Utjecaj nanočestica srebra na vijabilnost i oksidativni stres ljudskih keratinocita

Galić, Emerik

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:717653

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Emerik Galić

UTJECAJ NANOČESTICA SREBRA NA VIJABILNOST I OKSIDATIVNI STRES LJUDSKIH KERATINOCITA

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen u jedinici za dozimetriju zračenja i radiobiologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, pod vodstvom dr.sc. Ivana Pavičića, u sklopu znanstvenog projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-2016-06-2436: Značaj interakcija metalnih nanočestica sa sumpornim biomolekulama za nano-bio sučelje - NanoFaceS. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

UTJECAJ NANOČESTICA SREBRA NA VIJABILNOST I OKSIDATIVNI STRES LJUDSKIH KERATINOCITA

Emerik Galić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nanočestice srebra (AgNP) jedan su od najčešće korištenih nanomaterijala. Usprkos širokoj primjeni, njihov utjecaj na žive organizme je i dalje predmet istraživanja. U ovom radu je istražen utjecaj triju vrsta nanočestica srebra, stabiliziranih različitim omotačima, na vijabilnost i oksidativni stres ljudskih keratinocita. Pri tome se istražio učinak AgNP u i bez prisustva proteina koji u biološkim sustavima tvore na nanopovršini proteinsku koronu. Proteinska korona može modulirati interakciju nanočestica sa živim sustavima. Rezultati dobiveni primjenom MTS metode na mikrotitarskom čitaču i metode Live/Dead na protočnom citometru pokazuju da su negativno nabijene AgNP citotoksične pri najvišoj testiranoj koncentraciji u uvjetima bez proteinske korone, dok su pozitivno nabijene AgNP pokazale citotoksičnost u prisustvu proteinske korone. Neutralne AgNP nisu pokazale citotoksičnost u ispitivanom koncentracijskom rasponu. Mjerenjem ukupnog sadržaja slobodnih radikala i glutationa (GSH) nije dokazan oksidativni stres u ljudskih keratinocita nakon tretmana nanočesticama srebra.

(35 stranica, 15 slika, 6 tablica, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Nanočestice srebra, ljudski keratinociti, vijabilnost, citotoksičnost, oksidativni stres, proteinska korona

Voditelj: Dr.sc. Ivan Pavičić, viši znanstveni suradnik

Suvoditelj: Izv.prof. dr. sc. Inga Marjanović

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Inga Marjanović
2. prof. dr. sc. Nada Oršolić
3. izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Rad prihvaćen: 31.1.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology Graduation Thesis

THE IMPACT OF SILVER NANOPARTICLES ON THE VIABILITY AND OXIDATIVE STRESS OF HUMAN KERATINOCYTES

Emerik Galić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Silver nanoparticles (AgNP) are one of the most widely used types of nanomaterials. However, their effects on living organisms is still the subject of ongoing research. In this thesis, cell viability and oxidative stress response of human keratinocytes exposed to three different types of AgNP were investigated. In addition, cell response was evaluated after addition of proteins in test media to determine the effect of protein corona formed on AgNP surface. Recent studies suggest that protein corona may modulate the biological effect of nanoparticles. Testings were performed by MTS assay and Live/Dead flow cytometry tests. Obtained results demonstrated that negatively charged AgNP were cytotoxic to keratinocytes only at the highest concentrations applied without the presence of protein corona, while positively charged AgNP showed cytoxicity at the highest tested concentrations after protein corona formation. Neutral AgNP were not cytotoxic in the tested concentration range. Oxidative stress response in cells was tested by mesuring total amount of peroxy radicals and glutation. Results did not indicate any oxidative stress in human keratinocytes exposed to tested concentrations of AgNP.

(35 pages, 15 figures, 6 tables, 56 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: silver nanoparticles, human keratinocytes, viability, cytotoxicity, oxidative stress, protein corona

Supervisor: Ivan Pavičić, PhD, Senior Research Associate

Co-supervisor: Inga Marjanović, PhD, Assoc. prof.

Reviewers:

1. Inga Marjanović, PhD, Assoc. Prof.
2. Nada Oršolić, PhD, Full Prof.
3. Maja Matulić, PhD, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 31.1.2019.

Popis kratica i simbola

A/A – Antibiotik/antimikotik

AAS - Atomska apsorpcijska spektrometrija

AgNP - srebrne nanočestice

AOT- natrijev bis(2-etilheksil)-sulfosukcinat

Ask – askorbinska kiselina

BSA – goveđi serumski albumin

DCFH - diklorofluorescein

DMEM - Dulbecco's modified eagle's medium

DLS – dinamičko raspršenje svjetlosti

EDTA - Etilendiamintetraoctena kiselina

ELS – elektroforetsko raspršenje svjetlosti

FBS – serum goveđeg fetusa

GSH - glutation

GSSG - reducirani glutation

HaCat - ljudske keratinocite

MCBL - Monoklorobiman

MTS - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid

NADH – nikotinamid adenin dinukletoid

NADPH - nikotinamid adenin dinukletoid fosfat

PBS - – puferirana otopina fosfatnih soli

PI - Propidij jodid

PLL – poli-*L*-lizin

ppb - parts per billion

ppm – parts per million

PVP - polivinilipirilodon

ROS - reaktivne kisikove vrste

TEM - transmisijski elektronski mikroskop

UPW – ultračista voda

Sadržaj

1. Uvod ... 1
   1.1 Nanomaterijali ... 1
   1.2 Nanočestice srebra ... 2
   1.3 Biološka aktivnost nanočestica ... 3
   1.4 Sigurnost primjene nanočestica srebra ... 4
2. Cilj istraživanja ... 6
3. Materijali i metode ... 7
   3.1 Karakterizacija nanočestica ... 7
   3.2 Određivanje stabilnosti nanočestica atomskom absorpcijskom spektroskopijom ... 7
   3.3 Određivanje interferencije nanočestica s testovima *in vitro* ... 8
   3.4 Stanična kultura ... 9
   3.5 Određivanje stanične vijabilnosti ... 9
      3.5.1 Test stanične vijabilnosti MTS ... 9
      3.5.2 Test Live/Dead na protočnom citometru ... 10
   3.6 Određivanje oksidativnog stresa ... 10
      3.6.1 Test Monoklorobiman ... 10
      3.6.2 Test Dikloro-dihidro-fluorescein diacetat (DCFH-DA) ... 11
   3.7 Grafički prikaz i statistička obrada rezlutata ... 11
4. Rezultati ... 11
   4.1 Karakterizacija i određivanje stabilnosti nanočestica ... 11
   4.2 Odabir metode za određivanje vijabilnosti stanica ... 15
   4.3 Rezultati vijabilnosti keratinocita dobiveni metodama MTS Live/Dead ... 18
   4.4 Utjecaj nanočestica na oksidativni stres ljudskih keratinocita ... 24
5. Rasprava ... 26
6. Zaključak ... 29
7. Literatura ... 30
8. Životopis ... 35

1. Uvod

1.1 Nanomaterijali

Nanotehnologija je grana znanosti koja se bavi istraživanjem i primjenom novih materijala veličine 1 – 100 nm (EPA 2007). Široka primjena nanomaterijala je prikazana u Tablici 1.

Tablica 1. Primjena nanomaterijala u medicini i industriji (Klaine i sur. 2012)

Primjena	Rizik	Dobrobit
Nanokristali u fotovoltičnim uređajima.	Svjetlosno zagađenje, trošak za ekonomije fosilnog goriva.	Zelena, obnovljiva energija, novi samoosvjetljujući zasloni za elektroničke uređaje.
Nanosrebro u antimikrobnim zavojima za rane.	Otpuštanje biocidih nanočestica u okoliš, šteta za mikroorganizme.	Poboljšano zacjeljivanje rana i smanjen rizik infekcija
Nanočestice titanovog dioksida u kremama za sunčanje.	Šteta uzrokovana titanom na ekosustave pješčanih obala.	Transparentne i efikasne kreme za sunčanje koje smanjuju pojavnost raka kože.
Metalni nanomaterijali povećavaju efikasnost sagorijevanja goriva.	Respiratorno izlaganje nanomaterijalima iz ispušnih cijevi.	Manje čađe iz dizelskih vozila i zagađenja urbanog zraka, efikasno sagorijevanje, smanjen efekt staklenika.
Primjena nanosilikata u rekonstrukciji kosti.	Erodirane čestice s površine mogu prouzročiti patologiju u drugim organima.	Strukturni popravci zubi i kosti koristeći prirodne materijale koji su već u tijelu (nema imunog odgovora).
Nanomaterijali u pakiranjima za hranu.	Nenamjerni prijenos nanomaterijala s pakiranja na hranu.	Jača i lakša pakiranja za zaštitu mekane hrane, antibakterijsko pakiranje za duži rok trajanja. Povećana sigurnost hrane.
Karbonske nanocijevi u sportskoj opremi.	Nejasan životni ciklus na kraju njihove upotrebe	Bolji produkti koji traju duže za potrošače. Smanjuju ozljede povezane sa sportom.
Nanomaterijali kao katalizatori u industrijskim procesima.	Nepažljiva ugradnja toksičnih katalizatora, odbacivanje katalizatora na odlagališta.	Poboljšana efikasnost i ekonomija industrijskih procesa. Manje industrijskog otpada po toni proizvoda.
Nanomaterijali u filtraciji i pročišćavanju vode.	Nenamjerno izlaganje nanomaterijalima putem vode	Novi izvori sigurne vode za piće u siromašnim područjima. Efikasniji sustavi pročišćivanja vode. Smanjeno izlaganje patogenim organizmima i toksinima.

Nanočestice mogu biti sferičnog, tubularnog ili nepravilnog oblika. Postoje u obliku aglomerata, fuzionirane te agregirane. Također ih možemo podijeliti na prirodne i umjetno sintetizirane nanočestice (Nowack i Bucheli 2007). Nanomaterijali imaju jedinstvene fizikalno – kemijske, optičke, električne, magnetske, mehaničke i biološke karakteristike koje omogućuje njihovu raznoliku primjenu. Mnoge grane industrije kao što su elektronika, tekstil, energija, kozmetika, prehrambena industrija primjenjuju nanotehnologiju. Također se predviđa sve veći utjecaj nanotehnologije na medicinu, zelenu energiju, pročišćavanje otpadnih voda (Adlakha-Hutcheon i sur. 2009).

1.2 Nanočestice srebra

Srebrne nanočestice (AgNP, od *eng. silver nanoparticles*) su jedan od najšire korištenih oblika nanomaterijala u industriji i biomedicini zbog njihovo jedinstvenih karakteristika: kemijska stabilnost, električna i optička vodljivost, katalitička i biocidna aktivnost (Frattini i sur. 2005, Capek 2004). U medicini su našle primjenu zahvaljujući dokazanom antimikrobnom, antitumorskom, antiangiogenom djelovanju te potencijalu za primjenu u razvoju biosenzora i bioimaging-a (Zhang i sur. 2016). U tekstilnoj industriji se nanočestice srebra koriste kao higijensko sredstvo za spriječavanje nastanka bakterija, neugodnih mirisa, te u medicinskim oblozima za rane (Nanosilver in Perspective, 2011). Široka primjena nanosrebra u medicini prikazana je u Tablici 2.

Tablica 2. Povećana primjena nanosrebra u medicinskim proizvodima. (Varner i sur. 2010)

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

1.3 Biološka aktivnost nanočestica

Biološka aktivnost nanočestica može se pripisati sljedećim svojstvima. Visoki omjer površine i volumena povećava interakcije s okolnim molekulama što neizravno povećava efekte citotoksičnosti (Gatoo i sur. 2014) . Kemijski sastav čestice odgovoran je za njezinu reaktivnost (Gatoo i sur. 2014). Nadalje, površinski naboj koji sudjeluje u elektrostatskim interakcijama, a koji je karakteriziran zeta potencijalom, važan je faktor kod stvaranja agregata i u interakciji nanočestica i stanica te utječe na količinu adsorbiranih proteina na površini čestice (Horie i sur. 2012). Zatim, topljivost koja je povezana s toksičnošću zbog interakcija s komponentama medija poput aminokiselina i proteina (Misra i sur. 2012). Nanočestice adsorbiraju sekundarne čestice na svoju površinu što dovodi do unosa stranih čestica u stanicu, odnosno takozvanog efekta "Trojanskog konja" (Hsiao i sur. 2015). Hidrofobne nanočestice stvaraju interakcije s proteinima i staničnim membranama (Su i sur. 2017). Pokazana je inhibitorna aktivnost enzima nanočesticama (Wu i sur. 2009). Akumulacija inertne čestice u tijelu može pokrenuti stvaranje tkiva oko stranog tijela i dovesti do nastanka ožiljka (Buzea i sur. 2007)

Zbog svih navedenih svojstava, nanočestice podliježu različitim transformacijama u biološkim medijima. Primjerice, otapanje nanočestica ključno je u procjeni njihove toksičnosti. Otopina nanočestica sastoji se od djelomično otopljenih nanočestica, slobodnih iona te kompleksa nanočestica i adsorbiranih iona. Oblik u kojem se nanočestice nalaze u mediju utječe na njihovu biodostupnost, toksičnost i mehanizam unosa u stanicu (Misra i sur. 2012). Otapanje srebrnih nanočestica dovodi do otpuštanja toksičnih Ag^+ iona (Xia i sur. 2008).

Važan oblik transformacije nanočestica je stvaranje biomolekularne korone na njihovoj površini u biološkim medijima. Naime, nanočestice u biološkim tekućinama na površinu adsorbiraju proteine, lipide, vitamine, ugljikohidrate koji tvore tzv. koronu. Najviše adsorbiraju proteini, koji tvore proteinsku koronu oko nanočestice (Pareek i sur. 2018). Sastav proteinske korone ovisi o veličini, površinskom naboju te morfologiji nanočestice (Monopoli i sur. 2011). Proteinska korona utječe na distribuciju, aktivnost i toksičnost nanomaterijala zbog čega se pretpostavlja da korona ima važnu ulogu pri utjecaju nanočestica na biološke sustave (Lynch i sur. 2007). Pokazana je uloga korone na unos nanočestica u stanicu, citotoksičnost, upalne procese te oksidativni stres (Beduneau i sur. 2009, Clift i sur. 2010, Deng i sur. 2011). Proteini seruma stvaraju proteinsku koronu na površini nanočestica što dovodi do njihove smanjene citotoksičnosti (Cheng i sur. 2015).

