Karakterizacija nanočestica srebra i njihova interakcija s alfa kiselim glikoproteinom

Pezo, Anuka

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:560592

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Anuka Pezo

Karakterizacija nanočestica srebra i njihova interakcija s alfa kiselim glikoproteinom

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

Zahvaljujem se svojim mentorima dr. sc. Ivani Vinković Vrček i izv. prof. dr. sc. Mariju Gabričeviću na ukazanom povjerenju i strpljenju, te pruženom znanju i iskustvu. Također se zahvaljujem Ivoni Capjak, mag. pharm. iz Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu na pruženoj pomoći u eksperimentalnom dijelu ovog rada.

SADRŽAJ

1.UVOD 1
1.1. Nanomaterijali 1
1.2. Nanočestice srebra i njihova primjena 2
1.3. Interakcija nanočestica s proteinima plazme 3
1.4. Proteinska korona 4
1.5. Alfa-1-kiseli glikoprotein 7
2.OBRAZLOŽENJE TEME 8
3.MATERIJALI I METODE 9
3.1. Priprema nanočestica srebra 9
3.1.1. Sintetski postupci pripreme nanočestica srebra 12
3.2. Metode karakterizacije nanočestica srebra i njihova interakcija s alfa 1-kiselim glikoproteinom 13
3.2.1. Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti 13
3.2.2. Metoda elektroforetskog raspršenja svjetlosti 14
3.2.3 Transmisijska elektronska mikroskopija 14
3.2.4 UV-vis spektroskopija 15
3.3 Metode kvantifikacije vezanja nanočestica srebra i alfa-1-kiselog glikoproteina 16
3.3.1 Flourimetrija 16
3.3.2 Cirkularni dikroizam 17
4. REZULTATI I RASPRAVA 18
4.1. Fizikalno-kemijske karakteristike nanočestica srebra 18
4.2. Vezanje alfa-1-kiselog glikoproteina na nanočestice srebra 22
5. ZAKLJUČAK 26
6.LITERATURA 27
7.SAŽETAK/SUMMARY 30
7.1. Sažetak 30
7.2. Summary 31
8.PRILOZI 32
8.1. UV-Vis spektri nanočestica srebra 32
9.TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

POPIS KRATICA I SIMBOLA

α-1aGP – alfa-1 kiseli glikoprotein (od eng. alpha-1 acid glycoprotein)

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

AOT – natrijev bis(2-etilheksil)-sulfosukcinat

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

CTAB – cetiltrimetilamonijev bromid

CTAB-AgNP – nanočestice srebra obložene cetiltrimetilamonijevim bromidom

d_H – hidrodinamički promjer [nm]

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

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

NP – nanočestice (od eng. *NanoParticles*)

pI – izoelektrična točka

PLL – ε-poli-L-lizin

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

PVP – poli(vinilpirolidon)

PVP-AgNP – nanočestice srebra obložene poli(vinilpirolidonom)

SD – standardna devijacija

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

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

POPIS SLIKA

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

Slika 1.2. Sektori u kojima se primjenjuje nanosrebro (preuzeto iz Height MJ, 2011)

Slika 1.4.1. Shematska ilustracija i karakteristike tvrde i meke proteinske korone (preuzeto iz Rahman i sur., 2013)

Slika 1.4.2. Prikaz Scatchardov-og dijagrama

Slika 1.5. alfa-1-kiseli glikoprotein (preuzeto s RCSB Protein Dana Bank)

Slika 3.1. Top-down i bottom-up pristup sintezi nanočestica (Ju-Nam Y. i sur., 2008.)

Slika 4.1.1 TEM prikaz AOT-AgNP u ultračistoj vodi

Slika 4.1.2 TEM prikaz CTAB-AgNP u ultračistoj vodi

Slika 4.1.3 TEM prikaz PLL-AgNP u ultračistoj vodi

Slika 4.1.4 TEM prikaz PVP-AgNP u ultračistoj vodi

Slika 4.2.1. Primjer logaritamske krivulje AOT-AgNP stvorene u SPECFIT-u. Na apscisi se nalaze koncentracije AgNP, a na ordinati intenzitet fluorescencije alfa-1aGP stalne koncentracije na 380 nm.

Slika 4.2.2. Dijagram omjera alfa zavoja i beta ploča u strukturi alfa-1 kiselog glikoproteina ovisno o koncentraciji AOT-AgNP

Slika 4.2.3 Dijagram omjera alfa zavoja i beta ploča u strukturi alfa-1 kiselog glikoproteina ovisno o koncentraciji CTAB-AgNP

Slika 4.2.4. Dijagram omjera alfa zavoja i beta ploča u strukturi alfa-1 kiselog glikoproteina ovisno o koncentraciji PLL-AgNP

Slika 4.2.5. Dijagram omjera alfa zavoja i beta ploča u strukturi alfa-1 kiselog glikoproteina ovisno o koncentraciji PVP-AgNP

Slika 8.2.1. UV-Vis spektar AOT-AgNP (10 uM i 50 uM) u ultračistoj vodi

Slika 8.2.2. UV-Vis spektar CTAB-AgNP (10 uM i 50 uM)

Slika 8.2.3. UV-Vis spektar PLL-AgNP (10 uM i 50 uM)

Slika 8.2.4. UV-Vis spektar PVP-AgNP (10 uM i 50 uM)

POPIS TABLICA

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

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

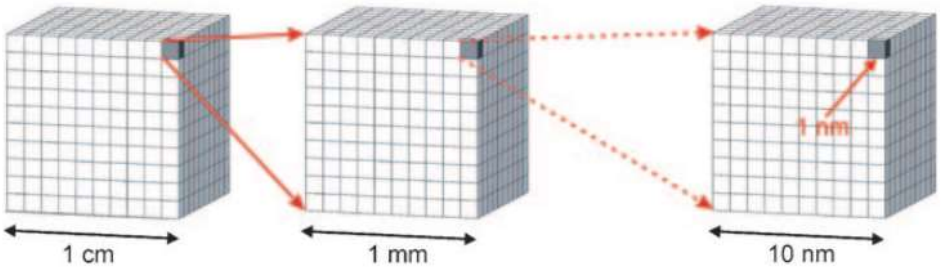
Tablica 4.1.c. Optički parametri nanočestica srebra u ultračistoj vodi (UV)

Tablica 4.2.a. Izračunate konstante vezanja gašenjem fluorescencije alfa-1aGP u prisutnosti nanočestica srebra u ultračistoj vodi

1. UVOD

1.1. Nanomaterijali

Posljednje desetljeće bilježi izrazit porast primjene nanomaterijala u biomedicini zbog vrlo atraktivnih fizikalno-kemijskih svojstava nanočestica koji su sastavni dijelovi tih materijala. Prefiks ″nano″ označava čestice koje barem jednu dimenziju imaju u rasponu od 1 do 100 nm, te je njihovo osnovno obilježje veliki omjer površine u odnosu na volumen. Kao primjer se može uzeti model kocke duljine bridova 1 cm koja ima volumen 1 cm^3 i površinu od 0.0006 m^2 (Slika 1.1.). Dijeljenjem te kocke na manje kockice duljine bridova 1 nm ostaje jednak volumen, međutim površina poraste čak 10^7 puta.



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

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

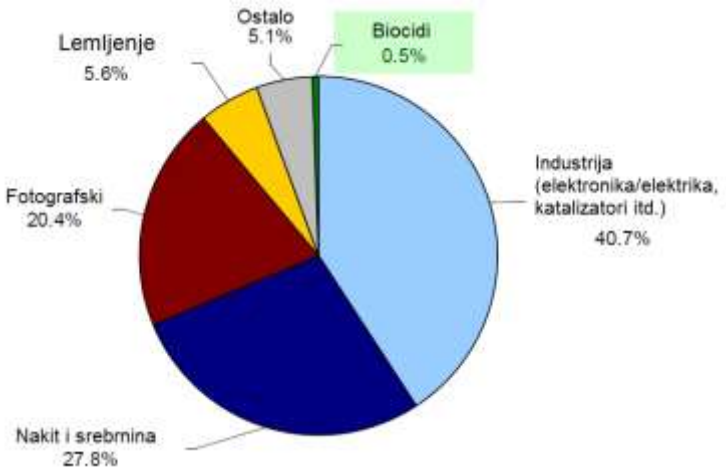
Zbog velikog broja nezasićenih veznih i koordinacijskih mjesta te slabo vezanih atoma na površini nanočestica, njihova fizikalno-kemijska, biološka i optička svojstva se uvelike razlikuju od makro- i mikroskopskih materijala (Goesmann i Feldman, 2010.). Nanočestice također pokazuju fenomen površinske plazmonske rezonancije (SPR, od engl. Surface Plasmon Resonance) koji je posljedica kolektivnih oscilacija ili fluktuacija u elektronskoj

gustoći s interaktivnim električnim poljem, a koje su izrazito osjetljive na adsorpciju molekula na metalne površine.

Zbog svih navedenih osobina nanomaterijali su pogodni za primjenu u različitim tehnologijama.

1.2. Nanočestice srebra i njihova primjena

Nanočestice srebra (AgNP, od eng. Ag NanoParticles) su jedne od najkomercijaliziranijih metalnih nanočestica, te danas imaju vrlo raširenu primjenu i upotrebu u mnogim područjima. Osim vrlo specifičnih električnih, optičkih i reaktivnih svojstava, one su izuzetno zanimljive za primjenu u biomedicini radi izraženih antibakterijskih, antifungalnih, antivirusnih i protuupalnih svojstava (Slika 1.2.). Uz to, u kombinaciji s antibioticima poput penicilina G, amoksicilina, eritromicina, klindamicina ili vankomicina pojačavaju djelovanje tih antibiotika u tretiranju infekcija izazvanih rezistentnim *Staphylococcus aureus* i *Escherichia Coli* sojevima (Wijnhoven i sur., 2009).
Osim toga, AgNP u industriji nalaze primjenu kao katalizatori, nanokonektori i nanoelektrode za elektroničke uređaje, u optici, memorijskim uređajima, kao kapacitatori (Tolaymat i sur., 2010.), a u svakodnevnim proizvodima ih nalazimo u tekstilu s antibakterijskim svojstvima, šamponima, filterima za zrak, spremnicima za hranu, premazima za hladnjake, itd. (Klaine i sur., 2012.).



