



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Barbara Pem

MEHANIZAM INTERAKCIJE BIOTIOLA S NANOČESTICAMA ZLATA I SREBRA

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Dr. sc. Ivana Vinković Vrček, znan. savj.

Prof. dr. sc. Valerije Vrček

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Barbara Pem

MEHANIZAM INTERAKCIJE BIOTIOLA S NANOČESTICAMA ZLATA I SREBRA

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Dr. sc. Ivana Vinković Vrček, znan. savj.

Prof. dr. sc. Valerije Vrček

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Barbara Pem

MECHANISM OF INTERACTION OF BIOTHIOLS WITH SILVER AND GOLD NANOPARTICLES

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Ivana Vinković Vrček, Scientific Advisor, PhD

Professor Valerije Vrček, PhD

Zagreb, 2021

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada pod mentorstvom dr. sc. Ivane Vinković Vrček, znanstvene savjetnice, i komentorstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka, u sklopu doktorskog studija Farmaceutsko-biokemijske znanosti Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je financiran projektom Hrvatske zaklade za znanost HRZZ-IP-2016-06-2436 (Značaj interakcija metalnih nanočestica sa sumpornim biomolekulama za nano-bio sučelje)“.

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Ivani Vinković Vrček, koja me uvela u svijet nanomedicine te mi pružila priliku i podršku za izgradnju znanstvene karijere. Hvala na trudu koji je uložila u moj razvoj i napredovanje.

Zahvaljujem komentoru prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku na prenesenom znanju i pomoći u provođenju NMR pokusa i kemijskih računa.

Zahvaljujem svim kolegama i suradnicima koji su doprinijeli nastanku ovog doktorata:

Dr. sc. Ivanu Pavičiću, dr. sc. Ani Mariji Marjanović Čermak i ostalim suradnicima s IMI-ja, na savjetima i podršci u rješavanju svakodnevnih problema.

Svim suradnicima s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, koji su mi pomogli s NMR pokusima i računima.

Svim suradnicima iz Laboratorija za biokoloide i površinsku kemiju s IRB-a na pomoći pri karakterizaciji nanomaterijala.

Svim suradnicima iz Laboratorija za računalni dizajn i sintezu funkcionalnih materijala s IRB-a na prenesenom znanju iz molekulske dinamike.

Posebnu zahvalu želim uputiti svojim kolegama Rinei, Luciji, Nikolini, Kruni i Emeriku, za svu pruženu podršku, nesebičnu pomoć i trenutke smijeha. Spasili ste mi glavu nebrojeno puta.

Mojim roditeljima, Damiru i Gabrijeli, bratu Juraju te bakama i djedovima na svemu što su mi omogućili.

Mojim prijateljima koji su me sa strpljenjem slušali čak i kada im ništa nije bilo jasno.

SAŽETAK

Transformacije nanočestica zlata (AuNP) i srebra (AgNP) u biološkim sustavima utječu na njihov biološki identitet, ponašanje i biološke učinke. Zbog svojeg velikog afiniteta prema sumporu, AgNP i AuNP lako stupaju u interakcije s endogenim biotiolima, pa je razumijevanje takvih interakcija preduvjet njihove uspješne biomedicinske primjene. Cilj ove doktorske disertacije bio je utvrditi mehanizam interakcije i vezanja biotiola s AgNP i AuNP kombiniranom primjenom eksperimentalnih i računalnih metoda. Nanočestice su pripremljene metodom redukcije, te su karakterizirane s obzirom na oblik, raspodjelu veličina, zeta potencijal i koloidnu stabilnost pomoću mikroskopskih i spektroskopskih tehnika. Direktna interakcija s biotiolima praćena je nuklearnom magnetskom rezonancijskom spektroskopijom, a primjenom kvantno-kemijskih i molekulsko-dinamičkih metoda potvrđen je pretpostavljeni mehanizam tih interakcija. Utvrđeno je da se prilikom interakcije biotiola s atomima Ag i Au na nanopovršini događa njihova oksidativna dimerizacija u disulfide. Mehanizam oksidativne dimerizacije odvija se u dva koraka: 1) oksidacija tiolne skupine u sulfensku kiselinu posredovana reaktivnim kisikovim vrstama i 2) reakcija tiola i sulfenske kiseline uz oslobađanje vode, katalizirana s Ag i Au. Nastali disulfidi adsorbiraju na površinu AgNP i AuNP putem nekovalentnih interakcija, u kojima sudjeluju sve njihove funkcionalne skupine. Izračunom energije vezanja potvrđena je spontanost adsorpcije i veći afinitet vezanja disulfida u odnosu na tirole. Stoga je konačni produkt interakcija metalnih površina s tiolima nastanak AgNP i AuNP obloženih disulfidima. Ova saznanja pridonose razumijevanju transformacija nanočestica u prisutnosti biotiola što je važno za procjenu njihovih bioloških učinaka i sigurnosti primjene u biomedicini.

Ključne riječi: nanočestice srebra, nanočestice zlata, cistein, glutation, nuklearna magnetska rezonancija, teorija funkcionala gustoće, molekulska dinamika

SUMMARY

Introduction

Nanoparticles (NPs) are defined as materials with at least one dimension in the range between 1 and 100 nm, which can be naturally or artificially created. Nanomedicine is the branch of nanotechnology focused on NPs for biomedical purposes. NPs may exist in a wide range of compositions, sizes, shapes, surface charges and surface properties. They possess unique physico-chemical properties compared to the bulk material, including large adsorption capacity, high reactivity, and favourable optical, catalytic and magnetic properties. All these properties can be utilized in biomedicine for the design of more efficient and safer diagnostic and therapeutic systems. Silver and gold NPs are of particular interest for biomedicine. Gold nanoparticles (AuNPs) possess good optical, catalytic and thermal properties that can be utilized for biosensors or cancer therapy, while silver nanoparticles (AgNPs) are mostly used due to their strong antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant action. For their successful clinical application, it is vital to determine their safety and toxicity profiles, which depend largely on their interaction with biological systems.

NPs may enter the human body through multiple pathways and undergo various transformations immediately upon contact with biological media. Biomolecules will adsorb to the NP surface forming the biomolecular corona. NPs may aggregate or dissolve in conditions of low pH and high ionic strength. The released ions may be precipitated by anions or reduced again by cellular reductants and form NPs *de novo*. All transformations are largely dependent on NPs' physico-chemical properties, medium composition and external conditions like temperature. All these modifications of NPs and their interaction with biological systems determine their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties.

In the human body, the primary non-protein complexants of metallic species are cysteine (CYS) and glutathione (GSH). Both are small endogenous biothiols with one –SH group which play crucial role in cellular functions and antioxidant defence. They may exist as free thiols or form disulphide dimers. Therefore, they are ideal and important models to evaluate mechanisms of interaction between sulphur-containing biomolecules and metallic NPs, like AuNPs and AgNPs. The adsorption and possible binding of thiols to metals are still a matter of debate, since the literature reports on whether they chemisorb or physisorb are contradictory.

There are many open questions surrounding the nature of events occurring at the nano-bio interface between biothiols and metallic NPs.

Objectives

The aim of this thesis was to investigate the occurrences at the interface of metallic NPs and biothiols, establishing their mechanism of interaction and adsorption to reveal their fate in the human body. CYS and GSH were used as model biothiol systems and their interaction with AgNPs and AuNPs was studied by a combination of experimental and theoretical approaches. Main hypothesis was that the interaction of endogenous biothiols with the surface of AgNPs and AuNPs results in the changes at the molecular level both in the structure of thiols and in the surface structure of NPs. Study findings will advance the knowledge on the effects, behaviour and fate of metallic NPs in biological systems, which is important for the development of safe and biocompatible nanomedical products.

Materials and methods

The first step of the study was the optimization of the preparation process of stable, small-sized AuNPs and AgNPs. Silver and gold salts were used as precursors and were reduced with sodium borohydride (NaBH_4) in water to AgNPs and AuNPs, respectively, in the presence or absence of CYS and GSH. The molar ratio of reactants (metal : NaBH_4 : thiol = 1 : 10 : 1) was the most important factor for preparation of colloidally stable nanosystems. To stabilize NPs in the absence of thiols, bis(2-ethylhexyl)sulphosuccinate (AOT), polyvinylpyrrolidone (PVP) and poly-L-lysine (PLL) were used as surface coating agents. The purification of NPs was performed by centrifugation and washing. Detailed characterisation of stable NPs was performed by transmission electron microscopy (TEM), dynamic/electrophoretic light scattering (DLS/ELS), UV/Vis spectroscopy and atomic absorption spectroscopy (AAS). The aggregation and dissolution behaviour was evaluated using the same methods in water and media containing CYS and GSH during 24 h incubation.

The direct interaction of biothiols with uncoated NP surfaces was investigated by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The NPs were prepared following the previously described protocol, and ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded in regular time intervals. The level of reactive oxygen species (ROS) was measured in the same reaction mixtures by the DCFH₂-DA assay. Computational study using the quantum chemistry software Gaussian 16 included a full conformational search on CYS and cystine, followed by an analysis of their binding to Ag_n and Au_n ($n = 2, 3, 4, 13$) clusters. Geometric optimisation, frequency

calculations and natural bond orbital (NBO) calculations of the interaction between CYS or cysteine and Ag_n and Au_n ($n = 2, 3, 4, 13$) clusters at the B3LYP/LANL2DZ level of theory were performed. Molecular dynamics calculations were performed in the program package Amber. The ligand (CYS, cystine, GSH or GSSG) was placed in a simulation box with either Ag or Au nanosurfaces (111 crystal structure, 4 layers, 748 atoms), and 2000 water molecules. The ligand was situated 15 Å from the surface, and the simulation was run for 70 ns. The obtained trajectories were used to calculate free energies of binding using the MM-GBSA approach.

Results and discussion

NPs prepared in the presence of CYS and GSH were spherical and small, ranging from 10 to 20 nm in diameter. In water, they aggregated slightly due to the cross-linking effects of surface coatings. Their zeta potential was strongly negative. Diameters of AOT, PVP and PLL-coated NPs were below 10 nm and their zeta potentials were negative, neutral and positive, respectively. The dissolution of all NPs in water was negligible (< 1%). After exposure of NPs to media rich in thiols, larger aggregates (> 500 nm) were formed after 24h of incubation. AOT- and PVP-AgNPs were more stable in CYS- than GSH-containing media, whereas the reverse was true for PLL-AgNPs. The destruction of NPs was visible in the loss of their surface plasmon resonance (SPR) peaks in UV/Vis spectra. Still, the dissolved fraction reduced even further after contact with NPs, but that could be the result of complexation with thiols. The destabilization effects may be caused by the drop in pH, the increase of ionic strength, binding or substitution of the surface coatings and cross-linking.

The ^1H and ^{13}C NMR spectra initially showed clear signals corresponding to CYS/GSH nuclei. As the reaction progressed, new signals started to appear, shifted downfield by cca 0.2 ppm. Those new signals were identified as belonging to CYS or GSH dimers (cystine and GSSG, respectively). The complete disappearance of original CYS/GSH peaks occurred 90-120 min after reaction start. Thereafter, reaction mixtures were purified and re-dispersed showing the same cystine and GSSG signals, but significantly broadened with loss of resolution indicating their adsorption on nanosurface. The creation of dimers during NP preparation is evidence of an oxidative process. Additional experiments of monitoring thiol oxidation in the absence of NPs proved it was very slow when no metals were present. Therefore, metallic NPs possess a catalytic activity for thiol dimerization.

Oxidation mechanism and binding of disulphides were confirmed computationally using density functional theory (DFT) and molecular dynamics (MD) methods. The most stable complexes were found to be attached through carboxyl groups, but interactions could also occur through the thiol or amine, or by establishing unconventional hydrogen bonds. The NBO analysis on the most stable complexes did not establish the presence of covalent or ionic bonds, but indicated the dipole – induced dipole type of interactions, *i.e.* the physisorption model.

Oxidation mechanism was further explored by calculating the energy of the highest occupied molecular orbital (HOMO). It was assumed that oxidative dimerization could occur either by radical or by ionic mechanism, so both were tested. The reaction involving two cysteine radicals is dependent on the ease of creation of the thiyl moiety. The calculated HOMO energies of some simple thiols were correlated with the experimental value of their oxidation potential, yielding a linear function that was used to extract the oxidation potentials for CYS – cluster complexes. The analysis of the stability of the singlet and triplet state of cystine showed that the presence of metals also lower the energy barrier for radical reactions, thus the radical mechanism could not be reliably ruled out. Still, the more likely mechanism is the ionic mechanism, involving the reaction between cysteine and its oxidised product cysteine sulfenic acid. Oxidation of thiols to sulfenic acids is possible with ROS, which were present in the reaction system and confirmed experimentally. The disulphide bond was formed following the release of one water molecule. Identification and energy calculations of transition states in this reaction yielded a marked catalytic effect of metallic clusters, in agreement with experimental results. Au was shown to be a stronger catalyst than Ag. However, the reaction with Au was slower in experiments due to far lower levels of ROS generated, making the first oxidation to sulfenic acid the rate-limiting step. This provided the theoretical confirmation of the possibility of oxidative processes happening in the atmosphere of borohydride solutions. Though this mechanism was studied computationally only on CYS, it is likely that it may occur the same way with GSH.

The MD simulations were used to study the adsorption of thiols and disulphides to nanosurfaces. Within the first couple of nanoseconds of the simulation, ligands descended to the surface, adsorbed and did not desorb, though they were able to move laterally. As suspected from DFT calculations, it was confirmed that all functional groups participate in binding, and the preferred orientations were the ones where maximum contact with the surface was achieved. Finally, the MM-GBSA approach was employed to evaluate the free energies of binding. The binding was exergonic and therefore spontaneous in all cases. The affinity of ligands is

somewhat higher for Au surfaces compared to Ag, and for disulphides compared to thiols. This indicates the physisorption of disulphides will be preferred when Ag and Au surfaces are exposed to a mixture of thiols and disulphides, which is consistent with the experimental results.

Conclusion

This doctoral research investigated the interplay of AgNPs and AuNPs with thiol-containing endogenous biomolecules to better understand the processes that may influence NMs safety and their biological fate. The study employed a simplified model where three processes were explored simultaneously: the NPs formation in the presence of CYS or GSH, oxidative dimerization of thiols to disulphides in the presence of ionic and nanoparticulate forms of Ag and Au, and adsorption of thiols onto nanosurfaces. This specific range of experiments was important in demonstrating potentially negative impacts of human exposure to AuNPs and AgNPs. Considering different literature reports, it is clear that the products of biothiol and metal interactions will vary in different experimental conditions. The by-products of these processes, if the conditions for their occurrence in the biological systems are met, may be oxidative stress due to ROS generation and intracellular thiol depletion, as well as loss of stability and changes in surface composition of NMs. Therefore, results of this study contributed to the increase of knowledge about nano-bio interactions and their importance for successful use of NMs in medicine.

Keywords: nanoparticles, silver, gold, cysteine, glutathione, nuclear magnetic resonance, density functional theory, molecular dynamics

SADRŽAJ

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| SAŽETAK..... | iii |
| SUMMARY | iv |
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Nanočestice i nanotehnologija..... | 1 |
| 1.2. Nanočestice srebra i zlata i njihova primjena..... | 2 |
| 1.3. Biotransformacije nanočestica u organizmu..... | 3 |
| 1.4. Interakcije endogenih biotiola s nanočesticama metala | 7 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 10 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 12 |
| 3.1. Materijali | 12 |
| 3.2. Priprava nanočestica srebra i zlata..... | 12 |
| 3.3. Karakterizacija i ispitivanje stabilnosti nanočestica | 15 |
| 3.4. Eksperimentalno praćenje učinka biotiola na nukleaciju, rast i stabilnost NP..... | 18 |
| 3.5. Test prisutnosti reaktivnih kisikovih vrsta..... | 20 |
| 3.6. Tehnike računalne kemije..... | 22 |
| 3.6.1. Postupak provođenja kvantno-kemijskih računa | 22 |
| 3.6.2. Postupak provođenja molekularno-dinamičkih računa i izračun Gibbsovih energija vezanja | 25 |
| 3.7. Statistička obrada podataka | 27 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 28 |
| 4.1. Optimizacija uvjeta za pripremu nanočestica | 28 |
| 4.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija nanočestica | 31 |
| 4.3. Praćenje stabilnosti nanočestica u prisutnosti biotiola | 34 |
| 4.4. Učinak biotiola na nukleaciju i rast nanočestica zlata i srebra | 37 |
| 4.5. NMR studija interakcije biotiola s nanočesticama zlata i srebra..... | 40 |
| 4.5.1. NMR spektroskopska analiza cisteina tijekom stvaranja nanočestica i interakcije s nanopovršinom..... | 40 |
| 4.5.2. NMR spektroskopska analiza glutationa tijekom stvaranja nanočestica i interakcije s nanopovršinom | 48 |
| 4.5.3. Teorijski izračun NMR kemijskih pomaka..... | 53 |
| 4.5.4. Zaključna rasprava NMR spektroskopskih rezultata | 55 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.6. Ispitivanje nastajanja reaktivnih kisikovih vrsta tijekom interakcije biotiola s procesom stvaranja nanočestica i s nanopovršinom..... | 56 |
| 4.7. Računalna studija interakcije biotiola i nanočestica..... | 58 |
| 4.7.1. Identifikacija stabilnih kompleksa biotiola i metala primjenom DFT metode | 59 |
| 4.7.2. Istraživanje reakcijskog mehanizma interakcije cisteina s nanočesticama primjenom računalnih metoda | 63 |
| 4.7.3. Ispitivanje prirode interakcije biotiola s metalima..... | 72 |
| 4.7.4. Molekulsko-dinamičko ispitivanje adsorpcije biotiola na nanopovršine..... | 79 |
| 5. ZAKLJUČAK | 84 |
| 6. LITERATURA..... | 85 |
| 7. DODATNI PRIKAZI REZULTATA | 100 |
| 8. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA | 105 |
| 9. ŽIVOTOPIS | 108 |
| TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA | |
| BASIC DOCUMENTATION CARD | |

1. UVOD

1.1. Nanočestice i nanotehnologija

Međunarodna organizacija za standardizaciju (engl. *International Organization for Standardization*, ISO) i Europska Unija definiraju nanočestice (engl. *nanoparticle*, NP) kao čestice kojima je barem jedna dimenzija (duljina, širina ili visina) u rasponu od 1 do 100 nm (1,2), a tehnološka grana znanosti koja proučava razvoj i primjenu nanočestica u znanstvene i industrijske svrhe je nanotehnologija (3).

Nanočestice mogu biti raznolikog kemijskog sastava, oblika, veličine, naboja i površinskih svojstava. Zajednička su im posebna fizikalno-kemijska svojstva u odnosu na makroskopsku količinu istog materijala. Posebna svojstva proizlaze upravo iz nanometarskih dimenzija koja osiguravaju velik omjer površine u odnosu na volumen (što dovodi do velikog kapaciteta NP za vezanje), reaktivnost, katalitička, optička i magnetska svojstva (3–7). Raspon veličina NP približno odgovara rasponu veličina bioloških makromolekula, stoga se NP mogu dizajnirati kako bi oponašale neke funkcije globularnih biomolekula (micele, polimerne strukture, proteinski ili RNA konstrukti) (8).

Posebna svojstva NP potaknula su znanstvena istraživanja s ciljem njihove primjene u biomedicini, uključujući razvoj novih dijagnostičkih postupaka, poboljšavanje terapijske učinkovitosti postojećih farmaceutskih pripravaka te razvoj nanolijekova (9). Tako NP mogu poslužiti kao dijagnostička sredstva (senzori, kontrastna sredstva), nosači molekula ili terapijska sredstva (10). Biološka aktivnost NP obuhvaća interakcije sa staničnim membranama i unos NP u stanice, interakciju s biomolekulama i njihovo vezanje, aktivaciju ili inaktivaciju enzima, stvaranje slobodnih radikala, proapoptotičko djelovanje i sl. Biološki učinci mogu biti: 1) uzrokovani samim materijalom od kojeg je NP načinjena (npr. citotoksični i antimikrobni učinci NP srebra ili bakrova oksida); 2) potaknuti vanjskim izvorom energije (npr. stvaranje slobodnih radikala od strane NP titanova dioksida ili proizvodnja topline NP paramagnetskog željezovog oksida potaknuta elektromagnetskim zračenjem), ili 3) proizlaziti iz lijekova i drugih molekula koje su vezane na ili unutar NP (npr. polimerne čestice ili liposomi kao nosači lijekova) (11,12). Osim sastava, učinci NP ovise o čimbenicima kao što su veličina, oblik, površinska struktura, naboj i hidrofilnost/hidrofobnost. Navedeni čimbenici utječu na bioraspodjelivost NP, njihovu sposobnost prelaska bioloških barijera te ostala farmakokinetička i farmakodinamička svojstva (3,4,13,14).

1.2. Nanočestice srebra i zlata i njihova primjena

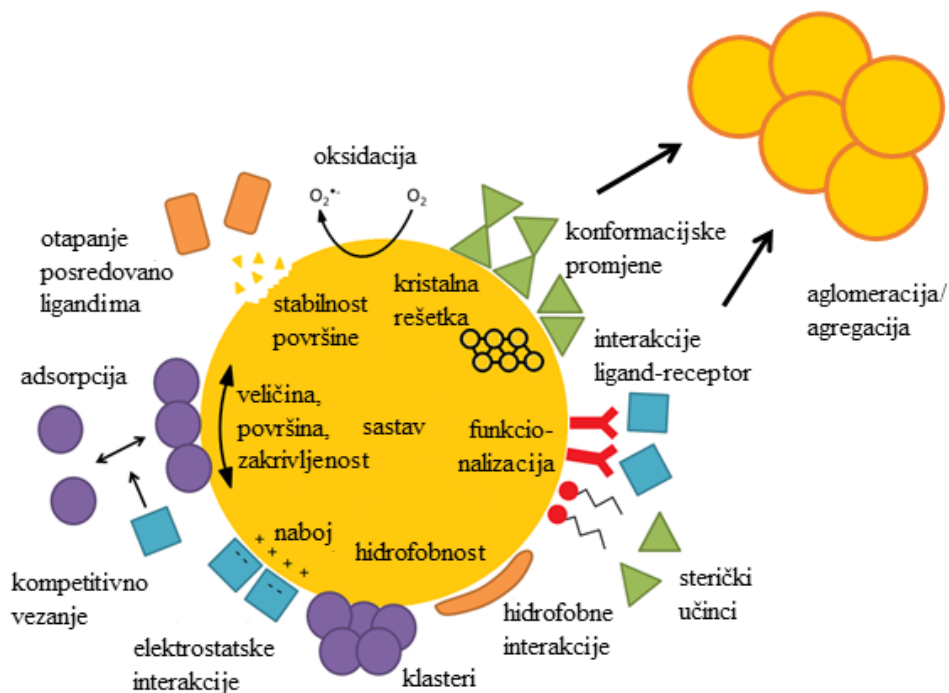
Nanočestice srebra (AgNP) i zlata (AuNP) pripadaju skupini NP metala, koje se istražuju i razvijaju za primjene u različitim područjima ljudske djelatnosti. AgNP se već nalaze u primjeni prehrambenoj (spremnici i pakiranja hrane), tekstilnoj (tkanine impregnirane srebrom), kozmetičkoj (losioni, antiperspiranti, preparati za njegu kože) i elektroničkoj industriji (vodljive tinte, senzori, poluvodiči), a od posebnog su interesa za biomedicinu ponajviše zbog biocidnog djelovanja, ali i protuupalnih, antiangiogenih i antioksidativnih učinaka. U biomedicinske svrhe AgNP se razvijaju kao dijagnostički senzori, kao antimikrobna sredstva u oblozima za rane, premazima za medicinske proizvode (katetere, implantate, proteze i sl.), ali i za terapiju tumora (4,8,14–17). Potražnja za AgNP u stalnom je porastu te se procjenjuje da su prisutne u 30% proizvoda široke potrošnje koji sadrže dodane nanomaterijale i u 75% medicinskih proizvoda s dodanim nanomaterijalima (18–20). Među proizvodima široke potrošnje koji u sastavu navode AgNP nalaze se plahte, čarape, ručnici, dječje igračke, jastuci, vlažne maramice, sapuni, deterdženti i sl., dok se u kategoriji medicinskih proizvoda nalaze oblozi za rane (21).

AuNP posjeduju zanimljiva optička svojstva poput povećanja apsorpcije ili raspršenja elektromagnetskog zračenja, izvrsni su senzori i katalizatori te imaju potencijal primjene u kemijskoj i elektroničkoj industriji (22,23). U biomedicini istražuje se njihova primjena u dijagnostici (biosenzori, agensi za *bioimaging*), u razvoju nanoformulacija za ciljani transport lijekova ili gena (genska terapija), u razvoju antitumorskih sredstava i terapeutika za reumatoidni artritis (8,9,17,23–26).

Uspješna klinička primjena NP ovisi o mnogo čimbenika koji uključuju ne samo svojstva i stabilnost NP nego i mehanizam njihovih interakcija s biološkim sustavima (3,13). Veličina, oblik, površinska svojstva, hidrofилnost i katalitička svojstva NP imaju značajan učinak na biološki odgovor. Također, prilikom ulaska u organizam NP prolaze kroz različite biotransformacijske procese koji im mogu izmijeniti ishodna svojstva (8). Ispitivanje učinaka NP otežano je jer je vrlo malo prikladnih analitičkih tehnika, a vrlo je velika varijabilnost samih NP (8). Usprkos sve većoj primjeni AuNP i AgNP i brojnim studijama koje pokazuju i pozitivne i negativne biološke učinke, pouzdane i sveobuhvatne informacije još uvijek nedostaju (27–31). S obzirom na interes za biomedicinske i druge primjene ovih NP, važno je razjasniti njihovo ponašanje u ljudskom organizmu i sigurnost njihove primjene. Jedan od koraka u procesu ispitivanja sigurnosti NP je utvrđivanje njihovih interakcija s molekulama bioloških medija.

1.3. Biotransformacije nanočestica u organizmu

U biološkim medijima, ovisno o sastavu, pH i ionskoj jakosti medija, moguće su raznovrsne transformacije NP zbog velikog broja mogućih interakcija s komponentama medija, a najčešći procesi su agregacija, aglomeracija, otapanje i/ili dezintegriranje NP, te stvaranje biomolekulske korone čestica (32–34). Agregacija je ireverzibilno, a aglomeracija reverzibilno združivanje NP u veće nakupine, koje se potom talože (35). Otapanje i/ili dezintegriranje je proces otpuštanja iona i/ili sastavnih komponenti NP s nanopovršine uslijed interakcije s komponentama medija (9). Svi ovi procesi, shematski prikazani na Slici 1, događaju se zbog vrlo velike površine NP, zbog čega je i površinska energija velika. Koloidni sustav teži snižavanju te energije te NP spontano agregiraju ili se otapaju ukoliko nanopovršina nije zaštićena (36). Na sve te procese utječu pH, temperatura i prisutnost liganada u mediju, te kemijska reaktivnost, veličina, oblik i površinski omotač NP (36).



Slika 1. Shema zbijanja prilikom kontakta nanočestice s biološkim medijem.

Mehanizam agregacije/aglomeracije temelji se na nasumičnim sudarima čestica zbog Brownovog gibanja u suspenziji. Prema DLVO (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek) teoriji, NP će se prilikom sudara ili udružiti u aglomerat ili se odbiti, ovisno o termodinamičkim interakcijama kratkog dometa (kao što su elektrostatske ili van der Waalsove interakcije) (36).

NP metala agregiraju u uvjetima niskog pH i visoke ionske jakosti te pod utjecajem nekih liganada (13). Otapanje/dezintegriranje NP ovisi o topljivosti materijala u mediju te koncentracijskom gradijentu od površine prema mediju. NP su bolje topljive od makroskopske količine istog materijala zbog velikog omjera površine i volumena. Stoga su otapanje/dezintegriranje i agregacija/aglomeracija međusobno antagonistički procesi.

Za održavanje stabilnosti suspenzija NP, često je nužno obložiti nanopovršinu molekulama koje djeluju kao stabilizatori. Stabilizacija se najčešće postiže osiguravanjem elektrostatskih ili steričkih interakcija. Elektrostatska stabilizacija postiže se povećanjem neto naboja površine NP, zbog oblaganja površine nabijenim molekulama. Prilikom sudara NP istoimenog naboja, doći će do odbijanja i onemogućit će se agregacija. Sterička stabilizacija provodi se oblaganjem površine NP velikim molekulama (polimerima), koji onemogućuju NP da se približe jedna drugoj u prostoru (36–39). Održavanje stabilnosti suspenzija NP ključno je za njihovu uspješnu proizvodnju i primjenu, a u biološkom mediju se stvaranjem biomolekulske korone može dogoditi dodatna stabilizacija NP.

Prilikom kontakta NP s biološkim sustavom poznato je da dolazi do trenutne adsorpcije biomolekula na površinu NP koje čine sloj poznat pod nazivom *biomolekulska korona* (40). To je složeni sustav, koji se može sastojati od iona, malih molekula, proteina, surfaktanata, polimera i drugih makromolekula (41–44). Adsorpcija može biti posredovana elektrostatskim, van der Waalsovim, hidrofobnim i steričkim silama, vodikovim vezama te efektima otapala (45–47). Biomolekulska korona je zapravo dinamički sustav, u kojem se neprestano odvija izmjena molekula na nanopovršini sa slobodnim molekulama u mediju (48). Sastav biomolekulske korone ovisi o svojstvima NP (veličina, oblik, zakrivljenost, sastav, kristaliničnost, naboj, površinski omotač, hidrofobnost), svojstvima medija (pH, ionska jakost, temperatura, koncentracija i afinitet liganada) te vremenu zadržavanja NP u mediju (13,45,49–51). Dinamička priroda korone može se opisati Vromanovim učinkom koji opisuje kompetitivnost procesa adsorpcije i desorpcije, pri čemu se u početku na nanopovršinu adsorbiraju molekule prisutne u mediju pri većoj koncentraciji, dok ih s vremenom istiskuju molekule manje koncentracije ali većeg afiniteta (52–54). Neki autori dijele koronu na „tvrdu“ i „meku“ obzirom na afinitet adsorpcije (48,55). Tvrda korona sastoji se od molekula velikog afiniteta za NP, u direktnom kontaktu s površinom, te je stabilnija i manje podložna promjenama. Meka korona sastoji se od molekula niskog afiniteta, koje su u interakciji s tvrdom koronom i lako izmjenjive (48,55).

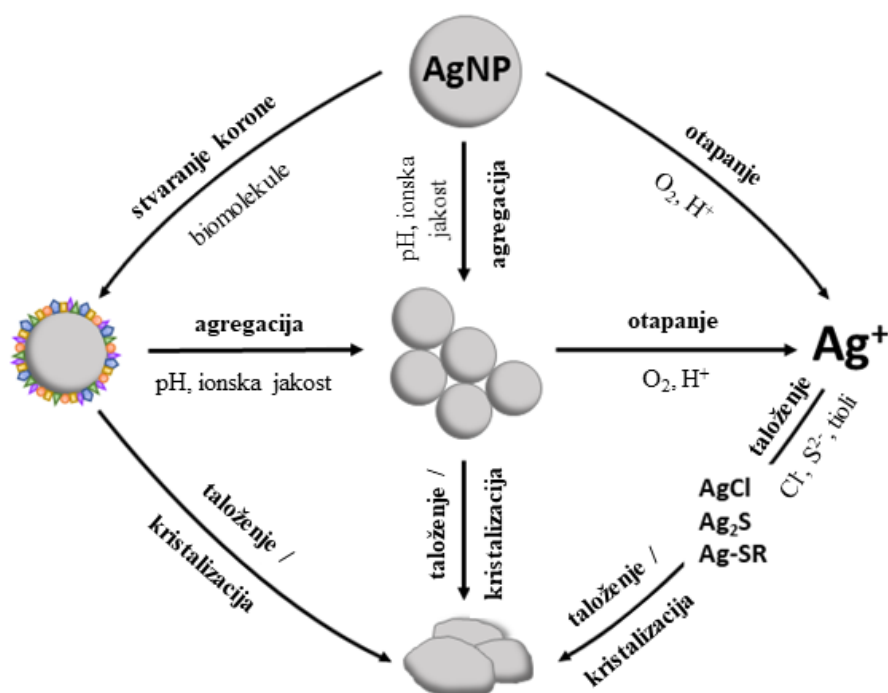
Biomolekulska korona mijenja površinska svojstva NP, utječe na njihovu stabilnost i na interakciju NP s drugim molekulama i biološkim strukturama. Stanice, tj. stanični receptori, dolaze u izravni kontakt samo s koronom, a ne s površinom NP (45,56). Stoga korona može značajno utjecati na farmakokinetiku i farmakodinamiku NP, mijenjajući njihov unos u stanice, vrijeme njihovog zadržavanja u krvotoku, interakciju s receptorima i ligandima, akumulaciju u stanicama i tkivima, pa tako i biološke učinke uključujući i toksičnost (45,49,50). Primjerice, adsorpcija proteina na nanopovršinu može rezultirati promjenom proteinske konformacije i/ili oštećenjem proteina (47). Promjene konformacije proteina često su ireverzibilne, te mogu dovesti do gubitka funkcije proteina (54,55).

Ovisno o primjeni i vrsti proizvoda koji sadrži NP, one u ljudski organizam mogu ući različitim načinima: injekcijom, inhalacijom, peroralno, kroz oštećenu kožu ili otpuštanjem iz implantata (57–59). Bez obzira na put unosa, NP u biološkom mediju prolaze kompleksne i sveobuhvatne transformacije, prema prethodno spomenutim principima (9,36,58,60–62).

Primjerice, prilikom preroralne primjene NP prvo dolaze u kontakt sa slinom, uz pomoć čijih se komponenti može formirati korona koja pomaže stabilizaciji NP (63,64). U želucu prevladava kiseli pH, te NP aglomeriraju ili se otapaju (57,65,66). Transformacija NP u želucu uglavnom je nepotpuna zbog zaštitnog djelovanja korone i kraćeg vremena zadržavanja (57,60,65). U crijevima, viši pH dovodi do sporijeg otapanja NP (61), a postoje i dokazi cijepanja aglomerata na primarne NP (66). Ukoliko se radi o AgNP, ionsko srebro može otpustiti s nanopovršine te apsorbirati ili stupati u interakcije (vidi Sliku 2). Većina NP iz probavnog sustava eliminira se fecesom (67), ali Ag^+ i njegovi topljivi kompleksi mogu se apsorbirati pasivnim ili aktivnim prijenosom (65). Neki autori predložili su mogućnost prelaska NP preko crijevne barijere (68,69). Apsorbirano srebro stupa u interakciju s tkivima i stanicama, unosi se fagocitozom ili pinocitozom i metabolizira u lizosomima (9,65), gdje se NP ponovo otapaju i otpuštaju u citosol (31). Otapanje je spor oksidacijski proces koji zahtijeva prisutnost kisika i protona (70,71), stoga se uglavnom odvija u kiselom mediju želuca ili u lizosomima (9,59,60,67). Na taj proces utječu karakteristike NP kao što su veličina (58,61), površinska funkcionalizacija (72,73), te faktori okoliša poput temperature i liganada (58,59). Enzimi ili kisikovi radikali također doprinose otapanju, jer mogu eliminirati površinski omotač ili koronu (9).

Ag^+ oslobođen u probavnom sustavu može se apsorbirati putem transportera ili kanala za ione i nutrijente (74), a Ag^+ iz lizosoma otpušta se u citosol (31,75). U biološkom mediju, Ag^+ je reaktivan i veže organske i anorganske tvari. Reagira s kloridima i sulfidima stvarajući

AgCl i Ag₂S, koji mogu formirati sekundarne NP (57,60,61,71,76–78). Ag, bilo kao NP ili ion, veže tiole zbog velikog afiniteta sumpora za metale, što isto dovodi do stvaranja granula Ag₂S kroz proces zvan sulfidacija (58,60,65,79,80). Biotransformacije i nakupljanje AgNP dokazani su u plućima nakon izloženosti inhalacijom (74) te u koži (60). Sulfidacija u koži dovodi do stanja zvanog argirija, plavo-sivog obojenja kože zbog nakupljanja granula sastavljenih od Ag, S i Se u hipodermisu (57,58,60). Međutim, tioli imaju dvostruko djelovanje, jer mogu stabilizirati NP ili pospješiti otapanje vezanjem iona s površine (60,80). Slično se događa i s AuNP, iako tu vrstu NP neki autori smatraju biološki inertnima (81,82), ali postoje dokazi njihovog otapanja u lizosomima ili u prisutnosti kisikovih radikala (31,82). AuNP se također mogu obložiti ili razgraditi u prisustvu tiola, peroksida ili aminokiselina te pretvoriti u manje čestice drugog oblika (9,81,83). Ioni Au dokazano stvaraju sekundarne NP koje sadrže i sumpor (82). Nakupine Au u staničnim vezikulima, zvanim aurosomi, poznata su posljedica terapije lijekovima koje sadrže Au(I) (84).



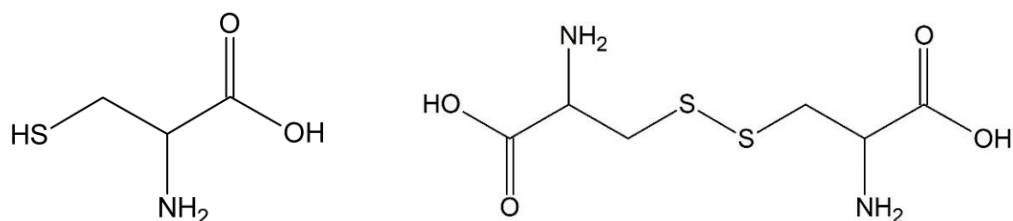
Slika 2. Shema biotransformacija AgNP.

Osim nakupina soli, nedavna istraživanja ukazuju na stvaranje sekundarnih NP redukcijom iona metala *in vivo*. NP elementarnog srebra nastale iz Ag⁺ pronađene su u tkivima (57,60,72,74), dok se Au³⁺ ili Au⁺ mogu polako reducirati do Au⁰ u tijelu (81,85). Opći uvjeti za *de novo* sintezu NP su prisutnost metala, reducensa i stabilizatora (86). Ti se zahtjevi mogu

lako ispuniti u složenim sustavima citoplazme ili izvanstaničnog matriksa. NADPH (87), gvanin (88), triptofan (88), hem proteini (89), tioli (u određenim uvjetima) (90,91), askorbinska kiselina i kateholamini (92) mogu biti reducensi u biološkom mediju. Ioni Ag^+ nakupljeni u koži mogu se također reducirati svjetlošću (57,58). *De novo* nastajanje AgNP dokazano je u bakterijama (93), dok je prisutnost reducirajućih molekula u organskom sustavu iskorištavana u biogenoj sintezi AgNP koristeći ekstrakte bakterija, gljivica (94), mikrobioma crijeva (95), biljaka (96), morskih organizama (97) i životinja (98).

1.4. Interakcije endogenih biotiola s nanočesticama metala

U ljudskom organizmu, cistein (CYS), glutation (GSH) i metalotioneini glavni su tiolni spojevi koji kompleksiraju metale (57,60). Metalotioneini su proteini i vjerojatno ne igraju značajnu ulogu u sulfidaciji (79). Međutim, CYS (Slika 3) i GSH (Slika 4) su male tiolne molekule, sveprisutne u organizmu te imaju afinitet za Ag^+ i Au^{3+} u pikomolarnom rasponu (60). Obje molekule igraju važnu ulogu u obrani tijela protiv oksidativnih oštećenja te je iscrpljivanje njihovih zaliha indikator oksidativnog stresa (99,100).

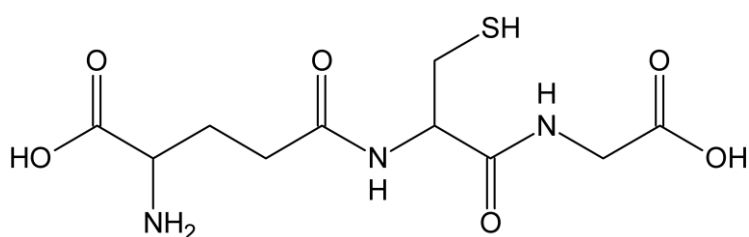


Slika 3. Strukture cisteina (lijevo) i cistina (desno).

CYS je neesencijalna aminokiselina, građevni dio proteina i samog GSH, te sudjeluje u metabolizmu organskih molekula. U strukturi sadrži jednu tiolnu skupinu (101), zbog čega sudjeluje u enzimatskim reakcijama kao nukleofil. Oksidacijom CYS nastaje cistin, dimer CYS s disulfidnom vezom. Disulfidne veze važne su za sekundarnu strukturu brojnih proteina (99,102,103). CYS je također antioksidans, izvor sulfida u organizmu, kelator metala u proteinima te nukleofil u proteazama (104–108).

GSH je tripeptid, γ -glutamyl-cisteinil-glicin, glavni mali tiol biljaka i životinja (109). Najzastupljeniji je biotiol u jetri (koncentracije oko 10 mM), dok mu je razina u krvi oko 1 mM. Sadrži jednu tiolnu skupinu, koja potječe iz cisteinskog bočnog lanca, te je jednako reaktivna

za metale (57,83). Igra glavnu ulogu u obrani organizma od oksidativnog oštećenja (100). Zovu ga staničnim redoks puferom, jer održava redoks potencijal tiol/disulfid. Oksidirani oblik (disulfid) označava se kao GSSG. GSH/GSSG sustav štiti stanice od hiperoksije, hiperbaričnog kisika, ozona te elektromagnetskog zračenja. GSH/GSSG ravnoteža regulirana je glutathion peroksidazom, koja eliminira vodikov peroksid i lipidne radikale, te koenzimom NADPH. GSH također može stvarati asimetrične disulfide s proteinima i ksenobioticima, uz posredovanje glutathion transferaze. GSH također ima ulogu u staničnoj signalizaciji, ekspresiji gena, regulaciji apoptoze, metabolizmu brojnih molekula, sintezi prostaglandina (109,110).



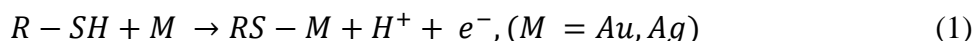
Slika 4. Struktura glutathiona

CYS i GSH idealni su modeli za proučavanje vezanja sumpornih biomolekula na površine Ag i Au upravo zato što mogu postojati kao slobodni tioli, ali i stvarati disulfidne veze (111). Također su važni za normalno funkcioniranje organizma te utjecaj na njihovu homeostazu može imati zdravstvene posljedice. Zbog svoje veličine, mogu proći kroz sloj proteina u biomolekulskoj koroni i doći do površine NP (112). Stoga je još važnije izučiti njihovo ponašanje u prisutnosti NP metala i ulogu u interakcijama i biotransformacijama.

Tiolne skupine (-SH) klasificiraju se kao meke Lewisove baze (nukleofili) te kao takve imaju veliki afinitet za meke kiseline, kao što su ioni metala (60). Također su podložne oksidaciji, pogotovo u ioniziranom (-S⁻) obliku (113). Oksidirani oblici, tj. disulfidi (S-S), također imaju afinitet prema metalima, ali manje od tiola (70). Udruživanje tiola i disulfida s metalima i površinama metala ispitivano je eksperimentalno i teoretski u brojnim studijama. Spontano stvaranje monoslojeva tiola na površinama metala fenomen je ispitan na brojnim alkiltiolima (114,115). Fotodifrakcijskim i tehnikama stojnih valova X-zraka (engl. *X-ray standing wave*, XSW) pokazano je vezanje tiola okomito na površinu Au (116). Novija istraživanja pokazuju da ti slojevi nisu čvrsto vezani, nego da tioli mogu difundirati bočno po

površini. Ipak, desorpcija na sobnoj temperaturi nije od velikog značaja, a izmjena liganada vrlo je spora (115).

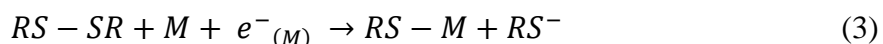
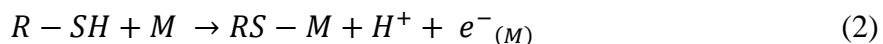
Objavljeni znanstveni podaci o vezanju tiola na površine metala su brojni, ali proturječni. Prevladavajuća hipoteza je da se tioli adsorbiraju na površinu Au te se formira jaka veza S–Au energije 44 kcal/mol. Vezanju sumpora prethodi deprotonacija tiolne skupine, pri čemu nastaje tiolni radikal (116). Sumpor donira elektronski par u prazne orbitale Ag i Au (17). Paik i sur. (117) pretpostavljaju mehanizam adsorpcije prikazan jednadžbom 1:



Pretpostavlja se da disocirani vodik prelazi u H₂ (118).

Suprotno tome, postoje tvrdnje da se vezanje tiola na metale odvija običnom fizisorpcijom, tj. da ne dolazi do nastanka tiolata. Oslobođanje molekuskog vodika nije potvrđeno eksperimentalno (119). Abraham i sur. pretpostavljaju fizisorpciju tiola na Au na sobnoj temperaturi, dok se kemisorpcija događa tek pri povišenim temperaturama (101).

Postoje indikacije da nema razlike u konačnoj strukturi monoslojeva dobivenih iz tiola i disulfida, tj. da se obje specije vežu u obliku tiolata. Pritom je adsorpcija tiola oksidativna, a disulfida reduktivna (114) kako je prikazano jednadžbama 2 i 3:



Prethodna istraživanja vezanja CYS i GSH na Ag ili Au pretežno su provedena na površinama poput elektroda. U takvim uvjetima, pronađeno je vezanje CYS na Au preko tiolne skupine, uz nužnu deprotonaciju tiola (118,120–122). Kasnije je predloženo da stvaranje tiolata nije jedini mehanizam vezanja, nego da sudjeluju i druge funkcionalne skupine (123,124). Prilikom vezanja CYS i Au, atomi Au ponašaju se kao Lewisove kiseline (elektron akceptori) (125). CYS dovodi do perturbacija elektronske strukture na površini te remeti raspored atoma Au u kristalnoj rešetki (126). Isto je utvrđeno za vezanje CYS na Ag površine (127–129). Spontano stvaranje slojeva GSH na površine Ag i Au također je eksperimentalno potvrđeno (130–135). Ipak, istraživanja na AuNP i AgNP su oskudna te postoji mnogo otvorenih pitanja oko prirode i mehanizama zbivanja na takvim nano-bio sučeljima.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Razvoj i primjena AgNP i AuNP u biomedicini pretpostavlja njihovu biokompatibilnost koja ovisi ne samo o fizikalno-kemijskim karakteristikama NP, nego i interakcijama na nano-bio sučelju (3,13). Jedan od ključnih događaja na tom sučelju koji se događa odmah nakon izlaganja NP biološkom mediju jest stvaranje biomolekulske korone, što značajno može utjecati na stabilnost i reaktivnost NP, te na njihove biološke učinke (3,136–138). Biomolekulska korona rezultat je složenih interakcija različitih biomolekula s nanopovršinom, koje ovise o svojstvima samih NP, o zastupljenosti biomolekula u mediju, te o njihovom afinitetu za nanopovršinu (9,139).

Većina istraživanja o biomolekulskoj koroni na AgNP i AuNP usmjerena je na njen proteinski sastav, iako se zbog velikog afiniteta sumpora za Ag i Au ne smije zanemariti uloga malih endogenih tiola. Male molekule mogu lako doći do površine NP čak i kada je ta površina već okupirana proteinima (112). Također, poznato je da tioli mogu kompleksirati ione metala, te pospješiti otapanje i biotransformacije AuNP i AgNP (60,140,141).

Najzastupljeniji mali tioli u ljudskom organizmu su CYS i GSH. Obje molekule su ključne za normalno funkcioniranje organizma te imaju gradivnu, metaboličku i antioksidativnu ulogu (99,100). Također, mogu formirati disulfide, što se smatra negativnom posljedicom, tj. iscrpljivanjem zaliha antioksidanasa (111). Zbog svoje važnosti za organizam i prisutnosti tiolne skupine, dobri su modeli za proučavanje interakcija na nano-bio sučelju.

Istraživanje u sklopu ove disertacije kombinira računalni i eksperimentalni pristup s ciljem utvrđivanja mehanizma interakcije CYS i GSH s različitim vrstama AgNP i AuNP u biološkom mediju. Postavljena hipoteza glasi da interakcija endogenih tiola s površinom AgNP i AuNP dovodi do promjena na molekulskoj razini i u strukturi tiola i u površinskom omotaču čestica. Za potvrdu ili opovrgavanje hipoteze postavljena su četiri specifična cilja:

1. Ispitati nastajanje AgNP i AuNP uz i bez prisustva CYS i GSH.
2. Karakterizirati, procijeniti stabilnosti i moguće transformacije AgNP i AuNP u vodenom mediju uz ili bez prisustva CYS i GSH.
3. Pratiti interakcije CYS/GSH s AgNP i AuNP uz određivanje funkcionalnih skupina koje sudjeluju u vezanju, orijentacije biomolekula na površini NP i strukture nastalih kompleksa.

