

Vijabilnost stanične linije HEK 293 u prisustvu sintetiziranih nanočestica zlata

Jančec, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:174730>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Marta Jančec

**Vijabilnost stanične linije HEK 293 u prisustvu sintetiziranih
nanočestica zlata**

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen na Institutu Ruđer Bošković te na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Marijana Gotića i. doc. dr. sc. Inge Marijanović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Zahvale

Zahvaljujem se mentorima dr. sc. Marijanu Gotiću i doc. dr. sc. Ingi Marijanović na brojnim znanstvenim i stručnim savjetima i pomoći tijekom izrade ovoga rada. Hvala vam od srca na posvećenom vremenu i znanju.

Iskrenu zahvalu upućujem neposrednoj voditeljici dr. sc. Tanji Jurkin na trudu, savjetima i utrošenom vremenu prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se dipl. inž. Stanislavu Martinu te Jasminu Foriću na nesebičnoj pomoći.

Veliko hvala Maji Pušić, mag. exp. biologije i dr. sc. Maji Antunović na pomoći i sugestijama prilikom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada kao i korisnim savjetima pri pisanju.

Zahvaljujem se svim kolegama i kolegicama, a posebno Pauli na pomoći i podršci, na motivaciji prilikom zajedničkog učenja i na druženju unutar i izvan faksa.

Hvala sestri Augustini i braći Filipu i Karlu što ste puni ljubavi uvijek uz mene.

Veliku zahvalu upućujem mužu Pašku. Hvala ti na razumijevanju, velikoj podršci i beskrajnoj ljubavi.

Najveću zahvalu upućujem svojim roditeljima koji su bili uz mene sve ove godine. Hvala vam na neizmjerljivoj potpori, ljubavi, strpljenju i odricanjima kojima ste mi omogućili završetak studiranja.

U Zagrebu, 2017. godine.

Marta Jančec

Ovaj diplomski rad posvećujem svojim roditeljima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

VIJABILNOST STANIČNE LINIJE HEK 293 U PRISUSTVU SINTETIZIRANIH NANOČESTICA ZLATA

Marta Jančec

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nanočestice zlata (AuNČ) koriste se kao biosenzori i kao kontrastni i radiosenzitivacijski agensi. Pored primjene u biomedicini, AuNČ pokazuju i izrazitu katalitičku aktivnost za oksidaciju alkohola. U ovom diplomskom radu AuNČ su sintetizirane novim originalnim postupkom oksidacije alkohola kod alkalnog pH. Sintetizirane AuNČ analizirane su pretražnom elektronskom mikroskopijom i rentgenskom difrakcijom. Koncentracija nanočestica u alkoholnim suspenzijama određena je uređajem za analizu praćenja nanočestica (*engl. Nanoparticle tracking analysis*). Sintetizirane AuNČ aplicirane su na stanice HEK 293 (*engl. human embryonic kidney cells 293*) u koncentracijskom rasponu od $0,88 \times 10^9$ do $1,80 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹, a vijabilnost stanica ispitana je testom MTT. Vijabilnost stanica HEK 293 24 sata nakon izlaganja uzorcima AuNČ dispergiranih u alkoholu je bila veća od vijabilnosti stanica izlaganih samo pripadajućem alkoholu. Nakon 48 sati izlaganja stanica HEK 293 AuNČ, vijabilnost stanica relativno je nešto manja u odnosu na iste uvjete kao kod 24 sati. Benzilni alkohol ima aromatski karakter, a n-propanol i 1-pentanol su lančaste molekule što može biti razlog za toksični utjecaj benzilnog alkohola na stanice.

(40 stranica, 15 slika, 4 tablice, 43 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: nanočestice zlata, test MTT, vijabilnost, alkohol

Voditelj: dr. sc. Marijan Gotić i doc. dr. sc. Inga Marijanović

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Inga Marijanović

izv. prof. dr. sc. Nenad Judaš

izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Zamjena: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

VIABILITY OF CELL LINE HEK 293 IN THE PRESENCE OF SYNTHESIZED GOLD NANOPARTICLES

Marta Jančec

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Gold Nanoparticles (AuNPs) are used as biosensors and as contrast and radiosensitizing agents. In addition to biomedical applications, AuNPs have shown excellent catalytic activity for alcohol oxidation. In this thesis, AuNPs were synthesized using new synthesis route, *i.e.* by alcohol oxidation in solution at alkaline pH. Synthesized AuNPs were examined using scanning electron microscope and X-ray diffraction. Besides, the synthesized AuNPs were applied to HEK 293 (human embryonic kidney cells 293) cells in concentration range between $0,88 \times 10^9$ and $1,80 \times 10^{11}$ NP L⁻¹ and the viability of cells was examined using MTT test. Viability of HEK 293 cells 24 hours after being exposed to AuNPs dispersed in alcohol was higher compared to viability of cells exposed only to corresponding alcohol. After 48 hours exposure of cells to AuNPs viability of cells was lower in comparison to the 24 hours exposure under the same experimental conditions. Since benzyl alcohol has aromatic character, whereas n-propanol and 1-pentanol are chained molecules, this fact may be a reason for toxic effect of benzyl alcohol on HEK 293 cells.

(40 pages, 15 pictures, 4 tables, 43 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: gold nanoparticles, MTT assay, viability, alcohol

Supervisor: Dr. Marijan Gotić, scientific adviser and dr. Inga Marijanović, Asst. Prof.

Reviewers: dr. Inga Marijanović, Asst. Prof.

izv. prof. dr. sc. Nenad Judaš

izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Substitute: dr. sc. Tomislav Jednačak, Asst. Prof.

Thesis accepted:

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. NANOČESTICE ZLATA.....	1
1.2. SINTEZA AuNČ.....	2
1.3. PRIMJENA AuNČ.....	3
1.3.1. KATALIZA.....	3
1.3.2. BIOMEDICINSKA PRIMJENA AuNČ.....	4
1.4. TOKSIČNOST I EKOTOKSIČNOST AuNČ.....	5
1.5. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	7
2. MATERIJALI I METODE.....	8
2.1. KEMIKALIJE, REAGENSI I MEDIJ ZA UZGOJ STANICA.....	8
2.2. INSTRUMENTI I PRIBOR.....	8
2.3. SINTEZA NANOČESTICA ZLATA.....	9
2.4. MIKROSTRUKTURNA KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA ZLATA.....	10
2.5. UZGOJ STANIČNE LINIJE HEK 293.....	11
2.6. ODREĐIVANJE BROJA VIJABILNIH STANICA U KULTURI.....	12
2.7. TRETIRANJE STANICA NANOČESTICAMA ZLATA.....	12
2.8. ISPITIVANJE VIJABILNOSTI STANICA TESTOM MTT.....	14
2.9. MORFOLOGIJA STANICA NAKON TRETMANA S AuNČ.....	16
3. REZULTATI.....	17
3.1. SINTEZA NANOČESTICA ZLATA.....	17
3.2. MIKROSTRUKTURNA KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA ZLATA.....	20
3.3. VIJABILNOST STANICA NAKON TRETIRANJA NANOČESTICAMA ZLATA.....	25
3.4. MIKROSKOPSKA ANALIZA STANICA HEK 293 NAKON TRETMANA AuNČ.....	27
4. RASPRAVA.....	31
5. ZAKLJUČAK.....	35
6. LITERATURA.....	36
7. ŽIVOTOPIS.....	41

POPIS KRATICA

AuNČ – nanočestice zlata

EPR - *engl. Enhanced permeability and retention*

PPT - Plazmonska fototermalna terapija

DMEM medij - *engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – dimetil sulfoksid (*engl. Dimethyl sulfoxide*)

HEK 293 - epitelne stanice dobivene iz humanih embrionalnih stanica bubrega (*engl. human embryonic kidney cells 293*)

MTT - *engl. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*

NČ - nanočestice

PBS - *engl. Phosphate-buffered saline*

XRD – difrakcija X-zraka

PEM - pretražni elektronski mikroskop

HPLC – *engl High performance liquid chromatography*

NTA – analiza i praćenje nanočestica (*engl. Nanoparticle Tracking Analysis*)

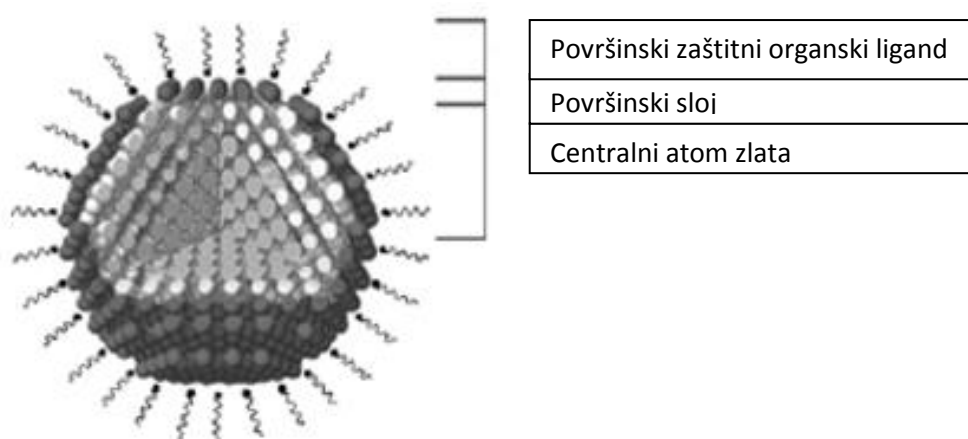
ICDD - *engl. International Centre for Diffraction Data*

1. UVOD

1.1. NANOČESTICE ZLATA

Svojstva AuNČ znatno ovise o veličini, obliku i površini AuNČ. Promjenom veličine AuNČ moguća je kontrola apsorpcije svjetlosti, fotoluminiscencijskih svojstava te električne vodljivosti. Odabir liganda pričvršćenog na površinu AuNČ, poput proteina i nukleinskih kiselina, daje mogućnost usmjerenja AuNČ na ciljano mjesto u tijelu, za detekciju, dijagnostiku ili terapijske svrhe. Zbog svoje prilagodljive veličine i oblika, AuNČ su stabilne u različitom okruženju, netoksične su, inertne i imaju kontrolirana optičko–elektronička svojstva (Jennings i sur., 2007).

Struktura AuNČ sintetiziranih u vodenoj fazi sastoji se od tri dijela: unutarnjih atoma zlata s čvrstom kristalnom strukturom (centralni atomi), vanjskog izloženog sloja na površini (površinski sloj) i površinski zaštitni organski ligand ili surfaktant (Slika 1.) (Seo i sur., 2012).



Slika 1. Strukturni model pojedinačne nanočestice zlata sintetizirane u vodenoj fazi uz prisutnost organskog liganda ili površinski aktivne tvari (Seo i sur., 2012).

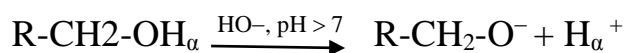
Nanočestice zlata imaju jedinstvena fizikalna i kemijska svojstva koja ih čine odličnim materijalima za izradu novih kemijskih i bioloških senzora. AuNČ se mogu sintetizirati na vrlo jednostavan način i mogu biti vrlo stabilne, posjeduju optoelektronička svojstva te imaju veliku površinu u odnosu na volumen (Saha i sur., 2012.).

1.2 SINTEZA AuNČ

Razvijene su mnoge metode za sintezu AuNČ, a one uključuju elektrokemijske metode i sintezu AuNČ u plinovitim i vodenim fazama. Sinteza vodenom fazom ima prednosti zbog mogućnosti promjena mnogih parametara tijekom sinteze, a time i utjecaja na veličinu, oblik i ostala fizičko-kemijska svojstva AuNČ. Isto tako, sinteza vodenom fazom je važna u biološkoj aplikaciji zbog njihove kompatibilnosti u okruženjima gdje stanice mogu preživjeti. AuNČ mogu biti sintetizirane redukcijom Au(III) u Au(0) u vodenom ili organskom mediju u prisustvu stabilizatora površine. Kontrola oblika AuNČ je važna zbog raspršenja i/ili apsorpcije svjetlosti. Kemijska aktivnost ovisna o površini je vrlo osjetljiva na morfologiju nanostrukture. Konjugati AuNČ s biološkim materijalima, kao što su oligonukleotidi, su zanimljivi zbog potencijalne upotrebe sparivanja DNA baza kako bi se proizveli nanokristali u prostoru i različiti načini za detekciju DNA segmenata. Moguće aplikacije su pronađene na području biosenzora, u dijagnozi bolesti i ekspresiji gena. (Seo i sur., 2012).

Sintetizirane nanočestice zlata čija je površina osjetljiva na promjenu pH medija u kiselom području ($\text{pH} < 7$) agregiraju. Tako pH osjetljive nanočestice zlata ulaskom u stanice gdje je $\text{pH} < 7$ brzo agregiraju te ne mogu izbaciti AuNČ egzocitozom, odnosno na taj način je povećana koncentracija AuNČ u stanicama. Štoviše, zbog agregacije unutar stanica apsorpcija AuNČ se pomiče prema infracrvenom području, što je iskorišteno za fototermalno ubijanje stanica raka (Nam i sur., 2009).

Sinteza AuNČ u alkoholnom mediju može se objasniti oksidacijom alkohola, gdje hidroksilna grupa ($-\text{C}-\text{OH}$) prelazi u karbonilnu ($>\text{C}=\text{O}$) grupu. Paralelno s katalitičkom oksidacijom alkohola dolazi do redukcije iona zlata iz Au(III) u Au(0) uz formiranje AuNČ. U kiselim uvjetima AuNČ nisu nastale. Najvažniji je prvi korak oksidacije alkohola u alkalnom mediju, odnosno deprotoniranje alkohola slobodnim hidroksidnim ionom (hidroksid ion potječe od dodanog NaOH) pri čemu nastaje alkoxid kao međuprodukt:



gdje je alfa vodik u hidroksilnoj (alkoholnoj) grupi ($-\text{OH}_\alpha$). Dobiveni alkoxid je vrlo reaktivan, podložan oksidaciji i služi kao prekursor za formiranje aldehida:



Aldehidi (R-CHO) nisu stabilni u alkalnom mediju i mogu se dalje oksidirati. Prvi korak deprotonacije alkohola ne ovisi o katalitičkim svojstvima zlata, već je katalizirano bazom (hidroksidnim ionima), dok se kod drugog koraka (nastajanja aldehida) AuNČ ponašaju kao katalizator. Sinteza AuNČ katalizirana bazom u 1-pentanolu pokazuje da AuNČ mogu biti sintetizirane bez upotrebe redukcijskog agensa (Jurkin i sur., 2006).

