Interakcija albumina s nanočesticama srebra različite površinske funkcionalizacije

Crnković, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:063082

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Tea Crnković

Interakcija albumina s nanočesticama srebra različite površinske funkcionalizacije

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Organska kemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka i neposrednim vodstvom dr. sc. Ivane Vinković Vrček.

Zahvaljujem se svojim mentorima dr. sc. Ivani Vinković Vrček i prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku na povjerenju i strpljenju, za pruženo znanje i iskustvo. Također se zahvaljujem Ivoni Capjak, mag. pharm. iz Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu, dr. sc. Dariji Jurašin s Instituta „Ruđer Bošković“ i doc. dr. sc. Mariji Ćurlin s Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na pruženoj pomoći u eksperimentalnom dijelu ovog rada.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Nanomaterijali i njihova biomedicinska primjena 1

1.2. Nanočestice srebra – važnost i primjena 2

1.3. Istraživanje stabilnosti nanočestica srebra 4

1.4. Ponašanje nanočestica u biološkom sustavu 5

1.5. Interakcija nanočestica s proteinima plazme 5

1.5.1. Proteinska korona 7

1.5.2. Parametri koji utječu na proteinsku koronu 10

1.5.3. Kinetika interakcije nanočestica i proteina 11

2. OBRAZLOŽENJE TEME 13

3. MATERIJALI I METODE 15

3.1. Priprema nanočestica srebra 15

3.1.1. Sintetski postupci pripreme neutralnih nanočestica srebra 19

3.1.2. Sintetski postupci pripreme pozitivno nabijenih nanočestica srebra 20

3.1.3. Sintetski postupci pripreme negativno nabijenih nanočestica srebra 20

3.2. Pročišćivanje sintetiziranih nanočestica 21

3.3. Karakterizacija nanočestica srebra i njihova interakcija s albuminom 21

3.3.1. Atomska apsorpcijska spektroskopija 22

3.3.2. Metoda dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti 22

3.3.3. UV-Vis spektrofotometrija 23

3.3.4. Transmisijska elektronska mikroskopija 24

3.4. Postupak kvantifikacije vezanja nanočestica srebra i albumina 25

3.4.1. Goveđi serumski albumin 25

3.4.2. Fosfatni pufer 26

3.4.3. Fluorimetrija 26

4. REZULTATI I RASPRAVA 29
4.1. Sinteza i karakterizacija nanočestica srebra 29
4.2. Interakcija nanočestica srebra i albumina 35
5. ZAKLJUČAK 42
6. LITERATURA 46
7. SAŽETAK/SUMMARY 52
7.1. Sažetak 52
7.2. Summary 53
8. PRILOZI 54
8.1. DLS distribucija veličina nanočestica srebra 54
8.2. UV-Vis spektri nanočestica srebra 57
8.3. Fluorescencijski spektri albumina uz prisutnost AgNP u ultračistoj vodi 60
8.4. Fluorescencijski spektri albumina uz prisutnost AgNP u fosfatnom puferu 64

POPIS KRATICA I SIMBOLA

AgNP – nanočestice srebra (od eng. *Ag NanoParticles*)

AOT – natrijev bis(2-etilheksil)-sulfosukcinat

AOT-AgNP – nanočestice srebra obložene natrijevim bis(2-etilheksil)-sulfosukcinatom

BSA – goveđi serumski albumin (od eng. *Bovine Serum Albumin*)

CIT-AgNP – nanočestice srebra obložene citratom

CTA – cetiltrimetilamonijev bromid

CTA-AgNP – nanočestice srebra obložene cetiltrimetilamonijevim bromidom

d_H – hidrodinamički promjer [nm]

DLS – dinamičko raspršenje svjetlosti (od eng. *Dynamic Light Scattering*)

ELS – elektroforetsko raspršenje svjetlosti (od eng. *Electrophoretic Light Scattering*)

FP – fosfatni pufer

NP – nanočestice (od eng. *NanoParticles*)

pI – izoelektrična točka

PLL – ε-poli-*L*-lizin

PLL-AgNP – nanočestice srebra obložene ε-poli-L-lizinom

PVP – poli(vinilpirolidon)

PVP-AgNP – nanočestice srebra obložene poli(vinilpirolidonom)

SD – standardna devijacija

SERS – od eng. *Surface Enhanced Raman Scattering*

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

SVD – od eng. *Single Value Decomposition*

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

POPIS SLIKA

Slika 1.1. Jednostavni model koji objašnjava odnos površine i volumena nanočestica (preuzeto iz Goesmann i Feldman, 2010).

Slika 1.3. Trenutna saznanja i nedoumice vezani za okolišne transformacije nanočestica srebra (preuzeto iz Levard i sur., 2012).

Slika 1.5. Hidrofobni učinak (preuzeto iz Hegyi i sur., 2013).

Slika 1.5.1.b. Shematska ilustracija meke i tvrde korone te koncept njihove adsorpcije i desorpcije koji određuje brzinu izmjene proteina u koroni (preuzeto iz Rahman i sur., 2013).

Slika 3.1. Rast i stabilizacija nanočestica (Feldmann i Goesmann, 2010).

Slika 3.4.1. Goveđi serumski albumin (preuzeto iz Majorek i sur., 2012).

Slika 4.1.a. Sintetizirane nanočestice srebra koncetracije 1 mM: a) AOT-AgNP, b) CIT-AgNP, c) CTA-AgNP, d) PLL-AgNP, e) PVP-AgNP.

Slika 4.1.b. TEM slike nanočestica srebra u ultračistoj vodi (skala 100 nm): a) PVP-AgNP, b) CTA-AgNP, c) PLL-AgNP, d) AOT-AgNP, e) CIT-AgNP.

Slika 4.1.c. TEM slike nanočestica srebra u fosfatnom puferu (skala 100 nm): a) PVP-AgNP, b) CTA-AgNP, c) PLL-AgNP, d) AOT-AgNP, e) CIT-AgNP.

Slika 4.2.a. TEM slike nanočestica srebra u fosfatnom puferu s 0.1% BSA (skala 100 nm): a) PVP-AgNP, b) CTA-AgNP, c) PLL-AgNP, d) AOT-AgNP, e) CIT-AgNP.

Slika 4.2.b. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.2 μM) sa šest koncentracija PLL-AgNP (2, 30, 60, 100, 250 i 400 μM) u ultračistoj vodi.

Slika 4.2.c. Primjer logaritamske krivulje PLL-AgNP stvorene u SPECFIT-u. Na apcisi se nalaze koncentracije AgNP, a na ordinati intenzitet fluorescencije BSA stalne koncentracije na 380 nm.

Slika 5.a. Sumarna pojednostavljena shema odnosa površinske funkcionalizacije AgNP, njihove veličine, ζ-potencijala i agregacije ovisno o mediju (skala 100 nm).

Slika 5.b. Grafički prikaz odnosa vrste AgNP i konstante vezanja s BSA ovisno o mediju.

Slika 8.1.1. Dijagram distribucije veličina PVP-AgNP u ultračistoj vodi.

Slika 8.1.2. Dijagram distribucije veličina CTA-AgNP u ultračistoj vodi.

Slika 8.1.3. Dijagram distribucije veličina PLL-AgNP u ultračistoj vodi.

Slika 8.1.4. Dijagram distribucije veličina CIT-AgNP u ultračistoj vodi.

Slika 8.1.5. Dijagram distribucije veličina AOT-AgNP u ultračistoj vodi.

Slika 8.1.6. Dijagram distribucije veličina PVP-AgNP u fosfatnom puferu.

Slika 8.1.7. Dijagram distribucije veličina CTA-AgNP u fosfatnom puferu.

Slika 8.1.8. Dijagram distribucije veličina PLL-AgNP u fosfatnom puferu.

Slika 8.1.9. Dijagram distribucije veličina CIT-AgNP u fosfatnom puferu.

Slika 8.2.1. UV-Vis spektar PVP-AgNP (50 μM) u ultračistoj vodi (UV) i fosfatnom puferu (FP).

Slika 8.2.3. UV-Vis spektar PLL-AgNP (50 μM) u ultračistoj vodi (UV) i fosfatnom puferu (FP).

Slika 8.2.4. UV-Vis spektar CIT-AgNP (50 μM) u ultračistoj vodi (UV) i fosfatnom puferu (FP).

Slika 8.2.5. UV-Vis spektar AOT-AgNP (50 μM) u ultračistoj vodi (UV) i fosfatnom puferu (FP).

Slika 8.2.2. UV-Vis spektar CTA-AgNP (50 μM) u ultračistoj vodi (UV) i fosfatnom puferu (FP).

Slika 8.3.1. Fluorescencijski spektar albumina pri koncentracijama 0.1, 0.15 i 0.2 μM u ultračistoj vodi.

Slika 8.3.2. Fluorescencijski spektar PVP-AgNP i CIT-AgNP koncentracije 100 μM u ultračistoj vodi.

Slika 8.3.3. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.2 μM) i rasponu koncentracija PVP-AgNP od 2 do 500 μM u ultračistoj vodi.

Slika 8.3.4. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.2 μM) i rasponu koncentracija CTA-AgNP od 2 do 500 μM u ultračistoj vodi.

Slika 8.3.5. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.2 μM) i rasponu koncentracija PLL-AgNP od 10 do 400 μM u ultračistoj vodi.

Slika 8.3.6. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.3 μM) i rasponu koncentracija CIT-AgNP od 20 do 900 μM u ultračistoj vodi.

Slika 8.3.7. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.15 μM) i rasponu koncentracija AOT-AgNP od 2 do 500 μM u ultračistoj vodi.

Slika 8.4.1. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.3 μM) i rasponu koncentracija PVP-AgNP od 2 do 900 μM u fosfatnom puferu.

Slika 8.4.2. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.3 μM) i rasponu koncentracija CTA-AgNP od 2 do 800 μM u fosfatnom puferu.

Slika 8.4.3. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.3 μM) i rasponu koncentracija PLL-AgNP od 10 do 900 μM u fosfatnom puferu.

Slika 8.4.4. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.3 μM) i rasponu koncentracija CIT-AgNP od 5 do 900 μM u fosfatnom puferu.

Slika 8.4.5. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.3 μM) i rasponu koncentracija AOT-AgNP od 2 do 450 μM u fosfatnom puferu.

POPIS TABLICA

Tablica 1.1. Povećana primjena nanosrebra u medicinskim proizvodima (preuzeto iz El-Badawy i sur., 2010).

Tablica 1.5.1.a. Različite nanočestice i proteini s kojima se one vežu (preuzeto iz Aggarwal i sur., 2009).

Tablica 1.5.2. Uloga fizikalno-kemijskih svojstava nanočestica i okolišnih čimbenika na proteinsku koronu (preuzeto iz Rahman i sur. 2013).

Tablica 3.4.3. Postupak pripreme 16 reakcijskih smjesa ukupnog volumena 0.5 mL za mjerenje fluorescencije BSA uz prisutnost nanočestica srebra u vodi i fosfatnom puferu (FP).

Tablica 4.1.a. Hidrodinamički promjer (dH) nanočestica srebra u ultračistoj vodi nakon 1 h dobiven iz distribucija veličine prema volumenu i intenzitetu.

Tablica 4.1.b. Zeta (ζ)-potencijal nanočestica srebra u ultračistoj vodi (UV) i fosfatnom puferu (FP).

Tablica 4.1.c. Hidrodinamički promjer (dH) nanočestica srebra u fosfatnom puferu nakon 1 h dobiven iz distribucija veličine prema volumenu i intenzitetu.

Tablica 4.1.d. Optički parametri nanočestica srebra u ultračistoj vodi (UV) i fosfatnom puferu (FP).

Tablica 4.2.a. Hidrodinamički promjer (dH) nanočestica srebra u fosfatnom puferu s 0.1% BSA nakon 1 h dobiven iz distribucija veličine prema volumenu i intenzitetu.

Tablica 4.2.b. Zeta (ζ)-potencijal nanočestica srebra u fosfatnom puferu i 0.1% BSA nakon 1 h.

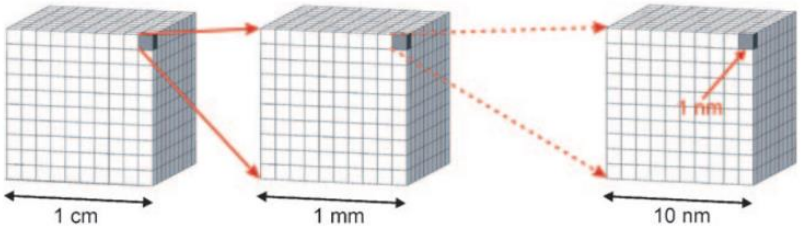
Tablica 4.2.c. Izračunate konstante vezanja gašenjem fluorescencije BSA u prisutnosti nanočestica srebra u ultračistoj vodi i fosfatnom puferu.

Tablica 5. Usporedba ponašanja nanočestica srebra u fosfatnom puferu (FP) u odnosu na ultračistu vodu i fosfatnom puferu s BSA (FP + BSA) u odnosu na čisti fosfatni pufer.

1. UVOD

1.1. Nanomaterijali i njihova biomedicinska primjena

Nanotehnologija istražuje i razvija nanosustave čiji su sastavni elementi nanočestice (NP, od eng. *NanoParticles*) (National Nanotechnology Initiative, 2000). Nanočestice definiramo kao čestice koje barem jednu dimenziju imaju u rasponu od 1 do 100 nm, pa je njihovo osnovno svojstvo iznimno veliki omjer površine u odnosu na volumen. Za slikoviti prikaz se može uzeti kocka duljine bridova 1 cm koja ima volumen 1 cm^3 i površinu od 0.0006 m^2 (prikazano na slici 1.1). Dijeljenjem te kocke na manje kockice duljine bridova 1 nm ostaje isti volumen od 1 cm^3, no zbroj njihovih površina je nevjerojatnih 6000 m^2.



Duljina bridova kocke	Broj kocki	Volumen kocki	Površina kocki
1 cm	1	1 cm^3	0.0006 m^2
1 mm	10^3	1 cm^3	0.006 m^2
1 μm	10^{12}	1 cm^3	6 m^2
1 nm	10^{21}	1 cm^3	6000 m^2

Slika 1.1. Jednostavni model koji objašnjava odnos površine i volumena nanočestica (preuzeto iz Goesmann i Feldman, 2010).

U usporedbi s velikim trodimenzionalnim krutinama, kod NP su fizikalno-kemijska svojstva ovisna o njihovoj površini, zbog velikog broja nezasićenih veznih i koordinacijskih mjesta te brojnih slabo vezanih atoma na površini. Važni primjeri ovog fenomena su sniženje ledišta (što je osobito dokumetirano kod zlatnih nanočestica) i značajno povećanje kemijske reaktivnosti (Goesmann i Feldman, 2010).

Nanočestice su potencijalno korisna sredstva u medicini i biologiji, jer imaju srazmjernu veličinu kao važne biološke komponente (DNA, proteini, stanične membrane) te zbog toga mogu djelovati na staničnoj razini. Sposobnost manipuliranja određenim svojstvima nanočestica otvara mnoge mogućnosti u racionalnom dizajnu nanočestica u svrhu ciljanog transporta lijekova ili u dijagnostičke svrhe (Aggarwal i sur., 2009).

1.2. Nanočestice srebra – važnost i primjena

Nanočestice srebra (AgNP, od eng. *Ag NanoParticles*), kao i nanočestice drugih metala, imaju drugačija fizikalna, kemijska, biološka i optička svojstva u odnosu na „standardne" kemikalije. Uslijed veličine na nanorazini, a pod utjecajem kemijskog sastava i površinske strukture, mogu im se modificirati svojstva poput topljivosti, oblika i sklonosti agregiranju. One se, primjerice, odlikuju pojavom površinske plazmonske rezonancije (SPR, od eng. *Surface Plasmon Resonance*) koja je posljedica kolektivnih oscilacija ili fluktuacija u elektronskoj gustoći s interaktivnim elektromagnetskim poljem. Te oscilacije su jako osjetljive na adsorpciju molekula na metalne površine.

Zbog svih tih svojstava AgNP danas imaju vrlo raširenu primjenu i upotrebu u mnogim gospodarskim područjima, uključujući potrošačke proizvode, biomedicinu, transport, energiju i agronomiju. Npr. AgNP se koriste u SERS (od eng. *Surface Enhanced Raman Scattering*) spektroskopiji, za detekciju DNA sljedova, laserskoj desorpciji, ionizacijskoj masenoj spektrometriji peptida, kolorimetrijskom određivanju histidina i herbicida, identifikaciji bakterija te u mnogim drugim istraživačkim područjima. U industriji se koriste kao katalizatori; srebrne nanožice služe kao nanokonektori i nanoelektrode za elektroničke uređaje, a u svakodnevnim proizvodima AgNP se zbog svojih antibakterijskih svojstava mogu naći u tekstilu, šamponima, filterima za zrak, premazima na hladnjacima i perilicama za rublje, spremnicima za hranu itd. (Height, 2011). U biomedicini se zbog svojih antimikrobnih svojstava AgNP koriste za liječenje opeklina i kao prevlake na kirurškim instrumentima i implantacijskim spravama. Također služe kao biosenzori za detekciju *E. coli* u sokovima i mlijeku, a u konjugaciji s 9-aminoakridinom (antitumorskim lijekom) koriste se u istraživanjima antiproliferativnih učinaka na HeLa stanicama (Mariam i sur., 2011). Uz to su AgNP pokazale antitrombocitna svojstva *in vivo* što je korisno u tretmanima tromboembolijskih poremećaja. Antikoagulacijske i trombolitičke terapije su obično popraćene ozbiljim komplikacijama vezanima s krvarenjem, a AgNP mogu ovdje poslužiti kao potencijalni antitrombolitici, jer ne pokazuju litičke utjecaje na trombocite (Shrivastava i sur., 2009). Tablica 1.1. prikazuje neke od najučestalijih primjena AgNP u biomedicini.

Tablica 1.1. Povećana primjena nanosrebra u medicinskim proizvodima (preuzeto iz El-Badawy i sur., 2010).

Područje	Primjeri
Anesteziologija	Impregnacija maski za disanje, endotrahealne cijevi za mehaničku ventilacijsku pomoć
Kardiologija	Impregnacija katetera za praćenje
Zubarstvo	Aditivi u dentalnim materijalima, srebrom punjene SiO_2 nanokompozitne smole
Dijagnostika	Biodetekcija, ultraosjetljive i ultrabrze platforme za kliničke testove za dijagnozu infarkta miokarda, fluorescentno opažanje RNA
Dostava lijeka	Udaljenom laserskom zrakom inducirani otvor mikrokapsula
Očna njega	Prevlaka na kontaktnim lećama
Vizualizacija	Nanokompoziti za stanično obilježavanje i vizualiziranje
Neurokirurgija	Impregnacija katetera za drenažu cerebrospinalne tekućine
Ortopedija	Aditivi u cementima za kost, implantati za zamjenu zglobova, ortopedske čarape
Palijativa	Superapsorbirajući hidrogel za materijale za inkontinenciju
Farmaceutici	Tretmani za dermatitis, ulcerozni kolitis i akne, inhibicija HIV-1 replikacije
Kirurgija	Impregnacija bolničkog tekstila (kirurške odore, maske...)
Urologija	Impregnacija kirurške mreže za zdjeličnu rekonstrukciju

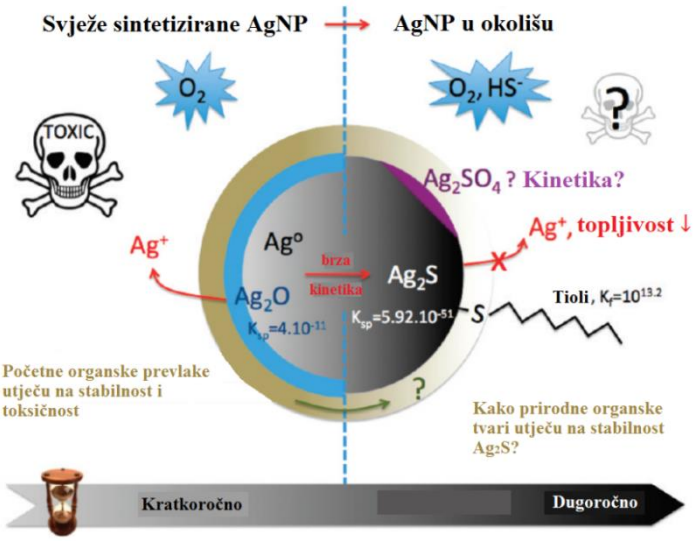
Ovakva široka primjena AgNP, uz sve potencijalne dobrobiti, povećava također mogućnost izravnog i neizravnog kontakta sa živim organizmima. Unatoč vrlo raširenoj primjeni, podaci o sigurnoj primjeni i mogućim posljedicama na ljudsko zdravlje i okoliš još uvijek su nedostatni. Ljudi mogu biti izloženi nanočesticama putem različih načina unosa (udisanje, gutanje, injektiranje...) i potreban je oprez, jer istraživanja pokazuju da čak i male koncentracije AgNP mogu biti toksične (Asharani i sur., 2009). Brojna istraživanja su pokazala da AgNP djeluju citotoksično i genotoksično, te da mogu uzrokovati apoptozu i nekrozu stanica (Carlson i sur., 2008). Osim toga, negativni utjecaji AgNP mogu se odraziti na kardiovaskularnom ili središnjem živčanom sustavu i na taj način dovesti do neurotoksičnosti ili imunotoksičnosti (Durán i sur., 2015).

1.3. Istraživanje stabilnosti nanočestica srebra

Poznato je da nanočestice srebra nisu termodinamički stabilne pri okolišnim uvjetima, te da mogu oksidirati ili reagirati s mnogim (an)organskim ligandima (Levard i sur., 2012). Poznato je da srebro reagira sa sulfidima, kloridima i organskim tvarima, a za AgNP se očekuje, zbog veličine na nanorazini, da će kinetika korozije i reaktivnost biti brža od makroskopskog srebra što značajno skraćuje vijek metalnog srebra u okolišu. Poznati korozivni agensi srebra su sveprisutni u prirodi i posljedično će okolišne promjene AgNP jako utjecati na njihova površinska svojstva (Liu i sur., 2010).

Tijekom priprave različitih vrsta AgNP obično se primjenjuje stabilizacija kako ne bi došlo do njihove agregacije putem adsorpcije ili kovalentnog vezanja na komponente medija. Stabilizacijske molekule na površini nanočestica pružaju elektrostatske, steričke ili elektrosteričke odbijajuće sile između samih čestica i na taj način spriječavaju pojavu agregacije (Phenrat i sur., 2008). Ako su ove molekule korištene za vrijeme sinteze, često se nazivaju „oblagajućim agensima“ ili „prevlakama“ i omogućuju kontrolu veličine i oblika sintetiziranih nanočestica. Ovisno o okolišnim uvjetima, stabilizatori utječu na površinski naboj, agregaciju i toksičnost AgNP.

Zbog oksidacije i snažnog afiniteta Ag za kisik, klor, sumpor i organske tvari (pogotovo one koje sadrže tiolne skupine), vijek AgNP u okolišu može biti vrlo kratak. Sulfidacija je jedan od mogućih procesa korozije, jer je Ag_2S vrlo stabilan i otvorena su mnoga pitanja vezanja za stabilnost nanometarskog Ag_2S kako je prikazano na slici 1.3.



Slika 1.3. Trenutna saznanja i nedoumice vezani za okolišne transformacije nanočestica srebra (preuzeto iz Levard i sur., 2012).

Stabilnost nabijenih nanočestica - koloida obično se opisuje DLVO teorijom koja je dobila ime prema Borisu **D**erjaguinu, Levu **L**andau, Evertu **V**erweyu i Theodooru **O**verbeeku. Ova teorija tvrdi da su koloidne otopine nanočestica stabilne kada elektrostatska odbijanja nadjačaju Van der Waalsova privlačenja. U suprotnom, one aglomeriraju sve dok ograničenje transporta ne okonča taj proces što se obično postigne kod makroskopskih aglomerata. Stabilne nakupine se stvaraju kada je proces aglomeracije smanjen sekundarnim procesima (Moerz i sur., 2015).

1.4. Ponašanje nanočestica u biološkom sustavu

Nanočestice ulaze u interakciju sa stanicama i općenito živim organizmima na fundamentalno drugačiji način od ostalih malih molekula. Čestice manje od 100 nm mogu ući u stanicu, manje od 40 nm mogu ući u jezgru, a čestice manje od 35 nm mogu proći krvno-moždanu barijeru (Saptarshi i sur., 2013). One mogu doći i u interakciju s različitim biomolekulama poput proteina, nukleinskih kiselina, lipida, pa čak i bioloških metabolita. Nanočestice korištene u medicinske svrhe često se daju parenteralno. Kao i kod ostalih stranih tvari, tijelo stvara biološki odgovor na unesene čestice. Ovaj odgovor je rezultat kompleksnog međudjelovanja faktora koji nisu samo posljedica intrizičnih karakteristika nanočestica (Aggarwal i sur., 2009).