4. Definirati mehanizam interakcije CYS i GSH s AgNP i AuNP, uz procjenu prirode nastalih veza.

Ovo mehanističko istraživanje temelji se na primjeni standardnih tehnika karakterizacije NP (transmisijska elektronska mikroskopija, dinamičko i elektroforetsko raspršenje svjetlosti, UV/Vis spektroskopija i atomska apsorpcijska spektroskopija), zatim NMR spektroskopije, te *in silico* metoda. Dobiveni rezultati značajno doprinose unaprjeđenju znanja o učincima, ponašanju i sudbini NP metala u biološkim sustavima uslijed interakcije s biotiolima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za izvođenje eksperimenata korištene su sljedeće kemikalije: srebrov nitrat (AgNO_3 , Mr 169,87), tetrakloraurinska kiselina (HAuCl_4 , Mr 393,83), natrijev borhidrid (NaBH_4 , Mr 37,83), natrijev hidroksid (NaOH , Mr 39,997), dušična kiselina (HNO_3 , Mr 36,01), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4 , Mr 141,96), kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4 , Mr 136,09), natrijev klorid (NaCl , Mr 58,44), kalijev klorid (KCl , Mr 74,55), klorovodična kiselina (HCl , Mr 36,46), natrijev bis (2-etilheksil)sulfosukcinat (AOT, $\text{C}_{20}\text{H}_{37}\text{NaO}_7\text{S}$, Mr 444,56), poli(vinilpirolidon) [PVP, $(\text{CH}_9\text{NO})_n$, Mr 40000], ϵ -poli-L-lizin [PLL, $(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O})_n$, Mr 4700], L-cistein (CYS, $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$, Mr 121,16), $^{13}\text{C}_3$ - ^{15}N -cistein ($\text{HS}^{13}\text{CH}_2^{13}\text{CH}^{15}\text{NH}_2^{13}\text{COOH}$, Mr 125,13), L-glutation reducirani (GSH, γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicin, Mr 307,32), teška voda (D_2O , Mr 20,03), 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH₂-DA, $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{O}_7$, Mr 487,29), fluorescein diacetat (F-DA, $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{O}_7$, Mr 416,38), 3-morfolinosindonimin hidroklorid (SIN-1, $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$, Mr 206,63). Pufirirana fiziološka otopina sastoji se od 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 i 1,8 mM KH_2PO_4 , otopljenih u ultračistoj vodi, tako da je konačni pH 7,4.

Sve kemikalije, osim ako nije drugačije navedeno, bile su analitičke čistoće i nabavljene od tvrtke Sigma Aldrich (Darmstadt, Njemačka). Srebrov nitrat nabavljen je od tvrtke Alfa Aesar (Karlsruhe, Njemačka). Natrijeve soli i dušična kiselina nabavljeni su od tvrtke Kemika (Zagreb, Hrvatska). Plastični pribor nabavljen je od tvrtke Sarstedt (Antwerpen, Belgija), a stakleni od tvrtke Schott (Mainz, Njemačka). Za sva razrjeđenja korištena je ultračista voda (deionizirana voda električne vodljivosti 18,2 M Ω /cm) dobivena pomoću Milli-Q[®] IX sustava za pročišćavanje vode (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka).

3.2. Priprava nanočestica srebra i zlata

Dva su osnovna pristupa sintezi NP: tzv. „*top-down*“ (odozgo prema dolje) i „*bottom-up*“ (odozdo prema gore). „*Top-down*“ pristup polazi od makroskopske količine materijala, koji se fizikalnim, kemijskim ili mehaničkim metodama smanjuju do NP (142). „*Bottom-up*“ pristup polazi od atoma, iona ili molekula, koji se prevode u NP fizikalnim i kemijskim procesima (primjenom visokih temperatura, mehaničkih sila ili kemijskih reakcija) (142–144), te uključuje

proces nukleacije, pri kojem se nastali atomi povezuju u klastere, a zatim u jezgre (nukleuse). Primarna nukleacija vrlo je brz proces mjerjen u mikrosekundama, nakon čega slijedi faza rasta u kojoj se od malih jezgara formiraju veće i stabilne NP kroz period od nekoliko minuta do nekoliko sati (145–147).

Za održavanje stabilnosti NP metala u suspenziji ključno je korištenje stabilizatorskih tvari, a najčešće su to površinski aktivne tvari i polimeri. Promjenom uvjeta sinteze, kao što su koncentracija reaktanata, koncentracija stabilizatora, temperatura, brzina, te redosljed dodavanja reaktanata, moguće je utjecati na veličinu, oblik, površinski naboj i površinsku strukturu NP (148).

U ovoj disertaciji, NP su pripremljene postupkom redukcije iona metala u vodenom mediju. Soli metala korištene kao prekursori iona metala bile su AgNO_3 i HAuCl_4 , a kao reducens korišten je NaBH_4 .

Za ispitivanje interakcija endogenih biotiola s „golom“ površinom NP, reakcija redukcije provedena je uz prisutnost CYS ili GSH. Na taj se način redukcija iona metala do elementarnog Ag/Au i vezanje biotiola odvijaju istovremeno, što je rezultiralo stabilnim NP direktno obloženim biotiolima. Reakcijski uvjeti i omjeri iona metala, NaBH_4 i biotiola, varirani su kako bi se dobile NP optimalnih svojstava (Tablica 1). Dva su sintetska pristupa iskušana: pristup 1, u kojem se reducens dodao u otopinu soli metala prije dodatka tiola, te pristup 2 u kojem su tioli dodani prije reducensa. U pristupu 1, soli metala otopljene su u ultračistoj vodi i otopina je prebačena u staklenu tikvicu s okruglim dnom. Svježe pripremljena otopina NaBH_4 dodana je kapanjem pri brzini od oko 1 kapi u sekundi, pri čemu je otopina neprekidno miješana na magnetskoj miješalici (600-700 okretaja u minuti). Potom je dodana otopina tiola te je smjesa ostavljena na miješanju 2 h. U pristupu 2, soli metala ponovo su otopljene u vodi, ali im je odmah dodana otopina tiola uz neprestano miješanje. Potom je NaBH_4 dokapan u reakcijsku smjesu i ostavljen da reagira 2 h. Sve sinteze provedene su na sobnoj temperaturi, zaštićene od svjetlosti. Produkti su ispitani vizualno kako bi se utvrdila stabilnost (postojanje taloga), te određivanjem raspodjele veličina dobivenih NP korištenjem tehnike dinamičkog raspršenja svjetlosti (vidi Poglavlje 3.3.).

Osim gore opisanih metoda pripreme NP, istraživanje je provedeno i na dodatne tri vrste AgNP koje su pripravljene korištenjem AOT, PVP i PLL kao površinskih stabilizatora. Pri tome je AgNO_3 otopljen u ultračistoj vodi u koncentraciji od 2,3 mM, te je otopini dodan AOT do koncentracije 0,5 mM, PVP do koncentracije 0,3% (m/v) ili PLL do koncentracije

0,05% (m/v). Otopine su nakon toga miješane na magnetnoj miješalici te je u njih dokapavan NaBH₄ do koncentracije 8 mM. Konačni volumen reakcijske smjese bio je 200 mL. Reakcijske smjese ostavljene su na miješanju tijekom 1 h na sobnoj temperaturi i zaštićene od svjetlosti.

Tablica 1. Ispitani uvjeti za pripremu AgNP i AuNP u prisutnosti CYS i GSH. Molarni omjeri reaktanata označeni su kao [Ag] : [NaBH₄] : [tiol] ili [Au] : [NaBH₄] : [tiol], a redoslijed dodavanja reaktanata označen je kao pristup 1 (ion metala → NaBH₄ → tiol) ili pristup 2 (ion metala → tiol → NaBH₄).

| Tiol | AgNP | | | AuNP | | |
|------|---------------|--------------------------------------|---------|---------------|--------------------------------------|---------|
| | konc. Ag [mM] | [Ag] : [NaBH ₄] : [tiol] | Pristup | konc. Au [mM] | [Au] : [NaBH ₄] : [tiol] | Pristup |
| CYS | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 1 | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 1 |
| CYS | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 2 | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 2 |
| CYS | 1 | 1 : 2 : 0,5 | 1 | 1 | 1 : 2 : 1 | 1 |
| CYS | 1 | 1 : 2 : 0,5 | 2 | 1 | 1 : 2 : 1 | 2 |
| CYS | 1 | 1 : 10 : 0,2 | 1 | 1 | 1 : 10 : 0,2 | 2 |
| CYS | 1 | 1 : 10 : 0,2 | 2 | 3 | 1 : 10 : 1 | 2 |
| CYS | 5,6 | 1 : 10 : 1 | 2 | 10 | 1 : 10 : 1 | 2 |
| CYS | 10 | 1 : 10 : 1 | 2 | / | / | / |
| GSH | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 1 | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 1 |
| GSH | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 2 | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 2 |
| GSH | 1 | 1 : 2 : 0,5 | 1 | 1 | 1 : 2 : 1 | 1 |
| GSH | 1 | 1 : 2 : 0,5 | 2 | 1 | 1 : 2 : 1 | 2 |
| GSH | 1 | 1 : 10 : 0,2 | 1 | 1 | 1 : 10 : 0,2 | 1 |
| GSH | 5,6 | 1 : 10 : 1 | 2 | 3 | 1 : 10 : 1 | 2 |
| GSH | 10 | 1 : 10 : 1 | 2 | 10 | 1 : 10 : 1 | 2 |

Pročišćavanje i ukoncentriravanje NP provedeno je postupkom centrifugiranja reakcijskih smjesa dva puta na brzini od 20.000 g. Nakon svakog centrifugiranja, supernatant koji sadrži reaktante preostale nakon pripreve i nusprodukte izdvojen je i odbačen, a talog NP je resuspendiran u ultračistoj vodi. Nakon pročišćavanja, pripravljene NP su čuvane na 4 °C, zaštićene od svjetlosti. Koncentracija NP određena je tehnikom atomske apsorpcijske spektrometrije (vidi niže) te izražena u mg Ag/L za AgNP ili mg Au/L za AuNP suspenzije.

3.3. Karakterizacija i ispitivanje stabilnosti nanočestica

Karakterizacija NP provedena je određivanjem oblika, veličine i raspodjele veličina, zeta potencijala, optičkih svojstava, te udjela slobodnih metalnih iona u suspenziji NP. Sve suspenzije NP karakterizirane su nakon pročišćavanja niže navedenim postupcima.

Koncentracija NP u ovom radu izražena je kao koncentracija metala u volumenu suspenzije (mg Ag/L ili mg Au/L) i određena je atomskom apsorpcijskom spektroskopijom (AAS). AAS je standardna metoda za elementalnu analizu, koja se zasniva na svojstvu atoma da apsorbiraju elektromagnetsko zračenje točno određenih valnih duljina. Apsorbancija slijedi Beer-Lambertov zakon, tj. linearno je ovisna o koncentraciji atoma (149). Za mjerenja je korišten instrument AAnalyst 600 (Perkin Elmer, Shelton, SAD) s grafitnom peći. Korištene su katodne lampe za Ag i Au, na valnim duljinama 328 nm, odnosno 268 nm. Koncentracija metala u svakom uzorku izračunata je iz kalibracijskog pravca koji prikazuje ovisnost apsorbancije uzorka o koncentraciji. Kalibracijski pravac rađen je na početku svakog radnog dana određivanjem apsorbancije standardnih otopina Ag ili Au poznate koncentracije. Radni standardi pripremljeni su razrjeđivanjem standardnih otopina Ag ili Au (1000 mg metala/L u 5% HNO₃, Merck, Darmstadt, Njemačka) u 1% (v/v) HNO₃, u rasponu koncentracija od 1 do 40 µg Ag/L za AgNP ili od 10 do 500 µg Au/L za AuNP. Kalibracijski pravac određen je korelacijom iz 6 točaka, te se smatrao prihvatljivim kada je koeficijent korelacije r^2 bio $> 0,995$. Uzorci su pripremljeni razrjeđivanjem u 1% (v/v) HNO₃ 100 do 250 tisuća puta i pipetirani u polistirenske čašice volumena 1 mL.

Tehnika transmisijske elektronske mikroskopije (TEM) omogućila je vizualizaciju NP te određivanje njihove primarne veličine (promjera) i stupnja agregacije/aglomeracije. TEM je jedna od najčešće korištenih tehnika u nanotehnologiji, te se uspješno primjenjuje za ispitivanja svojstava nanokristala, ugljikovih nanocijevi, poroznih i višeslojnih materijala i NP metala (150,151). Priprema uzoraka za ovu tehniku provedena je tako da su suspenzije NP razrijeđene ultračistom vodom do koncentracije 10 mg metala/L. Volumen od 10 µL suspenzije nakapan je na bakrene mrežice obložene Formvar® polimerom (SPI Supplies, West Chester, USA), te su ostavljene da se osuše na zraku. Za snimanje je korišten instrument TEM 902A (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Njemačka), postavljen u način rada sa svijetlim poljem (engl. *bright field*), gdje su NP vidljive kao tamni objekti na svijetloj podlozi. Korišten je akceleracijski napon od 80 kV te su slike snimljene na povećanjima od 50,000 do 140,000 puta. Slike su snimljene Canon PowerShot S50 kamerom povezanom na instrument.

Određivanje raspodjele veličina te praćenje stabilnosti NP u različitim medijima obzirom na agregaciju/aglomeraciju provedeno je pomoću tehnike dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS). Ova tehnika, za razliku od TEM-a, nije destruktivna i ne zahtijeva sušenje uzorka. Međutim, ona ne mjeri stvarni promjer NP, nego hidrodinamički promjer (d_H). d_H uključuje i solvacijsku ljusku koja se stvara oko čestice u mediju i giba s NP kao cjelina (152). Uzorci za mjerenje razrijeđeni su u ultračistoj vodi do koncentracije 10 mg metala/L. Volumen od 1 mL uzorka pipetiran je u jednokratnu plastičnu kivetu (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka). Sva mjerenja provedena su na Zetasizer Nano ZS instrumentu (Malvern Instruments, Malvern, UK), koji je bio opremljen zelenim laserom (532 nm), a detekcija raspršenog zračenja provodila se pod kutom od 173° na temperaturi od 25°C . Veličina NP dobiva se iz volumne distribucije i izražava se kao prosječna vrijednost 10 uzastopnih mjerenja. Za unos indeksa loma i apsorbancija NP korištene su vrijednosti dostupne u softveru instrumenta (za AgNP $n = 0,135$, $A = 0,01$; za AuNP $n = 0,20$, $A = 0,01$). Obrada podataka izvršena je u programu Zetasizer software 6.32 (Malvern Instruments, Malvern, UK).

Metoda elektroforetskog raspršenja svjetlosti (engl. *electrophoretic light scattering*, ELS), koja se temelji na određivanju elektroforetske pokretljivosti NP, korištena je za određivanje zeta (ζ) potencijala NP. To je potencijal na plohi smicanja, tj. na zamišljenoj granici električnog dvosloja koji se stvara u otopini oko nabijene čestice (153). ζ potencijal NP stoga ovisi o površinskom naboju NP i njezinom okruženju (dielektričnoj konstanti otapala, pH, ionskoj jakosti). Koristi se za kvalitativno predviđanje elektrostatske stabilizacije i specifičnih interakcija NP (154). NP koje imaju veliku apsolutnu vrijednost ζ potencijala (bilo pozitivnog ili negativnog predznaka), odbijati će se prilikom sudara i neće dolaziti do njihove agregacije ili aglomeracije. Općenito se NP proglašavaju elektrostatski stabiliziranima ako im je apsolutna vrijednost ζ potencijala veća od 30 mV (153,155). Svi uzorci NP su mjereni nakon razrjeđenja u ispitivanom mediju do koncentracije od 10 mg metala/L. Uzorci su pipetirani u posebne kivete za ELS mjerenja (Malvern Instruments, Malvern, UK) ukupnog volumena 1 mL. Sva mjerenja provedena su na Zetasizer Nano ZS instrumentu (Malvern Instruments, Malvern, UK). Za računanje ζ potencijala korištena je Henryjeva jednadžba sa Smoluchovskom aproksimacijom. Obrada podataka provedena je pomoću Zetasizer programa, verzija 6.32 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Rezultati su izraženi kao prosječna vrijednost 5 uzastopnih mjerenja uz standardnu devijaciju. Uz određivanje zeta potencijala, u uzorcima je nakon razrjeđivanja izmjeren pH prema niže navedenom postupku. Prilikom mjerenja nije korišten pufer jer on dovodi do agregacije NP.

Optičko svojstvo NP mjereno u ovom istraživanju je površinska plazmonska rezonancija (engl. *surface plasmon resonance*, SPR), koja proizlazi iz oscilacije slobodnih elektrona u vodljivoj vrpci metala. NP metala apsorbiraju zračenje čija valna duljina odgovara frekvenciji oscilacije. Intenzitet apsorbancije i vršna valna duljina ovise o karakteristikama NP i indeksu loma medija (156–159). SPR za ispitivane NP je određen UV/Vis spektroskopskom metodom na CARY 300 spektrofotometru (Varian Inc., Melbourne, Australija), koristeći kvarcnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm, u rasponu valnih duljina 200 – 800 nm. Sva mjerenja provedena su na 25 °C. Uzorci su razrjeđivani do koncentracije 10 mg metala/L u ultračistoj vodi.

Određivanje količine iona u suspenziji NP metala jednostavno se provodi tehnikama kvantifikacije kao što je AAS, no prethodno je potrebno odvojiti slobodne ione od NP metala. Jedna od najčešće korištenih separacijskih tehnika je ultrafiltracija (67). Tehnika se zasniva na filtraciji suspenzije NP preko membrane filtera s veličinom pora koje su manje od veličine NP, pomoću centrifugiranja (160). Brzina i vrijeme trajanja centrifuge optimiziraju se tako da najveći dio vodenog medija prođe kroz filter, a da ne dođe do odvajanja omotača, destabilizacije NP i dodatnog otapanja zbog preintenzivnih uvjeta (161). Za određivanje udjela slobodnih metalnih iona u suspenzijama NP, NP su razrijeđene u ispitivanom mediju do koncentracije 10 mg metala/L, inkubirane određeno vrijeme na sobnoj temperaturi zaštićene od svjetlosti. U zadanim vremenskim intervalima, alikvoti od 2 mL pipetirani su u Amicon-4 Ultra centrifugalne filtere s membranama veličine pora od 3 kDa (Merck Millipore, Darmstadt, Njemačka), te su filtrirani 20 min na 2200 g kako bi se razdvojile NP od iona. Membrane filtera načinjene su od Millipore Ultracell® regenerirane celuloze te im je procijenjena veličina pora ~2 nm (162). Filtrati su zakiseljeni s HNO₃ do konačne koncentracije kiseline 10% (v/v) kako bi se spriječila adsorpcija metalnih iona na stijenke polistirenskih posudica u koje su prikupljani filtrati. Kvantifikacija oslobođenih iona provedena je AAS metodom kako je prethodno opisano. Rezultati su prikazani kao postotci otopljenih iona u odnosu na ukupan sadržaj metala u suspenzijama NP prije filtracije. Za provjeru prolaska iona srebra i zlata kroz membranu korištene su vodene otopine AgNO₃ i HAuCl₄ koncentracije 10 mg/L, koje su filtrirane i analizirane istim postupkom kao i nanočestice. Kako bi se ispitalo zadržavanje iona na membrani filtera, nakon provedenog centrifugiranja otopina soli metala, filteri su isprani centrifugiranjem 2 mL ultračiste vode pri istim uvjetima te je filtrat također analiziran prethodno opisanim postupkom.

Osim gore opisanih osnovnih fizikalno-kemijskih parametara, ispitivana je i koloidna stabilnost NP u različitim medijima obzirom na njihovo otapanje i agregaciju/aglomeraciju. Agregacija ili aglomeracija NP su pojave mjerljive tehnikama za određivanje veličine NP, jer se manifestiraju kao povećanje promjera NP u suspenziji, dok se otapanje NP odnosi na određivanje udjela slobodnih iona metala u suspenziji NP. U ovoj disertaciji cilj je bio odrediti utjecaj biotiola na stabilnost NP u različitim medijima. Stoga su suspenzije AOT-, PVP- i PLL-AgNP razrijeđene do 100 mg metala/L u a) ultračistoj vodi, b) vodenoj otopini CYS koncentracije 100 mg/L i c) vodenoj otopini GSH koncentracije 100 mg/L. Otopine biotiola pripravljene su vaganjem 5 mg praha tiola i otapanjem u 50 mL ultračiste vode, te su korištene svježe. Suspenzije NP u medijima ostavljene su na miješanju na sobnoj temperaturi u periodu od 24 h. Alikvoti su uzimani odmah nakon pripreme suspenzija, te nakon 1, 4 i 24 h miješanja, nakon čega su razrijeđeni u ultračistoj vodi do prikladne koncentracije za pojedinu analitičku tehniku. Svakom uzorku određena je veličina i raspodjela veličina, oblik, ζ potencijal i optička svojstva tehnikama TEM, DLS, ELS, UV/Vis i AAS, prema postupcima opisanim u prethodnim odlomcima.

Dodatno je određen pH razrijeđenih suspenzija NP te otopina CYS i GSH koncentracija od 100 mg/L koristeći pH-metar Orion Star A214 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Njemačka). pH-metar je korišten nakon kalibracije standardnim otopinama nabavljenim od tvrtke Thermo Fisher Scientific čiji je pH bio 4,01, 7,00 i 10,01.

3.4. Eksperimentalno praćenje učinka biotiola na nukleaciju, rast i stabilnost NP

Učinak CYS i GSH na nukleaciju, rast i stabilnost AgNP i AuNP praćen je u reakcijskim smjesama koje su sadržavale 10 mM soli metala, 10 mM biotiola i 100 mM NaBH₄ odmah nakon miješanja, 1 h i 2 h nakon početka miješanja, a temeljem podataka koji su dobiveni provođenjem eksperimenata opisanim u poglavlju 3.2. Za određivanje oblika, veličine, raspodjele veličina, ζ potencijala i položaja SPR-a korištene su TEM, DLS i ELS tehnike, te UV/Vis spektroskopija.

Strukturne promjene CYS i GSH praćene su NMR spektroskopijom. NMR je metoda razvijena za ispitivanje strukture organskih spojeva na temelju magnetskih svojstava pojedinih atoma, a može se upotrijebiti za identifikaciju i kvantifikaciju liganada na nanopovršinama, provjeru čistoće obloženih NP, detekciju interakcija NP i liganada, određivanje afiniteta vezanja, praćenje oslobađanja i sl. (163). Praćenje interakcija liganada i NP moguće je NMR

spektroskopijom zbog promjena u kemijskom okolišu liganada kad se nađu na sučelju otopine i čvrste tvari. To može dovesti do pomaka pojedinih signala, širenja spektralnih linija ili čak nestajanja signala. Kemijski pomak može se promijeniti zbog vezanja na različita mjesta u kristalnoj rešetki i sparivanja rezonancija s elektronima vodljive vrpce metala (164). Ako je molekula imobilizirana na površini i ne može se brzo reorijentirati, vidljivo je nehomogeno širenje signala (165).

NMR spektroskopija omogućila je određivanje strukturnih promjena biotiola tijekom njihove interakcije s NP u nastajanju. Alikvoti reakcijskih smjesa, kao i kontrolnih otopina, pipetirani su u Wilmad[®] staklenu cjevčicu za NMR promjera 5 mm (predviđenu za spektrometre od 400 MHz, Sigma Aldrich, Darmstad, Njemačka) te im je dodana D₂O do konačne koncentracije 10% (v/v). Uzorcima su snimljeni ¹H i ¹³C spektri prema pulsnom protokolu dostupnom u programskom paketu VnmrJ 4.2A. Interakcija CYS/GSH i AgNP praćena je u reakcijskim smjesama koje su sadržavale 5,6 mM CYS/GSH, 5,6 mM AgNO₃ i 56 mM NaBH₄ ili 10 mM CYS/GSH, 10 mM AgNO₃ i 100 mM NaBH₄ u intervalima od 10-20 min nakon miješanja, u ukupnom trajanju od 2 h. Interakcija CYS/GSH i AuNP praćena je u reakcijskim smjesama koje su sadržavale 3 mM CYS/GSH, 3 mM HAuCl₄ i 30 mM NaBH₄ ili 10 mM CYS/GSH, 10 mM HAuCl₄ i 100 mM NaBH₄ u intervalima od 10-20 min nakon miješanja, u ukupnom trajanju od 2 h. Kasnije su NP pročišćene centrifugiranjem, resuspendirane u D₂O, te je ponovno snimljeni ¹H i ¹³C spektar. Isti eksperimenti ponovljeni su koristeći ¹³C₃-¹⁵N-obilježeni CYS, te je snimljen ¹³C spektar. Također su snimani ¹H i ¹³C spektri kontrolnih otopina kako je navedeno u daljnjem tekstu. Kontrolni spektri 50 mM CYS u vodi i 10 mM GSH u vodi korišteni su za asignaciju signala. Stabilnost CYS praćena je u 10 mM vodenoj otopini snimanjem spektra nakon 7 dana, a stabilnost 10 mM GSH određena je nakon 4 dana. Otopinama 10 mM CYS ili GSH podignut je pH na 9 zaluzivanjem s NaOH te su spektri snimljeni nakon 3 i 24 h. Stabilnost 10 mM CYS i GSH određena je i u prisustvu 100 mM NaBH₄ ili 10 mM AgNO₃/HAuCl₄ u periodu do 24 h. Stabilnost u smjesi s NaBH₄ određena je i za ¹³C₃-¹⁵N-obilježeni CYS. Konačno, snimljen je i spektar smjese 1 mM cistina i 25 mM CYS.

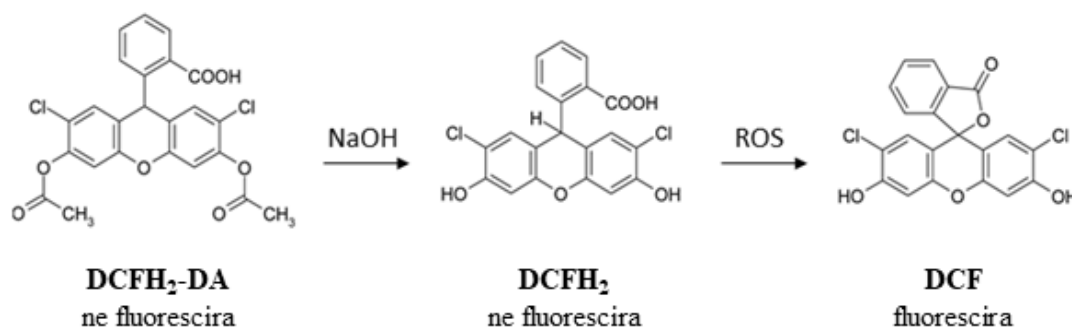
¹H i ¹³C NMR spektri snimljeni su koristeći Varian INOVA 400 spektrometar (Varian, Palo Alto, SAD) na 399,6 MHz, odnosno 100,5 MHz. Kemijski pomaci izraženi su u ppm prema signalu otapala (vode). Konačni spektar rezultat je zbrajanja spektara 64-128 uzastopnih snimanja. Razmak između uzastopnih snimanja bio je 5 s, što je dovoljno za relaksaciju jezgara u početni položaj. Signal ¹H vode potisnut je dodatnom pulsnom sekvencijom koja zrači uzorak

rezonantnom frekvencijom vode prije uobičajenog snimanja (presaturacija). Sve korištene pulsne sekvencije dostupne su u programskom paketu VnmrJ (4.2A). Za obradu spektara korišten je programski paket MestReNova 6.0.2 (Mestrelab Research S.L., Santiago de Compostela, Španjolska) (166).

3.5. Test prisutnosti reaktivnih kisikovih vrsta

Reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS) su skupina reaktivnih molekula i slobodnih radikala nastalih iz molekuskog kisika. U tijelu normalno nastaju kao nusprodukti mitohondrijskog metabolizma, tj. aerobnog disanja, ili zbog djelovanja oksidoreduktaza i metala, u peroksisomima ili na membranama (167,168).

Test prisutnosti reaktivnih kisikovih vrsta u vodenim medijima zasniva se na kemijskoj reakciji oksidacije ne-fluorescentnog reagensa u fluorescentni produkt (Slika 5).



Slika 5. Shema aktivacije i oksidacije 2'-7'-diklorodihidrofluorescein diacetata (DCFH₂-DA) u fluorescentni produkt 2'-7'-diklorofluorescein (DCF).

Reagens 2'-7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (DCFH₂-DA) lipofilna je, bezbojna i ne-fluorescentna tvar koja se koristi za detekciju prisutnosti ROS-ova u acelularnim i celularnim sustavima (169,170). Zbog stabilnosti se drži u diacetatnom obliku, no uklanjanjem acetata postaje reaktivna. Stoga se prije miješanja s uzorkom, acetatne skupine uklanjaju alkalnom hidrolizom. Nastali DCFH₂ dodaje se u uzorak, te u prisutnosti ROS-ova oksidira u 2'-7'-diklorofluorescein (DCF), koji fluorescira. Intenzitet fluorescencije razmjernan je koncentraciji ROS-ova u uzorku. DCFH₂-DA test često je korišten zbog svoje jednostavnosti i mogućnosti detekcije velikog broja ROS-ova (npr. R-O₂, R-O, OH[•], HOCl, NO₃⁻), međutim

ne detektira superoksid ili peroksid. Mane ovog testa su nestabilnost boje na zraku, sklonost fotooksidaciji te osjetljivost na eksperimentalne uvjete (171,172).

DCFH₂-DA test uspješno je primijenjen na detekciju ROS-ova u prisustvu nanomaterijala (173,174). S obzirom na specifična svojstva nanomaterijala, potrebno je ispitivanje interferencija. NP mogu interferirati zbog optičkih svojstava, stoga se ispituju autofluorescencija i apsorbancija NP pod istim uvjetima ekscitacije i emisije. Test autofluorescencije ne sadrži reagens DCFH₂, već samo NP u mediju. Ako se primijeti o dozi ovisno povećanje intenziteta fluorescencije, potrebno je smanjiti koncentracije NP u testu dok se signal ne izgubi. Test gašenja fluorescencije (apsorbancijom ili vezanjem boje) provodi se uz fluorescein diacetat (F-DA), reagens slične strukture DCFH₂-DA, koji ima stabilnu fluorescenciju. Gašenje signala F-DA iznad ispod 70% od vrijednosti u izostanku NP smatra se značajnom interferencijom i potrebno je smanjiti koncentracije NP (171).

Stvaranje ROS-ova za vrijeme interakcije CYS i GSH s NP ispitano je DCFH₂ testom. Reagens je komercijalni i nabavljen u diacetatnom obliku, stoga je prije testa 0,2 mM otopina DCFH₂-DA u metanolu hidrolizirana s 10 mM NaOH 30 min, zaštićena od svjetlosti. Potom je razrijeđena s 10 mM puferiranom fiziološkom otopinom, do konačne koncentracije DCFH₂ 10 μM. Stvaranje ROS-ova ispitano je u sljedećim sustavima: 1) 10 mM AgNO₃ i 10 mM CYS, 2) 10 mM HAuCl₄ i 10 mM CYS, 3) 10 mM AgNO₃ i 100 mM NaBH₄, 4) 10 mM HAuCl₄ i 100 mM NaBH₄, 5) 10 mM CYS i 100 mM NaBH₄, 6) 10 mM CYS, 100 mM NaBH₄ i 10 mM AgNO₃, 7) 10 mM CYS, 100 mM NaBH₄ i 10 mM HAuCl₄, 8) 10 mM AgNO₃ i 10 mM GSH, 9) 10 mM HAuCl₄ i 10 mM GSH i 10) 10 mM GSH i 100 mM NaBH₄, 11) 10 mM GSH, 100 mM NaBH₄ i 10 mM AgNO₃ i 12) 10 mM GSH, 100 mM NaBH₄ i 10 mM HAuCl₄. Svaki sustav postavljen je na miješanje na sobnoj temperaturi, te su alikvoti od 25 μL uzimani u tri vremenske točke: 10, 60 i 120 min. Alikvoti su otpipetirani na mikrotitarske pločice s 96 jažica, te je u svaku dodano 225 μL 10 μM DCFH₂. Ultračista voda korištena je kao negativna kontrola, dok je kao pozitivna kontrola korištena 10 μM otopina SIN-1. Pločice su inkubirane na sobnoj temperaturi, zaštićene od svjetlosti, 120 min. Intenzitet fluorescencije očitao je na VictorTM čitaču mikrotitarskih pločica (Perkin Elmer, Waltham, SAD), na valnim duljinama ekscitacije i emisije 485 nm i 530 nm. Intenzitet fluorescencije izražen je relativno kao postotak intenziteta slijepe probe (ultračista voda). Sva mjerenja provedena su u triplicatu. Kontrolna mjerenja u kojima je izostavljen svaki reagens oduzeta su od rezultata. Testovi interferencija provedeni su na prethodno opisani način. Za test gašenja fluorescencije, umjesto DCFH₂ dodana je otopina

0,1 μM fluoresceina, aktivirana alkalnom hidrolizom na isti način. Za test autofluorescencije, korištena je puferirana fiziološka otopina.

3.6. Tehnike računalne kemije

Računalna kemija grana je kemije koja proučava kemijske strukture i kemijske reakcije pomoću matematičkih modela i izračuna. Najčešće se koristi u slučajevima kada su eksperimenti teško izvedivi (primjerice za opis svojstava nestabilnih, kratko-živućih specija i prijelaznih stanja) ili kao dopuna eksperimentu (za potpunije tumačenje reakcijskih mehanizama, potvrdu hipoteza i sl.). Računalna kemija može se podijeliti na kvantnu kemiju, koja se temelji na zakonima kvantne fizike, i na molekulsku mehaniku/molekulsku dinamiku, koje se temelje na zakonima klasične fizike (Newtonovim zakonima) (175).

Svi računi u ovoj disertaciji provedeni su na klasteru Isabella Sveučilišnog računskog centra SRCE, na Sveučilištu u Zagrebu (176).

3.6.1. Postupak provođenja kvantno-kemijskih računa

Kvantna kemija polazi od osnovnog zakona kvantne fizike, tj. zasniva se na rješavanju Schrödingerove jednadžbe. Rješenje Schrödingerove jednadžbe skup je valnih funkcija i njihovih pripadajućih energija, što daje potpuni opis sustava (177). Jedna od metoda u kvantnoj kemiji je teorija funkcionala gustoće (engl. *density functional theory*, DFT), koja se ne temelji na valnim funkcijama nego elektronskoj gustoći, iz koje se računaju fizikalna svojstva molekulskih sustava (178).

U ovoj disertaciji, kvantno-kemijske DFT metode korištene su za ispitivanje mehanizma interakcije CYS i cistina s atomima Ag i Au te klasterima Ag_n i Au_n ($n = 2, 3, 4, 13$). CYS i cistin modelirani su u zwitterionskom obliku, te je provedena konformacijska analiza. Mogući konformeri, nastali rotacijom jednostrukih veza, stvoreni su u programu Pcmol (179) uz korištenje MMX parametara.

Dobivene strukture podvrgnute su geometrijskoj optimizaciji i frekvencijskom računu. Geometrijska optimizacija postupak je pronalaženja strukture molekule koja ima najnižu energiju (tzv. stacionarna točka na plohi potencijalne energije). Ploha potencijalne energije (engl. *potential energy surface*, PES) je funkcija energije u ovisnosti o položaju svakog atoma unutar molekule (180). Karakterizacija stacionarnih točaka, dobivenih geometrijskom

optimizacijom, provodi se pomoću frekvencijskog računa. Frekvencijski račun izračunava frekvencije vibracija svih atoma u molekuli. Također, geometrijska optimizacija i frekvencijski račun zajedno daju vrijednosti entalpije (H_{298}) i Gibbsove energije (G_{298}) svake molekule (181). U ovoj disertaciji, termalne korekcije za entalpiju (H_{kor}) i Gibbsovu energiju (G_{kor}) izračunate su korištenjem modela rigidnog rotora/harmoničkog oscilatora, na temperaturi 298,15 K (25 °C) i tlaku 1 atm. Po završetku računa, lociran je najstabilniji konformer (globalni minimum) i više lokalnih minimuma unutar energijskog raspona od 20 kJ/mol od globalnog. Te su strukture korištene u daljnjim računima.

Najstabilniji konformeri CYS i cistina postavljeni su u neposrednu blizinu atoma i klastera Ag ili Au sastavljenih od 2, 3, 4 ili 13 atoma. Struktura Ag/Au trimera bila je u obliku trokuta, u slučaju tetramera korišteni su romboidni i Y oblik (oba planarni), dok je klaster od 13 atoma bio pravilni ikozaedar. Klasteri su orijentirani u različitim položajima te dovedeni u prostornu interakciju (3 Å) sa svim funkcionalnim skupinama CYS i cistina (amino, karboksilna i tiolna). Za svaku kombinaciju ligand–klaster stvoreno je oko 200 struktura koje su podvrgnute geometrijskoj optimizaciji i frekvencijskom računu. U slučaju Ag_{13} i Au_{13} , položaji atoma metala zamrznuti su za vrijeme optimizacije kako bi se smanjila zahtjevnost računa. Dobiveni stabilni kompleksi analizirani su s obzirom na strukturu (orijentaciju molekule u odnosu na klaster metala) te su uspoređivane njihove energije. Globalni minimum smatra se najvjerojatnijim kompleksom pri sobnoj temperaturi. Sve geometrijske optimizacije provedene su u implicitnom otapalu korištenjem SMD modela (engl. *Solvation Model based on Density*) s dielektričnom konstantom vode ($\epsilon = 78,3553$) (182).

Za predviđanje mehanizma reakcije dimerizacije CYS locirana su i prijelazna stanja (TS). Prijelazno stanje povezuje dva minimuma na PES-u (reaktant i produkt). Kao reaktanti korišteni su globalni minimumi CYS i CYS-metal kompleksa iz prethodnih računa, optimizirana molekula CYS-sulfenske kiseline te jedna eksplicitno definirana molekula vode (supramolekulski pristup). Kao produkti korišteni su globalni minimum cistina, optimizirani kompleksi metala i 2 molekule vode. Struktura TS definirana je jednom imaginarnom frekvencijom vibracije. Za potvrdu povezanosti TS i minimuma proveden je račun intrinzične reakcijske koordinate (engl. *intrinsic reaction coordinate*, IRC). IRC račun polazi iz strukture TS, te parcijalno optimizira strukturu duž reakcijske koordinate u oba smjera (prema reaktantu i produktu, tj. povratni i napredni smjer) (183,184). Energetske barijere (ΔH^\ddagger) izračunate su kao razlike u energijama između struktura prijelaznog stanja te optimiziranih struktura reaktanata.

Za ispitivanje mogućnosti radikalskog mehanizma dimerizacije provedena je optimizacija i populacijska analiza (vidi niže) za molekule CYS, GSH, homocisteina, penicilamina i tiofenola, te komplekse CYS-Ag₂ i CYS-Au₂. Također je provedena populacijska analiza te su računate energije singletnih i tripletnih stanja CYS i cistina, uz i bez prisutnosti klastera Ag i Au.

Svi kvantno-kemijski računi provedeni su u programskom paketu Gaussian 16 (185), dok je program GaussView (186) korišten za vizualizaciju struktura. U svim optimizacijskim i frekvencijskim računima korišten je Becke 3-parametarski Lee-Yang Parr (B3LYP) hibridni funkcional (187–189), s baznim skupom razvijenim u Los Alamos National Laboratory, LANL2DZ (190,191). B3LYP funkcional prethodno je korišten za optimizaciju kompleksa aminokiselina i nanoklastera (124,192). Na temelju struktura dobivenih na B3LYP/LANL2DZ teorijskoj razini procjene energija poboljšane su izračunom energije na B1B95/LANL2DZ i TPSS/LANL2DZ teorijskim razinama. B1B95 je hibridni funkcional (193) koji je korišten u DFT studijama NP metala (194,195). TPSS (Tao-Perdew-Staroverov-Scuseria) (196) također je opisan kao prikladan funkcional za modeliranje klastera Ag (197,198). Uz to, korištena je posebna D3 funkcija Grimmeove disperzije za poboljšanje energetske računa (199). Za računanje singletnih i tripletnih stanja korištena je teorijska razina (U)PBE/LANL2DZ, gdje U označava neograničenu (engl. *unrestricted*) metodu za sustave s nesparenim elektronima. PBE (Perdew-Burke-Ernzerhof) funkcional često je korišten u DFT studijama NP (200–202).

Računalno predviđanje NMR kemijskih pomaka moguće je zbog povezanosti magnetskog zasjenjenja s energijom. Iz elektronske energije računa se tenzor zasjenjenja σ , iz kojega se dobije kemijski pomak usporedbom tenzora zasjenjenja promatrane i referentne jezgre (203,204). Za NMR račune, upotrijebljeni su svi stabilni kompleksi iz prvog dijela istraživanja s energijom unutar 20 kJ/mol od globalnog minimuma. Račun kemijskih pomaka proveden je metodom baždarno-invarijantnih atomskih orbitala (engl. *gauge-invariant atomic orbitals*, GIAO) na teorijskoj razini OLYP/LANL2DZ (205), s implicitnom solvatacijom. Ova metoda je navedena u literaturi kao učinkovita za niz organskih spojeva (206,207). Izračunati tenzori prevedeni su u kemijske pomake koristeći molekulu glicina kao referentni spoj, čiji je NMR spektar preuzet iz baze podataka AIST Spectral database (208). Doprinos svakog konformera konačnom pomaku izračunat je iz udjela svakog konformera u ukupnoj populaciji, koji je izračunat iz Boltzmannove distribucije.

Račun prirodnih veznih orbitala (engl. *natural bond orbital*, NBO) analizira valne funkcije u okviru Lewisove teorije kemijskih veza, tj. odgovara klasičnom Lewisovom prikazu

elektrona u molekuli (209). Prirodne atomske orbitale (engl. *natural atomic orbitals*, NAO) su jedinstvene orbitale pojedinog atoma koje najbolje opisuju valnu funkciju (210). Kombinacijom prirodnih atomskih orbitala dobivaju se prirodne hibridne orbitale (engl. *natural hybrid orbitals*, NHO), a njihovom se kombinacijom dobivaju NBO (211). Prirodne vezne orbitale su najbolji opisi veza i elektronskih parova u molekuli prema Lewisovoj teoriji (210). NBO račun također u sebi sadrži tzv. analizu prirodnih populacija (engl. *natural population analysis*, NPA) koja kvantificira orbitalne populacije i naboje na atomskim središtima (209). Za NBO račune, upotrijebljeni su svi stabilni kompleksi iz prvog dijela istraživanja s energijom unutar 20 kJ/mol od globalnog minimuma. Računi su provedeni na teorijskoj razini SMD-B3LYP/LANL2DZ. NPA i NBO računi provedeni su korištenjem NBO 6,0 programa koji je uključen u programski paket Gaussian 16 (212).

3.6.2. Postupak provođenja molekulsko-dinamičkih računa i izračun Gibbsovih energija vezanja

Molekulska dinamika (MD) skup je računalnih tehnika koje su zasnovane na principima klasične fizike, tj. na Newtonovim zakonima. Zbog manje zahtjevnosti i veće brzine računa, može se koristiti za velike kemijske sustave (više tisuća atoma). Najčešće se upotrebljava za simulaciju velikih biomolekula poput proteina, nukleinskih kiselina, lipida ili polisaharida. MD simulacije omogućavaju praćenje procesa poput izmjene konformera, interakcije više molekula ili gibanja molekula u mediju u vremenu (213). Rješavanjem Newtonovih jednadžbi gibanja dobiva se set koordinata i brzina atoma za svaku vremensku točku, odnosno trajektorija sustava.

Klasična molekulska dinamika provedena je u programskom paketu AMBER 17 (214). Stvorena je simulacijska kutija dimenzija 32 * 43 * 55 Å. U nju je smještena ploča metala (Au ili Ag), molekula liganda (CYS, cistin, GSH ili GSSG) i 2000 molekula vode. Ploče Ag(111) ili Au(111) sastojale su se od 748 atoma poredanih u 4 sloja. Donja tri sloja zamrznuta su kako bi se spriječilo raspadanje ploče, dok se gornji sloj atoma mogao slobodno gibati. Molekule liganada postavljene su na udaljenost od 15 Å iznad ploče. Polje sila korišteno za opis metala bilo je Interface, razvijeno u grupi Heinza i sur. (215). Standardno generalizirano polje sila GAFF (engl. *generalized force field*) korišteno je za opis liganada. Molekule vode opisane su TIP3P modelom koji definira vodu trima točkastim nabojima koji određuju elektrostatske interakcije (216). Kako bi se izbjegli rubni efekti, primjerice izdvajanje molekula vode na granici kutije u vakuum, koriste se periodični rubni uvjeti (engl. *periodic boundary conditions*,

PBC). Primjenom PBC, simulacijska kutija okružuje se sa svih strana svojim istovjetnim kopijama. Svaki atom koji izađe iz kutije na jednu stranu, istovremeno ponovno ulazi u kutiju na suprotnoj strani. PBC tako omogućuje očuvanje broja atoma, mase, energije i linearnog momenta (217). Kada se koristi PBC, elektrostatska komponenta energije računa se Ewaldovom sumacijom, koja razdvaja tu komponentu na dva člana, za interakcije kratkog i dugog doseg. Ewaldova metoda modificirana je Fourierovom transformacijom kako bi se ubrzali računi, čime se dobiva PME metoda (engl. *particle mesh Ewald*) (217).

U MD simulacijskoj kutiji, u klasičnoj simulaciji, broj atoma (N) i volumen (V) drže se stalnima, te su sva mikrostanja iste energije (E). Takve simulacije izvedene su u tzv. mikrokanonskom (NVE) ansamblu. Kako bi se simulacije približile eksperimentalnim uvjetima, ponekad se izvode simulacije pri konstantnoj temperaturi (T) i tlaku (p), pa se koriste kanonski (NVT) ili izobarno-izotermni (NpT) ansamblu. Za regulaciju temperature koriste se termostati, tj. algoritmi koji modificiraju kinetičku energiju atoma i molekula. Regulacija tlaka postiže se barostatima, koji skaliraju udaljenost među atomima i njihove brzine.

U prvom koraku energija sustava minimizirana je kroz 1000 ciklusa koristeći algoritam najstrmijeg spusta, a zatim je temperatura sustava podignuta s 0 na 298 K u vremenu od 100 ps. Korišten je Langevinov termostat s kolizijskom frekvencijom 2 ps^{-1} . Provedeno je 20 ns „*ekvilibracije*“ (uravnoteženja sustava) u NPT ansamblu, a konstantan tlak održavan je Berendsenovim barostatom. Konačno, provedeno je 50 ns simulacija u NVT ansamblu. Tijekom svih faza simulacije, korištena je granična vrijednost za nevezne interakcije od 10 Å, i SHAKE algoritam za fiksiranje duljine O–H veza u molekulama vode. Vremenski korak bio je 1 fs. Sve slike pripremljene su korištenjem programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (218).

Gibbsove slobodne energije vezanja (interakcija) mogu se izračunati korištenjem molekulsko-mehaničkih metoda MM-PBSA (engl. *Molecular mechanics–Poisson-Boltzmann surface area*) ili MM-GBSA (engl. *Molecular mechanic Generalised Born*) (219). Računi se provode na temelju trajektorija nastalih MD simulacijama. Entalpijski doprinos Gibbsovoj energiji vezanja odgovara potencijalnoj energiji sustava u NpV uvjetima, a računa se molekulsko-mehaničkim (MM) metodama, tj. pomoću polja sila. Entropijski doprinos računa se analizom normalnih modova, koja aproksimira vibracijsku i rotacijsku frekvenciju. MM-GBSA račun, korišten u ovoj disertaciji, koristi generaliziranu Bornovu jednadžbu za analizu solvatacijskih doprinosa. Napolarni doprinos određuje iz površine dostupne otapalu (engl. *solvent-accessible surface area*, SASA). U ovoj disertaciji, iz produkcijske faze svake

simulacije (kada je ligand bio u kontaktu s metalom) izvučeno je 1000 vremenskih točaka te su trajektorije korištene za računanje slobodne energije vezanja (ΔG_{ads}). Pritom je korišten MM-GBSA protokol dostupan u AmberTools paketu (214), koji je uspješno primjenjivan za izračun interakcija nanomaterijala i organskih molekula (220,221).

3.7. Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja su statistički obrađeni računanjem mjera središnjice (aritmetička sredina) i mjera rasapa (standardna devijacija). Normalna distribucija je pretpostavljena unatoč tome što je broj uzoraka manji od 30, jer je odstupanje od realne vrijednosti jednako vjerojatno u oba smjera (rezultat pogreške metode, a ne ne-normalne razdiobe rezultata). Stoga su korišteni parametrijski testovi. Usporedba dviju nezavisnih varijabli provedena je Studentovim t-testom, gdje je kriterij značajnosti da je razina značajnosti $p < 0,05$. Statistički značajne korelacije između dviju varijabli utvrđene su određivanjem Pearsonovog koeficijenta korelacije (r), te je kriterij značajnosti također $p < 0,05$. Statistička obrada provedena je korištenjem računalnog programa Statistica 14.0.0.15 (TIBCO Software, Palo Alto, SAD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Optimizacija uvjeta za pripremu nanočestica

Kao što je opisano u odjeljku 3.2, priprema NP provedena je koristeći pristup „odozdo prema gore“ redukcijom iona Ag ili Au. Početni cilj bio je pripremiti stabilne suspenzije NP manjih od 100 nm, koje bi se upotrijebile u daljnjim pokusima. Za pripremu NP potrebno je odabrati najbolje uvjete, odnosno pronaći odgovarajući omjer iona metala, reducensa i stabilizatora, pravilan redoslijed njihova dodavanja u reakcijsku smjesu, brzinu miješanja, vrijeme trajanja i temperaturne uvjete.

NaBH₄ odabran je kao reduksijsko sredstvo s obzirom na poznatu kemiju i čestu uporabu u nanotehnologiji. NaBH₄ je reducens najčešće korišten u organskoj kemiji za selektivnu redukciju aldehida i ketona, a ne reagira s karboksilnim kiselinama (222). Redovito se koristi za pripremu AgNP i AuNP (120,133,223–226). Također, povoljan je za NMR eksperimente jer ne posjeduje protone koji bi mogli davati NMR signal u ciljanom području (0 – 5 ppm; vidi poglavlje 4.5.).