Stoga je u procjeni kvalitete, efikasnosti i sigurnosti primjene nanočesica ključno procijeniti njihovu stabilnost i moguće transformacije koje ovise o veličini čestica, ukupnoj površini, morfologija površine i kristaličnost. Pokazano je da omotač srebrnih nanočestica također utječe na njihovo otapanje, odnosno stabilnost (Kittler i sur. 2010, Liu i sur. 2008). Nadalje, karakteristike medija (pH, ionska jakost, tvrdoća vode, prisutnost organskih molekula – polisaharida, proteina) imaju utjecaj na stabilnost nanočestica. (Gondikas i sur. 2012).

U ionskoj otopini, nanočestice stvaraju na površini električni dvosloj. Uslijed gibanja nanočestica, dolazi do razlikovanja ta dva sloja. Granica tih slojeva se naziva zeta potencijal koji se uzima kao mjera površinskog naboja nanočestice. Površinski naboj je jedan od parametara koji određuju njihovu stabilnost, budući da ostvaruju interakciju s biološkim molekulama putem elektrostatskih interakcija (Clogston i Patri 2010.).

1.4 Sigurnost primjene nanočestica srebra

Novija istraživanja ukazuju na toksičnost AgNP na različite tipove stanica (Vinković Vrček i sur 2014, Milić i sur. 2015). Iako u širokoj primjeni, procjena rizika izloženosti nanomaterijalima i njihov utjecaj na biološke sustave nisu dovoljno istraženi (Savolainen i sur. 2010). Nanotoksikologija je znanost koja proučava toksičan utjecaj nanomaterijala na biološke sustave. Ljudi mogu biti direktno izloženi nanočesticama preko zraka, vode, tla ili indirektno putem hrane koje konzumiraju (Nowack i Bucheli 2007). Nanočestice ulaze u stanicu putem difuzije, transmembranskih kanala ili adhezivnim interakcijama. Put ulaska ovisi o njenom tipu, veličini i površinskom naboju (Mahmood i sur. 2010). Na staničnoj razini je dokazan proinflamatorni učinak nanočestica, indukcija oksidativnog stresa, genotoksičnost te stanična smrt (Khanna i sur. 2015). Na razini organizma je pokazan negativan učinak na respiratorni, probavni, cirkulacijski te središnji živčani sustav (Medina i sur 2007). U Tablici 3 su prikazani mogući utjecaji nanočestica na različite biološke sustave. Pretpostavlja se da je glavni uzrok toksičnosti AgNP oksidacija te otpuštanju srebrnih (Ag+) iona (Xiu i sur. 2012), što dovodi do oksidativnog stresa, upale te stanične smrti (Khanna i sur. 2015).

Indukcijom oksidativnog stresa dolazi do povećanja koncentracija reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u stanici te neravnoteže između prooksidativnih i antioksidativnih molekula u stanici, što ima za posljedicu oštećenje staničnih struktura kao što su membrane, stanični lipidi, proteini i DNA (Valko i sur. 2007). Stanični odgovor na oksidativni stres je povećana ekspresija antioksidativnih i detosikacijskih enzima. Jedan od najvažnijih obrambenih molekula od oksidativnog stresa je glutation (GSH) koji neutralizira slobodne radikale. Kod velikog oksidativnog stresa dolazi do pada koncentracije GSH te povećanja koncentracije reduciranog glutationa (GSSG) u stanici (Halliwell i Gutteridge 1999). Dulja izloženost oksidativnom stresu dovodi do upale, citotoksičnosti te indukcije apoptoze (Xiao i sur. 2003). U ovom radu su mjereni ukupni slobodni radikali te razina glutationa kao indikatori okisdativnog stresa u stanicama.

Tablica 3. Mogući utjecaj nanočestica na biološke sustave (Nel i sur. 2006.)

Eksperimentalni efekti nanočestica	Mogući patofiziološki ishodi
Generacija ROS-a	Oksidativni stres, oštećenje proteina, DNA i membrana
Oksidativni stres	Faza II enzimske indukcije, upala, mitohondrijska perturbacija
Mitohondrijska perturbacija	Oštećenje unutrašnje membrane, tranzicija propusnosti, otvaranje pora, apoptoza, aponekroza, citotoksičnost
Upala	Infiltracija tkiva upalnim stanicama, fibroza, granulomi, aterogeneza, ekspresija proteina akutne faze
Unos preko retikuloendotelnog sustava	Asimptomatska sekvestracija i skladištenje u jetri, slezeni i limfnim čvorovima te moguće povećanje i disfunkcija organa
Denaturacija i degradacija proteina	Gubitak enzimske aktivnosti, autoantigeničnost
Unos u jezgru	Oštećenje DNA, grupiranje nukleoproteina, autoantigeni
Unos u živčano tkivo	Ozljeda mozga i perifernog živčanog sustava
Perturbacija fagocitne funkcije, otpuštanje medijatora	Kronična upala, fibroza, granulomi, smetnje u micanju infektivnog agensa
Endotelna disfunkcija, poremećaj zgrušavanja	Aterogeneza, tromboza, srčani udar
Stvaranje neoantigena, raspad imune tolerancije	Autoimunosti, efekti adjuvansa
Promijenjena regulacija staničnog ciklusa	Proliferacija, zastoj staničnog ciklusa, starenje
Oštećenje DNA	Mutageneza, metaplazija, karcinogeneza

ROS: reaktivne kisikove vrste

2. Cilj istraživanja

Povećanje primjene nanočestica srebra u medicini i industriji zahtijeva i procjenu sigurnosti korištenja takvih oblika materijala. Obzirom da se AgNP koriste u kozmetici, medicinskim oblozima i tekstilu koji dolaze u direktan kontakt s ljudskom kožom, glavni cilj ovog istraživanja bio je testirati utjecaj triju vrsta nanočestica srebra na vijabilnost i oksidativni stres ljudskih keratinocita u uvjetima *in vitro*. Hipoteza istraživanja bila je da AgNP nisu toksične za ljudske keratinocite.

Za dokazivanje hipoteze istraživanja postavljeni su sljedeći specifični ciljevi:

1. Ispitati stabilnost triju vrsta srebrnih nanočestica stabiliziranih različitim omotačima: natrijevim bis (2-etilheksil)-sulfosukcinatom (AOTAgNP), polivinilipirilodonom (PVPAgNP) i poli-L-lizinom (PLLAgNP) u medijima sa serumskim albuminima (DMEM + BSA) i bez seruma (DMEM) koji će se koristiti u esejima *in vitro*
2. Ispitati interferencije zadanih nanočestica metodama *in vitro*, koje će se koristiti na staničnim esejima radi točne interpretacije rezultata eksperimenata citotoksičnosti i oksidativnog stresa
3. Ispitati utjecaj triju vrsta srebrnih nanočestica (AOTAgNP, PVPAgNP i PLLAgNP) na vijabilnosti i oksidativni stres ljudskih keratinocita (HaCaT) u mediju s dodanim serumom goveđeg fetusa (DMEM + FBS) i bez seruma (DMEM)

3. Materijali i metode

3.1 Karakterizacija nanočestica

Sve nanočestice ispitivane u ovom diplomskom radu pripremljene su u laboratorijima Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, u sklopu istraživačkog projekta HRZZ-IP-2016-06-2436. Izabrane su tri vrste AgNP stabilizirane neutralnim polivinilpirolidonom (PVP), negativno nabijenim bis(2-etilheksil)-sulfosukcinatom (AOT) i pozitivno nabijenim poli-L-lizinom (PLL).

Nanočestice su vizualizirane pomoću transmisijskog elektronskog mikroskopa (TEM; 902A; Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany) pri naponu od 80 kV. Slike su napravljene pomoću Canon PowerShot S50 kamere. Uzorci su pripremljeni za TEM nakapavanjem otopine AgNP na bakrenu mrežicu s Formvar omotačem, nakon čega su se uzorci sušili na zraku.

Distribucija veličine AgNP je određena metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) korištenjem uređaja Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) sa zelenim laserom (532 nm), 173°. Veličina je dobivena u obliku prosječnog hidrodinamičkog polumjera iz 10 nezavisnih mjerenja. Veličina je mjerena u 3 različita medija i to: ultračistoj vodi (UPW), staničnom mediju (DMEM), i staničnom mediju uz dodatak goveđeg serumskog albumina (DMEM + BSA) nakon inkubacije od 24 h.

Površinski naboj (ζ potencijal) je mjeren metodom elektroforetskog raspršenja svjetlosti (ELS) na Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) uređaju sa zelenim laserom (532 nm), 173°. Dobivene vrijednosti ζ potencijala su prosječne vrijednosti 5 nezavisnih mjerenja. Podaci su obrađeni u Zetasizer software 6.32 (Malvern Instruments).

3.2 Određivanje stabilnosti nanočestica atomskom absorpcijskom spektroskopijom

Atomska absorpcijska spektrometrija (AAS) analitička je metoda koja mjeri koncentracije određenog kemijskog elementa u uzorku. Osjetljivost metode je na razini ppb (*parts per billion*). Metoda se temelji na činjenici da različiti kemijski elementi apsorbiraju svjetlost različitih valnih duljina. Uzorak u AAS-u se atomizira i prevodi u plinovito stanje. Izvor svjetlosti emitira zračenje određene valne duljine koje pogađa uzorak. Izvor svjetlosti je specifičan za analizu svakog kemijskog elementa. Uzorak apsorbira dio svjetlosti, a količina apsorbirane svjetlosti je proporcionalna koncentraciji analiziranog kemijskog elementa. Kvantifikacija koncentracije elementa prisutnog u uzorku se računa pomoću kalibracijske krivulje. Mjerenjem nekoliko standarda poznate koncentracije određuje se kalibracijska krivulja koja pokazuje ovisnost koncentracije o apsorbanciji. AAS se primjenjuje u kliničkim analizama bioloških uzoraka, znanosti o okolišu za praćenje zagađenja teškim metalima, farmaciji za mjerenje ostataka metalnih katalizatora te industriji za analizu materijala (RSC leaflet 2001). Količina otpuštenih Ag^+ iona mjera je stabilnosti AgNP koje su inkubirane u medijima: UV, DMEM, DMEM + BSA, tijekom 24 sata pri sobnoj temperaturi. Otopine AgNP u medijima su

miješane na miješalici cijelo vrijeme inkubacije. Koncentracija AgNP u medijima je bila 0.3 ppm. Nakon inkubacije uzorci su pipetirani u filtere (Amicon-4, Merck Millipore, USA) te centrifugirani 30 min, 14 000 g da bi se odvojili AgNP od Ag^+. Filtrat se razrijedio u HNO_3, do konačne koncentracije kiseline od 10% (v/v). Koncentracija Ag^+ se zatim odredila na uređaju AAanalyst 600 (Perkin Elmer, USA).

3.3 Određivanje interferencije nanočestica s testovima *in vitro*

Testovi *in vitro* se baziraju na mjerenju luminiscencije, absorbancije ili fluorescencije. Karakteristike nanočestica kao što su visoki apsorpcijski kapacitet, hidrofobnost, površinski naboj, optička i magnetska svojstva i katalitička aktivnost mogu interferirati sa sastavnicama eseja ili sustavom detekcije (Guadagnini i sur. 2015). Istraživanja su pokazala da nanočestice interferiraju s apsorpcijom svjetla i fluorescencijom na kojoj se temelje testovi *in vitro*. Nekontrolirane kemijske reakcije te adsorpcija kemijskih reagensa na nanočestice također uzrokuju interferencije (Monteiro-Riviere i sur. 2009). Nanočestice specifično interferiraju s klasičnim esejima citotoksičnosti ovisno o koncentraciji, vrsti nanočestica i vrsti testova (Dhawan i Sharma 2010). Vinković Vrček i suradnici (2015) istraživali su interferencije nanočesticama metodama *in vitro* i ranije. AgNP apsorbiraju pri valnim duljinama od 590 nm i 490 nm pri kojima se mjeri absorbancija formazanskog produkta kod testa MTT ili MTS. Pokazali su da različite vrste nanočestica srebra uzrokuju povećanje absorbancije u MTT testu pri koncentracijama nanočestica od 50 mg/L naviše, što dovodi do lažno negativnih rezultata i netočne interpretacije citotoksičnosti. U testu MTS je povećanje absorbancije bilo znatno niže. Pokazano je i da nanočestice srebra reduciraju tetrazolijevu sol u formazanski produkt, što također dovodi do očitanja više absorbancije i lažno negativnih rezultata pri procjeni citotoksičnosti. Kod testova *in vitro* baziranih na fluorescenciji kao što su eseji DCFH-DA i MBCl, pokazali su da nanočestice guše fluorescenciju pri koncentracijama od 10 µg/L i 1000 µg/L što također dovodi do lažno negativnih rezultata. Interferencije nanočestica s testovima *in vitro* je teško unaprijed predvidjeti (Vinković Vrček i sur. 2015) budući da ovise o kemijskom sastavu, veličini, obliku, površinskom naboju i stabilnosti nanočestica. U ovom radu su se procjenile interferencije ispitivanih AOTAgNP, PVPAgNP i PLLAgNP s MTS testom u uvjetima bez stanica. U prvom eksperimentu su testirane 3 koncentracije 3 tipa navedenih nanočestica (100, 50, 10 ppm) u prozirnoj pločici s 96 jažica tako da su u četveroplikatima dodavane otopine nanočestica (6x koncentrirane), medij (DMEM) i reagens MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent). Kontrole su bile u triplikatima: A) Nanočestice i medij, B) Medij i MTS reagens i C) Medij (DMEM). Uzorci su inkubirani 3 sata na 37°C, 5% CO_2 u inkubatoru (HeraCell, Thermo Scientific, USA) te je mjerena absorbancija pri 490 nm na čitaču pločica (Victor™ plate reader, Perkin Elmer, MA, USA).

U drugom eksperimentu je simulirana redukcija MTS reagensa u formazan pomoću askorbinske kiseline. Testirane su 3 koncentracije (100, 50, 10 ppm) 3 vrste srebrnih nanočestica (AOTAgNP, PVPAgNP i PLLAgNP). U četveroplikatima su dodane otopine nanočestica (6x koncentrirane), Medij (DMEM) i MTS reagens (CellTiter 96® AQueous One

Solution Reagent). Nakon inkubacije (1h, 37°C, 5% CO2) u jažice je dodana askorbinska kiselina (konačna koncentracija 83.3 µM). Kontrole su rađene u triplikatima i to: A) Nanočestice + medij (DMEM) + askorbinska kiselina, B) Medij (DMEM) + MTS reagens + Askorbinska kiselina, C) Medij + MTS reagens, D) Medij (DMEM). Askorbinska kiselina je dodana nakon inkubacije (1h, 37°C, 5% CO2). Nakon dodavanja askorbinske kiseline, uzorci su inkubirani (2h, 37°C, 5% CO_2) te je mjerena absorbancija pri 490 nm (Victor™ plate reader (Perkin Elmer, MA, USA)).

