

# Utjecaj polistirenskih i srebrnih nanočestica na vijabilnost i oksidativni stres modelnih staničnih linija Jurkat, HepG2

---

Hubak, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:217:045746>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Ana Hubak

**UTJECAJ POLISTIRENSKIH I SREBRNIH NANOČESTICA NA VIJABILNOST I  
OKSIDATIVNI STRES MODELNIH STANIČNIH LINIJA Jurkat, HepG2**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen u Jedinici za dozimetriju zračenja i radiobiologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Ivana Pavičića i suvoditeljstvom dr. sc. Sandre Radić-Brkanac, izv. prof. s Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre Ekologije i zaštite prirode (mag. oecol. et prot. nat.).

*Zahvaljujem se svom mentoru dr. sc. Ivanu Pavičić, s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, koji me je usmjeravao te mi pomogao u izradi ovog diplomskog rada. Također se neizmjereno zahvaljujem Krunoslavu Ilić koji mi je svakodnevno pomagao oko istraživanja i izrade ovog rada uz silno strpljenje i pažljivost.*

*Htjela bih se zahvaliti svojoj suvoditeljici diplomskog rada, izv. prof. dr. sc. Sandri Radić Brkanac na izuzetnoj susretljivosti, pažnji i trudu oko mene te inzistiranju da ovaj rad poprimi profesionalne crte.*

*Zahvaljujem se i svojim roditeljima na svemu što su mi pružili i naučili me tijekom školovanja.*

*Posebno hvala mom Miranu koji me je pogurao onda kada sam mislila da ne mogu dalje. Njegov zagrljaj i riječi utjehe zlata vrijede.*

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

**UTJECAJ POLISTIRENSKIH I SREBRNIH NANOČESTICA NA VIJABILNOST I OKSIDATIVNI STRES  
MODELNIH STANIČNIH LINIJA Jurkat, HepG2**

Ana Hubak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Jurkat stanična linija je besmrtna stanična linija T-limfocita koja je izvorno dobivena iz periferne krvi četrnaestogodišnjaka oboljelog od akutne limfoblastične leukemije, a HepG2 stanična linija je epitelna stanična linija koja je dobivena iz jetre hepatocelularnog karcinoma petnaestogodišnjeg dječaka. Obje stanične linije korištene su kao modelne stanične linije za ispitivanje toksičnosti nanočestica polistirena i srebra koje su bile stabilizirane različitim omotačima. Osim određivanja preživljavanja staničnih linija nakon tretmana s nanočesticama srebra i polistirena, mjerili smo i razine biomarkera oksidativnog stresa primjenom fluorescentnih proba diklorodihidrofluorescein diacetata i monoklorobimana. Rezultati dobiveni metodom Live/Dead na protočnom citometru pokazuju da se kombinirani tretman nanočestica na Jurkat staničnoj liniji pokazao citotoksičnijim od pojedinačnih tretmana s istim koncentracijama nanočestica. Dobiveni rezultati također pokazuju da je Jurkat stanična linija osjetljivija od HepG2 stanične linije. Nakon tretmana nanočesticama srebra i polistirena mjereno je ukupno sadržaja glutationa (GSH) i reaktivnih kisikovih vrsta u staničnim linijama Jurkat i HepG2 te nije dokazana pojava oksidativnog stresa.

(35 stranica, 14 slika, 3 tablica, 51 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: nanočestice srebra, polistirenske nanočestice, polistiren, vijabilnost, oksidativni stres, Jurkat, HepG2

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

Suvoditelj: izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

Ocjenitelji:

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

### **THE IMPACT OF POLYSTYRENE AND SILVER NANOPARTICLES ON THE VIABILITY AND OXIDATIVE STRESS OF Jurkat AND HepG2 CELL LINES**

Ana Hubak

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Jurkat cell lines are immortalized T-lymphocytes first derived from the peripheral blood of a child suffering from leukemia. HepG2 cell line is an immortalized cell line of human liver carcinoma cells, derived from the liver tissue of child suffering from hepatocellular carcinoma. In this research, we used cell lines as a test organism to assess toxicity of polystyrene and silver nanoparticles stabilized with different biomolecules. Besides determining the survival of cell lines after the treatment with polystyrene and silver nanoparticles we, also measured levels of oxidative stress biomarkers by using fluorescent probes dichloro-dihydro-fluorescein diacetate and monochlorobimane. Results with Live/Dead flow cytometry tests demonstrated that combined treatment of Jurkat cells with both PVPAgNP and PSNPs has proven to be more cytotoxic than individual treatments with the same nanoparticle concentrations. Obtained results also show that Jurkat cell line proved to be more sensitive than the HepG2 cell line. Oxidative stress response in cells was detected by measuring total amount of reactive oxygen species and glutathione. PVPAgNP and PSNP did not trigger oxidative in Jurkat and HepG2 cell lines.

(35 pages, 14 figures, 3 tables, 51 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: silver nanoparticles, polystyrene nanoparticles, polystyrene, viability, oxidative stress, Jurkat, HepG2

Supervisor: dr. sc. Ivan Pavičić, Senior research associate

Co-supervisor: izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

Reviewers:

## **Popis kratica i simbola**

A/A – Antibiotik/antimikotik

AgNP - srebrne nanočestice

DCFH - diklorofluorescein

DMEM - Dulbecco's modified eagle's medium

DLS – dinamičko raspršenje svjetlosti

ELS – elektroforetsko raspršenje svjetlosti

FBS – serum goveđeg fetusa

GSH - glutation

GSSG - reducirani glutation

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 dinukleotid

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

PBS – puferirana otopina fosfatnih soli

PI - Propidij jodid

ppb – broj čestica na bilijun (od eng. parts per billion)

ppm – broj čestica na milijun (od eng. parts per million)

PSNP – polistirenske nanočestice

PVP – polivinilpirolidon

ROS - reaktivne kisikove vrste

TEM - transmisijski elektronski mikroskop

UPW – ultračista voda

# Sadržaj

1.	UVOD .....	1
1.1.	Nanotehnologija .....	1
1.2.	Nanočestice .....	1
1.2.1.	Nanočestice srebra .....	2
1.2.2.	Nanočestice polistirena.....	4
1.3.	Istraživanja nanočestica .....	4
1.4.	Oksidativni stres.....	6
1.5.	Stanične linije.....	7
1.6.	Metode sinteze nanočestica.....	7
1.7.	Dinamičko raspršenje svjetlosti.....	8
1.8.	Elektroforetsko raspršenje svjetlosti .....	8
1.9.	Induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom .....	9
2.	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	10
3.	MATERIJALI I METODE.....	11
3.1.	Određivanje karakteristika PVPAgNP i PSNP.....	11
3.2.	Određivanje interferencije nanočestica.....	11
3.3.	Određivanje stanične vijabilnosti .....	12
3.3.1.	Test citotoksičnosti .....	12
3.3.2.	Test Live/Dead na protočnom citometru.....	13
3.4.	Određivanje oksidativnog stresa .....	14
3.4.1.	Test Monoklorobiman.....	14
3.4.2.	Test Dikloro-dihidro-fluorescein diacetat .....	15
3.5.	Grafički prikaz i statistička obrada rezultata .....	16
4.	Rezultati .....	17
4.1.	Karakterizacija i određivanje stabilnosti nanočestica.....	17
4.2.	Stanična vijabilnost Jurkat i HepG2 staničnih linija .....	18
4.3.	Utjecaj nanočestica na oksidativni stres staničnih linija HepG2 i Jurkat .....	21
5.	Rasprava.....	26
6.	Zaključak .....	29



7. Literatura .....	30
8. Životopis.....	35

# 1. UVOD

## 1.1. Nanotehnologija

Nanotehnologija je grana tehnologije koja se bavi proučavanjem svojstva materije na nanoskali, odnosno cilj joj je istraživanje i primjena funkcionalnih materijala, struktura i uređaja nanometarskih dimenzija manjih od 100 nm (Seetharam i sur. 2007). Ova grana tehnologije počela se promovirati još 1990-ih godina iako se tada nije upotrebljavao stvarni izraz, no prvi i najveći program istraživanja i razvoja nanotehnologije koji ju izričito promiče pokrenula je američka vlada 2000. godine (Klaine i sur. 2012). U razdoblju od 2000. do 2007. godine više od 60 zemalja u svijetu uspostavilo je razne programe istraživanja i razvoja nanotehnologije (Roco, 2007).

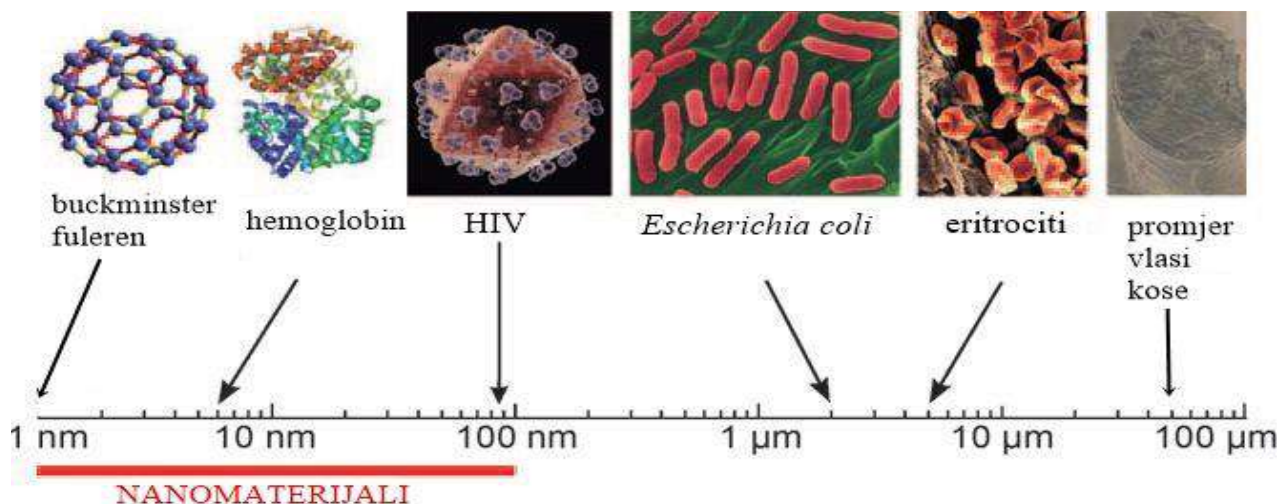
U posljednje vrijeme, nanotehnologija doživjela je veliku popularnost te se danas svakodnevno primjenjuje i to posebice u medicini i industriji. Najbolji primjeri prisutnosti nanomaterijala su: nanomaterijali prisutni u pakiranjima za hranu (Klaine i sur. 2012), nanočestice titanovog dioksida u kremama za sunčanje (Vance i sur. 2015), nanomaterijali kao katalizatori u industrijskim procesima, nanomaterijali u filtraciji i pročišćavanju vode i brojni drugi (Nowack i sur. 2007). Obzirom da nanomaterijali imaju jedinstvene fizikalno – kemijske, električne, magnetske, mehaničke i biološke karakteristike (Lanje i sur. 2010), omogućena im je raznolika primjena pa se zbog toga koriste u raznim granama industrije kao što su kozmetika, prehrambena industrija, poljoprivreda, elektronika itd. (Vance i sur. 2015). Zbog sve veće proizvodnje nanočestica nije moguće isključiti njihovu interakciju s biološkim sustavima i njihov unos u okoliš. Sve navedene činjenice ukazuju kako je vrlo važno provoditi brojna istraživanja toksikoloških utjecaja raznih nanočestica, procjene i sigurnosti njihovih rizika za ljudsko i životinjsko zdravlje, ali i za okoliš (Nowack i sur. 2007).