1.3. PRIMJENA AuNČ

1.3.1. KATALIZA

Zlato je kemijski inertno i katalitički neaktivno, no u formi nanočestica s promjerom manjim od 10 nm postaje dobar katalizator za mnoge reakcije. Nanočestice zlata su izuzetno dobri katalizatori za aerobnu oksidaciju jednostavnih molekula kao što su CO i H₂, kao i za složenije organske molekule kao što su ugljikovodici i alkoholi. Zlato kao katalizator je jako selektivno, vrlo otporno na ispiranje i otporno na oksidaciju s O₂.

Proučavani su mehanizmi oksidacije etanola i glicerola uz zlato i platinu kao katalizatore. Pomoću radioizotopa ¹⁸O₂ i H₂¹⁸O je dokazano da atomi kisika dolaze od hidroksidnih iona, a ne od molekule kisika i da se kisikovi atomi iz hidroksidnih iona (HO⁻) ugrađuju u alkohol tijekom oksidacijske reakcije. Hidroksidni ioni imaju važnu ulogu u oksidaciji, a isto tako i pH, dok je utjecaj zlata kao katalizatora mali ili gotovo nikakav bez dodane baze. (Zope i sur., 2010).

Jedan od otežavajućih faktora kod praktične uporabe nanočestica zlata kao katalizatora je poteškoća u njihovom recikliranju i ponovnoj upotrebi (Yuan i sur., 2011).

Selektivnom oksidacijom glicerola u glicerinsku kiselinu uz zlato kao katalizator u vodenoj otopini natrijeva hidroksida je pokazano da glicerol može oksidirati u glicerinsku kiselinu uz 100% selektivnosti. Uz zlato kao katalizator su korišteni nosači od ugljika i grafita. U prisustvu NaOH baze, H se lako odvaja od primarnih hidroksilnih grupa glicerola i tako pospješuje oksidaciju glicerola. U odsutnosti NaOH ne dolazi do pretvorbe glicerola u glicerinsku kiselinu. Isto tako, nosači od ugljika u odsutnosti zlata nisu aktivni. Selektivnost oksidacije glicerola u glicerinsku kiselinu ovisi o omjeru glicerola i NaOH. S visokom

koncentracijom NaOH selektivnost glicerinske kiseline je velika. Uz pažljivu kontrolu uvjeta reakcije može se postići 100%-tna selektivnost za dobivanje glicerinske kiseline. Za oksidaciju glicerola u glicerinsku kiselinu važna je i veličina nanočestica zlata, a najpogodnije su nanočestice zlata od 2 do 4 nm (Caretin i sur., 2002).

1.3.2. BIOMEDICINSKA PRIMJENA AuNČ

AuNČ se mogu koristiti za detekciju pogrešno povezanih parova baza u komplementarnoj molekuli DNA (Libchaber i sur., 2001). Pogodne su za funkcionalizaciju sa širokim rasponom organskih ili bioloških liganada za selektivna vezanja i detekciju malih molekula (Saha i sur., 2012).

AuNČ se također koriste u medicini i biologiji uključujući DNA/protein detekciju (You i sur., 2006.), kao biomolekulski regulatori (Groneberg i sur., 2006), za snimanje stanica (Huang i sur., 2006) i u dijagnostici stanica raka (Wu i sur., 2005).

AuNČ imaju svojstva koja su atraktivna za uporabu u terapiji raka. AuNČ su dovoljno male da mogu krvotokom putovati kroz cijelo tijelo i nakupljati se u tkivu tumora zbog EPR efekta. EPR (*engl. Enhanced permeability and retention*) efekt je koncept u kojem se molekule određene veličine (nanočestice, liposomi i dr.) akumuliraju u tumorskim stanicama mnogo više nego u normalnim stanicama. Površina AuNČ se može funkcionalizirati (obložiti) anti-tumorskim lijekovima na čiju se površinu mogu nanijeti protutijela faktora rasta pa se tako lijek aktivno usmjerava na stanice tumora koje imaju znatno veći broj receptora faktora rasta u usporedbi s normalnim stanicama (Jain i sur., 2012).

Korištenje lasera tijekom proteklih desetljeća postalo je vrlo obećavajuće u terapiji raka, najčešće metoda fototermalne terapije, koja koristi svjetlosne apsorbirajuće boje za postizanje fototermalnih oštećenja tumora. Nedavnim napretkom na području nanoznanosti uočena je pojava nanostruktura plemenitih metala s jedinstvenim fotofizičkim svojstvima, pogodnim za primjenu u fototerapiji tumora. AuNČ zbog pojave površinske plazmonske rezonancije posjeduju snažno poboljšanu vidljivu i infracrvenu apsorpciju svjetlosti, nekoliko redova veličine intenzivniju u usporedbi s konvencionalnim laserskim fototerapijskim sredstvima. Korištenje plazmonske nanočestice zlata kao izrazito pojačana sredstva za fotoapsorpciju je tako uvela mnogo selektivniju i učinkovitiju strategiju za liječenje raka, tzv.

Plazmonska fototermalna terapija (PPT). AuNČ pokazuju veliki potencijal za primjenu u plazmonske fototermalne terapije. (Huang i sur., 2008).

AuNČ su se pokazale kao vrijedni materijali u kozmetičkoj industriji zbog svojih snažnih antibakterijskih svojstava. Ove čestice se naširoko koriste u kozmetičkim proizvodima kao što su deodoranti, kreme za lice, „antiaging“ kreme, itd. Primijenjena je sinteza fluorescentnih AuNČ unutar ljudske kose. To uključuje potapanje bijele vlasi u otopinu zlata. Dlačice su postale blijedo žute te su zatim potamnile do duboke smeđe boje. Korištenjem elektronskog mikroskopa, znanstvenici su potvrdili da se čestice formiraju unutar središnje kore jezgre kose. Boja je ostala i nakon ponovljenih pranja (Lohani i sur., 2014).

AuNČ je moguće ugraditi u hidrogel koji se može injektirati ili implantirati na mjesto zahvaćeno karcinomom, gdje AuNČ deaktiviraju svaki gen uključen u proces tumora. Ova metoda je testirana na miševima kojima je implantiran ljudski rak dojke gdje su znanstvenici uspjeli smanjiti tumore za 90% za 2 tjedna (<http://news.mit.edu/2015/nanodevice-defeats-cancer-drug-resistance-0302>).

1.4. TOKSIČNOST I EKOTOKSIČNOST AuNČ

Ekotoksikološki učinci nanočestica (NČ) i dalje su slabo dokumentirani dok se njihova komercijalizacija za industrijske i kućanske aplikacije povećava. Za niz AuNČ je ispitana toksičnost unosom u ljudske stanice leukemije. Rezultati su pokazali da iako neki prekursori AuNČ mogu biti toksični, same AuNČ nisu nužno štetne za staničnu funkciju. AuNČ priređene citratom i biotinom nisu se pokazale toksičnima pri koncentraciji od 250 μM . AuNČ priređene glukozom i cisteinom nisu bile toksične pri koncentraciji do 25 μM . CTAB-modificirane AuNČ su se također pokazale netoksičnima (Connor i sur., 2005).

Krvotok organizma, citoplazma stanice i medij u kojemu stanice rastu je vodena otopina elektrolita, proteina, nutrijenata, metabolita itd. Medij za rast stanica sadrži serum, proteine, esencijalne aminokiseline, vitamine, elektrolite druge tvari kao što su antibiotici i metali u tragovima. Te različite komponente mogu reagirati s AuNČ i promijeniti njihova fizikalna svojstva kao veličinu, agregacijsko stanje ili površinski naboj (Alkilany i sur., 2010).

Nanočestice, pogotovo ako su sintetizirane u vodenom mediju, imaju površinski naboj koji ih stabilizira protiv agregacije putem elektrostatičkog odbijanja. Prisutnost elektrolita i visoka ionska jakost bioloških medija može rezultirati agregacijom nanočestica

(Vesaratchanon i sur., 2007). Agregacija nanočestica može utjecati na mogućnost interakcije ili na ulazak nanočestica u stanicu. Proteini iz plazme mogu se spontano adsorbirati na površini nanočestica. Nanočestice usvajaju fizikalna i kemijska svojstva adsorbirane proteinske ljuske. Isto tako, krv sadrži proteine i elektrolite koji mogu promijeniti površinski naboj i stupanj agregacije nanočestica. Metabolički test koji se smatra „zlatnim standardom“ za ispitivanje citotoksičnosti je test MTT, kolorimetrijski test koji mjeri enzimsku aktivnost staničnih mitohondrija (Cedervall i sur., 2007).

Premda nanomaterijali mogu stvoriti toksične učinke, trenutno ne postoje uvjerljivi podaci da će sadašnje razine nanomaterijala predstavljati opasnost za javno zdravlje. Potrebno je poduzeti aktivne mjere i precizno provjeriti toksičnost nanomaterijala što je ključan uvjet za osiguravanje održive industrije nanotehnologije (Wani i sur., 2011).

Koloidno zlato je godinama korišteno u terapijske svrhe, bez štetnih utjecaja, zbog čega se smatra da su i AuNČ sigurne za korištenje. Iste čestice mogu biti različite nanoveličine, od 1 do 100 nm, što ih isto tako čini vrlo različitih svojstava. Posljednjih desetljeća provedena su mnoga istraživanja koja dokazuju da su AuNČ umjereno toksične na eukariotske stanice. Taj toksični efekt uvelike ovisi o veličini nanočestica i njihovoj površini. Često je površinska prevlaka (surfaktanti, polimeri) mnogo toksičnija nego same AuNČ. Zbog velike površinske reaktivnosti, AuNČ mogu adsorbirati neke komponente iz medija toksičnog testa kojim se provodi ispitivanje toksičnosti AuNČ. Isto tako, plazmonski rezonancijski pojas AuNČ nekada interferira s mjerenjem apsorbancije kolorimetrijske boje. Preporučuje se napraviti više mjerenja kako bi imali čvrste dokaze o toksičnosti ili netoksičnosti čestica (Carriere, 2012).

Toksičnost AuNČ je mala, zbog čega su i AuNČ vrlo atraktivne za terapijske aplikacije. Opisano je da AuNČ od 15 do 100 nm uzrokuju vrlo malo smanjenje vijabilnosti ovisno o njihovom površinskom premazu. Stoga AuNČ same po sebi nisu toksične za ljudske stanice, dok organske molekule, surfaktanti i polimeri na površini AuNČ uzrokuju toksičnost. U istraživanjima toksičnosti živi organizmi su izloženi visokim koncentracijama AuNČ u kratkom vremenu inkubacije. Rezultati su pokazali da same AuNČ uzrokuju vrlo malu letalnost. Promatrane letalnosti su uglavnom bile povezane s toksičnim supstancama adsorbiranim na površini AuNČ. Vrlo slabo su istraživane dugoročne posljedice AuNČ na žive organizme nakon translokacije ili akumulacije. Istraživanja nanotoksikologije su općenito do sad slabo istraživane, stoga je potrebno još podataka kako bi se AuNČ mogle sigurno koristiti za dijagnoze ili terapijske svrhe (Carriere, 2012).

1.5. CILJ ISTRAŽIVANJA

Područje nanočestica i nanomaterijala zadnjih nekoliko godina je rastuće područje istraživanja i spada u prioritetna područja istraživanja kako u Hrvatskoj tako i u svijetu. Osobito veliku pažnju izazivaju nanočestice plemenitih metala (Ag, Au) raznih veličina i oblika (sfere, štapići, trokuti, zvijezde, itd).

Nanočestice zlata (AuNČ) koriste se kao biosenzori, kao zamjena za fluorofore ili boje, kao nosači za ciljanu isporuku lijekova i gena. Zbog velike primjene u biomedicini, istraživanje citotoksičnosti nanočestica zlata je veoma važno. Štoviše, to područje se intenzivno istražuje, jer je pokazano da citotoksičnost nanočestica zlata jako ovisi o fizičko-kemijskim parametrima poput veličine, oblika, površinskog naboja i tipa adsorbiranih organskih molekula na površini nanočestica zlata. U ovom radu sintetizirat će se nanočestice zlata originalnom kemijskom metodom, odnosno redukcijom Au^{3+} iona u alkalnoj vodenoj otopini propilnog, amilnog i benzilnog alkohola. Za tako sintetizirane nanočestice zlata ne postoje podatci o njihovoj toksičnosti, tako da će određivanje vijabilnosti HEK 293 stanica testom MTT biti koristan podatak za njihovu potencijalnu biomedicinsku primjenu.

Glavna hipoteza ovoga rada je: (i) sintetizirane nanočestice zlata nisu toksične za stanice HEK 293 i (ii) sintetizirane nanočestice zlata mogu se primjeniti u biomedicini.