3.4 Stanična kultura

Korištena je stanična linija imortaliziranih aneuploidnih ljudskih keratinocita - HaCaT – koja se uobičajeno koristi kao model za procjenu toksičnosti na kožno tkivo (Boukamp i sur. 1988). Ta je stanična linija prepoznata kao dobar model u *in vitro* istraživanju utjecaja AgNP na kožu (Zhang i sur. 2016). Stanice su uzgajane u bočicama za staničnu kulturu, pri 37°C, 5% CO_2 u inkubatoru. Pri nasađivanju stanica u pločicu, stanicama je prvo uklonjen medij te su isprane PBS-om (1%). Stanice su odvojene od podloge pomoću tripsina (Sigma Aldrich, USA), te je dodan medij sa serumom (DMEM + 10% FBS) za njegovu inhibiciju. Pri brojanju, stanice su pomiješane s tripanskim modrilom (Trypan Blue, Biorad, USA) u omjeru 1:1, te su stanice brojane pomoću automatskog brojača (TC 20, Biorad, USA).

3.5 Određivanje stanične vijabilnosti

3.5.1 Test stanične vijabilnosti MTS

Test MTS je kolorimetrijska metoda za utvrđivanje broja živih stanica. Temelji se na redukciji MTS tetrazolijeve soli [3-(4,5-dimetilltiazol-2-ill)-5-(3-carboksimetoksfenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij] u formazan pomoću staničnih dehidrogenaza koje koriste NADH ili NADPH kao kofaktor. Formazanski produkt je topljiv u staničnom mediju. Količina formazana se detektira mjerenjem absorbancije pri 490 nm (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay). U pločice je nasađen 20 000 stanica po jažici, u triplikatima. Za pokuse utjecaja nanočestica na stanice bez proteinske korone je dodan medij bez seruma (bez FBS-a), a za pokuse s proteinskom koronom medij sa serumom (10% FBS). Stanice su tretirane različitim koncentracijama nanočestica u triplikatima (PVP AgNP i PLL AgNP: 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62 ppm. AOT AgNP: 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 ppm). Za pozitivnu kontrolu je korišten triton X-100 (1% otopina) (Sigma Aldrich, USA), a za negativnu kontrolu ultračista vodu jednakog volumena kao volumen nanočestica za tretman stanica. Nakon 24 sata inkubacije pri 37°C, 5% CO_2, stanice su isprane 4x s PBS-om (1%), zatim sam dodan MTS reagens (CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent). Stanice su inkubirane 2 sata (37°C, 5% CO_2) te je izmjerena absorbancija pri 490 nm na čitaču pločica (Victor™ plate reader (Perkin Elmer, MA, USA)).

3.5.2 Test Live/Dead na protočnom citometru

Stanice obilježene fluorescentim bojama mogu se analizirati protočnom citometrijom. Propidij jodid (PI) je fluorescentna boja koja interkalira između dušičnih baza DNA molekule. Stanična membrana živih stanica nije propusna za PI. Mrtve stanice imaju oštećenu membranu, pa PI ulazi u stanicu te se veže na DNA molekulu. Metoda bojanja stanica s PI omogućuje diskriminaciju živih i mrtvih stanica zbog čega se koristi u testovima stanične vijabilnosti. Ekscitacija PI je pri 488 nm, a emisija pri 617 nm. Test Live/Dead napravljen je prema protokolu proizvođača (RND systems, Minneapolis, USA). U pločicu s 12 jažica je nasađeno 75 000 stanica po jažici. Sljedeći dan su stanice tretirane različitim koncentracijama nanočestica u duplikatima (PLL AgNP i PVP AgNP: 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 ppm. AOT AgNP: 160, 80, 40, 20, 10, 5 ppm). U prvom eksperimentu su stanice tretirane nanočesticama u mediju sa serumom (10% FBS) za testiranje citotoksičnosti u uvjetima pri kojima nastaje proteinska korona oko nanočestica. U drugom eksperimentu je testirano isto, ali u uvjetima pri kojima ne dolazi do formiranja proteinske korone, tako da su stanice tretirane nanočesticama u mediju bez seruma (bez FBS). Stanice su se inkubirale 24 h. Sakupljen je supernatant s mrtvim stanicama u plastične epruvete. Jažice su isprane PBS-om (1%), tripsinizirane (Sigma Aldrich, USA) te su žive stanice sakupljene u epruvete zajedno s mrtvim stanicama. Uzorci su centrifugirani (1000 g, 5 min) te je uklonjen supernatant. Nespecifično vezanje boje je blokirano dodavanjem 2% otopine BSA u PBS-u. Nakon 15 minuta blokiranja, uzorci su centrifugirani (1000 g, 5 min), uklonjen je supernatant, te dodan propidij jodid (5 µM). Uzorci su analizirani na protočnom citometru Attune NxT (Attune, USA).

3.6 Određivanje oksidativnog stresa

3.6.1 Test Monoklorobiman

Monoklorobiman test je fluorescentna metoda za mjerenje oksidativnog stresa. Monoklorobiman ulazi u stanica i veže se u kompleks s glutationom koji fluorescira. Reakcija je katalizirana glutation-S-transferazom (GSH). Kvantifikacija GSH se mjeri pri pobudnoj svjetlosti od 380 nm i emitiranoj svjetlosti pri 460 nm (Kamencic i sur. 2000). U pločicu s 12 jažica je nasađeno 75 000 stanica po jažici. Sljedeći dan su stanice tretirane različitim koncentracijama nanočestica (PLL AgNP: 10, 5, 1 ppm; PVP AgNP i AOT AgNP 20 , 10, 5 ppm). Nakon inkubacije od 24 sata, stanice su sakupljene te sonificirame 90 sekundi u hladnom tris-EDTA puferu ([EDTA] = 2mM, [Tris-Cl] = 50 mM, [NaCl] = 150 mM Ph = 6). Uzorci su zatim centrifugirani (380g, 7 min) . Supernatanti su sakupljeni u nove tubice te ponovno centrifugirani (14 000g, 1 min). Supernatanti su dodani u pločicu s 96 jažica. Dodan je monoklorobiman (20 µM) (Sigma Aldrich, USA) te su uzorci inkubirani 20 minuta u mraku. Fluorescencija je mjerena na čitaču pločica (Victor™ plate reader, Perkin Elmer, MA, USA).

3.6.2 Test Dikloro-dihidro-fluorescein diacetat (DCFH-DA)

DCFH-DA je metoda mjerenja oksidativnog stresa. Temelji se na oksidaciji 2', 7' diklorofluoresceina (DCFH) putem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). DCFH-DA je diacetat koji ulazi u stanicu gdje se događa cijepanje lipofilnih skupina pomoću nespecifičnih esteraza (Griffiths i sur. 2011). Nastali produkt ne fluorescira. U daljnjoj reakciji sa staničnim ROS-ovima dolazi do oksidacije u fluorescentni produkt 2', 7'- diklorofluorescin (DCF). Pobudna svjetlost je pri 450 nm, a emisijska pri 520 nm. Intenzitet emitirane svjetlosti je proporcionalan količini ROS–a u stanici. (Vinković Vrček i sur. 2015). U pločicu s 12 jažica je nasađeno 75 000 stanica po jažici. Sljedeći dan su stanice tretirane različitim koncentracijama nanočestica u duplikatima (PLL AgNP i PVP AgNP: 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25 ppm. AOT AgNP: 160, 80, 40, 20, 10, 5 ppm). U prvom eksperimentu su stanice tretirane nanočesticama u mediju sa serumom (10% FBS) za testiranje citotoksičnosti u uvjetima pri kojima nastaje proteinska korona oko nanočestica. U drugom eksperimentu je testirano isto, ali u uvjetima pri kojima ne dolazi do formiranja proteinske korone, tako da su stanice tretirane nanočesticama u mediju bez seruma (bez FBS). Stanice su se inkubirale 24 h. Sakupljen je supernatant s mrtvim stanicama u plastične epruvete. Jažice su isprane PBS-om (1%), tripsinizirane (Sigma Aldrich, USA) te su žive stanice sakupljene u epruvete zajedno s mrtvim stanicama. Uzorci su centrifugirani (1000 g, 5 min) te je uklonjen supernatant. Nespecifično vezanje boje je blokirano dodavanjem 2% otopine BSA u PBS-u. Nakon 15 minuta blokiranja, uzorci su centrifugirani (1000 g, 5 min), uklonjen je supernatant te je dodana DCF boja (10 µM). Uzorci su analizirani na protočnom citometru Attune NxT (Attune, USA).

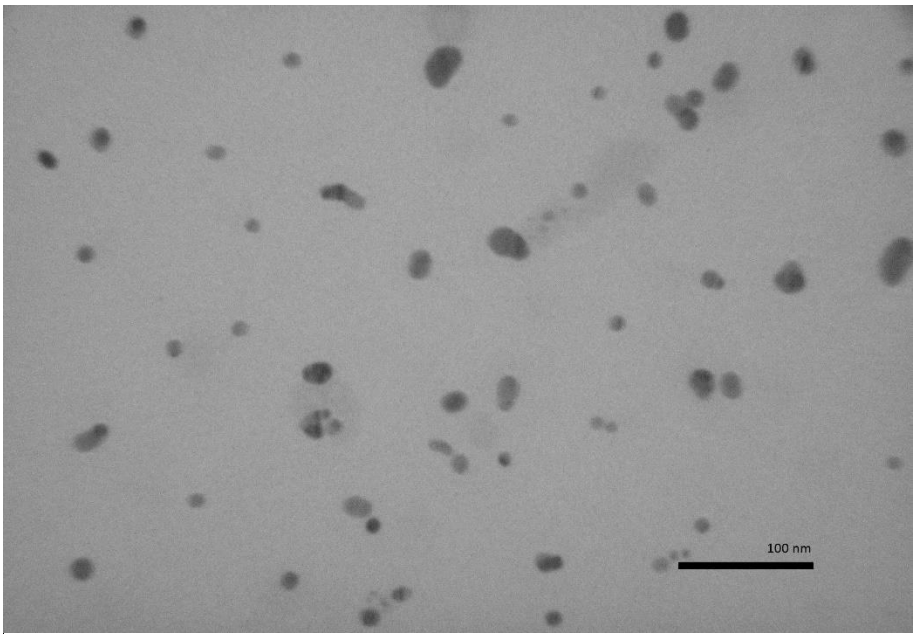
3.7 Grafički prikaz i statistička obrada rezlutata

Grafički prikaz rezultata je napravljen u Microsoft Excelu (Microsoft Office Professional Plus 2016). Statistička obrada podataka je napravljena pomoću GraphPad Prism 6.01 i Statistica version 13, koristeći Kruskal-Wallis one way ANOVA test i Mann-Whitney U test.

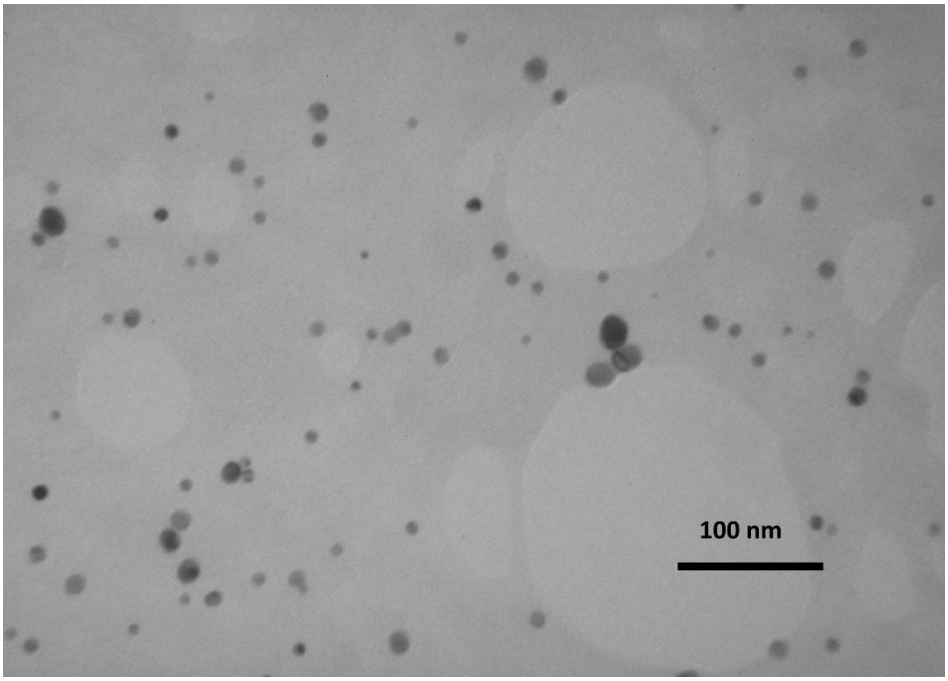
4. Rezultati

4.1 Karakterizacija i određivanje stabilnosti nanočestica

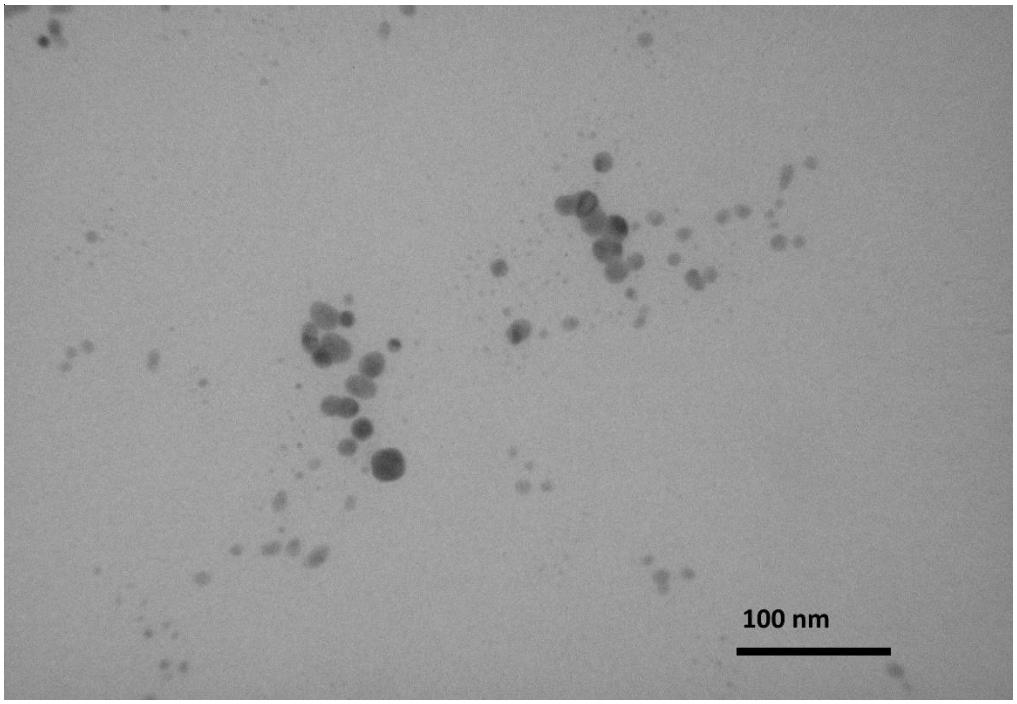
Nanočestice su sferičnog oblika, a veličina procijenjena promatranjem pod mikroskopom slaže se s mjerenjima veličine metodom DLS.