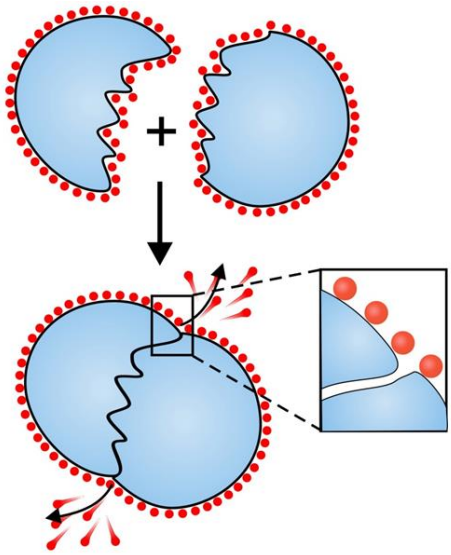
Nanočestice zbog svoje veličine obrađuju se i unose u stanice aktivnim, energijski ovisnim putem. U takvim aktivnim procesima, prvi kontakt između stanice i organizma je posredovan preko površine nanočestica u biološkom mediju. Iznenađujuće s obzirom na jako veliki interes za bionano interakcije s organizmima, relativno se malo zna o strukturi i organizaciji nanočestica u biološkom mediju za razliku od spoznaja o nanočesticama u jednostavnim otapalima (Walczyk i sur., 2010).

1.5. Interakcija nanočestica s proteinima plazme

U trenutku ulaska nanočestica u biološki medij, biomolekule stupaju u izravnu interakciju s tim nanočesticama. Proteini u interakciji s nanočesticama djeluju kao surfaktanti. Elektrostatske, disperzne i kovalentne interakcije dovode do adsorpcije proteina na površinu nanočestica i posljedično do promjene njihove konformacije (Moerz i sur., 2015). Vezanje proteina na planarne površine često dovodi do značajnih promjena u sekundarnoj strukturi, ali

velika zakrivljenost nanočestica može pomoći proteinima da sačuvaju početnu strukturu (Rahman i sur., 2013). Unatoč tome, istraživanja na raznim nanočesticama i proteinima pokazuju da ipak može doći do pertubacija proteinske strukture. Npr. lizozim adsorbiran na silika nanočestice ili albumin adsorbiran na zlatne nanočestice pokazuju brze konformacijske promjene i u sekundarnoj i u tercijarnoj strukturi (Rahman i sur., 2013). Promjene u proteinskoj strukturi mogu dovesti do gubitka tolerancije što može u najgorem slučaju dovesti do autoimunog odgovora, pa se o takvim promjenama vodi velika briga (Saptarshi i sur., 2013).

Adsorpcija može povećati ili smanjiti koloidnu stabilnost nanočestica na način da proteini uzrokuju aglomeraciju smanjenjem površinskog naboja na površini nanočestica ili izravnim vezanjem istovremeno na dvije nanočestice. Koloidna stabilnost nanočestica može se povećati ako protein ima ulogu razdvajatelja između pojedinih čestica te uzrokuje steričku i entropijsku stabilizaciju (Chanana i sur., 2013; Zook i sur., 2011). Općenito, adsorpcija proteina na nanočestice događa se isključivo zbog povećanja ukupne entropije proteina na površini nanočestica i zbog nespecifičnih interakcija između proteina i nanočestica što poglavito ovisi o fizikalno-kemijskim osobinama (Nakanishi i sur., 2001; Walkey i sur., 2012). Jedna od značajnijih nespecifičnih, nekovalentnih vezanja između nanočestica i proteina čine hidrofobne interakcije u kojima hidrofobni dijelovi molekula međusobnim vezanjem istiskuju molekule vode sa svoje površine i na taj način postaju stabilnije (Slika 1.5.).



Slika 1.5. Hidrofobni učinak (preuzeto iz Hegyi i sur., 2013).

Mehanizam vezanja proteina još nije dobro razjašnjen, niti je poznato kako to vezanje utječe na biološki odgovor prema određenoj nanočestici (npr. unos u fagocite retikuloendotelnog sustava). Unatoč tome je jasno da količina i vrsta proteina na površini nanočestica utječe na biodistribuciju i biološki identitet samih čestica. Biološki identitet određuje fiziološki odgovor uključujući aglomeraciju, stanični unos, vrijeme cirkulacije, signalizaciju, kinetiku, transport, akumulaciju i toksičnost (Hegyi i sur., 2013). Primjeri su vezanje opsonina poput IgG-a, faktora komplementa i fibrinogena koji poboljšavaju fagocitozu i konačno uklanjanje čestica iz sistemske cirkulacije preko stanica retikuloendotelnog sustava, dok vezanje dizopsonina poput albumina dovodi do produženog cirkulacijskog vremena u krvi (Goppert i Muller, 2005; Moghimi i sur., 1993). Vezanje određenih apolipoproteina može biti korisno kod distribucije nanočestica kroz krvno-moždanu barijeru (Goppert i Muller, 2003). Vezanje ovih proteina pokazalo je i visoku korelaciju s brzim unosom u jetru i slezenu čime je povećano uklanjanje čestica preko retikuloendotelnog sustava što je nepoželjni ishod ako se želi povećati cirkulacija i zadržavanje nanočestica u tijelu (Owens i Peppas, 2006).

1.5.1. Proteinska korona

Većina je materijala nakon kontakta s biološkim matriksima odmah obložena proteinima koji stvaraju tzv. proteinsku koronu (Sahoo i sur., 2007; Lynch i Dawson, 2008). Proteinska korona je po svojem sastavu iznimno kompleksna i promjenjiva. Cijeli proteom plazme sastoji se od otprilike 3700 proteina od kojih je barem 50 povezano s asocijacijom na nanočestice (Kim i sur., 2007). U tablici 1.5.1.a prikazane su pojedine nanočestice i proteini za koje je poznato da se međusobno vežu. U literaturi je poznat veliki broj nanočestica različitih površinskih modifikacija koje su istražene različitim metodama kako bi se otkrio sastav njihovih proteinskih korona. Sažetak tih istraživanja pokazuje da su kod svih proučavanih korona na različitim nanočesticama prisutni albumin, imunoglobulin G, fibrinogen i apolipoproteini (Aggarwal i sur., 2009).

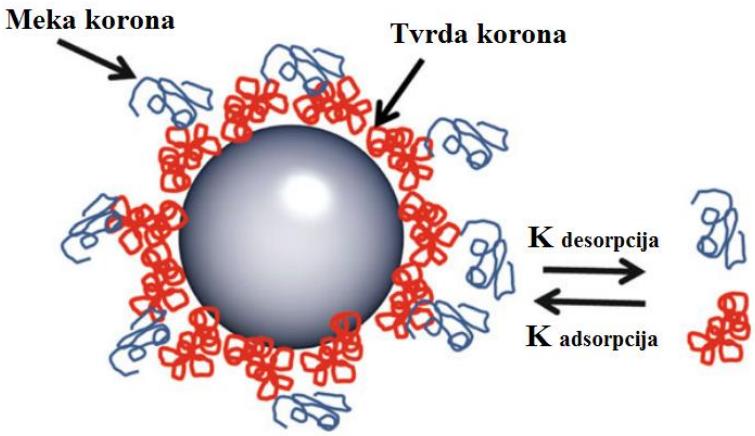
Tablica 1.5.1.a. Različite nanočestice i proteini s kojima se one vežu (preuzeto iz Aggarwal i sur., 2009).

Vrsta nanočestica	Identificirani proteini
Polistiren s poloksamerom	Faktor B, transferin, albumin, fibrinogen, IgG, apolipoproteini
Liposomi	Albumin, fibrinogen, apolipoproteini, IgG, α1-antitripsin, α2-makroglobulin, IgM
Jednozidne ugljikove nanocijevi	Albumin
Čvrste lipidne nanočestice s Tween 80 ili poloksamerom	Fibrinogen, IgG, IgM, apolipoproteini (osim ApoE), transtiretin
Nanočestice poli(laktične kiseline) s PEG-om	Albumin, fibrinogen, apolipoproteini, IgG
Poliheksadecilcijanoakrilatne nanočestice	Albumin, apolipoproteini, IgG, transferin
Nanočestice željezovog oksida	Albumin, IgG, IgM, fibrinogen, C3b
Polistiren s Rodaminom B	Albumin, IgG, fibrinogen, apolipoproteini, PLS:6
Kationski lipopleksi i polipleksi	Albumin
Anionske i metalne površine, hidrofilne anorganske nanočestice	Transferin, haptoglobulin, fetuin A, kininogen, unutarnji faktori zgrušavanja

Struktura i sastav proteinske korone ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima nanočestica, prirodi fiziološkog okruženja (krv, intersticijska tekućina, stanična citoplazma...) i duljini izlaganja. Proteinska korona mijenja veličinu i granični sastav nanočestica dajući im novi biološki identitet. Debljina poteinske korone ovisi o nizu čimbenika poput koncentracije proteina te veličine i površinskih svojstava nanočestica. Utvrđeno je da je debljina proteinskih korona koje se stvaraju nakon izlaganja nanočestica proteinima plazme otprilike 3-15 nm što je predebelo za samo jedna sloj adsorbiranih proteina.

Model proteinske korone predložili su Simberg i suradnici (Simberg i sur., 2009). Proteini koji se vežu velikim afinitetom na nanočestice tvore tzv. *tvrdu koronu* koja se sastoji od čvrsto vezanih proteina koji se teško desorbiraju, dok proteini koji se vežu slabim afinitetom stvaraju *meku koronu* (Slika 1.5.1.b). Tvrda i meka korona se također mogu definirati ovisno o brzini izmjene koja kod čvrste korone iznosi oko par sati (Monopoli i sur., 2011). Hipoteza je da su proteini čvrste korone, tj. primarno vezani proteini, u izravnoj interakciji s površinom nanočestica, a proteini meke korone, tj. sekundarno vezani proteini su u interakciji sa čvrstom

koronom preko interakcija protein-protein (Walkey i Chan, 2012). Takva višeslojna struktura ima značaj kod fiziološkog odgovora na nanočestice, jer sekundarno vezani proteini mogu promijeniti aktivnost primarno vezanih proteina ili ih mogu „maskirati“ i na taj način spriječiti njihovu interakciju s okolinom (Rahman i sur., 2013). U slučaju nekih nanočestica, pogotovo onih koje već imaju funkcionalnu grupu poput polietilen-glikola (PEG), postoji samo meka korona (Lundqvist i sur., 2011).



Slika 1.5.1.b. Shematska ilustracija meke i tvrde korone te koncept njihove adsorpcije i desorpcije koji određuje brzinu izmjene proteina u koroni (preuzeto iz Rahman i sur., 2013).

Vrlo je vjerojatno da se proteini koji su u visokim koncentracijama u plazmi prvi vežu za površinu nanočestica, no tijekom vremena ti proteini mogu disocirati i biti zamijenjeni proteinima niže koncentracije, ali većeg afiniteta (Lynch i sur., 2007). Cijeli proces kompetitivne adsorpcije proteina na ograničenu površinu temeljene na koncentraciji, afinitetu i inkubacijskom vremenu je poznat kao *„Vromanov efekt“* (Goppert i Muller, 2005). Proteini adsorbirani na nanomaterijale su u kontinuiranom stanju dinamičke izmjene. U bilo kojem trenutku proteini se mogu desorbirati omogućujući drugim proteinima da dođu u interakciju s površinom nanočestica (Rahman i sur., 2013). Ovaj učinak je važno uzeti u obzir prilikom razmatranja distribucije nanočestica u tijelu. Kako se čestice raspoređuju iz krvi na ostala mjesta, razlike u koncentracijama proteina kao i njihovi afiniteti vezanja mogu igrati važnu ulogu u tome kako će se formirati proteinska korona.

Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se bolje razumjelo zašto pojedini nanomaterijali uzimaju određene proteine za stvaranje korone. Za sada je poznato da razni čimbenici poput veličine nanočestica, oblika, zakrivljenosti, površinskog naboja, topljivosti, površinske modifikacije i način unosa nanočestica u tijelo bitno utječu na sastav, debljinu i konformaciju proteinske korone (Lundqvist i sur., 2008). Također, bolje poznavanje uloge fizikalno-kemijskih čimbenika proteinske korone može pomoći pri oblikovanju ciljanih nanomaterijala i dugocirkulirajućih nosača lijekova smanjene toksičnosti.

1.5.2. Parametri koji utječu na proteinsku koronu

Od značajnije uloge i utjecaja na stvaranje proteinske korone ima površinski naboj nanočestica. Primijećeno je da se povećanjem naboja na površini nanočestica povećava i adsorpcija proteina. Pozitivno nabijene nanočestice preferiraju adsorpciju proteina s izoelektričnim točkama (pI) manjima od 5.5 poput albumina, dok negativni površinski naboj bolje adsorbira proteine s pI iznad 5.5 poput IgG-a (Aggarwal i sur., 2009). Površinski naboj može također denaturirati adsorbirane proteine. U nedavnim istraživanjima na zlatnim nanočesticama s pozitivnim, negativnim i neutralnim ligandima otkriveno je da se proteini denaturiraju u prisutnosti nabijenih liganada (i pozitivnih i negativnih), dok neutralni ligandi očuvaju prirodnu strukturu proteina (Lynch i Dawson, 2008).

Drugi čimbenik koji utječe na proteinsku koronu je površinska funkcionalizacija nanočestica. Korištenjem raznih prevlaka i stabilizatora može se smanjiti adsorpcija proteina ili modelirati građa proteinske korone. Dostupni podaci o ulozi funkcionalnih grupa na proteinsku koronu još su nedostatni i potrebne su daljnje studije na tu temu.

Hidrofobnost je sljedeći čimbenik koji utječe i na količinu i na sastav adsorbiranih proteina. Povećana adsorpcija proteina na hidrofobne površine za razliku od hidrofilnih površina povećava brzinu opsonizacije nanočestica (Rahman i sur. 2013). Hidrofobne nanočestice adsorbiraju više molekula albumina iako je afinitet proteina za obje vrste nanočestica isti (Lindman i sur., 2007).

Zbog zakrivljenosti površine afiniteti vezanja proteina se razlikuju između nanočestica i ravnih površina. Zbog toga se ne smiju ekstrapolirati na nanočestice rezultati dobiveni istraživanjima na ravnim površinama. Usto je sastav proteinske korone različit za istu vrstu nanočestica drugačije veličine. Razlika u sastavu i organizaciji proteina korone je jako

značajna kada se veličina nanočestica približi veličini proteina (Lynch i Dawson, 2008). Jako zakrivljene površine nanomaterijala smanjuju interakcije između proteina i proteini adsorbirani na jako zakrivljenim nanočesticama prolaze kroz manje promjena u svojoj konformaciji. Sažetak svih značajnih fizikalno-kemijskih svojstava nanočestica i okolišnih čimbenika na proteinsku koronu prikazan je u tablici 1.5.2.

Tablica 1.5.2. Uloga fizikalno-kemijskih svojstava nanočestica i okolišnih čimbenika na proteinsku koronu (preuzeto iz Rahman i sur., 2013).

Čimbenik	Učinak
Veća gustoća naboja na nanočesticama	• povećana gustoća i debljina korone • nanočestice imaju veću brzinu opsonizacije • povećane konformacijske promjene proteina
Veća hidrofobnost nanočestica	• povećana debljina korone • povećane konformacijske promjene proteina • nanočestice imaju veću brzinu opsonizacije
Veća zakrivljenost nanočestica	• povećana debljina korone • smanjene konformacijske promjene proteina • ne mijenja identitet adsorbiranih proteina
Viša koncentracija proteina u okolišu	• povećana debljina korone • promjena u identitetu adsorbiranih proteina

1.5.3. Kinetika interakcije nanočestica i proteina

Proteinske interakcije mogu se svrstati u različite skupine ovisno o svojim molekularnim svojstvima i funkcijama molekula s kojima se vežu. Tako na primjer imamo interakcije s drugim proteinima, ugljikohidratima, lipidima, malim molekulama ili nukleinskim kiselinama. Sve te interakcije, u koje mogu ulaziti i nanočestice, nazivaju se protein-ligand interakcije. Čimbenici koji određuju pojedinu protein-ligand interakciju uključuju koncentracije pojedinih specija, afinitet vezanja te konstante brzine asocijacije i disocijacije. Načelo vezanja proteina i liganda može se prikazati jednostavnom jednadžbom 2. reda:

$$P + L \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} PL$$

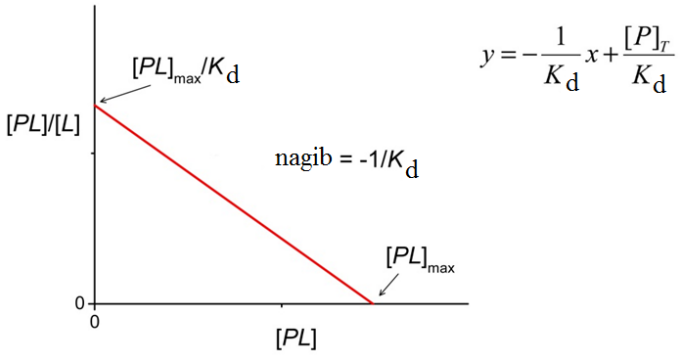
gdje su k_a i k_d konstante brzine asocijacije i disocijacije, P je protein, L je ligand, a PL je protein-ligand kompleks. Iz ove jednadžbe se mogu dobiti ravnotežne konstante asocijacije (K_a) i disocijacije (K_d):

$$\mathbf{K_d} = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_d}{k_a} \qquad \mathbf{K_a} = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{k_a}{k_d}$$

gdje su [P] koncentracija proteina, [L] koncentracija slobodnog liganda i [PL] koncentracija protein-ligand kompleksa u ravnoteži. Što je konstanta disocijacije niža, to je jače vezanje između proteina i liganda. U biološkim sustavima jako vezanje obično ima konstante disocijacije 10^{-9} M ili manje. Prema 2. zakonu termodinamike, pri konstantnom tlaku i temperaturi, reakcija će se odvijati spontano ako je razlika Gibbsove slobodne energije između konačnog i početnog stanja manja od 0. Kako se reakcija približava ravnoteži apsolutna vrijednost slobodne Gibbsove energije se smanjuje i u ravnoteži dobiva vrijednost $\Delta G = 0$. Također su koncentracije reaktanata i produkata uravnotežene i njihov omjer daje konstantu disocijacije, odnosno asocijacije (Hegyi i sur., 2013). Zbog toga se standardna slobodna Gibbsova energija može izravno odrediti iz ravnotežnih konstanti:

$$\Delta G^0 = - RT \ln K_a = RT \ln K_d$$

Dakle, poznavanjem koncentracija pojedinih reaktanata i produkata moguće je odrediti njihovu konstantu vezanja. Uvođenjem ukupne koncentracije proteina u reakcijskoj otopini može se izvesti linearna jednadžba i dijagram koji jasno pokazuje odnos koncentracija i ravnotežnih konstanti:



$$y = -\frac{1}{K_d}x + \frac{[P]_T}{K_d}$$

Ovaj prikaz se zove Scatchardov dijagram, no njegova je mana da iskrivljava eksperimentalne greške. Danas se ovaj dijagram rijetko koristi zbog dostupnih računalnih programa uz koje se jednostavno mogu izračunati ravnotežne konstante bez linearizacije (Hegyi i sur., 2013).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U današnjim predkliničkim testiranjima farmaceutskih molekula, među kojima se nalaze i nanočestice za biomedicinsku primjenu, evaluacija vezanja proteina plazme je najvažniji element kod određivanja efikasnosti, sigurnosti i raspolaganja s tim molekulama (Semple i sur., 1998). Zbog toga je ključno razumjeti mehanizam interakcije nanočestica s biomolekulama (Podila i sur., 2012). Za razvoj i primjenu nanočestica u biomedicinske svrhe nužno je dobiti informacije o njihovoj interakciji s proteinima, te o načinu i uvjetima stvaranja proteinske korone na površini tih nanočestica.

Da bi se u potpunosti razumjela proteinska korona, treba utvrditi ne samo koji se proteini vežu za nanočesticu, već i kinetiku, afinitet i stehiometriju proteinske asocijacije s nanočesticama (Walkey i Chan, 2012). Također, primijećeno je da stvaranje proteinske korone značajno ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima nanočestica zajedno sa svojstvima samih proteina koji se vežu za njih. Površinska funkcionalizacija je redovna tehnika za dobivanje biokompatibilnih metalnih nanočestica za biomedicinske aplikacije (Ravindran i sur., 2010), pa je važno razumijeti ulogu površinske funkcionalizacije nanočestica u svrhu kontroliranja interakcije nanočestica i proteina (Walkey i sur., 2012).

U ovom je istraživanju primijenjen modelni sustav koji se sastojao od srebrnih nanočestica i albumina. Srebrne nanočestice (AgNP) su izabrane jer su najzastupljenije metalne nanočestice u biomedicinskoj primjeni nanotehnologije. U ovom radu sintetizirano je 5 vrsta AgNP s različitim površinskim omotačima: dvije vrste s pozitivnim površinskim nabojem (ε-poli-L-lizin i cetiltrimetilamonij bromid), dvije vrste s negativnim (Na_3-citrat i bis(2-etilheksil)-sulfosukcinat) i jedna neutralna AgNP (poli-vinilpirolidon). Istraživana je njihova asocijacija s govođim serumskim albuminom (BSA, od eng. *Bovine Serum Albumine*) koristeći raznovrsne metode – metodu dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti, transmisijsku elektronsku mikroskopiju, UV-Vis spektrofotometriju te fluorimetriju. Albumin je logičan izbor za studiju vezanja na nanočestice srebra, jer se pokazao kao jedan od najvažnijih proteina plazme koji se veže na nanočestice koje dođu u kontakt s plazmom (Tablica 1.5.1.a).

Zbog podložnosti AgNP okolišnim transformacijama potrebno je raditi studije i na svježe sintetiziranim i na nanočesticama izloženima okolini u kojoj se želi istražiti njihov učinak što

je u ovome radu fosfatni pufer kao model biološkog medija. *In vitro* testovi koriste različite pufere za održavanje fiziološkog pH i najčešće korišteni je fosfatni pufer. Prethodna istraživanja su pokazala da komponente pufera mogu utjecati ne samo na fizikalno-kemijska svojstva nanočestica, nego i na njihovo biološko djelovanje što uključuje i sposobnost adsorpcije proteina (Domazet Jurašin i sur., 2016). Stoga je istraživanje interakcije AgNP s BSA provedeno u dva različita medija – ultračistoj vodi i fosfatnom puferu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Priprema nanočestica srebra

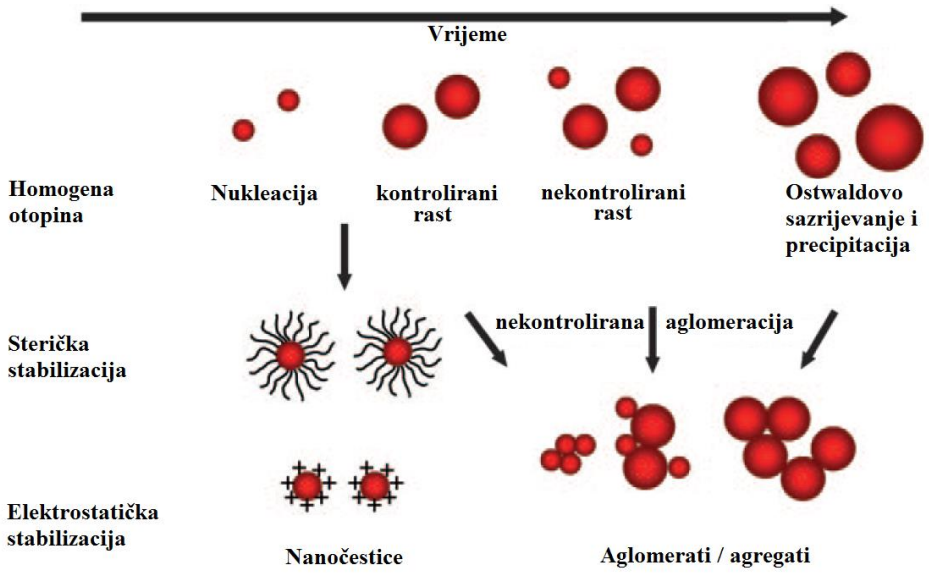
Napredak u području nanomaterijala omogućio je pripravljanje nanočestica srebra različitih oblika, veličina i površinskih svojstava. Najveći izazov kod sinteza je kontrola veličine i oblika čestica. U literaturi je prisutan veliki broj različitih metoda sinteza AgNP koje se mogu klasificirati prema pristupu, a razlike su svedene na specifične reaktante i reakcijske uvjete (El-Badawy i sur., 2010). Dvije su osnovne sintetske strategije:

Top-down tehnike temelje se na stvaranju izoliranih atoma iz većih komada materijala koristeći razne tehnike distribucije. Obično se primjenjuju fizikalne metode poput mljevenja, rezanja, ponavljajućeg suzbijanja ili fotolitografije. Nedostatak ove tehnike je prisutnost površinskih nedostataka na nanostrukturama koje značajno utječu na njihova svojstva.

