IMUNOKOMPATIBILNOST NANOČESTICA SREBRA – UČINAK NA MONONUKLEARNE STANICE HUMANE PERIFERNE KRVI

Vuković, Barbara

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:728722

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Barbara Vuković

IMUNOKOMPATIBILNOST NANOČESTICA SREBRA – UČINAK NA MONONUKLEARNE STANICE HUMANE PERIFERNE KRVI

Doktorska disertacija

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Barbara Vuković

IMUNOKOMPATIBILNOST NANOČESTICA SREBRA – UČINAK NA MONONUKLEARNE STANICE HUMANE PERIFERNE KRVI

Doktorska disertacija

Osijek, 2021.

Mentor rada: doc. dr. sc. Vatroslav Šerić, mag. med. biochem.

Komentorica rada: doc. dr. sc. Ivana Vinković Vrček, znan. savj., mag. med. biochem.

Rad ima 93 stranice.

PREDGOVOR

Ova doktorska disertacija izrađena je u sklopu znanstvenoga projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Značaj interakcija metalnih nanočestica sa sumpornim biomolekulama za nano-bio sučelje - NanoFaceS“ (HRZZIP-2016-06-2436) pod vodstvom dr. sc. Ivane Vinković Vrček, koja nas je svojim strastvenim radom i predanošću uvela u beskrajni svijet minijaturnih nanočestica koje su postale sastavni dio našeg svakidašnjeg života, i na tome joj velika HVALA.

Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Vatroslavu Šeriću bez kojeg ne bih ni živjela, ni radila u ovom prekrasnom gradu, te se u potpunosti ostvarila u poslovnom i osobnom životu.

Zahvaljujem magistri Blaženki Dobrošević koja je sa mnom godinama nesebično dijelila svoje znanje iz područja kliničke hematološke dijagnostike, a moje znanje dovela na zavidnu razinu, te me nakon dugog lutanja po raznolikim prostranstvima medicinske biokemije upoznala s mojom velikom ljubavi – hematološkom imunofenotipizacijom.

Zahvaljujem kolegicama Gordani, Silviji, Ani i Ani iz našeg tima „protočna“ koje su uvijek bile pri ruci kada je trebalo.

Zahvaljujem svojoj obitelji: suprugu Darku, sinu Petru, roditeljima Zdenki i Željku, bratu Siniši te baki Danici, na nesebičnoj potpori.

Zahvaljujem dr. Egiću, Toniju i Ivoni što su me 2020. godine vratili na noge i omogućili da doživim ovaj dan.

Ovaj rad posvećujem svom didu Stjepanu koji je znao da će ovaj dan doći, ali ga, nažalost, nije dočekao sa mnom.

„ I…a universe of atoms, an atom in the universe.“

Richard P. Feynman

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Nanotehnologija i nanomaterijali 1

1.2. Značaj i karakteristike nanočestica 2

1.3. Važnost i biomedicinska primjena nanočestica srebra (nanoAg) 3

1.4. Mehanizmi nanotoksičnosti 5

1.5. Metode evaluacije *in vitro* citotoksičnosti i genotoksičnosti nanočestica 6

1.6. Interakcije srebrnih nanočestica s imunološkim sustavom 7

1.7. Metode ispitivanja hemokompatibilnosti medicinskih (nano)proizvoda 8

1.8. Imunokompatibilnost nanoAg-a kao glavni preduvjet za dizajn sigurnih medicinskih nanouređaja na bazi srebra 11

1.9. Limfocitne i monocitne površinske molekule za ciljano djelovanje imunomodulacijskih metalnih nanočestica 13

2. HIPOTEZA 15

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 16

4. ISPITANICI I METODE 17

4.1. Ustroj studije 17

4.2. Ispitanici 17

4.3. Metode 18

4.3.1. Sinteza i karakterizacija nanoAg-a 18

4.3.2. Priprema stanica za ispitivanje 20

4.3.3. Tretiranje hPBMC stanica s nanoAg-om 21

4.3.4. Evaluacija citotoksičnosti nanoAg-a protočnom citometrijom 22

4.3.5. Analiza ulaska nanoAg-a u stanice 24

4.3.6. Analiza stanične smrt stanica 24

4.3.7. Analiza oksidativnog stresa u tretiranim stanicama 26

4.3.8. Vizualizacija hPBMC stanica tretiranih s nanoAg-om 27

4.3.9. Evaluacija genotoksičnosti nanoAg-a alkalnim komet testom 27

4.3.10. Evaluacija imunomodulatornog učinka nanoAg-a 28
4.3.11. Statističke metode 30
5. REZULTATI 32
5.1. Karakterizacija i stabilnost sintetiziranih nanočestica 32
5.2. Ulazak nanoAg-a u stanice i citotoksični učinci 34
5.3. Genotoksični učinci nanoAg-a na limfocite 50
5.4. Imunomodulatorno djelovanje nanoAg-a 51
6. RASPRAVA 66
7. ZAKLJUČAK 75
8. SAŽETAK 77
9. SUMMARY 79
10. LITERATURA 81
11. ŽIVOTOPIS 90

POPIS KRATICA

AAS – atomska apsorpcijska spektrometrija (od eng. *Atomic Absorption Spectroscopy*)

AOT – natrijev bis(2-etilheksil) sulfosukcinat (eng. *sodium dioctyl sulfosuccinate*)

BSA – goveđi serumski albumin (od eng. *bovine serum albumin*)

CLSM – konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija (od eng. *Confocal Laser Scanning Microscopy*)

COVID-19 – koronavirus bolest (od eng. *Coronavirus Disease 2019*)

DCFH-DA – dikloro-dihidro fluorescein diacetat (od eng. *Dichloro-Dihydro-Fluorescein Diacetate*)

DHE – dihidroetidij (od eng. *Dihydroethidium*)

DLS/ELS – dinamičko / elektroforetsko raspršenje svjetla (od eng. *Dynamic / Electrophoretic Light Scattering*)

$DiOC_6$ – diheksiloksakarbocijanin jodid (od eng. *Dihexyloxacarbocyanine Iodide*)

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

EK – Europska komisija

EU – Europska unija (od eng. *European Union*)

GC – plinska kromatografija (od eng. *Gas Chromatography*)

GLP – dobra laboratorijska praksa (od eng. *Good Laboratory Practice*)

GFAAS – atomska apsorpcijska spektroskopija grafitne peći (od eng. *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy*)

FITC – fluorescein izotiocijanat (od eng. *Fluorescein-Isothiocyanate*)

FSC – raspršenje svjetla pod malim kutem (od eng. *forward scatter*)

HIV – virus humane imunodeficijencije (od eng. *Human Immunodeficiency Virus*)

hPBMC – humane mononuklearne stanice periferne krvi (od eng. *human Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke preciznosti (od eng. *High Performance Liquid Chromatography*)

ICP-MS – masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (od eng. *Inductively Cuopled Plasma Mass Spectrometry*)

ISO – Međunarodna organizacija za standardizaciju (od eng. *International Organization for Standardization*)

LC – tekućinska kromatografija (od eng. *Liquid Chromatography*)

MFI – srednja vrijednost intenziteta fluorescencije (od eng. *mean fluorescence intensity*)

MS – masena spektrometrija (od eng. *Mass Spectrometry*)

NMR – nuklearna magnetska rezonanca (od eng. *Nuclear Magnetic Resonance*)

PALS – pozitronska anihilacijska spektroskopija (od eng. *Positron Annihilation Spectroscopy*)

PBS – fosfatni pufer u fiziološkoj otopini (od eng. *phosphate buffer saline*)

PLL – poli-L-lizin (od eng. *poly–L–lysine*)

PVP – polivinil pirolidon (od eng. *polyvinylpyrrolidone*)

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (od eng. *reactive oxygene species*)

SCENIHR – Znanstveni odbor Europske komisije za nove i novoustaljene zdravstvene rizike (od eng. *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*)

SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija (od eng. *Scanning Electrone Microscopy*)

SPR - površinska plazmonska rezonancija (od eng. *Surface Plasmon Resonance*)

SSC – raspršenje svjetla pod pravim kutem (od eng. side scatter)

TEM – transmisijska elektronska mikroskopija (od eng. *Transmission Electron Microscopy*)

TL – dužina repa DNK (od eng. *Tail Length*)

TI – intenzitet repa DNK (od eng. *Tail Intensity*)

UPW – ultračista voda. (od eng. *ultra pure water*)

UV-VIS – spektroskopija u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra (od eng. *Ultraviolet-Visible Spectroscopy*)

1. UVOD

1.1. Nanotehnologija i nanomaterijali

Prošlo je nešto više od šest desetljeća od poznatog predavanja teorijskog fizičara Richarda Feynmana pod nazivom „There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics“, održanom na skupu Američkog društva fizičara, kojim je najavio vladavinu „nevidljivog diva“ na polju tehnologije. Iako je tada prošao gotovo nezamjećeno, danas se taj trenutak smatra početkom razvoja nanotehnologije, koja je od osamdesetih godina prošloga stoljeća do danas doživjela enorman razvoj i ušla u sve pore života kakvog znamo.

U svom govoru iznio je neke revolucionarne ideje koje su tada bile nezamislive. Između ostalog, predložio je mogućnost stvaranja minijaturnih uređaja u kojima ćemo „poslagati atome onako kako želimo“, najavljujući cijeli raspon današnjih tehnoloških ostvarenja na nanometarskoj skali. Također je predložio mogućnost liječenja na način da „progutamo doktora“, najavljujući time eru nanovektora koji se danas u nanomedicini koriste u terapijske i dijagnostičke svrhe (1).

Nanotehnologija ili „znanost u malom“ proučava i razvija materiju na nanoskali. Proširila se gotovo na sve grane industrije (energetska, informacijska, vojna, autoindustrija, farmaceutska, tekstilna, prehrambena, poljoprivredna) i medicine (dijagnostika i terapija). Zbog ubrzanoga razvoja nanotehnologije, razvila su se područja nanomedicine i nanotoksikologije, koje proučavaju sve pozitivne i negativne učinke nanotehnologije na ljudsko zdravlje (2, 3).

Prema Europskoj komisiji (EK), nanotehnologija pripada skupini tzv. „ključnih naprednih tehnologija“ (KETs, od eng. *Key Enabling Technologies*), koje istovremeno predstavljaju veliki izazov i značajan potencijal za okolišni, energetski, društveno-ekonomski i medicinski razvoj. Jedan od ciljeva najvećeg znanstveno-tehnološkog programa Europske unije (EU), Obzora 2020, jest premostiti jaz između nanotehnoloških inovacija i potreba tržišta. Kako bi se osigurao siguran razvoj i primjena nanomaterijala, jedan od ciljeva Obzora 2020 je proširiti znanstveno utemeljena saznanja o svim učincima nanotehnologije na zdravlje i okoliš, te osigurati metodološki okvir za procjenu tih učinaka (4).

Prema zadnjem važećem EK pravilniku, nanomaterijali se definiraju kao prirodni ili (slučajno ili namjerno) proizvedeni materijali sastavljeni od nevezanih ili vezanih

(agregiranih / aglomeriranih) nanočestica, od kojih ≥ 50% sadrži jednu ili više vanjskih dimenzija u rasponu 1-100 nm. Ovu definiciju prihvatila je EU koja u svojim propisima o proizvodima za proizvođače navodi posebne regulatorne mjere za nanomaterijale (5, 6).

Iako su relativno novi, nanomaterijali su vrlo brzo ušli u široku primjenu, kako u svakodnevnom životu, tako i u liječenju ljudi, istovremeno izazivajući zabrinutost za zdravlje i okoliš u svim društvenim područjima, a posebno u području regulatorne znanosti. Na razini EU pokrenuti su veliki napori za okupljanjem znanstvenika, stručnjaka i tehnologa kako bi se razvile pouzdane metode za detekciju i karakterizaciju nanomaterijala, te testovi za procjenu i analizu interakcija nanomaterijala s biološkim sustavima, od razine stanice pa sve do razine cjelovitog organizma, što čini temelj razumijevanja potencijalno štetnih utjecaja nanometarskih struktura na zdravlje i okoliš, te omogućava razvoj sigurnih nanomaterijala. Sve veća raznolikost nanomaterijala zahtijeva standardizaciju metoda za toksikološki probir kako bi se osigurala sigurnost proizvoda za potrošače. Upravo ta standardizacija jedan je od ključnih problema kojim se danas bavi nanomedicinska i nanotoksikološka zajednica (7).

1.2. Značaj i karakteristike nanočestica

Nanomaterijali se razlikuju po strukturi (nanočestice, nanovlakna, nanocjevčice, nanokompoziti) i po sastavu (organski – fulereni i anorganski – metali). Najzastupljenija vrsta nanomaterijala su nanočestice koje se sve više primjenjuju u proizvodnji hrane, kozmetike, tekstila, elektronike, a posebno u polju biomedicine. Njihov veliki značaj proizlazi iz njihovih jedinstvenih fizikalnih svojstava – male dimenzije, a velike površine koja nastaje prilikom postupka smanjivanja čestice. Velika površina posjeduje veliku reaktivnost i posebna fizikalno-kemijska svojstva, a rezultat je porasta omjera između broja atoma na površini i onih u unutrašnjosti (2). Reaktivnost nanočestice čini ju puno učinkovitijom od izvorne vrste atoma od koje potječe, ali i potencijalno opasnijom za zdravlje i okoliš (8).

Brojne studije pokazale su kako nanočestice lako ulaze o organizam (spontano – preko kože, dišnog ili probavnog sustava ili namjerno – biomedicinskom primjenom) jer su im dimenzije slične kao u staničnih proteina i drugih makromolekula.

Prelaskom u krvotok ulaze u stanice, a potom se odlažu u različita tkiva i organe gdje mogu prouzročiti različite patofiziološke učinke (2, 7, 9).

Veliku primjenu imaju metalne nanočestice, najčešće sačinjene od zlata, srebra, bakra, željeza, cinka zbog jedinstvenih optičkih, fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava (10, 11). Njihova učinkovitost i biološki utjecaj ovise o fizikalno-kemijskim svojstvima od kojih su najvažniji veličina i distribucija veličine, kemijski sastav, naboj, oblik, sposobnost kristalizacije, topljivost u medijima, prisustvo nečistoća, površinska funkcionalizacija (10-12). Mnoga istraživanja tvrde da su manje nanočestice (<50 nm u promjeru) reaktivnije, ali istovremeno i toksičnije (13-15). Također, smatra se da su pozitivno nabijene nanočestice toksičnije od onih neutralnih ili negativno nabijenih. Nanočestice s kationskom površinom ili omotačem, kao što je npr. poli-L-lizin (PLL), djeluju elektrostatski na biološke membrane što dovodi do toksičnih učinaka, osobito na krvne stanice i koagulaciju. Tako primjerice metalne nanočestice mogu dovesti do hemolize eritrocita, aktivacije i agregacije trombocita, indukcije leukocitne prokoagulantne aktivnosti te posljedično diseminirane intravaskularne koagulacije. Metalne nanočestice s negativno nabijenim omotačem, kao što je npr. natrijev dioktil sulfosukcinat (AOT), pokazale su veću genotoksičnost na nekim mišjim staničnim linijama (15, 16). No, važno je napomenuti da se svojstva i učinci nanočestica ne mogu odvojeno promatrati, te se pri procjeni bioloških učinaka uvijek u obzir moraju uzeti svi čimbenici (17, 18).

1.3. Važnost i biomedicinska primjena nanočestica srebra (nanoAg)

Najzastupljenije metalne nanočestice u medicini su srebrne nanočestice (nanoAg) zbog odavno poznatog, snažnog biocidnog učinka ionskog srebra. Sintezom nanoAg-a, a ovisno o veličini, u jednu nanočesticu stane i do 15 000 atoma srebra, a biocidno djelovanje nanoAg-a temelji se na polaganom otpuštanju iona srebra s površine nanoAg-a. Time se omogućuje medicinska primjena uz korištenje niže doze, a jačeg učinka takvog oblika srebra u odnosu na ionski oblik (8). Biomedicinska primjena nanoAg-a obuhvaća širok spektar proizvoda s biocidnim svojstvima uključujući antibakterijske / antivirusne / antifungicidne kreme, zavoje impreginirane nanoAg-om, katetere, kirurške instrumente, implantate, proteze obložene nanoAg-om, zubna punjenja s nanoAg-om, ali i dijagnostičke biosenzore, te nanovektore za ciljanu isporuku lijekova i cjepiva (3, 9). Smatra se da će, zbog svojih

biocidnih svojstava, nanoAg uskoro postati alternativa klasičnom liječenju antibioticima (19). Antivirusna aktivnost nanoAg-a već se pokazala korisnom u borbi protiv HIV-a, herpes simplex virusa tipa 1, hepatitisa B i mnogih drugih, a uslijed globalne pandemije bolesti COVID-19 upravo su nanočestice srebra zbog biocidalnih svojstava izdvojene kao potencijalno oružje u borbi protiv SARS-CoV-2 virusa (10, 16, 19-22). Naime, istraživanja su pokazala da nanočestice plemenitih metala, pa tako i nanoAg, imaju sposobnost vezanja za makromolekule mikroba. U istraživanjima na HIV virusu, terapijska učinkovitost nanoAg-a postiže se vezanjem na glikoprotein 120 (gp120) koji predstavlja vezno mjesto virusa na CD4 receptor na površini pomagačkih T-limfocita i time inhibiraju vezanje virusa (22).

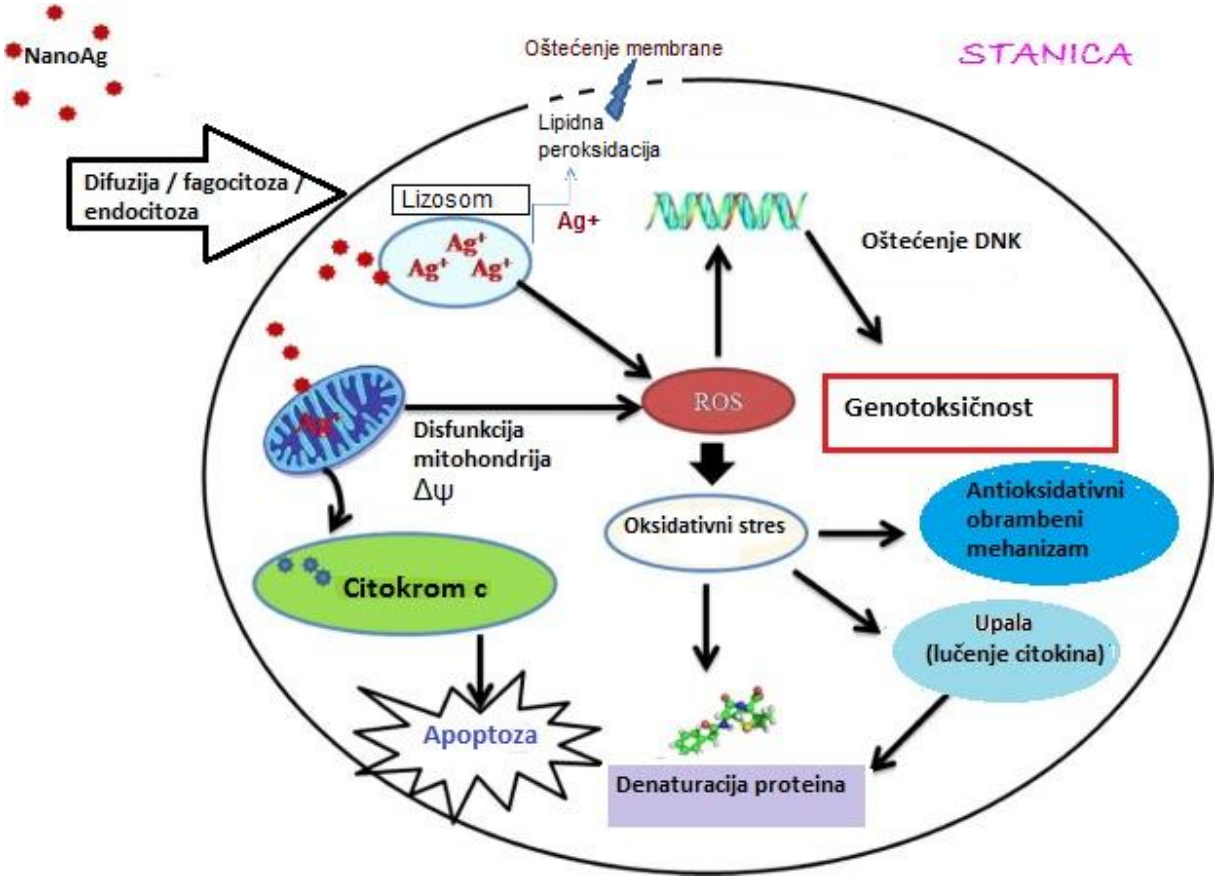
Uz navedena biocidna svojstva, nanočestice srebra posjeduju i antitumorska svojstva (23-25). Tumorska imunoterapija rastuća je grana nanomedicine. Lijekovi korišteni u tumorskoj imunoterapiji mogu djelovati ili na same stanice raka, ili kao imunosupresivi. Jedan od primjera su nanočestice željezovog oksida koje osim tumorske ablacije aktiviraju citotoksične (CD8+) T-limfocite koje sprječavaju tumorski rast (16). Dodatni primjeri uključuju nanoAg stabiliziran polivinilpirolidonom (PVP) koji zbog indukcije oksidativnog stresa djeluje citotoksično na leukemijske stanice u akutnoj mijeloičnoj leukemiji ili zlatne nanočestice vezane s HDL-kolesterolom u terapiji B-non-Hodgkinovog limfoma (24). Nanočestice srebra se koriste u antitumorskoj terapiji jer, između ostalog, imaju i antiangiogena svojstva te tako sprječavaju rast i širenje tumora. Antitumorski učinak nanoAg-a u liječenju nekih drugih limfoma očituje se preko aktivacije enzima kaspaze-3. Ciljano liječenje raka nanolijekovima može se ostvariti i njihovim kombiniranjem s antitijelima na specifične tumorske biljege. Osnovno svojstvo nanolijekova u liječenju raka jest njihova sposobnost razlikovanja malignih od normalnih (zdravih) stanica (11).

Problem biomedicinske primjene metalnih nanočestica, pa tako i nanoAg-a, predstavlja njihova reaktivnost i biotransformacija, ovisno o okolišu u kojem se nađu, pa mogu mijenjati svoja svojstva (agregacija / oksidacija / otpuštanje iona). Iz toga se razloga nanoAg površinski stabilizira primjenom omotača ili stabilizatora (eng. *capping / coating agents*). Uloga tih omotača je trostruka: zaštitna, stabilizacijska i funkcionalna. Dakle, osim što omotači sprječavaju oksidaciju, topljivost i agregaciju nanočestica, mogu dati nova, poboljšana svojstva. Podaci iz znanstvene literature pokazuju da je od svih oblika srebra najtoksičnije ionsko srebro, zatim koloidno

srebro, pa nanočestice srebra bez površinskog omotača, dok se one sa zaštitnim omotačem smatraju najmanje toksičnima (11, 12, 15, 26).

1.4. Mehanizmi nanotoksičnosti

Pretpostavlja se da je osnovni mehanizam citotoksičnosti i genotoksičnosti metalnih nanočestica oksidativni stres izazvan stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, od eng. reactive oxygene species) koji dodvodi do potrošnje glutationa. Ukoliko nanočestice uđu u stanicu i dovedu do oštećenja mitohondrijske membrane, pokreće se kaskada različitih procesa koji oštećuju stanično disanje (Slika 1.1). Svako oštećenje mitohondrijske membrane dovodi do mitohondrijske disfunkcije i dodatne proizvodnje ROS-ova koji uzrokuju lučenje proupalnih citokina, denaturaciju proteina i oštećenje DNK, odnosno genotoksičnost. Posljedično može doći do aktivacije enzima kaspaze-1 koji regulira programiranu staničnu smrt odnosno apoptozu ili do prevelikog, nekontroliranog oštećenja stanice i njene nekroze.



Slika 1.1. Mehanizam citotoksičnosti i genotoksičnosti srebrnih nanočestica.

U slučaju ulaska nanoAg-a u stanicu putem endocitoze, nanoAg se može otopiti u lizosomu, te se u stanicu otpuštaju toksični ioni srebra koji uzrokuju lipidnu peroksidaciju, te posljedično oštećenje stanične membrane (8, 9, 12, 33, 47- 50).

Uz apoptozu i nekrozu, istraživanja su pokazala da nanočestice mogu pokrenuti i mehanizam programirane stanične smrti poznat pod nazivom autofagija ili samoproždiranje, koji u normalnoj homeostazi ima zaštitnu ulogu dok nekontrolirana autofagija dovodi do citotoksičnih učinaka (51).

Upravo su gore opisani mehanizmi citotoksičnosti temelj dizajna nanoAg-a za antitumorske terapije. Primjerice, u djelovanju na leukemijske stanice, te stanice raka pluća, jetre, dojke i kože, nanoAg izaziva oksidativni stres i depleciju mitohondrijskog membranskog potencijala što uzrokuje apoptozu i/ili autofagiju tih malignih stanica. Također djeluju i antiangiogeno inhibirajući vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF, od eng. *vascular endothelial growth factor*) čime sprječavaju rast i širenje tumora. Težeći za razvojem ekološki prihvatljivih tehnologija, danas se ulažu povećani napori u sintezu biogenih nanočestica srebra (15). Polisaharidi iz mikroba imaju sposobnost redukcije i / ili stabilizacije nanoAg-a. Istraživanja su pokazala da takve nanočestice srebra djeluju biocidno na maligne stanice raka dojke i kolona, opet putem apoptoze ili autofagije (38, 52, 53).

1.5. Metode evaluacije *in vitro* citotoksičnosti i genotoksičnosti nanočestica

Za evaluaciju *in vitro* citotoksičnosti u tijeku je validacija postojećih, kao i razvoj novih *in vitro* testova. Za procjenu akutne toksičnosti i preosjetljivosti zasad se mogu primijeniti postojeći protokoli (ISO 10993-10; 2010 i ISO 10993-11/12; 2012). Za testiranje *in vitro* genotoksičnosti predloženo je nekoliko metoda: 1. test indukcije mutacije gena u sisavaca, 2. *in vitro* mikronukleus test i test na kromosomske aberacije i 3. *in vitro* komet test. Za sve *in vitro* testove citotoksičnosti nužna je prethodna evaluacija proporcije ulaska tj. internalizacije nanočestica u stanice/bakterije (eng. *nanoparticle uptake potential*). Za *in vivo* testiranje genotoksičnosti, uz gore navedene testove, preporučuju se i dodatne slične metode (32). Prema smjernicama, u ovom radu korišten je alkalni komet test za evaluaciju genotoksičnosti koji predstavlja osjetljivu metodu za određivanje primarnih oštećenja deoksiribonukleinske kiseline (DNK). Nakon denaturacije, intaktna DNK je prevelika

da bi putovala kroz pore agaroznog elektroforetskog gela, dok mali fragmenti oštećene DNK putuju pod utjecajem struje formirajući pritom oblik kometa. Rep nalik kometu označava oštećenje DNK lanca. Što je rep kometa duži, to je oštećenje jače (9).

Prilikom evaluacije nanotoksičnosti treba uzeti u obzir, uz osnovna fizikalno-kemijska svojstva, različito ponašanje nanočestica u različitim medijima. Metalne nanočestice imaju tendenciju sporog otpuštanja iona u medij što može rezultirati povećanom toksičnošću zbog oslobođenih iona, pa je nužno određivanje faktora topljivosti prije i za vrijeme testiranja. Iz tog razloga, SCENIHR smjernice preporučuju usporedno koristiti kontrolu u ionskom obliku (32). Posebnu pozornost treba usmjeriti na veličinu nanočestica i primjenjenu dozu o čemu uvelike ovisi toksičnost. Istraživanja su pokazala da veću toksičnost pokazuju manje nanočestice srebra u nižoj dozi, nego veće nanočestice u većoj dozi. Stoga je u proizvodnji sigurnih nanoproizvoda važno odrediti minimalnu toksičnu koncentraciju. Također, kvantificiranje internaliziranog nano-Ag-a iznimno je važno u analizi citotoksičnosti jer je upravo internalizirana koncentracija odgovorna za njihov biološki učinak (12, 18, 33).

Oblik nanoAg-a također igra važnu ulogu u ostvarivanju toksičnih učinaka. Zhang i suradnici zaključili su da je sferični oblik manje toksičan od nanožica jer nanožice ne mogu biti internalizirane, stoga djeluju na staničnoj površini (33).

Tip stanica također uvjetuje internalizaciju i način djelovanja nanoAg-a (12, 18, 35). Istraživanja su pokazala da su fibroblasti i astrociti manje osjetljivi na učinke nanoAg-a nego stanice glioblastoma i tumorskih plućnih stanica; normalne stanice općenito imaju drugačiji odgovor na djelovanje nanoAg-a nego tumorske stanice jer posjeduju manje lizosoma čije membrane igraju važnu ulogu u interakciji i obrani od oksidativnog stresa (33, 36- 38).

1.6. Interakcije srebrnih nanočestica s imunološkim sustavom

Osnovni preduvjet za kliničku primjenu koji moraju ispuniti svi medicinski proizvodi, pa tako i nano-proizvodi, jest biokompatibilnost koja uključuje hemokompatibilnost i histokompatibilnost, odnosno da ti proizvodi u kontaktu s krvlju i tkivima ne izazivaju štetne učinke (27). S obzirom na raspon biomedicinske primjene nanoAg-a, realno je očekivati da će se kod nekih primjena dogoditi interakcija nanoAg-a sa stanicama

prirodnih barijera organizma (fibroblasti, endotel, epitel, intestinalna barijera) kao i sa stanicama imunološkog sustava (monociti/makrofagi, granulociti, limfociti, NK-stanice, dendritične stanice). Te će interakcije biti određene fizikalno-kemijskim svojstvima nanoAg-a. Primjerice, istraživanja su pokazala da veličina nanoAg-a određuje njihov učinak na proliferaciju humanih limfocita (28). Zbog mogućeg kontakta s imunološkim sustavom, prilikom razvoja medicinskih proizvoda koji sadrže nanoAg, nužno je ispitati njihov učinak na imunokompatibilnost (10, 29). Mogući učinci nanoAg-a na imunološki sustav mogu biti poželjni (imunomodulatorni) i nepoželjni (imunotoksični). Imunotoksični učinak može se očitovati kao pojava upale, izazivanje autoimunih bolesti, pa čak i raka.

U novije doba, razvojem tzv. nanovakcinologije i ciljane dostave lijekova nanovektorima (npr. za antitumorsku terapiju), razvijaju se posebne formulacije nano-Ag-a s mogućnošću upravljanja (moduliranja) imunološkim odgovorom. Imunomodulacija se može očitovati kao stimulacija ili supresija imunološkog odgovora. Prilikom imunostimulacije, nanoAg se ponašaju kao adjuvansi ili hapteni kojima se želi pojačati imunološki odgovor, što je poželjno prilikom cijepljenja. Nadalje, nanočestice srebra mogu same po sebi biti imunosupresivi ili dostaviti imunosupresivni (ili protuupalni) lijek na ciljno mjesto. Cilj takvih imunosupresivnih nanovektora jest spriječiti odbacivanje organa prilikom transplantacije, te spriječiti razvoj upalnih i autoimunih bolesti (16, 21).

1.7. Metode ispitivanja hemokompatibilnosti medicinskih (nano)proizvoda

Metode ispitivanja hemokompatibilnosti za zadaću imaju evaluirati učinke kontaktnih medicinskih uređaja ili materijala na krv, odnosno na krvne sastojke. Problem ispitivanja hemokompatibilnosti nanoAg-a je njihovo interferiranje s klasičnim metodama koje dovodi do lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata. Naime, metalne nanočestice su optički aktivne te mogu raspršivati ili apsorbirati svjetlost u kolorimetrijskim testovima. Osim toga, nanočestice srebra često ulaze u interakcije s reagensima zbog svoje reaktivnosti. Stoga standard ISO 10993-4 za ispitivanje interakcija medicinskih uređaja s krvlju (30), uveden od strane Međunarodne organizacije za standardizaciju (ISO), u slučaju nano-proizvoda nije primjenjiv. Iz tog razloga, kao i zbog izuzetne složenosti humanog imunološkog sustava, danas na razini Europe, ali i cijelog svijeta, postoje brojna udruženja i inicijative kako oblikovati

i standardizirati metode za ispitivanje hemokompatibilnosti medicinskih proizvoda koji sadržavaju metalne nanočestice. Projekt ProSafe pod pokroviteljstvom EU-a ujedinio je brojne druge europske i američke projekte s ciljem pronalaska metoda i protokola prikladnih za procjenu nano-rizika (31). Međunarodna organizacija ISO udružila se s Zajedničkim istraživačkim centrom (JRC, od eng. *Joint Research Centre*) pri EK-u kako bi zajedno standardizirali karakterizaciju i procjenu sigurnosti nanomaterijala, no taj novi standard još nije dovršen. Drugo udruženje znanstvenika pri EU-u koje se okuplja u sklopu SCENIHR (od eng. *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*), izdalo je preliminarne smjernice za evaluaciju nanotoksičnosti koje se treba provoditi u četiri faze: 1. procjena rizika od otpuštanja nanočestica iz nanoproizvoda, 2. procjena širenja nanočestica i njihovog zadržavanja u organizmu (ulazak u krvotok i odlaganje u tkivima), 3. toksikološka procjena rizika (citotoksičnost, genotoksičnost i imunotoksičnost) i 4. karakterizacija i procjena ukupnog rizika (32).

Za evaluaciju prve faze, smjernice ističu da je ključna detaljna karakterizacija fizikalno-kemijskih svojstava nanočestica. U tu svrhu se preporučaje primjena cijelog niza metoda (AAS, MS, ICP-MS, UV-Vis, HPLC, GC/LC-MS, DLS, NMR, TEM, PALS, itd.), ovisno o svojstvu koje se želi ispitati. Druga faza koja se odnosi na biodistribuciju, uvelike ovisi o tome radi li se o nano-uređajima korištenim u invazivnom ili neinvazivnom medicinskom postupku. U trećoj fazi evaluira se toksičnost nanomaterijala na organe, tkiva i krvne stanice koja međusobno ne mora biti proporcionalna. Naime, nanotoksičnost ovisi o ulasku, odnosno internalizaciji nanočestica u pojedine organe, tkiva i krv. Organi i organski sustavi koji su bogati fagocitima (jetra, slezena, koštana srž) imaju veću mogućnost internalizacije nanočestica otpuštenih iz medicinskih nano-uređaja. Smjernice upozoravaju da, unatoč tome što postoje važeći protokoli za ispitivanje toksičnosti medicinskih uređaja (ISO 10993, ISO7IEC 17025, GLP), niti jedan nije validiran za nanomaterijale. Jedno od dodatnih specifičnosti ovih materijala jest dobivanje novih bioloških svojstava nanočestica kada dođu u kontakt s biomolekulama jer dolazi do adsorpcije biomolekula na njihovoj površini i formiranja tzv. biomolekulske korone. Tipična proteinska korona na nanočesticama sastoji se od serumskog albumina, imunoglobulina, transferina, fibrinogena, komplementa, apolipoproteina i hemoglobina, a površinski afinitet nanočestica za ove proteine određuje tip interakcije nanočestica sa stanicama (12). Upravo površinske makromolekule kao što

su proteini ili polisaharidi sprječavaju aglomeraciju nanočestica i omogućuju im ulazak u stanične organele (33). Stoga je ključno za vrijeme toksikološkog ispitivanja analizirati i utjecaj proteinske korone. Tijekom sinteze nanočestica za kliničke svrhe treba uzeti u obzir vrstu proteinske korone koja će se namjenski vezati na površinu kako bi nanočestice istovremeno bile i sigurne i učinkovite (34).