Slika 1. Izgled AOT AgNP određen transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM). AOT AgNP: nanočestice srebra stabilizirane natrijevim bis (2-etilheksil)-sulfosukcinatom



Slika 2. Izgled PVP AgNP određen transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM). PVP AgNP: nanočestice srebra stabilizirane polivinilipirilodon



Slika 3. Izgled PLL AgNP određen transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM). PLL AgNP: nanočestice srebra stabilizirane poli-*L*-lizinom

Vrijednosti hidrodinamičkog polumjera su mjerene u tri različita medija (Tablica 4). U ultračistoj vodi PVPAgNP i AOTAgNP pokazuju bimodalnu distribuciju, dok su PLLAgNP karakterizirane monomodalnom raspodjelom veličina. U staničnom mediju (DMEM) se događa značajna aglomeracija koju dodatak proteina smanjuje stabilizacijom nanočestica i stvaranjem proteinske korone.

Tablica 4. Vrijednosti hidrodinamičkog polumjera (nm) i volumna distribucija (%) triju vrsta srebrnih nanočestica mjerena u različitim medijima nakon inkubacije od 24 sata

Vrsta AgNP	Hidrodinamički polumjer (nm) i volumna distribucija nanočestica (%) u medijima		
	UPW	**DMEM**	**DMEM + BSA**
AOT AgNP	2,7 ± 0,9 (97%) 15,2 ± 5,3 (3%)	101,1 ± 10,2 (8 %) 753,8 ± 148,2 (92%)	46,9 ± 5,6 (89 %) 140,4 ± 10,6 (11 %)
PVP AgNP	4,9 ± 0,6 (98 %) 31,6 ± 3,5(2 %)	388 ± 90,2 (100%)	59,7 ± 11,2 (62 %) 82,8 ± 20,3 (38 %)
PLL AgNP	3,8 ± 0,4(100 %)	472,9 ± 54,5 (72,3%)	90,7 ± 3,2 (44 %) 211,8 ± 11,3 (56 %)

AgNP: srebrne nanočestice , AOT: natrijev bis(2-etilheksil)-sulfosukcinat, PLL: poli-*L*-lizin, PVP: polivinilipirilodon ,UPW: ultračista voda, DMEM: Dulbecco's modified eagle's medium, BSA: goveđi serumski albumin

Takva svojstva AgNP potvrđeno je i određivanjem ζ potencijala (Tablica 5) koje je jasno pokazalo da naboj stabilizirajućeg spoja određuje i površinski naboj AgNP, pa su AOT AgNP negativno, a PLL AgNP pozitivno nabijene. PVP AgNP su blago negativne zbog BH_4^- iona preostalih nakon sinteze. Elektrostatska stabilizacija se postiže pri apsolutnoj vrijednosti većoj od 30 mV^2 (Dhawan i Sharma 2010). PVP je neutralno nabijen omotač, stabilizacija nanočestica ovim omotačem je uzrokovana steričkim efektom (El-Nour i sur. 2010), a PLL i AOT omogućuju elektrostatsku stabilizaciju. U staničnom mediju (DMEM), se apsolutna vrijednost ζ potencijala smanjuje što destabilizira AgNP, dok vezanja proteina omogućuje stabilizaciju iako vrijednost površinskog naboja nije izraženo pozitivna ili negativna. Naime, AgNP u prisustvu proteina poprimaju vrijednost ζ potencijala koja je karakteristična za albumin.

Tablica 5. Zeta (ζ) potencijal (mV^2) triju vrsta srebrnih nanočestica u različitim medijima nakon 24 h inkubacije mjeren metodom ELS (elektroforetsko raspršenje svjetlosti)

Vrsta AgNP	Zeta potencijal nanočestica u UPW, DMEM i DMEM+BSA (mV^2)		
	UPW	**DMEM**	**DMEM + BSA**
AOT AgNP	-30,7 ± 4,9	-22,9 ± 1,1	-9,9 ± 1,0
PVP AgNP	-16,7 ± 0,1	-17,3 ± 0,6	-10,8 ± 1,6
PLL AgNP	37,5 ± 0,4	23,3 ± 1,5	-8,7 ± 0,4

AgNP: srebrne nanočestice , AOT: natrijev bis(2-etilheksil)-sulfosukcinat, PLL: poli-*L*-lizin, PVP: polivinilipirilodon ,UPW: ultračista voda, DMEM: Dulbecco's modified eagle's medium, BSA: goveđi serumski albumin

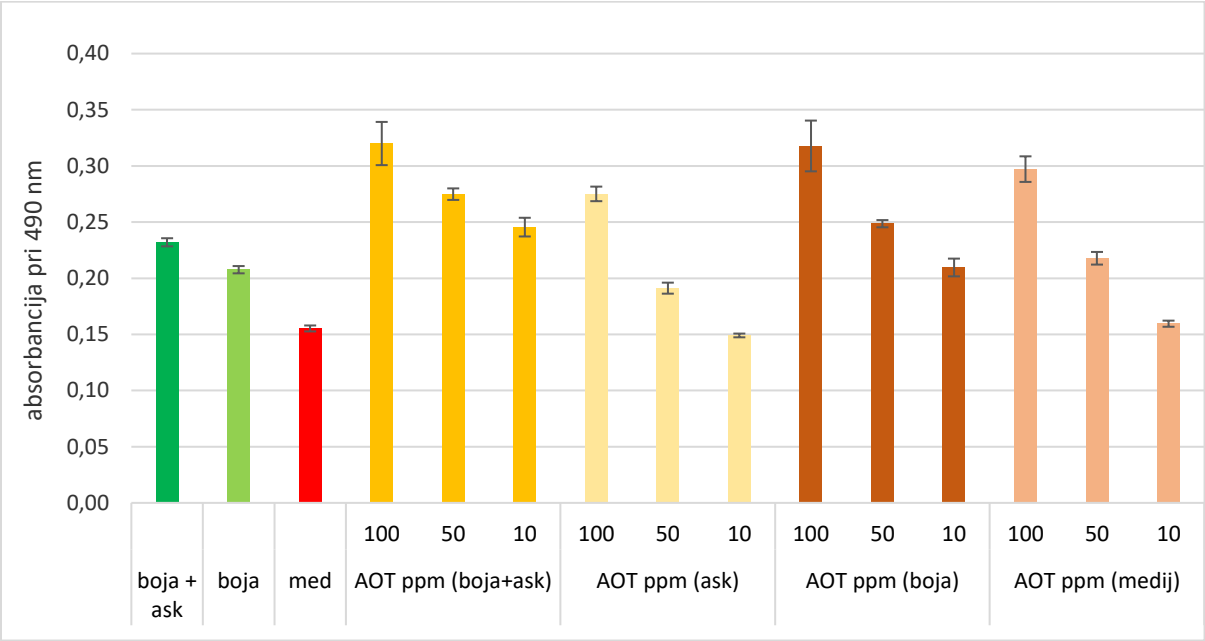
Podaci dobiveni metodom AAS (Tablica 6) i izraženi u obliku postotka otpuštenih iona u odnosu na standard pokazuju da sva tri tipa AgNP imaju nizak postotak otpuštanja Ag^+ iona u staničnom mediju sa i bez seruma, što ukazuje na njihovu stabilnost pri fiziološkim uvjetima.

Tablica 6. Količina otpuštenih Ag^+ (%) iona u različitim medijima nakon inkubacije od 24 sata u ultračistoj vodi (UV), staničnom mediju (DMEM) i staničnom mediju s goveđim serumskim albuminom (DMEM + BSA)

Vrsta AgNP	Količina otpuštenih Ag^+ iona u UPW, DMEM i DMEM+BSA (%)		
	UV	**DMEM**	**DMEM + BSA**
AOT AgNP	4,34	0,52	0
PVP AgNP	5,20	0	0
PLL AgNP	20,96	5,43	0

4.2 Odabir metode za određivanje vijabilnosti stanica

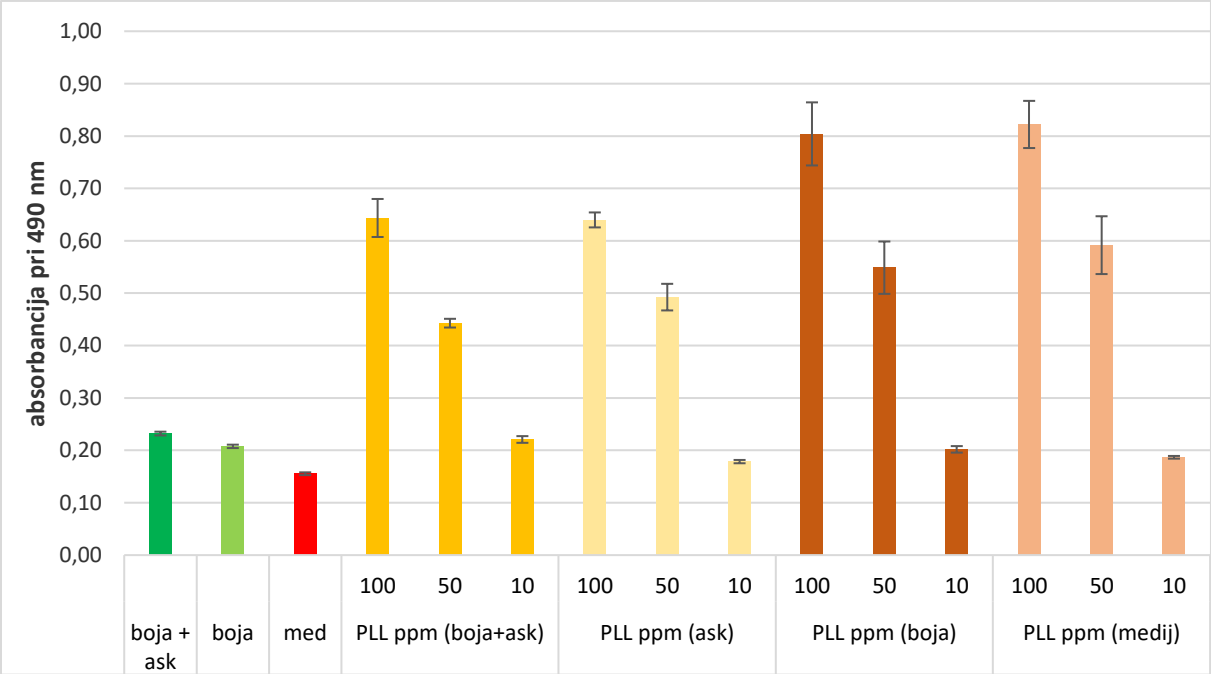
U svrhu postizanja jasnih rezultata, istražene su moguće interferencije AgNP s testovima vijabilnosti MTS i veličine oksidativnog stresa DCFH-DA. Statistička značajnost je izračunata korištenjem Mann-Whitney U testa.



Slika 4. Interferencija AOT AgNP s testom MTS. Testiran je utjecaj tri koncentracije nanočestica s dodatkom askorbinske kiseline (Ask) za aktivaciju boje, i bez askorbata. Za kontrole su korišteni aktivirana (boja + Ask) i neaktivirnana boja (boja) bez dodanih nanočestica. Test je napravljen u triplikatima. Absorbancija je mjerena pri 490 nm. AOT: natrijev bis(2-etilheksil)-sulfosukcinat

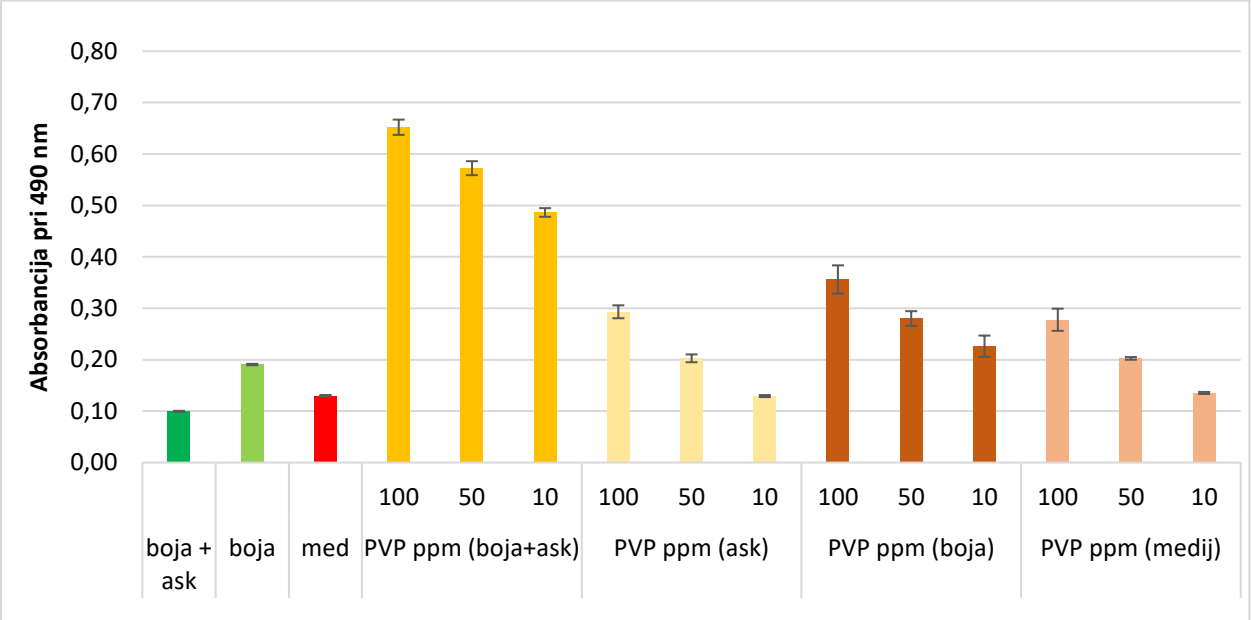
Interferencije su testirane s MTS reagensom i bez MTS reagensa, s dodatkom askorbinske kiseline za redukciju MTS reagensa u formazanski produkt i bez askorbinske kiseline (Slika 4.). U pokusu bez askorbata, pokazane su interferencije nanočestica u uvjetima dodane MTS soli i bez dodatka MTS-a. Pri testiranju interferencija s dodanim MTS-om, pokazana je statistički značajna razlika u absorbanciji u usporedbi s kontrolom pri svim testiranim koncentracijama AOT AgNP ($p<0.05$). U pokusu bez dodatka MTS boje, pokazana je statistički značajna razlika na razini od 10 % pri sve tri testirane koncentracije. Nadalje, rezultati pokusa s askorbinskom kiselinom (aktivator boje), također pokazuju statističku značajnu razliku ($p<0.05$) na koncentracijama od 100 i 50 ppm u tretmanu s dodanom MTS bojom. Pri koncentraciji od 10 ppm postoji statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu na razini od 10 %. Rezultati pokusa bez boje pokazuju statistički značajnu razliku prema kontroli na razini od 10 %.