Drugi važan čimbenik je odabir stabilizatora. Stabilizatori su molekule koje se vežu na površinu NP i sprječavaju njihovu agregaciju i otapanje (227). Za ispitivanje mehanizama interakcije i vezanja CYS i GSH na površinu NP, očekuje se stabilizacijsko djelovanje samih biotiola, pa drugi stabilizatori nisu potrebni. Za ispitivanje utjecaja biomimetičkih medija s CYS i GSH na stabilnost prethodno pripremljenih suspenzija NP, iskušana je sinteza AgNP i AuNP bez omotača. Takve suspenzije nije bilo moguće pripremiti zbog brzog taloženja elementarnog Au i Ag. Stoga je ta ideja odbačena te su odabrani drugi stabilizatori: negativno nabijeni mali surfaktant AOT, neutralni polimer PVP i pozitivno nabijeni polimer PLL koji su omogućili promatranje interakcije biotiola s različito nabijenih nanopovršinama (228–230).

Optimizacija uvjeta pripreme postignuta je nizom pokusa u kojima su varirani omjeri reaktanata i redoslijed njihova dodavanja, kako je opisano u poglavlju 3.2 i u tablicama 2 i 3. Dobivene suspenzije procijenjene su vizualno i određivanjem d_H . Promjena boje ukazuje na nastanak suspenzije NP, jer one posjeduju optičko svojstvo apsorbancije u vidljivom dijelu spektra. Također, pojava taloga ukazuje na nestabilnu suspenziju. NP su proglašene nestabilnima ako su se u potpunosti istaložile nakon sinteze ili unutar tjedan dana od sinteze, (što je bilo vidljivo kao nastajanje taloga i obezbojenje otopine) te ako se nisu mogle ponovno dispergirati.

Tablica 2. Uvjeti za pripremu AgNP u prisutnosti CYS ili GSH, s navedenim vizualnim značajkama i d_H konačnih NP. Ag : NaBH₄ : tiol odnosi se na molarni omjer reaktanata, a pristup 1 ili 2 na redoslijed dodavanja (ion metala → NaBH₄ → tiol ili ion metala → tiol → NaBH₄).

| Tiol | konc. Ag [mM] | Ag : NaBH ₄ : tiol | Pristup | Vizualne značajke | d_H [nm] (% po volumenu) |
|------|---------------|-------------------------------|---------|----------------------------|--------------------------------------------------------------|
| CYS | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 1 | smeđa suspenzija, stabilna | 3,0 ± 0,3 (100%) |
| CYS | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 2 | tamno smeđa, stabilna | 15,5 ± 2,0 (100%) |
| CYS | 1 | 1 : 2 : 0,5 | 1 | smeđe-siva, nestabilna | / |
| CYS | 1 | 1 : 2 : 0,5 | 2 | siva, crni talog | / |
| CYS | 1 | 1 : 10 : 0,2 | 1 | smeđa, nestabilna | 3,3 ± 0,6 (100%) |
| CYS | 1 | 1 : 10 : 0,2 | 2 | smeđa, nestabilna | 1,7 ± 0,8 (98%) 15,2 ± 1,7 (2%) |
| CYS | 5,6 | 1 : 10 : 1 | 2 | smeđa, stabilna | 8,0 ± 0,9 (99%) 309,7 ± 98,8 (<1%) |
| CYS | 10 | 1 : 10 : 1 | 2 | smeđa, stabilna | 14,4 ± 4,2 (46%); 41,7 ± 12,1 (47%); 279,9 ± 99,4 (7%) |
| GSH | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 1 | smeđa, stabilna | 4,8 ± 1,2 (99%) 51,6 ± 3,4 (<1%) |
| GSH | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 2 | tamno smeđa, nestabilna | / |
| GSH | 1 | 1 : 2 : 0,5 | 1 | siva, nestabilna | / |
| GSH | 1 | 1 : 2 : 0,5 | 2 | siva, nestabilna | / |
| GSH | 1 | 1 : 10 : 0,2 | 1 | smeđa, stabilna | 14,6 ± 3,1 (18%) 46,9 ± 6,3 (82%) |
| GSH | 5,6 | 1 : 10 : 1 | 2 | smeđa, stabilna | 6,0 ± 1,2 (99%) 315,1 ± 74,3 (<1%) |
| GSH | 10 | 1 : 10 : 1 | 2 | smeđa, stabilna | 25,3 ± 3,7 (100%) |

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je molarni omjer reaktanata bio važniji za uspješnu pripremu NP od redoslijeda dodavanja. Veliki suvišak NaBH₄ u odnosu na ione metala bio je nužan za postizanje stabilnih NP, što je sukladno literaturnim navodima (231). Priprema NP u prisutnosti CYS najuspješnija je u slučaju kada je koncentracija CYS oko 10 puta manja od koncentracije NaBH₄, dok u slučaju GSH koncentracija liganda nije presudna za stabilnost.

Tablica 3. Uvjeti za pripremu AuNP u prisutnosti CYS ili GSH, s navedenim vizualnim značajkama i d_H konačnih NP. Au : NaBH₄ : tiol odnosi se na molarni omjer reaktanata, a pristup 1 ili 2 na redosljed dodavanja (ion metala → NaBH₄ → tiol ili ion metala → tiol → NaBH₄).

| Tiol | konc. Au [mM] | Au : NaBH ₄ : tiol | Pristup | Vizualne značajke | d_H [nm] (% po volumenu) |
|------|---------------|-------------------------------|---------|----------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| CYS | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 1 | tamnocrvena, nestabilna | n.a. |
| CYS | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 2 | neuspjela, crni talog | n.a. |
| CYS | 1 | 1 : 2 : 1 | 1 | ljubičasta, nestabilna | n.a. |
| CYS | 1 | 1 : 2 : 1 | 2 | neuspjela, crni talog | n.a. |
| CYS | 1 | 1 : 10 : 0,2 | 2 | ljubičasta, stabilna | 10,7 ± 3,7 (30%) 48,5 ± 5,8 (70%) |
| CYS | 3 | 1 : 10 : 1 | 2 | ljubičasta, stabilna uz malo taloga | 24,2 ± 3,4 (54%) 80,0 ± 2,1 (10%) 219,7 ± 48,9 (35%) |
| CYS | 10 | 1 : 10 : 1 | 2 | tamnoljubičasta, stabilna, malo taloga | 42,2 ± 4,4 (74%); 341,1 ± 64,5 (26%) |
| GSH | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 1 | siva, nestabilna | n.a. |
| GSH | 1 | 1 : 2 : 0,2 | 2 | siva, nestabilna | n.a. |
| GSH | 1 | 1 : 2 : 1 | 1 | crvena, nestabilna | n.a. |
| GSH | 1 | 1 : 2 : 1 | 2 | smeđa, nestabilna | n.a. |
| GSH | 1 | 1 : 10 : 0,2 | 1 | ljubičasta, nestabilna | 10,2 ± 1 (48%) 37,4 ± 6,5 (29%) 168,4 ± 67,3 (22%) |
| GSH | 3 | 1 : 10 : 1 | 2 | tamnoljubičasta, stabilna | 6,4 ± 0,8 (65%) 65,1 ± 3,8 (33%) |
| GSH | 10 | 1 : 10 : 1 | 2 | tamnoljubičasta, stabilna | 17,3 ± 2,5 (85%) 132,3 ± 44,7 (15%) |

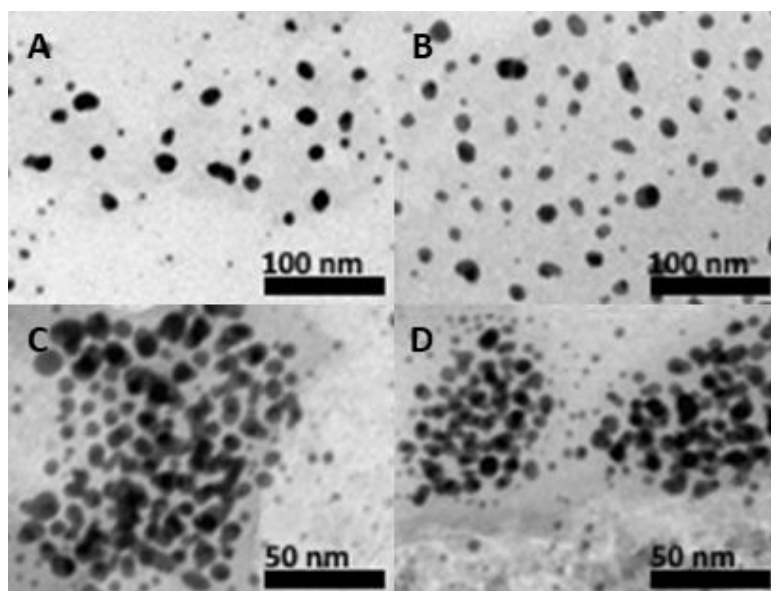
Međutim, koncentracije biotiola manje od 1 mM nisu povoljne za provođenje NMR pokusa, jer su ispod granice detekcije instrumenta. Konačno, na temelju rezultata vizualne provjere i DLS testova, odabran je pristup 2 te molarni omjer metal : NaBH₄ : tiol = 1 : 10 : 1. Ti uvjeti povoljni su i za CYS i za GSH, te pouzdano dovode do pripreme stabilnih NP odgovarajuće veličine. Najbolja stabilnost i monomodalna razdioba veličina postignuta je pri

koncentracijama metala/tiola 5,6 mM (za Ag) i 3 mM (za Au). Međutim, za poboljšanje kvalitete NMR spektara (vidi poglavlje 4.5.), sve koncentracije povećane su na 10 mM, što nije negativno utjecalo na karakteristike NP.

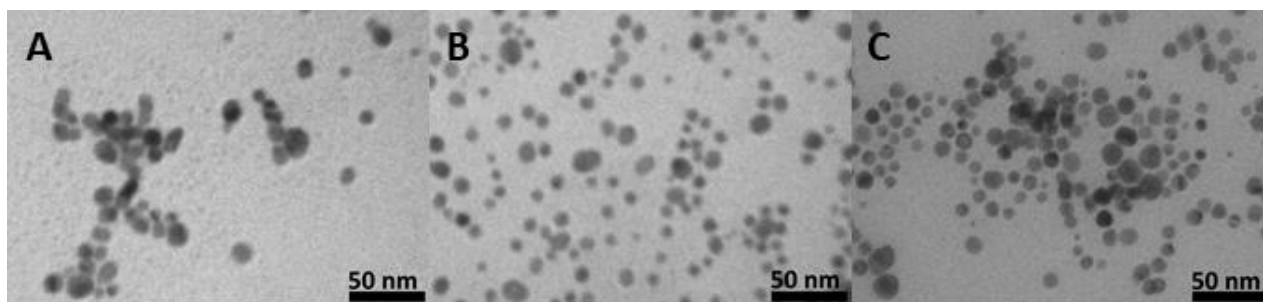
Priprema NP obloženih AOT-om, PVP-om i PLL-om dobro je poznata i usavršena u laboratoriju prije početka izrade ove disertacije, stoga nije bilo potrebe za optimizacijom. Sinteza je uspješno provedena prema protokolima objavljenim u navedenoj literaturi (232,233).

4.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija nanočestica

Oblik i morfologija NP potvrđeni su TEM snimanjem i mikrografije su prikazane na Slici 6. NP pripremljene s CYS i GSH pretežno su sferičnog oblika i malih dimenzija. AgNP su dobro raspršene, dok AuNP tvore nakupine, što je bilo uočljivo i vizualno (mala količina taloga). Ipak, talog je bilo moguće ponovno dispergirati, što ukazuje na to da su nakupine nastale aglomeracijom, a ne agregacijom. Aglomerati mogu nastati u suspenziji ili prilikom pripreme uzorka za TEM, jer postupak uključuje sušenje na zraku. Stoga je moguće da slike ne odražavaju stvarno stanje u suspenziji. NP stabilizirane AOT-om, PVP-om i PLL-om također su male i sferične (Slika 7), te ne pokazuju naznake aglomeracije.



Slika 6. TEM slike različitih NP. A) AgNP pripremljene s CYS, b) AgNP pripremljene s GSH, c) AuNP pripremljene s CYS i d) AuNP pripremljene s GSH.



Slika 7. TEM slike AgNP obloženih a) AOT-om, b) PVP-om i c) PLL-om.

Veličina NP izražava se kao d_H , koji odgovara združenom promjeru NP i solvacijske ljuske. Promjer NP mjereno je u vodi nakon pročišćavanja centrifugiranjem i rezultati su prikazani u tablici 4. CYS-AgNP raspodijeljene su bimodalno, tj. u dvije populacije od oko 15 i 40 nm, te je vidljiv manji postotak aglomerata (čestica većih od 200 nm). CYS-AuNP pretežno su promjera ~40 nm, uz malo veći udio aglomerata. Prisutnost aglomerata u suspenzijama s CYS nije neuobičajena, s obzirom da CYS unakrsno povezuje NP (engl. *cross-linking*) (234). Za razliku od toga, GSH-AgNP ne aglomeriraju, a GSH-AuNP aglomeriraju malo i stvaraju nakupine oko 130 nm u promjeru. Najveći udio u obje suspenzije zauzimaju populacije NP oko 20 nm.

Tablica 4. d_H i razdioba veličina prema volumenu, ζ potencijal, pH vrijednost i količina otpuštenih iona za odabrane AuNP i AgNP obložene CYS i GSH.

| NP | d_H /nm (% prema volumenu) | ζ / mV | pH | % iona |
|----------|------------------------------------------------------------|--------------|-----|--------|
| CYS-AgNP | 14,4 ± 4,2 (45%) 41,7 ± 12,1 (47%) 279,9 ± 99,4 (8%) | -35,5 ± 0,7 | 8,7 | 0,13 |
| CYS-AuNP | 42,2 ± 4,4 (73%) 341,1 ± 64,5 (27%) | -52,0 ± 0,9 | 7,9 | 0,00 |
| GSH-AgNP | 25,3 ± 3,7 (100%) | -63,2 ± 1,2 | 8,5 | 0,10 |
| GSH-AuNP | 17,3 ± 2,5 (85%) 132,3 ± 44,7 (15%) | -63,6 ± 0,6 | 7,1 | 0,00 |

ζ potencijal NP odraz je njihovog površinskog naboja i uvjeta u suspenziji. U sva četiri uzorka ζ potencijal je negativan. U slučaju GSH-NP, predznak ζ potencijala odgovara naboju omotača, jer je GSH negativno nabijen pri navedenom pH. CYS je pri ovim uvjetima zwitterion,

no moguće je da interferencije iona zaostalih iz sinteze (NO_3^- ili BH_4^-) dovode do ukupnog negativnog naboja. U sva četiri slučaja NP su elektrostatski stabilizirane, jer im je apsolutna vrijednost naboja veća od 30 mV (155).

Otapanje NP procijenjeno je određivanjem udjela ionskog Au i Ag u suspenzijama NP nakon pročišćavanja. Postotak Ag^+ i Au^{3+} određen je nakon razdvajanja NP od iona ultrafiltracijom. Prikladnost korištenih filtera za razdvajanje iona od NP pretpostavljena je jer je veličina pora filtera (~ 2 nm) manja od dimenzija nanočestica (162). Nakon filtracije otopina soli metala, u filtratima je pronađeno $>85\%$ početne koncentracije iona, dok je nakon ispiranja membrana vodom koncentracija iona u filtratima bila ispod razine detekcije. Time je pokazano da većina iona prolazi kroz membranu filtera, dok se $< 15\%$ na njoj zadržava te ih nije moguće isprati ponovnim centrifugiranjem. Iz tablice 4 vidljivo je da je udio otopljenog Ag zanemariv ($< 1\%$), dok je količina otopljenog Au bila ispod razine detekcije. Stoga su sve vrste NP proglašene stabilnima.

AOT-AgNP, PVP-AgNP i PLL-AgNP su manjih dimenzija od cisteinskih i glutationskih (Tablica 5), pretežno ispod 10 nm u promjeru. ζ potencijal AOT je negativan, a PLL pozitivan, što odražava predznake naboja samih stabilizatora u vodi. PVP je neutralan omotač, no manji negativni ζ potencijal može biti uzrokovan prisutnošću iona zaostalih iz sinteze, analogno CYS-NP. PLL i AOT doprinose elektrostatskoj stabilizaciji zbog svojeg naboja, dok je PVP je polimer koji zbog svojih dimenzija stabilizira NP sterički (49). Postotak otpuštenih iona u ovim suspenzijama nešto je veći u usporedbi s CYS- i GSH-NP, no u sva tri slučaja je ispod 1 %.

Tablica 5. d_H i razdioba veličina prema volumenu, ζ potencijal, pH vrijednost te količina otpuštenih iona različitih AgNP.

| NP | d_H / nm (% prema volumenu) | ζ / mV | pH | % Ag^+ |
|----------|------------------------------------------|-----------------|-----|-----------------|
| AOT-AgNP | $8,5 \pm 4,5$ (100%) | $-35,8 \pm 6,9$ | 7,8 | 0,4 |
| PVP-AgNP | $5,0 \pm 1,2$ (98%); $31,2 \pm 3,5$ (2%) | $-24,3 \pm 3,7$ | 8,5 | 0,6 |
| PLL-AgNP | $4,6 \pm 0,9$ (97%); $15,2 \pm 5,3$ (3%) | $44,9 \pm 6,5$ | 8,0 | 0,8 |

4.3. Praćenje stabilnosti nanočestica u prisutnosti biotiola

Kako bismo dobili uvid u transformacije NP nakon izloženosti medijima bogatim biotiolima, ispitane su promjene veličine, ζ potencijala, udjela otopljenih iona i UV/VIS spektara triju vrsta AgNP nakon inkubacije s vodenim otopinama CYS i GSH. Rezultati su prikazani u Tablici 6 i na Slici 8.

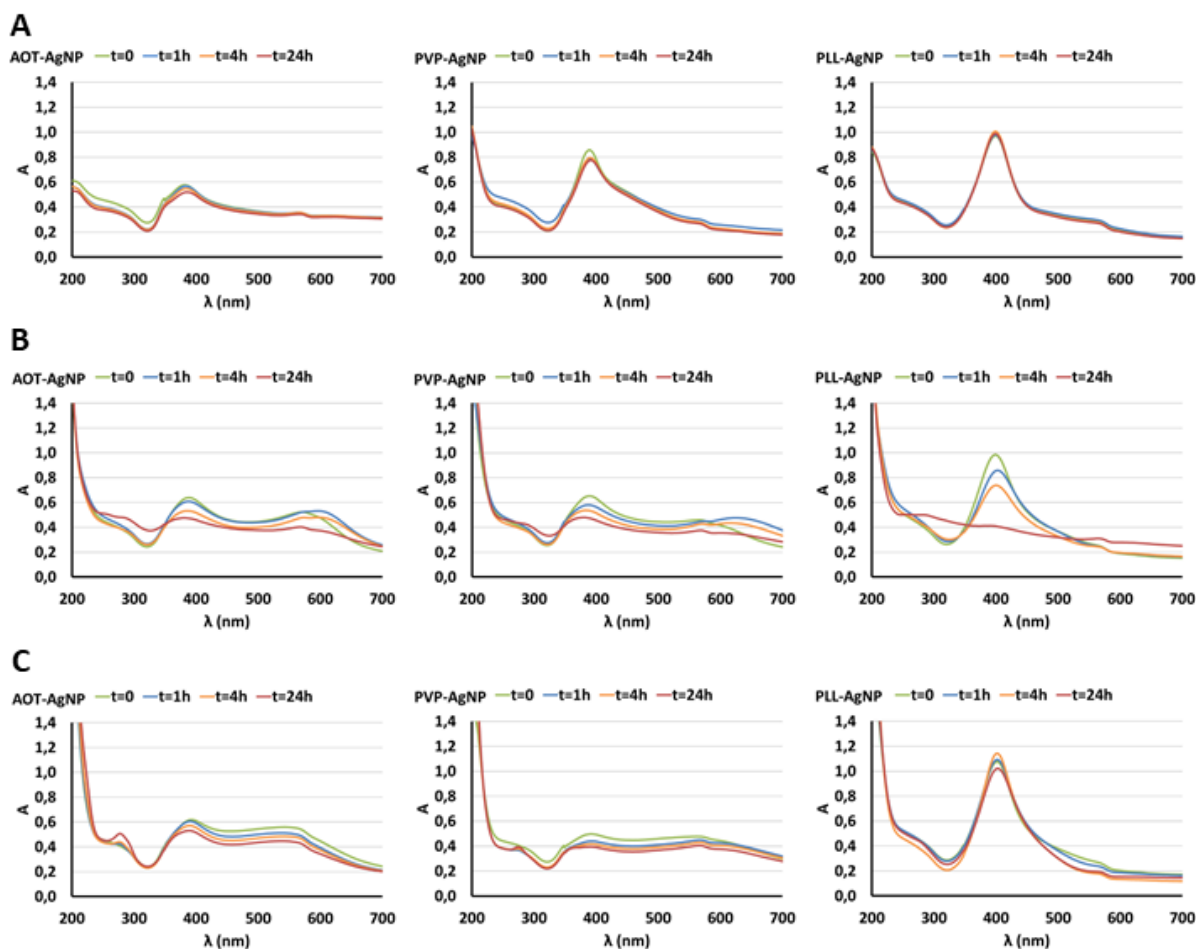
Iz mjerenja d_H vidljivo je različito ponašanje NP na prisutnost biotiola s obzirom na površinski omotač. AOT-AgNP zadržavaju stabilnost u prisutnosti CYS, no tvore aglomerate >500 nm nakon 24-satne inkubacije s GSH. PVP-AgNP aglomeriraju u oba medija, no u mediju s CYS ipak je vidljiv manji udio populacije od 10 nm, što znači da je gubitak stabilnosti samo djelomičan. Prisutnost GSH i ovdje dovodi do pojave aglomerata veličine od ~500 nm. Za razliku od prethodna dva slučaja, PLL-AgNP aglomerira u mediju s CYS, no stabilan je u mediju s GSH. Gubitak stabilnosti suspenzija odražava se i u UV/VIS spektrima (Slika 8). Sve tri vrste NP u vodi imaju maksimum apsorpcije oko 400 nm, što odgovara uobičajenom području valnih duljina za AgNP (235). Aglomeracija i taloženje dovode do smanjenog intenziteta ili potpunog gubitka SPR pika, a pojava novih razvučenih spektara u području 500 – 700 nm posljedica je velikih aglomerata. Samo PLL-AgNP u mediju s GSH zadržava početni izgled SPR signala.

Agregacija ili aglomeracija u medijima u prisutnosti liganada uobičajene su pojave koje se pretežno odvijaju u medijima visoke ionske jakosti zbog slabljenja elektrostatskih odbojnih sila (13,236). Također je poznat utjecaj kiselog pH na agregaciju i aglomeraciju AgNP (61). Izmjereni pH otopine CYS bio je 5,3, a otopine GSH 3,2. Stoga je očekivan veći destabilizacijski učinak GSH, što je i potvrđeno u slučaju AOT-AgNP i PVP-AgNP. PLL-AgNP je, suprotno očekivanjima, stabilniji u prisutnosti GSH nego CYS. Razlozi takvog ponašanja nisu utvrđeni, no vjerojatno su posljedica interakcije omotača s ligandom. PLL-AgNP jedine su ispitane NP s pozitivnim ζ . Moguće je da stoga privlače negativno nabijeni GSH, koji oblaže NP i doprinosi stabilizaciji elektrostatski ili sterički. Vežanje slojeva GSH na površinu također bi objasnilo pojavu NP većeg d_H (~30 nm).

ELS mjerenja pokazala su da CYS nema značajan učinak na ζ potencijal NP, dok su u otopini GSH apsolutne vrijednosti svih ζ bile niže nego u čistoj vodi. To ukazuje na maskiranja naboja, što doprinosi destabilizacijskom učinku. Smanjen pozitivan potencijal PLL-AgNP također ukazuje na interakciju omotača i GSH.

Tablica 6. d_H (postotak razdiobe po volumenu), ζ potencijal i postotak otpuštenog ionskog Ag suspenzija obloženih AgNP nakon 1, 4 i 24 sata inkubacije u medijima s CYS i GSH.

| Medij | NP | Vrijeme | d_H / nm (% volumena) | ζ / mV | % Ag ⁺ |
|--------------|----------|---------|--------------------------------------------------------------|--------------|-------------------|
| CYS 100 mg/L | AOT-AgNP | 1 h | 2,8 ± 0,5 (98%) 22,4 ± 2,6 (1%) | -34,0 ± 2,4 | 0,4 |
| | | 4 h | 2,7 ± 0,7 (99%) 24,5 ± 1,4 (1%) | -34,1 ± 1,3 | 0,4 |
| | | 24 h | 3,5 ± 0,3 (99%) 28,7 ± 4,2 (1%) | -42,0 ± 1,9 | 0 |
| | PVP-AgNP | 1 h | 17,8 ± 0,0 (11%) 103,4 ± 4,6 (89%) | -24,4 ± 0,6 | 0,2 |
| | | 4 h | 10,7 ± 3,7 (43%) 54,7 ± 0,0 (17%) 101,7 ± 9,4 (40%) | -24,2 ± 1,2 | 0,2 |
| | | 24 h | 12,7 ± 0,1 (18%) 63,6 ± 5,7 (82%) | -26,6 ± 0,6 | 0 |
| | PLL-AgNP | 1 h | 7,3 ± 1,4 (96%) 44,9 ± 6,2 (4%) | 42,1 ± 2,9 | 0,1 |
| | | 4 h | 10,0 ± 2,9 (31%) 66,9 ± 28,1 (61%) 529,5 ± 208,7 (8%) | 32,1 ± 0,8 | 0,1 |
| | | 24 h | 13,9 ± 0,9 (16%) 61,0 ± 10,8 (38%) 771,1 ± 205,1 (46%) | 42,6 ± 3,2 | 0 |
| GSH 100 mg/L | AOT-AgNP | 1 h | 128,8 ± 2,6 (100%) | -18,3 ± 1,7 | 0 |
| | | 4 h | 190,1 ± 3,3 (100%) | -20,5 ± 1,5 | 0 |
| | | 24 h | 585,5 ± 74,8 (99%) | -19,5 ± 0,5 | 0 |
| | PVP-AgNP | 1 h | 45,3 ± 0,0 (2%) 423,0 ± 45,0 (98%) | -13,6 ± 0,1 | 0 |
| | | 4 h | 264,7 ± 5,6 (100%) | -16,8 ± 0,5 | 0 |
| | | 24 h | 455,4 ± 17,9 (100%) | -18,3 ± 0,3 | 0 |
| | PLL-AgNP | 1 h | 5,6 ± 1,6 (93%) 29,1 ± 11,8 (7%) | 26,9 ± 0,4 | 0 |
| | | 4 h | 5,6 ± 1,6 (63%) 23,5 ± 6,6 (37%) | 28,8 ± 0,7 | 0 |
| | | 24 h | 6,0 ± 0,8 (95%) 37,2 ± 3,5 (5%) | 28,0 ± 2,0 | 0 |



Slika 8. UV/VIS spektri AgNP obloženih AOT-om (lijevi stupac), PVP-om (srednji stupac) ili PLL-om (desni stupac) nakon 0, 1, 4 i 24 sata inkubacije u odabranim medijima: a) ultračistoj vodi, b) vodenoj otopini CYS 100 mg/L i c) vodenoj otopini GSH 100 mg/L.

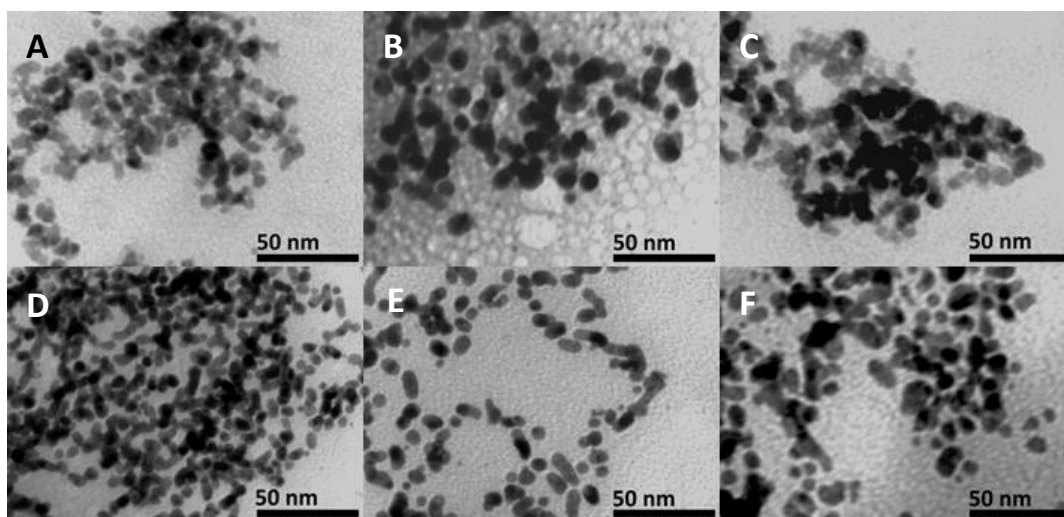
Analiza oslobođenog Ag^+ pokazuje smanjeno otapanje NP u prisutnosti CYS, dok je u svim slučajevima s GSH razina Ag^+ bila ispod granice detekcije. Ipak, to ne mora nužno značiti da biotili imaju zaštitni učinak na otapanje jer je poznato da obje molekule kompleksiraju ione metala (70). Stvaranje netopljivih kompleksa tijekom oslobađanja Ag^+ dovodi do taloženja na membrane filtera, stoga ioni u tom stanju nisu dostupni za analizu. Uz to, CYS i GSH mogu reducirati Ag^+ natrag u Ag^0 (57).

Prema literaturnim podacima, različite vrste NP različito reagiraju na prisutnost liganada poput CYS i GSH. U studiji Ravindrana i sur. AgNP obložene citratom aglomerirale su nakon dodatka CYS, no zadržale stabilnost u prisutnosti GSH (237). Pretpostavljeni mehanizam je povezivanje molekula CYS vodikovim vezama preko amino i karboksilnih skupina (234). Unakrsno povezivanje različitih NP dokazano je u literaturi (238,239). Takav proces je reverzibilan i razbijanje aglomerata je moguće zagrijavanjem (240). Unakrsno

povezivanje GSH moguće je pri kiselom pH, što je dovelo do pH-ovisne aglomeracije citratnih AuNP (241,242). Prema studiji Loza i sur. CYS je inhibirao otapanje PVP-AgNP, što se pripisuje vezanju na površinu i sprječavanju oksidacije (71). Suprotno tome, druga studija pokazala je pozitivan učinak CYS na otapanje PVP- i citratom-obloženih AgNP. CYS se vezao na površinu NP te odvlačio Ag^+ ione s površine stvarajući topljive komplekse. PVP-AgNP bile su otpornije na otapanje zbog težeg pristupa CYS površini (sterički utjecaj polimernog omotača) (243). Shi i sur. dokazali su nastajanje topljivih $[\text{Ag}(\text{CYS})_n]^+$ kompleksa u interakciji CYS i AgNP (244). GSH je uzrokovao otapanje AgNP obloženih poliakrilamidom ili citratom (245,246). Kompleksacija iona metala sa CYS i GSH važna je za ublažavanje njihovih toksičnih učinaka u organizmu (247,248).

4.4. Učinak biotiola na nukleaciju i rast nanočestica zlata i srebra

Za istraživanje učinka biotiola na nukleaciju i rast NP, te na interakciju biotiola s neobloženom nanopovršinom, fizikalno-kemijske karakteristike NP praćene su za vrijeme njihove pripreme redukcijom s NaBH_4 uz CYS/GSH. Slika 9 pokazuje da su već nakon 10 min reakcije NP prisutne u reakcijskoj smjesi, te da nema značajne promjene u veličini i obliku u periodu od 2 h. Sve NP su sferičnog oblika s primarnim promjerom oko 10 nm. TEM slike također pokazuju aglomerate NP.



Slika 9. Red gore: TEM slike AgNP uzetih iz reakcijske smjese koja je sadržavala AgNO_3 , CYS i NaBH_4 nakon (a) 10 min, (b) 60 min i (c) 120 min miješanja. Red dolje: TEM slike AuNP uzetih iz reakcijske smjese koja je sadržavala HAuCl_4 , CYS i NaBH_4 nakon (a) 10 min, (b) 60 min i (c) 120 min miješanja.

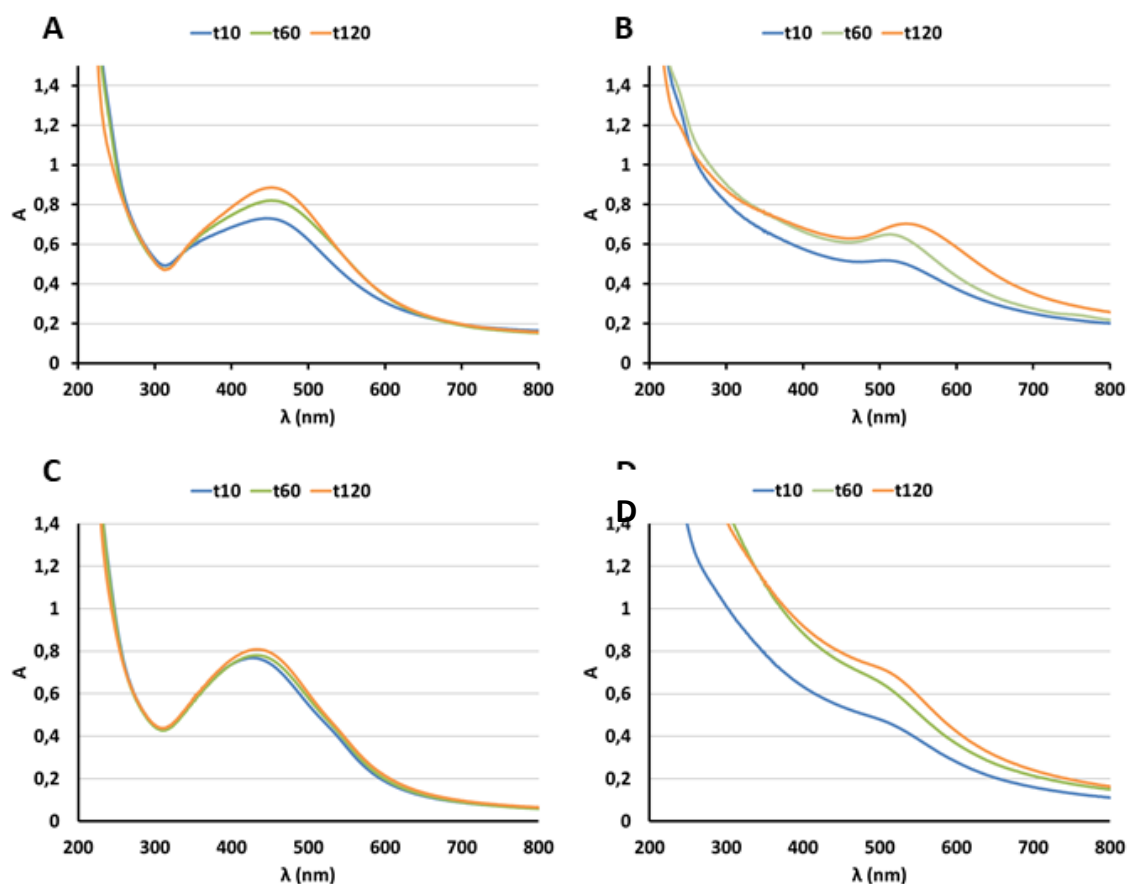
Tablica 7. d_H s udjelom po volumenu, ζ potencijali i pH vrijednosti u reakcijskim smjesama ionskog Ag ili Au, NaBH_4 i biotiola CYS ili GSH. Vrijednosti su određene u vremenskim intervalima od 10, 60 i 120 min od miješanja reaktanata. Navedeni omjeri u reakcijskim smjesama odnose se na milimolarne (mM) koncentracije svakog reaktanta.

| Reakcijska smjesa | Vrijeme | pH | d_H / nm (% volumena) | ζ / mV |
|--------------------------------------------------------------------------|---------|-------|------------------------------------------|--------------|
| [Ag ⁺] : [NaBH ₄] : [CYS] = 10 : 100 : 10 | 10 min | 9,09 | 50,2 ± 13,8 (55%) 288,0 ± 133,1 (45%) | -40,6 ± 1,6 |
| | 60 min | 9,88 | 41,6 ± 18,3 (62%) 264,1 ± 112,5 (38%) | -39,4 ± 1,2 |
| | 120 min | 10,12 | 34,1 ± 19,3 (86%) 260,8 ± 105,8 (14%) | -38,4 ± 1,0 |
| [Au ³⁺] : [NaBH ₄] : [CYS] = 10 : 100 : 10 | 10 min | 8,81 | 52,2 ± 17,2 (47%) 386,4 ± 103,3 (53%) | -42,5 ± 0,9 |
| | 60 min | 9,55 | 57,1 ± 14,5 (30%) 213,6 ± 73,2 (70%) | -39,7 ± 0,4 |
| | 120 min | 9,68 | 55,4 ± 27,0 (29%) 197,6 ± 48,0 (71%) | -38,9 ± 0,5 |
| [Ag ⁺] : [NaBH ₄] : [GSH] = 10 : 100 : 10 | 10 min | 8,86 | 4,6 ± 0,8 (83%) 40,0 ± 16,7 (17%) | -52,7 ± 2,4 |
| | 60 min | 9,41 | 4,5 ± 1,4 (100%) | -49,9 ± 2,7 |
| | 120 min | 9,51 | 3,2 ± 0,8 (100%) | -51,4 ± 0,4 |
| [Au ³⁺] : [NaBH ₄] : [GSH] = 10 : 100 : 10 | 10 min | 8,71 | 82,7 ± 0,8 (19%) 161,3 ± 52,7 (81%) | -48,8 ± 1,4 |
| | 60 min | 9,09 | 73,2 ± 4,5 (27%) 201,0 ± 64,4 (73%) | -52,4 ± 4,6 |
| | 120 min | 9,20 | 81,0 ± 19,8 (46%) 306,4 ± 160,1 (54%) | -47,4 ± 0,6 |

Izmjerene veličine i raspodjele veličina NP za vrijeme njihove pripreme odgovaraju veličinama mjerenim nakon pročišćavanja (vidi poglavlje 4.2., Tablica 4), uz iznimku populacije CYS-AgNP od 15 nm koja je ovdje odsutna. GSH-NP pokazuju značajne razlike za vrijeme pripreme i nakon pročišćavanja (Tablice 7 i 4). Veličine GSH-AgNP raspodijeljene su monomodalno i manje su od 5 nm, dok im je d_H vrijednost nakon pročišćavanja oko 25 nm. Suprotno tome, GSH-AuNP, uz aglomerate, prije pročišćavanja imaju populaciju veličine oko

80 nm, a nakon pročišćavanja 20 nm. Velike razlike mogu biti posljedica procesa sazrijevanja NP, njihove agregacije ili razbijanja aglomerata tijekom centrifugiranja i pranja, a na veličinu značajno djeluju različite veličine solvacijske ljuske zbog različitih uvjeta u mediju, ili interferencija prilikom mjerenja zbog prisutnosti NaBH_4 čijom reakcijom s AgNO_3 odnosno HAuCl_4 nastaju mjehurići.

Sve NP su elektrostatski stabilizirane što potvrđuje ζ potencijal negativniji od -30 mV (Tablica 7) (155). Iznosi ζ približno odgovaraju vrijednostima dobivenim nakon pročišćavanja (Tablica 4), a manje razlike su očekivane zbog velike ovisnosti ζ o uvjetima medija.



Slika 10. UV/VIS spektri reakcijskih smjesa a) CYS-AgNP, b) CYS-AuNP, c) GSH-AgNP i d) GSH-AuNP. Spektri su snimljeni u vremenskim intervalima od 10, 60 i 120 min od miješanja reaktanata.

Dodatna karakterizacija provedena je UV/VIS spektroskopijom (Slika 10), jer je valna duljina SPR signala ovisna o fizikalno-kemijskim svojstvima NP (sastavu, obliku, veličinu, površinskim svojstvima) i kemijskom okolišu (251). Sferične AgNP manje od 100 nm imaju maksimum SPR signala u području 400 – 500 nm, a AuNP u području 500 – 600 nm (235,252).

Maksimumi svih gore opisanih NP odgovaraju navedenim rasponima. Porast apsorpcije SPR signala posljedica je povećanja koncentracije NP zbog napredovanja reakcije, dok je pomak valne duljine maksimuma u crveno područje (engl. *red shift*) vjerojatno uzrokovan aglomeracijom (Slika 10).

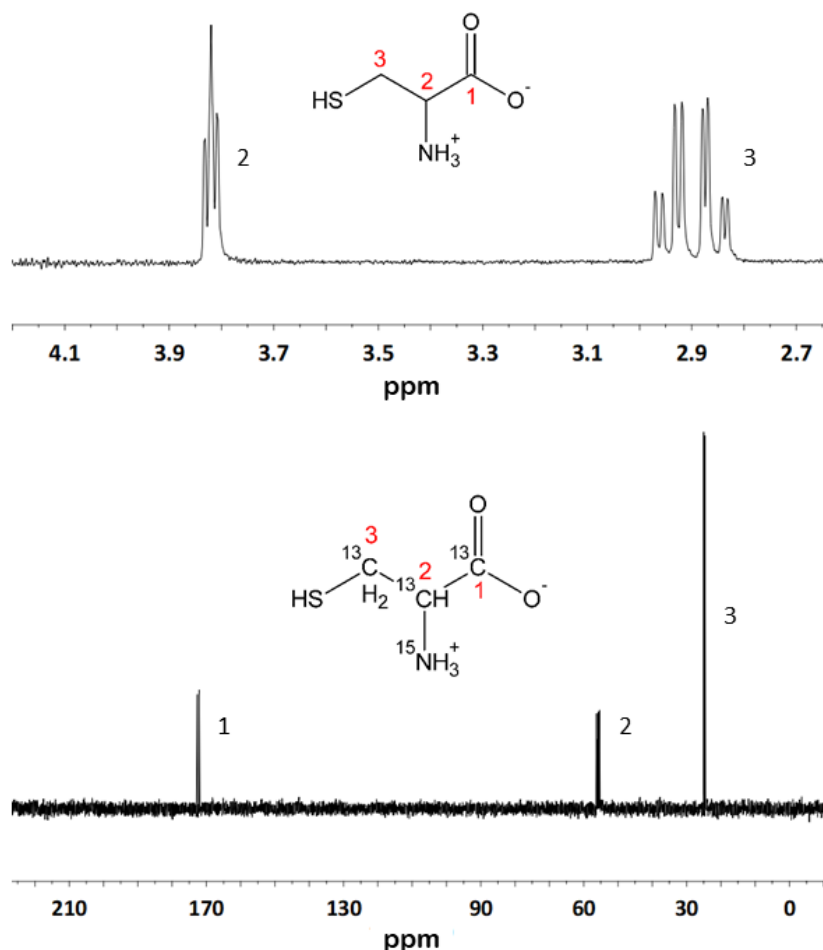
4.5. NMR studija interakcije biotiola s nanočesticama zlata i srebra

NMR spektroskopija odličan je alat za određivanje interakcije malih organskih molekula s NP metala jer male promjene kemijskog okoliša dovode do lako mjerljivog pomaka signala u NMR spektrima. Više studija potvrdilo je vrijednost ove tehnike za istraživanje interakcija tiola i NP (101,253–255). Primjena NMR spektroskopije na istraživanja NP metala obuhvaća analizu omotača (potvrdu vezanja, provjeru strukture i čistoće) te analizu interakcija s ligandima (adsorpcija, strukturne promjene molekula, kemijske reakcije). Spektralne promjene nakon vezanja za NP uočene su na primjerima aminoalkohola, alkilamina, alkiltiola i drugih sumpornih spojeva (256–259). Najčešće promjene u NMR spektrima su pomak signala, širenje signala, gubitak razlučivosti i nastanak novih signala. Pomak i širenje NMR signala mogu biti posljedica više fenomena: dipolarne relaksacije spinova u molekulskim lancima koji su gusto pakirani jedan pored drugog, povećanje brzine spin-spin relaksacije zbog imobilizacije molekula na površini, promijenjene homogenosti magnetskog polja u blizini jezgre metala te vezanja molekula na površinu u različitim orijentacijama i na različita vezna mjesta (258–260). Različite orijentacije molekule mogu dovesti i do pojave novih signala, kao što je uočeno na primjeru vezanja merkaptocetene kiseline na AuNP (257). Postoji i indicacija da kemijski pomak te promjene vremena T_1 i T_2 ovise o veličini NP (261).

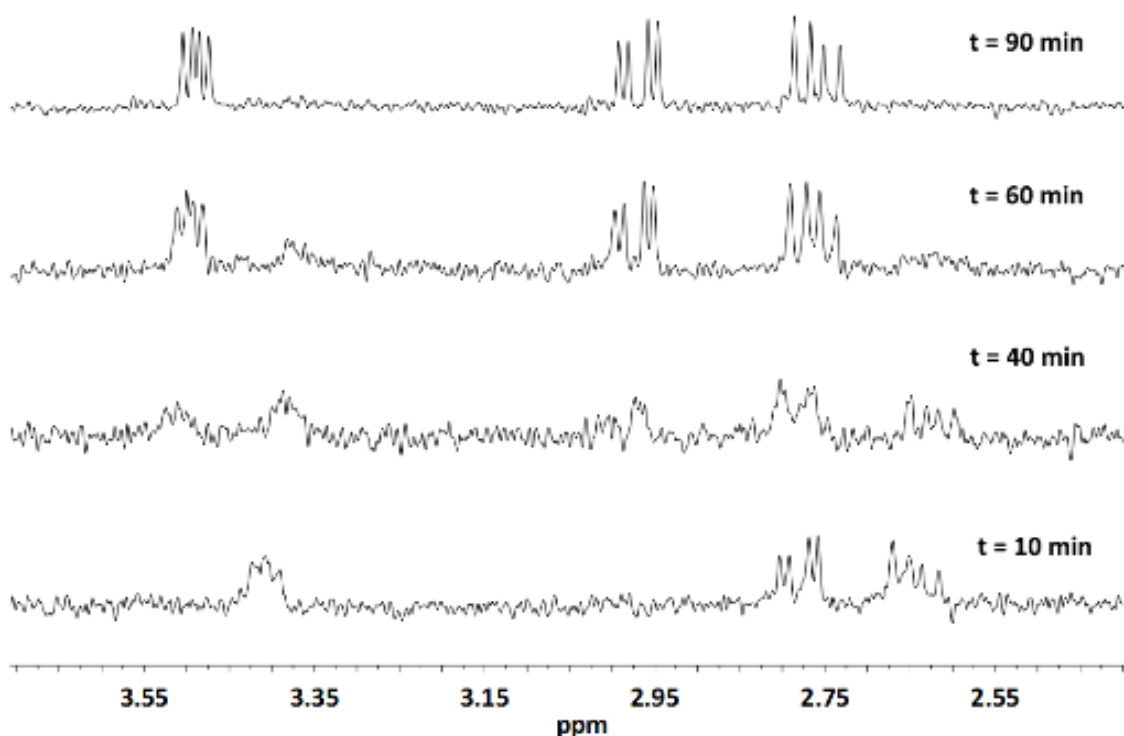
4.5.1. NMR spektroskopska analiza cisteina tijekom stvaranja nanočestica i interakcije s nanopovršinom

NMR spektar CYS snimljen je prvo u vodenoj otopini uz dodatak 10% D₂O (Slika 11). U ¹H spektru 50 mM CYS vidljiva su dva signala: triplet na 3,75 ppm i dublet kvarteta na 2,81 ppm. Asignacija signala preuzeta je iz javno dostupne baze NMR spektara AIST (208). Signal na 3,75 ppm odgovara protonu vezanom na ugljik na položaju 2 (također poznat kao α -proton jer je vezan na C _{α} aminokiseline), koji je dublet dubleta (ovisno o pH vrijednosti otopine moguće je preklapanje dubleta pa signal može poprimiti oblik tripleta) jer je spregnut s dva susjedna neekvivalentna protona. Signal na 2,81 ppm odgovara dvama magnetski

neekvivalentnim protonima na položaju 3, čiji je multiplicitet dublet dubleta. Signali tiolnog i amino protona nisu vidljivi u ovim spektrima jer se njihova frekvencija rezonancije uprosječuje zbog prebrze izmjene vodika s deuterijem iz otopine. U nespregnutom ^{13}C spektru $^{13}\text{C}_3\text{-CYS}$ vidljiva su tri signala koji potječu od tri C jezgre: dublet na 172,37 ppm, kvartet dubleta na 55,84 ppm i dublet na 24,84 ppm. Signal na položaju 172,37 ppm odgovara ugljiku na položaju 1 (karboksilni ugljik), te je dublet zbog cijepanja susjednim ^{13}C -obilježenim ugljikom. Signal na položaju 55,84 ppm odgovara ugljiku na položaju 2 (C_α), koji je pocijepan susjednim obilježenim ugljicima te dušikovim atomom. Signal na položaju 24,84 ppm odgovara ugljiku na položaju 3 (C_β), te je sprengnut sa susjednim ^{13}C -obilježenim ugljikom.