Specifični ciljevi ovog rada su: (i) sinteza nanočestica zlata oksidacijom alkohola kod alkalnog pH i (ii) određivanje vijabilnosti stanica HEK 293 kolorimetrijskim testom MTT u prisustvu različitih koncentracija AuNČ.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. KEMIKALIJE, REAGENSI I MEDIJ ZA UZGOJ STANICA

- Kloroaurična kiselina ($\text{HauCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 4%
- n-propanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$), p.a. $\geq 99\%$, Kemika, Zagreb, RH
- 1-pentanol ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$), ACS reagent, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Benzilni alkohol ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$), $\geq 98\%$, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD
- Vodena otopina natrijeva hidroksida ($\text{NaOH}(\text{aq})$), $c(\text{NaOH}) = 2 \text{ mol dm}^{-3}$ (razni proizvođači)
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) p.a. 96%, Gram-mol, Zagreb, RH
- DMEM medij (*engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD, uz dodatak 10% fetalnog govedeg seruma (FBS, *engl. Fetal bovine serum*), Life Technologies, Carlsbad, SAD, 5% penicilina i streptomicina, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD, pri 37 °C uz 5% CO_2 i 95% zraka, kod pH 7,4
- PBS (*engl. Phosphate-buffered saline*, PBS, 18912014, PBS Tablets), Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, SAD
- DMSO (*engl. Dimethyl sulfoxide*, BioUltra, for molecular biology, $\geq 99.5\%$ (GC)), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Tripsin-EDTA (*engl. Trypsin-EDTA*, T 4049), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Tripansko plavilo (*engl. Trypan blue*, solution 0,5%), Biological Industries, SAD
- MTT (*engl. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide*, M2128), Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD

2.2. INSTRUMENTI I PRIBOR

- Laboratorijsko posuđe: čaša od 50 ml, čaša od 25 ml, staklena posudica, pinceta, stakleni štapić, pipeta
- Magnetska mješalica, mješalac
- pH indikatorske trakice, Macherey-Nagel
- Ultrazvučna kupelj, Bandelin Sonorex
- Centrifuga, ScanSpeed 2236R High-Speed Centrifuge, LaboGene
- Centrifuga, Universal 320 R, Hettich
- Vakuurni sušionik, Cole-Parmer

- Elektronski mikroskop (FESEM model JSM-7000F, Jeol Ltd., koji je spojen s EDS/INCA 350 energijski razlučujućim rendgenskim spektrometrom (*engl. Energy Dispersive X-ray spectrometry*, EDS), Oxford Instruments Ltd.)
- Rentgenski difraktometar praha APD 2000, proizvođača ItalStructures, Riva Del Garda, Italija.
- NanoSight NS300, Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), proizvođača Malvern
- Mikrotitarski čitač, GloMax-Multi Detection System, Promega
- Inkubator (CO₂ Incubator, MCO-230AICUV), Panasonic
- Pipete, Eppendorf Research
- Multipipeta, TreffLab Treff-Pipette-8 Channel Pipette, American Laboratory Trading
- Laminar, Heraeus
- Fluorescencijski mikroskop, Axiovert 40 CFL, Zeiss
- Ploče s 6 jažica (*engl. Multiwell 6 Well*), Falcon
- Mikrotitarske ploče s 96 jažica (*engl. Microtest 96-Well*, Microtest III Tissue Culture Plate 96-Well), Falcon
- Petrijeva posuda (TC-Schale 100, Standard), Sarstedt
- Električni uređaj za pipetiranje, Falcon
- Pipete za električni uređaj za pipetiranje (5 mL, 10 mL, 25 mL), Falcon
- Flask (Tissue Culture Treated Flasks), Falcon
- Bürker-Türk-ova komorica za brojanje stanica

2.3. SINTEZA NANOČESTICA ZLATA

Pomoću pipete odmjeren je alkohol volumena 5 mL i dodan je u staklenu posudu. Nakon toga je pipetom odmjeren određeni volumen 4 % vodene otopine kloroaurične kiseline (HauCl₄ · 3H₂O (aq)). Tablica 1. prikazuje eksperimentalne uvjete za sintezu nanočestica zlata koja je korištena u ovom radu. U staklenu posudu su stavljeni određeni volumeni kemikalija prema Tablici 1. i mješalac te je sadržaj staklene posude promiješan na magnetskoj miješalici 2 minute. Nakon toga je dodana otopina natrijeva hidroksida (NaOH(aq)) dok pH otopine nije veća od 7 (8 ili 9). Staklena posuda s otopinom je ostavljena još par minuta na magnetskoj miješalici dok sadržaj staklene posude nije promijenio boju. pH otopine je ispitana uranjanjem pH papirića pomoću pincete u staklenu posudu s otopinom. Dobivene su nanočestice zlata dispergirane u alkoholu.

Tablica 1. Eksperimentalni uvjeti sinteze nanočestica zlata i pripadajuće masene koncentracije zlata u alkoholnim suspenzijama (Au1: AuNČ dispergirane u propanolu, Au2: AuNČ dispergirane u pentanolu, Au3: AuNČ dispergirane u benzilnom alkoholu)

Uzorak	ALKOHOL	V (4% HAuCl ₄) / μL	V (NaOH) / μL	$\gamma(\text{Au}) / \text{g L}^{-1}$
Au1	n-propanol	121,0	30	$12,10 \times 10^{-6}$
Au2	1-pentanol	83,5	40	$8,35 \times 10^{-6}$
Au3	Benzilni alkohol	87,5	20	$8,75 \times 10^{-6}$

Isti postupak sinteze je ponovljen još jednom kako bi se dobili praškasti uzorci AuNČ. Nakon što su dobivene AuNČ dispergirane u alkoholu, uzorci su centrifugirani dva puta na 7000 RPM 10 minuta te jednom isprani etanolom. Izolirani uzorci su zatim stavljeni u vakuum sušionik na 24 sata.

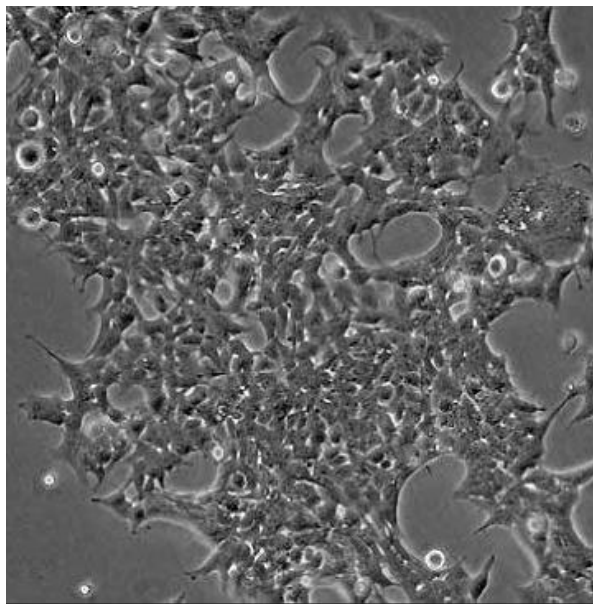
2.4. MIKROSTRUKTURNA KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA ZLATA

Za strukturnu karakterizaciju uzoraka korišten je rentgenski difraktometar praha. Difraktometar je namijenjen praškastim uzorcima i koristi CuK α ($\lambda = 1.54059 \text{ \AA}$) zračenje. Izolirani praškasti uzorci snimljeni su na 40 kV i 30 mA, uz grafitni monokromator i NaI-Tl detektor. Rendgenski difraktogrami su snimljeni u području od 10–120° s korakom od 0.03° i zadržavanje od 13 sekundi po koraku pri 20 °C. Uzorci su nanoseni na silicijsku pločicu nosača u tankom sloju. Silicijska pločica nosača uzoraka ne pokazuje maksimume u rendgenskom difraktogramu.

Morfologija i veličina sintetiziranih nanočestica je analizirana pretražnim elektronskim mikroskopom. Praškasti uzorci izoliranih nanočestica nanoseni su na vodljivu grafitnu traku. Uzorci u suspenziji analizirani su tako da se je jedna kap uzorka nanijela na pločicu od brušenog silicija i zatim osušila i analizirala PEM-om.

2.5. UZGOJ STANIČNE LINIJE HEK 293

Stanična linija HEK 293 (*engl. Human embryonic kidney cells 293*) su epitelne stanice dobivene iz humanih embrionalnih stanica bubrega (Slika 2.). Stanična linija HEK 293 je vrlo popularna u istraživanjima zbog svojeg brzog rasta i transfekcije, što ih čini čestima u istraživanjima raka. Stanične linije HEK 293 su korisne za mnoge eksperimente transfekcije, naročito razmnožavanje adenovirusnih i retrovirusnih vektora. HEK 293 su zaobljenije stanice koje rastu u suspenziji u staničnoj kulturi, iako su u početku bile adherentna stanična linija. Stanične linije trebaju biti inkubirane na 37 °C pri 5% CO₂ i u tim uvjetima se stanice udvostručavaju u približno 34 sata (<http://www.hek293.com/>). Isto tako, stanična linija HEK 293 je vrlo popularna među elektrofiziolozima za proučavanje izoliranih kanala receptora zbog sposobnosti transfekcije upotrebom raznih metoda, visoke učinkovitosti transfekcije i proizvodnje proteina, vjernog prijevoda i obrade proteina (Thomas i sur., 2004).



Slika 2. Stanična linija HEK 293 (<https://virushostinteractions.wordpress.com>)

Stanična linija HEK 293 je odležana u vodenoj kupelji na 37 °C te je zatim prenesena u Petrijevu posudu. Stanična linija je uzgajana u mediju DMEM uz dodatak 10 % fetalnog govedeg seruma, 5% penicilina i streptomicina u inkubatoru dva dana na 37 °C i 4% CO₂.

Nakon dva dana je medij DMEM odsisan, a adherentne stanice HEK 293 su u Petrijevoj posudi isprane s 10 mL PBS koji služi za uklanjanje zaostalog medija, odnosno seruma koji inaktivira tripsin. Nakon toga je dodan 1 mL tripsin-EDTA te su stanice stavljene

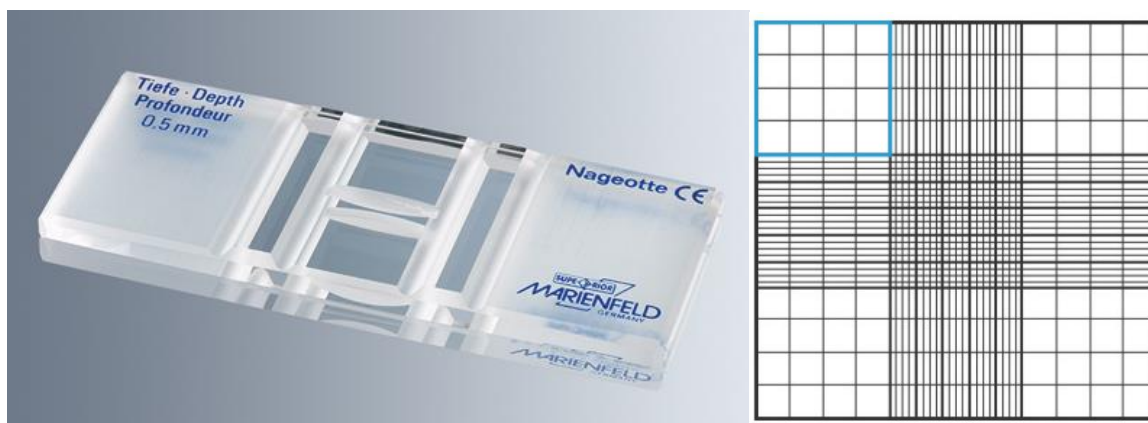
na inkubaciju 5 minuta. Kada su stanice odvojene od podloge, dodan je isti volumen hranjivog medija DMEM kako bi se stanice neutralizirale. Stanice se talože centrifugiranjem (7000 RPM, 8 minuta) na centrifugi. Supernatant je odsisan i dodano je 10 mL novog medija DMEM.

2.6. ODREĐIVANJE BROJA VIJABILNIH STANICA U KULTURI

Broj stanica je određen tripanskim plavilom pomoću Bürker-Türk-ove komorice (Slika 3.) za brojanje stanica. U mikrotubicu su dodani tripansko plavilo i resuspendirane stanice u omjeru 1:1, volumena 100 μ L. Iz mikrotubice je 2 μ L otopine dodano u Bürker-Türk-ovu komoricu, a broj vijabilnih stanica je određen na invertnom mikroskopu. Žive, vijabilne stanice s neoštećenom staničnom membranom ne propuštaju boju tripansko plavilo te su neobojene, dok tripansko plavilo selektivno boji mrtve, nevijabilne stanice. Broj živih stanica je određen računom:

$$X = N \times 10^4 \times 2 \text{ st/mL}$$

N – broj stanica u komorici, 2 – faktor razrjeđenja



Slika 3. Bürker-Türk komorica (<http://www.marienfeld-superior.com>)

2.7. TRETIRANJE STANICA NANOČESTICAMA ZLATA

U jažice pločica s 96 jažica nasadeno je po 2000 stanica. Pločice su sa stanicama i medijem DMEM stavljene na inkubaciju na 1 dan na 37 °C pri 4% CO₂. Idućeg dana je odstranjen medij. Dodano je 200 μL novog medija po jažici na pločicama i nanese su AuNČ dispergirane u alkoholu (n-propanol, 1-pentanol i benzilni alkohol) s pripadajućim kontrolama. Alkohol i nanočestice zlata dispergirane u alkoholu su dodani masenih koncentracija u rasponu od 6,0 x 10⁻⁸ do 1,25 x 10⁻⁷ gL⁻¹ točnih vrijednosti masenih koncentracija prikazanih u Tablici 2. Svaki uzorak je dodan u 3 masene koncentracije u triplikatu.

Tablica 2. Vrijednosti masenih koncentracija AuNČ u različitim alkoholima za tretman stanica (γ 1: nakon dodatka 1 μL AuNČ dispergiranih u alkoholu, γ 2: nakon dodatka 3 μL AuNČ dispergiranih u alkoholu, γ 3: nakon dodatka 5 μL AuNČ dispergiranih u alkoholu.). Početne masene koncentracije AuNČ su prikazane u Tablici 1.

Uzorak	ALKOHOL	γ1	γ2	γ3
Au1	n-propanol	6,0 x 10 ⁻⁸ g L ⁻¹	1,2 x 10 ⁻⁷ g L ⁻¹	3,0 x 10 ⁻⁷ g L ⁻¹
Au2	1-pentanol	4,1 x 10 ⁻⁸ g L ⁻¹	1,3 x 10 ⁻⁷ g L ⁻¹	2,1 x 10 ⁻⁷ g L ⁻¹
Au3	Benzilni alkohol	4,4 x 10 ⁻⁸ g L ⁻¹	1,3 x 10 ⁻⁷ g L ⁻¹	2,2 x 10 ⁻⁷ g L ⁻¹

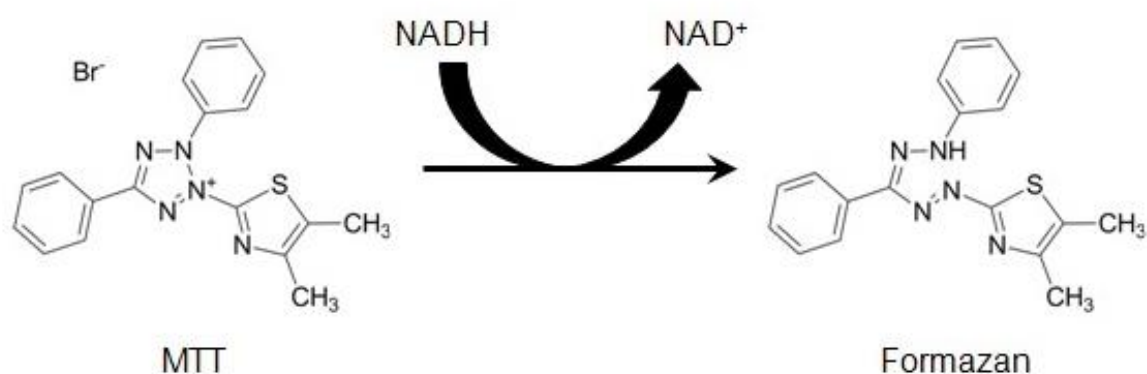
Za određivanje koncentracije nanočestica u suspenziji korištena je NTA metoda za analizu i praćenje nanočestica (NTA - *engl. Nanoparticle Tracking Analysis*) uređajem NanoSight NS300, proizvođača Malvern. Dobivene su koncentracije NČ L⁻¹ u alkoholima prilikom tretiranja stanica HEK 293 (Tablica 3.)