## 1.2. Nanočestice

Nanomaterijali su često opisani kao prirodni, slučajni ili proizvedeni materijali, koji sadržavaju čestice u nevezanom, agregiranom ili aglomeriranom stanju, ali u njima 50% ili više čestica, u jednolikoj veličinskoj raspodjeli, ima jednu ili više vanjskih dimenzija u rasponu od 1 do 100 nm (Bondarenko i sur. 2013). Zbog svoje izrazito male veličine, nanočestice pripadaju u ultrafine čestice i mogu prodrijeti na mjesta gdje veće čestice ne mogu. Svojstva koja karakteriziraju nanočestice vidljive su iz omjera površine i volumena, a među njih se ubrajaju visoka reaktivnost, dobra katalitička svojstva, u odnosu na materijal koji nije u nano obliku, te sklonost aglomeraciji

(Lanje i sur. 2010). Površina nanočestica služi kao indirektna mjera veličine čestica te za lakše shvaćanje nanodimenzija *Slika 1.* prikazuje odnose veličina poznatih tvari u odnosu na veličinu nanomaterijala. Što se oblika tiče, mogu biti pravilnog (sferičnog, tubularnog, oblika prizme itd.) ili nepravilnog, a grubo se prema nastanku mogu podijeliti na tri vrste:

1. Prirodne – nastale bez utjecaja čovjeka (vulkanska prašina)
2. Antropogene – nastale indirektno čovjekovim djelovanjem na okoliš (čađa izgaranjem fosilnih goriva)
3. Sintetizirane – nastale s posebnom svrhom, dizajnirane i stvorene umjetno.



*Slika 1.* Skala veličina poznatih materijala u odnosu na veličinu nanomaterijala (preuzeto i prilagođeno iz Feldmann i Goesmann, 2010).

### 1.2.1. Nanočestice srebra

Nanočestice srebra (AgNP, od *eng. silver nanoparticles*) poznate su po svojim karakteristikama: kemijska stabilnost, električna i optička vodljivost, katalitička i biocidna aktivnost (Frattini i sur. 2005), a upravo ta svojstva se pripisuju njihovim velikim mogućnostima primjene u nanobiotehničkim istraživanjima (Firdhouse i Lalitha, 2015). Zbog navedenih svojstava, nanočestice srebra se često uvrštavaju u jedne od najviše korištenih nanočestica u potrošačkim proizvodima i medicinskoj primjeni (Ulm i sur. 2015). Neki od primjera gdje se nanočestice srebra u medicini koriste su: ortopedija – aditivi u cementima za kost, očna njega – prevlake na kontaktnim lećama, kardiologija – premazivanje katetera za praćenje, anesteziologija – premazivanje maski za disanje (Varner i sur. 2010), dok se u tekstilnoj industriji srebrne

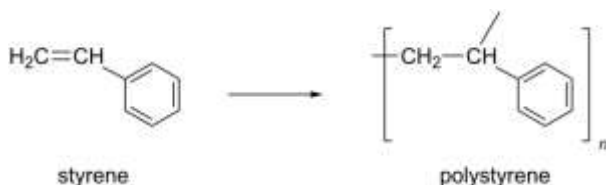
nanočestice koriste kao higijensko sredstvo koje služi za uklanjanje neugodnih mirisa i sprječavanje nastanka bakterija (Nowack i sur. 2007).

Zbog svoje raznovrsne primjene, srebrne nanočestice, dospijevaju u okoliš putem otpadnih voda, iz raznih industrijskih postrojenja ili odlagališta otpada. Također, zbog sve veće primjene proizvoda koji sadrže srebrne nanočestice i posljedično nakupljanja srebra u okolišu, upitan je njihov utjecaj na zdravlje ljudi i kvalitetu okoliša (Nowack i sur. 2007). Upravo navedene činjenice govore kako je potrebno prikupiti relevantne podatke koji upućuju na konkretne i točne informacije vezane uz koncentraciju nanosrebra u okolišu. Često se još uvijek većina istraživanja vezana uz nanosrebro provodi na raznim bakterijama, od kojih je najpoznatija *Escherichia coli*, ali ne zbog procjene rizika, nego zbog antibakterijskog svojstva nanočestica srebra (Blinova i sur. 2013).

Sve veće nakupljanje nanočestica u okolišu potaknulo je brojne znanstvenike za ispitivanje raznih mehanizama njihove toksičnosti. Znanstvena literatura pokazuje da nanočestice srebra mogu izazivati genotoksičnost, poticati kontroliranu staničnu smrt, oksidativni stres na stanicama zato što zbog nagle ili prevelike potrošnje kisika u stanicama nastaju slobodni radikali koje nazivamo i reaktivnim kisikovim vrstama. Takve reaktivne kisikove vrste imaju barem jedan nespareni elektron u svojoj vanjskoj ljusci, te su vrlo štetni zbog toga što imaju mogućnost reagiranja s makromolekulama, kao što je DNK i time izazvati štetne promjene u njihovoj strukturi, ali mogu dovesti do lipidne peroksidacije koja za posljedicu ima smanjenje fluidnosti staničnih membrana (Kerksick i Willoughby, 2005). Povećana ekspresija detoksikacijskih i antioksidativnih enzima, može biti odgovor stanica na oksidativni stres, a time se počinje aktivirati glutation (GSH) kojeg znanstvenici smatraju jednim od najvažnijih obrambenih molekula od oksidativnog stresa čija je zadaća neutralizirati slobodne radikale. Jaki oksidativni stres dovodi do pada koncentracije GSH i do povećanja koncentracije reduciranog glutationa (GSSG) u stanicama (Kerksick i Willoughby, 2005). Što je izloženost oksidativnom stresu dulja, time su posljedice za stanicu veće jer su zabilježene brojne upale, citotoksičnosti i začetci apoptoze, odnosno kontrolirane stanične smrti (Xiao i sur. 2003). Nanočestice u stanice ulaze difuzijom, transmembranskim kanalima ili adhezivnim interakcijama, a sami put ulaska ovisi o tipu čestica, veličini i površinskom naboju (Mahmood i sur. 2010). Smatra se kako će u budućnosti sve više istraživanja na biološkim i okolišnim učincima nanočestica srebra pomoći u razumijevanju štetnog djelovanja na zdravlje ljudi i ekološke sustave (Stensberg i sur. 2014).

### 1.2.2. Nanočestice polistirena

Polistiren se ubraja u jednu od najkorištenijih vrsta plastike, no zapravo je to polimer koji je dobiven polimerizacijom stirenskih monomera (*Slika 2.*). Ako polistiren dospije u prirodu postaje višestruko opasan jer nije biorazgradiv te u vodu i tlo otpušta štetne sastojke. Glavni razlog njegove toksičnosti je monomer stiren koji se može otpustiti tijekom zagrijavanja ili proizvodnjom polistirena (Gurman i sur. 1987).



*Slika 2.* Sinteza polistirena (preuzeto iz Loos i sur. 2014)

Za polistiren se može reći da je inertan, odnosno otporan na kiseline i lužine te da se lako otapa u kloriranim i aromatskim organskim otapalima. Ima vrlo visoku čvrstoću, ali nisku elastičnost jer ima mogućnost istezanja samo 3-4%. Također, polistiren je dobre toplinske postojanosti, posjeduje dobra električna svojstva i veliku optičku prozirnost, ali nedostatak mu je što je lomljiv i niske udarne žilavosti (Loos i sur. 2014).

Polistirenske nanočestice (PSNP, od *eng. polystyrene nanoparticles*) koriste se u raznim istraživanjima kao model za proučavanje interakcije između nanočestica i stanica jer je poznato da imaju mogućnost ulaska u različite vrste stanica (Varela i sur. 2012). Znanstvenici su uočili kako polistirenske nanočestice imaju dobra fluorescencijska svojstva koja se lako mogu pratiti te su dokazali da utječu na proces apsorpcije i uzrokuju fiziološki odgovor (Mahler, 2012).

### 1.3. Istraživanja nanočestica

Najčešća istraživanja nanočestica provode se na jednostavnijim modelnim sustavima. Zbog dobivanja pouzdanih rezultata tijekom istraživanja važno je poznavati svojstva kojima se može opisati biološka aktivnost nanočestica. Neka od svojstava su: visoki omjer površine i volumena što može povećati interakcije sa okolnim molekulama i dovesti do povećanja citotoksičnosti (Gatoo i sur. 2014); površinski naboj ( $\zeta$  potencijal) smatra se važnim čimbenikom tijekom interakcije nanočestica i stanica, ali može utjecati i na količinu apsorbiranih proteina na površini čestice (Horie i sur. 2012); inhibitorna aktivnost enzima nanočesticama (Wu i sur. 2009) itd. Upravo navedena svojstva nanočesticama omogućuju brojne transformacije dok se nalaze u biološkim medijima. Iako su brojne nanočestice dokazano toksične, otopina srebrnih nanočestica

često se koristi kao čimbenik prema kojem se određuje njihova toksičnost jer se otpušta toksičan srebrov kation (Xia i sur. 2008). Takva otopina se sastoji od iona koji su slobodni, djelomično otopljenih nanočestica i mješavine srebrnih nanočestica i adsorbiranih iona. Nakon kontakta s biološkim matriksima, većina materijala je odmah obložena proteinima koji stvaraju tzv. proteinsku koronu. Proteinska korona je po svojem sastavu iznimno kompleksna i promjenjiva. U Tablici 1. prikazane su pojedine nanočestice i proteini za koje je poznato da se međusobno vežu. Razna istraživanja su pokazala kako brojna svojstva tih proteina utječu na sam ulazak nanočestica u biološke sustave, na biodistribuciju, ali mogu proizvesti i neželjene nuspojave (Mout i sur. 2012). Nadalje, pretpostavlja se da različiti omotači mogu utjecati na citotoksičnost i površinski naboj nanočestica (Jurašin i sur. 2016). Stabilizacijski omotači označavaju modifikacije površine nanočestica tako što se površina nanočestica oblaže različitim molekulama koje onda određuju identitet i svojstva takvih modificiranih nanočestica (Bozich i sur., 2014). Dokazano je da na stabilnost nanočestica utječu brojni faktori pa je zbog toga potrebno poznavati karakteristike medija i samih nanočestica kako bi se u određenim situacijama moglo utjecati na stabilnost pomoću različitih dendrimera, polimera i biomolekula (Mout i sur. 2012). Osim toga za sigurnu primjenu i procjenu kvalitete nanočestica potrebno je točno procijeniti njihovu stabilnost i moguće transformacije koje ovise o veličini čestica, ukupnoj površini, mogućim promjenama na površini i kristalnosti (Jurašin i sur. 2016).

Tablica 1. Vrste nanočestica i proteini s kojima se vežu (preuzeto iz Aggarwal i sur. 2009)

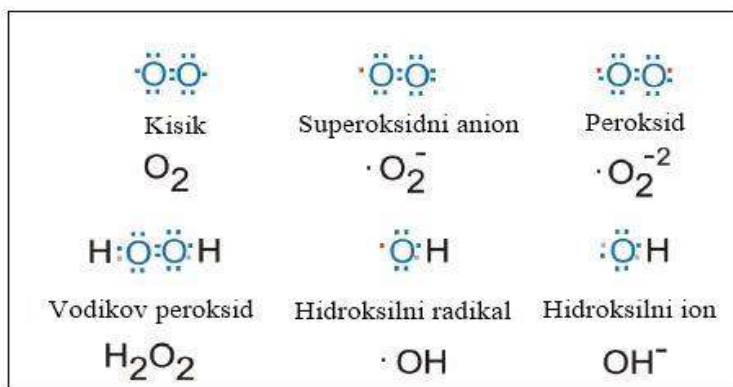
<b>Vrsta nanočestica</b>	<b>Identificirani proteini</b>
<i>Polistiren s poloksamerom</i>	Faktor B, transferin, albumin, fibrinogen, IgG, apolipoproteini
<i>Liposomi</i>	Albumin, fibrinogen, apolipoproteini, IgG, $\alpha$ 1-antitripsin, $\alpha$ 2-makroglobulin, IgM
<i>Jednozidne ugljikove nanocijevi</i>	Albumin
<i>Čvrste lipidne nanočestice s Tween 80 ili poloksamerom</i>	Fibrinogen, IgG, IgM, apolipoproteini (osim ApoE), transtiretin
<i>Nanočestice poli(laktične kiseline) s PEG-om</i>	Albumin, fibrinogen, apolipoproteini
<i>Poliheksadecilcianoakrilatne nanočestice</i>	Albumin, apolipoproteini, IgG, transferin
<i>Nanočestice željezovog oksida</i>	Albumin, IgG, IgM, fibrinogen, C3b
<i>Polistiren s Rodaminom B</i>	Albumin, IgG, fibrinogen, apolipoproteini, PLS:6
<i>Kationski lipopleksi i polipleksi</i>	Albumin
<i>Anionske i metalne površine, hidrofilne anorganske nanočestice</i>	Transferin, haptoglobulin, fetuin A, kininogen, unutarnji faktori zgrušavanja

#### 1.4. Oksidativni stres

Stvaranje radikala i njihovo neutraliziranje je stanje koje se u brojnoj literaturi naziva oksidativnim stresom. Slobodnim radikalima se nazivaju ioni ili molekule koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskom elektronskom omotaču (Cheeseman i Slater, 1993). Reaktivni spojevi kisika (ROS, od *eng. Reactive Oxygen Species*) čine najveći dio slobodnih radikala, a osim njih to su i reaktivni dušikovi spojevi (RNS, od *eng. Reactive Nitrogen Species*) i brojni drugi manje reaktivni spojevi. Tako opisani radikali su vrlo štetni jer mogu reagirati s makromolekulama, kao što je DNK, i time izazvati štetne posljedice za njihovu strukturu ili mogu dovesti do oksidacije polinezasićenih masnih kiselina čime se smanjuje i fluidnost staničnih membrana (Kerksick i Willoughby, 2005).

