UČINAK RAZLIČITIH NANOČESTICA SREBRA NA HEMOSTAZU

Milić, Marija

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:290366

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Marija Milić

UČINAK RAZLIČITIH NANOČESTICA SREBRA NA HEMOSTAZU

Doktorska disertacija

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Marija Milić

UČINAK RAZLIČITIH NANOČESTICA SREBRA NA HEMOSTAZU

Doktorska disertacija

Osijek, 2021.

Mentor rada: doc. dr. sc. Vatroslav Šerić, mag. med. biochem., spec. med. biokem.

Komentor rada: doc. dr. sc. Ivana Vinković Vrček, mag. med. biochem., znan. savj.

Rad ima: 90 stranica

Ova doktorska disertacija izrađena je u sklopu znanstvenoga projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Značaj interakcija metalnih nanočestica sa sumpornim biomolekulama za nano-bio sučelje - NanoFaceS“ (HRZZIP-2016-06-2436) voditeljice doc. dr. sc. Ivane Vinković Vrček.

„Čovjek ne bi u potpunosti uživao u ljepoti i bogatstvu svoga znanja kada u njegovu stjecanju ne bi trebalo prevladati neke poteškoće. Osvajanje vrhunaca ne bi bilo ni upola lijepo kada na tome putu ne bi trebalo prijeći mračne doline.“

Hellen Keller

Puno je pojedinaca koji su mi na razne načine pomogli u ostvarenju ove doktorske disertacije. Žao mi je što ih sve ne mogu spomenuti.

Zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Vatroslavu Šeriću što me nagovorio da upišem poslijediplomski studij i neprestano poticao da ga završim.

Zahvaljujem komentorici doc. dr. sc. Ivani Vinković Vrček koja je osmislila i vodila izradu doktorata, uložila puno svoga vremena i truda, rješavala sve probleme, hrabrila me i bila izuzetno strpljiva sa mnom.

Zahvaljujem kolegicama magistrama Barbari Vuković i Blaženki Dobrošević na pomoći pri izradi dijela doktorskoga istraživanja.

Zahvaljujem kolegicama i svim ostalim suradnicima Odjela za hematološku dijagnostiku i koagulaciju na podršci i strpljenju.

Zahvaljujem roditeljima što su mi bili duhovna podrška tijekom izrade doktorata.

I na kraju**,** beskrajno zahvaljujem svojoj užoj obitelji na strpljenju. Žao mi je što sam vam oduzela nešto dragocjeno, a to je vrijeme provedeno u zajedništvu.

Rad posvećujem svojoj pokojnoj braći Danijelu i Kristijanu.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Uporaba srebra u medicini 1

1.2. Svojstva i priprava nanočestica srebra 2

1.3. Biološki učinci nanočestica srebra 5

1.4. Hemokompatibilnost proizvoda za medicinsku uporabu 8

1.5. Hemostaza 9

1.6. Laboratorijske metode ispitivanja hemostaze 11

1.7. Eritrociti i hemostaza 14

1.8. Trombociti 15

1.9. Interakcija trombocita s nanočesticama 16

2. HIPOTEZA 20

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 21

4. MATERIJALI I METODE 22

4.1. Ustroj studije 22

4.2. Materijali 22

4.2.1. Uzorkovanje periferne venske krvi, priprema plazme, plazme bogate trombocitima i opranih trombocita 22

4.3. Metode 23

4.3.1. Priprema nanočestica srebra 23

4.3.2. Karakterizacija nanočestica srebra 24

4.3.3. Hemolitička aktivnost nanočestica srebra 25

4.3.4. Učinak nanočestica srebra na agregaciju trombocita 26

4.3.5. Koagulacijski testovi PV, APTV i TV 27

4.3.6. Analiza stvaranja trombina 28

4.3.7. Rotacijska tromboelastometrija 28

4.3.8. Citotoksičnost nanočestica srebra 29

4.3.9. Ulazak nanočestica srebra u trombocite 30
4.3.10. Promjene potencijala mitohondrijske membrane trombocita 31
4.3.11. Određivanje biljega oksidativnog stresa 31
4.3.12. Aktivacija trombocita 32
4.4. Statističke metode 33
5. REZULTATI 34
5.1. Fizikalno-kemijska svojstva nanočestica sreba 34
5.2. Hemolitički učinak nanočestica sreba 36
5.3. Učinak nanočestica sreba na hemostazu 38
5.3.1. Učinak nanočestica sreba na primarnu hemostazu 38
5.3.2. Učinak nanočestica sreba na sekundarnu hemostazu 41
5.3.3. Učinak nanočestica srebra na globalnu hemostazu u punoj krvi 47
5.4. Interakcija nanočestica srebra s trombocitima 50
5.4.1. Citotoksični učinci nanočestica srebra 50
5.4.2. Ulazak nanočestica srebra u trombocite 52
5.4.3. Oksidacijski stres u trombocitima 54
5.4.4. Oštećenja mitohondrijske membrane u trombocitima 57
5.4.5. Učinak nanočestica srebra na aktivaciju trombocita 58
6. RASPRAVA 62
7. ZAKLJUČCI 73
8. SAŽETAK 74
9. SUMMARY 76
10. LITERATURA 78
11. ŽIVOTOPIS 88
12. PRILOZI 90

POPIS KRATICA

ADP - adenozin difosfat

AOT - natrijev bis (2-etilheksil) - sulfosukcinat

APTV - aktivirano parcijalno protrombinsko vrijeme

AUC - površina ispod krivulje (od engl. *area under the curve*)

BSA - goveđi serumski albumin (od engl. *bovine serum albumin*)

CFT - vrijeme stvaranja ugruška (od engl. *clot formation time*)

Cmax - maksimalna brzina nastanka trombina

CT - vrijeme zgrušavanja (od engl. *clotting time*)

DCFH-DA - diklorofuorescein diacetat

d_H - hidrodinamički promjer

DHE - dihidroetidij

DiOC6 - 3,3′-diheksiloksakarbocijanin jodid

DLS - dinamičko raspršenje svjetlosti (od engl. *dinamic light scattering*)

ELS - elektroforetsko raspršenje svjetlosti (od engl. *electrophoretic light scattering*)

ETP - endogeni trombinski potencijal

FSC - svjetlost raspršena na stanicama pod kutom od 90° (od engl. *forward scatter*)

GP - glikoprotein

GSH - reducirani glutation

HMWK - visokomolekularni kininogen (od engl. *high molecular weight kininogen*)

ISO - Međunarodna organizacija za normizaciju (od engl. *International Organization for Standardization*)

LDH - laktat dehidrogenaza

MBM - monoklorobiman

MCF - maksimalna čvrstoća ugruška (od engl. *maximum clot firmness*)

MMP - potencijal mitohondrijske membrane (od engl. *mitochondrial membrane potential*)

nanoAg - nanočestice srebra

NATEM - nativna tromboelastometrija (od engl. *nonactivated thromboelastometry*)

PAMAM - poliamidoamin

PBS - fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (od engl. *phosphate buffered saline*)

PdI - indeks polidisperzije (od engl. *polydispersity indeks*)

PLL - ε-poli-L-lizin

PLNP - polistirenske lateks nanočestice (od engl. *polystyrene nanoparticles*)

POC - testiranje uz bolesnika (od engl. *point of care*)

PRP - plazma bogata trombocitima (od engl. *platelet rich plasma*)

PV - protrombinsko vrijeme

PVP - polivinilpirolidon

ROS - reaktivni kisikovi spojevi (od engl. *reactive oxygen species*)

ROTEM - rotacijska tromboelastometrija

SSC - svjetlost raspršena na stanicama pod kutom od 20° (od engl. *side scatter*)

TEM - transmisijski elektronski mikroskop

TGT- analiza stvaranja trombina (od engl. *thrombin generation test*)

TRAP-6 - heksapeptidni aktivator receptora trombina (od engl. *thrombin receptor activating peptide*)

TV - trombinsko vrijeme

vWF - von Willebrandov faktor

WP - oprani trombociti (od engl. *washed platelets*)

1. UVOD

1.1. Uporaba srebra u medicini

Čovjek odavno upotrebljava srebro (lat. *argentum*) u različite svrhe od kojih je jedna i njegovo antibakterijsko djelovanje. Još je Hipokrat zapisao da srebro ima ljekovita svojstva (1), a u srednjem vijeku se srebrni nitrat (lat. *lapis infernalis*) koristio za liječenje različitih upalnih procesa i kao sredstvo za uklanjanje bradavica. Prije pojave antibiotika koloidno srebro se početkom 20. stoljeća koristilo kao antibakterijsko sredstvo u različitim pripravcima (otopine za oralnu primjenu, kreme i sl.), pa i za prevenciju infekcije očiju gonokokima kod novorođenčadi (2).

Razvojem nanotehnologije 80-tih godina 20. stoljeća srebro se sve više počinje primjenjivati u obliku nanočestica srebra (nanoAg) jer kao takvo ima jače baktericidno djelovanje (3)(4)(5). Od prvog medicinskog proizvoda s nanoAg-om, zavoja za opekotine, broj proizvoda koji sadrže nanoAg vrtoglavo raste. Danas se na godišnjoj razini proizvede oko 320 tona nanoAg-a (6) koje se ugrađuje u razne proizvode od onih široke potrošnje do biomedicinskih proizvoda.

Američki institut Woodrow Wilson International Center for Scholars vodi registar proizvoda s nanomaterijalima (7) iz kojeg je vidljivo da se njihov broj u posljednjih deset godina povećao približno trideset puta te da su najzastupljeniji proizvodi (24 %) upravo oni koji sadrže nanoAg (8). NanoAg se koristi u velikom broju medicinskih proizvoda zbog baktericidnog (3)(4)(5), fungicidnog (9)(10), virustatskog (11)(12), protuupalnog djelovanja, a privlačna je njegova uporaba u oblogama za rane jer ubrzava zarastanje (10). Tako se nanoAg najčešće koristi u povojima za rane i opekotine, ortopedskim i kardiovaskularnim implantatima, premazima kirurških konaca i instrumenata, urinskim i venskim kateterima, stomatološkom priboru i sredstvima za kontracepciju (8)(13). Osim biocidne primjene, nanoAg se u medicini koristi i u dijagnostičke svrhe, te za ciljanu dopremu lijekova do željenih tkiva i/ili organa (10)(14). Zbog biocidnoga djelovanja nanoAg ima još veću primjenu u proizvodima široke potrošnje te se primjerice ugrađuje u odjeću kako bi spriječio razvoj bakterija koje uzrokuju neugodne mirise (12), dodaje se deterdžentima i kozmetičkim proizvodima, dodaje se premazima za hladnjake i spremnike za hranu kako bi se duže sačuvala hrana, a također se koristi za dezinfekciju vode (8).

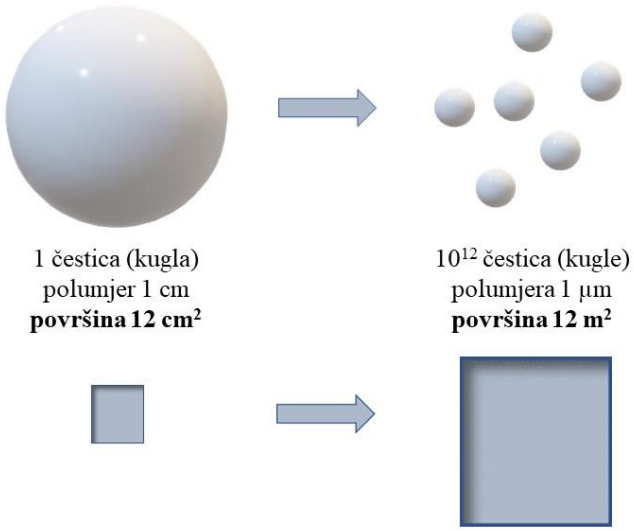
Tako je nanoAg masovno ušlo u sve pore ljudskoga života, a spoznaje o njegovoj sigurnosti za zdravlje ljudi i okoliša, i zakonska regulativa znatno kasne za njegovom rastućom uporabom. Manipulacijom fizikalno-kemijskih karakteristika nanoAg-a tijekom faze dizajna mogu se postići željena svojstva u smjeru jačega ili produženoga baktericidnoga djelovanja, novih terapijskih i dijagnostičkih mogućnosti, hemokompatibilnosti i sl.

1.2. Svojstva i priprava nanočestica srebra

Prema definiciji ISO-a (od engl. *International Organization for Standardization*) nanočestice su čestice koje imaju barem jednu dimenziju u rasponu od 1 do 100 nm (15) dok je definicija Europske komisije iz 2011. g. malo opširnija i detaljnija te navodi: „Nanomaterijali su prirodno, slučajno ili namjerno proizvedeni materijali koji sadrže slobodne čestice, čestice u aglomeratima ili agregatima u kojima više od 50 % čestica prema raspodjeli veličine ima jednu vanjsku dimenziju u rasponu od 1-100 nm“ (16). U usporedbi s biološkim molekulama nanočestice veličine 10 nm otprilike su velike kao molekula imunoglobulina G. Nanočestice mogu biti prirodnog podrijetla kao što su na primjer čestice pepela iz vulkana, čestice sumpora u izvorskoj vodi bogatoj sumporovodikom i nanočestice koje stvaraju neke bakterije i gljivice prilikom detoksifikacije (17). Nanočestice antropogenog porijekla stvara čovjek slučajno ili namjerno. Slučajno stvorene nanočestice su na primjer čestice platine koje se otpuštaju u okoliš iz automobilskih katalizatora za gorivo (17), a namjerno proizvedene nanočestice stvara čovjek s određenom namjerom (14). Nanočestice mogu biti različitog oblika (kugle, kocke, štapići, vlakna, cjevčice itd.) i različitog sastava (metalne, ugljikove, lipidne, polimerne itd.).

S obzirom na veličinu koja se nalazi na nanoskali, nanočestice imaju iznimno veliki omjer površine i volumena iz kojeg proizlaze njihova jedinstvena fizikalno-kemijska svosjtva. Čestica oblika kugle polumjera 1 cm ima površinu 12 cm^2. Ukoliko takvu česticu razbijemo na male čestice polumjera 1 μm, nastat će 10^{12} čestica (Slika 1.1.). One sve zajedno imaju isti ukupni volumen kao početna čestica, ali im je ukupna površina 12 m^2 što je povećanje površine od 10000 puta. Što su čestice manje, to im je površina veća pa je i veći broj atoma na površini čestice. Zbog toga su nanočestice reaktivnije od makročestica te se na nanorazini mijenjaju kemijska, mehanička i fizikalna svojstva materijala. Tako materijali na nanorazini mogu postati tvrđi, rastezljiviji, veće električne ili toplinske vodljivosti, drugačijih optičkih ili magnetskih svojstava i sl. Neka svojstva nanočestica mogu se precizno regulirati promjenom veličine nanočestice, ali često su promjene svojstava neočekivana (18). Upravo su ovi fenomeni zaslužni

za novu, izuzetno raznoliku i sve veću primjenu nanočestica u raznim industrijskim granama, energetici, medicini, zaštiti okoliša, računarstvu, u vojne svrhe, u svakodnevnom životu itd., a nanotehnologija je postala jedna od ključnih tehnoloških grana.



Slika 1.1. Prikaz odnosa veličine i površine čestica

Na nanorazini se pojačava biocidno djelovanje srebra. Kao i ostali plemeniti metali srebro ne reagira s vodom i kiselinama, a u nazočnosti kisika ono polako otpušta male količine iona srebra (2) koji su odgovorni za njegovo biocidno djelovanje (19). Međutim, količina otpuštenih iona srebra s površine elementarnog srebra je premala za učinkovito biocidno djelovanje (2). Zbog reaktivnosti nanoAg-a s njegove površine se otpušta veća količina iona srebra, a kinetika otpuštanja ovisi o veličini nanočestica, njihovom obliku i površinskoj funkcionalizaciji, te pH-u medija, temperaturi, ionskoj jakosti i sastavu medija u kojem se nanočestice nalaze. Ovaj proces je ubrzan interakcijom nanoAg-a s raznim organskim ili anorganskim molekulama koji su sastavni dio biološkog medija (2). Smatra se da je nanoAg poput depoa iona srebra s kojeg se polako otpuštaju ioni pa stoga nanoAg ima produženo baktericidno djelovanje. Brojna su istraživanja u kojima se usporedila toksičnost nanoAg-a i iona Ag-a na eukariotske stanice, međutim još uvijek nema jasnih zaključaka jesu li uzrokom toksičnosti samo ioni Ag-a, nanoAg ili kombinacija oba oblika srebra (20)(21)(22).

NanoAg se može pripraviti različitim fizikalnim ili kemijskim metodama. Fizikalne metode temelje se na taloženju iz plinovite faze ili laserskoj ablaciji, a kemijske na redukciji srebrnih

soli, najčešće srebrnog nitrata uz reducense borov hidrid, citrat ili askorbat (18). Podešavanjem eksperimentalnih uvjeta te primjenom različitih reducensa i površinskih omotača mogu se sintetizirati nanočestice različite veličine, oblika i površinske funkcionalizacije (23). Biološke metode priprave nanoAg-a se sve više istražuju zbog jednostavnosti i ekološke prihvatljivosti. U njima se primjenjuju mikroorganizmi ili enzimi, te ekološki prihvatljivi reducensi i površinski omotači (10).

Površinski omotači se tijekom sinteze metalnih nanočestica pirmjenjuju za postizanje koloidne stabilnosti. Stabilizacijske molekule sprječavaju nastanak aglomerata i agregata jer se takve čestice međusobno odbijaju zbog elektrostatskih, steričkih ili elektrosteričkih sila (24). Za stabilizaciju nanoAg-a najčešće se koriste surfaktanti, polimeri i polielektroliti. Često korišteni omotači su polivinilpirolidon (PVP), polietilenglikol, citrat, albumin i kolagen (10). Različiti omotači, osim što stvaraju različit naboj na nanočesticama, utječu i na ostala fizikalno-kemijska svojstva te određuju njihovo ponašanje u biološkom mediju (25). Omotači na nanočesticama mogu služiti i za dodavanje funkcionalnih grupa poput antitijela i polisaharida kako bi se omogućilo specifično vezanje nanočestice na određenu stanicu tj. tkivo ili organ. Ovako ciljano dopremanje nanočestica do određenog tkiva važno je za dijagnostičku i terapijsku primjenu nanočestica (26). U Tablici 1.1. prikazane su već poznate i najčešće primjenjivane molekule kojima se oblažu nanočestice kako bi se postigla određena funkcionalnost. Tako se, na primjer, nanočestice oblažu polietilenglikolom (PEG) kako bi se izbjegao imunološki odgovor organizma i produžio im poluživot u plazmi (27).

