structural Basis of Small-Molecule Aggregate Induced Inhibition of a Protein-Protein Interaction. *J Med Chem* 2017;60:3511–7.
 102. Atkins E. Pathogenesis of Fever. *Physiol Rev* 1960;40:580–646.
 103. March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 1985;315:641–7.
 104. Graves BJ, Hatada MH, Hendrickson WA, Miller JK, Madison VS, Satow Y. Structure of interleukin 1 α at 2.7-Å resolution. *Biochemistry* 1990;29:2679–84.

105. Dinarello CA. The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* 1994;8:1314–25.
106. Yu B, Blaber M, Gronenborn AM, Clore GM, Caspar DLD. Disordered water within a hydrophobic protein cavity visualized by x-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:103–8.
107. Liu Y, Hardie J, Zhang X, Rotello VM. Effects of engineered nanoparticles on the innate immune system. *Semin Immunol* 2017;34:25–32.
108. Kim S, Oh WK, Jeong YS, Hong JY, Cho BR, Hahn JS, et al. Cytotoxicity of, and innate immune response to, size-controlled polypyrrole nanoparticles in mammalian cells. *Biomaterials* 2011;32:2342–50.
109. Talamini L, Violatto MB, Cai Q, Monopoli MP, Kantner K, Krpetić Ž, et al. Influence of Size and Shape on the Anatomical Distribution of Endotoxin-Free Gold Nanoparticles. *ACS Nano* 2017;11:5519–29.
110. Walkey CD, Olsen JB, Song F, Liu R, Guo H, Olsen DWH, et al. Protein corona fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. *ACS Nano* 2014;8:2439–55.
111. Nierenberg D, Khaled AR, Flores O. Formation of a protein corona influences the biological identity of nanomaterials. *Reports Pract Oncol Radiother* 2018;23:300–8.
112. Saha K, Rahimi M, Yazdani M, Kim ST, Moyano DF, Hou S, et al. Regulation of Macrophage Recognition through the Interplay of Nanoparticle Surface Functionality and Protein Corona. *ACS Nano* 2016;10:4421–30.
113. Huang YW, Wu CH, Aronstam RS. Toxicity of transition metal oxide nanoparticles: Recent insights from in vitro studies. *Materials* 2010;3:4842–59.
114. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997;82:291–5.
115. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:23–6.
116. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993;23:21–48.

117. Rinna A, Torres M, Forman HJ. Stimulation of the alveolar macrophage respiratory burst by ADP causes selective glutathionylation of protein tyrosine phosphatase 1B. *Free Radic Biol Med* 2006;41:86–91.
118. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007;87:245–313.
119. Evelson P, Travacio M, Repetto M, Llesuy S, Escobar J, Lissi EA. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys* 2001;388:261–6.
120. Abraham RT, Weiss A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat Rev Immunol* 2004;4:301–8.
121. Gillis S, Watson J. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med* 1980;152:1709–19.
122. Roose JP, Diehn M, Tomlinson MG, Lin J, Alizadeh AA, Botstein D, et al. T cell receptor-independent basal signaling via Erk and Abl kinases suppresses RAG gene expression. *PLoS Biol* 2003;1:271-287.
123. Bosshart H, Heinzelmann M. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann Transl Med* 2016;4:4–7.
124. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* 2014;23:37–45.
125. Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, Newham P, Perkins ND. Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages. *BMC Immunol* 2007;8:1–17.
126. Forrester MA, Wassall HJ, Hall LS, Cao H, Wilson HM, Barker RN, et al. Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. *Cell Immunol* 2018;332:58–76.
127. Zent CS, Elliott MR. Maxed out macs: physiologic cell clearance as a function of

- macrophage phagocytic capacity. *FEBS J* 2017;284:1021–39.
128. Geiser M, Ph D. Update on Macrophage Clearance of Inhaled. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2010;23:207–17.
 129. Bae YH, Park K. Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. *J Control Release* 2011;153:198–205.
 130. Florence AT. “Targeting” nanoparticles: The constraints of physical laws and physical barriers. *J Control Release* 2012;164:115–24.
 131. Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, Ghandehari H. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem. *Nano Today* 2015;10:487–510.
 132. Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Arch Toxicol* 2012;86:1123–36
 133. Liang L, Cui M, Zhang M, Zheng P, Deng Z, Gao S, et al. Nanoparticles’ interference in the evaluation of in vitro toxicity of silver nanoparticles. *RSC Adv* 2015;5:67327–34.
 134. 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;8:16114–41.
 135. Tsuzuki T. Commercial scale production of inorganic nanoparticles. *Int J Nanotechnol* 2009;6:567–78.
 136. Koczur KM, Mourdikoudis S, Polavarapu L. The versatile role of PVP in nanoparticle synthesis Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalt Trans* 2016;1:1–24.
 137. Kumar G, Degheidy H, Casey BJ, Goering PL. Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. *Food Chem Toxicol* 2015;85:45–51.
 138. Zucker RM, Daniel KM, Massaro EJ, Karafas SJ, Degn LL, Boyes WK. Detection of silver nanoparticles in cells by flow cytometry using light scatter and far-red fluorescence. *Cytometry A* 2013;83:962–72.
 139. Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. γ H2AX: A sensitive molecular marker of DNA

- damage and repair. *Leukemia* 2010;24:679–86.
140. Nitin N, Javier DJ, Roblyer DM, Richards-Kortum R. Widefield and high-resolution reflectance imaging of gold and silver nanospheres. *J Biomed Opt* 2007;12:051505.
 141. Guggenheim EJ, Khan A, Pike J, Chang L, Lynch I, Rappoport JZ. Comparison of confocal and super-resolution reflectance imaging of metal oxide nanoparticles. *PLoS One* 2016;11:1–26.
 142. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25:402–8.
 143. Ferdous Z, Nemmar A. Health impact of silver nanoparticles: A review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21:2375.
 144. Butler KS, Peeler DJ, Casey BJ, Dair BJ, Elespuru RK. Silver nanoparticles: Correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. *Mutagenesis* 2015;30:577–91.
 145. Lu W, Senapati D, Wang S, Tovmachenko O, Singh AK, Yu H, et al. Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. *Chem Phys Lett* 2010;487:92–6.
 146. Kwok KWH, Dong W, Marinakos SM, Liu J, Chilkoti A, Wiesner MR, et al. Silver nanoparticle toxicity is related to coating materials and disruption of sodium concentration regulation. *Nanotoxicology* 2016;10:1306–17.
 147. De Matteis V, Cascione M, Toma CC, Leporatti S. Silver nanoparticles: Synthetic routes, in vitro toxicity and theranostic applications for cancer disease. *Nanomaterials* 2018;8:319.
 148. Cook JA, Iype SN, Mitchell JB. Differential Specificity of Monochlorobimane for Isozymes of Human and Rodent Glutathione S-Transferases. *Cancer Res* 1991;51:1606–12.
 149. Baracca A, Sgarbi G, Solaini G, Lenaz G. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: Evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2003;1606:137–46.

150. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *Biotechniques* 2011;50:98–115.
151. Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\delta\psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 2003;8:115–28.
152. Jeggo PA, Löbrich M. DNA double-strand breaks: Their cellular and clinical impact? *Oncogene* 2007;26:7717–9.
153. Woodbine L, Brunton H, Goodarzi AA, Shibata A, Jeggo PA. Endogenously induced DNA double strand breaks arise in heterochromatic DNA regions and require ataxia telangiectasia mutated and Artemis for their repair. *Nucleic Acids Res* 2011;39:6986–97.
154. Sharma V, Collins LB, Chen T, Herr N, Takeda S, Sun W, et al. Oxidative stress at low levels can induce clustered DNA lesions leading to NHEJ mediated mutations. *Oncotarget* 2016;7:25377–90.
155. Chatterjee N, Eom HJ, Choi J. Effects of silver nanoparticles on oxidative DNA damage-repair as a function of p38 MAPK status: A comparative approach using human Jurkat T cells and the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Mol Mutagen* 2014;55:122–33.
156. Eom HJ, Choi J. p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environ Sci Technol* 2010;44:8337–42.
157. Gurunathan S, Kang MH, Jeyaraj M, Kim JH. Differential immunomodulatory effect of graphene oxide and vanillin-functionalized graphene oxide nanoparticles in human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Mol Sci* 2019;20:247.
158. Gurunathan S, Jeyaraj M, Kang M-H, Kim J-H. The Effects of Apigenin-Biosynthesized Ultra-Small Platinum Nanoparticles on the Human Monocytic THP-1 Cell Line. *Cells* 2019;8:444.
159. Khatri M, Bello D, Pal AK, Cohen JM, Woskie S, Gassert T, et al. Evaluation of cytotoxic, genotoxic and inflammatory responses of nanoparticles from photocopiers in three human cell lines. *Part Fibre Toxicol* 2013;10:1–22.

160. Hwang J, Choi D, Han S, Jung SY, Choi J, Hong J. Potential toxicity of polystyrene microplastic particles. *Sci Rep* 2020;10:1–12.
161. Martínez-Gutierrez F, Thi EP, Silverman JM, de Oliveira CC, Svensson SL, Hoek A Vanden, et al. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2012;8:328–36.
162. Murphy A, Casey A, Byrne G, Chambers G, Howe O. Silver nanoparticles induce pro-inflammatory gene expression and inflammasome activation in human monocytes. *J Appl Toxicol* 2016;36:1311–20.
163. Syed S, Zubair A, Frieri M. Immune response to nanomaterials: Implications for medicine and literature review. *Curr Allergy Asthma Rep* 2013;13:50–7.
164. Gardel ML, Kasza KE, Brangwynne CP, Liu J, Weitz DA. Chapter 19 Mechanical Response of Cytoskeletal Networks. *Methods Cell Biol* 2008;89:487–519.
165. Pegoraro AF, Janmey P, Weitz DA. Mechanical properties of the cytoskeleton and cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2017;9:e022038.
166. Septiadi D, Crippa F, Moore TL, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A. Nanoparticle–Cell Interaction: A Cell Mechanics Perspective. *Adv Mater* 2018;30:1–30.
167. Xu L, Dan M, Shao A, Cheng X, Zhang C, Ayokel RA, et al. Silver nanoparticles induce tight junction disruption and astrocyte neurotoxicity in a rat blood-brain barrier primary triple coculture model. *Int J Nanomedicine* 2015;10:6105–19.
168. Setyawati MI, Tay CY, Chia SL, Goh SL, Fang W, Neo MJ, et al. Titanium dioxide nanomaterials cause endothelial cell leakiness by disrupting the homophilic interaction of VE-cadherin. *Nat Commun* 2013;4:1–12.
169. Soenen SJH, Nuytten N, De Meyer SF, De Smedt SC, De Cuyper M. High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling. *Small* 2010;6:832–42.
170. Hou Y, Cai K, Li J, Chen X, Lai M, Hu Y, et al. Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells. *Int J*

Nanomedicine 2013;8:3619–30.

171. Wu X, Tan Y, Mao H, Zhang M. Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells. *Int J Nanomedicine* 2010;5:385–99.
172. Buyukhatipoglu K, Clyne AM. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *J Biomed Mater Res - Part A* 2011;96:186–95.
173. Sun S, Wong S, Mak A, Cho M. Impact of oxidative stress on cellular biomechanics and rho signaling in C2C12 myoblasts. *J Biomech* 2014;47:3650–6.
174. Allani PK, Sum T, Bhansali SG, Mukherjee SK, Sonee M. A comparative study of the effect of oxidative stress on the cytoskeleton in human cortical neurons. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;196:29–36.
175. Farah ME, Sirotkin V, Haarer B, Kakhniashvili D, Amberg DC. Diverse protective roles of the actin cytoskeleton during oxidative stress. *Cytoskeleton* 2011;68:340–54.
176. Kim KS, Cho CH, Park EK, Jung MH, Yoon KS, Park HK. AFM-Detected apoptotic changes in morphology and biophysical property caused by paclitaxel in Ishikawa and HeLa cells. *PLoS One* 2012;7:e30066.
177. Giese, Steven P. Macrophage antioxidant protection within atherosclerotic plaques. *Front Biosci* 2009;14:1230.
178. Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GRY. Molecular and cellular mechanisms of Macrophage survival in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 2012;107:1-12.
179. Wang P, Geng J, Gao J, Zhao H, Li J, Shi Y, et al. Macrophage achieves self-protection against oxidative stress-induced ageing through the Mst-Nrf2 axis. *Nat Commun* 2019;10:1-16.