Prema ISO 10993-4 standardu, za testiranje hemokompatibilnosti medicinskih uređaja potrebno je ispitati hemolizu eritrocita, aktivaciju primarne i sekundarne hemostaze, te učinak na imunološki sustav (funkcijska aktivnost leukocita i komplementa). Istraživanja su pokazala da polistirenske i neke metalne nanočestice uzrokuju hemolizu, te aktivaciju komplementa, trombocita i granulocita (11, 17, 39, 40). Za testiranje hemokompatibilnosti metalnih nanočestica danas nema dostupnih validiranih testova. Jedino je preporučeno testiranje hemolize eritrocita metodom navedenom u standardu ISO 10993-4. U kontaktu s krvi posebnu pozornost treba usmjeriti na stanice sa sposobnošću fagocitoze kao što su mononuklearne stanice (monociti) i polimorfonuklearne stanice (neutrofili). Interakcija nanočestica sa stanicama limfatičnog tkiva od osobite je važnosti u razvoju nanovektora za ciljano uvođenje lijekova, cjepiva i tumorske dijagnostike. Međutim, za evaluaciju interakcija nanočestica s tkivnim i krvnim fagocitima i limfocitima u današnje vrijeme nema dostupnih validiranih metoda (32, 41). Neka su istraživanja predložila mogućnost ispitivanja imunotoksičnosti citomorfološkom, citotoksičnom i analizom funkcionalne aktivnosti leukocita (polimorfonuklearnih i mononuklearnih krvnih stanica) (42).

Ulazak nanoAg-a u stanice kao mjera proporcije njihove internalizacije u stanice, jedan je od preduvjeta za ostvarenje njihove citotoksične funkcije. Mogući mehanizmi ulaska u stanice su difuzija, endocitoza, pinocitoza ili fagocitoza (9, 12). Osim ulaska u stanicu, nanočestice srebra mogu i prianjati na površini stanica vežući se za staničnu membranu, no izuzetno je teško postojećim metodama razlikovati površinski vezane od internaliziranih nanočestica. Razlikovanje ova dva mehanizma ključno je u analizi citotoksičnosti i procjeni rizika (43). Za analizu citotoksičnosti, odnosno stanične smrti, danas su u eksperimentalnom smislu preporučene dvije skupine metoda: mikroskopska vizualizacija morfoloških promjena stanica i (semi)kvantitativno određivanje kolorimetrijskim ili fluorimetrijskim metodama. Ove potonje nadalje se kategoriziraju na testove za analizu integriteta stanične membrane, te testove za analizu staničnog metabolizma (npr. mitohondrijske aktivnosti). U ovom dijelu najzastupljenija je metoda protočne citometrije (27). Ovom

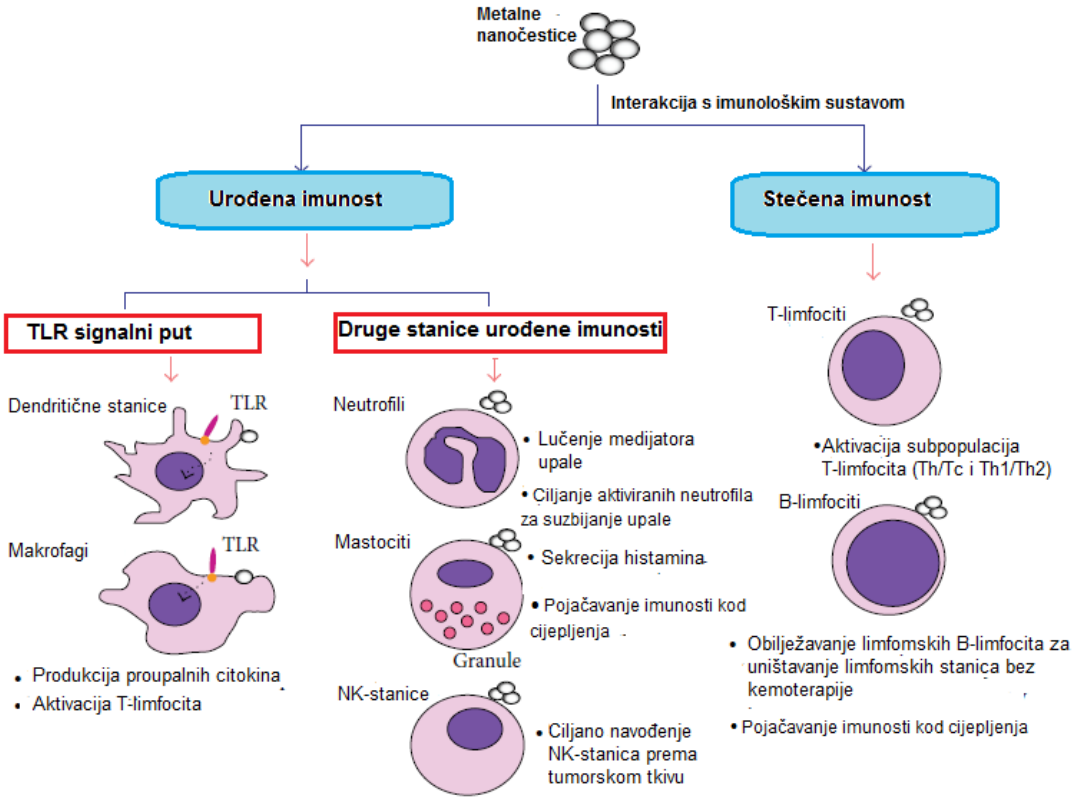
metodom se danas najčešće evaluira i internalizacija nanočestica u stanice, jer se tim procesom povećava unutrašnja kompleksnost odnosno granuliranosti stanice, dok veličina stanice ostaje ista (27, 44-47). Kao vizualna potvrda internalizacije nanoAg-a u stanice, danas se najčešće koristi transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) (9), a konfokalnom mikroskopijom moguće je detaljnije utvrditi lokalizaciju nanoAg-a unutar stanice (12).

1.8. Imunokompatibilnost nanoAg-a kao glavni preduvjet za dizajn sigurnih medicinskih nanouređaja na bazi srebra

Evaluacijom hemokompatibilnosti nanoAg-a kao jednog od ključnih problema njihove implementacije u medicini, važno je razmotriti kako se nanoAg u sigurnoj dozi u interakciji s humanim imunološkim sustavom može koristiti u biomedicinske tj. terapijske svrhe. Ovdje se prvenstveno misli na dva velika terapijska izazova: njihovo antivirusno i antileukemijsko odnosno antilimfomsko djelovanje. Leukemije i limfomi su tumori bijelih krvnih stanica (leukocita) koje mogu nastati medularno ili ekstramedularno (u koštanoj srži ili izvan nje). Nekoliko studija pokazalo je da nanoAg posjeduje antileukemijsko/antilimfomsko djelovanje putem nekoliko različitih mehanizama. No, važno je napomenuti da leukemijske/limfomske stanice mogu biti prisutne u limfatičnim tkivima (najčešće limfnim čvorovima) bez da ih se može detektirati u krvi i koštanoj srži. Stoga je važno dizajnirati nanočestice srebra koje će za cilj imati upravo limfatična tkiva. U tu svrhu može poslužiti princip prema kojem se dizajniraju i nanovakcine za ciljano dostavljanje cjepiva, s obzirom da su upravo limfni čvorovi izvori T- i B-limfocita (56). Neka istraživanja pokazala su da polistirenske-nanočestice induciraju porast CD8+ citotoksičnih T-limfocita koji inhibiraju tumorski rast, a također su efikasni za dostavu DNK cjepiva (57). Također, dokazano je da nefunkcionalizirane nanočestice srebra imaju citotoksični učinak na mononuklearne stanice periferne krvi u ovisnosti o koncentraciji i vremenu. Isto tako, dokazano je da PVP-stabilizirane nanočestice srebra srednje veličine u niskoj dozi uzrokuju apoptozu i nekrozu u humanoj monocitnoj staničnoj liniji THP-1 nakon 24 h (58, 59).

Osim kod terapijskih nanoAg sustava, svaka uspješna translacija nano-proizvoda i za ostale medicinske svrhe zahtijeva detaljnu procjenu njihove sigurnosti i imunokompatibilnosti. Zadnje desetljeće istraživanja interakcija nanočestica s

imunološkim sustavom dovelo je tek do razumijevanja osnova tih interakcija. Saznanja u razumijevanju složenih mehanizama nano-imunotoksičnosti u samom su začetku.



Slika 1.2. Interakcije metalnih nanočestica s imunološkim sustavom.

Dosad se najviše pozornosti posvećivalo dizajniranju nano-proizvoda kojima se izbjegavala interakcija s imunološkim sustavom (biocidni filmovi, biosenzori), a danas se sve više pokušava pomoću njih manipulirati imunološkim odgovorom (16). Metalne nanočestice (kao i sami metali) ulaze u interakciju s urođenim i stečenim imunološkim sustavom, uzrokujući različite učinke na pojedine stanične populacije (Slika 1.2). Dodavanjem funkcionalnih molekula na površinu nanočestica prilikom sinteze može se spriječiti neželjena imunološka reakcija, što je posebno važno kod genske terapije, te ciljanog uvođenja lijekova i cjepiva (11).

U analizama interakcija nanočestica s imunološkim sustavom prijašnje studije uglavnom su davale prednost staničnim linijama, a ne primarnim stanicama zbog homogenosti i veće stabilnosti. U današnje vrijeme se prednost daje primarnim stanicama zbog realističnijeg staničnog odgovora. Također, rezultati brojnih studija analize produkcije citokina u staničnim kulturama su vrlo oprečni. U nekim studijama

je ista vrsta nanočestica izazivala lučenje proupalnih, a u drugima protuupalnih citokina (10, 14, 54). Uzrok tome vjerojatno je primjena različitih imunokemijskih metoda kao i nestandardiziranih postupaka. Poznato je da sve dostupne imunokemijske metode za analizu citokina mogu dati lažno negativne rezultate zbog interferencije s nanočesticama ili smanjene vijabilnosti stanica i adherencije proteina (citokina) na površinu nanočestica prilikom formiranja proteinske korone (27). Također, istraživanja ističu da je za postizanje pouzdanih rezultata u procjeni imunokompatibilnosti ključno korištenje uzoraka svježe, neaktivirane krvi (optimalno unutar četiri sata od uzorkovanja) (30, 55).

1.9. Limfocitne i monocitne površinske molekule za ciljano djelovanje imunomodulacijskih metalnih nanočestica

U zadnjem desetljeću brojne studije pokušale su objasniti iznimno komplicirana proupalna, anti-upalna i adjuvantna svojstva metalnih nanočestica. Pomoću nanoAg može se suprimirati aktivacija neutrofila koje su dio urođenog imunološkog sustava i na taj način djelovati anti-upalno. NanoAg se može dizajnirati na način da u krvotoku interakcijom s antigen-predočnim stanicama aktivira stanice stečene imunosti, tj. T- i B-limfocite. Dosad je dokazano da samo nekoliko vrsta metalnih nanočestica aktiviraju T-limfocite (npr. TiO_2). Istraživanje imunomodulatornih učinaka nanoAg-a u miševa dokazalo je njihove adjuvantske učinke u vidu T- i B-limfocitne, te monocitno-makrofagne aktivacije. No, mehanizmi tih učinaka još uvijek nisu dovoljno razjašnjeni. Također, danas postoje brojne metode za ispitivanje aktivacijskih i supresijskih mehanizama na imunološkim stanicama, ali nisu standardizirane (10, 11, 54-58).

U procesu usavršavanja genske terapije kod pacijenata s HIV-om koriste se genetski modificirani CD4+ i CD8+ T-limfociti. U tu se svrhu limfociti prije terapije kultiviraju, a da bi se povećala njihova moć obnove narušenog imunološkog sustava i povećanja imunološke obrane od virusa kod zaraženih pacijenata, važno je da uzgojeni limfociti zadrže svoju funkciju, o čemu se, nažalost, malo zna. Proliferacijski testovi metoda su izbora za provjeru funkcije, iziskuju puno vremena i vještine, a rezultati su tek semikvantitativni. Iz tog razloga usvojen je generalni dogovor da se u svrhu razlikovanja pozitivnog i negativnog imunološkog odgovora odredi udio aktiviranih CD69+ i CD25+ pozitivnih T-limfocita. Naime, molekula CD69 je rani

aktivacijski antigen koji je izražen na površini T-limfocita unutar nekoliko sati od aktivacije, dok je CD25 antigen izražen na površini mononuklearnih stanica u razdoblju od 24-48 h nakon aktivacije (60). No, na površini ovih cirkulirajućih imunoloških stanica postoje još brojne molekule uključene u njihove funkcije za koje su specijalizirane. Antigen CD3 je pan-biljeg T-limfocita i dio je kompleksa s T-staničnim receptorom (TCR) na površini ovih stanica. Površinska molekula CD4 je transmembranski glikoprotein koji se nalazi na površini subpopulacije T-limfocita koja se naziva pomagački T-limfociti. Ova subpopulacija aktivira se prilikom aktivacije humoralne imunosti tijekom sinteze imunoglobulina od strane B-limfocita. CD4 molekula receptor je potreban za vezanje virusa HIV-1 i samim tim jest ciljna molekula za antivirusnu terapiju. Ovaj biljeg je prisutan i na monocitima, ali s manjom gustoćom i drugačijom, zasad nedovoljno poznatom funkcijom. Antigen CD8 je dimer prisutan na površini subpopulacije T-limfocita koja se naziva citotoksični T-limfociti i ima važnu ulogu u prepoznavanju antigena. U manjoj gustoći prisutan je i na NK-stanicama. Promjena omjera CD4+ i CD8+ pozitivnih T-limfocita u perifernoj krv zapažena je u različitim kroničnim upalnim bolestima, autoimunim bolestima i imunodeficijencijentnim stanjima. Molekula CD14 je tzv. GPI sidro (od eng. *glycosyl-phosphatidyl-inositol anchor*) na površini monocita i makrofaga. Antigeni CD16 i CD56 su dvije nekovalentno vezane molekule koje se u toj kombinaciji mogu specifično naći na velikim granuliranim limfocitima, odnosno NK-stanicama. Molekula CD19 je površinski glikoprotein i pan-biljeg B-limfocita koji ima ulogu u razvoju, aktivaciji i diferencijaciji B-limfocita. Antigen CD25 je površinski glikoprotein koji se nalazi na aktiviranim T i B-limfocitima, te na aktiviranim monocitima i makrofagima. Antigen CD69 je površinski dimer poznat kao induktor aktivacije stanica. Ova molekula rani je aktivacijski biljeg na površini T i B-limfocita, te makrofaga i NK-stanica. Molekula HLA-DR nađena je na antigen-predočnim stanicama (dendritične stanice, B-limfociti, monociti, makrofagi) i na aktiviranim T-limfocitima (60, 69-71).

Sva dosadašnja istraživanja koja uključuju imunomodulatorne nanočestice srebra ukazuju na veliki problem razumijevanja njihovog složenog utjecaja na imunološki sustav, koji ovisi o brojnim čimbenicima koji se moraju uzeti u obzir prilikom dizajna medicinskih nano-proizvoda na bazi srebra. Također, istraživanja neimunomodulatornih srebrnih nanočestica ukazuju na veliki problem standardizacije metoda za procjenu imunokompatibilnosti s humanim imunološkim sustavom zbog njihovih posebnih fizikalno-kemijskih svojstava.

2. HIPOTEZA

Ovo doktorsko istraživanje temelji se na dvije osnovne hipoteze:

1. Srebrne nanočestice imaju citotoksične i genotoksične učinke na stanice humanog imunološkog sustava, tj. na mononuklearne stanice periferne krvi, koji ovise o vrsti površinskog omotača, koncentraciji i vremenu izloženosti.
2. Srebrne nanočestice imaju imunomodulatorni učinak tj. mijenjaju prirodu imunološkog odgovora, ovisno o vrsti površinskog omotača.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su sljedeći:

1. A) Analiza citotoksičnosti koja je imala sljedeće ciljeve:

   a) dokazati ulazak nanoAg-a u ispitivane stanice
   b) dokazati međusobnu ovisnost primjenjene i internalizirane koncentracije nanoAg-a
   c) dokazati da mehanizam stanične smrti (apoptoza / nekroza) ovisi o vrsti površinskog omotača nanočestice, koncentraciji i vremenu izloženosti
   d) dokazati da je oksidativni stres proces koji dovodi do stanične smrti
   e) odrediti minimalno toksičnu tj. netoksičnu koncentraciju (koncentraciju nanoAg-a pri kojoj preživi >90% stanica) za analizu oksidativnog stresa i imunomodulatornih učinaka.

1. B) Analiza genotoksičnosti koja je imala sljedeće ciljeve:

   a) dokazati da nanoAg uzrokuje oštećenje DNK
   b) dokazati ovisnost stupnja oštećenja DNK o vrsti i koncentraciji nanoAg-a.

2. Analiza imunomodulacije s ciljem

   a) dokaza da nanoAg u minimalno toksičnoj koncentraciji, a ovisno o vrsti omotača, ima imunomodulatorni učinak na humani imunološki sustav, mijenajući odnose leukocitnih staničnih populacija i njihove funkcionalne značajke.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ustroj studije

Ova studija je dizajnirana kao presječna *in vitro* studija jer su svi tretmani i analize rađene u *in vitro* uvjetima na izoliranim mononuklearnim stanicama. Stanice su izolirane iz svježih uzoraka periferne krvi oduzete zdravim osobama (dobrovoljcima), ali same osobe nisu bile podvrgnute nikakvom tretmanu. Takve stanice uzete su kao reprezentativni primjerak humanih imunoloških stanica periferne krvi, i to prema važećim preporukama koje u analizi hemokompatibilnosti medicinskih proizvoda s humanim biosustavima prednost daju primarnim stanicama pred kulturama stanica (30, 55).

4.2. Ispitanici

Ovo istraživanje odobreno je 21.12.2017. od strane Etičkog povjerenstva Sveučilišta J.J.Strossmayera u Osijeku Medicinskog fakulteta Osijek (Klasa: 602-04/17-08/12, broj: 2158-61-07-17-219).

Cjelokupno istraživanje rađeno je na prikupljenim uzorcima od ukupno 30 zdravih ispitanika (dobrovoljaca), koji su prethodno pročitali i potpisali informirani pristanak. Ispitanicima je u Ambulanti za vađenje krvi Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek uzorkovano po dvije epruvete periferne venske krvi s antikoagulansom K_2-EDTA za sve analize osim za konfokalnu i transmisijsku elektronsku mikroskopiju gdje je antikoagulans bio Li-heparin.

Zdravi ispitanici bili su uključeni u istraživanje nakon učinjene analize kompletne krvne slike, a isključni kriterij je bila patološka leukocitoza ili leukopenija, kao dokaz prisustva aktivne infekcije. Drugi isključni kriterij bio je snižen ili povišen udio limfocita ili monocita u diferencijalnoj krvnoj slici. Na taj način isključena je mogućnost prethodne aktivacije imunološkog sustava vanjskim čimbenikom (patogenom).

Sva ispitivanja provedena su na izoliranim humanim mononuklearnim stanicama periferne krvi, limfocitima i monocitima (hPBMC), kako bi se maksimalno izbjegao utjecaj ostalih krvnih stanica.

Svaka pojedina analiza ispitivanih učinaka citotoksičnosti i genotoksičnosti nanoAg-a rađena je na mononuklearnim stanicama izoliranim iz uzoraka pune krvi

prikupljenih od šest zdravih ispitanika, dok je analiza imunomodulatornog učinka rađena na izoliranim mononuklearnim stanicama pune krvi prikupljene od tri zdrava ispitanika. Sve analize učinaka koje su rađene metodom protočne citometrije, radile su se na 10 000 prikupljenih stanica po ispitaniku, što znači ukupno na 30 000, odnosno 60 000 prikupljenih stanica, što je u skladu s važećim protokolima. Prema tim protokolima 10 000 skupljenih stanica smatra se reprezentativnim uzorkom (44, 47).

Analiza genotoksičnosti alkalnim komet testom radila se na 100 kometa po ispitaniku, tj. ukupno na 600 kometa (od 6 zdravih ispitanika).

Analiza transmisijskom elektronskom mikroskopijom kao potvrda priprave nanoAg-a rađena je na jednom reprezentativnom uzorku izolata mononuklearnih stanica periferne krvi.

Analiza svjetlosnom mikroskopijom kao vizualna potvrda učinka nanoAg-a na morfološka svojstva stanice, te na programiranu staničnu smrti ili nekrozu stanica, rađena je na jednom reprezentativnom uzorku izolata mononuklearnih stanica periferne krvi.

Analiza konfokalnom mikroskopijom kao vizualna potvrda internalizacije i lokalizacije nanoAg-a unutar stanice i staničnih struktura rađena je na jednom reprezentativnom uzorku izolata mononuklearnih stanica periferne krvi.

4.3. Metode

4.3.1. Sinteza i karakterizacija nanoAg-a

U ovom su se doktorskom istraživanju koristile četiri vrste nanoAg-a koje su se razlikovale po načinu stabilizacije, odnosno prema površinskoj funkcionalizaciji, a koje su sintetizirane i karakterizirane na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI) u Zagrebu. Primarni promjer svih vrsta nanoAg-a bio je u rasponu 5-15 nm, zbog čega pripadaju kategoriji malih nanočestica. Sve vrste nanoAg-a sintetizirale su se redukcijom srebrnog nitrata (2.3 mM $AgNO_3$) s natrij-bor-hidridom (4 mM $NaBH_4$), prema metodama uspostavljenim i validiranim u grupi dr.sc. Ivane Vinković Vrček na IMI-u koje su već opisane u ranije objavljenim radovima (9, 61). Tijekom sinteze, stabilizacija nanoAg-a provedena je korištenjem četiri različita površinska omotača: neutralnim polivinilpirolidonom (PVP), goveđim serumskim

albuminom (BSA), negativno nabijenim natrijevim bis(2-etilheksil) sulfosukcinatom (AOT), te pozitivno nabijenim poli-L-lizinom (PLL). Nakon sinteze, sve vrste nanoAg-a oprane su s ultračistom vodom (UPW) centrifugiranjem 20 minuta na 11 000 x *g* kako bi se uklonili ostaci slobodnih iona srebra, neapsorbiranih molekula omotača i ostalih kemikalija korištenih u sintezi.

Određivanjem signala površinske plazmonske rezonancije (SPR, od eng. surface plasmon resonance) pomoću UV/VIS spektrofotometra (CARY 300, Varian Inc., Australija) potvrđeno je nastajanje nanočestica. Koncentracije pojedinih vrsta nanoAg-a izražene se u mg Ag/L, a određene su mjerenjem ukupne koncentracije Ag u koncentriranim (eng. *stock*) otopinama nanoAg-a pomoću atomske apsorpcijske spektroskopije grafitne peći (GFAAS, od eng. graphite furnace atomic absorption spectroscopy) (Perkin Elmer Analyst 600, Perkin Elmer, Shelton, SAD).

Karakterizacija svojstava sva četiri tipa nanoAg-a provela se u UPW pri koncentraciji od 10 mg Ag/L i temperaturi od 25 °C. Veličina i naboj određeni su metodama dinamičkog (DLS, od eng. *dynamic light scattering*) i elektroforetskog (ELS, od eng. *electrophoretic light scattering*) raspršenja svjetlosti pomoću uređaja Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Velika Britanija) sa zelenim laserom (ex. 532 nm). DLS i ELS podaci analizirani su pomoću programskog paketa Zetasizer software 6.32 (Malvern Instruments). DLS metodom određen je hidrodinamički promjer (d_H) nanoAg, a ELS metodom površinski naboj izražen kao zeta (ζ) potencijal. Nanočestice su vizualizirane pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa (TEM, Zeiss 902A, Njemačka). Preparati za TEM pripremljeni su tako što se nanoAg koloidna otopina kapnula na TEM mrežicu obloženu polimerom Formvar®, te su mrežice sušene na zraku i sobnoj temperaturi. Slike su zabilježene kamerom Canon PowerShot S50 koja je sastavni dio mikroskopa. Primarni promjer nanoAg-a je određen analizom dobivenih TEM slika pomoću programskog paketa ImageJ. Analizirano je ukupno 110 čestica po preparatu tj. po vrsti nanoAg-a.

Koloidna stabilnost i ponašanje (otapanje i aglomeracija) nanoAg-a ispitana je u različitim medijima: ultračistoj vodi (UPW), te fosfatnom puferu (PBS, pH 7,4) bez i s ispitivanim stanicama (PBS+hPBMC). Za karakterizaciju svojstava svih vrsta nanoAg-a u svakom mediju, nanočestice srebra su inkubirane 1 h pri koncentraciji od 10 mg Ag/L, te su im određeni d_H, ζ potencijal i udio otpuštenih srebrnih iona. Frakcija otpuštenih iona srebra iz svake vrste nanoAg-a određena je ultrafiltracijom uzorka kroz centrifugalne filtere Amicon-4 Ultra veličine pora od 3 kDa (Merck

Millipore Darmstadt, Njemačka). U filtratu je pomoću GFAAS tehnike određena ukupna koncentracija srebra, a udio otopljenih iona Ag (%) izražen je kao relativni omjer koncentracije Ag prije i poslije ultrafiltracije. Samo u slučaju medija koji sadrži ispitivane stanice (PBS+hPBMC), metode DLS i ELS nisu dali pouzdane rezultate jer prisutnost samih stanica značajno povećava raspršenje svjetla i prekriva signale koji potječu od nanoAg-a. U ovom slučaju raspršenje nanoAg-a je procijenjeno vizualno, dok se formacija proteinske korone potvrdila prema drugom važećem protokolu opisanom u prethodno objavljenim istraživanjima (62, 63). Ukratko, formiranje proteinske korone u mediju PBS+hPBMC testiralo se inkubiranjem svake vrste nanoAg-a s 25 mg Ag/L kroz 1 h u ovom mediju (najviša testirana koncentracija nanoAg-a). Kako bi se isključio utjecaj stanica, one su prvo uklonjene centrifugiranjem, a zatim se kvantificirao sadržaj proteina u supernatantu. U ovom mediju (PBS + hPBMC) određen je ukupan sadržaj proteina pomoću reagensa Micro Total Protein Kit (Merck, Darmstadt, Njemačka). Dobivena koncentracija iznosila je 24 mg/L proteina. Treba napomenuti da je izuzetno važno odrediti sadržaj proteina u biološkom mediju prilikom određivanja svojstava i stabilnosti nanoAg-a jer je poznato da se proteinske korona formira na površini nanoAg-a već unutar nekoliko minuta nakon raspršivanja u takvom mediju, dajući novu koloidnu stabilizaciju nanočesticama, bez obzira na njihova osnovna fizikalno-kemijska svojstva.

4.3.2. Priprema stanica za ispitivanje

Prije početka rada na stanicama, sve vrste nanoAg-a su se 3 minute sonificirale u ultrazvučnoj kupelji u svrhu pripreme stabilne koloidne suspenzije.

Sva ispitivanja su rađena na hPBMC izoliranim iz svježih uzoraka venske krvi oduzete zdravim dobrovoljcima. Stanice su izolirane na gradijentu gustoće pomoću reagensa Lymphoprep (Axis-Shield, Oslo, Norveška) prema uputama proizvođača. Svježi uzorci pune krvi razrijeđeni su s 0,9% otopinom NaCl u volumnom omjeru 1:1, te su lagano nadslojeni na Lymphoprep otopinu koja je prethodno dodana u epruvetu za centrifugiranje. Nakon centrifugiranja (pri uvjetima 800 x *g*, 20 minuta, sobna temperatura, bez kočnice) hPBMC su stvorile tanku, bijelu vrpcu između sloja plazme i Lymphoprep otopine. Stanice su odvojene pomoću Pasteurove pipete u posebnu epruvetu, razrijeđene s 0,9% otopinom NaCl, te oprane od nečistoća uz dva

centrifugiranja pri brzini od 250 x *g* kroz 10 minuta. Nakon odvajanja supernatanta, talog stanica otopljen je u PBS mediju.

Broj stanica određen je na hematološkom brojaču Sysmex XN2000 (Sysmex, Njemačka) prije i poslije izolacije. Broj stanica prije izolacije rađen je u svrhu isključivanja patološkog broja leukocita i relativnih udjela hPBMC stanica u diferencijalnoj krvnoj slici. Nakon izolacije bilo je nužno izbrojati stanice u izolatu (koncentratu) kako bi se razrijeđivanjem uzorka dobila odgovarajuća koncentracija stanica za daljnji rad ($1x10^6$/mL).

4.3.3. Tretiranje hPBMC stanica s nanoAg-om

Za tretiranje hPBMC pripremljene su radne otopine $AgNO_3$, četiri vrste nanoAg-a prema omotaču (PVP-nanoAg, AOT-nanoAg, PLL-nanoAg i BSA-nanoAg), te četiri vrste samih omotača (PVP, AOT, PLL i BSA) odgovarajućih koncentracija. U početnim pokusima citotoksičnosti stanice su tretirane s PVP-nanoAg-om, AOT-nanoAg-om i PLL-nanoAg-om u koncentracijama od 1, 5, 10 i 25 mg Ag/L, a s BSA-nanoAg-om u koncentracijama 0,2, 1, 5 i 10 mg Ag/L. Ispitivane koncentracije odabrane su prema rezultatima dosadašnjih ispitivanja (18, 23, 33, 58). Ahlberg i suradnici koncentraciju nano-Ag-a od 20 mg/L nazivaju „subtoksičnom“, a Zhang i suradnici koncentraciju od 1 mg/L smatraju nedovoljno citotoksičnom, ali dovoljnom za genotoksični učinak. Odabrane koncentracije naknadno su potvđene preliminarnim mjerenjima u kojima je BSA-nanoAg pokazao toksičniji učinak od ostalih vrsta nanoAg-a pri istim koncentracijama. Na istom principu odabrane su i dvije vremenske točke: 1 h i 3 h. Naime, u prethodnim istraživanjima pri korištenju niskih koncentracija, srebrne nanočestice su pokazale toksičnost pri inkubacijama dužim od 6 h.

Nakon analize rezultata citotoksičnosti (ulaska nanoAg-a u stanicu i stanične smrti), za ostale analize odabrani su najpovoljniji uvjeti tretiranja. Za analizu oksidativnog stresa odabrana je koncentracija od 1 mg Ag/L za sve vrste nanoAg-a osim, za BSA-nanoAg za koje je primjenjena koncentracija od 0,2 mg Ag/L, uz vrijeme inkubacije od 1 h, jer je pri tim uvjetima preživljenje hPBMC stanica bilo veće od 90%. Za analizu genotoksičnosti odabrane su dvije koncentracije nanoAg-a: 0,2 i 1 mg Ag/L. Za analizu imunomodulacije PVP-, PLL- i AOT-nanoAg-a odabrane su sljedeće koncentracije: 1, 2 i 3 mg Ag/L, a za BSA-nanoAg odabrane su koncentracije od 0,5,

1 i 1,5 mg Ag/L. Za analizu rane aktivacije stanice su inkubirane 6 h, a za analizu srednje kasne aktivacije 24 h.

Nakon inkubacije hPBMC s nanoAg-om (tijekom 1 h i 3 h pri 37 °C u mraku), stanice su oprane dva puta u PBS mediju centrifugiranjem 5 minuta na brzini od 250 x *g*, da bi se uklonio suvišak nanoAg-a koje bi interferiralo u daljnjim mjerenjima. Nakon toga se pristupilo mjerenjima na protočnom citometru, kao i pripremi preparata za konfokalnu i svjetlosnu mikroskopiju.

Prema SCENIHR smjernicama, stanice su kao kontrola učinka otpuštenog ionskog srebra iz nanočestica tretirane i s Ag^+ (u obliku $AgNO_3$) u koncentracijskom području od 0,01-1 mg Ag/L. Ovo koncentracijsko područje temeljeno je na prethodnom istraživanju Milić i suradnika u kojem je dokazano da se s površine nanoAg-a otpusti maksimalno 1% iona srebra (9). Također, utjecaj samih omotača evaluiran je po istom principu. Primjenjene koncentracije za PVP, PLL i AOT (0,3 %, 0,001 % i 0,01 mM) odgovarale su onim koncentracijama koje odgovaraju sadržaju omotača u kolodinim otopinama nanoAg-a pri najvišoj koncentraciji nanoAg-a (25 mg/L) korištenoj u pokusima na hPBMC. Učinak samog BSA nije evaluiran jer su prethodna istraživanja pokazala da su nanočestice bazirane na samom BSA hemokompatibilne (64).

Svi tretmani rađeni su na izoliranim stanicama hPBMC posebno za svakog davatelja.

4.3.4. Evaluacija citotoksičnosti nanoAg-a protočnom citometrijom

Evaluacija citotoksičnih učinaka obuhvaćala je analizu ulaska nanoAg-a u stanice, te indukcije stanične smrti (apoptoze ili nekroze), uslijed okisidativnog stresa nastalog zbog stvaranja ROS-ova u citoplazmi ili iz mitohondrija stanica nakon promjene tj. smanjenja mitohondrijskog membranskog potencijala ($\Delta\psi m$). Cijeli proces analiziran je metodom protočne citometrije na citometru FACSCalibur BD (Beckton Dickinson, Njemačka) s jednim (zelenim) laserom (argon, ex. 488 nm). U svojoj konfiguraciji ovaj protočni citometar sadrži tri detektora fluorescencije (FL1 530/30 BP, FL2 582/42 BP i FL3 650 LP). Signal koji proizlazi od raspršenja svjetla pod malim kutom (FSC, od eng. *forward scatter*) detektira se na FSC diodi, a predstavlja veličinu stanica. Signal koji proizlazi od raspršenja svjetla pod približno pravim kutem (SSC, od eng. *side scatter*) detektira se na SSC detektoru i predstavlja

unutrašnju granuliranost (kompleksnost) stanice. Protočni citometar FACSCalibur je anlogni sustav, što znači da se sve prethodno postavljene postavke prilikom skupljanja stanica ne mogu više naknadno mijenjati za vrijeme analize podataka, što nije slučaj s novim, digitalnim sustavima. Iz toga razloga, Salvati i suradnici (45) u svom standardiziranom operativnom postupku (SOP) za mogućnost usporedbe različitih eksperimenata (koji se odvijaju pod različitim postavkama za jakost struje, napon i optiku) rađenih na analognim citometrima, navode obvezu korištenja normalizacije podataka. Za normalizaciju podataka predlažu nekoliko metoda od kojih je najčešća tzv. MFI metoda (MFI, od eng. *mean fluorescence intensity*), te je ta metoda odabrana u ovom istraživanju. Ona predstavlja omjer između geometrijske srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije (MFI vrijednosti) tretiranog i netretiranog (kontrolnog) uzorka (45, 65).

Sve analize citotoksičnosti rađene su metodom protočne citometrije, pri čemu je u analizi podataka korištena različita strategija ograđivanja stanica (eng. *gating strategy*) prema važećem protokolu (44). Prema tom protokolu ograđivanje stanica rađeno je na točkastom citogramu (eng. *dot plot*) veličine i granuliranosti stanica (FCS (lin)/SSC (log)). Žive stanice koje su internalizirale nanoAg prati porast veličine SSC, dok FSC ostaje nepromijenjen. Za razliku od njih, stanice koje su ušle u apoptozu ili nekrozu prati porast veličine SSC i pad FSC-a. Stoga se za analizu ulaska nanoAg-a u stanice ograđuju samo žive stanice (ogradom se isključuju mrtve stanice i stanični debris), dok se za analizu oksidativnog stresa i smrti stanice ogradom isključuje samo stanični debris, a uključuju sve skupljene hPBMC stanice. Ova metoda je ovdje odabrana jer predstavlja važeći protokol, te je opće prihvaćena zbog svoje praktičnosti, lagane izvedivosti i dostupnosti velikom broju laboratorija koji koriste protočnu citometriju u ispitivanju učinaka nanomaterijala (44, 46, 65). Iako je u ovom radu korišten važeći protokol za određivanje ulaska i citotoksičnosti nanočestica ovom metodom, danas je poznato da je uključivanje fluorescentno obilježenih nanočestica ili fluorescentnih boja za vijabilnost pouzdaniji način određivanja ovih događaja uzrokovanih nanočesticama jer kod malog udjela živih stanica također može doći do smanjenja FSC-a. Korištenje fluorescentno obilježenih nanočestice omogućuje njihovo preciznije praćenje i kvantifikaciju unutar stanice u stvarnom vremenu (65).

4.3.5. Analiza ulaska nanoAg-a u stanice

Analiza ulaska nanoAg-a u stanice provedena je prema ranije opisanom protokolu (44), koji propisuje da se sve akvizicije tj. postupci prikupljanja stanica na citometru, a potom i analize, moraju raditi na 10 000 skupljenih događaja (eng. *events*), pri čemu jedan događaj predstavlja jednu stanicu. Autori Salvati i suradnici (45) su u svom Standardiziranom operativnom postupku (SOP) dokazali da već i skupljenih 4 000 događaja predstavlja reprezentativni uzorak.