Tablica 1.1. Uobičajene strategije oblaganja nanočestica za određenu primjenu u medicini

Svrha	**Omotač**
Ciljano prepoznavanje stanica	antitijela, specifični ligandi, enzimi
Ciljana doprema lijekova	liposomi, polimerne nanočestice
Imunokompatibilnost	polietilenglikol, poli (akrilna kiselina)
Biokompatibilnost	kitozan, polivinil alkohol, hijaluronska kiselina

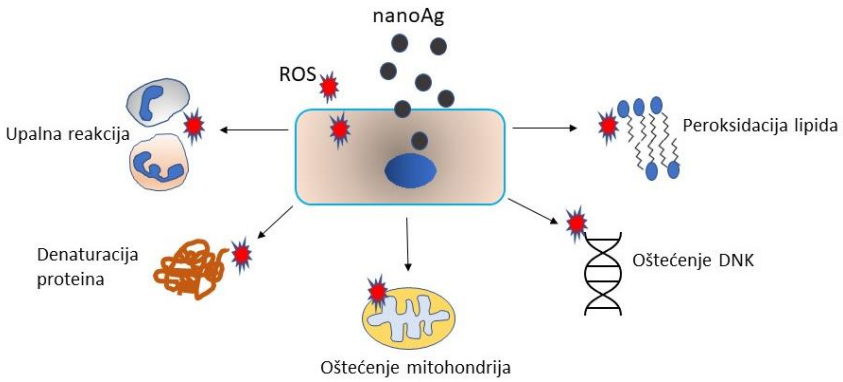
1.3. Biološki učinci nanočestica srebra

Zbog sve većeg broja bakterija rezistentnih na antibiotike neprestano se traga za novim terapijskim mogućnostima. Poseban problem predstavlja pojava multirezistentnih bakterija koje su otporne na antibiotike različitih skupina. Stoga su netradicionalni antimikrobni pripravci poput nanoAg-a posebno zanimljivi (28), ali unatoč dokazanom baktericidnom, fungicidnom i virustatskom djelovanju nanoAg-a, još nije potpuno poznat mehanizam kojim se ovo djelovanje ostvaruje. Smatra se da je otpuštanje iona Ag-a osnova baktericidnog djelovanja na način da reagiraju s proteinima na staničnoj membrani bakterija, inhibiraju respiracijski proces, izazivaju oksidacijki stres i ometaju razmnožavanje bakterija (29). Istražuje se i djelotvornost nanoAg-a u kombinaciji s postojećim antibioticima i može li primjena surfaktanata i anionskih deterdženata na površini nanoAg-a pojačati mikrobicidnu aktivnost (28). Nažalost, i za nanoAg je uočen nastanak rezistencije kao npr. za jedan soj *E.coli* (30). Idealno antimikrobno sredstvo treba biti maksimalne biocidne učinkovitosti, a minimalne toksičnosti za čovjeka i okoliš. Neophodna su još brojna istraživanja kojima će se utvrditi koja su ključna fizikalno-kemijska svojstva nanoAg-a kako bi ono imalo navedene karakteristike idealnog antimikrobnog sredstva (29).

Temeljni problem uporabe nanočestica, a posebno onih namijenjenih u terapijske ili dijagnostičke svrhe je toksičnost za ljudski organizam. Važan čimbenik toksičnosti nanočestica je mogućnost njihova prolaska kroz biološke barijere i ulaska u stanice kojima nanočestice mogu poremetiti normalnu staničnu fiziologiju i izazvati različite štetne učinke. Brojna su *in vitro* i *in vivo* istraživanja dokazala da nanoAg prodiru kroz obrambene barijere i ulaze u stanice, tkiva i organe (31)(32)(33)(34)(35)(36). Tako je pokazano da nanoAg ulaze i u trombocite (37). Vjerojatni mehanizmi ulaska nanočestica u stanice su difuzija, adhezivne interakcije, pinocitoza, endocitoza i fagocitoza (38). Interakciju nanoAg-a sa stanicama uvelike određuju njihova fizikalno-kemijska svojstva, a osim veličine, oblika i vrste površinske funkcionalizacije, stanični učinci nanoAg-a ovise i o koncentraciji (dozi) i vremenu izloženosti (27). Električni naboj na nanočesticama je izuzetno važan za adsorpciju nanočestice na stanicu i njihovu translokaciju preko stanične membrane. Elektrostatsko privlačenje suprotnih naboja omogućuje pozitivno nabijenim nanočesticama adheziju na membranu stanice koja je negativno nabijena. Tako je za pozitivno nabijene nanočestice zlata dokazano da se vežu za membranu i brže ulaze u stanicu u odnosu na negativno nabijene nanočestice zlata iste veličine i oblika (27). Veličina nanočestica i njihov ulazak u stanicu su u obrnuto proporcionalnom odnosu što je

pokazano u mnogim dosadašnjim istraživanjima (39)(27). Osim veličine važan je i oblik nanočestice, pa je pokazano da su kuglaste i štapićaste nanočestice zlata bile toksičnije od zvjezdastih i prizmatskih nanočestica na HeLa stanicama (27). Kada se razmatra dozimetrija, citotoksični učinci nanoAg nisu isti za sve tipove stanica, pa se toksični učinci ispoljavaju različito kod različitih tipova stanica (39) (40)(41).

U kontaktu s membranom stanice nanoAg može stupiti u interakciju s različitim membranskim receptorima i putem njih aktivirati neke od signalnih putova u stanici, a može izazvati i oštećenja membrane zbog čega dolazi do naglog porasta koncentracije kalcija unutar stanice i posljedično do aktivacije signalnih apoptotičkih putova (25). Nakon ulaska u stanicu, nanoAg najčešće izaziva oksidativni stres koji je pospješen otpuštanjem ionskog oblika Ag-a tijekom razgradnje i otapanja nanoAg-a u biološkom mediju (42). Nastali reaktivni kisikovi spojevi (ROS, od engl. *reactive oxygen species*) uklanjaju se antioksidativnim staničnim mehanizmima. Kad se njihovi kapaciteti nadvladaju, ROS-ovi uzrokuju denaturaciju proteina, oštećenja DNK i peroksidaciju lipida, a aktivira se i upalna reakcija (Slika 1.2.). Oštećenjem mitohondrija stvara se još više ROS-ova, nastaju pore u membranama mitohondrija, remeti se protonski gradijent, prestaje sinteza ATP-a i dolazi do kolapsa mitohondrijskog membranskog potencijala što je ujedno i ključni signal za nastanak apoptoze (43). Upravo je unutarnji apoptotički signalni put (putem mitohondrija) glavni mehanizam citotoksičnosti metalnih nanočestica kakve su nanoAg (44).



Slika 1.2. Nanočesticama srebra (nanoAg) uzrokovan oksidativni stres i posljedične promjene. ROS – reaktivni kisikovi spojevi

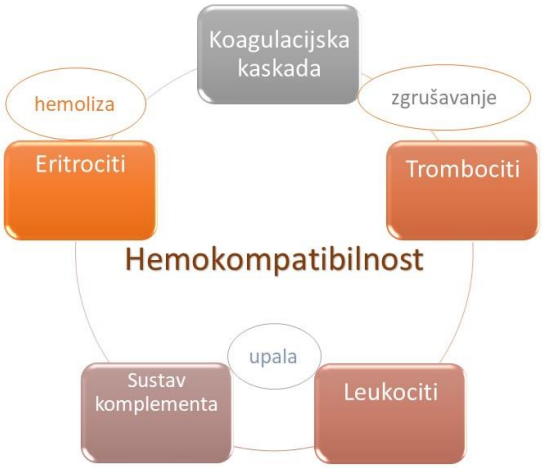
U fiziološkim uvjetima aerobnog metabolizma u stanicama se stvara mala količina ROS-a koji nastaju slučajno kao nusproizvod tijekom oksidativne fosforilacije u mitohondrijima i steroidogeneze, a namjerno ih stanica stvara npr. tijekom fagocitoze zbog mikrobicidnog djelovanja. U ROS-ove ubrajamo superoksidne radikale, hidroksilne radikale, hidroperoksidne radikale i vodikov peroksid. Nastanak ROS-ova može biti izazvan ksenobioticima, teškim metalima, ionizirajućim zračenjem, mikrorganizmima itd. Glavni izvor superoksidnog radikala je respiracijski lanac u mitohondrijima, a on zbog nemogućnosti preslaska membrane ostaje u mitohondriju. Vodikov peroksid nastaje u peroksisomima djelovanjem nekoliko enzima, a između ostalog nastaje i pri uklanjanju superoksidnog radikala djelovanjem enzima superoksid dismutaze. U prisutnosti Fe^{2+} iz vodikovog peroksida nastaje Fentonovom reakcijom vrlo reaktivan hidroksilni radikal (44). Hidroksilni radikal može oksidirati aminokiseline stvarajući Schiffove baze, izazvati promjene proteina i enzima, može oštetiti DNA, a s lipidima membrana može započeti lančanu reakciju peroksidacije (45). Organizam, odnosno stanica, ima brojne enzime i antioksidanse kojima uklanja slobodne radikale i ROS-ove, a ima i mogućnost popravka nastalih oštećenja. Najaktivniji enzimi tog obrambenog mehanizma su superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza, a najpoznatiji antioksidansi su reducirani glutation (GSH), vitamin C, vitamin E i beta-karoten (45).

GSH je tripeptid koji sadrži tiolnu (-SH) skupinu, a nalazi se u citosolu stanice i u ekstracelularnim tekućinama. Izuzetno je važan za zaštitu stanica od oštećenja slobodnim radikalima i za održavanje redoks homeostaze stanice. U stanici je većina glutationa u reduciranom obliku, dok je manje od 5 % ukupnog glutationa u oksidiranom obliku. Budući da se stalno stvaraju male količine ROS-ova i drugih slobodnih radikala u stanici, GSH se neprestano troši, ali se odmah i regenerira djelovanjem enzima glutation-reduktaze. GSH je neophodan za djelovanje glutation-peroksidaze, glavnog enzima koji razgrađuje vodikov peroksid.

U nekim patofiziološkim stanjima može se stvoriti veća količina ROS-a koju navedeni enzimi i antioksidansi u stanici ne mogu ukloniti zbog čega nastaje oksidacijski stres. Posljedice oksidacijskog stresa i oštećenja koja nastaju u stanici i tkivima su prethodno opisani (Slika 1.2.). Smatra se da oksidativni stres ima ulogu u patogenezi mnogih kliničkih stanja (45).

1.4. Hemokompatibilnost proizvoda za medicinsku uporabu

Ukoliko se nanočestice namjeravaju koristiti u terapijske ili dijagnostičke svrhe, a koje podrazumijevaju direktan kontakt nanočestica s krvi, takvi proizvodi i njihovi sastavni dijelovi moraju biti hemokompatibilni (46). Hemokompatibilnost podrazumijeva da strana tvar u kontaktu s krvi ne izaziva niti jedu od štetnih reakcija u krvi (Slika 1.3.), a to su upalna reakcija, aktivacija sustava komplementa, aktivacija hemostatskog sustava i hemoliza (47).



Slika 1.3. Komponente krvi važne za ispitivanje hemokompatibilnosti.

Sustavnih istraživanja hemokompatibilnosti nanoAg-a u ovisnosti o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima je jako malo, a ta su saznanja neophodna za bržu kliničku translaciju inovativnih nanoproizvoda i u konačnici za njihovu sigurnu biomedicinsku primjenu.

Pregledom dostupne literature u posljednjih deset godina pronađeno je petnaestak istraživanja o utjecaju nanoAg-a na hemostazu, a sažeti pregled prikazan je u Prilogu u Tablici 12.1. U većini ovih istraživanja ispitan je utjecaj nanoAg-a samo na neke komponente hemostaze kao npr. samo na agregaciju trombocita ili samo na unutarnji put zgrušavanja. S obzirom na površinske omotače primjenjene za stabilizaciju nanoAg-a, objavljena su samo dva istraživanja u kojima se uspoređuju dvije odnosno tri vrste nanoAg-a s različitim omotačima (48)(49).

1.5. Hemostaza

Hemostaza je složen proces zgrušavanja krvi u kojem sudjeluju trombociti, brojni plazmatski koagulacijski proteini i endotelne stanice. Interakcije svih komponenti hemostaze su precizno kontrolirane kako bi postojala ravnoteža između hiperkoagulabilnog i hipokoagulabilnog stanja. Svrha hemostatskog procesa je spriječiti gubitak krvi. Kada nastane oštećenje tkiva i krvnih žila, odmah se pokreće proces zgrušavanja krvi. Poremećaji zgrušavanja krvi kod kojih se ugrušak ne stvara pravovremeno ili nije kvalitetan, dovode do prekomjernog gubitka krvi ili spontanih krvarenja u tkivo. S druge strane, ako se proces zgrušavanja pokrene u intaktnoj krvnoj žili, tada nastaje tromboza koja može dovesti do embolije. Oba stanja su opasna po život (50).

Zbog kompleksnosti i lakšeg razumijevanja hemostaze, hemostaza se dijeli na dva osnovna procesa, primarnu i sekundarnu hemostazu. U primarnoj hemostazi sudjeluju trombociti, a u sekundarnoj hemostazi sudjeluju plazmatski koagulacijski proteini tzv. čimbenici zgrušavanja. Nastali ugrušak nastao zajedničkim djelovanjem primarne i sekundarne hemostaze mora se nakon nekog vremena razgraditi kako bi oštećena krvna žila i tkivo zacijelili. Ovaj proces se naziva fibrinoliza. Prema novom modelu hemostaze svi ovi procesi nisu odijeljeni i odvojeni već se međusobno isprepliću, te se u novije vrijeme hemostaza dijeli na faze inicijacije, amplifikacije i propagacije. Postojeće kliničke pretrage kojima ispitujemo hemostazu jednostavnije je objasniti i tumačiti pomoću prvobitne podjele na primarnu i sekundarnu hemostazu.

Prilikom ozljede krvne žile trombociti odmah priliježu uz oštećen endotel i subendotelne strukture brojnim interakcijama. Primarna hemostaza započinje procesom adhezije trombocita na ozljedu priljubljivanjem trombocita na kolagen iz subendotela pomoću von Willebrandovog faktora (vWF) tako što se vWF jednim dijelom molekule veže na kolagen, a drugim dijelom na trombocit preko trombocitnog receptora glikoproteina Ib-V-IX (GP Ib-V-IX). Tako trombocit biva privučen na mjesto ozljede, dolazi u blizinu kolagena i s njim direktno stupa u interakciju putem GP VI (50). Vezanje kolagena na ovaj receptor aktivira trombocit, dolazi do promjene u citoskeletu, promjene oblika trombocita i degranulacije alfa i gustih granula trombocita. Iz gustih granula oslobađa se adenozin difosfat (ADP) koji dodatno aktivira trombocite, ali aktivira i druge trombocite iz okoline koji nisu vezani na kolagen kako bi se povećao broj aktiviranih trombocita na mjestu ozljede. Osim kolagena i ADP-a trombocite aktiviraju još i fibrinogen, trombin, adrenalin, tromboksan A_2 (51). Svaki od ovih trombocitnih agonista ima svoj receptor na trombocitu. Vezanjem agonista na receptor pokreću se unutarstanični signalni

putovi preko G-proteina, tirozin kinaza i naglog povišenja koncentracije kalcija unutar trombocita. Tijekom aktivacije trombocita narušava se struktura fosfolipidnog dvosloja membrane i dolazi do premještanja negativno nabijenog fosfatidilserina na vanjsku stranu djelovanjem fosfolipidne skramblaze koja se aktivira porastom koncentracije kalcija. Na vanjskoj strani trombocitne membrane fosfatidilserin stvara prokoagulantnu površinu na koju se vežu čimbenici zgrušavanja i omogućuje odvijanje sekundarne hemostaze. U membrani se nalazi fosfatidilinozitol (PI) iz kojeg se prilikom aktivacije trombocita oslobađa arahidonska kiselina koja je agonist aktivacije trombocita. Iz arahidonske kiseline djelovanjem cikooksigenaze nastaje još jedan agonist trombocita tromboksan A_2. Konačni korak aktivacije trombocita je prelazak trombocitnog membranskog integrinskog receptora GP IIb-IIIa iz stanja niskog afiniteta u visokoafinitetni oblik za fibrin. Ovaj korak je neophodan za agregaciju trombocita jer omogućuje ireverzibilnu agregaciju trombocita i stabilizaciju primarnog trombocitnog ugruška s fibrinskom mrežicom. Tada nastaje stabilan ugrušak (52). Budući da je fibrin konačan produkt sekundarne hemostaze, ovdje vidimo vezu između primarne i sekundarne hemostaze i njihovu međusobnu isprepletenost.

Sekundarnom hemostazom nazivamo niz kaskadnih enzimskih reakcija koje završavaju stvaranjem fibrinske mrežice. Enzimi i njihovi kofaktori tzv. čimbenici zgrušavanja koji sudjeluju u ovoj kaskadnoj reakciji su proteini plazme u kojoj se nalaze u neaktivnom obliku, a prelaze u aktivni oblik nakon pokretanja hemostatskog procesa. Za odvijanje sekundarne hemostaze neophodni su još i ioni kalcija i fosfolipidna membrana trombocita (53). Sekundarnu hemostazu dijelimo na vanjski i unutarnji put zgrušavanja.

Unutarnji put zgrušavanja može se pokrenuti u kontaktu s negativno nabijenom površinom. Kolagen iz subendotela je fiziološki aktivator. Negativno nabijena površina aktivira čimbenik zgrušavanja FXII. Aktivirani FXII proteolitički razgrađuje prekalikrein i aktivira FXI. Nastali kalikrein uz visokomolekularni kininogen aktivira fibrinolitički sustav, sustav komplementa i kininski sustav (53). Aktivirani FXI aktivira FIX, a on uz FVIII, ione kalcija i fosfolipide membrana aktivira FX. U ovom koraku se spajaju vanjski i unutarnji put zgrušavanja. Daljnje sekvencijske reakcije aktivacije čimbenika zgrušavanja prikazane na Slici 1.4. dovode do nastanka fibrinske mrežice koja prožima agregirane trombocite. Nekontrolirana sistemska aktivacija unutarnjega puta zgrušavanja u organizmu može dovesti ne samo do tromboze već i do nagloga pada krvnoga tlaka, angioedema, ubrzane fibrinolize i upalnoga procesa (54).