Bottom-up tehnike započinju s otopljenim solima srebra koje se reduciraju pri čemu nastaju nanočestice procesom nukleacije i rasta. Kod ovih tehnika potrebno je koristiti raličite tvari (surfaktante, polielektrolite, polimere) za stabilizaciju nastalih nanočestica te omogućiti kontrolu veličine i oblika nanočestica. Nedostaci *bottom-up* tehnike su nemogućnost masovne proizvodnje za industrijsku primjenu i akumulacija zaostalih kemikalija u suspenzijama nanočestica. Od tih nečistoća najčešće je ionsko srebro, jer učinkovitost redukcije nikada nije 100% (El-Badawy i sur., 2010).

Nastajanje nanočestica odvija se u tri faze: 1) nukleacija, 2) evolucija jezgri u klice i 3) rast klica u nanokristale (Slika 3.1.). Ovdje su klice definirane kao čestice veće od jezgara koje više nemaju fluktuacije strukture. Nukleacija predstavlja prvi korak u procesu kristalizacije. Polaganim porastom koncentracije atoma dolazi se do točke superzasićenja gdje se atomi počinju agregirati u male nakupine (jezgre) procesom samonukleacije. Jednom formirane jezgre zatim ubrzano rastu i koncentracija metalnih atoma u otopini pada. Ako koncentracija atoma brzo padne, ispod razine minimalnog superzasićenja, dodatna se nukleacija neće više dogoditi. Kontinuiranim dovođenjem atoma putem kemijske reakcije jezgre će rasti u sve veće nanokristale dok se ne postigne ravnoteža između atoma na površini nanokristala i atoma u otopini. Osim rasta putem dodavanja pojedinačnih atoma, jezgre i nanokristali se mogu spajati u veće čestice aglomeracijom (Slika 3.1.). Kod dobivanja atoma redukcijom iz viših oksidacijskih stanja, kao što je slučaj kod redukcije Ag^{+}, nije sigurno je li srebro prvo

reducirano u metalno srebro koje se zatim agregira u jezgre i raste u nanokristale ili nereducirane specije tvore jezgre prije same redukcije (Feldmann i Goesmann, 2010).



Slika 3.1. Rast i stabilizacija nanočestica (Feldmann i Goesmann, 2010).

Jednom kada je nakupina čestica narasla do kritične veličine, strukturne fluktuacije postaju energetski nepovoljne i nakupina ostaje u dobro definiranoj strukturi. Ova kritična točka dovodi do nastanka klice. Stoga je za dobivanje nanočestica točno određenog oblika ključno osigurati strogu kontrolu populacije klica različitim unutrašnjim strukturama (El-Badawy i sur., 2010; Feldmann i Goesmann, 2010).

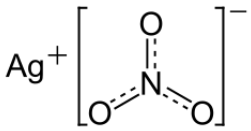
Sve metode priprave AgNP koje su korištene u ovom radu temeljne su na redukciji ionskog oblika srebra uz prisutnost stabilizatora različitih naboja prema uvjetima navedenima dalje u tekstu. Ako nije drugačije naznačeno, sve korištene kemikalije nabavljene su od Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Njemačka).

Otapalo

Iako se mnoga organska otapala poput etilen glikola primijenjuju u sintezama nanočestica srebra, voda se ipak najčešće koristi. U ovom radu korištena je ultračista (električne provodljivosti 18.2 MΩcm) voda pripremljena u sustavu za pročišćivanje GenPure UltraPure (TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert, Njemačka).

Prekursor nanočestica srebra

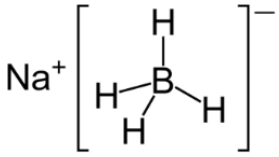
Srebrov nitrat ($AgNO_3$, Mr 169.87) je korišten kao prekursor za AgNP. Za razliku od ostalih srebrovih soli, srebrov nitrat je kemijski stabilan, a nitratni ion (NO_3^-) je dominantni anion u reakcijskoj smjesi.



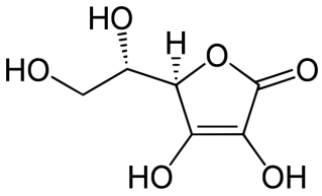
Reducensi

Reducens je kemijska tvar koja daje slobodne elektrone za redukciju elektron akceptora, tj. oksidansa. U sintezama opisanima u ovim radom korištena su tri reducensa:

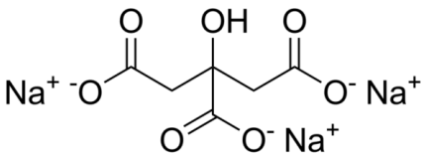
Natrijev borhidrid ($NaBH_4$, Mr 37.83) je jako i brzo anorgansko redukcijsko sredstvo koje uzrokuje formiranje brojnih srebrovih jezgri na početku sinteze i time smanjuje vrijeme rasta što spriječava stvaranje većih čestica.



Askorbinska kiselina ($C_6H_8O_6$, Mr 176.12), poznatija kao vitamin C, je organska molekula s antioksidativnim i blagim redukcijskim svojstvima.



Trinatrijev citrat ($Na_3C_6H_5O_7$, Mr 258.06) je organska molekula koja sadrži 3 karboksilne skupine i ima redukcijska svojstva.

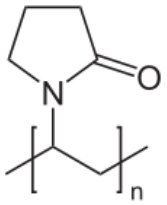


Stabilizatori

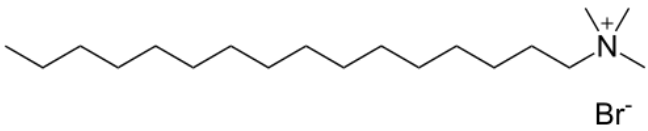
Stabilizatori se koriste za dobivanje stabilnih, monodisperznih nanočestica. Oni štite čestice od agregacije te vjerojatnost sudara i koalescencije među česticama pada zbog reakcija između funkcionalnih grupa stabilizatora i samih nanočestica. Najčešće korišteni stabilizatori u sintezi metalnih nanočestica su polielektroliti, polimeri i surfaktanti.

U ovom radu korišteni su sljedeći stabilizatori:

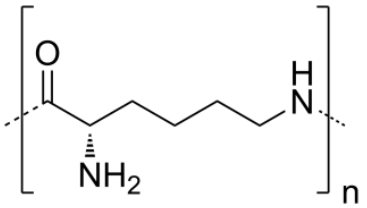
Poli(vinilpirolidon) (PVP, Mr 40 000) je neutralni homopolimer s polivinilnom okosnicom, a ponavljajuće jedinice sadrže visoko polarne amidne skupine i nepolarne metilne skupine. Uz efikasnu stabilizaciju disperznih nanočestica, kompleks PVP i Ag^+ ujedno promovira nukleaciju srebrovih atoma.



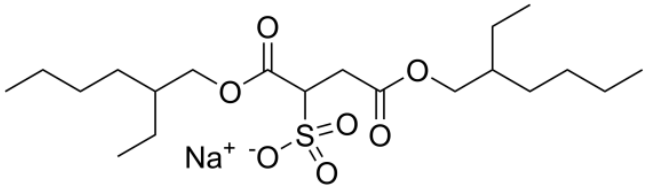
Cetiltrimetilamonijev bromid (CTA, Mr 364.45) je kationski, jednolančani surfaktant koji tvori micele u vodenoj otopini, a nanočesticama koje stabilizira daje pozitivan površinski naboj.



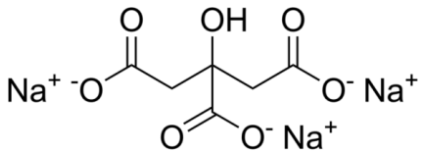
ε-poli-L-lizin (PLL, Mr ~4700) je homopolipeptid koji je građen od 25 do 30 ostataka aminokiseline L-lizina. Na pH 7 je njegova amino-skupina protonirana i kao stabilizator daje pozitivan površinski naboj nanočesticama.



Natrijev bis(2-etilheksil)-sulfosukcinat (AOT, Mr 444.56) je anionski, dvolančani surfaktant koji se inače koristi kao emulgator ili laksativ, a nanočesticama daje negativni površinski naboj.



Trinatrijev citrat ($Na_3C_6H_5O_7$, Mr 258.06) se također koristio kao stabilizator s negativnim nabojem, a inače se koristi kao aditiv hrani i kolektivno je poznat kao E broj E331.



3.1.1. Sintetski postupci pripreme neutralnih nanočestica srebra

Nanočestice srebra obložene PVP-om (PVP-AgNP)

Nanočestice srebra sintetizirane su primjenom metode opisane u literaturi (Malina i sur., 2012) uz određene modifikacije. U 186 mL ultračiste vode otopljeno je 2 g PVP-a i uz konstantno miješanje je dodano 10 mL vodene otopine $AgNO_3$ koncentracije 90 mM. Zatim je polako dokapano 4 mL vodene otopine $NaBH_4$ (0.4 M). Tako da je ukupni volumen reakcijske smjese bio 200 mL, a konačne koncentracije reaktanata: 1% (w/v) PVP, 4.5 mM $AgNO_3$ i 8 mM $NaBH_4$. Odmah po dodavanju reducensa smjesa poprimi žutu, koja tijekom vremena prelazi u tamno-smeđu boju. Reakcijska smjesa jako je miješana na sobnoj temperaturi tijekom 30 min.

3.1.2. Sintetski postupci pripreme pozitivno nabijenih nanočestica srebra

Nanočestice srebra obložene CTA-om (CTA-AgNP)

Nanočestice srebra sintetizirane su primjenom metode opisane u literaturi (Domazet Jurašin i sur., 2016). U 180 mL ultračiste vode dodano je 6.25 mL CTA (16 mM) i 10 mL $AgNO_3$ (90 mM). Zatim je dokapano 4 mL $NaBH_4$ (0.4 M) tako da je ukupni volumen reakcijske smjese 200 mL, a konačne koncentracije reaktanata: 0.5 mM CTA, 4.5 mM $AgNO_3$ i 8 mM $NaBH_4$. Odmah po dodavanju reducensa smjesa poprimi žutu, koja tijekom vremena prelazi u smeđu boju. Reakcijska smjesa jako je miješana na sobnoj temperaturi 30 min.

Nanočestice srebra obložene PLL-om (PLL-AgNP)

Nanočestice srebra sintetizirane su primjenom metode opisane u literaturi (Domazet Jurašin i sur., 2016). U 136 mL ultračiste vode dodano je 50 mL PLL (9 mM) i 10 mL $AgNO_3$ (90 mM). Zatim je dokapano 4 mL $NaBH_4$ (0.4 M) tako da je ukupni volumen reakcijske smjese 200 mL, a konačne koncentracije reaktanata: 2.25 mM PLL, 4.5 mM $AgNO_3$ i 8 mM $NaBH_4$. Odmah po dodavanju reducensa smjesa poprimi žutu, koja tijekom vremena prelazi u tamno-smeđu do crvenu boju. Reakcijska smjesa jako je miješana na sobnoj temperaturi tijekom 30 min.

3.1.3. Sintetski postupci pripreme negativno nabijenih nanočestica srebra

Nanočestice srebra obložene AOT-om (AOT-AgNP)

Nanočestice srebra sintetizirane su primjenom metode opisane u literaturi (Domazet Jurašin i sur., 2016). U 169 mL ultračiste vode dodano je 17 mL AOT (5.9 mM) i 10 mL $AgNO_3$ (90 mM). Zatim je dokapano 4 mL $NaBH_4$ (0.4 M) tako da je ukupni volumen reakcijske smjese 200 mL, a konačne koncentracije reaktanata: 0.5 mM AOT, 4.5 mM $AgNO_3$ i 8 mM $NaBH_4$. Odmah po dodavanju reducensa smjesa poprimi žutu, koja tijekom vremena prelazi u tamno-smeđu boju. Reakcijska smjesa jako je miješana na sobnoj temperaturi tijekom 30 min.

Nanočestice srebra obložene citratom (CIT-AgNP)

Nanočestice srebra sintetizirane su primjenom metode opisane u literaturi (Li i sur., 2013). 200 μL 0.1 μM vodene otopine askorbinske kiseline dodano je u 194 mL kipuće vode i dalje grijano 1 min. 0.538 mL vodene otopine natrijevog citrata (250 mM) i 0.667 mL vodene otopine $AgNO_3$ (90 mM) naizmjenično je dodavano u 5 mL vode uz miješanje na sobnoj temperaturi. Nakon 5 min inkubacije na sobnoj temperaturi, smjesa je dodana u kipuću vodenu otopinu askorbinske kiseline (odmah nakon 1 min što je askorbinska kiselina bila dodana u kipuću vodu) tako da je ukupni volumen reakcijske smjese 200 mL i konačne koncentracije reaktanata: 0.1 nM askorbinska kiselina, 0.672 mM citrat i 0.3 mM $AgNO_3$. Boja reakcijske otopine brzo prelazi iz bezbojne u žutu. Otopina je dalje zagrijavana na 80 °C tijekom 1 h uz stalno miješanje.

3.2. Pročišćivanje sintetiziranih nanočestica

Nakon kemijske reakcije potrebno je produkte pročistiti od neiskorištenih reaktanata u smjesi. Sve pripremljene AgNP pročišćene su ultracentrifugiranjem na 12 000 okr/min, 30 min u RC5C Sorvall ultracentrifugi (DuPont, SAD). Supernatant se odvajao od čestica s dna epruvete pažljivom upotrebom automatske pipete te su se čestice nekoliko puta ispirale destiliranom vodom. Isprane resuspendirane nanočestice su se pohranile na 4 °C uz zaštitu od svjetlosti do daljnje upotrebe. Uklanjanjem kemikalija na ovaj način smanjila se ionska jakost otopine što je povećalo debljinu električnog dvosloja na površini nanočestica i stabiliziralo pripremljeno AgNP.

3.3. Karakterizacija nanočestica srebra i njihova interakcija s albuminom

Nakon pripreme željenih AgNP provedena je njihova karakterizacija u ultračistoj vodi, fosfatnom puferu i fosfatnom puferu uz dodatak albumina koristeći metode dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS, od eng. *Dynamic Light Scattering*), elektroforetskog raspršenja svjetlosti (ELS, od eng. *Electrophoretic Light Scattering*), UV-Vis spektrofotometrije te transmisijske elektronske mikroskopije (TEM, od eng. *Transmission Electron Microscopy*). Uslijed različitog iskorištenja sintetskih reakcija i temeljitosti pročišćivanja produkata, svim

pročišćenim pripravcima određene su koncentracije obzirom na srebro primjenom atomske apsorpcijske spektroskopije.

3.3.1. Atomska apsorpcijska spektroskopija

Atomi imaju valentne elektrone koji se nalaze u valjskoj ljusci. Atomi se mogu escitirati zračenjem što stvara apsorpcijski spektar i u tom slučaju valentni elektroni prelaze u više energetsko stanje. Atomska apsorpcijska spektroskopija mjeri apsorbiranu svjetlost nakon prolaska kroz oblak atoma. Ova svjetlost je obično u vidljivom ili ultraljubičastom dijelu elektromagnetskog spektra i svaki atom ima jedinstveni spektar koji apsorbira što omogućuje specifičnu i osjetljivu detekciju tvari. Što je veći broj atomiziranih čestica, svjetlost prolazi dulji put i proporcionalno tome se povećava količina apsorbirane svjetlosti (Allen i sur., 2012).

Ukupna koncentracija srebra u pripravljenim koloidima određivana je odgovarajućim razrjeđivanjem otopine nanočestica srebra s 0.5% nitratnom kiselinom koristeći atomski apsorpcijski spektrofotometar Analyst 600 (Perkin Elmer, SAD). Valna duljina apsorbirane svjetlosti bila je 328.1 nm. Koncentracija svake pojedine otopine AgNP određena je izradom kalibracijske krivulje uz upotrebu standarda Ag čije su koncentracije bile u rasponu između 0.5 i 20 μg/L.

3.3.2. Metoda dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti

Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS, od eng. *Dynamic Light Scattering*) je fizikalna metoda koja se koristi za određivanje distribucije veličina malih čestica u suspenziji. Svjetlost se raspršuje kada prolazi kroz medij koji je polarizabilan ili nema jedinstvenu dielektričnu konstantu. Svjetlost je u interakciji s elektronima vezanim u materijalima koji ponovno zrače tu svjetlost kao raspršenu. Prema Rayleighovoj teoriji čestice koje su manje od određene valne duljine svjetlosti imaju sve dijelove pod istim električnim poljem tako da su raspršeni valovi koji su proizvedeni dipolnim oscilacijama vezanih elektrona u istoj fazi. Inducirani dipoli paralelni su s ravninom polarizacije i ako se raspršena svjetlost gleda u ravnini okomitoj od ravnine polarizacije ona neće imati kutne distribucije pošto je ona jednostavno zbroj svih doprinosa pojedinih dipola koji se konstruktivno dodaju (Malvern Instruments Ltd., 1997). Koloidne otopine u sebi imaju raspršene čestice veličine od 1 do

1000 nm te se DLS metoda često koristi za karakterizaciju i praćenje stabilnosti čestica u otopini što je osobito važno kod otopina AgNP koje imaju sklonost agregiranju (Lemarchand i sur., 2003).

Metoda elektroforetskog raspršenja svjetlosti (ELS, od eng. *Electrophoretic Light Scattering*) je analitička metoda koja mjeri elektroforetsku pokretljivost suspenzije čestica ili makromolekula. Kao i u DLS metodi, suspenzija je osvjetljena izvorom svjetlosti, najčešće laserom valnih duljina od 400 do 800 nm. Raspršeno svjetlo iz suspenzije je detektirano optičkim sustavom spojenim na fotodetektor i sustav za obradu signala koji mjeri mobilnost čestica koristeći Dopplerov efekt. ELS se razlikuje od DLS-a u tome što se umjesto nasumičnih Brownianovih kretnji suspendiranih čestica prate usmjerene kretnje izazvane električnim poljem. Ove kretnje su ovisne o ζ(zeta)-potencijalu suspendiranih česticama koje će se kretati određenom brzinom opisanom kao elektroforetska pokretljivost prema suprotno nabijenoj elektrodi (McNeil-Watson, 2013).

Veličina i distribucija veličine te površinski naboj nanočestica srebra određeni su metodama dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti korištenjem Zetasizer Nano ZS instrumenta (Malvern, UK) opremljenog zelenim laserom (532 nm). Pri tome su pripremljene otopine nanočestica srebra koncentracije 1 mg/L. Intenzitet raspršenog svjetla detektiran je pod kutem od 173°. Hidrodinamički promjer (d_H) i distribucija veličina nanočestica dobivene su iz distribucije volumena i intenziteta u svrhu usporedbe dobivenih vrijednosti iz te dvije distribucije. Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost 6 mjerenja. Površinski naboj nanočestica srebra određen je mjerenjem elektroforetskog zeta (ζ)-potencijala korištenjem istog instrumenta i koji je izračunat iz izmjerene elektroforetske pokretljivosti prema Henryjevoj jednadžbi koristeći Smoluchowskijevu aproksimaciju (f(Ka) = 1.5). Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost 3 mjerenja. Sva su mjerenja provedena na 25 °C i podaci su obrađeni u Zetasizer softwareu 6.32 (Malvern Instruments Ltd., 1997).

3.3.3. UV-Vis spektrofotometrija

Svaka kemijska struktura može apsorbirati svjetlost različitih valnih duljina zbog karakterističnih elektronskih struktura (elektronskih distribucija). Ekscitirani elektroni mogu se vratiti u osnovno stanje preko vibracijske tranzicije. Dio energije se izgubi u sudaranju s molekulama otapala. Fenomen apsorpcije se može kvantificirati Beer-Lambertovim zakonom:

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

gdje je I_0 intenzitet ulazne svjetlosti, I je intenzitet izlazne svjetlosti, c je molarna koncentracija, *l* je duljina puta svjetlosti, a ε je molarni ekstinkcijski koeficijent. Izraz [log I_0/I] je apsorbancija A_λ na određenoj valnoj duljini λ.

Apsorpcijski spektar se mjeri spektrofotometrom. Elektromagnestsko zračenje, tj. izvor svjetlosti se dobiva iz volfram-halogene (290-900 nm) i deuterijeve lampe (210-370 nm). Ovakva svjetlost ima valove različitih valnih duljina tako da je potreban monokromator koji će razložiti svjetlost na pojedine valne duljine. Monokromatska svjetlost prolazi kroz uzorak i detektira se fotodetektorom (fotomultiplikatorske cijevi ili fotodioda). Za mjerenja u vidljivom svjetlu koriste se staklene ili plastične kivete, no kako one mogu apsorbirati ultraljubičasto zračenje za UV područje se koriste kvarcne kivete (Sheehan, 2009).

Mjerenje UV-Vis spektara otopina nanočestica srebra u ultračistoj vodi i fosfatnom puferu provodilo se pripremama svježih otopina netom prije početka mjerenja pri koncentraciji AgNP-a od 50 µM. Interakcija BSA i AgNP proučavala se u ultračistoj vodi, odnosno fosfatnom puferu, tako da se prvo dodavala matična otopina BSA i nakon toga matična otopina AgNP, jer nanočestice u čistom puferu odmah počnu agregirati i zbog toga ne bi bilo moguće istražiti utjecaj albumina na njihovu stabilizaciju u puferu. Mjerenja su se provodila na spektrofotometru Cary 50 UV-Vis (Varian, Agilent Technologies, SAD) u rasponu valnih duljina od 200 do 800 nm.

3.3.4. Transmisijska elektronska mikroskopija

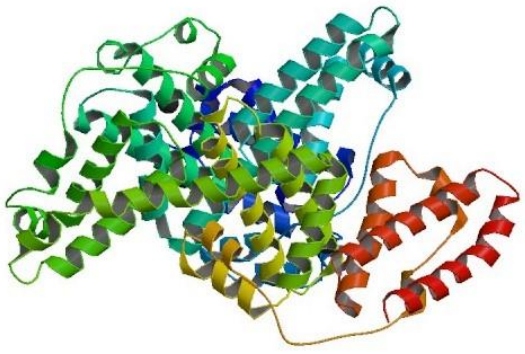
Elektronski mikroskopi koriste snopove elektrona umjesto zraka vidljive svjetlosti za vizualiziranje jako malih čestica. Mala valna duljina elektrona omogućuje elektronskim mikroskopima veću razlučivost i veće optičko povećanje. Postoje transmisijski i pretražni elektronski mikroskopi, ovisno o tome stvaraju li sliku elektroni koji prolaze kroz uzorak ili oni koji se odbijaju od njegove površine. U transmisijskoj elektronskoj mikroskopiji (TEM) snop elektrona prolazi kroz tanki sloj tvari i dolazi u interakciju s njima što stvara sliku. Slika se povećava i fokusira na fluorescentnom zaslonu, na sloju fotografskog filma ili se detektira kamerom.

Srebrne nanočestice prikazane u ovom radu vizualizirane su korištenjem TEM mikroskopa (Zeiss 902A). Mikroskop je radio u svjetlom polju pri naponu ubrzanja od 80 kV. Slike su snimljene Canon PowerShot S50 kamerom spojenom na mikroskop. TEM uzorci pripremljeni su stavljanjem kapi suspenzije uzorka na bakrenu rešetku obloženu Formavarom. Uzorak je osušen na zraku na sobnoj temperaturi.

3.4. Postupak kvantifikacije vezanja nanočestica srebra i albumina

3.4.1. Goveđi serumski albumin

Albumin je najobilniji protein plazme. Kao glavni topljivi protein cirkulacijskog sustava, albumin ima mnogo fizioloških funkcija koje uključuju vezanje i transport masnih kiselina, porfirina, bilirubina, metala, steroida, lijekova itd. Sulfhidrilne skupine aminokiselina imaju ulogu skupljača reaktivnih kisikovih i dušikovih specija koje igraju važnu ulogu u oksidativnom stresu (Evans, 2002). Goveđi serumski albumin (BSA, od eng. *Bovine Serum Albumin*), je odabran za ovo istraživanje kao proteinski model zbog svoje dobre topljivosti u vodi te fiziološkog značaja i biomedicinske primjene što je važno za studije interakcija. Građen je od 582 aminokiselinskih ostataka i ima molekularnu masu od otprilike 66 kDa (Ravindran i sur., 2010). BSA ima dva triptofana na položajima 134 i 212 koji posjeduju intrizičnu fluorescenciju što omogućuje praćenje interakcije BSA s AgNP i otapalom.



Slika 3.4.1. Goveđi serumski albumin (preuzeto iz Majorek i sur., 2012).