Najčešće vrste ROS uključuju superoksidni radikal, hidroksilni radikal, vodikov peroksid, dušikov oksid, lipidni alkoksil i peroksilni radikal prikazani na *Slici 3*. Glavna razlika između vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i ostalih radikala je ta što je on opasniji jer može prolaziti kroz stanične membrane, ali enzim katalaza koji se nalazi unutar stanica razgrađuje velike količine  $H_2O_2$  i time stvara molekule vode. Ipak postoji mogućnost da iz  $H_2O_2$  nastane najopasniji radikal, hidroksilni radikal koji uz prisustvo prijelaznih metala može napraviti štetu na lipidima, nukleinskim kiselinama i proteinima (Kerksick i Willoughby, 2005).

Antioksidansi su enzimi i biomolekule unutar organizma koji imaju ulogu zaštite od slobodnih radikala (Cheeseman i Slater, 1993). Međutim, ako je stanica duže vremena izložena utjecaju štetnih tvari i kemikalija, antioksidansi nisu u stanju stvoriti toliki obrambeni mehanizam da bi se obranili od konstantnog stvaranja novih radikala te tada dolazi do stanja koje se naziva oksidativni stres (Kerksick i Willoughby, 2005).



Slika 3. Najčešće vrste radikala (preuzeto iz Loos i sur. 2014).

## 1.5. Stanične linije

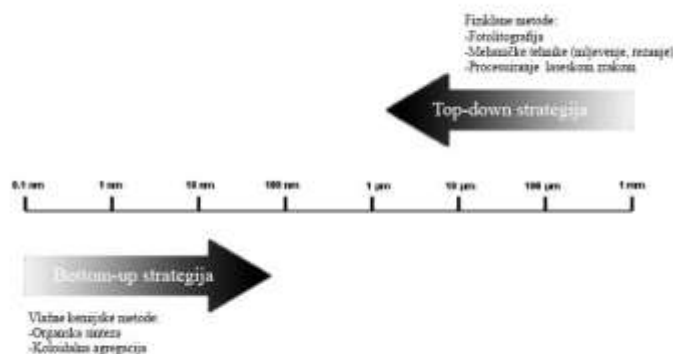
HepG2 stanična linija je epitelna stanična linija koja je dobivena iz jetre hepatocelularnog karcinoma petnaestogodišnjeg dječaka (Hewitt, 2004). Ova stanična linija često se koristi kao modelni sustav u raznim studijama u kojima se ispituju lijekovi te u studijama metabolizma jetre i toksičnosti ksenobiotika, otkrivanju okolišnih i prehrambenih citotoksičnih i genotoksičnih parametara, a time i citoprotektivnih i antigenotoksičnih agenasa i razumijevanju hepatokarcinogeneze (Mersch-Sundermann i sur. 2004).

Jurkat stanična linija je besmrtna stanična linija T-limfocita koja je izvorno dobivena iz periferne krvi četrnaestogodišnjaka oboljelog od akutne limfoblastične leukemije (Abraham i Weiss, 2004). Najčešće se koristila kao prototip stanične linije za proučavanje signalizacije T stanica i molekularne događaje u životnom ciklusu HIV infekcija. Stanice mogu rasti u nakupinama i pojedinačno, a jedna od osobitosti je konstantna proizvodnja interleukina-2. Primarno se koriste u svrhu određivanja osjetljivosti stanica raka na lijekove i zračenje (Montano, 2014).

Opisane stanične linije su odabrane za istraživanje zbog ispitivanja toksičnosti nanočesica srebra i polistirena na modelnim sustavima krvi i jetre.

## 1.6. Metode sinteze nanočestica

Za sintezu nanočestica mogu se primijeniti dvije glavne metode, a to su „*top-down*“ i „*bottom-up*“ strategije detaljnije prikazane na *Slici 4*. Također, postoje konvencionalna ili nekonvencionalna metoda te zelena ili ne-zelena metoda koje im se mogu pripisati ovisno o odabiru reaktanata pri sintezi (El-Badawy i sur. 2010).



Slika 4. „*Top-down*“ i „*bottom-up*“ pristup sintezi nanočestica (Ju-Nam i Lead, 2008).



„*Top-down*“ strategije putem različitih distribucijskih tehnika stvaraju izolirane atome iz većih količina materijala, odnosno ovakva metoda uključuje stvaranje čestica i materijala iz veće količine istovrsnog materijala primjenom tehnika usitnjavanja (Daraio i Jin, 2012). Iako se mogu dobiti male čestice veličine 10-100 nm, nedostatak ovakve metode je moguća prisutnost površinskih nepravilnosti koje značajno utječu na svojstva nanostrukture s obzirom na njihovu veliku površinu po jedinici volumena.

„*Bottom-up*“ metode koriste otopljene soli srebra koje se potom reduciraju pri čemu nastaju raznovrsne nanočestice procesom nukleacije i rasta. Primjeri korištenja ovakve metode su laserska piroliza te atomska ili molekularna kondenzacija (Daraio i Jin, 2012). Nedostatci koje je važno napomenuti su kompliciranost proizvodnje nanočestica na industrijskoj razini (Tolaymat i sur. 2010), potencijalno zaostajanje rezidualnih kemikalija i otapala u konačnom proizvodu, ali i ionsko srebro koje može zaostati (El-Badawy i sur. 2010).

### **1.7. Dinamičko raspršenje svjetlosti**

Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS, od *eng. Dynamic Light Scattering*) pripada instrumentalnoj metodi koja opisuje Brown-ovo gibanje čestica, odnosno određuje se veličina i distribucija veličine u koloidnim suspenzijama (Hoo i sur. 2008). Spomenuto Brown-ovo gibanje je zapravo gibanje čestica u otopini te se zapažaju nasumični sudari s otapalom i dovode do zaključka kako se velike čestice gibaju sporije, a manje nešto brže. Sama veličina čestica izračunava se pomoću „Stokes-Einstenove jednadžbe“ (Hoo i sur. 2008).

Uređaj kojim se provodi DLS funkcionira tako da laserski snop obasjava određene čestice te nakon toga raspršeno zračenje pada na detektor. Detektor zatim analizira intenzitet fluktuacija raspršenog zračenja koje pokazuje specifičan uzorak s obzirom na konstruktivnu i destruktivnu interferenciju raznih nanočestica. Zbog nastalog gibanja čestica u otopini, uređaj mjeri stupnjeve sličnosti između dva signala u određenom vremenskom intervalu (Pecora, 2000).

### **1.8. Elektroforetsko raspršenje svjetlosti**

Elektroforetsko raspršenje svjetlosti (ELS, od *eng. Electrophoretic Light Scattering*) je još jedna u nizu metoda, a služi za određivanje površinskog naboja koloidnih čestica u vodenom mediju. Koloidne čestice su malih dimenzija te zbog toga imaju veliku specifičnu površinu što znači da je izraženo međudjelovanje između njihove površine i okolnog medija. Razlika ELS metode od DLS je u tome što se umjesto nasumičnih Brown-ovih kretnji suspendiranih čestica u ELS mjere usmjerene kretnje izazvane električnim poljem. Takva kretanja se, uz kemijski sastav, površinski

naboj, građu i karakterizaciju površine čestica, određuje preko parametra kojeg nazivamo zeta potencijalom ( $\zeta$ ). Glavna karakterizacija nabijenih čestica bitnih za zeta potencijal je ta što se one kreću određenom brzinom prema suprotno nabijenoj elektrodi (McNeil-Watson, 2013). Brzina kretanja čestica pod utjecajem električne energije mjeri se pomoću Dopplerovog učinka kod čijeg se mjerenja uočava razlika frekvencije raspršene svjetlosti s površine čestica od ulazne svjetlosti te se tako može izračunati brzina čestica, ali i zeta potencijal. Uređaj kojim se mjeri elektroforetsko raspršenje svjetlosti sastoji se od izvora svjetlosti, leća koje usmjeravaju svjetlost, komore s uzorkom na koju je priključen izvor struje, leća koje su zadužene za skupljanje izlazne svjetlosti, detektora i korelatora, a nakon provedene metode podaci se obrađuju digitalno (Xu i Scarlett, 2002).

### **1.9. Induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom**

Induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom (ICP-MS) je tehnika u kojoj se za detekciju nastalih iona koristi maseni spektrometar, a kao ionizacijski izvor služi induktivno spregnuta plazma. Rad instrumenta kojim se ICP-MS tehnika provodi može se podijeliti na: uvođenje uzorka kojim se uzorak u tekućem stanju uvodi u pneumatski raspršivač gdje se pretvara u aerosol. Male kapljice aerosola, koje predstavljaju 1-2% uzorka se razdvajaju od većih kapljica pomoću komore za sprejanje te se nakon toga male kapljice uvode u baklju. Zatim se stvaraju ioni tako što aerosol zbog različitih temperatura u baklji, prolazi faze desolvacije, isparavanja, atomizacije i ionizacije te se pretvara iz tekućeg aerosola u čvrste čestice, a potom u plin. Glavna svrha plazme je formiranje pozitivno nabijenih iona iz uzoraka aerosola. Nakon toga slijedi regija sučelja u kojoj se događa učinkoviti i konzistentni prijenos nastalih iona iz plazme (pri atmosferskom tlaku) u područje masenog analizatora (vakuum). Ionske leće usmjeravaju i prenose ione u maseni spektrometar, ali zaustavljaju neutralne čestice i fotone do masenog analizatora i detektora jer te čestice uzrokuju nestabilnost signala i povećaju pozadinski šum. Razdvajanje iona i detekcija događa se u vakuum fazi na temelju omjera mase i naboja. Najčešći detektor koji se koristi je multiplikator elektrona, a računa i pohranjuje ukupni signal za svaki omjer masa i naboja stvarajući maseni spektar (Thomas, 2004).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj istraživanja provedenih tijekom izrade ovog diplomskog rada bio je testirati utjecaj nanočestica srebra i nanočestica polistirena na vijabilnost i oksidativni stres dviju staničnih linija, Jurkat i HepG2. Nulta hipoteza tijekom istraživanja bila je da PVPAgNP i PSNP u kombinaciji nisu toksičnije nego pojedinačno.

Za postizanje glavnog cilja, postavljeni su specifični ciljevi koji obuhvaćaju:

- Ispitati stabilnost nanočestica srebra veličine 50 nm (PVPAgNP) i nanočestica polistirena veličine 20 nm u medijima sa serumom goveđeg fetusa (DMEM + FBS) koji će se koristiti u analizama in vitro.
- Ispitati utjecaj srebrnih nanočestica (PVPAgNP) i polistirenskih nanočestica na vijabilnost i oksidativni stres Jurkat i HepG2 staničnih linija.
- Ispitati interferencije srebrnih i polistirenskih nanočestica metodama in vitro koje će se koristiti u staničnim testovima zbog interpretacije točnih rezultata istraživanja oksidativnog stresa i citotoksičnosti.

Rezultati ovog istraživanja moći će doprinijeti boljoj procjeni potencijalnih rizika primjene i uporabe nanočestica srebra i polistirena na ljudsko zdravlje.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Određivanje karakteristika PVPAgNP i PSNP**

U laboratorijima na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, sintetizirane su nanočestice srebra (PVPAgNP) veličine 50 nm i komercijalne nanočestice polistirena (Phosphorex, SAD) veličine 20 nm (bez modifikacija) korištene u istraživanjima za ovaj diplomski rad.