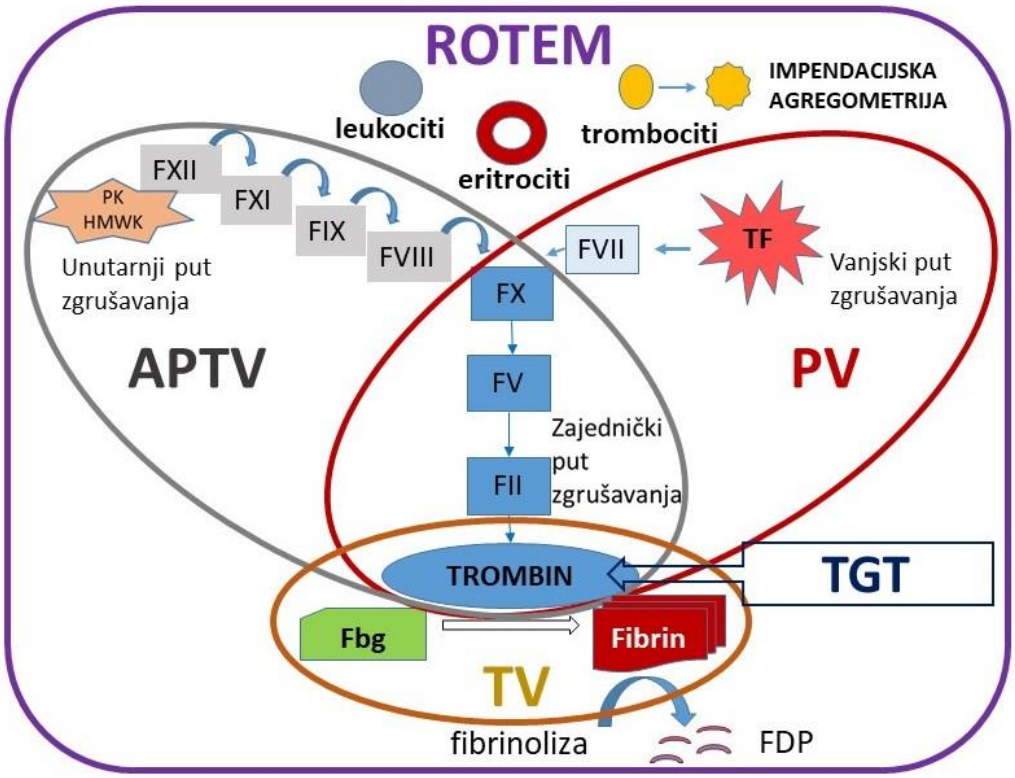
Vanjski put zgrušavanja se pokreće kada tkivni faktor dođe u kontakt s FVII. Tkivni faktor na stanicama izvan krvne žile dolazi u kontakt s krvi tek kad nastane ozljeda. Kompleks tkivnog faktora i FVII aktivira FX. Daljnje sekvencijske reakcije aktivacije čimbenika zgrušavanja prikazane su na Slici 1.4. Posljednji u nizu aktivira se čimbenik zgrušavanja FII. To je vrlo potentan enzim trombin koji ima brojne funkcije, a najvažnija mu je da stvara fibrin iz fibrinogena. Trombin iz fibrinogena stvara fibrinske monomere koji spontano polimeriziraju i na trombocitima se vežu za GP IIb-IIIa. Tako fibrinska mrežica prožima agregirane trombocite kako bi nastao stabilan ugrušak. FXIII stabilizira polimerizirani fibrin unakrsno ga povezujući kovalentnim vezama. Osim što stvara fibrin, trombin je i vrlo snažan aktivator trombocita te on na taj način povezuje primarnu i sekundarnu hemostazu. Trombin pojačava svoj nastanak aktiviranjem FV i FVIII, ali on aktivira i inhibitore zgrušavanja protein C i protein S (53). Trombin aktivira i fibrinolitički proces i djeluje proupalno potičući izlučivanje interleukina 6 i 8 (51).

Prema novom modelu hemostaze aktivacija čimbenika zgrušavanja započinje s tkivnim faktorom, a kontaktna aktivacija je samo pomoćna reakcija kojom se pojačava cijela kaskada. Stoga je neophodno ispitati mogu li nanočestice poremetiti aktivaciju hemostaze putem tkivnog faktora, a ne samo pomoćnu reakciju kontaktne aktivacije.

1.6. Laboratorijske metode ispitivanja hemostaze

Ne postoji samo jedan test kojim bismo utvrdili sve moguće poremećaje hemostaze jer je hemostaza vrlo složen proces. U *in vitro* uvjetima teško je oponašati hemostatski proces s obzirom da u njemu, osim plazmatskog koagulacijskog sustava, sudjeluju i trombociti i endotel, a nije zanemariv niti doprinos sila koje djeluju na stijenku krvne žile i sile smicanja nastale protokom krvi. Stoga se u ispitivanju poremećaja hemostaze mora koristiti više testova, a koriste se i različiti uzorci (plazma, plazma bogata trombocitima, puna krv). Neprestano se pokušavaju razviti globalni testovi koji će što bolje obuhvatiti sve komponente procesa hemostaze. U rutinskom kliničko-laboratorijskom ispitivanju poremećaja sekundarne hemostaze koriste se prvenstveno koagulacijski testovi probira koji uključuju protrombinsko vrijeme (PV), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV) i trombinsko vrijeme (TV). Ovim testovima otkrivaju se deficiti čimbenika zgrušavanja, njihovi inhibitori i poremećaji polimerizacije fibrinogena, a izvode se u uzorcima plazme. Za ispitivanje poremećaja primarne hemostaze analizira se sposobnost trombocita da agregiraju na poticaj

različitih agonista u plazmi bogatoj trombocitima ili punoj krvi. Kod ispitivanja učinaka nanočestica na hemostazu ne postoji standardizirani protokol s preporukom izbora testova, a u objavljenim istraživanjima nalazimo velik broj različitih testova koji su korišteni pa je teško uspoređivati rezultate (Prilog, Tablica 12.1.). Upitna je i korelacija upotrijebljenih testova s kliničkim stanjem jer testiranja nisu klinički validirana. Osim toga, vidljivo je iz prikazanih istraživanja da je često ispitan samo jedan segment hemostaze kao npr. samo unutarnji put zgrušavanja. U ovom doktorskom istraživanju upotrijebljeni su različiti metodološki pristupi (Slika 1.4.) kako bi se što detaljnije ispitao učinak nanoAg-a na hemostazu.



Slika 1.4. Klasičan model koagulacijske kaskade koji obuhvaća vanjski, unutarnji i zajednički put zgrušavanja i fibrinolitički proces. Označeni su testovi kojima otkrivamo poremećaje hemostaze, a koji su korišteni u ovom istraživanju. ROTEM-om mjerimo viskoelastične promjene u punoj krvi tijekom procesa zgrušavanja i fibrinolize čime se opisuje interakcija trombocita s čimbenicima zgrušavanja i njihovim inhibitorima. TGT-om se mjeri nastanak trombina u plazmi tijekom određenoga vremena, a rezultat je međudjelovanja prokoagulacijskih i antikoagulacijskih čimbenika u plazmi. PV-om, APTV-om i TV-om mjerimo vrijeme potrebno za nastanak ugruška u plazmi nakon aktivacije vanjskoga i unutarnjega puta te posljednjega koraka u zajedničkom putu zgrušavanja. Impedancijskom

agregometrijom se procjenjuje funkcija trombocita odnosno njihova agregabilnost u punoj krvi. ROTEM - rotacijska tromboelastometrija, TF - tkivni faktor, PV - protrombinsko vrijeme, APTV - aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme, TV- trombinsko vrijeme, PK - prekalikrein, HMWK - visokomolekularni kininogen, TGT - analiza stvaranja trombina, Fbg - fibrinogen, FDP - razgradni produkti fibrinogena i fibrina

Budući da se sekundarna hemostaza, i to unutarnji put zgrušavanja aktivira u kontaktu sa stranim tvarima, tako i nanočestice mogu biti uzrokom aktivacije sekundarne hemostaze. U *in vitro* uvjetima, za razliku od *in vivo* istraživanja, može se izolirano, bez trombocita, promatrati učinak nanočestica na sekundarnu hemostazu. Istraživanja su općenito češće usmjerena na trombocite pa nalazimo malo radova o učincima nanočestica na sekundarnu hemostazu. U preglednom članku autorice E. Frohlich (51) nalazi se popis objavljenih radova o učincima različitih nanočestica na hemostazu te je iz toga popisa vidljivo da npr. karboksilirani nanodijamanti i TiO_2 ne pokazuju nikakav učinak, niti na vanjski, niti na unutarnji put zgrušavanja, amidirane višeslojne ugljikove nanocjevčice aktiviraju vanjski put zgrušavanja, karboksilirane ugljikove nanocjevčice aktiviraju unutarnji put zgrušavanja dok za polistirenske nanočestice (PLNP, od engl. *polystyrene nanoparticles*) i za SiO_2 nalazimo oprečne rezultate (51). Za očekivati je da će negativno nabijene nanočestice djelovati protrombotski, jer se unutarnji put zgrušavanja pokreće u kontaktu s negativno nabijenim molekulama. Međutim, primjena negativno nabijenih karboksiliranih PLNP kod miševa je pojačala induciranu trombozu, a pozitivno nabijene amidne PLNP smanjile su induciranu trombozu (51). Nasuprot tome, plućnu emboliju kod miševa su intenzivnije izazvale kationske kvantne točke kadmijevog selenida u odnosu na anionske (51). Isto tako je diseminirano intravaskularno zgrušavanje kod miševa izazvala primjena kationskih poliamidoaminskih (PAMAM) dendrimera puno intenzivnije nego anionskih PAMAM dendrimera (51). Očito je da se učinak nanočestica ne može predvidjeti samo na osnovu njihovog naboja, već da su važna i druga fizikalno kemijska svojstva poput vrste materijala, veličine, hidrofobnosti itd. Veličina nanočestica u odnosu na sekundarnu hemostazu je ispitana samo u nekoliko istraživanja (55)(56)(57). Zaključeno je da manje nanočestice s većom zakrivljenošću površine ne mogu aktivirati unutarnji put zgrušavanja jer se na njihovoj površini ne može složiti kompleks FXIIa-kalikren-FXI kao što je slučaj s većim nanočesticama istoga materijala koje djeluju protrombotski (58).

Za nanoAg su dostupni znanstveni podaci vrlo oprečni kako je vidljivo iz Tablice 1.1. u Prilogu. Nema sistematskih istraživanja ovisnosti vrste omotača, naboja i drugih fizikalno-kemijskih svojstava nanoAg-a u odnosu na hemostazu.

1.7. Eritrociti i hemostaza

Eritrociti su najbrojnije stanice krvi (4×10^{12}/L), stvaraju se u koštanoj srži i prosječan životni vijek im je 3 mjeseca. Stare i oštećene eritrocite uklanja iz cirkulacije monocitno-makrofagni sustav slezene i jetre. Osnovna funkcija eritrocita je doprema kisika u tkiva i uklanjanje CO_2 iz tkiva. Oštećenje, raspad eritrocita i razlijevanje njihova sadržaja u plazmu nazivamo hemolizom. To je patofiziološki proces koji mogu uzrokovati lijekovi, toksini, imunološki poremećaji, ali i različiti mehanički procesi. Opsežna hemoliza uzrokovat će anemiju, a slobodni hemoglobin u plazmi oštećenje bubrega.

Uloga eritrocita u hemostazi i trombozi dugo vremena nije bila prepoznata. Zbog svoje brojnosti eritrociti jako utječu na viskoznost i reološka svojstva krvi. U struji krvi eritrociti se prvenstveno smještaju u sredinu krvne žile, a trombocite potiskuju uz endotel te omogućuju bliski kontakt s endotelom čiji integritet trombociti „nadgledaju“. U stanju anemije pojačana je sklonost krvarenju upravo zbog izostanka ovog fenomena. Kod eritrocitoze pojačana je interakcija trombocita s endotelom, a time i učestalija tromboza (59). S oštećenih eritrocita odvajaju se mikrovezikule i na eritrocitnim membranama se ispoljava fosfatidilserin, a oboje su podloga za pokretanje koagulacijske kaskade. Eritrociti su uz aktivirane trombocite važni kao prokoagulantna površina za sustav hemostaze i na njima se direktno aktivira FIX (60). Osim toga, oslobođeni hemoglobin iz eritrocita troši NO iz plazme koji je vazodilatator i inhibitor aktivacije trombocita. Kod hemolitičkih anemija veća je učestalost klinički ozbiljnog poremećaja tzv. diseminiranoga intravaskularnoga zgrušavanja što također potvrđuje vezu eritrocita i hemostaze (60).

Za mnoge nanočestice je dokazano da uzrokuju hemolizu, pa tako i za nanoAg iako nije sasvim otkriven mehanizam njihove hemolitičke aktivnosti (48)(61)(62)(63)(64). Smatra se da nanoAg reagira s tiolnim skupinama proteina, glikoproteina i fosfolipidima u membrani eritrocita uzorkujući njihovu denaturaciju, oštećenje membrane i osmotsku lizu. Osim toga, nanoAg i oslobođeni ioni Ag-a vjerojatno izazivaju i oksidativni stres u eritrocitima. Do sada je dokazano da je intenzitet hemolize uzrokovan nanoAg-om ovisan o njihovoj koncentraciji, veličini, površinskoj funkcionalizaciji i naboju (48)(64)(48)(61)(65).

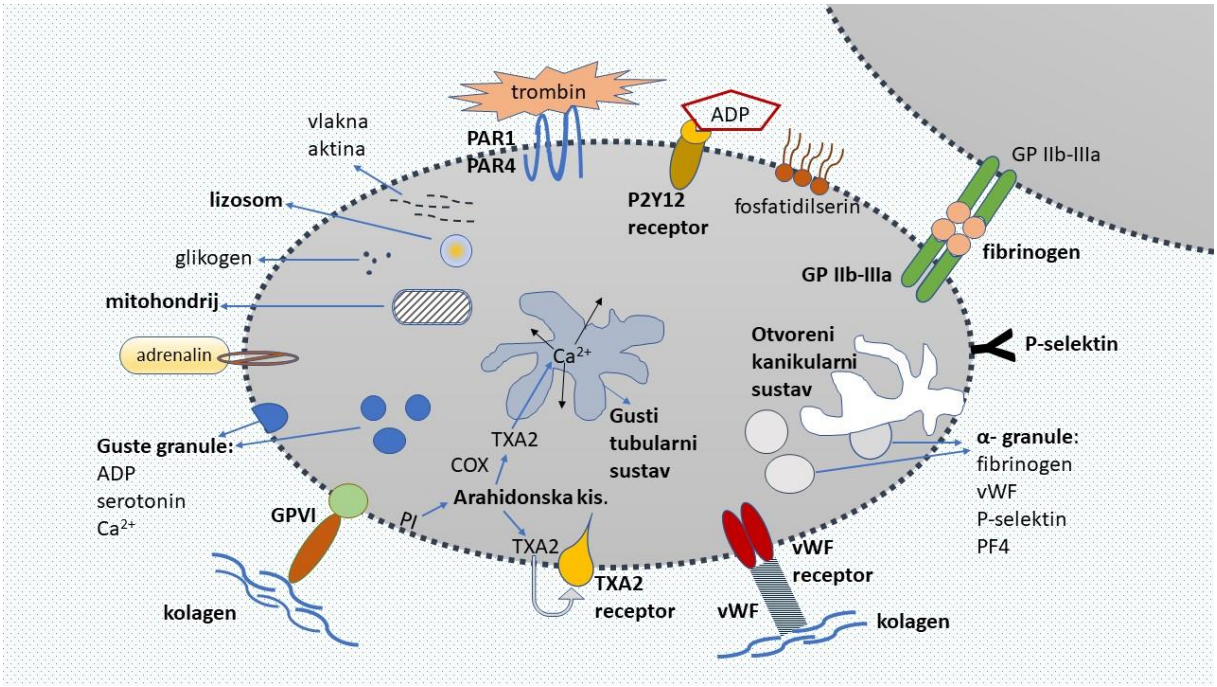
Hemolizu je neophodno ispitati u sklopu ispitivanja hemokompatibilnosti prije kliničke primjene medicinskih proizvoda koji se namjeravaju koristiti u kontaktu s krvi kako bi se spriječile štetne posljedice hemolize na organizam (47). Materijali koji izazivaju hemolizu manju od 2 % eritrocita smatraju se hemokompatibilnima, a veću od 5 % smatraju se neprihvatljivima za kliničku uporabu (47).

1.8. Trombociti

Trombociti su krvne „pločice“, diskoidnog su oblika (0,5 x 3 μm) i volumena 7 - 11 fl. Oni nemaju jezgru jer nastaju fragmentacijom citoplazme megakariocita u koštanoj srži. Nakon izlaska iz koštane srži u krv, u cirkulaciji ostaju 7 -10 dana. Brojčana koncentracija trombocita u krvi zdravih osoba je 150 - 400 x 10^9 /L. Trombociti cirkuliraju uz stjenku krvne žile i tako „pregledavaju“ njen integritet te odmah „otkrivaju“ svako oštećenje endotela. Oni su ključni u složenom procesu hemostaze, ali osim ove uloge imaju i ulogu u upalnom procesu, imunološkom odgovoru, angiogenezi, zarastanju rana, rastu tumora, metastaziranju tumora itd. (50).

Trombociti se strukturno sastoje od tri glavne zone: periferna zona, sol-gel zona i zona s organelima. U perifernoj zoni nalazi se membrana trombocita obavijena glikokaliksom koji je znatno deblji nego kod ostalih krvnih stanica. Građen je od glikoproteina, glikolipida, proteoglikana, glikozaminoglikana i oligosaharida. Ovdje se nalaze brojni, važni glikoproteinski receptori potrebni trombocitu za obavljanje hemostatske uloge i za različite interakcije s drugim stanicama. Važni glikoproteinski receptori za adheziju i agregaciju trombocita su GP Ib-V-IX (receptor za vWF), GP VI (receptor za kolagen) i GP IIb-IIIa (receptor za fibrinogen) (52). Plazmatska membrana trombocita je kao i kod ostalih stanica građena od lipidnog dvosloja, a važniji fosfolipidi su fosfatidil inozitol i fosfatidilserin. Membrana ima brojne invaginacije koje nazivamo otvoreni kanikularni sustav (52) i zbog njega je površina membrane trombocita jako velika. Ispod membrane trombocita nalaze se vlakna aktina i sloj mikrotubula koji održavaju oblik trombocita i omogućuju promjene oblika, stvaranje pseudopodija te izlučivanje sadržaja alfa granula. Gusti tubularni sustav je ostatak grubog endoplazmatskog retikuluma u kojemu se zadržava Ca^{2+} i enzimi potrebni za aktivaciju trombocita (fosfolipaza A2, ciklooksigenaza i tromboksan sintaza) (52). U zoni organela nalaze se alfa-granule, guste granule, lizosomi, mitohondriji i zrnca glikogena. U trombocitu ima 50 - 80 alfa granula koje sadrže brojne proteine bitne za hemostatsku funkciju trombocita

(fibrinogen, vWF, FV, FVIII, adhezijski protein P-selektin itd.) (66). Alfa granule sadrže i proteine koji sudjeluju u upalnom odgovoru i obrani organizma od mikroorganizama kao npr. interleukine, mikrobicidne proteine, kemokine, komponente komplementa i IgG. Osim toga, u alfa granulama trombocita nalaze se i faktori rasta: faktor rasta fibroblasta, faktor rasta porijeklom iz trombocita, faktor rasta vaskuarnog endotela (66). Gustih granula u trombocitima je puno manje u odnosu na alfa granule, a sadrže nukleotide (najviše adeninskih nukleotida), katione (Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+}), fosfate (polifosfate i pirofosfate) i bioaktivne amine (serotonin i histamin) (Slika 1.5.) (66).



Slika 1.5. Struktura trombocita. Istaknuti su receptori i agonisti bitni za aktivaciju i agregaciju trombocita. ADP - adenozin difosfat, vWF - von Willebrandov faktor, GP - glikoprotein, PF4 - trombocitni faktor 4, COX - ciklooksigenaza, TXA2 - tromboksan A2, PI - fosfatidilinozitol

1.9. Interakcija trombocita s nanočesticama

Nanočestice mogu na trombocite djelovati na više načina. One mogu trombocite direktno aktivirati ili mogu mijenjati njihov odgovor na agoniste pojačavanjem ili inhibiranjem toga odgovora. Nanočestice mogu imati i citotoksičan učinak na trombocite (4). Ove učinke nanočestice mogu izazvati interakcijom s brojnim receptorima na površini trombocita, s membranom trombocita ili mogu nakon ulaska u trombocite mijenjati neke od signalnih putova.