Slika 1.2. Sektori u kojima se primijenjuje nanosrebro (preuzeto iz Height MJ, 2011)

Napredak u području nanomaterijala omogućio je pripravljanje AgNP različitih oblika, veličina i površinskih svojstava. Najveći izazov pri sintezi je kontrola veličine i oblika čestica, morfologije, kemijskog sastava i kristalne strukture.

Međutim, ovako široka primjena AgNP povećava također mogućnost izravnog i neizravnog utjecaja na žive organizme, te može dovesti do brojnih negativnih posljedica na ljudsko zdravlje i okoliš. Tako je pokazano da dermalna primjena AgNP u previsokim koncentracijama može uzrokovati mitohondrijima uvjetovanu apoptozu, a primjenom na kožu oštećenu opeklinama uzrokuju promjene boje kože, kao i povišene koncentracije srebra u plazmi i urinu. Ljudi mogu biti izloženi nanočesticama putem različih načina unosa (udisanje, gutanje, injektiranje...) i potreban je oprez, jer istraživanja pokazuju da čak i male koncentracije AgNP mogu biti toksične (Asharani i sur., 2009).

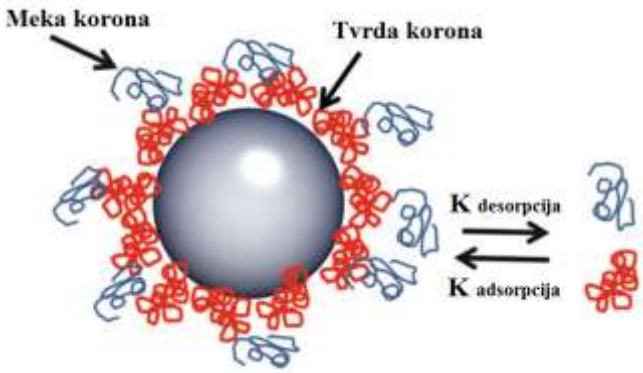
1.3. Interakcija nanočestica s proteinima plazme

Nanočestice ulaze u interakciju sa stanicama i općenito živim organizmima na fundamentalno drugačiji način od ostalih makro- i mikroskopskih materijala. Čestice manje od 100 nm mogu ući u stanicu, manje od 40 nm mogu ući u jezgru, a čestice manje od 35 nm mogu proći krvno-moždanu barijeru (Saptarshi i sur., 2013). Nanočestice korištene u medicinske svrhe često se daju parenteralno, dok se AgNP danas koriste kao biocidni površinski slojevi na kateterima, stentovima, uređajima za dijalizu, koštanim implantatima, i sl. Pri takvim načinima primjene, nanočestice dolaze u kontakt s krvi. Krvna plazma sadrži nekoliko tisuća različitih proteina. Osim proteina, lipidi su također dostupni u krvnoj plazmi. Stoga, nakon kontakta nanočestica s krvi, biološke molekule dolaze u kontakt s nanočesticama pri čemu dolazi do vezanja tih biomolekula na površinu nanočestica (M. Rahman i sur., 2013). Proteini u interakciji s nanočesticama djeluju kao surfaktanti. Elektrostatske, disperzne i kovalentne interakcije dovode do adsorpcije proteina na površinu nanočestica i posljedično do promjene njihove konformacije (Moerz i sur., 2015). Vezanje proteina na planarne površine često dovodi do značajnih promjena u sekundarnoj strukturi, iako velika zakrivljenost nanočestica može pomoći proteinima da sačuvaju početnu strukturu (Rahman i sur., 2013). Adsorpcija proteina na nanočestice događa se isključivo zbog povećanja ukupne entropije proteina na površini nanočestica i zbog nespecifičnih interakcija između proteina i nanočestica što ovisi o fizikalno-kemijskim obilježjima kako nanočestica tako i proteina (Nakanishi i sur., 2001; Walkey i sur., 2012). Jedna od značajnijih nespecifičnih, nekovalentnih vezanja između

nanočestica i proteina čine hidrofobne interakcije u kojima hidrofobni dijelovi molekula međusobnim vezanjem istiskuju molekule vode sa svoje površine i na taj način postaju stabilnije. Također, količina i vrsta proteina na površini nanočestica utječu na biodistribuciju i biološki identitet samih čestica. Biološki identitet određuje fiziološki odgovor uključujući aglomeraciju, stanični unos, cirkulaciju, signalizaciju, transport, bioakumulaciju i toksičnost (M. Rahman i sur., 2013).

1.4. Proteinska korona

Proteini koji se nakon kontakta s nanočesticama adsorbiraju na njihovu površinu čine tzv. proteinsku koronu, čiji nastanak i svojstva ovise o afinitetu proteina prema nanočesticama i o protein-proteinskim interakcijama. Proteini koji imaju visoki afinitet vezanja na nanočestice tvore tzv. *tvrdu koronu* koja se sastoji od čvrsto vezanih proteina koji se ne mogu desorbirati, dok proteini koji imaju nisak afinitet vezanja na naočestice čine tzv. *meku koronu* (Slika 1.4). Tvrde i meke korone također se mogu definirati na temelju vremena razmjene koje za tvrdu koronu iznosi i do nekoliko sati, dok proteini meke korone mogu imati vremena izmjene do nekoliko sekundi Model proteinske korone prvi su predložili Simberg i suradnici (Simberg i sur.,2009). Hipoteza tvrdi da proteini tvrde korone tzv. primarno vezani proteini izravno utječu na površinu nanočestice, dok su proteini meke korone tzv. sekunardno vezani proteini u interakciji s tvrdom koronom preko protein-proteinskih interakcija. Takva višeslojna struktura značajna je kod fiziološkog odgovora jer sekunadrno vezani proteini mogu mijenjati aktivnost primarno vezanih proteina ili ih maskirati i na taj način spriječiti njihovu interakciju s okolišem.



Slika 1.4.1 Shematska ilustracija i karakteristike tvrde i meke proteinske korone (preuzeto iz Rahman i sur., 2013)

Debljina proteinske korone ovisi o nekoliko faktora kao što je koncentracija proteina, veličina te površinska svojstva čestica. Debljina proteinskih korona koje nastaju nakon izlaganja nanočestica proteinima plazme iznosi oko 3-15 nm što je predebelo za samo jedan sloj adsorbiranih proteina, te se sastoje od više slojeva. Razni parametri kao što su veličina nanočestica, oblik, zakrivljenost, površinski naboj (zeta potencijal), topljivost i put primjene nanočestica utječu na sastav, debljinu i konformaciju proteinske korone. No, od značajnije uloge i utjecaja na stvaranje proteinske korone ima površinski naboj nanočestica i hidrofobnost. Hidrofobnost utječe i na količinu i na sastav apsorbiranih proteina. Povećana adsorpcija proteina na hidrofobne površine za razliku od hidrofilnih površina povećava brzinu opsonizacije nanočestica (Rahman i sur. 2013). Površinski naboj čestica je također parametar koji značajno utječe na stvaranje proteinske korone. Povećanjem naboja na površini nanočestica povećava se i adsorpcija proteina. Pozitivno nabijene nanočestice preferiraju adsorpciju proteina s izoelektričnim točkama (pI) manjima od 5.5 poput albumina, dok negativni površinski naboj bolje adsorbira proteine s pI iznad 5.5 poput IgG-a (Aggarwal i sur., 2009). Površinska funkcionalizacija nanočestica zbog toga značajno određuje stvaranje proteinske korone, te se korištenjem raznih presvlaka i stabilizatora može smanjiti/povećati adsorpcija proteina ili modelirati građa proteinske korone na nanočesticama.

Zbog zakrivljenosti površine afiniteti vezanja proteina se razlikuju za nanočestice i ravne površine. Dakle, rezultati dobiveni na ravnim površinama se ne mogu ekstrapolirati na nanočestice. Sastav proteinske korone različit je za istu vrstu nanočestica drugačije veličine. Razlika u sastavu i organizaciji proteina korone je jako značajna kada se veličina nanočestica približi veličini proteina (Lynch i Dawson, 2008). Jako zakrivljene površine nanomaterijala smanjuju interakcije između proteina i proteini adsorbirani na jako zakrivljenim nanočesticama prolaze kroz manje promjena u svojoj konformaciji.

Načelo vezanja proteina i liganda može se prikazati jednostavnom jednadžbom 2. reda:

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

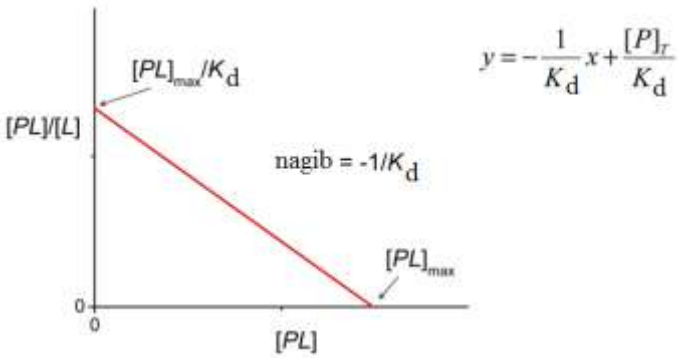
gdje su k_a i k_d konstante brzine asocijacije i disocijacije, P je protein, L je ligand, a PL je protein-ligand kompleks. Iz ove jednadžbe se mogu dobiti ravnotežne konstante asocijacije (K_a) i disocijacije (K_d):

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

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

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

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



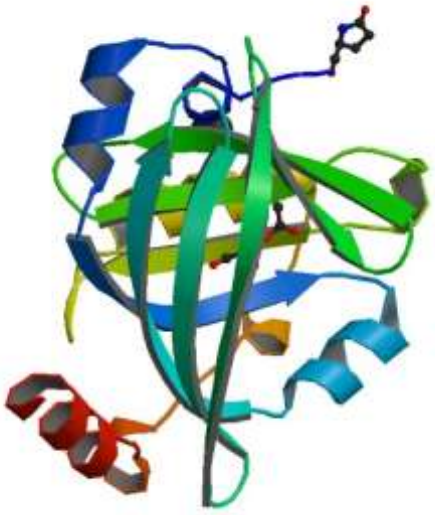
Slika 1.4.2. Prikaz Scatchardov-og dijagrama

Ovaj prikaz se zove Scatchardov dijagram, no njegova je mana da iskrivljava eksperimentalne greške. Danas se ovaj dijagram rijetko koristi zbog dostupnih računalnih

programa uz koje se jednostavno mogu izračunati ravnotežne konstante bez linearizacije (Hegyi i sur., 2013).