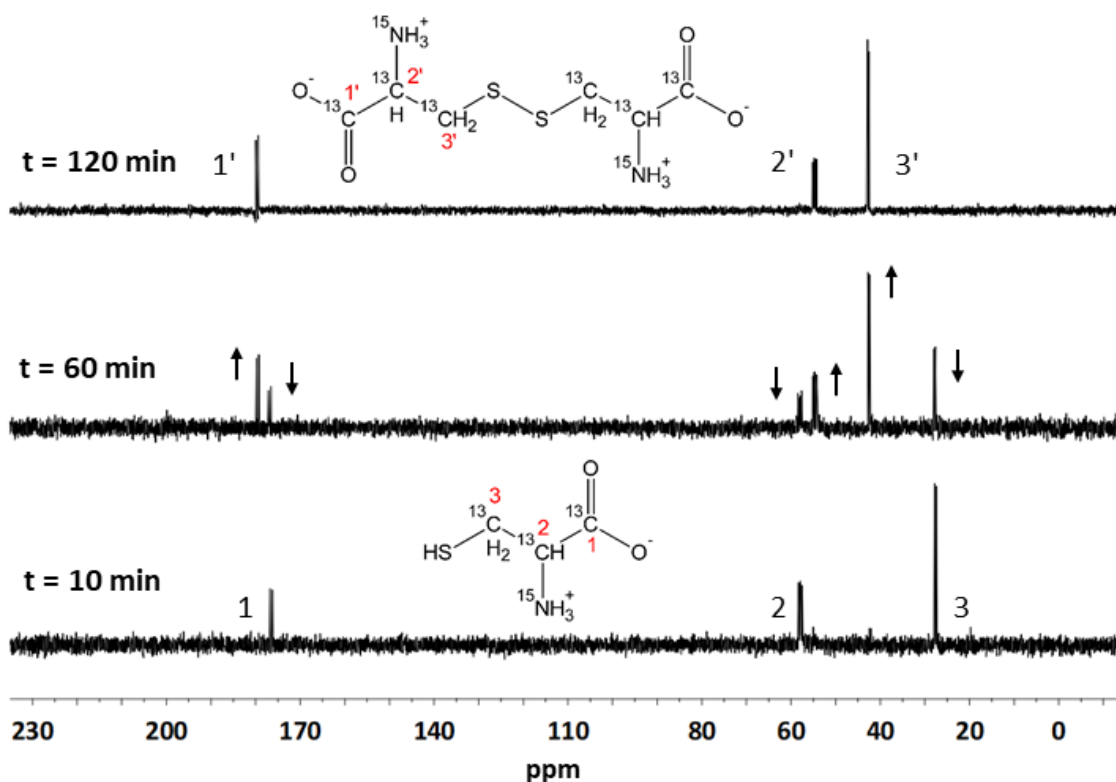


Slika 11. ^1H NMR spektar (gore) i ^{13}C NMR spektar (dolje) 50 mM otopine $^{13}\text{C}_3\text{-CYS}$ u vodi. Strukture CYS označene su brojevima 1-3 kako bi se obilježili položaji atoma, kojima su pridruženi signali u spektrima.



Slika 12. ^1H NMR spektri reakcijske smjese 5,6 mM AgNO_3 , 56 mM NaBH_4 i 5,6 mM CYS u navedenim vremenskim intervalima nakon početka reakcije.

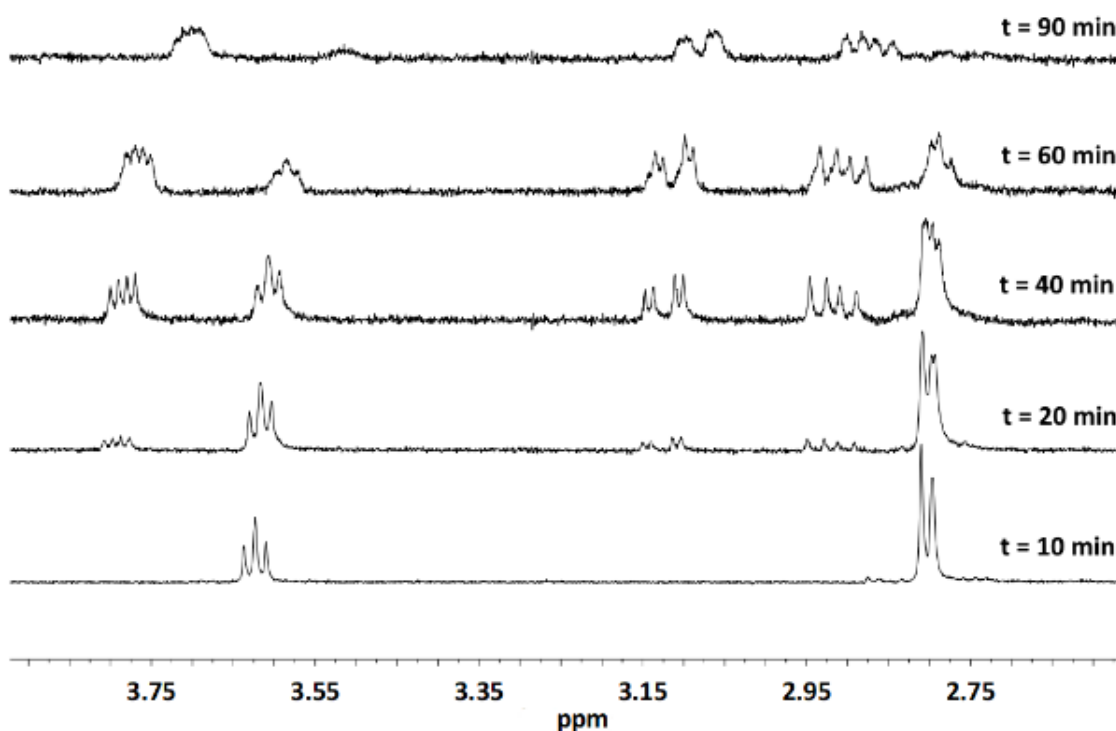
U pokusu praćenja interakcija CYS s nano-Ag i nano-Au, smjesa soli metala, borhidrida i CYS miješana je u ultračistoj vodi na sobnoj temperaturi. U reakcijskoj smjesi 5,6 mM AgNO_3 , 56 mM NaBH_4 i 5,6 mM CYS u vremenu od 10 min nakon početka reakcije, vidljivi su signali triju protona CYS (Slika 12). Signali su pomaknuti u više polje u odnosu na otopinu čistog CYS, što je posljedica bazičnog pH reakcijske smjese. Nakon 40 min reakcije, u spektru je vidljiva pojava novih signala, uz istovremeno smanjenje intenziteta početnih signala. Nakon 90 min reakcije, početni signali su potpuno nestali, te su vidljivi samo novi signali, svi pomaknuti u niže polje za oko 0,2 ppm. Budući da su promjene u NMR spektru relativno spore, snimljen je intermedijerni spektar u kojem usporedno postoje obje vrste signala, iz čega se može zaključiti da je riječ o kemijskoj reakciji, a ne brzom ravnotežnom procesu. Izgled i položaj novih signala upućuju na nastanak oksidiranog oblika CYS – cistina.



Slika 13. ^{13}C NMR spektri reakcijske smjese 10 mM AgNO_3 , 100 mM NaBH_4 i 10 mM $^{13}\text{C}_3$ - ^{15}N -obilježenog CYS u navedenim vremenskim intervalima nakon početka reakcije. Signali i pripadajući C atomi obilježeni su slovima. Strelice pokazuju porast odnosno pad intenziteta signala u ovisnosti o napretku reakcije.

Pretvorba CYS u cistin za vrijeme pripreve AgNP potvrđena je ^{13}C NMR spektroskopijom (Slika 13). Pokusi su provedeni s $^{13}\text{C}_3$, ^{15}N -obilježenim CYS jer nije bilo moguće dobiti kvalitetne spektre samo s ^{13}C -neobilježenim CYS. Karbonilni i metilenski ugljici vide se u spektru kao dubleti zbog sprežanja s kiralnim ^{13}C , a potonji se vidi kao dva dubleta dubleta koji su dodatno sprežnuti s ^{15}N . Za vrijeme reakcije signali svih C atoma su nestali u nakon 2 h, te su se pojavili novi signali, koji odgovaraju strukturi cistina. Karbonil i metilen su pomaknuti u niže polje, a kiralni ugljik je pomaknut u više polje u usporedbi s početnim signalima CYS.

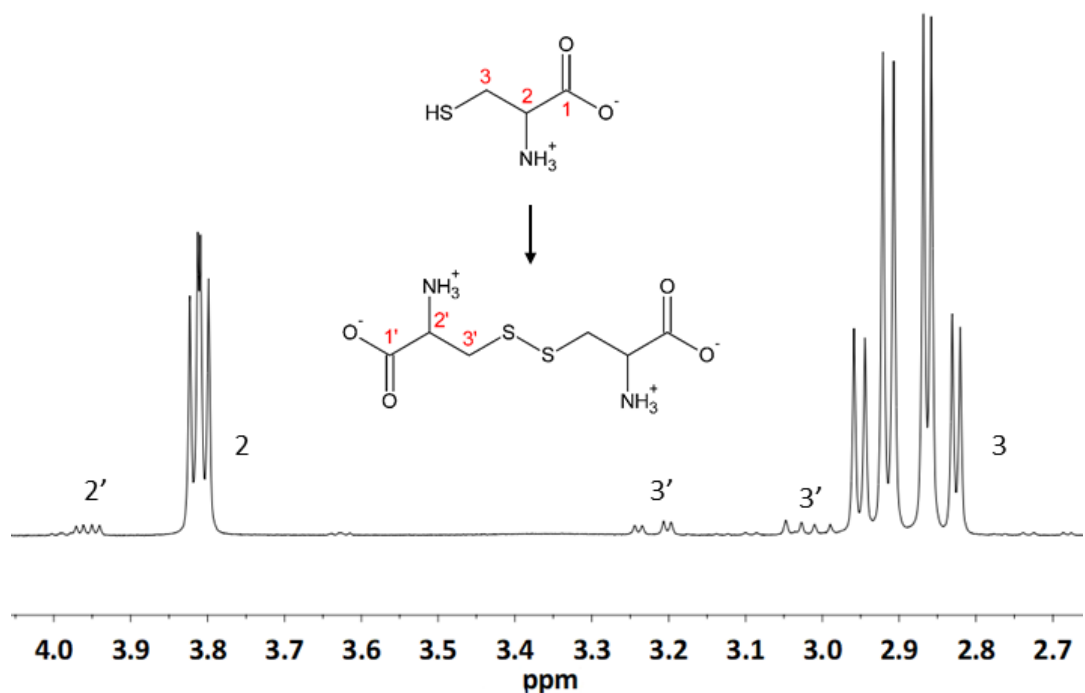
Slične promjene u NMR spektrima uočene su prilikom snimanja reakcijske smjese soli Au, CYS i NaBH_4 (Slika 14). U tim uvjetima vidljiva su dva početna signala CYS, koji u periodu od 90 min potpuno nestanu te ih zamijene signali cistina.



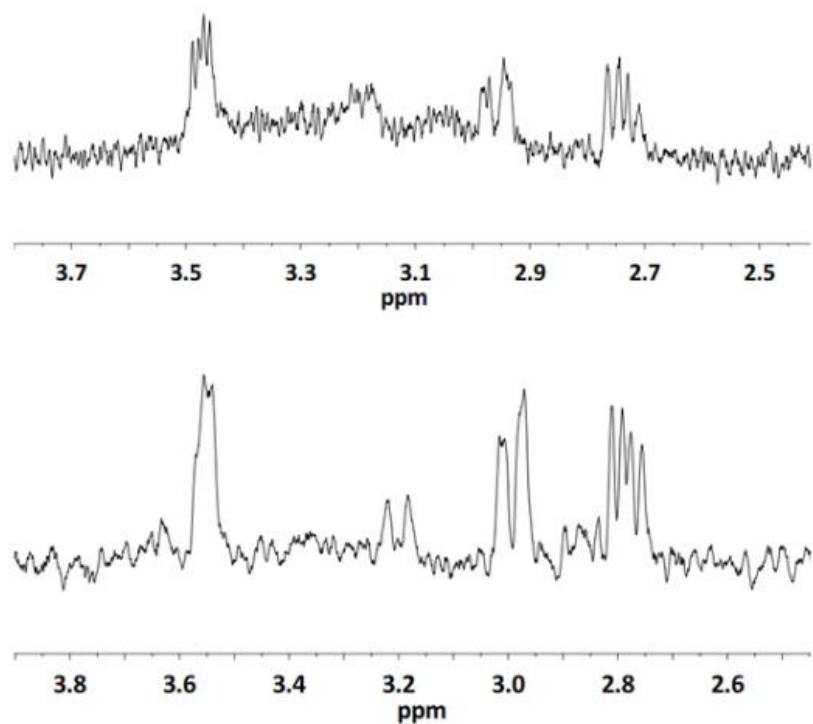
Slika 14. ¹H NMR spektri reakcijske smjese 3 mM HAuCl₄, 30 mM NaBH₄ i 30 mM CYS u navedenim vremenskim intervalima nakon početka reakcije.

Kao dodatnu potvrdu nastanka cistina, komercijalni uzorak cistina otopljen je zajedno s CYS u vodi. Koncentracija CYS bila je 25 mM, a cistina 1 mM. Slika 15 pokazuje jednak raspored signala kakav je vidljiv u spektrima reakcijske smjese.

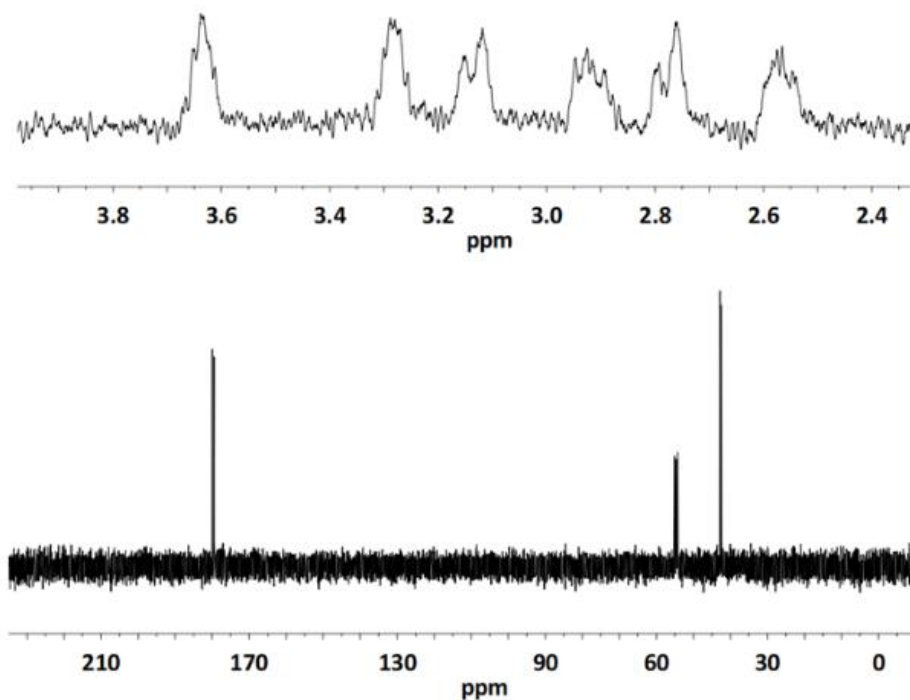
Nakon završetka pripreme, NP su centrifugirane i ponovno dispergirane u D₂O, te su ponovno snimljeni ¹H i ¹³C spektri (slike 16 i 17). U snimljenim NMR spektrima, re-dispergirane NP pokazuju tipične signale cistina, premda je kvaliteta spektra jako narušena. Vežanje na NP očekivano dovodi do širenja signala i gubitka razlučivosti, što je vjerojatno posljedica vežanja na različita vezna mjesta na površini i različitih orijentacija liganda (262). U usporedbi s ¹³C spektrom slobodnog CYS, svi signali su pomaknuti u niže polje, što odgovara ranijim opažanjima (263).



Slika 15. ¹H NMR spektri smjese komercijalnih CYS i cistina u molarnom omjeru 1 : 25.

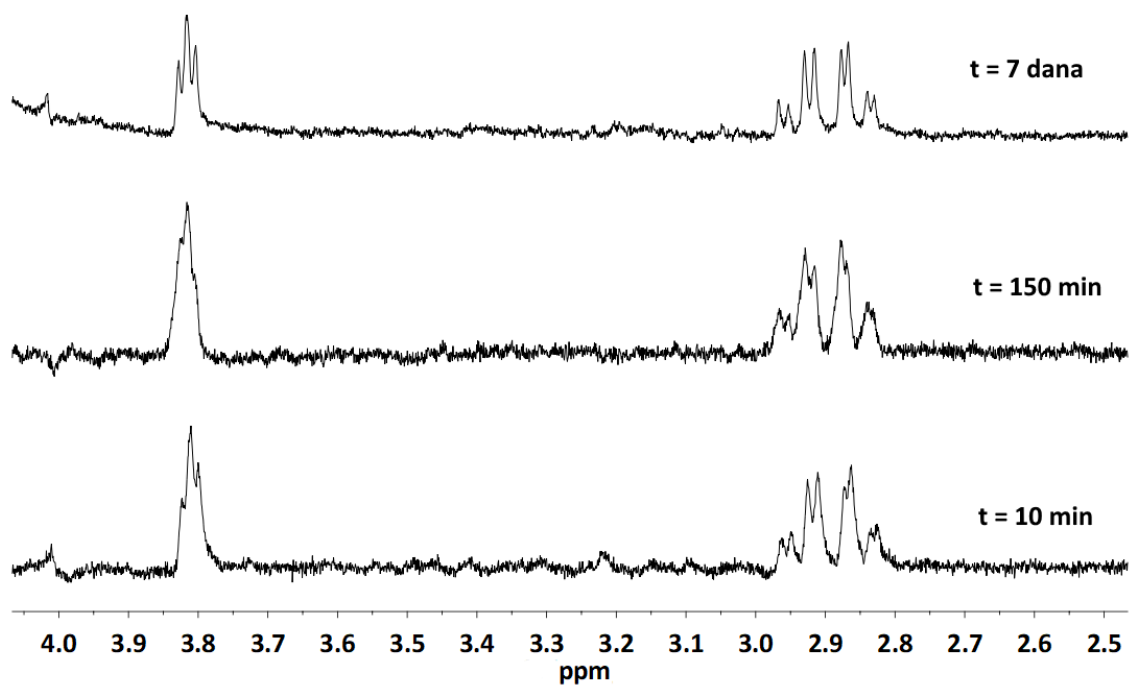


Slika 16. ¹H NMR spektri AgNP (gore) i AuNP (dolje) pripremljenih u prisutnosti CYS, nakon pročišćavanja. Signali odgovaraju cistinu.

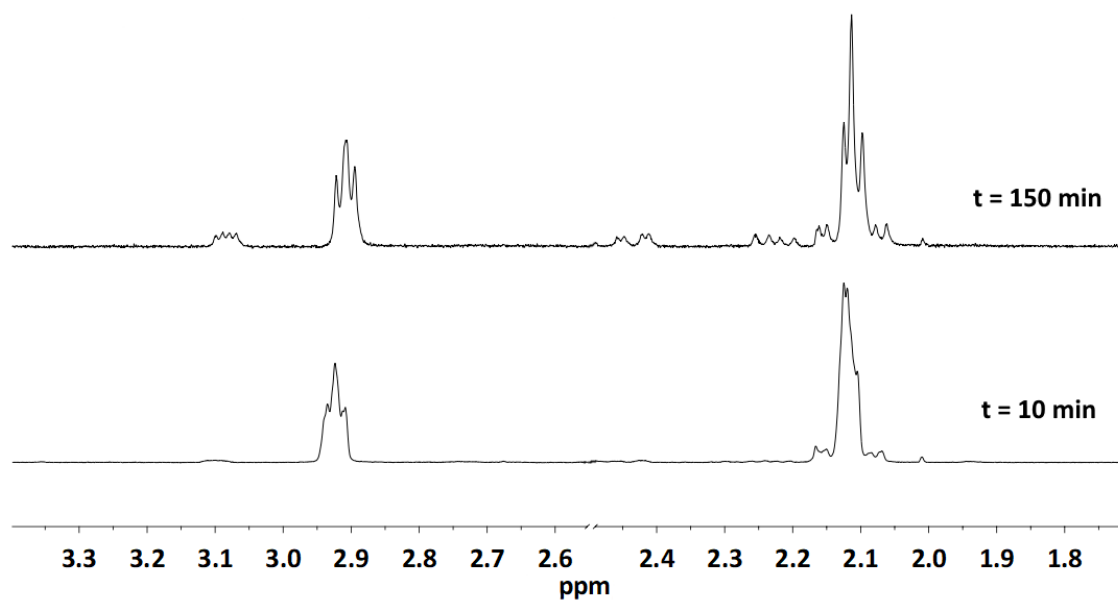


Slika 17. ^1H NMR (gore) i ^{13}C NMR (dolje) spektri cistinom-obloženih AgNP u D_2O nakon pročišćavanja centrifugiranjem.

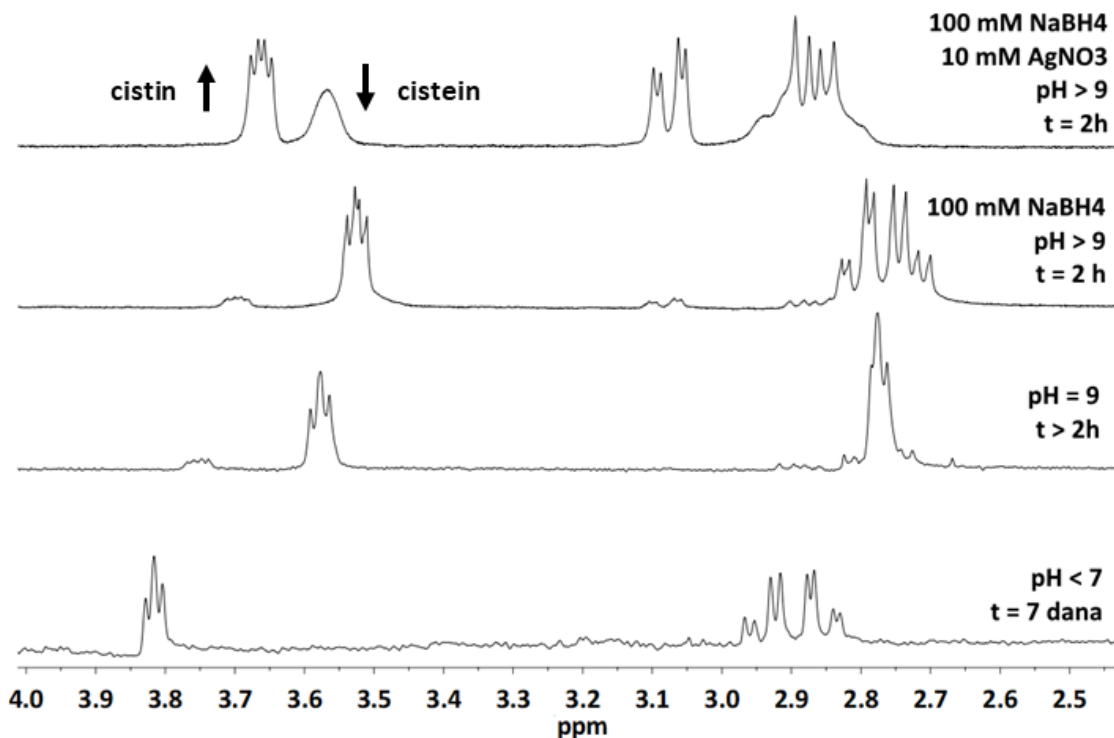
Dodatni pokusi provedeni su kao provjera koliko je CYS podložan spontanoj oksidaciji u vodenom mediju neutralnog i bazičnog pH. Suprotno literaturnim navodima (264), uočeno je da je spontana oksidacija CYS (10 mM) u vodi (neutralni medij, pH 6,8) vrlo spori proces, posebno u odnosu na vremenski raspon proučavane kemijske reakcije (Slika 18). U reakcijskoj smjesi s AgNO_3 i NaBH_4 vrijednost pH varira od 8,8 do 10,1, što bi moglo ubrzati reakciju oksidacije. No, pokazano je da u bazičnom mediju (pH = 9) uz dodatak NaOH CYS oksidira vrlo sporo (Slika 19). Uz dodatak 100 mM NaBH_4 , brzina reakcije značajno se povećala, dok je dodatak AgNO_3 doveo do nastajanja AgNP i potaknuo stvaranje disulfida (Slika 20). Usporedba spektara na Slici 20 pokazuje sljedeće: 1) brzina oksidacije CYS u neutralnom mediju nije značajna u vremenskom rasponu u kojem se odvija priprava NP (oko 2 h); 2) brzina oksidacije CYS u lužnatom mediju (uz dodatak NaOH ili NaBH_4) također nije značajna u istom vremenskom rasponu i 3) tek uz dodatak Ag^+ brzina oksidacije CYS postaje relevantna u vremenskom rasponu priprave NP.



Slika 18. ^1H NMR spektri 10 mM CYS u neutralnom mediju (vodena otopina, pH 6,8) u navedenim vremenskim intervalima.



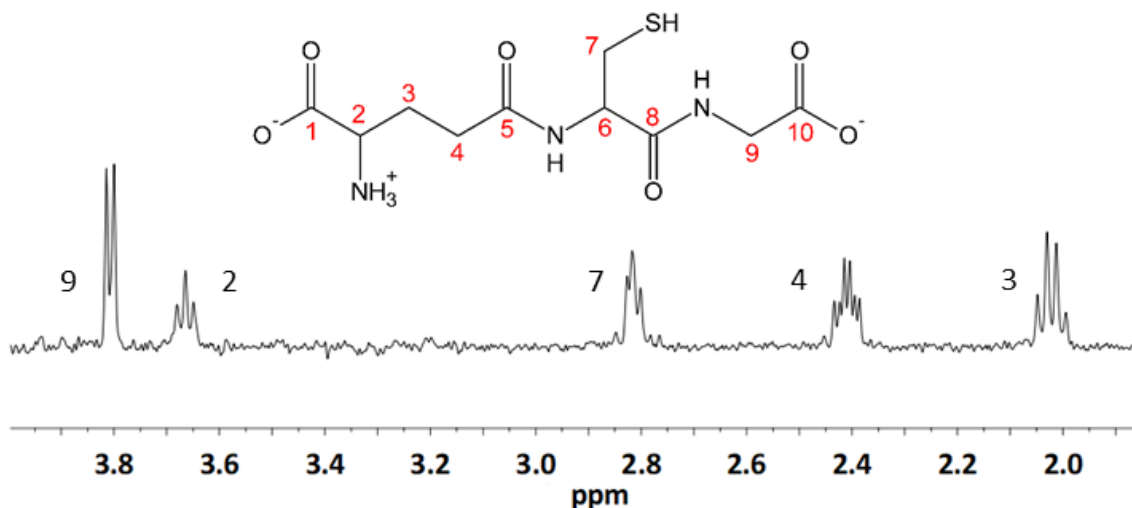
Slika 19. ^1H NMR spektri 10 mM CYS u pri pH 9 u navedenim vremenskim intervalima.



Slika 20. ^1H NMR spektri 10 mM CYS u različitim reakcijskim smjesama (odozdo prema gore): u vodenoj otopini pH 6,7, u vodenoj otopini pH 9, u 100 mM vodenoj otopini NaBH_4 i u reakcijskoj smjesi 100 mM NaBH_4 i 10 mM AgNO_3 .

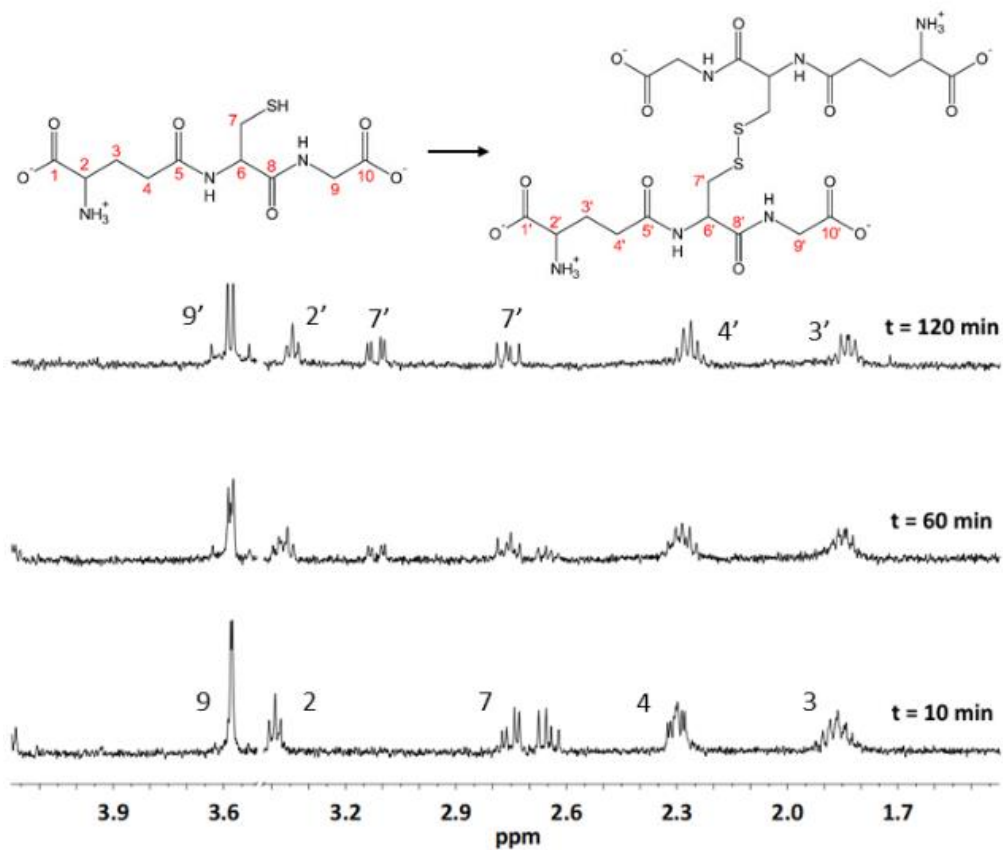
4.5.2. NMR spektroskopska analiza glutationa tijekom stvaranja nanočestica i interakcije s nanopovršinom

NMR spektar GSH u vodenoj otopini, uz dodatak 10% D_2O , prikazan je na slici 21. U ^1H spektru vidljivo je pet signala: dublet na 3,83 ppm, dublet dubleta na 3,68 ppm, dublet dubleta na 2,81 ppm, multiplet na 2,40 ppm i multiplet na 2,02 ppm. Asignacija signala preuzeta je iz javno dostupne baze NMR spektara AIST (208). Signal na 3,83 ppm odgovara protonima vezanim za ugljik na položaju 9 (glicinski dio strukture). Signali na položajima 3,68 ppm, 2,02 ppm i 2,40 ppm redom odgovaraju protonima na položajima 2, 3 i 4 (γ -glutaminski dio strukture). Signal na položaju 2,81 ppm odgovara dvama magnetski ne-ekvivalentnim protonima na položaju 7. Kao i kod CYS, ni ovdje nisu prisutni signali amino, tiolnih ni karboksilnih protona, zbog brze izmjene s deuterijem iz medija. Još jedan signal koji nedostaje je proton na položaju 6, koji je pomaknut > 4 ppm te ga prekriva vrlo široki signal vode, što nije bilo moguće izbjeći.

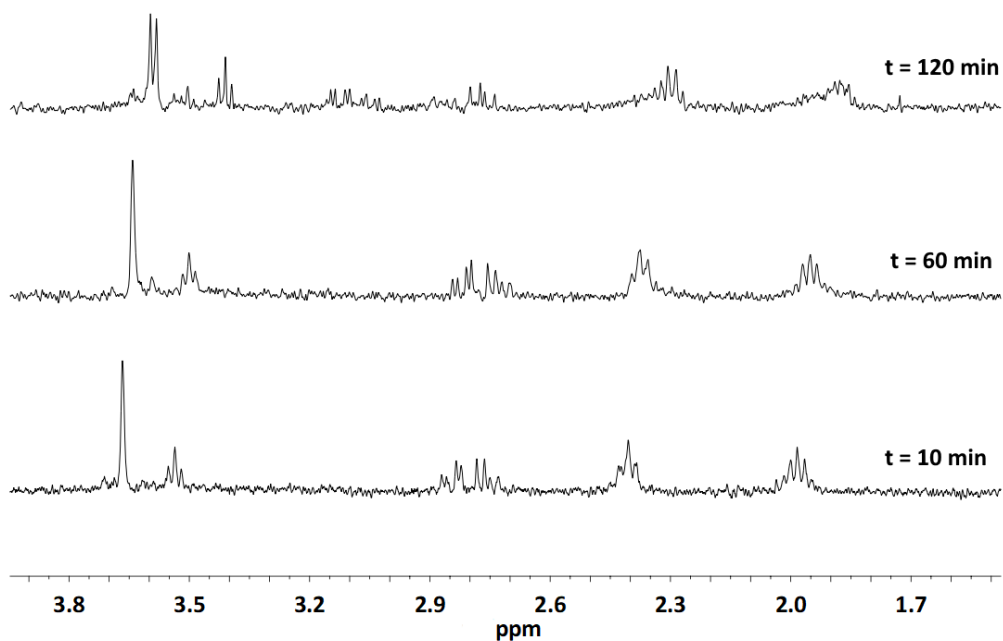


Slika 21. ^1H NMR spektar 10 mM GSH u vodenoj otopini. Struktura GSH označena je brojevima 1-10, koji označavaju položaje za koji su vezani vodikovi atomi, te su njima pridruženi signali u spektru.

Pokus praćenja interakcija GSH s NP za vrijeme njihove pripreve proveden je na isti način kao i u slučaju CYS. ^1H spektri reakcijske smjese 5,6 mM AgNO_3 , 56 mM NaBH_4 i 5,6 mM GSH prikazani su na slici 22. Spektar nakon 10 min reakcije odgovara reduciranom obliku GSH. Svi signali pomaknuti su u više polje u odnosu na spektar na slici 21 zbog razlike u pH vrijednostima (reakcijska smjesa je bazična). Nakon 60 min smanjuje se intenzitet signala koji odgovara položaju 7, dok se novi signal pojavljuje u nižem polju (3,1 ppm). Nakon 120 min, početni signal 7 nestaje, dok su vidljiva dva odvojena signala u nižem polju. Budući da položaj 7 odgovara protonima u neposrednoj blizini tiolne skupine, promjena signala ukazuje na reakciju dimerizacije u kojoj sudjeluje tiolna skupina. Stoga konačni spektar prikazuje produkt dimerizacije GSH, odnosno oksidirani oblik GSSG. Dva protona vezana na položaj 7 u produktu se pojavljuju kao dva odvojena signala, što ukazuje da je slobodna rotacija oko C-S veze ograničena sterički. Preostali signali ne pokazuju značajne promjene u multiplicitetu ili kemijskom pomaku, vjerojatno jer su udaljeni od disulfidne veze. Isti slučaj vidljiv je u reakcijskoj smjesi 3 mM HAuCl_4 , 30 mM NaBH_4 i 30 mM GSH: početni signal 7 nestaje, te se pojavljuju dva signala 7', zbog nastanka GSSG (Slika 23). Na slici 23 može se još vidjeti blago širenje signala 3 i 4, što bi moglo upućivati na vezanje GSSG za NP.

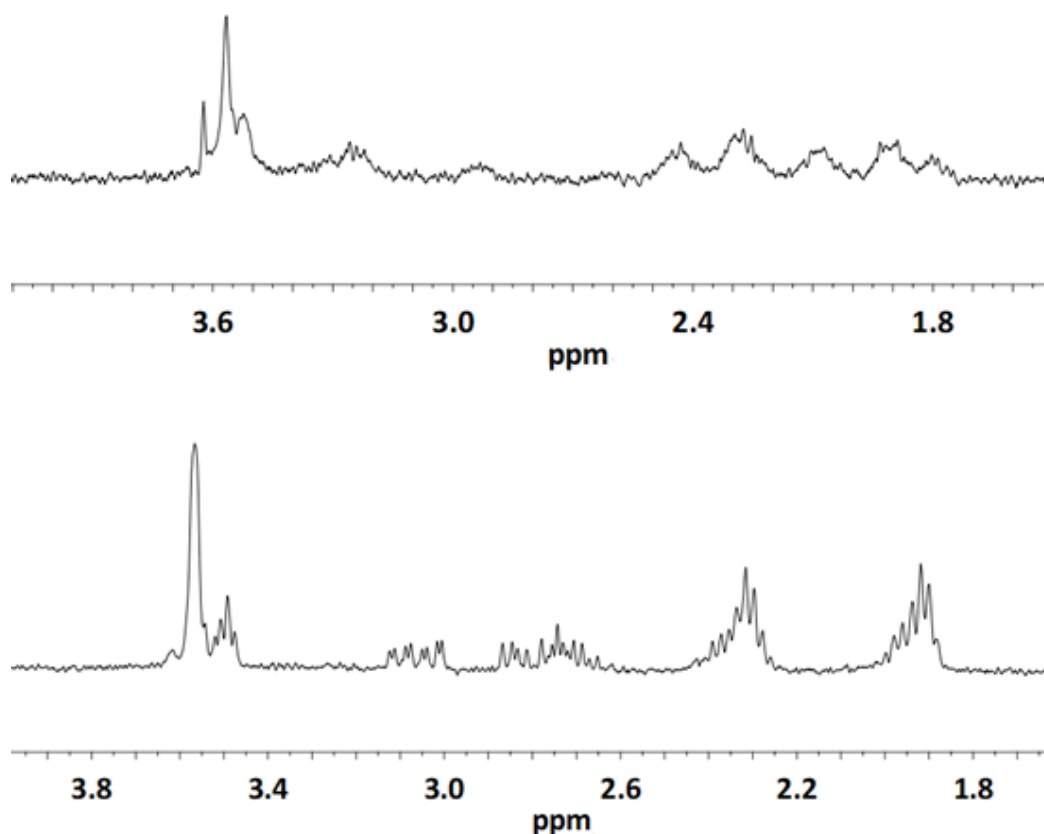


Slika 22. ¹H NMR spektri reakcijske smjese 5,6 mM AgNO₃, 56 mM NaBH₄ i 5,6 mM GSH u navedenim vremenskim intervalima nakon početka reakcije.



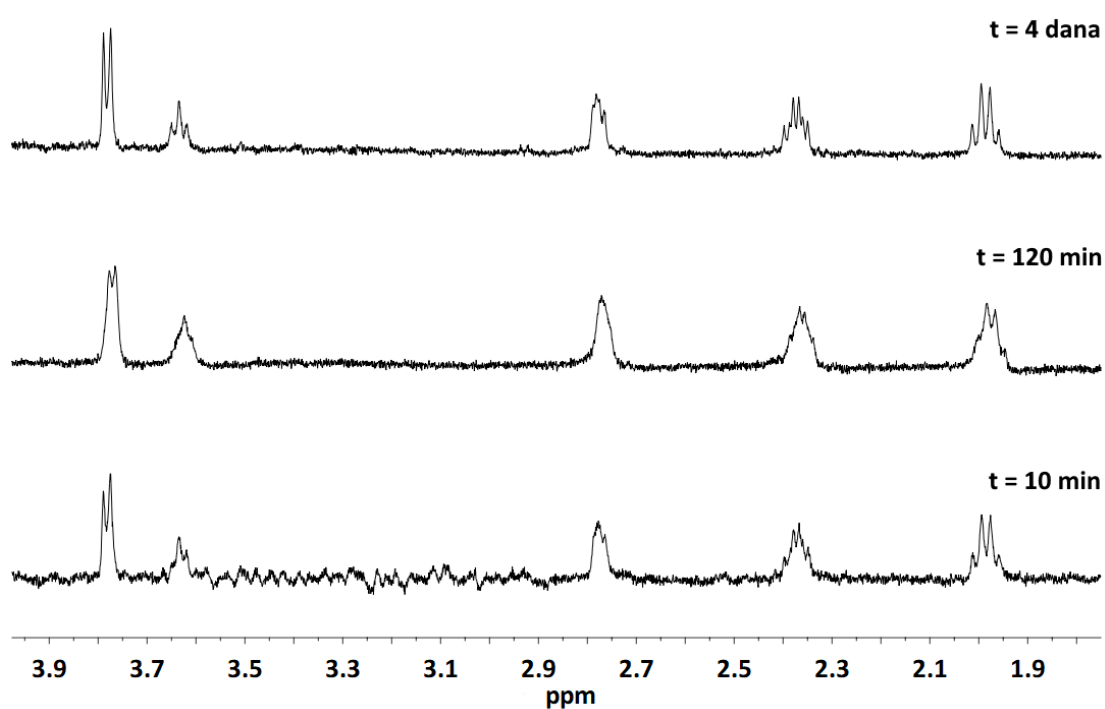
Slika 23. ¹H NMR spektri reakcijske smjese 3 mM HAuCl₄, 30 mM NaBH₄ i 30 mM GSH u navedenim vremenskim intervalima nakon početka reakcije.

Spektri snimljeni nakon pročišćavanja NP (Slika 24) pokazuju iste signale 7', što upućuje na nastanak AgNP i AuNP obloženih GSSG. U oba slučaja širenje signala i gubitak razlučivosti indikacija su vezanja za nanopovršinu.

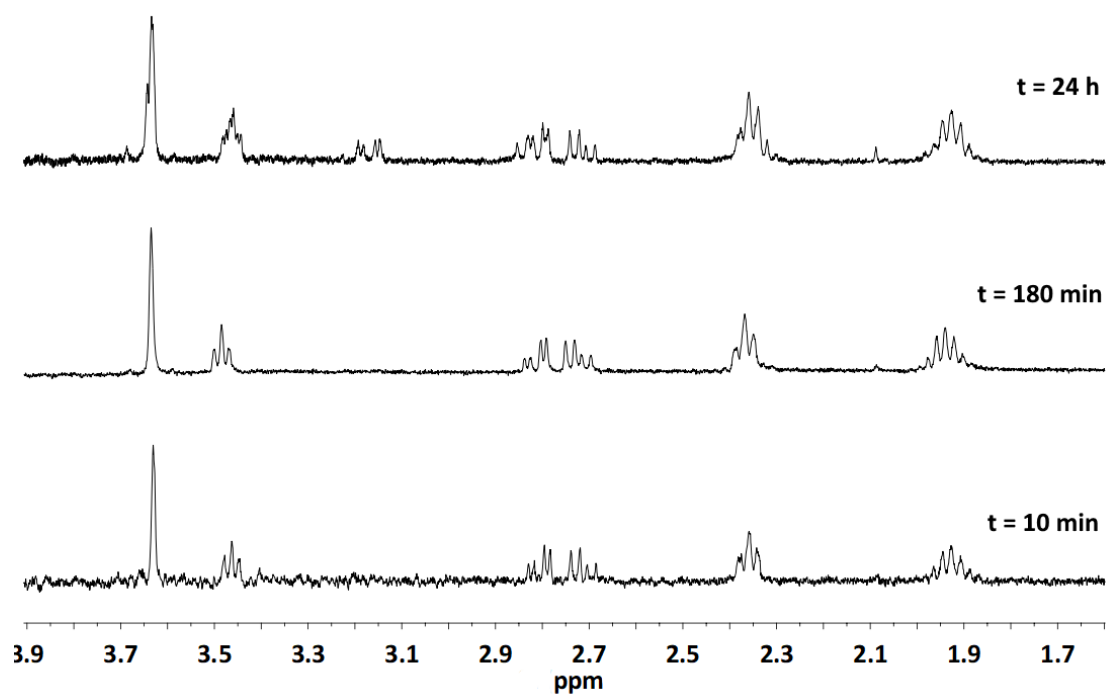


Slika 24. ^1H NMR spektri AgNP (gore) i AuNP (dolje) pripremljenih u prisutnosti GSH, nakon pročišćavanja. Signali odgovaraju GSSG.

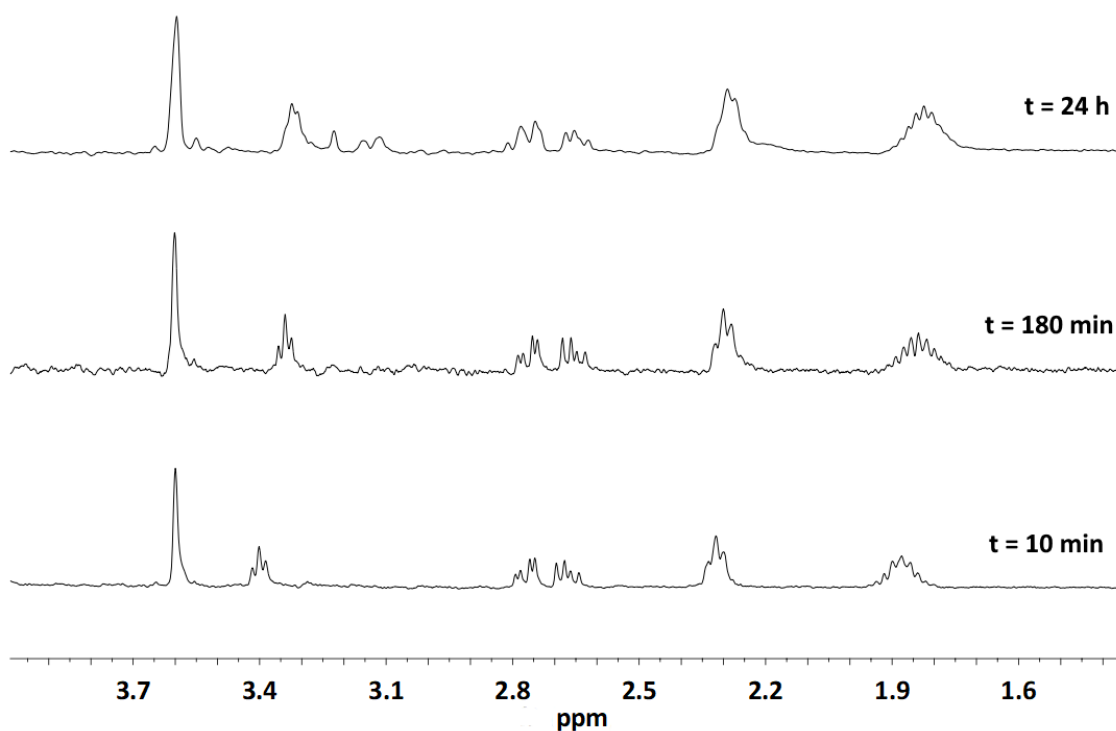
Jednako kao u slučaju CYS, provedene su kontrolne studije oksidacije GSH u odsutnosti reaktanata ishodne reakcijske smjese. 10 mM GSH u vodenom mediju (Slika 25) ne oksidira u periodu od 4 dana. Zaluživanje otopine na pH 9 pogoduje oksidaciji (Slika 26), no ona je i dalje vrlo spora u odnosu na vremenski okvir reakcije pripreme NP (GSH pokazuje djelomičnu oksidaciju nakon 24 sata). Deseterostruki molarni suvišak NaBH_4 također ne dovodi do značajne oksidacije u periodu od 24 h (Slika 27).



Slika 25. ^1H NMR spektri 10 mM GSH u kiselom mediju (vodena otopina, pH 3,2) u navedenim vremenskim intervalima.



Slika 26. ^1H NMR spektri 10 mM GSH u pri pH 9 u navedenim vremenskim intervalima.



Slika 27. ^1H NMR spektri reakcijske smjese 100 mM NaBH_4 i 10 mM GSH u navedenim vremenskim intervalima nakon početka reakcije.

4.5.3. Teorijski izračun NMR kemijskih pomaka

Kvantna kemija omogućuje računanje NMR kemijskih pomaka na temelju izračunatih energija optimiziranih struktura. GIAO NMR izračuni korišteni su u ovoj disertaciji na optimiziranim kompleksima CYS s Ag_n i Au_n ($n = 2, 4$). Izračunati kemijski pomaci prikazani su u tablici 8. Usporedba računalno i eksperimentalno dobivenih kemijskih pomaka korisna je naznaka valjanosti odabrane metode.

Eksperimentalno je utvrđeno da cistin kompleksiran na AgNP i AuNP ima signale ^1H pomaknute za oko 0,2 ppm u više polje u odnosu na slobodni CYS. Slično je potvrđeno u literaturi za GSH-AuNP sustave (265). Taj pomak nije povezan s pH vrijednošću medija, što je dokazano mjerenjima na pH 9 (Slika 23), nego je posljedica učinka zasjenjenja zbog vezanja cistina za NP metala. Isti pomak predviđen je i GIAO NMR računima. Svi izračunati signali cistin- Ag_n kompleksa bili su pomaknuti prema višem polju, u usporedbi s pomacima slobodnog cistina. Za razliku od toga, signali CYS vezanog na Ag_2 pomaknuti su u niže polje. To upućuje na vezanje cistina na površinu metala. GIAO NMR računi ispravno predviđaju pomake ^{13}C signala karbonilne skupine (C_1) i metilenske skupine (C_3) u cistinu u niže polje, a kiralnog

ugljika (C_2) u više polje u usporedbi sa signalima CYS. Međutim, u slučaju kompleksacije Ag_2 i cistinoa, izračunati pomak C_3 premješten je u više polje u odnosu na CYS. U literaturi je poznato neslaganje računalnih i eksperimentalnih podataka (266), no povremena odstupanja ne opovrgavaju vrijednost računskih podataka, već ukazuju na potrebu za usavršavanjem ili odabirom drugih računskih modela. Pomak signala cistina u niže polje vidljiv je i u slučaju kompleksacije s AuNP. Računalni pristup potvrdio je da signali atoma C_α u cistinu imaju pomak u nižem polju (cca 0,2 ppm) nakon kompleksacije s Au_2 , dok kod metilenskih protona nema promjene kemijskog pomaka. Slaganje računalnih i eksperimentalnih pomaka daje dodatnu potvrdu stvaranja kompleksa cistina i NP.