8. POPIS KRATICA

AAS	atomska apsorpcijska spektroskopija (engl. <i>atomic absorption spectroscopy</i>)
AFM	atomska mikroskopija sila (engl. <i>atomic force microscopy</i>)
ANOVA	analiza varijance (engl. <i>analysis of variance</i>)
CD11b	grozd diferencijacije 11b (engl. <i>cluster of differentiation 11b</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil indol
DCFH-DA	2',7'-diklorofluorescein diacetat
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. <i>dynamic light scattering</i>)
ELS	elektroforetsko raspršenje svjetlosti (engl. <i>electrophoretic light scattering</i>)
FITC	fluorescein izotiocijanat
IL-1 β	interleukin 1 β
IL-2	interleukin 2
IL-6	interleukin 6
IL-8	interleukin 8
mBCl	monoklorobiman
nanoAg	nanočestice srebra
nanoPS	nanočestice polistirena
NF- κ B	jezgrin faktor κ B (engl. <i>nuclear factor κB</i>)
PAMP	molekulski obrasci povezani s patogenima
PBS	puferirana fiziološka otopina (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PMA	forbol 12-miristat 13-acetat
PRR	receptori za prepoznavanje obrazaca (engl. <i>pattern recognition receptor</i>)

PVP	poli (vinilpirolidon)
SSC	postranično raspršena svjetlost (engl. <i>side-scatter light</i>)
Rh123	rodamin123
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute medij
TCR	receptor T stanica (engl. <i>T cell receptor</i>)
TLR	receptor nalik Toll proteinu (engl. <i>Toll-like receptor</i>)
TNF α	čimbenik nekroze tumora α (engl. <i>tumor necrosis factor α</i>)
TRITC	tetrametilrodami

9. ŽIVOTOPIS

Krunoslav Ilić rođen je 27. studenog 1990. u Bjelovaru. Studij molekularne biologije upisao je na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu 2009. godine, a titulu magistra molekularne biologije (mag.biol.mol) stekao je 2015. godine. Od 2014. do 2017. godine bio je zaposlen u Fidelti d.o.o. kao mlađi znanstvenik u odjelu *In vitro* farmakologije. 2017. godine zaposlio se na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada kao asistent u Jedinici za dozimetriju zračenja i radiobiologiju, a 2018. godine upisao je poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu. U sklopu COST akcije CA15114 boravio je u Tallinnu u Estoniji od 01. do 28. travnja 2018. godine na STSM suradnji (*Short Term Scientific Mission*). Od 15. ožujka do 15. travnja 2018. boravio je u Grazu u Austriji radi suradnje na bilateralnom austrijsko-hrvatskom projektu „NanoPasS - Pharmacokinetic profiling of silver nanoparticles: the role of biological barriers”. Sudjelovao je na 14. međunarodnoj školi biofizike Greta Pifat Mrzljak, koja se održala u periodu od 23. kolovoza do 01. rujna 2018. godine u Splitu. Dobitnik je stipendije Francuske vlade za studij i stručno usavršavanje te je boravio u Marseilleu u Francuskoj od 20. listopada do 20. studenog 2019., u grupi dr.sc. Felixa Rica na Sveučilištu Aix-Marseille.

Znanstveni radovi (CC):

Ilić K, Krce L, Rodriguez-Ramos J, Rico F, Kalčec N, Aviani I, et al. Cytotoxicity of nanomixture: combined action of silver and plastic nanoparticles on immortalized human lymphocytes. *J. Trace Elem Med Biol* 2022;73:127004

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;110:2250-61.

Lovaković BT, 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.

Pavičić I, Milić M, Pongrac IM, Ahmed LB, Glavan TM, Ilić K, et al. Neurotoxicity of silver nanoparticles stabilized with different coating agents: In vitro response of neuronal precursor cells. *Food Chem Toxicol* 2020;136:110935.

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.

Marjanović Čermak AM, Ilić K, Pavičić I. Microtubular structure impairment after GSM-modulated RF radiation exposure. *Arh Hig Rada Toksikol* 2020;71:205-10.

Vuković B, Milić M, Dobrošević B, Milić M, Ilić K, Pavičić I, et al. Surface Stabilization Affects Toxicity of Silver Nanoparticles in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Nanomaterials*. 2020;10:1390.

Ilić K, Selmani A, Milić M, Glavan TM, Zapletal E, Čurlin M, et al. The shape of titanium dioxide nanomaterials modulates their protection efficacy against ultraviolet light in human skin cells. *J Nanopart Res* 2020;22:1-3.

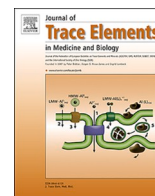
Cedilak M, Banjanac M, Belamarić D, Radičević AP, Faraho I, Ilić K, et al. Precision-cut lung slices from bleomycin treated animals as a model for testing potential therapies for idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2019;55:75-83.

Roje Ž, Ilić K, Galić E, Pavičić I, Turčić P, Stanec Z, et al. Synergistic effects of parabens and plastic nanoparticles on proliferation of human breast cancer cells. *Arh Hig Rada Toksikol* 2019;70:310-4.

10. PRILOG

Znanstveni rad objavljen u časopisu „Journal of Trace Elements in Biology and Medicine“, zastupljenom u bazi Current Contents, koji sadrži rezultate prikazane u ovom doktorskom radu:

Ilić K, Krce L, Rodriguez-Ramos J, Rico F, Kalčec N, Aviani I, Turčić P, Pavičić I, Vrčec IV. Cytotoxicity of nanomixture: combined action of silver and plastic nanoparticles on immortalized human lymphocytes. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2022 May 20:127004.



Cytotoxicity of nanomixture: Combined action of silver and plastic nanoparticles on immortalized human lymphocytes

Krunoslav Ilić^a, Lucija Krce^b, Jorge Rodriguez-Ramos^c, Felix Rico^c, Nikolina Kalčec^a, Ivica Aviani^b, Petra Turčić^d, Ivan Pavičić^a, Ivana Vinković Vrček^{a,*}

^a Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatia

^b University of Split, Faculty of Science, Department of Physics, Split, Croatia

^c Aix-Marseille University, INSERM, CNRS, LAL, 13009 Marseille, France

^d University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia

ARTICLE INFO

Keywords:

Silver
Polystyrene
Nanoparticles
Jurkat cells
Cytotoxicity
Uptake
Oxidative stress

ABSTRACT

Background: Silver nanoparticles (AgNP) are one of the most commercialized types of nanomaterials, with a wide range of applications owing to their antimicrobial activity. They are particularly important in hospitals and other healthcare settings, where they are used to maintain sterility of surfaces, textiles, catheters, medical implants, and more. However, AgNP can not only harm bacteria, but also damage mammalian cells and tissue. While the potential toxicity of AgNP is an understood risk, there is a lack of data on their toxicity in combination with polymeric materials, especially plastic nanoparticles such as polystyrene nanoparticles (PSNP) that can be released from surfaces of polystyrene devices during their medical use.

Aim: This study aimed to investigate combined effect of AgNP and nanoplastics on human immune response.

Methods: Cells were treated with a range of PSNP and AgNP concentrations, either applied alone or in combination. Cytotoxicity, induction of apoptosis, generation of oxidative stress, uptake efficiency, intracellular localization and nanomechanical cell properties were selected as exposure biomarkers.

Results: Collected experimental data showed that nanomixture induced oxidative stress, apoptosis and mortality of Jurkat cells stronger than its individual components. Cell treatment with AgNP/PSNP mixture also significantly changed cell mechanical properties, evidenced by reduction of cells' Young Modulus.

Conclusion: AgNP and PSNP showed additive toxic effects on immortalized human lymphocytes, evidenced by increase in cellular oxidative stress, induction of apoptosis, and reduction of cell stiffness. These results have important implications for using AgNP and PSNP in medical contexts, particularly for long-term medical implants.

1. Introduction

Silver nanoparticles (AgNP) are one of the most commercialized nanomaterials, with a wide variety of applications ranging from food packaging and antimicrobial textiles to mold remediation and water disinfection [1]. Healthcare sector represents a very prominent and promising field for their use, where antimicrobial properties of silver have been utilized in fighting against hospital-acquired infections (HAI) [2–4]. AgNP are already used in many different medical devices including dental implants and prostheses, catheters, endotracheal tubes, wound dressing materials, etc [5]. Their well-described antibacterial properties make them an attractive option for maintaining sterility of

implanted medical devices, while surface modifications may enable fine-tuning of their biocidal activity [6]. Despite their enormous potential and versatility, their well-described toxic action at cellular level should be considered during design and development of such devices [7]. AgNP toxicity is mediated by silver ions released from the nano-surface, which trigger the generation of reactive oxygen species (ROS) and subsequent damage to biomembranes, proteins and nucleic acids [8]. Toxicity of AgNP depends on their physico-chemical properties such as size, shape, ζ potential, surface functionalization, dose, and aggregation behavior [9,10]. Consequently, variable cytotoxicity profiles can be expected for different AgNP types [9]. While the necessity of AgNP toxicity testing is well understood for development of safe

* Corresponding author.

E-mail address: ivinkovic@imi.hr (I. Vinković Vrček).

<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.127004>

Received 21 July 2021; Received in revised form 9 April 2022; Accepted 17 May 2022

Available online 20 May 2022

0946-672X/© 2022 Elsevier GmbH. All rights reserved.

AgNP-enabled products, a problem that received far less attention is AgNP behavior and effects during contact with different material, such as polymeric materials in medical devices, antimicrobial AgNP-impregnated textiles, silver-containing dental implants, etc. These effects need to be evaluated on a case-by-case basis in relevant *in vitro* and *in vivo* models, depending on potential medical applications of AgNP. Interactions between AgNP and other types of materials, and potential toxicity of such mixtures, is also of great importance because of their presence and persistence in the environment [11,12]. As worldwide production and use of AgNP is steadily increasing, their ecotoxicity should be considered during development of novel AgNP applications [1]. Although effects of AgNP on different ecosystems has yet to be fully elucidated [13], data published so far justify concern over their environmental impact [14–17].

Synthetic materials, such as various types of plastic polymers, are potential candidates for co-application with AgNP in medical devices as they could provide scaffolds for AgNP deposition and possibly control of their release. Polystyrene is such material that is already extensively used in a multitude of different settings. Polystyrene is a colorless, hard plastic with a wide variety of applications in industrial and commercial products [18]. Due to its excellent properties and biocompatibility, it has also found uses in medical and research applications such as diagnostic instruments and disposable laboratory ware, Petri dishes, tissue culture components, flasks, and pipettes [18,19]. It is also used as scaffolding material for wound dressing and artificial organs, such as the liver [20,21]. While its stability and resistance towards degradation has been claimed [22], Lambert et al. [23] evidenced continuous erosion of polystyrene surface and release of nano-sized polystyrene particles even under mild conditions (30 °C in demineralized water). Moreover, polystyrene was implicated in complex interactions with blood leukocytes, particularly monocyte-derived macrophages, which resulted in changes in their enzymatic activity and oxidative stress induction [24, 25]. These results are early warnings for potential "in human" degradation of medical devices and implants designed for long-term use. Due to the ubiquity and longevity of plastic materials, they form the basis of many types of medical devices [18] and are found in AgNP-enabled medical products leading to potential co-exposure effects. Moreover, the presence of enormous quantities of various plastic materials in the environment, including polystyrene, is a problem that cannot be overstated [26–28]. The issue is compounded by generation of plastic micro- and nanoparticles by degradation in the environment, as these particles can be ingested by both invertebrates and vertebrates and cause a range of health problems [29,30]. As with AgNP, toxicity of plastic nanoparticles could be changed if they come in contact with other materials, a point that has yet to receive adequate attention by the scientific community.

The effect of PSNP on human health is yet to be understood fully, but the ubiquity of plastic materials and potential hazards they represent spurred research efforts to understand and categorize the adverse effects of nano-plastics. To that end, the available literature data identified activation of oxidative and inflammatory response as possible adverse Outcome Pathways (AOP) [31] for micro- and nanoplastics that are initiated at molecular level by generation of free radicals [32]. Subsequent key events include DNA damage, inflammation, lipid peroxidation, neurotoxicity and initiation of carcinogenesis [32,33].

In the case of co-application of polystyrene material and AgNP in medical devices, their interactions and joint action should be considered at the complex interface between polystyrene scaffolding that may release PSNP, AgNP-based antimicrobial coatings, and immune cells that come in contact with these materials. In particular, circulating lymphocytes and monocytes, as well as resident tissue macrophages, are representative cell classes at the site of implantation. To date, there is no scientific data on the effects of PSNP/AgNP combination on immune response in mammalian cells. This study aimed to unravel the consequences of exposing Jurkat cells, an immortalized human T lymphocytes, to this nanomixture. Cells were treated with a range of PSNP and

AgNP concentrations, either applied alone or in combination. Cytotoxicity, induction of apoptosis, generation of oxidative stress, uptake efficiency and intracellular localization were selected as exposure biomarkers. Due to possible effects of cell culture medium on behavior of NP, as well as protein corona formation on nanosurfaces in such medium, all experiments were performed with and without serum proteins in the culture medium. Serum proteins are known to affect nano-related properties such as size, charge and aggregation behavior which are important for their biological activity [34]. Thus, experiments were performed with and without serum proteins in cell culture media to elucidate the role of protein corona on AgNP and PSNP properties and their biological effect.