S obzirom da nanoAg raspršuje svjetlo, ulazak nanoAg-a u stanice dokazuje se povećanjem veličine SSC, odnosno granuliranosti stanice, u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane hPBMC), koja se očituje kao porast geometrijske srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije (geoMFI). Dokaz ulaska nanoAg-a u stanice jest porast granuliranosti stanice, tj. MFI (SSC) omjer >1 (65).

Proporcija internaliziranog nanoAg-a određena je za sve četiri vrste nanoAg-a, u četiri koncentracijske i dvije vremenske točke (navedeno u odjeljku 4.3.3.).

4.3.6. Analiza stanične smrt stanica

Analiza stanične smrti metodom protočne citometrije rađena je istovremeno uz analizu ulaska nanoAg-a u stanice. U tu svrhu korišten je komercijalni reagens FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharminogen, SAD). Ovaj reagens kit sadrži dvije fluorescentne boje: FITC Annexin V koji služi za za detekciju stanica u ranoj i kasnoj apoptozi i propidij jodid (PI) za detekciju primarne i sekundarne nekroze. Udjeli stanica određeni su prema sljedećim kriterijima: stanice u ranoj apoptozi (FITC Annexin V +/ PI -), kasnoj apoptozi-sekundarnoj nekrozi (FITC Annexin V + / PI +), primarnoj nekrozi (FITC Annexin V - / PI +) i žive stanica (FITC Annexin V - / PI -) (44, 66).

Nakon tretiranja s nanoAg-om, tretirane i kontrolne (netretirane) hPBMC stanice resuspendirane su u tzv. vezujućem puferu (Hepes / NaOH / NaCl / $CaCl_2$) koji je nužan za vezanje FITC Annexin V reagensa. Prema preporukama proizvođača, volumen od 5 µL FITC Annexin V i PI dodan je u 100 µL hPBMC ($1x10^6$/mL). Stanice su inkubirane 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon inkubacije, stanice su bile spremne za skupljanje i analizu na protočnom citometru.

Za analizu apoptoze/nekroze korištene su netretirane, obojene hPBMC kao negativna kontrola, a kao pozitivna kontrola korištene su tzv. FMO (eng. *fluorescence-minus-one*) kontrole. To su stanice tretirane s višom koncentracijom nanoAg-a u kojoj je dodana samo jedna fluorescentna boja, stoga su ovdje korištene dvije takve kontrole: FMO-PI i FMO-FITC Annexin V. Korištena je i dvostruko-obojena pozitivna kontrola (eng. *double-stained*) u koju su dodane obje fluorescentne boje. Ove pozitivne kontrole nužne su tijekom analize podataka jer se zbog sinteze apoptotičkih tjelešaca za vrijeme apoptoze stvara heterogena populacija FITC Annexin V+ / PI+ dvostruko-pozitivnih stanica. Iz tog razloga, analiza podataka je otežana, te nije moguće precizno odvojiti pozitivne od negativnih populacija. Pomoću FMO kontrola omogućeno je precizno odvajanje dobivenih populacija. Negativna kontrola (netretirane hPBMC) nužna je zbog određivanja udjela živih stanica u izolatu na kraju pokusa koji se koristi tijekom normalizacije dobivenih rezultata. Fluorescentni signali tj. MFI vrijednosti prikupljeni su s dva detektora: s FL1 za FITC Annexin V i s FL2 za PI.

Geometrijske MFI vrijednosti za granuliranost (SSC) i fluorescenciju (FL1 i FL2) prikupljeni su za istovremenu analizu ulaska nanoAg-a u stanicu i stanične smrti. Proporcija internalizacije nanoAg-a u stanicu i indukcija apoptoze utvrđene su nakon normalizacije rezultata s MFI metodom (omjer MFI (tretirane/netretirane); porast omjera MFI (SSC) >1 je označavao povećanu granuliranost stanica nakon ulaska nanoAg-a u stanice, a porast omjera MFI (FL1 ili FL2) indukciju apoptoze ili nekroze.

Analiza ulaska nanoAg-a u stanice i analiza stanične smrti ispitala se za sve četiri vrste nanoAg-a (PVP, BSA, AOT i PLL) u različitim koncentracijskim i vremenskim intervalima (navedeno u odjeljku 4.3.3.).

Prema literaturi, udio živih stanica za evaluaciju minimalno toksične doze literaturno iznosi > 80% (27). Nakon obrade rezultata preliminarnih pokusa, vrijeme inkubacije od 1 h i koncentracija nanoAg-a od 1 mg Ag/L (AOT-, PVP- i PLL-nanoAg) pokazali su preživljenje kod > 90% stanica; BSA-nanoAg pokazao je takvo preživljenje stanica pri koncentraciji od 0,2 mg/L. Iz tog razloga su ovi uvjeti odabrani za daljnje pokuse analize oksidativnog stresa i genotoksičnosti.

Analiza stanične smrti (apoptoze / nekroze) određena je i za ionsko srebro (Ag^+), te same omotače (PVP, PLL i AOT) u kontrolnim pokusima.

4.3.7. Analiza oksidativnog stresa u tretiranim stanicama

Razina oksidativnog stresa u tretiranim stanicama određena je pomoću parametara promjene mitohondrijskog membranskog potencijala (Δψm) i povećana sinteza ROS-ova, kao glavnih posrednika u mehanizmu smrti stanica apoptozom. U tu su se svrhu koristile tri fluorescentne boje: dikloro-dihidro-fluorescein diacetat (DCFH-DA, Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka) za detekciju razine ukupnih reaktivnih kisikovih spojeva u stanici, dihidroetidij (DHE, Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka) za detekciju razine superoksid radikala i diheksiloksakarbocijanin jodid ($DiOC_6$, Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka) za detekciju promjene mitohondrijskog membranskog potencijala u stanici primjenom ranije opisanih protokola za bojanje i analizu stanica (47, 49, 59, 67, 68). Koncentrirane otopine DCFH-DA, DHE i $DiOC_6$ razrijeđene su s UPW na radne koncentracije od 110 μM, 50 μM i 0,1 μM. Nakon dodavanja određenog volumena radnih koncentracija ovih otopina u određeni volumen suspenzije hPBMC stanica, konačne koncentracije fluorescentnih boja bile su redom: 5, 25 i 0,05 μM. Tretirane i kontrolne (netretirane) stanice inkubirane su 30 minuta na 37 °C u mraku s bojama DCFH-DA i DHE, a 15 minuta s $DiOC_6$. Nakon toga, oprane su s PBS-om od suviška boje centrifugiranjem 5 minuta na 300 x *g*. Nakon odlijevanja supernatanta i dodatka 200 mL PBS-a, stanice su bile skupljene za obradu na protočnom citometru.

Tri različite vrste kontrola korištene su za analizu oksidativnog stresa: nativne (netretirane, neobojene) i netretirane, obojene hPBMC kao negativne kontrole, te obojene hPBMC tretirane s H_2O_2 kao pozitivna kontrola. Stanice pozitivne kontrole tretirane su s 1 μM H_2O_2 u mraku 30 minuta, te oprane u PBS-u (centrifugiranjem 5 minuta na 300 x *g*). Nakon toga bojane su po gore navedenom protoklolu sa DCFH-DA, DHE i $DiOC_6$, te na kraju skupljene na protočnom citometru.

Signali fluorescencije DCFH-DA i $DiOC_6$ detektirani su na FL1 detektoru, dok je signal za DHE detektiran na FL2 detektoru. Rezultati su normalizirani MFI metodom kako je opisano u dijelu Evaluacija citotoksičnosti protočnom citometrijom (4.3.5.). Sva su mjerenja rađena na 60 000 prikupljenih hPBMC (od 6 davatelja).

4.3.8. Vizualizacija hPBMC stanica tretiranih s nanoAg-om

Nakon inkubacije svježih hPBMC stanica s različitim vrstama nanoAg-a, stanice su centrifugirane u citocentrifugi (Cytofuge 2, Stat Spin, SAD) kroz 10 minuta na brzini od 30 x *g*, koristeći pritom predmetna stakalca. Nakon toga, stanice su fiksirane i bojane po Pappenheim-u (May-Grunwald / Giemsa), te vizualizirane svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX43, Beckman Coulter, Njemačka) kako bi se odredile morfološke promjene nastale u tretiranim stanicama.

Preciznija vizualizacija ulaska nanoAg-a u stanice rađena je pomoću konfokalnog mikroskopa u refleksnom kontrastnom modu. Tretirane i kontrolne stanice nasađene su na pokrovnice smještene u mikrotitatskim pločicama s 12 bunarića ($5x10^3$ stanica / bunarić) kroz 24 sata. Nakon toga, stanice su odvojene i inkubirane tri sata s nanoAg-om pri koncentraciji 1 mg Ag/L. Zatim su isprane dva puta u PBS-u i tretirane sa ledenim metanolom (-20 °C) 3 minute, pa s 0,1% otopinom Triton X-100 u PBS-u za denaturaciju membrane i ponovno isprane u sterilnom PBS-u. Zatim su obojane fluorescentnom bojom FITC Phalloidin (Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka) uz dodatak 1 µg/mL otopine antitijela u sterilnom PBS-u i inkubirane 20 minuta. Nakon toga dodano je 10 µg/mL Hoechst boje (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD) koja je inkubirana 15 minuta sa stanicama. Pokrovnice su zatim oprane u PBS-u, osušene, zaštićene s medijem Fluoroshield Antifade Mounting Medium (Abcam, Cambridge, Velika Britanija) i stavljene na predmetna stakalca za mikroskopiranje. Slike su slikane pomoću Leica TCS SP8 X konfokalnog mikroskopa (Leica, München, Njemačka) opremljenog s laserom za ekscitaciju u superkontinuumu i podešavajućim spektralnim detektorom. Slike u Z-*stack* modu uzete su kao dokaz lokalizacije nanoAg-a u stanicama, a ne na vanjskoj membrani. U tu svrhu korišteni su odvojeni kanali za slikanje u ImageJ programu (University of Wisconsin-Madison, Wisconsin, SAD).

4.3.9. Evaluacija genotoksičnosti nanoAg-a alkalnim komet testom

Za evaluaciju genotoksičnih učinaka, odnosno oštećenja DNK u hPBMC stanicama uzrokovana tretmanom s nanoAg-om, koristila se alkalna inačica komet testa. Izolirane hPBMC ($1x10^6$/mL) nasađene su na mikrotitarsku pločicu s 24 bunarića u hranjivom mediju (RPMI, Gibco, Njemačka) bez BSA, u CO_2 inkubatoru (Heraeus,

Njemačka) u uvjetima 95% vlage, 5% CO_2 pri temperaturi od 37 °C. Stanice su tretirane tijekom 3 h s 0,2 i 1 mg Ag/L nanoAg-a. Ove su koncentracije odabrane prema prijašnjim istraživanjima u kojima su rađeni pokusi s komet testom, a potvrđene su u ovom radu u evaluaciji citotoksičnosti (18, 33). Kontrolne hPBMC stanice inkubirane su samo s RPMI medijem s jednakim voluimenom UPW koji odgovara volumenu dodanih nanoAg radnih otopina u pokusima. Za vrijeme inkubacije, monociti su se zalijepili na dno, a limfociti su ostali raspršeni u supernatantu. Nakon tretmana, limfociti su odvojeni i isprani od suviška nanoAg-a. Koncentracija im je podešena na 10^4 stanica/mL u RPMI mediju, a 10 µl tako pripremljene stanične suspenzije pomiješano je sa 100 µl 0.5%-tne agaroze niskog tališta te nanešeno na već pripremljena stakalca na kojima se nalazilo 200 µl 1%-tne agaroze normalnog tališta (Sigma Aldrich, Darmstadt, Njemačka). Stakalca su nakon inkubacije 10 minuta na 4°C stavljena u otopinu za lizu tijekom 24 h, te zatim u otopinu za denaturaciju na 20 minuta. Nakon toga stakalca su prebačena u svježu otopinu za denaturaciju u spremnik s puferom za elektroforezu pri pH 13. Horizontalna elektroforeza rađena je pri uvjetima od 25 mV i 300 mA kroz 20 minuta na 4°C. Nakon neutralizacije sa Tris puferomom (pH 7,5), preparati su bojani u etidij bromidom (20 mg/L) kroz 10 minuta i pregledani isti dan. Rađeno je šest pokusa (od šest donora) napravljenih u duplikatu za svaku vrstu tretmana. U svakom pokusu analizirano je minimalno 50 kometa po preparatu (100 kometa po uzorku, ukupno 600 kometa). Preparati su analizirani pod fluorescencijskim mikroskopom (Zeiss, Njemačka) povezanog sa crno-bijelom CCD kamerom i računalom sprogramskim paketom za analizu slike kometa (Comet assay; Perceptive Instruments Ltd, Instem, Velika Britanija).

Za kvantifikaciju oštećenja DNK, korišteni su parametri dužine repa kometa (TL, µm) i intenziteta repa (TI, % DNK u repu).

4.3.10. Evaluacija imunomodulatornog učinka nanoAg-a

Imunomodulatorni učinak nanoAg-a ispitao se analizom T- i B-limfocitnog, NK- i monocitnog staničnog odgovora, te analizom stanične aktivacije monocita i limfocita pomoću razine izražaja staničnih tzv. CD (eng. cluster of differentiation) biljega (antigena) na površini stanica. Površinski biljezi limfocita i monocita analizirani su pomoću komercijalnih reagensa koji sadrže specifična monoklonska protutijela

obilježena fluorokromom (Beckton Dickinson, Njemačka): BD Multitest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, BD Multitest CD3 FITC/CD16+56 PE/CD45 PerCP/CD19 APC, BD CD69 Vioblue, BD CD14 FITC, BD CD25 PE i BD HLA-DR PerCP. Analiza je provedena metodom protočne citometrije (citometar BD LSR II sa softverima za akviziciju BD FACSDiva 8.0.1. i za analizu FloJo, Beckton Dickinson, Njemačka). Za razliku od analognog sustava na kojemu se određivala stanična smrt, ulazak nanoAg-a u stanice i oksidativni stres, ovaj sustav je digitalan i ne zahtijeva naknadnu normalizaciju rezultata.

Analiza se radila na izoliranim hPBMC stanicama iz uzoraka pune krvi prikupljenih od ukupno tri zdrava dobrovoljca, a akvizicija i analiza radila se na 10 000 skupljenih događaja (stanica) po uzorku (ukupno 30 000 stanica). Analizirani su površinski biljezi CD3, CD4, CD8, CD14, CD16+56, CD19, CD25, CD69 i HLA-DR, koji definiraju pojedine leukocitne subpopulacije i određuju njihove funkcije.

Prije početka stimulacije odredio se broj stanica i podesio na koncentraciju $1x10^6$ stanica po mL RPMI medija u dodataka 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, od eng. foetal bovine serum), koja je propisana od strane proizvođača reagensa (protutijela). Pokusne stanice su inkubirane s četiri vrste nanoAg-a u tri različite koncentracije: 0,5, 1 i 1,5 mg Ag/L za BSA-nanoAg, 1, 2 i 3 mg Ag/L za AOT-nanoAg, PVP- nanoAg i PLL-nanoAg, u dva različita vremena inkubacije za limfocite (6 h za ranu i 24 h za srednje kasnu aktivaciju), te u jednom vremenu inkubacije za monocite (24 h), pri temperaturi 37°C i pri 5% CO_2. U svaki pokus uključena je negativna kontrola (netretirane, neobojene stanice) za diskriminaciju pozitivnog i negativnog fluorescentnog signala i pozitivna kontrola (stanice stimulirane s PMA (25 µg/mL) i ionomicinom (1µM)) za dokaz pozitivnog odgovora na stimulans. Također su u svaki pokus uključene analize stanica tretiranih samim omotačima (PVP, PLL i AOT) i ionskim srebrom (u obliku $AgNO_3$), kako bi se odredio njihov doprinos aktivaciji stanica.

Nakon inkubacije stanice su oprane u PBS-u centrifugiranjem pri brzini od 400 x *g*. Nakon pranja, talog stanica je resuspendiran u PBS-u i podijeljen na volumene prilagođene za bojanje s monoklonskim protutijelima obilježenim fluorokromom. Također su u stanične suspenzije dodani reagensi za vijabilnost (BD Viobility 405/520) i FcR blok, te su inkubirani prema preporukama proizvođača reagensa. Nakon ispiranja suviška reagensa, stanice su bile spremne za analizu protočnom citometrijom.

U ovom dijelu određivao se udio stanica (%) koje izražavaju navedene površinske i aktivacijske biljege i geoMFI za pomagačke i citotoksične T-limfocite, prije i poslije tretmana s niskim (netoksičnim) koncentracijama nanoAg-a (tretirani uzorak u odnosu na netretirani uzorak, tj. negativnu kontrolu).

4.3.11. Statističke metode

Svi podaci prikazani su numerički i opisani su kao aritmetička sredina mjerenja i standardno odstupanje od aritmetičke sredine ($\bar{x}$±SD) u slučajevima normalne raspodjele. U ostalim slučajevima podaci su bili opisani medijanom i granicama interkvartilnog raspona (IR). Samo su u slučaju analize genotoksičnosti rezultati bili opisani medijanom i rasponom od minimalne do maksimalne vrijednosti jer je u svim rasponima rezultata intenziteta repa kometa minimalna vrijednost bila nula.
Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirane su Shapiro-Wilkovim testom.

U analizi citotoksičnosti koja je obuhvaćala staničnu smrt, testirale su se razlike više nezavisnih skupina koje su obuhvaćale netretiranu (kontrolnu) skupinu, te pokusne skupine tretirane s četiri vrste nanoAg-a u nekoliko koncentracijskih i vremenskih točaka. Numeričke varijable bile su normalno raspodijeljene, stoga su se razlike testirale jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) s post hoc Dunnettovim testom.

U analizi citotoksičnosti koja se odnosi na ulazak nanoAg-a u stanice, numeričke varijable nisu bile normalno raspodijeljene. Testirane su razlike nekoliko nezavisnih skupina kao i kod analize stanične smrti, ali u ovom slučaju Kruskal-Wallisovim testom, uz post hoc Dunnov test.

U analizi citotoksičnosti u kojoj je analiziran oksidativni stres produkcijom ROS-ova, testirana je razlika između dviju nezavisnih skupina (kontrolnih i pokusnih, tj. netretiranih i tretiranih) za sve vrste nano-Ag-a. Numeričke varijable bile su normalno raspoređene, pa su razlike testirane pomoću Studentovog t-testa. U analizi promjene mitohondrijskog membranskog potencijala testirane su razlike između dvije nezavisne skupine kao i kod analize produkcije ROS-ova. U ovom slučaju varijable nisu bile normalno raspoređene, stoga su razlike testirane Mann-Whitneyevim U-testom.

Rezultati analize genotoksičnosti tj. komet testa rađenih u duplikatu uspoređeni su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) s post-hoc Scheffè modifikacijom. S

obzirom da se rezultati pojedinih uzoraka nisu statistički značajno razlikovali, svi podaci (100 kometa po pokusu) su analizirani zajedno.

U analizi rezultata imunomodulatornih učinaka testirale su se razlike više nezavisnih skupina koje su obuhvaćale netretiranu (kontrolnu) skupinu, te pokusne skupine tretirane s četiri vrste nanoAg-a u nekoliko koncentracijskih i vremenskih točaka. Numeričke varijable nisu bile normalno raspoređene, stoga su se razlike testirale Kruskal-Wallisovim testom, uz post hoc Dunnov test. U analizi izražaja površinskih receptora CD4 i CD8 na pomagačkim odnosno citotoksičnim T-limfocitima, testirana je razlika između dviju nezavisnih skupina (kontrolnih i pokusnih, tj. netretiranih i tretiranih) za sve vrste nano-Ag-a. Numeričke varijable bile su normalno raspoređene, pa su razlike testirane pomoću Studentovog t-testa.

U kontrolnim pokusima citotoksičnosti, odnosno stanične smrti uzrokovane samim omotačima i ionskim srebrom, testirana je razlika dviju nezavisnih skupina (kontrolne-netretirane i pokusne-tretirane). Varijable su slijedile normalnu raspodijelu, stoga su razlike testirane pomoću Studentovog t-testa. U kontrolnim pokusima imunomodulatornih učinaka samih omotača i ionskog srebra, također su testirane razlike dviju nezavisnih skupina kao i u kontrolnim pokusima stanične smrti. U ovom slučaju varijable nisu slijedile normalnu raspodjelu, pa su razlike testirane Mann-Whitneyevim U-testom.

S obzirom na zadane ciljeve, kod konačne obrade, prikaza i rasprave rezultata najviše nas je zanimalo ostvaruju li različite vrste nanoAg-a toksične i modulatorne učinke na humane imunološke stanice. Iz tog razloga, u slučaju višestrukih usporedbi u poglavlju Rezultati prikazane su samo razlike između tretiranih i netretiranih tj. kontrolnih stanica.

Za sve statističke analize korišten je statistički program Statistica (inačica 12.0, Statsoft Inc., Tulsa, SAD). Sve p vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha=0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Karakterizacija i stabilnost sintetiziranih nanočestica

Cilj sinteze bio je pripremiti srebrne nanočestice sferičnog oblika i promjera oko 10 nm. Evaluacijom fizikalno-kemijskih svojstava pomoću nekoliko različitih metoda potvrđeno je da sve vrste nanoAg-a imaju željenu koloidnu stabilnost i svojstva.

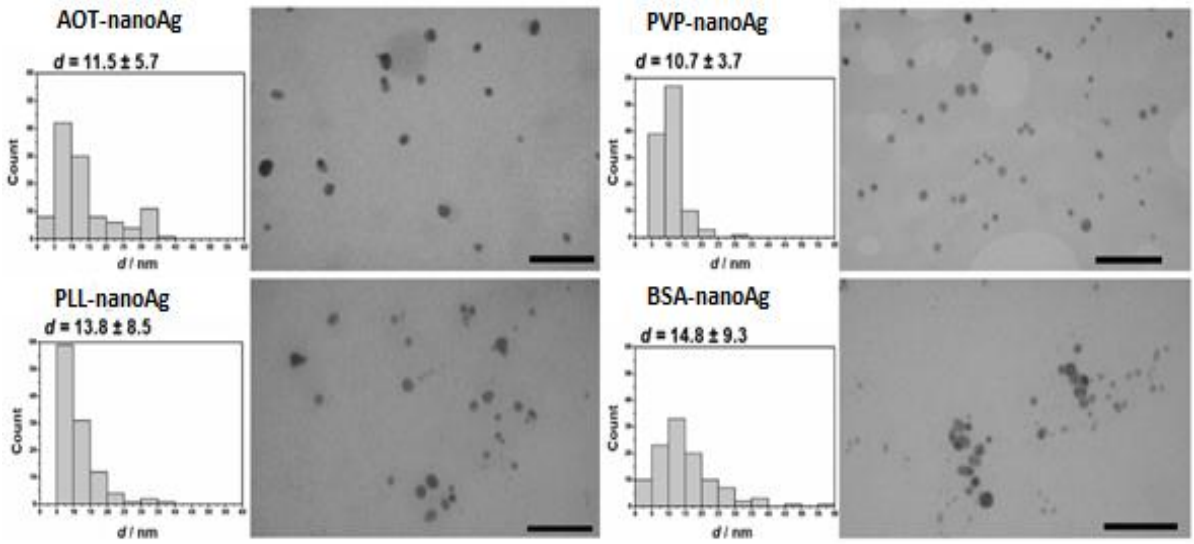
Podaci dobiveni ELS metodom potvrdili su pozitivan ζ potencijal za PLL-nanoAg, dok su ostale vrste nanoAg-a imale negativan ζ potencijal (Tablica 5.1). Iako je PVP-nanoAg stabiliziran neutralnim omotačem, pokazao je slabo negativan ζ potencijal koji je rezultat BH_4^- aniona koji se vežu na površinu PVP-nanoAg-a za vrijeme sinteze. Ukupni negativni potencijal BSA molekule dao je negativni ζ potencijal BSA-nanoAg-a.

Udio slobodnih srebrnih iona (% Ag^+) izmjeren je metodom GFAAS u filtratima dobivenim centrifugalnim ultrafiltriranjem dispergiranih nanočestica, te je maksimalno iznosio 1,1 % (Tablica 5.1).

Metodom DLS dobivene su vrijednosti za hidrodinamički promjer (d_H, nm) koje su proizašle iz distribucije veličine prema volumenu (Tablica 5.1). Primarni promjer (d, nm) nanočestica određen TEM metodom proizašao je iz presjeka površine nanoAg-a, te je bio u rasponu od 10,7 do 14,3 nm (Slika 5.1), pri čemu je DLS pokazao da se radi o bimodalnoj raspodjeli veličine (Tablica 5.1).

Tablica 5.1. Fizikalno-kemijska svojstva različitih vrsta nanoAg-a prema površinskom omotaču.

Tip nanoAg	d_H (nm)	Udio (%) srednje vrijednosti volumena	ζ potencijal (mV)	Udio (%) Ag^+
AOT-nanoAg	14.9 ± 4.5 28.4 ± 6.7	92.2 7.8	−39.8 ± 3.8	0.4
PVP-nanoAg	5.8 ± 1.6 29.8 ± 6.1	94.8 5.2	−19.3 ± 2.6	0.4
PLL-nanoAg	8.8 ± 0.9 52.6 ± 16.3	95.7 4.3	40.6 ± 1.5	1.1
BSA-nanoAg	14.1 ± 3.3 58.4 ± 18.1	86.3 13.7	−10.6 ± 3.2	0.8



Slika 5.1. Prikaz oblika i veličine različitih vrsta nanoAg-a prema omotaču pomoću transmisijske elektronske mikroskopije (TEM). Skala veličine prikazuje 100 nm.

Nadalje, određena je koloidna stabilnost svih vrsta nanoAg-a u PBS mediju jer je to bio medij u kojima su izolati hPBMC stanica otopljeni. Zbog velike ionske jakosti PBS-a očekivala se destabilizacija nanoAg-a.

U PBS mediju sve vrste nanoAg-a značajno su aglomerirale što je vidljivo iz rezultata prikazanih u Tablici 5.2. U tom se mediju pojavila populacija nanočestica čija je veličina bila oko 200 nm ili veća, te je predstavljala značaj udio (> 80%) ukupne populacije. Takvo ponašanje bilo je očekivano s obzirom na veliku ionsku jakost PBS medija koja je destabilizirala nanoAg.

Tablica 5.2. Koloidna stabilnost različitih vrsta nanoAg-a prema omotaču u PBS mediju bez i sa dodatkom stanica (PBS / PBS+hPBMC).

Tip nanoAg	PBS			PBS + hPBMC	
	d_H, nm	ζ potencijal (mV)	% Ag^+	µg proteina / mg Ag	% Ag^+
AOT-nanoAg	32.4 ± 7.9 (15%) 328.3 ± 28.7 (85%)	−19.1 ± 4.2	0.3	796 ± 58	0.1
PVP-nanoAg	12.7 ± 8.1 (8%) 408.9 ± 67.7 (92%)	−13.7 ± 3.3	0.1	714 ± 43	0.3
PLL-nanoAg	12.8 ± 6.3 (18%) 512.5 ± 91.4 (82%)	−14.1 ± 2.5	0.8	803 ± 62	0.4
BSA-nanoAg	11.8 ± 4.6 (2%) 198.7 ± 56.4 (98%)	−15.4 ± 2.8	0.7	842 ± 74	0.2

U mediju PBS+hPBMC nije bilo moguće odrediti distribuciju veličina DLS metodom, no vizualnim pregledom je uočeno da su sve vrste nanoAg-a bile jako dobro dispergirane zbog dodatne stabilizacije proteinima koji su bili prisutni u tom mediju. Analizom proteina utvrđeno je da se u tom mediju nalazi oko 24 mg/L slobodnih proteina koji su odmah nakon unosa nanoAg-a u taj medij ušli u interakciju i adsorbirali se na površinu nanoAg-a. Postojanje proteinske korone potvrđeno je na površini svih vrsta nanoAg-a u PBS+hPBMC mediju (Tabllica 5.2).

Otapanje nanoAg-a značajno je smanjeno u oba medija velike ionske jakosti (PBS i PBS+hPBMC). Količina slobodnih iona u mediju sa stanicama bila je u rasponu od 0,1 do 0,4 %, a u samom PBS-u do 0,8 %. (Tablica 5.2). Smanjenje razine slobodnih Ag^+ iona u PBS-u može se objasniti aglomeriranjem nanoAg-a čime im se smanjuje slobodna površina dostupna za proces otapanja, ali i mogućim stvaranjem netopivih AgCl soli u tom mediju. U PBS+hPBMC mediju se smanjenje otapanja dogodilo uslijed dodatne stabilizacije nanoAg-a stvaranjem proteinske korone.

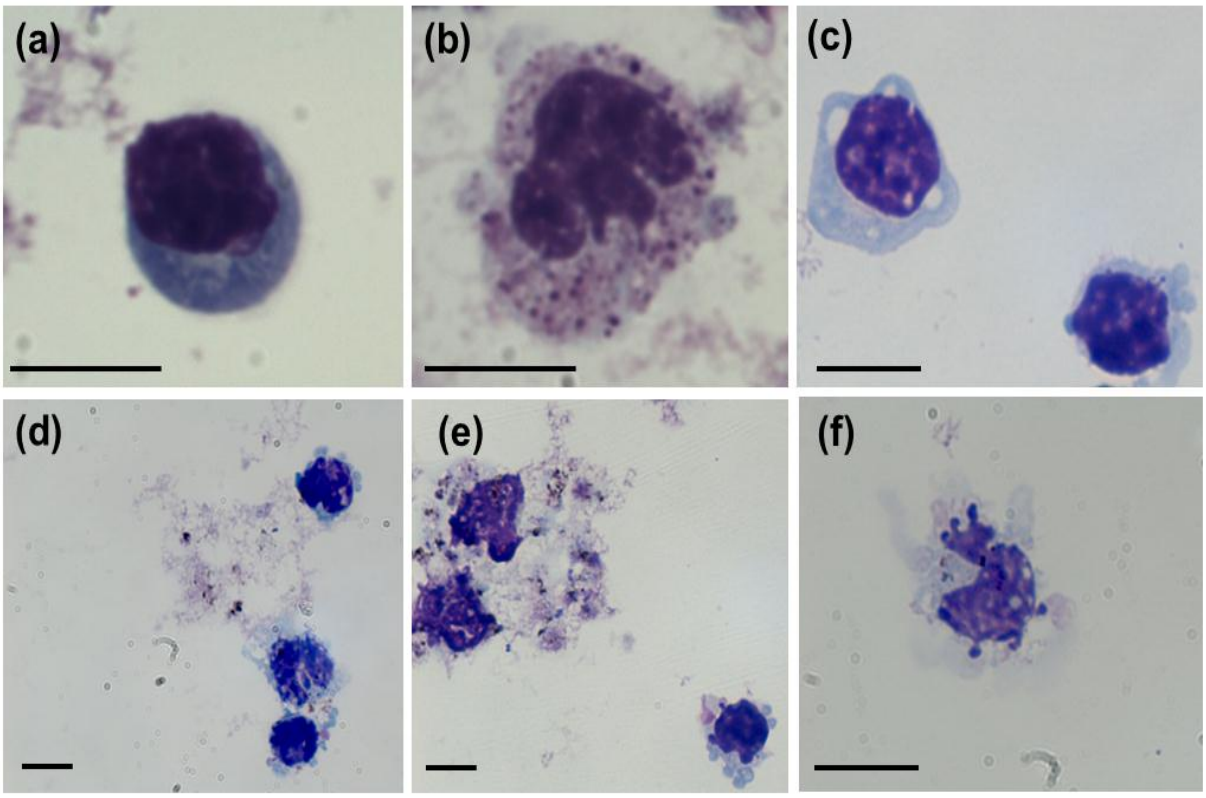
5.2. Ulazak nanoAg-a u stanice i citotoksični učinci

Svježe izolirane hPBMC stanice tretirane različitim nanočesticama srebra prema omotaču vizualno su pregledane pod svjetlosnim mikroskopom, čime su se uočile brojne citomorfološke promjene stanica, te nastanak apoptotičkih tjelešaca, kao i ulazak nanoAg-a u stanicu putem endocitoze (Slika 5.2). Kod svih tretmana su uočene značajne strukturalne promjene u vidu grubog kromatina i uvećanih jezgara, pojave apoptotičkih tjelešaca, nekrotične stanice, te povećan broj vezikula u citoplazmi.

Određivanje citotoksičnosti nanoAg-a protočnom citometrijom provedeno je u nekoliko faza: (1) istovremenom analizom ulaska nanoAg-a u stanice i stanične smrti u vidu apoptoze i/ili nekroze, (2) analizom stvaranja ROS-ova i (3) mjerenjem promjene mitohondrijskog membranskog potencijala.

U prvom dijelu analize citotoksičnosti uočeno je da sve četiri vrste nanoAg-a induciraju apoptozu, ali i nekrozu hPBMC ovisno o vremenu izloženosti i koncentraciji (Slike 5.3-5.6). Također, indukcija apoptoze uvjetovana je i vrstom nanoAg-a s obzirom na vrstu površinskog omotača. Jako negativne nanočestice (AOT-nanoAg) značajno su inducirale apoptozu (3% stanica u ranoj i 20,5% stanica u kasnoj apoptozi) već nakon inkubacije od 1 h pri koncentraciji AOT-nanoAg-a od 10 mg

Ag/L, dok je udio apoptotičnih stanica značajno porastao nakon 3 sata već pri koncentraciji od 5 mg Ag/L (23,5% u kasnoj apoptozi), a inducirala se i nekrotična smrt stanica (17,2%) (Slike 5.4-5.6).

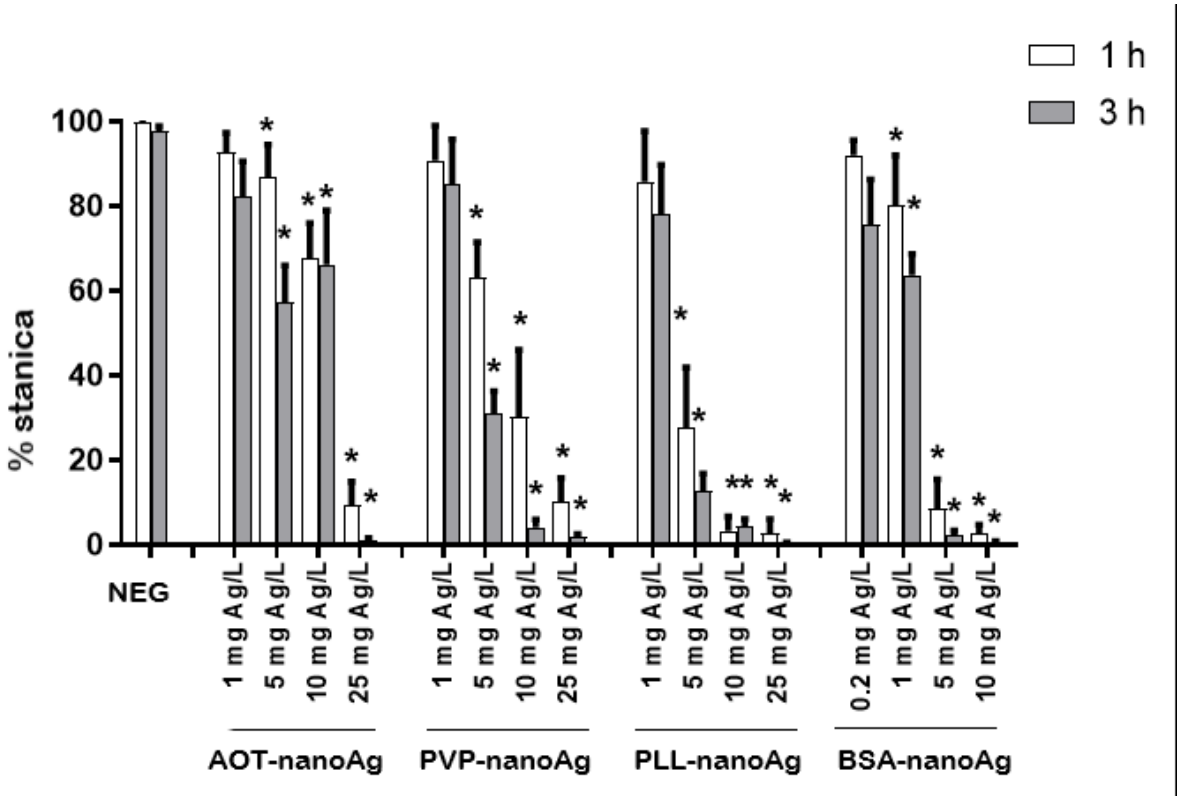


Slika 5.2. Vizualizacija kontrolnih i tretiranih hPBMC stanica pod svjetlosnim mikroskopom. Kontrolni, netretirani limfocit (a) i monocit (b). Stanice tretirane s AOT-, PVP-, PLL- i BSA-nanoAg-om sadrže brojne citomorfološke promjene. Vezikule u limfocitu (gore lijevo) i apoptotička tjelešca (dolje desno) nakon tretmana s AOT-nanoAg-om (c). Velike strukturalne promjene u vidu grubog kromatina i apoptotičkih tjelešaca na limfocitima i monocitu nakon tretmana s PVP-nanoAg-om (d). Stanice u nekrozi (gore lijevo) i apoptozi (dolje desno) nakon tretmana s PLL-nanoAg-om (e). Endocitotske vezikule u citoplazmi, uvećana multilobulirana jezgra i grubi kromatin u monocitu nakon tretmana s BSA-nanoAg-om (f). Skala veličine je 10 μm.