Tablica 3. Vrijednosti koncentracija nanočestica zlata u alkoholu izražene kao broj nanočestica zlata po jedinici volumena (NČ L⁻¹) prilikom tretiranja stanica HEK 293

ALKOHOL	NČ L ⁻¹ (1)	NČ L ⁻¹ (2)	NČ L ⁻¹ (3)
n-propanol	0,88 x 10 ⁹	2,64 x 10 ⁹	4,40 x 10 ⁹
1-pentanol	1,41 x 10 ⁹	4,23 x 10 ⁹	7,05 x 10 ⁹
Benzilni alkohol	3,62 x 10 ¹⁰	1,08 x 10 ¹¹	1,80 x 10 ¹¹

2.8. ISPITIVANJE VIJABILNOSTI STANICA TESTOM MTT

Test redukcije tetrazolijeve soli, MTT (*engl. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*), je prvi homogeni test za ispitivanje vijabilnosti stanica razvijen za test na pločici s 96 jažica. Vijabilne stanice s aktivnim metabolizmom pretvaraju MTT u purpurno obojeni formazanski proizvod s maksimumom apsorbancije blizu 570 nm (Riss i sur., 2013).



Slika 4. Redukcija MTT u formazan (Riss i sur., 2013).

Test MTT je kolorimetrijski test za kvantitativno određivanje proliferacije i postotka preživljavanja stanica sisavaca. Detektira samo žive stanice pa se koristi i za određivanje citotoksičnosti i aktivacije stanica. Rezultati se očitavaju na mikrotitarskom skenirajućem spektrofotometru što je vrlo precizno. U MTT testu nije potrebno ispiranje stanica. Često je korišten zbog svoje brzine i preciznosti. (Mosmann, 1983.) Metoda se zasniva na pretvorbi u vodi topljive tetrazolijske soli (MTT) u purpurno obojeni formazanski precipitat (Slika 4.), reakciji koju čine enzimi aktivni samo u živim stanicama (Mickisch i sur., 1990). Utvrđeno je da je razina MTT cijepanja živih stanica različitog podrijetla izravno proporcionalna broju stanica i da se povećava nelinearno s vremenom. Formazanski produkt MTT tetrazolija akumulira se kao netopljivi talog unutar stanica, a taloži se i u blizini površine stanica i u mediju. Formazan mora biti otopljen prije snimanja očitavanja apsorbancije. Različite su metode korištene za otapanje formazanskog produkta, stabiliziranje boje i izbjegavanje isparavanja.

Različite metode otapanja uključuju upotrebu: zakiseljenog izopropanola, DMSO, dimetilformamida, SDS i kombinacija deterdženta i organskog otapala (Gerlier i sur., 1986). Kada stanice umru, gube sposobnost pretvaranja MTT u formazan, stoga oblikovanje boje služi kao koristan i prikladan marker samo za žive stanice. Točan stanični mehanizam redukcije MTT u formazanu nije dobro poznat, ali vjerojatno uključuje reakciju s NADH ili sličnim redukcijskim molekulama koje prenose elektrone na MTT (Marshall i sur., 1995).

MTT je razrijeđen zagrijanim medijem u omjeru 1:10. Svakoj jažici na jednoj pločici sa stanicama i na jednoj pločici slijepe probe je dodano 40 μL razrijeđenog MTT te su pločice vraćene u inkubator na 2 i pol sata. Nakon 2 i pol sata je u obje pločice u sve jažice dodano 170 μL DMSO. Pločice su ostavljene na sobnoj temperaturi 10 minuta i nakon toga je izvršena detekcija na mikrotitarskom čitaču pločica na valnoj duljini od 570 nm. Idućeg dana je na drugoj pločici sa stanicama i na pločici slijepe probe ponovljeno isto što prethodnog dana; dodano je 40 μL razrijeđenog MTT, nakon čega su pločice stavljene u inkubator na 2 i pol sata. Nakon 2 i pol sata je u obje pločice dodano 170 μL DMSO u svaku jažicu. 10 minuta nakon što su pločice odstajale na sobnoj temperaturi, također je izvršena detekcija na mikrotitarskom čitaču pločica na valnoj duljini od 570 nm gdje se određuje apsorbancija sadržaja u jažici.

Vijabilnost stanica u postotcima određena je prema jednadžbi:

$$\text{vijabilnost stanica} = \frac{\Delta\text{aps}(\text{uzorak}) - \Delta\text{aps}(\text{blank})}{\Delta\text{aps}(\text{ctrl}) - \Delta\text{aps}(\text{ctrl blank})} \times 100 [\%],$$

gdje je $\Delta\text{aps}(\text{uzorak})$ srednja vrijednost apsorbancije određenog uzorka, $\Delta\text{aps}(\text{blank})$ je srednja vrijednost apsorbancije uzorka slijepe probe, $\Delta\text{aps}(\text{ctrl})$ je srednja vrijednost apsorbancije kontrolnog uzorka i $\Delta\text{aps}(\text{ctrl blank})$ je srednja vrijednost apsorbancije kontrolnog uzorka slijepe probe.

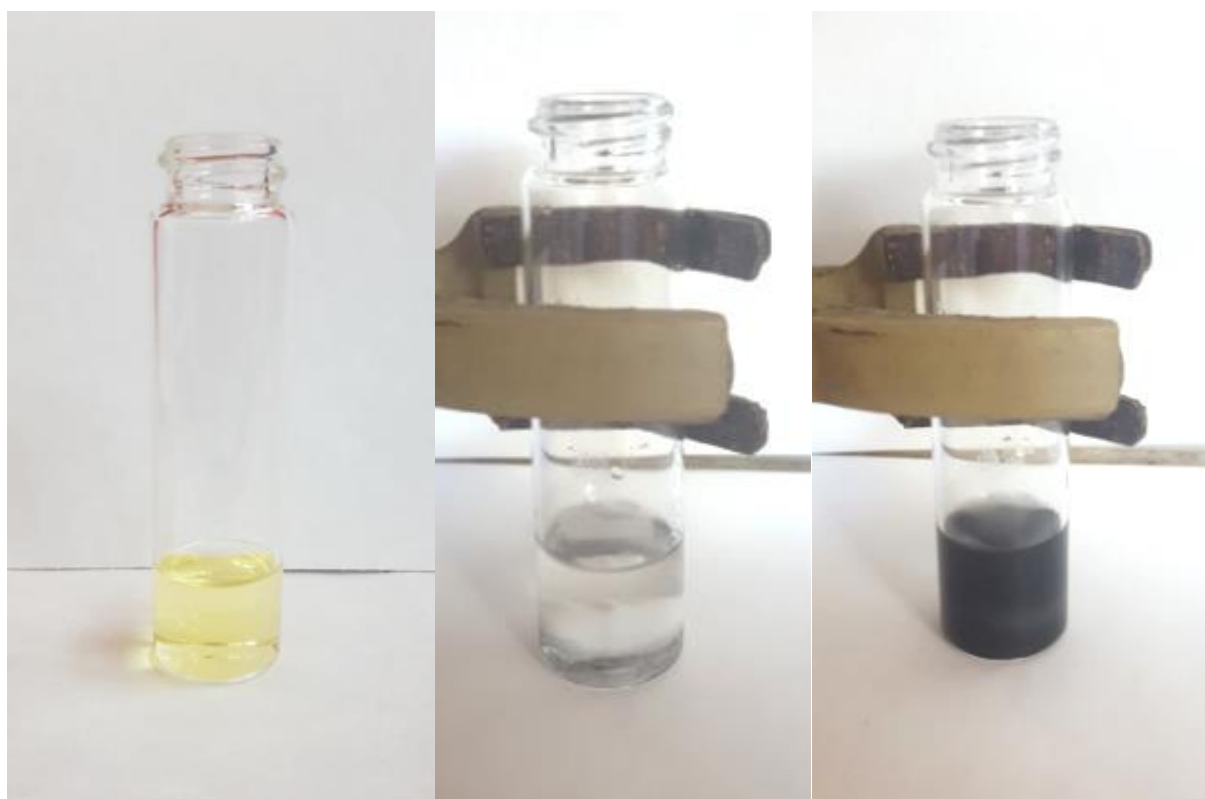
2.9. MORFOLOGIJA STANICA NAKON TRETMANA S AuNČ

Stanice su tretirane AuNČ dispergiranimi u alkoholu (n-propanol, 1-pentanol i benzilni alkohol) i čistim pripadajućim alkoholima kao kontrolom. Koncentracija AuNČ u propilnom alkoholu bila je $0,88 \times 10^{10} \text{ NČ L}^{-1}$, u pentanolu $1,41 \times 10^{10} \text{ NČ L}^{-1}$, a u benzilnom alkoholu $3,62 \times 10^{11} \text{ NČ L}^{-1}$. Kao kontrola su služile i netretirane stanice. Nakon 24 sata stanice su promatrane invertnim mikroskopom.

3. REZULTATI

3.1. SINTEZA NANOČESTICA ZLATA

U staklenu posudu je dodano 5 mL n-propanola i 4 % vodene otopine kloroaurične kiseline ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (aq)) volumena prikazanog u Tablici 1. S obzirom na to da je alkohol bezbojan, a otopina kloroaurične kiseline žute boje, otopina je zbog kloroaurične kiseline poprimila žutu boju (Slika 5. a). Kako bi se povisio pH otopine iznad 7 (8 ili 9), dodana je otopina natrijeva hidroksida (NaOH (aq)) i magnetski štapić obložen teflonom te je sadržaj staklene posude promiješan na magnetskoj miješalici (Slika 5. b). Nakon 2 minute otopina je promijenila boju iz žute, preko bezbojne do crne boje (Slika 5. c).



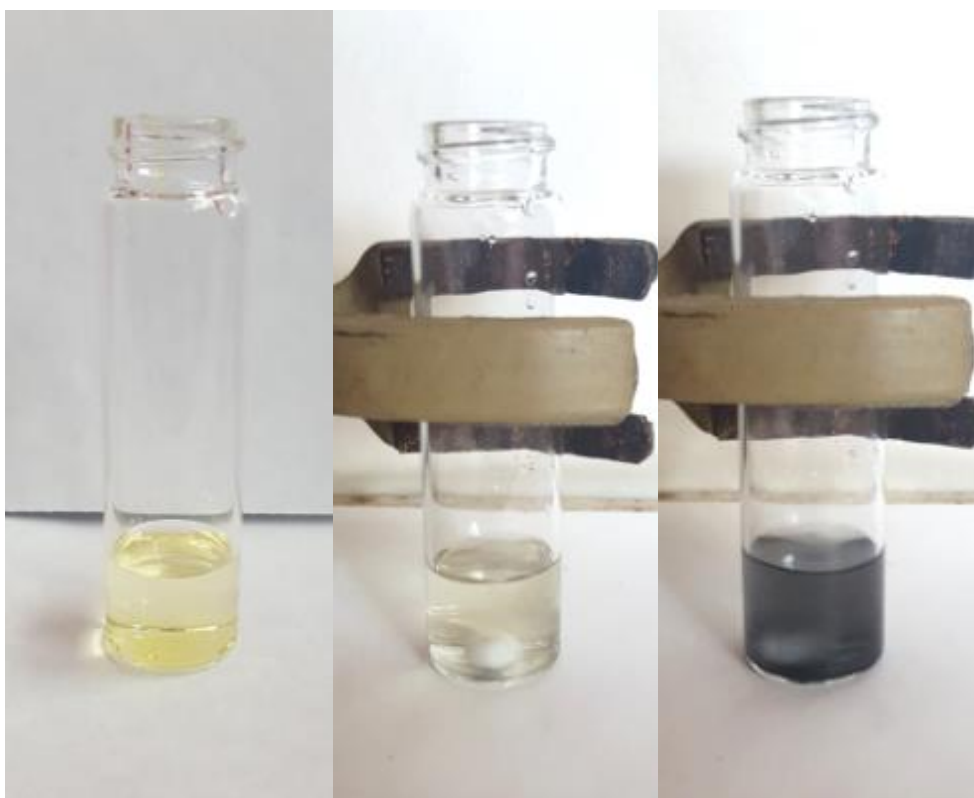
a)

b)

c)

Slika 5. a) Prikaz sadržaja staklene posude nakon dodavanja n-propanola i otopine kloroaurične kiseline, b) Prikaz sadržaja staklene posude nakon dodavanja otopine NaOH (aq) i 1 minutu miješanja na magnetskoj miješalici, c) Prikaz sadržaja staklene posude nakon 3 minute miješanja na magnetskoj miješalici

U staklenu posudu je dodano 5 mL 1-pentanola i 4 % vodene otopine kloroaurične kiseline ($\text{HauCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} (\text{aq})$) volumena prikazanog u Tablici 1. Otopina je zbog kloroaurične kiseline, koja je žuta, poprimila žutu boju (Slika 6. a). Kako bi se povisio pH otopine iznad 7 (8 ili 9), dodana je otopina natrijeva hidroksida ($\text{NaOH}(\text{aq})$) i mješalac te se sadržaj staklene posude promiješao na magnetskoj miješalici. Nakon 4 minute otopina je promijenila boju iz žute, preko bezbojne do crne boje (Slika 6. b i c).