Jurkat i HepG2 stanične linije uzgajane su u bočicama za staničnu kulturu u inkubatoru pri uvjetima od 37°C i 5% CO<sub>2</sub>. Stanicama je prije nasađivanja uklonjen medij, isprane su PBS-om i odvojene od podloge koristeći tripsin (Sigma Aldrich, USA). Nakon toga je dodan medij sa serumom goveđeg fetusa (DMEM + 10% FBS) kako bi se potaknula inhibicija. Jurkat i HepG2 stanična linija pomiješana je s tripanskim modrilom (Trypan Blue, Biorad, USA) u jednakom omjeru (1:1) da bi se lakše prebrojale automatskim brojačem (TC 20, Biorad, USA).

Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) korištena je za određivanje veličine PVPAgNP i PSNP tako što se koristio uređaj Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) koji radi pomoću zelenog lasera valne duljine od 532 nm pri 173°. Rezultat je dobiven iz 10 uzastopnih nezavisnih mjerenja u tri različita medija i prikazan je kao prosječni hidrodinamički polumjer. Mediji za mjerenje su bili: ultračista voda (UPW), stanični medij (DMEM) i stanični medij u koji je dodan serum goveđeg fetusa (DMEM + 10% FBS). Mjerenje je provedeno nakon 24 h (vrijeme inkubacije).

Metoda elektroforetskog raspršenja svjetlosti (ELS) korištena je za određivanje površinskog naboja, odnosno zeta potencijala ( $\zeta$  potencijal) PVPAgNP i PSNP korištenjem uređaja Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK) koji radi pomoću zelenog lasera valne duljine od 532 nm pri 173°. Rezultat je dobiven iz 3 uzastopna nezavisna mjerenja u tri različita medija i prikazan je kao površinski naboj. Mediji za mjerenje su bili: ultračista voda (UPW), stanični medij (DMEM) i stanični medij u koji je dodan serum goveđeg fetusa (DMEM + 10% FBS). Mjerenje je provedeno nakon 24 h (vrijeme inkubacije).

#### **3.2. Određivanje interferencije nanočestica**

In vitro testovi citotoksičnosti lako su dostupni i izvedivi pa se zbog toga često koriste kao instrument za procjenu rizika od novih kemikalija. Takvi testovi baziraju se na mjerenju luminiscencije, apsorbancije ili fluorescencije. Brojna istraživanja su pokazala da nanočestice

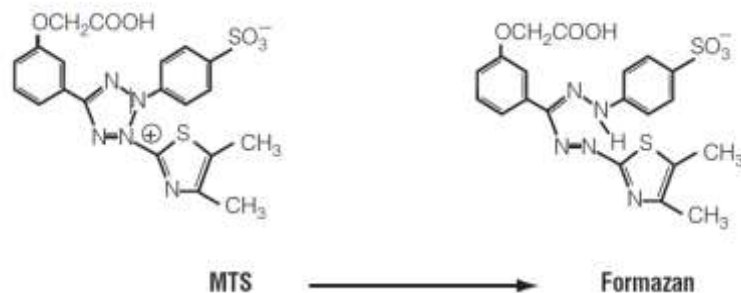
interferiraju s apsorpcijom svjetla i fluorescencijom, ali interferencije uzrokuju i nekontrolirane kemijske reakcije te adsorpcija kemijskih reagensa na nanočestice. Međutim, nedavna istraživanja pokazala su da primjena klasičnih in vitro testova u ispitivanju bioloških učinaka nanočestica može dovesti do lažno negativnih ili pak lažno pozitivnih rezultata (Horie i sur. 2012). Zbog nepredvidivog ponašanja nanočestica i njihove reaktivnosti, moguće je očekivanje interakcija s reagensima. Različite vrste srebrnih nanočestica uzrokuju povećanje apsorpcije u MTT testu, dok je kod MTS testa povećanje bilo manje. Također, nanočestice srebra reduciraju tetrazolijevu sol u formazanski produkt, što dovodi do očitavanja više apsorpcije i lažno negativnih rezultata pri procjeni citotoksičnosti. Vrlo je teško predvidjeti mogućnost interferencije nanočestica testovima in vitro jer ti rezultati ovise o kemijskom sastavu, veličini, obliku, površinskom naboju i stabilnosti nanočestica (Vinković Vrček i sur. 2016).

U istraživanju za ovaj rad su se procijenile interferencije PVPAgNP i PSNP s MTS testom u uvjetima bez stanica. Testirane su dvije koncentracije (1 i 10 ppm) dva tipa navedenih nanočestica. Osim pojedinačnog testa, testirane su i kombinacije tih koncentracija (1 i 10 ppm) PVPAgNP sa 10 ppm PSNP i u drugoj kombinaciji sa 100 ppm PSNP u prozirnoj pločici s 96 jažica tako da su u četveroplikatima dodavane otopine nanočestica (10x koncentrirane), medij za Jurkat (RPMI 1640), medij za HepG2 (EMEM) i reagens MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent). Kontrole koje su korištene su bile u triplikatima i to 1. nanočestice i medij, 2. medij i MTS reagens, 3. medij (RPMI 1640 i EMEM). Nakon toga su uzorci inkubirani u inkubatoru (HeraCell, Thermo Scientific, USA) 3 sata pri uvjetima od 37°C, 5% CO<sub>2</sub> te je nakon toga mjerena apsorpcija pri 490 nm na čitaču pločica (Victor™ plate reader, Perkin Elmer, MA, USA).

### **3.3. Određivanje stanične vijabilnosti**

#### **3.3.1. Test citotoksičnosti**

MTS test koristi se za ispitivanje citotoksičnosti određene tvari, odnosno pomoću MTS testa utvrđuje se broj živih stanica. Temelji se na sposobnosti živih stanica da reduciraju MTS tetrazolijevu soli ((3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolijeva sol)) u obojani formazanski produkt. Na *Slici 5.* prikazana je redukcija MTS-a u formazan koja se odvija u metabolički aktivnim stanicama uz pomoć NAD(P)H ovisne oksidoreduktaze. Intenzitet boje koji je nastao redukcijom MTS-a proporcionalan je broju živih stanica te se određuje spektrofotometrijski. Obojani formazanski produkt topljiv je u staničnom mediju, te se mjerenjem apsorpcije pri 490 nm detektira njegova količina (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay).



Slika 5. Prikaz redukcije MTS-a u formazan (preuzeto sa [www.promega.com](http://www.promega.com))

Ispitivanje citotoksičnosti na Jurkat i HepG2 staničnim linijama započinje naciepljivanjem ploče s 96 jažica. Za Jurkat staničnu liniju u jažicu naciepljeno je 50 000 stanica, a za HepG2 20 000 u jažicu. Za pokuse utjecaja nanočestica (PVPAgNP i PSNP) na stanice s proteinskom koronom dodan je medij sa serumom (10% FBS). Stanice su tretirane različitim koncentracijama nanočestica u triplikatima (PVPAgNP: 0.1, 1, 10, 100 ppm; PSNP: 1, 10, 50, 100, 250 ppm). Testirane su i kombinacije koncentracija (1, 10, 100 ppm) PVPAgNP sa 10 ppm PSNP i u drugoj kombinaciji sa 100 ppm PSNP. Kao pozitivna kontrola korišten je 10% DMSO, a kao negativna kontrola stanice sa ultračistom vodom (UPW) i PBS-om jednakog volumena kao volumen nanočestica za tretman stanica. Nakon inkubacije od 24 sata pri uvjetima od 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, stanice su isprane 3x s PBS-om (1%), zatim je dodan MTS reagens (CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent). Stanice su ponovno inkubirane 2 sata pri istim uvjetima te je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 490 nm na čitaču pločica Victor™ plate reader (Perkin Elmer, MA, USA).

### 3.3.2. Test Live/Dead na protočnom citometru

Test Live/Dead bazira se na bojanju fluorescentnim bojama koje se vežu za aminske skupine proteina koncentrirane u citoplazmi pa se stoga stanice koje su obilježene fluorescentnim bojama mogu analizirati protočnom citometrijom. Propidij jodid (PI) je fluorescentna boja koja se može upotrijebiti za bojanje stanica ili nukleinskih kiselina te se veže na DNK interakcijom između dušičnih baza. Kod živih stanica stanična membrana nije propusna za propidij jodid, ali kod mrtvih stanica dolazi do oštećenja membrana pa propidij jodid ima mogućnost ući u stanicu i vezati se na DNK molekulu. Upravo se metoda bojanja stanica s PI koristi u testovima stanične vijabilnosti jer omogućuje diskriminaciju živih i mrtvih stanica.

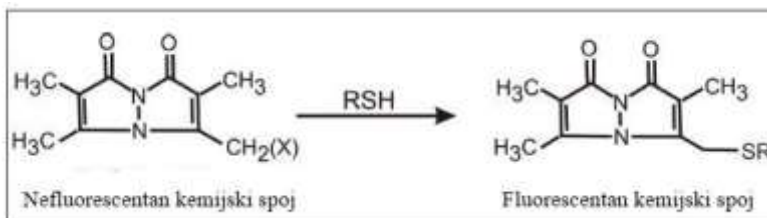
Ispitivanje postotka živih i mrtvih stanica na Jurkat i HepG2 staničnoj liniji počinje naciepljivanjem ploče s 96 jažica. Za svaku staničnu liniju u svaku jažicu naciepljeno je 100 000 stanica u zasebne jažice. Stanice su tretirane različitim koncentracijama nanočestica u duplikatima (PVPAgNP: 0.1, 1, 10, 100 ppm; PSNP: 1, 10, 50, 100, 250 ppm). Kao pozitivna kontrola korišten je 10% DMSO, a kao negativna kontrola stanice sa ultračistom vodom (UPW) i PBS-om jednakog volumena kao

volumen nanočestica za tretman stanica. Tijekom istraživanja stanice su tretirane nanočesticama u mediju sa serumom goveđeg fetusa (10% FBS) za testiranje citotoksičnosti u uvjetima pri kojima nastaje proteinska korona oko nanočestica, te su stanice inkubirane 24 h. Za HepG2 stanice sakupljen je supernatant s mrtvim stanicama u plastične epruvete, dok su kod Jurkat mrtve stanice suspenzijske, odnosno žive stanice su taložene na samom dnu jažice. Jažice su isprane PBS-om (1%), tripsinizirane (Sigma Aldrich, USA) te su žive stanice HepG2 sakupljene u epruvete zajedno s mrtvim stanicama. Uzorci su centrifugirani (1000 g, 5 min) te je uklonjen supernatant. Dodan je propidij jodid (5  $\mu$ M). Uzorci su analizirani na protočnom citometru Attune NxT (Attune, USA).

### 3.4. Određivanje oksidativnog stresa

#### 3.4.1. Test Monoklorobiman

Monoklorobiman ili mBCl je spoj koji pokazuje svojstvo fluorescencije prije nego što konjugira s tiolnim molekulama stvarajući tzv. fluorescentne adukte prikazane na *Slici 6.*, a koristi se kao indikator za mjerenje oksidativnog stresa. Monoklorobiman ulazi u stanice i veže se u kompleks s glutationom koji fluorescira pa se često koristi kao biomarker koncentracije glutationa (GSH) i stanicama, a tu reakciju katalizira glutation-S-transferaza. Kvantifikacija GSH se mjeri pri pobudnoj svjetlosti od 380 nm i emitiranoj svjetlosti pri 460 nm (Kamencic i sur. 2000).



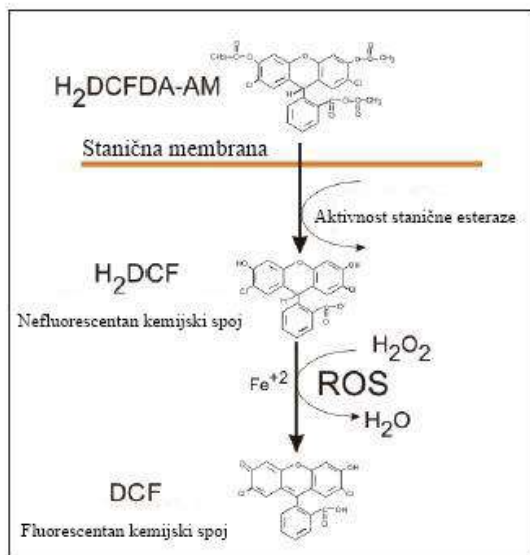
*Slika 6.* Nastanak fluorescentnog adukta konjugacijom monoklorobimana s tiolnom molekulom (preuzeto i prilagođeno sa [www.promega.com](http://www.promega.com))

Ispitivanje oksidativnog stresa na Jurkat i HepG2 staničnim linijama započinje naciepljivanjem ploče s 96 jažica. Za Jurkat staničnu liniju u jažicu naciepljeno je 50 000 stanica, a za HepG2 20 000 u jažicu. Tijekom istraživanja stanice su tretirane različitim koncentracijama nanočestica (PVPAgNP: 0.1, 1, 10, 100 ppm; PSNP: 1, 10, 50, 100, 250 ppm). Testirane su i kombinacije koncentracija (1, 10, 100 ppm) PVPAgNP sa 10 ppm PSNP i u drugoj kombinaciji sa 100 ppm PSNP. Poslije 24 sata inkubacije pri uvjetima od 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, uklonjen je medij, stanice su isprane 3x s PBS-om (1%), dodan je monoklorobiman (100  $\mu$ L po jažici) (Sigma Aldrich, USA). Uzorci su

ponovno inkubirani u mraku 30 minuta, pa je zatim mjerena fluorescencija mjerena na čitaču pločica Victor™ plate reader (Perkin Elmer, MA, USA).