1.5. Alfa-1-kiseli glikoprotein

α1-kiseli glikoprotein (alfa-1aGP) je važan transportni protein krvne plazme koji veže mnoge lijekove i ksenobiotike. Kao akutni fazni protein snažno utječe na farmakokinetiku i farmakodinamiku mnogih lijekova. Spada u skupinu serumskih glikoproteina te ima molekularnu masu od 41-43 kDa (Gornik i Lauc, 2008). Oko 45% ukupne mase čini pet *N*-vezanih glikana dok se proteinski dio sastoji od jednog lanca dužine 183 aminokiseline koji je kodiran s tri različita gena. U proteinskom dijelu nalaze se i dva disulfidna mosta (Fournier i sur., 2000). Na krajevima glikanskih lanaca nalaze se sijalinske kiseline zbog kojih je α1-kiseli glikoprotein negativno nabijen pri fiziološkom pH. Upravo zbog svojeg negativnog naboja α1-kiseli glikoprotein je pogodan supstrat za vezanje bazičnih i neutralnih lipofilnih lijekova te steroidnih hormona u krvi. Vibracijska spektroskopija potvrdila je detalje sekundarne strukture i strukturnog sadržaja predviđenog homolognim modeliranjem proteinskog dijela, tj. 15% alfa heliksa, 41% beta-ploča, 12% beta-zavoja, 8% bendova i 24% neuređene strukture na pH 7.4 (Kopecký V Jr i sur., 2003). α1-kiseli glikoprotein (Slika 1.5.) odabran je za ovo istraživanje kao proteinski model zbog svoje dobre topljivosti u vodi te fiziološkog značaja i biomedicinske primjene što je važno za studije interakcija.



Slika 1.5. α1-kiseli glikoprotein (preuzeto s RCSB Protein Dana Bank)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

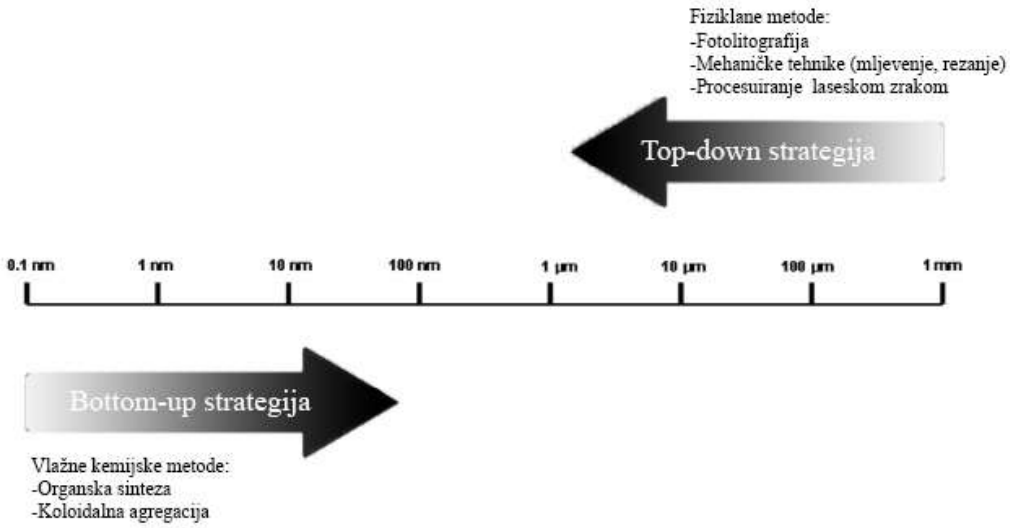
U današnjim predkliničkim testiranjima farmaceutskih proizvoda, među kojima se nalaze i nanomaterijali za biomedicinsku primjenu, evaluacija vezanja proteina plazme je važan element u određivanju njihove efikasnosti, sigurnosti i bioraspoloživosti (Semple i sur., 1998). Razumijevanje prirode vezanja biomolekula, posebno transportnih proteina, na nanočestice je važno za dizajn učinkovitih i sigurnih terapijskih i dijagnostičkih primjena nanočestica (Jessy Mariam i sur., 2014). Da bi se u potpunosti razumjela proteinska korona, treba utvrditi ne samo koji se proteini vežu za nanočesticu, već i poznavati kinetiku, afinitet i stehiometriju vezanja proteina na nanočestice (Walkey i Chan, 2012). Također, važno je utvrditi koja fizikalno-kemijska svojstva nanočestica na koji način utječu na nano-biološke interakcije.

Glavni cilj ovoga rada bio je odrediti prirodu vezanja α1-kiselog glikoproteina na nanočestice srebra različitih površinskih svojstava. Nanočestice srebra izabrane su kao najzastupljenije metalne nanočestice u biomedicinskoj primjeni. Alfa-1 kiseli glikoprotein je logičan izbor za studij vezanja na nanočestice srebra, jer je jedan od najvažnijih transportnih proteina plazme.
Pripremljene su 4 vrste AgNP s različitim površinskim omotačima: dvije vrste s pozitivnim površinskim nabojem primjenom PLL i CTAB stabilizacijskih omotača, jedna s negativno nabijenim stabilizacijskim omotačem AOT i jedna AgNP vrsta stabilizirana s neutralnim PVP. Istražene su njihove fizikalno-kemijske karakteristike te njihovo vezanje na α1-kiseli glikoprotein. U svrhu određivanja veličine čestica, površinskog naboje, oblika i stabilnosti u različitim medijima korištene su metode dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti, transmisijska elektronska mikroskopija, te UV-Vis spektrofotometrija. Za određivanje prirode vezanja proteina na AgNP korištena je fluorimetrija i metoda cirkularnog dikroizma. Dobiveni su podaci o veličini, obliku, površinskom naboju, te stabilnosti AgNP u ultračistoj vodi i u fosfatnom puferu. Određene su konstante vezanja α1-kiselog glikoproteina na AgNP različitih površinskih svojstava, te konformacijske promjene proteina nakon vezanja na nanočestice.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Priprema nanočestica srebra

Dvije su osnovne strategije sinteze nanočestica:



Slika 3.1. Top-down i bottom-up pristup sintezi nanočestica (Ju-Nam Y. i sur., 2008.)

Top-down metode različitim distribucijskim tehnikama stvaraju izolirane atome iz većih komada materijala. Koriste se fizikalne metode poput mljevenja, rezanja, ponavljajućeg suzbijanja ili fotolitografije. Iako se mogu dobiti male čestice (10-100nm), nedostatak ove

metode je prisutnost površinskih nepravilnosti koje značajno utječu na svojstva nanostruktura s obzirom na njihovu veliku površinu po jedinici volumena.

Bottom-up metode koriste otopljene soli srebra koje se potom reduciraju pri čemu nastaju nanočestice procesom nukleacije i rasta. Kod ovih metoda ključna je upotreba tvari (surfaktanti, polimeri) za stabilizaciju nanočestica te njihovu kontrolu veličine i oblika. Nedostatci bottom-up metode su kompliciranost proizvodnje nanočestica na industrijskoj razini (Tolaymat i sur., 2010.), potencijalno zaostajanje rezidualnih kemikalija i otapala u konačnom proizvodu, te ionsko srebro koje može zaostati s obzirom da efektivnost redukcije nije 100%.

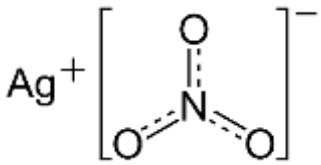
Sve metode priprave AgNP koje su korištene u ovom radu temeljne su na redukciji ionskog oblika srebra uz prisutnost različitih stabilizatora prema uvjetima navedenima dalje u tekstu. Ako nije drugačije naznačeno, sve korištene kemikalije nabavljene su od Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Njemačka).

Otapalo

Voda je najčešće otapalo koje se primjenjuje u sintezama nanosrebra. U ovom radu korištena je Mili-Q H_2O što označava ultračistu vodu tipa 1. koja se dobiva uzastopnim koracima filtracije i deionizacije, a karakterizirana je električnom vodljivošću od 18.2 MΩcm pri 25 °C.

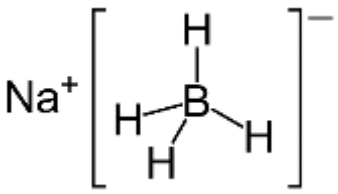
Prekursor srebrovih iona

Srebrov nitrat ($AgNO_3$, Mr 169.87) korišten je kao prekursor za sintezu AgNP. Kemijski je stabilan, a nitratni ion (NO_3^-) je dominantni anion u reakcijskoj smjesi.



Reducensi

U sintezama opisanima u ovom radu korišten je natrijev borhidrid (NaBH4, Mr 37.83) kao reducens. To je vrlo snažno i brzo anorgansko redukcijsko sredstvo.

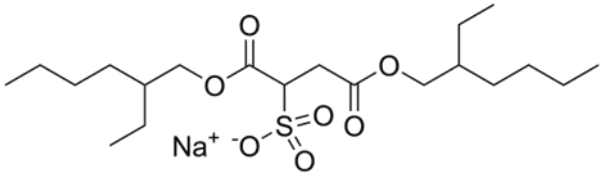


Stabilizatori

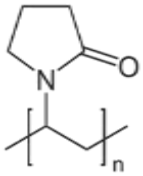
Primjena bioloških molekula kao stabilizatora nužna je prilikom priprave metalnih nanočestica. Stabilizatori štite nanočestice od aglomeracije, te time dobivamo stabilne monodisperzne nanočestice. Primjenom različitih stabilizatora može se modificirati aktivnost i svojstva nanočestica, te tako pripremati nanomaterijale željenih karakteristika.

U ovom radu korišteni su sljedeći stabilizatori:

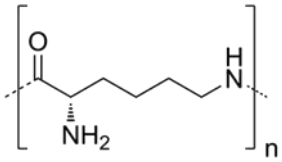
Natrijev bis(2-etilheksil)-sulfosukcinat (AOT, Mr 444.56) je anionski surfaktant koji nanočesticama daje negativan površinski naboj.



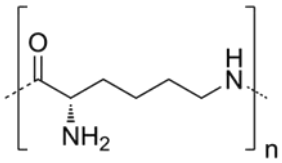
Poli(vinilpirolidon) (PVP, Mr 40 000) je neutralni homopolimer s karbonilnom, amidnim i metilnim funkcionalnim skupinama. Jačina stabilizacije ovisi o duljini lanca, te se pokazalo da dulji lanci daju povećanu stabilnost kroz učinkovitu zaštitu jezgre Ag.