2. Materials and methods

2.1. Nanoparticles preparation and characterization

Commercially available PSNP (Phosphorex, 20 nm diameter, stock concentration – 10.5 g/L, cat.nr. 102, Hopkinton, MA, USA) and fluorescent PSNP (emission 460–500 nm, Phosphorex, 20 nm diameter, stock concentration – 10.5 g/L, cat.nr. 2100, USA) were used in the study, while AgNP were synthesized by reducing silver nitrate with sodium borohydride (both purchased from Merck, Darmstadt, Germany) using poly(vinyl)pyrrolidone (PVP) as surface coating agent (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) according to the procedure published elsewhere [35]. Briefly, PVP was dissolved in ultrapure water (UPW) to the final concentrations of 75 µM. Then, 5 mL of 90 mM AgNO₃ was added to 200 mL of PVP solution, under constant stirring on IKA RCT basic magnetic stirrer plate (IKA Werke, Germany). To this mixture, 2 mL of 320 mM NaBH₄ was added dropwise (approximately 1 drop/sec), and the mixture was left under constant stirring for 45 min at room temperature, protected from light. Finally, freshly synthesized AgNP were purified by centrifugation at 15,000g for 40 min, resuspended in UPW and kept in the dark at 4 °C. In order to ensure good purification, the precipitation and re-suspension were performed twice using the same conditions. Total Ag concentration in AgNP suspensions was determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) (Perkin Elmer AAnalyst 600, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) with Zeeman background correction. Calibration was performed using Ag standard solution (1000 mg/L in 5% HNO₃) purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Size distribution and surface charge of AgNP and PSNP were determined by dynamic (DLS) and electrophoretic light scattering (ELS) methods, respectively, using a Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Prior to AgNP and PSNP sample analysis, the performance of the instrument was evaluated using standard polystyrene beads of 20 and 50 nm diameter (Thermo Scientific™ 3000 Series Nanosphere™ products, cat. nr. 3020 A and 3050 A, respectively). These polystyrene bead sizes were chosen due to similarity in size to AgNP and PSNP used in our experiments. All data were processed with Zetasizer software 6.32 (Malvern, UK). Size distribution results are given as an average value of 10 measurements obtained from volume distributions. The surface charge was obtained through electrophoretic ζ potential and reported as an average value of 5 measurements. Additionally, both NP types were visualized using a transmission electron microscope (TEM) and atomic force microscopy (AFM). TEM instrument (Zeiss 902 A, Oberkochen, Germany) operated in bright field mode at an acceleration voltage of 80 kV for AgNP samples and 120 kV for PSNP samples. Images were taken using a Canon PowerShot S50 camera (Canon, Tokyo, Japan). Samples were prepared by depositing a drop of the AgNP or PSNP suspensions on a Formvar®-coated copper grid (Agar Scientific, Stansted, UK) and air-dried at room temperature. TEM images were used for measurement of AgNP and PSNP primary sizes. The size was determined from the cross-sectional area of the particles which was converted to an equivalent spherical diameter by using ImageJ software. Primary particles were distinguished from aggregates by tracing them manually. Altogether at least

100 particles per particle type were measured.

PSNP and AgNP were further characterized by AFM. The same preparation protocol was done for AgNP and PSNP. The specimen preparation started by nanoparticle (2 mg/L) overnight incubation in sterile PBS. The following day, freshly cleaved mica sheets were coated with a poly-L-lysine solution (0.1% w/v in H₂O) for 5 min. Coated mica sheets were then rinsed with UPW and air-dried at room temperature. Topography measurements were performed in the AC-mode at ambient conditions using a Nanowizard IV system (JPK/Bruker, Billerica, Massachusetts, USA). The used rectangular silicone probe (TSPA-V2, Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) characterized for a tip radius of 7 nm (typical), spring constant of 37 N/m and resonance frequency of 320 kHz. The setpoint of the amplitude used for imaging was set as ~60% of the free oscillation amplitude (~20 nm). Topography was obtained for 4 × 4 μm scan sizes and 1024 pixels/line.

Dissolution of AgNP was evaluated in UPW, RPMI1640 cell culture medium (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), and RPMI1640 supplemented with 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) by diluting the AgNP or AgNP/PSNP (1:1) suspensions at a final concentration of 10 mg Ag/L. Aliquots were taken and subjected to ultrafiltration using Amicon-4 Ultra centrifugal filter units with a cut-off size of 3 kDa (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) at the 15,000g for 30 min. This procedure effectively removed all AgNP. Obtained filtrates were immediately acidified with HNO₃ (Merck, Darmstadt, Germany) to a final acid content of 1% (v/v). The concentration of ionic Ag in filtrates was measured with GFAAS (Perkin Elmer Analyst 600, Perkin Elmer, Waltham, USA). Dissolution is reported as % of Ag concentration found in filtrates compared to total Ag content. All experiments were done in triplicates.

Evaluation of AgNP, PSNP and AgNP/PSNP colloidal stability was conducted using three different dispersion media: UPW, RPMI1640 medium supplemented with 1% Antibiotic/Antimycotic, and RPMI1640 supplemented with 10% (v/v) FBS and 1% Antibiotic/Antimycotic (AA, all obtained from Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). In each dispersion experiment, AgNP and PSNP were applied at a total concentration of 10 mg/L and monitored for the period of 24 h for changes in size distribution, surface charge and dissolution behavior.

2.2. Cell culture

Jurkat cells (ATCC, cat.nr. TIB-152, Manassas, Virginia, USA) were used as cellular model because their morphology and activity faithfully reproduces human T lymphocytes biology [36]. Cells were grown in T75 flasks (Eppendorf, Hamburg, Germany) in RPMI1640 cell culture medium (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) supplemented with 10% (v/v) FBS and 1% (v/v) AA at 37 °C and 5% CO₂ until reaching a concentration of 1 000 000 cells/mL. Cells were then seeded in 12-well plates (Eppendorf, Hamburg, Germany) in 1 mL/well of cell culture medium at 100 000/mL density, or in black 96-well plates (Eppendorf, Hamburg, Germany) in 100 μL/well of cell culture medium at 20, 000/well density. Plates were incubated overnight at 37 °C and 5% CO₂.

2.3. Flow cytometry evaluation of cell death and apoptosis induction

The day after cell seeding in 12-well plates, plates were centrifuged for 5 min at 2000 × g, the cell culture medium was removed, and fresh medium was added (with or without 10% (v/v) FBS), after which 10x concentrated working solutions of PSNP in sterile PBS or AgNP in sterile UPW were added to wells to obtain desired concentrations. For combined AgNP and PSNP treatments, 800 μL of fresh medium was added, followed by 200 μL of 10x concentrated NP mixture in sterile PBS pre-incubated at room temperature for 30 min. Cells were also treated with ionic silver (Ag⁺) by adding AgNO₃ (Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA) water solutions to cell culture medium. AgNO₃ was added in 10, 25, 50, 75 and 100 μM concentrations, which corresponded to 1.7, 4.2, 8.5, 12.7 and 17.0 mg Ag/L of Ag⁺, respectively. Negative controls were

cells treated with 100 μL of PBS, while positive controls were cells treated with 100 μL of DMSO (Kemika, Zagreb, Croatia). Cells were incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Following the incubation, samples for flow cytometry were prepared by collecting cells and staining them with Annexin V Kit (Bio Rad, Hercules, California, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells stained by Annexin V-FITC dye were labeled apoptotic, propidium iodide (PI)-stained cells were categorized as necrotic/late apoptotic, and cells that were not stained with either of the kit's dyes were categorized as live intact cells. AgNP uptake was determined from the intensities of side scatter light (SSC) of analyzed cells, as SSC values correlate with the extent of AgNP uptake [37]. For side-scatter light experiments, 488 nm laser (blue laser) was used, and refracted light was collected at 90° from the laser's path. As different refractive indices could have an impact on interpretation of scatter data, and subsequently on quantification of NP uptake, appropriate controls were included in the flow cytometry experiments – samples containing individual NPs, samples containing NP mixtures, and untreated cells. Prior to sample acquisition, PMT voltage for SSC detector was adjusted to capture signals corresponding to cells, i.e. voltage was such that cell population could clearly be distinguished from debris (~1000 mV on Attune NxT flow cytometer). This experimental set-up had two important analytical consequences. Due to their significantly smaller size compared to cells, NPs were undistinguishable from cellular debris, and easily excluded from analysis by gating the cell population (see figure below). Thus, any SSC signal produced by NPs alone was not considered. PMT voltage was too low to determine subtle changes in refractive indices caused by e.g. apoptosis, but it was suitable to capture dramatic changes in SSC intensity caused by high concentrations of AgNP, without breaching the upper limit of detection.

A separate experiment was performed to determine PSNP uptake, using fluorescently-labeled polystyrene nanoparticles (Phosphorex, cat. nr. 2100, Hopkinton, Massachusetts, USA). In order to obtain reliable quantification of both AgNP and PSNP, preliminary experiments were performed to ensure that cell treatment with AgNP did not increase cell fluorescence, and that PSNP uptake did not change SSC values. Thus, direct correlation of changes in SSC values to AgNP uptake and changes in green fluorescence to PSNP uptake was possible, both in samples where NP were applied individually and in samples treated with NP mixtures. Samples were acquired on an Attune® acoustic focusing flow cytometer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) equipped with a 488 nm laser. Results were analyzed using FlowJo software (FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA).

2.4. Oxidative stress response measured by fluorescent assays

Reactive oxygen species (ROS) generation in Jurkat cells treated with AgNP, PSNP or PSNP/AgNP combination was quantified using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) staining. Monochlorobimane (MCB) assay was used to determine total cellular glutathione (GSH) and rhodamine 123 (Rh123) assay to analyze mitochondrial membrane integrity of Jurkat cells. The day after cell seeding, the cell culture medium was aspirated, and cells were incubated with staining solutions in PBS (20 μM DCFH-DA, 50 μM MCB, 100 nM Rh123) for 30 min at 37 °C and 5% CO₂. After the incubation, dying solutions were aspirated, and fresh medium was added to wells followed by addition of treatments. Sterile UPW was added to negative control wells, and 10 μM *tert*-butyl hydroperoxide (t-BOH; Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) was added to positive controls. Following 1 h treatment, the culture medium was aspirated from wells with multichannel pipette and cells were washed twice with 100 μL/well of PBS. Fluorescence intensity was detected by Victor3 multilabel plate reader (Perkin Elmer, Waltham, USA) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 535 nm. All experiments were repeated 3 times. Results are reported as % of fluorescence intensity compared to negative controls.

2.5. Evaluation of particle cellular internalization by confocal microscopy

To investigate cellular uptake of PSNP, AgNP or nanomixture, treated cells were visualized using confocal microscopy. Microscopy coverslips were sterilized for 2 h at 120 °C and placed in a 12-well plate. Poly-L-lysine solution (PLL, 0.1 mg/mL in UPW) was added to wells and incubated for 15 min at room temperature. Following the incubation, PLL solution was removed, and wells were washed twice with PBS and left for 2 h to dry. Cells were seeded on sterile coverslips inside a 12-well plate at 10,000 cells/well density in RPMI 1640 with 10% FBS. After seeding, cells were treated with 1 mg/L AgNP, 10 mg/L of fluorescent PSNP or with nanomixture containing 1 mg/L AgNP and 10 mg/L PSNP. After 1 h of incubation at 37 °C and 5% CO₂, plates were centrifuged at 1000 × g for 5 min and washed with 500 µL/well of PBS. After removing supernatants, cells were treated with cold methanol (−20 °C) for 3 min, followed by another PBS wash. Subsequently, 0.1% solution of Triton X-100 in PBS was added for membrane denaturation, incubated for 5 min at room temperature, and washed again with PBS. Then, cells were stained with phalloidin-tetramethyl rhodamine B isothiocyanate (TRITC, Sigma Aldrich, USA) solution (prepared at 1 µg/mL in PBS with addition of 0.1% (v/v) Triton X-100) during 20 min incubation. Excess dye was washed with PBS. Next, Hoechst dye (ThermoFisher Scientific, USA) was added (10 µg/mL in PBS), followed by 15 min incubation. Coverslips with cells were then washed once in PBS, dried, covered with Fluoroshield (Sigma Aldrich, USA), and placed on microscopy slides that were stored at −20 °C until the acquisition was performed on Leica TCS SP8 X microscope (Leica Microsystems, Germany) equipped with a supercontinuum excitation laser and tunable spectral detector. The excitation wavelengths and detection bands used were: 405 nm and 430–550 nm, respectively, for Hoechst, 488 nm and 500–550 nm, respectively, for FITC-PSNP, and 543 nm and 570–700 nm, respectively, for TRITC. Z-stack images were acquired to distinguish between particles localized within cells and particles attached to the cell or glass surface. Separately acquired channels were combined in ImageJ editor (University of Wisconsin, USA). Unlabeled AgNP were directly visualized in the reflectance mode, while acquired images were superimposed on images obtained from fluorescent channels.