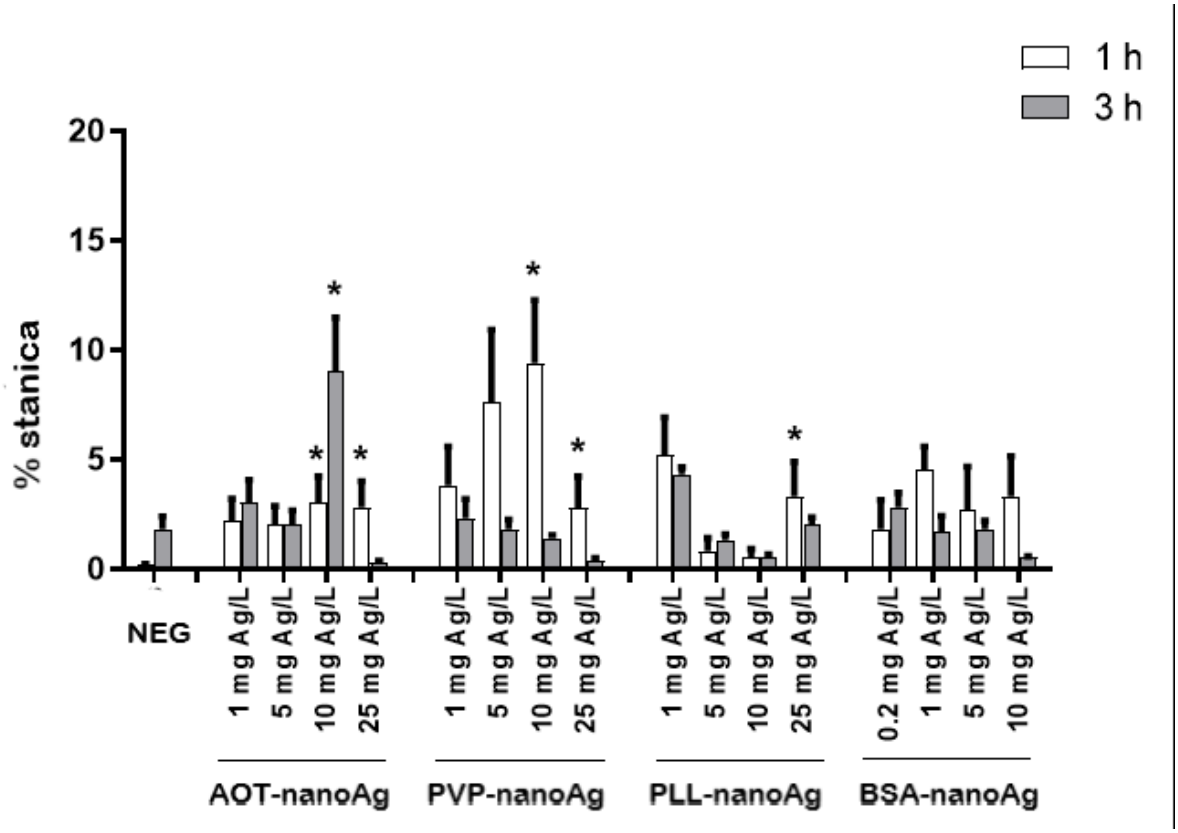
Neutralne nanočestice (PVP-nanoAg) pokazale su sličan učinak, ali su inducirale apoptozu i nekrozu u znatno većem udjelu stanica. Nakon inkubacije od 1 h pri koncentraciji od 10 mg Ag/L, izazvale su kasnu apoptozu kod čak 43,2% stanica (Slika 5.5), a nekrozu u 17,2% stanica (Slika 5.6). Sličan učinak zapažen je nakon inkubacije od 3 h pri nižoj koncentraciji PVP-nanoAg-a (5 mg Ag/L) gdje 48,6% stanica otišlo u kasnu apoptozu (Slika 5.5), a 18,6% stanica u nekrozu (Slika 5.6).

Pozitivno nabijene nanočestice (PLL-nanoAg) pokazale su znatno veću toksičnost, jer je koncentracija od 5 mg Ag/L već nakon 1 h inkubacije izazvala kasnu apoptozu kod 61,5% stanica (Slika 5.5) i nekrozu kod 10,2% stanica (Slika 5.6). Najveća toksičnost zabilježena je kod tretmana s BSA-nanoAg-om kod kojih je već nakon 1 h pri koncentraciji od 5 mg Ag/L 66% stanica bilo u kasnoj apoptozi (Slika 5.5), a 18% stanica u primarnoj nekrozi (Slika 5.6).

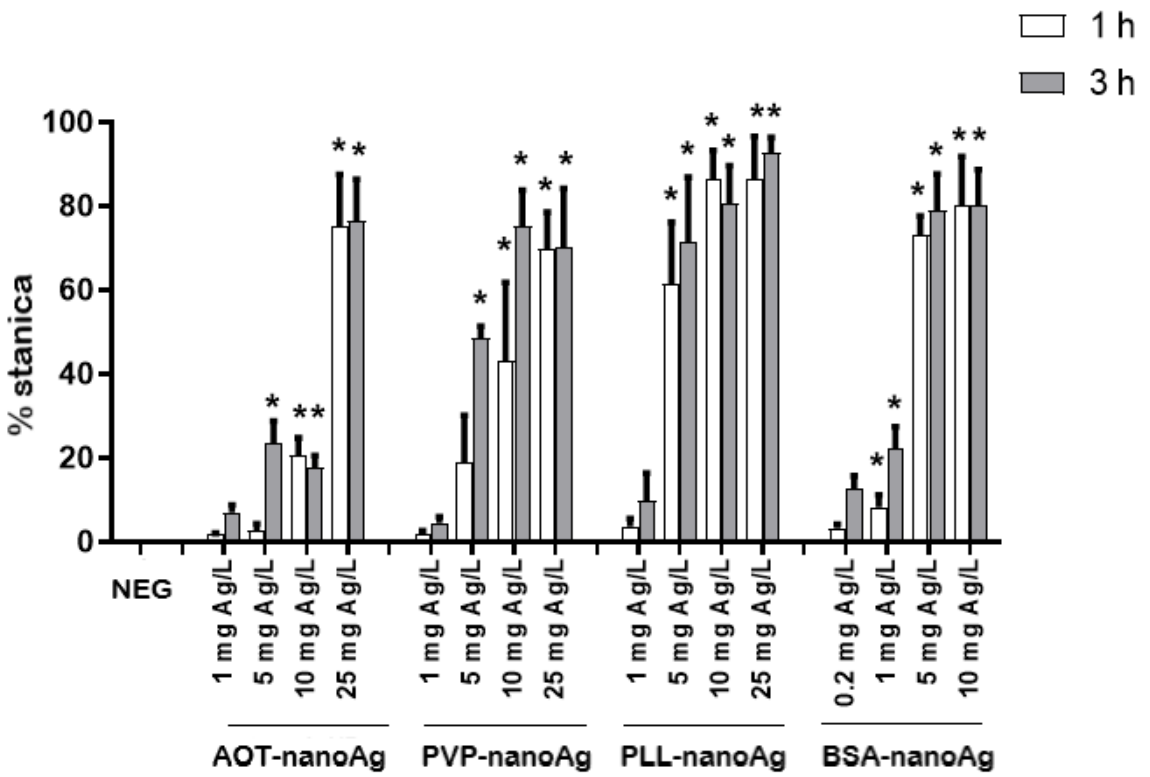
Analizom rezultata preživjelih stanica zaključeno je kako je > 90% hPBMC stanica preživjelo jedino kod koncentracije nanoAg-a od 1 mg Ag/L nakon jednosatne inkubacije, dok je za BSA-nanoAg ta koncentracija bila znantno niža (0,2 mg Ag/L) (Slika 5.3).



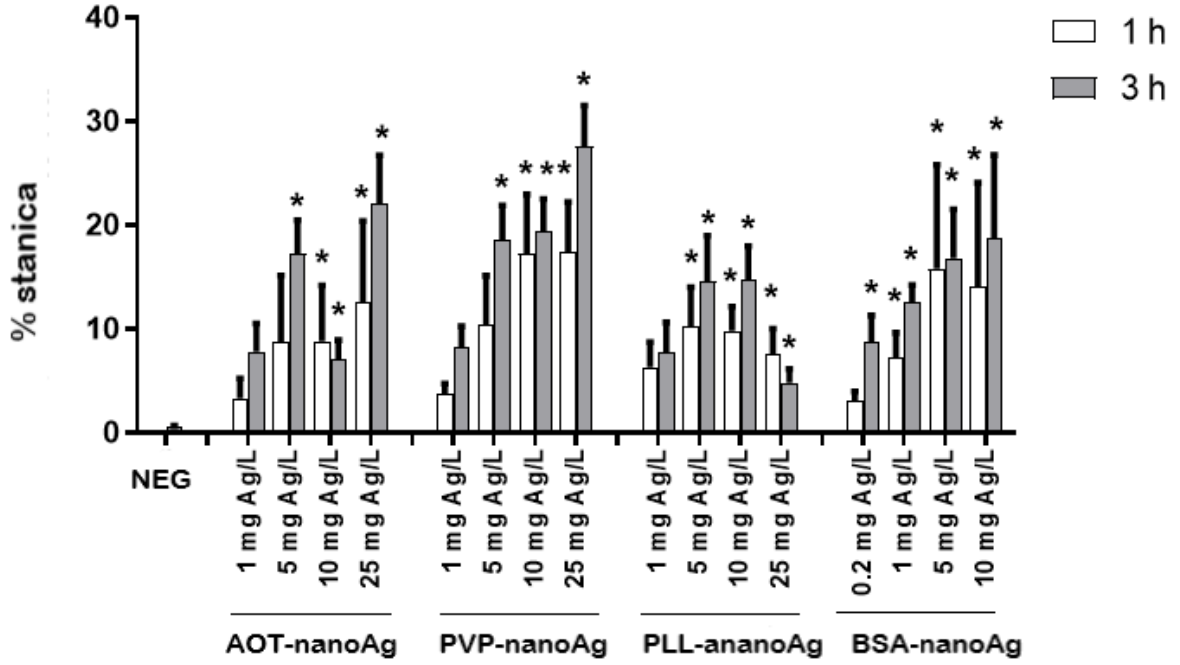
Slika 5.3. Učinak različitih koncentracija AOT-, PVP-, PLL- i BSA-nanoAg-a na udio (%) živih stanica u odnosu na netretirane stanice (NEG) nakon 1 h (bijeli stupci) i 3 h (sivi stupci) izloženosti. Rezultati ukupne analize svih mjerenja dobivenih iz 6 neovisnih pokusa (n=6) prikazani su kao aritmetička sredina i standardno odstupanje. Rezultati statističke analize ANOVA testom (uz post hoc Dunnett) označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p<0,05$).



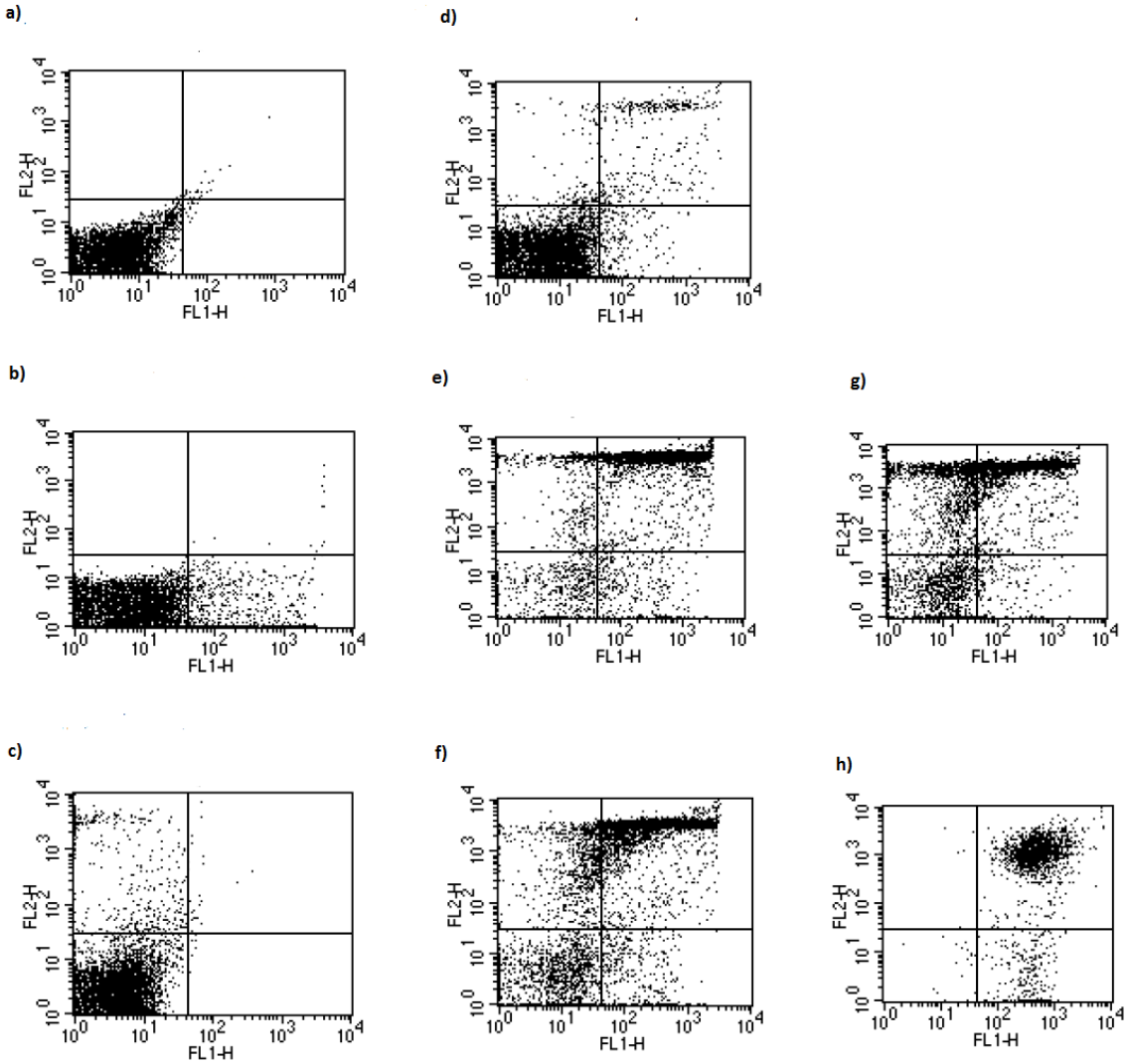
Slika 5.4. Učinak različitih koncentracija AOT-, PVP-, PLL- i BSA-nanoAg-a na udio (%) stanica u ranoj apoptozi u odnosu na netretirane stanice (NEG) nakon 1 h (bijeli stupci) i 3 h (sivi stupci) izloženosti. Rezultati ukupne analize svih mjerenja dobivenih iz 6 neovisnih pokusa (n=6) prikazani su kao aritmetička sredina i standardno odstupanje. Rezultati statističke analize ANOVA testom (uz post hoc Dunnett) označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p<0,05$).



Slika 5.5. Učinak različitih koncentracija AOT-, PVP-, PLL- i BSA-nanoAg-a na udio (%) stanica u kasnoj apoptozi u odnosu na netretirane stanice (NEG) nakon 1 h (bijeli stupci) i 3 h (sivi stupci) izloženosti. Rezultati ukupne analize svih mjerenja dobivenih iz 6 neovisnih pokusa (n=6) prikazani su kao aritmetička sredina i standardno odstupanje. Rezultati statističke analize ANOVA testom (uz post hoc Dunnett) označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p<0,05$).

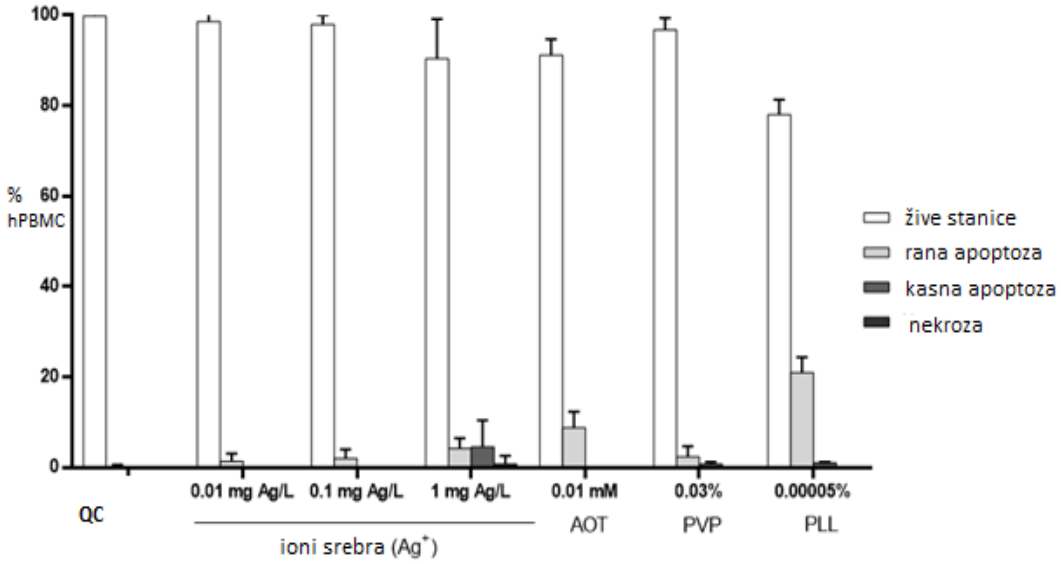


Slika 5.6. Učinak različitih koncentracija AOT-, PVP-, PLL- i BSA-nanoAg-a na udio (%) stanica umrlih primarnom nekrozom u odnosu na netretirane stanice (NEG) nakon 1 h (bijeli stupci) i 3 h (sivi stupci) izloženosti. Rezultati ukupne analize svih mjerenja dobivenih iz 6 neovisnih pokusa (n=6) prikazani su kao aritmetička sredina i standardno odstupanje. Rezultati statističke analize ANOVA testom (uz post hoc Dunnett) označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p<0,05$).



Slika 5.7. Primjer analize apoptoze/nekroze stanica u točkastom citogramu metodom protočne citometrije (sofverski program CellQuest). Kontrolne hPBMC za pozitivnu kontrolu, odnosno za postavljanje kvadranta, tretirane su 1 h s 1 mg Ag/L nanoAg-a, a pokusne stanice su tretirane 1 h s 5 mg Ag/L nanoAg-a. Za potrebe analize korištene se četiri kontrole: negativna - netretirane, neobojene stanice (a), pozitivna FMO-PI kontrola – tretirane stanice obojane samo s FITC Annexin-om V (b), pozitivna FMO-FITC Ann V kontrola – tretirane stanice obojene samo s PI (c), dvostruko obojena pozitivna kontrola – tretirane stanice obojene s FITC Annexin V i PI (d). Sve pokusne stanice su dvostruko obojane. Na ovom primjeru analize prikazane su pokusne stanice tretirane s: PVP-nanoAg-om (e), BSA-nanoAg-om (f), AOT-nanoAg-om (g) i PLL-nanoAg-om (h). U donjem lijevom kvadrantu su žive stanice, u donjem desnom ranoapoptotičke, u gornjem desnom kasnoapoptotičke, a u lijevom gornjem kvadrantu stanice u primarnoj nekrozi.

Prema srednjim vrijednostima udjela preživjelih stanica inkubiranih 1 h s minimalno toksičnom koncentracijom (1 mg Ag/L), možemo zaključiti da najmanji citotoksični potencijal imaju AOT-nanoAg (92,8%), a zatim redom PVP-nanoAg (92%) i PLL-nanoAg (90,8%); BSA-nanoAg ima preživljenje od 92,5% stanica, ali pri znatno nižoj koncentraciji (0,2 mg Ag/L) (Slika 5.3). Do takvog zaključka također možemo doći promatrajući srednje vrijednosti udjela umrlih stanica, no važno je napomenuti da su rezultati pokazali kako stanice tretirane s PLL- i AOT-nanoAg-om više umiru apoptozom, a stanice tretirane s BSA- i PVP-nanoAg-om više umiru nekrozom (Slike 5.4-5.6). To je vidljivo i na primjeru analize apoptoze / nekroze stanica u točkastom citogramu (Slika 5.7).



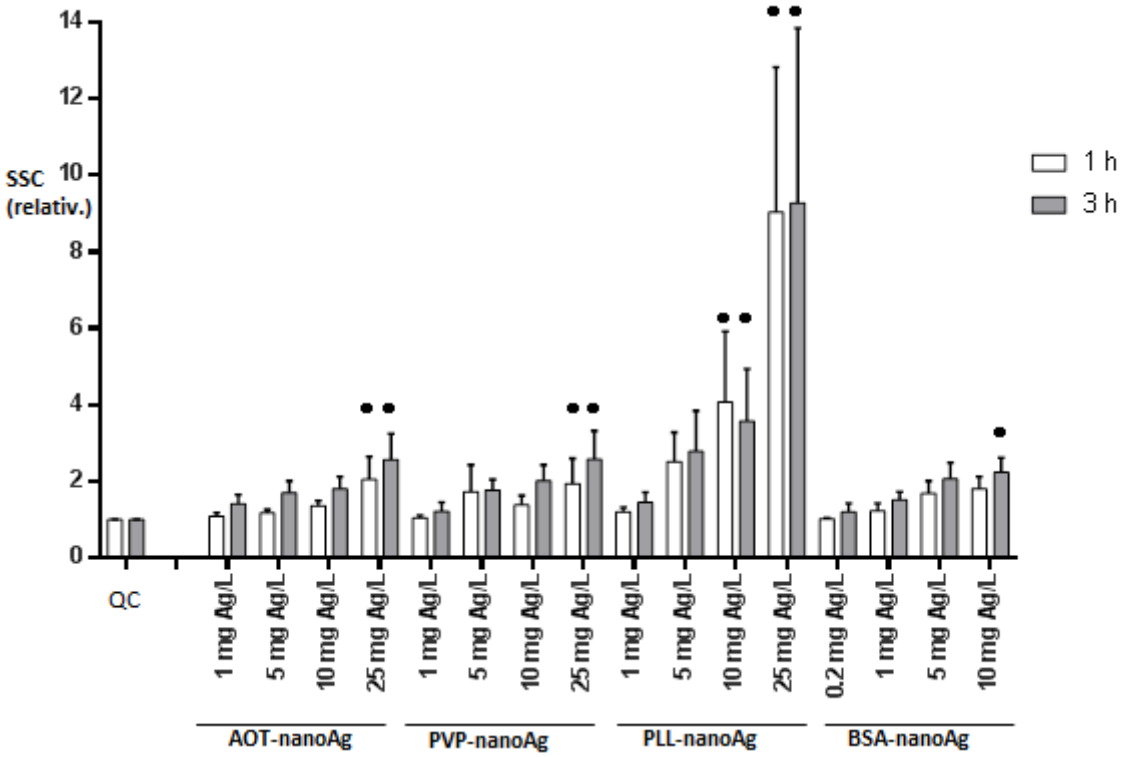
Slika 5.8. Analiza citotoksičnosti ionskog srebra i omotača (AOT, PVP i PLL) na udio (%) živih (bijeli stupac), ranoapoptotičkih (svijetlosivi stupac), kasnoapoptotičkih (tamnosivi stupac) i nekrotičkih (crni stupac) stanica nakon 3 sata izloženosti. Rezultati ukupne analize svih mjerenja dobivenih iz 6 neovisnih pokusa (n=6) prikazani su kao aritmetička sredina i standardno odstupanje. Rezultati statističke analize Studentovim t-testom pokazali su da nema statistički značajne razlike između kontrolnog (QC) i tretiranih uzoraka ($p<0,05$).

U svrhu procjene doprinosa samih omotača citotoksičnosti nanoAg-a, hPBMC stanice tertirane su 3 h s vodenom otopinom omotača (PVP, PLL, AOT) u onoj koncentraciji u kojoj se nalaze raspršeni u otopini nanoAg-a koncentracije 25 mg/L. Iako nisu statistički značajni, rezultati su pokazali da sami PVP omotač ne utječe

značajno na vijabilnost stanica, odnosno na promjene udjela pojedinih staničnih populacija, dok AOT i PLL blago induciraju ranu apoptozu (Slika 5.8).

Kontrolni pokus s ionima srebra (u obliku $AgNO_3$) pokazao je da Ag^+ ne utječu značajno na vijabilnost hPBMC u koncentraciji 1 mg Ag^+/L (Slika 5.8). Iz ovih kontrolnih pokusa možemo zaključiti da sami omotači kao ni ioni srebra ne interferiraju s rezultatima ispitivanja citotoksičnosti nanoAg-a.

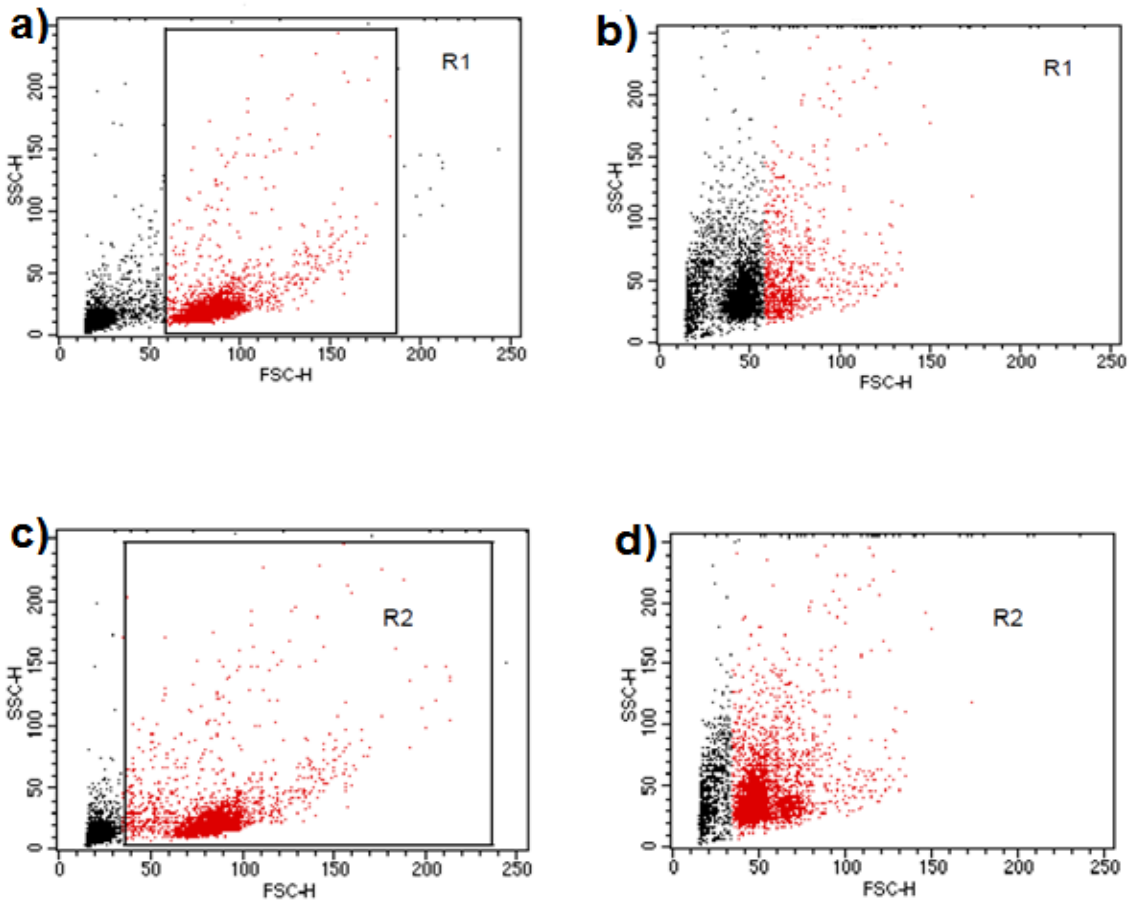
Prilikom analize stanične smrti protočnom citometrijom, istovremeno se mjerio i ulazak nanoAg-a u hPBMC stanice određivanjem porasta raspršenja svjetla pod pravim kutem (SSC). Rezultati su pokazali da je porast SSC-a, odnosno internalizirana koncentracija proporcionalna primjenjenoj i to kod svih vrsta nanoAg-a, dok vremenska ovisnost nije uočena (Slika 5.9).



Slika 5.9. Analiza proporcije ulaska različitih vrsta nanoAg-a u stanice porastom koncentracije u odnosu na negativnu kontrolu (QC). Stanice hPBMC su bile izložene nanoAg-u kroz 1 h (bijeli stupci) i 3 h (sivi stupci). Rezultati mjerenja su normalizirani prema kontroli (QC), te predstavljaju relativnu proporciju internalizacije (SSC (relativ)). Rezultati ukupne analize 6 neovisnih pokusa (n=6) prikazani su kao medijan i interkvartilni raspon. Rezultati statističke analize Krskal-Wallisovim testom (uz post hoc Dunnov test) označeni točkom (•) statistički se značajno razlikuju od kontrole, uz razinu značajnosti $p<0,05$.

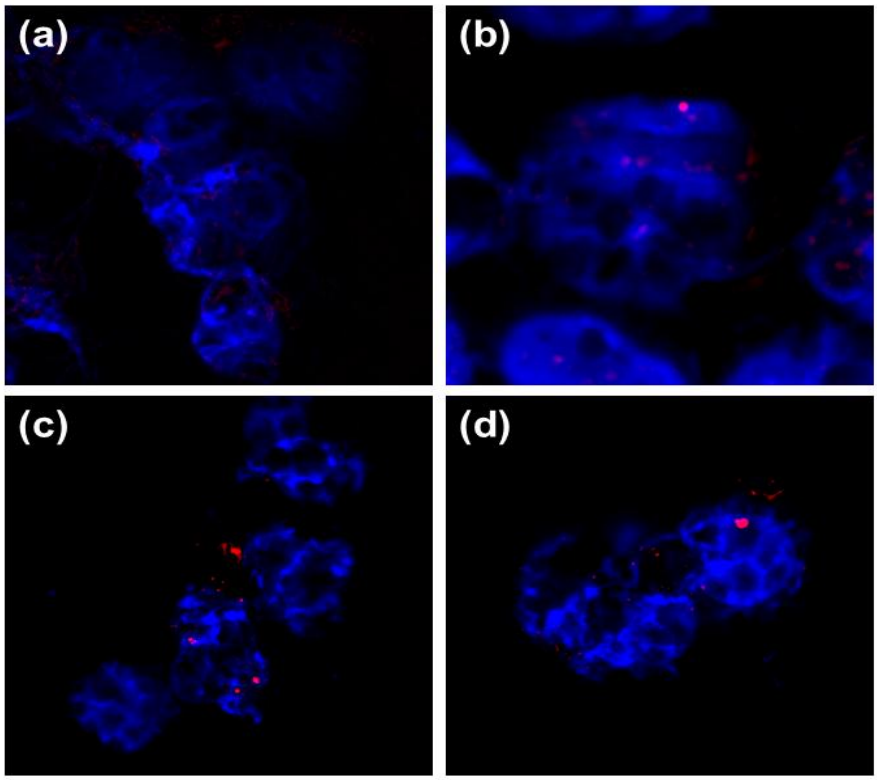
PLL-nanoAg pokazao je najveći porast SSC-a kod primjenjenih koncentracija. PVP- i AOT-nanoAg pokazali su sličan trend u porastu SSC-a, uz značajan porast tek pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji (25 mg Ag/L), dok je BSA-nanoAg pokazao značajan porast već pri koncentraciji od 10 mg Ag/L (Slika 5.9).

Valja napomenuti da je u ovom slučaju primjenjena posebna strategija ograđivanja stanica, pri čemu je analiza rađena na ogradi isključivo živih stanica. Na taj način odvojile su se žive stanice od stanica u apoptozi koje također daju porast signala za SSC. Time se izbjeglo lažno povećanje SSC-a koje ne potječe od ulaska nanoAg-a u stanice (Slika 5.10).



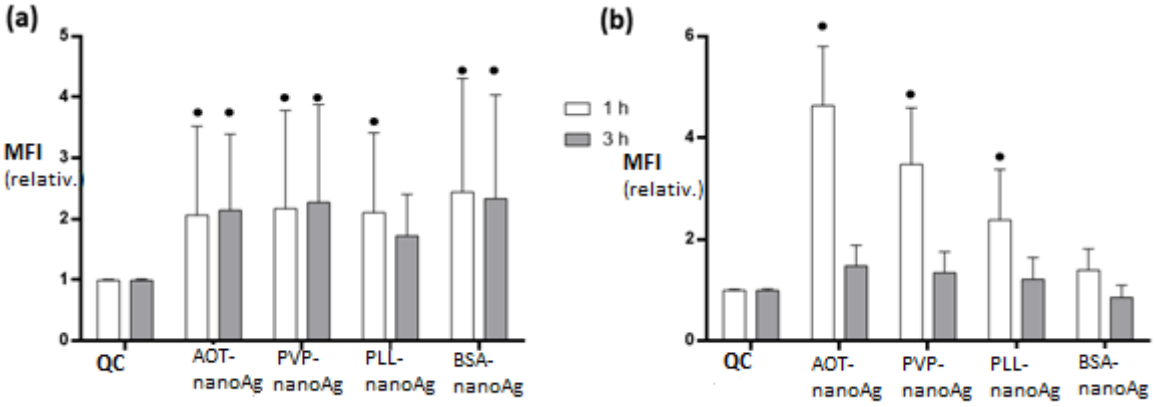
Slika 5.10. Različite strategije ograđivanja stanica u analizi ulaska nano-Ag-a u stanice i stanične smrti (apoptoze) na točkastom dijagramu veličine (FSC-H) i zrnatosti (SSC-H). Stanice unutar ograde R1 predstavljaju sve žive hPBMC, a unutar ograde R2 sve hPBMC skupljene na citometru u jednom pokusu. Na citogramima a) i c) su kontrolne, netretirane hPBMC koje služe za postavljanje ograde. Na citogramu b) primjer je ograđivanja živih hPBMC za analizu ulaska nano-Ag-a u stanice nakon tretmana. Na citogramu d) primjer je ograđivanja svih skupljenih hPBMC za analizu apoptoze nakon tretiranja s nanoAg-om. Ograđivanje se izvodi na kontrolnim stanicama, a zatim se takva ograda preslika na tretirane stanice.

Međutim, klasičnom protočnom citometrijom nije moguće jasno razlikovati adsorpciju nanoAg-a na površinu stanica od internalizacije u stanice. U tom slučaju došlo bi do malog, ali nedovoljnog porasta raspršenja svjetla pod malim kutem (FSC), no to ne bi bila egzaktna potvrda adsorpcije, odnosno internalizacije. Vizualizacija stanica CLSM mikroskopom uz primjenu refleksnog kontrastnog moda konačan je dokaz internalizacije nanoAg-a u citoplazmu, kao i u jezgru hPBMC stanica (Slika 5.11).