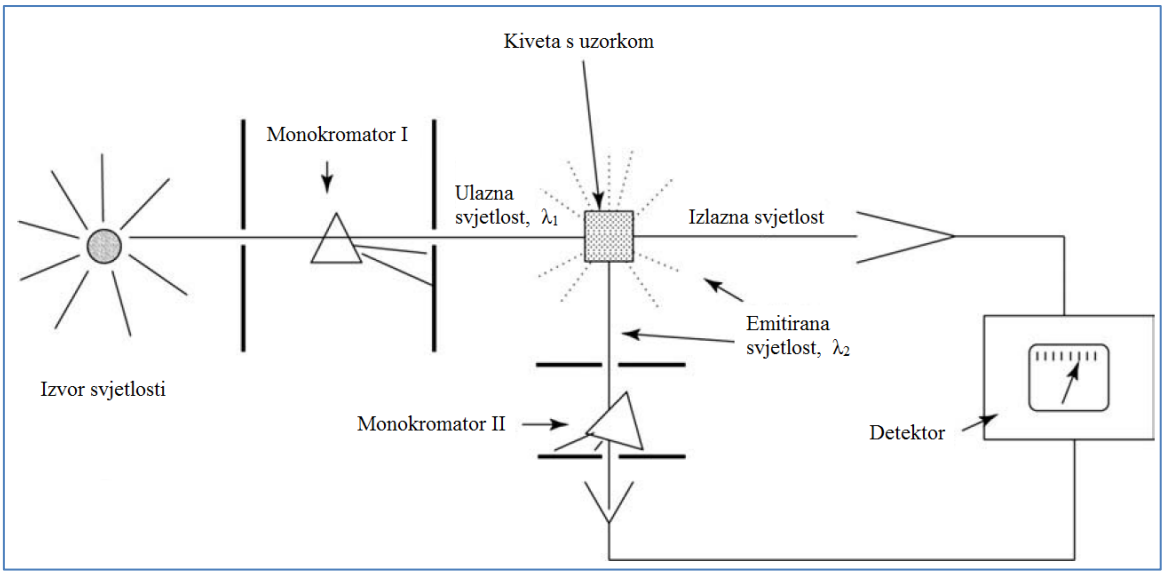
Vodena otopina BSA pripremljena je vaganjem 6.5 μg žuto-bijelog liofiliziranog BSA (Mr 65 000) i njegovim otapanjem u 10 mL destilirane voda tako da je konačna koncentracija BSA 10 μM. Uvijek svježe pripremljena otopina je dalje služila kao matična otopina kod priprema reakcijskih smjesa za TEM i praćenje fluorescencijski spektara.

3.4.2. Fosfatni pufer

Za pripremu 0.5 L fosfatnog pufera (FP, 50 mM, pH 7.4) izvagano je 0.8807 g natrijevog dihidrogenfosfat - dihidrata (NaH_2PO_4 x $2H_2O$, Mr 156.01) i 6.9318 g dinatrijevog hidrogenfosfat - 12-hidrata (Na_2HPO_4 x $12H_2O$, Mr 358.14) koji su otopljeni u destiliranoj vodi tako da su im konačne koncentracije u puferu redom 11.29 mM i 38.71 mM.

3.4.3. Fluorimetrija

Fluorescencija je fenomen u kojem kromofora nakon apsorbirane svjetlosti emitira svjetlost veće valne duljine, tj. manje energije. Te kromofore imaju specifičnu valnu duljinu apsorpcije i drugačiju veću valnu duljinu emisije što može poslužiti za osjetljivo mjerenje koncentracije takvih molekula. Mjerenja se provode na spektrofluorimetru. Ulazna zraka određene valne duljine prolazi kroz uzorak, a emitirano zračenje se detektira fotomultiplikatorskom cijevi. Glavna razlika fluorimetrije u odnosu na spektrofotometriju jest u prisutnosti drugog monokromatora koji odabire valnu duljinu emitiranog zračenja pod kutem od 90° u odnosu na ulazno zračenje. Pošto je fluorescencija emitirana u svim smjerovima, ovakav dizajn isključuje neželjenu detekciju ulaznog zračenja (Sheehan, 2009).



Slika 3. UV-Vis spektrofluorimetar (preuzeto iz Sheehan, 2009).

U ovome radu bila je praćena fluorescencija triptofanskih ostataka BSA uz prisutnost različitih koncentracija AgNP u svrhu kvantificiranja njihove asocijacije. Korišten je spektrofluorimetar OLIS RSM 1000F (Olis, Inc., Bogart, GA, USA). Valna duljina ekscitacije je 280 nm, a emisijski spektar se pratio u rangu od 300 do 420 nm s očekivanim maksimumom fluorescencije BSA na 360 nm (Slika 8.3.1.). Preliminarnim mjerenjima došlo se do optimalnih koncentracija iz kojih se može izračunati konstanta vezanja. Neposredno prije mjerenja u Eppendorf epruvete su pripremljenje reakcijske smjese dodavanjem određenih volumena reagenasa kako je opisano u tablici 3.4.3.

Prvo je dodana ultračista voda, odnosno fosfatni pufer, zatim matična otopina BSA i na kraju matična otopina AgNP-a. Otopina je lagano promiješana nakon dodavanja svih reagenasa kako ne bi nastali mjehurići koji mogu smetati fluorescencijskim mjerenjima. Iznimno je važno da se dodaje BSA u vodu, odnosno pufer prije nanočestica kako one ne bi počele agregirati što je osobito prisutno u fosfatnom puferu, zbog veće ionske jakosti pufera u odnosu na ultračistu vodu. Također, korištene su visoke koncentracije matičnih otopina nanočestica kako bi se mogao dodavati mali volumen i na taj način spriječilo značajno razrijeđenje fosfatnog pufera. Za većinu nanočestica pripremio se raspon od 2 do 500 µM, dok je za neke nanočestice bilo potrebno ići do koncentracije od 900 µM. Koncentracija BSA je održavana stalnom unutar iste serije razrijeđenja (0.15, 0.2 ili 0.3 µM), tako da se je omjer

koncentracija BSA:AgNP kretao od 1:10 do 1:3000. Mjerenja su rađena u triplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD.

Izmjereni spektri obrađeni su u programu *SPECFIT Global Analysis System* za prilagođavanje ravnotežnih i kinetičkih sustava koji koristi proširenu analizu faktora i Marquardtovu minimizaciju najmanjih kvadrata (Gampp i sur., 1985; SPECFIT User Manual, 1992).

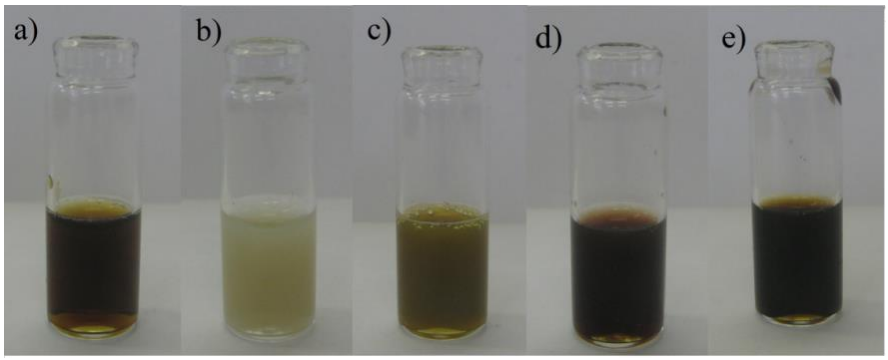
Tablica 3.4.3. Postupak pripreme 16 reakcijskih smjesa ukupnog volumena 0.5 mL za mjerenje fluorescencije BSA uz prisutnost nanočestica srebra u vodi i fosfatnom puferu (FP).

	Matična otopina AgNP, μM	Konačna koncentracija AgNP, μM	Volumen dodane matične otopine AgNP, mL	Volumen dodanog BSA (10 μM), mL	Volumen dodane vode/FP, mL
1.	100	2	0.01	0.0075	0.4825
2.	100	6	0.03	0.0075	0.4625
3.	100	10	0.05	0.0075	0.4425
4.	3000	14	0.0023	0.0075	0.4902
5.	3000	20	0.0033	0.0075	0.4892
6.	3000	30	0.005	0.0075	0.4875
7.	3000	40	0.0067	0.0075	0.4858
8.	3000	60	0.01	0.0075	0.4825
9.	3000	80	0.0133	0.0075	0.4792
10.	3000	100	0.0167	0.0075	0.4758
11.	3000	140	0.0233	0.0075	0.4692
12.	3000	200	0.0333	0.0075	0.4592
13.	3000	250	0.0417	0.0075	0.4508
14.	3000	300	0.05	0.0075	0.4425
15.	3000	400	0.0667	0.0075	0.4258
16.	3000	500	0.0833	0.0075	0.4092

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteza i karakterizacija nanočestica srebra

Na slici 4.1.a prikazan je makroskopski izgled otopina sintetiziranih nanočestica srebra čije obojenje varira od mliječno žute (CIT-AgNP) do tamno-smeđe (PVP-AgNP). Ove čestice su bile dalje korištene za karakterizaciju i praćenje njihove interakcije s albuminom.



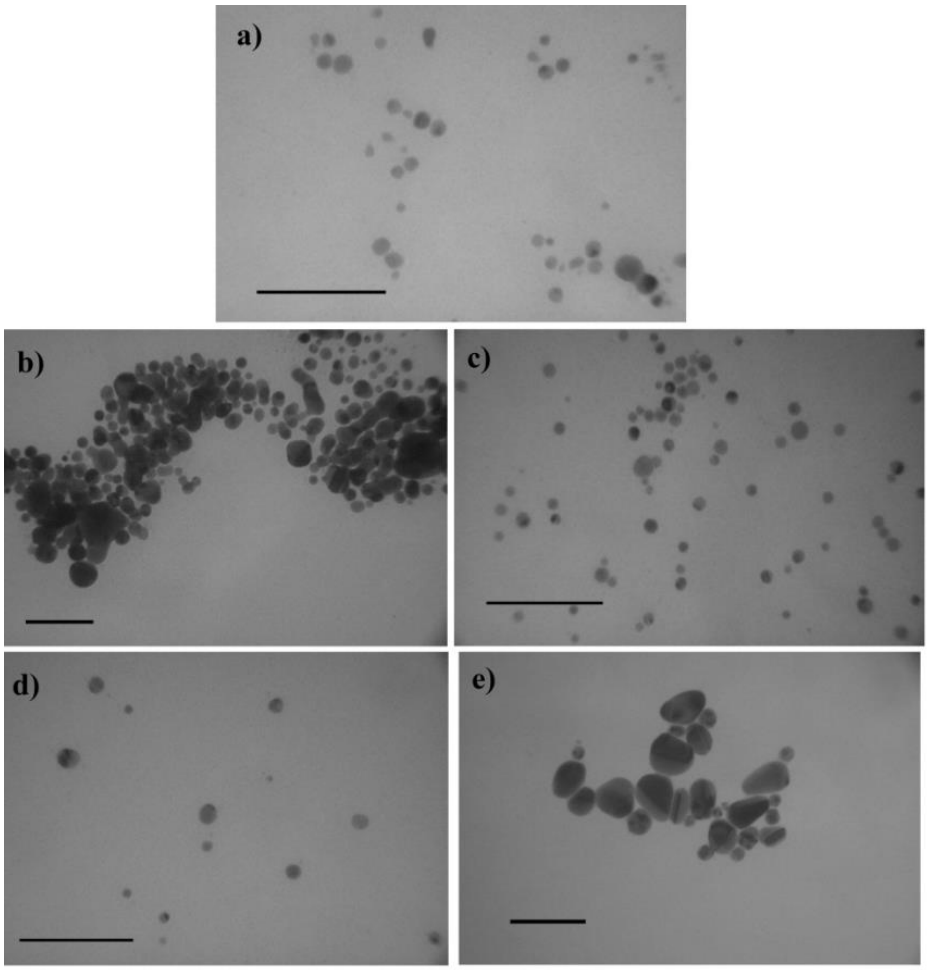
Slika 4.1.a. Sintetizirane nanočestice srebra koncetracije 1 mM: a) AOT-AgNP, b) CIT-AgNP, c) CTA-AgNP, d) PLL-AgNP, e) PVP-AgNP.

Fizikalno-kemijska svojstva sintetiziranih nanočestica određena su u ultračistoj vodi i fosfatnom puferu korištenjem metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti, elektroforetskog raspršenja svjetlosti te UV-Vis spektrofotometrijom i transmisijskom elektronskom mikroskopijom. U tablici 4.1.a nalaze se podaci za hidrodinamički promjer (d_H) nanočestica srebra u ultračistoj vodi dobiven iz distribucije veličina prema volumenu i intenzitetu. DLS mjerenja pokazala su da je distribucija veličina monomodalna prema volumenu i prema intenzitetu samo za AOT-AgNP. Ostale čestice su pokazale bimodalnu distribuciju veličina, odnosno trimodalnu u slučaju CTA-AgNP. DLS dijagrami distribucije veličina nanočestica prema volumenu prikazani su u Prilogu 8.1.

Tablica 4.1.a. Hidrodinamički promjer (d_H) nanočestica srebra u ultračistoj vodi nakon 1 h dobiven iz distribucija veličine prema volumenu i intenzitetu.

Vrsta nanočestica	**d_H, nm**	**Prosječni volumen, %**	**d_H, nm**	**Prosječni intenzitet, %**
PVP-AgNP	4.9 ± 1.7 33.5 ± 4.0	98.7 1.2	6.2 ± 1.1 69.5 ± 2.9	11.3 86.5
CTA-AgNP	17.4 ± 5.4 81.5 ± 7.6 193.6 ± 36.8	88.1 2.9 8.7	22.3 ± 5.7 182.9 ± 17.4	6.0 91.6
PLL-AgNP	7.4 ± 1.3 55.7 ± 13.4	96.2 3.7	8.9 ± 1.7 115.7 ± 15.4	2.9 88.1
AOT-AgNP	19.9 ± 0.5	99.4	27.8 ± 0.4	96.5
CIT-AgNP	12.1 ± 2.8 96.3 ± 10.3	97.1 2.7	15.0 ± 1.8 144.3 ± 11.7	11.6 87.8

Očekivano su distribucije veličine prema intenzitetu drugačije od distribucije prema volumenu. Npr. više od 97% volumena CIT-AgNP ima prosječnu veličinu od 12.1 ± 2.8 nm kod distribucije prema volumenu, dok više od 87% CIT-AgNP ima prosječnu vrijednost veličine od 144.3 ± 11.7 nm kod distribucije prema intenzitetu. Poznato je da je distribucija prema intenzitetu podložna interferenciji zbog raspršenja zato što je intenzitet raspršene svjetlosti puno veći za velike aglomerate u odnosu na male čestice (Domazet Jurašin i sur., 2016). Sukladno DLS rezultatima, TEM snimke u ultračistoj vodi (Slika 4.1.b) pokazale su monodisperznu distribuciju veličina za PVP-, PLL- i AOT-AgNP, a CTA- i CIT-AgNP polidisperznu distribuciju.



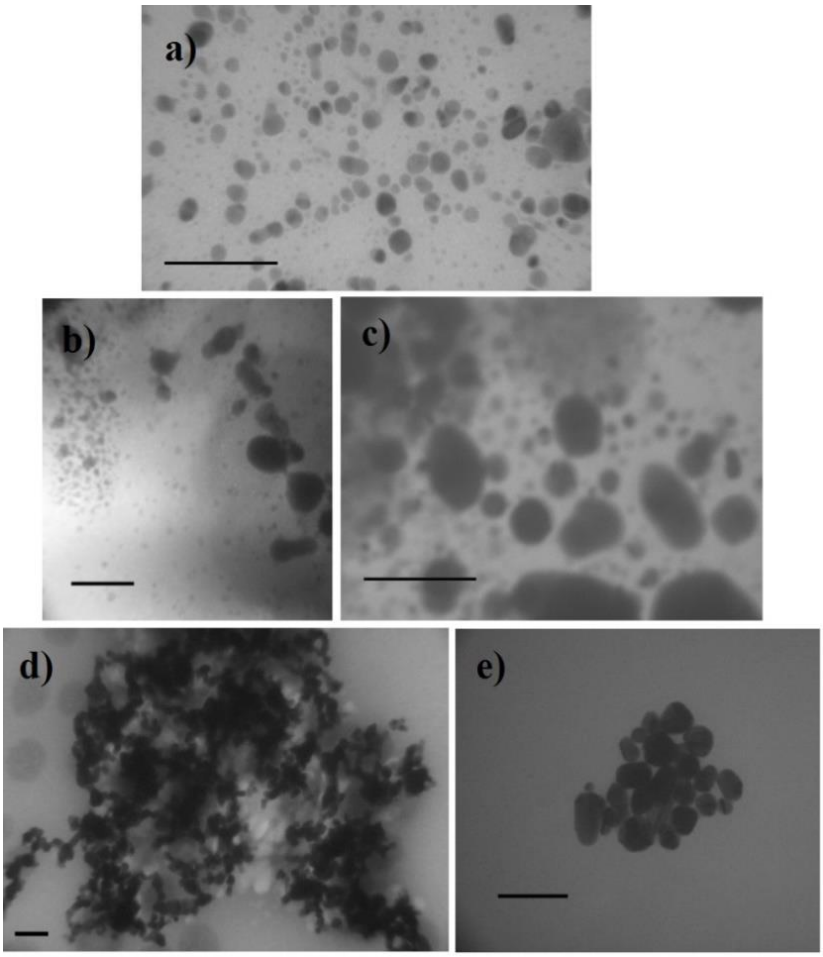
Slika 4.1.b. TEM slike nanočestica srebra u ultračistoj vodi (skala 100 nm): a) PVP-AgNP, b) CTA-AgNP, c) PLL-AgNP, d) AOT-AgNP, e) CIT-AgNP.

Podaci dobiveni ELS metodom u ultračistoj vodi prikazani u tablici 4.1.b pokazuju da samo dvije vrste nanočestica (CTA-AgNP i PLL-AgNP) imaju pozitivni površinski naboj sa ζ-potencijalom 38.5 ± 2.9 i 23.6 ± 4.0 mV. Iako je korišten jedan neutralni stabilizator (PVP), nanočestice obložene njime ipak imaju negativni površinski naboj od -19.2 ± 0.8 mV. Ovakav ishod može se objasniti korištenjem borhidrida (BH_4^-) kao reducensa ionskog srebra u sintezi i njegovim posljedičnim vezanjem za površinu nanočestica što je dovelo do negativnog ζ-potencijala.

Tablica 4.1.b. Zeta (ζ)-potencijal nanočestica srebra u ultračistoj vodi (UV) i fosfatnom puferu (FP).

Vrsta nanočestica	Medij	ζ potencijal, mV
PVP-AgNP	UV	-19.2 ± 0.8
	FP	-12.1 ± 0.7
CTA-AgNP	UV	+38.5 ± 2.9
	FP	-18.5 ± 1.3
PLL-AgNP	UV	+23.6 ± 4.0
	FP	-5.4 ± 2.0
AOT-AgNP	UV	-27.8 ± 1.9
	FP	-19.1 ± 1.1
CIT-AgNP	UV	-38.5 ± 2.9
	FP	-18.9 ± 1.3

Apsolutna vrijednost ζ-potencijala u fosfatnom puferu se smanjila kod PVP-AgNP, AOT-AgNP i CIT-AgNP u usporedbi s vrijednostima u ultračistoj vodi. Očekivano je da kada se ζ-potencijal približava nuli, odbijajuće sile između čestica se smanjuju što smanjuje i stabilnost disperzije nanočestica. Pozitivno nabijene CTA-AgNP i PLL-AgNP u fosfatnom puferu poprime negativni površinski naboj uslijed vezanja komponenti pufera (fosfatni ioni) te ujedno im je smanjena i apsolutna vrijednost površinskog naboja što ide u prilog povećanoj nestabilnosti i aglomeraciji nanočestica što se jasno može vidjeti na TEM slikama (Slika 4.1.c) i DLS podacima (Tablica 4.1.c). Niža stabilnost PLL-AgNP u usporedbi s CTA-AgNP može se objasniti značajno negativnijim ζ-potencijalom CTA-AgNP u fosfatnom puferu. Gotovo sve nanočestice su aglomerilare zbog visoke ionske jakosti fosfatnog pufera i prilikom dodavanja matične otopine nanočestica srebra u fosfatni pufer mogao se primijetiti sivi oblak odmah nakon dodira otopine nanočestica i pufera. Stabilizatori mogu izgubiti svoj učinak kod visokih ionskih jakosti zbog kompleksiranja s drugim ionima i posljedično Van der Waalsove sile uzrokuju agregaciju nezaštićenih nanočestica (Dominguez-Medina i sur., 2013).



Slika 4.1.c. TEM slike nanočestica srebra u fosfatnom puferu (skala 100 nm): a) PVP-AgNP, b) CTA-AgNP, c) PLL-AgNP, d) AOT-AgNP, e) CIT-AgNP.

DLS podaci u tablici 4.1.c. i slika 4.1.c pokazuju da nije došlo do promjene oblika i veličine CIT-AgNP i PVP-AgNP nakon disperzije u fosfatnom puferu za razliku od ostalih nanočestica koje pokazuju promijenjenu morfologiju i veličinu. Također se može vidjeti iz ovih podataka da aglomerati AgNP pokazuju veliku polidisperznost. CTA-AgNP nisu pokazale tako ekstremnu aglomeraciju poput PLL- i AOT-AgNP. Bilo bi za očekivati da su ionski stabilizatori efikasniji od neionskih surfaktanata i polimera, no objašnjenje za aglomeraciju nije tako jednostavno. CIT-AgNP su stabilizirane poglavito elektrostatskim odbijanjem, a veliki ligandi poput polimera PVP-a pružaju dodatne steričke prepreke. Ovi rezultati se podudaraju s prethodno objavljenim podacima (Vinković Vrček i sur., 2014).

Tablica 4.1.c. Hidrodinamički promjer (d_H) nanočestica srebra u fosfatnom puferu nakon 1 h dobiven iz distribucija veličine prema volumenu i intenzitetu.

Vrsta nanočestica	**d_H, nm**	**Prosječni volumen, %**	**d_H, nm**	**Prosječni intenzitet, %**
PVP-AgNP	4.1 ± 1.3 37.9 ± 2.6	98.5 1.6	5.4 ± 1.4 78.9 ± 10.7	9.2 89.4
CTA-AgNP	27.9 ± 5.4 71.8 ± 7.1 602.0 ± 57.2	40.9 10.6 51.4	32.3 ± 6.7 418.8 ± 72.7	4.2 95.6
PLL-AgNP	686.6 ± 133.8 5289 ± 214	95.0 4.7	542.4 ± 135.7 5038 ± 105	97.1 2.8
AOT-AgNP	409.0 ± 74.1 5351 ± 128	93.2 7.3	295.4 ± 75.0 5144 ± 228	98.4 2.0
CIT-AgNP	13.4 ± 2.5 63.3 ± 7.2	85.5 14.1	16.1 ± 2.9 101.4 ± 16.3	8.0 89.9

Dalje se ponašanje AgNP-a pratilo UV-Vis spektrofotometrijom (Tablica 4.1.d.). Ovom metodom moguće je odrediti optička svojstva nanočestica pošto one imaju karakteristični apsorpcijski maksimum na vidljivim valnim duljinama zbog površinske plazmonske rezonancije (SPR). Optička svojstva AgNP su usko povezana s njihovim promjenama veličine, oblika i površine kao i s promjenom neposredne okoline nanočestica što uključuje pojavu agregata i proteinske korone (Argentiere i sur., 2016). Na UV-Vis spektrima u ultračistoj vodi (Prilog 8.2) vidljivo je da su sve sintetizirane AgNP imale SPR pik u području od 360 do 430 nm što je karakteristično za nanočestice srebra.

Tablica 4.1.d. Optički parametri nanočestica srebra u ultračistoj vodi (UV) i fosfatnom puferu (FP).

Nanočestice srebra (50 μM)	λ_{max}, nm			A_{max}	
	UV	FP	$\Delta\lambda_{max}$	UV	FP
PVP-AgNP	395	390	-5	0.5136	0.2114
CTA-AgNP	440	420	-20	0.0293	0.1183
PLL-AgNP	400	455	55	0.2676	0.1192
AOT-AgNP	400	400	0	0.3762	0.1688
CIT-AgNP	420	400	-20	0.3670	0.1482

Vidljivo je da su sve SPR pikovi u FP raširili a intenzitet im se smanjio. Istovremeno su se pojavili i dodatni apsorpcijski maksimumi u rasponu od 600 do 800 nm što ukazuje na agregaciju AgNP u fosfatnom puferu, već opisanu iz DLS rezultata (Tablica 4.1.c). Obzirom da agregirane čestice nemaju SPR apsorpcijski maksimum njihova pojava dovodi do značajnog smanjenja vrijednosti A_{max} kod svih AgNP osim CTA-AgNP što se jasno vidi u tablici 4.1.d (Argentiere i sur., 2016).