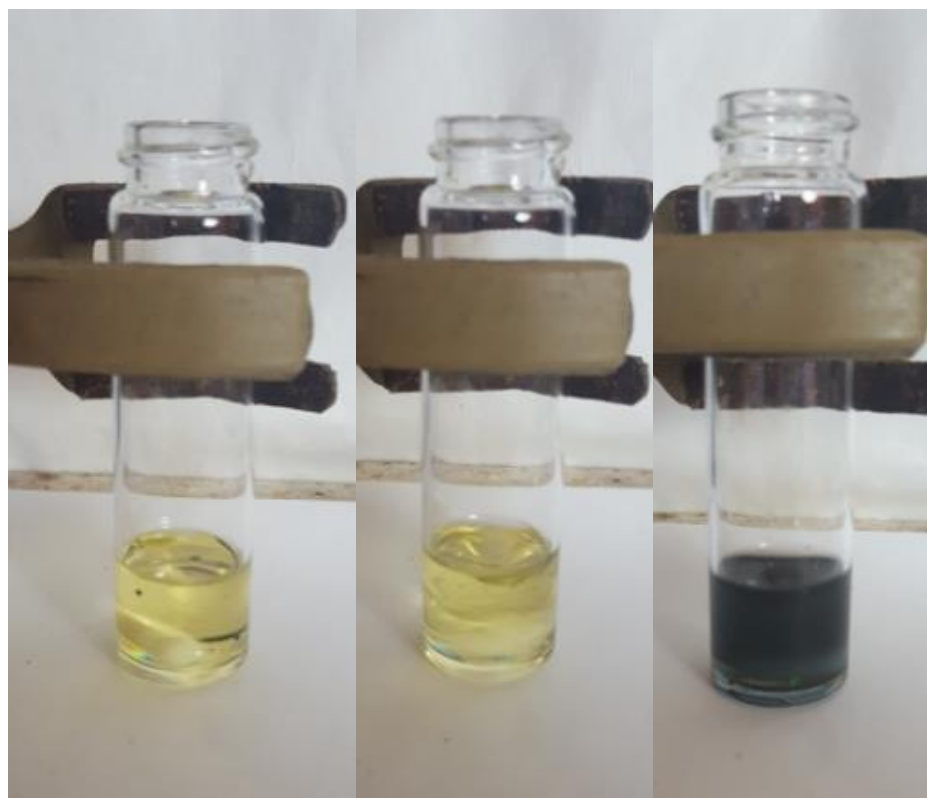
a)

b)

c)

Slika 6. a) Prikaz sadržaja staklene posude nakon dodavanja n-propanola i otopine kloroaurične kiseline, b) Prikaz sadržaja staklene posude nakon dodavanja otopine $\text{NaOH}(\text{aq})$ i 1 minutu miješanja na magnetskoj miješalici, c) Prikaz sadržaja staklene posude nakon 4 minute miješanja na magnetskoj miješalici

U staklenu posudu je dodano 5 mL benzilnog alkohola i 4 % vodene otopine kloroaurične kiseline (4 % HAuCl_4) volumena prikazanog u Tablici 1. Otopina je zbog kloroaurične kiseline, koja je žuta, poprimila žutu boju (Slika 7. a). Kako bi se povisio pH otopine iznad 7 (8 ili 9), dodana je otopina natrijeva hidroksida ($\text{NaOH}(\text{aq})$) volumena prikazanog u Tablici 1., mješalac te je sadržaj staklene posude promiješan na magnetskoj miješalici. Nakon 20 sekundi otopina je promijenila boju iz žute, preko bezbojne do crne boje (Slika 7. b i c). Promjena boje sadržaja u staklenoj posudi prikazana je na Slici 7.



a)

b)

c)

Slika 7. a) Prikaz sadržaja staklene posude nakon dodavanja n-propanola i otopine kloroaurične kiseline, b) Prikaz sadržaja staklene posude nakon dodavanja otopine $\text{NaOH}(\text{aq})$ i 1 minutu miješanja na magnetskoj miješalici, c) Prikaz sadržaja staklene posude nakon 3 minute miješanja na magnetskoj miješalici

3.2. MIKROSTRUKTURNA KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA ZLATA

Rentgenski difraktogram uzoraka Au1, Au2 i Au3 (Au1: AuNČ dispergirane u propanolu, Au2: AuNČ dispergirane u pentanolu, Au3: AuNČ dispergirane u benzilnom alkoholu) prikazan je na Slici 8. Difrakcijski maksimumi kod sva tri uzorka u potpunosti se poklapaju s difrakcijskim maksimumima zlata, prema ICDD (*engl. International Centre for Diffraction Data*) kartici br. 04-0784, što ukazuje da se sva tri uzorka sastoje od nanočestica zlata. Difrakcijski maksimumi indeksirani su Millerovim indeksima također prema ICDD kartici broj 04-0784. Difrakcijski maksimumi su prošireni što ukazuje na činjenicu da je veličina kristala zlata u nano području. Na osnovi proširenja difrakcijskih maksimuma moguće je procijeniti veličinu kristala prema Scherrerovoj jednadžbi uz uvjet da ne postoje naprezanja kristala koja dodatno proširuju difrakcijski maksimum:

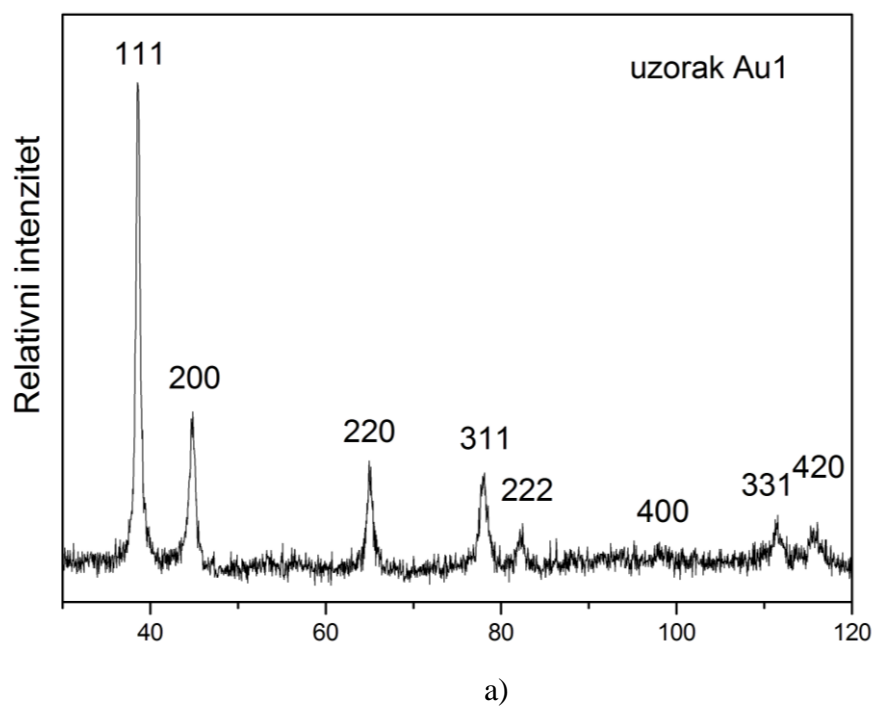
$$D_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta_{1/2} \cos \theta}$$

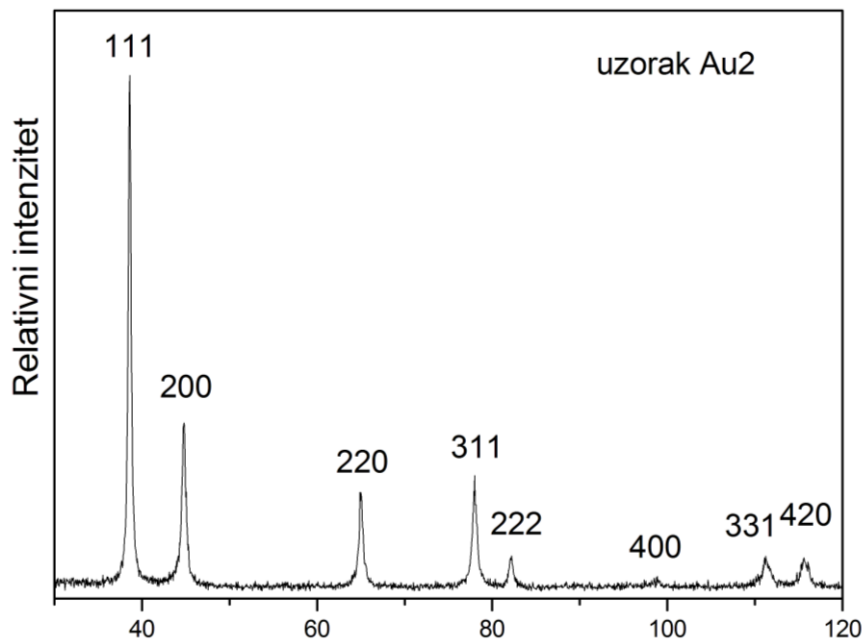
gdje je D_{hkl} prosječna veličina kristala okomito na mrežne ravnine hkl u kristalu, K je korekcijski faktor ($K = 0.94$ za sferne čestice), λ označava valnu duljinu CuK α zračenja (0,15406 nm), θ je Braggov kut u radijanima (stupnjevi se pretvaraju u radijane prema formuli: $1^\circ = 0.0174$ rad), a $\beta_{1/2}$ stvarna puna širina na polovici difrakcijskog maksimuma (*engl. FWHM – the full width at half maximum*). Stvarna $\beta_{1/2}$ se dobiva tako da se od mjerene $\beta_{1/2}$ mjer. oduzme $\beta_{1/2}$ inst zbog instrumentalnog proširenja maksimuma do kojeg dolazi zbog različitih nesavršenosti instrumenta. $\beta_{1/2}$ inst za rentgenski difraktometar na kojem je bio analiziran uzorak je približno $0,07^\circ$ kod $2\theta = 38,6^\circ$. Tablica 4. prikazuje položaje maksimuma Millerovih indeksa 111, vrijednosti $\beta_{1/2}$ mjer, $\beta_{1/2}$ inst, $\beta_{1/2}$ i izračunate prosječne veličine Au nanokristala okomito na mrežne ravnine 111 za sva tri uzorka Au1, Au2 i Au3. Prosječna veličina kristala okomita na mrežne ravnine 111 je 15,4 nm (Au1), 23,6 nm (Au2) i 20,4 nm (Au3).

Tablica 4. Položaji maksimuma Millerovih indeksa 111, vrijednosti $\beta_{1/2}$ mjer, $\beta_{1/2}$ inst, $\beta_{1/2}$ i izračunate prosječne veličine Au nanokristala okomito na mrežne ravnine 111.

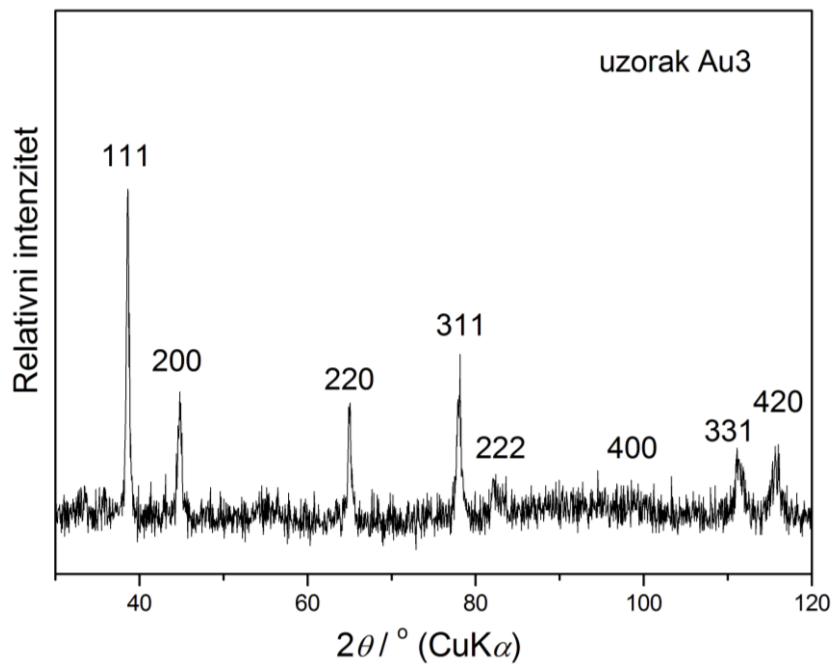
Uzorak	$2\theta / ^\circ$	$\beta_{1/2}$ mjer/ $^\circ$	$\beta_{1/2}$ inst/ $^\circ$	$\beta_{1/2}^*$	D_{111} / nm
Au1	38,6	0,577	0,07	0,570	15,4
Au2	38,6	0,379	0,07	0,372	23,6
Au3	38,6	0,438	0,07	0,431	20,4

$$*\beta_{1/2} = \beta_{1/2} \text{ mjer} - \beta_{1/2} \text{ inst}$$





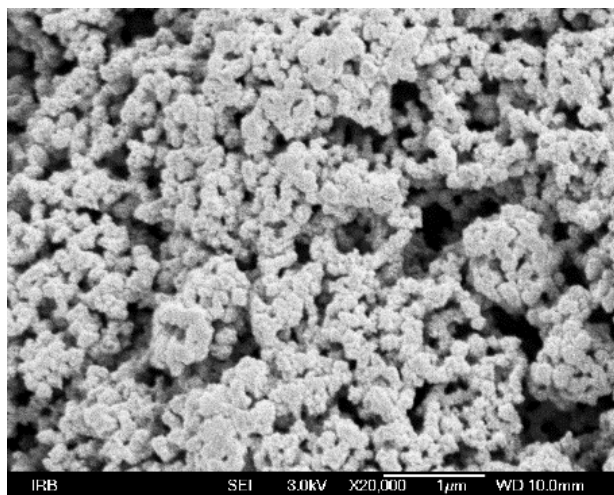
b)



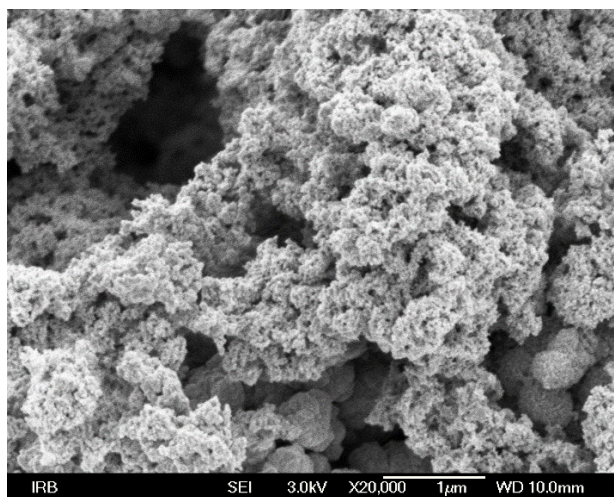
c)

Slika 8. Difrakcijska slika nanočestica zlata uzorka a) Au1, b) Au2 i c) Au3 koji su karakterizirani na osnovi ICDD (engl. International Centre for Diffraction Data) kartice br. 04-0784. Brojevi iznad difrakcijskih maksimuma predstavljaju Millerove indekse.