### 3.4.2. Test Dikloro-dihidro-fluorescein diacetat

Dikloro-dihidro-fluorescein diacetat (DCFH-DA) je biomarker koji se koristi prilikom mjerenja razine oksidativnog stresa, a određuje koncentracije vodikovog peroksida. DCFH-DA je diacetat koji može ući u stanice gdje ga endogene esterase cijepaju i dolazi do nastajanja nefluorescentnog spoja DCFH (Griffiths i sur. 2011). Na *Slici 7.* je prikazan fluorescentan spoj DCF koji nastaje prilikom oksidacije reaktivnim vrstama kisika. Pobudna svjetlost ovog spoja je pri 450 nm, a emisijska pri 520 nm, dok je intenzitet emitirane svjetlosti je proporcionalan količini ROS-a u stanici (Vinković Vrček i sur. 2015).



*Slika 7.* Prikaz reakcije kojom nastaje spoj DCF iz spoja DCFH-DA (preuzeto i prilagođeno iz Loos i sur. 2014).

Ispitivanje razine oksidativnog stresa na Jurkat i HepG2 staničnim linijama nastavlja se naciepljivanjem ploče s 96 jažica. Za Jurkat staničnu liniju u jažicu naciepljeno je 50 000 stanica, a za HepG2 20 000 u jažicu. Tijekom istraživanja stanice su tretirane različitim koncentracijama nanočestica (PVPAgNP: 0.1, 1, 10, 100 ppm; PSNP: 1, 10, 50, 100, 250 ppm). Testirane su i kombinacije koncentracija (1, 10, 100 ppm) PVPAgNP sa 10 ppm PSNP i u drugoj kombinaciji sa 100 ppm PSNP. Za vrijeme istraživanja stanice su tretirane PVPAgNP i PSNP u mediju sa serumom goveđeg fetusa (DMEM + 10% FBS) za testiranje citotoksičnosti u uvjetima pri kojima nastaje proteinska korona. Inkubacija stanica trajala je 24 sata pri uvjetima od 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Za HepG2



stanice sakupljen je supernatant s mrtvim stanicama u plastične epruvete, dok su kod Jurkat mrtve stanice suspenzijske, odnosno žive stanice su taložene na samom dnu jažice. Zatim su jažice isprane PBS-om (1%), tripsinizirane (Sigma Aldrich, USA) te su u epruvete sakupljene žive i mrtve stanice zajedno. Nakon toga, uzorci su centrifugirani (1000 g, 5 min), uklonjen je supernatant te je dodana DCF boja (100  $\mu$ L po jažici). Uzorci su analizirani na protočnom citometru Attune NxT (Attune, USA).

### **3.5. Grafički prikaz i statistička obrada rezultata**

Statistička analiza podataka i njihov grafički prikaz provedena je korištenjem računalnog programa STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., SAD) i Excel programa Microsoft Office paketa. Brojčani podatak prikazan grafikonom za MTS test, aritmetička je sredina tri replike. Razlike između eksperimentalnih grupa testirane su jednosmjernom analizom varijance – one way ANOVA i post hoc testom višestrukih usporedbi. Statistički značajnim rezultatima smatrani su oni rezultati koji su se razlikovali na razini  $p < 0,05$ . Drugi parametri nisu statistički obrađeni jer su mjereni u duplikatima.

## 4. Rezultati

### 4.1. Karakterizacija i određivanje stabilnosti nanočestica

Metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti nanočesticama srebra i polistirena određena je distribucija veličina s obzirom na volumen pomoću parametra - hidrodinamičkog polumjera (nm) prikazanog u Tablici 2. Nanočestice srebra i polistirena većinom su pokazale monomodalnu distribuciju veličina, dok su njihove kombinacije bimodalnu distribuciju veličina. Stvaranje proteinske korone smanjuje aglomeraciju, a događa se u mediju sa dodatkom seruma goveđeg fetusa (DMEM + 10% FBS).

Tablica 2. Vrijednosti hidrodinamičkog polumjera (nm) i volumna distribucija (%) mjerene metodom DLS za dvije vrste nanočestica i njihove kombinacije u različitim medijima nakon inkubacije od 24 sata

<b>Vrsta nanočestica</b>	<b>Hidrodinamički polumjer (nm) i volumna distribucija nanočestica (%) u medijima</b>		
	<b>UPW</b>	<b>DMEM</b>	<b>DMEM + 10% FBS</b>
<i>PVPAgNP 50 nm 100 ppm</i>	78,1 ± 7,3 (99%)	881,5 ± 130,4 (100%)	21,0 ± 2,4 (18%) 119,2 ± 4,0 (82%)
<i>PSNP 20 nm 100 ppm</i>	19,4 ± 0,5 (100%)	46,5 ± 29,5 (45%) 162,4 ± 51,8 (21%) 674,3 ± 183,4 (34%)	8,5 ± 0,5 (100%) 1015 ± 128 (<1%)
<i>PVPAgNP + PSNP 100 + 100 ppm</i>	14,9 ± 0,0 (11%) 55,7 ± 7,8 (88%)	139,7 ± 0,0 (20%) 912,7 ± 86,6 (79%)	119,5 ± 1,4 (99%)

AgNP: srebrne nanočestice, PVP: polivinilpirolidon; PSNP: polistirenske nanočestice ; UPW: ultračista voda, DMEM: Dulbecco's modified eagle's medium, FBS: serum goveđeg fetusa

Metodom elektroforetskog raspršenja svjetlosti nanočestice srebra i polistirena u ultračistoj vodi pokazale su kako su stabilne jer ih karakterizira zeta ( $\zeta$ ) potencijal niži od  $-30 \text{ mV}^2$  (Tablica 3).

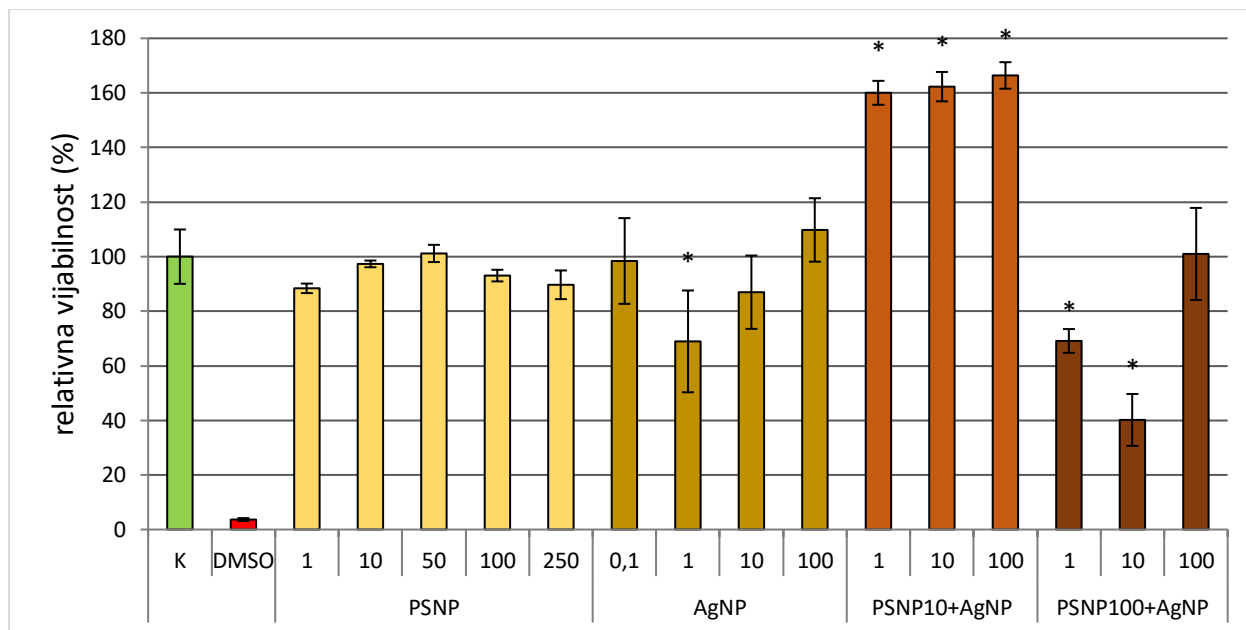
Tablica 3. Zeta ( $\zeta$ ) potencijal ( $\text{mV}^2$ ) mjeren metodom ELS za dvije vrste nanočestica i njihove kombinacije u različitim medijima nakon 24 h inkubacije

Vrsta nanočestica	Zeta potencijal nanočestica u UPW, DMEM i DMEM+10% FBS ( $\text{mV}^2$ )		
	UPW	DMEM	DMEM + 10% FBS
PVPAgNP 50 nm	$-35,9 \pm 4,5$	$-9,3 \pm 0,3$	$-9,7 \pm 0,2$
PSNP 20 nm	$-39,7 \pm 10,8$	$-22,9 \pm 2,3$	$-9,3 \pm 0,9$
PVPAgNP + PSNP	$-29,0 \pm 0,5$	$-13,1 \pm 0,7$	$-9,2 \pm 0,5$

AgNP: srebrne nanočestice, PVP: polivinilpirolidon; PSNP: polistirenske nanočestice ; UPW: ultračista voda, DMEM: Dulbecco's modified eagle's medium, FBS: serum goveđeg fetusa

#### 4.2. Stanična vijabilnost Jurkat i HepG2 staničnih linija

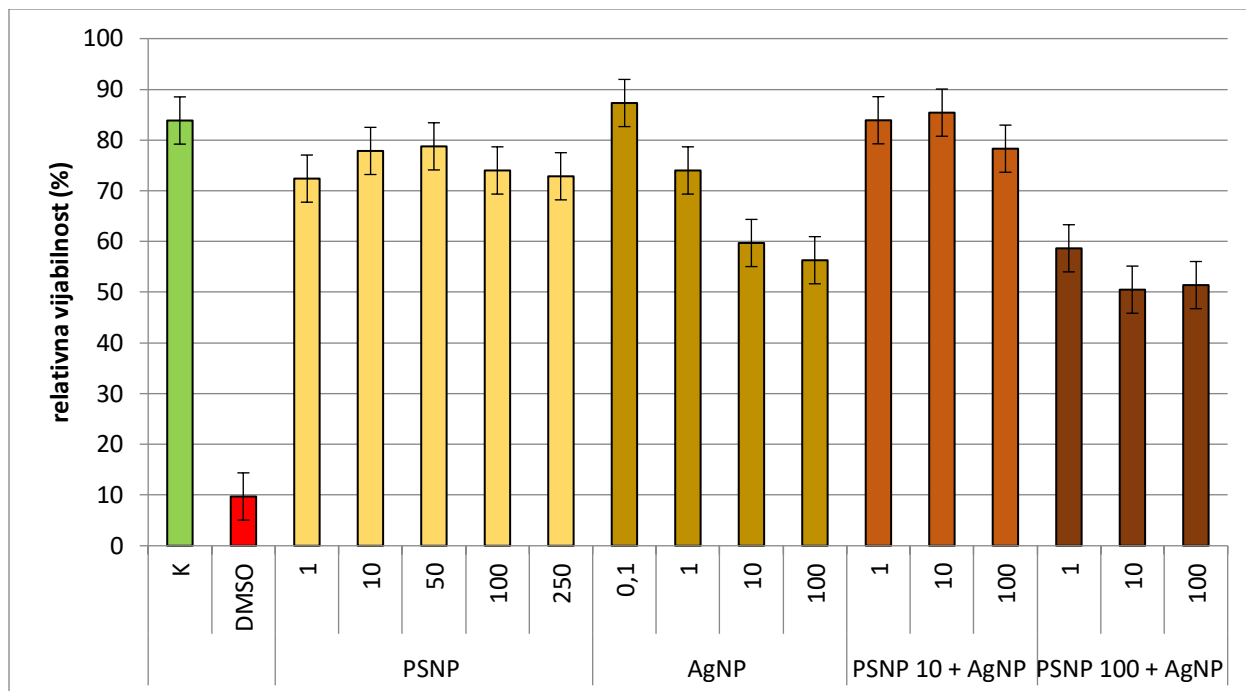
Rezultati testa vijabilnosti MTS utjecaja nanočestica PVPAgNP i PSNP na vijabilnost stanične linije HepG2 prikazani su na *Slici 8*. Stanična vijabilnost Jurkat i HepG2 staničnih linija testirana je pri uvjetima dodatka seruma goveđeg fetusa u staničnom mediju u trajanju od 24 sata. Pri takvim uvjetima nastaje proteinska korona oko PVPAgNP i PSNP. Kombinirani tretman 100 ppm PSNP + AgNP uzrokuje statistički značajno povećanje relativne vijabilnosti, odnosno proliferacijski učinak, dok tretman s 100 ppm PSNP u kombinaciji s nižim koncentracijama AgNP je izazvao statistički značajno smanjenje vijabilnosti stanica. Isti učinak imao je i AgNP u koncentraciji od 1 ppm.