Interferencije nanočestica PLL AgNP su testirane pri jednakim uvjetima kao za AOT AgNP (Slika 5). U pokusu bez askorbata, rezultati pokazuju statistički značajnu razliku ($p<0.05$) pri koncentracijama od 50 i 100 ppm u pokusu s dodanom bojom MTS. Pri koncentraciji od 10 ppm također postoji statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu na razini od 10 %. Bez dodane MTS boje postoje interferencije pri svim testiranim koncentracijama na značajnosti od 10%. Pri simulaciji formazanskog produkta dodatkom askorbinske kiseline, također postoje interferencije u pokusu s dodatkom boje pri koncentracijama od 50 i 100 ppm ($p<0.05$). Statistički značajna razlika na razini od 10% je pokazana i na koncentraciji od 10 ppm te na svim testiranim koncentracijama u pokusu bez dodatka reagensa MTS.



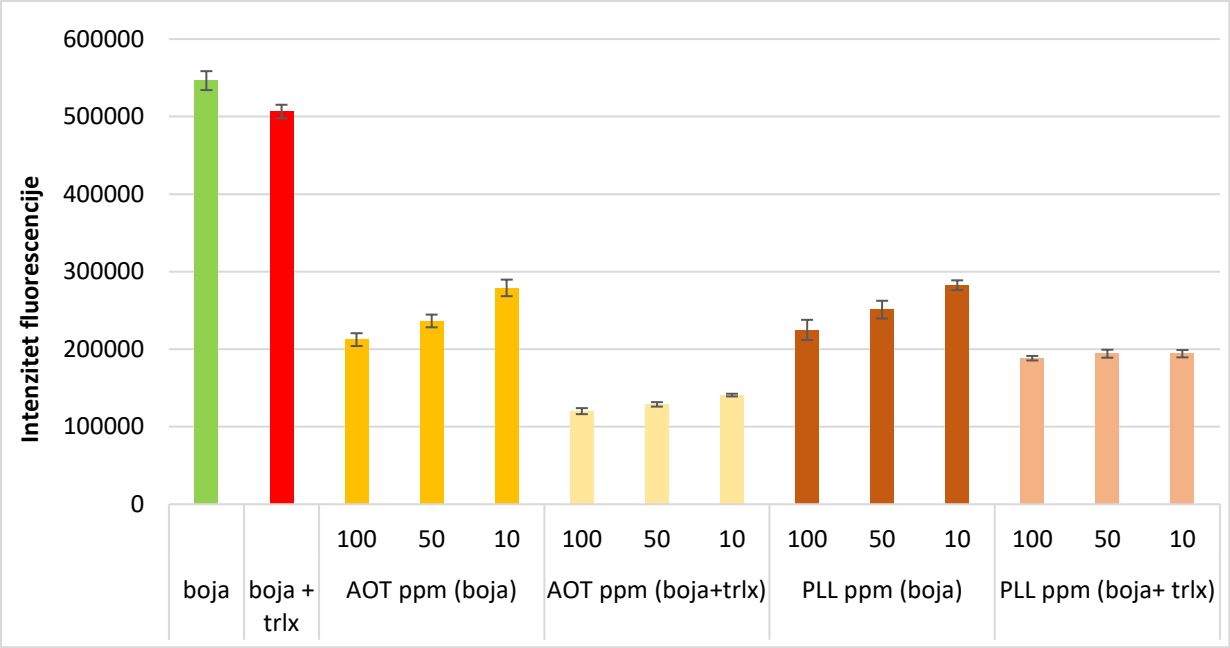
Slika 5. Interferencija nanočestica PLL AgNP s testom MTS. Testiran je utjecaj triju koncentracija nanočestica s dodatkom askorbinske kiseline (Ask) za aktivaciju boje, i bez askorbata. Za kontrole su korišteni aktivirana (boja + Ask) i neaktivirnana boja (boja) bez dodanih nanočestica. Test je napravljen u triplikatima. Absorbancija je mjerena pri 490 nm. PLL: poli-*L*-lizin

Rezultati interferencije nanočestica PVP AgNP s testom MTS su prikazani na slici 6. Interferencije nanočestica su testirane s MTS reagensom i bez MTS reagensa. U pokusu s dodanim MTS-om, nanočestice pokazuju interferencije pri svim testiranim koncentracijama na razini značajnosti od 10%. U pokusu bez MTS reagensa, značajne interferencije su pokazane na koncentraciji PVP AgNP od 100 i 50 ppm. Pri simulaciji redukcije MTS soli u formazanski produkt askorbinskom kiselinom, interferencije su također testirane s MTS bojom i bez MTS boje. U obje skupine pri svim testiranim koncentracijama je pokazana interferencija testa s nanočesticama ($p<0.05$).



Slika 6. Interferencija nanočestica PVP AgNP s testom MTS. Testiran je utjecaj triju koncentracija nanočestica s dodatkom askorbinske kiseline (Ask) za aktivaciju boje, i bez askorbata. Za kontrole su korišteni aktivirana (boja + Ask) i neaktivirana boja (boja) bez dodanih nanočestica. Test je napravljen u triplikatima. Absorbancija je mjerena pri 490 nm. PVP: polivinilipirilodon

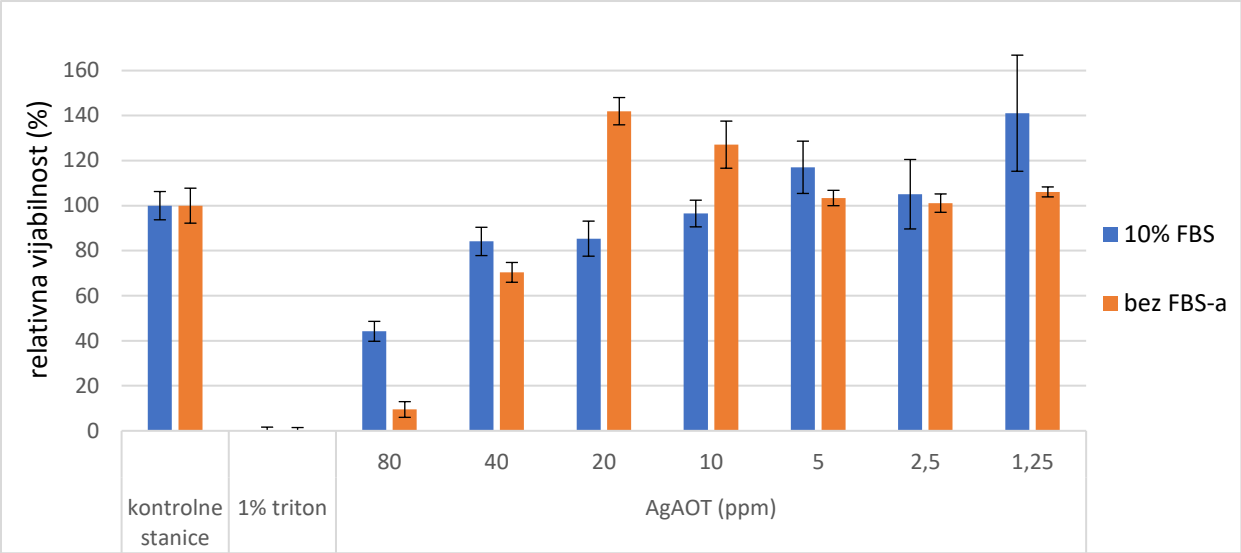
Rezultati interferencija AOT AgNP i PLL AgNP su prikazani na sllici 7. Interferencije su testirane DCF bojom bez aktivacije i s aktivatorom (Trolox, Sigma Aldrich, USA). Interferencije nanočestica s DCFH-DA esejom su pokazane pri svim koncentracijama u oba testirana uvjeta ($p<0.05$).



Slika 7. Interferencija nanočestica AOT AgNP i PLL AgNP s testom DCFH-DA. Tesiran je utjecaj triju koncentracija nanočestica s dodatkom troloxa (trlx) za aktivaciju boje, troloxa. Za kontrole su korišteni aktivirana (boja + trlx) i neaktivirnana boja (boja) bez dodanih nanočestica. Mjerenje, AOT: natrijev bis(2-etilheksil)-sulfosukcinat

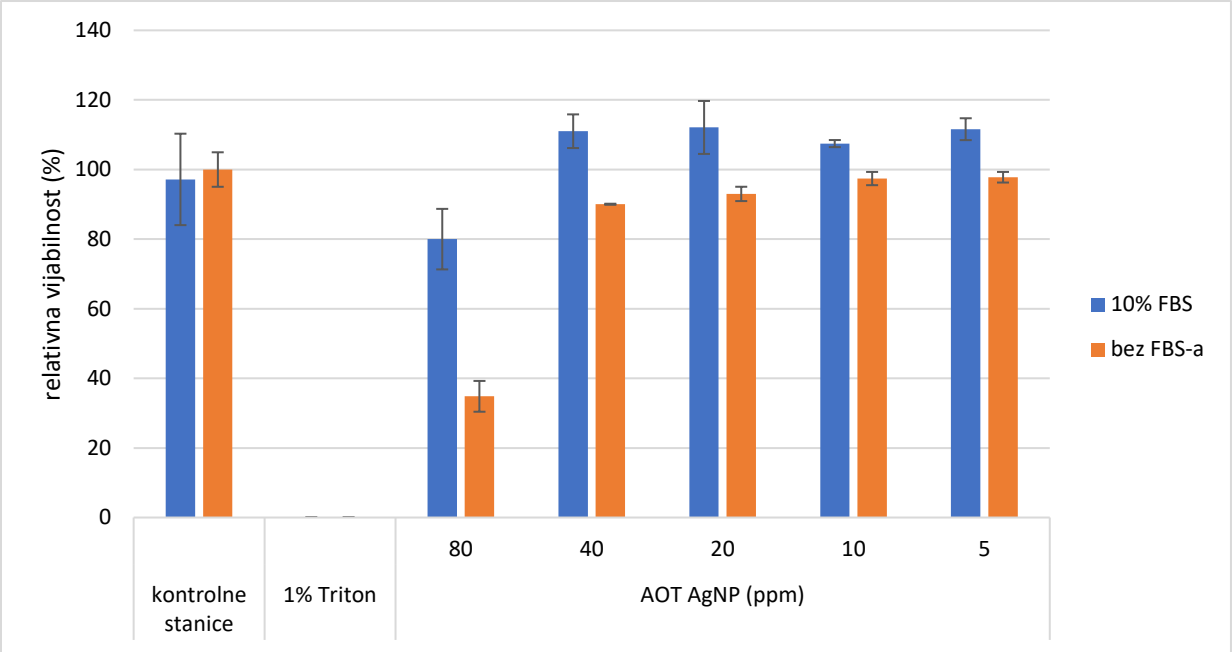
4.3 Rezultati vijabilnosti keratinocita dobiveni metodama MTS Live/Dead

Rezultati testa vijabilnosti MTS utjecaja nanočestica AOT AgNP na vijabilnost stanica HaCaT prikazani su na slici 8. Utjecaj nanočestica na vijabilnost je testiran pri uvjetima s s 10% FBS-om u staničnom mediju, 24 sata pri kojima nastaje proteinska korona oko nanočestica i bez FBS-a kada ne nastaje proteinska korona. Pri tretmanu s FBS-om, nije pokazana statistički značajna razlika u vijabilnosti između tretiranih stanica i netretiranih kontrolnih stanica pri testiranim koncentracijama. U tretmanu bez FBS-a u staničnom mediju, statistički značajna razlika u vijabilnosti je pokazana samo pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 80 ppm, u odnosu na netretiranu kontrolu ($p<0.05$). IC50 vrijednost je izračunata za AOT AgNP u tretmanu bez FBS-a iznosi 40.07 ppm. Za tretman s FBS-om, IC50 vrijednost nije izračunata budući da testirane koncentracije nisu bile toksične.



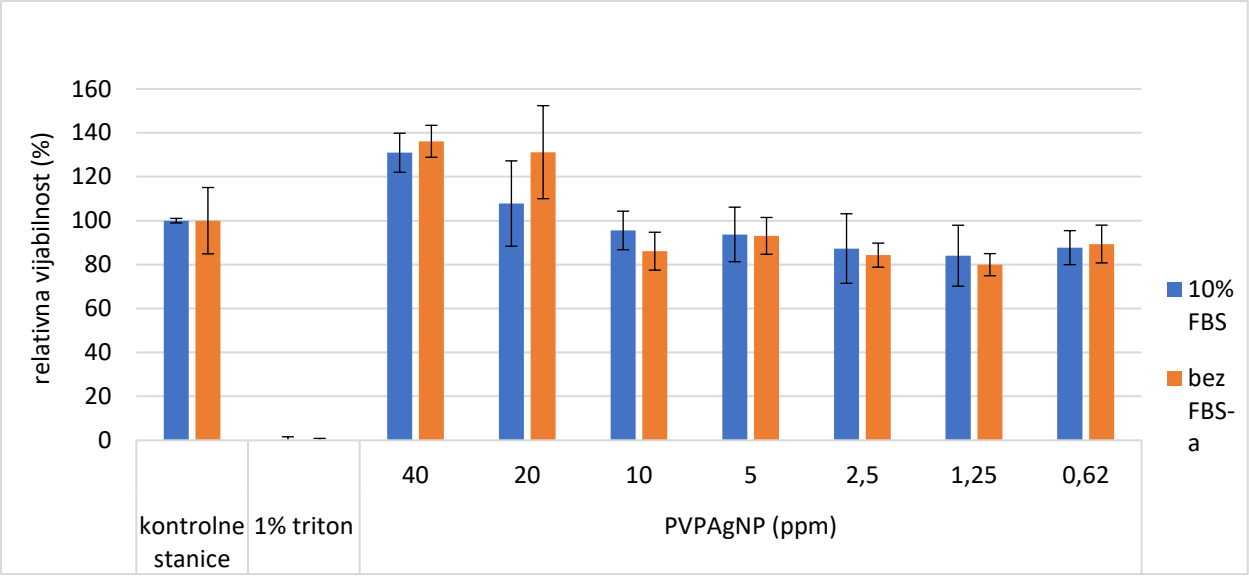
Slika 8. Stanična vijabilnosti ljudskih keratinocita određena testom MTS. Testirane su različite koncentracije nanočestica AOT AgNP u uvjetima nastanka proteinske korone (10% FBS) i bez proteinske korone (bez FBS-a). Stanice su nasađene u triplikatima, tretirane te inkubirane 24 sata. Za pozitivnu kontrolu je korištena otopina detergenta Triton (1%), a za negativnu kontrolu ultračista voda (UPW). Absorbancija je mjerena pri 490 nm. Relativna vijabilnost je prikazana kao omjer vijabilnosti tretiranih i netretiranih kontrolnih stanica.