Tablica 8. Izračunati i eksperimentalni NMR kemijski pomaci (u ppm, prema TMS) za CYS, cistin i njihove komplekse s Ag_n i Au_n klasterima ($n = 2, 4$). Oznake atoma prate numeraciju iz slike 23.

| | Sustav | $C_1 / C_1' *$ | $C_2 / C_2' *$ | $C_3 / C_3' *$ | H_2 | H_3 | H_3 |
|-----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-------|-------|-------|
| Računski | CYS | 173,94 | 57,85 | 36,35 | 3,98 | 3,52 | 2,94 |
| | CYS + Ag_2 | 173,67 | 58,31 | 35,64 | 4,34 | 3,72 | 2,92 |
| | CYS + Ag_4 | 180,20 | 56,62 | 33,19 | 4,86 | 2,86 | 2,40 |
| | CYS + Au_2 | 177,66 | 61,20 | 35,02 | 4,70 | 3,34 | 2,43 |
| | CYS + Au_4 | 178,34 | 59,25 | 37,32 | 4,90 | 3,21 | 2,48 |
| | cistin | 174,59 | 56,57 | 51,91 | 4,12 | 3,71 | 3,85 |
| | cistin + Ag_2 | 176,59 | 59,70 | 37,49 | 3,85 | 2,67 | 3,27 |
| | cistin + Ag_4 | 178,61 | 61,72 | 38,06 | 4,06 | 2,89 | 3,19 |
| | cistin + Au_2 | 175,07 | 56,26 | 50,63 | 4,34 | 3,76 | 3,94 |
| cistin + Au_4 | 175,57 | 56,58 | 50,99 | 4,34 | 3,86 | 3,80 | |
| Eksperimentalni | CYS | 172,37 | 55,84 | 24,84 | 3,82 | 2,96 | 2,85 |
| | CYS – Ag | 176,52 | 57,60 | 27,49 | 3,40 | 2,78 | 2,67 |
| | CYS – Au | / | / | / | 3,63 | 2,81 | / |
| | cistin | 180,16 | 54,56 | 42,91 | 3,74 | 3,15 | 2,94 |
| | cistin – Ag | 179,68 | 54,71 | 42,68 | 3,49 | 2,99 | 2,78 |
| | cistin – Au | / | / | / | 3,81 | 3,08 | 2,92 |

* Oznake C_1 , C_2 i C_3 odnose se na ugljikove atome u CYS, oznake C_1' , C_2' i C_3' odnose se na ugljikove atome u cistinu.

4.5.4. Zaključna rasprava NMR spektroskopskih rezultata

Oksidacija biotiola za vrijeme nastajanja AgNP i AuNP i interakcije s nanopovršinom do sad nisu istraživane u literaturi. NMR studije CYS u interakciji s AuNP i AgNP uglavnom tumače promjene u spektru kao posljedicu vezanja CYS na nanopovršinu. Aryal i sur. pripremali su CYS-obložene AuNP borhidridnom redukcijom te uočili pomak signala α -protona (ovdje označen brojem 2, Slika 11) u više polje i razdvajanje signala β -protona (ovdje označen brojem 3, Slika 21) na dva nova signala. Razdvajanje signala protumačeno je kao posljedica vezanja, tj. imobilizacije molekule, dok je širenje signala pripisano nehomogenosti magnetskog polja. IR i Raman pokusi naizgled su potvrdili nastajanje S–Au veze jer je uočeno nestajanje S–H vrpce u spektrima. Međutim, autori nisu uzeli u obzir mogućnost stvaranja S–S veze (224,267). S druge strane, pokusi izmjene liganada s CYS i citratnim AuNP ne pokazuju pomake signala CYS. Unatoč tome, zbog nestajanja signala citrata pretpostavljeno je istiskivanje citrata s nanopovršine od strane CYS, te stvaranje S–Au veze. Autori su pažnju usmjerili na praćenje signala citrata i nisu komentirali pojavu vrlo malih signala u spektru CYS, koji položajem i oblikom zapravo odgovaraju cistinu (268). Signali cistina prisutni su i u spektrima Csapó i sur. nakon interakcije CYS i AgNP u lužnatom mediju (253). Jedino studija Ma i sur. opisuje sintezu AuNP uz borhidrid i CYS te spominju mogućnost nastanka cistina i njegovog vezanja na površinu. Ipak, nisu provedena dodatna istraživanja potrebna za potvrdu te hipoteze (269).

Nadalje, u literaturi je primijećena i oksidacija CYS u cistin u kiselom mediju u prisutnosti kationa Au, no za razliku od ranijih slučajeva, oksidacija se ne zaustavlja na disulfidu nego napreduje do sulfonske kiseline. U NMR spektru to je vidljivo kao pomak svih signala u niže polje i razdvajanje signala protona 3, a rezultati su potvrđeni i masenom spektrometrijom. Isto je primijećeno u slučaju GSH (269,270).

Literaturni navodi vezanja GSH na NP metala pokazuju pomak svih signala u niže polje, razdvajanje signala protona na položaju 7 te pretvorbu signala u multiplete na položajima 3 i 4 kako je ranije opisano (254,255,271). Širenje signala vidljivo je i u ^{13}C spektru (265). Premda dosadašnja istraživanja pripisuju razdvajanje signala procesu vezanja biotiola na nanopovršinu, spektri oksidiranog GSH koji se mogu pronaći u literaturi također sadrže dva odvojena signala protona 7 (272).

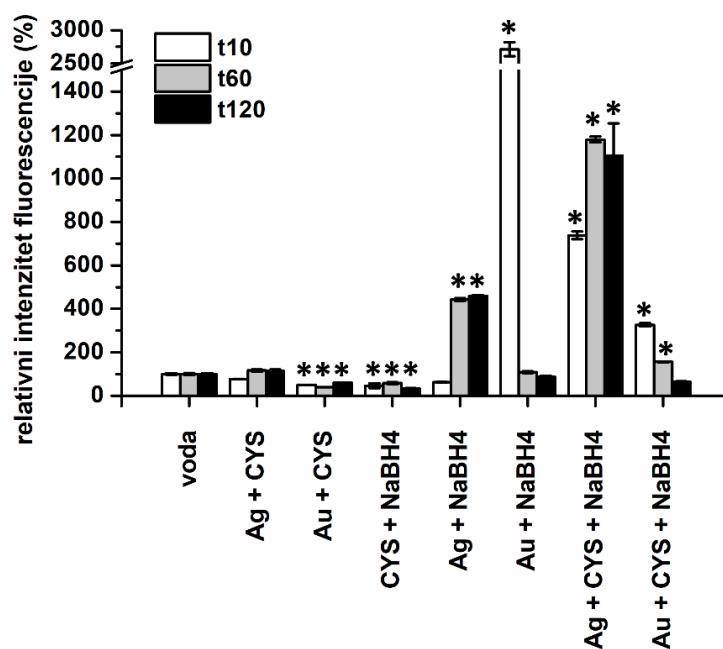
Glavna zapreka prepoznavanju oksidacije tiola kao procesa koji se odvija prilikom pripreme AgNP i AuNP je činjenica da se ta reakcija odvija u mediju s borhidridom, tj. u

reduktivnom okruženju. NaBH_4 je snažan reducens koji dokazano promovira redukciju disulfidne skupine u tiolne, a ne pogoduje obrnutoj reakciji (273). Ipak, s obzirom na složenost borhidridne kemije i sudjelovanje metala, mogućnost postojanja određenih oksidirajućih međuprodukata u reakcijskoj smjesi ne može se zanemariti. U daljnjim poglavljima predložen je reakcijski mehanizam oksidativne dimerizacije tiola u prisutnosti AgNP i AuNP.

4.6. Ispitivanje nastajanja reaktivnih kisikovih vrsta tijekom interakcije biotiola s procesom stvaranja nanočestica i s nanopovršinom

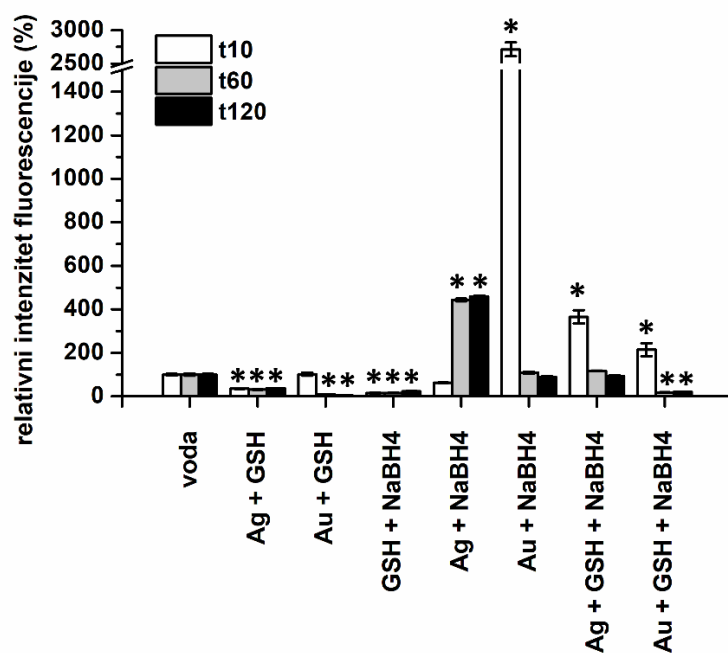
Nastajanje ROS-ova jedno je od mogućih objašnjenja oksidacije CYS i GSH. Posredovanje ROS-ova omogućilo bi oksidaciju tiolne skupine (-SH) do sulfenske kiseline (-SOH), koja je jedan od mogućih međukoraka dimerizacijske reakcije (vidi poglavlja niže) (274,275). U literaturi je već objavljeno da u reakcijskim smjesama prilikom pripreme NP metala mogu nastati superoksidni i peroksidni anioni (276). Nanomaterijali imaju veliku površinu, te su površinski atomi vezani nestabilnim vezama visoke energije, zbog čega su izrazito reaktivni (171). Također, NP metala imaju slobodne elektrone u vodljivoj vrpici koji mogu stupati u interakciju s elektromagnetskim zračenjem, što može dovesti do ROS aktivnosti (277). Uz to, NP mogu sudjelovati u redoks reakcijama ili ih katalizirati zbog svoje sposobnosti pohrane i prijenosa elektrona na druge specije (276,278).

Do sada nije bilo naznake mogu li kisikovi radikali nastati u reduktivnoj atmosferi otopina NaBH_4 . Stvaranje ROS-ova ispitano je tijekom inkubacije CYS i GSH u medijima relevantnim za nastajanje NP kako je opisano u poglavlju 3.5. DCFH₂ test pokazao je statistički značajno nastajanje ROS-ova za vrijeme interakcije CYS i NP (Slika 28). Razina ROS-ova povećala se > 1000% u reakcijskoj smjesi CYS-AgNP u usporedbi s otopinom CYS u vodi, dok je u reakcijskoj smjesi CYS-AuNP povećanje bilo > 300%. Reakcijska smjesa koja sadrži Ag stvara značajnu razinu ROS-ova kontinuirano za vrijeme provođenja eksperimenta, dok u smjesi s Au njihova razina polako opada s vremenom. Istovremeno, dodatak CYS u otopinu iona metala ili NaBH_4 nije doveo do zamjetne pojave ROS-ova. Naprotiv, u tim medijima statistički je značajno smanjenje razine ROS-ova, vjerojatno zbog antioksidativne uloge CYS, pa se oksidacija CYS u prisutnosti NaBH_4 ne može objasniti posredovanjem ROS-ova, ali moguće je da do nje dolazi zbog složene kemije NaBH_4 u vodi (279–281).



Slika 28. Relativni intenzitet fluorescencije DCF u ispitanim medijima korištenim za određivanje nastanka ROS-ova na sučelju između CYS i NP metala. Mjerenja su provedena nakon 10, 60 i 120 min od miješanja reaktanata. Podatci su izraženi kao % intenziteta fluorescencije u odnosu na ultračistu vodu.

U medijima s GSH očekivano je prisutno puno manje ROS-ova zbog poznatog antioksidativnog učinka GSH. Ipak, u reakcijskim smjesama metala, NaBH_4 i GSH vidljiv je statistički značajan porast intenziteta fluorescencije (>300%) nakon 10 min, što ipak upućuje na oksidativnu aktivnost medija (Slika 29). Razina fluorescencije opada s vremenom, te doseže razinu slijepe probe nakon 60 min ukazujući na brzo antioksidativno djelovanje GSH. U smjesi GSH sa samim metalima ili BH_4^- zamijećeno je značajno smanjenje ROS-ova koje se može pripisati antioksidativnom učinku. Također, primijećen je značajan signal u smjesama metala i BH_4^- , koji je vjerojatno posljedica interferencija, tj. direktne interakcije iona metala i DCFH_2 , budući da su Ag^+ i Au^{3+} oksidansi (81).



Slika 29. Relativni intenzitet fluorescencije DCF u ispitanim medijima korištenim za određivanje nastanka ROS-ova na sučelju između GSH i NP metala. Mjerenja su provedena nakon 10, 60 i 120 min od miješanja reaktanata. Podatci su izraženi kao % intenziteta fluorescencije u odnosu na ultračistu vodu.

Konačno, nastanak ROS-ova primijećen je u svim medijima gdje su nastali AgNP i AuNP, što podupire hipotezu da su oksidacijski procesi započeti na sučelju s NP metala odgovorni za brzu oksidaciju tiola u disulfid. Katalitička uloga NaBH_4 i NP metala u oksidaciji tiola povezana je s nastankom ROS-ova, no ne može se u potpunosti objasniti time. ROS-ovi su nužni za pretvorbu tiolne skupine u sulfensku kiselinu, ali učinci složene kemije hidrida su također prisutni u smjesama koje sadrže NaBH_4 . Ipak, treba istaknuti da interakcija samog CYS i AgNO_3 može rezultirati stvaranjem AgNP, kao što je od ranije poznato iz literature (282), iako je taj proces spor. Ni NaBH_4 ni AgNO_3 sami nisu u stanju uzrokovati brzu dimerizaciju S–S, ali u kombinaciji su učinkovitiji za katalizu dimerizacije.

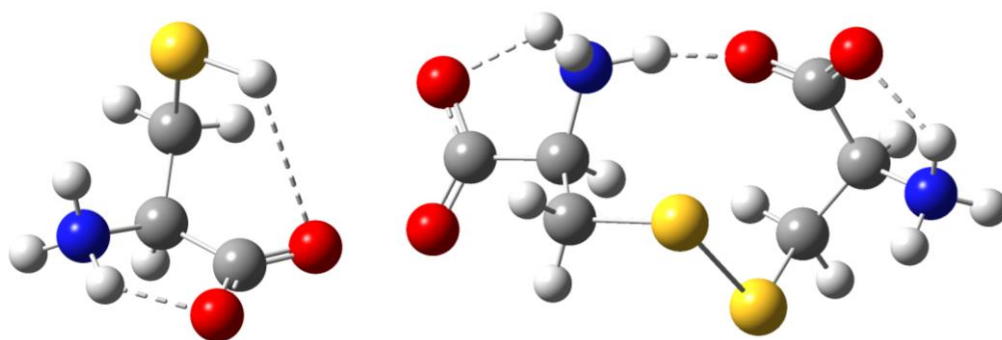
4.7. Računalna studija interakcije biotiola i nanočestica

Računalna istraživanja interakcije biotiola i NP u ovoj disertaciji usmjerena su prema dvama specifičnim ciljevima. Prvi cilj je ispitati i teorijski razjasniti mehanizam oksidacije CYS

u cistin za vrijeme stvaranja NP metala. Drugi cilj je istražiti vezanje biotiola za metale i formiranje adsorbata na nanopovršinama. U svrhu postizanja tih ciljeva kombinirane su tehnike kvantne kemije (DFT) i molekulske dinamike.

4.7.1. Identifikacija stabilnih kompleksa biotiola i metala primjenom DFT metode

Konformacijska analiza liganada te identifikacija stabilnih kompleksa ligand-metal provedena je DFT metodom. Analiza je provedena samo sa strukturama CYS i cistina, jer su GSH i GSSG znatno veće i fleksibilnije molekule, zbog čega su izračuni mnogo zahtjevniji. Također, u okviru kvantne kemije nije moguće simulirati NP koje se sastoje od više stotina ili tisuća atoma, nego je istraživanje ograničeno na klustere od 2 do 13 atoma.

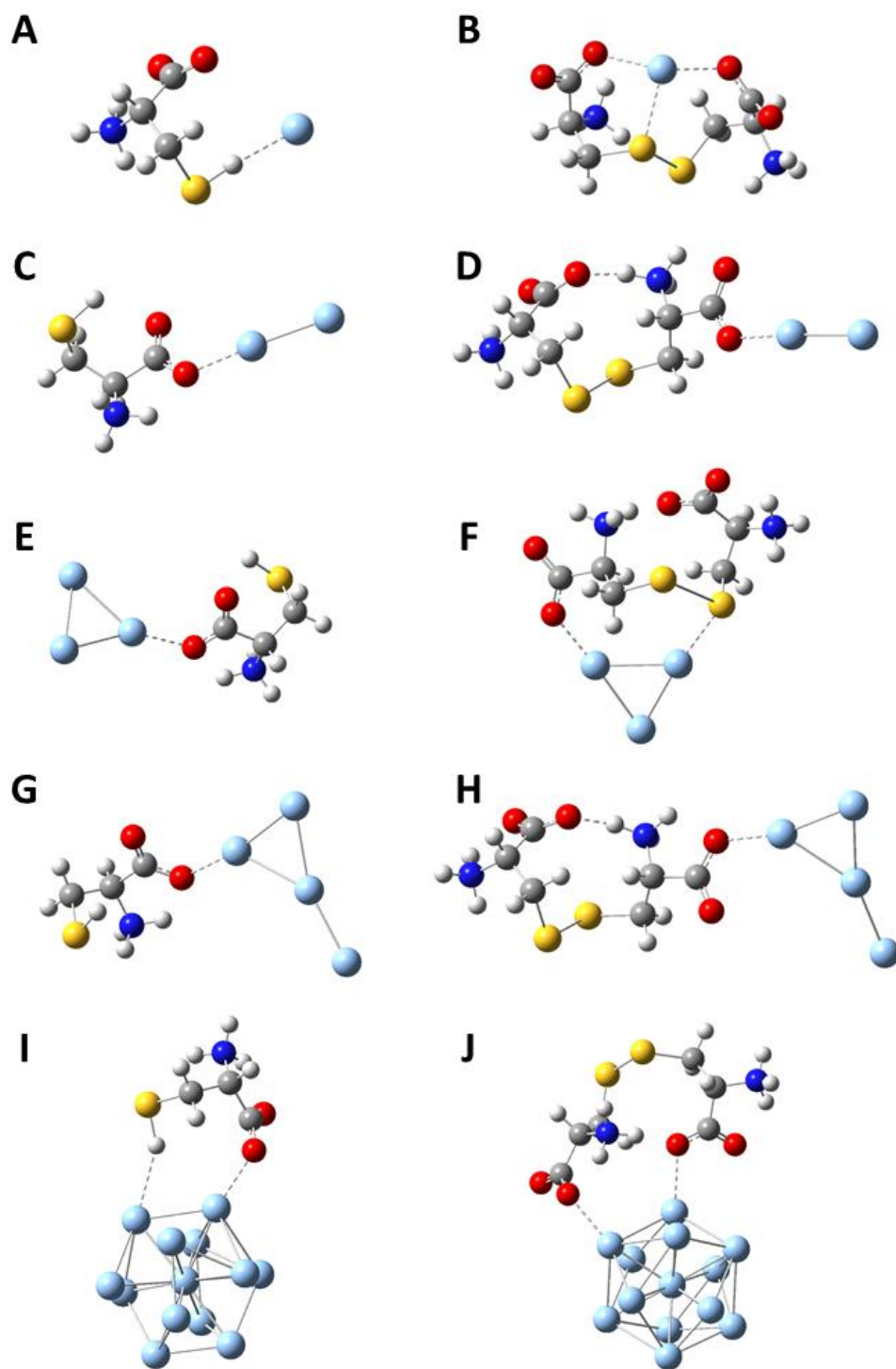


Slika 30. Najstabilniji konformeri (na teorijskoj razini B3LYP/LANL2DZ) CYS (lijevo) i cistina (desno).

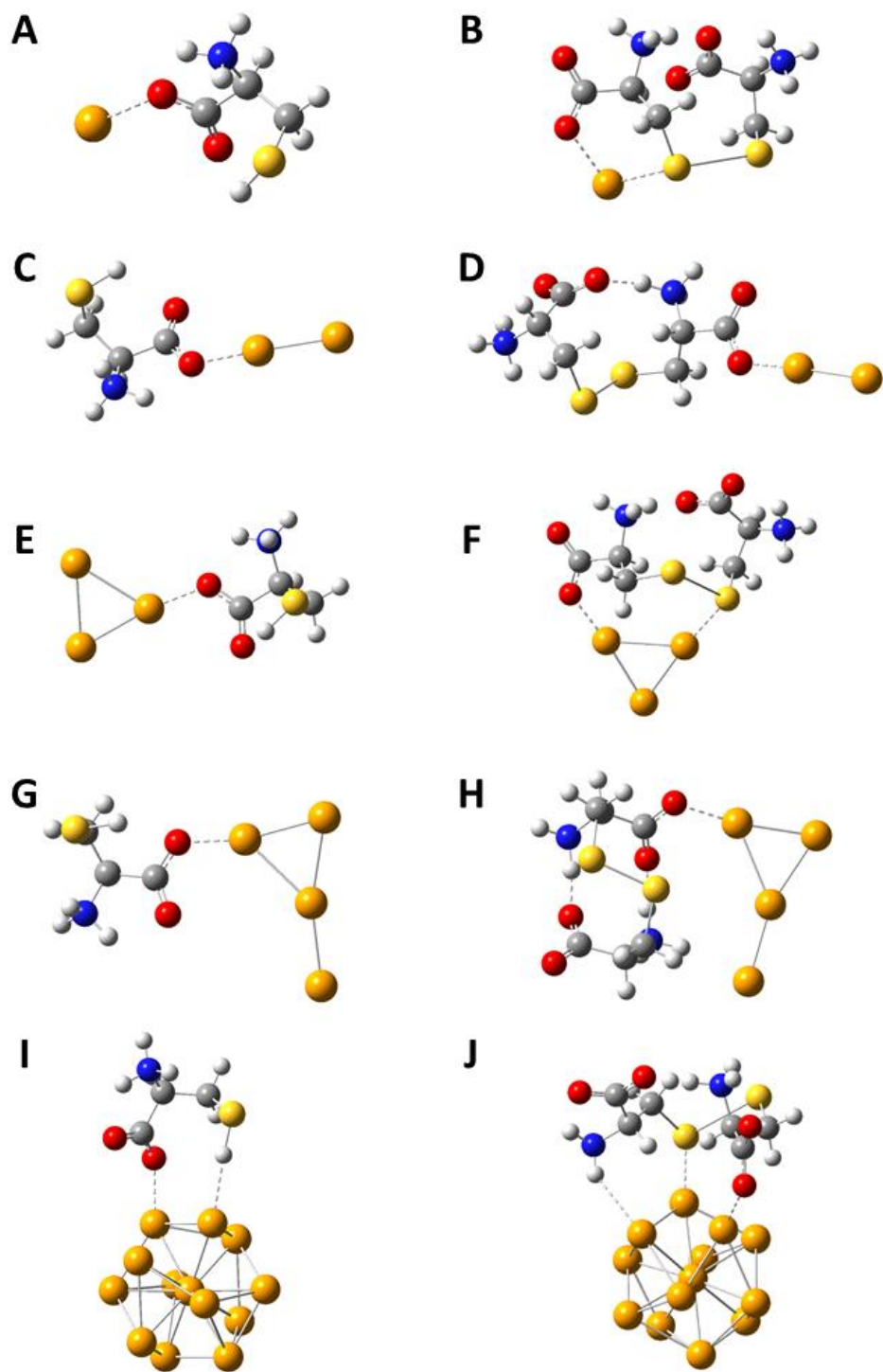
Konformacijskom analizom CYS i cistina, provedenom na teorijskoj razini B3LYP/LANL2DZ, locirane su najstabilnije strukture (globalni minimumi), koji su prikazani na slici 30, te lokalni minimumi s energijom unutar 20 kJ/mol od navedenih (nisu prikazani). Konformeri obiju molekula modelirani su u zwitterionskom obliku i optimizirani bez ograničenja, jer je prisustvo implicitnog otapala bilo dovoljno da spriječi spontani prijenos protona i neutralizaciju amino i karboksilnih skupina. U oba slučaja, najstabilniji konformeri sadrže intramolekulske vodikove veze između susjednih karboksilnih i amino skupina, a cistin stvara i dodatnu vodikovu vezu između amino-vodika i karboksilnog kisika skupina koje nisu susjedne. U molekuli CYS, proton SH skupine usmjeren je prema karboksilnom kisiku. Najstabilnije strukture CYS i cistina korištene su u računima optimizacije kompleksa s atomima i klasterima Ag_n i Au_n ($n = 1, 2, 3, 4, 13$). Nakon optimizacije na teorijskoj razini

B3LYP/LANL2DZ, locirani su globalni minimumi za svaki kompleks (Slike 31 i 32). U skladu s većom nukleofilnošću anionskog karboksilata, većini slučajeva najstabilniji kompleksi uključivali su interakciju metala s karboksilnom skupinom liganda, a ne tiolnom skupinom, posebice kod manjih klastera. Jedina iznimka bio je kompleks CYS-Ag, u kojem je interakcija uspostavljena preko tiola stvaranjem nekonvencionalne vodikove veze. U slučajevima cistin-Ag, cistin-Ag₃, CYS-Ag₁₃, cistin-Au, cistin-Au₃ i CYS-Au₁₃, interakcija je ostvarena posredovanjem i karboksilnog kisika i sumpora, dok su u slučaju cistin-Au₁₃ sve funkcionalne skupine sudjelovale u stabilizacijskim interakcijama.

Vežanje CYS za metal preko karboksilne skupine odgovara nekim literaturnim navodima (283–285), no s obzirom na proturječne rezultate autori nisu suglasni oko funkcionalnih skupina odgovornih za interakciju CYS–metal. Vežanje putem triju funkcionalnih skupina prikazano je u literaturi. Zhang i sur. optimizirali su planarne klastere Au_n (n = 1, 3, 5, 7) i Au_n (n = 2, 4, 6) s CYS u obliku tiola i tiolata. Kod većih klastera opisali su interakciju tiolnog dijela CYS s dva atoma Au, dok kod manjih klastera Au_n (n = 2, 4, 6) prevladava interakcija s jednim atomom Au. Tiolat formira kovalentnu vezu S – Au, dok tiol sudjeluje u donorsko-akceptorskim elektrostatskim interakcijama (286). Xie i sur. uočili su vežanje CYS za Au₃ i Au₄ preko svih triju funkcionalnih skupina, no najpovoljnije je vežanje preko amino skupine, a najmanje povoljno preko karboksilnog kisika (287). Pakiari i sur. također su ustanovili da se CYS veže s Au₃ preko svih funkcionalnih skupina (288), a jednako su zaključili i Srivastava i sur. za veće klastere Au_n (n = 8, 10, 12). Također su primijetili i nastajanje nekonvencionalnih vodikovih veza N-H...Au i O-H...Au (289). Nazmutdinov i sur. pokazali da CYS veže planarni klaster Au₁₂ preko tiolne i karboksilne skupine (283). Ganji i sur. i Pelayo i sur. locirali su klastere CYS i Au₃₂ vezane preko sumpora (290,291), jednako kao i Perez i sur. na Au₅₅ klasteru (292). Carr i sur. utvrdili su da više molekula CYS stupa u interakciju s Au₅₅ formirajući dvosloj, u kojem je unutarnji sloj vezan na površinu kovalentno preko tiolne skupine, dok je vanjski sloj vezan vodikovim vezama za molekule CYS unutarnjeg sloja posredovanjem karboksilnih i amino skupina (200). Konačno, radovi Tlahuice-Flores i sur. (293) te Santosa i sur. (294) prikazuju vežanje CYS na klaster Au₂₀ i na nanopovršinu Ag(111), no oni razmatraju samo interakcije putem atoma sumpora. Istraživanje interakcije CYS i Ag proveli su Buglak i sur. koji prikazuju bidentatne komplekse CYS i Ag⁺ preko tiolne i karboksilne skupine, komplekse neutralnog CYS i Ag₂ preko amino skupine, te aniona CYS i Ag₂ preko tiolne skupine (284). Chang i sur. locirali su CYS adsorbiran na ikozaedarski Ag₅₅ u kojem je tiolna skupina u kontaktu s površinom (295), a Diaz Fleming i sur. predložili su da je karboksilna skupina najvažnija za vežanje CYS i Ag (285).



Slika 31. Najstabilniji konformeri (na teorijskoj razini B3LYP/LANL2DZ) kompleksa: a) CYS i Ag, b) cistina i Ag, c) CYS i Ag₂, d) cistina i Ag₂, e) CYS i Ag₃, f) cistina i Ag₃, g) CYS i Ag₄, h) cistina i Ag₄, i) CYS i Ag₁₃, j) cistina i Ag₁₃.



Slika 32. Najstabilniji konformeri (na teorijskoj razini B3LYP/LANL2DZ) kompleksa: a) CYS i Au, b) cistina i Au, c) CYS i Au₂, d) cistina i Au₂, e) CYS i Au₃, f) cistina i Au₃, g) CYS i Au₄, h) cistina i Au₄, i) CYS i Au₁₃, j) cistina i Au₁₃.

Sve su navedene studije provedene različitim metodologijama (različite teorijske razine, solvatacija, oblici CYS, veličine i oblici klastera te početne postavke struktura), stoga nije neobično očekivati razlike u rezultatima. Trenutno je najvjerojatnija hipoteza da je vezanje CYS za klastere metala i NP moguće preko svih triju funkcionalnih skupina, a koja će veza biti prisutna u najstabilnijem kompleksu ovisi o protonaciji svake grupe te površinskom naboju metala (124,127,282). U ovoj disertaciji, uz najstabilniju strukturu, računalno su identificirani i drugi stabilni kompleksi u kojima je interakcija nastala preko tiola ili amina. U većini slučajeva razlike slobodnih energija globalnog minimuma i tih drugih struktura bile su dovoljno male da se može pretpostaviti da su sve orijentacije i vrste vezanja moguće pri sobnoj temperaturi. Vjerojatno je da se interakcija CYS i cistina s NP metala odvija preko više funkcionalnih skupina odjednom, no to nije moguće vidjeti kod malih klastera. Stoga je provedena i molekulsko-dinamička studija adsorpcije biotiola na nanopovršine od nekoliko stotina atoma (vidi poglavlje 4.7.4.).

Također, tijekom optimizacije kompleksa dolazi do izmjena početne strukture CYS i cistina u određenim slučajevima. Zbog interakcije tiolne skupine CYS s klasterima metala dolazi do deprotonacije, odnosno prijenosa protona na karboksilatnu skupinu, pri čemu tiolatna skupina stvara vezu s metalom. Isto su primijetili Pakiari i sur. (288). U nekim slučajevima dolazi do pucanja disulfidne veze cistina u blizini klastera metala. Primjeri takvih struktura prikazani su na slici D8 u prilogu (poglavlje 7). Kompleksi u kojima je tijekom geometrijske optimizacije došlo do značajne promjene u strukturi liganada nisu uključeni u daljnja istraživanja.

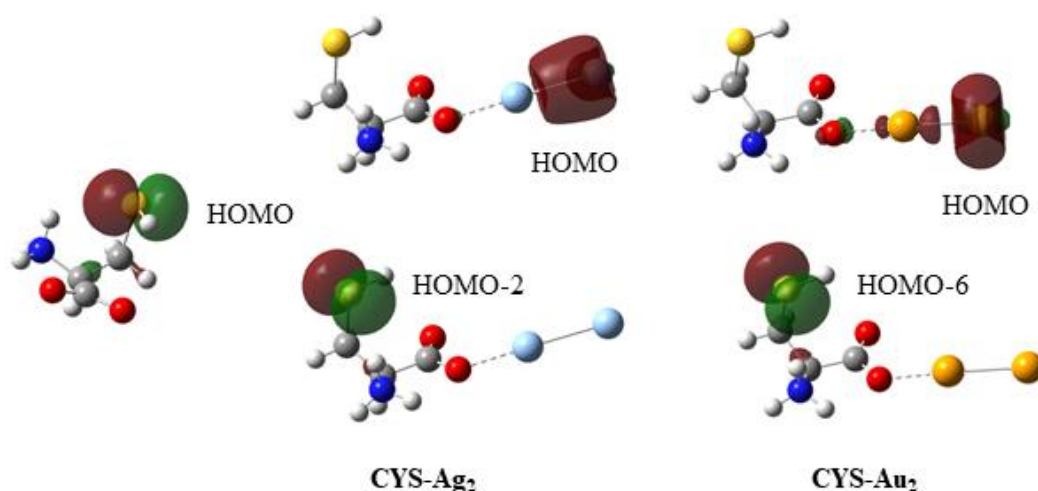
Analiza DFT računa provedena je odabirom kompleksa čije su slobodne energije bile unutar 20 kJ/mol od globalnog minimuma, te su samo ti kompleksi razmatrani u nastavku istraživanja. Također, računi nisu provedeni na kompleksima s neparnim brojem atoma metala, zbog dodatne složenosti simuliranja struktura s multiplicitetom većim od 1 (neparan broj elektrona). Zbog povećanja jednostavnosti i pouzdanosti računalne studije, istraživanje mehanizma, NMR kemijskih pomaka i NBO analize provedene su samo na dimerima i tetramerima metala.

4.7.2. Istraživanje reakcijskog mehanizma interakcije cisteina s nanočesticama primjenom računalnih metoda

Drugi korak računalne studije bio je istraživanje mehanizma oksidacije CYS u cistin u uvjetima stvarana nanočestica. Pretpostavljeno je da postoje dvije mogućnosti: radikalski i

ionski mehanizam, koje su potom istražene računski. Radikalni mehanizam uključuje nastajanje tiilnog radikala (RS•), nakon čega dvije radikalne skupine stvaraju disulfidnu vezu. S druge strane, ionski mehanizam pretpostavlja međukorak oksidacije tiolne skupine CYS u sulfensku kiselinu, te stvaranje disulfidne veze uz eliminaciju vode. Prema literaturnim navodima, u odsutnosti metalnog katalizatora, preferiran je ionski mehanizam (296–299).

Mogućnost odvijanja radikalne reakcije ovisi o brzini stvaranja i stabilnosti tiilnog radikala, što se može procijeniti kombinacijom računskog pristupa i eksperimentalnih podataka. Mogućnost otpuštanja elektrona i stvaranja radikala neke specije opisuje se oksidacijskim potencijalom E° . Iznos E° nije poznat za tiolne u kompleksima s metalima, međutim eksperimentalne vrijednosti oksidacijskih potencijala CYS i drugih biološki relevantnih tiola dostupne su u literaturi (Tablica 9). Vrijednost E° može se procijeniti računski jer su eksperimentalno dobiveni oksidacijski potencijali proporcionalni energijama najviše popunjene molekulske orbitale (engl. *highest occupied molecular orbital*, HOMO) (300–303). Vrijednosti energije HOMO (E_{HOMO}) mogu se izračunati DFT simulacijama provođenjem populacijske analize. Populacijska analiza provedena je za određene male tiolne koji su bliski CYS i za koje su dostupni eksperimentalni podatci E° . U svakoj od tih molekula, HOMO je orbitala p -tipa lokalizirana na atomu sumpora (Slika 33). E_{HOMO} vrijednosti korelirane su s literaturnim vrijednostima oksidacijskog potencijala (E°_{eksp}) i utvrđena je linearna povezanost (Slika 34) s Pearsonovim koeficijentom korelacije $r = -0,9972$ (p -vrijednost $< 0,005$). Na temelju dobivenog pravca regresije, izračunata je vrijednost E°_{eksp} za komplekse tiola s klasterima metala (Tablica 9).

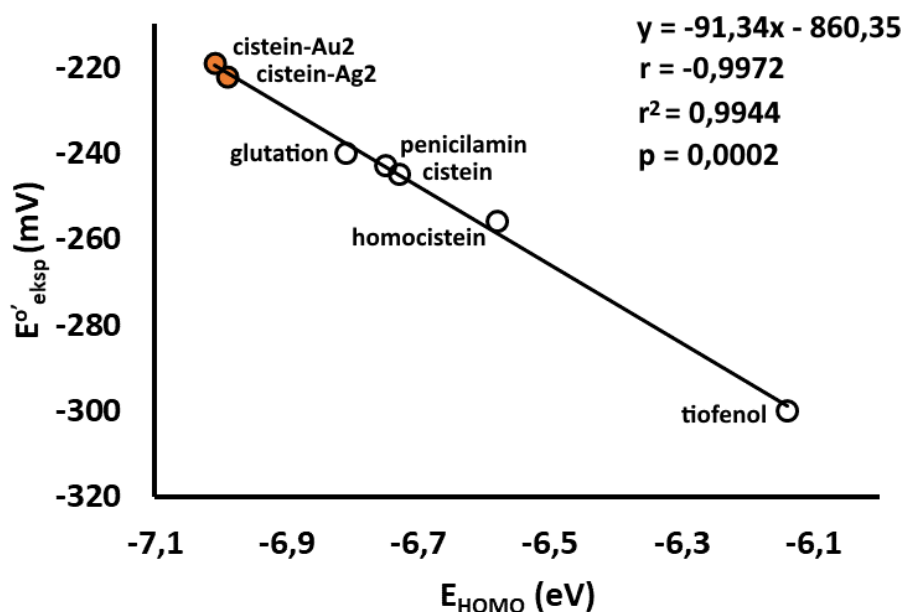


Slika 33. Orbitale 3p-tipa (ne nužno HOMO) lokalizirane na atomu sumpora u CYS (lijevo) i kompleksi CYS s Ag₂ i Au₂ (dolje). HOMO orbitale kompleksa CYS-Ag₂ i CYS-Au₂ (gore) lokalizirane su na metalu.

Tablica 9. Energije izračunate na teorijskoj razini B3LYP/LANL2DZ i eksperimentalno dobiveni oksidacijski potencijali za odabrane tirole i komplekse s dimerima metala.

| Tioli | E_{HOMO}^a (Hartree) | E_{HOMO} (eV) | E°_{eksp} (mV) |
|----------------------|-------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| tiofenol | -0,22766 | -6,14 | -300 |
| homocistein | -0,24376 | -6,58 | -256 |
| CYS | -0,24956 | -6,73 | -245 |
| penicilamin | -0,25024 | -6,75 | -243 |
| GSH | -0,25245 | -6,81 | -240 |
| CYS -Ag ₄ | -0,25864 | -6,98 | -222 |
| CYS -Ag ₂ | -0,25894 ^b | -6,99 | -222 ^d |
| CYS -Au ₂ | -0,25994 ^c | -7,01 | -219 ^d |
| CYS -Au ₄ | -0,26086 | -7,01 | -219 |

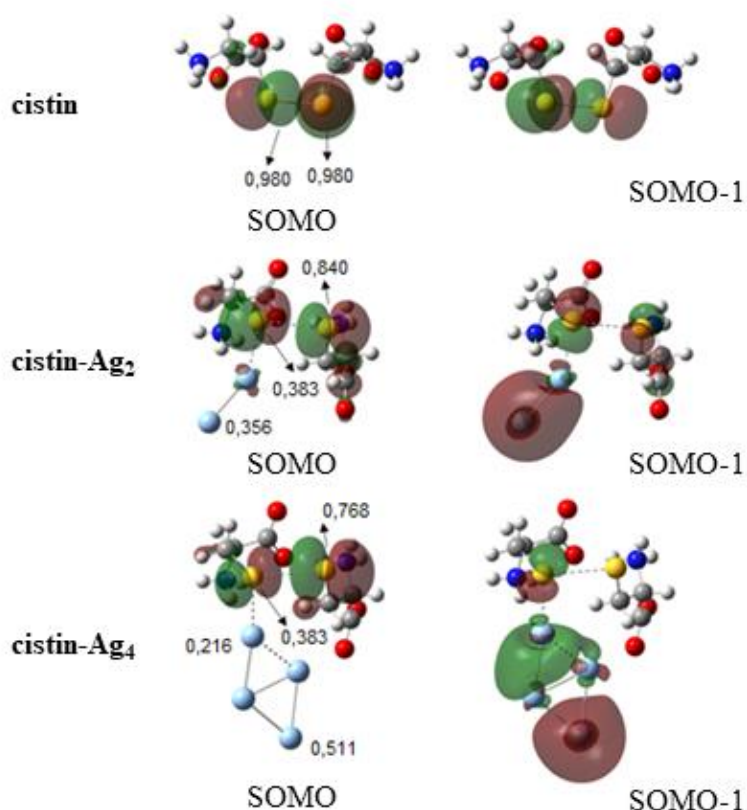
^a orbitala 3p-tipa lokalizirana na S atomu ^b HOMO-2 stanje. ^c HOMO-6 stanje. ^d procijenjena vrijednost.



Slika 34. Povezanost izračunate energije E_{HOMO} (teorijska razina B3LYP/LANL2DZ) i eksperimentalno dobivenog oksidacijskog potencijala (E°_{eksp}) iz literature. Narančastom bojom označen je procijenjeni E° CYS u kompleksu s Ag₂ i Au₂.

E_{HOMO} odgovarajućeg HOMO-2 stanja za izračunate modele kompleksa CYS-Ag₂ i CYS-Au₂ bila je niža od svih drugih ispitanih tiola, što upućuje na ograničenu ionizaciju, tj. otežano izdvajanje elektrona iz orbitale na atomu sumpora. Kompleksacija CYS s Ag₄ ili Au₄ ne dovodi do daljnjeg smanjenja energijske vrijednosti 3p-orbitale. Dakle, stvaranje tiilnog radikala u neutralnom (zwitterionskom) CYS inhibirano je kompleksacijom na Ag₂/Ag₄ ili Au₂/Au₄. Ipak, u eksperimentalnim uvjetima moguće je da CYS postoji u anionskom obliku, koji bi trebao lakše otpustiti elektron od zwitteriona.

Kako bi se procijenila mogućnost nastajanja cistina radikalskim mehanizmom, provedena je usporedba stabilnosti singletnog i tripletnog (diradikaliski sustav) stanja cistina. Cistin u tripletnom stanju ima po jedan elektron disulfidne veze lokaliziran na svakom S atomu. Tripletno stanje cistina odgovara prijelaznom stanju reakcije dvaju radikala CYS, stoga energetska razlika singletnog i tripletnog stanja cistina potencijalno opisuje lakoću stvaranja disulfidne veze radikalskim mehanizmom. Energetska razlika tih dvaju stanja cistina u prisutnosti klastera metala prikazana je u tablici 10.



Slika 35. SOMO za tripletno osnovno stanje cistina (diradikaliski oblik) i njegovih kompleksa s dimerima i tetramerima Ag. Distribucije spina izračunate su na teorijskoj razini UB3LYP/LANL2DZ.

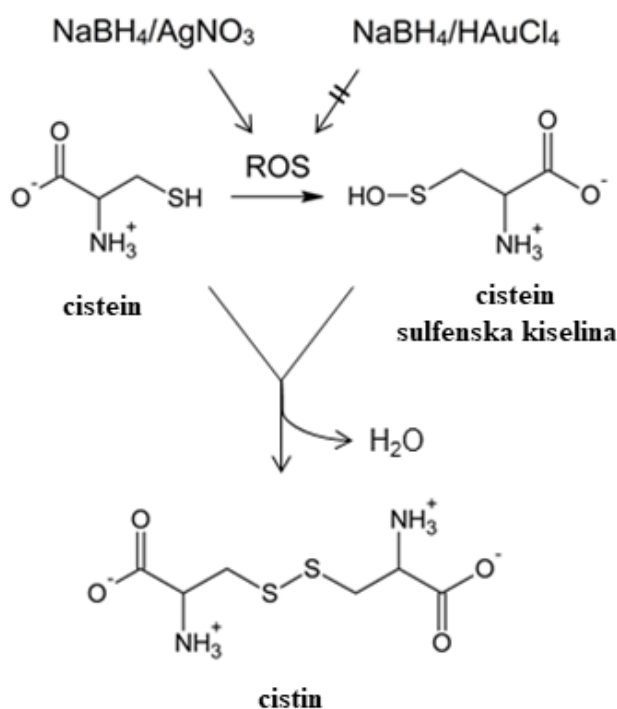
Singletno stanje cistina, u odsutnosti klastera Ag ili Au, energetski je stabilnije (+103,8 kJ/mol, na razini (U)PBE/LANL2DZ//SMD-UB3LYP/LANL2DZ) od odgovarajućeg tripletnog stanja. U kompleksima s metalima tripletno osnovno stanje CYS postaje stabilnije. Dvije polupopunjene molekulske orbitale (engl. *singly occupied molecular orbital*, SOMO; i SOMO-1) su 3*p*-tipa i nalikuju HOMO u cistinu i singletu CYS (Slika 35). U kompleksima s klasterima metala, dio elektronske gustoće nalazi se u *d*-orbitalama metala. Budući da rezultati pokazuju da mali klasteri Ag ili Au mogu snižavati energetsku barijeru radikalnih reakcija, nije moguće isključiti radikalni mehanizam reakcija oksidacije.

Tablica 10. Entalpije, Gibbsove energije i razlike energija izračunate za singletna i tripletna stanja na različitim teorijskim razinama.^a

| Sustav | SMD-(U)B3LYP/LANL2DZ | | (U)PBE//(U)B3LYP | (U)PBE//(U)B3LYP + H _{kor} |
|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------|------------------------|----------------------------------------|
| | H ₂₉₈ | H _{kor} ^b | E + ΔG _{solv} | ΔH ₂₉₈ |
| cistin (singlet) | -666,240499 | 0,221584 | -665,774025 | 0,0 |
| cistin (triplet) | -666,197360 | 0,220479 | -665,733384 | +103,8 |
| cistin-Ag ₂ (singlet) | -957,843423 | 0,226377 | -957,310428 | 0,0 |
| cistin-Ag ₂ (triplet) | -957,833730 | 0,225094 | -957,297877 | +29,6 |
| cistin-Ag ₄ (singlet) | -1249,438030 | 0,231940 | -1248,839645 | 0,0 |
| cistin-Ag ₄ (triplet) | -1249,464708 | 0,230966 | -1248,873956 | -92,6 |
| cistin-Au ₂ (singlet) | -937,228467 | 0,226401 | -936,753693 | 0,0 |
| cistin-Au ₂ (triplet) | -937,195597 | 0,225171 | -936,717555 | +91,7 |
| cistin-Au ₄ (singlet) | -1208,213542 | 0,232231 | -1207,732427 | 0,0 |
| cistin-Au ₄ (triplet) | -1208,217106 | 0,229910 | -1207,739672 | -25,1 |

^a (U)PBE//UB3LYP odgovara (U)PBE-D3/LANL2DZ//SMD-(U)B3LYP/LANL2DZ + ΔG_{solv} ((U)PBE-D3, SCRF = (SMD, solvent = water)). ^b H_{kor}: termalna korekcija entalpije.

Drugi mogući mehanizam stvaranja disulfidne veze, tzv. ionski mehanizam, odvija se reakcijom između CYS i njegovog oksidiranog derivata CYS-sulfenske kiseline (Slika 36). Oba reaktanta mogu postojati u zwitterionskom obliku. Oksidacija tiolne skupine u sulfensku kiselinu moguća je u prisutnosti ROS-ova, koji su eksperimentalno dokazani u reakcijskom sustavu. Potom slijedi reakcija tiola i sulfenske kiseline, u kojoj se uz oslobađanje vode stvara disulfidna veza.



Slika 36. Predloženi mehanizam stvaranja cistina u reakciji CYS i CYS-sulfenske kiseline, uz posredovanje ROS-ova i prisutnost metala i borhidrida.

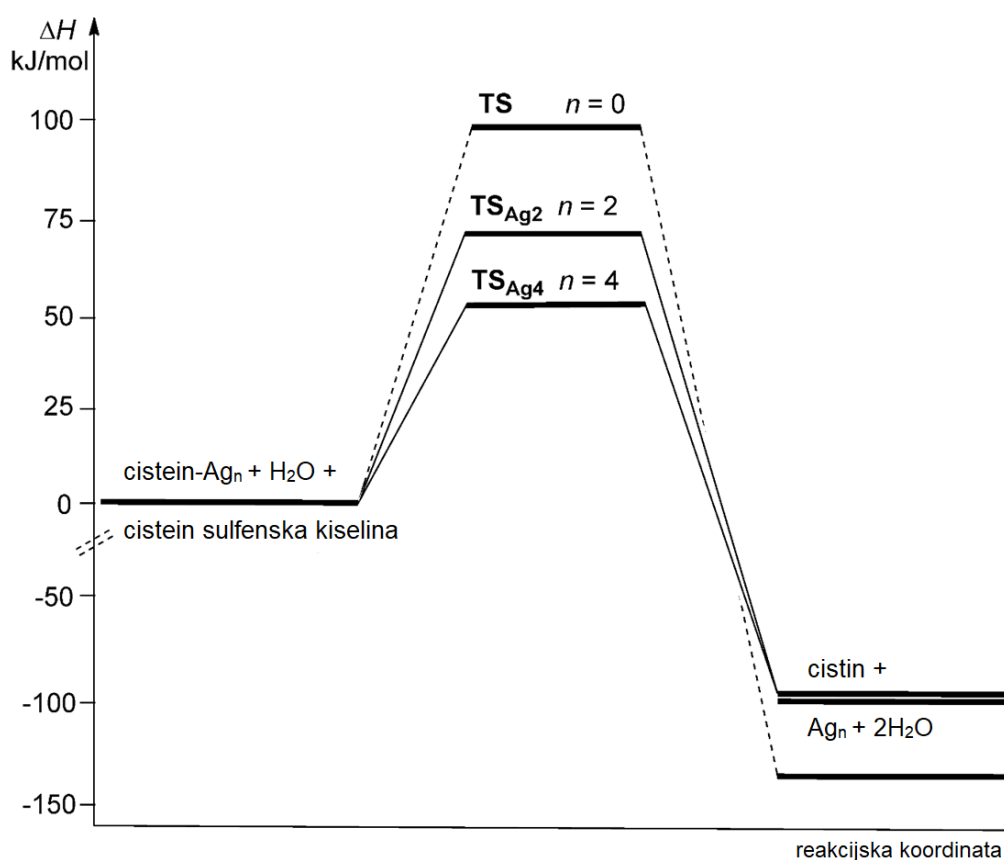
Računalno opisivanje ionskog mehanizma zahtjeva lociranje prijelaznog stanja TS, te računanje slobodnih energija reaktanata, TS i produkata kako bi se dobio energijski dijagram. Klasteri metala, dimeri i tetrameri, smješteni su u blizini reaktanata u različitim orijentacijama kako bi se pronašla najstabilnija struktura. U slučaju tetramera, ispitana su dva oblika klastera: romboidni i Y oblik. Romboidni oblik u literaturi se navodi kao stabilniji, no razlike energija su vrlo male (304). Za opis prijelaznog stanja bila je potrebna dodatna molekula vode (eksplicitno definirana).