*Slika 8.* Vijabilnost (srednja vrijednost  $\pm$  SD,  $n=3$ ) HepG2 stanica dobivena testa MTS. \* označava statistički značajno različitu vrijednost u odnosu na kontrolu ( $P<0.05$ ). K označava kontrolnu vrijednost, a korištene su stanice, ultračista voda (UPW) i PBS jednakog volumena kao volumen nanočestica za tretman stanica. Za pozitivnu kontrolu korišten je 10% DMSO.

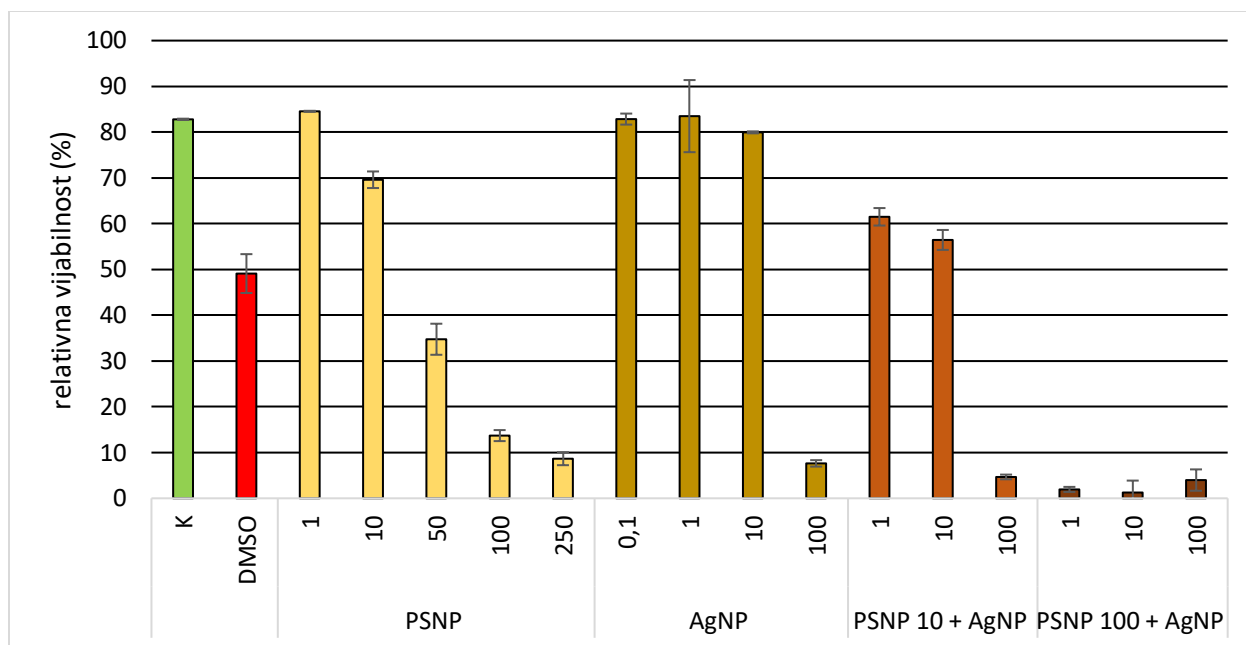
MTS test na staničnoj liniji Jurkat nije pokazao značajno smanjenje stanične vijabilnosti pa ti rezultati nisu prikazani.

Na protočnom citometru testirana je vijabilnost staničnih linija HepG2 (*Slika 9.*) i Jurkat (*Slika 10.*) pri jednakim uvjetima kao u testu MTS. Ako se usporede rezultati djelovanja srebrnih nanočestica na HepG2 protočne citometrije sa testom MTS, uočljivo je kako se na MTS testu smanjenjem koncentracije nanočestica i toksičnost smanjuje, dok je kod protočne citometrije vidljivo da se smanjenjem koncentracija toksičnost povećava.



Slika 9. Vijabilnost i  $\pm$  SD (duplikat) HepG2 stanica dobivena protočnom citometrijom. K označava kontrolnu vrijednost, a korištene su stanice, ultračista voda (UPW) i PBS jednakog volumena kao volumen nanočestica za tretman stanica. Za pozitivnu kontrolu korišten je 10% DMSO.

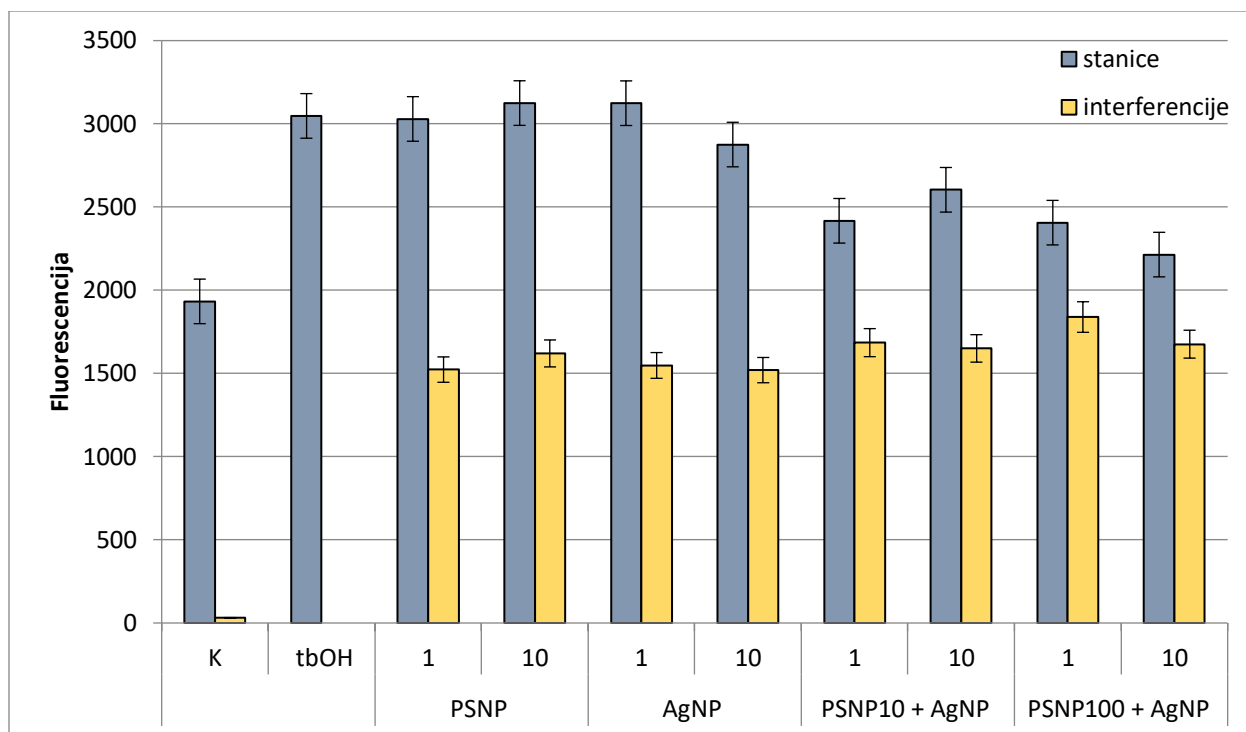
Kombinirani tretman Jurkat stanica sa PVPAgNP i PSNP pokazao se citotoksičnijim od pojedinačnih tretmana s istim koncentracijama nanočestica. Kombinacija 100 ppm PSNP i 10 ppm PVPAgNP, što pojedinačno nije narušilo staničnu vitalnost, smanjilo je postotak živih stanica nakon 24 sata. Iako se točan mehanizam interakcije s nanočesticama unutar mješavine i na staničnoj površini tek treba razjasniti, očigledno povećana citotoksičnost ukazuje na mogućnost zajedničkog mehanizma djelovanja.



*Slika 10.* Vijabilnost i  $\pm$  SD (duplikat) Jurkat stanica dobivena protočnom citometrijom. K označava kontrolnu vrijednost, a korištene su stanice, ultračista voda (UPW) i PBS jednakog volumena kao volumen nanočestica za tretman stanica. Za pozitivnu kontrolu korišten je 10% DMSO.

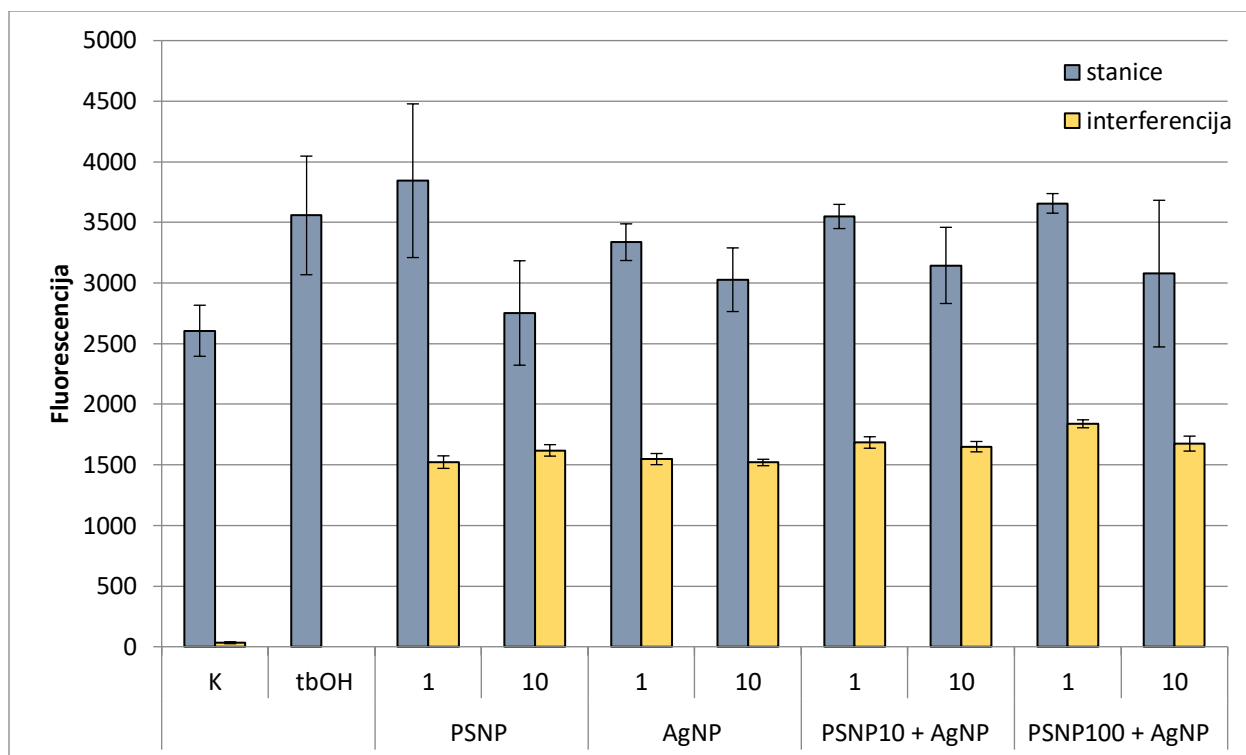
#### 4.3. Utjecaj nanočestica na oksidativni stres staničnih linija HepG2 i Jurkat

Bojom monoklorobiman mjerena je ukupna količina glutaciona u stanicama nakon tretmana različitim koncentracijama nanočestica srebra i polistirena. Stanice su tretirane pri uvjetima nastanka proteinske korone oko nanočestica (DMEM + 10% FBS). Pojedinačni tretman s PVPAgNP i PSNP je uzrokovao veću indukciju oksidativnog stresa u HepG2 staničnoj liniji (*Slika 11.*), dok tretman kombinacija nanočestica nije značajno povisio razinu oksidativnog stresa u HepG2 stanicama.