4.2. Interakcija nanočestica srebra i albumina

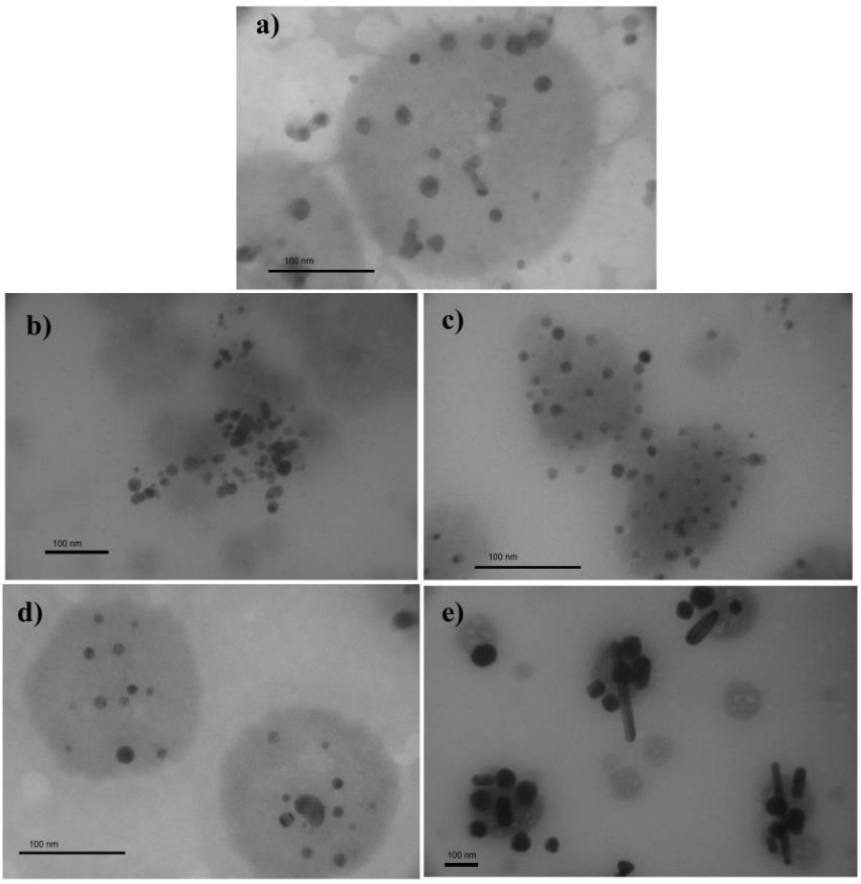
Nakon suspendiranja u biološki medij nanočestice reagiraju s proteinima koji potom tvore proteinsku koronu koja posljedično mijenja fizikalno-kemijska svojstva nanočestica, ali i sami proteini mogu proći kroz konformacijske i funkcionalne promjene (Churchman i sur., 2013).

DLS podaci prikazani u tablici 4.2.a ukazuju da BSA stabilizira suspenzije nanočestica srebra u fosfatnom puferu. Iako je prisutnost BSA spriječila aglomeraciju nanočestica, njihov hidrodinamički promjer (d_H) se ipak udvostručio za sve nanočestice zbog globularnog oblika BSA koji je obložio njihovu površinu. Heterogena distribucija veličine ukazuje na nejednoliku pokrivenost površine ovisno o prisutnom stabilizatoru. Za PVP- i CIT-AgNP koji su imali bimodalnu distribuciju veličina u ultračistoj vodi, interakcija s BSA je dovela do monomodalne distribucije. Kod nanočestica koje su aglomerilare u fosfatnom puferu, dodatak BSA je gotovo u potpunosti spriječio ili smanjio aglomeraciju. U tablici 4.2.a vidi se da je d_H dobiven iz distribucije prema volumenu konstantan i značajno niži od onog u fosfatnom puferu za CTA-, PLL- i AOT-AgNP.

Tablica 4.2.a. Hidrodinamički promjer (d_H) nanočestica srebra u fosfatnom puferu s 0.1% BSA nakon 1 h dobiven iz distribucija veličine prema volumenu i intenzitetu.

Vrsta nanočestica	**d_H, nm**	**Prosječni volumen, %**	**d_H, nm**	**Prosječni intenzitet, %**
PVP-AgNP	59.6 ± 11.4	0.2	82.9 ± 20.7	36.2
CTA-AgNP	71.8 ± 6.4	0.9	99.7 ± 10.6	72.5
PLL-AgNP	85.6 ± 17.6 208.4 ± 14.8	41.2 56.7	34.3 ± 7.8 174.9 ± 8.4	2.3 97.7
AOT-AgNP	47.8 ± 8.9 671.0 ± 140.4	1.7 0.1	63.4 ± 27.0 548.9 ± 126.4	7.1 20.4
CIT-AgNP	114.2 ± 12.9 22.4 ± 2.9	82.3 17.7	117.8 ± 9.5	99.9

Primijećeno povećanje hidrodinamičkog promjera CIT-AgNP u prisutnosti BSA u fosfatnom puferu nije posljedica aglomeracije, već indikacija sporije adsorpcije BSA na njihovu površinu. Ova tvrdnja je potkrijepljena TEM slikama (Slika 4.2.a) koje jasno pokazuju raspršene nanočestice u fosfatnom puferu. BSA može biti vezan snažnim kovalentnim vezama putem cisteinskih ostataka i površine nanočestica ili protein-protein elektrostatskim i deplecijskim interakcijama. Ako dolazi do obje interakcije istovremeno, debljina proteinske korone će se razlikovati ovisno o vrsti nanočestica.



Slika 4.2.a. TEM slike nanočestica srebra u fosfatnom puferu s 0.1% BSA (skala 100 nm): a) PVP-AgNP, b) CTA-AgNP, c) PLL-AgNP, d) AOT-AgNP, e) CIT-AgNP.

ELS podaci u tablici 4.2.b pokazuju kako sve nanočestice imaju jako slični ζ-potencijal u fosfatnom puferu s BSA neovisno o stabilizatoru u rasponu od -10.0 do -12.5 mV. Smanjenje apsolutnih vrijednosti ζ-potencijala u usporedbi sa čistim fosfatnim puferom bez BSA znači da je oblaganje nanočestica s BSA glavni uzrok njihove stabilizacije u fosfatnom puferu i on je slabo negativno nabijen pri fiziološkom pH i općenito pri pH iznad njegove izoelektrične točke (pI 4.78). Zbog toga su elektrostatske sile između pozitivno nabijenih nanočestica srebra i negativno nabijenog BSA dovele do adsorpcije, no ostaje pitanje zašto odbijajuće sile negativnih nanočestica nisu spriječile adsorpciju BSA. Osim negativno nabijene površine pri fiziološkom pH, struktura BSA također ima pozitivno nabijene lizinske i cisteinske ostatke čija interakcija s nanočesticama srebra je očito značajna (Peters Jr., 1996).

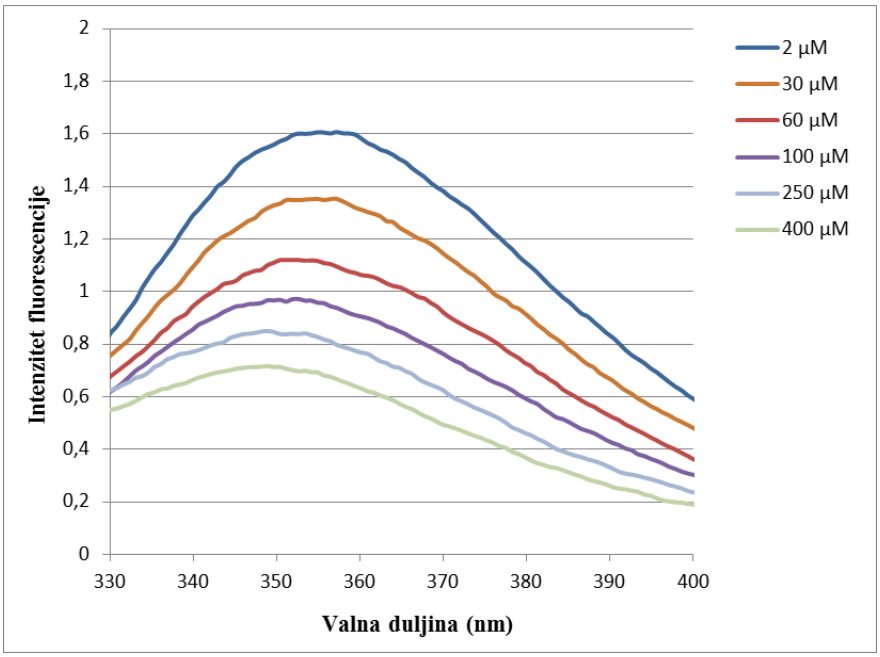
Tablica 4.2.b. Zeta (ζ)-potencijal nanočestica srebra u fosfatnom puferu i 0.1% BSA nakon 1 h.

Vrsta nanočestica	ζ potencijal, mV
PVP-AgNP	-10.0 ± 0.7
CTA-AgNP	-12.0 ± 1.4
PLL-AgNP	-12.3 ± 1.2
AOT-AgNP	-9.89 ± 1.0
CIT-AgNP	-11.8 ± 0.4

Hidrofobne, hidrofilne te elektrostatske interakcije, uključujući Van der Waalsove sile, najvjerojatnije igraju ulogu u asocijaciji nanočestica i proteina, no za sada one nisu temeljito istražene (Patil i sur., 2007; Sant i sur., 2008).

Iz izmjerenih fluorescencijskih spektara BSA i AgNP vidi se maksimum fluorescencije BSA na 360 nm čiji intenzitet je proporcionalan njegovoj koncentraciji (Slika 8.3.1.). Povećanjem koncentracije dodanih AgNP gasi se fluorescencija BSA na 360 nm i raste fluorescencijski maksimum samih AgNP koji se nalazi ispod 300 nm (Prilozi 8.3. i 8.4.).

Prema Milleru (Miller, 1979), na Δλ (razlika ekscitacijske i emisijske valne duljine) od oko 60 nm mogu se pratiti promjene mikrookoliša triptofanskih ostataka u albuminu. Pomak maksimuma fluorescencije prema nižim valnim duljinama prikazan na slici 4.2.b. ukazuje na zaštitu triptofanskih ostataka od vodene faze što znači da je do povećanja hidrofobnosti došlo zbog prisutnosti nanočestica (Mariam i sur., 2011). Slika 4.2.b prikazuje primjer fluorescencijskog emisijskog spektra BSA inkubiranog s PLL-AgNP gdje se jasno vidi kako postupnim smanjenjem emisijskog intenziteta BSA dolazi do pomaka maksimuma emisije u lijevo prema manjoj valnoj duljini za otprilike 7 nm. Ovaj fenomen je prisutan kod svih korištenih nanočestica i u vodi i u fosfatnom puferu te su slični rezultati dobiveni u istraživanjima na drugim nanočesticama (Mariam i sur., 2011; Jhonsi i sur., 2009).

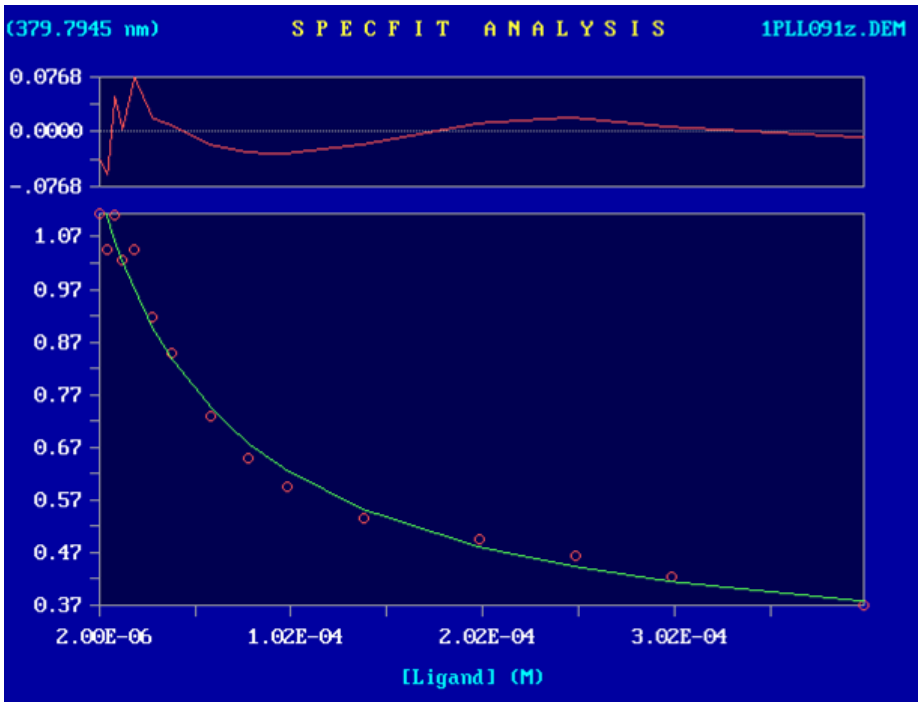


Slika 4.2.b. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.2 µM) sa šest koncentracija PLL-AgNP (2, 30, 60, 100, 250 i 400 µM) u ultračistoj vodi.

SPECFIT računalni program omogućuje jednostavno izračunavanje konstanti vezanja unošenjem *Text Document (.txt)* tablica s titracijskim spektrima fluorescencije albumina stalne koncentracije i AgNP varijabilne koncentracije. Program putem SVD (od eng. *Single Value Decomposition*) statističke analize i temeljem ugođavanja najmanjih kvadrata predviđa logaritamsku krivulju čiji je primjer prikazan na slici 4.2.c. Vrijednosti fluorescencije BSA dobivene na 380 nm nalaze se na ordinati, a na apcisi je gradijent koncentracija AgNP poredanih od manje koncentracije prema većima. Analiza podataka je predložila 1:1 komplekse i nije ukazala na stvaranje kompleksa višeg reda. Zbog toga je predložen model vezanja:

$$\text{BSA} + \text{AgNP} \leftrightarrow \text{BSA-AgNP}$$

Iz stvorene logaritamske krivulje izračunat je logaritam konstante vezanja ($\log K_a$) te ovisno koliko ta krivulja prati izmjerene točke izračunata je i standardna devijacija (Štambuk i sur., 2014; SPECFIT User Manual, 1993).



Slika 4.2.c. Primjer logaritamske krivulje PLL-AgNP stvorene u SPECFIT-u. Na apcisi se nalaze koncentracije AgNP, a na ordinati intenzitet fluorescencije BSA stalne koncentracije na 380 nm.

Obrađivanjem titracijskih krivulja svih pet korištenih AgNP čija su mjerenja napravljena u triplikatu dobili su se pojedinačni $\log K_a$ i od njih je izračunata konačna srednja vrijednost $\log K_a \pm$ SD koji se nalaze u tablici 4.2.c. Iz dobivenih $\log K_a$ može se vidjeti da se konstante vezanja razlikuju između pojedinih AgNP te između istovrsnih AgNP u ultračistoj vodi i fosfatnom puferu. PVP- i CTA-AgNP imaju jednake konstante vezanja i u vodi i u fosfatnom puferu redom 3.7 i 3.6. Kod PLL- i CIT-AgNP je došlo do smanjenja $\log K_a$ od 0.9 do 0.7 što je na logaritamskoj skali značajna promjena. Jedino je u slučaju AOT-AgNP došlo do jačeg vezanja u fosfatnom puferu. Titracijski spektri nalaze se u Prilogu 8.3. i 8.4.

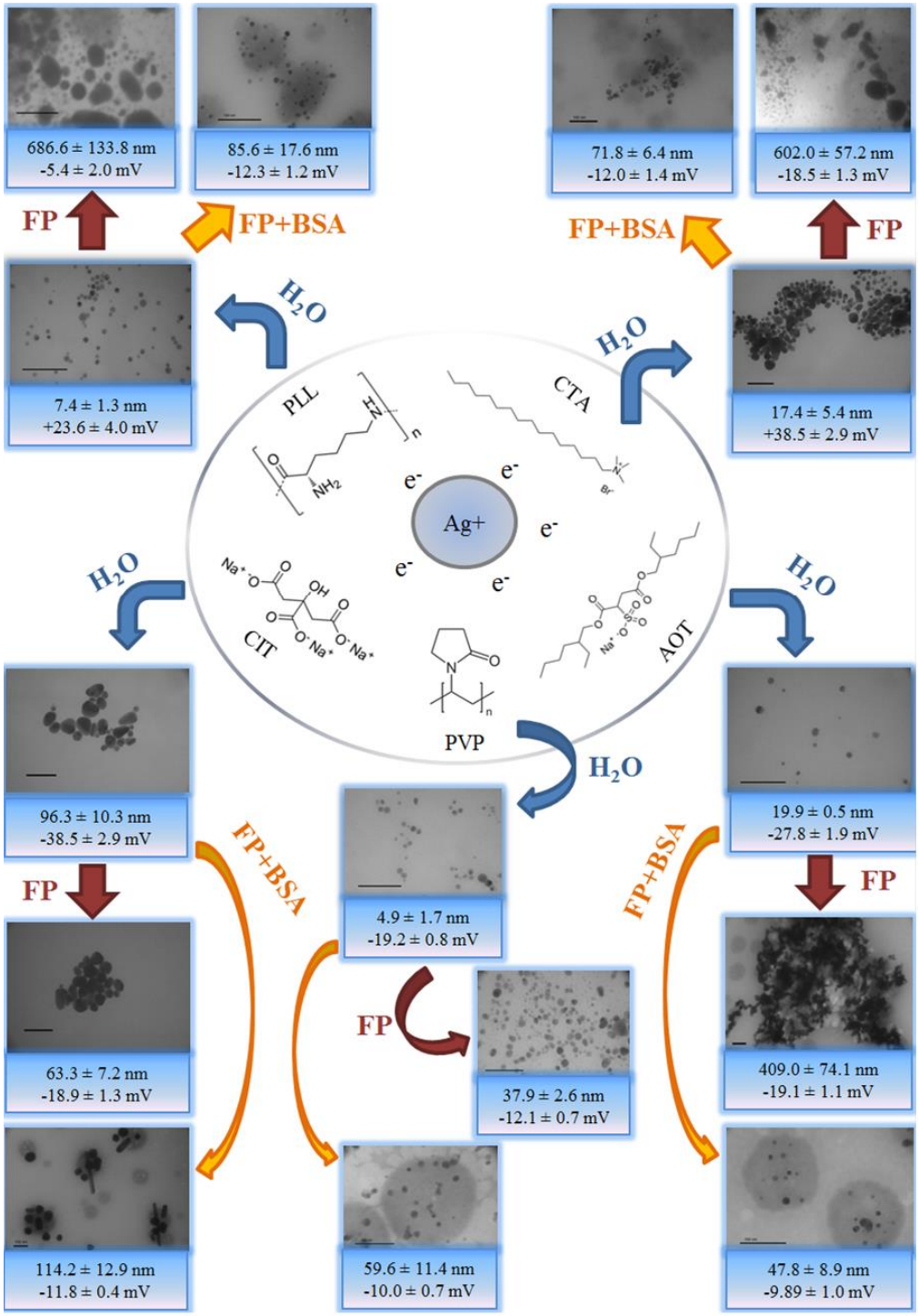
Tablica 4.2.c. Izračunate konstante vezanja gašenjem fluorescencije BSA u prisutnosti nanočestica srebra u ultračistoj vodi i fosfatnom puferu.

	Ultračista voda		**Fosfatni pufer**	
Nanočestice srebra	Pojedinačna mjerenja $\log K_a$	Konačni $\log K_a$	Pojedinačna mjerenja $\log K_a$	Konačni $\log K_a$
PVP-AgNP	3.7 ± 0.07 3.9 ± 0.1 3.6 ± 0.1	3.7 ± 0.15	3.5 ± 0.1 3.7 ± 0.07 3.6 ± 0.05	3.6 ± 0.1
CTA-AgNP	3.7 ± 0.1 3.5 ± 0.3 3.9 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.6 ± 0.1 3.6 ± 0.06 3.7 ± 0.05	3.6 ± 0.06
PLL-AgNP	4.2 ± 0.06 4.1 ± 0.08 4.1 ± 0.07	4.1 ± 0.06	2.9 ± 0.06 3.0 ± 0.2 3.2 ± 0.2	3.0 ± 0.15
AOT-AgNP	4.2 ± 0.1 4.2 ± 0.1 3.7 ± 0.1	4.0 ± 0.3	4.8 ± 0.1 5.2 ± 0.1 5.0 ± 0.2	5.0 ± 0.2
CIT-AgNP	3.9 ± 0.1 3.7 ± 0.09 3.8 ± 0.1	3.8 ± 0.1	3.1 ± 0.1 2.9 ± 0.2 3.4 ± 0.4	3.1 ± 0.25

Zanimljivo je da se konstante vezanja BSA na AgNP u vodi u odnosu na fosfatni pufer nisu značajnije promijenile samo za CTA-AgNP i PVP-AgNP, dok je za ostale AgNP ta promjena iznosila nekoliko redova veličina. To se može objasniti značajnom promjenom populacije koja se za PLL-, AOT- i CIT-AgNP dogodila u puferu uz prisustvo albumina u odnosu na ultračistu vodu. To direktno ukazuje da je vezanje albumina uvjetovano i veličinom nanočestica.

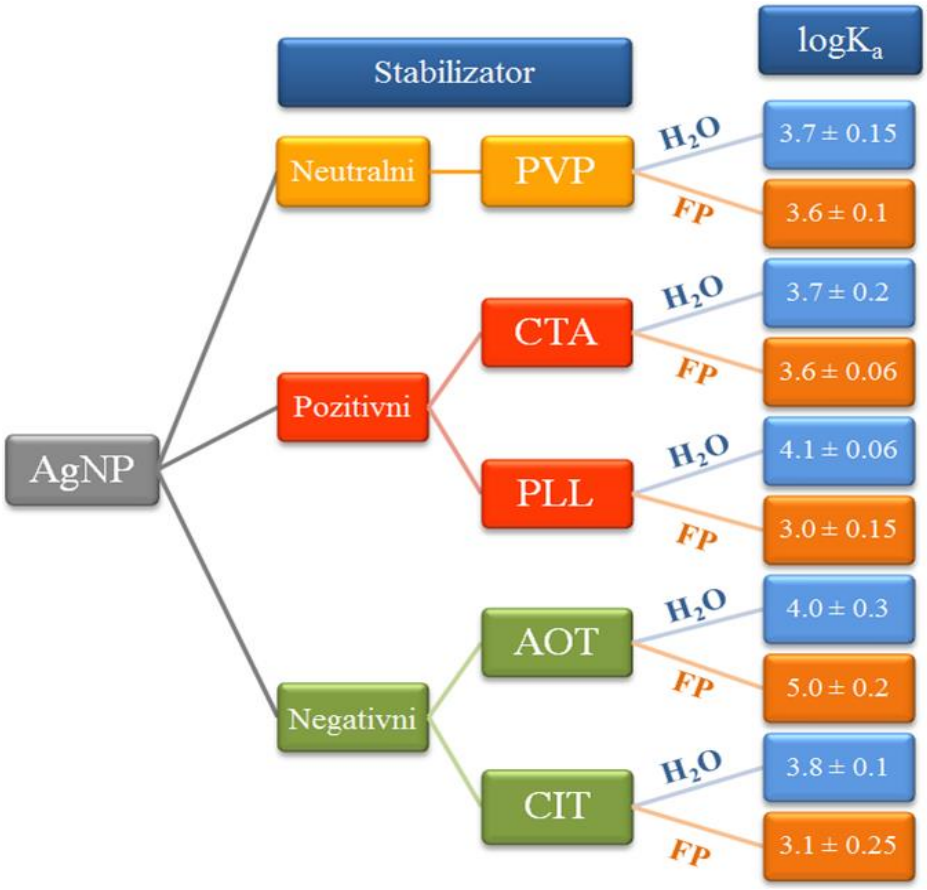
5. ZAKLJUČAK

Korištenje različitih stabilizatora nanočestica srebra dovelo je do različitih koloidnih stabilnosti u vodi i fosfatnom puferu (Slika 5.a).



Slika 5.a. Sumarna pojednostavljena shema odnosa površinske funkcionalizacije AgNP, njihove veličine, ζ-potencijala i agregacije ovisno o mediju (skala 100 nm).

Dobiveni podaci upućuju da su kombinacija negativnog naboja i snažnog adsorpcijskog učinka stabilizatora zajedno s njihovom molekularnom strukturom važni čimbenici koji utječu na koloidnu stabilnost metalnih nanočestica u elektrolitnim otopinama. Korištene metode – dinamičko i elektroforetsko raspršenje svjetlosti, UV-Vis spektrofotometrija te transmisijska elektronska mikroskopija – pokazale su se pouzdanima za sigurno određivanje i evaluaciju stabilnosti nanočestica u biološkim medijima. Najvažnije opažanje u ovom radu je da BSA dovodi do koloidne stabilizacije nanočestica srebra u fosfatnom puferu neovisno o njihovom kemijskom sastavu, strukturi površine i površinskom naboju. Ovi rezultati su sukladni prethodno objavljenim radovima na temu stabilizacije metalnih nanočestica u biološkim medijima (Cedervall i sur., 2007; Dominguez-Medina i sur., 2013). Iz gašenja fluorescencije BSA u prisutnosti AgNP dobile su se njihove konstante vezanja koje se razlikuju za pojedinu vrstu AgNP i ovisno o mediju. Na slici 5.b prikazan je dijagram dobivenih konstanti vezanja za svaku česticu i može se zaključiti da se BSA otprilike jednako ili slabije veže za AgNP u fosfatnom puferu, osim kod AOT-AgNP koji je pokazao jače vezanje.