Poznato je da trombociti lako internaliziraju bakterije, viruse, razne čestice pa i nanočestice zahvaljujući velikoj površini otvorenog kanikularnog sustava membrana (67).

Brojna su istraživanja objavljena o utjecaju raznih nanočestica na trombocite, odnosno na primarnu hemostazu. U preglednom članku autorice Eleonore Frohlich (51) navedene su nanočestice koje aktiviraju trombocite (BPO_4, CdTe, CdSe, SiO_2, jednoslojne i višeslojne ugljikove nanocjevčice i nanodijamanti), nanočestice koje inhibiraju trombocite (kationski liposomi i nanočestice cetilalkohol polisorbata) i nanočestice za koje nije dokazan utjecaj na trombocite (TiO_2, Fe_3C, poli(laktat-ko-glikolne) kiseline i šuplje zlatne nanosfere) (51). Najviše istraživanja o učinku nanočestica na trombocite objavljeno je za zlatne nanočestice zbog interesa za njihovu primjenu u nanomedicini. Međutim, objavljeni rezultati su oprečni pa je tako, na primjer, u jednom istraživanju pokazano da nanočestice zlata inhibiraju aktivaciju trombocita (68), u drugom istraživanju da potiču agregaciju trombocita (69), a nalazimo i istraživanja u kojima autori nisu našli nikakav učinak nanočestica zlata na trombocite (70). Učinak nanočestica zlata na aktivaciju trombocita ovisi o veličini nanočestica, pa je najjača aktivacija postignuta s najmanjim nanočesticama zlata (18 nm), a nanočestice veličine 50-70 nm gotovo da nisu imale nikakav učinak na trombocite (71). Mogućnost ulaska nanočestica zlata u trombocite također je obrnuto proporcionalna njihovoj veličini (71). Istraživanje učinka PAMAM dendrimera koji su atraktivni kao nosači za ciljanu dopremu lijekova, pokazalo je da samo veće čestice PAMAM dendrimera uzrokuju agregaciju trombocita (72).

U ranijim istraživanjima pokazano je da učinak nanočestica na trombocite ovisi i o njihovom stabilizacijskom omotaču. Tako je, primjerice, pokazano da ukoliko su nanočestice željezovog oksida, srebra ili zlata stabilizirane citratom, ispoljavaju anitrombocitni i antikoagulantni učinak, dok iste nanočestice sa stabilizacijskim omotačem od škroba nemaju antikoagulantni učinak (73). Mehanizam antikoagulantnog učinka navedenih nanočestica dokazan je na više načina: smanjenjem agregacija trombocita uz agoniste ADP, adrenalin, kolagen i trombin, smanjenjem oslobađanja ATP-a iz gustih granula, sniženjem izražaja biljega CD62P na trombocitima i smanjenjem fosforilacije tirozinskih ostataka proteina. Ove metalne nanočestice imaju svojstva koja bi se mogla iskoristiti u dijagnostičke svrhe za izradu kontrastnih sredstava za snimanja magnetskom rezonancijom. U navedenom je istraživanju naglašeno da bi se pažljivim dizajnom nanočestica i izborom stabilizacijskog omotača dijagnostička namjena nanočestica mogla dodatno prilagoditi za primjenu kod pacijenata s visokim rizikom od tromboze ili krvarenja.

Na PAMAM dendrimerima, osim ovisnosti o veličini, ispitana je i ovisnost učinaka na trombocite o naboju, odnosno funkcionalnim grupama (72). Agregaciju trombocita izazivali su samo veliki kationski PAMAM dendrimeri, a intenzitet agregacije bio je ovisan o broju amidnih skupina na nanočestici koje zbog pozitivnog naboja narušavaju integritet membrane i posljedično dovode do agregacije trombocita. Agregaciju trombocita nisu izazivali neutralni, anionski, niti mali kationski PAMAM dendrimeri (72). Drugačiji rezultati su dobiveni ispitivanjem različitih PLNP jer niti kationske, niti anionske, niti nemodificirane PLNP nisu izazivale značajniju agregaciju trombocita (74). Geys i sur. usporedili su karboksilirane i amidirane kvantne točke CdSe/ZnS pri čemu su trombocite intenzivnije agregirale anionske od kationskih kvantnih točaka kad je kao agonist aktivacije trombocita korišten ADP (75).

Iz navedenih istraživanja se stoga ne može izvući općeniti zaključak o tome koja će funkcionalna skupina ili površinski naboj činiti nanočesticu inertnom prema trombocitima, poticati aktivaciju, agregaciju trombocita ili njihovu inhibiciju.

Prikaz objavljenih istraživanja u kojima je ispitivan utjecaj nanoAg-a na trombocite nalazi se u Prilogu u Tablici 12.1. Rezultati su i za nanoAg kao i za prethodno prikazane nanočestice proturječni. Osim toga, veliki problem u prikazanim istraživanjima predstavlja nedostatak kvalitetne karakterizacije nanočestica pa u većini ovih istraživanja nije čak naveden niti stabilizacijski omotač. Kako bi istraživanja bioloških učinaka nanočestica bila pouzdana, neophodna je njihova kvalitetna fizikalno-kemijska karakterizacija (76). Nije napravljeno niti jedno sistematsko istraživanje u kojem je detaljno ispitan odnos fizikalno-kemijskih svojstava nanoAg-a i njihovog učinka na hemostazu.

Iz objavljenih članaka (Tablica 12.1. u Prilogu) vidimo da su na trombocitima prvenstveno ispitana antiagregacijska tj. proagregacijska svojstva nanoAg-a, dok je citotoksični učinak ispitan samo u dva istraživanja. Rywaniak i sur. tvrde da je uz ispitivanje agregacije trombocita potrebno ispitati i vijabilnost trombocita jer izloženost trombocita citotoksičnoj tvari može biti uzrokom sniženoj agregaciji trombocita. Budući da nevijabilni trombociti ne mogu agregirati, rezultat smanjene agregacije trombocita u ovakvom slučaju je lažan i može dovesti do krivog zaključka o antiagregacijskom svojstvu ispitivane tvari (77). Ragaseema i sur. ispitali su izražaj fosfatidilserina na trombocitima kako bi dokazali da smanjena agregacija trombocita nije posljedica gubitka vijabilnosti trombocita nakon izlaganja trombocita nanoAg-u (78). Suprotno ovome, Jun i sur. su dokazali pojačan izražaj fosfatidilserina na trombocitima, međutim oni izražaj fosfatidilserina ne određuju u svrhu ispitivanja vijabilnosti trombocita već kao dokaz

aktivacije trombocita (79). Shrivastava i sur., kao i Hajtuch i sur. su pokazali da se laktat dehidrogenaza (LDH) ne oslobađa iz trombocita nakon njihovog izlaganja nanoAg-u što ukazuje na održani integritet membrane (37)(49). NanoAg nije izazvao lizu trombocita niti kod visokih doza nanoAg-a (100 mg/L) (37) (49). LDH je citosolski enzim koji se nalazi u svim stanicama, a oslobađa se iz stanice tek kada dođe do raspada membrane odnosno iz nekrotičnih, kasnoapoptotičnih i nekroptotičnih stanica.

Izaziva li nanoAg u trombocitima oksidativni stres nije istraženo i ne nalazimo objavljenih istraživanja o tome.

2. HIPOTEZA

Učinak nanoAg-a na primarnu i sekundarnu hemostazu, te njihova citotoksičnost na trombocite ovise o površinskoj funkcionalizaciji nanočestica.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Ispitati remete li nanoAg hemostazu i ovisi li taj učinak o omotačima koji se koriste za stabilizaciju nanočestica i površinsku funkcionalizaciju.
- Upotrijebiti različite metodološke pristupe kako bi ispitali sve elemente hemostaze:
    - Ispitati učinak različitih nanoAg-a na primarnu hemostazu: agregaciju i aktivaciju trombocita.
    - Ispitati učinak različitih nanoAg-a na sekundarnu hemostazu: promjene u koagulacijskoj kaskadi enzima, odnosno nastanku fibrina aktivacijom vanjskog i unutarnjeg puta zgrušavanja, i posljednjega koraka pri nastanku fibrina.
    - Ispitati učinak različitih nanoAg-a na ukupni potencijal plazme za stvaranje trombina.
    - Ispitati učinak različitih nanoAg-a na globalni test hemostaze.
- Ispitati citotoksični učinak različitih vrsta nanoAg-a na trombocite ispitivanjem stanične vijabilnosti, razine oksidativnog stresa i staničnih oštećenja.
- Ispitati izazivaju li nanoAg hemolizu i ovisi li taj učinak o omotačima koji se koriste za stabilizaciju nanočestica i površinsku funkcionalizaciju.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj studije

Istraživanje je osmišljeno kao *in vitro* studija na uzorcima krvi dobivenim od dobrovoljnih zdravih davatelja. Prikupljeni uzorci krvi korišteni su za pripremu plazme, plazme bogate trombocitima (PRP, od engl. *platelet rich plasma*) i opranih trombocita (WP, od engl. *washed platelets*) koji su podvrgnuti tretmanu s različitim nanoAg u *in vitro* uvjetima. Svaki pokus je uključivao negativnu kontrolu, netretirani uzorak, prema kojoj su rezultati normalizirani.

4.2. Materijali

4.2.1. Uzorkovanje periferne venske krvi, priprema plazme, plazme bogate trombocitima i opranih trombocita

Istraživanje je provedeno na uzorcima krvi zdravih odraslih dobrovoljaca, muškaraca i žena, u dobi od 18 do 55 godina. Svi dobrovoljci su prethodno pročitali i potpisali informirani pristanak, koji je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskoga fakulteta Osijek (klasa 602-04/17-08/12, broj 2158-61-07-17-213) i Etičko povjerenstvo KBC-a Osijek (R2:18722-10/2015).

U ambulanti Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek dobrovoljcima su uzorkovane dvije epruvete periferne venske krvi u BD Vacutainer (BD, New Jersey, SAD) s antikoagulansom 3,2 %-tnim puferiranim citratom. Omjer krvi i antikoagulansa bio je 9:1. Prilikom uzorkovanja krvi primijenjena je minimalna staza kako bi se aktivacija trombocita svela na minimum. Za ispitivanje hemolitičke aktivnosti nanočestica srebra krv je uzorkovana na antikoagulans K_3EDTA (BD, New Jersey, SAD).

Osnovni kriterij prema kojem su odabrani dobrovoljci čiji je uzorak krvi bio pogodan za ovo istraživanje jest normalna brojčana koncentracija trombocita u krvi, a isključene su osobe s akutnim i kroničnim bolestima, te osobe koje su deset dana prije vađenja krvi uzimale sljedeće lijekove: nesteroidne antireumatske lijekove, antibiotike, antihipertenzive i inhibitore ponovne pohrane serotonina.

Analize su napravljene na uzorcima svježe pune krvi, plazme, PRP-a i WP-a u roku od 4 sata nakon uzorkovanja krvi. Svaki tip pokusa učinjen je na uzorcima krvi dobivenih od 4 - 6 zdravih dobrovoljaca.

Plazma je pripremljena centrifugiranjem krvi na brzini od 1500 x *g* 2 puta tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi. Za analizu stvaranja trombina (TGT, od engl. *thrombin generation test*) alikvot citratne plazme je zamrznut na -70 °C najduže tri mjeseca.

Uzorci PRP-a i WP-a pripremljeni su centrifugiranjem uzorka citratne pune krvi tijekom 10 min na brzini od 100 x *g* i odvojeni su PRP uzorci u novi spremnik. Za pripremu WP-a, PRP je centrifugiran 10 min na brzini od 700 x *g* bez kočnice, odbačen je supernatant, a talog trombocita resuspendiran u 2 ml fiziološke otopine puferirane fosfatnim puferom (PBS, od engl. *phosphate buffered saline*). Broj trombocita određen je na hematološkom brojaču krvnih stanica Sysmex XN 2000 (Kobe, Japan). Oprani trombociti su ostavljeni da miruju sat vremena kako bi se eventualno aktivirani trombociti vratili u neaktivirano stanje.

4.3. Metode

4.3.1. Priprema nanočestica srebra

Sinteza nanoAg-a provedena je kemijskom redukcijom $AgNO_3$ s $NaBH_4$, a nanočestice su stabilizirane različitim površinskim omotačima prema ranije objavljenim postupcima (80). Upotrijebljeni su sljedeći stabilizacijski omotači: natrijev bis(2-etilheksil)-sulfosukcinat (AOT) (*M*r=616,64), PVP (*M*r=40000), ε-poli-*L*-lizin (PLL) (*M*r=30000-70000) i goveđi serumski albumin (BSA, od engl. *bovine serum albumin*). Otopine omotača (AOT, PVP i PLL) pripremljene su otapanjem odgovarajuće količine omotača u ultračistoj vodi (vodljivosti manje do 18.18 MΩ·cm) kako bi konačna koncentracija AOT bila 0,5 mM, PVP 0,3 % (w/v), a PLL 1 % (w/v). Ukupni konačni volumen otopina bio je 200 mL. Svakoj od ovih otopina omotača prvo je dodano 5 mL 92 mM $AgNO_3$, a zatim postepeno 2 mL otopine 0,4 M $NaBH_4$ (1 kap svake sekunde) uz konstantno miješanje na magnetnom mješaču (IKA RCT, IKA Werke, Germany). Reakcijske smjese su potom snažno miješane tijekom 45 minuta na sobnoj temperaturi. Dobivene nanoAg su pročišćene centrifugiranjem na 11000 x *g* tijekom 20 minuta, supernatant je dekantiran, a talog je resuspendiran u 2 mL ultračiste vode i pohranjen u mraku na 4 °C.

NanoAg stabilizirane s BSA sintetizirane su miješanjem 7 mL 50 mM otopine $AgNO_3$ s 33 mL otopine BSA (90 mg). Otopina je snažno miješana na sobnoj temperaturi u prisutnosti kisika, zatim je dodan 1 mL 0,397 M otopine $NaBH_4$. Molarni odnos Ag^+ : BSA bio je 28:1, a Ag^+ : BH_4^- 1:1. Nakon 40 minuta otopina je pročišćena ultracentrifugiranjem na 25000 x *g* tijekom

30 minuta pri temperaturi od -5 °C. Talog nanoAg-a resuspendiran je u ultračistoj vodi i pohranjen na 4 °C u mraku.

Prisutnost nanočestica je nakon sinteze provjerena detekcijom rezonancije površinskih plazmonskih vrpci mjerenjem apsorbance u UV-Vis području spektrofotometrom (CARY 300, Varian Inc., Australia).

4.3.2. Karakterizacija nanočestica srebra

Detaljna karakterizacija pripremljenih nanoAg-a provedena je za kolodine otopine koncentracije 10 mg Ag /L u ultračistoj vodi pri temperaturi od 25 °C. Veličina nanoAg-a je određena metodom elektronske mikroskopije uporabom transmisijskog elektronskog mikroskopa (TEM) (Zeiss 902A, Zeiss, Jena, Njemačka) u svijetlom polju uz ubrzanje naponom od 80 kV. TEM snimke su napravljene kamerom Canon PowerShot S50 spojenom na mikroskop. Preparati su pripremljeni stavljanjem kapljice nanoAg otopina na Formvar® polimerom obloženu bakrenu mrežicu, koja je osušena na zraku pri sobnoj temperaturi. Iz TEM snimki određena je primarna veličina nanoAg-a analizom poprečnog presjeka nanočestica iz kojeg je izveden ekvivalent promjera kugle.

Distribucija hidrodinamičkog promjera nanoAg-a određena je pomoću tehnike dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS, od engl. *dinamic light scattering*), a površinski naboj čestica izmjeren je tehnikom elektroforetskog raspršenja svjetlosti (ELS, od engl. *electrophoretic light scattering*) na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) koji je bio opremljen zelenim laserom (532 nm) pod kutom od 173°. Rezultati za hidrodinamički promjer (d_H) dobiveni su iz maksimuma distribucije veličine i volumena čestica, a izraženi su kao srednja vrijednost deset mjerenja. Površinski naboj izražen je kao zeta potencijal (ζ), koji je određen korištenjem Henryjeve jednadžbe, uz aproksimaciju prema Smoluchovskijem, iz podataka o elektroforetskoj mobilnosti čestica. Vrijednosti ζ u mV izraženi su kao srednja vrijednost pet mjerenja. Podatci su obrađeni računalnim programom Zetasizer software 6.32 (Malvern Instruments). DLS tehnika omogućila je i određivanje indeksa polidisperzije (PdI, od engl. *polydispersity indeks*) za pripremljene nanoAg čija je vrijednost pokazala koliko je distribucija veličina za različite nanoAg raspršena. Vrijednosti PdI < 0,05 ukazuju na monodisperznost sustava, dok koloidne otopine koje su karakterizirane PdI > 0,7 imaju vrlo široku distribuciju veličina nanočestica. Izračun ovih parametara definiran je ISO standardom (engl. *International Organization for Standardization*) ISO 13321:1996E i ISO 22412:2008.

Udio ionskog srebra u koloidnim otopinama nanoAg-a ispitan je ultrafiltracijom otopina pomoću Amicon-4 Ultra centrifugalnih filtera veličine pora 3 kDa (Merck Milipore, Darmstadt, Germany). Koncentracija srebra u dobivenom filtratu određena je atomskim apsorpcijskim spektrofotometrom s grafitnom kivetom (Perkin Elmer Analyst 600, Perkin Elmer, Shelton, USA) uz Zemanovu korekciju. Za kalibraciju je korištena standardna otopina srebra 1000 mg/L Ag u 5 % (w/v) HNO_3 (Merck, Darmstadt, Germany). Postotak Ag^+ izračunat je iz omjera koncentracija srebra prije i nakon ultrafiltracije.

4.3.3. Hemolitička aktivnost nanočestica srebra

Hemoliza eritrocita u uzorcima pune krvi koji su tretirani različitim koncentracijama nanoAg-a određena je pomoću modificirane metode prema Drabkinu (81). U tu je svrhu korišten Drabkinov reagens (Randox Laboratories, Crumlin, UK) koji sadrži $K_4[Fe(CN)_6]$ i KCN. Hemoglobin oslobođen iz hemoliziranih eritrocita oksidira se u prisustvu $K_4[Fe(CN)_6]$ u methemoglobin, koji u reakciji s KCN-om stvara obojeni cijanmethemoglobin. Stvoreni cijanmethemogolobin određen je kolorimetrijski mjerenjem apsorbance reakcijske smjese na 540 nm (A_{540}). Kalibracijska krivulja je konstruirana iz A_{540} vrijednosti izmjerenih u standardnim otopinama humanog hemoglobina u koncentracijskom rasponu od 0,0113 do 2,88 mg/mL.