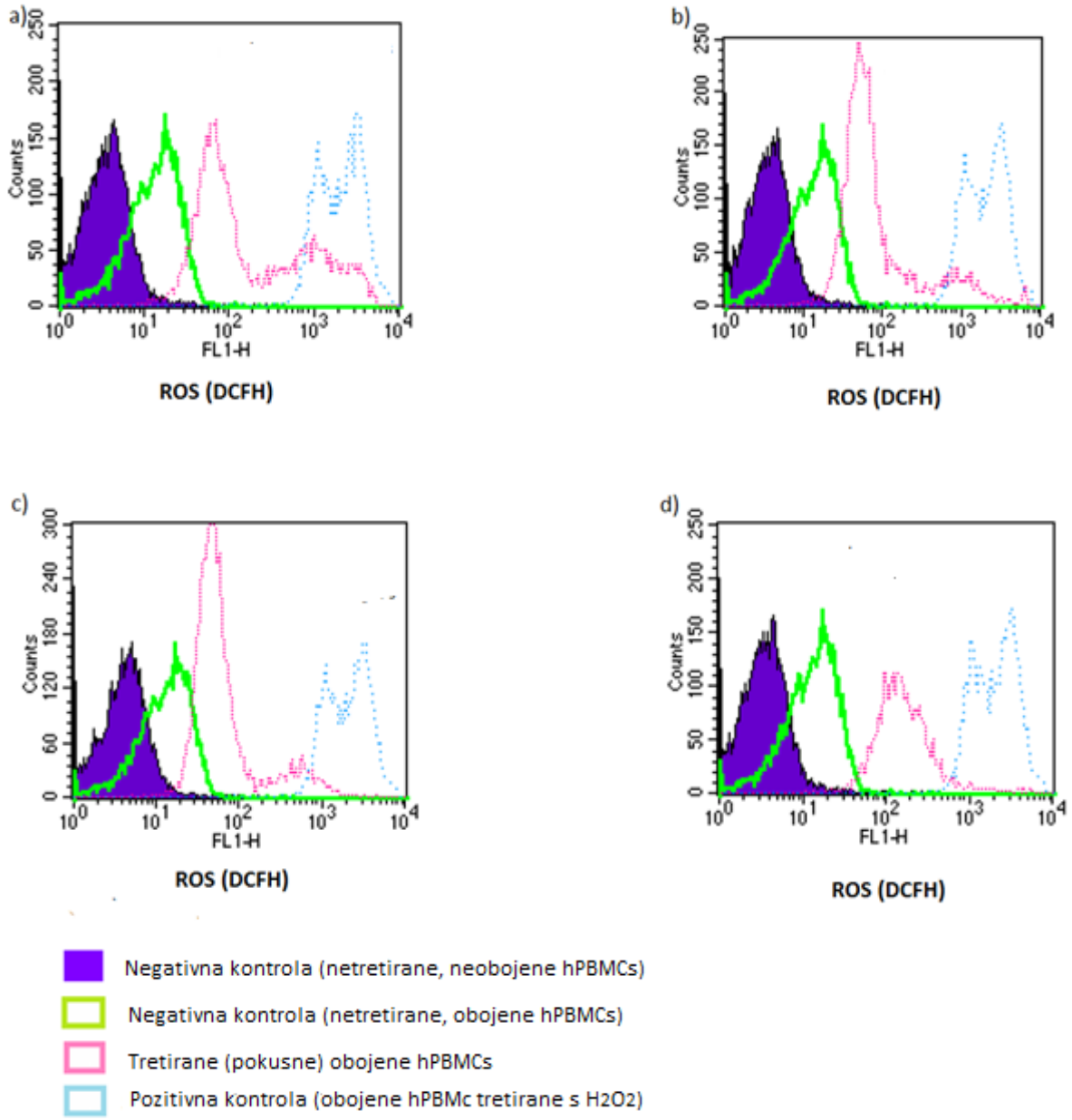


Slika 5.11. Precizna vizualizacija ulaska nanoAg-a u stanice i unutarstanične lokalizacije nanoAg-a mikroskopskom metodom CLSM s modom kontrasne refleksije. Netretirane (kontrolne) stanice (a) uspoređene su sa stanicama tretiranim s AOT-nanoAg-om (b), PVP-nanoAg-om (c) i PLL-nanoAg-om (d). Slike prikazuju Z-projekcije stanica maksimalnog intenziteta. Bojanje nukleinskih kiselina iz jezgre rađeno je pomoću Hoechst 33258 fluorescentne boje (plavo), dok CLSM reflektirajući signali (crveno) označavaju nanoAg lokalizirane u jezgri i citoplazmi hPBMC stanica (b, c, d).

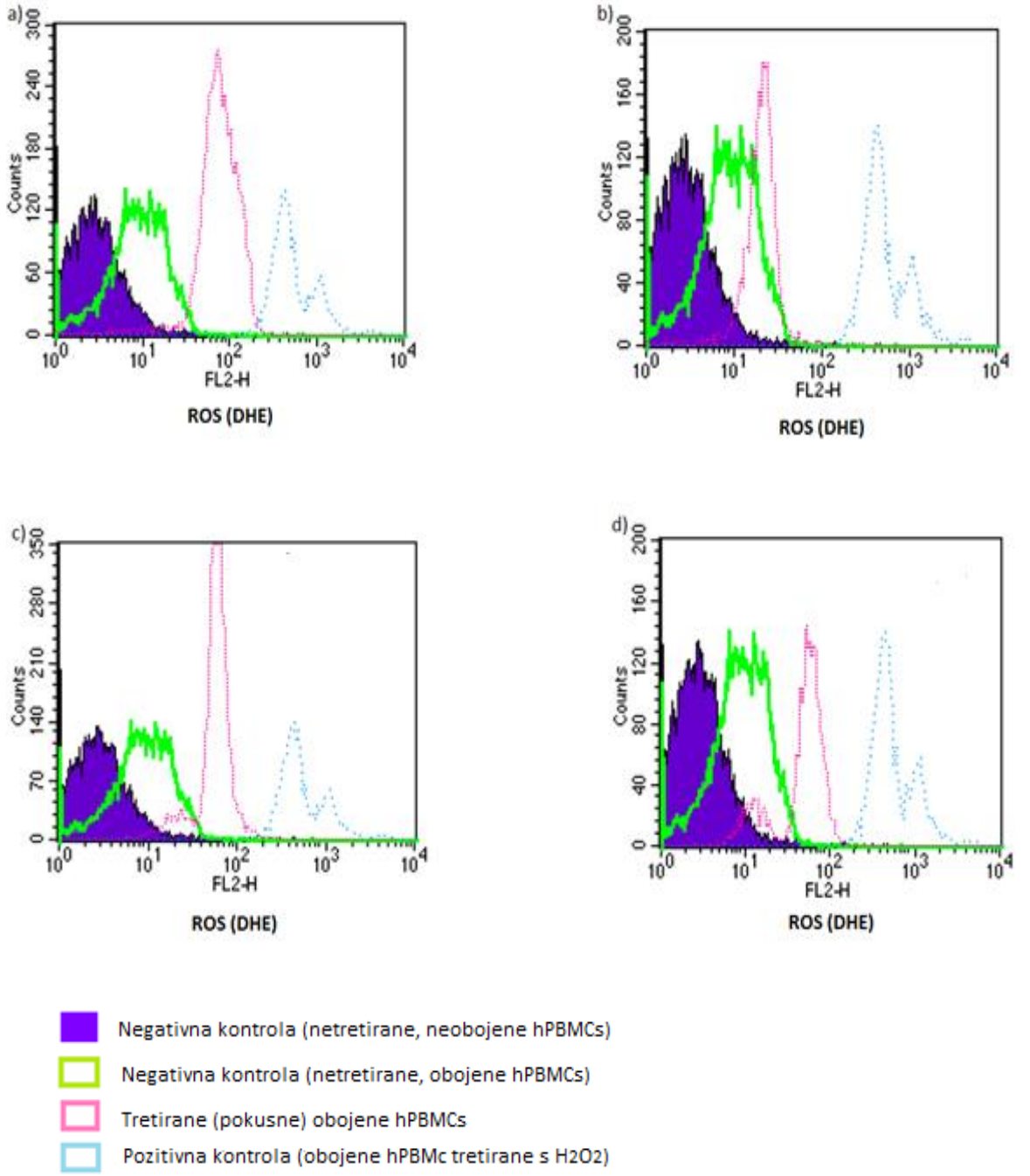
U zadnjoj fazi procjene citotoksičnosti analiziran je odgovor hPBMC stanica na oksidativni stres izazvan djelovanjem različitih vrsta nanoAg-a u minimalno toksičnoj koncentraciji, odnosno koncentraciji pri kojoj je ranije utvrđeno da preživi >90% stanica (1 mg Ag/L) u dvije vremenske točke (1 h i 3 h). Rezultati analize rezultata dobivenih protočnom citometrijom s DHE i DCFH-DA fluorescentnim bojama pokazali su da sve vrste nanoAg-a značajno povećavaju razinu ROS-ova u hPBMC stanicama (Slika 5.12). Produkcija superoksid-radikala odvija se slično za sve tipove nanoAg-a bez obzira na vrijeme inkubacije, dok su peroksi-radikali detektirani samo u stanicama koje su tretirane 1 h s AOT-, PVP- i PLL-nanoAg-om (Slika 5.12).



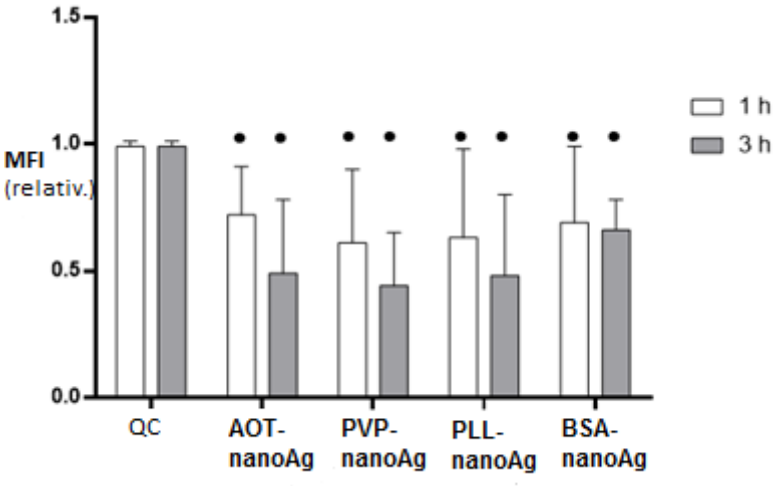
Slika 5.12. Analiza oksidativnog stresa. Stanice hPBMC su tretirane različitim vrstama nanoAg-a u minimalno toksičnoj koncentraciji nakon 1 h (bijeli stupci) i 3 h (sivi stupci) inkubacije. Razina produkcije superoksid-radikala određena je pomoću fluorescentne boje DHE (a), a peroksi-radikala pomoću DCFH-DA (b). Rezultati ukupne analize dobiveni iz 6 neovisnih pokusa (n=6) prikazani su kao aritmetička sredina relativnog intenziteta fluorescencije (MFI) i standardno odstupanje u odnosu na negativnu kontrolu (QC). Rezultati statističke analize Studentovim t-testom označeni točkom (•) statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p<0,05$).



Slika 5.13. Primjer histogramske analize produkcije ROS-ova (sofverski program CellQuest). Za detekciju peroksi-radikala stanice su bojane fluorescentnom bojom DCFH-DA nakon tretiranja s: PVP-nanoAg (a), BSA-nanoAg (b), AOT-nanoAg (c) i PLL-nanoAg (d). Na svim histogramima vidljiv je porast fluorescencije (FL1-H) tretiranih hPBMC (rozo) u odnosu na negativne kontrole (ljubičasto i zeleno). Pozitivna kontrola (plavo) je potrebna u svakom pokusu kao dokaz pozitivnog signala fluorescencije u prisutnosti ROS-ova (tretman s vodikovim peroksidom).



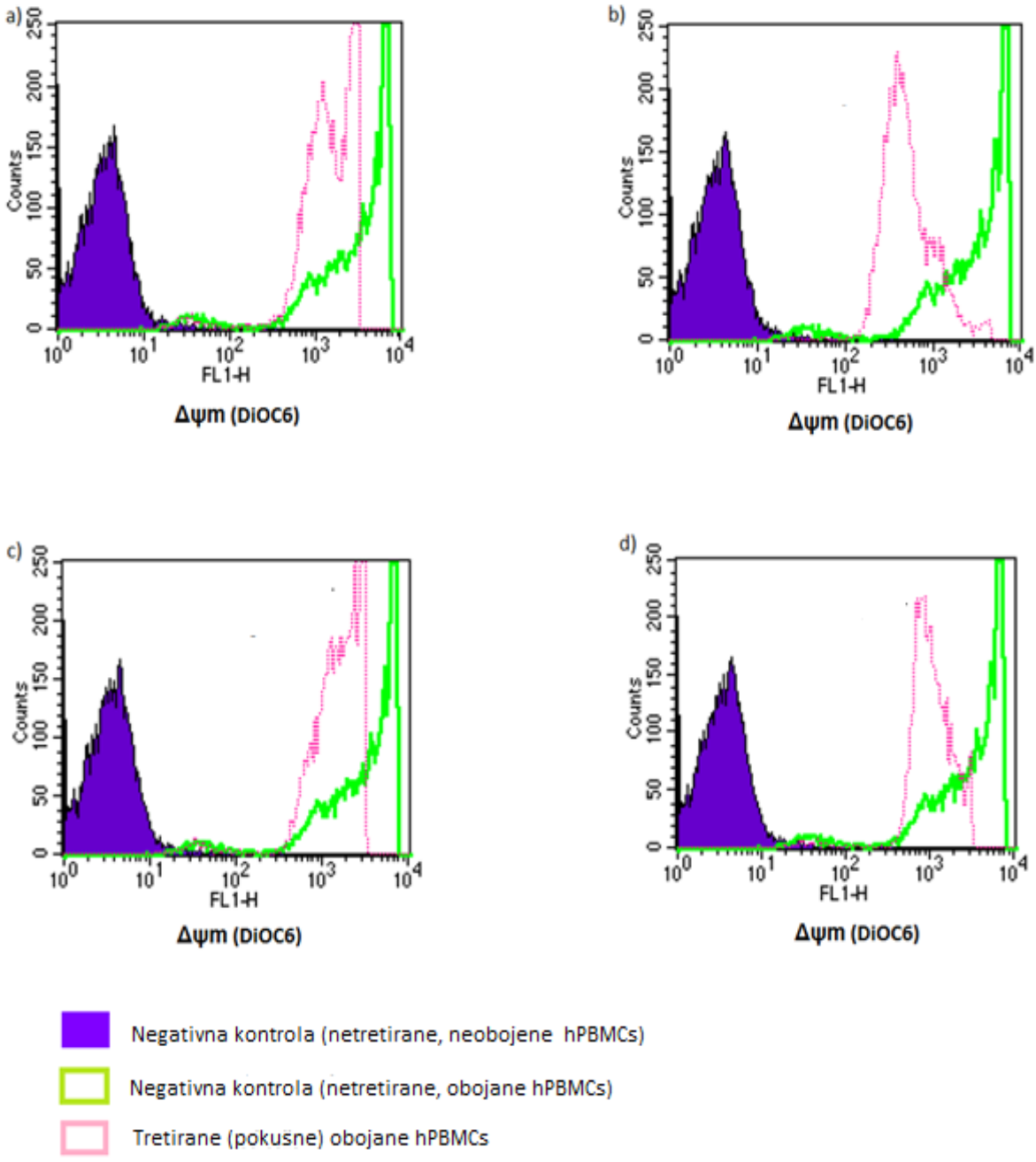
Slika 5.14. Primjer histogramske analize produkcije ROS-ova (sofverski program CellQuest). Za detekciju superoksid-radikala stanice su bojane fluorescentnom bojom DHE nakon tretiranja s: PVP-nanoAg (a), BSA-nanoAg (b), AOT-nanoAg (c) i PLL-nanoAg (d). Na svim histogramima vidljiv je porast fluorescencije (FL2-H) tretiranih hPBMC (rozo) u odnosu na negativne kontrole (ljubičasto i zeleno). Pozitivna kontrola (plavo) je potrebna u svakom pokusu kao dokaz pozitivnog signala fluorescencije u prisutnosti ROS-ova (tretman s vodikovim peroksidom).



Slika 5.15. Analiza promjene mitohondrijskog membranskog potencijala (Δψm) bojanjem fluorescentnom bojom $DiOC_6$ nakon izloženosti različitim vrstama nanoAg-a kroz 1 h (bijeli stupci) i 3 h (sivi stupci) inkubacije. Rezultati ukupne analize dobiveni iz 6 neovisnih pokusa (n=6) prikazani su kao medijani i interkvartilni raspon relativnog intenziteta fluorescencije (MFI). Rezultati statističke analize Mann-Whitneyevim U-testom označeni točkom (•) statistički se značajno razlikuju od kontrole (QC) ($p<0,05$).

Evaluacijom promjena mitohondrijskog membranskog potencijala (Δψm), rezultati su pokazali značajno smanjenje fluorescencije DiOC6 kod tretiranih stanica u odnosu na netretirane (kontrolne) stanice za sve vrste nanoAg-a u oba inkubacijska razdoblja (Slika 5.15).

Primjeri histogramske analize podataka za fluorescenciju prikupljenih na protočnom citometru u analizi produkcije ROS-ova prikazani su na Slikama 5.12 i 5.13, a primjer analize deplecije mitohondrijskog membranskog potencijala prikazan je na Slici 5.16.



Slika 5.16. Primjer histogramske analize deplecije mitohondrijskog membranskog potencijala (Δψ) (sofverski program CellQuest). Stanice su bojane fluorescentnom bojom $DiOC_6$ nakon tretiranja s: PVP-nanoAg (a), BSA-nanoAg (b), AOT-nanoAg (c) i PLL-nanoAg (d). Na svim histogramima vidljiv je pad fluorescencije (FL1-H) tretiranih hPBMC (rozo) u odnosu na negativnu, obojenu kontrolu (zeleno).

5.3. Genotoksični učinci nanoAg-a na limfocite

Evaluacija genotoksičnosti nanoAg-a na limfocitima rađena je alkalnim komet testom. Svaka vrsta nanoAg-a testirana je u dvije koncentracije – 0,2 i 1 mg Ag/L. Rezultati su pokazali značajan porast dužine repa (TL) i intenziteta (TI) svih nanoAg-a ovisno o koncentraciji (Tablica 5.3). Niža koncentracija PVP- i BSA-nanoAg-a (0,2 mg Ag/L) nije inducirala značajan porast TL. Značajne promjene nije bilo ni za TI (% DNK u repu) u stanicama tretiranim s nižom koncentracijom PLL- i PVP-nanoAg-a. Aritmetička sredina i medijani dužine repa kometa imali su slične vrijednosti kod svih vrsta nanoAg-a, dok je maksimalna vrijednost raspona bila znatno veća od aritmetičke sredine uvećane za standardno odstupanje. Najviša vrijednost intenziteta repa zabilježena je za stanice tretirane višom koncentracijom BSA-nanoAg-a, kod kojeg je zabilježen i najveći raspon između minimalne i maksimalne vrijednosti (Tablica 5.3).

Tablica 5.3. Rezultati analize genotoksičnosti u limfocitima. Stanice su tretirane različitim vrstama nanoAg-a u dvije koncentracije. Rezultati su dobiveni na analizi ukupno 100 kometa u 6 neovisnih pokusa (n=6, ukupno 600 kometa). Statistička analiza rađena je ANOVA testom s post-hoc Scheffè modifikacijom. Statistički značajne razlike u vrijednostima dužine (TL) i intenziteta (TI) repa kometa između tretiranih i kontrolnog uzorka označene su zvjezdicom (*), uz razinu značajnosti $p<0,05$.

NanoAg	Konc. (mg/L)	TL (μm)			TI (% DNK u repu)		
		$\bar{x}$ ± SD	Medijan	Raspon (min.-max.)	$\bar{x}$ ± SD	Medijan	Raspon (min.-max.)
Kontrola	0	16.80 ± 4.27	16.25	8.75–31.25	0.30 ± 0.61	0.07	0.00–8.51
AOT-nanoAg	0.2	19.07 ± 5.00 *	17.29	10.83–36.67	0.49 ± 0.55 *	0.31	0.00–3.03
	1	18.45 ± 4.19 *	17.50	11.67–40.83	0.70 ± 0.94 *	0.38	0.00–5.84
BSA-nanoAg	0.2	17.55 ± 4.01	16.67	10.83–34.17	0.51 ± 0.58 *	0.30	0.00–2.97
	1	19.19 ± 4.74 *	17.92	10.42–34.58	0.88 ± 0.91 *	0.61	0.00–6.33
PLL-nanoAg	0.2	18.20 ± 3.90 *	16.67	12.08–30.83	0.31 ± 0.33	0.20	0.00–1.91
	1	18.70 ± 4.54 *	17.50	12.08–34.58	0.61 ± 0.73 *	0.39	0.00–4.50
PVP-nanoAg	0.2	17.06 ± 3.66	16.25	10.00–30.00	0.26 ± 0.35	0.09	0.00–2.39
	1	18.40 ± 4.50 *	17.08	12.08–31.17	0.49 ± 0.58 *	0.27	0.00–3.32

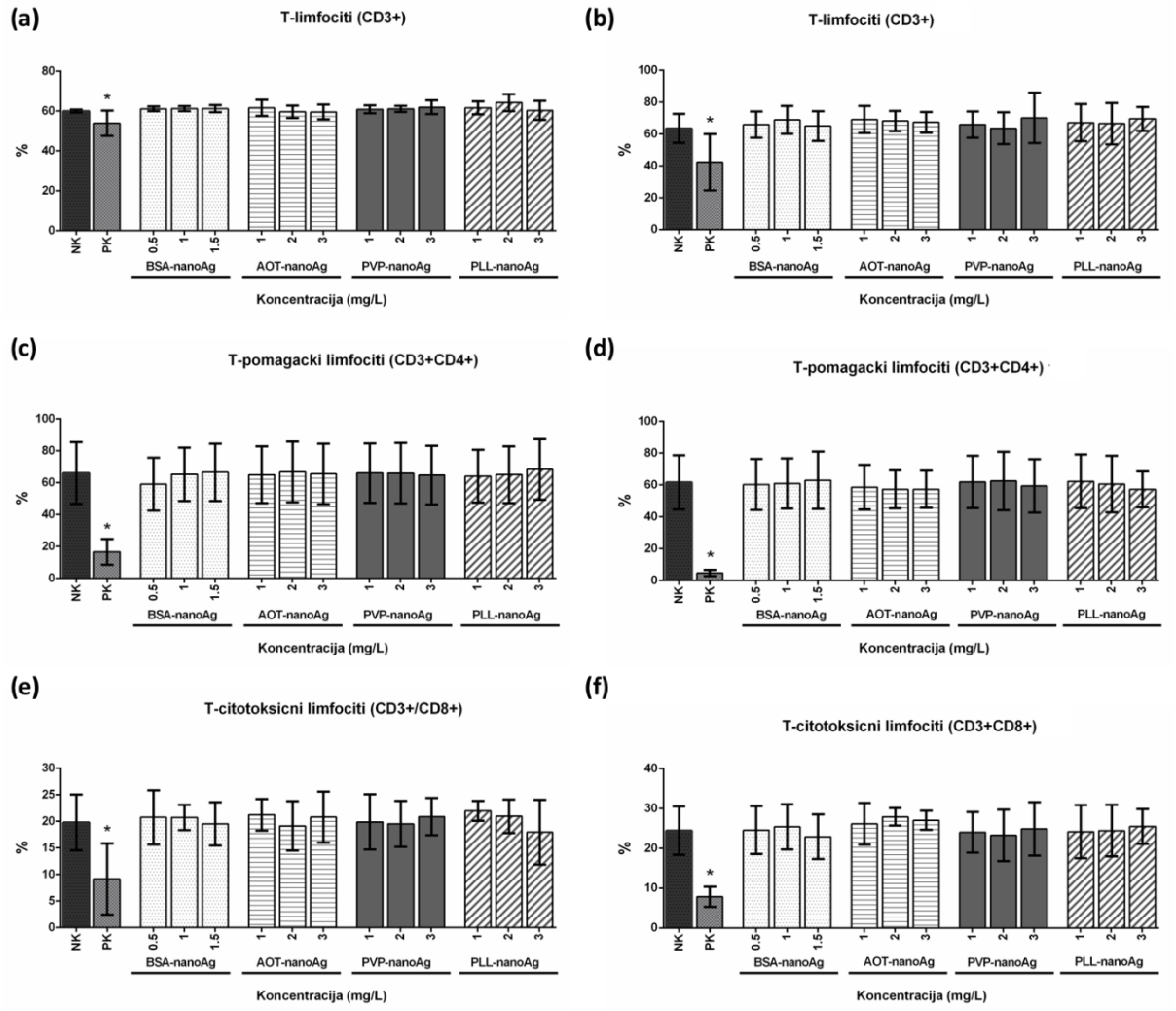
5.4. Imunomodulatorno djelovanje nanoAg-a

Imunomodulatorni učinak na hPBMC stanice analiziran je za sve četiri vrste nanoAg-a (BSA-, AOT-, PVP- i PLL-nanoAg), za same omotače (AOT, PVP i PLL) te za ionski oblik srebra primjenom niskih, netoksičnih koncentracija u dva različita stimulacijska vremena za limfocite (rana – 6 h i srednje kasna aktivacija – 24 h), te jednom vremenu za monocite (srednje kasna aktivacija – 24 h). Način odabira koncentracija detaljno je naveden u poglavlju 4.3.3. Analizirani su učinci nanoAg-a na površinske molekule i aktivaciju T-limfocita, pomagačkih i citotoksičnih T-limfocita, B-limfocita i NK-stanica, te monocita. Slike 5.17 i 5.18 prikazuju udio pojedinih populacija limfocita u populaciji ukupnih hPBMC stanica prije i poslije tretmana različitim vrstama nanoAg-a. Niti jedna vrsta nanoAg-a nije statistički značajnije utjecala na ukupni udio pojedinih vrsta mononuklearnih stanica. Duža stimulacija T-limfocita i NK-stanica s PMA/ionomicinom utjecala je na statistički značajno smanjenje njihovih ukupnih udjela (Slike 5.17 i 5.18).

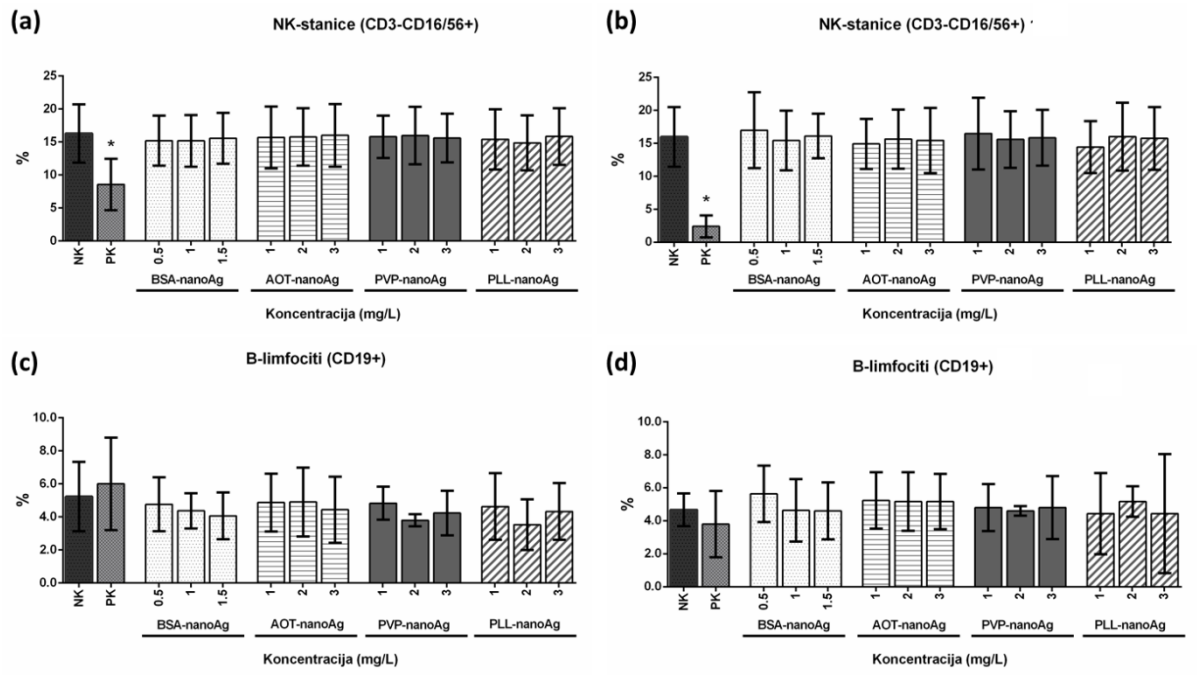
Analiza aktivacije različitih populacija limfocita provedena je primjenom CD69 biljega, a rezultati su prikazani na Slikama 5.19 i 5.20. Dobiveni rezultati pokazali su da ni jedna vrsta nanoAg-a pri primjenjenim (niskim) koncentracijama nije izazvala aktivaciju ukupnih T-limfocita (CD3+/CD69+), pomagačkih T-limfocita (CD3+/CD4+/CD69+) i citotoksičnih T-limfocita (CD3+/CD8+/CD69+) nakon 6 i 24 h (Slika 5.19). Međutim, u populacijama aktiviranih NK-stanica (CD3-/CD16/56+/CD69+) i B-limfocita (CD19+/CD69+), pojedine vrste nanoAg-a su izazvale ranu (nakon 6 h) ili srednje kasnu aktivaciju (nakon 24 h). Statistički značajna aktivacija kod NK-stanica primjećena je samo nakon tretmana tijekom 24 h s BSA-nanoAg-om kod 1,5 mg Ag/L, dok je statistički značajna aktivacija B limfocita primjećena i kod tretmana s BSA-nanoAg-om i s PLL-nanoAg-om. Ostale vrste nanoAg-a izazvale su koncentracijski ovisan porast udjela aktiviranih stanica, ali razlike u odnosu na kontrolne, netretirane stanice nisu bile statistički značajne (Slika 5.20).

Zanimljive rezultate pokazala je analiza MFI vrijednosti za ukupne pomagačke (CD3+/CD4+) i citotoksične (CD3+/CD8+) T-limfocite. Na Slici 5.21 vidi se da su se MFI vrijednosti kod tretmana s najvećom koncentracijom PLL-nanoAg-a tijekom 6 h značajno spustile za pomagačke i citotoksične T-limfocite, što upućuje na smanjenje izražaja CD4 i CD8 površinskih biljega.

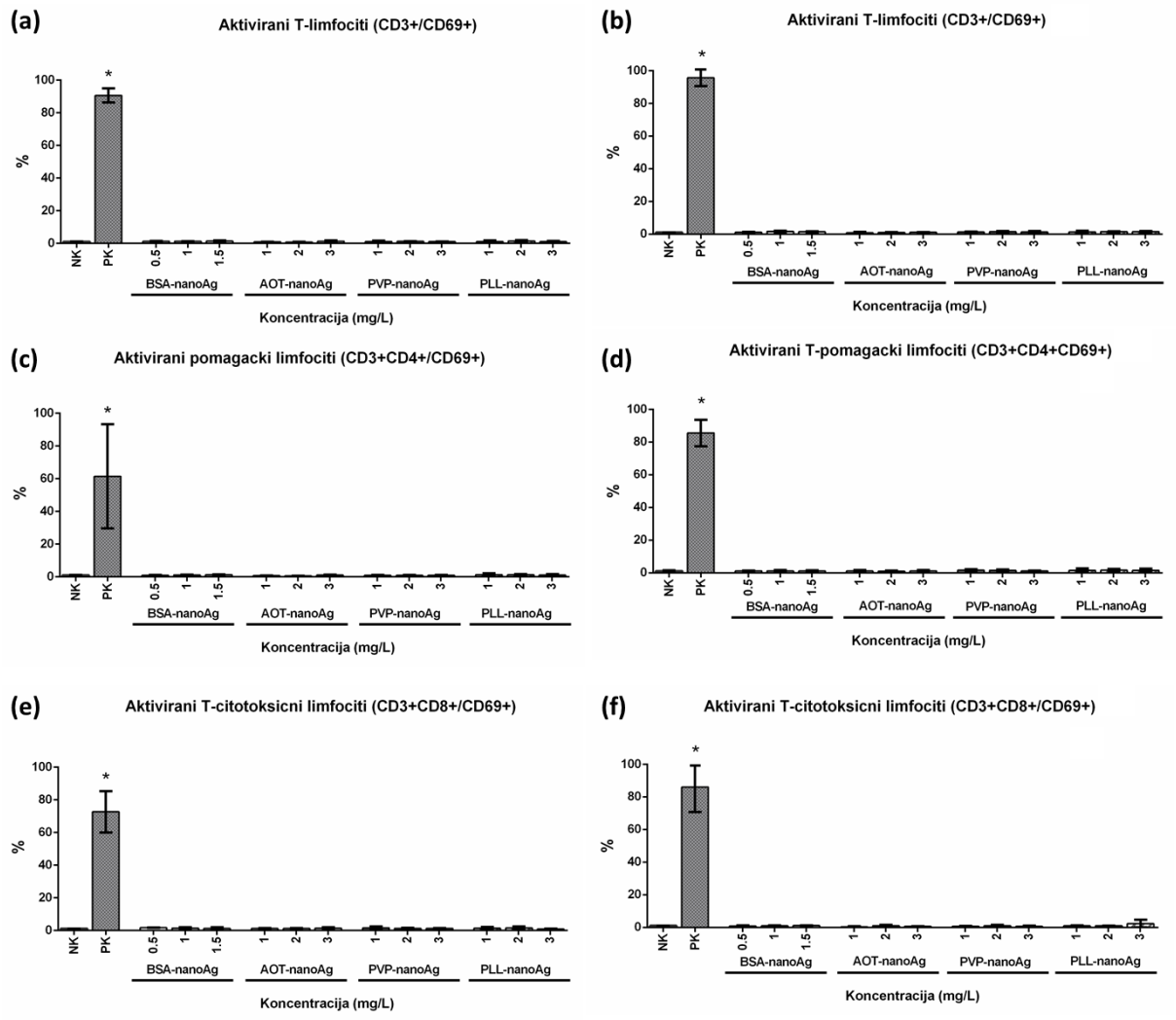
U slučaju monocita, nanoAg tretman nije prouzrokovao značajne razlike niti u udjelu ukupnih niti u udjelu aktiviranih monocita u ukupnoj populaciji hPBMC stanica (Slika 5.22).



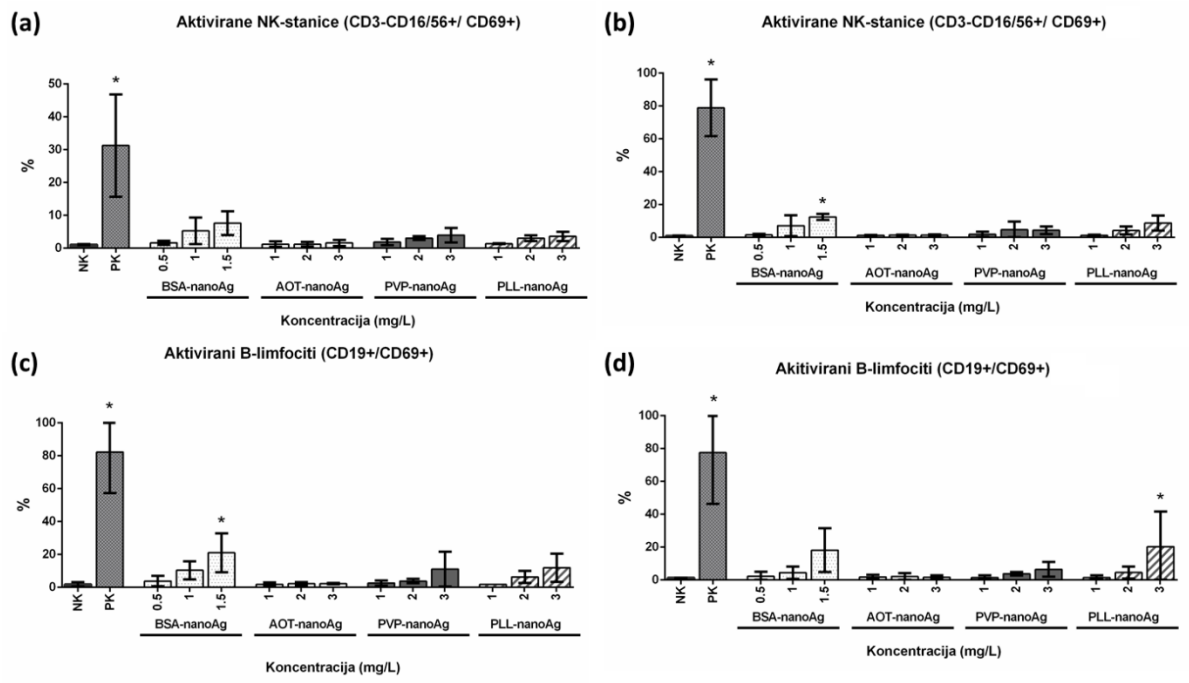
Slika 5.17. Analiza učinka nanoAg-a na zastupljenost T-limfocita i njihovih subpopulacija. Analizom je obuhvaćen učinak različitih vrsta nanoAg-a u tri koncentracije na udio (%): ukupnih T-limfocita nakon 6 h (a) i nakon 24 h (b) stimulacije, pomagačkih T-limfocita nakon 6 h (c) i nakon 24 h (d) stimulacije, citotoksičnih T-limfocita nakon 6 h (e) i nakon 24 h (f) stimulacije. Rezultati ukupne analize proizašli iz 3 neovisna pokusa (n=3) opisani su kao medijani i interkvartilni raspon. Rezultati statističke analize Kruskal-Wallisovim testom (uz post hoc Dunnov test) označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od negativne kontrole (NK) ($p<0,05$). Pozitivna kontrola (PK) prikazana je kao dokaz pozitivnog odgovora hPBMC stanica na stimulans (PMA/ionomicin).