Slika 5.b. Grafički prikaz odnosa vrste AgNP i konstante vezanja s BSA ovisno o mediju.

U tablici 5. nalaze se sumirana saznanja o ponašanju korištenih AgNP u fosfatnom puferu sa i bez BSA te na slici 5.a nalazi se shema odnosa karakteristika AgNP u pojedinom mediju gledajući na agregaciju, veličinu i ζ-potencijal.

Tablica 5. Usporedba ponašanja nanočestica srebra u fosfatnom puferu (FP) u odnosu na ultračistu vodu i fosfatnom puferu s BSA (FP + BSA) u odnosu na čisti fosfatni pufer.

Vrsta nanočestica	**Vrsta medija**	**Aglomeracija**	**ζ-potencijal**	**Morfologija nanočestica**
PVP-AgNP	FP	Stabilan	Smanjen	Nema promjena
	FP + BSA	Stabilan	Smanjen	Lokalizacija u dijelovima s BSA
CTA-AgNP	FP	Stabilan	Smanjen, promjena naboja	Nema promjena
	FP + BSA	Stabilan	Smanjen	Lokalizacija u dijelovima s BSA
PLL-AgNP	FP	Jaka agregacija	Smanjen, promjena naboja	Nepravilni oblici
	FP + BSA	Stabilan	Povećan	Lokalizacija u dijelovima s BSA
AOT-AgNP	FP	Jaka agregacija	Smanjen	Nepravilni oblici
	FP + BSA	Stabilan	Smanjen	Lokalizacija u dijelovima s BSA
CIT-AgNP	FP	Stabilan	Smanjen	Nema promjena
	FP + BSA	Stabilan	Smanjen	Lokalizacija u dijelovima s BSA

Mehanizam adsorpcije proteina i način na koji se stvara proteinska korona su iznimno važni za razumijevanje biološke reaktivnosti nanočestica *in vivo* (Saptarshi i sur., 2013). Također sprječavanje aglomeracije pomoću albumina može poslužiti u nanotehnološkim aplikacijama, ali to i ističe potpomognuti transport nanočestica krvotokom. Iako su provedena brojna biološka istraživanja na nanočesticama, još nedostaje podataka o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima i ponašanju u biološkim medijima. Razumijevanje tih parametara može pomoći pri boljem dizajnu i primjeni nanomaterijala.

6. LITERATURA

Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61, 428–437.

Allen JJ, Barron AR, Bott S, Bovet C, Boyd J, Bratt A, Chiang PT, Cisneros B, Conn C. Introduction to Atomic Absorption Spectroscopy. U: Physical Methods in Chemistry and Nano Science. Barron AR, urednik, Houston, Rice University, 2012, str. 3−16.

Argentiere S, Cella C, Cesaria M, Milani P, Lenardi C. Silver Nanoparticles in Complex Biological Media: an integrated characterization method before in vitro/in vivo experiments. 2016. (neobjavljen)

Asharani PV, Kah L, Mun G, Hande MP, Valiyaveettil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, 2009, 3, 279–290.

Carlson C, Hussain SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B*, 2008, 112, 13608–13619.

Cedervall T, Lynch I, Lindman S, Berggård T, Thulin E, Nilsson H, Dawson KA, Linse S. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2007, 104, 2050–205.

Chanana M, Rivera-Gil P, Correa-Duarte MA, LizMarzán LM, Parak WJ. Physicochemical Properties of Protein-Coated Gold Nanoparticles in Biological Fluids and Cells before and after Proteolytic Digestion. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52, 4179–4183.

Churchman AH, Wallace R, Milne SJ, Brown AP, Brydson R, Beales PA. Serum albumin enhances the membrane activity of ZnO nanoparticles. *Chem Commun*, 2013, 49, 4172–4174.

Domazet Jurašin D, Ćurlin M, Capjak I, Crnković T, Lovrić M, Babič M, Horák D, Vinković Vrček I, Gajović S. Surface coating affects behavior of metallic nanoparticles in a biological environment. *Beilstein J Nanotechnol*, 2016, 7, 246–262.

Dominguez-Medina S, Blankenbur J, Olson J, Landes CF, Link S. Adsorption of a Protein Monolayer via Hydrophobic Interactions Prevents Nanoparticle Aggregation under Harsh Environmental Conditions. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2013, 1, 833–842.

Durán N, Silveira CP, Durán M, Martinez DST. Silver nanoparticle protein corona and toxicity: a mini-review. *J Nanobiotechnol*, 2015, 13, 55.

El-Badawy D, Feldhake R, Venkatapathy R. State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More. 2010, EPA/600/R-10/084.

Evans TW. Review article: albumin as a drug—biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002, 16, 6–11.

Gampp H, Maeder M, Meyer CJ, Zuberbuhler AD. Calculation of equilibrium constants from multiwavelength spectroscopic data-IV Model-free least-squares refinement by use of evolving factor analysis. *Talanta*, 1986, 33, 943–951.

Goesmann H, Feldmann C. Nanoparticulate Functional Materials. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49, 1362–1395.

Goppert TM, Muller RH. Plasma protein adsorption of Tween 80- and poloxamer 188-stabilized solid lipid nanoparticles. *J Drug Target*, 2003, 11, 225–231.

Goppert TM, Muller RH. Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting. *Int J Pharm*, 2005, 302, 172–186.

Hegyi G, Kardos J, Kovács M, Málnási-Csizmadia A, Nyitray L, Pál G, Radnai L, Reményi A, Venekei I. Molecular forces stabilising ligand binding. U: Introduction to Practical Biochemistry. ELTE Faculties of Science Student Foundation, urednik, Mađarska, Eötvös Loránd University, 2013.

Height MJ. Nanosilver in Perspective. Expert Workshop „Nanosilver“, „Health Risk Assesment of Nanosilver“. Federal Institute for Risk Assesment (BfR) – Berlin Marienfelde, 2011.

Jhonsi MA, Kathiravan A, Renganathan R. Spectroscopic studies on the interaction of colloidal capped CdS nanoparticles with bovine serum albumin. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2009, 72, 167–172.

Kim HR, Andrieux K, Delomenie C, Chacun H, Appel M, Desmaele D, Taran F, Georgin D, Couvreur P, Taverna M. Analysis of plasma protein adsorption onto PEGylated nanoparticles by complementary methods: 2-DE, CE and Protein Labon-chip system. *Electrophoresis*, 2007, 28, 2252–2261.

Lemarchand C, Couvreur P, Besnard M, Costantini D, Gref R. Novel Polyester-Polysaccharide Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 2003, 20, 1284−92.

Levard C, Hotze EM, Lowry GV, Brown Jr. GE. Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environ Sci Technol*, 2012, 46, 6900−6914.

Li H, Xia H, Wang D, Tao X. Simple synthesis of monodisperse, quasi-spherical, citrate-stabilized silver nanocrystals in water. *Langmuir*, 2013, 29, 5074−5079.

Lindman S, Lynch I, Thulin E, Nilsson H, Dawson KA, Linse S. Systematic investigation of the thermodynamics of HSA adsorption to N-iso-propylacrylamide/ N-tert-butylacrylamide copolymer nanoparticles. Effects of particle size and hydrophobicity. *Nano Lett*, 2007, 7, 914–920.

Liu JY, Sonshine DA. Shervani S, Hurt RH. Controlled Release of Biologically Active Silver from Nanosilver Surfaces. *ACS Nano*, 2010, 4, 6903−6913.

Lundqvist M, Stigler J, Cedervall T, Berggard T, Flanagan MB, Lynch I, Elia G, Dawson K. The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACS Nano*, 2011, 5, 7503–7509.

Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105, 14265–14270.

Lynch I, Cedervall T, Lundqvist M, Cabaleiro-Lago C, Linse S, Dawson KA. The nanoparticle–protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Adv Colloid Interface Sci*, 2007, 134–135, 167–74.

Lynch I, Dawson KA. Protein–nanoparticle interactions. *NanoToday*, 2008, 3, 40–47.

Majorek KA, Porebski PJ, Dayal A, Zimmerman MD, Jablonska K, Stewart AJ, Chruszcz M, Minor W. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol Immunol*, 2012, 52, 174–182.

Malina D, Sobczak-Kupiec A, Wzorek Z, Kowalski Z. Silver Nanoparticles Synthesis with Different Concentrations of Polyvinylpyrrolidone. *Dig J Nanomater Biostruct*, 2012, 7, 1527–1534.

Mariam J, Dongre PM, Kothari DC. Study of Interaction of Silver Nanoparticles with Bovine Serum Albumin Using Fluorescence Spectroscopy. *J Fluoresc*, 2011, 21, 2193–2199.

Marvern Instruments Ltd. Zetasizer Basic, 1997.

McNeil-Watson F. Electrophoretic Light Scattering. U: Encyclopedia of Biophysics. Roberts GCK, urednik, Berlin, Springer, 2013, str. 648−654.

Miller JN. Recent advances in molecular luminescence analysis. *Proc Anal Div Chem Soc*, 1979, 16, 203–208.

Moerz ST, Kraegeloh A, Chanana M, Kraus T. Formation Mechanism for Stable Hybrid Clusters of Proteins and Nanoparticles. *ACS Nano*, 2015, 9, 6696–6705.

Moghimi SM, Muir IS, Illum L, Davis SS, Kolb-Bachofen V. Coating particles with a block co-polymer (poloxamine-908) suppresses opsonization but permits the activity of dysopsonins in the serum. *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1179, 157–165.

Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Bombelli FB, Dawson KA. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *J Am Chem Soc*, 2011, 133, 2525–2534.

Nakanishi K, Sakiyama T, Imamura K. On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J Biosci Bioeng*, 2001, 91, 233–244.

National Nanotechnology Initiative. The Initiative and Its Implementation Plan, 2000.

Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*, 2006, 307, 93–102.

Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W, Seal S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials*, 2007, 28, 4600–4607.

Peters Jr T. All About Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications. 1. izdanje, San Diego, Academic Press Inc., 1996.

Phenrat T, Saleh N, Sirk K, Kim HJ, Tilto RD, Lowry GV. Stabilization of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions by anionic polyelectrolytes: adsorbed anionic polyelectrolyte layer properties and their effect on aggregation and sedimentation. *J Nanopart Res*, 2008, 10, 795−814.

Podila R, Chen R, Ke PC, Rao AM. Effects of surface functional groups on the formation of' nanoparticle-protein corona. *Appl Phys Lett*, 2012, 101, e263701.

Rahman M, Laurent S, Tawil N, Yahia L, Mahmoudi M. Nanoparticle and Protein Corona. U: Protein-Nanoparticle Interactions. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Springer Series in Biophysics 15, 2013, str. 21–44.

Ravindran A, Singh A, Raichur AM, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA). *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, 76, 32–37.

Sahoo B, Goswami M, Nag S, Maiti S. Spontaneous formation of a protein corona prevents the loss of quantum dotfluorescence in physiological buffers. *Chem Phys Lett*, 2007, 445, 217–220.

Sant S, Poulin S, Hildgen P. Effect of polymer architecture on surface properties, plasma protein adsorption, and cellular interactions of pegylated nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 87, 885–895.

Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnol*, 2013, 11, 26.

Semple SC, Chonn A, Cullis PR. Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: relation to clearance behaviour in vivo. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998, 32, 3–17.

Sheehan D. Physical Biochemistry: Principles and Applications. 2. izdanje. Irska, Wiley-Blackwell, 2009, str. 58−63.

Shrivastava S, Bera T, Singh KS, Singh G, Ramchandrarao P, Dash D. Characterization of antiplatelet properties of silver nanoparticles. *ACS Nano*, 2009, 3, 1357–1364.

Simberg D, Park JH, Karmali PP, Zhang WM, Merkulov S, McCrae K, Bhatia SN, Sailor M, Ruoslahti E. Differential proteomics analysis of the surface heterogeneity of dextran iron

oxide nanoparticles and the implications for their in vivo clearance. *Biomaterial*s, 2009, 30, 3926–3933.

SPECFIT Global Analysis System With Expanded Factor Analysis & Marquardt Least Squares Minimization User Manual. Chapel Hill, SAD, Specfit Software Associates, 1993.

Štambuk N, Manojlović Z, Turčić P, Martinić R, Konjevoda P, Weitner T, Wardega P, Gabričević M. A Simple Three-Step Method for Design and Affinity Testing of New Antisense Peptides: An Example of Erythropoietin. *Int J Mol Sci*, 2014, 15, 9209–9223.

Vinković Vrček I, Žuntar I, Petlevski R, Pavičić I, Dutour Sikirić M, Ćurlin M, Goessler W. Comparison of in vitro toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells. *Environ Toxicol*, 2014.

Walczyk D, Baldelli Bombelli F, Monopoli MP, Lynch I, Dawson KA. What the Cell "Sees" in Bionanoscience. *J Am Chem Soc*, 2010, 132, 5761–5768.

Walkey CD, Chan WC. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem Soc Rev*, 2012, 41, 2780–2799.

Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WCW. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. *J Am Chem Soc*, 2012, 134, 2139–2147.

Zook JM, MacCuspie RI, Locasicio LE, Halter MD, Elliott JT. Stable Nanoparticle Aggregates/Agglomerates of Different Sizes and the Effect of Their Size on Hemolytic Cytotoxicity. *Nanotoxicology*, 2011, 5, 517–530.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

Interakcija albumina s nanočesticama srebra različite površinske funkcionalizacije

Tea Crnković

U današnjim predkliničkim testiranjima farmaceutskih molekula, među kojima se nalaze i nanočestice za biomedicinsku primjenu, evaluacija vezanja proteina plazme je najvažniji element kod određivanja efikasnosti, sigurnosti i raspolaganja s tim molekulama. Zbog toga je u ovom istraživanju primijenjen modelni sustav koji se sastojao od goveđeg serumskog albumina (BSA) i 5 vrsta srebrnih nanočestica (AgNP) s različitim površinskim omotačima. Karakterizacija i stabilnost AgNP te njihova interakcija s BSA praćeni su metodama dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti, transmisijskom elektronskom mikroskopijom, UV-Vis spektrofotometrijom te spektrofluorimetrijom. Otkriveno je da BSA dovodi do koloidne stabilizacije AgNP u fosfatnom puferu neovisno o njihovom kemijskom sastavu, strukturi površine i površinskom naboju. Također su dobivene različite konstante vezanja AgNP i BSA ovisno o površinskoj funkcionalizaciji AgNP i korištenom mediju. Time je potvrđena hipoteza da biomolekule poput BSA mogu pružiti stabilizaciju nanočestica u biološkom okruženju.

Ključne riječi: nanočestice srebra, albumin, interakcija, biološki medij, stabilnost

7.2. Summary

Interaction of albumin and silver nanoparticles with different surface funcionalization

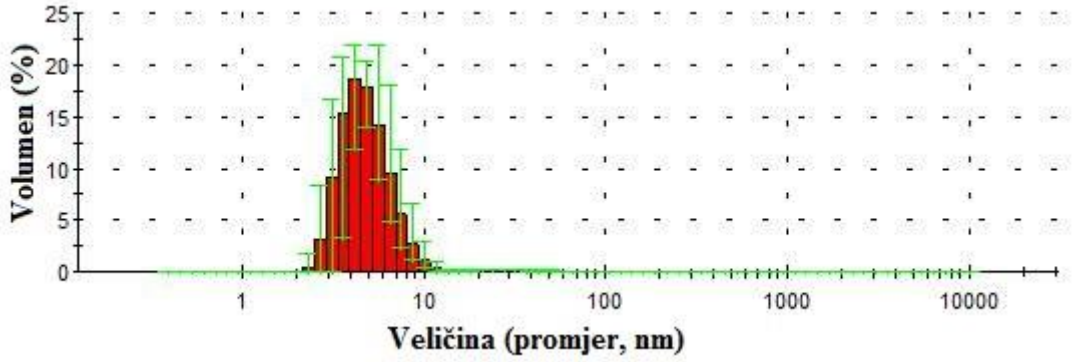
Tea Crnković

In today's preclinical testings of pharmaceutical molecules, among which are also present nanoparticlas for biomedical applications, evaluation of plasma protein binding is one of the most important elements in efficency, safety and distribution determination. Therefore, in this thesis a model system of bovine serum albumin (BSA) and 5 types of silver nanoparticles (AgNP) with different surface coatings was used. Characterization and stability of AgNP along with their interaction with BSA were determined by using dynamic and electrophoretic light scattering methods, transmission electron microscopy, UV-Vis spectrophotometry, and spectrofluorimetry. It was discovered that BSA provided colloidal stability for AgNP in phosphate buffer regardless of their chemical composition, surface structure and surface charge. Also, different binding constants of BSA and AgNP were obtained depending on AgNP surface functionalisation and used medium. Thereby, a hypothesis which states that biomolecules like BSA can enhance stabilization of nanoparticles in biological environment was confirmed.

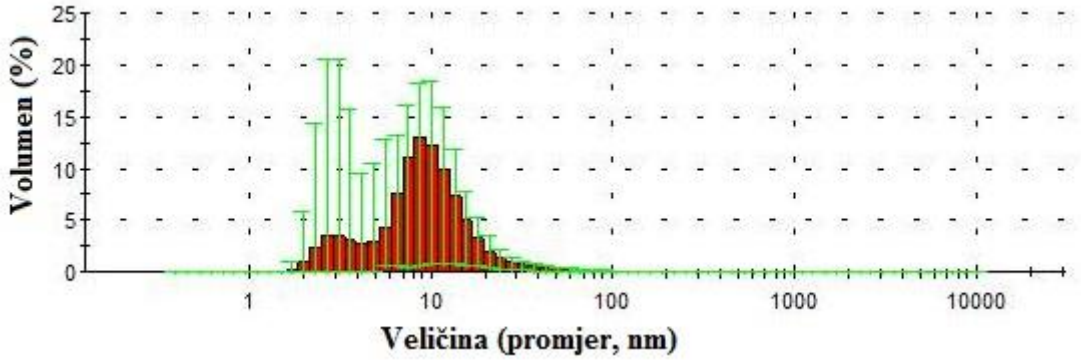
Keywords: silver nanoparticles, albumin, interaction, biological medium, stability

8. PRILOZI

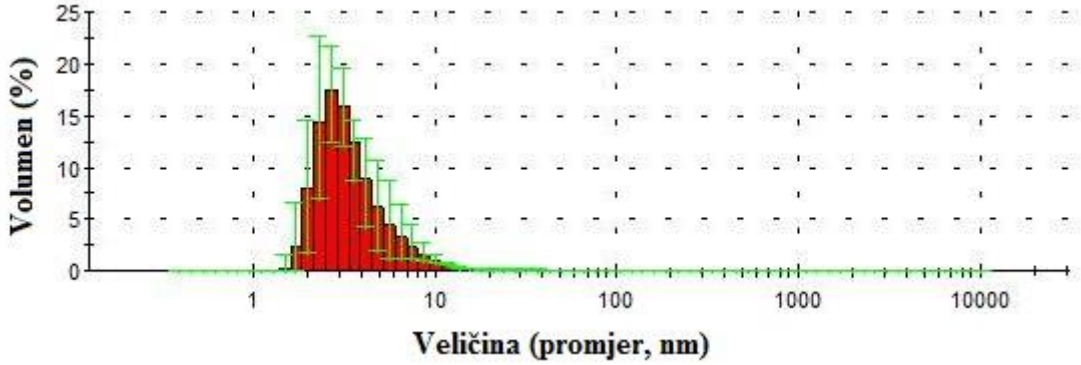
8.1. DLS distribucija veličina nanočestica srebra



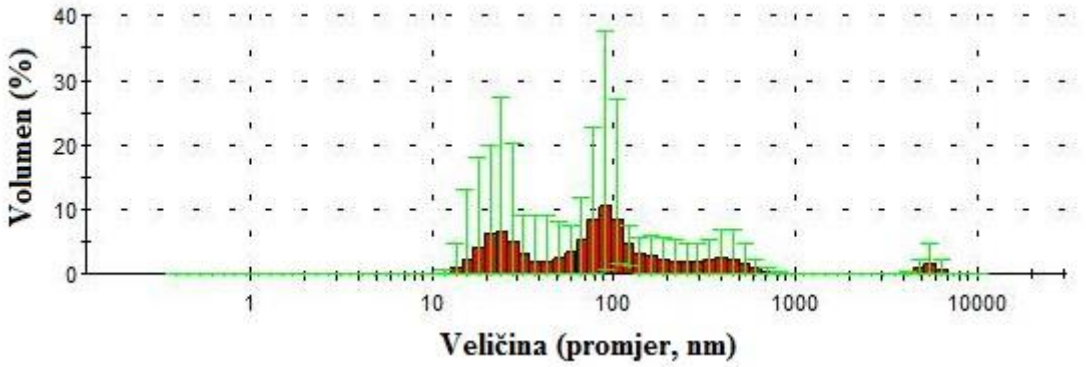
Slika 8.1.1. Dijagram distribucije veličina PVP-AgNP u ultračistoj vodi.



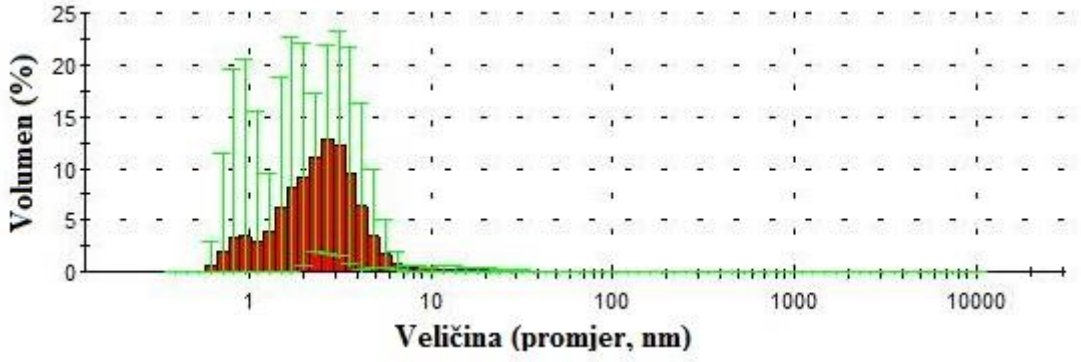
Slika 8.1.2. Dijagram distribucije veličina CTA-AgNP u ultračistoj vodi.



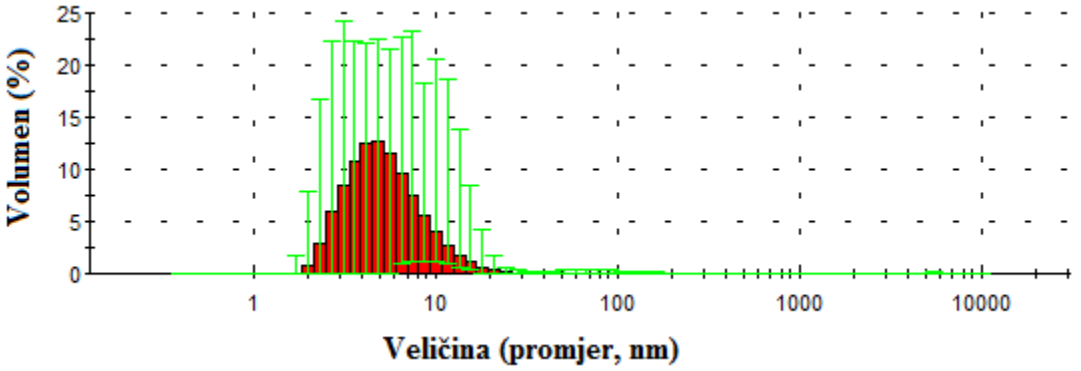
Slika 8.1.3. Dijagram distribucije veličina PLL-AgNP u ultračistoj vodi.



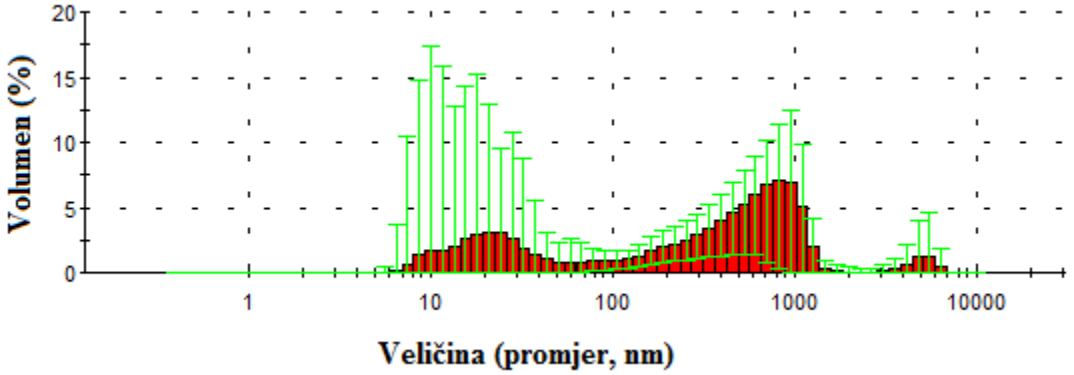
Slika 8.1.4. Dijagram distribucije veličina CIT-AgNP u ultračistoj vodi.