ε-poli-L-lizin (PLL, Mr ~4700) je homopolimer kojemu je u neutralnom pH mediju amino skupina protonirana, te kao stabilizator daje pozitivan naboj nanočesticama.



Cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB, Mr 364.45) je jednolančani surfaktant koji kao stabilizator nanočesticama daje pozitivan površinski naboj.



3.1.1. Sintetski postupci pripreme nanočestica srebra

Nanočestice srebra obložene AOT-om (AOT-AgNP)

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

Nanočestice srebra obložene PVP-om (PVP-AgNP)

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

Nanočestice srebra obložene PLL-om (PLL-AgNP)

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

Nanočestice srebra obložene CTAB-om (CTAB-AgNP)

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

3.2. Metode karakterizacije nanočestica srebra i njihova interakcija s alfa 1-kiselim glikoproteinom

Nakon sinteza, idući korak bio je karakterizacija nastalih AgNP u ultračistoj vodi korištenjem metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti, elektroforetskog raspršenja svjetlosti, UV-Vis sprektrofotometrije i transmisijske elektronske mikroskopije.

3.2.1. Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti

Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS, od eng. Dynamic Light Scattering) je neinvazivna metoda za mjerenje veličine čestica i molekula u suspenziji. Temelji se na Brownovom gibanju koje Stokes - Einstein-ove jednadžba povezuje s veličinom čestica. Brownovo gibanje označava nasumično kretanje čestica zbog sudara s molekulama otapala. Male čestice gibaju se brže, dok se velike gibaju sporije. Također, što je temperatura veća brže je gibanje čestica.

Uređaj funkcionira tako da se čestice obasjavaju monokromatskom koherentnom laserskom zrakom, te potom raspršeno zračenje pada na detektor. Mjeri se stupanj fluktacije intenziteta raspršenog zračenja koje pokazuje specifičan uzorak s obzirom na konstruktivnu, tj.

destruktivnu interferenciju raspršenog zračenja različitih čestica (Malvern Instruments Ltd., 1997).

Korišten je instrument Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) opremljen zelenim laserom (532 nm), te određena veličina čestica i distribucija veličine. Pri tome su pripremljene otopine nanočestica srebra koncentracije 1 mg/L. Intenzitet raspršenog svjetla detektiran je pod kutem od 173°. Hidrodinamički promjer (d_H) i distribucija veličina nanočestica dobivene su iz distribucije volumena čestica. Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost 6 mjerenja. Sva mjerenja su provedena pri 25°C. Dobiveni podaci su obrađeni primjenom Zetasizer programskog paketa, verzija 6.32 (Malvern Instruments Ltd., 1997).

3.2.2. Metoda elektroforetskog raspršenja svjetlosti

Elektroforetsko raspršenje svjetlosti (ELS, od eng. Electrophoretic Light Scattering) je analitička metoda koja mjeri elektroforetsku pokretljivost suspenzije čestica ili makromolekula. Izvor svjetlosti, najčešće laser valnih duljina od 400 do 800 nm, osvjetljava suspenziju. Optički sustav spojen na fotodetektor detektira raspršenu svjetlost, a sustav za obradu signala mjeri mobilnost čestica koristeći Dopplerov efekt. ELS se razlikuje od DLS-a u tome što se umjesto nasumičnih Brownianovih kretnji suspendiranih čestica prate usmjerene kretnje izazvane električnim poljem. Kretnje su ovisne o ζ potencijalu suspendiranih čestica koje se kreću određenom brzinom opisanom kao elektroforetska pokretljivost prema suprotno nabijenoj elektrodi (McNeil-Watson, 2013). Površinski naboj nanočestica određen je mjerenjem elektroforetskog zeta (ζ)-potencijala korištenjem Zetasizer Nano ZS instrumenta (Malvern, UK) instrumenta i koji je izračunat iz izmjerene elektroforetske pokretljivosti prema Henryjevoj jednadžbi koristeći Smoluchowskijevu aproksimaciju (f(Ka) = 1.5). Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost 3 mjerenja. Sva mjerenja su provedena pri 25°C. Dobiveni podaci su obrađeni primjenom Zetasizer programskog paketa, verzija 6.32 (Malvern Instruments Ltd., 1997).

3.2.3 Transmisijska elektronska mikroskopija

Elektronski mikroskopi koriste snopove elektrona umjesto zraka vidljive svjetlosti za vizualiziranje analiziranih objekata. Mala valna duljina elektrona omogućuje elektronskim mikroskopima veću razlučivost i veće optičko povećanje. Postoje transmisijski i pretražni

elektronski mikroskopi, ovisno o tome stvaraju li sliku elektroni koji prolaze kroz uzorak ili oni koji se odbijaju od njegove površine. U transmisijskoj elektronskoj mikroskopiji (TEM) snop elektrona prolazi kroz tanki sloj tvari i dolazi u interakciju s njima što stvara sliku. Slika se povećava i fokusira na fluorescentnom zaslonu, na sloju fotografskog filma ili se detektira kamerom.

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

3.2.4 UV-vis spektroskopija

Apsorpcijom elektromagnetskog zračenja u UV i vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra dolazi do promjena u energiji elektrona ispitivanih molekula. Pobuđeni elektroni vraćaju se u osnovno stanje, pri čemu se oslobađa energija. Fenomen apsorpcije se može kvantificirati Beer-Lambertovim zakonom:

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

gdje je I_0 intenzitet ulazne svjetlosti, I je intenzitet izlazne svjetlosti, c je molarna koncentracija, l je duljina puta svjetlosti, a ε je molarni ekstinkcijski koeficijent. Izraz [log I0/I] je apsorbancija A_λ na određenoj valnoj duljini λ.

Apsorpcijski spektar mjeri se spektrofotometrom. Osnovni dijelovi spektrofotometra su izvor svjetlosti, monokromator, fotodetektor i kiveta. Kao izvor svjetlosti se najviše koriste deuterijeva (210-370 nm) i volfram-halogena (290-900 nm) žarulja. Monokromator služi da svjetlost iz žarulje, koja je različitih valnih duljina, razloži na pojedine valne duljine. Svjetlost koja je prošla kroz uzorak se detektira fotodetektorom koji može biti fotomultiplikatorska cijev ili fotodioda. Uzorak se nalazi u staklenoj, plastičnoj ili najčešće u kvarcnoj kiveti (Sheehan, 2009).

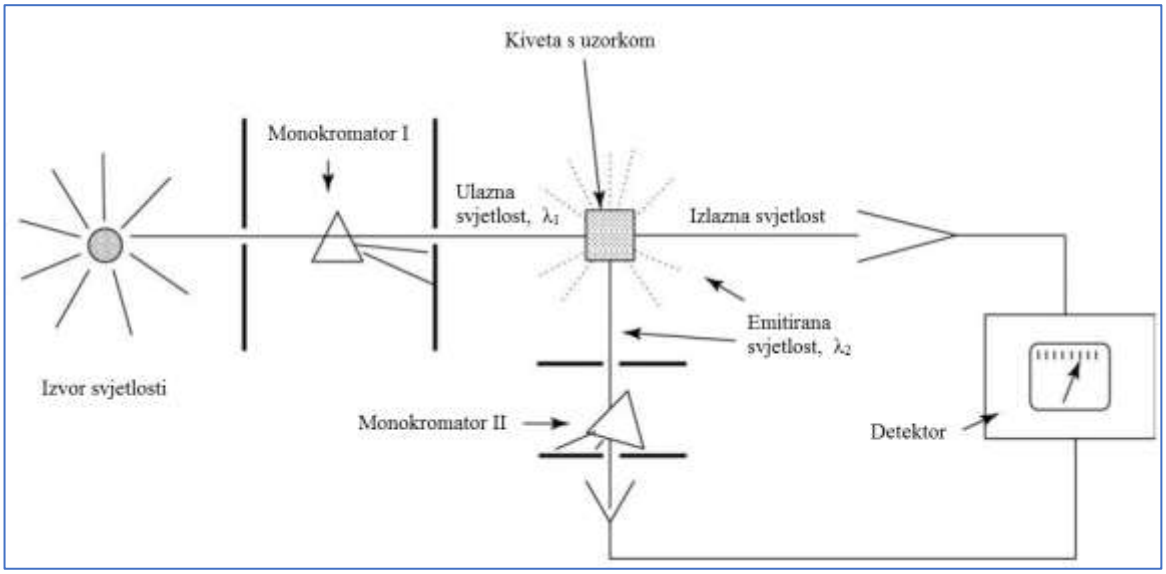
Mjerenje UV-Vis spektara otopina nanočestica srebra u ultračistoj vodi provodilo se pripremama svježih otopina netom prije početka mjerenja pri koncentraciji AgNP-a od 10 μM

i 50 μM. Otopine su se prenosile u kvarcnu kivetu optičke duljine puta od 1 cm. Mjerenja su se provodila na spektrofotometru Carry 50 UV-Vis (Varian, Agilent Technologies, SAD) u rasponu valnih duljina od 200 do 800 nm.

3.3 Metode kvantifikacije vezanja nanočestica srebra i alfa-1-kiselog glikoproteina

3.3.1 Flourimetrija

Flourescencija je fenomen u kojem kromofori nakon apsorbirane svjetlosti emitiraju svjetlost manje energije. Metoda mjeri intenzitet flourescencije na određenoj valnoj duljini uz pomoć spektrofluorometra. Ulazna zraka određene valne duljine prolazi kroz uzorak, a emitirano zračenje se detektira fotomultiplikatorskom cijevi. Drugi monokromator koji odabire valnu duljinu emitiranog zračenja pod kutem od 90° u odnosu na ulazno zračenje čini glavnu razliku između fluorometrije i spektroskopometrije.



Slika 3.3.1. UV-Vis spektrofluorimetar (preuzeto iz Sheehan, 2009).

U ovome radu bila je praćena fluorescencija α-1kiselog glikoproteina uz prisutnost različitih koncentracija AgNP u svrhu kvantificiranja njihove asocijacije. Korišten je spektrofluorimetar OLIS RSM 1000F (Olis, Inc., Bogart, GA, USA). Za valnu duljinu ekscitacije izabrano je 280 nm, a emisijski spektar se pratio u rasponu od 300 do 420 nm s očekivanim maksimumom

fluorescencije na 360 nm. Preliminarnim mjerenjima došlo se do optimalnih koncentracija iz kojih se može izračunati konstanta vezanja.