Tablica 11. Izračunate energije za reaktante, prijelazna stanja i produkte u reakciji S-S dimerizacije CYS u vodi.^a

| Stacionarne točke | | B3LYP/LANLD2Z | | | B1B95/LANLD2Z | | TPSS/LANLD2Z + GD3 ^b | |
|--------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Ag _n | | H ₂₉₈ (Hartree) | H _{kor} ^c (Hartree) | ΔH ₂₉₈ (kJ/mol) | E ^d (Hartree) | ΔH ₂₉₈ (kJ/mol) | E ^d (Hartree) | ΔH ₂₉₈ (kJ/mol) |
| n = 0 | CYS-H ₂ O | -410,12982 | 0,14498 | | -409,99845 | | -410,26773 | |
| | CYS sulf. kis. | -408,90993 | 0,12508 | 0 | -408,77516 | 0 | -409,04276 | 0 |
| | TS | -819,01200 | 0,26942 | +72,8 | -818,71336 | +156,5 | -819,27175 | +100,6 |
| | cistin-2H ₂ O | -819,05691 | 0,27385 | -44,5 | -818,82441 | | -819,36749 | -139,7 |
| n = 2 | CYS-Ag ₂ | -625,30295 | 0,12433 | | -625,07072 | | -625,21462 | |
| | CYS sulf. kis. | -408,90993 | 0,12508 | 0 | -408,77516 | 0 | -409,04276 | 0 |
| | H ₂ O | -76,40820 | 0,02452 | | -76,38232 | | -76,41767 | |
| | TS Ag ₂ | -1110,59047 | 0,27356 | +70,4 | -1110,1706 | +140,3 | -1110,64709 | +72,4 |
| | cistin-2H ₂ O | -819,05691 | 0,27385 | -36,3 | -818,82441 | -88,5 | -819,36749 | -102,7 |
| | Ag ₂ | -291,57799 | 0,00431 | | -291,44174 | | -291,35090 | |
| n = 4 | CYS-Ag ₄ | -916,89276 | 0,13016 | | -916,55106 | | -916,60982 | |
| | CYS sulf. kis. | -408,90993 | 0,12508 | 0 | -408,77516 | 0 | -409,04276 | 0 |
| | H ₂ O | -76,40820 | 0,02452 | | -76,38232 | | -76,41767 | |
| | TS Ag ₄ | -1402,20488 | 0,27453 | +15,8 | -1401,65268 | +123,0 | -1402,04459 | +53,7 |
| | cistin-2H ₂ O | -819,05691 | 0,27385 | -60,3 | -818,82441 | -92,4 | -819,36749 | -96,7 |
| | Ag ₄ | -583,17697 | 0,00957 | | -582,91931 | | -582,74324 | |
| Au _n n = 2 | CYS-Au ₂ | -604,68124 | 0,12462 | | -604,43289 | | -604,64817 | |
| | CYS sulf. kis. | -408,90993 | 0,12508 | 0 | -408,77516 | 0 | -409,04276 | 0 |
| | H ₂ O | -76,40820 | 0,02452 | | -76,38232 | | -76,41767 | |
| | TS Au ₂ | -1089,98710 | 0,27647 | +32,2 | -1089,55030 | +101,1 | -1090,10196 | +18,2 |
| | cistin-2H ₂ O | -819,05691 | 0,27385 | -36,3 | -818,82441 | -49,9 | -819,36749 | -54,1 |
| | Au ₂ | -270,95630 | 0,00430 | | -270,7889 | | -270,76564 | |

^a Solvacijske energije (ΔG_{solv}) izračunate SMD modelom (solvent=water) ^b D3 verzija Grimmeove disperzije s originalnom D3 funkcijom. ^c Termalna korekcija entalpije ^d Energije izračunate na SMD-B3LYP/LANLD2Z geometrijama.

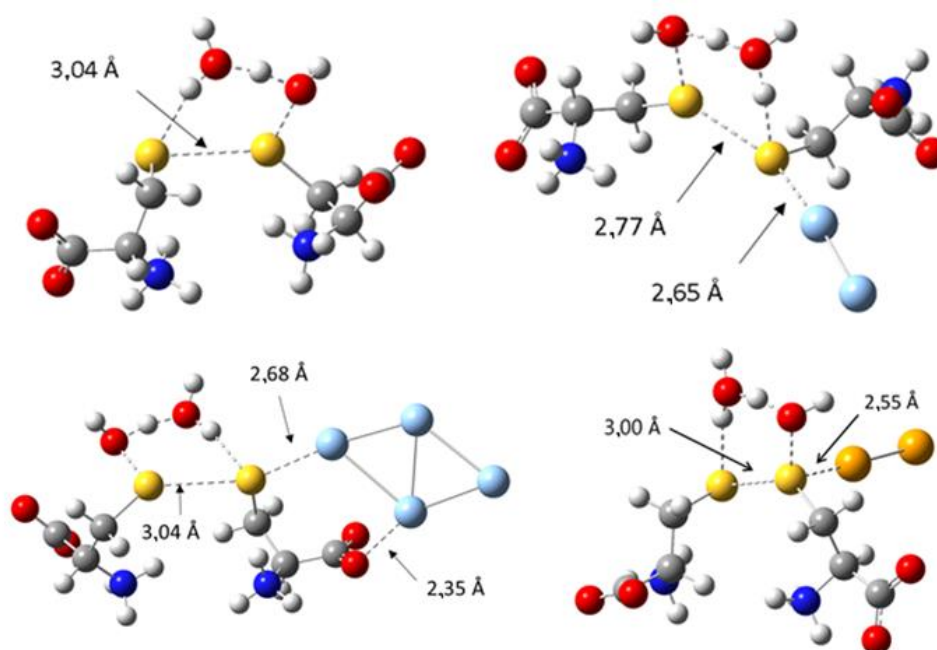
U reakciji CYS i CYS-sulfenske kiseline, uočen je katalitički učinak klastera Ag (Slika 37). Prijelazno stanje TS ($n = 0$) za reakciju dimerizacije bez prisutnosti metala karakterizirano je imaginarnom frekvencijom koja odgovara stvaranju S–S uz sudjelovanje molekule, a udaljenost dvaju S atoma je 3,04 Å (Slika 38). Izračunata energijska barijera (ΔH^\ddagger) za dimerizaciju vrlo je visoka (100,6 kJ/mol, Tablica 11), što ukazuje na otežano odvijanje takve reakcije pri sobnoj temperaturi. Takav rezultat u skladu je s eksperimentalnom potvrdom kinetičke stabilnosti CYS u neutralnoj vodenoj otopini (vidi poglavlje 4.5.1.).



Slika 37. Energijski dijagram na temelju računa na razini TPSS/LANLD2DZ//SMD-B3LYP/LANL2DZ za reakciju između CYS i CYS-sulfenske kiseline u vodi katalizirane klasterom Ag_n ($n = 2$ ili 4). Stvaranje CYS bez sudjelovanja Ag prikazano je isprekidanom linijom.

Uvođenjem Ag_2 u računalnu simulaciju dimerizacije CYS, energetska barijera spušta se za 28,2 kJ/mol ($\Delta H^\ddagger = 72,4$ kJ/mol), što pokazuje katalitički učinak Ag u reakciji stvaranja disulfidne veze. Struktura prijelaznog stanja TS_{Ag_2} (Slika 38) slična je strukturi iz nekatalizirane reakcije, no jedan atom Ag je u blizini atoma sumpora (2,65 Å). Udaljenost dvaju atoma

sumpora također se smanjila s 3,04 Å na 2,77 Å. Zamjena dimera Ag tetramerom dovodi do dodatnog spuštanja reakcijske barijere ($\Delta H^\ddagger = 53,7$ kJ/mol) (Slika 45). Suprotno očekivanjima s obzirom na eksperimentalne podatke, klasteri Au učinkovitiji su katalizatori. Izračunata energetska barijera za reakciju kataliziranu Au₂ iznosi samo 18,2 kJ/mol (za 20,3 kJ/mol manje od odgovarajuće barijere za reakciju s Ag₂). S obzirom da je NMR pokusima utvrđeno sporije napredovanje reakcije dimerizacije u prisutnosti Au, moraju postojati drugi čimbenici koji utječu na brzinu reakcije. Moguće je da je nastajanje reaktivnog intermedijera CYS-sulfenske kiseline mnogo sporije, što je vjerojatno posljedica manje ROS-aktivnosti smjese NaBH₄/HAuCl₄ (vidi gore). U nedostatku ROS-ova, oksidacija CYS do sulfenske kiseline napreduje vrlo sporo. Također, izračunata promjena entalpije (ΔH_r) za reakciju kataliziranu Au₂ iznosi samo -54,1 kJ/mol, što znači da je odgovarajuća reakcija katalizirana Ag₂ termodinamički povoljnija ($\Delta H_r = -102,7$ kJ/mol).



Slika 38. Optimizirane strukture (na razini SMD-B3LYP/LANL2DZ) prijelaznog stanja TS (gore lijevo) za reakciju između CYS i CYS-sulfenske kiseline u vodi, i prijelaznih stanja TS_{Ag2} (gore desno), TS_{Ag4} (dolje lijevo) i TS_{Au2} (dolje desno) za analogne procese katalizirane, redom, klasterima Ag₂, Ag₄ i Au₂.

Ograničenje ovog pristupa je što ne uključuje kinetičke i termodinamičke aspekte reakcije oksidacije CYS u CYS sulfensku kiselinu, koji bi mogli pridonijeti točnijem

objašnjenju procesa koji su ovdje analizirani. Iako je energetska barijera reakcije dimerizacije visoka (100,6 kJ/mol), s obzirom na egzergonost reakcije odvijanje tog procesa u vodi nije nemoguće, premda bi bilo vrlo sporo. Stabilnost CYS u vodi vjerojatno je dodatno osigurana doprinosom energije aktivacije za reakciju oksidacije CYS do sulfenske kiseline, što je izlazilo iz opsega ove disertacije.

Kataliza oksidacije CYS klasterom metala i važnost prisutnosti ROS-ova za cijeli proces, ključni su parametri za objašnjenje eksperimentalnih rezultata. Ovdje je pružen računski dokaz mogućnosti odvijanja oksidacije CYS u naizgled reduktivnim uvjetima vodene otopine borhidrida. Premda je mehanizam računski potvrđen samo za CYS, vjerojatno je da i za GSH vrijedi analogan proces. Tiolna skupine u GSH pripada cisteinskom dijelu molekule, te proces oksidacije GSH ima vrlo sličan eksperimentalni profil. S obzirom na manju proizvodnju ROS-ova u sustavima s GSH, moguće je da je stoga oksidacija otežana, kao što vrijedi za slučaj oksidacije CYS u kompleksima s Au.

Biološki značaj ovih rezultata drugo je zanimljivo pitanje. U stanicama su prirodno prisutne relativno visoke razine CYS i GSH, kao i ROS-ovi koji nastaju kao posljedica metaboličkih reakcija (168). Ulaskom AgNP i AuNP u biološki medij, NP i njihovi otopljeni ioni mogu povećati stvaranje ROS-ova (305,306) sudjelovanjem u Fenton reakcijama ili redoks reakcijama (307), katalizom radikalskih reakcija (308), interakcijom s membranom mitohondrija ili aktivacijom enzima (168). Isto tako, iz otopljenih iona moguća je *de novo* sinteza NP posredovanjem staničnih reducenasa, pri čemu se nukleacija i rast mogu odvijati na sličan način kao i prilikom pripreme s borhidridom. Premda nije moguće direktno korelirati naše eksperimentalne uvjete s biološkima, ROS-ovisan mehanizam oksidacije CYS na površini NP za vrijeme *de novo* formiranja može se smatrati mogućim i u biološkim uvjetima. S obzirom da AgNP mogu nastati iz Ag^+ u reakciji s kisikovim radikalima, i tako stvarati dodatne ROS-ove, ovo može stvoriti zatvoreni krug koji rezultira trošenjem rezervi staničnih biotiola i oksidativnim oštećenjima na staničnoj razini.

4.7.3. Ispitivanje prirode interakcije biotiola s metalima

Osim tumačenja mehanizma oksidacije tiola za vrijeme nastajanja NP, cilj disertacije bio je ispitati prirodu adsorpcije (vezanja) biotiolnih liganada za metale. Prilikom stvaranja NP, u reakcijskoj smjesi je prisutna smjesa tiola i disulfida, te su NMR pokusi ukazali na adsorpciju i stvaranje površinskog omotača disulfida. Taj zaključak potrebno je teorijski potvrditi te

objasniti vrste interakcija u adsorpciji, stabilnosti liganada na površini i mogućnosti adsorpcije u nekom drugom obliku (tiol ili tiolat).

Stvaranje kemijskih veza na površini NP još uvijek je neriješeno pitanje za tiole i disulfide. Određene studije koje su eksperimentalno razmatrale vezanje CYS na makropovršine Ag i Au tvrde da se i CYS i cistin vežu na jednak način (u obliku tiolata) i stvaraju monoslojeve (309,310). Watanabe i sur. promatrali su vezanje CYS i cistina na Ag elektrode metodom površinskog pojačanja raspršenja Raman zračenja (engl. *surface-enhanced Raman scattering*, SERS) te postavili hipotezu da je adsorbirani cistin u ravnoteži s CYS-tiolatom, tj. da adsorpcija rezultira kidanjem disulfidne veze (311):



Međutim, izlaganje obloženih AgNP cistinu dovelo je do adsorpcije pretežno u obliku disulfida, dok je dugotrajna inkubacija dovela do nastajanja tiolata. Rezultati upućuju da je kidanje disulfidne veze na površini Ag i adsorpcija u obliku tiolata termodinamički povoljniji scenarij (312). Kasnija studija adsorpcije CYS i cistina na Au dovela je do sličnih zaključaka. Cistin se može adsorbirati kovalentno nakon kidanja disulfidne veze, ili adsorbirati nekovalentnim vezama bez kidanja (313). U slučaju reduciranog i oksidiranog oblika GSH na Au, jedna je studija pokazala da se GSSG veže kao disulfid, a GSH kao tiolat. Vezanje GSH olakšano je zbog manjih steričkih smetnji (134).

Za ispitivanje prirode interakcija i veza unutar kompleksa prikladna je NBO analiza, koja daje uvid u molekulske orbitale te može predvidjeti tip, popunjenost, polarizaciju i hibridizaciju orbitala. NBO je uspješno primjenjivan u analizi kompleksa organskih molekula i klastera metala (284,288,289). NBO analiza nadovezuje se na optimizaciju kompleksa u okviru DFT metoda, te je račun proveden s najstabilnijim kompleksima CYS i cistina s dimerima i tetramerima Ag i Au, na teorijskoj razini B3LYP/LANL2DZ uz SMD solvatacijski model. U svim navedenim strukturama interakcija molekule i klastera bila je ostvarena preko karboksilne skupine.

NBO račun primijenjen je za računanje prirodnih parcijalnih naboja atoma, prvo u samom CYS, a potom i u kompleksima CYS i klastera metala (Tablica 12). Usporedba parcijalnih naboja prije i poslije kompleksacije CYS sa klasterima pokazuje male, ali indikativne promjene u atomima koji sudjeluju u interakciji. Općenito, kisik koji sudjeluje u interakciji s Ag poprima veći negativni naboj, dok drugi karboksilni kisik i karboksilni ugljik postaju pozitivniji. Atomi i Ag i Au u kontaktu s CYS nose parcijalni pozitivni naboj, dok su

ostali atomi klastera negativno nabijeni. Takav raspored naboja ukazuje na blagu polarizaciju klastera kao rezultat interakcije sa CYS. Ipak, promjena naboja nije dovoljno značajna kako bi se interakciji pripisao ionski karakter. Kompleksi cistina i klastera metala (Tablica 13) pokazuju jednak obrazac kao i kompleksi CYS, što je očekivano s obzirom na sličnost struktura, tj. činjenicu da se u navedenim cistinskim kompleksima samo jedan dio strukture nalazi u blizini klastera. NBO račun također je ukazao na značajnu delokalizaciju elektrona unutar struktura, te na postojanje značajnog odstupanja od klasičnog (Lewisovog) prikaza u svim kompleksima.

Tablica 12. Parcijalni naboji atoma u kompleksima CYS s dimerima i tetramerima Ag i Au na teorijskoj razini B3LYP/LANL2DZ. Atomi su označeni brojevima prema numeraciji sa slike 23. Pripadnost (zagrade) označavaju atom za koji je vezan vodik.

| Atom (pripadnost) | izračunati parcijalni naboji atoma | | | | |
|----------------------|------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | CYS | CYS-Ag ₂ | CYS-Ag ₄ | CYS-Au ₂ | CYS-Au ₄ |
| S | -0,12991 | -0,12324 | -0,11117 | -0,11890 | -0,11707 |
| O 1 | -0,80975 | -0,82839 | -0,83043 | -0,81363 | -0,77529 |
| O 2 * | -0,77080 | -0,72776 | -0,72234 | -0,69900 | -0,72112 |
| N | -0,80657 | -0,79824 | -0,79696 | -0,79440 | -0,79446 |
| C 1 | 0,78937 | 0,82445 | 0,83065 | 0,83365 | 0,83609 |
| C 2 | -0,12533 | -0,11345 | -0,10876 | -0,10862 | -0,10509 |
| C 3 | -0,51836 | -0,51919 | -0,51848 | -0,52043 | -0,52043 |
| H (C2) | 0,26968 | 0,27704 | 0,26445 | 0,28237 | 0,28280 |
| H (C3) | 0,27097 | 0,27316 | 0,25686 | 0,27483 | 0,27544 |
| H (C3) | 0,25934 | 0,26280 | 0,27105 | 0,26515 | 0,26568 |
| H (S) | 0,15595 | 0,15803 | 0,15751 | 0,15919 | 0,15853 |
| H (N) | 0,48078 | 0,48756 | 0,48178 | 0,49133 | 0,48518 |
| H (N) | 0,47407 | 0,46356 | 0,48330 | 0,46594 | 0,46737 |
| H (N) | 0,46057 | 0,47871 | 0,46764 | 0,48170 | 0,48362 |
| Ag/Au 1 * | n.p. | 0,07173 | 0,22813 | 0,04342 | 0,17723 |
| Ag/Au 2 | n.p. | -0,18677 | 0,15493 | -0,24260 | 0,09269 |
| Ag/Au 3 | n.p. | n.p. | -0,27680 | n.p. | -0,25196 |
| Ag/Au 4 | n.p. | n.p. | -0,23136 | n.p. | -0,23922 |

n.p. = nije primjenjivo, * označava atome u međusobnoj interakciji

Tablica 13. Parcijalni naboji atoma u kompleksima cistina s dimerima i tetramerima Ag i Au iz na teorijskoj razini B3LYP/LANL2DZ. Atomi su označeni brojevima prema numeraciji sa slike 23. Pripadnost (zagrade) označavaju atom za koji je vezan vodik.

| Atom (pripadnost) | izračunati parcijalni naboji atoma | | | | |
|----------------------|------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | cistin | cistin-Ag ₂ | cistin-Ag ₄ | cistin-Au ₂ | cistin-Au ₄ |
| S | 0,02679 | 0,03214 | 0,03459 | 0,03560 | 0,02777 |
| S' | 0,00076 | 0,00556 | 0,00491 | 0,00783 | 0,02265 |
| O 1 * | -0,81161 | -0,79826 | -0,82778 | -0,78132 | -0,76753 |
| O 1' | -0,76666 | -0,76274 | -0,76249 | -0,75987 | -0,74805 |
| O 2 | -0,78250 | -0,76197 | -0,72955 | -0,72963 | -0,75161 |
| O 2' | -0,81058 | -0,81079 | -0,81158 | -0,81168 | -0,84053 |
| N | -0,81621 | -0,81292 | -0,81126 | -0,81134 | -0,80260 |
| N' | -0,79965 | -0,79929 | -0,79900 | -0,79873 | -0,81147 |
| C 1 | 0,80185 | 0,83896 | 0,83732 | 0,84881 | 0,82192 |
| C 1' | 0,82430 | 0,82523 | 0,82557 | 0,82636 | 0,85841 |
| C 2 | -0,12854 | -0,11556 | -0,11454 | -0,11096 | -0,12213 |
| C 2' | -0,12341 | -0,12276 | -0,12264 | -0,12240 | -0,10794 |
| C 3 | -0,52652 | -0,52811 | -0,52909 | -0,52927 | -0,52228 |
| C 3' | -0,52523 | -0,52601 | -0,52580 | -0,52614 | -0,52938 |
| H (C2) | 0,2478 | 0,25563 | 0,25608 | 0,26055 | 0,27100 |
| H (C2') | 0,27958 | 0,28045 | 0,28036 | 0,28093 | 0,28177 |
| H (C3) | 0,26040 | 0,26197 | 0,26259 | 0,26378 | 0,27242 |
| H (C3) | 0,27577 | 0,27766 | 0,27741 | 0,27928 | 0,26844 |
| H (C3') | 0,26679 | 0,26779 | 0,26757 | 0,26797 | 0,27408 |
| H (C3') | 0,27256 | 0,27330 | 0,27337 | 0,27387 | 0,27303 |
| H (N) | 0,47161 | 0,47177 | 0,47554 | 0,47235 | 0,47097 |
| H (N) | 0,48221 | 0,48461 | 0,48446 | 0,48619 | 0,45012 |
| H (N) | 0,48012 | 0,48065 | 0,48064 | 0,48099 | 0,46766 |
| H (N') | 0,46467 | 0,46543 | 0,46543 | 0,46586 | 0,48388 |
| H (N') | 0,45273 | 0,45606 | 0,45613 | 0,45810 | 0,47937 |
| H (N') | 0,48292 | 0,48318 | 0,48327 | 0,48341 | 0,47242 |
| Ag/Au 1 * | n.p. | 0,07020 | 0,22890 | 0,03846 | 0,17942 |
| Ag/Au 2 | n.p. | -0,19219 | 0,14652 | -0,24901 | -0,23398 |
| Ag/Au 3 | n.p. | n.p. | -0,27795 | n.p. | 0,09704 |
| Ag/Au 4 | n.p. | n.p. | -0,22896 | n.p. | -0,23487 |

n.p. = nije primjenjivo, * označava atome u međusobnoj interakciji

Račun prirodnih veznih orbitala otkriva molekulske orbitale u zadanim strukturama koje nastaju kombinacijom atomskih orbitala, tj. opisuje vezanje unutar molekule. Parametri molekulskih orbitala (popunjenost, centri polarizacije i hibridizacija) za cisteinske komplekse navedeni su u tablici 14. Za prikaz su odabrane one veze, tj. orbitale koje okružuju mjesto interakcije, budući da interakcija metala i CYS u računima nije definirana kao vezanje. Takav rezultat isključuje postojanje ionske ili kovalentne veze. Međutim, promatranjem okolnih veza mogu se dobiti indikacije o toj interakciji. Iz tablice 14 vidljivo je da su veze sigma (σ) tipa. C–O veza CYS ima sp^2 -hibridizacijski karakter, i jako je polarizirana (33% na ugljiku i 67% na kisiku). Popunjenost vezne orbitale je približno jednaka idealnoj ($2e^-$). Kompleksacija metalom dovodi do neznatnog pada popunjenosti i porasta polariziranosti. Ag–Ag i Au–Au veze također su polarizirane (40% naprama 60%). Uz informacije o parcijalnim nabojima, ovo je još jedna potvrda polarizacije klastera kao posljedice interakcije s CYS. Polariziranost veze veća je kod Au klastera u odnosu na Ag, vjerojatno zbog lakše delokalizacije elektrona vanjske ljuske Au.

Svojstva cistina i cistinskih kompleksa slična su cisteinskom sustavu (Tablica 15). C–O i metal–metal veze također su polarizirane, te su vrijednosti vrlo slične onima kod CYS. Međutim, u slučaju kompleksa cistina s tetramerom Au NBO analizom prepoznata je O–Au veza. Razlog je vjerojatno malo drugačija struktura tog kompleksa u odnosu na ostale, zbog čega se smanjuje udaljenost klastera i molekule cistina. Ta je veza σ -karaktera, zadovoljava kriterij popunjenosti ($>1,8e^-$) te je vrlo polarizirana. Gustoća elektrona usmjerena je pretežno prema atomu kisika. Informacija o hibridizaciji ukazuje da je veza nastala preklapanjem s i p orbitala kisika sa orbitalom Au.

S obzirom na ukupne rezultate NBO analize, moguće je zaključiti da molekule CYS i cistina s klasterima metala stupaju u dipol – inducirani dipol interakcije, te ne dolazi do kovalentnog ili ionskog vezivanja. Takvim rezultatima odgovarao bi model fizisorpcije, tj. interakcije fizikalnim silama. Nabijena karboksilna skupina u zwitterionima inducira preraspodjelu elektrona u valentnoj vrpici metala, formirajući inducirani dipol. Moguće je da druge funkcionalne skupine ostvaruju slične interakcije. Ipak, pojava vezne orbitale u jednom od navedenih slučajeva ostavlja mogućnost vezivanja, tj. stvaranja jačih interakcija. Iako su dipol – inducirani dipol relativno slabe interakcije, pretpostavka je da vezanjem za nanopovršinu preko više funkcionalnih skupina istovremeno značajno doprinosi jakosti adsorpcije, o čemu će biti riječi u daljnjim poglavljima.

Tablica 14. Parametri popunjenosti, polarizacije i hibridizacije odabranih molekularnih orbitala molekule CYS i njegovih kompleksa s dimerima i tetramerima Ag ili Au.

| Struktura | Veza | Orbitala | Popunjenost | Centar (% polarizacije) | Hibridizacija |
|---------------------|---------|------------|-------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| CYS | C – O | σ | 1,994 | C (33,3%) O (66,7%) | s(32,6%)p2,07(67,4%) s(33,4%)p1,99(66,6%) |
| | | σ^* | 0,057 | C (66,7%) O (33,3%) | s(33,4%)p1,99(66,6%) s(32,6%)p2,07(67,4%) |
| CYS-Ag ₂ | C – O | σ | 1,992 | C (32,7%) O (67,3%) | s(32,0%)p2,12(68,0%) s(32,8%)p2,05(67,2%) |
| | | σ^* | 0,065 | C (67,3%) O (32,7%) | s(32,0%)p2,12(68,0%) s(32,8%)p2,05(67,2%) |
| | Ag – Ag | σ | 1,999 | Ag1 (41,6%) Ag2 (58,4%) | s(86,9%)p0,12(10,2%)d0,03(2,8%) s(96,7%)p0,02(1,5%)d0,02(1,9%) |
| | | σ^* | 0,053 | Ag1 (58,4%) Ag2 (41,6%) | s(86,9%)p0,12(10,2%)d0,03(2,8%) s(96,7%)p0,02(1,5%)d0,02(1,9%) |
| CYS-Ag ₄ | C – O | σ | 1,993 | C (32,7%) O (67,3%) | s(32,0%)p2,12(68,0%) s(32,7%)p2,06(67,3%) |
| | | σ^* | 0,066 | C (67,3%) O (32,7%) | s(32,0%)p2,12(68,0%) s(32,7%)p2,06(67,3%) |
| | Ag – Ag | σ | n.p. | n.p. | n.p. |
| | | σ^* | n.p. | n.p. | n.p. |
| CYS-Au ₂ | C – O | σ | 1,991 | C (32,1%) O (67,9%) | s(31,3%)p2,19(68,7%) s(2,0%)p2,13(68,1%) |
| | | σ^* | 0,073 | C (67,9%) O (32,1%) | s(31,3%)p2,19(68,7%) s(2,0%)p2,13(68,1%) |
| | Au – Au | σ | 1,998 | Au1 (39,9%) Au2 (60,1%) | s(78,7%)p0,12(9,1%)d0,16(12,3%) s(89,3%)p0,01(0,8%)d0,11(10,0%) |
| | | σ^* | 0,127 | Au1 (60,1%) Au2 (39,9%) | s(78,7%)p0,12(9,1%)d0,16(12,3%) s(89,3%)p0,01(0,8%)d0,11(10,0%) |
| CYS-Au ₄ | C – O | σ | 1,990 | C (32,5%) O (67,5%) | s(32,4%)p2,08(67,6%) s(33,2%)p2,02(66,8%) |
| | | σ^* | 0,060 | C (67,5%) O (32,5%) | s(32,4%)p2,08(67,6%) s(33,2%)p2,02(66,8%) |
| | Ag – Ag | σ | 1,988 | Au1 (42,2%) Au2 (57,8%) | s(86,2%)p0,09(8,0%)d0,07(5,8%) s(92,3%)p0,00(0,3%)d0,08(7,5%) |
| | | σ^* | 0,252 | Au1 (57,8%) Au2 (42,2%) | s(86,2%)p0,09(8,0%)d0,07(5,8%) s(92,3%)p0,00(0,3%)d0,08(7,5%) |

n.p. = nije primjenjivo

Tablica 15. Parametri popunjenosti, polarizacije i hibridizacije odabranih molekularnih orbitala molekule cistina i njegovih kompleksa s dimerima i tetramerima Ag ili Au.

| Struktura | Veza | Orbitala | Popunjenost | Centar (% polarizacije) | Hibridizacija |
|------------------------|---------|------------|-------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| cistin | C – O | σ | 1,994 | C (33,4%) O (66,6%) | s(32,8%)p2,05(67,2%) s(33,7%)p1,97(66,3%) |
| | | σ^* | 0,055 | C (66,6%) O (33,4%) | s(32,8%)p2,05(67,2%) s(33,7%)p1,97(66,3%) |
| cistin-Ag ₂ | C – O | σ | 1,991 | C (33,0%) O (67,0%) | s(34,0%)p1,95(66,1%) s(33,1%)p2,02(66,9%) |
| | | σ^* | 0,052 | C (67,0%) O (33,0%) | s(34,0%)p1,95(66,1%) s(33,1%)p2,02(66,9%) |
| | Ag – Ag | σ | 1,999 | Ag1 (41,4%) Ag2 (58,6%) | s(86,6%)p0,12(10,5%)d0,03(2,8%) s(96,7%)p0,01(1,4%)d0,02(1,9%) |
| | | σ^* | 0,056 | Ag1 (58,6%) Ag2 (41,4%) | s(86,6%)p0,12(10,5%)d0,03(2,8%) s(96,7%)p0,01(1,4%)d0,02(1,9%) |
| cistin-Ag ₄ | C – O | σ | 1,992 | C (32,7%) O (67,3%) | s(32,8%)p2,05(67,2%) s(32,0%)p2,13(68,0%) |
| | | σ^* | 0,064 | C (67,3%) O (32,7%) | s(32,8%)p2,05(67,2%) s(32,0%)p2,13(68,0%) |
| | Ag – Ag | σ | n.p. | n.p. | n.p. |
| | | σ^* | n.p. | n.p. | n.p. |
| cistin-Au ₂ | C – O | σ | 1,990 | C (32,4%) O (67,6%) | s(32,8%)p2,05(67,2%) s(32,3%)p2,09(67,7%) |
| | | σ^* | 0,061 | C (67,6%) O (32,4%) | s(32,8%)p2,05(67,2%) s(32,3%)p2,09(67,7%) |
| | Au – Au | σ | 1,999 | Au1 (39,7%) Au2 (60,3%) | s(78,4%)p0,12(9,2%)d0,16(12,4%) s(89,2%)p0,01(0,7%)d0,11(10,1%) |
| | | σ^* | 0,133 | Au1 (60,3%) Au2 (39,7%) | s(78,4%)p0,12(9,2%)d0,16(12,4%) s(89,2%)p0,01(0,7%)d0,11(10,1%) |
| cistin-Au ₄ | C – O | σ | 1,989 | C (31,5%) O (68,5%) | s(35,4%)p1,82(64,6%) s(31,2%)p2,21(68,8%) |
| | | σ^* | 0,086 | C (68,5%) O (31,5%) | s(35,4%)p1,82(64,6%) s(31,2%)p2,21(68,8%) |
| | O – Au | σ | 1,945 | O (89,0%) Au (11,0%) | s(14,8%)p5,77(85,2%) s(85,7%)p0,05(4,0%)d0,12(10,3%) |
| | | σ^* | 0,476 | O (11,0%) Au (89,0%) | s(14,8%)p5,77(85,2%) s(85,7%)p0,05(4,0%)d0,12(10,3%) |

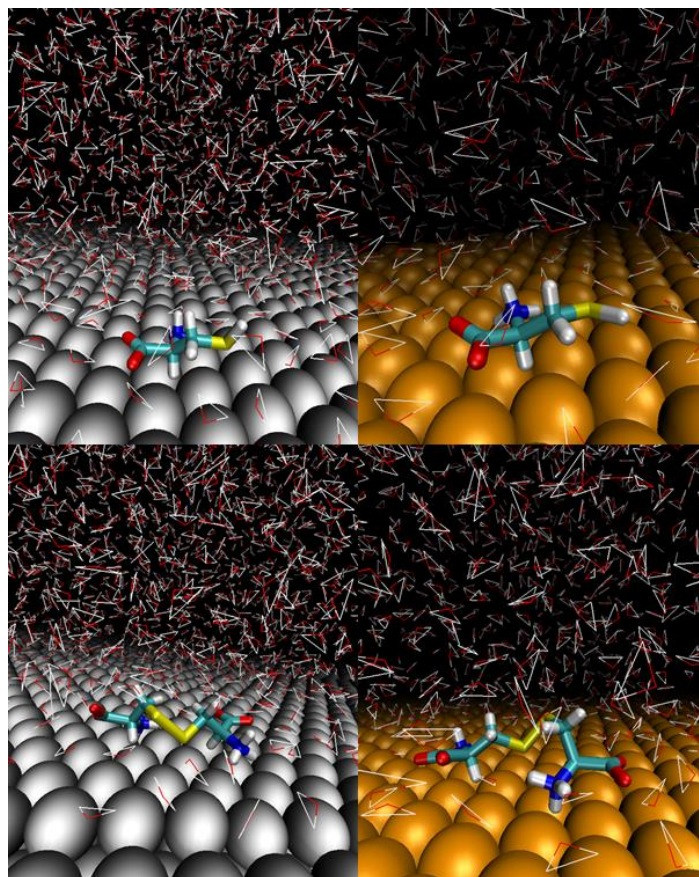
n.p. = nije primjenjivo

4.7.4. Molekulsko-dinamičko ispitivanje adsorpcije biotiola na nanopovršine

Teorijska potvrda adsorpcije i ponašanja liganada na nanopovršinama provedena je metodama klasične MD, koje omogućuju simulaciju sustava s više stotina atoma metala te opis kretanja i interakcija molekula u vremenu. Zbog značajne razlike u dimenzijama između ispitivanih liganada i NP, učinci zakrivljenosti površine mogu se zanemariti (314) te je postavljen sustav s beskonačnom ravnom pločom metala koristeći uvjete periodičnosti. Ograničenje klasične MD je nemogućnost simulacije kidanja i stvaranja kovalentnih veza (315), zbog čega ovaj model uključuje samo nekovalentne interakcije. Ipak, rezultati NBO analize upućuju da u promatranim sustavima ne dolazi do kovalentnog vezanja, stoga se model smatra prikladnim za opis adsorpcije.

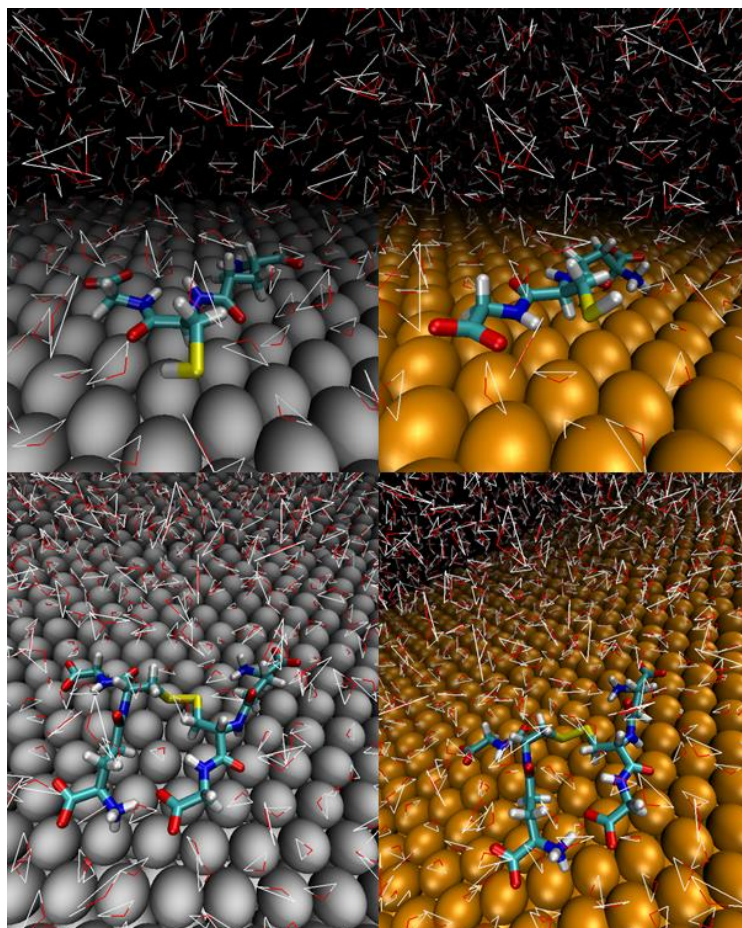
Početni položaj liganada bio je 15 Å iznad površine metala. U svim promatranim sustavima, ligandi se unutar prvih nekoliko nanosekundi pomiču iz početnog položaja i adsorbiraju na površinu. Tamo ostaju vezani do kraja simulacija. Sve molekule slobodno su difundirale na površini u različitim smjerovima, no desorpcija nije primijećena, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (316,317). Za razliku od DFT računa, MD simulacije pokazale su da sve funkcionalne skupine sudjeluju u interakciji (slike 39 i 40). CYS i cistin vežu se u šupljinu između atoma Ag/Au preko amino skupine, te orijentacija vodika amino skupine ukazuje na moguće stvaranje nekonvencionalne vodikove veze, koja je opisana i u literaturi (318). Karboksilne skupine orijentiraju se paralelno s površinom, te su oba kisika u kontaktu s metalom. Tiolna skupina najviše vremena provodi u kontaktu s metalom preko atoma sumpora i vodika. Ipak, HS–C veza ostala je fleksibilna (omogućena je slobodna rotacija), što je ostavilo mogućnost djelomičnog izlaganja sumpora otapalu. Ta činjenica ukazuje na potencijal oksidacije tiolne skupine posredstvom ROS-ova i stvaranje sulfenske kiseline na površini NP, što će rezultirati dimerizacijom. Druga je opcija da se oksidativna dimerizacija odvija u otopini te da se specije vežu u dimernom obliku.

Vežanje cistina slično je vezanju CYS, te se amino i karboksilne skupine ponašaju na jednak način. Stoga je CYS smješten na površini kako bi što više funkcionalnih skupina bilo u dodiru s metalnom. Ipak, zbog specifične geometrije nije moguće da oba sumpora disulfidne veze budu u interakciji s metalom, te je jedan od njih uvijek izložen prema otopini. U slučaju GSH i GSSG, energetski najpovoljnije stanje je ono u kojem je više skupina u dodiru s površinom u isto vrijeme.



Slika 39. Posljednji kadrovi produkcijske faze molekulske dinamičkih simulacija: CYS na površini Ag (gore lijevo) ili Au (gore desno), cistina na površini Ag (dolje lijevo) ili Au (dolje desno). CYS i cistin prikazani su modelom kugle i štapića jednakog promjera. Ag i Au prikazani su kalotnim modelom u sivoj, odnosno narančastoj boji. Molekule vode prikazane su linijskim/ žičanim prikazom.

Takav rezultat odgovara literaturnim navodima za derivate aminokiselina (319). GSH se povremeno može orijentirati s tiolnom skupinom okrenutom prema otopini, slično kao CYS, no amino i karboksilne skupine uvijek ostaju vezane. GSSG se maksimalno rasprostire po površinama. Sve peptidne veze u oba oblika GSH orijentirane su paralelno s površinom. GSSG i nakon adsorpcije zadržava intramolekulsku vodikovu vezu između amino i karboksilne skupine.



Slika 40. Posljednji kadrovi produkcijske faze molekulske dinamičke simulacije: GSH na površini Ag (gore lijevo) ili Au (gore desno), GSSG na površini Ag (dolje lijevo) ili Au (dolje desno). GSH i GSSG prikazani su modelom kugle i štapića jednakog promjera. Ag i Au prikazani su kalotnim modelom u sivoj, odnosno narančastoj boji. Molekule vode prikazane su linijskim/ žičanim prikazom.

Mali broj prethodnih studija ispitivao je interakcije biotiola i disulfida s metalima (319–322). U svima je uočeno da se adsorpcija i jedne i druge vrste liganada odvija spontano i brzo, te da ne dolazi do spontane desorpcije. Također, studije potvrđuju da ligandi uspostavljaju fizikalne interakcije putem svih triju funkcionalnih skupina, kao što je i ovdje prikazano. Chapman i sur. primijetili su da CYS veže Au(110) površine pretežno putem tiola, a cistin karboksilnih skupina, no uz napomenu da tioli tvore snažnije interakcije u deprotoniranom stanju (320). Slično su uočili Monti i sur. s CYS na Au(111) površinama (321), dok su u kasnijem radu objavili da je interakcija cistina s Au(110) pretežno uspostavljena preko sumpora iz disulfidne veze, a manje značajno s ostalim skupinama (322). Ipak, simulacije s većim brojem molekula liganada pokazuju nastajanje slojeva, u kojima cistin može biti i kovalentno i

nekovalentno vezan u različitim konformacijama (322). Dvije studije vezanja GSH na Au zaključile su da konformacija i broj funkcionalnih skupina u kontaktu s metalom najviše ovisi o ionizacijskom stanju molekule (323,324). Objavljeni su i rezultati interakcije GSH s malim AuNP (1,4 i 2,5 nm), u kojima GSH ostaje stabilno vezan na površinu NP i sudjeluje u međučestičnim interakcijama (325). Dakle, rezultati u sklopu ove disertacije pokazuju slaganje s literaturnim navodima.

Tablica 16. Izračunate slobodne energije adsorpcije (ΔG_{ads}), te razlike slobodnih energija ($\Delta\Delta G_{\text{ads}}$) za različite sustave iz MD simulacija, korištenjem MM-GBSA pristupa. Sustavi su sadržavali po jednu molekulu ili CYS, ili cistina, ili GSH, ili GSSG kao ligande, te Ag ili Au nanopovršinu kao receptor

| Sustav | ΔG_{ads} (kJ/mol) | $\Delta\Delta G_{\text{ads}}$ (kJ/mol) (Ag – Au) | $\Delta\Delta G_{\text{ads}}$ (kJ/mol) (tiol – disulfid) |
|-------------|----------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| CYS – Ag | -82,1 | +8,5 | +61,6 |
| CYS – Au | -90,6 | 0,0 | +89,5 |
| cistin – Ag | -143,7 | +36,4 | 0,0 |
| cistin – Au | -180,1 | 0,0 | 0,0 |
| GSH – Ag | -90,8 | +2,1 | +287,9 |
| GSH – Au | -92,9 | 0,0 | +339,3 |
| GSSG – Ag | -378,7 | +53,5 | 0,0 |
| GSSG – Au | -432,3 | 0,0 | 0,0 |

Završni korak u istraživanju interakcija tiola s nanopovršinama bio je računanje energija adsorpcije putem MM-GBSA pristupa. Taj pristup je razvijen za interakcije proteina i liganada, no primjenjivan je i za vezanje liganada s NP (220,221). Ova metoda učinkovita je za rangiranje liganada prema afinitetu za receptorsku strukturu, jer je razmjerno točna u računanju relativnih slobodnih energija vezanja, no nije toliko pouzdana u računanju apsolutnih energija (326). Stoga je metoda primijenjena na računanje relativnih afiniteta vezanja CYS, cistina, GSH i GSSG za nanopovršine Ag i Au (Tablica 16). Kao što je vidljivo iz dobivenih energija, adsorpcija je egzergona u svim slučajevima. Ipak, niža slobodna energija adsorpcije liganada za Au u odnosu na Ag ukazuje na veći afinitet vezanja površine Au, što je u suprotnosti s nedavno objavljenim rezultatima (327). Ipak, Santos i sur. opisali su kovalentno vezanje CYS radikala za Ag(111) i Au(111) površine (327), te je moguće da je nekovalentna adsorpcija

prikazana ovdje povoljnija na Au. Za razliku od tiola, energija vezanja disulfida značajno je veća, ukazujući da disulfidi vežu obje nanopovršine većim afinitetom u odnosu na tiole. Iz toga je moguće zaključiti da će adsorpcija disulfida biti preferirana ako su obje specije prisutne u suspenziji NP. To je u skladu s NMR rezultatima (vidi poglavlje 4.5.) stvaranja obloženih NP.

S obzirom na suprotstavljene literaturne navode, jasno je da je konačni produkt interakcija tiola i metala ovisan o eksperimentalnim uvjetima. Specifični eksperimentalni slučaj naveden ovdje uključuje sljedeće korake: 1) stvaranje NP, 2) oksidaciju tiola i 3) adsorpciju liganda, koji se odvijaju gotovo istovremeno za vrijeme dvosatnog pokusa. NMR rezultati, u sprezi s MD računima, pokazuju potpunu oksidaciju tiola u disulfide te preferiranu adsorpciju disulfida na površine metala.

5. ZAKLJUČAK

Osnovni cilj istraživanja u sklopu ove disertacije bio je ispitati međusobni utjecaj AgNP i AuNP s molekulama ljudskog organizma koje nose tiolnu skupinu. Na temelju prikazanih rezultata moguće je izvesti sljedeće zaključke:

- Optimalna reakcijska smjesa za pripremu stabilnih AgNP i AuNP u prisutnosti CYS i GSH sadrži soli metala, NaBH₄ i tiol u molarnom omjeru od 1 : 10 : 1. U odsutnosti tiola potrebno je koristiti druge stabilizatore.
- Pripremljene NP stabilne su u vodenim otopinama u vremenskom periodu od 24 h. Dodatak CYS i GSH uzrokuje agregaciju zbog interakcija s površinom NP i uslijed unakrsnog povezivanja. Destabilizacijski učinak ovisan je o karakteristikama površinskog omotača NP.
- Priprava NP u prisutnosti tiola rezultira nastankom ROS-ova, koji dovode do oksidacije tiola u disulfide (tj. dimerizacije CYS i GSH). Oksidativna dimerizacija katalizirana je metalima.
- Produkt priprave AgNP i AuNP metodom borhidridne redukcije u prisutnosti CYS i GSH su NP obložene disulfidima (cistin i GSSG).
- Tioli i disulfidi stupaju u interakciju s metalima nekovalentnim vezivanjem u kojima ulogu imaju sve funkcionalne skupine (tiolna, amino i karboksilna). Adsorpcija je spontan proces s negativnom slobodnom energijom vezanja, te je afinitet vezanja veći za oksidirane oblike u odnosu na reducirani CYS i GSH.

Uzevši u obzir raznolike i ponekad proturječne literaturne navode, očito je da je produkt interakcija biotiola i metala jako ovisan o eksperimentalnim uvjetima. U ovoj disertaciji, specifični slučaj obuhvaćao je sljedeće korake: i) stvaranje NP, ii) oksidaciju tiola i iii) adsorpciju liganada. Premda zbog ograničenja studije (reakcija s borhidridom) nije moguće napraviti izravnu usporedbu sa zbivanjima u biološkom mediju, potrebni uvjeti za ispunjavanje navedenih koraka mogući su i *in vivo*, posredovanjem jakih bioloških reducenasa. Posljedice takvog procesa bit će oksidativni stres u stanici zbog stvaranja ROS-ova i iscrpljivanja reduciranih oblika CYS i GSH (stanični antioksidansi), gubitak stabilnosti NP i promjene u sastavu površinskog omotača NP (zbog vezanja oksidacijskih produkata).