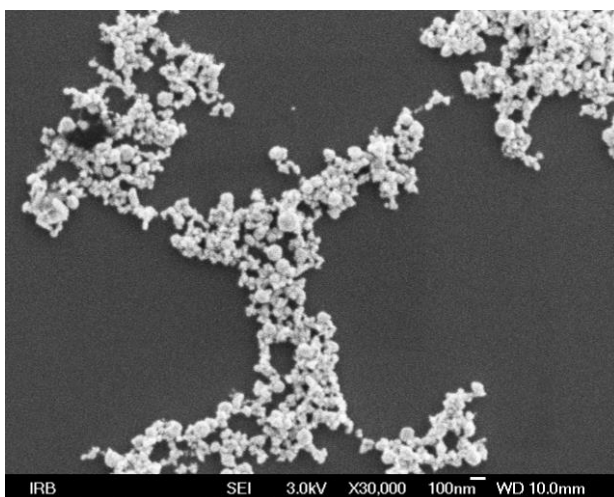
Pretražnim elektronskim mikroskopom su dobivene mikrografije uzoraka Au1, Au2 i Au3 (Slika 9.). Uzorak Au1 se sastoji od diskretnih nanočestice veličine oko 100 nm. Uzorak Au2 sadrži nanočestice veličine oko 50 nm, a uzorak Au3 se sastoji od nanočestica veličine između 50 i 100 nm.



a)



b)

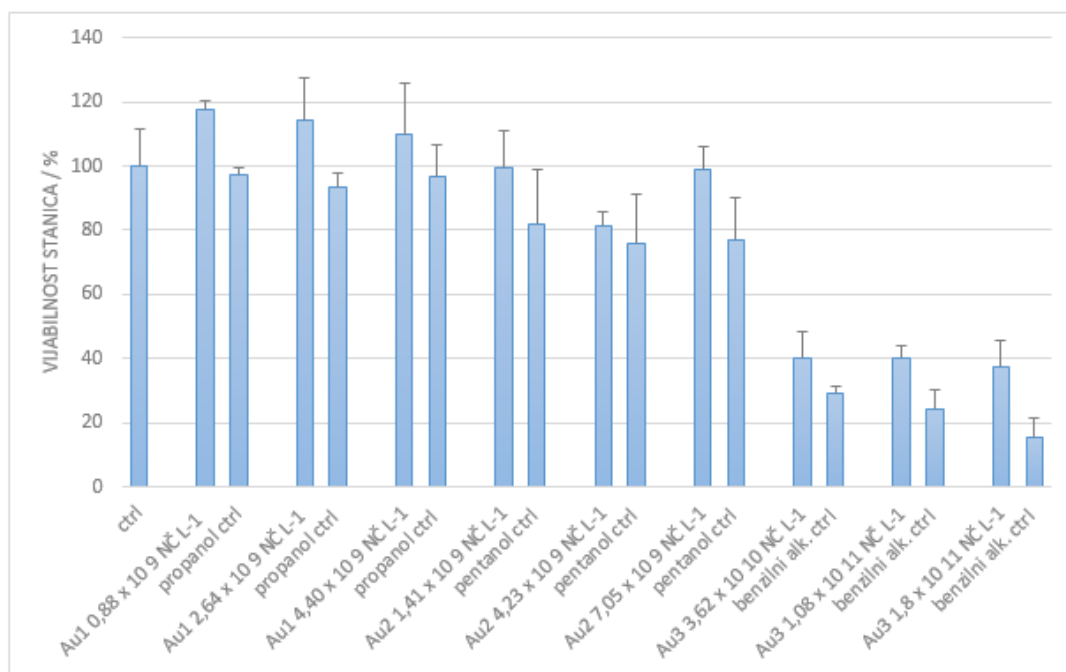


c)

Slika 9. PEM mikrografije uzorka a) Au1, b) Au2 i c) Au3 pri povećanjima od 20000-30000X

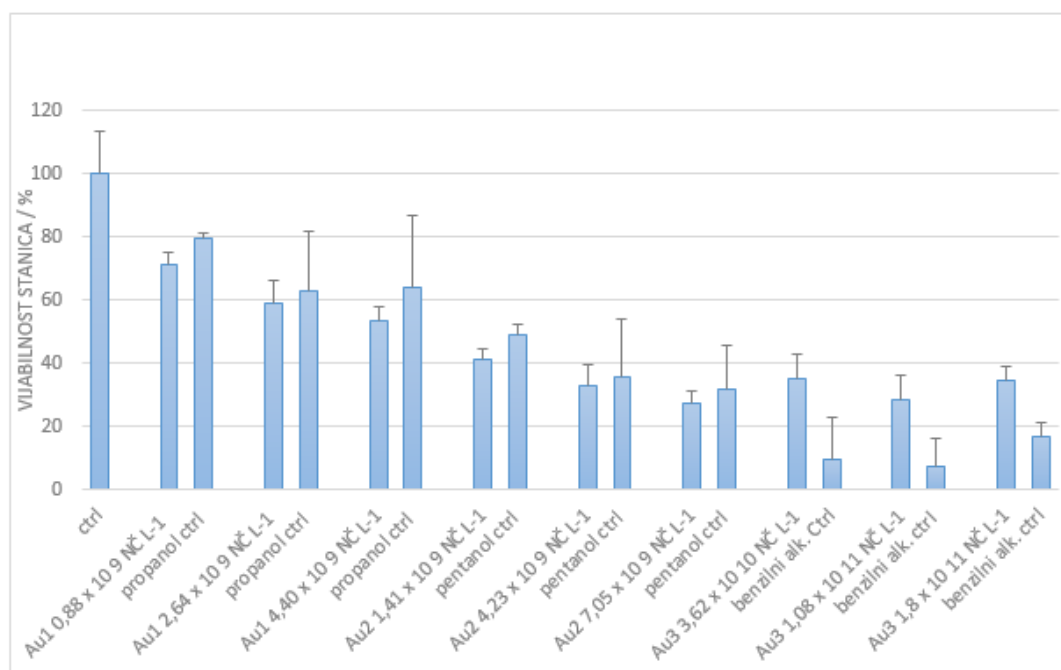
3.3. VIJABILNOST STANICA NAKON TRETIRANJA NANOČESTICAMA ZLATA

Citotoksični učinak AuNČ ispitan je na staničnoj liniji HEK 293. AuNČ su dispergirane u alkoholu od kojeg su i sintetizirane (n-propanol, 1-pentanol, benzilni alkohol), a kao kontrola su u jažice sa stanicama dodani i alkoholi istih koncentracija kao i AuNČ dispergirane u alkoholu u koncentracijskom rasponu od $0,88 \times 10^9$ do $1,8 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹. Rezultati testa MTT 24 sata nakon tretiranja stanica su prikazani na Slici 10. Kod sva tri alkohola je vijabilnost stanica veća pri tretiranju s AuNČ dispergiranim u alkoholu nego pri tretiranju stanica samo s alkoholom. Pri tretiranju stanica s AuNČ dispergiranim u n-propanolu (uzorak Au1) vijabilnost stanica je veća od kontrolne grupe stanica pri sve tri koncentracije. Vijabilnost stanica tretiranih n-propanolom je nešto niža od kontrolne grupe stanica (93-97%). Stanice koje su tretirane AuNČ dispergiranim u 1-pentanolu (uzorak Au2) vijabilnosti su 81-99%. Pri tretiranju stanica 1-pentanolom vijabilnost je nešto niža nego pri tretiranju stanica s uzorkom Au2 (75-81%). Najveći citotoksični utjecaj AuNČ se očituje kod AuNČ dispergiranih u benzilnom alkoholu (uzorak Au3). Vijabilnost stanica iznosi 37-40%, dok je vijabilnost stanica tretiranih benzilnim alkoholom 15-29%.



Slika 10. Vijabilnost stanične linije HEK 293 24 sata nakon tretiranja uzorkom Au1, uzorkom Au2, uzorkom Au3, propanolom, pentanolom i benzilnim alkoholom u koncentracijskom rasponu od $0,88 \times 10^9$ do $1,8 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹. ctrl: kontrola, Au1: AuNČ dispergirane u propanolu, Au2: AuNČ dispergirane u pentanolu, Au3: AuNČ dispergirane u benzilnom alkoholu.

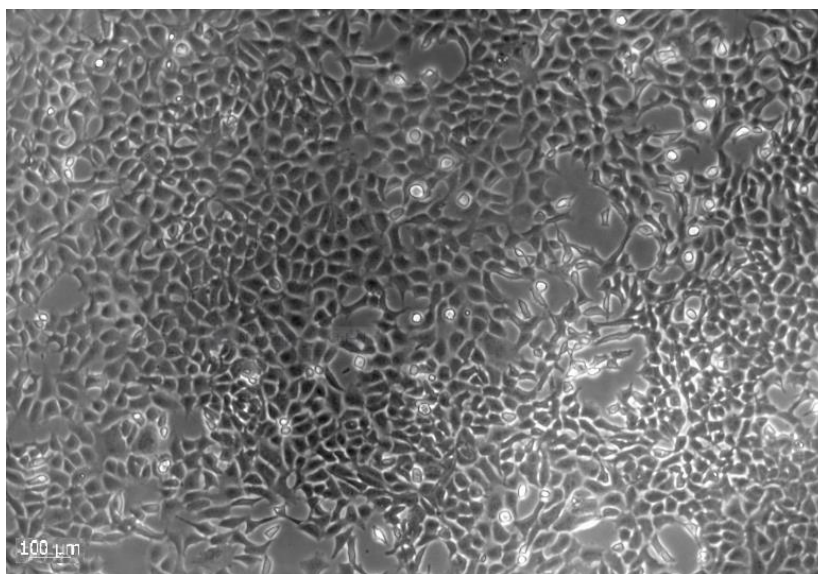
Rezultati testa MTT 48 h nakon tretiranja stanica prikazani su na Slici 11. Vijabilnost stanica tretiranih alkoholima n-propanolom i 1-pentanolom je veća nego u slučaju tretiranja stanica AuNČ dispergiranim u alkoholima n-propanol i 1-pentanol. Vijabilnost stanica nakon unosa AuNČ dispergiranih u propanolu (uzorak Au1) iznosi 53-71%, dok je vijabilnost stanica nakon unosa propanola 62-79%. Vijabilnost stanica nakon unosa AuNČ dispergiranih u pentanolu (uzorak Au2) je nešto manja, 27-41%, dok je vijabilnost stanica nakon tretiranja pentanolom 31-49%. Za razliku od propanola i pentanola, vijabilnost stanica nakon unosa AuNČ dispergiranih u benzilnom alkoholu je veća nego nakon unosa benzilnog alkohola na stanice. Vijabilnost stanica tretiranjem AuNČ dispergiranim u benzilnom alkoholu (uzorak Au3) iznosi 28-35%, dok je vijabilnost stanica tretiranih benzilnim alkoholom 7-16%.



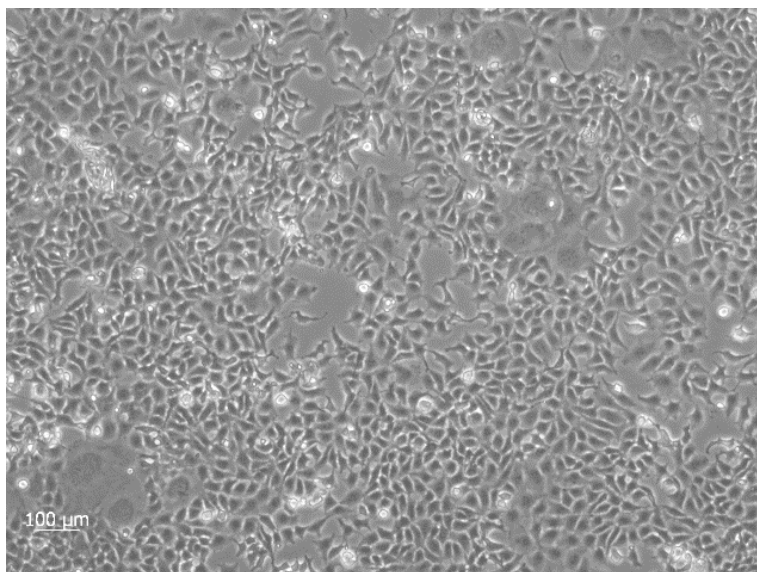
Slika 11. Vijabilnost stanične linije HEK 293 48 sati nakon tretiranja uzorkom Au1, Au2, Au3, propanolom, pentanolom i benzilnim alkoholom u koncentracijskom rasponu od 0,88 x 10⁹ do 1,8 x 10¹¹ NČ L⁻¹. ctrl: kontrola, Au1: AuNČ dispergirane u propanolu, Au2: AuNČ dispergirane u pentanolu, Au3: AuNČ dispergirane u benzilnom alkoholu.

3.4. MIKROSKOPSKA ANALIZA STANICA HEK 293 NAKON TRETMANA AuNČ

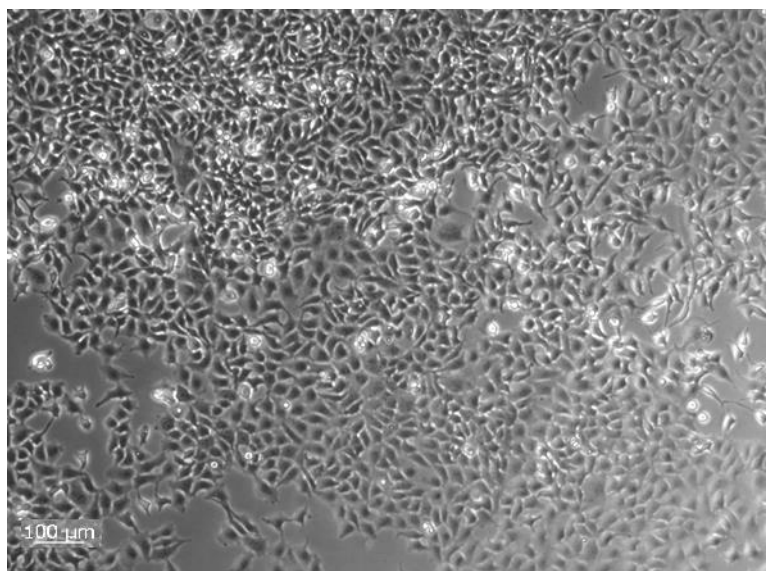
Stanice tretirane s AuNČ dispergiranimi u alkoholu (Au1- $0,88 \times 10^{10}$ NČ L⁻¹, Au2- $1,41 \times 10^{10}$ NČ L⁻¹, Au3- $3,62 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹) slikane su invertnim mikroskopom, 24 sata nakon tretmana. Slike su pokazale isto što i rezultati testa MTT; stanice tretirane uzorkom Au1 (Slika 13. a) i stanice tretirane propanolom (Slika 13. b) pokazale su veliku vijabilnost. Isti slučaj je i kod stanica tretiranih uzorkom Au2 (Slika 14. a) i stanica tretiranih pentanolom (Slika 14. b). Uzorak Au3 (Slika 15. a) izazvao je veliku smrtnost stanica, dok je smrtnost stanica tretiranih benzilnim alkoholom (Slika 15. b) još veća, gdje gotovo i nije bilo živih stanica. Slike su uspoređene s kontrolnim stanicama (Slika 12.) koje nisu tretirane AuNČ ni alkoholima.