Prvo je dodana ultračista voda, zatim matična otopina α-1kiselog glikoproteina i na kraju matična otopina AgNP-a. Otopina je lagano promiješana nakon dodavanja svih reagenasa kako ne bi nastali mjehurići koji mogu smetati fluorescencijskim mjerenjima. Mjerenja su rađena u triplikatu i rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (SD). Izmjereni spektri obrađeni su u programu *SPECFIT Global Analysis System* za prilagođavanje ravnotežnih i kinetičkih sustava koji koristi proširenu analizu faktora i Marquardtovu minimizaciju najmanjih kvadrata (Gampp i sur., 1985; SPECFIT User Manual, 1992).

3.3.2 Cirkularni dikroizam

Cirkularni dikroizam je spektroskopska metoda koja otkriva informacije o kiralnosti molekule. Koristi se za proučavanje i kvantificiranje optički aktivnih spojeva i njihovih interakcija. Informacije koje sadrži CD spektar mogu se koristiti za jedinstveno identificiranje kiralnih spojeva i njihove konfiguracije, predviđanje sekundarne strukture proteina i drugih bioloških makromolekula te za nadzor strukturnih promjena koje prate zamatanje i odmatanje proteina.

Metoda se temelji na razlici u apsorpciji lijevo i desno polariziranje svjetlosti. Taj se efekt uočava kod optički aktivnih kromofora. U proteinima kromoforne skupine su peptidne veze, bočni ogranci aromatskih aminokiselina i disulfidne veze. Za apsorpciju u području valnih duljina manjih od 240 nm (daleki UV) odgovorne su uglavnom peptidne veze. U tom području valnih duljina različiti tipovi sekundarnih struktura daju karakteristične CD spektre koji se mogu analizirati i uspoređivati.

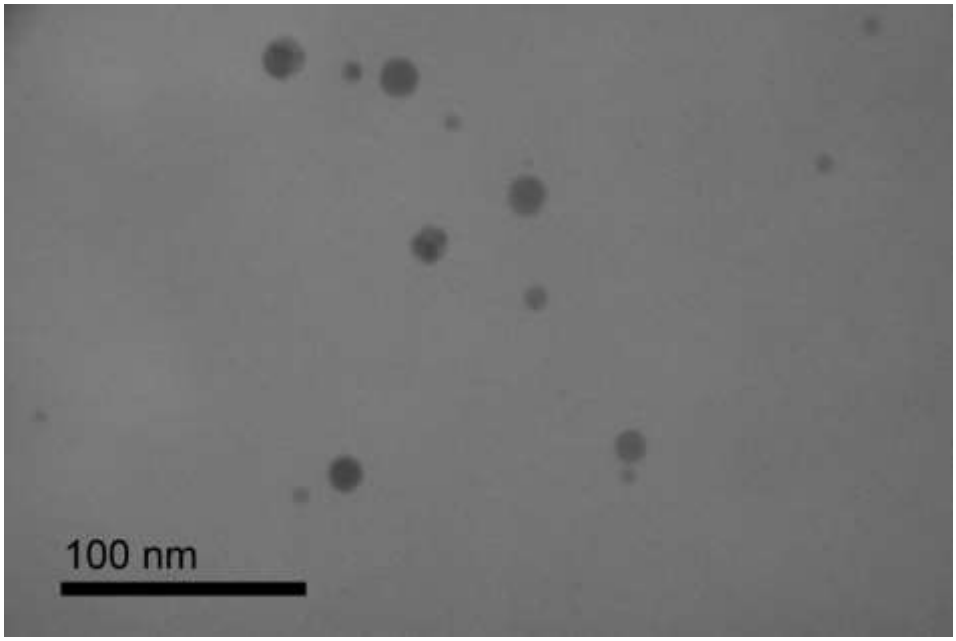
Primjenom algoritama koji koriste zbirke simuliranih CD spektara temeljenih na X-ray kristalografiji za referentne podatke o bjelančevinama, određuje se sadržaj sekundarne strukture. Alternativni algoritmi koriste zbirke izmjerenih CD spektara odabranih proteina pod definiranim uvjetima kao referentni skup podataka. Najjednostavnija procjena frakcijskog sastava nepoznatog proteina može se dobiti pomoću seta od barem tri valne duljine i istodobno rješavanjem niza jednadžbi u obliku gore navedene jednadžbe (Cantor and Schimmel, 1980).

CD spektri snimljeni su na JASCO J815 spektrofotometru u kvarcnim kivetama (1 cm) miješanjem 10 μM otopine α1-kiselog glikoproteina s različitim koncentracijama AgNP. Podaci su obrađeni u DicroWeb programskom paketu.

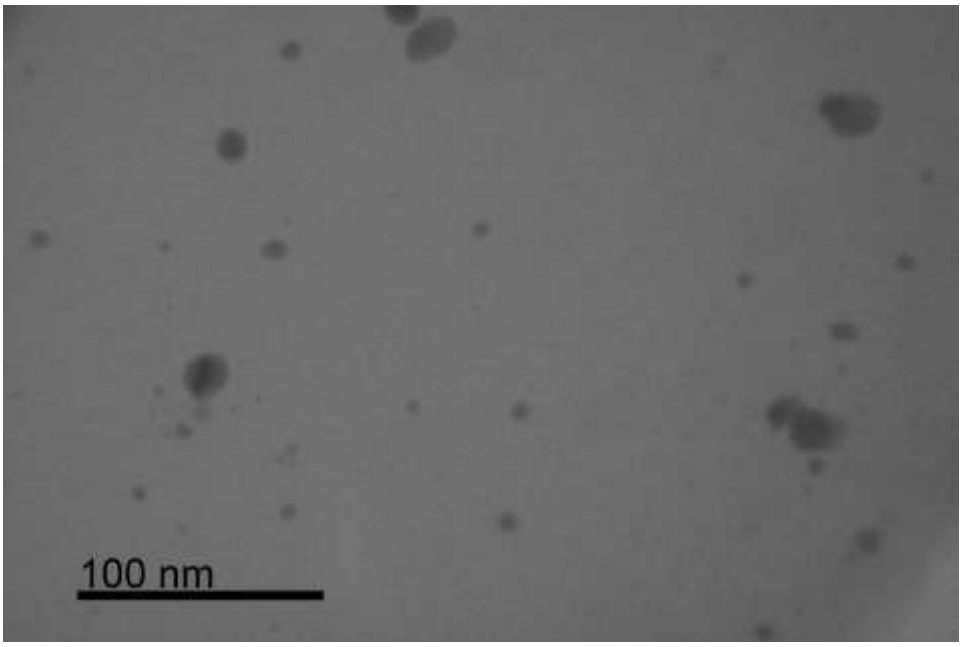
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Fizikalno-kemijske karakteristike nanočestica srebra

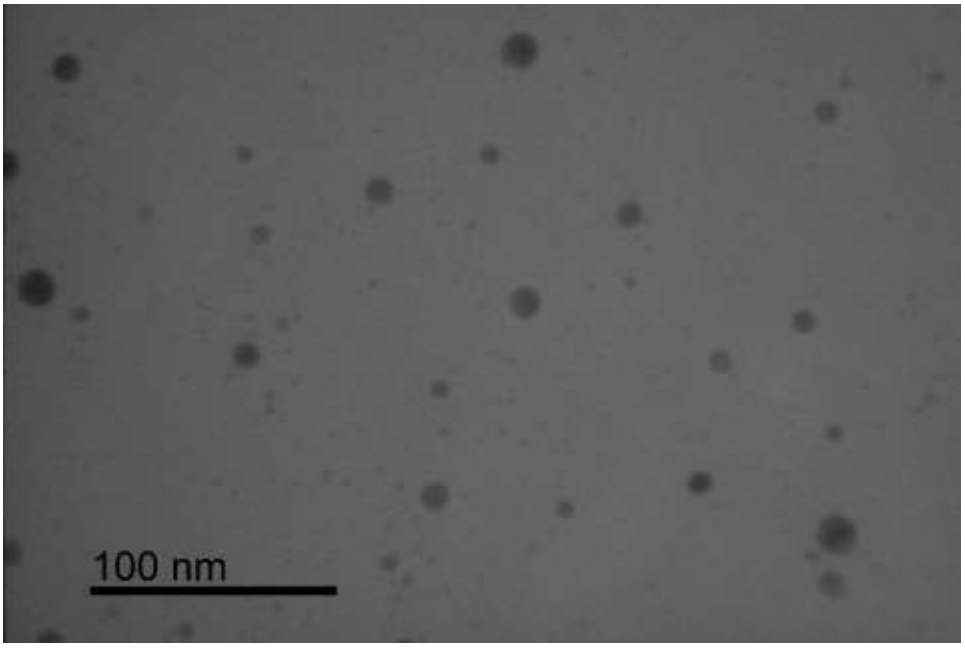
Fizikalno-kemijska svojstva sintetiziranih nanočestica određena su u ultračistoj vodi korištenjem DLS i ELS metoda, te UV-Vis spektrofotometrijom i transmisijskom elektronskom mikroskopijom. Oblik i izgled AgNP ispitan je primjenom TEM tehnike (Slike 4.1.1.-4.1.4.), koja je pokazala da su sve ispitivane nanočestice sfernog oblika.