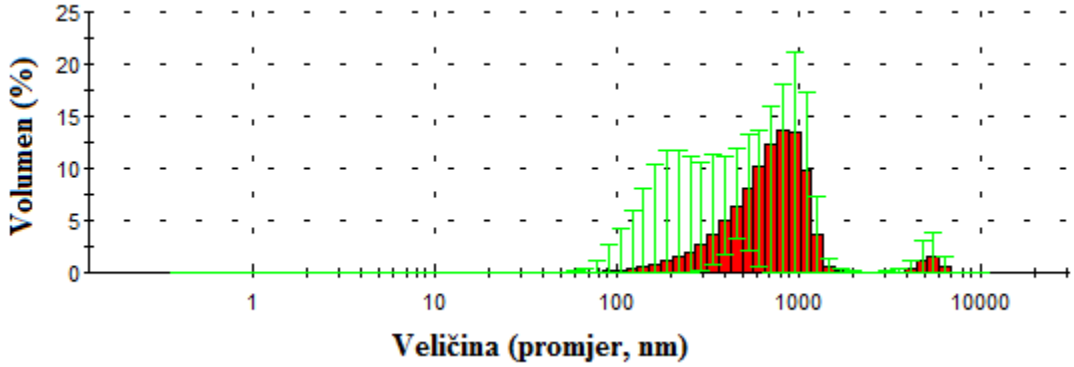
Slika 8.1.5. Dijagram distribucije veličina AOT-AgNP u ultračistoj vodi.



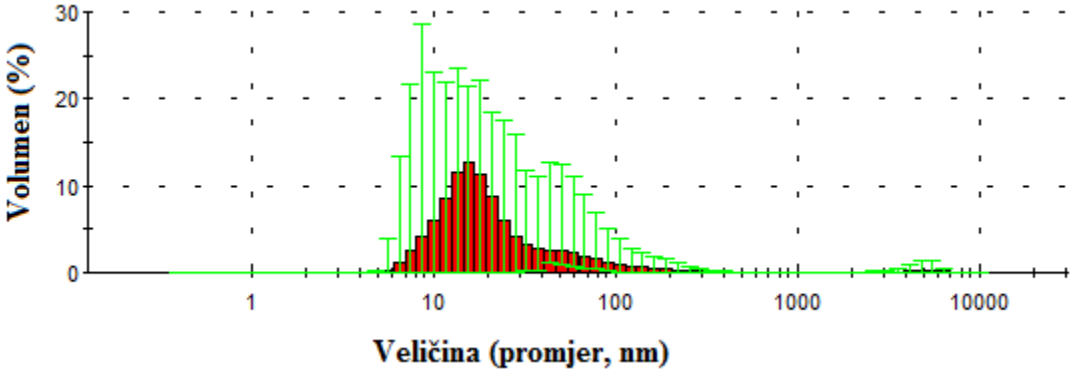
Slika 8.1.6. Dijagram distribucije veličina PVP-AgNP u fosfatnom puferu.



Slika 8.1.7. Dijagram distribucije veličina CTA-AgNP u fosfatnom puferu.

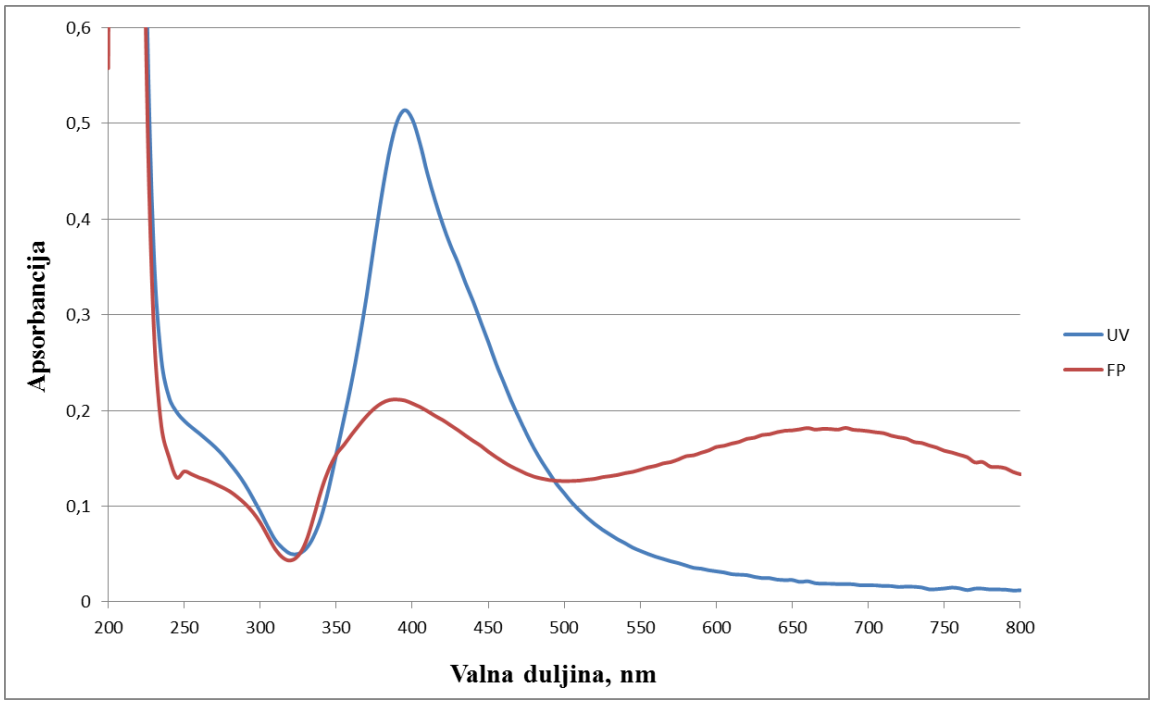


Slika 8.1.8. Dijagram distribucije veličina PLL-AgNP u fosfatnom puferu.

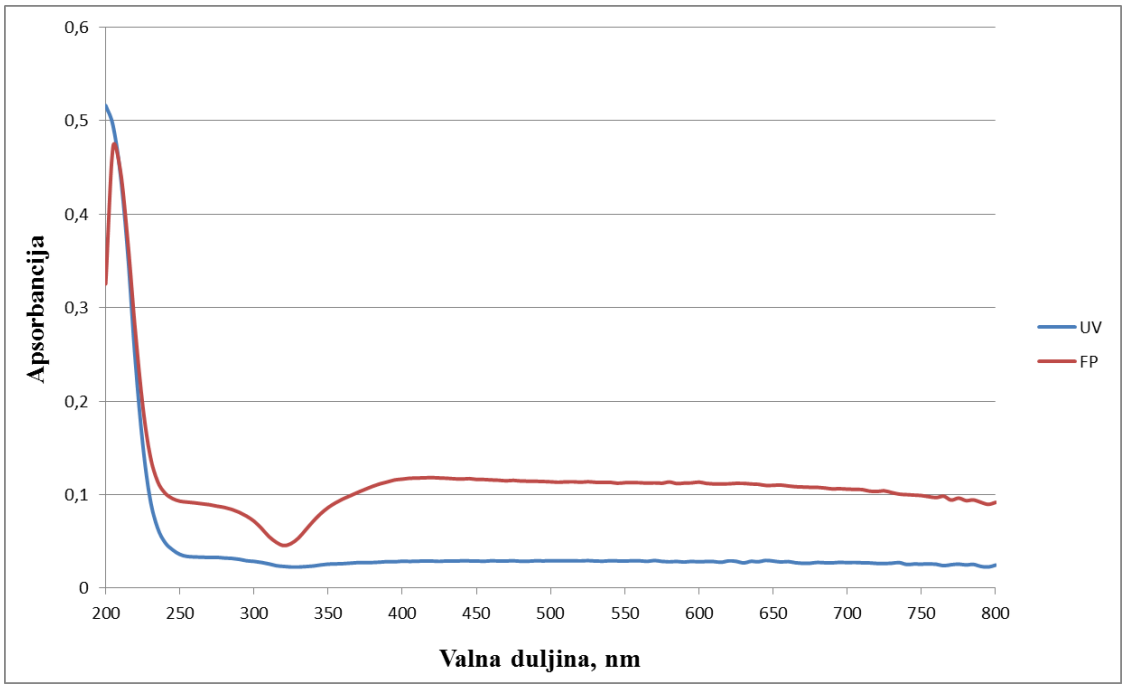


Slika 8.1.9. Dijagram distribucije veličina CIT-AgNP u fosfatnom puferu.

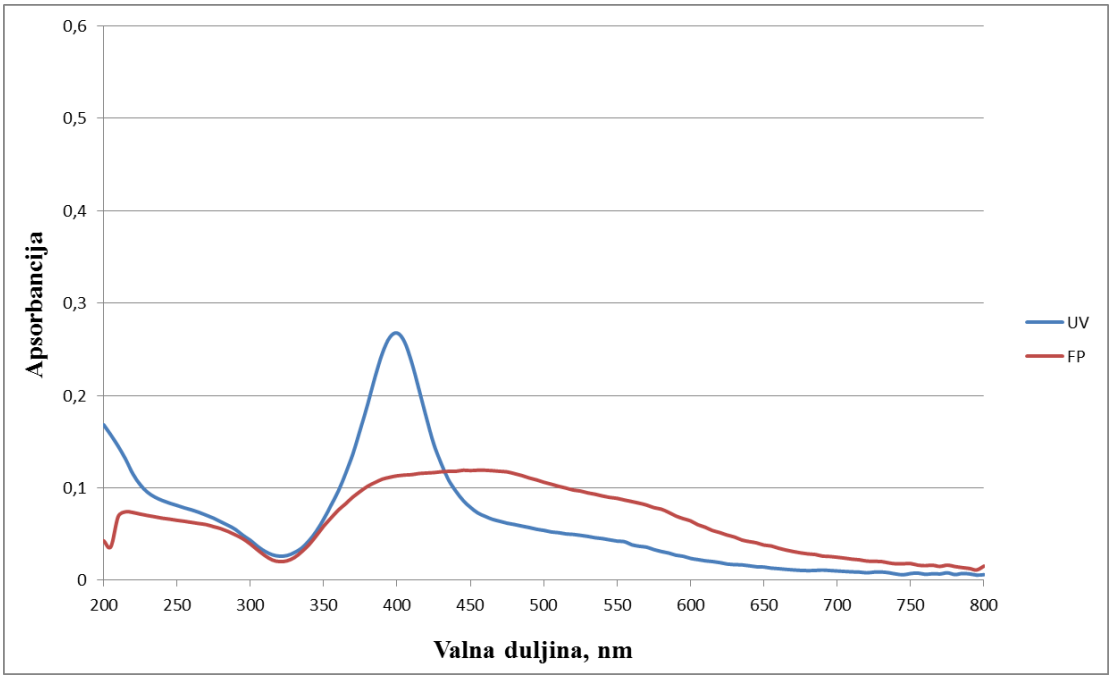
8.2. UV-Vis spektri nanočestica srebra



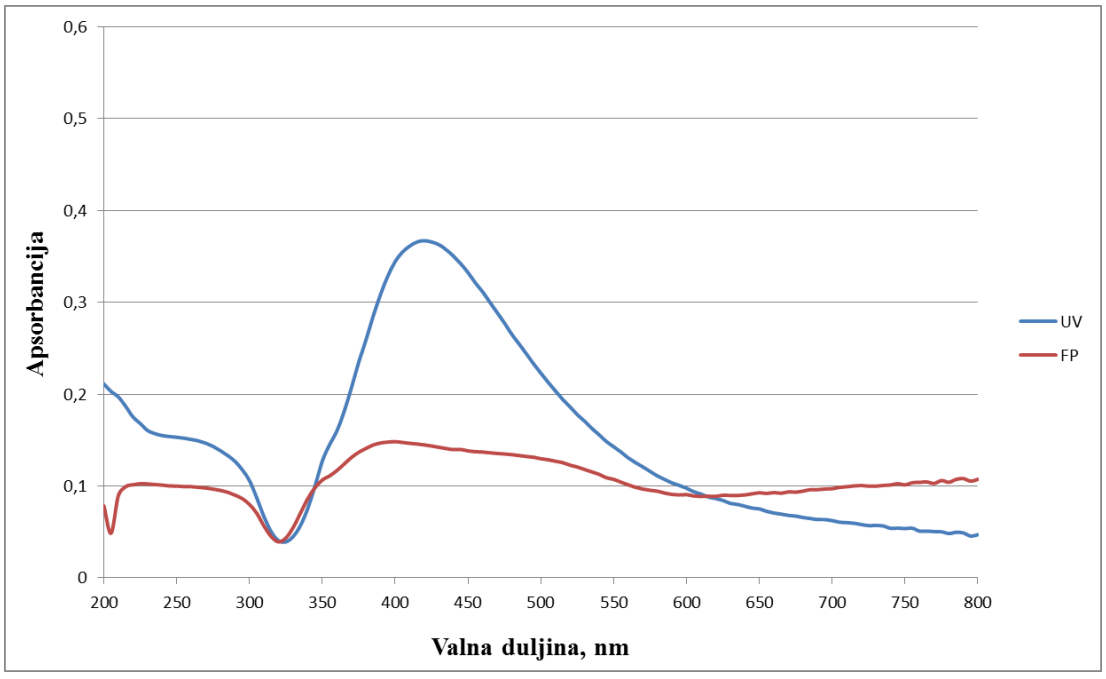
Slika 8.2.1. UV-Vis spektar PVP-AgNP (50 µM) u ultračistoj vodi (UV) i fosfatnom puferu (FP).



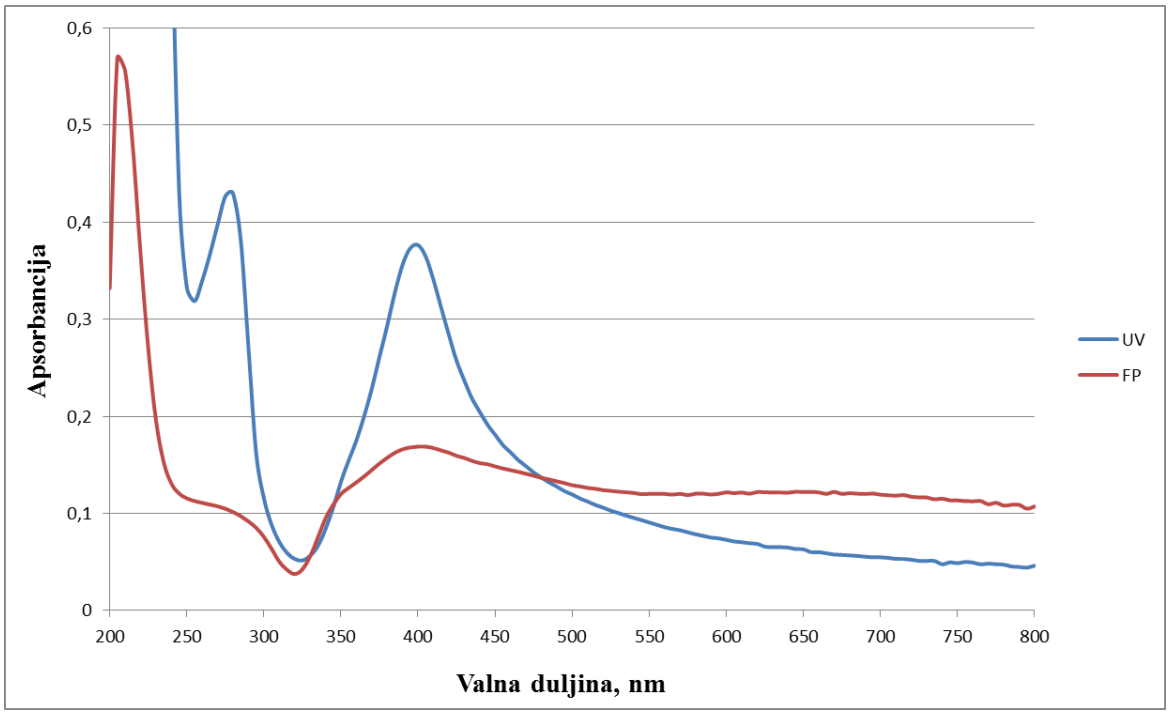
Slika 8.2.2. UV-Vis spektar CTA-AgNP (50 µM) u ultračistoj vodi (UV) i fosfatnom puferu (FP).



Slika 8.2.3. UV-Vis spektar PLL-AgNP (50 µM) u ultračistoj vodi (UV) i fosfatnom puferu (FP).

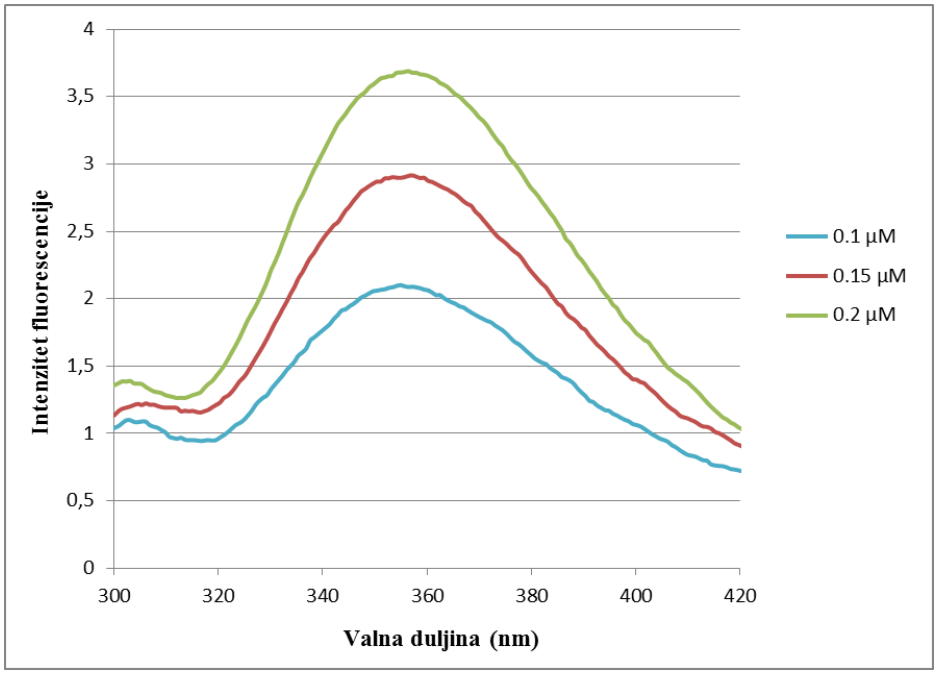


Slika 8.2.4. UV-Vis spektar CIT-AgNP (50 µM) u ultračistoj vodi (UV) i fosfatnom puferu (FP).

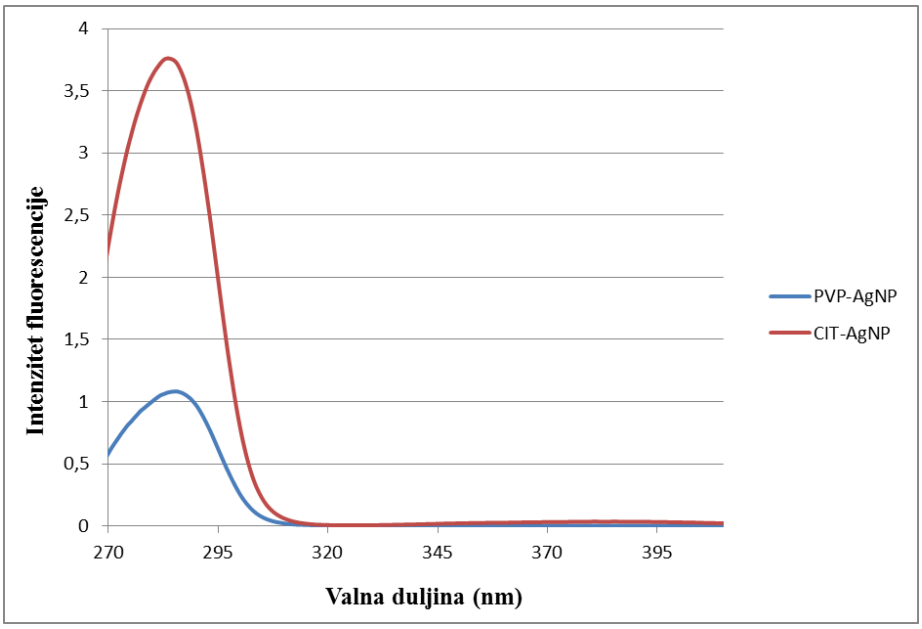


Slika 8.2.5. UV-Vis spektar AOT-AgNP (50 µM) u ultračistoj vodi (UV) i fosfatnom puferu (FP).

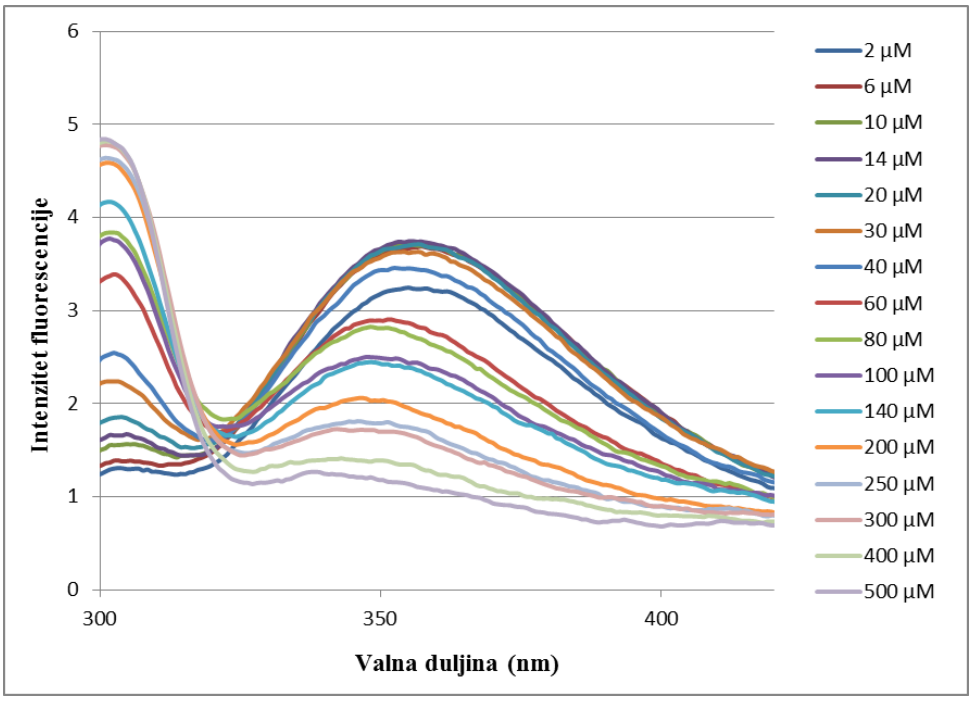
8.3. Fluorescencijski spektri albumina uz prisutnost AgNP u ultračistoj vodi



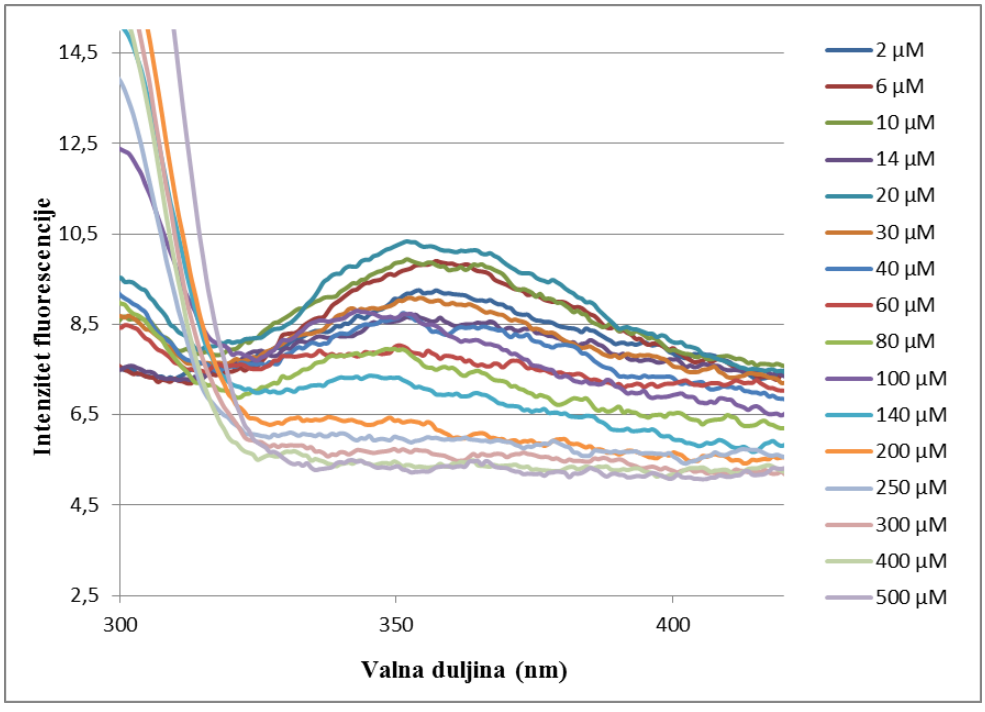
Slika 8.3.1. Fluorescencijski spektar albumina pri koncentracijama 0.1, 0.15 i 0.2 µM u ultračistoj vodi.