U uzorcima krvi zdravih dobrovoljaca na K_3EDTA antikoagulans određena je koncentracija hemoglobina. U 5,0 mL Drabkinovog reagensa dodano je 20 µL pune krvi i nakon 15 min izmjerena je $A_{540.}$ Nakon toga krvi su razrijeđene Dulbekovom PBS (DPBS) otopinom do koncentracije hemoglobina 10 ± 1 mg/mL. U uzorcima razrijeđene krvi ponovno je određena koncentracija hemoglobina prema istom protokolu (početna koncentracija hemoglobina). Ovim uzorcima krvi (100 µL) dodano je 700 µL DPBS-a i otopine nanoAg-a (100 µL) do konačnih koncentracija 1, 10, 50 i 100 mg Ag/L. Na isti način pripremljena je slijepa proba (DPBS), pozitivna kontrola (Triton 2 % w/v), negativna kontrola (PEG 10 mg/mL), a za kontrolu hemolize zbog smanjene osmolarnosti dodana je destilirana voda. Smjese su inkubirane tijekom 3 h na 37 °C i zatim centrifugirane na brzini od 800 x *g* tijekom 15 min. Supernatantu (50 µL) je dodan Drabkinov reagens (50 µL), inkubirano je 15 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je izmjerena A_{540}. Iz kalibracijske krivulje određene su vrijednosti oslobođenoga hemoglobina. Postotak hemolize izračunat je iz omjera koncentracije oslobođenog hemoglobina i početne koncentracije hemoglobina uz korekciju slijepe probe.

Poznato je da nanoAg interferiraju u kolorimetrijskim reakcijama zbog apsorpcije svjetla u vidljivom dijelu spektra (80) pa je stoga ispitana mogućnost optičke interferencije nanoAg-a u postupku ispitivanja hemolize. Postupak ispitivanja hemolize je ponovljen, ali je umjesto razrijeđene pune krvi upotrijebljena plazma koja je pripremljena centrifugiranjem pune krvi uzete na K_3EDTA antikoagulans na brzini od 1200 x *g* tijekom 15 min. Rezultati ispitivanja hemolitičke aktivnosti nanoAg-a korigirani su za optičku interferenciju nanoAg-a.

Druga moguća interferencija u postupku hemolize proistječe iz svojstva nanočestica da vežu proteine i stoga je moguće da se dio oslobođenoga hemoglobina vezao na nanoAg i bio uklonjen iz supernatanta. Zato je dodatno ispitana adsorpcija hemoglobina na površinu nanoAg-a koristeći otopinu ljudskog hemoglobina (10 mg/mL) u razrijeđenoj ljudskoj plazmi umjesto pune krvi u postupku ispitivanja hemolize.

4.3.4. Učinak nanočestica srebra na agregaciju trombocita

U većini objavljenih istraživanja o učincima nanoAg-a na agregaciju trombocita korištena je metoda optičke agregometrije i PRP (79)(62), ali kod te metode opisana je optička interferencija s nanoAg-om (62). Stoga je u ovom istraživanju upotrijebljena metoda impedancijske agregometrije za koju nisu utvrđene interferencije s nanoAg-om, a korišten je uzorak pune krvi. Impedancijskim agregometrom mjeri se promjena impedancije koja nastaje zbog adhezije i agregacije trombocita na elektrode agregometra nakon aktivacije trombocita agonistima agregacije. Korišteni su sljedeći agonisti za aktivaciju trombocita: ADP, kolagen i ristocetin. Oni aktiviraju trombocite putem različitih receptora, odnosno putem različitih biokemijskih putova u trombocitu.

Uzorcima pune krvi (323 µL) (n=6) dodane su otopine nanoAg-a (17 µL) tako da su konačne koncentracije nanaoAg-a u uzorcima bile 1, 5, 10, 20, 50 i 100 mg Ag/L. Za pripremu negativne kontrole korištena je fiziološka otopina. Uzorci su inkubirani tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je određena agregacija trombocita prema protokolu proizvođača uz agoniste ADP konačne koncentracije 6,5 µM, kolagen konačne koncentracije 3,2 µg/mL i ristocetin konačne koncentracije 0,77 mg/mL, sve od proizvođača Roche (Roche Diagnostics, Manheim, Njemačka).

Ispitali smo može li sam nanoAg izazvati agregaciju trombocita mjerenjem impedancije u punoj krvi tijekom 30 minuta odmah nakon dodatka nanoAg-a prema vlastitom protokolu na

Multiplate analizatoru. Punoj krvi (300 µL) (n=6) razrijeđenoj s fiziološkom otopinom (300 µL) dodane su otopine nanoAg-a (15 µL) tako da je konačna koncentracija nanoAg-a u krvi bila 100 mg Ag/L. Na isti način ispitan je i utjecaj samih omotača (PVP 0,0075 % (w/v), PLL 0,0025 % (w/v) i (w/v), AOT 0,0125 mM) i ionskog oblika srebra (dodatkom $AgNO_3$ do konačne koncetracije 0,1, 1 i 10 mg Ag/L). Sva mjerenja su učinjena na uzorcima krvi od 6 donora u duplikatu jer mjerne posudice (Roche Diagnostics, Manheim, Njemačka) sadrže dva para elektroda. Agregacija trombocita mjerena je na uređaju Multiplate (Roche Diagnostics, Manheim, Njemačka) koji grafički prikazuje promjenu agregacije trombocita (AU, od engl. *aggregation unit*) tijekom vremena te računa površinu ispod krivulje (AUC, od engl. *area under the curve*). AUC vrijednost je prema preporuci proizvođača najbolja veličina koja opisuje agregaciju trombocita. Izmjerene AUC su preračunate u odnosu na AUC uzorka koji nije tretiran s nanoAg-om (% negativne kontrole), a rezultati izraženi kao srednja vrijednost ± SD.

4.3.5. Koagulacijski testovi PV, APTV i TV

Utjecaj nanoAg-a na aktivaciju vanjskoga i unutarnjega puta zgrušavanja te na posljednji korak pretvorbe fibrinogena u fibrin određen je koagulacijskim testovima mjerenjem PV-a, APTV-a i TV-a. Tim se koagulacijskim testovima mjeri vrijeme potrebno da nastane ugrušak tj. fibrinska mrežica u plazmi nakon dodatka određenog aktivatora zgrušavanja. PV je izmjereno nakon dodatka rekombinantnog tkivnog faktora (Innovin), APTV nakon dodatka elaginske kiseline i fosfolipida soje (Actin FS), a TV nakon dodatka trombina (BC Thrombin) na instrumentu BCS XP (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Njemačka) prema protokolu proizvođača koji je navedene metode validirao za rutinsku primjenu u kliničkim laboratorijima u svrhu ispitivanja poremećaja hemostaze. Navedeni reagensi su komercijalno dobavljeni od proizvođača Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Njemačka.

Ispitivanja su provedena tako da su uzorcima plazme (380 µL) (n=6) dodane otopine nanoAg-a (20 µL) do konačnih koncentracija od 1, 5, 10, 20, 50 i 100 mg Ag/L. Za pripremu negativne kontrole korištena je fiziološka otopina. Uzorci su inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi i zatim su izmjereni PV, APTV i TV. Rezultati su izraženi u odnosu na PV, APTV i TV izmjerenih u uzorku plazme koja nije tretirana s nanoAg-om (% negativne kontrole) uz SD vrijednosti.

Utjecaj samih omotača (PVP 0,0075 % (w/v), PLL 0,0025 % (w/v) i (w/v), AOT 0,0125 mM) i $AgNO_3$ (konačne koncentracije 0,1; 1 i 10 mg Ag/L) na PV, APTV i TV ispitani su na način opisan za nanoAg.

4.3.6. Analiza stvaranja trombina

Za ispitivanje učinka nanoAg-a na nastanak trombina u plazmi upotrijebljen je test stvaranja trombina (TGT, od engl. *thrombin generation test*) (82) koji se smatra zlatnim standardom za ispitivanje učinaka nanočestica na hemostazu (83). Ovom metodom prati se nastanak kromogena djelovanjem trombina na supstrat iz kojeg trombin sporo oslobađa kromogen. Promjena apsorbancije kromogena mjerena je tijekom 30 minuta na 405 nm prema protokolu proizvođača na instrumentu BCS XP (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Njemačka) reagensom Innovance ETP od istog proizvođača. Za aktivaciju zgrušavanja upotrijebljen je reagens Innovin koji sadrži rekombinantni tkivni faktor (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Njemačka). Računalni program analizatora BCS XP analizira krivulje stvaranja trombina i daje nam podatke: endogeni trombinski potencijal (ETP) iz površine ispod krivulje i maksimalnu brzinu nastanka trombina (Cmax) u mA/min.

Ispitivanje je provedeno na odmrznutim uzorcima plazme koji su odmrznuti u vodenoj kupelji tijekom 10 minuta na 37 °C. Uzorcima plazme (380 μL) (n=6) dodane su otopine nanoAg-a (20 μL) do konačnih koncentracija od 1, 5, 10, 20, 50 i 100 mg Ag/L. Za pripremu negativne kontrole korištena je fiziološka otopina. Uzorci su inkubirani 30 min na sobnoj temperaturi i zatim je izmjeren ETP i Cmax. Rezultati su izraženi u odnosu na ETP i Cmax izmjerenih u uzorku plazme koja nije tretirana s nanoAg-om (% negativne kontrole).

Utjecaj samih omotača (PVP 0,0075 % (w/v), PLL 0,0025 % (w/v) i (w/v), AOT 0,0125 mM) i $AgNO_3$ (konačne koncentracije 0,1; 1 i 10 mg Ag/L) na PV, APTV i TV ispitani su na način opisan za nanoAg.

4.3.7. Rotacijska tromboelastometrija

Promjene globalne hemostaze pod utjecajem nanoAg ispitane su mjerenjem viskoelastičnih svojstava pune krvi tijekom procesa zgrušavanja i fibrinolize metodom rotacijske tromboelastometrije (ROTEM). Primijenjena je metoda neaktivirajuće tromboelastometrije, (NATEM, od engl. *nonactivated thromboelastometry*) u kojoj se rekalcificira citratna puna krv.

U NATEM testu se kao reagens koristi $CaCl_2$ (Startem, Tem International, Minhen, Njemačka), a viskoelastična svojstva krvi se mjere tijekom 60 minuta. Računalni program grafički prikazuje tromboelastogram sa sljedećim mjerenim veličinama: vrijeme zgrušavanja (CT, od engl. *clotting time*), vrijeme stvaranja ugruška (CFT, od engl. *clot formation time*), kut alfa (α), maksimalna čvrstoća ugruška (MCF, od engl. *maximum clot firmness*) i maksimalna razgradnja ugruška.

Uzorcima pune krvi (323 µL) (N=6) dodane su otopine nanoAg-a (17 µL) (n=6) do konačnih koncentracija 1, 5, 10, 20, 50 i 100 mg Ag/L, a za pripremu negativne kontrole korištena je fiziološka otopina. Smjese krvi i nanoAg-a su inkubirane tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi i zatim je napravljena analiza NATEM na uređaju ROTEM (Tem International, Minhen, Njemačka) prema protokolu proizvođača. Na isti način ispitan je i utjecaj samih omotača (PVP 0,3 % (w/v), PLL 0,01 % (w/v) i AOT 0,01 mM) i $AgNO_3$ (konačne koncentracije u krvi 0,1; 1 i 10 mg Ag/L) na globalnu hemostazu.

Rezultati za CT, CFT, kut alfa i MCF izraženi su u odnosu na rezultate dobivene za uzorke koji nisu tretirani s nanoAg-om (% negativne kontrole).

4.3.8. Citotoksičnost nanočestica srebra

Citotoksični učinak nanoAg-a na trombocite ispitan je pomoću polianionske boje calcein AM koja lako ulazi u stanicu, ali se samo u metabolički aktivnoj stanici metabolizira djelovanjem esteraza u zelenu fluorescentnu boju (84). Udio živih stanica određen je iz intenziteta fluorescencije boje koji je veći za vijabilne stanice u odnosu na mrtve stanice.

Pokusi su provedeni na opranim trombocitima izoliranim od 6 donora. Oprani trombociti razrijeđeni su toliko da im je konačan broj bio 20 x 10^6/mL, te su zatim tretirani s različitim nanoAg u koncentracijskom rasponu od 0,2 i 100 mg Ag/L, s omotačima (PVP, AOT, PLL) i ionskim oblikom srebra. Nakon inkubacije od 30 minuta, nanoAg, omotači i ionsko srebro isprani su dodatkom 2 ml PBS-a i centrifugiranjem 7 min na 700 × g. Na talog ispranih trombocita je zatim dodano 100 µL PBS-a i 1 µL otopine calceina AM (0,1 mM) nakon čega su trombociti inkubirani s bojom 15 minuta na 37 °C. Nakon toga, calcein AM je ispran s 2 mL PBS-a i talog resuspendiran u 200 µL PBS-a te odmah analiziran na protočnom citometru BD FACSCalibur (Beckton Dickinson, Heidelberg, Njemačka). Za normalizaciju podataka upotrijebljen je omjer geometrijske srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije (MFI, engl.

mean fluorescence intensity) tretiranog i netretiranog (kontrolnog) uzorka. Rezultati su prikazani kao % živih odnosno mrtvih stanica u odnosu na kontrolni (netretirani uzorak) uz pripadajaće SD vrijednosti.

4.3.9. Ulazak nanočestica srebra u trombocite

Ispitivanje ulaska nanoAg-a u trombocite provedeno je uporabom protočne citometrije i TEM metode. Na protočnom citometru BD FACSCalbur je paralelno uz praćenje svjetlosti raspršene na stanicama pod kutom od 90° (FSC, od engl. *forward scatter*) i MFI vrijednosti za tretirane i netretirane WP mjereno i raspršenje svjetlosti na stanicima pod kutom od 20° (SSC, od engl. *side scatter*) u odnosu na ulaznu zraku svjetla. S obzirom na to da nanoAg raspršuje svjetlo granuliranosti stanice se poveća pa se ulazak nanoAg-a u stanice dokazuje povećanjem veličine SS u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice). Dokaz ulaska nanoAg-a u stanice jest porast granuliranosti stanice, tj. MFI (SSC) omjer > 1 dok FSC ostaje isti (84). Prednost ove metode je što se u vrlo kratkom vremenu analizira velik broj stanica (približno 10000) za razliku od mikroskopskih tehnika kojima se može analizirati daleko manji broj stanica. Proporcija internaliziranih nanoAg-a određena je za sve četiri vrste nanoAg-a (PVP-, PLL-, AOT- i BSA-nanoAg) pri četiri koncentracije.

Međutim, metodom protočne citometrije nije moguće razlikovati povećava li se granuliranost stanica nakon tretmana s nanoAg-om zbog ulaska nanoAg u stanice ili zbog njihove adsorpcije na površinu stanice. Stoga je provedeno dodatno ispitivanje TEM metodom koja je poslužila za vizualizaciju trombocita tretiranih s nanoAg-om.

PRP je tretiran sa sve četiri vrste nanoAg-a (PVP-nanoAg, AOT-nanoAg, PLL-nanoAg, BSA-nanoAg) tako da je u 100 µL PRP-a dodano 10 µL otopine nanoAg-a do konačne koncentracije 10 mg Ag/L. Nakon 30 minutne inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku, smjesa je centrifugirana 7 min na 700 × *g*. Talog trombocita je resuspendiran u 1 mL fiksativa za TEM (2 % glutaraldehid) i pohranjen na 4 °C. Stanice su postfiksirane s 1 % osmij-tetroksida otopljenim u 0,1 M natrij-kokodilatnog pufera i s 0.5 % uranil acetatom otopljenim u 0,05 M maleatnom puferu. Nakon fiksacije, stanice su dehidrirane u koncentracijskom nizu otopina etanola i uklopljene u Epon smolu. Načinjeni su ultratanki rezovi koji su preneseni na Formvarom® obloženu bakrenu mrežicu i zatim pregledani na TEM mikroskopu kako je opisano u odjeljku 4.3.2.

4.3.10. Promjene potencijala mitohondrijske membrane trombocita

Za procjenu mogućega mehanizama toksičnoga djelovanja različitih nanoAg-a na trombocite, izmjerene su promjene membranskih potencijala mitohondrija. Različiti podražaji i agensi mogu značajno promjeniti propusnost mitohondrijskih membranskih pora inducirajući bilo depolarizaciju ili hiperpolarizaciju mitohondrijske membrane. Promjene u potencijalu mitohondrijske membrane (MMP, od engl. *mitochondrial membrane potential*) su ispitane korištenjem fluorescentne karbocianinske boje 3,3′-diheksiloksakarbocijanin jodid (DiOC6) koja ulazi u mitohondrije. Iz mitohondrija se oslobađa u slučaju depolarizacije mitohondrijske membrane što dovodi do pada intenziteta fluorescencije ove boje. U slučaju hiperpolarizacije, DiOC6 se koncentrira u mithondrijima te intenzitet fluorescencije raste. Izbor koncentracije boje temeljio se na titracijskim pokusima kako bi se pronašla doza koja pravilno procjenjuje MMP jer je dobro poznato da veća koncentracija DiOC6 može inhibirati stanično disanje (43). U ovim pokusima korišteni su uzorci PRP-a i WP-a dobiveni od 6 donora koji su tretirani različitim nanoAg-ima pri koncentracijama koje nisu izazvale značajniju smrtnost trombocita, odnosno pri kojima je bilo živo > 80 % trombocita. Nakon inkubacije od 30 min na 37 °C, trombociti su isprani s PBS-om, inkubirani s 1 nM DiOC6 tijekom 30 minuta na 37 °C te još jednom isprani s PBS-om. Obojene stanice analizirane su očitavanjem intenziteta fluorescencije koristeći Victor™ čitač mikrotitarskih pločica (PerkinElmer, Waltham, MA, SAD). Valna duljina pobude bila je 485 nm, a valna duljina emisije 510 nm. Sva mjerenja odrađena su u triplikatu. Rezultati su prikazani kao % flourescencije (uz pripadajuće SD vrijednosti) u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice), dok su za pozitivnu kontrolu odabrani trombociti tretirani s 50 μM tert-butil hidroksidom.

4.3.11. Određivanje biljega oksidativnog stresa

Kao mogući mehanizam citotoksičnih učinaka nanoAg-a na trombocite ispitan je oksidativni stres. Za biljege oksidativnog stresa u trombocitima tretiranim s različitim nanoAg-ima odabrani su nastajanje peroksidnih radikala, nastajanje superoksidnih radikala te razina unutarstaničnog GSH. U tu svrhu su korištene flourescentne boje diklorofuorescein diacetat (DCFH-DA), dihidroetidij (DHE) i monoklorbiman (MCBM). DCFH-DA boja lako ulazi u stanicu u kojoj se djelovanjem esteraza odcjepljuje lipofilna skupina DA i ukoliko su u stanici prisutni perokdisni radikali oksidirat će DCFH u fluorescentni spoj 2’-7’dichlorofluorescein

(85). DHE isto kao DCFH-DA lako ulazi u stanicu i u prisutnosti superoksidnog radikala oksidira se u fluorescentni spoj 2-hidroetidij koji je stabilan u stanici (86). MCBM nakon ulaska u stanicu reagira s GSH stvarajući flourescentan spoj (87). Intenzitet fluorescencije tih triju boja direktno je proporcionalan količini peroksidnih, superoksidnih radikala, odnosno razini GSH.