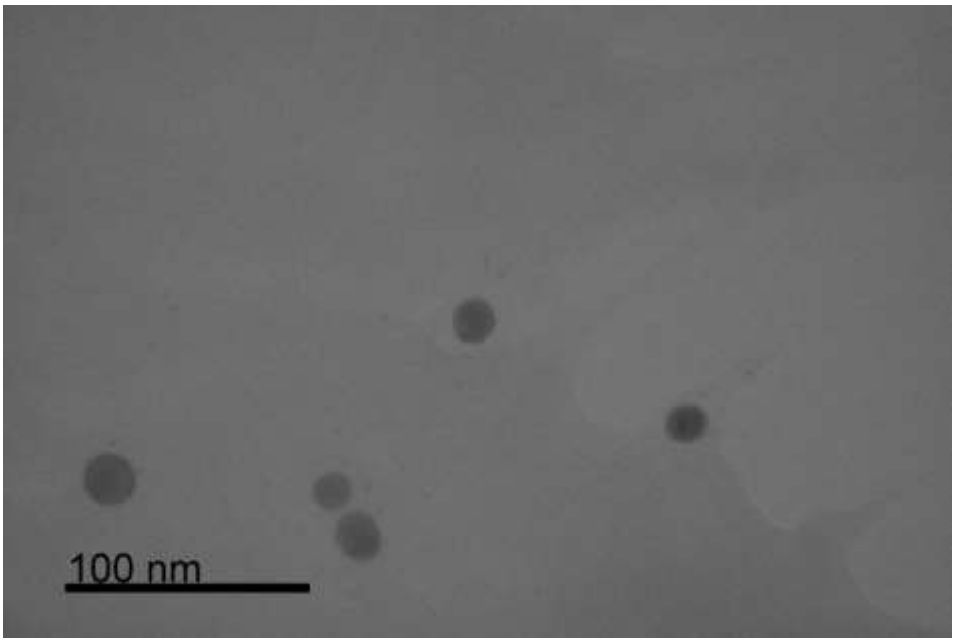
Slika 4.1.1. TEM prikaz AOT-AgNP u ultračistoj vodi



Slika 4.1.2. TEM prikaz CTAB-AgNP u ultračistoj vodi



Slika 4.1.3. TEM prikaz PLL-AgNP u ultračistoj vodi



Slika 4.1.4. TEM prikaz PVP-AgNP u ultračistoj vodi

U tablici 4.1.a nalaze se podaci za hidrodinamički promjer (d_H) nanočestica srebra u ultračistoj vodi dobiven iz distribucije veličina prema volumenu. DLS mjerenja pokazala su da je distribucija veličina monomodalna prema volumenu za sve nanočestice.

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

Vrsta nanočestica	d_H (nm)	Prosječan volumen(%)
AOT-AgNP	2,2 ± 0,9	100
CTAB-AgNP	8,0 ± 1,5	100
PVP-AgNP	4,2 ± 0,6	100
PLL-AgNP	2,7 ± 0,3	100

Podaci dobiveni ELS metodom u ultračistoj vodi prikazani u tablici 4.1.b pokazuju da dvije vrste nanočestica (CTAB-AgNP i PLL-AgNP) imaju pozitivni površinski naboj sa ζ-potencijalom +28,2 ± 1,5 i +38,6 ± 6,9 mV. Iako je korišten jedan neutralni stabilizator (PVP), nanočestice obložene njime ipak imaju negativni površinski naboj od-18,02 ± 3,71 mV. To može se objasniti korištenjem borhidrida (BH_4^-) kao reducensa ionskog srebra u sintezi i njegovim posljedičnim vezanjem za površinu nanočestica što je dovelo do negativnog ζ-potencijala. Mjerenjem zeta-potencijala potvrđeno je da se radi o izrazito stabilnim koloidma koji su karakterizirani površinskim nabojem nižim od -40 mV. Naime, što je apsolutni iznos površinskog naboja nanočestica veći (>20 mV, odnosno <-20 mV), to su te nanočestice stabilnije uslijed značajnih elektrostatskih odbojnih sila.

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

Vrsta nanočestica	ζ potencijal (mV)
AOT-AgNP	-40,57 ± 6,49
CTAB-AgNP	+28,17 ± 1,54
PVP-AgNP	-18,02 ± 3,71
PLL-AgNP	+38,58 ± 6,91

Dalje se ponašanje AgNP-a pratilo UV-Vis spektrofotometrijom. Ovom metodom moguće je odrediti optička svojstva nanočestica pošto one imaju karakteristični apsorpcijski maksimum na vidljivim valnim duljinama zbog površinske plazmonske rezonancije (SPR), kako je prikazano u tablici 4.1.c. UV-Vis spektri AgNP nalaze se u prilogu 8.1.

Tablica 4.1.c. Optički parametri nanočestica srebra u ultračistoj vodi (UV)

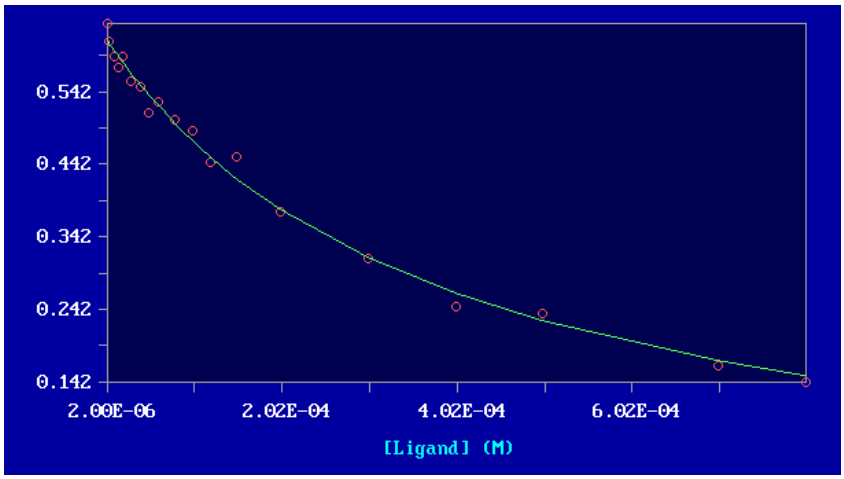
Nanočestice srebra	Koncentracija	λ max	A_{max}
AOT-AgNP	10 μM	395	0,075
	50 μM	400	0,376
CTAB-AgNP	10 μM	530	0,023
	50 μM	390	0,092
PVP-AgNP	10 μM	385	0,054
	50 μM	394	0,514
PLL-AgNP	10 μM	400	0,065
	50 μM	400	0,268

4.2. Vezanje α1-kiselog glikoproteina na nanočestice srebra

Izračunavanje konstanti vezanja nam omogućuje *SPECFIT*, unošenjem tablica s titracijskim spektrima fluorescencije α1-kiselog glikoproteina stalne koncentracije i AgNP varijabilne koncentracije. Program predlaganjem statističke analize predviđa logaritamsku krivulju čiji je primjer prikazan na slici 4.2.c. Vrijednosti fluorescencije α1-kiselog glikoproteina dobivene na 380 nm nalaze se na ordinati, a na apcisi je gradijent koncentracija AgNP poredanih od manje koncentracije prema većima. Analiza podataka je predložila 1:1 komplekse i nije ukazala na stvaranje kompleksa višeg reda. Zbog toga je predložen model vezanja:

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

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



Slika 4.2.1. Primjer logaritamske krivulje AOT-AgNP stvorene u SPECFIT-u. Na apcisi se nalaze koncentracije AgNP, a na ordinati intenzitet fluorescencije alfa-1aGP stalne koncentracije na 380 nm.

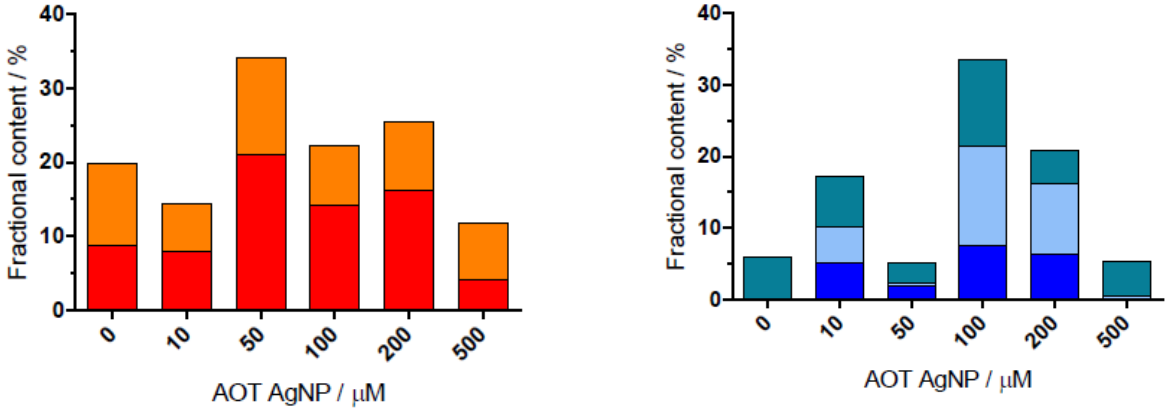
Obrađivanjem titracijskih krivulja korištenih AgNP čija su mjerenja napravljena u triplikatu dobili su se pojedinačni $\log K_a$ i izračunata je konačna srednja vrijednost $\log K_a \pm$ SD koji se nalaze u tablici 4.2.c Iz dobivenih $\log K_a$ može se vidjeti da se konstante vezanja razlikuju između pojedinih AgNP.

Tablica 4.2.a. Izračunate konstante vezanja gašenjem fluorescencije α1-kiselog glikoproteina u prisutnosti nanočestica srebra u ultračistoj vodi

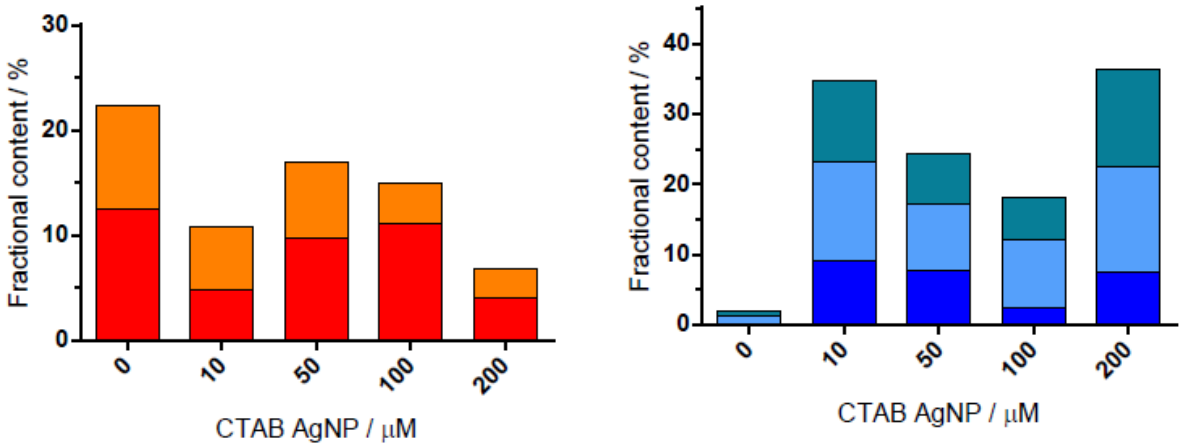
Nanočestice srebra	Pojedinačna mjerenja $\log K_a$	Konačni $\log K_a$	Konačni K_a
AOT-AgNP	3,3 ± 0,06 3,2 ± 0,06 3,4 ± 0,05	3,3 ± 0,10	$2{,}00 \times 10^3 \pm 1{,}3$
CTAB-AgNP	2,7 ± 0,30 2,4 ± 0,60 2,4 ± 0,50	2,5 ± 0,14	$3{,}16 \times 10^2 \pm 1{,}4$
PVP-AgNP	3,5 ± 0,05 3,8 ± 0,03 3,8 ± 0,03	3,8 ± 0,14	$6{,}31 \times 10^3 \pm 1{,}4$
PLL-AgNP	3,8 ± 0,01 3,7 ± 0,01 3,6 ± 0,01	3,7 ± 0,1	$5{,}87 \times 10^3 \pm 1{,}0$