2.6. Force spectroscopy of living Jurkat cells

Mechanical properties of nanoparticle-treated Jurkat cells were determined by force spectroscopy measurement using atomic force microscope (AFM). Atomic force spectroscopy has been already demonstrated as a label-free technique for probing changes in cellular mechanics, which indicate changes in composition and stiffness of cytoskeleton caused by different biological processes, e.g. oxidative stress [38]. For AFM evaluation, cells were seeded in Fluorodish Petri dishes (d = 35 mm, WPI, Sarasota, Florida, USA) coated with 0.1 mg/mL PLL solution in PBS. Dishes were first incubated with PLL solution for 5 min, then washed twice with sterile PBS and left to dry for 1 h. Jurkat cells were then seeded in cell culture medium with 5% FBS at density of 100 000 cells/mL and treated with 1 mg/L AgNP, 10 mg/L of fluorescent PSNP (Phosphorex, cat.nr. 2100, Hopkinton, Massachusetts, USA), or PSNP/AgNP mixture. Treated cells were incubated overnight at 37 °C and 5% CO₂. Non-treated cells were attached to Petri dishes and incubated in the same conditions. Following the incubation, cells were washed twice with sterile PBS, and 2 mL of PBS was added to the dishes as an imaging medium. Force spectroscopy experiments were performed at 37 °C and within 2 h after the cells have been taken out from the incubator. Prior to the AFM analysis, bright-field and fluorescence images were taken of attached cells in order to visualize PSNP localization. Before spectroscopy measurement, the pre-calibrated PFQNM-LC-A-CAL probe (Bruker, Billerica, MA, USA) was coated with 0.01% (v/v) Pluronic F-127 (Sigma Aldrich, USA) solution in water for 30 min, after which the probe was rinsed twice with water and air-dried. The pre-calibrated cantilever had a 0.078 N/m – 0.082 N/m spring constant,

15 µm long tip, and a defined 65 nm tip radius. Force spectroscopy measurements were carried out using a Nanowizard IV system (JPK/Bruker, Berlin, Germany), mounted on an inverted optical fluorescence microscope IX73 (Olympus, Tokyo, Japan). The force-distance curves were acquired above the nucleus of 5 different cells in each sample in a 1 µm² squared region for up to 64 equidistant points. The force set-point was held at 0.5 nN with the cantilever speed of 2 µm/s. The force-indentation curves were obtained from the force-distance curves – the indentation was determined by calculating the difference between the displacement of the z piezo and the cantilever deflection. Finally, Young modulus (*E*), a quantitative expression of cell elasticity [39], was calculated by fitting the force-indentation curves to the Hertz model assuming the parabolic indenter with a 65 nm radius while the Poisson coefficient of the cells was set to 0.5 [40]. For this model, the loading force and the indentation depth are related by:

$$F = \frac{4\sqrt{RE}}{3(1-\nu^2)}\delta^{\frac{3}{2}}, \quad (1)$$

where *R* is the radius of the tip curvature, *E* is the Young's modulus and *ν* is the Poisson ratio [41].

The model was fitted to the whole indentation (Fig. 1).

2.7. Statistical analysis

All statistical analyses were performed in GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Statistical significance for flow cytometry and oxidative stress data was determined with one-way ANOVA, followed by Dunnett's Multiple Comparison test, where all values obtained for treated cells were compared to negative control cell values. The concentration of AgNP, PSNP and combined AgNP/PSNP required for 50% inhibition of cell viability (IC₅₀ values) were obtained by calculating percentages of inhibition from percentages of viable cells and using GraphPad non-linear regression curve-fitting function. This function uses the equation.

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{-(\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope}}) \quad (2)$$

where *Y* is the percentage of live cells, *X* is the logarithm of nanoparticle dose, Top and Bottom values correspond to upper and lower plateau values for *Y*, respectively, and HillSlope is the slope factor.

Young Modulus (*E*) values for each individual force curve were extracted from JPK software, after which log*E* values were obtained. Elasticity values distributions from AFM measurements were considered as following a log-normal distribution. Thus, all data was converted to log₁₀ and statistics performed on the log treated data. Differences between treatments were then analyzed using parametric one-way ANOVA

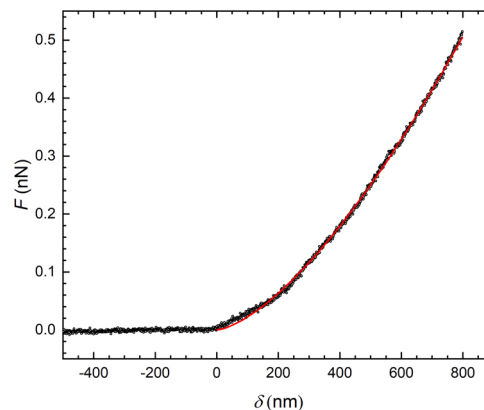


Fig. 1. Representative force-indentation curve obtained from force spectroscopy AFM experiments. Red curve shows the fit of contact elastic model (paraboloid) to the 800 nm indentation, which was used for calculation of the Young modulus (*E*).

followed by Dunnett's multiple comparison test. Significance threshold was set at $P < 0.05$. All data are presented as mean values including standard deviation (SD).

3. Results

3.1. Physico-chemical characteristics and colloidal stability of particles and nanomixture

Primary size and shape of AgNP and PSNP were determined by TEM and AFM (Fig. 2). TEM analysis showed that both PSNP and AgNP were spherical with primary diameters of 17.1 ± 4.8 and 67.1 ± 5.7 nm, respectively. In the UPW, the DLS characterization revealed slightly higher hydrodynamic diameter (d_H) values than primary sizes as expected and negative ζ potential values for both particle types (Table 1). It should be highlighted that sample preparation for TEM and AFM analysis may be biased by NP agglomeration due to sample dehydration. Here, TEM and AFM analyses were focused on determining single particle sizes that could be compared to hydrodynamic diameter distribution obtained from DLS. The degree of aggregation measured with DLS is more relevant for our experimental settings, as hydrodynamic diameters were determined in the cell culture media used for cell experiments. These measurements showed some particle aggregation in RPMI 1640 medium (evidenced by three separate peaks for PSNP), but addition of FBS prevented NP agglomeration.

Increased ionic strength of RPMI1640 cell culture medium induced significant particle agglomeration and decrease in absolute values of ζ potentials. The presence of proteins enabled protein corona formation (RPMI/FBS medium), which improved particle colloidal stability evidenced by d_H values similar to those observed in UPW (third column in

Table 1), and masked nanoparticle surface charge leading to changes of ζ potential values. On the AgNP surface, different silver species may be present such as Ag^0 and Ag^+ . We assumed that Ag^0 was not released, but only soluble Ag^+ form. Thus, Table 1 presents Ag content that corresponded to released Ag^+ species in the tested media, while residual Ag from synthesis was removed during AgNP purification. Measured Ag concentrations were compared to initial Ag concentrations in AgNP suspensions in order to obtain percentages of released Ag. The presence of different ions decreased the amount of free Ag^+ ions in AgNP dispersed in RPMI1640 medium, probably due to the formation of insoluble Ag salts. In the RPMI/FBS medium, protein corona formed on the AgNP surface inhibited the Ag release as no free Ag^+ ions were detected in filtrates (Table 1).

3.2. Effect of nanomixture on the apoptosis and mortality of immune cells

As the first step in evaluating the toxic effect of PSNP/AgNP mixture, Jurkat cells were treated with different doses of AgNP, PSNP, or a combination of both (Fig. 3). Flow cytometry showed a dose-response for both NP-induced apoptosis (Fig. 3) and NP uptake (Fig. 4).

AgNP exhibited higher toxicity compared to PSNP with significant increase in the percentage of late apoptotic/necrotic cells already at 10 mg/L AgNP (Fig. 3). The presence of proteins in the cell culture medium significantly affected the toxicity of both AgNP and PSNP. The FBS is a regular component of cell culture media for different cell types, as it contains proteins, amino acids, hormones, enzymes and numerous other molecules necessary for cell survival and growth. For certain cell types, other serum formulations (e.g. horse serum) are more suitable, but as a general rule cells require serum supplements for growth. Due to high NP absorptivity, cell culture media components (particularly

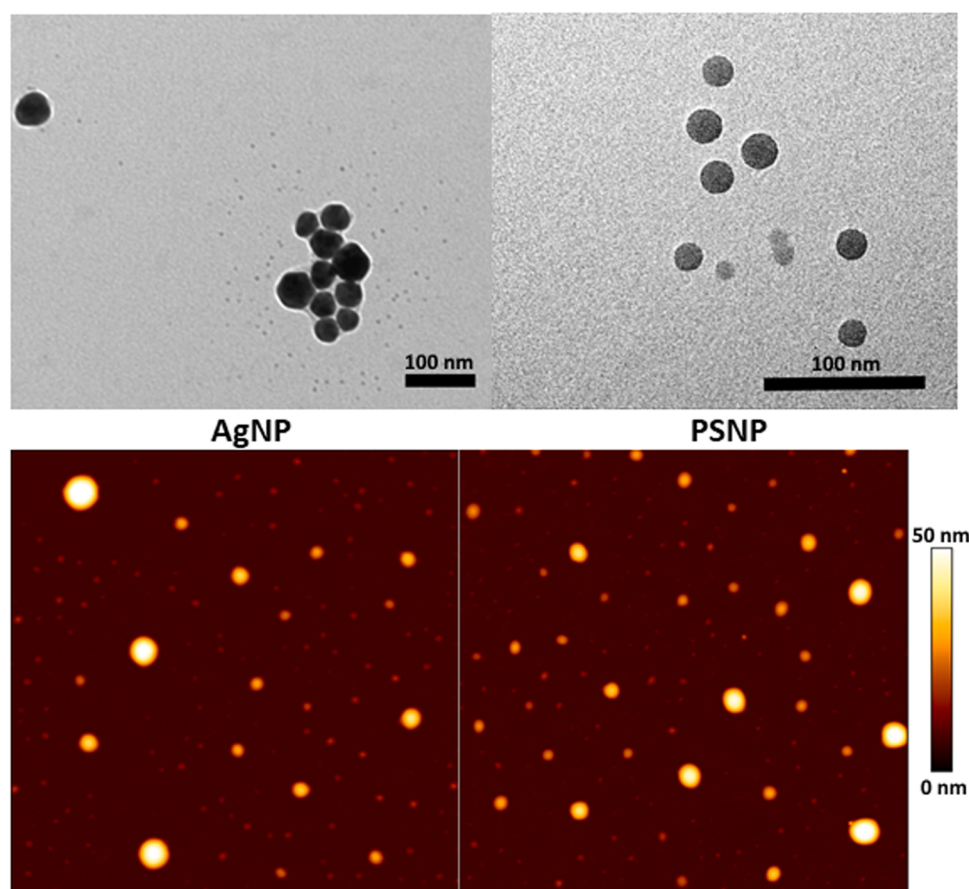


Fig. 2. Upper row - Transmission electron microscopy (TEM) images of AgNP (left) and PSNP (right) dispersed in ultrapure water. Scale bars are 100 nm. Bottom row - Atomic force microscopy (AFM) images of individual AgNP (left) and PSNP (right). Scan size is 4 μm for both images. Provided height scale applies to both images.

Table 1

Hydrodynamic diameter (d_H , in nm) obtained from the size volume-weighted distribution ($n = 10$) and ζ potential values (mV) for individual particle types and 1:1 mixture of AgNP (at 10 mg Ag/L) and PSNP (at 10 mg/L). Measurements were performed after 24 h incubation of particles in different media (ultra-pure water (UPW), RPMI1640 cell culture media and RPMI1640 supplemented with 10% FBS (RPMI/FBS)) at 37 °C in the dark. Dissolution of AgNP under different experimental settings is presented as % of released Ag fraction calculated from mass concentrations measured on GFAAS after centrifugal ultrafiltration. All data are presented as mean values $\pm$ SD.