6. LITERATURA

1. ISO/TR 14786:2014 Nanotechnologies — Considerations for the development of chemical nomenclature for selected nano-objects. 2014.
2. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. Off J Eur Union 2011;38–40.
3. Akter M, Sikder MT, Rahman MM, Ullah AKMA, Hossain KFB, Banik S, et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *J Adv Res* 2018;9:1–16.
4. Haider A, Kang I-K. Preparation of Silver Nanoparticles and Their Industrial and Biomedical Applications: A Comprehensive Review. *Adv Mater Sci Eng* 2015;2015:1–16.
5. Guadagnini R, Halamoda Kenzaoui B, Walker L, Pojana G, Magdolenova Z, Bilanicova D, et al. Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic in vitro tests. *Nanotoxicology* 2015;9(sup1):13–24.
6. Riaz Ahmed KB, Nagy AM, Brown RP, Zhang Q, Malghan SG, Goering PL. Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of in vitro cytotoxicity studies. *Toxicol Vitro* 2017;38:179–92.
7. Dhawan A, Sharma V. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. *Anal Bioanal Chem* 2010;398(2):589–605.
8. Pelaz B, Alexiou C, Alvarez-Puebla RA, Alves F, Andrews AM, Ashraf S, et al. Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano* 2017;11(3):2313–81.
9. Feliu N, Docter D, Heine M, del Pino P, Ashraf S, Kolosnjaj-Tabi J, et al. In vivo degeneration and the fate of inorganic nanoparticles. *Chem Soc Rev* 2016;45(9):2440–57.
10. Thanh NTK, Green LAW. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today* 2010;5(3):213–30.
11. Bharathala S, Sharma P. Biomedical Applications of Nanoparticles. In: Maurya PK, Singh S, editors. *Nanotechnology in Modern Animal Biotechnology*. New York: Elsevier, 2019:113–32.
12. McNamara K, Tofail SAM. Nanoparticles in biomedical applications. *Adv Phys X* 2017;2(1):54–88.
13. Jurašin DD, Čurlin M, Capjak I, Crnković T, Lovrić M, Babič M, et al. Surface coating affects behavior of metallic nanoparticles in a biological environment. *Beilstein J Nanotechnol* 2016;7(1):246–62.
14. Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci* 2016;17(9):1534.
15. Aziz S, Aziz S, Akbarzadeh A. Advances in Silver Nanotechnology: An Update on Biomedical Applications and Future Perspectives. *Drug Res (Stuttg)*. 2017;67(04):198–203.
16. Ullah Khan S, Saleh TA, Wahab A, Ullah Khan MH, Khan D, Ullah Khan W, et al. Nanosilver: new ageless and versatile biomedical therapeutic scaffold. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:733–62.
17. Austin LA, Mackey MA, Dreaden EC, El-Sayed MA. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery. *Arch Toxicol* 2014;88(7):1391–417.
18. Schäfer B, Brocke J, Epp A, Götz M, Herzberg F, Kneuer C, et al. State of the art in human risk assessment of silver compounds in consumer products: a conference report on silver and nanosilver held at the BfR in 2012. *Arch Toxicol* 2013;87(12):2249–62.
19. Ahonen M, Kahru A, Ivask A, Kasemets K, Kõljalg S, Mantecca P, et al. Proactive Approach for Safe Use of Antimicrobial Coatings in Healthcare Settings: Opinion of the COST Action Network AMiCI. *Int J Environ Res Public Health* 2017;14(4):366.
20. Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF, Rejeski D, et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol* 2015;6:1769–80.
21. The Project on Emerging Nanotechnologies. Preuzeto s: <https://www.nanotechproject.tech/cpi/>. (pristupljeno: 2. lipnja 2021.).
22. Hornos Carneiro MF, Barbosa F. Gold nanoparticles: A critical review of therapeutic

- applications and toxicological aspects. *J Toxicol Environ Heal Part B* 2016;19(3–4):129–48.
23. Alex S, Tiwari A. Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Applications—A Review. *J Nanosci Nanotechnol* 2015;15(3):1869–94.
 24. Lin Z, Monteiro-Riviere NA, Riviere JE. Pharmacokinetics of metallic nanoparticles. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2015;7(2):189–217.
 25. Cai W, Gao T, Hong H, Sun J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol Sci Appl* 2008;1:17–32.
 26. Yamada M, Foote M, Prow TW. Therapeutic gold, silver, and platinum nanoparticles. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2015;7(3):428–45.
 27. Verma A, Stellacci F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions. *Small* 2010;6(1):12–21.
 28. Landgraf L, Müller I, Ernst P, Schäfer M, Rosman C, Schick I, et al. Comparative evaluation of the impact on endothelial cells induced by different nanoparticle structures and functionalization. *Beilstein J Nanotechnol* 2015;6:300–12.
 29. Geiser M. Update on Macrophage Clearance of Inhaled Micro- and Nanoparticles. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2010;23(4):207–17.
 30. Iversen T-G, Skotland T, Sandvig K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today* 2011;6(2):176–85.
 31. Sabella S, Carney RP, Brunetti V, Malvindi MA, Al-Juffali N, Vecchio G, et al. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale* 2014;6(12):7052.
 32. Hotze EM, Labille J, Alvarez P, Wiesner MR. Mechanisms of Photochemistry and Reactive Oxygen Production by Fullerene Suspensions in Water. *Environ Sci Technol* 2008;42(11):4175–80.
 33. Hussain SM, Braydich-Stolle LK, Schrand AM, Murdock RC, Yu KO, Mattie DM, et al. Toxicity Evaluation for Safe Use of Nanomaterials: Recent Achievements and Technical Challenges. *Adv Mater* 2009;21(16):1549–59.
 34. Park E-J, Yi J, Kim Y, Choi K, Park K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol Vitro* 2010;24(3):872–8.
 35. Walter D. Primary Particles - Agglomerates - Aggregates. In: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), editor. *Nanomaterials*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013:9–24.
 36. Muraleetharan V, Mantaj J, Swedrowska M, Vilasaliu D. Nanoparticle modification in biological media: implications for oral nanomedicines. *RSC Adv* 2019;9(69):40487–97.
 37. Kohut A, Voronov A, Peukert W. An Effective Way to Stabilize Colloidal Particles Dispersed in Polar and Nonpolar Media. *Langmuir* 2007;23(2):504–8.
 38. Segets D, Marczak R, Schäfer S, Paula C, Gnichwitz J-F, Hirsch A, et al. Experimental and Theoretical Studies of the Colloidal Stability of Nanoparticles—A General Interpretation Based on Stability Maps. *ACS Nano* 2011;5(6):4658–69.
 39. Gebauer JS, Malissek M, Simon S, Knauer SK, Maskos M, Stauber RH, et al. Impact of the Nanoparticle–Protein Corona on Colloidal Stability and Protein Structure. *Langmuir* 2012;28(25):9673–9.
 40. Tavanti F, Pedone A, Menziani MC. Competitive Binding of Proteins to Gold Nanoparticles Disclosed by Molecular Dynamics Simulations. *J Phys Chem C* 2015;119(38):22172–80.
 41. Cedervall T, Lynch I, Foy M, Berggård T, Donnelly SC, Cagney G, et al. Detailed Identification of Plasma Proteins Adsorbed on Copolymer Nanoparticles. *Angew Chemie Int Ed* 2007;46(30):5754–6.
 42. Lynch I, Dawson KA, Linse S. Detecting Cryptic Epitopes Created by Nanoparticles. *Sci Signal* 2006;2006(327):pe14–pe14.
 43. Lundqvist M, Stigler J, Cedervall T, Berggård T, Flanagan MB, Lynch I, et al. The Evolution of the Protein Corona around Nanoparticles: A Test Study. *ACS Nano* 2011;5(9):7503–9.
 44. Mahmoudi M, Lynch I, Ejtehadi MR, Monopoli MP, Bombelli FB, Laurent S. Protein–Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges. *Chem Rev* 2011;111(9):5610–37.
 45. Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM V., Somasundaran P, et al. Understanding

- biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat Mater* 2009;8(7):543–57.
46. Rahman M, Laurent S, Tawil N, Yahia L, Mahmoudi M, editors. *Protein-Nanoparticle Interactions*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013: 21–44.
 47. Treuel L, Nienhaus GU. Toward a molecular understanding of nanoparticle–protein interactions. *Biophys Rev* 2012;4(2):137–47.
 48. Monopoli MP, Walczyk D, Campbell A, Elia G, Lynch I, Baldelli Bombelli F, et al. Physical–Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to in Vitro and in Vivo Biological Impacts of Nanoparticles. *J Am Chem Soc* 2011;133(8):2525–34.
 49. Kittler S, Greulich C, Gebauer JS, Diendorf J, Treuel L, Ruiz L, et al. The influence of proteins on the dispersability and cell-biological activity of silver nanoparticles. *J Mater Chem* 2010;20(3):512–8.
 50. Koshkina O, Lang T, Thiermann R, Docter D, Stauber RH, Secker C, et al. Temperature-Triggered Protein Adsorption on Polymer-Coated Nanoparticles in Serum. *Langmuir* 2015;31(32):8873–81.
 51. Huang R, Carney RP, Stellacci F, Lau BLT. Protein–nanoparticle interactions: the effects of surface compositional and structural heterogeneity are scale dependent. *Nanoscale* 2013;5(15):6928.
 52. Vroman L, Adams AL, Fischer GC, Munoz PC. Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII, and fibrinogen in plasma at interfaces. *Bloo.* 1980;55(1):156–9.
 53. 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(6):428–37.
 54. Göppert TM, Müller RH. Polysorbate-stabilized solid lipid nanoparticles as colloidal carriers for intravenous targeting of drugs to the brain: Comparison of plasma protein adsorption patterns. *J Drug Target* 2005;13(3):179–87.
 55. Walkey CD, Chan WCW. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem Soc Rev* 2012;41(7):2780–99.
 56. Walczyk D, Bombelli FB, Monopoli MP, Lynch I, Dawson KA. What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *J Am Chem Soc* 2010;132(16):5761–8.
 57. Liu J, Wang Z, Liu FD, Kane AB, Hurt RH. Chemical Transformations of Nanosilver in Biological Environments. *ACS Nano* 2012;6(11):9887–99.
 58. Sharma VK, Siskova KM, Zboril R, Gardea-Torresdey JL. Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. *Adv Colloid Interface Sci* 2014;204:15–34.
 59. Chevallet M, Veronesi G, Fuchs A, Mintz E, Michaud-Soret I, Deniaud A. Impact of labile metal nanoparticles on cellular homeostasis. *Current developments in imaging, synthesis and applications. Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2017;1861(6):1566–77.
 60. Marchioni M, Jouneau P-H, Chevallet M, Michaud-Soret I, Deniaud A. Silver nanoparticle fate in mammals: Bridging in vitro and in vivo studies. *Coord Chem Rev* 2018;364:118–36.
 61. Axson JL, Stark DI, Bondy AL, Capracotta SS, Maynard AD, Philbert MA, et al. Rapid Kinetics of Size and pH-Dependent Dissolution and Aggregation of Silver Nanoparticles in Simulated Gastric Fluid. *J Phys Chem C* 2015;119(35):20632–41.
 62. Fröhlich E, Roblegg E. Oral uptake of nanoparticles: human relevance and the role of in vitro systems. *Arch Toxicol* 2016;90(10):2297–314.
 63. Ngamchuea K, Batchelor-McAuley C, Compton RG. The fate of silver nanoparticles in authentic human saliva. *Nanotoxicology* 2018;12(4):305–11.
 64. Wu W, Zhang R, McClements DJ, Chefetz B, Polubesova T, Xing B. Transformation and Speciation Analysis of Silver Nanoparticles of Dietary Supplement in Simulated Human Gastrointestinal Tract. *Environ Sci Technol* 2018;52(15):8792–800.
 65. Danscher G, Locht LJ. In vivo liberation of silver ions from metallic silver surfaces. *Histochem Cell Biol* 2010;133(3):359–66.
 66. Walczak AP, Fokkink R, Peters R, Tromp P, Herrera Rivera ZE, Rietjens IMCM, et al. Behaviour of silver nanoparticles and silver ions in an in vitro human gastrointestinal digestion model. *Nanotoxicology* 2012;7(7):1198–210.
 67. Bove P, Malvindi MA, Kote SS, Bertorelli R, Summa M, Sabella S. Dissolution test for risk

- assessment of nanoparticles: a pilot study. *Nanoscale* 2017;9(19):6315–26.
68. Boudreau MD, Imam MS, Paredes AM, Bryant MS, Cunningham CK, Felton RP, et al. Differential Effects of Silver Nanoparticles and Silver Ions on Tissue Accumulation, Distribution, and Toxicity in the Sprague Dawley Rat Following Daily Oral Gavage Administration for 13 Weeks. *Toxicol Sci* 2016;150(1):131–60.
 69. Loeschner K, Hadrup N, Qvortrup K, Larsen A, Gao X, Vogel U, et al. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part Fibre Toxicol* 2011;8(1):18.
 70. Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt RH. Controlled Release of Biologically Active Silver from Nanosilver Surfaces. *ACS Nano* 2010;4(11):6903–13.
 71. Loza K, Diendorf J, Sengstock C, Ruiz-Gonzalez L, Gonzalez-Calbet JM, Vallet-Regi M, et al. The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media. *J Mater Chem B* 2014;2(12):1634.
 72. Abdelkhalig A, van der Zande M, Undas AK, Peters RJB, Bouwmeester H. Impact of in vitro digestion on gastrointestinal fate and uptake of silver nanoparticles with different surface modifications. *Nanotoxicology* 2020;14(1):111–26.
 73. Valenti LE, Giacomelli CE. Stability of silver nanoparticles: agglomeration and oxidation in biological relevant conditions. *J Nanoparticle Res* 2017;19(5):156.
 74. Davidson RA, Anderson DS, Van Winkle LS, Pinkerton KE, Guo T. Evolution of Silver Nanoparticles in the Rat Lung Investigated by X-ray Absorption Spectroscopy. *J Phys Chem A* 2015;119(2):281–9.
 75. Theodorou IG, Müller KH, Chen S, Goode AE, Yufit V, Ryan MP, et al. Silver Nanowire Particle Reactivity with Human Monocyte-Derived Macrophage Cells: Intracellular Availability of Silver Governs Their Cytotoxicity. *ACS Biomater Sci Eng* 2017;3(10):2336–47.
 76. Levard C, Hotze EM, Colman BP, Dale AL, Truong L, Yang XY, et al. Sulfidation of Silver Nanoparticles: Natural Antidote to Their Toxicity. *Environ Sci Technol* 2013;47(23):13440–8.
 77. Loza K, Sengstock C, Chernousova S, Köller M, Epple M. The predominant species of ionic silver in biological media is colloidally dispersed nanoparticulate silver chloride. *RSC Adv* 2014;4(67):35290.
 78. Peloquin DM, Baumann EJ, Luxton TP. Multi-method assessment of PVP-coated silver nanoparticles and artificial sweat mixtures. *Chemosphere* 2020;249:126173.
 79. Miclăuş T, Beer C, Chevallier J, Scavenius C, Bochenkov VE, Enghild JJ, et al. Dynamic protein coronas revealed as a modulator of silver nanoparticle sulphidation in vitro. *Nat Commun* 2016;7(1):11770.
 80. Le Ouay B, Stellacci F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. *Nano Today* 2015;10(3):339–54.
 81. Merchant B. Gold, the Noble Metal and the Paradoxes of its Toxicology. *Biologicals* 1998;26(1):49–59.
 82. Balfourier A, Luciani N, Wang G, Lelong G, Ersen O, Khelfa A, et al. Unexpected intracellular biodegradation and recrystallization of gold nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci* 2020;117(1):103–13.
 83. Jiang X, Du B, Zheng J. Glutathione-mediated biotransformation in the liver modulates nanoparticle transport. *Nat Nanotechnol* 2019;14(9):874–82.
 84. Brown CL, Whitehouse MW, Tiekink ERT, Bushell GR. Colloidal metallic gold is not bio-inert. *Inflammopharmacology* 2008;16(3):133–7.
 85. Zou T, Lum CT, Lok C-N, Zhang J-J, Che C-M. Chemical biology of anticancer gold(iii) and gold(i) complexes. *Chem Soc Rev* 2015;44(24):8786–801.
 86. Deepak V, Kalishwaralal K. *Metal Nanoparticles in Microbiology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011:17–35.
 87. Mallikarjun V, Clarke DJ, Campbell CJ. Cellular redox potential and the biomolecular electrochemical series: A systems hypothesis. *Free Radic Biol Med* 2012;53(2):280–8.
 88. Elias B, Kirsch-De Mesmaeker A. Photo-reduction of polyazaaromatic Ru(II) complexes by biomolecules and possible applications. *Coord Chem Rev* 2006;250(13–14):1627–41.
 89. Reedy CJ, Elvekrog MM, Gibney BR. Development of a heme protein structure electrochemical function database. *Nucleic Acids Res* 2007;36:D307–13.

90. Mirzahassemi A, Noszál B. Species-Specific Standard Redox Potential of Thiol-Disulfide Systems: A Key Parameter to Develop Agents against Oxidative Stress. *Sci Rep* 2016;6(1):37596.
91. Iosub I, Giurginca M, Iftimie N, Meghea A. Redox Properties of Some Aminoacids and Proteins. *Mol Cryst Liq Cryst* 2006;448(1):39/[641]-49/[651].
92. Danscher G. Histochemical demonstration of heavy metals. *Histochemistry*. 1981;71(1):1–16.
93. Klaus T, Joerger R, Olsson E, Granqvist C-G. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96(24):13611–4.
94. Phanjom P, Ahmed G. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Aspergillus oryzae* (MTCC No. 1846) and Its Characterizations. *Nanosci Nanotechnol* 2015;5(1):14–21.
95. Yin N, Gao R, Knowles B, Wang J, Wang P, Sun G, et al. Formation of silver nanoparticles by human gut microbiota. *Sci Total Environ* 2019;651:1489–94.
96. Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol Adv* 2013;31(2):346–56.
97. Asmathunisha N, Kathiresan K. A review on biosynthesis of nanoparticles by marine organisms. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2013;103:283–7.
98. Jha AK, Prasad K. Can animals too negotiate nano transformations? *Adv nano Res* 2013;1(1):35–42.
99. Requejo R, Hurd TR, Costa NJ, Murphy MP. Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *FEBS J* 2010;277(6):1465–80.
100. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, Tata V De, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* 2003;66(8):1499–503.
101. Abraham A, Mihaliuk E, Kumar B, Legleiter J, Gullion T. Solid-State NMR Study of Cysteine on Gold Nanoparticles. *J Phys Chem C* 2010;114(42):18109–14.
102. Berg JM, Tymoczko J, Stryer L. *Biokemija*. Zagreb, Hrvatska: Školska knjiga, 2013: 1152.
103. Bak DW, Bechtel TJ, Falco JA, Weerapana E. Cysteine reactivity across the subcellular universe. *Curr Opin Chem Biol* 2019;48:96–105.
104. Sekhar R V., Patel SG, Guthikonda AP, Reid M, Balasubramanyam A, Taffet GE, et al. Deficient synthesis of glutathione underlies oxidative stress in aging and can be corrected by dietary cysteine and glycine supplementation. *Am J Clin Nutr* 2011;94(3):847–53.
105. Lill R, Mühlhoff U. Iron-Sulfur Protein Biogenesis in Eukaryotes: Components and Mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22(1):457–86.
106. Lippard SJ, Berg JM. *Principles of Bioinorganic Chemistry*. Mill Valley, CA, USA: University Science Books, 1994: 411.
107. Baker DH, Czarnecki-Maulden GL. Pharmacologic Role of Cysteine in Ameliorating or Exacerbating Mineral Toxicities. *J Nutr* 1987;117(6):1003–10.
108. Giles NM, Giles GI, Jacob C. Multiple roles of cysteine in biocatalysis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300(1):1–4.
109. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med* 1999;27(9–10):916–21.
110. Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 1989;257(4):L163–73.
111. Pem B, Pongrac IM, Ulm L, Pavičić I, Vrček V, Domazet Jurašin D, et al. Toxicity and safety study of silver and gold nanoparticles functionalized with cysteine and glutathione. *Beilstein J Nanotechnol* 2019;10(1):1802–17.
112. Vangala K, Ameer F, Salomon G, Le V, Lewis E, Yu L, et al. Studying Protein and Gold Nanoparticle Interaction Using Organothiols as Molecular Probes. *J Phys Chem C* 2012;116(5):3645–52.
113. Bulaj G, Kortemme T, Goldenberg DP. Ionization–Reactivity Relationships for Cysteine Thiols in Polypeptides. *Biochemistry* 1998;37(25):8965–72.
114. Hager G, Brolo AG. Adsorption/desorption behaviour of cysteine and cystine in neutral and basic media: electrochemical evidence for differing thiol and disulfide adsorption to a Au(111) single crystal electrode. *J Electroanal Chem* 2003;550–551:291–301.
115. Bürgi T. Properties of the gold–sulphur interface: from self-assembled monolayers to clusters.

- Nanoscale 2015;7(38):15553–67.
116. Häkkinen H. The gold–sulfur interface at the nanoscale. *Nat Chem* 2012;4(6):443–55.
 117. Paik W, Eu S, Lee K, Chon S, Kim M. Electrochemical Reactions in Adsorption of Organosulfur Molecules on Gold and Silver: Potential Dependent Adsorption. *Langmuir* 2000;16(26):10198–205.
 118. Galal A, Atta NF, El-Ads EH. Probing cysteine self-assembled monolayers over gold nanoparticles – Towards selective electrochemical sensors. *Talanta* 2012;93:264–73.
 119. Daniel M-C, Astruc D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem Rev* 2004;104(1):293–346.
 120. Abraham A, Ilott AJ, Miller J, Gullion T. ¹H MAS NMR Study of Cysteine-Coated Gold Nanoparticles. *J Phys Chem B* 2012;116(27):7771–5.
 121. Isted GE, Martin DS, Smith CI, LeParc R, Cole RJ, Weightman P. The adsorption of L-cysteine on Au(110) in ultra-high vacuum and electrochemical environments. *Phys status solidi* 2005;2(12):4012–6.
 122. Fawcett WR, Fedurco M, Kováčová Z, Borkowska Z. Adsorption study of cysteine, n-acetylcysteamine, cysteinesulfinic acid and cysteic acid on a polycrystalline gold electrode. *J Electroanal Chem* 1994;368(1–2):275–80.
 123. Ihs A, Liedberg B. Chemisorption of -cysteine and 3-mercaptopropionic acid on gold and copper surfaces: An infrared reflection-absorption study. *J Colloid Interface Sci* 1991;144(1):282–92.
 124. Jing C, Fang Y. Experimental (SERS) and theoretical (DFT) studies on the adsorption behaviors of l-cysteine on gold/silver nanoparticles. *Chem Phys* 2007;332(1):27–32.
 125. Caprile L, Cossaro A, Falletta E, Della Pina C, Cavalleri O, Rolandi R, et al. Interaction of l-cysteine with naked gold nanoparticles supported on HOPG: a high resolution XPS investigation. *Nanoscale* 2012;4(24):7727.
 126. Kühnle A, Linderoth TR, Hammer B, Besenbacher F. Chiral recognition in dimerization of adsorbed cysteine observed by scanning tunnelling microscopy. *Nature* 2002;415(6874):891–3.
 127. Lee H, Kim MS, Suh SW. Raman spectroscopy of sulphur-containing amino acids and their derivatives adsorbed on silver. *J Raman Spectrosc* 1991;22(2):91–6.
 128. Graff M, Bukowska J. Adsorption of Enantiomeric and Racemic Cysteine on a Silver Electrode – SERS Sensitivity to Chirality of Adsorbed Molecules. *J Phys Chem B* 2005;109(19):9567–74.
 129. Brolo AG, Germain P, Hager G. Investigation of the Adsorption of l-Cysteine on a Polycrystalline Silver Electrode by Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Second Harmonic Generation (SESHG). *J Phys Chem B* 2002;106(23):5982–7.
 130. Sheng C, Zhao H, Gu F, Yang H. Effect of Pb 2+ on L-glutathione monolayers on a silver surface investigated by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. *J Raman Spectrosc* 2009;40(9):1274–8.
 131. Huang GG, Han XX, Hossain MK, Kitahama Y, Ozaki Y. A Study of Glutathione Molecules Adsorbed on Silver Surfaces under Different Chemical Environments by Surface-Enhanced Raman Scattering in Combination with the Heat-Induced Sensing Method. *Appl Spectrosc* 2010;64(10):1100–8.
 132. Farrag M, Mohamed RA. Ecotoxicity of ~1 nm silver and palladium nanoclusters protected by l -glutathione on the microbial growth under light and dark conditions. *J Photochem Photobiol A Chem* 2016;330:117–25.
 133. Murariu M, Stoica I, Gradinaru R, Drochioiu G, Mangalagiu I. Glutathione-based silver nanoparticles with dual biomedical activity. *Rev Roum Chim* 2014;59(10):867–74.
 134. Zhou A, Xie Q, Wu Y, Cai Y, Nie L, Yao S. Study of the Adsorption of Glutathione on a Gold Electrode by Using Electrochemical Quartz Crystal Impedance, Electrochemical Impedance Spectroscopy, and Cyclic Voltammetry. *J Colloid Interface Sci* 2000;229(1):12–20.
 135. Calborean A, Martin F, Marconi D, Turcu R, Kacso IE, Buimaga-Iarinca L, et al. Adsorption mechanisms of l-Glutathione on Au and controlled nano-patterning through Dip Pen Nanolithography. *Mater Sci Eng C* 2015;57:171–80.
 136. Syafiuddin A, Salmiati, Salim MR, Beng Hong Kueh A, Hadibarata T, Nur H. A Review of Silver Nanoparticles: Research Trends, Global Consumption, Synthesis, Properties, and Future Challenges. *J Chinese Chem Soc* 2017;64(7):732–56.

137. Cai R, Chen C. The Crown and the Scepter: Roles of the Protein Corona in Nanomedicine. *Adv Mater* 2019;31(45):1805740.
138. Barbir R, Goessler W, Ćurlin M, Micek V, Milić M, Vuković B, et al. Protein Corona Modulates Distribution and Toxicological Effects of Silver Nanoparticles In Vivo. *Part Part Syst Charact* 2019;36(8):1900174.
139. Auría-Soro C, Nesma T, Juanes-Velasco P, Landeira-Viñuela A, Fidalgo-Gomez H, Acebes-Fernandez V, et al. Interactions of Nanoparticles and Biosystems: Microenvironment of Nanoparticles and Biomolecules in Nanomedicine. *Nanomaterials* 2019;9(10):1365.
140. Veronesi G, Aude-Garcia C, Kieffer I, Gallon T, Delangle P, Herlin-Boime N, et al. Exposure-dependent Ag⁺ release from silver nanoparticles and its complexation in AgS₂ sites in primary murine macrophages. *Nanoscale* 2015;7(16):7323–30.
141. Levard C, Reinsch BC, Michel FM, Oumahi C, Lowry G V., Brown GE. Sulfidation Processes of PVP-Coated Silver Nanoparticles in Aqueous Solution: Impact on Dissolution Rate. *Environ Sci Technol* 2011;45(12):5260–6.
142. Pacioni NL, Borsarelli CD, Rey V, Veglia A V. Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles. In: Alarcon EI, Griffith M, Udekwu K, editors. *Silver Nanoparticle Applications Engineering Materials*. Cham: Springer International Publishing Switzerland, 2015:13–46.
143. Sakthivel S, Prasanna Venkatesh R. Solid state synthesis of nano-mineral particles. *Int J Min Sci Technol* 2012;22(5):651–5.
144. Goesmann H, Feldmann C. Nanoparticulate Functional Materials. *Angew Chemie Int Ed* 2010;49(8):1362–95.
145. Polte J, Erler R, Thünemann AF, Sokolov S, Ahner TT, Rademann K, et al. Nucleation and Growth of Gold Nanoparticles Studied via in situ Small Angle X-ray Scattering at Millisecond Time Resolution. *ACS Nano* 2010;4(2):1076–82.
146. Wojtysiak S, Kudelski A. Influence of oxygen on the process of formation of silver nanoparticles during citrate/borohydride synthesis of silver sols. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2012;410:45–51.
147. Thanh NTK, Maclean N, Mahiddine S. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chem Rev* 2014;114(15):7610–30.
148. Agnihotri S, Mukherji S, Mukherji S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv* 2014;4(8):3974–83.
149. Zettner A. Principles and Applications of Atomic Absorption Spectroscopy. In: Sobotka H, Stewart CP, editors. *Advances in Clinical Chemistry*. New York: Elsevier, 1964:1–62.
150. Neogy S, Savalia RT, Tewari R, Srivastava D, Dey GK. Transmission electron microscopy of nanomaterials. *Indian J Pure Appl Phys* 2006;44:119–24.
151. Kumar PS, Pavithra KG, Naushad M. Characterization techniques for nanomaterials. In: Thomas S, Sakho EHM, Kalarikkal N, Oluwafemi OS, Wu J, editors. *Nanomaterials for Solar Cell Applications* New York, NY: Elsevier, 2019:97–124.
152. Pecora R. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *J Nanoparticle Res* 2000;2:123–31.
153. Zetasizer Nano Series User manual. Worchestershire, UK: Malvern Instruments Limited, 2013: p. 111–8.
154. Doane TL, Chuang C-H, Hill RJ, Burda C. Nanoparticle ζ -Potentials. *Acc Chem Res* 2012;45(3):317–26.
155. Jacobs C, Müller RH. Production and characterization of a budesonide nanosuspension for pulmonary administration. *Pharm Res* 2002;19(2):189–94.
156. Willets KA, Van Duyne RP. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annu Rev Phys Chem* 2007;58(1):267–97.
157. Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. *Acc Chem Res* 2008;41(12):1578–86.
158. Hutter E, Fendler JH. Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance. *Adv Mater* 2004;16(19):1685–706.
159. Sagle LB, Ruvuna LK, Ruemmele JA, Van Duyne RP. Advances in localized surface plasmon

- resonance spectroscopy biosensing. *Nanomedicine* 2011;6(8):1447–62.
160. Misra SK, Dybowska A, Berhanu D, Luoma SN, Valsami-Jones E. The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies. *Sci Total Environ* 2012;438:225–32.
 161. Odzak N, Kistler D, Behra R, Sigg L. Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media. *Environ Pollut* 2014;191:132–8.
 162. Van Koetsem F, Verstraete S, Wallaert E, Verbeken K, Van der Meeren P, Rinklebe J, et al. Use of filtration techniques to study environmental fate of engineered metallic nanoparticles: Factors affecting filter performance. *J Hazard Mater* 2017;322:105–17.
 163. López-Cebral R, Martín-Pastor M, Seijo B, Sanchez A. Progress in the characterization of bio-functionalized nanoparticles using NMR methods and their applications as MRI contrast agents. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* 2014;79:1–13.
 164. Smith AM, Marbella LE, Johnston KA, Hartmann MJ, Crawford SE, Kozycz LM, et al. Quantitative Analysis of Thiolated Ligand Exchange on Gold Nanoparticles Monitored by ¹H NMR Spectroscopy. *Anal Chem* 2015;87(5):2771–8.
 165. Marbella LE, Millstone JE. NMR Techniques for Noble Metal Nanoparticles. *Chem Mater* 2015;27(8):2721–39.
 166. Cobas C, Dominguez S, Larin N, Iglesias I, Geada C, Seoane F, et al. MestReNova. Santiago de Compostela, Spain: Mestrelab Research S.L., 2009
 167. Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 2001;29(2):345.
 168. Abdal Dayem A, Hossain M, Lee S, Kim K, Saha S, Yang G-M, et al. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *Int J Mol Sci* 2017;18(1):120.
 169. Brandt R, Keston AS. Synthesis of diacetyldichlorofluorescein: A stable reagent for fluorometric analysis. *Anal Biochem* 1965;11(1):6–9.
 170. Keston AS, Brandt R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal Biochem* 1965;11(1):1–5.
 171. Pal AK, Bello D, Budhlall B, Rogers E, Milton DK. Screening for Oxidative Stress Elicited by Engineered Nanomaterials: Evaluation of Acellular DCFH Assay. *Dose-Response* 2012;10(3):1.
 172. Zhao J, Riediker M. Detecting the oxidative reactivity of nanoparticles: a new protocol for reducing artifacts. *J Nanoparticle Res* 2014;16(7):2493.
 173. Wilson M. Interactions between Ultrafine Particles and Transition Metals in Vivo and in Vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002;184(3):172–9.
 174. Sauvain J-J, Rossi MJ, Riediker M. Comparison of Three Acellular Tests for Assessing the Oxidation Potential of Nanomaterials. *Aerosol Sci Technol* 2013;47(2):218–27.
 175. Foresman JB, Frisch AE. Exploring chemistry with electronic structure methods. Wallingford CT: Gaussian Inc., 1996: 531.
 176. Isabella Cluster, University Computing Centre. Preuzeto s: <https://www.srce.unizg.hr/en/isabella-cluster>. (pristupljeno: 2. lipnja 2021.).
 177. Atkins P, Friedman R. *Molecular Quantum mechanics*. Oxford: Oxford University Press, 2005: 537.
 178. Tsuneda T. *Density Functional Theory in Quantum Chemistry*. Tokyo: Springer Japan, 2014: 207.
 179. Gilbert KE. *Pcmodel 10.0*. Bloomington, USA: Serena Software, 2014:
 180. Bachrach SM. *Computational Organic Chemistry*. Hoboken, New Jersey, USA: Wiley Interscience, 2007: 1–496.
 181. Hehre WJ. *A Guide to Molecular Mechanics and Quantum Chemical Calculations*. Irvine: Wavefunction Inc., 2003: 1–816.
 182. Marenich A V., Cramer CJ, Truhlar DG. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. *J Phys Chem B* 2009;113(18):6378–96.
 183. Fukui K. The path of chemical reactions - the IRC approach. *Acc Chem Res* 1981;14(12):363–8.
 184. Hratchian HP, Schlegel HB. Using Hessian Updating To Increase the Efficiency of a Hessian

- Based Predictor-Corrector Reaction Path Following Method. *J Chem Theory Comput* 2005;1(1):61–9.
185. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al. Gaussian 16, Revision C.01. Wallingford CT: Gaussian Inc., 2016
 186. Dennington R, Keith TA, Millam JM. GaussView. Shawnee Mission, KS, KS: Semichem Inc., 2016
 187. Becke AD. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys Rev A* 1988;38(6):3098–100.
 188. Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys* 1993;98(7):5648–52.
 189. Lee C, Yang W, Parr RG. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B* 1988;37(2):785–9.
 190. Schaefer HF. *Methods of Electronic Structure Theory*. Schaefer HF, editor. Boston, MA: Springer US, 1977: 446.
 191. Hay PJ, Wadt WR. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *J Chem Phys*.1985;82(1):299–310.
 192. Popa T, Paci I. Structure and Chirality in Sulfur-Containing Amino Acids Adsorbed on Au(111) Surfaces. *J Phys Chem C* 2015;119(18):9829–38.
 193. Becke AD. Density-functional thermochemistry. IV. A new dynamical correlation functional and implications for exact-exchange mixing. *J Chem Phys* 1996;104(3):1040–6.
 194. Yang Y, Weaver MN, Merz KM. Assessment of the “6-31+G** + LANL2DZ” Mixed Basis Set Coupled with Density Functional Theory Methods and the Effective Core Potential: Prediction of Heats of Formation and Ionization Potentials for First-Row-Transition-Metal Complexes. *J Phys Chem A* 2009;113(36):9843–51.
 195. Faza ON, Rodríguez RÁ, López CS. Performance of density functional theory on homogeneous gold catalysis. *Theor Chem Acc* 2011;128(4–6):647–61.
 196. Tao J, Perdew JP, Staroverov VN, Scuseria GE. Climbing the Density Functional Ladder: Nonempirical Meta-Generalized Gradient Approximation Designed for Molecules and Solids. *Phys Rev Lett* 2003;91(14):146401.
 197. Blom MN, Schooss D, Stairs J, Kappes MM. Experimental structure determination of silver cluster ions (Ag_n^+ , $19 \leq n \leq 79$). *J Chem Phys* 2006;124(24):244308.
 198. van der Tol J, Jia D, Li Y, Chernyy V, Bakker JM, Nguyen MT, et al. Structural assignment of small cationic silver clusters by far-infrared spectroscopy and DFT calculations. *Phys Chem Chem Phys* 2017;19(29):19360–8.
 199. Grimme S, Antony J, Ehrlich S, Krieg H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *J Chem Phys* 2010;132(15):154104.
 200. Carr JA, Wang H, Abraham A, Gullion T, Lewis JP. l-Cysteine Interaction with Au₅₅ Nanoparticle. *J Phys Chem C* 2012;116(49):25816–23.
 201. Luque NB, Vélez P, Pötting K, Santos E. Ab Initio Studies of the Electronic Structure of l-Cysteine Adsorbed on Ag(111). *Langmuir* 2012;28(21):8084–99.
 202. Popa T, Ting ECM, Paci I. Chiral effects in amino acid adsorption on Au(111): A comparison of cysteine, homocysteine and methionine. *Surf Sci* 2014;629:20–7.
 203. Navarro-Vázquez A. State of the art and perspectives in the application of quantum chemical prediction of ¹H and ¹³C chemical shifts and scalar couplings for structural elucidation of organic compounds. *Magn Reson Chem* 2017;55(1):29–32.
 204. Bühl M, van Mourik T. *NMR spectroscopy: quantum-chemical calculations*. Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci 2011;1(4):634–47.
 205. Hoe W-M, Cohen AJ, Handy NC. Assessment of a new local exchange functional OPTX. *Chem Phys Lett* 2001;341(3–4):319–28.
 206. Toomsalu E, Burk P. Critical test of some computational methods for prediction of NMR ¹H and ¹³C chemical shifts. *J Mol Model* 2015;21(9):244.
 207. Rusakov YY, Rusakova IL, Semenov VA, Samultsev DO, Fedorov S V., Krivdin LB. Calculation of ¹⁵N and ³¹P NMR Chemical Shifts of Azoles, Phospholes, and Phosphazoles: A Gateway to Higher Accuracy at Less Computational Cost. *J Phys Chem A*

- 2018;122(33):6746–59.
208. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology. Preuzeto s: <https://sdfs.db.aist.go.jp>. (pristupljeno: 2. lipnja 2021.)
 209. Glendening ED, Landis CR, Weinhold F. Natural bond orbital methods. *WIREs Comput Mol Sci* 2012;2(1):1–42.
 210. What Are NBOs (and Other “Natural”-type Orbitals)? Preuzeto s: https://nbo6.chem.wisc.edu/webnbo_css.htm. (pristupljeno: 2. lipnja 2021.)
 211. Reed AE, Curtiss LA, Weinhold F. Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint. *Chem Rev* 1988;88(6):899–926.
 212. Glendening ED, Badenhoop JK, Reed AE, Carpenter JE, Bohmann JA, Morales CM, et al. NBO 6.0. Madison, WI, USA: Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, 2013
 213. Rapaport DC. *The Art of Molecular Dynamics Simulation*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 2004: 1–564.
 214. Case DA, Belfon K, Ben-Shalom IY, Brozell SR, Cerutti DS, Cheatham III TE, et al. *AMBER 2017*. San Francisco: University of California, 2017
 215. Heinz H, Vaia RA, Farmer BL, Naik RR. Accurate Simulation of Surfaces and Interfaces of Face-Centered Cubic Metals Using 12–6 and 9–6 Lennard-Jones Potentials. *J Phys Chem C* 2008;112(44):17281–90.
 216. Mahoney MW, Jorgensen WL. A five-site model for liquid water and the reproduction of the density anomaly by rigid, nonpolarizable potential functions. *J Chem Phys* 2000;112(20):8910–22.
 217. Allen MP. Introduction to Molecular Dynamics Simulation. In: Attig N, Binder K, Grubmueller H, Kremer K, editors. *Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins*, Lecture Notes. Julich: John von Neumann Institute of Computing, 2004:1–28.
 218. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J Mol Graph*. 1996;14(1):33–8.
 219. Kollman PA, Massova I, Reyes C, Kuhn B, Huo S, Chong L, et al. Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Acc Chem Res* 2000;33(12):889–97.
 220. Contreras ML, Torres C, Villarroel I, Rozas R. Molecular dynamics assessment of doxorubicin–carbon nanotubes molecular interactions for the design of drug delivery systems. *Struct Chem* 2019;30(1):369–84.
 221. Torres C, Villarroel I, Rozas R, Contreras L. Carbon Nanotubes Having Haeckelite Defects as Potential Drug Carriers. *Molecular Dynamics Simulation. Molecules* 2019;24(23):4281.
 222. Pine SH. *Organska kemija*. 3rd ed. Zagreb, Hrvatska: Školska knjiga, 1994: 1203.
 223. Bergquist L, Hegmann T. Chiral Amplification by L- Cysteine-Capped Gold Nanoparticles in Lyotropic Chromonic Liquid Crystals. *ChemNanoMat* 2017;3(12):863–8.
 224. Aryal S, B.K.C. R, Dharmaraj N, Bhattarai N, Kim CH, Kim HY. Spectroscopic identification of SAu interaction in cysteine capped gold nanoparticles. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 2006;63(1):160–3.
 225. Fernández-Ponce C, Muñoz-Miranda JP, de los Santos DM, Aguado E, García-Cozar F, Litrán R. Influence of size and surface capping on photoluminescence and cytotoxicity of gold nanoparticles. *J Nanoparticle Res* 2018;20(11):305.
 226. Harper B, Sinche F, Ho Wu R, Gowrishankar M, Marquart G, Mackiewicz M, et al. The Impact of Surface Ligands and Synthesis Method on the Toxicity of Glutathione-Coated Gold Nanoparticles. *Nanomaterials* 2014;4(2):355–71.
 227. Studart AR, Amstad E, Gauckler LJ. Colloidal Stabilization of Nanoparticles in Concentrated Suspensions. *Langmuir* 2007;23(3):1081–90.
 228. Brkić Ahmed L, Milić M, Pongrac IM, Marjanović AM, Mlinarić H, Pavičić I, et al. Impact of surface functionalization on the uptake mechanism and toxicity effects of silver nanoparticles in HepG2 cells. *Food Chem Toxicol* 2017;107:349–61.
 229. Kubo A-L, Capjak I, Vrček IV, Bondarenko OM, Kurvet I, Vija H, et al. Antimicrobial potency of differently coated 10 and 50 nm silver nanoparticles against clinically relevant bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2018;170:401–10.

230. Pongrac I, Pavičić I, Milić M, Brkić Ahmed L, Babič M, Horák D, et al. Oxidative stress response in neural stem cells exposed to different superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2016;11:1701.
231. Song KC, Lee SM, Park TS, Lee BS. Preparation of colloidal silver nanoparticles by chemical reduction method. *Korean J Chem Eng* 2009;26(1):153–5.
232. Pem B, González-Mancebo D, Moros M, Ocaña M, Becerro AI, Pavičić I, et al. Biocompatibility assessment of up-and down-converting nanoparticles: implications of interferences with in vitro assays. *Methods Appl Fluoresc* 2018;7(1):014001.
233. Ilić K, Hartl S, Galić E, Tetyczka C, Pem B, Barbir R, et al. Interaction of Differently Coated Silver Nanoparticles With Skin and Oral Mucosal Cells. *J Pharm Sci* 2021;110(5):2250–61.
234. Ravindran A, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Studies on Differential Behavior of Silver Nanoparticles Towards Thiol Containing Amino Acids. *Curr Nanosci* 2012;8(1):141–9.
235. Rajasekharreddy P, Usha Rani P, Sreedhar B. Qualitative assessment of silver and gold nanoparticle synthesis in various plants: a photobiological approach. *J Nanoparticle Res* 2010;12(5):1711–21.
236. Badawy AM El, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM. Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions. *Environ Sci Technol* 2010;44(4):1260–6.
237. Ravindran A, Dhas SP, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Differential interaction of silver nanoparticles with cysteine. *J Exp Nanosci* 2013;8(4):589–95.
238. Athilakshmi J, Mohan M, Chand DK. Selective detection of cysteine/cystine using silver nanoparticles. *Tetrahedron Lett* 2013;54(5):427–30.
239. Afshinnia K, Marrone B, Baalousha M. Potential impact of natural organic ligands on the colloidal stability of silver nanoparticles. *Sci Total Environ* 2018;625:1518–26.
240. Mandal S, Gole A, Lala N, Gonnade R, Ganvir V, Sastry M. Studies on the Reversible Aggregation of Cysteine-Capped Colloidal Silver Particles Interconnected via Hydrogen Bonds. *Langmuir* 2001;17(20):6262–8.
241. Basu S, Ghosh SK, Kundu S, Panigrahi S, Praharaj S, Pande S, et al. Biomolecule induced nanoparticle aggregation: Effect of particle size on interparticle coupling. *J Colloid Interface Sci* 2007;313(2):724–34.
242. Li J-F, Huang P-C, Wu F-Y. Highly selective and sensitive detection of glutathione based on anti-aggregation of gold nanoparticles via pH regulation. *Sensors Actuators B Chem* 2017;240:553–9.
243. Gondikas AP, Morris A, Reinsch BC, Marinakos SM, Lowry G V., Hsu-Kim H. Cysteine-Induced Modifications of Zero-valent Silver Nanomaterials: Implications for Particle Surface Chemistry, Aggregation, Dissolution, and Silver Speciation. *Environ Sci Technol* 2012;46(13):7037–45.
244. Shi J, Sun X, Zou X, Zhang H. Amino acid-dependent transformations of citrate-coated silver nanoparticles: Impact on morphology, stability and toxicity. *Toxicol Lett* 2014;229(1):17–24.
245. Kästner C, Saloga PEJ, Thünemann AF. Kinetic monitoring of glutathione-induced silver nanoparticle disintegration. *Nanoscale* 2018;10(24):11485–90.
246. Marchioni M, Gallon T, Worms I, Jouneau P-H, Lebrun C, Veronesi G, et al. Insights into polythiol-assisted AgNP dissolution induced by bio-relevant molecules. *Environ Sci Nano* 2018;5(8):1911–20.
247. Mulley G, Jenkins ATA, Waterfield NR. Inactivation of the Antibacterial and Cytotoxic Properties of Silver Ions by Biologically Relevant Compounds. *PLoS One* 2014;9(4):e94409.
248. Huang Z, Zeng Z, Chen A, Zeng G, Xiao R, Xu P, et al. Differential behaviors of silver nanoparticles and silver ions towards cysteine: Bioremediation and toxicity to *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere* 2018;203:199–208.
249. Khan Z, Talib A. Growth of different morphologies (quantum dots to nanorod) of Ag-nanoparticles: Role of cysteine concentrations. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2010;76(1):164–9.
250. Zhong Z, Patskovskyy S, Bouvrette P, Luong JHT, Gedanken A. The Surface Chemistry of Au Colloids and Their Interactions with Functional Amino Acids. *J Phys Chem B* 2004;108(13):4046–52.