Nadalje, promjene u sekundarnoj strukturi proteina promatrali smo metodom cirkularnog dikroizma. Promjenom koncentracije nanočestica srebra mijenja se i omjer alfa zavoja i beta

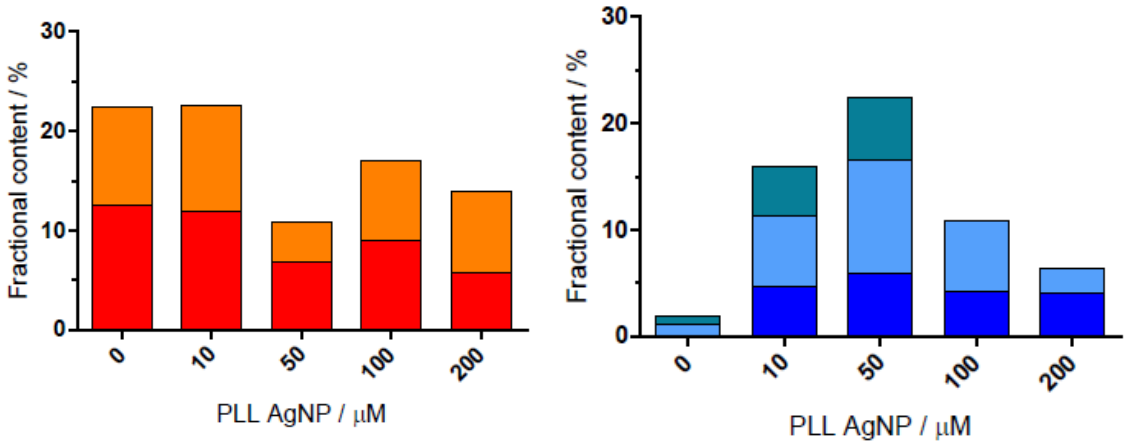
ploča. Povećanjem zastupljenosti beta ploča u strukturi proteina, smanjuje se njegova funkcionalnost.



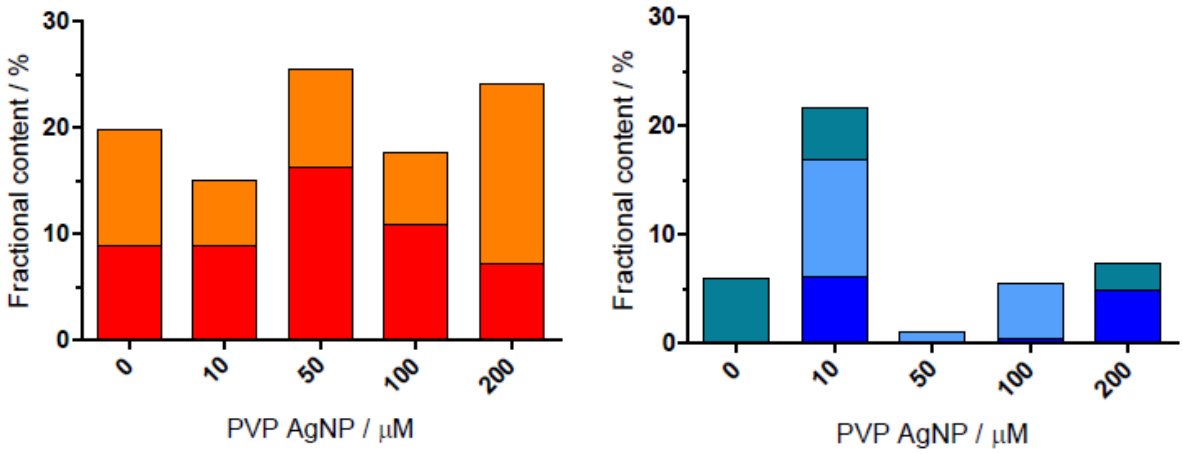
Slika 4.2.2. Dijagram omjera alfa zavoja i beta ploča u strukturi alfa-1 kiselog glikoproteina ovisno o koncentraciji AOT-AgNP



Slika 4.2.3 Dijagram omjera alfa zavoja i beta ploča u strukturi alfa-1 kiselog glikoproteina ovisno o koncentraciji CTAB-AgNP



Slika 4.2.4. Dijagram omjera alfa zavoja i beta ploča u strukturi alfa-1 kiselog glikoproteina ovisno o koncentraciji PLL-AgNP



Slika 4.2.5. Dijagram omjera alfa zavoja i beta ploča u strukturi alfa-1 kiselog glikoproteina ovisno o koncentraciji PVP-AgNP

5. ZAKLJUČAK

Korištenje različitih stabilizatora nanočestica srebra dovelo je do različitih koloidnih stabilnosti u vodi. Korištene metode – dinamičko i elektroforetsko raspršenje svjetlosti, UV-Vis spektrofotometrija te transmisijska elektronska mikroskopija – pokazale su se pouzdanima za sigurno određivanje i evaluaciju stabilnosti nanočestica. Transmisijskom elektronskom mikroskopijom utvrđeno je da se dobivaju sferne nanočestice. Iz gašenja fluorescencije α1-kiselog glikoproteina u prisutnosti AgNP dobivene su njihove konstante vezanja koje se razlikuju za pojedinu vrstu AgNP. Cirkularni dikroizam pokazao je da je funkcionalnost α1-kiselog glikoproteina najveća sa PVP-AgNP, tj najmanji je sadržaj beta ploča u strukturi proteina.

Mehanizam adsorpcije proteina i način na koji se stvara proteinska korona su iznimno važni za razumijevanje biološke reaktivnosti nanočestica *in vivo* (Saptarshi i sur., 2013). Također sprječavanje aglomeracije pomoću alfa-1 kiselog glikoproteina može poslužiti u nanotehnološkim aplikacijama.

6. LITERATURA

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

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

Cantor CR, Schimmel PR. Biophysical Chemistry: Part II Techniques for the Study of Biological Structure and Function; W.H. Freeman & Company: Oxford, 1980.

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

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

Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. Biochim Biophys Acta, 2000, 1482, 157-171.

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

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

Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers*, 2008, 25, 267–278.

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

Klaine SJ, et al.: Paradigms to Assess the Environmental Impact of Manufactured Nanomaterials. *Environ Toxicol Chem*. 2012, 31, 3-14.

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

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

Marvern Instruments Ltd. Zetasizer Basic, 1997.

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

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

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

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

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

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

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

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

Tolaymat T, El Badawy A, Genaidy A, Scheckel K, Luxton T, Suidan M. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci. Tot. Environ.*, 2010, 408, 999-1006.

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

Wijnhoven SWP, Peijnenburg WJGM, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EHW, Roszek B, Bisschops J, Gosens I, van de Meent D, Dekkers S, de Jong WH, van Zijverden M, Sips AJAM, Geertsma RE. Nanosilver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment, *Nanotoxicology*, 2009, 3 (2), 109-138.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

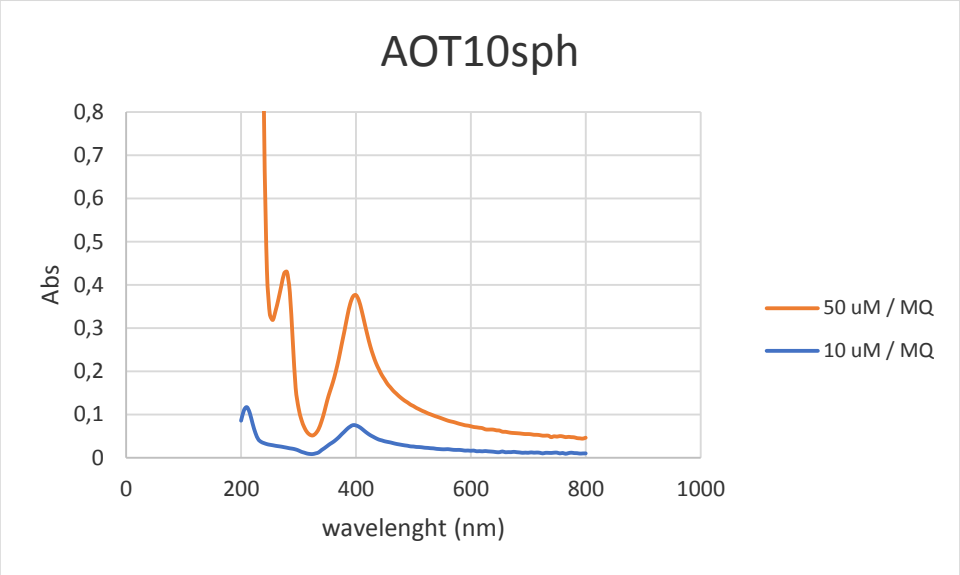
U današnjim predkliničkim testiranjima farmaceutskih molekula, među kojima se nalaze i nanočestice za biomedicinsku primjenu, evaluacija vezanja proteina plazme je najvažniji element kod određivanja efikasnosti, sigurnosti i raspolaganja s tim molekulama. U ovom je istraživanju primijenjen modelni sustav koji se sastojao od alfa-1-kiselog glikoproteina i 4 vrste srebrnih nanočestica (AgNP) različite površinske funkcionalizacije. Karakterizacija i stabilnost AgNP te njihova interakcija s alfa-1-kiselim glikoproteinom praćeni su metodama dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti, transmisijskom elektronskom mikroskopijom, UV-Vis spektrofotometrijom te spektrofluorimetrijom. Metodom cirkularnog dikroizma proučavala se promjena u sekundarnoj strukturi alfa-1-kiselog glikoproteina ovisno o koncentraciji Ag-NP. Dobivene su različite konstante vezanja AgNP i alfa-1-kiselog glikoproteina ovisno o površinskoj funkcionalizaciji AgNP. Time je potvrđena hipoteza da biomolekule poput alfa-1-kiselog glikoproteina mogu pružiti stabilizaciju nanočestica u biološkom okruženju.