Pokusi su provedeni korištenjem PRP-a i WP-a prikupljenim od 6 donora. PRP i WP su tretirani različitim nanoAg-ima pri koncentracijama koje nisu izazvale značajniju smrtnost trombocita, odnosno pri kojima je bilo živo > 80 % trombocita. Nakon inkubacije od 30 min na 37 °C, trombociti su isprani s PBS-om, inkubirani s 20 μM DCFH-DA, 20 μM DHE ili s 50 μM MCBM bojom 15 minuta u mraku na 37 °C. Nakon inkubacije, stanice su isprane s PBS-om i analizirane pomoću Victor ™ čitača mikrotitarskih pločica. Za bojenje DCFH-DA i DHE, valna duljina pobude bila je 485 nm, a valna duljina emisije 535 nm. Za MCBM valna duljina pobude bila je 355 nm, a emisije 460 nm. Rezultati su prikazani kao % flourescencije (uz pripadajuće SD vrijednosti) u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice), dok su za pozitivnu kontrolu odabrani trombociti tretirani s 50 μM tert-butil hidroksidom.

4.3.12. Aktivacija trombocita

Aktivacija trombocita pri izlaganju različitim vrstama nanoAg-a ispitana je dokazivanjem biljega aktivacije na površini trombocita metodom protočne citometrije. Izabrani su P-selektin i aktivirani GP IIb-IIIa kao biljezi aktivacije. P-selektin je adhezijski protein koji se nalazi na unutarnjoj strani α-granula u trombocitima. Nakon aktivacije trombocita i oslobađanja sadržaja α-granula ispoljava se na vanjskoj strani membrane trombocita. Njegov izražaj na membrani trombocita određen je mišjim antihumanim monoklonskim antitijelom na CD62P konjugiranim s fluorokromom PE. GP IIb-IIIa prilikom aktivacije trombocita prelazi iz niskoafinitetnog u visokoafinitetni oblik čiji izražaj je izmjeren mišjim antihumanim monoklonskim antitijelom PAC-1 konjugiranim s fluorokromom FITC. Za obilježavanje trombocita u punoj krvi upotrijebljeno je mišje antihumano monoklonsko antitijelo na CD61 konjugirano s fluorokromom PerCP koje se veže na specifični membranski površinski trombocitni antigen glikoprotein GP IIIa.

Pokusi su provedeni na uzorcima pune krvi i WP-a prikupljenim od 4 donora. Svaki od uzoraka (90 μL) je odmah nakon uzorkovanja i pripreme tretiran s različitim nanoAg, otopinama omotača kao i ionskim oblikom srebra dodatkom 10 μL radnih otopina do željenih konačnih koncentracija koje su odabrane prema rezultatima dobivenim za citotoksičnost. Odabrane su

one koncentracije nanoAg-a, omotača i $AgNO_3$ koje nisu izazvale značajniju smrtnost trombocita, odnosno pri kojima je bilo živo > 80 % trombocita. Netretirani uzorci su bili negativna kontrola, a uzorci tretirani s 10 μM heksapeptidnim aktivatorom receptora trombina (TRAP-6, od engl. *thrombin receptor activating peptide*) su poslužili kao pozitivna kontrola. Svi uzorci su zatim inkubirani tijekom 30 minuta na 37 °C. Po 5 μL tretiranih uzoraka je zatim preneseno u nove epruvetice s antitijelima (1. CD61 PERCP i CD62 PE; 2. CD61 PERCP i PAC-1 FITC), te inkubirano 15 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Zatim je dodano 500 μL hladnog 1 % (v/v) paraformaldehida u fiziološkoj otopini te su provedene analize na protočnom citometru praćenjem MFI vrijednosti za pojedini biljeg. Sva mjerenja su ponovljena 3 puta. Rezultati su prikazani kao postotak (uz odgovarajuće SD vrijednosti) u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice).

4.4. Statističke metode

Svi podatci prikazani su numerički i opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu raspodjelu, a u ostalim slučajevima medijanom i rasponom (minimalna i maksimalna vrijednost). Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između nezavisnih skupina testirane su analizom varijance (ANOVA) s post-hoc Tukey HSD testom. U slučaju analize ulaska nanočestica u stanicu, gdje je testirana razlika varijabli koji ne slijede normalnu raspodjelu, a nije dokazana pretpostavka o homogenosti varijanci, razlike su testirane pomoću Kruskall-Wallis testa uz post-hoc Dunn test. Razina statističke značajnosti postavljena je na $p = 0,05$. Za statističku analizu upotrijebljen je statistički program STATISTICA 13.2 (StatSoft-Dell-TIBCO Software Inc, Palo Alto, SAD).

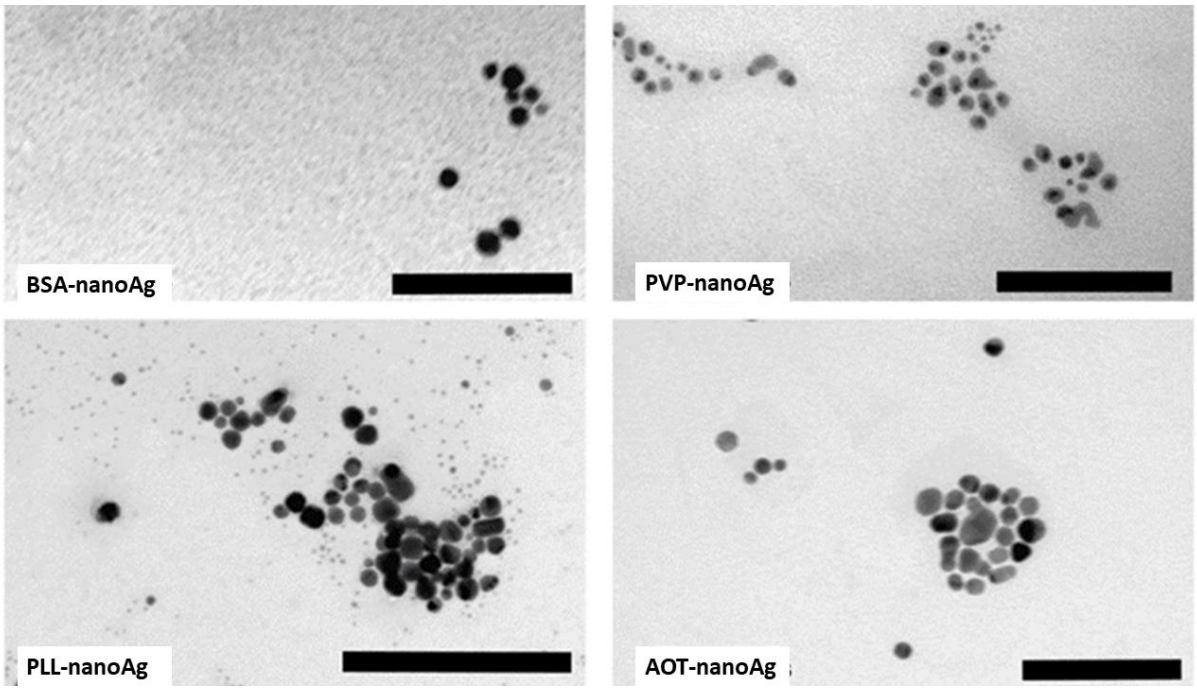
5. REZULTATI

5.1. Fizikalno-kemijska svojstva nanočestica sreba

Popis svih nanoAg vrsta koji su korišteni u ovom istraživanju prema njihovom stabilizacijskom omotaču, obliku i primarnoj veličini nalazi se u Tablici 5.1. Veličina i oblik nanoAg-a određeni su TEM-om Slika 5.1.

Tablica 5.1. Vrste nanočestica srebra (nanoAg) korištene u ovom istraživanju s obzirom na stabilizacijski omotač, oblik i primarnu veličinu. Promjer (*d*) u nm za različite nanoAg te njihov oblik određeni su transmisijskom elektronskom mikroskopijom.

NanoAg vrsta	Omotač	Oblik	*d* /nm
BSA-nanoAg	goveđi serumski albumin	kugla	9.1 ± 2.8
PVP-nanoAg	polivinilpirolidon	kugla	6.8 ± 4.1
PLL-nanoAg	poli-*L*-lizin	kugla	7.6 ± 3.5
AOT-nanoAg	bis (2-etilheksil)-sulfosukcinat	kugla	12.3 ± 3.7



Slika 5.1. Snimke nanočestica srebra (nanoAg) stabiliziranih s BSA, PVP, PLL i AOT omotačima dobivene transmisijskom elektronskom mikroskopijom. Mjerilo je veličine 100 nm.

Osim primarne veličine i oblika, svim je nanoAg vrstama određen hidrodinamički promjer (d_H) DLS metodom, površinski naboj mjerenjem ζ potencijala ELS metodom, te udio slobodnih Ag^+ iona u ultračistoj vodi (Tablica 5.2.). Kako je bilo očekivano, d_H vrijednosti bile su veće od *d* vrijednosti jer se na površinu nanoAg-a u otapalu adsrobiraju molekule otapala, kao i druge sastavnice otapala. Sve su nanoAg vrste bile monodisperzne što je vidljivo i iz izmjerenih PdI vrijednosti koje su bile < 0.3. Površinski naboj nanoAg vrstama bio je određen nabojem primijenjenoga stabilizacijskoga omotača osim u slučaju PVP-nanoAg. Tako su PLL-nanoAg imale pozitivan, a AOT-nanoAg i BSA-nanoAg negativan ζ potencijal (Tablica 5.2.). Iako je za PVP-nanoAg korišten neutralni polimer PVP, negativan naboj te vrste vjerojatno potječe od iona BH_4^- koji su korišteni pri sintezi i koji su se tijekom priprave adsorbirali na površinu nanoAg-a.

Količina slobodnih Ag^+ iona u mediju ultračiste vode bila je za sve nanoAg vrste manja od 5 % (Tablica 5.2.), a najveći udio slobodnih iona izmjeren je kod PVP-nanoAg vrste.

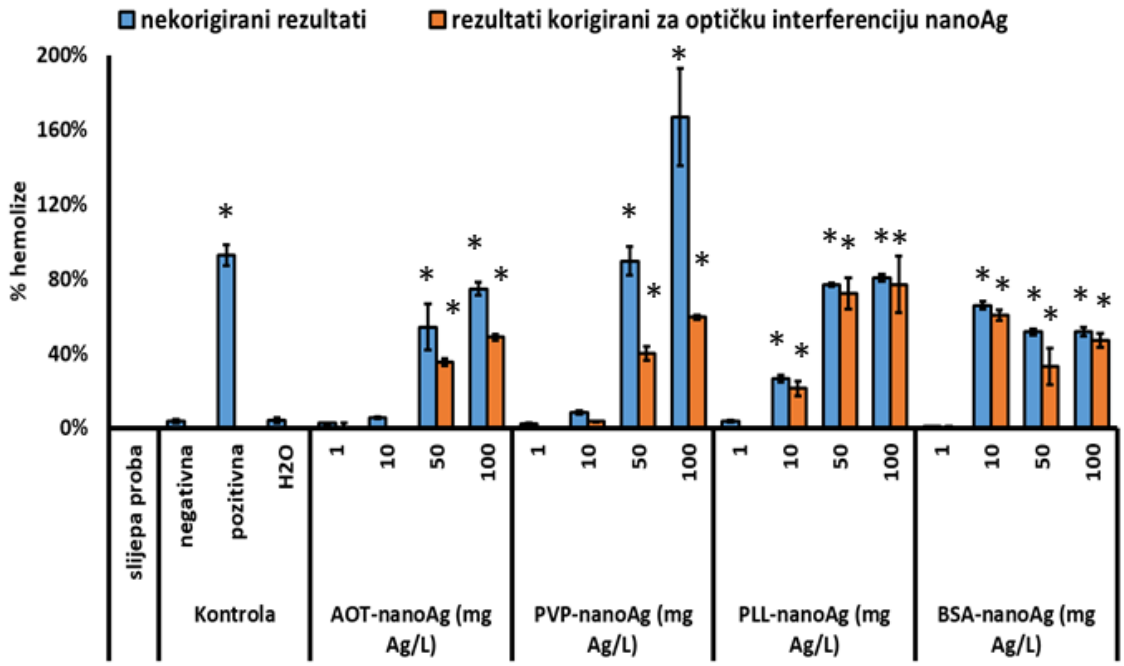
Tablica 5.2. Hidrodinamički promjer (d_h), zeta potencijal (ζ) i indeks polidisperzije (*PdI*) izmjereni dinamičkim i elektroforetskim rasapom svjetlosti. Postotak slobodnih iona Ag za BSA-, PVP-, PLL- i AOT-nanoAg koncentracije 10 mg Ag/L izmjeren u ultračistoj vodi pri 25 °C.

NanoAg vrsta	d_H /nm	ζ / mV	% otopljenog Ag	*PdI*
AOT-nanoAg	15.1 ± 3.8	–42.9 ± 2.6	3.2 ± 0.4	0.29
PLL-nanoAg	10.6 ± 4.1	35.2 ± 1.4	3.9 ± 1.1	0.22
PVP-nanoAg	9.7 ± 2.4	–14.4 ± 0.9	4.8 ± 0.7	0.14
BSA-nanoAg	11.1 ± 3.8	–8.9 ± 0.7	0.8 ± 0.2	0.12

Dobiveni podatci pokazali su da je postignut jedan od ciljeva ovog istraživanja: priprava različitih vrsta nanoAg-a s različitim stabilizacijskim omotačima, ali istoga oblika (okruglog) i primarne veličine (oko 10 nm) kako bi se odredila hemokompatibilnost i utjecaj na hemostazu nanoAg vrsta s obzirom na njihovu različitu površinsku funkcionalizaciju.

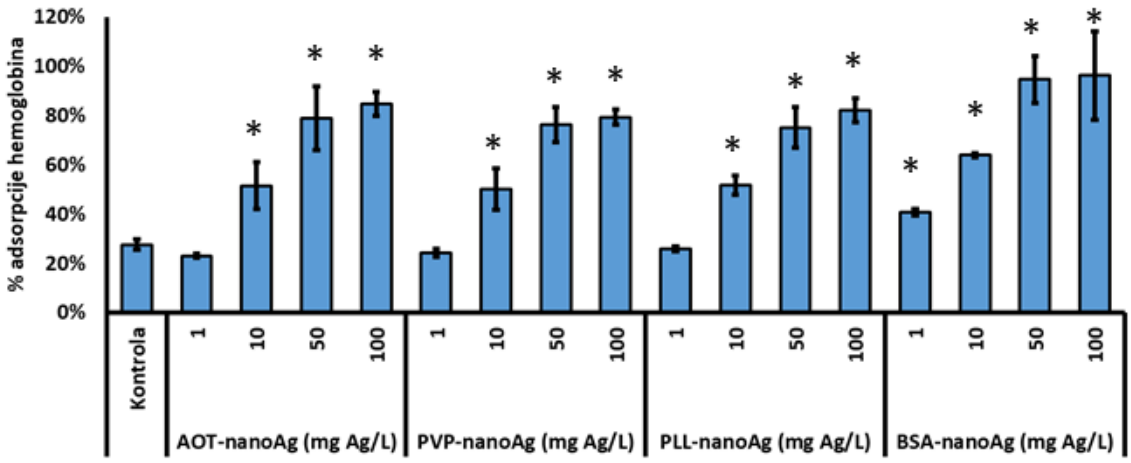
5.2. Hemolitički učinak nanočestica sreba

Prilikom ispitivanja učinaka nanoAg-a na eritrocite dobiveni su lažno pozitivni rezultati, te je pri nekim koncentracijama nanoAg-a izmjerena hemoliza eritrocita bila veća od 100 % (Slika 5.3.). Uzrok tome je apsorpcija svjetlosti od strane nanoAg vrsta na valnoj duljini od 540 nm koja je korištena u metodi određivanja hemolize prema Drabkinu. U svrhu dobivanja pouzdanih i ispravnih rezultata, rezultati su korigirani kako je opisano u poglavlju Materijali i metode. Iz korigiranih rezultata vidljivo je da intenzitet hemolize kod svih nanoAg-a ovisi o dozi osim za BSA-nanoAg (Slika 5.3.). Hemolizu su najintenzivnije izazivale PLL-nanoAg.



Slika 5.3. Postotak hemoliziranih eritrocita nakon 3 sata inkubacije pune krvi s BSA-, PVP-, PLL- i AOT-nanoAg. Rezultati su prikazani kao postotak hemolize koji je izračunat iz omjera oslobođenog hemoglobina i početne koncentracije hemoglobina. Plave kolone predstavljaju izmjerene nekorigirane vrijednosti hemoglobina metodom prema Drabkinu, a crvene kolone su vrijednosti korigirane zbog optičke interferencije nanoAg vrsta. Negativna kontrola je puna krv tretirana s politeilenglikolom (10 mg/mL), a pozitivna kontrola je puna krv tretirana s Triton-X 0,02 % (v/v). Rezultati su prikazani sa standardnim devijacijama mjerenja 6 uzoraka u triplikatu. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*).

Međutim, prilikom ispitivanja hemolize uzrokovanoj nanočesticama metodom prema Drabkinu, ali i drugim metodama koje mjere oslobođeni hemoglobin, treba uzeti u obzir mogućnost da se hemoglobin kao svaki drugi protein može adsorbirati na površinu nanočestice. To je i potvrđeno dodatnim ispitivanjem za koje su rezultati prikazani na Slici 5.4. iz koje je vidljiva koncentracijska ovisnost količine adsorbiranog hemoglobina na nanoAg.



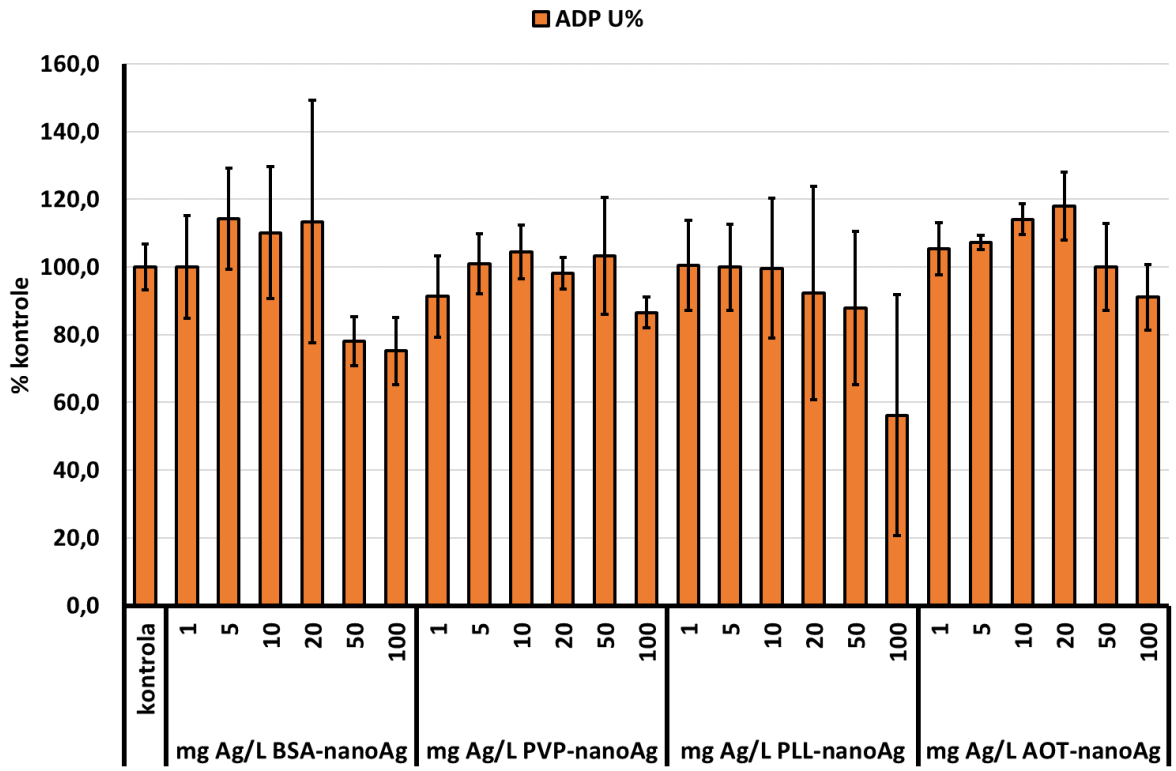
Slika 5.4. Postotak hemoglobina vezan na površinu AOT -, PVP-, PLL- i BSA-nanoAg nakon 3 sata inkubacije sa standardnom otopinom hemoglobina (10 mg/L hemoglobina u ljudskoj plazmi). Rezultati su prikazani sa standardnim devijacijama mjerenja 6 uzoraka u triplikatu. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*).