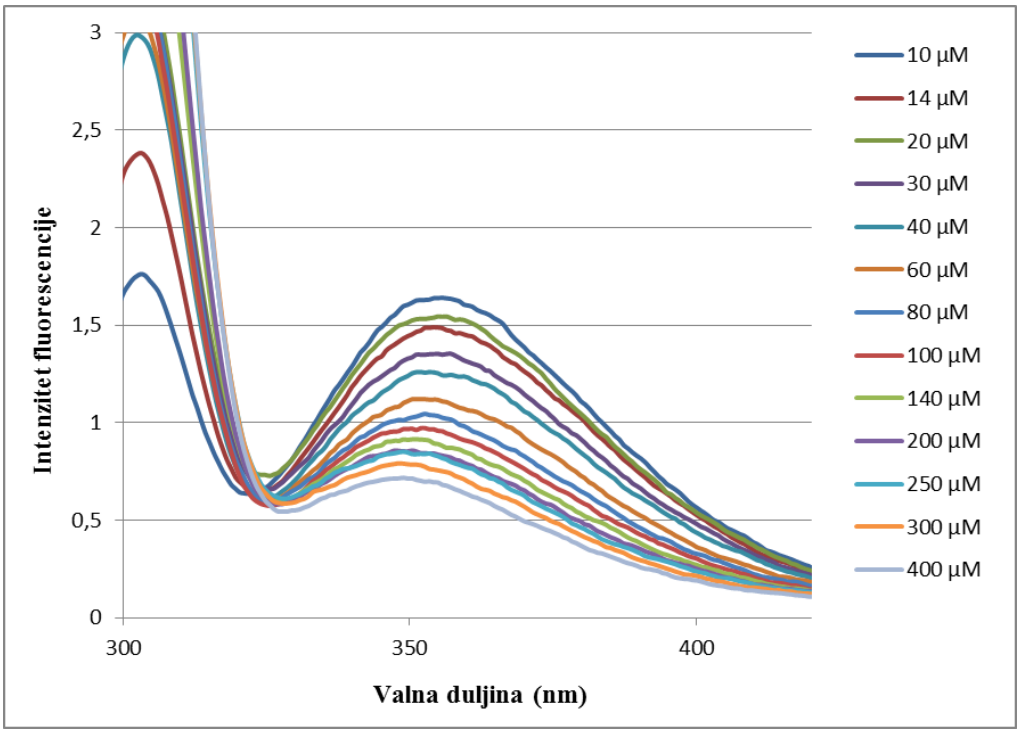
Slika 8.3.2. Fluorescencijski spektar PVP-AgNP i CIT-AgNP koncentracije 100 µM u ultračistoj vodi.



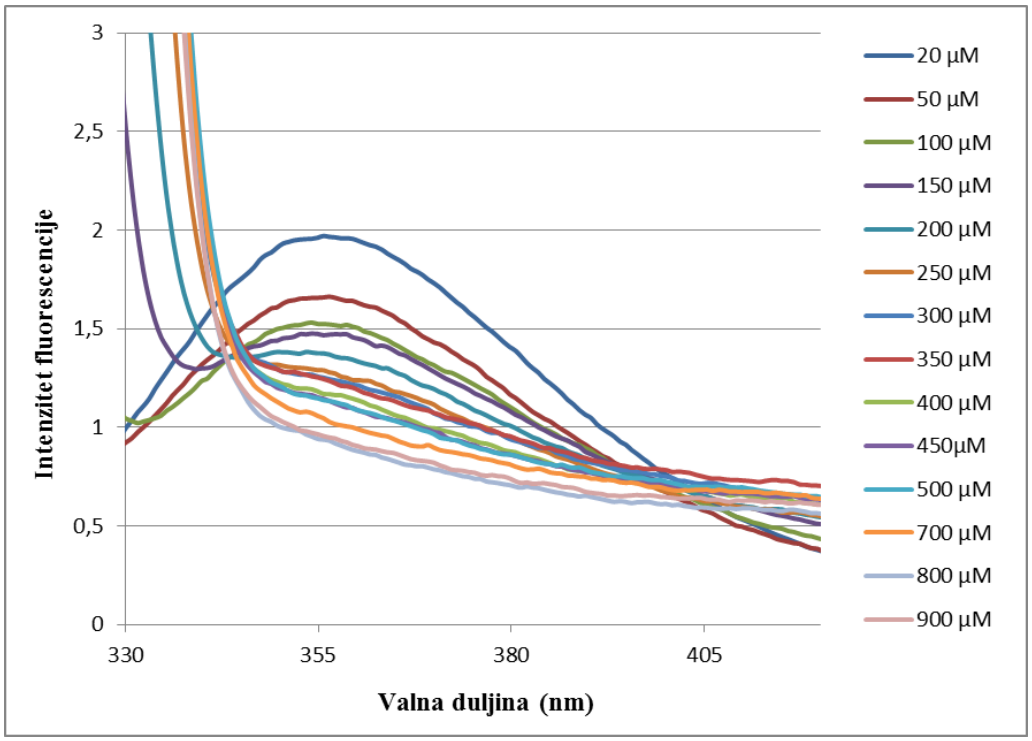
Slika 8.3.3. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.2 µM) i rasponu koncentracija PVP-AgNP od 2 do 500 µM u ultračistoj vodi.



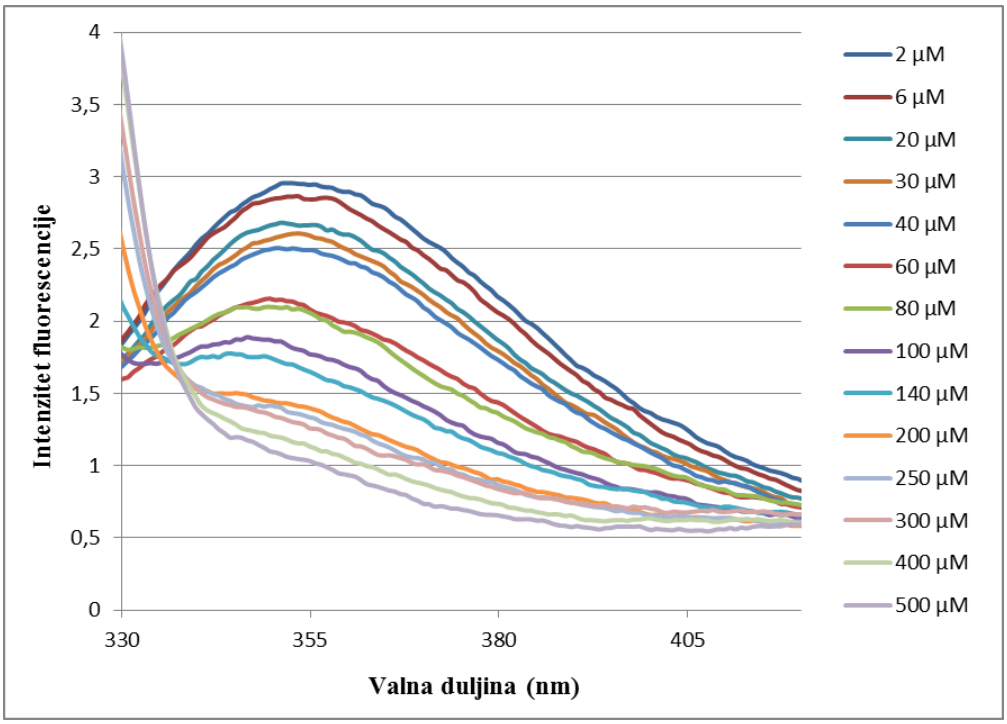
Slika 8.3.4. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.2 µM) i rasponu koncentracija CTA-AgNP od 2 do 500 µM u ultračistoj vodi.



Slika 8.3.5. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.2 µM) i rasponu koncentracija PLL-AgNP od 10 do 400 µM u ultračistoj vodi.

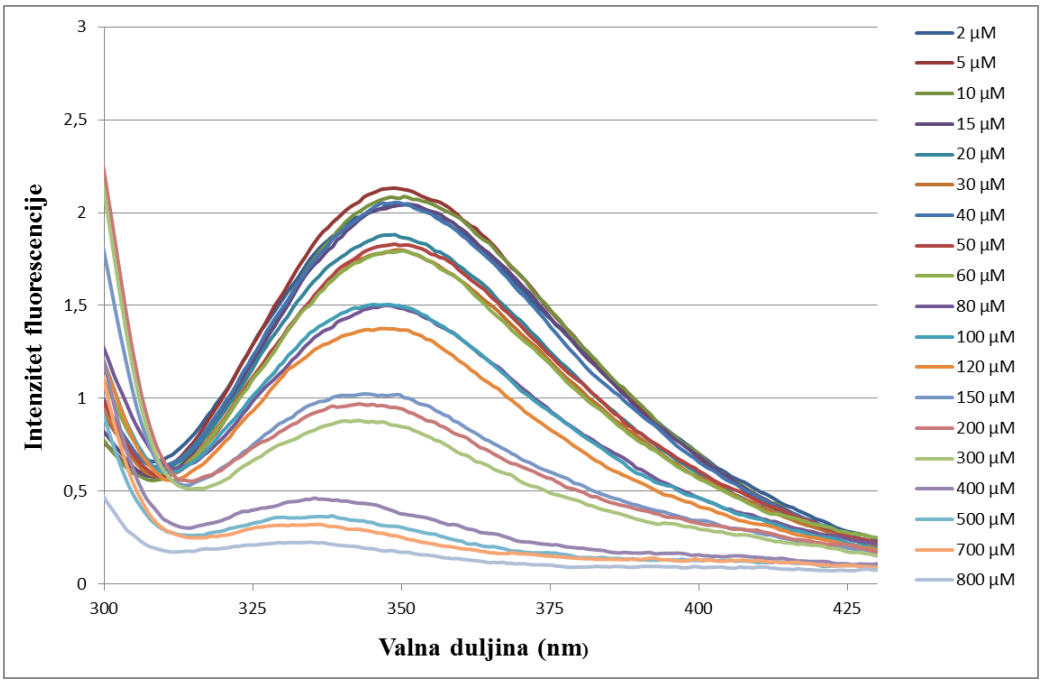


Slika 8.3.6. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.3 µM) i rasponu koncentracija CIT-AgNP od 20 do 900 µM u ultračistoj vodi.

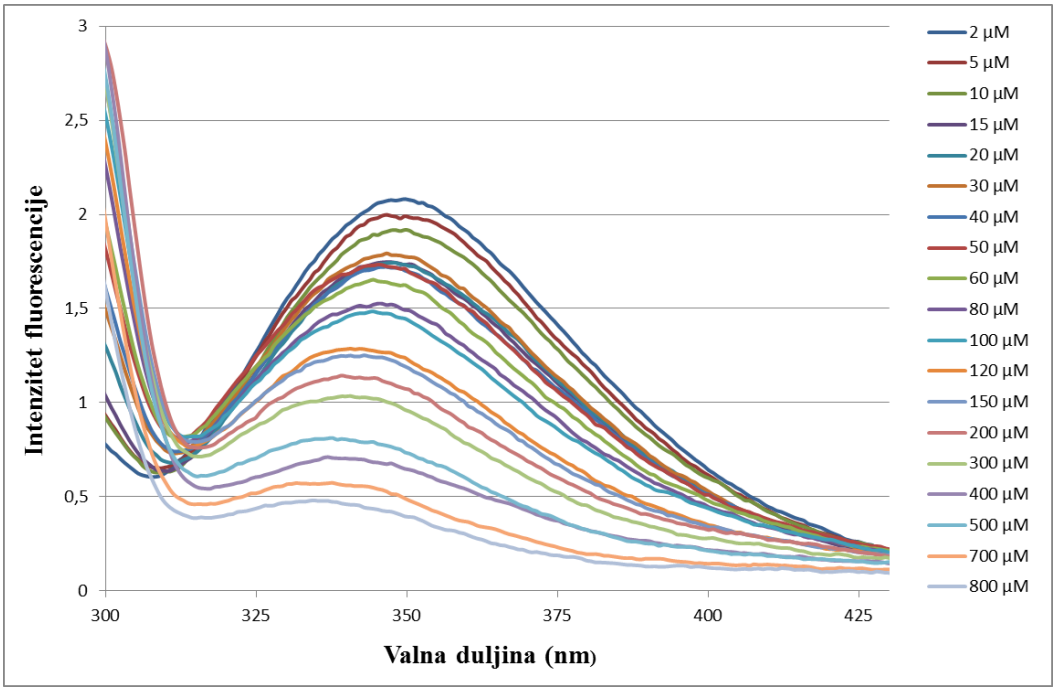


Slika 8.3.7. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.15 µM) i rasponu koncentracija AOT-AgNP od 2 do 500 µM u ultračistoj vodi.

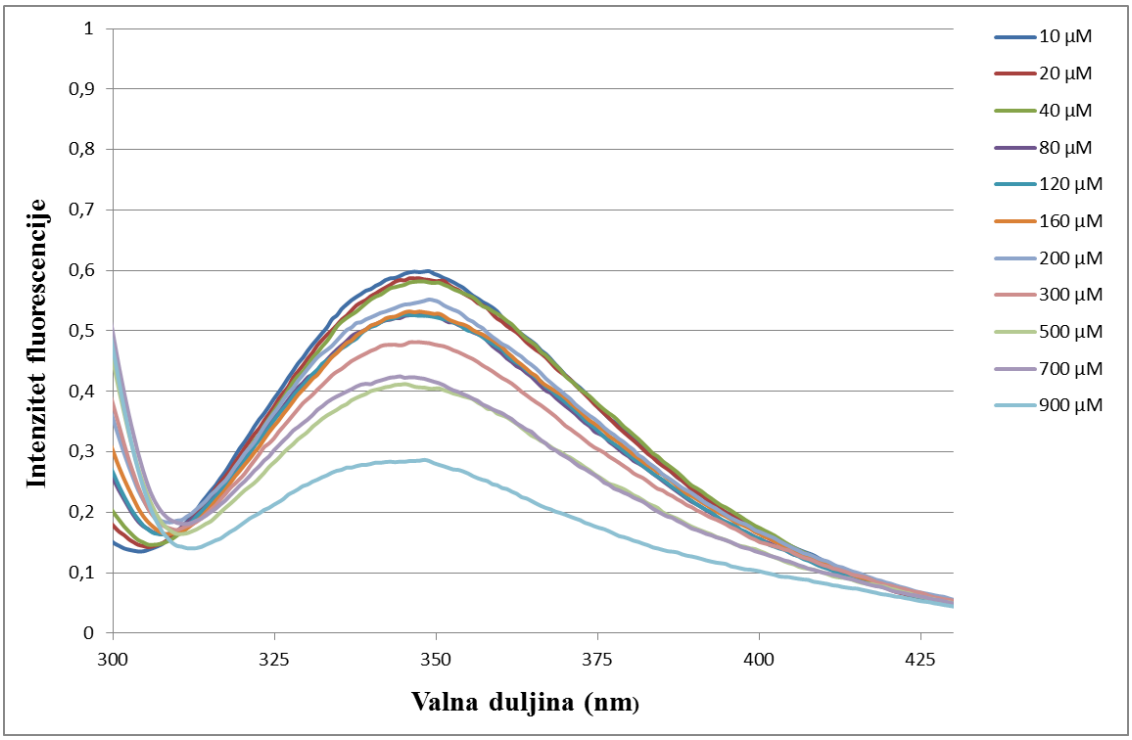
8.4. Fluorescencijski spektri albumina uz prisutnost AgNP u fosfatnom puferu



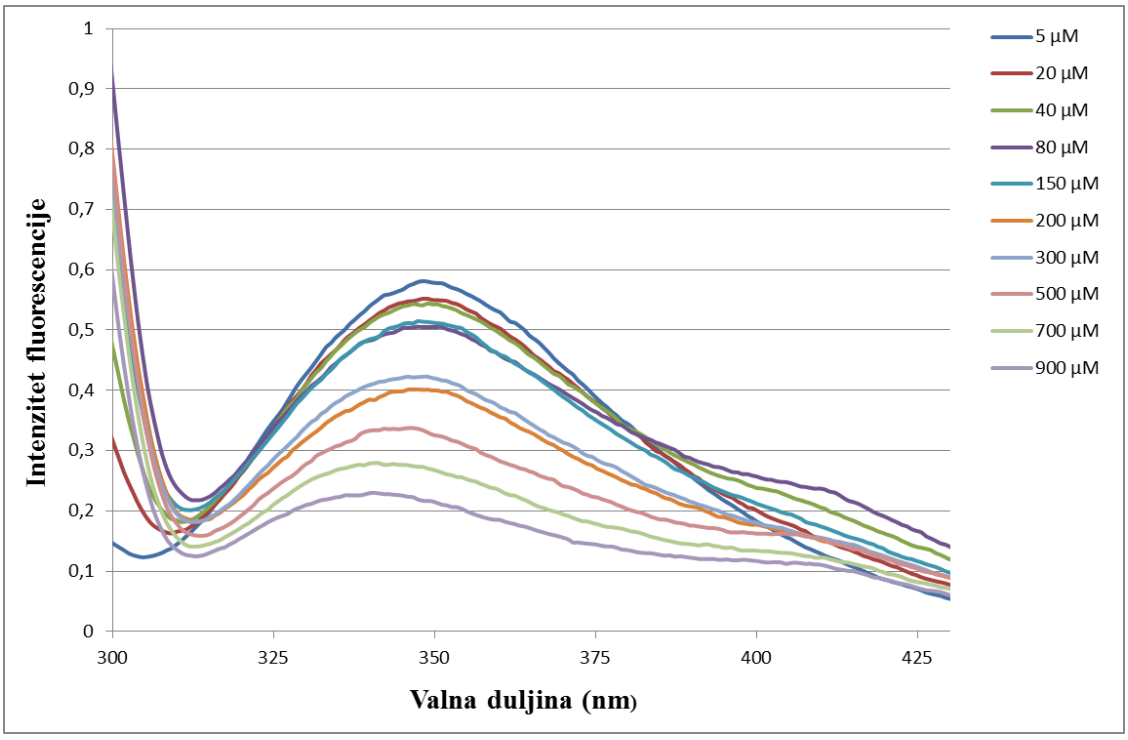
Slika 8.4.1. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.3 µM) i rasponu koncentracija PVP-AgNP od 2 do 900 µM u fosfatnom puferu.



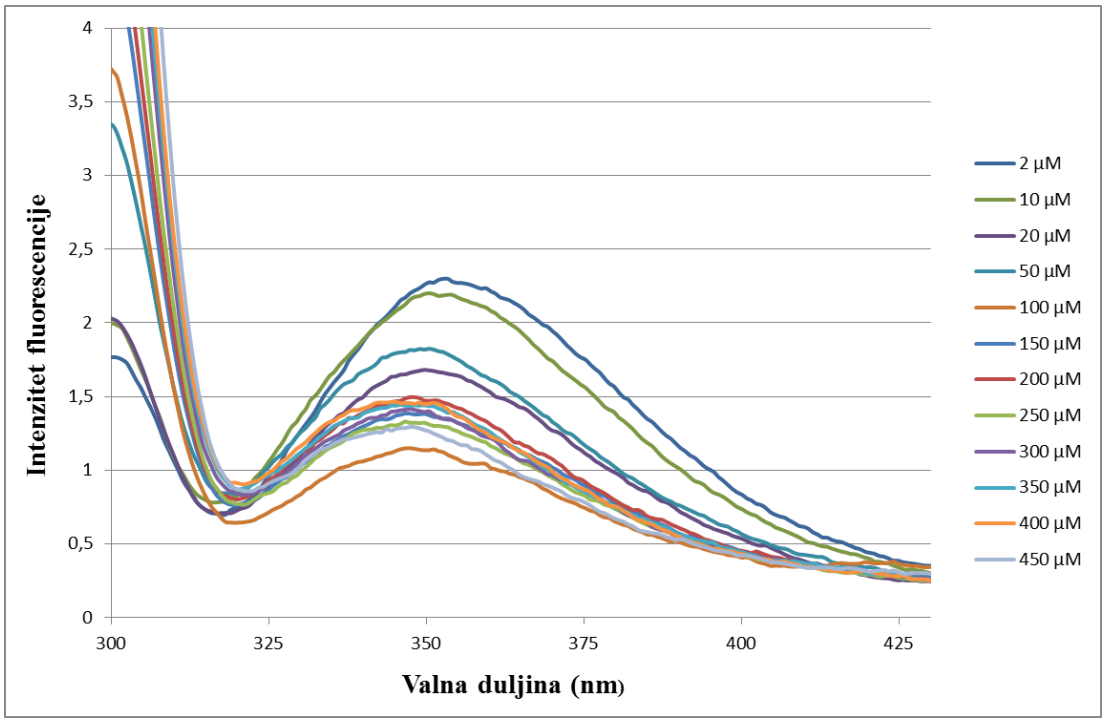
Slika 8.4.2. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.3 µM) i rasponu koncentracija CTA-AgNP od 2 do 800 µM u fosfatnom puferu.



Slika 8.4.3. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.3 µM) i rasponu koncentracija PLL-AgNP od 10 do 900 µM u fosfatnom puferu.



Slika 8.4.4. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.3 µM) i rasponu koncentracija CIT-AgNP od 5 do 900 µM u fosfatnom puferu.



Slika 8.4.5. Fluorescencijski spektar albumina pri stalnoj koncentraciji (0.3 µM) i rasponu koncentracija AOT-AgNP od 2 do 450 µM u fosfatnom puferu.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za organsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

INTERAKCIJA ALBUMINA S NANOČESTICAMA SREBRA RAZLIČITE POVRŠINSKE FUNKCIONALIZACIJE

Tea Crnković

SAŽETAK

U današnjim predkliničkim testiranjima farmaceutskih molekula, među kojima se nalaze i nanočestice za biomedicinsku primjenu, evaluacija vezanja proteina plazme je najvažniji element kod određivanja efikasnosti, sigurnosti i raspolaganja s tim molekulama. Zbog toga je u ovom istraživanju primijenjen modelni sustav koji se sastojao od goveđeg serumskog albumina (BSA) i 5 vrsta srebrnih nanočestica (AgNP) s različitim površinskim omotačima. Karakterizacija i stabilnost AgNP te njihova interakcija s BSA praćeni su metodama dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti, transmisijskom elektronskom mikroskopijom, UV-Vis spektrofotometrijom te spektrofluorimetrijom. Otkriveno je da BSA dovodi do koloidne stabilizacije AgNP u fosfatnom puferu neovisno o njihovom kemijskom sastavu, strukturi površine i površinskom naboju. Također su dobivene različite konstante vezanja AgNP i BSA ovisno o površinskoj funkcionalizaciji AgNP i korištenom mediju. Time je potvrđena hipoteza da biomolekule poput BSA mogu pružiti stabilizaciju nanočestica u biološkom okruženju.

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

Rad sadrži: 66 stranica, 39 grafičkih prikaza, 11 tablica i 61 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nanočestice srebra, albumin, interakcija, biološki medij, stabilnost

Mentor: **Dr. sc. Valerije Vrček,** *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Valerije Vrček,** *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ivana Vinković Vrček, *viša znanstvena suradnica Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.*
Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2016.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

INTERACTION OF ALBUMIN AND SILVER NANOPARTICLES WITH DIFFERENT SURFACE FUNCIONALIZATION

Tea Crnković

SUMMARY

In today's preclinical testings of pharmaceutical molecules, among which are also present nanoparticlas for biomedical applications, evaluation of plasma protein binding is one of the most important elements in efficency, safety and distribution determination. Therefore, in this thesis a model system of bovine serum albumin (BSA) and 5 types of silver nanoparticles (AgNP) with different surface coatings was used. Characterization and stability of AgNP along with their interaction with BSA were determined by using dynamic and electrophoretic light scattering methods, transmission electron microscopy, UV-Vis spectrophotometry, and spectrofluorimetry. It was discovered that BSA provided colloidal stability for AgNP in phosphate buffer regardless of their chemical composition, surface structure and surface charge. Also, different binding constants of BSA and AgNP were obtained depending on AgNP surface functionalisation and used medium. Thereby, a hypothesis which states that biomolecules like BSA can enhance stabilization of nanoparticles in biological environment was confirmed.

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

Thesis includes: 66 pages, 39 figures, 11 tables and 61 references. Original is in Croatian language.

Keywords: silver nanoparticles, albumin, interaction, biological medium, stability

Mentor: **Valerije Vrček, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Valerije Vrček, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivana Vinković Vrček, Ph.D. *Senior Research Associate*, Institute for Medical Research and Occupational Health in Zagreb
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2016