Particle type	Parameter	Media		
		UPW	RPMI1640	RPMI/FBS
AgNP	d_H (nm)	72.1 $\pm$ 7.3	881.5 $\pm$ 130.4	119.5 $\pm$ 1.4
	(% population)	(100%)	(100%)	(100%)
	ζ potential (mV)	-21.9 $\pm$ 4.5	-9.3 $\pm$ 0.3	-9.7 $\pm$ 0.2
	PDI	0.215 $\pm$ 0.011	0.487 $\pm$ 0.094	0.224 $\pm$ 0.013
	% released Ag ⁺	5.13 $\pm$ 2.93	Not detected	Not detected
PSNP	d_H (nm)	19.4 $\pm$ 0.5	46.5 $\pm$ 29.5	18.5 $\pm$ 3.5
	(% population)	(100%)	(45%) 162.4 $\pm$ 51.8 (21%) 674.3 $\pm$ 183.4 (34%)	(100%)
	ζ potential (mV)	-39.7 $\pm$ 10.8	-22.9 $\pm$ 2.3	-9.3 $\pm$ 0.9
	PDI	0.134 $\pm$ 0.049	0.619 $\pm$ 0.238	0.361 $\pm$ 0.016
	% released Ag ⁺	5.0 $\pm$ 2.2	Not detected	Not detected
PSNP/AgNP mixture	d_H (nm)	65.7 $\pm$ 7.8	912.7 $\pm$ 86.6	119.2 $\pm$ 4.0
	(% population)	(88%) 18.9 $\pm$ 4.0 (12%)	(80%) 139.7 $\pm$ 0.0 (20%)	(82%) 21.0 $\pm$ 2.4 (18%)
	ζ potential (mV)	-29.0 $\pm$ 0.5	-13.1 $\pm$ 0.7	-9.2 $\pm$ 0.5
	PDI	0.307 $\pm$ 0.008	0.458 $\pm$ 0.043	0.234 $\pm$ 0.011
	% released Ag ⁺	5.0 $\pm$ 2.2	Not detected	Not detected

proteins) may be adsorbed on NP surfaces, which leads to the formation of biomolecular (protein) corona. This may significantly change NP physico-chemical properties, their interactions with proteins on cell surface, and consequently the nature of cellular response exposed to such NP. Even though FBS, or other serum types, are default components of various cell culture media, its effect on NP properties and their

toxicity is often overlooked when analyzing in vitro data. Here, we endeavored to define the influence of protein corona on AgNP and PSNP toxicity, particularly its relation to NP physico chemical properties (dissolution, aggregation) and known mechanisms of AgNP and PSNP toxicity – Ag⁺ release from NP surface (for AgNP) that may induce ROS generation (for both NP types). The limiting factor of this approach is the fact that serum components are paramount for long-term cell survival, and serum deprivation can have negative effects on cell metabolism, such as cell cycle arrest. The experimental set up was therefore constrained, as only short exposure periods to NPs (up to 24 h) were tested where the effects of serum deprivation are not as severe, and toxicity unrelated to NPs did not interfere with oxidative stress and cell death caused by NPs.

Lower IC50 values for AgNP were calculated in RPMI1640 medium (18.4 mg/L AgNP) compared to RPMI/FBS medium (42.9 mg/L AgNP), and the absence of proteins in cell culture medium significantly increased the % of apoptotic cells already at the lowest AgNP dose applied. PSNP showed comparatively lower cytotoxicity and apoptosis induction, but these effects were appreciably greater in the experiment where cells were treated in the absence of FBS (Fig. 3). AgNO₃ exhibited significant cytotoxicity in concentrations as low as 8.5 mg/L (with FBS in cell culture medium) and 4.2 mg/L (without FBS added to medium), with calculated IC50 values 1.2 and 0.42 mg/L in complete cell culture medium with 10% v/v FBS and without FBS, respectively. Analysis of the side scatter intensity revealed a similar extent of AgNP uptake in experiments with and without FBS (Fig. 4a). Uptake of PSNP was not quantifiable from the SSC data, as they showed much weaker light-scattering ability compared to AgNP. To obtain more reliable information, PSNP labeled with green fluorescent dye were added to Jurkat cells and incubated for 1 h. Data obtained for mean fluorescence intensities are reported relative to control cells (Fig. 4b). As was the case with AgNP, there was no significant difference in uptake of PSNP with or without FBS.

Toxicity of AgNP/PSNP mixture was evaluated by combining three AgNP doses (1, 10 and 100 mg/L) with two PSNP doses (10 and 100 mg/L) to obtain a total of 6 different nanomixtures: 10 mg/L PSNP combined with 1, 10 and 100 mg/L AgNP, and 100 mg/L PSNP combined with the same AgNP concentrations. Experiments were performed in cell culture medium with and without the FBS addition. Combined treatment of Jurkat cells evidenced higher toxicity of NP applied as a mixture than individual AgNP or PSNP treatments (Fig. 5). In cell culture medium supplemented with FBS, the IC50 value for AgNP combined with 10 and 100 mg/L PSNP was 4.9 and 1.37 mg/L AgNP, respectively. These

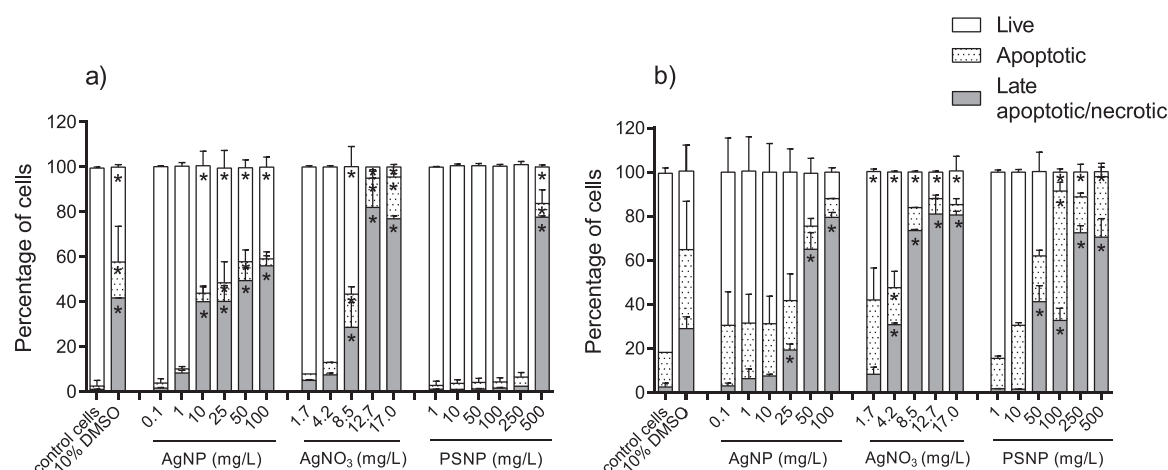


Fig. 3. Flow cytometry results on viability and apoptosis induction in Jurkat cells treated with different concentrations of AgNP, AgNO₃ or PSNP for 24 h in cell culture medium a) supplemented with 10% FBS and b) without FBS. Non-treated cells were used as negative control, while cells treated with 10% DMSO were used as a positive control. Results are presented as % of number of cells and calculated as mean values obtained from 3 replicate experiments conducted in five replicates. Standard deviations are given as error bars. Values that are significantly different ($p < 0.05$) from negative control are denoted with asterisks.

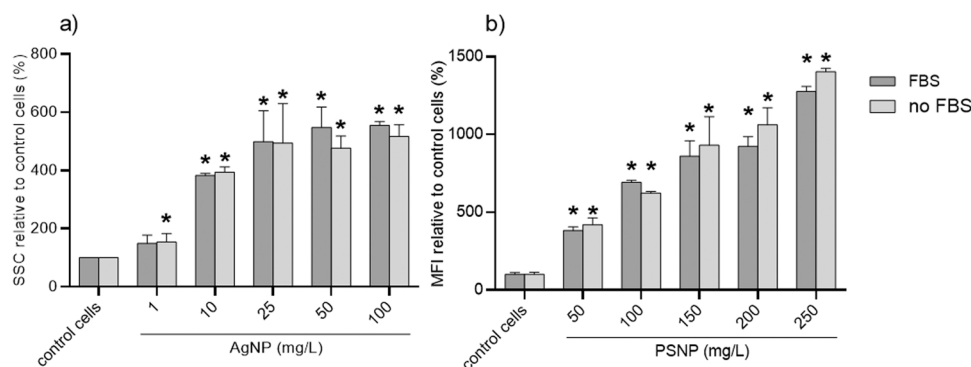


Fig. 4. AgNP and PSNP uptake in Jurkat cells determined by flow cytometry. (a) AgNP uptake was determined by side scatter intensity (SSC) of treated Jurkat cells. (b) Uptake of fluorescently labeled PSNP was determined by an increase in mean fluorescence intensity (MFI). Non-treated cells were used as negative control. Results are calculated as mean values obtained from 3 replicate experiments conducted in five replicates. Standard deviations are given as error bars. Values that are significantly different ($p < 0.05$) from negative control are denoted with asterisks.

values were significantly lower than IC_{50} of 42.9 mg/L observed for cells treated only with AgNP. In culture medium without the addition of FBS, the IC_{50} values for AgNP were 2.1 and 1.4 mg/L for combined treatments with 10 and 100 mg/L PSNP, respectively. In comparison, IC_{50} value for AgNP alone in culture medium without FBS was 18.4 mg/L. Increased toxicity of nanomixture compared to single NP treatments can also be seen from percentages of dead and apoptotic cells (Fig. 5).

In the experiment with FBS added to the cell culture medium, treatment with 10 or 100 mg/L PSNP resulted in $96 \pm 0.4\%$ live cells, while the cell viability was decreased to 90 ± 0.8 and $57 \pm 0.3\%$ for AgNP treatments with 1 and 100 mg/L concentration, respectively. Combined treatment with AgNP/PSNP mixture caused a severe drop in the number of viable cells and significantly increased the number of apoptotic cells. The number of late apoptotic/necrotic cells increased by more than 15% when Jurkat cells were treated with mixture containing 10 mg Ag/L AgNP and 10 mg/L PSNP compared to single treatments with AgNP or PSNP. Experiments performed in cell culture medium without FBS revealed a similar trend of more severe cell viability for treatment with nanomixture compared to treatment with single NP type. Thus, 10 mg/L PSNP treatment in combination with 10 and 100 mg/L

AgNP resulted in significantly increased number of late apoptotic/necrotic cells with concomitant decrease in % of viable cell compared to single AgNP or PSNP treatments (Fig. 5).

3.3. Oxidative stress response to nanoparticles mixture

Oxidative stress response of Jurkat cells treated with nanoparticles was evaluated using DCF, MCB and Rh123 assays, in order to quantify three different aspects of cellular response: ROS generation, intracellular GSH status, and mitochondrial membrane damage, respectively. Experiments were performed in cell culture medium with or without FBS (10% v/v). Results obtained by DCF staining (Fig. 6A) revealed a non-significant increase in ROS generation in Jurkat cells treated with AgNP or PSNP individually when the medium was supplemented with FBS. However, ROS generation was significantly induced in cells treated with their mixture, exceeding 120% of control cells fluorescent signal in all combined AgNP/PSNP application cases. Interestingly, ROS generation was significantly elevated in cells cultured in medium without FBS and treated with PSNP alone, i.e. DCF fluorescent signal was above 120% of control cells signal (Fig. 6A). Results of MCB assay (Fig. 6B)

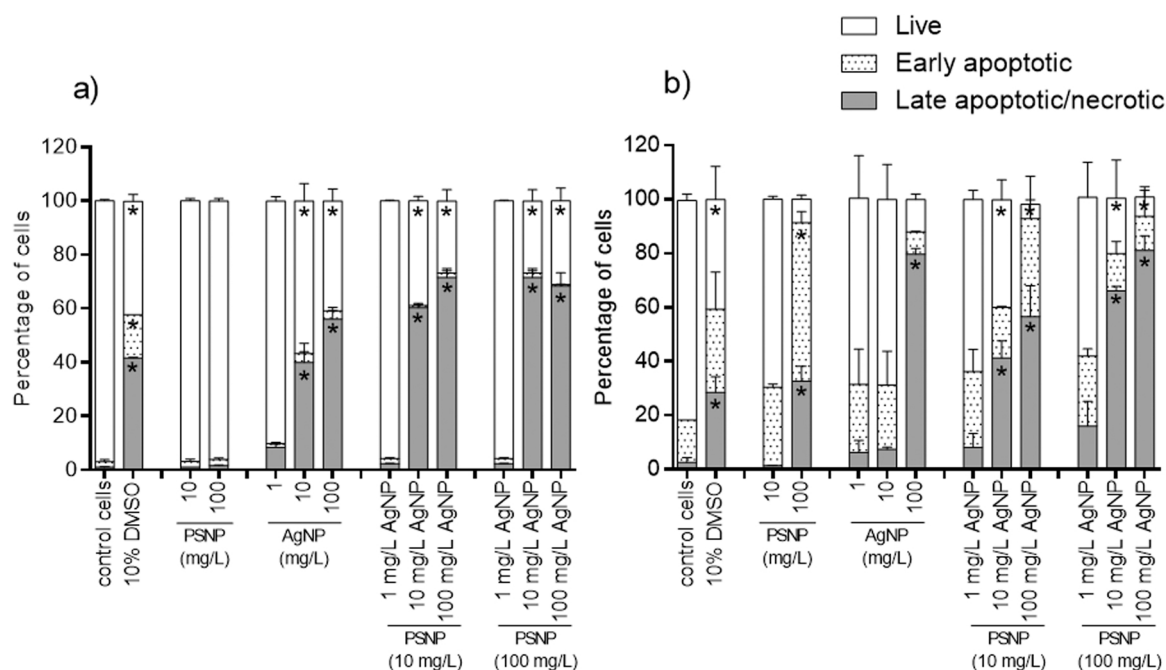


Fig. 5. Flow cytometry results on the % of live (viable) cells, early apoptotic and late/apoptotic/necrotic Jurkat cells after treatment with different doses of AgNP, PSNP or AgNP/PSNP mixture for 24 h in cell culture medium a) supplemented with 10% FBS and b) without FBS. Non-treated cells were used as negative control, while cells treated with 10% DMSO were used as a positive control. Results are presented as % of number of cells and calculated as mean values obtained from 3 replicate experiments conducted in five replicates. Standard deviations are given as error bars. Values that are significantly different ($p < 0.05$) from negative control are denoted with asterisks.