Opaženo vezanje uzrokom je lažno negativnih rezultata jer onaj dio hemoglobina koji se adsorbirao na površinu nanoAg-a nije reagirao s Drabkinovim reagensom, pa je ukupan rezultat ispitivanja hemolize nepouzdan. Jednostavnu korekciju rezultata nije bilo moguće provesti jer su rezultati prikazani na Slici 5.4. dobiveni inkubacijom nanoAg-a u otopini hemoglobina, dok su pokusi hemolize provedeni u punoj krvi. U punoj krvi nije moguće odrediti točnu koncentraciju hemoglobina koji se otpušten iz hemoliziranih eritrocita veže na površinu nanoAg-a jer ta količina može biti maskirana prisutnošću drugih proteina iz pune krvi na nanopovršini. Također nije bilo moguće odrediti do koje je mjere inhibirana detekcija adsorbiranog hemoglobina u reakciji prema Drabkinu.

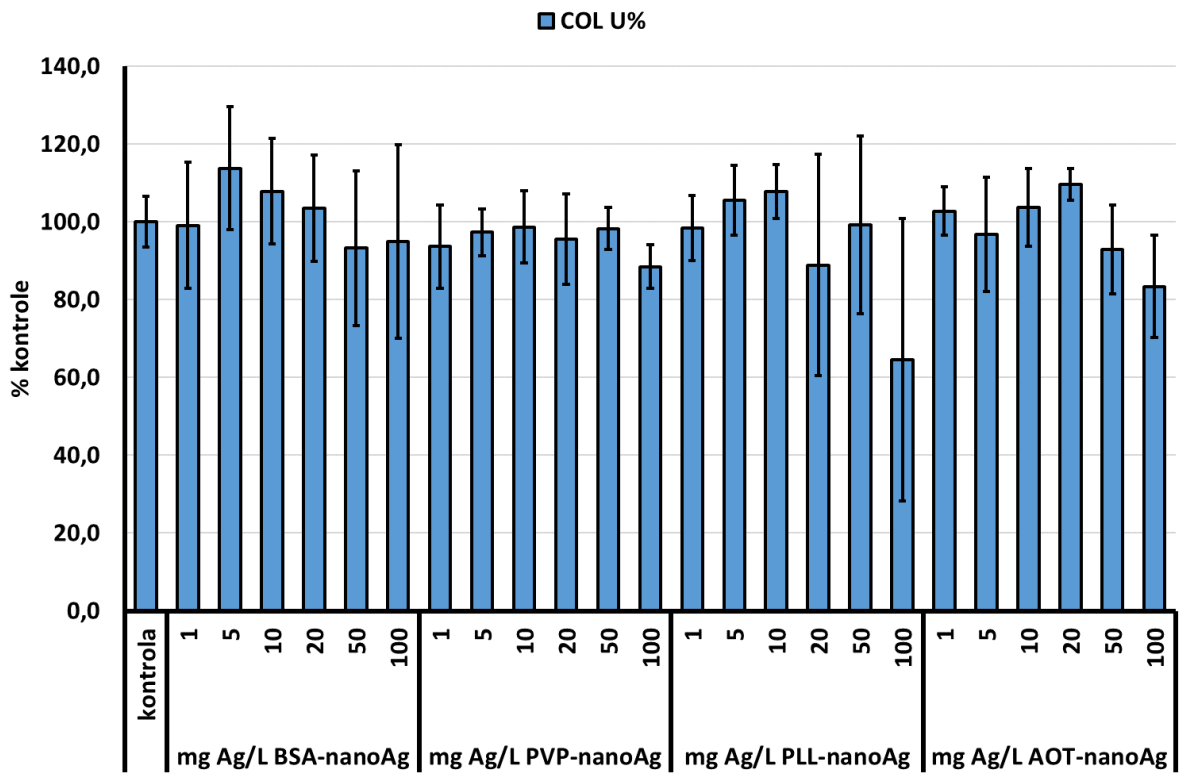
5.3. Učinak nanočestica sreba na hemostazu

5.3.1. Učinak nanočestica sreba na primarnu hemostazu

Rezultati ispitivanja učinaka različitih nanoAg-a na agregaciju trombocita impedancijskom agregometrijom uz agoniste ADP, kolagen i ristocetin prikazani su na Slikama 5.5., 5.6. i 5.7.

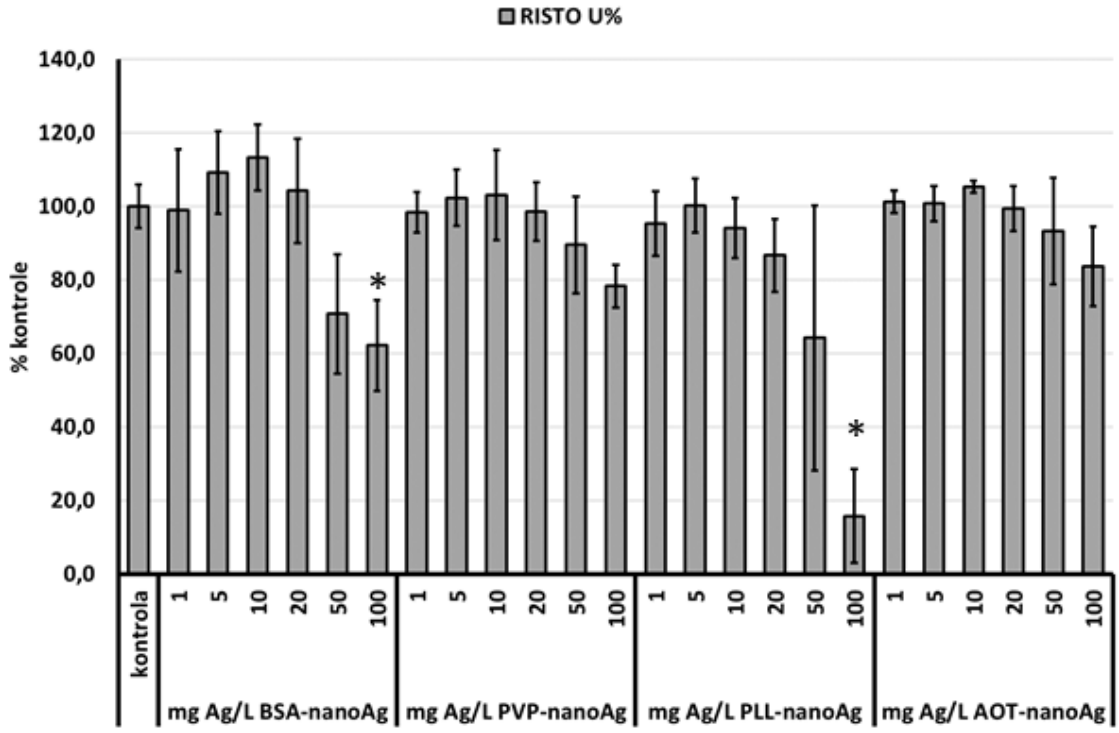


Slika 5.5. Učinak BSA-, PVP-, PLL- i AOT-nanoAg-a na agregaciju trombocita u punoj krvi mjerenu impedancijskom agregometrijom. Uzorci pune krvi tretirani su tijekom 30 minuta različitim koncentracijama nanoAg vrsta, a agregacija trombocita je potaknuta adenozin difosfatom (ADP). Rezultati su izraženi kao postotak negativne kontrole (netretirana puna krv). Prikazane su srednje vrijednosti 2 mjerenja za svaki od 6 uzoraka s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*). U - arbitarna jedinica mjere agregacije trombocita



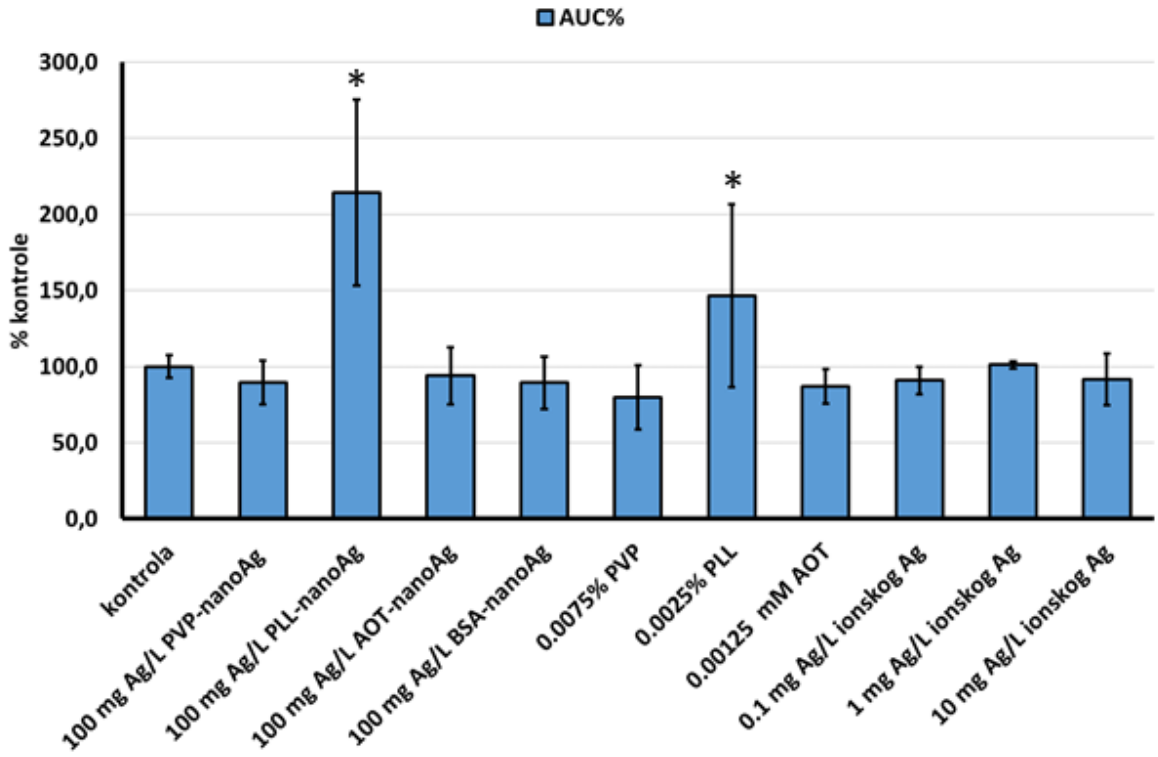
Slika 5.6. Učinak BSA-, PVP-, PLL- i AOT-nanoAg-a na agregaciju trombocita u punoj krvi mjerenu impedancijskom agregometrijom. Uzorci pune krvi tretirani su tijekom 30 minuta različitim koncentracijama nanoAg vrsta, a agregacija trombocita je potaknuta kolagenom (COL). Rezultati su izraženi kao postotak negativne kontrole (netretirana puna krv). Prikazane su srednje vrijednosti 2 mjerenja za svaki od 6 uzoraka s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*). U - arbitarna jedinica mjere agregacije trombocita

Vidljivo je da su sve nanoAg vrste kod viših koncentracija (50 i 100 mg Ag/L) smanjile agregaciju trombocita iako većina dobivenih rezultata nije bila statistički različita od kontrole (vrijednosti za netretirane trombocite). Statistički značajne razlike prema kontroli uočene su samo kod trombocita tretiranih s PLL-nanoAg-om kod kojih je agregacija bila potaknuta ristocetinom (Slika 5.7.).



Slika 5.7. Učinak BSA-, PVP-, PLL- i AOT-nanoAg-a na agregaciju trombocita u punoj krvi mjerenu impedancijskom agregometrijom. Uzorci pune krvi tretirani su tijekom 30 minuta različitim koncentracijama nanoAg vrsta, a agregacija trombocita je potaknuta ristocetinom (RISTO). Rezultati su izraženi kao postotak negativne kontrole (netretirana puna krv). Prikazane su srednje vrijednosti 2 mjerenja za svaki od 6 uzoraka s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*). U - arbitarna jedinica mjere agregacije trombocita

U pokusu u kojem je ispitana sposobnost samih nanoAg-a da izazovu agregaciju trombocita (bez aktivacije trombocita agonistima), izmjeren je izražen i statistički značajan učinak PLL-nanoAg na agregaciju trombocita (Slika 5.8). Budući da je agregacija trombocita mjerena odmah nakon dodatka nanoAg-a punoj krvi, iz ovoga se može zaključiti da su trombociti agregirali tijekom inkubacijskog perioda i u ostalim pokusima. U kontrolnom pokusu s omotačima korištenim za stabilizaciju nanoAg-a primijenjene su koncentracije omotača koje odgovaraju količinama omotača u otopinama nanoAg koncentracije od 100 mg Ag/L. Samo je PLL izazvao statistički značajnu promjenu u agregaciji trombocita u odnosu na konotrolu (netretirani uzorak), slično kao i PLL-nanoAg (Slika 5.8.). U istom kontrolnom pokusu ispitano je i ionsko srebro koje nije imalo učinka na agregaciju pri ispitivanim koncentracijama.



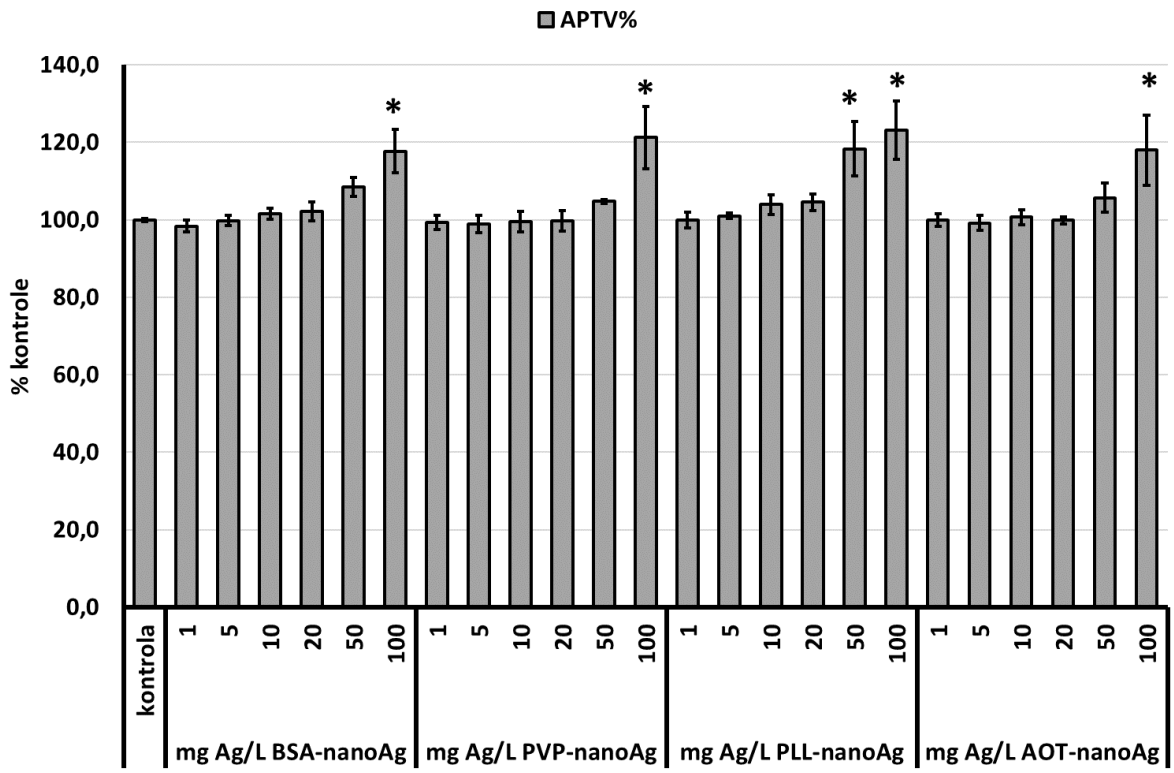
Slika 5.8. Učinak BSA-, PVP-, PLL- i AOT-nanoAg-a, omotača PVP, PLL i AOT i ionskog srebra na agregaciju trombocita u punoj krvi izmjeren impedancijskom agregometrijom koja je mjerena odmah nakon dodatka nanoAg, a bez dodatka agonista. Rezultati su izraženi kao postotak negativne kontrole (netretirana puna krv). Prikazane su srednje vrijednosti 2 mjerenja za svaki od 3 uzorka s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*). AUC - površina ispod krivulje koja prikazuje odnos promjene impedancije tijekom vremena izazvane agregacijom trombocita.