Na protočnom citometru testirana je vijabilnost pri jednakim uvjetima kao u testu MTS (Slika 9). Statistički značajno smanjenje vijabilnosti ($p<0.05$) je pokazano pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 80 ppm, u tretmanu bez FBS-a u staničnom mediju.



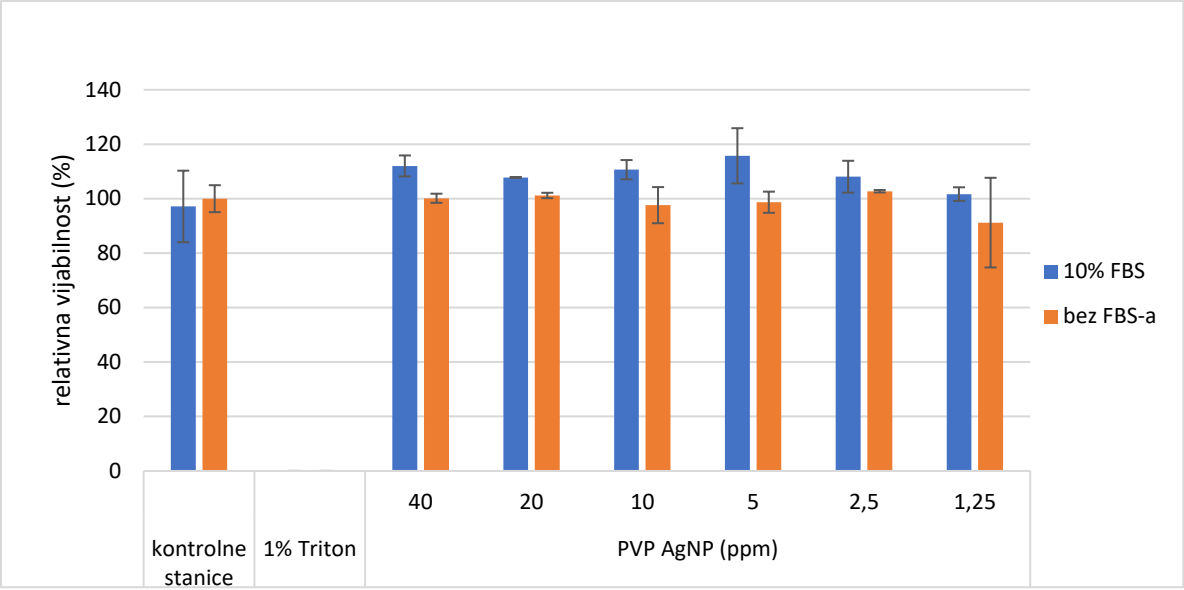
Slika 9. Vijabilnost ljudskih keratinocita, tretiranih različitim koncentracijama nanočestica AOT AgNP, određena protočnom citometrijom. Vijabilnost je testirana pri uvjetima nastanka proteinske korone (10% FBS) i bez proteinske korone (bez FBS-a). Stanice su nasađene u duplikatima, tretirane te inkubirane 24 sata. Za pozitivnu kontrolu je korištena otopina Triton detergenta (1%), a za negativnu kontrolu ultračista voda (UPW). Dodan je propidij jodid (5 µM) te su stanice analizirane pomoću protočnog citometra. Relativna vijabilnost je izračunata na osnovi usporedbe vijabilnosti između tretiranih i netretiranih kontrolnih stanica.

Utjecaj nanočestica PVP AgNP na vijabilnost ljudskih keratinocita je utvrđen testom MTS (Slika 10.). Utjecaj nanočestica je testiran pri uvjetima s dodatkom FBS-a u stanični medij i bez dodatka FBS-a. Podaci pokazuju da u tretmanu s FBS-om nema statistički značajne razlike u vijabilnosti između testiranih koncentracija PVP AgNP i kontrolnih stanica. U tretmanu bez FBS-a, postoji statistički značajna razlika pri koncentracijama od 20 i 40 ppm s obzirom na kontrolne stanice ($p<0.05$). Prividno povećanje vrijednosti vijabilnosti pri ovim koncentracijama je posljedica interferencija nanočestica s MTS testom (slika 6.)



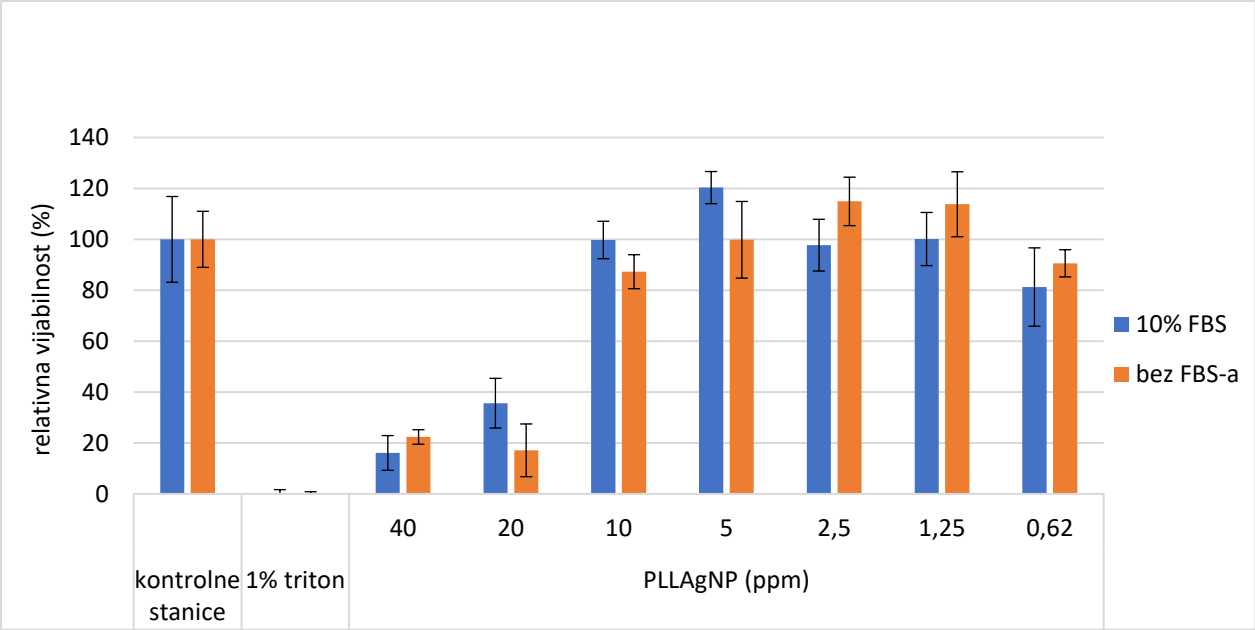
Slika 10. Stanična vijabilnosti ljudskih keratinocita određena testom MTS. Testirane su različite koncentracije nanočestica PVP AgNP u uvjetima nastanka proteinske korone (10% FBS) i bez proteinske korone (bez FBS-a). Stanice su nasađene u triplikatima, tretirane te inkubirane 24 sata. Za pozitivnu kontrolu je korištena otopina detergenta Triton (1%), a za negativnu kontrolu ultračista voda (UPW). Absorbancija je mjerena pri 490 nm. Relativna vijabilnost je prikazana kao omjer vijabilnosti tretiranih i kontrolnih stanica.

Vijabilnost stanica je testirana i metodom protočne citotometrije pri jednakim uvjetima kao u eseju MTS (Slika 11.). Pri testiranim koncentracijama u tretmanu s FBS-om i bez FBS-a u staničnom mediju, nema statistički značajne razlike u vijabilnosti između tretiranih i netretiranih stanica. PVP AgNP ne pokazuje citotoksičan učinak na stanice pri testiranim koncentracijama.

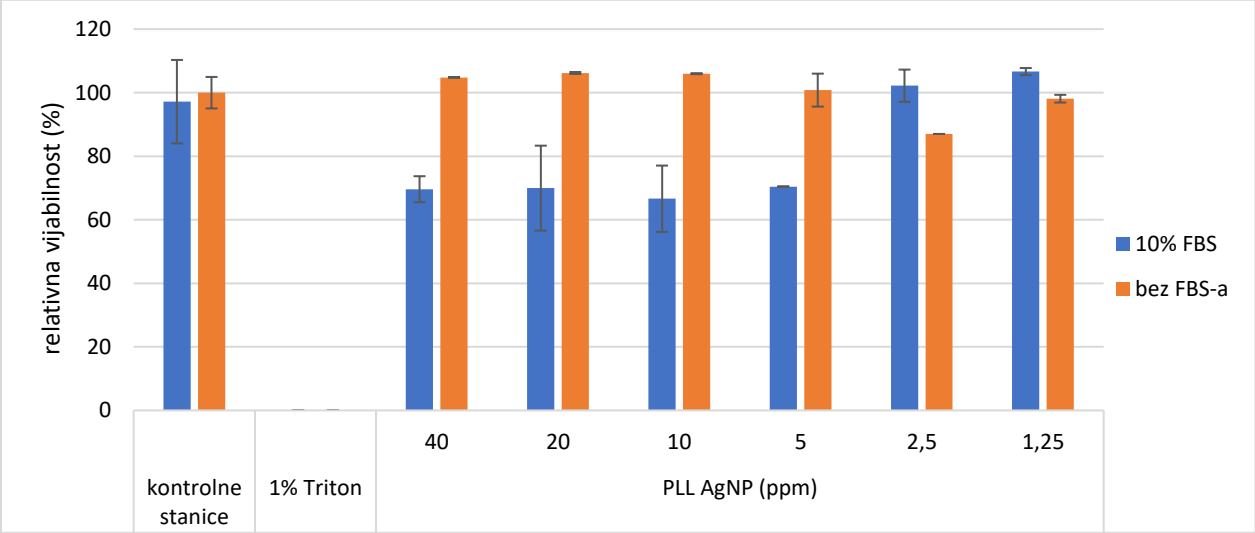


Slika 11. Vijabilnost ljudskih keratinocita, tretiranih različitim koncentracijama nanočestica PVP AgNP, određena protočnom citometrijom. Vijabilnost je testirana pri uvjetima nastanka proteinske korone (10% FBS) i bez proteinske korone (bez FBS-a). Stanice su nasađene u duplikatima, tretirane te inkubirane 24 sata. Za pozitivnu kontrolu je korištena otopina Triton detergenta (1%), a za negativnu kontrolu ultračista voda (UPW). Dodan je propidij jodid (5 µM), te su stanice analizirane pomoću protočnog citometra. Relativna vijabilnost je izračunata na osnovi usporedbe vijabilnosti između tretiranih i netretiranih kontrolnih stanica.

Rezultati MTS eseja stanične vijabilnosti nakon tretiranja stanica nanočesticama PLL AgNP prikazani su Slikom 12. U tretmanu s FBS-om u staničnom mediju postoji statistički značajna razlika u vijabilnosti između tretiranih i kontrolnih stanica pri koncetracijama od 20 i 40 ppm ($p<0.05$). IC50 iznosi 10.72 ppm. U tretmanu bez FBS-a u staničnom mediju, nema statistički značajne razlike između tretiranih i ne tretiranih stanica pri testiranim koncentracijama nanočestica.



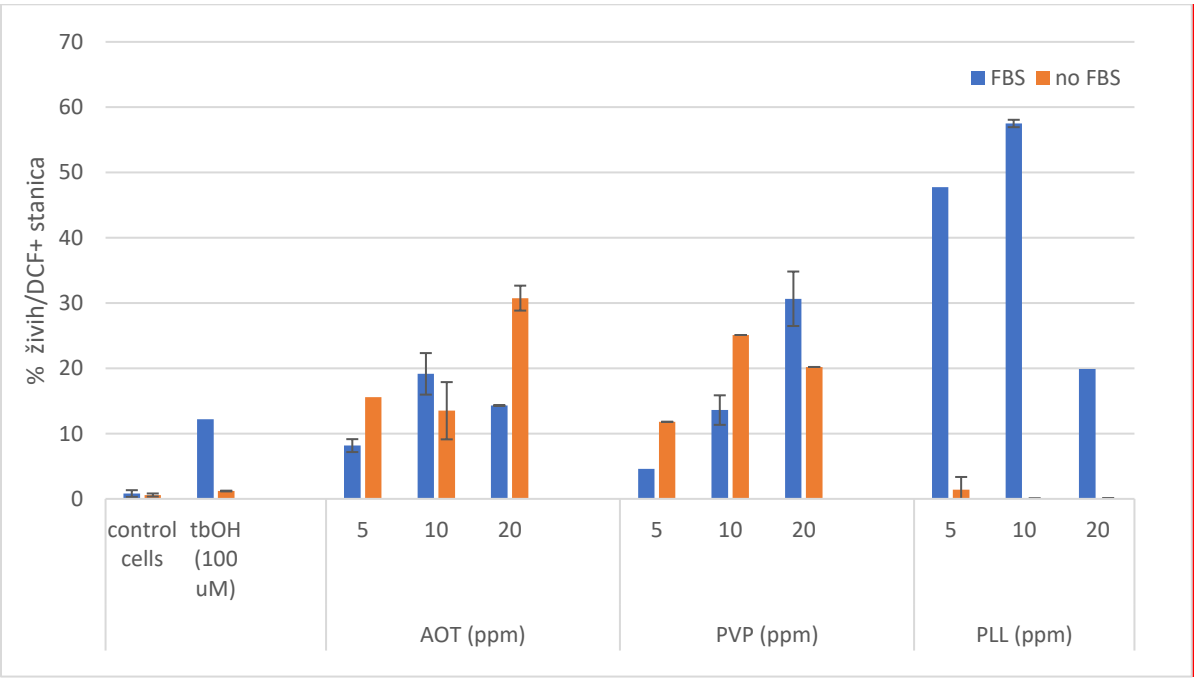
Slika 12. Stanična vijabilnosti ljudskih keratinocita određena testom MTS. Testirane su različite koncentracije nanočestica PLL AgNP u uvjetima nastanka proteinske korone (10% FBS) i bez proteinske korone (bez FBS-a). Stanice su nasađene u triplikatima, tretirane te inkubirane 24 sata. Za pozitivnu kontrolu je korištena otopina Triton detergenta (1%), a za negativnu kontrolu ultračista voda (UPW). Absorbancija je mjerena pri 490 nm. Relativna vijabilnost je prikazana kao omjer tretiranih i kontrolnih stanica.