7.2. Summary

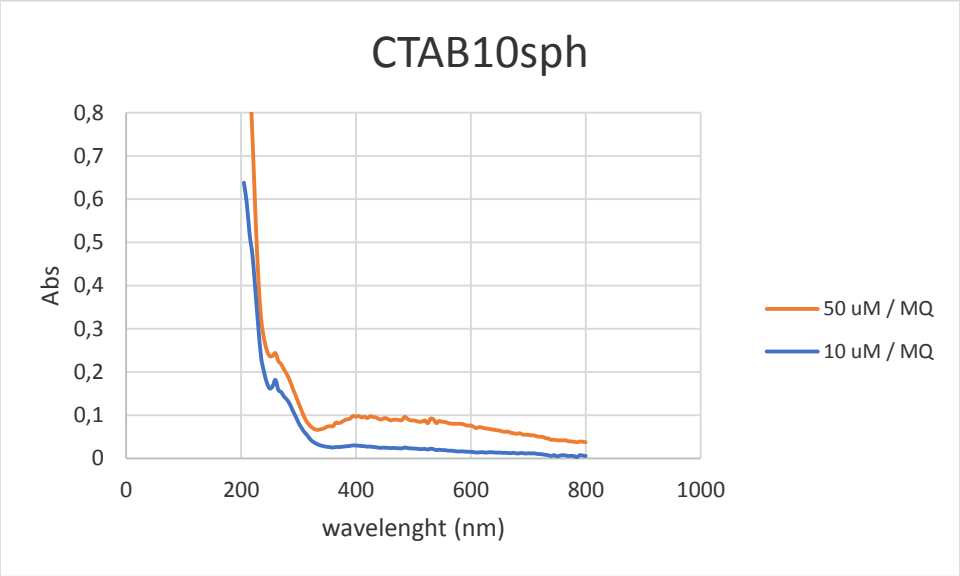
In today's preclinical testings of pharmaceutical molecules, among which are also present nanoparticlas for biomedical applications, evaluation of plasma protein binding is one of the most important elements in efficency, safety and distribution determination. In this thesis a model system of alpha-1-acid glycoproteinand 4 types of silver nanoparticles (AgNP) was used. Characterization and stability of AgNP along with their interaction with alpha-1 acid glycoprotein were determined by using dynamic and electrophoretic light scattering methods, transmission electron microscopy, UV-Vis spectrophotometry, and spectrofluorimetry. By the method of circular dichroism, a change in the secondary structure of alpha-1-acid glycoproteinglycoprotein was studied depending on the concentration of AgNP. Different binding constants of alpha-1-acid glycoprotein and AgNP were obtained depending on AgNP surface functionalisation. A hypothesis which states that biomolecules like alpha-1-acid glycoproteincan enhance stabilization of nanoparticles in biological environment was confirmed.

8. PRILOZI

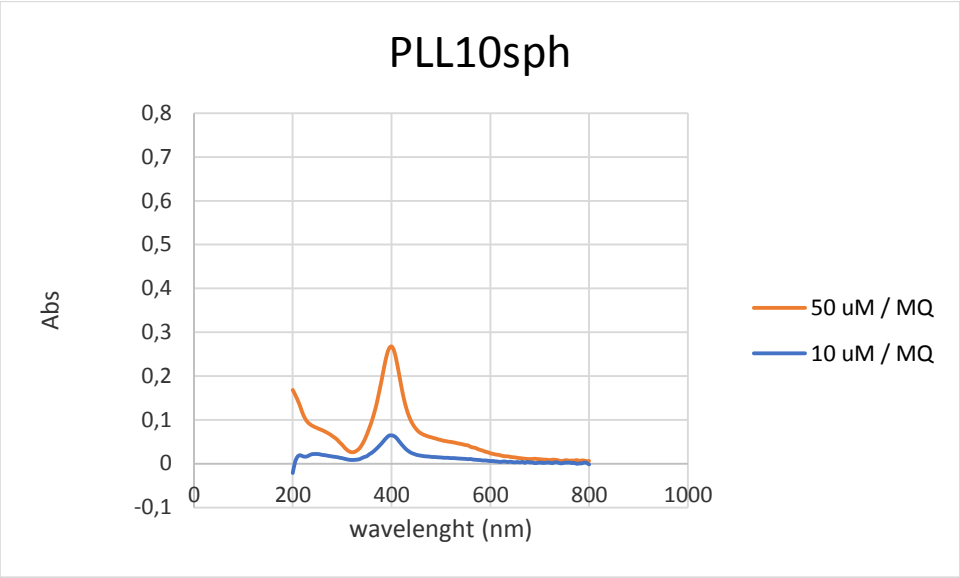
8.1. UV-Vis spektri nanočestica srebra



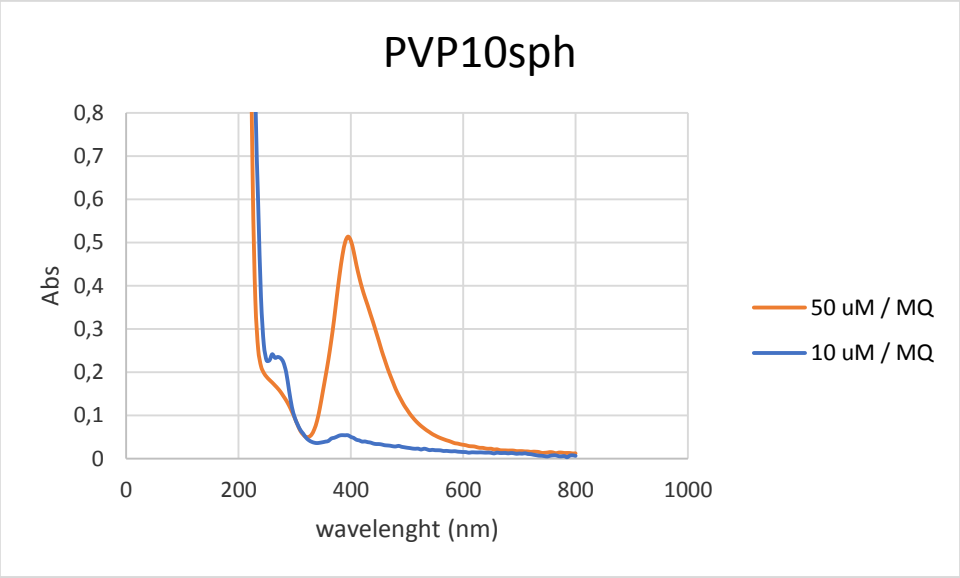
Slika 8.2.1 UV-Vis spektar AOT-AgNP (10 uM i 50 uM) u ultračistoj vodi



Slika 8.2.2 UV-Vis spektar CTAB-AgNP (10 uM i 50 uM) u ultračistoj vodi



Slika 8.2.3 UV-Vis spektar PLL-AgNP (10 uM i 50 uM) u ultračistoj vodi



Slika 8.2.4. UV-Vis spektar PVP-AgNP (10 uM i 50 uM) u ultračistoj vodi

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za opću i anorgansku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

KARAKTERIZACIJA NANOČESTICA SREBRA I NJIHOVA INTERAKCIJA S ALFA KISELIM GLIKOPROTEINOM

Anuka Pezo

SAŽETAK

U današnjim predkliničkim testiranjima farmaceutskih molekula, među kojima se nalaze i nanočestice za biomedicinsku primjenu, evaluacija vezanja proteina plazme je najvažniji element kod određivanja efikasnosti, sigurnosti i raspolaganja s tim molekulama. U ovom je istraživanju primijenjen modelni sustav koji se sastojao od alfa-1-kiselog glikoproteina i 4 vrste srebrnih nanočestica (AgNP) različite površinske funkcionalizacije. Karakterizacija i stabilnost AgNP te njihova interakcija s alfa-1-kiselim glikoproteinom praćeni su metodama dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti, transmisijskom elektronskom mikroskopijom, UV-Vis spektrofotometrijom te spektrofluorimetrijom. Metodom cirkularnog dikroizma proučavala se promjena u sekundarnoj strukturi alfa-1-kiselog glikoproteina ovisno o koncentraciji Ag-NP. Dobivene su različite konstante vezanja AgNP i alfa-1-kiselog glikoproteina ovisno o površinskoj funkcionalizaciji AgNP. Time je potvrđena hipoteza da biomolekule poput alfa-1-kiselog glikoproteina mogu pružiti stabilizaciju nanočestica u biološkom okruženju.

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

Rad sadrži: 33 stranica, 19 grafičkih prikaza, 4 tablica i 25 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nanočestice, alfa kiseli glikoprotein

Mentor: **Dr. sc. Mario Gabričević**, *izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc.Ivana Vinković Vrček**, *viši znanstveni suradnik*

Mario Gabričević, *izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Davor Šakić, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: ožujak 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of general and inorganic chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

CHARACTERIZATION OF SILVER NANOPARTICLES AND THEIR INTERACTION WITH ALPHA ACID GLYCOPROTEIN

Anuka Pezo

SUMMARY

In today's preclinical testings of pharmaceutical molecules, among which are also present nanoparticlas for biomedical applications, evaluation of plasma protein binding is one of the most important elements in efficency, safety and distribution determination. In this thesis a model system of alpha-1-acid glycoproteinand 4 types of silver nanoparticles (AgNP) was used. Characterization and stability of AgNP along with their interaction with alpha-1 acid glycoprotein were determined by using dynamic and electrophoretic light scattering methods, transmission electron microscopy, UV-Vis spectrophotometry, and spectrofluorimetry. By the method of circular dichroism, a change in the secondary structure of alpha-1-acid glycoproteinglycoprotein was studied depending on the concentration of AgNP. Different binding constants of alpha-1-acid glycoproteinand AgNP were obtained depending on AgNP surface functionalisation. A hypothesis which states that biomolecules like alpha-1-acid glycoproteincan enhance stabilization of nanoparticles in biological environment was confirmed.

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

Thesis includes: 33 pages, 19 figures, 4 tables and 25 references. Original is in Croatian language.

Keywords: nanoparticles, alpha acid glycoprotein

Mentor: **Mario Gabričević, Ph.D,** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivana Vinković Vrček, Ph.D.**

Mario Gabričević, Ph.D. *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Davor Šakić *Assistant,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March, 2018.