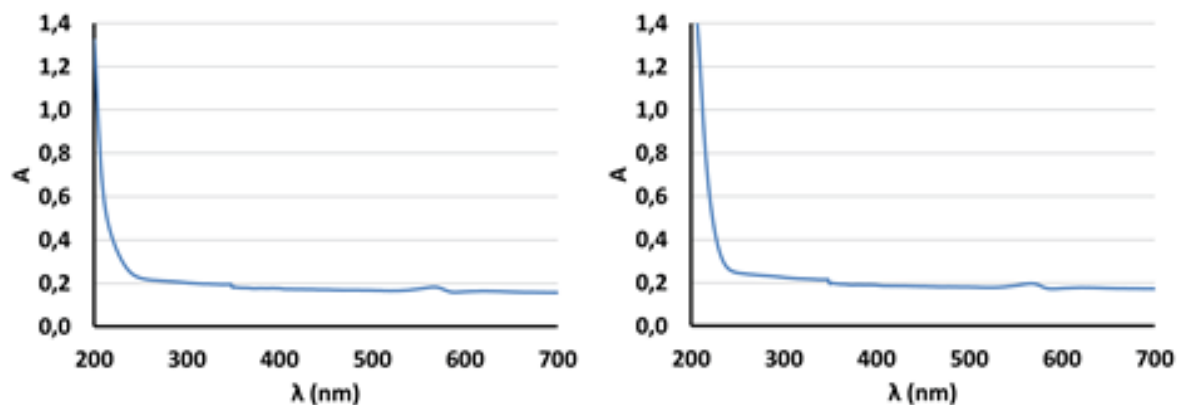
251. Philip D. Synthesis and spectroscopic characterization of gold nanoparticles. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 2008;71(1):80–5.
252. Haiss W, Thanh NTK, Aveyard J, Fernig DG. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. *Anal Chem* 2007;79(11):4215–21.
253. Csapó E, Patakfalvi R, Hornok V, Tóth LT, Sipos Á, Szalai A, et al. Effect of pH on stability and plasmonic properties of cysteine-functionalized silver nanoparticle dispersion. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2012;98:43–9.
254. Blaske F, Stork L, Sperling M, Karst U. Adduct formation of ionic and nanoparticulate silver with amino acids and glutathione. *J Nanoparticle Res* 2013;15(9):1928.
255. Udayabhaskararao T, Bootharaju MS, Pradeep T. Thiolate-protected Ag₃₂ clusters: mass spectral studies of composition and insights into the Ag–thiolate structure from NMR. *Nanoscale* 2013;5(19):9404.
256. Porta F, Krpetić Ž, Prati L, Gaiassi A, Scari G. Gold-Ligand Interaction Studies of Water-Soluble Aminoalcohol Capped Gold Nanoparticles by NMR. *Langmuir* 2008;24(14):7061–4.
257. Schuetze B, Mayer C, Loza K, Gocyla M, Heggen M, Epple M. Conjugation of thiol-terminated molecules to ultrasmall 2 nm-gold nanoparticles leads to remarkably complex ¹H-NMR spectra. *J Mater Chem B* 2016;4(12):2179–89.
258. Korgel BA, Fullam S, Connolly S, Fitzmaurice D. Assembly and Self-Organization of Silver Nanocrystal Superlattices: Ordered “Soft Spheres.” *J Phys Chem B* 1998;102(43):8379–88.
259. Kumar A, Mandal S, Selvakannan PR, Pasricha R, Mandale AB, Sastry M. Investigation into the Interaction between Surface-Bound Alkylamines and Gold Nanoparticles. *Langmuir* 2003;19(15):6277–82.
260. Wallner A, Jafri SHM, Blom T, Gogoll A, Leifer K, Baumgartner J, et al. Formation and NMR Spectroscopy of ω-Thiol Protected α,ω-Alkanedithiol-Coated Gold Nanoparticles and Their Usage in Molecular Charge Transport Junctions. *Langmuir* 2011;27(14):9057–67.
261. Zelakiewicz BS, de Dios AC, Tong. ¹³C NMR Spectroscopy of ¹³C-1-Labeled Octanethiol-Protected Au Nanoparticles: Shifts, Relaxations, and Particle-Size Effect. *J Am Chem Soc* 2003;125(1):18–9.
262. Song Y, Harper AS, Murray RW. Ligand Heterogeneity on Monolayer-Protected Gold Clusters. *Langmuir* 2005;21(12):5492–500.
263. Badia A, Gao W, Singh S, Demers L, Cuccia L, Reven L. Structure and Chain Dynamics of Alkanethiol-Capped Gold Colloids. *Langmuir* 1996;12(5):1262–9.
264. Krattenmacher F, Heermann T, Calvet A, Krawczyk B, Noll T. Effect of manufacturing temperature and storage duration on stability of chemically defined media measured with LC-MS/MS. *J Chem Technol Biotechnol* 2019;94(4):1144–55.
265. Schaaff TG, Knight G, Shafiqullin MN, Borkman RF, Whetten RL. Isolation and Selected Properties of a 10.4 kDa Gold:Glutathione Cluster Compound. *J Phys Chem B* 1998;102(52):10643–6.
266. Dračinský M, Unzueta P, Beran GJO. Improving the accuracy of solid-state nuclear magnetic resonance chemical shift prediction with a simple molecular correction. *Phys Chem Chem Phys* 2019;21(27):14992–5000.
267. Aryal S, K.C. RB, Bhattarai N, Kim CK, Kim HY. Study of electrolyte induced aggregation of gold nanoparticles capped by amino acids. *J Colloid Interface Sci* 2006;299(1):191–7.
268. Majzik A, Fülöp L, Csapó E, Bogár F, Martinek T, Penke B, et al. Functionalization of gold nanoparticles with amino acid, β-amyloid peptides and fragment. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;81(1):235–41.
269. Ma Z, Han H. One-step synthesis of cystine-coated gold nanoparticles in aqueous solution. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2008;317(1–3):229–33.
270. Đurović MD, Bugarčić ŽD, Heinemann FW, van Eldik R. Substitution versus redox reactions of gold(III) complexes with l-cysteine, l-methionine and glutathione. *Dalt Trans* 2014;43(10):3911–21.
271. Guo C, Yarger JL. Characterizing gold nanoparticles by NMR spectroscopy. *Magn Reson Chem* 2018;56(11):1074–82.
272. Rabenstein DL, Millis KK. Nuclear magnetic resonance study of the thioltransferase-catalyzed glutathione/glutathione disulfide interchange reaction. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct*

- Mol Enzymol 1995;1249(1):29–36.
273. Stahl CR, Siggia S. Determination of Organic Disulfides by Reduction with Sodium Borohydride. *Anal Chem* 1957;29(1):154–5.
 274. Roos G, Messens J. Protein sulfenic acid formation: From cellular damage to redox regulation. *Free Radic Biol Med* 2011;51(2):314–26.
 275. Gupta V, Carroll KS. Sulfenic acid chemistry, detection and cellular lifetime. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2014;1840(2):847–75.
 276. He D, Jones AM, Garg S, Pham AN, Waite TD. Silver Nanoparticle–Reactive Oxygen Species Interactions: Application of a Charging–Discharging Model. *J Phys Chem C* 2011;115(13):5461–8.
 277. He W, Liu Y, Wamer WG, Yin J-J. Electron spin resonance spectroscopy for the study of nanomaterial-mediated generation of reactive oxygen species. *J Food Drug Anal* 2014;22(1):49–63.
 278. Jones AM, Garg S, He D, Pham AN, Waite TD. Superoxide-Mediated Formation and Charging of Silver Nanoparticles. *Environ Sci Technol* 2011;45(4):1428–34.
 279. Mesmer RE, Jolly WL. The Hydrolysis of Aqueous Hydroborate. *Inorg Chem* 1962;1(3):608–12.
 280. Gardiner JA, Collat JW. Kinetics of the Stepwise Hydrolysis of Tetrahydroborate Ion. *J Am Chem Soc* 1965;87(8):1692–700.
 281. Retnamma R, Novais AQ, Rangel CM, Yu L, Matthews MA. Kinetic modeling of self-hydrolysis of aqueous NaBH₄ solutions by model-based isoconversional method. *Int J Hydrogen Energy* 2014;39(12):6567–76.
 282. Roy M, Mukherjee P, Mandal BP, Sharma RK, Tyagi AK, Kale SP. Biomimetic synthesis of nanocrystalline silver sol using cysteine: stability aspects and antibacterial activities. *RSC Adv* 2012;2(16):6496.
 283. Nazmutdinov RR, Manyurov IR, Zinkicheva TT, Jang J, Ulstrup J. Cysteine adsorption on the Au(111) surface and the electron transfer in configuration of a scanning tunneling microscope: A quantum-chemical approach. *Russ J Electrochem* 2007;43(3):328–41.
 284. Buglak AA, Ramazanov RR, Kononov AI. Silver cluster–amino acid interactions: a quantum-chemical study. *Amino Acids* 2019;51(5):855–64.
 285. Diaz Fleming G, Finnerty JJ, Campos-Vallette M, Célis F, Aliaga AE, Fredes C, et al. Experimental and theoretical Raman and surface-enhanced Raman scattering study of cysteine. *J Raman Spectrosc* 2009;40(6):632–8.
 286. Zhao Y, Zhou F, Zhou H, Su H. The structural and bonding evolution in cysteine–gold cluster complexes. *Phys Chem Chem Phys* 2013;15(5):1690–8.
 287. Xie H-J, Lei Q-F, Fang W-J. Intermolecular interactions between gold clusters and selected amino acids cysteine and glycine: a DFT study. *J Mol Model* 2012;18(2):645–52.
 288. Pakiari AH, Jamshidi Z. Interaction of Amino Acids with Gold and Silver Clusters. *J Phys Chem A* 2007;111(20):4391–6.
 289. Srivastava R. Interaction of Cysteine with Au_n (n = 8, 10, 12) Even Neutral Clusters: A Theoretical Study. *ChemistrySelect* 2017;2(9):2789–96.
 290. Darvish Ganji M, Tavassoli Larijani H, Alamol-hoda R, Mehdizadeh M. First-principles and Molecular Dynamics simulation studies of functionalization of Au₃₂ golden fullerene with amino acids. *Sci Rep* 2018;8(1):11400.
 291. Pelayo J de J, Valencia I, Díaz G, López-Lozano X, Garzón IL. Enantiospecific adsorption of cysteine on a chiral Au₃₄ cluster. *Eur Phys J D* 2015;69(12):277.
 292. Pérez LA, López-Lozano X, Garzón IL. Density functional study of the cysteine adsorption on Au nanoclusters. *Eur Phys J D* 2009;52(1–3):123–6.
 293. Tlahuice-Flores A. Zwitterion l-cysteine adsorbed on the Au₂₀ cluster: enhancement of infrared active normal modes. *J Mol Model* 2013;19(4):1937–42.
 294. Santos E, Avalué L, Pötting K, Vélez P, Jones H. Experimental and theoretical studies of l-cysteine adsorbed at Ag(111) electrodes. *Electrochim Acta* 2008;53(23):6807–17.
 295. Chang L, Fisher A, Liu Z, Cheng D. Highly sensitive and selective colorimetric detection of sulphide using Ag–Au nanoalloys: a DFT study. *RSC Adv* 2016;6(20):16285–91.
 296. Khavani M, Izadyar M, Reza Housaindokht M. Quantum chemistry study on the mechanism of

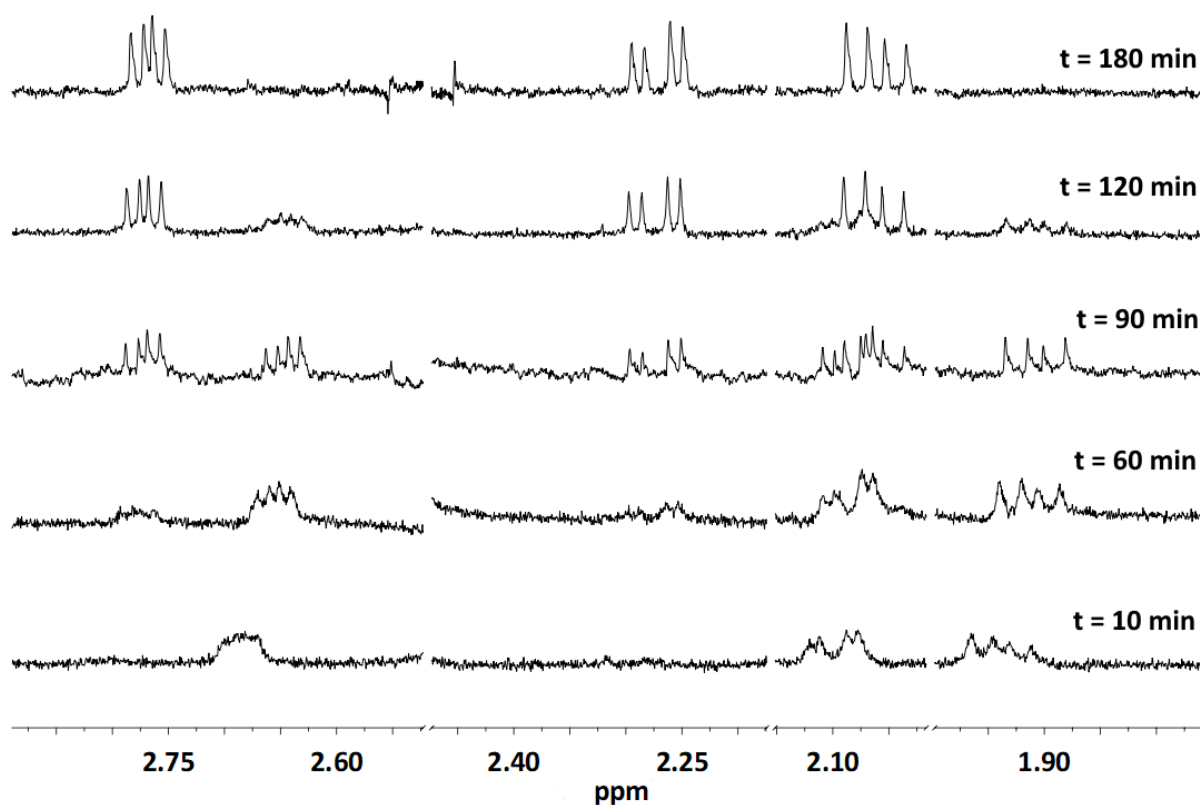
- oxidation of cysteine to cystine using hydrogen peroxide. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem* 2015;190(10):1680–91.
297. Zeida A, Babbush R, González Lebrero MC, Trujillo M, Radi R, Estrin DA. Molecular Basis of the Mechanism of Thiol Oxidation by Hydrogen Peroxide in Aqueous Solution: Challenging the S N 2 Paradigm. *Chem Res Toxicol* 2012;25(3):741–6.
298. Luo D, Smith SW, Anderson BD. Kinetics and Mechanism of the Reaction of Cysteine and Hydrogen Peroxide in Aqueous Solution. *J Pharm Sci* 2005;94(2):304–16.
299. Bayse CA. Transition states for cysteine redox processes modeled by DFT and solvent-assisted proton exchange. *Org Biomol Chem* 2011;9(13):4748.
300. Piris M, Matxain JM, Lopez X, Ugalde JM. The extended Koopmans' theorem: Vertical ionization potentials from natural orbital functional theory. *J Chem Phys* 2012;136(17):174116.
301. Bozkaya U, Ünal A. State-of-the-Art Computations of Vertical Ionization Potentials with the Extended Koopmans' Theorem Integrated with the CCSD(T) Method. *J Phys Chem A* 2018;122(17):4375–80.
302. Zhan C-G, Nichols JA, Dixon DA. Ionization Potential, Electron Affinity, Electronegativity, Hardness, and Electron Excitation Energy: Molecular Properties from Density Functional Theory Orbital Energies. *J Phys Chem A* 2003;107(20):4184–95.
303. Toma M, Kuvek T, Vrček V. Ionization Energy and Reduction Potential in Ferrocene Derivatives: Comparison of Hybrid and Pure DFT Functionals. *J Phys Chem A* 2020;124(39):8029–39.
304. Santamaria R, Kaplan IG, Novaro O. A comparative theoretical study of stable geometries and energetic properties of small silver clusters. *Chem Phys Lett* 1994;218(5–6):395–400.
305. Omata Y, Lewis JB, Lockwood PE, Tseng WY, Messer RL, Bouillaguet S, et al. Gold-induced reactive oxygen species (ROS) do not mediate suppression of monocytic mitochondrial or secretory function. *Toxicol Vitro* 2006;20(5):625–33.
306. Ahlberg S, Meinke MC, Werner L, Epple M, Diendorf J, Blume-Peytavi U, et al. Comparison of silver nanoparticles stored under air or argon with respect to the induction of intracellular free radicals and toxic effects toward keratinocytes. *Eur J Pharm Biopharm* 2014;88(3):651–7.
307. He W, Zhou Y-T, Wamer WG, Boudreau MD, Yin J-J. Mechanisms of the pH dependent generation of hydroxyl radicals and oxygen induced by Ag nanoparticles. *Biomaterials* 2012;33(30):7547–55.
308. He W, Zhou Y-T, Wamer WG, Hu X, Wu X, Zheng Z, et al. Intrinsic catalytic activity of Au nanoparticles with respect to hydrogen peroxide decomposition and superoxide scavenging. *Biomaterials* 2013;34(3):765–73.
309. LeParc R, Smith CI, Cuquerella MC, Williams RL, Fernig DG, Edwards C, et al. Reflection Anisotropy Spectroscopy Study of the Adsorption of Sulfur-Containing Amino Acids at the Au(110)/Electrolyte Interface. *Langmuir* 2006;22(7):3413–20.
310. Zhang J, Chi Q, Nielsen JU, Hansen AG, Andersen JET, Wackerbarth H, et al. Organized monolayers of biological macromolecules on Au(111) Surfaces. *Russ J Electrochem* 2002;38(1):68–76.
311. Watanabe T, Maeda H. Adsorption-Controlled Redox Activity. Surface-Enhanced Raman Investigation of Cystine versus Cysteine on Silver Electrodes. *J Phys Chem* 1989;93(7):3258–60.
312. López-Tobar E, Hernández B, Ghomi M, Sanchez-Cortes S. Stability of the Disulfide Bond in Cystine Adsorbed on Silver and Gold Nanoparticles As Evidenced by SERS Data. *J Phys Chem C* 2013;117(3):1531–7.
313. Acres RG, Feyer V, Tsud N, Carlino E, Prince KC. Mechanisms of Aggregation of Cysteine Functionalized Gold Nanoparticles. *J Phys Chem C* 2014;118(19):10481–7.
314. Casalini T, Limongelli V, Schmutz M, Som C, Jordan O, Wick P, et al. Molecular Modeling for Nanomaterial–Biology Interactions: Opportunities, Challenges, and Perspectives. *Front Bioeng Biotechnol* 2019;7:268.
315. Hollingsworth SA, Dror RO. Molecular Dynamics Simulation for All. *Neuron* 2018;99(6):1129–43.
316. Mateo-Martí E, Rogero C, Gonzalez C, Sobrado JM, de Andrés PL, Martin-Gago JA. Interplay between Fast Diffusion and Molecular Interaction in the Formation of Self-Assembled

- Nanostructures of S -Cysteine on Au(111). *Langmuir* 2010;26(6):4113–8.
317. Monti S, Carravetta V, Ågren H. Decoration of gold nanoparticles with cysteine in solution: reactive molecular dynamics simulations. *Nanoscale* 2016;8(26):12929–38.
318. El-Mageed HRA, Mustafa FM, Abdel-Latif MK. The ability of gold nanoclusters as a new nanocarrier for D-penicillamine anticancer drug: a computational chemistry study. *Struct Chem* 2020;31(2):781–93.
319. Hoefling M, Iori F, Corni S, Gottschalk K-E. The Conformations of Amino Acids on a Gold(111) Surface. *ChemPhysChem* 2010;11(8):1763–7.
320. Chapman CRL, Ting ECM, Kereszti A, Paci I. Self-Assembly of Cysteine Dimers at the Gold Surface: A Computational Study of Competing Interactions. *J Phys Chem C* 2013;117(38):19426–35.
321. Monti S, Carravetta V, Ågren H. Simulation of Gold Functionalization with Cysteine by Reactive Molecular Dynamics. *J Phys Chem Lett* 2016;7(2):272–6.
322. Monti S, Carravetta V, Ågren H. Theoretical Study of the Adsorption Mechanism of Cystine on Au(110) in Aqueous Solution. *Small* 2016;12(44):6134–43.
323. Bieri M, Bürgi T. l-Glutathione Chemisorption on Gold and Acid/Base Induced Structural Changes: A PM-IRRAS and Time-Resolved in Situ ATR-IR Spectroscopic Study. *Langmuir* 2005;21(4):1354–63.
324. Tehrani ZA, Jamshidi Z, Javan MJ, Fattahi A. Interactions of glutathione tripeptide with gold cluster: Influence of intramolecular hydrogen bond on complexation behavior. *J Phys Chem A* 2012;116(17):4338–47.
325. Sousa AA, Hassan SA, Knittel LL, Balbo A, Aronova MA, Brown PH, et al. Biointeractions of ultrasmall glutathione-coated gold nanoparticles: effect of small size variations. *Nanoscale* 2016;8(12):6577–88.
326. Hou T, Wang J, Li Y, Wang W. Assessing the Performance of the MM/PBSA and MM/GBSA Methods. 1. The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *J Chem Inf Model* 2011;51(1):69–82.
327. Santos E, Avalle LB, Scurtu R, Jones H. l-Cysteine films on Ag(111) investigated by electrochemical and nonlinear optical methods. *Chem Phys* 2007;342(1–3):236–44.

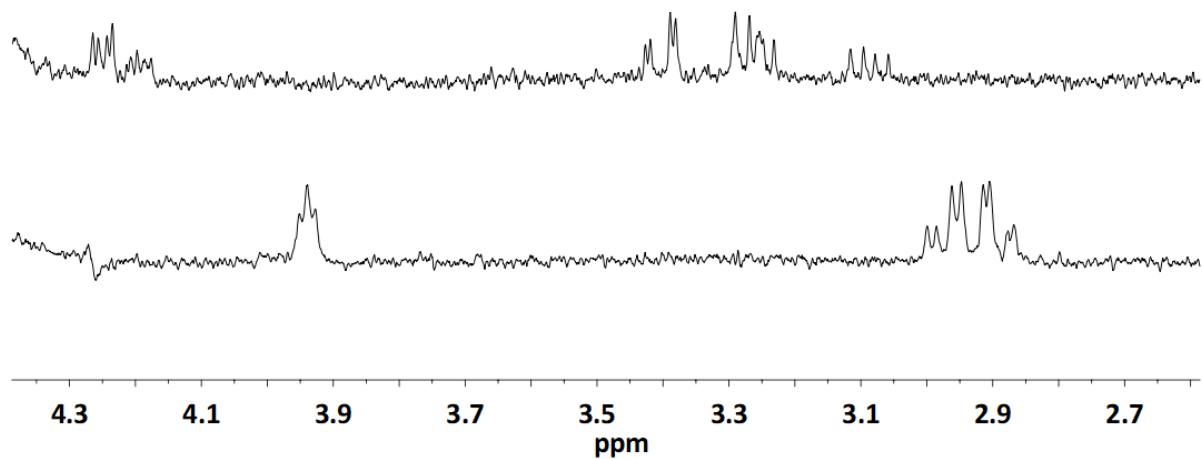
7. DODATNI PRIKAZI REZULTATA



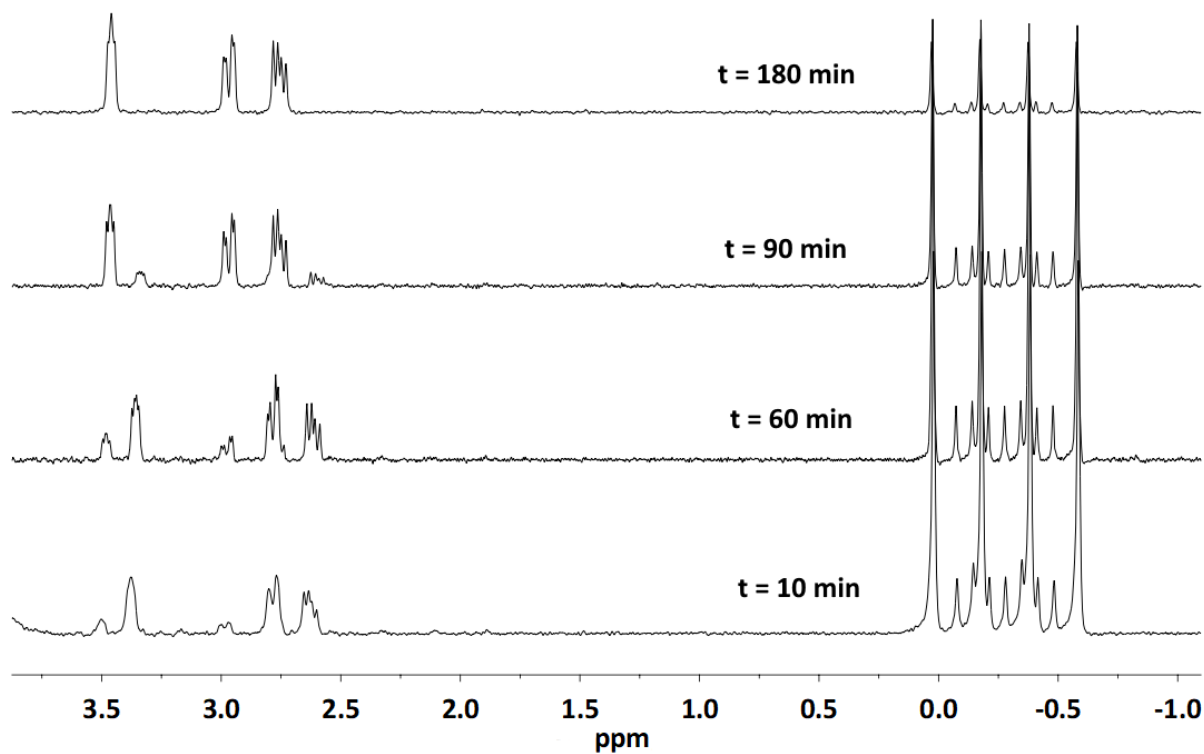
Slika D1. UV/VIS spektri vodenih otopina CYS 100 mg/L (lijevo) i GSH 100 mg/L (desno).



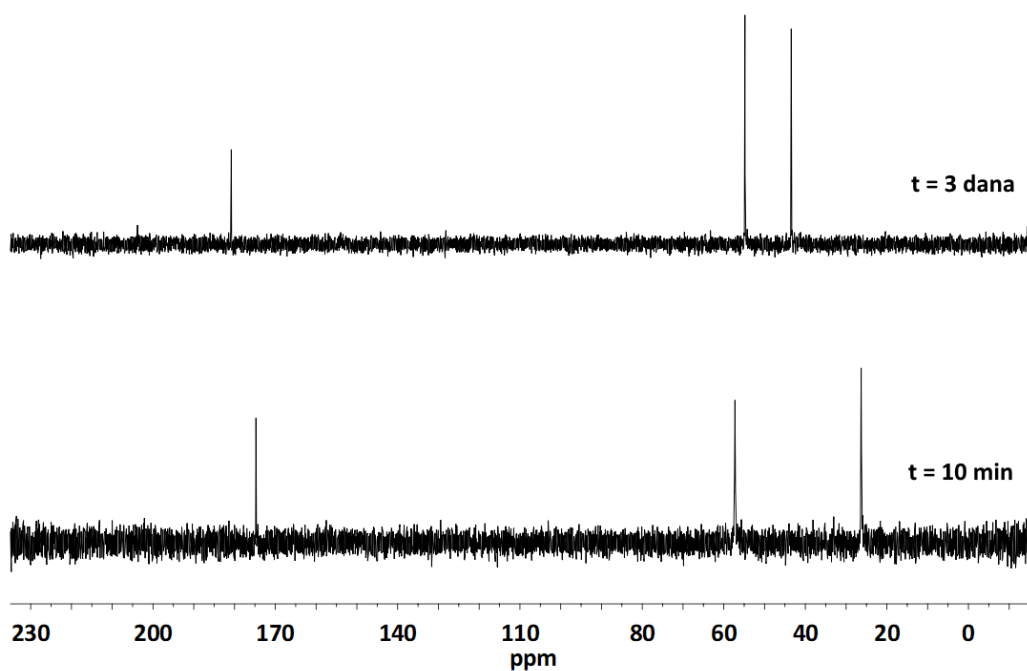
Slika D2. ^1H NMR spektri reakcijske smjese 10 mM AgNO_3 , 100 mM NaBH_4 i 10 mM CYS 10, 60 i 90 min nakon početka reakcije. Prekidi u spektru posljedica su izrezivanja artefakata nastalih kontaminacijom organskim otapalom.



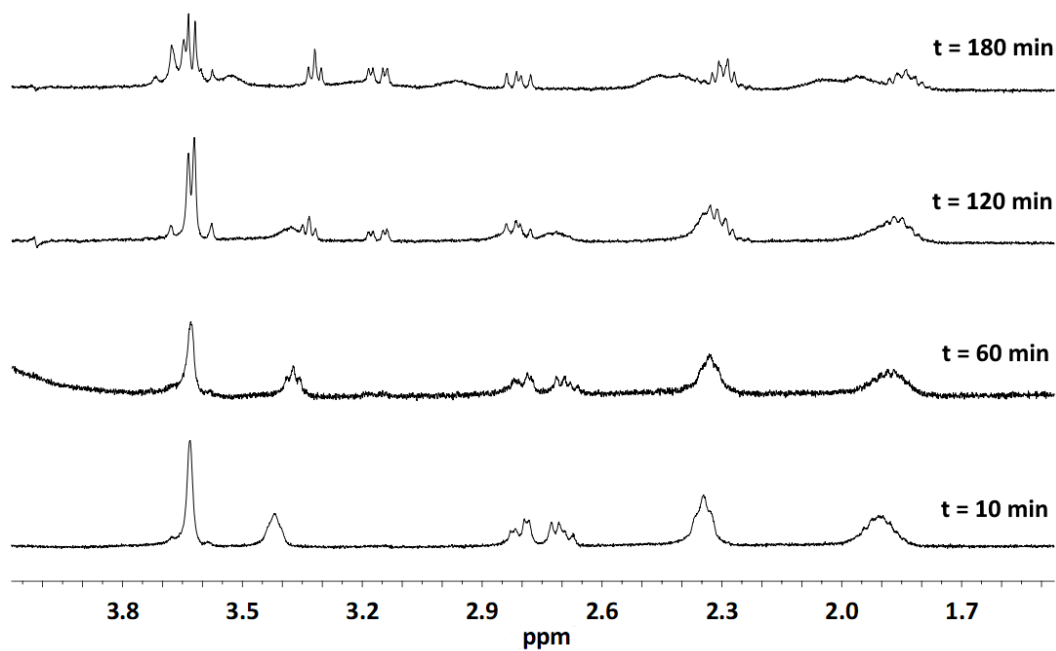
Slika D3. ^1H NMR spektri 10 mM CYS u smjesi s 10 mM AgNO_3 (dolje) ili 10 mM HAuCl_4 (gore).



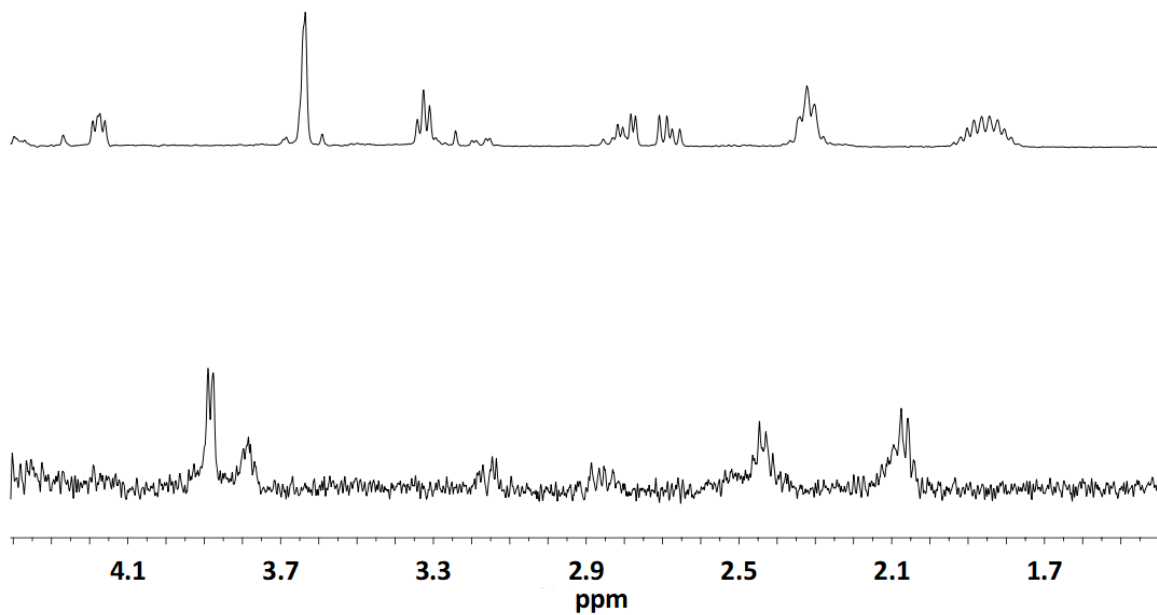
Slika D4. ^1H NMR spektri reakcijske smjese 10 mM CYS i 100 mM NaBH_4 10, 60, 90 i 180 min nakon početka reakcije . Signali ispod 0 ppm odgovaraju NaBH_4 .



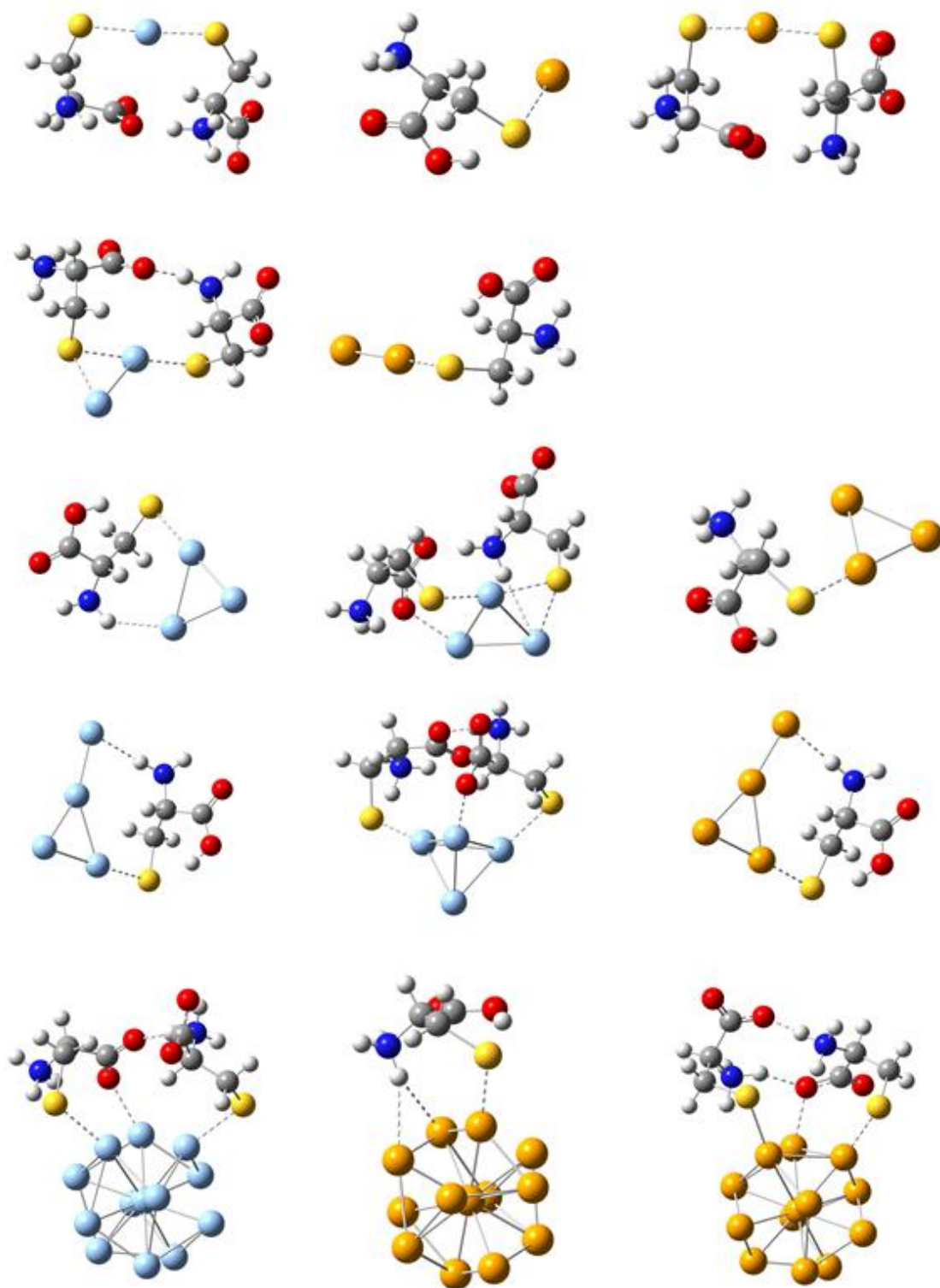
Slika D5. ^{13}C NMR spektri reakcijske smjese 10 mM NaBH_4 i 10 mM $^{13}\text{C}_3$ - ^{15}N -obilježenog CYS 10 min i 3 dana nakon početka reakcije.



Slika D6. ^1H NMR spektri reakcijske smjese 10 mM AgNO_3 , 100 mM NaBH_4 i 10 mM GSH 10, 60, 120 i 180 min nakon početka reakcije .



Slika D7. ^1H NMR spektri 10 mM GSH u smjesi s 10 mM AgNO_3 (dolje) ili 10 mM HAuCl_4 (gore).



Slika D8. Primjeri struktura kompleksa CYS ili cistina s Ag_n i Au_n ($n = 1, 2, 3, 4, 13$) klasterima u kojima je došlo do pucanja intermolekulskih veza. Takve strukture izbačene su iz analize.

8. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

| | |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AAS | atomska apsorpcijska spektrometrija |
| AgNP | nanočestica srebra |
| AIST | japanski Institut za napredne znanosti i tehnologije, nositelji baze NMR spektara (engl. <i>Institute of Advanced Industrial Science and Technology</i>) |
| AOT | bis(2-etilheksil)sulfosukcinat |
| AuNP | nanočestica zlata |
| B3LYP | Becke triparametrijski Lee-Yang-Parr funkcional |
| CYS | cistein (engl. <i>cysteine</i>) |
| DCF | 2',7'-diklorofluorescin |
| DCFH ₂ | 2',7'-diklorodihidrofluorescin |
| DCFH ₂ -DA | 2',7'-diklorodihidrofluorescin diacetat |
| DFT | teorija funkcionala gustoće (engl. <i>density functional theory</i>) |
| DLS | dinamičko raspršenje svjetlosti (engl. <i>dynamic light scattering</i>) |
| DLVO | Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek teorija |
| ELS | elektroforetsko raspršenje svjetlosti (engl. <i>electrophoretic light scattering</i>) |
| F-DA | fluorescein diacetat |
| G | Gibbsova (slobodna) energija |
| GAFF | generalizirano polje sila (engl. <i>generalized force field</i>) |
| GIAO | metoda baždarno-invarijantnih atomskih orbitala (engl. <i>gauge-invariant atomic orbitals</i>) |
| GSH | glutation, reducirani |
| GSSG | glutation, oksidirani |
| H | entalpija |
| HOMO | najviša popunjena molekulska orbitala (engl. <i>highest occupied molecular orbital</i>) |

| | |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IR | infracrvena spektroskopija (engl. <i>infrared spectroscopy</i>) |
| IRC | intrinzična reakcijska koordinata (engl. <i>intrinsic reaction coordinate</i>) |
| ISO | Međunarodna organizacija za standardizaciju (engl. <i>International Organization for Standardization</i>) |
| LANL2DZ | dvostruki zeta bazni skup razvijen u Los Alamos National Laboratory |
| MD | molekulska dinamika |
| MM | molekulska mehanika |
| MM-GBSA | metoda za izračun slobodne energije (engl. <i>molecular mechanics – generalised-Born surface area</i>) |
| MM-PBSA | metoda za izračun slobodne energije (engl. <i>molecular mechanics – Poisson-Boltzmann surface area</i>) |
| NADPH | nikotinamid adenin dinukleotid fosfat |
| NAO | prirodna atomska orbitala (engl. <i>natural atomic orbital</i>) |
| NBO | prirodna vezna orbitala (engl. <i>natural bond orbital</i>) |
| NHO | prirodna hibridna orbitala (engl. <i>natural hybrid orbital</i>) |
| NMR | nuklearna magnetska rezonancija |
| NP | nanočestica (engl. <i>nanoparticle</i>) |
| NPA | analiza prirodnih populacija (engl. <i>natural population analysis</i>) |
| NpT | izotermno-izobarni ansambl |
| NVE | mikrokanonski ansambl |
| NVT | kanonski ansambl |
| PBC | periodični rubni uvjeti (engl. <i>periodic boundary conditions</i>) |
| PBE | Perdew-Burke-Ernzerhof funkcional |
| PES | ploha potencijalne energije (engl. <i>potential energy surface</i>) |
| PLL | poli-L-lizin |
| PME | Ewaldova metoda s Fourierovom transformacijom (engl. <i>particle mesh Ewald</i>) |
| ppm | dijelovi na milijun (engl. <i>parts per million</i>) |

| | |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PVP | polivinilpirolidon |
| ROS | reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i>) |
| SASA | površina dostupna otapalu (engl. <i>solvent-accessible surface area</i>) |
| SERS | površinsko poboljšanje raspršenja Raman zračenja (engl. <i>surface-enhanced Raman scattering</i>) |
| SHAKE | algoritam ograničavanja gibanja vodikovih atoma tijekom MD simulacija |
| SIN-1 | 3-morfolinosindonimin hidroklorid |
| SMD | solvatacijski model zasnovan na gustoći (engl. <i>solvation model based on density</i>) |
| SOMO | polupopunjena molekulska orbitala (engl. <i>singly occupied molecular orbital</i>) |
| SPR | površinska plazmonska rezonancija (engl. <i>surface plasmon resonance</i>) |
| SRCE | Sveučilišni računski centar |
| TEM | transmisijska elektronska mikroskopija (engl. <i>transmission electron microscopy</i>) |
| TIP3P | model molekula vode u kojem su duljine veza i kutovi fiksirani, a elektrostatske interakcije definirane preko 3 točkasta naboja (engl. <i>transferable intermolecular potential 3-point</i>) |
| TMS | tetrametilsilan |
| TPSS | Tao-Perdew-Staroverov-Scuseria funkcional |
| TS | prijelazno stanje (engl. <i>transition state</i>) |
| ζ | zeta potencijal |
| UV/Vis | ultraljubičasto/vidljivo područje (engl. <i>ultraviolet/visible</i>) |
| VMD | program za vizualizaciju kemijskih struktura (engl. <i>Visual Molecular Dynamics</i>) |
| XSW | tehnika stojnih valova X zraka (engl. <i>X-ray standing wave</i>) |

9. ŽIVOTOPIS

Barbara Pem rođena je u Zagrebu 29.1.1994., gdje je završila osnovnu školu i gimnaziju. Od 2012. do 2017. studirala je farmaciju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu, te diplomirala s velikom pohvalom (Magna cum Laude) kao najbolji student u generaciji. Tijekom studija primala je Državnu stipendiju za darovite studente i Stipendiju Grada Zagreba, te je 2017. primila Rektorovu nagradu za individualni znanstveni rad. Od 2017. zaposlena je kao asistent na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, te 2018. upisuje poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu. Sudjeluje u provođenju dvaju znanstvenih projekata Hrvatske zaklade za znanost (NanoFaceS i SENDER) te dvaju Horizon2020 projekata (RiskGone i Phoenix). Za vrijeme studija nekoliko je puta odlazila na studijske boravke u inozemstvo kao dobitnica europskih stipendija. Boravila je 2 mjeseca na Institutu za kemiju Sveučilišta u Grazu (Austrija) kao dobitnica stipendije zaklade FEBS (Federation of European Biochemical Societies), 2 mjeseca na Sveučilištu Zapadne Engleske u Bristolu (UK) u sklopu Short Term Scientific Mission programa COST akcije Nano2Clinic, 3 mjeseca na Institutu za medicinu rada u Edinburghu (UK) kao dobitnica stipendije British Scholarship Trust te 1 mjesec u Leibniz Institutu za fotoničku tehnologiju u Jeni (Njemačka) u sklopu hrvatsko-njemačkog bilateralnog projekta. Objavila je 16 znanstvenih radova u CC časopisima, održala jedno predavanje te sudjelovala na više domaćih i međunarodnih kongresa s posterskim priopćenjima.

Znanstveni radovi (CC):

1. Pem B, Ćurlin M, Domazet Jurašin D, Vrček V, Barbir R, Micek V, Fratila RM, Martinez de la Fuente J, Vinković Vrček I. Fate and transformation of silver nanoparticles in different biological conditions. *Beilstein J Nanotechnol*, 2021, 12, 665-679.
2. Tariba Lovaković B, Barbir R, Pem B, Goessler W, Ćurlin M, Micek V, Debeljak Ž, Božičević L, Ilić K, Pavičić I, Gorup D, Vinković Vrček I. Sex-related response in mice after sub-acute intraperitoneal exposure to silver nanoparticles. *NanoImpact*, 2021, 23, 100340.
3. Erceg I, Selmani A, Gajović A, Radatović B, Šegota S, Ćurlin M, Strasser V, Kontrec J, Kralj D, Maltar-Strmečki N, Barbir R, Pem B, Vinković Vrček I, Dutour Sikirić M. Precipitation at Room Temperature as a Fast and Versatile Method for Calcium Phosphate/TiO₂ Nanocomposites Synthesis. *Nanomaterials*, 2021, 11, 1523.

4. Murugadoss S, Vinković Vrček I, Pem B, Jagiello K, Judzinska B, Sosnowska A, Martens M, Willighagen EL, Puzyn T, Dusinska M, Cimpan MR, Fessard V, Hoet PH. A strategy towards the generation of testable adverse outcome pathways for nanomaterials. *ALTEX*, 2021, doi:10.14573/altex.2102191
5. Opačak S, Babić D, Perić B, Marinić Ž, Smrečki V, Pem B, Vinković Vrček I, Kirin S. A ferrocene-based pseudopeptide chiroptical switch. *Dalton Trans*, 2021, 13, 4504-4511.
6. Pem B, Toma M, Vrček V, Vinković Vrček, I. Combined NMR and Computational Study of Cysteine Oxidation during Nucleation of Metallic Clusters in Biological Systems. *Inorg Chem*, 2021, 60, 4144-4161.
7. Ilić K, Hartl S, Galić E, Tetyczka C, Pem B, Barbir R, Milić M, Vinković Vrček I, Roblegg E, Pavičić I. Interaction of differently coated silver nanoparticles with skin and oral mucosal cells. *J Pharm Sci*, 2021, 110, 2250-2261.
8. Barbir R, Pem B, Kalčec N, Kastner S, Podlesnaia K, Csáki A, Fritzsche W, Vinković Vrček I. Application of Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy to Investigate a Nano–Bio Interface. *Langmuir*, 2021, 37, 1991-2000.
9. Milić M, Vuković B, Barbir R, Pem B, Milić M, Šerić V, Fröhlich E, Vinković Vrček I. Effect of differently coated silver nanoparticles on hemostasis. *Platelets*, 2020, 32, 5, 651-661.
10. Galić E, Ilić K, Hartl S, Tetyczka C, Kasemets K, Kurvet I, Milić M, Barbir R, Pem B, Erceg I i sur. Impact of surface functionalization on the toxicity and antimicrobial effects of selenium nanoparticles considering different routes of entry. *Food Chem Toxicol*, 2020, 144, 111621.
11. Selmani A, Ulm L, Kasemets K, Kurvet I, Erceg I, Barbir R, Pem B, Santini P, Delač Marion I, Vinković T i sur. Stability and toxicity of differently coated selenium nanoparticles under model environmental exposure settings. *Chemosphere*, 2020, 250, 126265.
12. Vrandečić, K, Ćosić J, Ilić J, Ravnjak B, Selmani A, Galić E, Pem B, Barbir R, Vinković Vrček I, Vinković T. Antifungal activities of silver and selenium nanoparticles stabilized with different surface coating agents. *Pest Manag Sci*, 2020, 76, 2021-2029.
13. Pem B, Pongrac IM, Ulm Lea, Pavičić I, Vrček V, Domazet Jurašin D, Ljubojević M, Krivohlavek A, Vinković Vrček I. Toxicity and safety study of silver and gold nanoparticles functionalized with cysteine and glutathione. *Beilstein J Nanotechnol*, 2019, 10, 1802-1817.

14. Muna M, Blinova I, Kahru A, Vinković Vrček I, Pem B, Orupõld K, Heinlaan M. Combined Effects of Test Media and Dietary Algae on the Toxicity of CuO and ZnO Nanoparticles to Freshwater Microcrustaceans *Daphnia magna* and *Heterocypris incongruens*: Food for Thought. *Nanomaterials*, 2019, 9, 23-36.
15. Pem B, González-Mancebo D, Moros M, Ocana M, Becerro AI, Pavičić I, Selmani A, Babič M, Horak D, Vinković Vrček I. Biocompatibility assessment of up- and down-converting nanoparticles: implications of interferences with in vitro assays. *Methods Appl Fluores*, 2019, 7, 014001.
16. Pem B, Vrček V. Substituent effects on the stability of 1, 4-benzodiazepin-2-one tautomers. A density functional study. *International J Quantum Chem*, 2018, 118, e25523.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

Mehanizam interakcije biotiola s nanočesticama zlata i srebra

Barbara Pem

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada

Sažetak

Transformacije nanočestica zlata (AuNP) i srebra (AgNP) u biološkim sustavima utječu na njihov biološki identitet, ponašanje i biološke učinke. Zbog svojeg velikog afiniteta prema sumporu, AgNP i AuNP lako stupaju u interakcije s endogenim biotiolima, pa je razumijevanje takvih interakcija preduvjet njihove uspješne biomedicinske primjene. Cilj ove doktorske disertacije bio je utvrditi mehanizam interakcije i vezanja biotiola s AgNP i AuNP kombiniranom primjenom eksperimentalnih i računalnih metoda. Nanočestice su pripremljene metodom redukcije, te su karakterizirane obzirom na oblik, raspodjelu veličina, zeta potencijal i koloidnu stabilnost pomoću mikroskopskih i spektroskopskih tehnika. Direktna interakcija s biotiolima praćena je nuklearnom magnetskom rezonancijskom spektroskopijom, a primjenom kvantno-kemijskih i molekulsko-dinamičkih metoda potvrđen je pretpostavljeni mehanizam tih interakcija. Utvrđeno je da se prilikom interakcije biotiola s atomima Ag i Au na nanopovršini događa njihova oksidativna dimerizacija u disulfide. Mehanizam oksidativne dimerizacije odvija se u dva koraka: 1) oksidacija tiolne skupine u sulfensku kiselinu posredovana reaktivnim kisikovim vrstama i 2) reakcija tiola i sulfenske kiseline uz oslobađanje vode, katalizirana s Ag i Au. Nastali disulfidi adsorbiraju na površinu AgNP i AuNP putem nekovalentnih interakcija, u kojima sudjeluju sve njihove funkcionalne skupine. Izračunom energije vezanja potvrđena je spontanost adsorpcije i veći afinitet vezanja disulfida u odnosu na tirole. Stoga je konačni produkt interakcija metalnih površina s tiolima nastanak AgNP i AuNP obloženih disulfidima. Ova saznanja pridonose razumijevanju transformacija nanočestica u prisutnosti biotiola što je važno za procjenu njihovih bioloških učinaka i sigurnosti primjene u biomedicini.

Ključne riječi: nanočestice srebra, nanočestice zlata, cistein, glutation, nuklearna magnetska rezonancija, teorija funkcionala gustoće, molekulska dinamika

Rad sadrži 110 stranica, 48 slika, 16 tablica i 327 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

1. mentorica: dr. sc. Ivana Vinković Vrček, znanstvena savjetnica

2. mentor: dr. sc. Valerije Vrček, redovni profesor u trajnom zvanju

Ocjenjivači: dr. sc. Mario Jug, redovni profesor

dr. sc. Ivana Perković, izvanredna profesorica

dr. sc. Robert Vianello, znanstveni savjetnik

Datum prihvatanja rada [upisuje se naknadno]

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

Mechanism of interaction of biothiols with silver and gold nanoparticles

Barbara Pem

Institute for Medical Research and Occupational Health

Summary

Transformations of gold and silver nanoparticles (AuNPs and AgNPs) impact their biological effects, behaviour and fate in the human body. Interaction of NPs with endogenous biothiols is one of the major events leading to those transformations, thus the understanding of their interplay is a prerequisite for biomedical applications of NPs. This study was conducted on a model system consisting of cysteine (CYS) or glutathione (GSH) and AgNPs or AuNPs, by combining experimental and theoretical approaches. NPs were prepared by the reduction method and their shape, size distribution, zeta potential and dissolution were determined by microscopy and spectroscopic techniques. Direct interaction of biothiols with Ag and Au was monitored during NP preparation by nuclear magnetic resonance spectroscopy, and the reaction mechanism and processes on the metal surface were determined by quantum-chemical and molecular dynamics methods. In the reaction mixture, simultaneously with the formation of nanoparticles, oxidative dimerization of biothiols occurs and disulphides bind to the nanoparticle surface. Mechanism of oxidative dimerization consists of two steps: 1) oxidation of the thiol group to sulfenic acid by reactive oxygen species, and 2) reaction of thiol with sulfenic acid involving the release of one water molecule (Ag and Au act as catalysts). Generated disulphides adsorb to the AgNP and AuNP surface through non-covalent interactions with participation from all functional groups. Binding energy calculations confirm the adsorption is spontaneous, and that disulphides bind with higher affinity compared to thiols. Thus, the final product of the interaction of metallic surfaces with thiols is the formation of disulphide-coated AgNPs and AuNPs. These findings contribute to the understanding of biotransformations of both biothiols and particles that are important for the application of nanoparticles in biomedicine.

Keywords: silver nanoparticles, gold nanoparticles, cysteine, glutathione, nuclear magnetic resonance, density functional theory, molecular dynamics

Thesis contains 110 pages, 48 figures, 16 tables, 327 citations. The original is in Croatian language.

1st supervisor: Dr Ivana Vinković Vrček, Scientific Advisor

2nd supervisor: Dr Valerije Vrček, Full Professor with tenure

Reviewers: Dr Mario Jug, Full Professor

Dr Ivana Perković, Associate Professor

Dr Robert Vianello, Scientific Advisor

Thesis accepted [Upisuje se naknadno]