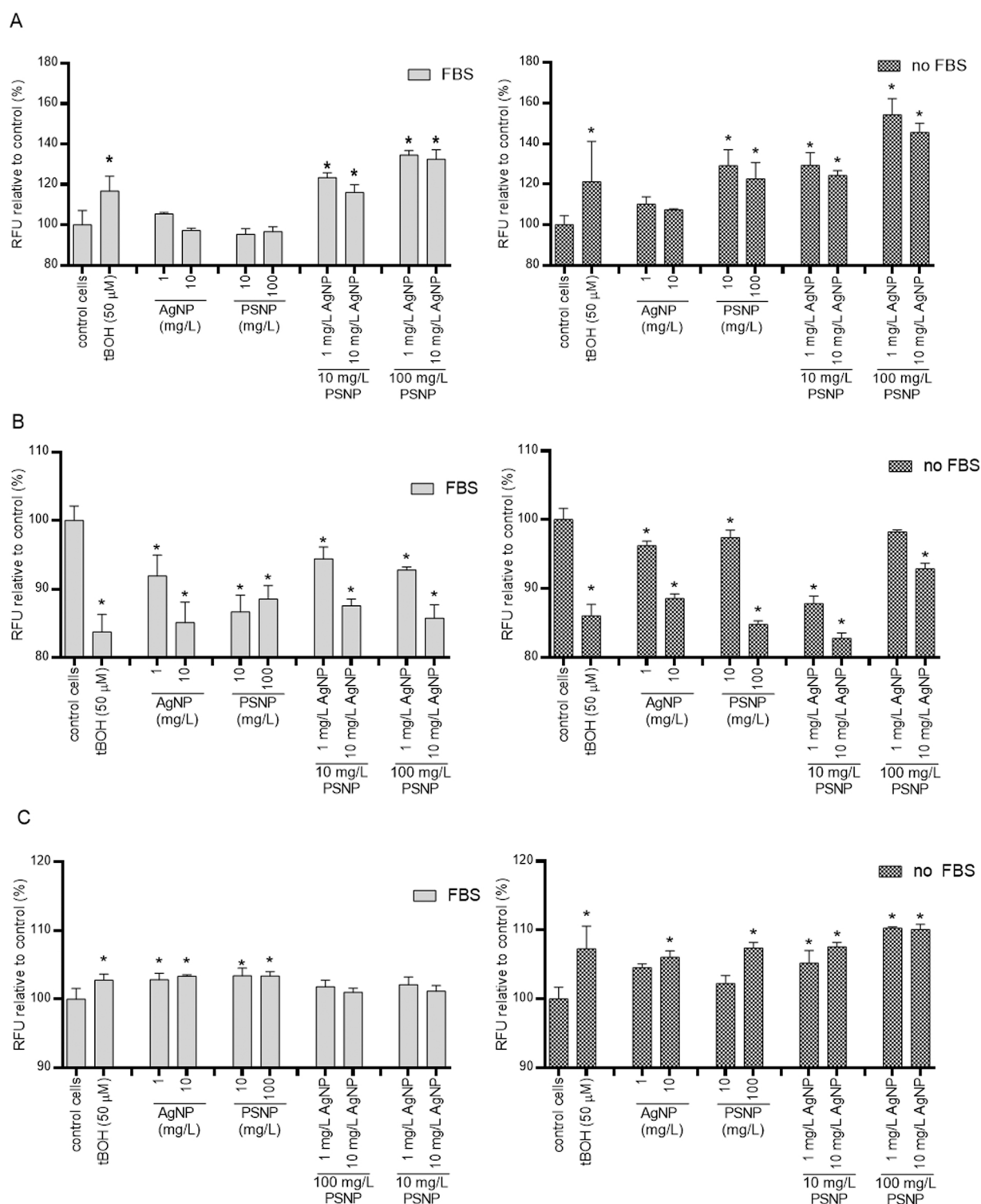


Fig. 6. Results of oxidative stress response of Jurkat cells treated with AgNP, PSNP and AgNP/PSNP mixture at different doses, with or without addition of FBS in the cell culture medium: A – DCF assay results; B – MCB assay results; C – Rhodamine 123 assay results. Non-treated cells were used as negative control, while cells treated with 50 μ M tBOH were used as a positive control. Results are presented as % of relative fluorescence units compared to negative control and calculated as mean values obtained from 3 replicate experiments conducted in five replicates. Standard deviations are given as error bars. Statistical significance was determined by one-way ANOVA with Dunnett multiple comparison ($P < 0.05$). Results significantly different compared to control cells are denoted with asterisk (*).

revealed a dose-dependent depletion of intracellular GSH in all experiments, irrespective of the presence of FBS in the cell culture medium, which indicated that nanoparticles triggered cells' protective mechanism against ROS generation. Evaluation of changes in mitochondrial membrane potential by Rh123 staining (Fig. 6C) showed an increase in

fluorescence intensity, which indicates Rh123 dye leakage from mitochondria caused by damage to their membranes. Addition of FBS to culture medium reduced the extent of mitochondrial damage caused both by individual nanoparticle treatments and combined treatments. Thus, an increase in fluorescent signal was observed in cells treated with

AgNP or PSNP alone in media supplemented with FBS, but not in cells treated by nanoparticle mixture, whereas in medium without FBS added significant increase in fluorescence intensity was observed for all treatments except with lower doses of AgNP or PSNP.

3.4. Visualization of nanoparticle uptake by confocal microscopy

Confocal fluorescent imaging was used to confirm the internalization of nanoparticles by Jurkat cells. Nanoparticle uptake could not be definitively proven from flow cytometry results as the SSC intensity could have increased either from nanoparticle uptake, or because of nanoparticles attached to the cell surface [42]. Jurkat cells were treated with AgNP/PSNP mixture for 1 h and prepared for visualization by confocal microscope. A set of z-stack images that captured different heights of focal planes above the glass surface to which the cells were attached was acquired to distinguish internalized nanoparticles from those adhered to the glass, or attached to the outer cell membrane. A representative composite image, assembled from fluorescent channels and the reflectance channel, can be seen below (Fig. 7). Both AgNP (red) and PSNP (green) were found to be attached to the cell membrane but also localized within the cells. Interestingly, there was no significant overlap between the two nanoparticle types, as AgNP and PSNP signals were clearly separated. Thus, the same behavior of these NPs in mixture was observed when visualizing them after dispersion in ultra-pure water (Fig. 2) and after their interaction with Jurkat cells (Fig. 7); PSNP and AgNP were not clustered or aggregated and signals obtained from fluorescent channel with 500–550 nm filter did not overlap with signals acquired on reflectance channel.

3.5. Nanomechanical evaluation of Jurkat cells treated with nanoparticle mixture effects

Before force spectroscopy measurements on Jurkat cells, which yielded Young modulus, treated cells were visualized in fluorescent and bright field modes in order to determine localization of fluorescently labeled PSNP.

The elasticity of the untreated and untreated NPs-treated cells was obtained by fitting the Hertz model, for the parabolic shaped indenter, to the force-indentation curves. A representative force-indentation curve is shown in Fig. 1. Cell treatment with PSNP lowered Jurkat cells' Young modulus (E) (mean = 1028 Pa, mean $\log_{10}[E \text{ (Pa)}] = 3.012$) compared to control cells (mean = 1336 Pa, mean $\log_{10}[E \text{ (Pa)}] = 3.126$). Treatment with AgNP did not significantly change $\log_{10}E$ (mean = 723 Pa, mean $\log_{10}[E \text{ (Pa)}] = 2.859$) while AgNP/PSNP mixture significantly reduced cell elasticity (mean = 537 Pa, $\log_{10}[E \text{ (Pa)}] = 2.730$, $P < 0.05$)

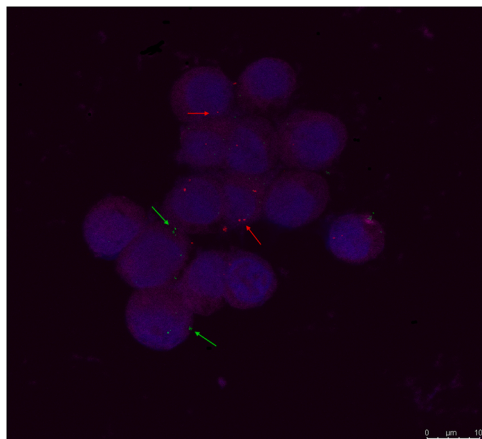


Fig. 7. Confocal image of Jurkat cells treated with AgNP/PSNP mixture for 1 h. Cell nuclei are shown in blue, actin is shown in magenta, PSNP are shown in green, and AgNP are shown in red. Scale bar is 10 μm .

(Fig. 8).

4. Discussion

Nanotoxicity is a field of scientific inquiry growing in parallel with increased application of nanoparticles in commercial products and their presence in the environment. Although toxicological profiles of different nanoparticles applied individually is unquestionably important for understanding their impact on human health, additive toxic effects of different nanoparticle types are still mostly unknown, due to understandable limitations of common in vitro and in vivo assays. Here, we sought to provide relevant information on combined toxicities of some of the most commercially and environmentally important nanoparticles, AgNP and PSNP, as well as to offer a platform for testing other combinations of nanomaterials that would determine their chemical properties and biological profiles. Size, shape and ζ potential of AgNP and PSNP were determined using TEM, AFM and DLS/ELS methods, which revealed that both NP types were spherical and characterized by negative ζ potential. Suspensions of AgNP and PSNP in RPMI1640 medium showed a significant degree of aggregation, whereas the addition of FBS to medium changed AgNP and PSNP properties and resulted in a more uniform size distribution, lower degree of aggregation, and ζ potential closer to neutral values. These effects could be ascribed to formation of protein corona that stabilized individual NP types and provided steric hindrance to NP aggregation. Protein corona formation can also change ζ potential.

Results of NP characterization presented here offered an outline for understanding NP behavior in conditions relevant for in vitro experiments, and demonstrated the importance of protein corona for NP stability and interactions. However, additional methods of NP characterization could provide a more detailed overview of their chemical and physical properties, and further elucidate mechanisms by which such properties determine their toxicological profile. In particular, field-flow fractionation is a powerful technique that could be used to assess individual NP and establish their aggregation profile with granular precision, as well as providing more detail on protein corona

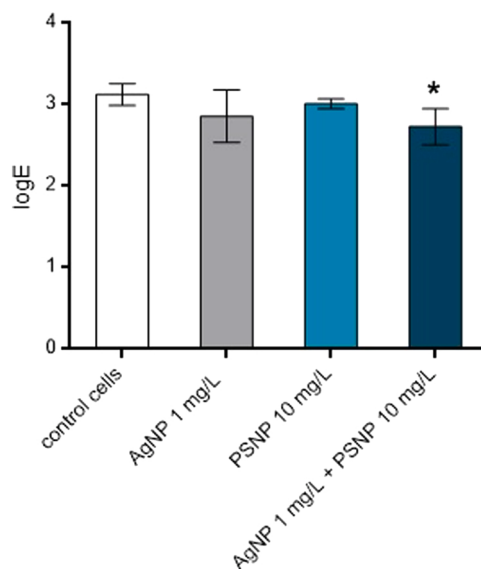


Fig. 8. Logarithms of Young's modulus values ($\log_{10}[E(\text{Pa})]$) for non-treated Jurkat cells, cells treated with AgNP 1 mg/L, PSNP 10 mg/L, and a combination of both nanoparticle types. Mean values are shown with standard deviations. Statistically significant results were obtained for 1 mg/L AgNP and 10 mg/L PSNP treatment, and are denoted with an asterisk (*) ($P < 0.05$). Changes in E between control cells and cells treated with individual nanoparticle types were not significant ($P = 0.13$ for 1 mg/L AgNP and $P = 0.76$ for 10 mg/L PSNP).

influence on nanoparticle properties [43,44]. Also, analysis of protein corona composition could shed more light on NP interactions with biological systems and link the chemico-physical properties of NP with their biological profiles [45].