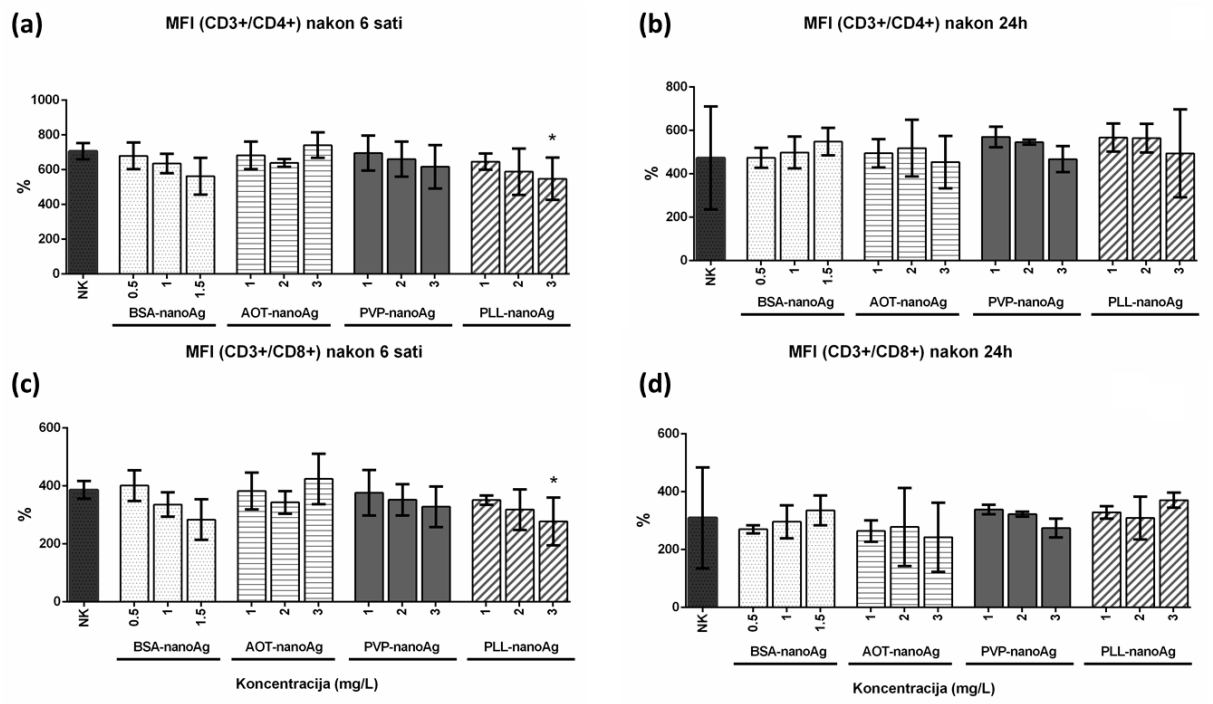
Slika 5.18. Analiza učinka nanoAg-a na zastupljenost B-limfocita i NK-stanica. Analizom je obuhvaćen učinak različitih vrsta nanoAg-a u tri koncentracije na udio (%): NK-stanica nakon 6 h (a) i nakon 24 h (b) stimulacije, te B-limfocita nakon 6 h (c) i nakon 24 h (d) stimulacije. Rezultati ukupne analize proizašli iz 3 neovisna pokusa (n=3) opisani su kao medijani i interkvartilni raspon. Rezultati statističke analize Kruskal-Wallisovim testom (uz post hoc Dunnov test) označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od negativne kontrole (NK) ($p<0,05$). Pozitivna kontrola (PK) prikazana je kao dokaz pozitivnog odgovora hPBMC stanica na stimulans (PMA/ionomicin).



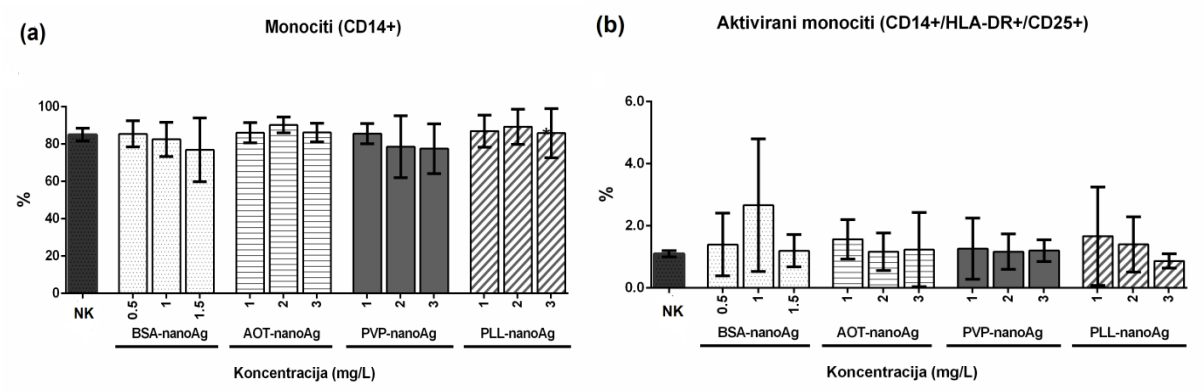
Slika 5.19. Analiza učinka nanoAg-a na aktivaciju T-limfocita i T-limfocitnih subpopulacija. Analizom je obuhvaćen učinak različitih nanoAg-a u tri koncentracije na udio (%) aktiviranih: T-limfocita nakon 6 h (a) i nakon 24 h (b) stimulacije, pomagačkih T-limfocita nakon 6 h (c) i nakon 24 h (d) stimulacije, citotoksičnih T-limfocita nakon 6 h (e) i nakon 24 h (f) stimulacije. Rezultati ukupne analize proizašli iz 3 neovisna pokusa (n=3) opisani su kao medijani i interkvartilni raspon. Rezultati statističke analize Kruskal-Wallisovim testom (uz post hoc Dunnov test) označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od negativne kontrole (NK) ($p<0,05$). Pozitivna kontrola (PK) prikazana je kao dokaz pozitivnog odgovora hPBMC stanica na stimulans (PMA/ionomicin).



Slika 5.20. Analiza učinka nanoAg-a na aktivaciju B-limfocita i NK-stanica. Analizom je obuhvaćen učinak različitih vrsta nanoAg-a u tri koncentracije na udio (%) aktiviranih: NK-stanica nakon 6 h (a) i nakon 24 h (b) stimulacije, te B-limfocita nakon 6 h (c) i 24 h (d) stimulacije. Rezultati ukupne analize proizašli iz 3 neovisna pokusa (n=3) opisani su kao medijani i interkvartilni raspon. Rezultati statističke analize Kruskal-Wallisovim testom (uz post hoc Dunnov test) označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od negativne kontrole (NK) ($p<0,05$). Pozitivna kontrola (PK) prikazana je kao dokaz pozitivnog odgovora hPBMC na stimulans (PMA/ionomicin).

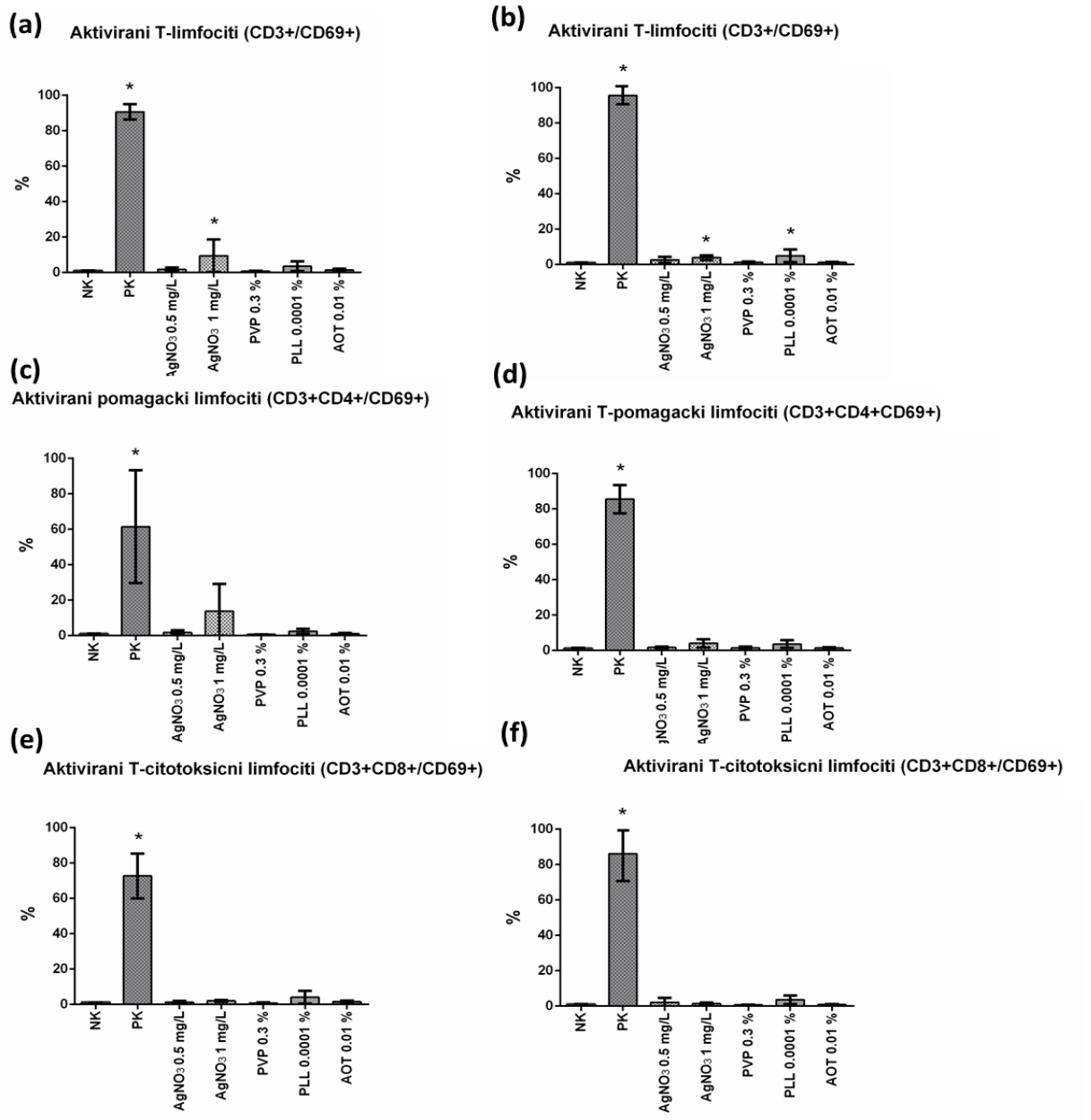


Slika 5.21. Analiza učinka nanoAg-a na izražaj (intenzitet fluorescencije) površinskih molekula T-limfocitnih subpopulacija. Analizom je obuhvaćen učinak različitih vrsta nanoAg-a u tri koncentracije na MFI (CD3+/CD4+) kod pomagačkih T-limfocita nakon 6 h (a) i 24 h (b) stimulacije, te na MFI (CD3+/CD8+) kod citotoksičnih T-limfocita nakon 6 h (c) i 24 h (d) stimulacije. Rezultati ukupne analize proizašli iz 3 neovisna pokusa (n=3) opisani su kao aritmetička sredina i standardno odstupanje od negativne kontrole (NK). Rezultati statističke analize Studentovim t-testom označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od kontrole ($p<0,05$).

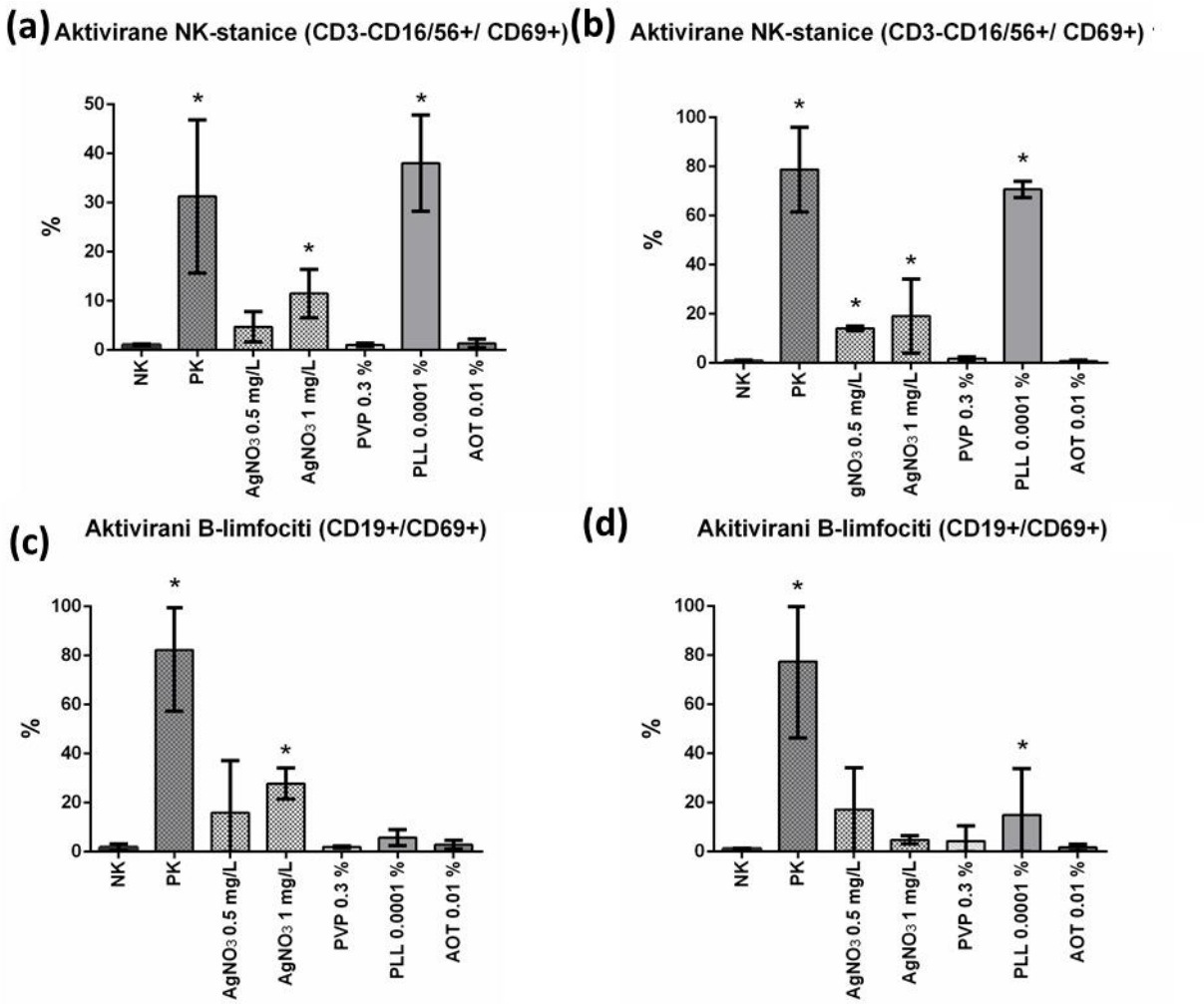


Slika 5.22. Analiza učinka nanoAg-a na aktivaciju monocita. Analizom je obuhvaćen učinak različitih vrsta nanoAg-a u tri koncentracije (mg Ag/L) na udio (%) svih monocita (a) i aktiviranih monocita (b) nakon 24 h stimulacije. Rezultati ukupne analize proizašli iz 3 neovisna pokusa (n=3) opisani su kao medijani i interkvartilni raspon. Rezultati statističke analize Kruskal-Wallisovim testom (uz post hoc Dunnov test) označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od negativne kontrole (NK) ($p<0,05$).

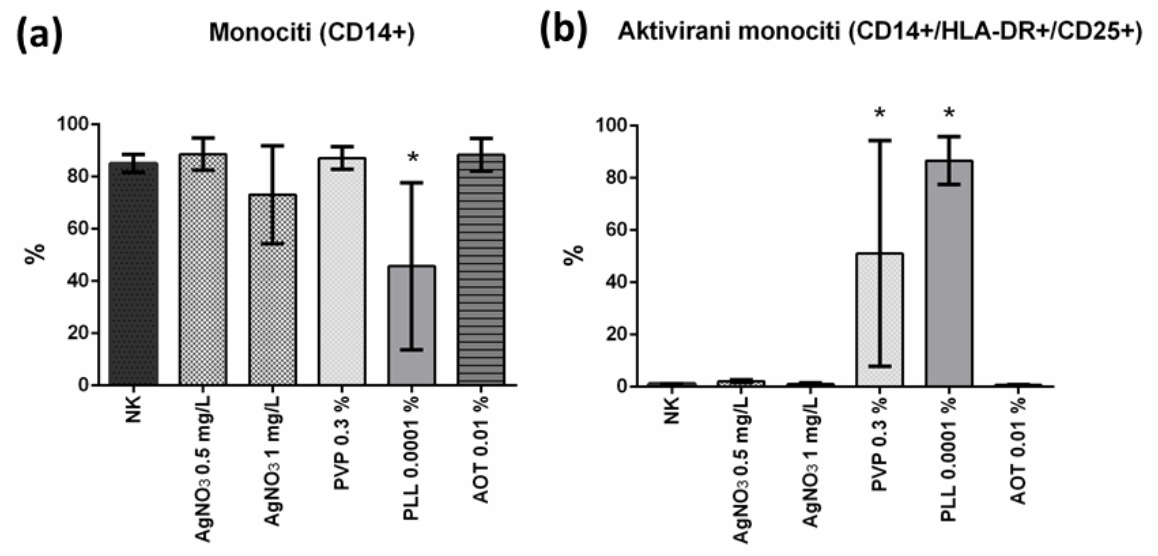
Kako bi se utvrdilo kakav je učinak ionskog srebra i stabilizacijskih omotača na aktivaciju hPBMC stanica, provedeni su dodatni, kontrolni pokusi koji su dali rezultate prikazane na Slikama 5.23-5.25. U slučaju ionskog oblika srebra, aktivacija je zabilježena kod tretmana s koncentracijom Ag^+ od 1 mg Ag/L za ukupne T-limfocite nakon 6 h i nakon 24 h (Slike 5.23a i 5.23b), za NK-stanice nakon 6 h i nakon 24 h (Slike 5.24a i 5.24b) i za B-limfocite nakon 6 h (Slika 5.24c). Od omotača, jedino su PVP i PLL izazvali značajne razlike u aktivaciji hPBMC u odnosu na netretirane stanice. PLL je tako izazvao aktivaciju NK-stanica (Slike 5.24a i 5.24b), B limfocita (Slika 5.24d) i monocita (Slika 5.25b), dok je tretman s PVP-om doveo samo do aktivacije monocita (Slika 5.25b). Kod tumačenja ovih rezultata potrebno je naglasiti da su statistički značajne razlike u slučaju omotača i ionskog srebra primijećene samo kod sljedećih koncentracija: 0.3% (m/v) PVP, 0.001% (m/v) PLL, 0.01% (m/v) AOT i 1 mg Ag/L $AgNO_3$, dok kod nižih koncentracija za pojedinu vrstu tretmana nije primijećen nikakav učinak na hPBMC stanice.



Slika 5.23. Analiza učinka samih stabilizacijskih omotača i ionskog srebra na aktivaciju T-limfocita i njihovih subpopulacija. Analizom je obuhvaćen učinak različitih omotača i Ag^+ na udio (%) aktiviranih: T-limfocita nakon 6 h (a) i nakon 24 h (b) stimulacije, pomagačkih T-limfocita nakon 6 h (c) i nakon 24 h (d) stimulacije, citotoksičnih T-limfocita nakon 6 h (e) i nakon 24 h (f) stimulacije. Rezultati ukupne analize proizašli iz 3 neovisna pokusa (n=3) opisani su kao medijani i interkvartilni raspon. Rezultati statističke analize Mann-Whitneyevim U-testom označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od negativne kontrole (NK) ($p<0,05$). Pozitivna kontrola (PK) prikazana je kao dokaz pozitivnog odgovora hPBMC na stimulans (PMA/ionomicin).

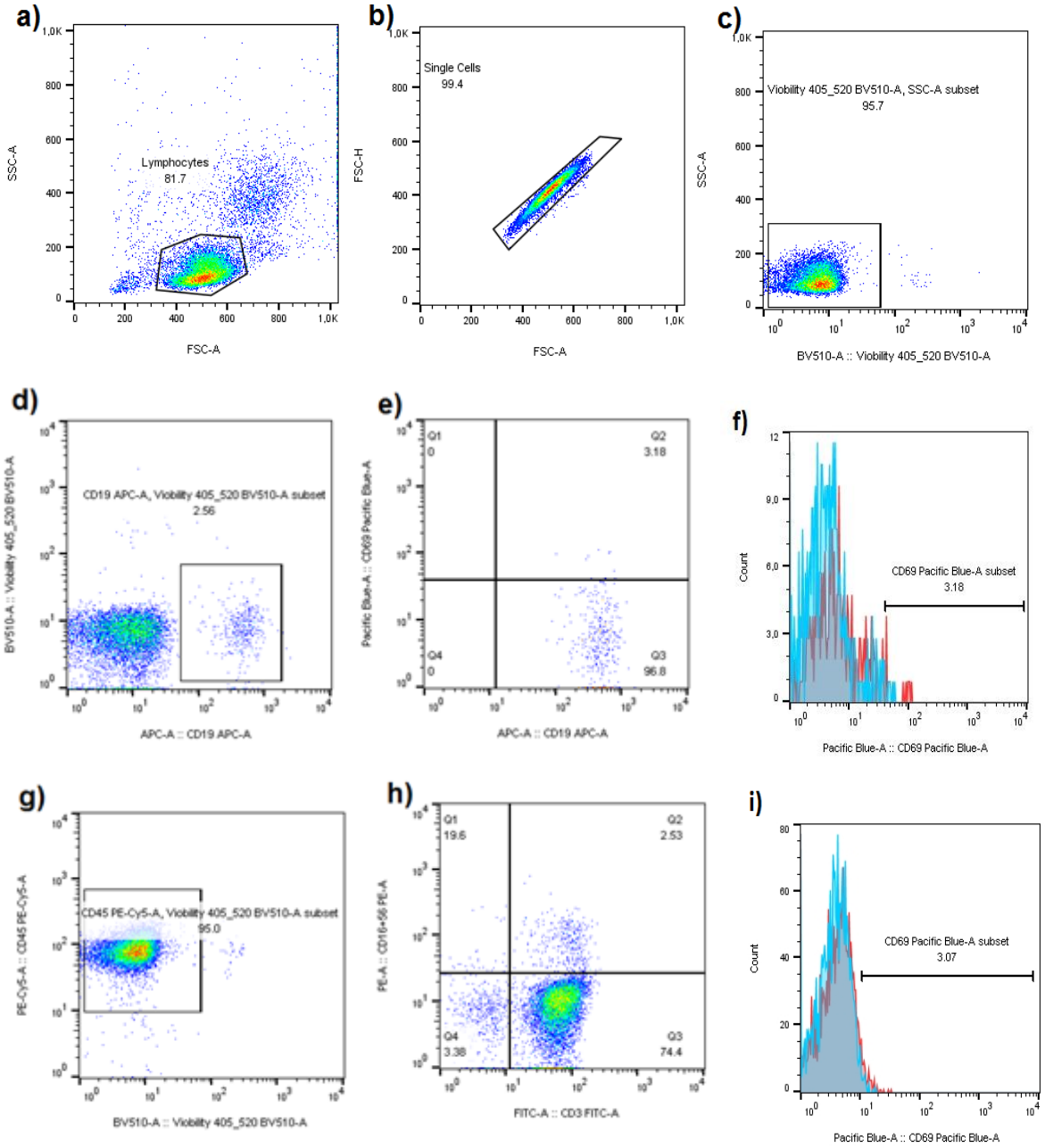


Slika 5.24. Analiza učinka samih stabilizacijskih omotača i ionskog srebra na aktivaciju B-limfocita i NK-stanica. Analizom je obuhvaćen učinak različitih omotača i Ag^+ na udio (%) aktiviranih: NK-stanica nakon 6 h (a) i nakon 24 h (b) stimulacije, te B-limfocita nakon 6 h (c) i nakon 24 h (d) stimulacije. Rezultati ukupne analize proizašli iz 3 neovisna pokusa (n=3) opisani su kao medijani i interkvartilni raspon. Rezultati statističke analize Mann-Whitneyevim U-testom označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od negativne kontrole (NK) ($p<0,05$). Pozitivna kontrola (PK) prikazana je kao dokaz pozitivnog odgovora hPBMC na stimulans (PMA/ionomicin).

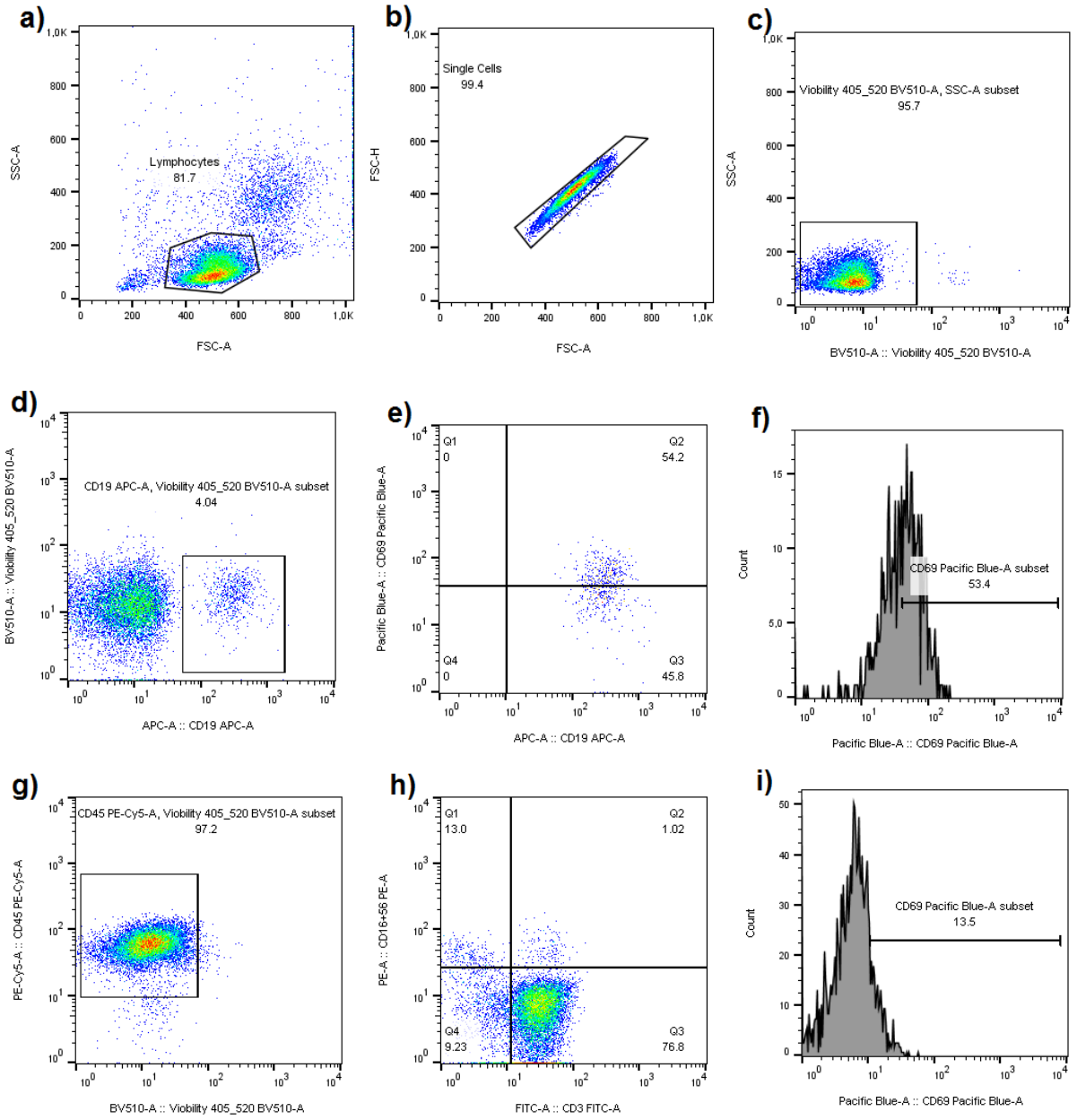


Slika 5.25. Analiza učinka stabilizacijskih omotača i ionskog srebra na aktivaciju monocita. Analizom je obuhvaćen učinak triju različitih omotača i dvije koncentracije Ag^+ na udio (%) svih monocita (a) i aktiviranih monocita (b) nakon 24 h stimulacije. Rezultati ukupne analize proizašli iz 3 neovisna pokusa (n=3) opisani su kao medijani i interkvartilni raspon. Rezultati statističke analize Mann-Whitneyevim U-testom označeni zvjezdicom (*) statistički se značajno razlikuju od negativne kontrole (NK) ($p<0,05$).

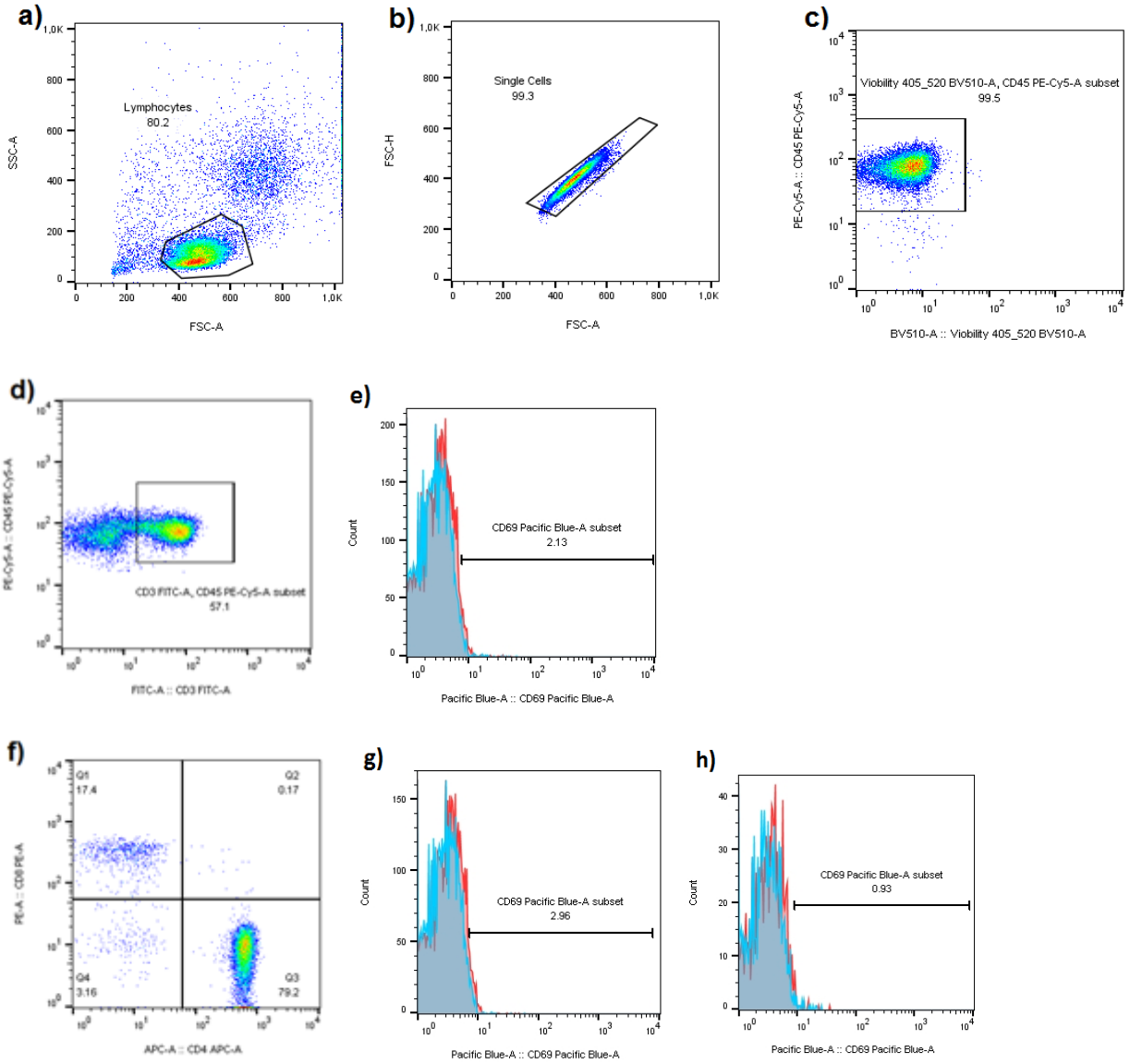
Primjeri strategije ograđivanja i analize aktivacije različitih populacija i subpopulacija hPBMC stanica nakon inkubacije s nanoAg-om i nakon stimulacije s PMA/ionomicinom obrađeni u programskom paketu FloJo, te su prikazani na Slikama 5.26.-5.30. Usporedna analiza tretiranih stanica i stanica pozitivne kontrole potrebna je zbog dokaza pozitivnog odgovora stanica na stimulans, kao i zbog preciznijeg postavljanja ograde između aktivirane i neaktivirane populacije stanica.