*Slika 11.* Procjena oksidativnog stresa u HepG2 stanicama mjerena korištenjem fluorescentne probe mBCL. K označava kontrolnu vrijednost, a korištena je ultračista voda (UPW). Za pozitivnu kontrolu korištena je otopina TbOH (6,3  $\mu$ M).

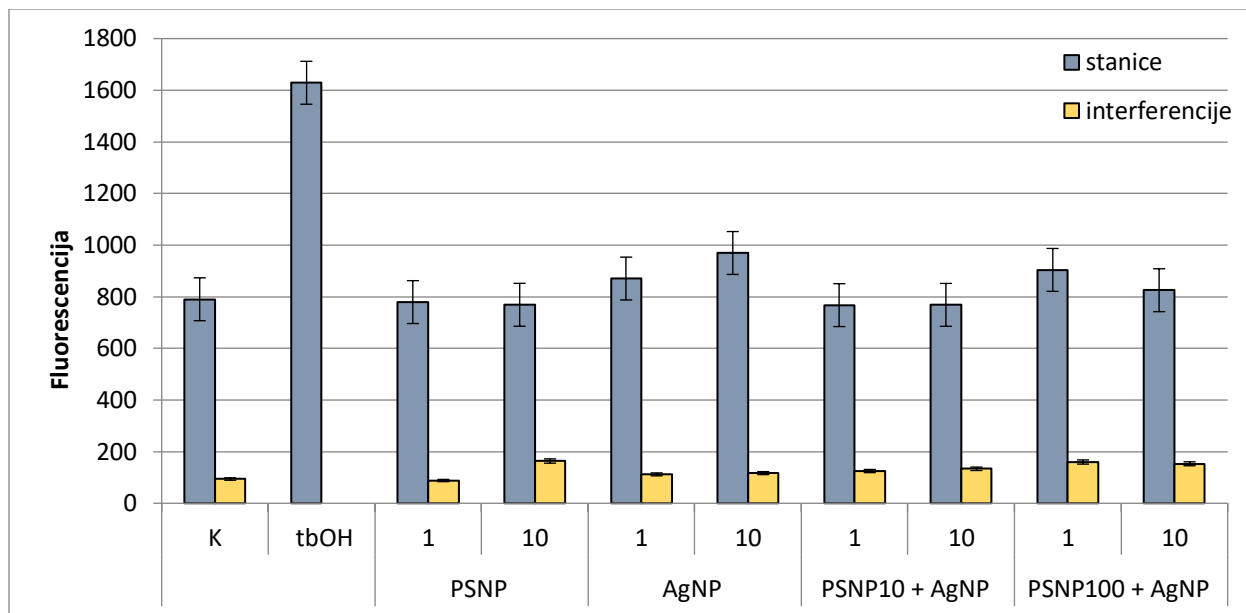
Rezultati za Jurkat staničnu liniju (*Slika 12.*) Monoklorobiman testa pokazali su veću razinu oksidativnog stresa kod nižih koncentracija nanočestica u odnosu na veće koncentracije.



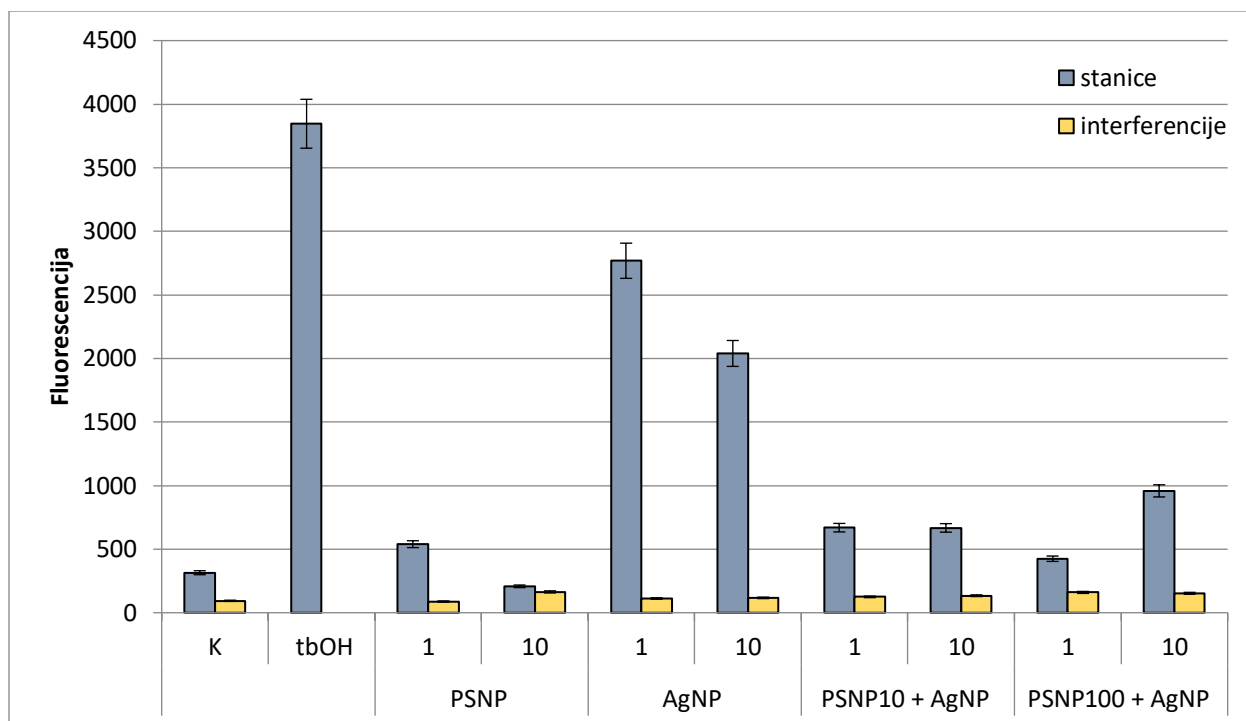
*Slika 12.* Procjena oksidativnog stresa u Jurkat stanicama mjerena korištenjem fluorescentne probe mBCL. K označava kontrolnu vrijednost, a korištena je ultračista voda (UPW). Za pozitivnu kontrolu korištena je otopina TbOH (1,6  $\mu$ M).

Pojava oksidativnog stresa istražena je i korištenjem DCFH-DA testa na protočnom citometru, pri uvjetima nastanka proteinske korone (DMEM + 10% FBS). Test DCFH-DA mjeri ukupne slobodne radikale u stanici. Rezultati kod HepG2 stanične linije (*Slika 13.*) ne pokazuju indukciju oksidativnog stresa pri testiranim koncentracijama nanočestica. Rezultati kod stanične linije Jurkat (*Slika 14.*) pokazali su indukciju oksidativnog stresa i stvaranje reaktivnih vrsta kisika nakon tretmana PVPAgNP, dok tretman PSNP nije značajno povišio razinu ROS-a u Jurkat stanicama. Možemo vidjeti da Jurkat stanice tretirane kombinacijama srebrnih i polistrenskih nanočestica također nisu pokazale pojačanu produkciju ROS-a, što ukazuje da bi nanočestice polistirena mogle imati određene zaštitne učinke.





Slika 13. Procjena oksidativnog stresa u HepG2 stanicama mjerena korištenjem fluorescentne probe DCFH-DA. K označava kontrolnu vrijednost, a korištena je ultračista voda (UPW). Za pozitivnu kontrolu korištena je otopina TbOH (25,0  $\mu$ M).



Slika 14. Procjena oksidativnog stresa u Jurkat stanicama mjerena korištenjem fluorescentne probe DCFH-DA. K označava kontrolnu vrijednost, a korištena je ultračista voda (UPW). Za pozitivnu kontrolu korištena je otopina TbOH (25,0  $\mu$ M).

## 5. Rasprava

S obzirom na sve veći broj istraživanja upotrebe nanomaterijala i nanotehnologije u različitim granama industrije u kojima se nanotehnologija primjenjuje, značajno je porastao i broj toksikoloških istraživanja nanočestica. Do sada je većina istraživanja provedena na bakterijama, algama, životinjskim i ljudskim stanicama iz kojih su dobiveni brojni pozitivni i negativni rezultati utjecaja nanočestica (Navarro i sur. 2008). Usprkos toj činjenici brojna pitanja na tu temu su i dalje otvorena.

U ovom radu prvo je provedena karakterizacija i testiranje stabilnosti nanočestica jer karakteristike nanočestica u različitim medijima i uvjetima mogu utjecati na interakcije nanočestica sa stanicama. Tijekom istraživanja metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti nanočesticama srebra i polistirena određena je distribucija veličina s obzirom na volumen pomoću parametra - hidrodinamičkog polumjera (nm) (Tablica 2). Nanočestice srebra i polistirena većinom su pokazale monomodalnu distribuciju veličina, dok su njihove kombinacije bimodalnu distribuciju veličina. Stvaranje proteinske korone smanjuje aglomeraciju, a događa se u mediju sa dodatkom seruma goveđeg fetusa (DMEM + 10% FBS). Metodom elektroforetskog raspršenja svjetlosti nanočestice srebra i polistirena u ultračistoj vodi pokazale su kako su stabilne jer ih karakterizira zeta ( $\zeta$ ) potencijal niži od  $-30 \text{ mV}^2$  (Tablica 3). Vežanje proteina u staničnom mediju sa dodatkom goveđeg fetusa omogućuje stabilizaciju nanočestica, u odnosu na stanični medij gdje se apsolutna vrijednost zeta potencijala smanjuje. Ultra čista voda ima manju ionsku jakost u odnosu na stanični medij te je zbog toga prosječni hidrodinamički volumen manji u ultra čistoj vodi za srebrne i polistirenske nanočestice. Tijekom istraživanja proveden je test stabilnosti nanočestica u staničnom mediju bez serumskih proteina (DMEM) i u staničnom mediju sa serumom goveđeg fetusa (DMEM + 10% FBS). Nanočestice su pokazale veću stabilnost u vodenoj otopini te smanjenu stabilnost u staničnom mediju s dodatkom seruma goveđeg fetusa.

Prije početka istraživanja, na staničnim linijama HepG2 i Jurkat napravljena je procjena interferencije srebrnih nanočestica veličine 50 nm i polistirenskih nanočestica veličine 20 nm jer su u prijašnjim istraživanjima pokazane interferencije nanočestica srebra s testovima in vitro (Vinković Vrček i sur. 2015). Rezultat je pokazao interferencije oba tipa nanočestica testom MTS što potvrđuje rezultate prijašnjih istraživanja. Osim MTS testa, interferencija nanočestica mjerena je i s testom DCFH-DA kojim je pokazano smanjivanje signala fluorescencije zbog interferencija srebrnih nanočestica s tom kemikalijom. Zbog dobivanja pouzdanijih rezultata, stanična vijabilnost, osim MTS i DCFH-DA testa, ispitana je i na protočnom citometru.

Statistički obrađeni podaci su prikazani za parametar MTS testa, dok za ostale parametre to nije bilo moguće napraviti jer su istraživanja za njih provedena u nedovoljnom broju replika.