The cytotoxicity profile of AgNP/PSNP mixture was determined by the treatment of Jurkat cells with each NP type alone and with their mixture in a range of concentrations. The results showed that AgNP treatment reduced Jurkat viability, regardless of the supplementation of cell culture media with FBS, while PSNP had a much lower impact on cell viability in physiologically more relevant cell culture conditions where FBS was added to medium; however, in the absence of FBS, PSNP cytotoxicity was severely exacerbated. It is likely that protein corona that was formed around nanoparticles from FBS proteins shielded cell membranes from direct PSNP contact, thereby reducing their toxic effects. Cell treatment with AgNO₃ severely reduced cell viability in concentrations as low as 4.2 mg/L. Considering that no release of Ag⁺ ions from AgNP was detected in cell culture media (see Table 1), it is not likely that extracellular Ag⁺ release significantly contributed to AgNP cytotoxicity; instead, ROS generation catalyzed by internalized AgNP and consequent oxidative stress may be considered as the underlying mechanism of toxicity. It is also important to mention that Jurkat cell fitness was reduced during 24 h incubation in culture medium without FBS, which can be seen from minor differences in cell viability of control samples. This effect can account for an increase in percentages of apoptotic cells across all samples but does not completely explain the dramatic increase in PSNP toxicity in the absence of protein corona.

Combined AgNP/PSNP treatment had a much greater effect on Jurkat cell viability, both with and without FBS in the culture medium. Non-toxic concentrations of each nanoparticle type significantly reduced Jurkat cell viability and induced apoptosis when applied as a mixture. It has been shown previously that AgNP achieve their toxic effect through induction of oxidative stress, which in turn damages cellular components [46]. Thus, AgNP share molecular initiating event (MIE) of toxic mechanism with PSNP, and these results can be understood as a compounded effect of overloading cellular mechanisms for managing oxidative stress [32,47]. Induction of oxidative stress, depletion of cellular GSH and mitochondrial membrane damage caused by both nanoparticle types, which could be seen in DCF, MCB and Rh123 assays, are in line with existing scientific evidence on AgNP and PSNP toxicity [48,49]. It is important to note that slightly elevated ROS induction likely did not reach the threshold of statistical significance because low, non-toxic concentrations were tested. Even so, nanoparticle mixture significantly increased ROS production, which agrees with oxidative stress being key event (KE) for their toxicity, and was also expected based on flow cytometry results.

Interestingly, reduction of cell viability for a mixture consisting of 10 mg Ag/L AgNP and 10 mg/L PSNP exceeded toxicity expected when concentration addition is applied on results obtained for individual nanoparticle types. This suggests synergistic toxic action of AgNP and PSNP, which has important implications for understanding the biological fate of medical devices and the potential damage they might cause over long term use. The exacerbated toxicity was apparent after only 24 h. Considering the resilience of PSNP, it is likely that they could cause damage for much longer if released inside the human body.

Uptake of both nanoparticle types as determined by flow cytometry was dose-dependent, with minor differences in the uptake extent when FBS was removed from the culture medium. In order to confirm nanoparticle internalization, treated cells were imaged by confocal microscopy showing their localization within cells, as well as being attached to the cell membrane. Considering the dynamics of nanoparticle endo- and exocytosis [50], and the relatively incubation time (1 h), Fig. 7 represents a snapshot of nanoparticle trafficking process captured in early stages where NPs are associated with cell membranes and entering various endocytotic pathways. Although applied in mixture, each nanoparticle type interacted with cells independently, as fluorescent and reflectance signals, originating from PSNP and AgNP respectively,

did not overlap. The likely reason for observed lack of interaction was the formation of protein corona around NP, which introduced electrostatic repulsion between negatively charged cell culture medium components that were adsorbed on NP surfaces, as well as steric effects that precluded close contact between these two NP types. This phenomenon was previously observed with different NP [51,52], including AgNP [53].

The analysis of force-distance curves obtained for cells treated with AgNP/PSNP showed a significant decrease in cell elasticity, which indicated changes in cytoskeletal structure. Although there is a lack of data on biophysical changes of live Jurkat cells interacting with PSNP or AgNP, it was previously reported that treatment with various types of nanoparticles reduces cell stiffness [54,55]. The mechanism by which nanoparticles cause such decrease is not fully elucidated [56]; potential causes include apoptosis-related structural changes, direct nanoparticle interaction with membranes, re-organization of cytoskeleton following nanoparticle internalization, or the formation of nanoparticle-containing vacuoles [57,58]. Interestingly, this effect only reached statistical significance when the AgNP/PSNP mixture was used for cell treatment compared to treatment with a single nanoparticle type applied at the same dose. As for the oxidative stress evaluation, the lack of significant biological effect of individual NP treatments was likely due to non-toxic NP concentrations used in the AFM analysis. Considering the lack of interaction between the AgNP and PSNP, as evidenced by confocal microscopy, it is possible that decrease in cell elasticity is dependent on the number of nanoparticles added to cells, rather than their type. Thus, combined NP treatment introduced greater particle number to each cell, leading to an increase in endocytosis and consequent reduction of cell Young's modulus, regardless of nanomaterial. This decrease in *E* value following NP treatments can be understood as a consequence of apoptosis induction as shown previously in mice-derived lymphocytes [59] and in human mesenchymal stem cells [60]. These results demonstrate that AFM analysis has great potential as label free detection technique of changes in cell morphology and even metabolism compared to often used cellular assays that rely on fluorescent staining. Owing to the well-described interferences of NP with colorimetric and fluorescent assays causing often biased results [24], capabilities of AFM technique for safety screening of NMs should be explored more comprehensively.

As with methods for characterization of NP presented above, the list of in vitro assays to determine NP toxicity is by no means exhausted with our selection, and further studies of this type should strive to incorporate more assays for analyzing different aspects of cellular responses. The set of experiments presented here focused on NP uptake, ROS generation, induction of apoptosis and changes in cytoskeletal structures that led to severe cellular dysfunction and cell death. However, there is a wealth of information to be discovered on NP interactions with different cells and tissues using sub-lethal doses. In that case, separation of live, intact cells such as cell sorting or sedimentation field-flow fractionation, followed by, for example, single cell transcriptomics may be very helpful [61–63]. Considering that research of nanomixtures and their impact on human health is still in its early stages, testing different approaches could yield useful and surprising data for development of nano-products that are safer both for human health and the environment.

5. Conclusions

Data presented here evidenced additive detrimental effects of AgNP and PSNP on Jurkat cell viability, increase in ROS production and subsequent apoptosis induction. Although both nanoparticle types share the same MIE of toxicity, i.e. ROS generation and subsequent cellular damage, a decrease in cell viability exceeded the expected additive effect of total nanoparticle concentration. The AgNP and PSNP did not interact in cell culture medium and entered the cells via endocytosis independently when applied as mixture. More importantly, Jurkat cell treated with AgNP/PSNP mixture at concentrations that were not toxic

when these NP were applied alone showed increased ROS production, apoptotic and death cells. Combined effect of AgNP and PSNP treatment also significantly modulated mechanical properties of Jurkat cells by reducing cell stiffness. Results presented here show that toxicological profiles of NP mixtures can differ significantly from profiles of individual NP types, which needs to be taken into account during the development of novel nano-enabled materials for medical applications.

CRedit authorship contribution statement

Krunoslav Ilić: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Lucija Krce:** Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing – review & editing. **Jorge Rodriguez-Ramos:** Data curation, Formal analysis, Writing – review & editing. **Felix Rico:** Investigation, Methodology, Funding acquisition, Writing – review & editing. **Nikolina Kalčec:** Formal analysis, Methodology, Writing – review & editing. **Ivica Aviani:** Funding acquisition, Resources, Methodology. **Petra Turčić:** Funding acquisition, Validation, Writing – review & editing. **Ivan Pavičić:** Methodology, Validation, Supervision. **Ivana Vinković Vrček:** Conceptualization, Project administration, Resources, Supervision, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This study was financially supported by the Croatian-Chinese bilateral project “Endocrine disrupting mechanism of typical environmental pollutants – EmergeTox” funded by Ministry of Science and Education, Republic of Croatia and by the Chinese Academy of Sciences and the CRO-SAD 2/2019 bilateral project. This project has received funding from the European Research Council (ERC, Grant agreement No. 772257). JRR and FR thank Martine Pellicot for technical assistance and the INSERM culture cell platform (managed by Thi Tien Nguyen) of TPR2 building in Luminy campus (Marseille). This research was partially supported under the project STIM – REI, Contract Number: KK.01.1.1.01.0003, a project funded by the European Union through the European Regional Development Fund – the Operational Programme Competitiveness and Cohesion 2014–2020 (KK.01.1.1.01).