Slika 13. Vijabilnost ljudskih keratinocita, tretiranih različitim koncentracijama nanočestica PLL AgNP, određena protočnom citometrijom. Vijabilnost je testirana pri uvjetima nastanka proteinske korone (10% FBS) i bez proteinske korone (bez FBS-a). Stanice su nasađene u duplikatima, tretirane te inkubirane 24 sata. Za pozitivnu kontrolu je korištena otopina Triton detergenta (1%), a za negativnu kontrolu ultračista voda (UPW). Dodan je propidij jodid (5 µM), te su stanice analizirane pomoću protočnog citometra. Relativna vijabilnost je prikazana kao omjer tretiranih i kontrolnih stanica.

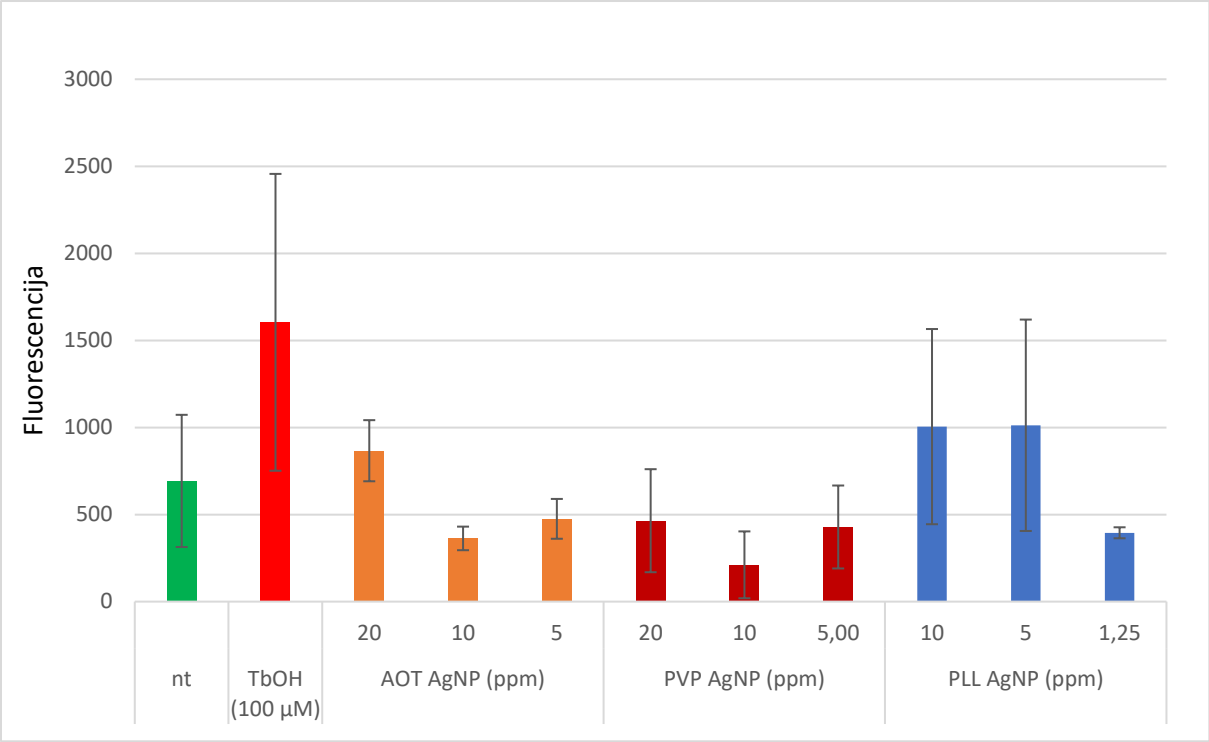
4.4 Utjecaj nanočestica na oksidativni stres ljudskih keratinocita

Istražena je pojava oksidativnog stresa na stanicama ljudskih keratinocita korištenjem DCFH-DA testa na protočnom citometru, pri uvjetima nastanka proteinske korone (DMEM+FBS) i bez proteinske korone (DMEM). Test DCFH-DA mjeri ukupne slobodne radikale u stanici. Rezultati testa DCFH-DA ne pokazuju indukciju oksidativnog stresa u ljudskih keratinocita pri testiranim koncentracijama nanočestica (AOT AgNP, PVP AgNP, PLL AgNP) (Slika 14.).



Slika 14. Oksidativni stres ljudskih keratinocita nakon tretmana različitim koncentracijama srebrnih nanočestica (AOT AgNP, PVP AgNP, PLL AgNP). Pojava oksidativnog stresa je testirana pri uvjetima nastanka proteinske korone (10 % FBS) i bez proteinske korone (bez FBS-a). Stanice su nasađivane u duplikatima, tretirane te inkubirane 24 sata. Za pozitivnu kontrolu je korištena otopina TbOH (100 µM) , a za negativnu kontrolu ultračista voda (UPW). Dodan je DCF reagens (10 µM) te su stanice analizirane pomoću protočnog citometra. Rezultati su prikazani kao postotak DCF+ stanica u odnosu na ukupan broj živih stanica.

Testom Monoklorobiman je mjerena ukupna količina glutationa u stanicama, nakon tretmana različitim koncentracijama nanočestica (AOT AgNP, PVP AgNP, PLL AgNP) koje se nisu pokazale citotoksičnima prema rezultatima testa MTS. Stanice su tretirane pri uvjetima nastanka proteinske korone oko nanočestica (DMEM + FBS). Rezultati monoklorobiman eseja ne pokazuju pojavu oksidativnog stresa nakon tretmana ljudskih keratinocita srebrnim nanočesticama (Slika 15) budući da se statistički nisu razlikovali od negativne kontrole.



Slika 15. Oksidativni stres ljudskih keratinocita nakon tretmana različitim koncentracijama srebrnih nanočestica (AOT AgNP, PVP AgNP, PLL AgNP). Pojava oksidativnog stresa je testirana pri uvjetima nastanka proteinske korone (10% FBS). Mjerena je promjena količine ukupnog glutationa (GSH) testom monoklorobiman. Stanice su nasađivane u duplikatima, tretirane te inkubirane 24 sata. Za pozitivnu kontrolu je korištena otopina TbOH (100 µM), a za negativnu kontrolu ultračista voda (nt). Stanice su sonificirane, dodan je monoklorobiman reagens (20 µM) te je mjeren intenzitet fluorescencije na čitaču pločica. Nt: netretirane stanice.

5. Rasprava

Karakterizacija nanočestica i testiranje njihove stabilnosti prvi je korak u istraživanjima *in vitro.* Karakteristike nanočestica u različitim medijima i uvjetima može utjecati na interakcije nanočestica sa stanicama. Radi točne interpretacije rezultata testova *in vitro*, ključna je karakterizacija, procjena stabilnosti i interferencija nanočestica s testovima *in vitro*. Nakon sinteze, izgled i veličina nanočestica su promatrani pod TEM-om. Metodom DLS je mjeren hidrodinamčki polumjer kao mjera veličine, a metodom ELS je mjeren zeta potencijal, odnosno površinski naboj kao mjera stabilnosti nanočestica. PVP AgNP pokazuju bimodalnu distribuciju veličine u vodi, dok u staničnom mediju sa i bez serumskog albumina imaju unimodalnu distribuciju volumena. Vrijednosti rH u staničnom mediju bez i s albuminom je veći u odnosu na rH u UPW. Nanočestice vežu različite kemijske vrste na svoju površinu u staničnom mediju (aminokiseline, vitamine, šećere), dok u mediju s albuminom stvaraju dodatne interakcije s navedenim proteinom. Vrijednosti zeta (ζ) potencijala PVP AgNP je negativan što je vjerojatno uzrokovano zaostalim anionima, koji nisu ušli u reakciju pri sintezi nanočestica. Stabilizacija nanočestica PVP omotačem je steričke prirode, a ne elektrostatske. Elektrostatska stabilizacija nanočestica je pri vrijednosti zeta potencijalu većem od ± 30 mV^2. PLL je pozitivno nabijen omotač te je stabilizacija postignuta elektrostatskim efektom. Zeta potencijal PLL AgNP-a u ultra čistoj vodi je veći od 30 mV^2 , što ukazuje na stabilnost PLL AgNP u ovom mediju. U staničnom mediju zeta potencijal se smanjuje, dok u staničnom mediju s albuminom dobiva negativan predznak, što ukazuje na smanjenu stabilnost nanočestice u ovim medijima. Smanjena vrijednost površinskog naboja se može objasniti interakcijom nanočestica s različitim nabijenim kemijskim vrstama u staničnom mediju. Stanični medij ima veću ionsku jakost od UPW što može maskirati površinski naboj nanočestica. U staničnom mediju je prosječni hidrodinamički volumen veći u odnosu na vodu za sva tri tipa nanočestica. Nanočestice u različitim medijima mogu biti nestabilne. Stabilnost nanočestica je testirana u staničnom mediju bez serumskih proteina (DMEM) i u staničnom mediju s albuminom (DMEM + BSA). Količina otpuštenih Ag+ iona u staničnom mediju je mjerena AAS- om nakon ultrafiltracije kako bi se odvojile nanočestice od Ag+ iona. Rezultati niske postotke otpuštenih Ag+ iona što pokazuje da su nanočestice inkubirane u staničnom mediju bez i s BSA stabilne.

Poznato je da nanočestice srebra interferiraju s testovima *in vitro* (Vinković Vrček i sur. 2015). Prije pokusa na stanicama napravili smo procjenu interferencija srebrnih nanočesticama veličine 50 nm metodama *in vitro* koje su se zatim koristile za stanične pokuse. Sva tri tipa testiranih nanočestica pokazuju interferenciju s esejom MTS. Vrijednosti absorbancije su značajno različite u pokusu s dodanim MTS reagensom i bez MTS reagensa u odnosu na kontrolu, iz čega se može zaključiti da nanočestice interferiraju s bojom, ali i sa svjetlošću kod MTS testa. Interferencije nanočestica s testom DCFH-DA su pokazane pri svim koncentracijama. Dolazi do smanjivanja signala fluorescencije zbog interferencija srebrnih nanočestica s ovom metodom. S obzirom na ove rezultate kod MTS eseja je modificiran protokol tako da su nanočestice nakon tretmana ispirane 4x PBS-om da bi se uklonile, prije očitavanja absorbancije na čitaču pločica. Stanična vijabilnost je dodatno istražena na protočnom citometru gdje ne dolazi do problema interferencija budući da se nanočestice

mogu razlikovati od stanica prema veličini. DCFH-DA esej oksidativnog stresa je također napravljen na protočnom citometru zbog problema s interferencijama.

Vijabilnost ljudskih keratinocita je testirana testom MTS te testom Live/Dead uz analizu protočnim citometrom. Vijabilnost je testirana pri uvjetima nastanka proteinske korone oko nanočestica i pri uvjetima kada ne dolazi do nastanka proteinske korone. Za AOT Ag NP nije pokazana statistički značajna razlika pri uvjetima s proteinskom koronom s obzirom na netretirane kontrolne stanice. Pri uvjetima bez korone, pokazana je statistički značajna razlika u vijabilnosti s obzirom na kontrolne stanice pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 80 ppm. Rezultati MTS eseja i protočne citometrije su usporedivi. Moguće je da proteinska korona utječe na agregaciju ovog tipa srebrnih nanočestica, što ima za posljedicu smanjenu citotoksičnost pri višim koncentracijama (Moore i sur. 2015.). Rezultati pokusa na PVP AgNP ukazuju da ovaj tip nanočestica nije toksičan za ljudske keratinocite pri koncentracijama testiranim u ovom radu. U oba tretmana, s FBS-om (prisutnost proteinske korone) i bez FBS-a (bez proteinske korone) nema statističke značajne razlike u vijabilnosti između tretiranih i kontrolnih stanica, što se slaže s rezultatima koji su dobili Holmes i sur. 2016. Treći tip testiranih srebrnih nanočestica - PLL AgNP pokazuje veću citotoksičnost pri uvjetima nastanka proteinske korone, nego pri uvjetima bez korone. Značajno smanjena vijabilnost stanica je utvrđena pri 20 i 40 ppm na MTS eseju stanične vijabilnosti. Pri tretmanu bez FBS-a nije pronađena značajna razlika u vijabilnosti između tretiranih i kontrolnih stanica. Rezultati protočne citometrije također pokazuju veću citotosičnost u uvjetima s FBS-om i usporedivi su s rezultatima MTS eseja. Proteinska korona vjerojatno utječe na agregaciju ovog tipa nanočestica, što moguće dovodi do povećanog ulaska nanočestica u stanicu i samim time povećane citotoksičnosti. Da bi se bolje istražio mehanizam citotoksičnosti, potrebno je napraviti istraživanja agregacije PLL AgNP u uvjetima pri kojima nastaje korona, zatim istraživanja unosa i lokalizacije nanočestica u stanici. Pokazano je da proteinska korona modulira stopu agregacije nanočestica, no teško je predvidjeti na koji način i koliko ima utjecaj na citotoksičnost nanočestica. Vjerojatno je utjecaj proteinske korone specifičan za agregaciju različitih tipova nanočestica, te samim time i na njihovu citotoksičnost (Moore i sur. 2015).

Test DCFH-DA mjeri ukupne slobodne radikale u stanici. Kod stanica koje su pod oksidativnim stresom povećana je koncentracija slobodnih radikala. Očekivali smo povećanje koncentracije ukupnih slobodnih radikala pri koncentracijama nanočestica koje nisu citotoksične (Ahlberg i sur. 2016). Međutim takav trend nije pokazan. Ahlberg i suradnici su 2016. pokazali povećanje oksidativnog stresa ovisno o koncentraciji nanočestica (*dose dependent response*) u ljudskih keratinocita nakon inkubacije od 1 sata. Preduga inkubacija nakon tretmana stanica nanočesticama (24 h) je mogući uzrok što nisam uspio dokazati oksidativni stres. Odgovor stanice u obliku staničnog stresa vjerojatno se događa u kraćem vremenskom periodu, te je nakon 24 h odgovor stanice u obliku staničnog stresa prošao. Zanette i suradnici su 2011. pokazali da DCFH-DA većinski boja peroksidne radikale, moguće je da u HaCaT staničnoj liniji ljudskih keratinocita pri oksidativnom stresu ne dolazi do povećanja koncentracije specifično ovog radikala, što dovodi do negativnih rezultata pri mjerenju staničnog stresa ovom metodom. Nadalje, antiproliferativni odgovor stanica HaCaT može biti neovisan o indukciji staničnog stresa. Budući da ljudski keratinociti imaju visoku ekspresiju katalaze, moguće je da

zbog protektivne uloge enzima, nije došlo do indukcije oksidativnog stresa pri tretmanu s nanočesticama (Zannete i sur. 2011).