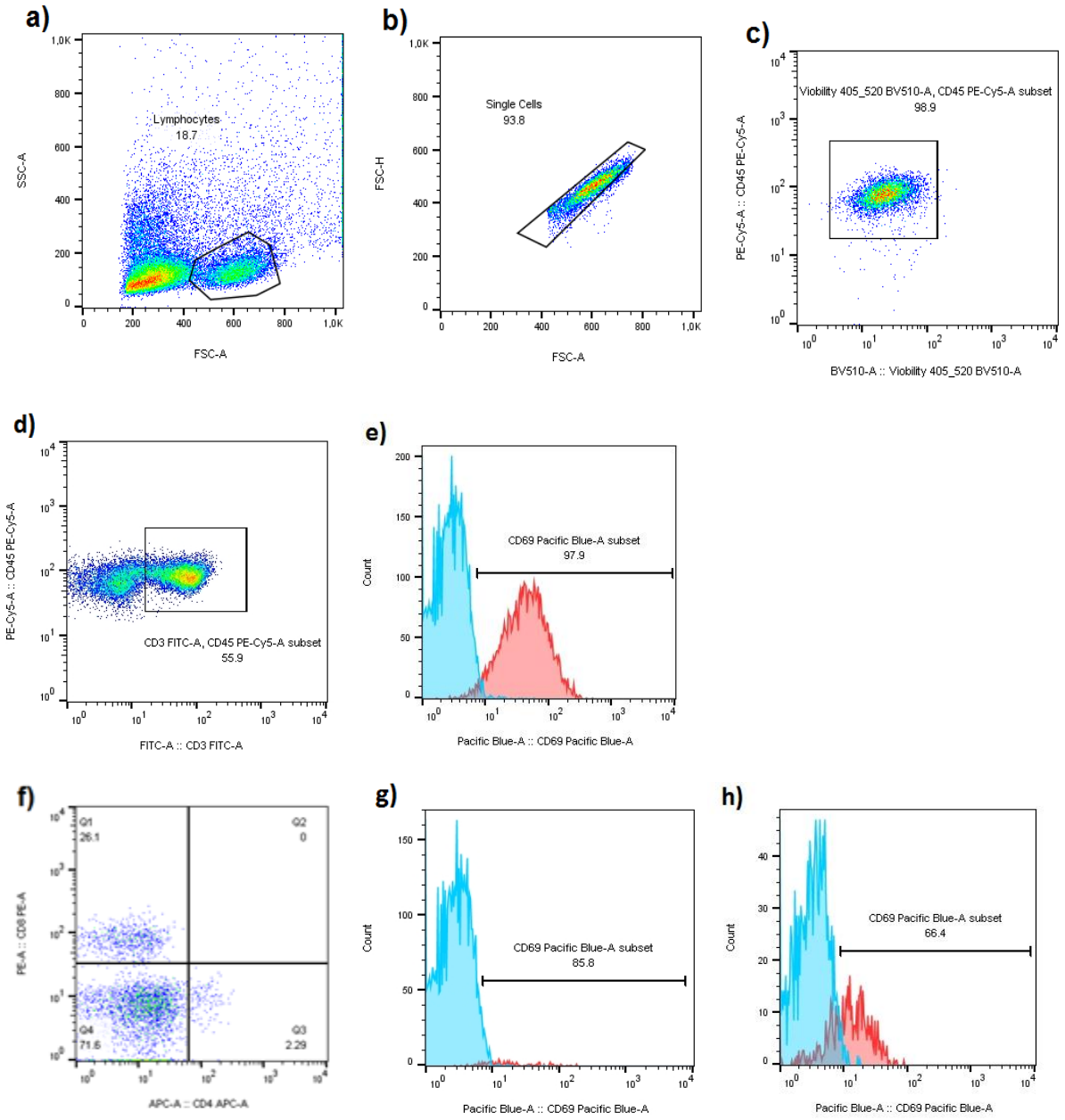
Slika 5.26. Primjer strategije ograđivanja i analize aktivacije B-limfocita i NK-stanica. Stanice u primjeru su inkubirane 6 h s PLL-nanoAg-om (2 mg Ag/L). Limfociti su prvo ograđeni na citogramu veličine (FSC) i zrnatosti (SSC) (a), zatim su isključene slijepljene stanice (b), a potom su ograđene samo žive stanice (c). Nakon toga su ograđeni samo B-limfociti (CD19+) (d), a potom su na ogradi svih B-limfocita kvadrantom odvojeni aktivirani B-limfociti (dvostruko pozitivni CD19+/CD69+) (e), uz dodatan histogramski prikaz preklapanja (eng. *overlay*) udjela aktiviranih B-limfocita netretiranih (plavo) i tretiranih (crveno) stanica, u odnosu na broj stanica u ogradi (eng. *count*) (f). Nakon toga ograđene su sve žive NK-stanice (CD3-/CD16+56+) (g, h), uz histogramski prikaz preklapanja (eng. overlay) udjela aktiviranih (CD3-/CD16+56+/CD69+) netretiranih (plavo) i tretiranih (crveno) NK-stanica, u odnosu na broj stanica u ogradi (i).



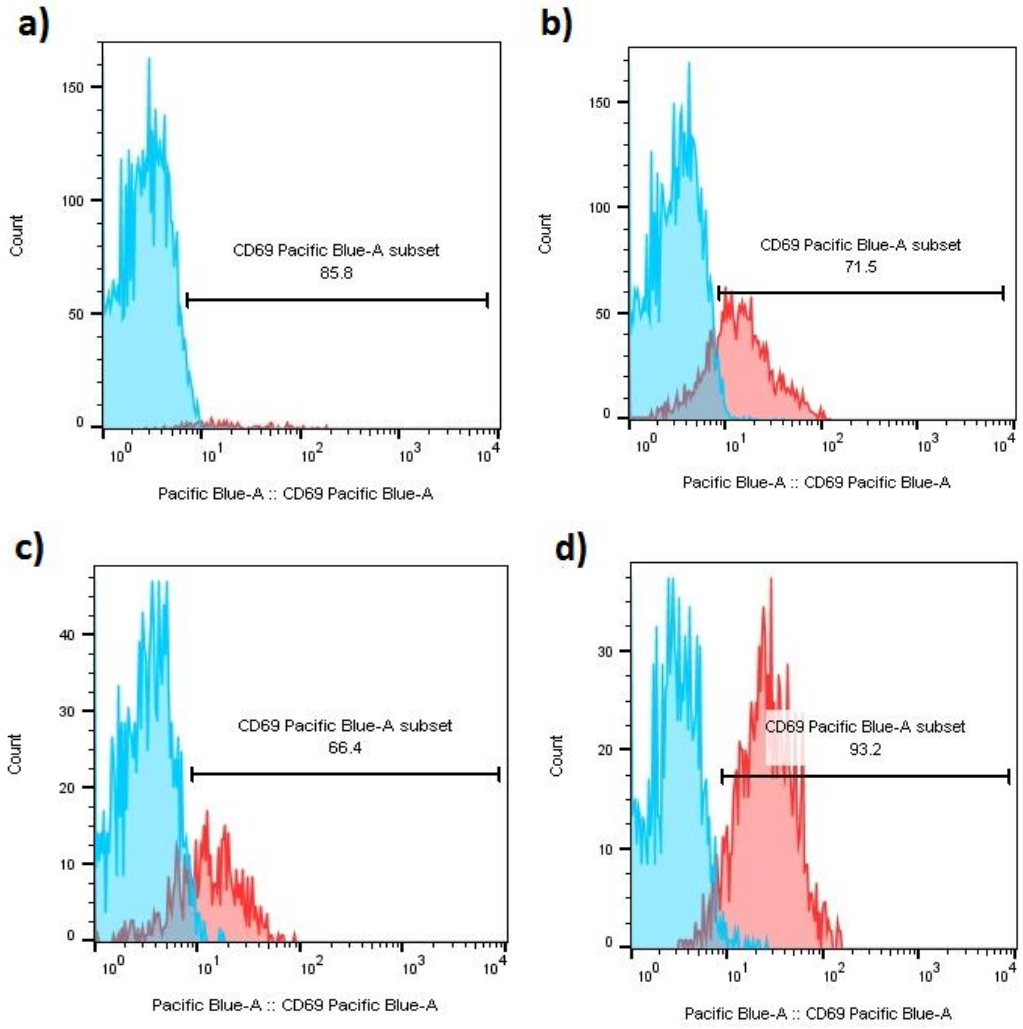
Slika 5.27. Primjer strategije ograđivanja i analize aktivacije populacije B-limfocita I NK-stanica nakon 24-h stimulacije stanica s PMA/ionomicinom (pozitivna kontrola). Prvo su ograđeni limfociti na citogramu veličine (FSC) i zrnatosti (SSC) (a), zatim su isključene slijepljene stanice (b), a ograđene samo žive stanice (c). Nakon toga su ograđeni samo B-limfociti (CD19+) (d), a potom su na ogradi svih B-limfocita kvadrantom odvojeni aktivirani B-limfociti (dvostruko pozitivni CD19+/CD69+) (e), uz dodatan histogramski prikaz udjela aktiviranih B-limfocita u odnosu na netretirane stanice (f). Nakon toga ograđene su sve žive NK-stanice (CD3-/CD16+56+) (g, h), te histogramski određene aktivirane NK-stanice (CD3-/CD16+56+/CD69+) u odnosu na netretirane stanice (i). Položaj histogramskog markera za CD69+pozitivne stanice određen je pomoću negativne kontrole tj. netretiranih stanica (prikazano u primjeru na Slici 5.26. f) i i)).



Slika 5.28. Primjer strategije ograđivanja i analize aktivacije populacije T-limfocita, te subpopulacija pomagačkih i citotoksičnih T-limfocita nakon inkubacije s 24 h s PLL-nanoAg-om (1 mg Ag/L). Limfociti su prvo ograđeni na citogramu veličine (FSC) i zrnatosti (SSC) (a), zatim su isključene slijepljene stanice (b), a potom su ograđene samo žive stanice (c). Nakon toga su ograđeni samo T-limfociti (CD3+) (d), a potom je na histogramskom prikazu preklapanja prikazan udio aktiviranih T-limfocita (CD3+/CD69+) netretiranih (plavo) i tretiranih (crveno) stanica, u odnosu na broj stanica u ogradi (e). Nakon toga su na ogradi svih T-limfocita kvadrantom odvojene subpopulacije pomagačkih (CD4+) i citotoksičnih (CD8+) T-limfocita (f), a potom histogramskim preklapanjem prikazani udjeli aktiviranih (CD69+) pomagačkih (g) i citotoksičnih (h) T-limfocita netretiranih (plavo) u odnosu na tretirane (crveno) stanice.



Slika 5.29. Primjer strategije ograđivanja i analize aktivacije populacije T-limfocita, te subpopulacija pomagačkih i citotoksičnih T-limfocita nakon 24-h stimulacije stanica s PMA/ionomicinom (pozitivna kontrola). Prvo su svi limfociti ograđeni na citogramu veličine (FSC) i zrnatosti (SSC) (a), zatim su isključene slijepljene stanice (b), a potom su ograđene samo žive stanice (c). Nakon toga su ograđeni samo T-limfociti (CD3+) (d), a potom je na histogramskom prikazu preklapanja prikazan udio aktiviranih T-limfocita (CD3+/CD69+) stimuliranih (crveno) u odnosu na nestimulirane (plavo) stanice (e). Nakon toga su na ogradi svih T-limfocita kvadrantom odvojene subpopulacije pomagačkih (CD3+/CD4+) i citotoksičnih (CD3+/CD8+) T-limfocita (f), a potom na ogradi svih T-limfocita histogramskim preklapanjem prikazani udjeli aktiviranih (CD69+) pomagačkih (g) i citotoksičnih (h) T-limfocita (stimulirane (crveno) u odnosu ne nestimulirane (plavo) stanice).



Slika 5.30. Primjer preciznije strategije ograđivanja i analize aktivacije subpopulacija pomagačkih i citotoksičnih T-limfocita nakon 24-h stimulacije s PMA/ionomicinom. Na ogradi svih T-limfocita (CD3+) (a) vidljiv je jako nizak udio pomagačkih T-limfocita stimuliranih (crveno) u odnosu na visoki udio kod nestimuliranih (plavo) stanica, te stoga lažno snižen udio aktiviranih (CD69+) T-pomagačkih stanica, dok je na ogradi svih pomagačkih T-limfocita (CD3+/CD4+) analiza aktiviranih pomagačkih T-limfocita realnija (b). Na ogradi svih T-limfocita (CD3+) (c) vidljiv je nešto niži udio citotoksičnih T-limfocita stimuliranih (crveno) u odnosu na visoki udio kod nestimuliranih (plavo) stanica, te također lažno snižen udio aktiviranih (CD69+) T-citotoksičnih stanica, dok je na ogradi svih citotoksičnih T-limfocita (CD3+/CD8+) analiza aktiviranih citotoksičnih T-limfocita realnija (d).

6. RASPRAVA

Prilikom evaluacije biokompatibilnosti, ključna je detaljna karakterizacija svojstava nanočestica. Ta svojstva uključuju oblik, veličinu, naboj i stabilnost nanočestica u mediju u kojem se provode testiranja (32). Biološki mediji su posebno kompleksni jer sadrže mnoštvo različitih biomolekula koje na površini nanočestica već unutar nekoliko minuta stvaraju tzv. biomolekulsku koronu. Stvaranje takve korone na nanopovršini povećava koloidnu stabilnost nanočestica, ali i određuje njihovo ponašanje i sudbinu u biološkom mediju, neovisno o temeljnim fizikalno-kemijskim svojstvima prvotno dizajniranih nanočestica (34). Na početku ove studije rađena je detaljna karakterizacija svojstava nanočestica srebra (nanoAg) prema preporučenim metodama i ranije objavljenim protokolima (9, 32, 53). Također, formiranje proteinske korone i koloidna stabilnost svih korištenih vrsta nanoAg-a u različitim testnim medijima već je prethodno evaluirana u prijašnjim istraživanjima grupe istraživača pod vodstvom dr.sc. Ivane Vinković Vrček na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI) u Zagrebu (9, 53). U ovom istraživanju dodatno je testirano formiranje proteinske korone u mediju koji je sadržavao ispitivane humane mononuklearne stanice periferne krvi (PBS+hPBMC). Rezultati su pokazali da se većina proteina veže na površinu svih vrsta nanoAg-a. Prema istraživanju Tenzera i suradnika, ukupna količina vezanih proteina ne mijenja se s vremenom (72). Stabilnost nanoAg-a s obzirom na topljivost u mediju sljedeće je važno pitanje na koje treba dati odgovor u istraživanju njihove biokompatibilnosti. Dobiveni rezultati pokazali su da je otapanje nanoAg-a i otpuštanje slobodnih iona srebra u oba medija (PBS i PBS+hPBMC) vrlo nisko. Takvi rezultati se mogu objasniti vezanjem Ag^+ sa slobodnim anionima u PBS mediju, te stvaranjem Ag^+-kompleksa koji mogu ili sedimentirati ili se vezati na površinu aglomerata nanoAg-a čije je prisustvo opaženo u PBS mediju (7, 73). No, kako je i očekivano, prisutnost proteina u mediju PBS+hPBMC i formiranje proteinske korone na površini nanoAg-a značajno sprječava otpuštanje Ag^+, što je u skladu s ranije objavljenim znanstvenim podacima (61, 62, 74). Neovisno o afinitetu za vezanje proteina, Zhang i suradnici navode PVP-nanoAg kao najstabilnije, a citratne nanoAg kao najmanje stabilne nanočestice srebra u mediju bogatom kloridima, kakav je i PBS medij (33).

Mikroskopsko ispitivanje interakcije različitih vrsta nanoAg-a s hPBMC stanicama pokazalo je da nanoAg uzrokuje morfološke promjene na samim stanicama i unutar

njih, a konfokalnom mikroskopijom je utvrđeno da sve vrste nanoAg-a lako ulaze u stanice, pa čak i u jezgre hPBMC stanica. Promjene na membrani u vidu endocitotskih vezikula i/ili apoptotičkih tjelešaca, te multilobulirane jezgre s grubim kromatinom znakovi su očiglednog mehaničkog stresa stanice i posljedične apoptoze. Slične morfološke promjene na mononuklearnim stanicama tretiranim s nanoAg-om opisali su Joksić i suradnici (28), te Zhornik i suradnici (75).

Bojanje stanica fluorescentnim bojama Annexin V-FITC i PI za analizu citotoksičnosti protočnom citometrijom jasno je ukazalo na sposobnost svih vrsta testiranih nanočestica da induciraju apoptozu ili nekrozu hPBMC. Statistički značajni rezultati potvrđuju da kod sve četiri vrste nanoAg-a porastom koncentracije i vremena izloženosti raste i udio stanica u apoptozi, što se i smatra primarnim mehanizmom stanične smrti uslijed izloženosti nanoAg-u (12-15, 30, 41, 42, 50, 51, 59). Pri nižim koncentracijama, stanice nakon 1 h ulaze u ranu apoptozu, a nakon 3 h uglavnom u kasnu apoptozu; pri višim koncentracijama gotovo da ni nema stanica u ranoj apoptozi. Smrt stanica primarnom nekrozom uglavnom je inducirana pri višim koncentracijama nanoAg-a i dužem vremenskom razdoblju izlaganja. Uz očekivan koncentracijski i vremenski uvjetovan, toksični potencijal znatno je ovisio i o vrsti omotača na površini nanoAg-a. Zanimljivo je istaknuti da jedino pozitivno nabijeni PLL-nanoAg gotovo isključivo inducira apoptozu, a ne nekrozu. Iz analize stanične smrti može se zaključiti da početna toksična koncentracija nanoAg-a iznosi 1 mg Ag/L nakon jednosatne inkubacije i da su negativno nabijene (AOT) i neutralne (PVP) nanočestice srebra najsigurnije s obzirom na citotoksične učinke. Ovi rezultati nadopunjuju rezultate nekoliko prijašnjih istraživanja. Tako su Skladanowski i suradnici objavili da je za eukariotske stanice sigurna koncentracija nanoAg-a u rasponu od 1 do 5 mg Ag/L (23). Zhang i autori su odredili koncentraciju < 5 mg/L kao netoksičnu dozu za BSA-nanoAg (33). Foldbjerg i suradnici istraživali su indukciju oksidativnog stresa, te posljedičnu apoptozu i nekrozu THP-1 stanica uzrokovanu tretmanom s PVP-nanoAg-om, te su koncentraciju >25 mg Ag/L proglasili citotoksičnom (59). Barkhordari i suradnici su istraživali citotoksičnost nanoAg-a na mononuklearne stanice periferne krvi u ovisnosti o vremenu i koncentraciji, te su koncentraciju 1 mg Ag/L i 6 sati inkubacije naveli kao minimalno toksične, ali nisu opisali fizikalno-kemijska svojstva ispitivanih nanoAg-a (58). U istraživanju citotoksičnog učinka nanoAg-a sa škrobnim omotačem na fibroblaste, AshaRani i suradnici navode koncentraciju od 25 mg Ag/L pri kojoj se pojačano

proizvode ROS-ovi. Analizu su provodili u dvije vremenske točke (2 i 5 h), ali nisu uočili vremensku ovisnost (50). Shin i suradnici odredili su da koloidna otopina nanoAg-a koncentracije 15 mg Ag/L tek nakon 72 h ima proliferacijski učinak na hPBMC stanice uzgojene u kulturi (54). Li i suradnici uočili su vremenski i koncentracijski uvjetovanu citotoksičnost citratnih nanoAg-a na PBMC stanicama izoliranim iz krvi kitova, a koncentracije od 0,1 i 1 mg Ag/L nazivaju sub-letalnima, odnosno navode da se pri tim koncentracijama funkcijski mijenjaju polimorfonuklearne stanice (fagocitoza i respiratorni prasak) i mononuklearne stanice (proliferacija) (42). Ahlberg i suradnici također su istraživali citotoksičnost nanoAg-a na kulturi hPBMC stanica, te su za PVP-nanoAg odredili koncentracijski raspon 15-20 mg Ag/L kao subtoksični (18). Zanimljivo je istaknuti kako su nanočestice goveđeg albumina (BAN, od eng. bovine albumin nanoparticles) u prijašnjim istraživanjima dokazano hemokompatibilne (64), dok je ovo istraživanje pokazalo da srebrne nanočestice stabilizirane s proteinskom molekulom BSA imaju ponajveći citotoksični, genotoksični pa čak i imunomodulatorni učinak, i to u vrlo niskoj koncentraciji. S obzirom na to da su rezultati evaluacije koloidne stabilnosti upravo za BSA-nanoAg pokazali najveću stabilnost u ispitivanom mediju, možemo zaključiti da učinci ove vrste nanoAg-a ne potječu od njihove agregacije ili otpuštanja srebrnih iona, nego od samih nanočestica stabiliziranih proteinskim omotačem.

Rezultati dobiveni tijekom provođenja ovog doktorskog istraživanja na svježim, primarnim stanicama pokazuju citotoksični potencijal nanoAg-a pri nižim koncentracijama i kraćim vremenskim razdobljima nego što je to slučaj kod stanica uzgajanih u kulturi. Ovaj rezultat ide u prilog preporukama važećih smjernica koje za određivanje hemokompatibilnosti medicinskih proizvoda daju prednost upravo primarnim stanicama (27, 55).

Svaki unutarstanični događaj induciran s nanoAg-om ne bi bio moguć bez internalizacije nanoAg-a u hPBMC stanice. Kvantitativnim određivanjem ulaska nanoAg-a u stanice, kombiniranim metodološkim pristupom pomoću konfokalne mikroskopije i protočne citometrije (27, 43-47), uočeno je povećanje internalizacije svih vrsta nanoAg-a u hPBMC stanice ovisno o primjenjenoj koncentraciji nanoAg-a, ali ne i o vremenu izloženosti. Najjači potencijal za ulazak u stanicu određen je za PLL-nanoAg, što se može objasniti elektrostatskim interakcijama pozitivno nabijenog omotača s negativno nabijenom staničnom površinom. Potencijal ulaska za PVP- i AOT-nanoAg je sličan, te je već kao takav uočen kod ljudskih hepatoma stanica (76),

a vjerojatno je posljedica proteinske korone formirane na površini ovih vrsta nanoAg-a, čime je olakšana interakcija sa staničnom membranom i aktivna internalizacija, bez obzira na nepovoljne elektrostatske uvjete (72, 77). Koncentracijski uvjetovan porast internalizacije nanoAg-a u hPBMC stanice već je ranije opisan u istraživanju Greulich i suradnika koji su ispitivali veće nanoAg (70 nm) kombinirajući protočnu citometriju i SEM (78). Vranić i suradnici ističu kako kvantifikacija internalizacije nanočestica protočnom citometrijom sama po sebi nije dovoljno specifična za razlikovanje internaliziranih od adsorbiranih nanočestica na površinu stanica, te da je potrebna primjena metode vizualizacije, pri čemu su navedeni autori preporučili novu, napredniju inačicu protočne citometrije koja sadrži nadogradnju slikovnog moda (eng. *flow cytometry imaging)* (43). U ovom istraživanju primijenjena je metoda konfokalne mikroskopije u modu kontrastne refleksije kojom je nepobitno dokazana internalizacija nanoAg-a u hPBMC stanice uz istovremeno precizno lokaliziranje nanoAg-a u stanicama. Iako je veličina pora limfocitne membrane (4x2,5 nm) manja od promjera testiranih nanoAg-a (oko 10 nm), internalizacija se odvija putem endocitoze ili kao posljedica deformacije stanica, oštećenja stanične membrane ili vakuolizacije, kako su uočili Li i suradnici u PBMC stanica kitova (42). U svim tretiranim stanicama vizualizacijom je vidljiva lokalizacija nanoAg-a u jezgri, zbog čega je ispitana njegova genotoksičnost. Sposobnost da metalne nanočestice prodru u jezgru limfocita opisana je u ranijim istraživanjima sa željeznim (79) i zlatnim (80) nanočesticama.

Stanična internalizacija nanoAg-a može dovesti do toksičnog događaja koji je prouzrokovan tzv. LETH (od eng. *Lysosome-Enchanced Trojan Horse*) mehanizmom uslijed kojeg se s površine nanoAg-a oslobađaju ioni Ag^+. Posljedica oksidacije nanoAg-a LETH mehanizmom nije samo oslobađanje iona srebra, nego i pretjerana sinteza ROS-ova što dovodi do indukcije oksidativnog stresa u stanicama. Ključna uloga ROS-ova u mehanizmu toksičnosti nanoAg-a ustanovljena je i u ranijim istraživanjima (12-15, 41, 50, 51, 59). U ovom istraživanju, potvrđeno je da ulaskom nanoAg-a u stanice hPBMC dolazi do oksidacije nanoAg-a, stvaranja superoksid-radikala (detektiranih fluorescentnom bojom DHE), te hidroksi-, perhidroksi- i peroksi-radikala (detektiranih fluorescentnom bojom DCFH-DA), ovisno o vrsti i koncentraciji nanoAg-a. Ovakav toksični mehanizam već je opisan u slučaju korištenja metalnih nanočestica kod brojnih staničnih linija, kao i kod humanih mononukleara (58, 59, 81-

86). Iz svega navedenog možemo zaključiti da je citotoksičnost nanoAg-a uvjetovana njihovim ulaskom u stanice uslijed čega dolazi do stvaranja ROS-ova.

Rezultati ispitivanja mogućih promjena mitohondrijskog membranskog potencijala (bojanjem s DiOC6 bojom) su pokazali da nanoAg direktno ili indirektno oštećuje mithondrijsku membranu. Oksidativni stres uzrokovan produkcijom ROS-ova može inducirati brzu depolarizaciju unutarnje membrane mitohondrija, smanjenje njenog potencijala i poslijedično smanjenje oksidativne fosforilacije. Oštećeni mitohondrij producira još više ROS-ova, pogotovo peroksi- i superoksid-radikala. Upravo ova dodatna mitohondrijska produkcija ROS-ova smatra se izuzetno važnim dodatnim mehanizmom nanoAg citotoksičnosti (87, 88). U ovom istraživanju rezultati su potvrdili podjednaku jačinu smanjenja mitohondrijskog membranskog potencijala (Δψm) uslijed tretmana sa svim vrstama nanoAg-a neovisno o vremenu inkubacije, bez obzira što su ispitivane u minimalnoj toksičnoj koncentraciji kroz relativno kratko razdoblje. Stoga porast razine ROS-ova u hPBMC nakon tretmana s nanoAg-om može biti rezultat i oksidativnog stresa i poremećaja mitohondrijskog metabolizma. Rezultati produkcije ROS-ova i deplecije Δψm odgovaraju rezultatima indukcije apoptoze (i nekroze) hPBMC stanica tretiranih različitim nanoAg vrstama. Naime, ROS-ovi unutar mitohondrija dovode do otvaranja tranzicijskih pora u njegovoj membrani i posljedičnog otpuštanja apoptogenih faktora (89). U ovom istraživanju apoptoza koja se dogodila kod hPBMC stanica nakon jednosatnog tretmana s nanoAg-om potvrđuje ove mehanizme. Progresija iz rane u kasnu apoptozu, te iz kasne apoptoze u nekrozu nakon dužeg vremena izloženosti implicira da je izazivanje apoptoze glavni mehanizam stanične smrti hPBMC stanica nakon tretmana s nanoAg-om.

Prevelika količina ROS-ova inicira mnoge po stanicu razorne mehanizme, uključujući i degradaciju te fragmentaciju DNK (9). Rezultati ovog istraživanja pokazali su početak fragmentacije DNK pri višoj koncentraciji nanoAg-a, što se očitovalo kao porast dužine repa DNK kometa (TL). No, jedino intenzitet repa DNK kometa (TI) može pouzdano ukazati na jačinu DNK oštećenja. Rezultati dobiveni provođenjem komet testa jasno su pokazali da genotoksični potencijal ovisi o vrsti omotača primijenjenog za stabilizaciju i funkcionalizaciju nanoAg-a. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da je nanoAg s proteinskim omotačem (BSA) najjače genotoksičan, dok je PVP-nanoAg pokazao najslabiji genotoksični potencijal. Slični učinci genotoksičnosti uočeni su kod hPBMC tretiranim s malim Ag-nanoklasterima

bez omotača, kao i kod nanoAg-a bez omotača (28, 82). S obzirom na to da su genotoksični učinci u ovom istraživanju uočeni već nakon 3 h inkubacije, može se zaključiti da genotoksičnost nije uzrokovana samo produkcijom ROS-ova i indukcijom apoptoze, nego i izravnom interakcijom nanoAg-a s DNK kao posljedicom ulaska nanoAg-a u staničnu jezgru, kako je dokazano vizualizacijom internalizacije nanoAg-a pomoću konfokalnog mikroskopa.

Dodatna jedinstvenost ovog istraživanja su kontrolni pokusi evaluacije potencijalno toksičnih učinaka samih funkcijskih molekula – omotača (PVP, AOT i PLL) koji su korišteni kao stabilizatori ispitivanih nanočestica, kako bi se isključila mogućnost lažno pozitivnih rezultata testova citotoksičnosti i imunomodulacije uzrokovana upravo njima, a ne samim nanoAg-om. Rezultati su pokazali da jedino PLL omotač sam po sebi može stanice uvesti u ranu apoptozu, kao i aktivirati mononuklearne stanice, te bi se iz tog razloga trebao izbjegavati kao stabilizator u sintezi nanoAg-a za biomedicinske svrhe. Prema SCENIHR smjernicama (32), dodatno je kao kontrola ispitivana i toksičnost iona srebra u koncentraciji u kojoj se otpušta s površine nanoAg-a u biološkom mediju. Važno je napomenutu da se u kontrolnim pokusima navedene koncentracije omotača odnose samo na odgovarajuće koloidne suspenzije nanoAg-a u koncentraciji od 25 mg Ag/L, što je najviša ispitivana koncentracija u pokusima citotoksičnosti, te značajno viša koncentracija u odnosu na one primijenjene kod analize imunomodulatornih učinaka. Uz to, maksimalni udio slobodnih Ag^+ iona za pojedine nanoAg suspenzije u PBS+hPBMC mediju ne iznosi više od 0,4%, pa se u slučaju tretmana s najvišom koncentracijom nanoAg-a ne može očekivati više od 0,1 mg Ag/L ionskog oblika srebra u pokusima citotoksičnosti, te svega 0,012 mg Ag/L u pokusima imunomodulacije. Rezultati su očekivano pokazali da u tako niskoj koncentraciji nema negativnog utjecaja iona srebra na humane mononuklearne stanice. Stoga se opaženi učinci nanoAg-a mogu pripisati isključivo nanočesticama, a ne otpuštenom srebru.

Prilikom razvoja nanoAg-a za biomedicinsku *in vivo* aplikaciju, treba voditi računa o mogućoj interakciji s imunološkim sustavom, odnosno o prirodi imunološkog odgovora koji se želi izbjeći (imunokompatibilnost) ili postići (imunomodulacija). U ovom istraživanju *in vitro* staničnim modelom humanog imunološkog sustava analizirala se priroda imunološkog odgovora nakon stimulacije s različito stabiliziranim tj. funkcionaliziranim nanočesticama srebra, u ovisnosti o njihovoj koncentraciji i vremenu izloženosti. Rezultati analize kratkotrajnog učinka različitih

vrsta nanoAg-a kao potencijalnih imunomodulatora na udio ukupnih T-limfocita (CD3-pozitivnih stanica) pokazali su da nema značajne promjene nakon 6 h i 24 h stimulacije s nanočesticama, ali ima nakon stimulacije s PMA/ionomicinom. Slični rezultati uočeni su i kod ukupnog udjela T-limfocitnih subpopulacija: pomagačkih (CD4-pozitivnih) i citotoksičnih (CD8-pozitivnih) T-limfocita. Za razliku od niskih koncentracija nano-Ag-a korištenih u ovom radu, koncentracija PMA/ionomicina koja je sigurna za 6-satnu stimulaciju T-limfocita pokazala se citotoksičnom za njihovu 24-satnu stimulaciju, što je rezultiralo značajnim smanjenjem ukupnih udjela kako ukupnih T-limfocita, tako i njihovih subpopulacija (poglavito pomagačkih T-limfocita). Slični rezultati već su uočeni u prijašnjim ispitivanjima stimulacije limfocita s PMA/ionomicinom koji smanjuje njihovu vijabilnost nakon dugotrajnije izloženosti (90). Iz tog razloga rezultati aktivacije subpopulacija T-limfocita pomoću PMA/ionomicina morali su biti analizirani posebnom strategijom ograđivanja prikazanoj na Slici 30, kako ne bi došlo do lažno sniženih rezultata aktivacije uslijed snižene vijabilnosti tih stanica. Dok su rezultati pozitivne kontrole stimulacije s PMA/ionomicinom pokazali visok stupanj aktivacije T-limfocita (CD3/CD69-pozitivnih stanica), kao i njihovih subpopulacija, pomagačkih (CD3/CD4/CD69-pozitivnih) i citotoksičnih (CD3/CD8/CD69-pozitivnih) T-limfocita nakon 6 h i 24 h stimulacije, nije uočena njihova značajna aktivacija nano-Ag-om. Naime, aktivacija T-limfocita odvija se preko CD3-TCR-površinskog signalnog kompleksa, pri čemu dolazi do izražaja biljega CD69 na njihovoj površini. Ovi rezultati u skladu su s istraživanjem Lo i suradnika koji su uočili da anti-CD3-nanočestice ne aktiviraju naivne T-limfocite, ali aktiviraju one već pobuđene antigenom (91). Ovo je važno za povećanje ekspanzije pobuđenih T-limfocita prije uvođenja cjepiva ili imunoterapije nanovektorima (91). U ovom istraživanju korištene su stanice zdravih donora, imunološki neaktiviranih, što za pretpostavku ima da su T-limfociti korišteni u pokusima bili prethodno nepobuđeni. Za razliku od nepromijenjenog udjela T-limfocitnih subpopulacija, analiza MFI vrijednosti pokazala je da postoji statistički značajno smanjenje broja antigena CD4 na površini pomagačkih T-limfocita nakon 6 h stimulacije s 3 mg Ag/L PLL-nanoAg-a, a sličan učinak uočen je i nakon 24 h. Također, uočeno je da postoji statistički značajno smanjenje broja antigena CD8 na površini citotoksičnih T-limfocita nakon 6 h stimulacije s 3 mg Ag/L PLL-nanoAg-a. Sličan trend pokazale su i ostale nanočestice srebra nakon 24 h stimulacije, ali bez statističke značajnosti u odnosu na netretirane stanice. Ovi rezultati nadopunjuju istraživanja antivirusnog učinka

nanoAg-a. Naime, poznato je da se virusi, poglavito HIV, vežu na limfocite preko CD4-receptora, mijenjaju odnos pomagačkih i citotoksičnih T-limfocita i tako dovode do imunodeficijencije. Smanjenjem broja tih receptora na površini T-limfocita pomoću nanoAg-a, onemogućilo bi se vezanje virusa na stanice i ostvarivanje njihovih učinaka u stanici (10, 11, 20-22). Iz ovih rezultata možemo zaključiti da su srebrne nanočestice, bez obzira na vrstu površinske funkcionalizacije, u niskoj koncentraciji imunokompatibilne tj. ne aktiviraju stečenu staničnu imunost. No, s obzirom da su rezultati pokazali da nanoAg s pozitivno nabijenim površinskim stabilizatorom (PLL) uzrokuje sniženje broja T-staničnih površinskih receptora za viruse, budućim istraživanjima trebalo bi detaljnije ispitati kako dizajnirati nanoAg u svrhu razvoja danas iznimno aktualne antivirusne terapije.

Rezultati imunomodulatornog učinka nanoAg-a na udio ukupnih B-limfocita (CD19-pozitivnih stanica) pokazali su da nema značajne promjene nakon 6 h i 24 h stimulacije s nanoAg-om. Međutim, uočeno je značajno povećanje aktivacije (CD19/CD69-pozitivnih) B-limfocita nakon 6 h i 24 h stimulacije s 1,5 mg Ag/L BSA-nanoAg, te nakon 24 h s 3 mg Ag/L PLL-nanoAg. Također, uočena je značajna aktivacija B-limfocita sa samim PLL-omotačem nakon 24 h stimulacije. Učinak PLL-omotača, kao i PLL-nanoAg-a na aktivaciju B-limfocita, može se objasniti pozitivnim nabojem PLL-a koji dovodi do jakih elektrostatskih interakcija s negativno nabijenom limfocitnom membranom, zbog čega je u konačnici došlo i do povećanog unosa PLL-nanoAg-a u stanicu. Također, nanočestice s BSA omotačem koji oponaša proteinsku koronu koja se formira oko nanoAg-a u humanom staničnom mediju, dovode do međumolekulskih interakcija nanoAg-a sa staničnom površinom, i posljedične aktivacije B-limfocita. Ovo istraživanje u skladu je s istraživanjem Temchure i suradnika koji su uočili da nanočestice kalcijevog fosfata obloženog proteinskim omotačem izazivaju aktivaciju humoralne imunosti, što je poželjno u razvoju nanovakcinologije (92).

Rezultati imunomodulacijskih učinaka pokazali su da nema značajne promjene udjela ukupnih NK-stanica (CD16/56-pozitivnih) nakon stimulacije s nanoAg-om. No, postoji značajna aktivacija NK-stanica (CD16/56+/69-pozitivnih) s 1,5 mg Ag/L BSA-nanoAg nakon 24 h stimulacije. Može se uočiti povećana aktivacija NK-stanica već i nakon 6 h stimulacije s BSA- i PLL-nanoAg-om, ali nije postignuta statistička značajnost. Također, postoje značajni rezultati aktivacije ovih stanica tretmanom sa samim PLL-omotačem. Takvi se rezultati mogu objasniti istim molekulskim

interakcijama kao i kod B-limfocita. Rezultati aktivacije NK-stanica pokazuju da određene vrste nano-Ag-a mogu stimulirati urođenu imunost. Ovo je važno otkriće jer je upravo infiltracija aktiviranih NK-stanica kod pacijenata s malignim oboljenjima jedan od temelja antitumorske terapijske strategije (11).