References

- [1] M. Rosenberg, et al., Potential ecotoxicological effects of antimicrobial surface coatings: a literature survey backed up by analysis of market reports, *PeerJ* (2019).
- [2] M.A. Syed, S. Babar, A.S. Bhatti, H. Bokhari, Antibacterial effects of silver nanoparticles on the bacterial strains isolated from catheterized urinary tract infection cases, *J. Biomed. Nanotechnol.* 5 (2009) 209–214.
- [3] A. Panáček, et al., Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp, *Biomaterials* 30 (2009) 6333–6340.
- [4] M. Kasithevar, P. Periakaruppan, S. Muthupandian, M. Mohan, Antibacterial efficacy of silver nanoparticles against multi-drug resistant clinical isolates from post-surgical wound infections, *Microb. Pathog.* 107 (2017) 327–334.
- [5] S. Nakamura, et al., Synthesis and application of silver nanoparticles (Ag nps) for the prevention of infection in healthcare workers, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019).
- [6] S. Taheri, et al., Substrate independent silver nanoparticle based antibacterial coatings, *Biomaterials* 35 (2014) 4601–4609.
- [7] Q.H. Tran, V.Q. Nguyen, A.T. Le, Corrigendum: silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives, *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 4 (033001) (2018) 9, <https://doi.org/10.1088/2043-6262/4/3/033001>, aad12b.
- [8] V. Marassi, et al., Silver nanoparticles as a medical device in healthcare settings: a five-step approach for candidate screening of coating agents, *R. Soc. Open Sci.* 5 (2018).
- [9] M. Akter, et al., A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: physicochemical properties and perspectives, *J. Adv. Res.* 9 (2018) 1–16.
- [10] J. Natsuki, A review of silver nanoparticles: synthesis methods, properties and applications, *Int. J. Mater. Sci. Appl.* 4 (2015) 325.
- [11] W. Zhang, B. Xiao, T. Fang, Chemical transformation of silver nanoparticles in aquatic environments: mechanism, morphology and toxicity, *Chemosphere* 191 (2018) 324–334.
- [12] T. Zhang, et al., Role of secondary particle formation in the persistence of silver nanoparticles in humic acid containing water under light irradiation, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 14164–14172.
- [13] J. Du, et al., A review on silver nanoparticles-induced ecotoxicity and the underlying toxicity mechanisms, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 98 (2018) 231–239.
- [14] S. Lekame, et al., The toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) to three freshwater invertebrates with different life strategies: *Hydra vulgaris*, *Daphnia carinata*, and *Paratya australiensis*, *Front. Environ. Sci.* 6 (2018) 1–13.
- [15] Y.J. Lee, et al., Ion-release kinetics and ecotoxicity effects of silver nanoparticles, *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2012) 155–159.
- [16] X. Luo, et al., Insights into the ecotoxicity of silver nanoparticles transferred from *Escherichia coli* to *Caenorhabditis elegans*, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–12.
- [17] M.A. Kakakheh, et al., Long-term exposure to high-concentration silver nanoparticles induced toxicity, fatality, bioaccumulation, and histological alteration in fish (*Cyprinus carpio*), *Environ. Sci. Eur.* 33 (2021).
- [18] L.W. McKeen, Plastics used in medical devices. *Handbook of Polymer Applications in Medicine and Medical Devices*, Elsevier Inc., 2014, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-22805-3.00003-7>.
- [19] A.V. Smirnov, et al., Surface modification of polystyrene thin films by RF plasma treatment, *Bionanoscience* 7 (2017) 680–685.
- [20] D. Vachon, G.E. Wnek, Medical Uses of Styrene Sulfonate Polymers, 2001.
- [21] D. Pavithra, M. Doble, Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants - Issues and prevention, *Biomed. Mater.* 3 (2008).
- [22] B.T. Ho, T.K. Roberts, S. Lucas, An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: the microbial approach, *Crit. Rev. Biotechnol.* 38 (2018) 308–320.
- [23] S. Lambert, M. Wagner, Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene, *Chemosphere* 145 (2016) 265–268.
- [24] R.S. Labow, E. Meek, J.P. Santerre, Hydrolytic degradation of poly(carbonate)-urethanes by monocyte-derived macrophages, *Biomaterials* 22 (2001) 3025–3033.
- [25] J.P. Santerre, K. Woodhouse, G. Laroche, R.S. Labow, Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials, *Biomaterials* 26 (2005) 7457–7470.
- [26] P. Villarrubia-Gómez, S.E. Cornell, J. Fabres, Marine plastic pollution as a planetary boundary threat – the drifting piece in the sustainability puzzle, *Mar. Policy* 96 (2018) 213–220.
- [27] P. Li, et al., Characteristics of plastic pollution in the environment: a review, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 107 (2021) 577–584.
- [28] S.B. Borelle, et al., Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution, *Science* 369 (2020) 1515–1518.
- [29] S. Wagner, T. Reemtsma, Things we know and don't know about nanoplastic in the environment, *Nat. Nanotechnol.* 14 (2019) 300–301.
- [30] B. Jovanović, Ingestion of microplastics by fish and its potential consequences from a physical perspective, *Integr. Environ. Assess. Manag.* 13 (2017) 510–515.
- [31] M.E. Pittman, S.W. Edwards, C. Ives, H.M. Mortensen, AOP-DB: a database resource for the exploration of adverse outcome pathways through integrated association networks, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 343 (2018) 71–83.
- [32] M. Hu, D. Palić, Micro- and nano-plastics activation of oxidative and inflammatory adverse outcome pathways, *Redox Biol.* 37 (2020).
- [33] J. Jeong, J. Choi, Development of AOP relevant to microplastics based on toxicity mechanisms of chemical additives using ToxCast™ and deep learning models combined approach, *Environ. Int.* 137 (2020), 105557.
- [34] D. Nierenberg, A.R. Khaled, O. Flores, Formation of a protein corona influences the biological identity of nanomaterials, *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* 23 (2018) 300–308.
- [35] I. Vinković Vrček, et al., Does surface coating of metallic nanoparticles modulate their interference with in vitro assays? *RSC Adv.* (2015) <https://doi.org/10.1039/c5ra14100a>.
- [36] R.T. Abraham, A. Weiss, Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 301–308.
- [37] R.M. Zucker, et al., Detection of silver nanoparticles in cells by flow cytometry using light scatter and far-red fluorescence, *Cytometry A* 83 (2013) 962–972.
- [38] H.F. Pastrana, A.X. Cartagena-Rivera, A. Raman, A. Ávila, Evaluation of the elastic Young's modulus and cytotoxicity variations in fibroblasts exposed to carbon-based nanomaterials, *J. Nanobiotechnol.* 17 (2019) 1–15.
- [39] M. Offroy, A. Razafitianamaharavo, A. Beaussart, C. Pagnout, J.F.L. Duval, Fast automated processing of AFM PeakForce curves to evaluate spatially resolved Young modulus and stiffness of turgent cells, *RSC Adv.* 10 (2020) 19258–19275.
- [40] H. Hertz, Miscellaneous papers, *Math* 92 (1881) 146–162.
- [41] M. Radmacher, Studying the mechanics of cellular processes by atomic force microscopy, *Methods Cell Biol.* 83 (2007) 347–372.
- [42] B. Vuković, et al., Surface stabilization affects toxicity of silver nanoparticles in human peripheral blood mononuclear cells, *Nanomaterials* 10 (2020) 1–18.
- [43] H. Zhang, et al., Identification of distinct nanoparticles and subsets of extracellular vesicles by asymmetric flow field-flow fractionation, *Nat. Cell Biol.* 20 (2018) 332–343.
- [44] A. Zattoni, B. Roda, F. Borghi, V. Marassi, P. Reschiglian, Flow field-flow fractionation for the analysis of nanoparticles used in drug delivery, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87 (2014) 53–61.

- [45] G. Caracciolo, O.C. Farokhzad, M. Mahmoudi, Biological identity of nanoparticles in vivo: clinical implications of the protein corona, *Trends Biotechnol.* 35 (2017) 257–264.
- [46] R. de Lima, A.B. Seabra, N. Durán, Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles, *J. Appl. Toxicol.* 32 (2012) 867–879.
- [47] S. Kim, D.Y. Ryu, Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues, *J. Appl. Toxicol.* 33 (2013) 78–89.
- [48] I.M. Pongrac, et al., Oxidative stress response in neural stem cells exposed to different superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Int. J. Nanomed.* 11 (2016) 1701–1715.
- [49] L. Rubio, I. Barguilla, J. Domenech, R. Marcos, A. Hernández, Biological effects, including oxidative stress and genotoxic damage, of polystyrene nanoparticles in different human hematopoietic cell lines, *J. Hazard. Mater.* 398 (2020), 122900.
- [50] J.H. Park, N. Oh, Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells, *Int. J. Nanomed.* 51 (2014), <https://doi.org/10.2147/IJN.S26592>.
- [51] Y. Zhang, Y. Chen, P. Westerhoff, J. Crittenden, Impact of natural organic matter and divalent cations on the stability of aqueous nanoparticles, *Water Res.* 43 (2009) 4249–4257.
- [52] D. Docter, et al., The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned - challenge accepted? *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 6094–6121.
- [53] M. Delay, T. Dolt, A. Woellhaf, R. Sembritzki, F.H. Frimmel, Interactions and stability of silver nanoparticles in the aqueous phase: influence of natural organic matter (NOM) and ionic strength, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4206–4212.
- [54] J. Pi, et al., Selenium nanoparticles induced membrane bio-mechanical property changes in MCF-7 cells by disturbing membrane molecules and F-actin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23 (2013) 6296–6303.
- [55] F. Xu, C. Piett, S. Farkas, M. Qazzaz, N.I. Syed, Silver nanoparticles (AgNPs) cause degeneration of cytoskeleton and disrupt synaptic machinery of cultured cortical neurons, *Mol. Brain* 6 (2013).
- [56] I.V. Ogneva, S.V. Buravkov, A.N. Shubenkov, L.B. Buravkova, Mechanical characteristics of mesenchymal stem cells under impact of silica-based nanoparticles, *Nanoscale Res. Lett.* 9 (2014) 1–10.
- [57] I. Dulinska-Molak, et al., The influence of carbon-encapsulated iron nanoparticles on elastic modulus of living human mesenchymal stem cells examined by atomic force microscopy, *Micron* 108 (2018) 41–48.
- [58] J. Li, H. Mao, N. Kawazoe, G. Chen, Insight into the interactions between nanoparticles and cells, *Biomater. Sci.* 5 (2017) 173–189.
- [59] M. Hu, J. Wang, H. Zhao, S. Dong, J. Cai, Nanostructure and nanomechanics analysis of lymphocyte using AFM: from resting, activated to apoptosis, *J. Biomech.* 42 (2009) 1513–1519.
- [60] N.I. Nikolaev, T. Müller, D.J. Williams, Y. Liu, Changes in the stiffness of human mesenchymal stem cells with the progress of cell death as measured by atomic force microscopy, *J. Biomech.* 47 (2014) 625–630.
- [61] A. Orfao, A. Ruiz-Argüelles, General concepts about cell sorting techniques, *Clin. Biochem.* 29 (1996) 5–9.
- [62] S. Battu, J. Cook-Moreau, P.J.P. Cardot, Sedimentation field-flow fractionation: methodological basis and applications for cell sorting, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 25 (2002) 2193–2210.
- [63] S. Aldridge, S.A. Teichmann, Single cell transcriptomics comes of age, *Nat. Commun.* 11 (2020) 9–12.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

PROCJENA ZAJEDNIČKOG DJELOVANJA NANOČESTICA SREBRA I POLISTIRENA NA MODELNE STANIČNE LINIJE IMUNOSNOG SUSTAVA

KRUNOSLAV ILIĆ

Nanotehnologija danas ima ulogu rastuće važnosti u razvoju novih industrijskih i medicinskih proizvoda. Nanočestice srebra (nanoAg) jedne su od najviše istraživanih tipova nanomaterijala za potencijalnu primjenu u medicini zbog svojih izraženih antimikrobnih svojstava. Njihova uporaba u medicinskom kontekstu ograničena je zbog štetnog utjecaja kojeg mogu imati na ljudske stanice i tkiva. Iako je toksičnost nanočestica srebra dobro poznata i istraжена, manjkaju informacije o kombiniranim biološkim učincima nanoAg i drugih materijala ili nanomaterijala. Za razvoj novih, sigurnih uređaja i pomagala u kojima se koristi nanoAg, nužno je ispitati zdravstvene rizike koji mogu nastati međudjelovanjem nanoAg i materijala koji se primjenjuju u tim proizvodima. Polistiren je biološki inertan materijal široke industrijske i medicinske primjene, te su zbog toga nanočestice polistirena (nanoPS) odabrane za ispitivanje učinka mješavina nanočestica na modelne stanice ljudskog imunosnog sustava, Jurkat i THP-1. Nanočestice su karakterizirane metodama atomske mikroskopije sila te dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti. Analiziran je utjecaj nanoAg i nanoPS na preživljenje stanica, pokretanje apoptoze, parametre oksidativnog stresa, oštećenje DNA, pokretanje upalnog odgovora te promjene mehaničkih svojstava stanica. Unos nanočestica vizualiziran je konfokalnim mikroskopom i kvantificiran protočnim citometrom. Pokazano je da nanoAg i nanoPS ne stupaju u interakcije u vodenoj suspenziji ili u staničnom mediju, te da su mješavine nanoAg i nanoPS imale štetniji učinak na stanice Jurkat i THP-1 nego pojedinačne vrste nanomaterijala. Ovi rezultati važan su doprinos razumijevanju učinaka nanomaterijala na ljudsko zdravlje i razvoju novih i sigurnih primjena nanotehnologije u medicini.

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

Rad sadrži: 95 stranica, 26 slika, 6 tablica, 179 literaturnih navoda, 1 prilog. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nanočestice srebra, nanočestice polistirena, stanična biologija, upalni odgovor, oksidativni stres, nanomehanika

Mentori: dr. sc. Ivan Pavičić, znanstveni savjetnik
izv. prof. dr. sc. Petra Turčić, spec. klin. farm.

Ocjenjivači: [upisuju se naknadno]

Datum prihvatanja rada: [upisuje se naknadno]

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

EVALUATION OF COMBINED EFFECTS OF SILVER AND POLYSTYRENE NANOPARTICLES ON MODEL IMMUNE CELLS

KRUNOSLAV ILIĆ

Nanotechnology has a role of growing importance in development of novel industrial and medical applications. Silver nanoparticles (nanoAg) are some of the most researched types of nanomaterials for potential use in medicine due to their significant antimicrobial properties. Their use in medical applications is limited due to their potential toxicity to human cells and tissue. Although the toxicity of silver nanoparticles is well known, there is a distinct lack of information on combined biological effects of nanoAg and other types of materials or nanomaterials. In order to develop safe nanoAg-enabled products, it is paramount to determine if interactions of nanoAg with other materials could pose additional health hazard compared to nanoAg alone. Polystyrene is a biologically inert material with widespread use in industrial and medical applications, and polystyrene nanoparticles (nanoPS) were used to assess the effects of nanometrial mixtures on model immune cell lines, Jurkat and THP-1. Nanoparticles were characterized using atomic force microscopy, as well as dynamic and electrophoretic light scattering techniques. The effects of nanoAg and nanoPS on cell survival, induction of apoptosis, oxidative stress parameters, DNA damage, immune response and changes in cell mechanical properties were analyzed. Nanoparticle uptake was visualized with confocal microscope and quantified using flow cytometry. Results have shown that nanoAg and nanoPS do not interact in water suspensions or in cell culture media, and that nanoAg/nanoPS mixtures had an augmented, detrimental impact on Jurkat and THP-1 cells compared to individual nanoparticle types. These results present an important contribution for understanding impact of nanomaterials on human health, and for development of novel and safe applications of nanotechnology in medicine.

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

Thesis includes: 95 pages, 26 figures, 6 tables and 179 references, 1 supplement. Original is in Croatian language.

Key words: silver nanoparticles, polystyrene nanoparticles, cell biology, immune response, oxidative stress, nanomechanics

Supervisors: Ivan Pavičić, Scientific Advisor, PhD
Associate Professor Petra Turčić, PhD

Reviewers: [upisuju se naknadno]

Accepted: [upisuje se naknadno]