Monoklorobiman esej mjeri koncentraciju glutationa (GSH) u stanici. Pri stanju oksidativnog stresa dolazi do povećanja koncentracije GSH kako bi se održala normalna koncentracija slobodnih radikala u stanici, ili dolazi do smanjenja GSH u reakcijama neutralizacije slobodnih radikala (Singh i sur, 2016). Rezultati testa monoklorobiman ne pokazuju promjenu u koncentraciji GSH što ukazuje da nije došlo do obimnog oksidativnog stresa. Rezultati testa monoklorobiman se slažu s rezultatima testa DCFH-DA u kojem također nema dokaza o indukciji oksidativnog stresa. Kao i kod testa DCFH-DA, moguće je da je vrijeme inkubacije od 24 sata nakon tretmana stanica nanočesticama predugo, te je odgovor stanice u obliku oksidativnog stresa završio.

6. Zaključak

1. Karakterizacijom je utvrđeno da su nanočestice AOT AgNP, PLL AgNP i PVP AgNP stabilne u vodenoj otopini te su smanjene stabilnosti u staničnom mediju s dodatkom albumina goveđeg seruma
2. Sve tri vrste srebrnih nanočestica veličine 50 nm pokazuju interferencije s testovima vijabilnosti MTS i oksidativnog stresa DCFH-DA
3. Nanočestice PVP Ag NP ne pokazuju citotoksičan utjecaj na ljudske keratinocite, dok nanočestice AOT AgNP pri 80 ppm i PLL AgNP pri koncentracijama od 5 ppm na više pokazuju citotoksičan efekt
4. Nije pokazan odgovor stanica na tretman nanočesticama srebra u obliku oksidativnog stresa

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti da su neke od nanočestice testiranih u ovom radu pokazale utjecaj na vijabilnost ljudskih keratinocita te da njihova potencijalna primjena može imati negativan utjecaj na biološke sustave. Odgovor stanica na tretman nanočesticama u obliku oksidativnog stresa nije dokazan.

7. Literatura

Adlakha-Hutcheon G., Khaydarov R., Korenstein R., Varma R., Vaseashta A., Stamm H., Abdel-Mottaleb M. (2009): Nanomaterials: Risks and Benefits. Nanomaterials, Nanotechnology. U: NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. Springer, Dordrecht str. 195-207

Ahlberg S., Rancana F., Eppleb M., Lozab K., Höppea D., Lademanna J., Vogta A., Kleuserc B., Gereckec C., Meinkea M. C. (2016): Comparison of different methods to study effects of silver nanoparticles on the pro- and antioxidant status of human keratinocytes and fibroblasts. Methods **109**: 55-63.

Atomic absorption spectrometry RSC leaflet, Piccadilly, London

Beduneau A., Ma Z., Grotepas C.B., Kabanov A., Rabinow B.E., Gong N., Mosley R. L., Dou H., Michael D. Boska M. D., Gendelman H. E. (2009): Facilitated monocyte-macrophage uptake and tissue distribution of superparmagnetic iron-oxide nanoparticles. PLoS One **4**: 4343.

Boukamp P., Petrussevska R. T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N. E. (1988): Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line. J. Cell Biol. **106**: 761-771.

Buzea C., Ivan. I. Pacheco Blandino I. I. P., Robbie K. (2007): Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. Biointerphases **2**: 17 – 172.

Capek I. (2004): Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions. Adv. Colloid Interface Sci. **110**: 49–74.

Cheng X., Tian X., Wu A., Li J., Tian J., Chong Y., Chai Z., Zhao Y., Chen C., Ge C. (2015): Protein Corona Influences Cellular Uptake of Gold Nanoparticles by Phagocytic and Nonphagocytic Cells in a Size-Dependent Manner. Appl. Mater. Interfaces **7**: 20568–20575.

Clift M. J. D., Bhattacharjee S., Brown D. M., Stone V. (2010) The effects of serum on the toxicity of manufactured nanoparticles. Toxicol. Lett. **198**: 358–365.

Clogston J. D., A. K. Patri A. K. (2010): zeta potential measurement. U: Scott E. McNeil. Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery, Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media. str. 63-70

Deng Z. J., Mingtao Liang M., Monteiro M., Toth I., Minchin R. F. (2011) Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. Nat. Nanotechnol. **6**: 39-44.

Dhawan A., Sharma V. (2010): Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. Anal. Bioanal. Chem. **398**: 589–605.

El-Nour K.M.M. A., Eftaiha A., Al-Warthan A., Ammar R. A. A. (2010): Synthesis and applications of silver nanoparticles. Arab. J. Chem **3**: 135–140.

EPA, 2007. Nanotechnology White Paper. U.S. Environmental Protectionn Agency Report, Washington DC 20460, USA. EPA 100/B-07/001.

Frattini A., Pellegri N., Nicastro D., Sanctis O. D. (2005): Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes. Mater. Chem. Phys. **94**: 148–152.

Gatoo M. A., Naseem S., Arfat M. Y., Dar A. M., Qasim K., Swaleha Zubair S. (2014): Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations. BioMed Res. Int. **2014**: 1-8.

Gondikas A. P., Morris A., Reinsch B. C., M. Marinakos S. M., Lowry G. V., Hsu-Kim H. (2012): Cysteine-Induced Modifications of Zero-valent Silver Nanomaterials: Implications for Particle Surface Chemistry, Aggregation, Dissolution, and Silver Speciation. Environ. Sci. Technol. **46**: 7037−7045.

Griffiths S. M., Singh N., Jenkins G. J. S., Williams P. M., Orbaek A. W., Barron A. R., Wright C. J., Doak S. H. (2011): Dextran Coated Ultrafine Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Compatibility with Common Fluorometric and Colorimetric Dyes Anal. Chem. **83**: 3778–3785.

Guadagnini R., Halamoda Kenzaoui B., Walker L., Pojana G., Magdolenova Z., Bilanicova D., Saunders M., Juillerat- Jeanneret L., Marcomini A., Huk A., Dusinska M., Fjellsbø L. M., Marano F., Boland S. (2015): Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. Nanotoxicology **9**: 13–24.

Halliwell B., Gutteridge J. M. (1999): Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford.

Height M. J. (2011): Nanosilver in Perspective - Health Risk Assessment of Nanosilver. Federal Institute for Risk Assessment (BfR) - Berlin Marienfelde.

Holmes A. H., Lim J., Studier H., Roberts M. S. (2016): Varying the morphology of silver nanoparticles results in differential toxicity against microorganisms, HaCaT keratinocytes and affects skin deposition. Nanotoxicology **10**: 1-41.

Horie M., Kato H., Fujita K., Endoh S., Iwahashi H. (2012): In Vitro Evaluation of Cellular Response Induced by Manufactured Nanoparticles. Chem. Res. Toxicol. **25**: 605−619.

Hsiao I. L., Hsieh Y. K., Wang C. F., Chen I. C., Huang Y. H. (2015): Trojan-horse Mechanism in the Cellular Uptake of Silver Nanoparticles Verified by Direct Intra- and Extracellular Silver Speciation Analysis. Environ. Sci. Technol. **6**: 3813-21.

Kamencic H., Lyon A., Paterson P. G., Juurlink B. H. J. (2000): Monochlorobimane Fluorometric Method to Measure Tissue Glutathione. Anal. Biochem **286**: 35–37.

Khanna P., Ong C., Bay B., Baeg G. (2015): Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. Nanomaterials **5**: 1163–1180.

Kittler S., Greulich C., Diendorf J., Koller M., Epple M. (2010): Toxicity of Silver Nanoparticles Increases during Storage Because of Slow Dissolution under Release of Silver Ions. Chem. Mater. **22**: 4548–4554.

Klaine S. J., Koelmans A. A., Horne N. (2012): Paradigms to Assess the Environmental Impact of Manufactured Nanomaterials. Environ. Toxicol. Chem. **31**: 3-14

Liu J., Deborah M. Aruguete D. M., Jinschek J. R., Rimstidt J. D., Hochella Jr. M. F. (2008): The non-oxidative dissolution of galena nanocrystals: Insights into mineral dissolution rates as a function of grain size, shape, and aggregation state. Geochim. Cosmochim. Acta **72**: 5984–5996.

Lynch I., Cedervall T., Lundqvist M., Cabaleiro-Lago C., Linse S., Dawson K. A. (2007): The nanoparticle-protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. Adv. Colloid Interface Sci. **134–135**: 167–174.

Mahmood M., Casciano D. A., Mocan T., Iancu C., Xu Y., Mocan L., Iancu D. T., Dervishi E., Li Z. R., Abdalmuhsen M., Biris A. R, Ali N., Howard P., Biris A.S. (2010): Cytotoxicity and biological effects of functional nanomaterials delivered to various cell lines. J. Appl. Toxicol. **30**: 74–83.

Medina C., Santos-Martinez M.J., Radomski A., Corrigan O. I., Radomski M.W. (2007): Nanoparticles: Pharmacological and toxicological significance. Br. J. Pharmacol. **150**: 552–558.

Milić M., Leitingerb G., Pavičić I., Zebić Avdičević M., Dobrović S., Goesslere W., Vinković Vrček I. (2015): Cellular uptake and toxicity effects of silver nanoparticles in mammalian kidney cells. J. Appl. Toxicol. **35**: 581-592.

Misra S. K., Dybowska A., Berhanu D., Luoma S. N, Valsami-Jones E. (2012): The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. Sci. Total Environ. **438**: 225-239

Monopoli M. P., Walczyk D., Campbell A., Elia G., Lynch I, Bombelli F. B., Kenneth A. Dawson K. A. (2011): Physical-Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to in Vitro and in Vivo Biological Impacts of Nanoparticles. J. Am. Chem. Soc. **133**: 2525–2534.

Monteiro-Riviere N. A., Inman A. O., Zhang L. W. (2009): Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. Toxicol. Appl. Pharmacol. **234:** 222–235.

Moore T. L., Rodriguez-Lorenzo L., Hirsch V., Balog S., Urban D., Jud C.,Rothen-Rutishauser B.,Lattuada M., Petri-Fink A. (2015): Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. Chem. Soc. Rev. **44**: 6287.

Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. (2006): Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. Science **311**: 622-627

Nowack B., Bucheli T. D. (2007): Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. Environ. Pollut. **150:** 5-22.

Pareek V., Bhargava A., Bhanot V., Gupta R., Jain N., Panwar J. (2018): Formation and Characterization of Protein Corona Around Nanoparticles: A Review. J. Nanosci. **18**: 6653–6670.

Savolainen K., Alenius H., Norppa H., Pylkkänen L., Tuomi T., Kasper G. (2010): Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies—A review. Toxicology **269:** 92-104

Singh R., Karakoti A.S., Self W.T., Seal S., Singh S. (2016): Redox-Sensitive Cerium Oxide Nanoparticles Protect Human Keratinocytes from Oxidative Stress Induced by Glutathione Depletion. Langmuir. **32**(46), 12202-12211

Su C. F., Merlitz H., Rabbel H., Sommer J. U. (2017): Nanoparticles of Various Degrees of Hydrophobicity Interacting with Lipid Membranes. J. Phys. Chem. Lett. **8**: 4069−4076.

Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Mark T.D. Cronin m. T. D., Mazura M., Telser J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease Int. J. Biochem. Cell Biol. **39**: 44-84.

Varner K. E., El-Badawy A., Feldhake D., Venkatapathy R. (2010) State-Of-The-Science Review: Everything NanoSilver and More. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. EPA/600/R-10/084.

Vinković Vrček I., Pavičić I., Crnković T., Jurašin D., Babič M., Horák D., Lovrić M., Ferhatović L., Ćurlin M., Gajović S. (2015): Does surface coating of metallic nanoparticles modulate their interference with in vitro assays? RSC Adv. **5**: 70787

Vinković Vrček I., Žuntar I., Petlevski R., Pavičić I., Dutour Sikirić M., Ćurlin M., Goessler W. (2014): Comparison of In Vitro Toxicity of Silver Ions and Silver Nanoparticles on Human Hepatoma Cells. Environ Toxicol

Wu Z., Zhang B., Yan B. (2009): Regulation of Enzyme Activity through Interactions with Nanoparticles Int. J. Mol. Sci. **10**: 4198-4209.

Xia T., Kovochich M., Liong M., Mädler L., Gilbert B., Shi H., Yeh J. I., Zink J. I., Nel A. E. (2008): Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. ACS Nano **2**: 2121–2134.

Xiao G. G., Wang M., Li N., Loo J. A., Nel A.E. (2003): Use of proteomics to demonstrate a hierarchical oxidative stress response to diesel exhaust particle chemicals in a macrophage cell line. **278**: 50781–50790.

Xiu Z. M., Zhang Q. B., Puppala H. L., Colvin V. L., Alvarez P. J. J. (2012): Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles. Nano Lett. **12**: 4271−4275.

Zanette C., Pelin M., Crosera M. , Adami G., Bovenzi M., Larese F. F., Florio C. (2011): Silver nanoparticles exert a long-lasting antiproliferative effect on human keratinocyte HaCaT cell line. Toxicol. In Vitro **25**: 1053–1060.

Zhang X. F., Shen W., Gurunathan S. (2016): Silver Nanoparticle-Mediated Cellular Responses in Various Cell Lines: An in Vitro Model. Int. J. Mol. Sci. **17**: 1603.

Web izvori:

https://www.thermofisher.com/hr/en/home.html, pristupljeno 30.11.2018

https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-analysis-cell-viability-using-propidium-iodide, pristupljeno 30.11.2018

https://www.rndsystems.com/resources/protocols/flow-cytometry-protocol-analysis-cell-viability-using-propidium-iodide, pristupljeno 30.11.2018.

8. Životopis

Rođen sam u Našicama. Završio sam II. gimnaziju u Osijeku. Preddiplomski studij Biologije na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera na Odjelu za biologiju sam završio 2016. godine te upisao diplomski studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, na Biološkom odsjeku. U tijeku studija sam radio stručnu praksu na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada i Institutu Ruđer Bošković. Sudjelovao sam na stručnim radionicama, konferencijama te studentskom simpoziju. Hobiji su mi putovanja i tjelovježba.