Slika 12. Stanična linija HEK 293 uz povećanje 50X, 24 sata nakon nasađivanja, bez tretmana

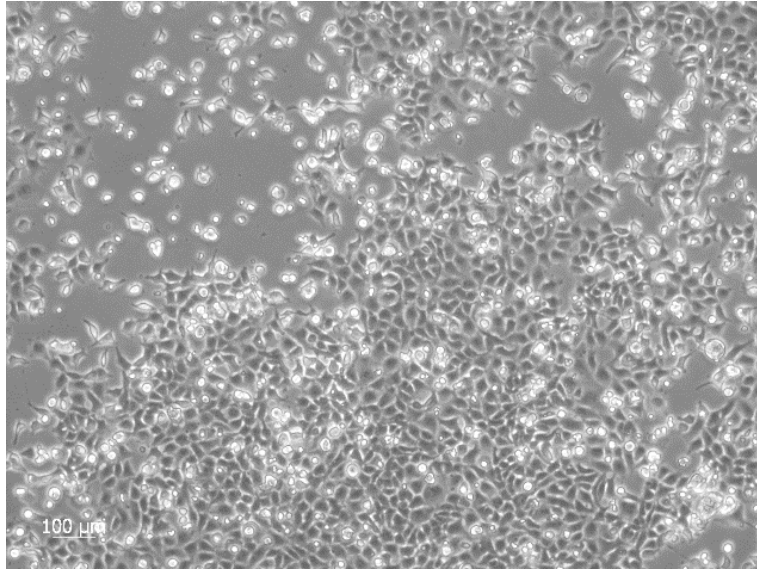


a)

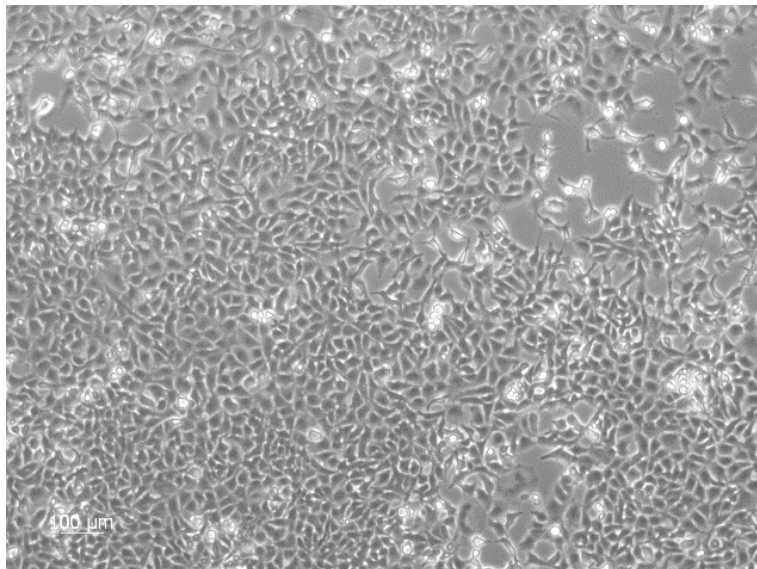


b)

Slika 13. Stanična linija HEK 293 uz povećanje 50X, 24 sata nakon tretiranja a) uzorkom AuI koncentracije $0,88 \times 10^{10} \text{ NČ L}^{-1}$, b) propanolom

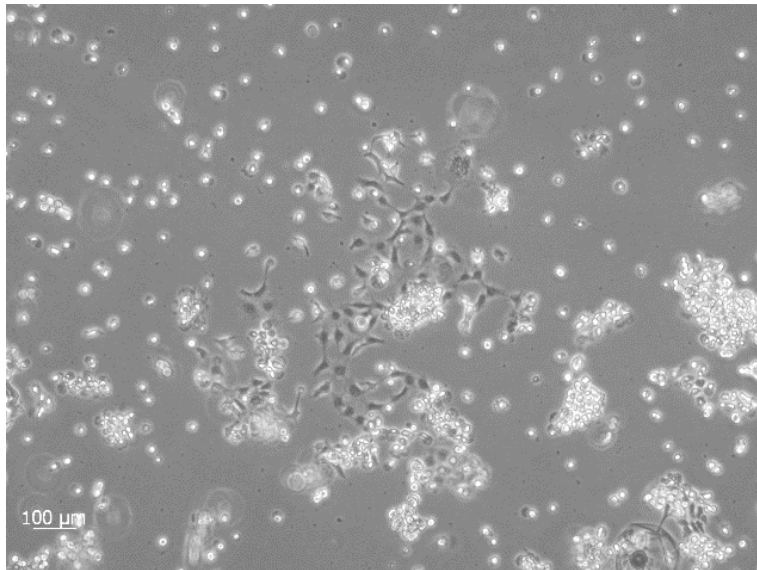


a)

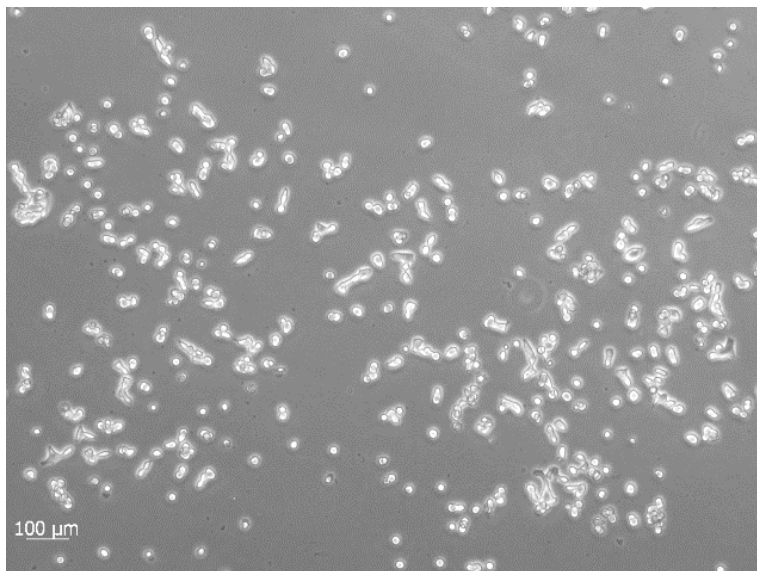


b)

Slika 14. Stanična linija HEK 293 uz povećanje 50X, 24 sata nakon tretiranja a) uzorkom Au₂ koncentracije $1,41 \times 10^{10}$ NČ L⁻¹, b) pentanolom



a)



b)

Slika 15. Stanična linija HEK 293 uz povećanje 50X, 24 sata nakon tretiranja a) uzorkom Au₃ koncentracije $3,62 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹, b) benzilnim alkoholom

4. RASPRAVA

AuNČ se koriste kao biosenzori i kao kontrastni i radiosenzitizacijski agensi. AuNČ su najzastupljenije nanočestice u biomedicinskoj primjeni, a razlog tome leži u njihovoj izrazitoj biokompatibilnosti i mogućnosti modificiranja njihove površine s raznim biološko aktivnim molekulama. Pored primjena u medicini i biologiji (You i sur., 2006.), AuNČ pokazuju i izrazitu katalitičku aktivnost za oksidaciju alkohola. U ovom diplomskom radu AuNČ su sintetizirane oksidacijom alkohola. Mehanizam nastajanja AuNČ kod takve sinteze nije istraživani međutim poznavanjem radova iz tog područja može se raspravljati o mehanizmu nastajanja AuNČ u alkoholnom mediju. Naime, oksidacija alkohola do karbonilnih spojeva jedna je od najvažnijih pretvorbi u organskoj kemiji. Zlato je jako dobar katalizator za oksidaciju alkohola u vodenom mediju kod alkalnog pH, međutim u polarnim organskim otapalima oksidacija alkohola katalizirana zlatom je znatno otežana. Abad i sur. (2008) su zaključili da oksidacija alkohola uz zlato kao katalizator uključuje prisutnost pozitivno nabijenih atoma zlata velike gustoće koji mogu djelovati kao Lewisova kisela mjesta. Kwon i sur. (2011) su istraživali je li elektrokatalitička oksidacija uz zlato u lužnatom mediju katalizirana bazom ili zlatom. Na temelju usporedbe oksidacijskih djelovanja niza sličnih alkohola s različitim pKa - vrijednostima na zlatnim elektrodama u alkalnoj otopini, Kwon i sur. su dokazali da je prvo deprotoniranje alkohola katalizirano bazom, a drugo deprotoniranje alkohola je katalizirano zlatom. Visoka oksidacijska aktivnost zlata u odnosu na platinu za neke je alkohole povezana s visokom otpornošću zlata za formiranje otrovnih površinskih oksida. Potvrdili su da su glavni produkti oksidacije alkohola aldehidi, koji su jako nestabilni u lužnatoj otopini, posebno u prisustvu kisika, pri čemu se razgrađuju na različite produkte čak i bez katalizatora. Pokazano je da baza ima iznimnu ulogu u brzini reakcije oksidacije (Zope i sur., 2010). Potvrđeno je da u oksidaciji alkohola uz zlato kao katalizator katalitičku važnost ima veličina nanočestica zlata gdje su pogodnije manje čestice (Boronat i sur., 2010).

U ovom radu AuNČ su sintetizirane oksidacijom alkohola pri alkalnom pH koristeći 3 vrste alkohola: n-propanol, 1-pentanol i benzilni alkohol. Kao alkalno sredstvo korištena je vodena otopina natrijeva hidroksida. Nakon dodavanja (NaOH(aq)) pri sintezi AuNČ, sadržaj u staklenoj posudi je vrlo brzo promijenio boju dok bez baze nije došlo do reakcije. S obzirom na potencijalnu primjenu AuNČ u biomedicini, testirana je citotoksičnost dispergiranih AuNČ u pripadajućem alkoholu (uzorci Au1, Au2 i Au3) u triplikatima pri tri različite koncentracije u rasponu od $0,88 \times 10^9$ do $1,8 \times 10^{11}$ NČ L⁻¹.

Općenito, vrlo je teško usporediti rezultate toksičnosti AuNČ zbog toga što istraživači koriste različite biološke modele, AuNČ različitih oblika i veličina, premazane različitim ligandima (Carriere, 2012). Hainfeld i sur. (2004) su istraživali kako povećati tretmane radioterapije. Unosom AuNČ u miša u suspenziji PBS, AuNČ su brzo prošle kroz jetru ne uzrokujući štetu životinji. Dokazano je da postoji razlika u unosu AuNČ veličine 1,4 nm i 18 nm u štakora. Manje AuNČ su eliminirane iz organizma putem urina. 3,7% AuNČ veličine 1,4 nm su cirkulirale u krvi nakon 24 sata. S druge strane, gotovo sve AuNČ veličine 18 nm su nakon 24 sata nestale iz krvi i akumulirale se u jetru i slezenu. Provedena su istraživanja i s većim AuNČ i zaključeno je da se akumulacija u jetri, slezeni i plućima povećava što su AuNČ veće (Semmler-Benke i sur., 2008).

U mnogim istraživanjima znanstvenici su pokazali da su AuNČ netoksične (Connor i sur., 2005; Shukla i sur., 2005). Isto tako, pokazano je da utjecaj AuNČ na ljudske stanice ovisi o obliku AuNČ, gdje je sferičan oblik najpogodniji (Sun i sur., 2011). Neke AuNČ su se u istraživanjima pokazale toksičnima, no smatra se da na toksični efekt ima utjecaj površinski premaz na AuNČ (Carriere, 2012). Connor i sur., (2005) su koristeći ljudske stanične linije pokazali da su AuNČ uz različita sredstva (citrati, biotin, cistein, glukoza, cetiltrimetilamonij bromid) netoksične, bazirano na testu MTT. Slične rezultate su dobili i Shukla i sur. (2005) koristeći AuNČ (promjera 3,5 nm) na staničnim linijama imunološkog sustava. Villiers i sur. (2009) su proučavali toksičnost AuNČ sintetiziranih iz citrata (promjera 10 nm) na dendritičkim stanicama (dijelovima ljudskog imunološkog sustava koji procesira i prezentira antigene na svojoj površini za druge stanice). Otkrili su da AuNČ nisu toksične, nisu izazvale aktivaciju i nisu promijenile fenotip stanica. Sun i sur. (2011) su istraživali kako oblik AuNČ utječe na njihovu toksičnost. U istraživanjima *in vivo* su pokazali da je optimalan oblik AuNČ za biomedicinska istraživanja sferičan, zatim u obliku kocke te na kraju u obliku štapića. *In vivo* testovi biodistribucije su pokazali da su se sve AuNČ nakupljale u jetri i slezeni.

Istraživana je citotoksičnost nanočestica zlata s različitim koloidnim sredstvima za stabilizaciju (citratima, škrobom i arapskom gumom) (Vijayakumar i sur., 2012). Nanočestice zlata su općenito netoksične zbog svoje inertnosti. AuNČ se lako označavaju različitim proteinima i biomolekulama bogatim aminokiselinama koje su važne za različite biomedicinske primjene uključujući ciljanu dopremu lijekova, oslikavanje stanica i uporabu AuNČ kao biosenzora. Uspoređujući korištena stabilizacijska sredstva zaključili su da su citrati najosjetljiviji na promjene koncentracija. Pri većoj koncentraciji AuNČ vijabilnost stanica uz citrat kao stabilizacijsko sredstvo je manja nego za AuNČ stabilizirane škrobom i

arapskom gumom. Vijayakumar i sur. pokazali su da su nanočestice zlata dispergirane u vodenoj otopini s citratima, škrobom i arapskom gumom kao stabilizacijskim sredstvima netoksične za stanice u koncentracijskom području između 20 i 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Sun i sur. (2011) su pokazali da na akumulaciju AuNČ utječe njihov oblik. Zhang i sur. (2011) su proučavali utjecaj veličine, oblika i površinske modifikacije na toksičnost AuNČ na ljudskim stanicama HEp-2 i pasjim stanicama MDCK. AuNČ u obliku štapića pokazale su veću citotoksičnost od sferičnih AuNČ. Većina stanične smrti dogodila se unutar jednog sata od inkubacije putem procesa apoptoze.