U slučaju imunomodulatornog učinka nanoAg-a na monocite kao još jedne predstavnike urođene imunosti, analizom rezultata uočena je povećana aktivacija nakon tretmana s BSA-nanoAg-om, ali rezultati nisu bili statistički značajni; sami omotači PLL i PVP značajno su aktivirali monocite, te bi ubuduće trebalo izbjegavati njihovu upotrebu pri dizajnu imunokompatibilnih nanočestica srebra. Iz rezultata imunomodulatornog učinka nanoAg-a na stanice urođenog imunološkog sustava možemo zaključiti da bi buduća istraživanja trebalo provesti na većem broju ispitivanih stanica kako bi se potvrdila njegova aktivacija ovom vrstom metalnih nanočestica. Slično istraživanje provedeno je na zlatnim nanočesticama, gdje je uočeno da one aktiviraju monocitno-makrofagni sustav i inhibiraju rast tumora (11). Također, važno je napomenuti da ovi rezultati rješavaju nedoumice prijašnjih istraživanja o djelovanju nanoAg-a na lučenje proupalnih citokina kod različitih staničnih linija makrofaga. Naime, rezultati tih istraživanja bili su oprečni – na pojedinim staničnim linijama nanočestice srebra su stimulirale, a na drugima inhibirale lučenje proupalnih citokina (10). Ovo istraživanje još jednom potvrđuje novi generalni konsenzus koji daje prednost određivanju površinskih aktivacijskih biljega pred određivanjem koncentracije citokina (60).

7. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Srebrne nanočestice (nanoAg) imaju citotoksičan učinak na mononuklearne stanice humanog imunološkog sustava (hPBMC)
- nanoAg ulazi u citoplazmu hPBMC endocitozom, a unutar stanice izazivaju strukturalna oštećenja u mitohondrijima i jezgri
- porastom primjenjene koncentracije raste internalizirana koncentracija nanoAg-a
- nanoAg uzrokuje programiranu staničnu smrt (apoptozu) hPBMC stanica, a pri višim koncentracijama i smrt nekrozom
- citotoksičnost nanoAg-a ovisi o koncentraciji, vremenu izloženosti i vrsti omotača na površini nanoAg-a
- sami omotači (PVP, AOT) ne pridonose značajno citotoksičnosti, osim PLL-a kojega bi trebalo izbjegavati prilikom dizajna biomedicinskih proizvoda
- proteinski omotač BSA nije toksičan, ali tako stabiliziran nanoAg ostvaruje značajne citotoksične učinke
- ionsko srebro u niskoj koncentraciji (u kojoj se otpusti iz nanoAg-a) ne pridonosi citotoksičnosti
- unutar stanice nanoAg uzrokuje oksidativni stres, odnosno povećanu proizvodnju ROS-ova (superoksid- i peroksi-radikala)
- nanoAg smanjuje mitohondrijski membranski potencijal, te uzrokuje dodatno stvaranja ROS-ova
- nanoAg su genotoksične za hPBMC stanice
- stupanj oštećenja DNK ovisi o vrsti i koncentraciji nanoAg-a, pri čemu su BSA-nanoAg pokazale najveći, a PVP-nanoAg najmanji genotoksični potencijal
- nanoAg ovisno o omotaču ima imunomodulatorni učinak, tj. dovodi do aktivacije stanica humoralne i urođene imunosti, odnosno B-limfocita, te NK-stanica i monocita, a pritom ne aktivira T-limfocite, odnosno ne ometa staničnu imunost
- nanoAg na površini pomagačkih T-limfocita smanjuje broj CD4 antigena koji su receptori za brojne viruse
- nanočestice PLL-nanoAg i BSA-nanoAg pokazale su značajan imunomodulatorni potencijal

- prilikom evaluacije toksičnosti potrebno je zasebno odrediti minimalnu toksičnu koncentraciju za pojedinu vrstu ispitivanih nanočestica
- korištenje nanoAg-a u biomedicinske svrhe zahtijeva precizan dizajn (s obzirom na fizikalno-kemijska svojstva i površinsku strukturu) i precizno definiranje sigurnih uvjeta korištenja (koncentracija i vrijeme izloženosti) kako bi se minimaliziralo njihovo toksično djelovanje na imunološki sustav.

8. SAŽETAK

Imunokompatibilnost nanočestica srebra – učinak na mononuklearne stanice humane periferne krvi

CILJ ISTRAŽIVANJA. Srebrne nanočestice (nanoAg) su jedne od najistraživanijih metalnih nanočestica. Zbog svoje biocidne aktivnosti sve se učestalije primjenjuju u dijagnostičke i terapijske svrhe, što zahtijeva ispitivanje njihove biokompatibilnosti. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati biološke učinke različito funkcionaliziranih nanočestica srebra na stanice humanog imunološkog sustava, te standardizirati metode za procjenu imunokompatibilnosti u svrhu dizajna sigurnih nanomedicinskih proizvoda koji sadrže srebro.

NACRT STUDIJE. Ova studija je presječna *in vitro* studija. Sve analize provedene su na izoliranim humanim mononuklearnim stanicama periferne krvi (hPBMC) koje predstavljaju reprezentativni primjerak krvnih imunoloških stanica. Metode za procjenu imunokompatibilnosti odabrane su prema ISO smjernicama za ispitivanje hemokompatibilnosti medicinskih uređaja, te su prilagođene ispitivanju učinaka nanomaterijala na humane imunološke stanice.

ISPITANICI I METODE. Cjelokupno istraživanje provedeno je na limfocitima i monocitima izoliranim iz svježih uzoraka pune krvi dobivenih od ukupno 30 zdravih ispitanika. U svrhu istraživanja pripremljene su četiri vrste nanoAg-a sferičnog oblika promjera oko 10 nm, stabilizirane različitim površinskim omotačima: neutralnim (PVP), pozitivnim (PLL), negativnim (AOT) i proteinskim (BSA). Metodom protočne citometrije analizirani su učinci citotoksičnosti (internalizacija nano-Ag-a, indukcija apoptoze i nekroze, te oksidativnog stresa) i imunomodulacije. Za vizualni prikaz formacije nanoAg-a u nanostrukturu, unutarstanične lokalizacije, te citotoksičnosti nanoAg-a, korištene su različite vrste mikroskopije (TEM, CLSM, svjetlosna mikroskopija). Za evaluaciju genotoksičnosti korišten je alkalni komet test.

REZULTATI. Sve testirane vrste nanoAg-a promijenile su morfologiju hPBMC stanica, inducirajući apoptozu i nekrozu proporcionalno koncentraciji i vremenu izloženosti. Najvišu toksičnost pokazale su pozitivno nabijene (PLL) i proteinske (BSA) nanoAg. Ulazak nanoAg-a u stanice rastao je proporcionalno primjenjenoj koncentraciji, te je bio najviši kod PLL-nanoAg-a. Sve vrste nanoAg-a u stanici uzrokovale su oksidativni stres produkcijom ROS-ova i oštećenjem mitohondrijske membrane. Ovisno o koncentraciji, sve vrste nanoAg-a su uzrokovale

genotoksičnost. BSA- i PLL-nanoAg uzrokovali su aktivaciju B-limfocita, NK-stanica i monocita, T-limfociti se nisu značajno aktivirali, ali se smanjio broj virusnog CD4-receptora na površini pomagačkih T-limfocita.
ZAKLJUČCI. Ova studija predstavlja sistematičnu i sveobuhvatnu analizu koja pokazuje kako različito funkcionalizirane nanočestice srebra mogu utjecati na humani imunološki sustav. Rezultati ove studije predstavljaju značajan doprinos procjeni sigurnosti medicinskih nano-proizvoda na bazi srebra.

Ključne riječi: biokompatibilnost; biomedicinska primjena; citotoksičnost; genotoksičnost; imunomodulatorni učinak; srebrne nanočestice.

9. SUMMARY

Immunocompatibility of silver nanoparticles - effect on human peripheral blood mononuclear cells

OBJECTIVES. Silver nanoparticles (AgNPs) are one of the most investigated metal-based nanomaterials. Their biocidal activity has boosted their application in both diagnostic and therapeutic medical procedures. Therefore, it is crucial to create biocompatible AgNPs. This study has tried to deepen scientific knowledge about biomedical safety of AgNPs, depending on their different surface properties, which affect human immune system. Also, this study has as its goal to standardize immunocompatiblity methods, in order to evaluate human-related safety of AgNPs.

STUDY DESIGN. This study is designed as cross-sectional in vitro study. All procedures and analysis were performed in vitro, on human peripheral blood mononuclear cells (hPBMCs), as main representatives of circulating immunological cells. Immunocompatibility evaluation methods were applied according to ISO guidelines for biological evaluation of medical products and got adjusted, in order to evaluate medically-applied nanomaterials on human immune cells.

MATERIALS AND METHODS. Mononuclear cells (lymphocytes and monocytes) were isolated from freshly drawn, whole blood samples of 30 healthy donors. For the study purposes, there were four, spherically shaped nanoAg, with 10nm diameter, prepared and stabilized with different coating: AgNPs encompassing protein (BSA), neutral (PVP), positive (PLL) and negative (AOT) agents, used for their surface stabilization. Cytotoxicity effects, including nanoparticle cellular uptake potential, apoptotic and necrotic cell death, induction of oxidative stress, damages of mitochondrial membrane and cell activation, were analyzed using flow cytometry method. Nanoformation, intracellular localization and cytotoxicity effects of AgNPs were visually confirmed by different types of microscopic methods (TEM, CLSM, light). Genotoxicity evaluation was performed by alkaline comet assay. Coating-, dose- and time-dependent cellular toxicity of AgNPs was assessed.

RESULTS. All tested AgNPs altered morphology of freshly isolated hPBMCs, inducing apoptosis and necrosis in a dose- and time-dependent manner. The highest toxicity had positively-charged and protein-coated AgNPs. Cellular uptake of AgNPs was also dose-dependently increased and the highest was for positively charged AgNPs. All types of AgNPs caused the production of reactive oxygen species (ROS)

and damaged mitochondrial membrane intracellularly. Depending on the dose, all AgNPs exhibited genotoxic potential. BSA- and PLL-AgNPs stimulated B-cells, as well as NK-cells and monocyte activation; there was no significant T-cell activation, but there was a depletion of virus CD4-receptor on T-helper cell surface.
CONCLUSIONS. This study provides systematic and comprehensive data, showing how differently functionalized AgNPs may affect the human immune system. These results present a valuable scientific contribution to safety assessment of nanosilver-based, blood-contacting medical products.

Keywords: biocompatibility; biomedical application; cytotoxicity; genotoxicity; immunomodulatory effects; silver nanoparticles.

10. LITERATURA

1. European Commission. Nanotechnology: the invisible giant tackling Europe's future challenges. European Union, 2013. Dostupno na adresi: https://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/nanotechnology. Datum pristupa: 01.09.2020.
2. Ivanković M. Nanomaterials i nanoproducts – Possibilities and risks. Polimeri. 2011;32:23-28.
3. Burdusel A-C, Gherasim O, Grumezescu AM, Mogoanta L, Ficai A, Andronescu E. Biomedical application of silver nanoparticles: an up-to-date overview. Nanomaterials. 2018;8:681.
4. European Commission. Horizon 2020: Nanotechnologies, Advanced Materials, Biotechnology and Advanced Manufacturing and Processing. European Union, 2020. Dostupno na adresi: https://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/en/h2020-section/nanotechnologies. Datum pristupa: 01.09.2020.
5. European Commission. Nanotechnology. Dostupno na adresi: https://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/nanotechnology. Datum pristupa: 01.09.2020.
6. European Commission. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial Text with EEA relevance. Official Journal of the European Union. Dostupno na adresi: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32011H0696. Datum pristupa: 01.09.2020.
7. Huang H, Lai W, Ciu M, Liang L, Lin Y, Fang Q. i sur. An evaluation of blood compatibility of silver nanoparticles. Sci. Rep. 2016;6:25518.
8. Fu PP, Xia Q, Hwang H-M, Ray PC, Yu H. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. J Food Drug Anal. 2014; 22:64-75.
9. Milić M, Leitinger G, Pavičić I, Zebić Avdičević M, Dobrović S, Goessler W, i sur. Cellular uptake and toxicity effects of silver nanoparticles in mammalian kidney cells. J. Appl. Toxicol. 2014;35:581-92.
10. Klippstein R, Fernandez-Montesinos R, Castillo PM, Zadarenko AP, Pozo D. Silver nanoparticles interactions with the immune system: implications for health and disease. U: Perez DP, urednik. Silver nanoparticles.Rijeka: InTech Europe; 2010. str. 309-324.

11. Luo Y-H, Chang LW and Lin P. Metal-based nanoparticles and the immune system: activation, inflammation and potential applications. BioMed Res Int, 2015;2015:1-12.
12. Akter M., Sikder T, Rahman M, Ullah A, Hossain KFB. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. J Adv Res. 2018;9:1-16.
13. Kim T-H, Kim M, Park H-S, Shin US, Gong M-S, Kim H-W. Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. J Biomed Mater Res Part A. 2012;100: 1033-1043.
14. Park MVDZ, Neigh AM, Vermuelen JP, de la Fonteyne LJJ, Verharen HW, Briede JJ, i sur. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. Biomaterials. 2011;32:9810-9817.
15. deLima R, Seabra AB, Duran N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. J. Appl. Toxicol. 2012;32:867-879.
16. Dobrovolskaia MA, Shurin M, Shvedova AA. Current understanding of interactions between nanoparticles and the immune system. Toxicol Appl Pharmacol. 2016;299:78–89.
17. Mayer A, Vadon M, Rinner B, Novak A, Wintersteiger R, Frochlich E. The role of nanoparticle size in hemocompatibility. Toxicol. 2009;258;139-147.
18. Ahlberg S, Antonopulos A, Diendorf J, Dringen R, Epple M, Flock R, i sur. PVP-coated, negatively charged silver nanoparticles: A multi-center study of their physicochemical characteristics, cell culture and in vivo experiments. Beilstein J. Nanotechnol. 2014;5:1944-1965.
19. Kubo A-L, Capjak I, Vinković Vrček I, Bondarenko OM, Kurvet I, Vija H, i sur. Antimicrobial potency of differently coated 10 i 50 nm silver nanoparticles against clinically relevant bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018;170;401-410.
20. Baram-Pinto D, Shukla S, Perkas N, Gedanken A, Sarid R. Inhibition of herpes simplex virus type 1 by silver nanoparticles capped with marcaptoethane sulfonate. Biochonjug Chem. 2009;20:1497-1502.
21. Kononenko V, Narat M, Drobne D. Nanoparticle interaction with the immune system. Arh Hig Rada Toksikol. 2015;66:97-108.

22. Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Camacho-Bragado A, Gao X, Lara H i sur. Interactions of silver nanoparticles with HIV-1. J Nanobiotechnology. 2005;3:3-6.
23. Sklandowski M, Golinska P, Rudnicka K, Dahm H, Rai M. Evaluation of toxicity, immune compatibility and antibacterial activity of biogenic silver nanoparticles. Med Microbiol Immunol. 2016;205:603-613.
24. Guo D, Zhu L, Huang Z, Zhou H, Ge Y, Ma W i sur. Anti-leukemia activity of PVP-coated silver nanoparticles via generation of reactive oxygen species and release of silver ions. Biomaterials. 2013;34:7884-7894.
25. Austin LA, Mackey MA, Dreaden EC, El-Sayed MA. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery. Arch Toxicol. 2014;88:1391-1417.
26. Niu Z, Li Y. Removal and utilization of capping agents in nanocatalysis. Chem. Mater. 2014;26:72–83.
27. Drasler B, Sayre P, Gunter Steinhauser K, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. *In vitro* approaches to asses the hazard of nanomaterials. NanoImpact. 2017;8:99-116.
28. Joksić G, Stašić J, Filipović J, Šobot AV, Trtica M. Size of silver nanoparticles determines proliferation ability of human circulating lymphocytes *in vitro*. Toxicol Lett. 2016;247:29-34.
29. Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Khademhosseini A. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. J Control Release. 2013;166:182-194.
30. International Organization for Standardization. EN ISO 10993-4:2017 Biological evaluation of medical devices — Part 4: Selection of tests for interactions with blood. Dostupno na adresi: https://www.iso.org/standard/63448.html. Datum pristupa: 15.09.2020.
31. Günther-Steinhäuser K, Sayre PG. Reliability of methods and data for regulatory assessment of nanomaterial risks. 2017;7:66-74.
32. European Commission - Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Guidance on the determination of potential health effects of nanomaterials used in medical devices. European Union 2015. Dostupno na adresi:

https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenihr. Datum pristupa: 15.09.2020.
33. Zhang T, Wang L, Chen Q, Chen C. Cytotoxic potential of silver nanoparticles. Yonsei Med J. 2014;55:283-291.
34. Capjak I, Goreta SŠ, Jurašin D.D., Vinković Vrček I. How protein coronas determine the fate of engineered nanoparticles in biological environment Arh Hig Rada Toksikol. 2017;68:245-253.
35. Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. Frontiers in microbiology. 2016;7: 1831.
36. Zhang XF, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. Int J Mol Sci. 2016;17;1534.
37. Wang L, Liu Y, Li W, Jiang X, Ji Y, Wu X. Selective targeting of gold nanorods at the mitochondria of cancer cells: implications for cancer therapy. Nano Lett. 2011;11:772-780.
38. Buttacavoli M, Albanese NN, Di Cara G, Alduina R, Faleri C, Gallo M, i sur Anticancer activity of biogenerated silver nanoparticles: an integrated proteomic investigation. Oncotarget. 2017;9:9685-9705.
39. Milić M, Vuković B, Barbir R, Pem B, Milić M, Šerić V, i sur. Effect of differently coated silver nanoparticles on hemostasis. Platelets. 2020;1-11.
40. Chen LQ, Fang L, Ling J, Ding CZ, Kang B, Huang CZ. Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. Chem Res Toxicol. 2015;28:501-509.
41. Janrao KK, Gadhave MV, Banerjee SK, Gaikwad DD. Nanoparticle Induced Nanotoxicity: An Overview. Asian J Biomed Pharm Sci. 2014;4:1-7.
42. Li WT, Chang HW, Yang WC, Lo C, Wang LY, Pang VF. i sur. Immunotoxicity of Silver Nanoparticles (AgNPs) on the Leukocytes of Common Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). Sci. Rep. 2018;8:5593.
43. Vranic S, Boggetto N, Contremoulins V, Mornet S, Reinhardt N, Marano F i sur. Deciphering the mechanisms of cellular uptake of engineered nanoparticles by accurate evaluation of internalization using imaging flow cytometry. Part Fibre Toxicol. 2013;10:2.

44. Ibuki Y, Toyooka T. Nanoparticle uptake measured by flow cytometry. U: Reineke J, urednik. Nanotoxicity: Methods and protocols, Methods in molecular biology. New York: Springer Science+ Business Media; 2012, str.157-166.
45. Salvati A, Nelissen I, Haase A, Aberg C, Moya S, Jacobs A i sur. Quantitative measurement of nanoparticle uptake by flow cytometry illustrated by an interlaboratory comparison of the uptake of labelled polystyrene nanoparticles. NanoImpact. 2018;9:42-50.
46. Suzuki H, Toyooka T, Ibuki Y. Simple and easy method to evaluate uptake potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. Environ. Sci. Technol. 2007;41,3018-3024.
47. Toduka Y, Toyooka T, Ibuki Y. Flow cytometric evaluation of nanoparticles using side-scattered light and reactive oxygen species-mediated fluorescence-correlation with genotoxicity. Environ.Sci.Technol. 2012;46:7629-7636.
48. Nymark P, Catalán J, Suhonen S, Järventaus H, Birkedal R, Clausen PA, i sur. Genotoxicity of polyvinilpyrrolidone-coated silver nanoparticles in BEAS 2B cells. Toxicology. 2013;313:38-48.
49. Oh WK, Kim S, Moonjung C, Kim C, Jeong YS, Cho BR, i sur. Cellular uptake and innate immune response of silica-titania hollow nanoparticles based on size and surface functionality. ACS Nano. 2010;4:5301-5313.
50. AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveettil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. AcsNano. 2009;3:279-290.
51. Torres Andon F, Fadeel B. Programmed cell death: molecular mechanisms and implications for safety assessment of nanomaterials. Accounts of chemical research. 2012;46:733-742.
52. Wei L, Lu J, Xu H, Patel A, Chen Z-S, Chen G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. Drug Discov Today. 2015;20:595-601.
53. Vinković Vrček I, Žuntar I, Petlevski R, Pavičić I, Dutour Sikirić M, Ćurlin M., i sur. Comparison of in vitro toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells. Environ Toxicol. 2016;31:679-692.
54. Shin SH, Ye MK, Kim HS, Kang HS. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. Int Immunopharmacol. 2007;7:1813–1818.

55. Leendert S, Blok SLJ, Engels GE, van Oeveren W. In vitro hemocompatibility testing: The importance of fresh blood. Biointerphases. 2016;11:029802.
56. Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao C, Mitter N, Yu C, i sur. Nanoparticle vaccines. Vaccine. 2014;32:327-337.
57. Minigo G, Scholzen A, Tang CK, Henley JC, Kalkanidis M, Pietersz GA, i sur. Poly-L-lysine-coated nanoparticles: A potent delivery system to enchance DNA vaccine efficacy. Vaccine. 2007;25:1316-1327.
58. Barkhordari A, Barzegar S, Hekmatimoghaddam H, Jebali A, Moghadam SR, Khanjani N. The toxic effects of silver nanoparticles on blood mononuclear cells. Int J Occup Environ Med. 2014;5:164-168.
59. Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. Toxicol Lett. 2009;190:156-162.
60. Nielsen SD, Afzelius P, Ersboll AK, Nielsen JP, Hansen J-ES. Expression of the activation antigen CD69 predicts functionality of *in vitro* expanded peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors and HIV-infected patients. Clin Exp Immunol. 1998;114:66-72.
61. Jurašin DD, Ćurlin M, Capjak I, Crnković T, Lovrić M, Babić M, i sur. Surface coating affects behaviour of metallic nanoparticles in a biological environment. Bellstein J Nanotechnol. 2016;7:246-262.
62. Barbir R, Goessler W, Ćurlin M, Micek V, Milić M, Vuković B, i sur. Protein corona modulates distribution and toxicological effects if silver nanoparticle *in vivo.* Part Part Syst Charact. 2019;36:1-12.
63. Capjak I, Goreta SŠ, Jurašin D.D., Vinković Vrček I. How protein coronas determine the fate of engeneerednnanoparticles in biological environment. Arh Hig Rada Toksikol. 2017;68:245-253.
64. Elblbesy MA. Hemocompatibility of albumin nanoparticles as a drug delivery system-an *in vitro* study. J Biomater Nanobiotechnol. 2016;7:64-71.
65. 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;83:962-972.
66. Pietkiewicz S, Schmidt JH, Lavrik IN. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination if imaging flow cytometry

with classical Annexin V / propidium iodide staining. J Immunol Method. 2015;423:99-103.

67. Amer J, Goldfarb A, Fibach E. Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells. Eur J Haematol. 2003;70:84-90.
68. Chang, H, Huang, H, Huang, T, Yang, P, Wang, Y, Juan H. Flow Cytometric Detection of Mitochondrial Membrane Potential. Bio-protocol. 2013:3:1-5.
69. Janols H, Bredberg A, Thuvesson I, Janciauskiene S, Grip O, Wullt M. Lymphocyte and monocyte flow cytometry immunophenotyping as a diagnostic tool in uncharacteristic inflammatory disorders. BMC Infect Dis. 2010;10:205.
70. Vilanova M, Tavares D, Ferreira P, Oliveira L, Nobrega A, Appelberg R, i sur. Role of monocytes in the up-regulation of the early activation marker CD69 on B and T murine lymphocytes induced by microbial mitogens. Scand J Immunol. 1996;43:155-163.
71. Triplette M, Attia EF, Akgün KM, Soo Hoo GW, Freiberg MS, Butt AA, i sur. A Low Peripheral Blood CD4/CD8 Ratio Is Associated with Pulmonary Emphysema in HIV. PLoS One. 2017; 12(1): e0170857.
72. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, Musyanovych A, Fetz V, Hecht R, i sur. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. Nat Nanotechnol. 2013;8:772-781.
73. Ahonen M, Kahru A, Ivask A, Kasemets K, Koljalg S, Mantecca P, i sur. Proactive approacg for safe use of antimicrobial coatings in healthcare settings: Opinion of the cost action network AMiCI. Int J Environ Res Public Health. 2017;14:366.
74. Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. Front Microbiol. 2016;7:1-17.
75. Zhornik EV, Baranova LA, Drozd ES, Sudas MS, Chau NH, Buu NQ, i sur. Silver nanoparticles induce lipid peroxidation and morphological changes in human lymphocytes surface. Cell Biophys. 2014;59:380–386.
76. Brkić Ahmed L, Milić M, Pongrac IM, Marjanović AM, Mlinarić H, Pavičić I, i sur. Impact of surface functionalization on the uptake mechanism and toxicity effects of silver nanoparticles in HepG2 cells. Food Chem Toxicol. 2017;107: 349-361.

77. Li X, Lenhart JJ, Walker HW. Dissolution-accompanied aggregation kinetics of silver nanoparticles. Langmuir. 2010;26:16690-16698.
78. Greulich C, Diendorf J, Gessmann J, Simon T, Habjan T, Eggler G, i sur. Cell type-specific response of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. Acta Biomater. 2011;7:3505-3514.
79. Garden OA, Reynolds PR, Yates J, Larkman DJ, Marelli-Berg FM, Haskard DO, i sur. A rapid method for labelling CD4+ T cells with ultrasmall paramagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging that preserves proliferative, regulatory and migratory behaviour in vitro. J. Immunol. Methods. 2006;314:123–133.
80. Singh L, Parboosing R, Kruger HG, Maguire GEM, Govender T. Intracellular localization of gold nanoparticles with targeted delivery in MT-4 lymphocytes. Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol. 2016;7: 1–7.
81. Paino IMM, Zucolotto V. Poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles: Activation of neutrophils and nanotoxicology effects in human hepatocarcinoma and mononuclear cells. Environ. Toxicol. Pharmacol. 2015;39:614–621.
82. Orta-García, S.T.; Plascencia-Villa, G.; Ochoa-Martínez, A.C.; Ruiz-Vera, T.; Pérez-Vázquez, F.J.; Velázquez-Salazar, J.J.; Yacamán, M.J.; Navarro-Contreras HR, Pérez-Maldonado IN. Analysis of cytotoxic effects of silver nanoclusters on human peripheral blood mononuclear cells “in vitro”. J. Appl. Toxicol. 2015;35:1189–1199.
83. Sabella S, Carney RP, Brunetti V, Malvindi MA, Al-Juffali N, Vecchio, G, i sur. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. Nanoscale. 2014;6:7052–7061.
84. Greulich C, Diendorf J, Geßmann J, Simon T, Habijan T, Eggeler, G, i sur. Cell type-specific responses of peripheral blood mononuclear cells to silver nanoparticles. Acta Biomater. 2011;7:3505–3514.
85. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. Small. 2010;6:12–21.
86. Jones AM, Garg S, He D, Pham AN, Waite TD. Superoxide-Mediated Formation and Charging of Silver Nanoparticles. Environ. Sci. Technol. 2011;45:1428–1434.

87. Maurer LL, Meyer JN. A systematic review of evidence for silver nanoparticle-induced mitochondrial toxicity. Environ. Sci. Nano. 2016;3:311–322.
88. Park J, Lee J, Choi C. Mitochondrial network determines intracellular ROS dynamics and sensitivity to oxidative stress through switching inter-mitochondrial messengers. PLoS ONE. 2011;6:e23211.
89. Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential (δψm) in apoptosis; an update. Apoptosis. 2003;8:115–128.
90. O'Neil-Andersen NJ, Lawrence DA. Differential modulation of surface and intracellular protein expression by T cells after stimulation in the presence of monensin or brefeldin A. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9:243-50.
91. Lo YC, Eddin MA, Powell JD. Selective activation of antigen-experienced T cells by anti-CD3 constrained on nanoparticles. JImmuno. 2013;191:5107-5114.
92. Temchura VV, Kozlova D, Sokolova V, Uberla K, Epple M. Targeting and activation of antigen-specific B-cells by calcium phosphate nanoparticles loaded with protein antigen. Biomaterials. 2014;35:6098-6105.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime doktoranda: Barbara Vuković (djevojačko Šimonović)
Datum rođenja: 7.4.1984.
Mjesto rođenja: Požega

Obrazovanje (od novijeg ka starijem):
- 2013.-2017. Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku
- 2012.-2016. Poslijediplomski specijalistički studij Medicinska biokemija i laboratorijska medicina, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu
- 2002.-2008. Farmaceutsko-biokemijski fakultet-studij medicinske biokemije, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu
- 1998.-2002. srednja škola- Gimnazija, Požega (opći smjer)
- 1990.-1998. osnovna škola – Osnovna škola Ivan Goran Kovačić, Velika

Radno iskustvo (od novijeg ka starijem):
- Od 2017. specijalist medicinske biokemije i laboratorijske medicine, Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Odjel za hematološku dijagnostiku i koagulaciju, KBC Osijek
- 2012.-2017. specijalizacija iz Medicinske biokemije i laboratorijske medicine, Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, KBC Osijek
- 2009.-2012. Zavod za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu, KB Merkur, Zagreb
- 2008.-2009. pripravnički staž, Zavod za kliničku kemiju, KB Merkur, Zagreb

Popis radova i aktivnih sudjelovanja na skupovima:
A) Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima
1. Flegar-Meštrić Z, Perkov, S, **Šimonović B**, Juretić D. Applicability of common reference intervals for serum creatinine concentrations to the Croatian population. Clin Chem Lab Med. 2010; 48(2):231-5.
2. **Vuković B**, Milić M, Dobrošević B , Milić M, Ilić Krunoslav, Pavičić I, i sur. Surface stabilization affects toxicity of silver nanoparticles in human peripheral blood mononuclear cells. Nanomaterials. 2020; 10: 1390 (1-18).
3. Milić M, **Vuković B**, Barbir R, Pem B, Milić M, Šerić V, i sur. Effect of differently coated silver nanoparticles on hemostasis. Platelets. 2020; 1-11.

4. Barbir R, Goessler W, Ćurlin M, Micek V, Milić M, **Vuković B**, i sur. Protein corona modulates distribution and toxicological effects if silver nanoparticle *in vivo.* Part Part Syst Charact. 2019; 36(8): 1900174 (1-12).

B) Poglavlje u knjizi / priručniku

1. **Vuković B,** Dobrošeić B. Imunofenotipizacija hematoloških neoplazmi: atraktivna alternativa klasičnoj diferencijalnoj krvnoj slici. U: Debeljak Ž. Priričnik: Trajno usavršavanje medicinskih biokemičara - Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju: svjetlosna i masena mikroskopija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 9-36.

C) Pozvana predavanja na domaćem skupu

1. **Šimonović B**. Kratka analitička validacija Troponina I na analizatoru Architect i1000SR (pozvano predavanje), Simpozij Abbott Diagnostics održan 12.6.2010. u Belom Manastiru.
2. **Vuković B**. Imunofenotipizacija hematoloških neoplazmi: atraktivna alternativa klasičnoj diferencijalnoj krvnoj slici. Trajno usavršavanje medicinskih biokemičara - Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju: svjetlosna i masena mikroskopija. Zagreb, prosinac 2019.

D) Sudjelovanje na znanstvenim skupovima (posterska izlaganja)

1. Sučić M, Marošević L, **Šimonović B,** Marković-Glamočak M, Ries S, Gjadrov-Kuveždić K, Nemet D, Mikulić M, Labar B. CD11a, myeloperoxidase and alkaline expression in bone marrow mature granulopoetic cells in patients with AML and ALL. (abstract). Leukemia and Lymphoma, East and West Together, Dubrovnik, Croatia, October 15-19, 2007. Leukemia Research. Bennet JM, Hamblin TJ (ur). Amsterdam: Elsevier, 2007. S66-S66
2. Flegar-Meštrić Z., Perkov S, Kardum Paro MM, Sikirica M, Ožvald I, **Šimonović B**, Šurina B. Applicability of the recommended reference intervals for serum creatinine concentrations (abstract). Euromedlab Innsbruck 2009; 18th IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Innsbruck, Austria, June 7-11, 2009:W-C025. Clin Chem Lab Med 2009;47, Special Suppl., S376.
3. Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Kardum Paro MM, Ožvald I, **Šimonović B**, Sikirica M. Harmonizacija referentnih intervala za koncentraciju kreatinina u serumu (poster). 6. hrvatski kongres medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem. 30.9.-4.10.2009. Supetar, Brač. Biochemia Medica 2009;19, supplement 1:S177.

4. Ožvald I, Šurina B, Perkov S, **Šimonović B**, Čolić-Cvrlje V, Naumovski-Mihalić S, Kocman B, Vidas Ž, Flegar-Meštrić Z. Effect of primary immunotherapy on post transplantation outcome in HCV-infected liver transplant recipients (abstract). Euromedlab Innsbruck 2009; 18th IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Innsbruck, Austria, June 7-11, 2009:W-A140. Clin Chem Lab Med 2009;47, Special Suppl., S292.

5. **Šimonović B**, Ožvald I, Šurina B, Šiftar Z, Flegar-Meštrić Z. Performance characteristics and clinical usefulness of troponin I assays (abstract). First European Joint Congress of EFCC and UEMS, Lisabon, Portugal, October 13-16, 2010, P18-8, p. 167.

6. Flegar-Meštrić Z, Nazor A, Perkov S, Šurina B, Kardum Paro MM, Šiftar Z, Sikirica M, Sokolić I, Ožvald I, **Šimonović B**, Vidas Ž. The role of laboratory diagnostics in liver transplantation (abstract). First European Joint Congress of EFCC and UEMS, Lisabon, Portugal, October 13-16, 2010, P09-1, p. 83.

7. Flegar-Meštrić Z, Ožvald I, **Šimonović B**, Knotek M, Vidas Ž, Sabljar-Matovinović M. Value of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as biomarker of acute kidney injury after kidney transplantation: A pilot study (abstract). IFCC–WorldLab-EuroMedLab Berlin 2011, Berlin 15-19 May 2011. Clin Chem Lab Med 2011;49, Special supplement; 0712

8. Flegar-Meštrić Z, **Šimonović B**. Performance evaluation of the Roche Elecsys PAPP-A and free beta HCG screening assays (oralna prezentacija). IFCC–WorldLab-EuroMedLab Berlin 2011, Berlin 15-19 May 2011. Clin Chem Lab Med 2011;49, Special supplement; 0983

9. Flegar-Meštrić Z, Šurina B, Perkov S, Ožvald I, **Šimonović B**. Measurement uncertainty for routine measurement procedures in clinical chemistry laboratory accredited according to ISO 15189 (oralna prezentacija). IFCC–WorldLab-EuroMedLab Berlin 2011, Berlin 15-19 May 2011. Clin Chem Lab Med 2011;49, Special supplement; 1198.

10. Omazić J, **Vuković B**, Mandić S, Horvat V, Šerić V. Verification of imprecision for TSH, FT4 and FT3 with 3 different methods (abstract). 15th EFLM Continuos Postgraduate Course in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2015. eA236-Ea237

11. Dobrošević B, **Vuković B**, Pavela J, Lončar B, Šerić V. Anaplastic large-cell lymphoma with aberrant expression of CD13: case report (abstract). EuroMedLab

Athens 2017, Athens, 11-15 June 2017. Clin Chem Lab Med 2017;55, Special suppl, ppS1-S1121

12. **Vuković B,** Marković I, Debeljak Ž, Dobrošević B, Šerić V. Daignostic biomarkers for serotonin producing midgut carcinoid: case report (abstract). IFCC WorldLab 2017-Durban South Africa, 22-25 October 2017. Clin Chem Lab Med 2017;55, Special suppl, ppS1269-S1297

13. **Vuković B**, Dobrošević B, Šerić V. Leukemija vlasastih stanica-varijanta-važnost imunofenotipizacije u diferencijalnoj dijagnozi: prikaz slučaja (poster). 9.kongres Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, 09.-12.05.2018, Zagreb. Biochemia Medica 2018; 28(Suppl 1): S1-S223

14. Dobrošević B, Šimundić T, **Vuković B**, Pavela J, Lukić I, Šerić V.Određivanje ekspresije Toll like receptora 4 kod pacijenata s arterijskom hipertenzijom. 9.kongres Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, 09.-12.05.2018., Zagreb. Biochemia Medica 2018; 28(Suppl 1): S1-S223.