Stanična vijabilnost Jurkat i HepG2 staničnih linija testirana je MTS i Live/Dead testom pri uvjetima dodatka seruma goveđeg fetusa u staničnom mediju u trajanju od 24 sata. Pri takvim uvjetima nastaje proteinska korona oko PVPAgNP i PSNP. Kod stanične linije HepG2, kombinirani tretman 100 ppm PSNP + AgNP uzrokuje statistički značajno povećanje relativne vijabilnosti, odnosno proliferacijski učinak, dok tretman s 100 ppm PSNP u kombinaciji s nižim koncentracijama AgNP je izazvao statistički značajno smanjenje vijabilnosti stanica. Isti učinak imao je i AgNP u koncentraciji od 1 ppm (*Slika 8.*). MTS test na staničnoj liniji Jurkat nije pokazao značajno smanjenje stanične vijabilnosti pa zbog toga ti rezultati nisu prikazani u ovom radu. Na protočnom citometru testirana je vijabilnost staničnih linija HepG2 (*Slika 9.*) i Jurkat (*Slika 10.*) pri jednakim uvjetima kao u testu MTS. Ako se usporede rezultati djelovanja srebrnih nanočestica protočne citometrije s testom MTS kod HepG2 stanične linije, uočljivo je kako se na MTS testu smanjenjem koncentracije nanočestica i toksičnost smanjuje, dok je kod protočne citometrije vidljivo da se smanjenjem koncentracija toksičnost povećava. Takvi rezultati već su dobiveni u prijašnjim istraživanjima brojnih znanstvenika (Vinković Vrček i sur. 2016). Također, u prijašnjim istraživanjima je dokazana mogućnost da proteinska korona utječe na agregaciju srebrnih nanočestica što dovodi do smanjenja citotoksičnosti kod viših koncentracija (Moore i sur. 2015). Kombinirani tretman na Jurkat stanicama s PVPAgNP i PSNP pokazao se citotoksičnijim od pojedinačnih tretmana s istim koncentracijama nanočestica. Kombinacija 100 ppm PSNP i 10 ppm PVPAgNP, što pojedinačno nije narušilo staničnu vitalnost, značajno je smanjila postotak živih stanica nakon 24 sata. Tek se treba detaljnije objasniti točan mehanizam interakcije s nanočesticama unutar mješavine i na staničnoj površini, no vidljivo je kako povećana citotoksičnost ukazuje na mogućnost zajedničkog mehanizma djelovanja.

Rezultati za HepG2 staničnu liniju (*Slika 11.*) testa s monoklorobimanom pokazali su veću indukciju oksidativnog stresa nakon tretmana s PVPAgNP i PSNP, dok tretman kombinacijom nanočestica nije povisio razinu oksidativnog stresa u HepG2 stanicama. Rezultati za Jurkat staničnu liniju (*Slika 12.*) testa s monoklorobimanom pokazali su veću razinu oksidativnog stresa kod nižih koncentracija nanočestica u odnosu na veće koncentracije. Moguće je da je vrijeme inkubacije od 24 sata nakon tretmana stanica nanočesticama predugo, pa je zabilježeno smanjenje fluorescencije odnosno količine GSH.

Rezultati testa DCFH-DA kod HepG2 stanične linije (*Slika 13.*) ne pokazuju indukciju oksidativnog stresa pri testiranim koncentracijama nanočestica. Preduga inkubacija nakon tretmana stanica nanočesticama (24 h) je mogući uzrok što se nije uspio dokazati oksidativni stres koji bi možda bio zabilježen nakon kraće inkubacije. Slična zapažanja su zabilježena u istraživanjima Zannete i sur. 2011. Rezultati testa DCFH-DA kod stanične linije Jurkat (*Slika 14.*) pokazali su indukciju oksidativnog stresa i stvaranje reaktivnih vrsta kisika tretiranim PVPAgNP, dok tretman PSNP nije značajno povisio razinu ROS-a u Jurkat stanicama. Jurkat stanice tretirane kombinacijama srebrnih i polistrenskih nanočestica također nisu pokazale pojačanu produkciju ROS-a, što navodi

na zaključak da nanočestice polistirena mogu imati određene zaštitne učinke u proizvodnji ROS-a (Vinković Vrček i sur. 2015).

## 6. Zaključak

Nakon provedenog istraživanja može se zaključiti:

- nanočestice srebra veličine 50 nm (PVPAgNP) i nanočestice polistirena (PSNP) veličine 20 nm stabilne su u vodenoj otopini te su smanjene stabilnosti u staničnom mediju s dodatkom seruma goveđeg fetusa
- srebrne i polistirenske nanočestice pokazuju interferencije s testovima vijabilnosti MTS i protočne citometrije te testom oksidativnog stresa DCFH-DA
- kombinirani tretman s 100 ppm PSNP i 10 ppm PVPAgNP na Jurkat staničnoj liniji se pokazao citotoksičnijim od pojedinačnih tretmana s istim koncentracijama nanočestica, a Jurkat stanična linija pokazala se osjetljivijom od HepG2 stanične linije
- tretman nanočesticama nije izazvao oksidativni stres u staničnim linijama

Zaključno, pojedini tretmani nanočestica testiranih u ovom radu pokazali su utjecaj na vijabilnost staničnih linija te bi stoga i njihova buduća primjena mogla imati negativan utjecaj na brojne biološke sustave pa tako i na ljudsko zdravlje. Ovaj je rad pokazao i značaj istraživanja kombiniranog djelovanja nanočestica, a ne samo njihovih pojedinačnih koncentracija.

## 7. Literatura

Abraham R.T., Weiss A. (2004): Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nature Reviews Immunology* **4**: 301-308.

Aggarwal P., Hall J.B., McLeland C.B., Dobrovolskaia M.A., McNeil S.E. (2009): Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and the therapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**: 428–437.

Blinova I., Niskanen J., Kajankari P., Kanarbik L., Käkinen A., Tenhu H., Penttinen O.-P., Kahru A. (2013): Toxicity of two types of silver nanoparticles to aquatic crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Environmental Science and Pollution Research* **20**: 3456–3463.

Bondarenko O., Juganson K., Ivask A., Kasemets K., Mortimer M., Kahru A. (2013): Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Archives of Toxicology* **87**: 1181-1200.

Bozich J. S., Klaper R. D., Lohse S. E., Murphy C. J., Torelli M. D., Hamers R. J. (2014): Surface chemistry, charge and ligand type impact the toxicity of gold nanoparticles to *Daphnia magna*. *Environmental Science: Nano* **1**: 260–270.

Cheeseman K.H., Slater T.F. (1993) An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* **49**: 481-493.

Daraio C., Jin S. (2012): Synthesis and patterning methods for nanostructures useful for biological applications. U: Silva G.A., Parpura V. (ur.) *Nanotechnology for biology and medicine: At the building block level*. New York, Springer Science+Business Media Inc., str. 27-44.

El-Badawy A., Feldhake D., Venkatapathy R. (2010): State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, 600, 72-84.

Feldmann C., Goessmann H. (2010): Nanoparticulate functional materials. *Angewandte Chemie International Edition* **49**: 1362 – 1395.

Firdhouse M.J., Lalitha P. (2015): Biosynthesis of silver nanoparticles and its application. *Journal of Nanotechnology* **2015**: Article ID 829526.

Frattini A., Pellegrini N., Nicastro D., Sanctis O. D. (2005): Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes. *Materials Chemistry and Physics* **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 Research International* **2014**: 1-8.

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. *Analytical chemistry* **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.

Gurman J.L., Baier L., Levin B.C. (1987): Polystyrenes: A review of the literature on the products of thermal decomposition and toxicity. *Fire and Materials* **11**, 109–130.

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

Hewitt N.J., Hewitt P. (2004): Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica* **34**: 243-256.

Hoo C.M., Starostin N., West P., Mecartney M.L. (2008): A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research* **10**: 89-96.

Horie M., Kato H., Fujita K., Endoh S., Iwahashi H. (2012): In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology* **25**: 605–619.

Ju-Nam Y., Lead J.R. (2008): Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of the Total Environment* **400**: 396–414.

Jurašin D.D., Čurlin M., Lovrić M., Gajović S., Capjak I., Crnković T., Babič M., Horák D., Vinković V.I. (2016): Surface coating affects behavior of metallic nanoparticles in a biological environment. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **7**: 246–262.

Kamencic H., Lyon A., Paterson P.G., Juurlink B.H.J. (2000): Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Analytical Biochemistry* **286**: 35–37.



Kerksick C., Willoughby D. (2005): The antioxidant role of glutathione and n-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* **2**: 38-44.

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

Lanje A.S., Sharma S.J., Pode R.B. (2010): Synthesis of silver nanoparticles: a safer alternative to conventional antimicrobial and antibacterial agents. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **2**:478-483.

Loos, C., Syrovets, T., Musyanovych, A., Mailänder, V., Landfester, K., Nienhaus, G.U., Simmet, T. (2014): Functionalized polystyrene nanoparticles as a platform for studying bio-nano interactions. *Beilstein journal of nanotechnology* **5**: 2403–2412.

Mahler G.J., Esch M.B., Tako E. (2012): Oval exposure to polystyrene nanoparticles affects iron absorption. *Nature Nanotechnology* **7**: 264-271.

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. *Journal of Applied Toxicology* **30**: 74–83.

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

Mersch-Sundermann V., Knasmüller S., Wu X.J., Darroudi F., Kassie F. (2004) Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology* **198**: 329–340.

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. *Journal of the American Chemical Society* **133**: 2525–2534.

Montano M. (2014): Model systems. U: Montano M. (ur.) *Translational Biology in Medicine*. Woodhead Publishing Series in Biomedicine, str. 9-33.

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. *Chemical Society Reviews* **44**: 6287-6305.

Mout R., Moyano D.F., Rana S., Rotello V.M. (2012): Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chemical Society Reviews* **41**: 2539–2544.

- Navarro E., Piccapietra F., Wagner B., Marconi F., Kaegi R., Odzak N., Sigg L., Behra R. (2008): Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Technology* **42**: 8959-8964.
- Nowack B., Bucheli T.D. (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution* **50**: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. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **18**: 6653–6670.
- Pecora R. (2000): Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research* **2**: 123–131.
- Roco M.C. (2007): National nanotechnology initiative-Past, present, future. U: William A.G. III, Donald B., Sergey E.L., Gerald J.I. (ur.) *Handbook on Nanoscience, Engineering and Technology*. Boca Raton: CRC Press, str. 14-26.
- Seetharam R.N., Sridhar K.R. (2007): Nanotoxicity: Threat posed by nanoparticles. *Current Science*. **93(6)**: 769-770.
- Stensberg M.C., Madangopal R., Yale G., Wei Q., Ochoa-Acuña H., Wei A., Mclamore E.S., Rickus J., Porterfield D.M., Sepúlveda M.S. (2014): Silver nanoparticle-specific mitotoxicity in *Daphnia magna*. *Nanotoxicology* **8**: 833-842.
- Thomas R. (2004):. *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners, Third Edition (Practical Spectroscopy)*. Boca Raton, CRC Press.
- Tolaymat T., El Badawy A., Genaidy A., Scheckel K., Luxton T., Suidan M. (2010): An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of Total Environment* **408**: 999-1006.
- Ulm L., Krivohlavek A., Šikić S., Jurašin D., Ljubojević M., Šinko G., Vinković Vrček I., Crnković T., Žuntar I. (2015): Response of biochemical biomarkers in the aquatic crustacean *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research* **22**: 19990–19999.
- Vance M.E., Kuiken T., Vejerano E.P., McGinnis S.P., Hochella M.F., Rejeski D., Hull M.S. (2015): Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **6**:1769-1780.

Varela J.A.P., Bexiga M.G., Åberg C., Simpson J.C., Dawson K.A. (2012): Quantifying size-dependent interactions between fluorescently labeled polystyrene nanoparticles and mammalian cells. *Journal of Nanobiotechnology* **10**: 39-39.

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 Advances* **5**: 70787-70807.

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. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 50781–50790.

Xu R., Scarlett B. (2002). Particle characterization: Light scattering methods. Dordrecht: Springer Netherlands.

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. *Toxicology In Vitro* **25**: 1053–1060.

Internetske stranice:

<https://worldwide.promega.com/>, pristupljeno 02.07.2020.

## 8. Životopis

Rođena sam 3. veljače 1996. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završila sam u OŠ „Josipa Kozarca“ u Lipovljanima, a srednju školu u općoj gimnaziji „Tin Ujević“ Kutina. Još dok sam pohađala opću gimnaziju, rodila se ljubav prema prirodi, posebno istraživačkom djelu. Stoga sam preddiplomski studij upisala na Šumarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Urbano šumarstvo, zaštita prirode i okoliša. Tijekom preddiplomskog studija bila sam demonstratorica na kolegiju Dendrologija te sam studij završila 2018. godine s temom „Ptice močvarice Parka prirode Lonjsko polje“ pod mentorstvom prof.dr.sc. Josipa Margaletić.

Iste 2018. godine upisala sam diplomski studij na Prirodoslovno - matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Ekologija i zaštita prirode. Zanimanje i ljubav prema istraživanjima i dijelu ekotoksikologije probudila se u prvom semestru diplomskog studija te se nadam da je ovo samo početak i da će se nastaviti i nakon završetka studija.