U ovom radu vijabilnost stanica HEK 293 24 sata nakon izlaganja nanočesticama uzoraka Au1 i Au2 bila je velika, odnosno veća od vijabilnosti stanica izlaganih samo pripadajućem alkoholu, što ukazuje da AuNČ u ispitivanom koncentracijskom području nisu toksične za HEK 293 stanice. S obzirom na vrlo male koncentracije dodanog alkohola sa i bez AuNČ te uz razrjeđenje u mediju volumena 200 μL , utjecaj alkohola na stanice ne bi trebao biti presudan jer je njegova koncentracija vrlo mala. Bez obzira na tu činjenicu, benzilni alkohol je uzrokovao veliku smrtnost stanica i kao kontrola i s dispergiranim AuNČ. Nakon 24 sata AuNČ na neki način pogođuju stanicama te ih „štite“ od utjecaja alkohola. Vijabilnost stanica HEK 293 nakon izlaganja nanočesticama uzorka Au3 je manja u odnosu na propilni i amilni (1-pentanol) alkohol, međutim i kod benzilnog alkohola AuNČ povoljno djeluju na stanice i relativno povećavaju vijabilnost u odnosu na sami benzilni alkohol. Velika toksičnost pri tretiranju stanica s nanočesticama uzorka Au3 prouzročio je sam alkohol unatoč vrlo maloj koncentraciji alkohola koji je dodan, zbog toga što je smrtnost stanica velika i pri tretiranju stanica samim benzilnim alkoholom.

Prema rezultatima 48 sati nakon tretiranja stanica AuNČ možemo zaključiti da su AuNČ postale toksičnije. Stanice tretirane alkoholima n-propanolom i 1-pentanolom su se oporavile od njihovog utjecaja pa im se vijabilnost povećala. U posljednjem slučaju pri tretiranju stanica AuNČ dispergiranim u benzilnom alkoholu vijabilnost je bila veća nego pri tretiranju stanica samim benzilnim alkoholom što možemo objasniti boljom disperzijom AuNČ sintetiziranih benzilnim alkoholom. Tako dobro dispergirane AuNČ su mogle bolje „zaštiti“ stanice od utjecaja benzilnog alkohola koji im očito ne pogođuje. Usporedbom vijabilnosti pri tretiranju stanica različitim koncentracijama AuNČ dispergiranih u alkoholu i alkohola nije uočena pravilnost (pad ili porast vijabilnosti s povećanjem koncentracije). To se može objasniti primjenom relativno malih koncentracija AuNČ.

S obzirom na to da se oblik i veličina AuNČ ne mogu povezati s toksičnosti sintetiziranih AuNČ, zbog vrlo sličnog oblika i veličine 50-100 nm, potrebno je uzeti u obzir vrstu alkohola od kojeg su pojedine AuNČ sintetizirane. Benzilni alkohol je aromatska molekula koja sadrži benzilnu skupinu, a n-propanol i 1-pentanol su lančaste molekule što može biti razlog za jači citotoksični utjecaj benzilnog alkohola na stanice. S obzirom na dobivene rezultate, AuNČ sintetizirane n-propanolom i 1-pentanolom pokazuju potencijalnu primjenu u medicini. Stanična linija HEK 293 je vijabilna nakon tretmana s nanočesticama uzoraka Au1 i Au2, što je potvrđeno testom MTT i mikroskopskom analizom invertnim mikroskopom. Unatoč povoljnim rezultatima za nanočestice uzoraka Au1 i Au2, prije konkretne upotrebe u medicinskoj primjeni potrebno je provesti istraživanja *in vivo*, provjeriti utjecaj drugih koncentracija na žive organizme te provjeriti citotoksičnost uzoraka Au1 i Au2 još nekim testovima kako bi se dobili precizniji rezultati. AuNČ sintetizirane benzilnim alkoholom nisu pogodne za medicinsku primjenu. U ovom radu nanočestice uzorka Au3 su uzrokovale veliku smrtnost stanica HEK 293, što je potvrđeno testom MTT i mikroskopskom analizom invertnim mikroskopom.

5. ZAKLJUČAK

- Nova metoda sinteze AuNČ oksidacijom tri različite vrste alkohola (n-propanol, 1-pentanol i benzilni alkohol) rezultirala je dobivenim AuNČ različitog utjecaja na stanice HEK 293
- AuNČ sintetizirane n-propanolom i 1-pentanolom su pogodne za biomedicinsku primjenu zbog vijabilnosti stanica HEK 293 nakon tretmana
- AuNČ sintetizirane benzilnim alkoholom nisu pogodne za biomedicinsku primjenu zbog male vijabilnosti stanica nakon tretmana
- Vijabilnost stanica HEK 293 24 sata nakon izlaganja AuNČ dispergiranih u alkoholu je veća od vijabilnosti stanica izlaganih samo pripadajućem alkoholu
- Vijabilnost stanica HEK 293 48 sati nakon izlaganja AuNČ dispergiranih u alkoholu je manja u odnosu na iste uvjete pri 24 sata
- Vijabilnost stanica HEK 293 48 sati nakon izlaganja alkoholima je viša u odnosu na vijabilnost nakon izlaganja stanica HEK 293 AuNČ dispergiranim u alkoholima, osim kod benzilnog alkohola
- Benzilni alkohol ima aromatski karakter, a n-propanol i 1-pentanol su lančaste molekule što je značajno za toksični utjecaj benzilnog alkohola na stanice
- Hipoteza je djelomično potvrđena; AuNČ dobivene od n-propanola i 1-pentanola nisu toksične za staničnu liniju HEK 293, a AuNČ dobivene od benzilnog alkohola su toksične za staničnu liniju HEK 293.

6. LITERATURA

- Abad A., Corma A., Garcia H. (2008): Catalyst parameters determining activity and selectivity of supported gold nanoparticles for the aerobic oxidation of alcohols: the molecular reaction mechanism. *Chem. Eur. J.* 14: 212-222.
- Alkilany A.M., Murphy C.J. (2010): Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research.* 12: 2313–2333.
- Boronat M., Corma A., Illas F., Radilla J., Rodenas T., Sabater M. J. (2010): Mechanism of selective alcohol oxidation to aldehydes on gold catalysts: Influence of surface roughness on reactivity, *Journal of Catal.* 278: 50-58.
- Carrettin S., McMorn P., Johnstone P., Griffin K., Hutchings G. J. (2002): Selective oxidation of glycerol to glyceric acid using a gold catalyst in aqueous sodium hydroxide. *Chem. Commun.* 7: 696-697.
- Cedervall T., Lynch I., Foy M. (2007): Detailed identification of plasma proteins adsorbed on copolymer nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46: 5754–5756.
- Chan W.C.W. (2007): Bio- applications of nanoparticles. U: Jennigs T., Strouse G. (ur.) Past, present, and future of gold nanoparticles. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC, str. 34-47.
- Connor E. E., Mwamuka J., Gole A., Murphy C. J., Wyatt M. D. (2005): Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 3: 325-327.
- Dubertret B., Calame M., Libchaber A.J. (2001): Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nature Biotechnol.* 19(4): 365-370.
- Gerlier D., Thomasset N. (1986): Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods.* 94: 57-63.
- Groneberg D. A., Giersig M., Welte T. (2006): Nanoparticle-based diagnosis and therapy. *Current Drug Targets.* 7: 643-648.
- Hainfeld J. F., Slatkin D. N., Smilowitz H. M. (2004): The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys. Med. Biol.*, 49(18): 3-15.
- Huang X. H., El-Sayed I. H., Qian W. (2006): Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 2115-2120.

- Huang X., Jain P. K., El-Sayed I. H., El-Sayed M. A. (2008): Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science*. 23: 217-228
- Jain S., Hirst D. G., O'Sullivan J. M. (2012): Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *An international journal of radiology, radiation oncology and all related sciences*. 85: 1010
- Jurkin T., Guliš M., Dražić G., Gotić M. (2016): Synthesis of gold nanoparticles under highly oxidizing conditions. *Gold Bull*. 49: 21-33.
- Kwon Y., Lai S.C.S., Rodriguez P., Koper M. T. M (2011): Electrocatalytic oxidation of alcohols on gold in alkaline media: base or gold catalysis? *J. Am. Chem. Soc.* 133: 6914-6917.
- Liu J. W., Lu Y (2006): Fast colorimetric sensing of adenosine and cocaine based on a general sensor design involving aptamers and nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Edit.* 45: 90-94.
- Lohani A., Verma A., Joshi H., Yadav N., Karki N. (2014): *Nanotechnology-Based Cosmeceuticals*. Hindawi Publishing Corporation.
- Louis C., Pluchery O. (2012): *Gold nanoparticles for physics, chemistry and biology*. U: Seo D., Song H. (ur.) *Synthesis of gold nanoparticles in liquid phase*. Imperial College Press. str. 103-138.
- Marshall N. J., Goodwin C. J., Holt S. J. (1995): A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regul.* 5(2): 69-84.
- Mickisch G., Fajta S., Keilhauer G., Schlick E., Tschada R., Alken P. (1990): Chemosensitivity testing of primary human renal cell carcinoma by a tetrazolium based microculture assay (MTT) *Urol.res.* 18(2): 131-6.
- Mosmann T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.
- Nam J., Won N., Jin H., Chung H., Kim S. (2009): pH-induced aggregation of gold nanoparticles for photothermal cancer therapy. *J. Am. Chem. Soc.* 38: 13639-13645.

- Pina C. D., Falletta E., Rossi M. (2008): Highly selective oxidation of benzyl alcohol to benzaldehyde catalyzed by bimetallic gold-copper catalyst. *Journal of Catalysis* 260: 384-386.
- Riss T. L., Moravec R. A., Niles A. L., Duellman S., Benink H. A., Worzella T. J., Minor L. (2013): Cell viability assays. National Center for Advancing Translational Sciences, NBK144065
- Saha K., Agasti S. S., Kim C., Li X., Rotello V. M. (2012): Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. *Chem. Rev.* 112: 2739-2779.
- Semmler-Behnke M., Kreyling W. G., Lipka J., Fertsch S., Wenk A., Takenaka S., Schmid G., Brandau W. (2008): Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats. *Small.* 4(12): 2108-11.
- Shukla R., Bansal V., Chaudhary M., Basu A., Bhonde R. R., Sastry M. (2005): Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir.* 21: 10644–10654.
- Sun Y. N., Wang C. D., Zhang X. M., Ren L., Tian X. H. (2011): Shape dependence of gold nanoparticles on in vivo acute toxicological effects and biodistribution. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11: 1210–1216.
- Thomas P., Smart T. G. (2004): HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Elsevier.* 51(3): 189-203.
- Vesaratchanon S., Nikolov A., Wasan D. T. (2007): Sedimentation in nano-colloidal dispersions: effects of collective interactions and particle charge. *Adv. Colloid Interface Sci.* 134–35: 268–278.
- Vijayakumar S., Ganesan S. (2012): In vitro cytotoxicity assay on gold nanoparticles with different stabilizing agents. *Journal of nanomaterials.*
- Villiers C. L., Freitas H., Couderc R., Villiers M. B., Marche M. P. (2009): Analysis of the toxicity of gold nanoparticles on the immune system: effect on dendritic cell functions. *J. Nanopart. Res.* 12: 55–60.
- Wani M.Y., Hashim M.A., Nabi F., Malik M.A. (2011): Nanotoxicity: Dimensional and Morphological Concerns. *Advances in Physical Chemistry.*

- Wu W., Wieckowski S., Pastorin G. (2005): Targeted delivery of amphotericin B to cell by using functionalized carbon nanotubes. *Angew. Chem. Int. Edit.* 44: 6358-6362.
- Yuan Y., Yan N., Dyson P. J. (2011): pH- sensitive gold nanoparticles catalysts for the aerobic oxidation of alcohols. *Inorg. Chem.* 50: 11069-11074.
- You C. C., Arvizo R. R., Rotello V. M. (2006): Regulation of alpha-chymotrypsin activity on the surface of substrate-functionalized gold nanoparticles. *Chem. Commun.* 2905-2907.
- Zhang Y., Xu D., Li W, Yu J., Chen Y. (2012): Effect of Size, Shape, and Surface Modification on Cytotoxicity of Gold Nanoparticles to Human HEP-2 and Canine MDCK Cells. *Journal of Nanomaterials.*
- Zope B. N., Hibbitts D. D., Neurock M., Davis R. J. (2010): Reactivity of the gold/water interface during selective oxidation catalysis. *Science* 330: 74-78.

INTERNETSKI IZVORI

<http://www.hek293.com/> (29.05.2017.)

<https://virushostinteractions.wordpress.com/2015/02/03/human-embryonic-kidney-293t-cells/>
(25.5.2017.)

<http://www.marienfeld-superior.com/index.php/counting-chambers/articles/counting-chambers.html> (29.4.2017.)

<http://news.mit.edu/2015/nanodevice-defeats-cancer-drug-resistance-0302> (5.5.2017.)

7. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Marta Jančec

Mjesto i datum rođenja: Čakovec, 15. listopada, 1992.

Kontakt telefon: +385 98 977 4832

Adresa: Ivane Brlić Mažuranić 19, Čakovec

Email: marta.jancec@gmail.com

FORMALNO OBRAZOVANJE:

- 1999. - 2007. Prva osnovna škola Čakovec
- 2007. - 2011. Gimnazija Josipa Slavenskog Čakovec
- 2011. - 2017. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Cjeloviti integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije, nastavnički smjer

DODATNO OBRAZOVANJE:

- 2001. - 2007. Umjetnička škola Miroslav Magdalenić

Aktivnosti vezane uz obrazovanje:

- Sudjelovanje na manifestaciji Noć biologije 2012., 2014., 2015. i 2016. godine, radionice i prezentacije - Posebna *Rektorova nagrada* za akademsku godinu 2011./2012. za *sudjelovanje* u manifestaciji *Noć biologije*

Studentski poslovi:

- Atlantic trade d.o.o. – skladišni poslovi; pospremanje i deklariranje robe
- Veseli kutak d.o.o. Jankomir, City Centar One West – čuvanje djece, vođenje rođendana, maskota Tobi, rad s ljudima
- GFK Centar za istraživanje tržišta – telefonsko anketiranje
- EUROKOTRA d.o.o., Nicole Cosmetics – prodaja parfema
- Inditex, Zara - Pomoćni poslovi u trgovini te poslovi deklariranja i etiketiranja robe na dostavama