5.3.2. Učinak nanočestica sreba na sekundarnu hemostazu

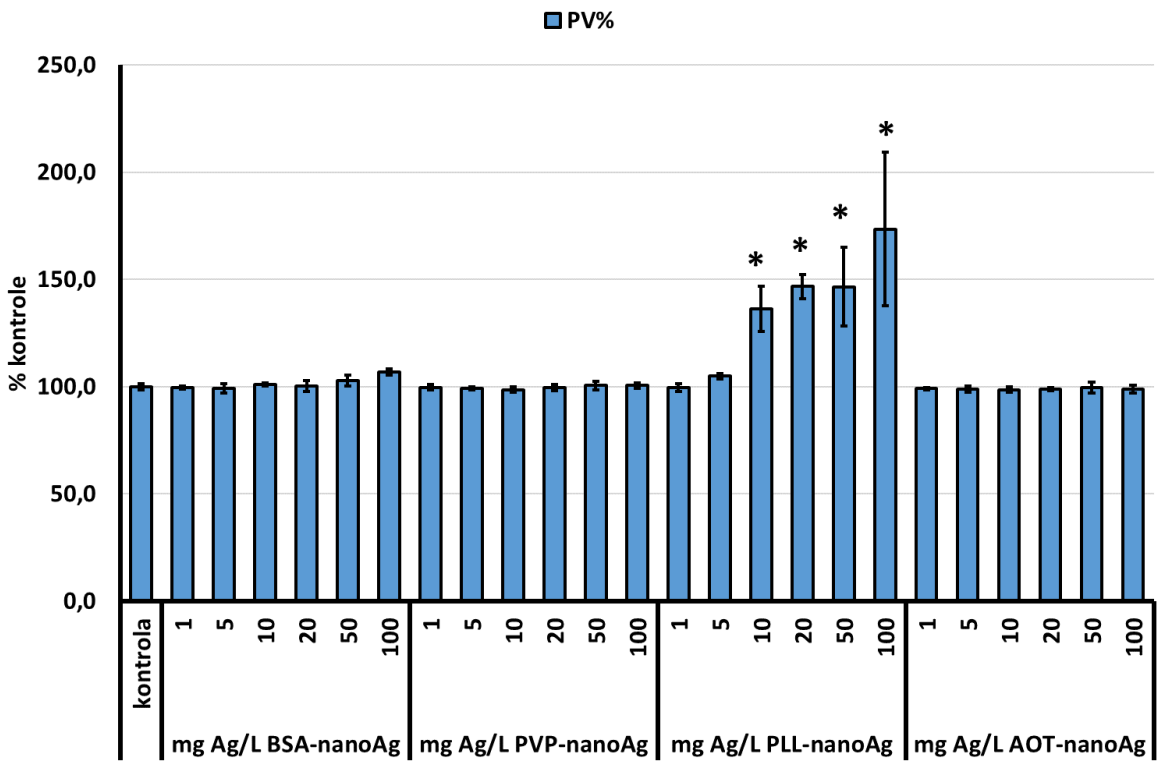
Učinak različitih nanoAg vrsta na vanjski i unutarnji put zgrušavanja ispitan je mjerenjem PV-a i APTV-a. Sve četiri vrste ispitivanih nanoAg-a statistički su značajno produžile APTV pri primjeni najviših koncentracija, odnosno kod 100 mg Ag/L BSA-, PVP- i AOT-nanoAg te kod 50 i 100 mg Ag/L i PLL-nanoAg (Slika 5.9.). Na vanjski put zgrušavanja utjecao je samo PLL-nanoAg, i to već od koncentracije 10 mg Ag/L, što je vidljivo iz statistički značajnog produženja

PV-a u odnosu na kontrolu (Slika 5.10). Što je primijenjena koncentracija PLL-nanoAg bila veća, PV je bilo sve duže.

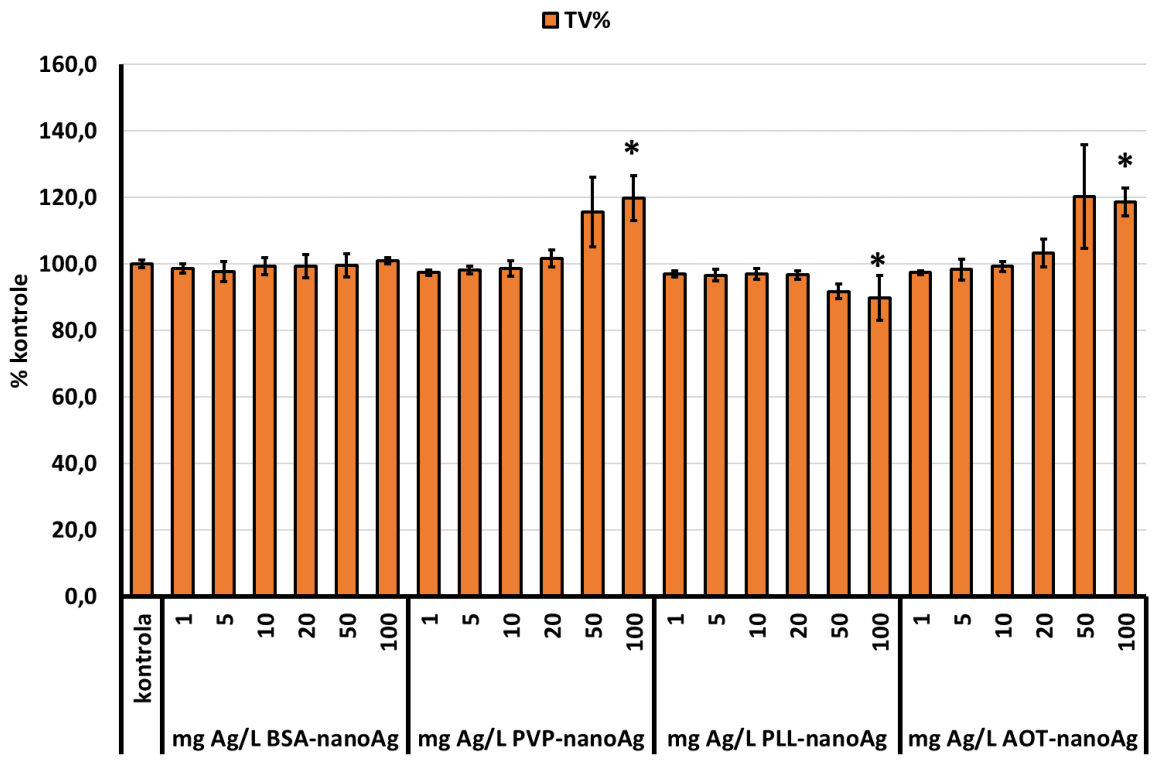
Osim PV-a i APTV-a, mjeren je i TV u svrhu ispitivanja utjecaja nanoAg-a na posljednji korak u koagulacijskoj kaskadi tj. pretvorbi fibrinogena u fibrin djelovanjem trombina. Dobiveni rezultati (Slika 5.11) su zanimljivi, jer su PVP- i AOT-nanoAg kod najviših koncentracija uzrokovali produženje TV-a, dok je PLL-nanoAg uzrokovao njegovo skraćenje, odnosno inhibirao je nastanak fibrinskog ugruška (Slika 5.11.).



Slika 5.9. Učinak BSA-, PVP-, PLL- i AOT-nanoAg-a na unutarnji put zgrušavanja izmjeren koagulacijskim testom u plazmi. Aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV) je izmjereno nakon izlaganja plazme nanoAg-u različitih koncentracija tijekom 30 minuta. Rezultati su izraženi kao postotak APTV-a u odnosu na negativnu kontrolu (netretirana plazma). Prikazane su srednje vrijednost rezultata (uz pripadajuće standardne devijacije) dobivenih za uzorke plazme koje se prikupljene od 6 donora. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*).

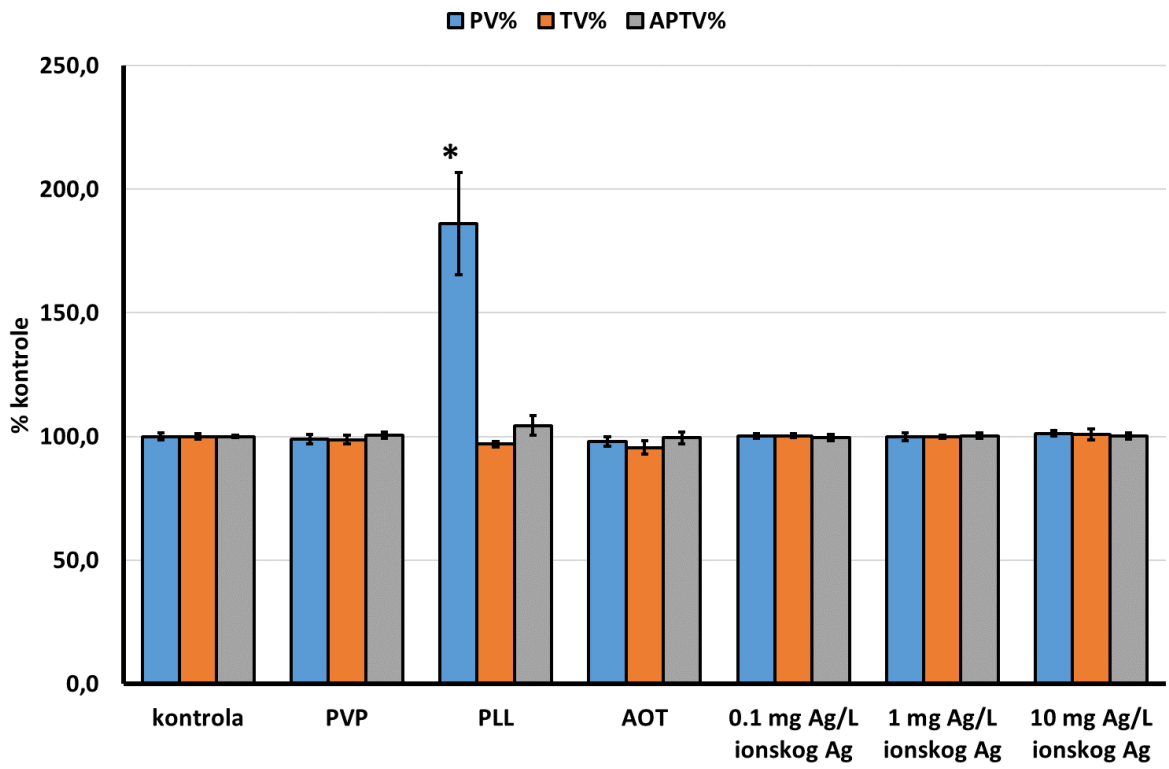


Slika 5.10. Učinak BSA-, PVP-, PLL- i AOT-nanoAg-a na vanjski put zgrušavanja izmjeren koagulacijskim testom u plazmi. Protrombinsko vrijeme (PV) je izmjereno nakon izlaganja plazme nanoAg-u različitih koncentracija tijekom 30 minuta. Rezultati su izraženi kao postotak u odnosu na negativnu kontrolu (netretirana plazma). Prikazane su srednje vrijednost rezultata (uz pripadajuće standardne devijacije) dobivenih za uzorke plazme prikupljene od 6 donora. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*).



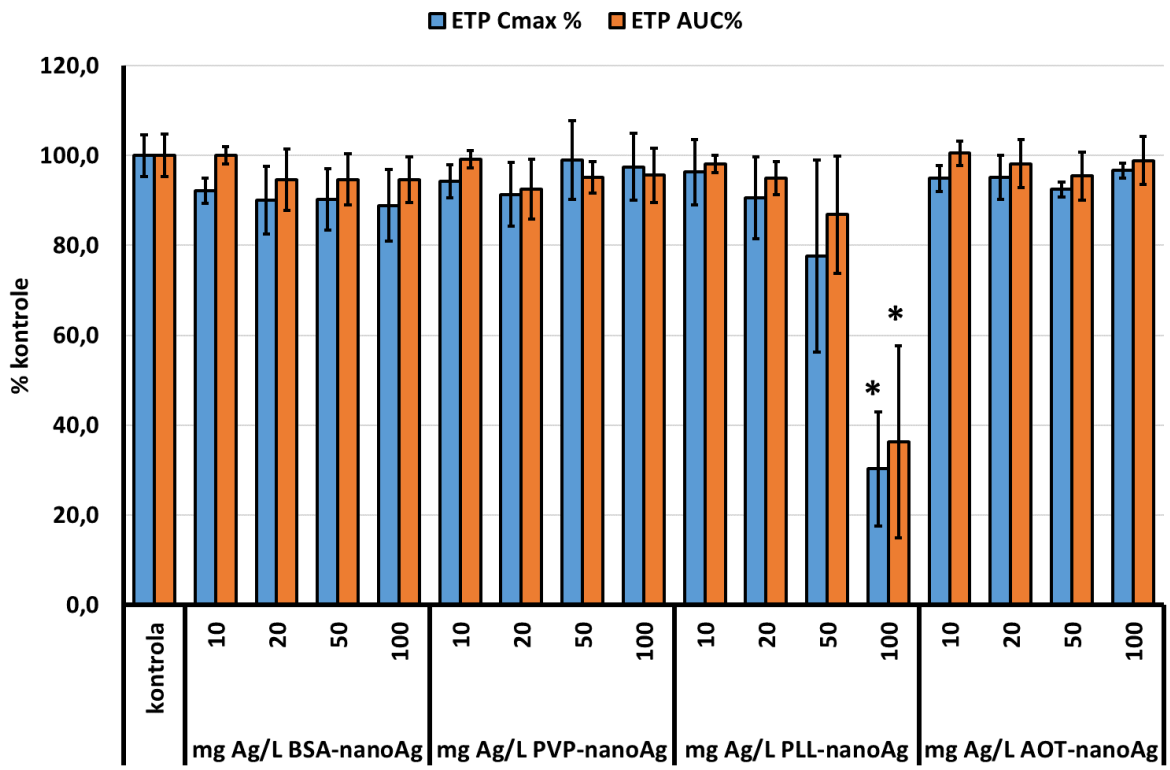
Slika 5.11. Učinak BSA-, PVP-, PLL- i AOT-nanoAg-a na posljednji korak u zajedničkom putu zgrušavanja izmjeren koagulacijskim testom u plazmi. Trombinsko vrijeme (TV) je izmjereno nakon izlaganja plazme nanoAg-u različitih koncentracija tijekom 30 minuta. Rezultati su izraženi kao postotak vremena zgrušavanja u odnosu na negativnu kontrolu (netretirana plazma). Prikazane su srednje vrijednost rezultata (uz pripadajuće standardne devijacije) dobivenih za uzorke plazme prikupljene od 6 donora. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*).

U kontrolnom pokusu s omotačima korištenim za stabilizaciju ispitivanih nanoAg, primijenjene su koncentracije omotača koje odgovaraju količinama omotača u otopini nanoAg koncentracije od 100 mg Ag/L. Nije utvrđen njihov utjecaj na APTV i TV biljege kao niti utjecaj ionskog srebra na APTV i TV, ali je PLL omotač značajno produžio PV u odnosu na kontrolu (Slika 5.12.).



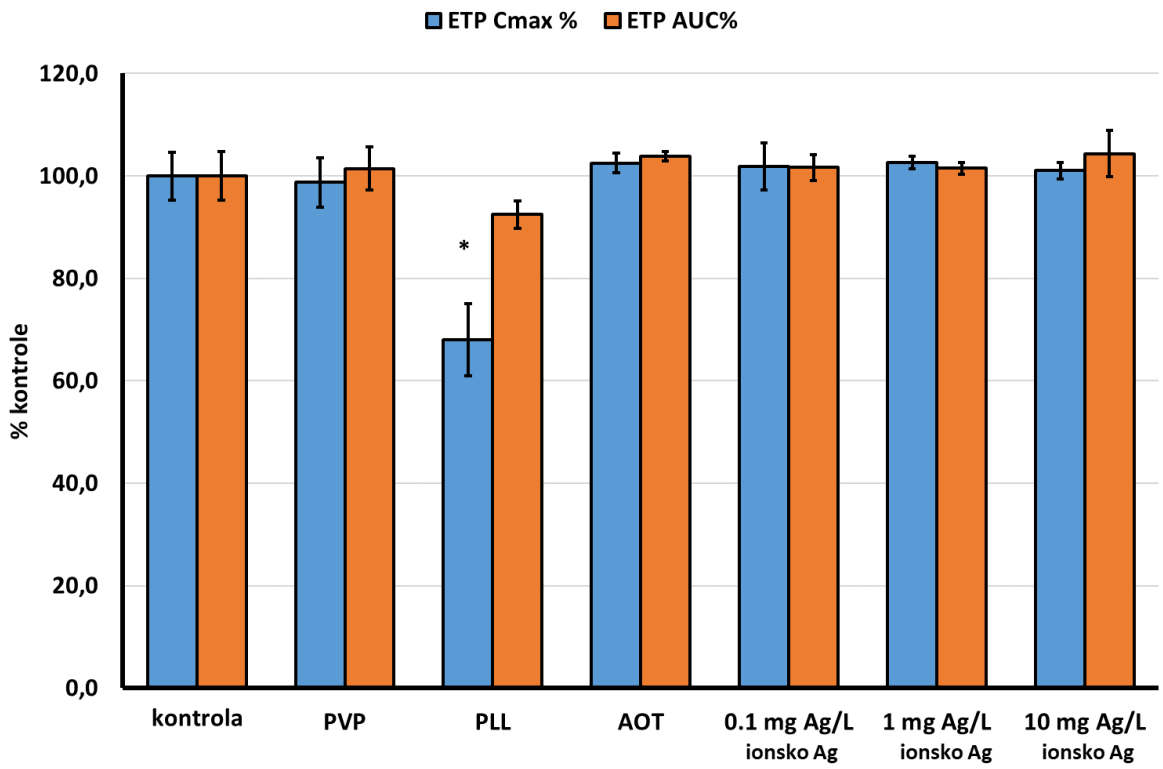
Slika 5.12. Učinak omotača korištenih za stabilizaciju ispitivanih nanoAg vrsta i ionskog Ag na unutarnji i vanjski put zgrušavanja, i posljednji korak u zajedničkom putu zgrušavanja izmjeren koagulacijskim testovima u plazmi. Protrombinsko vrijeme (PV), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV) i trombinsko vrijeme (TV) izmjereni su nakon izlaganja plazme PVP-u, PLL-u, AOT-u i ionskom srebru tijekom 30 minuta. Rezultati su izraženi kao postotak vremena zgrušavanja u odnosu na negativnu kontrolu (netretirana plazma). Prikazane su srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama rezultata dobivenih u plazmama od 3 dobrovoljna davatelja. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označena je asteriksom (*).

Nadalje je istražen učinak nanoAg vrsta na stvaranje trombina u plazmi. Stvaranje trombina je rezultat ravnoteže između prokoagulantnih i antikoagulantnih čimbenika u plazmi. Analizom stvaranja trombina tijekom određenog vremena procjenjuje se je li poremećena ova ravnoteža tj. je li prevladao učinak prokoagulantnih ili antikoagulantnih čimbenika. Od svih ispitanih nanoAg vrsta samo je PLL-nanoAg statistički značajno smanjio ukupni potencijal plazme za stvaranjem trombina i brzinu stvaranja trombina što je vidljivo iz sniženih ETP AUC i Cmax vrijednosti (Slika 5.13).



Slika 5.13. Učinak BSA-, PVP-, PLL- i AOT-nanoAg-a na stvaranje trombina u plazmi. Uzorci plazme prikupljeni od 6 donora izlagani su različitim nanoAg-ima tijekom 30 minuta. Izmjereni su endogeni trombinski potencijal (ETP) iz površine ispod krivulje nastanka trombina (AUC) i maksimalna brzina nastanka trombina (Cmax), a rezultati su izraženi kao postotak u odnosu na negativnu kontrolu (netretirana plazma). Prikazane su srednje vrijednosti uz pripadajuće standardne devijacije. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*).

Rezultati ispitivanja učinaka stabilizacijskih omotača i ionskog srebra na stvaranje trombina u plazmi upućuju na to da je PLL odgovoran za učinke PLL-nanoAg jer je u jednakoj mjeri smanjio ETP, dok PVP, AOT i ionsko srebro nisu imali statistički značajni učinak (Slika 5.14.).

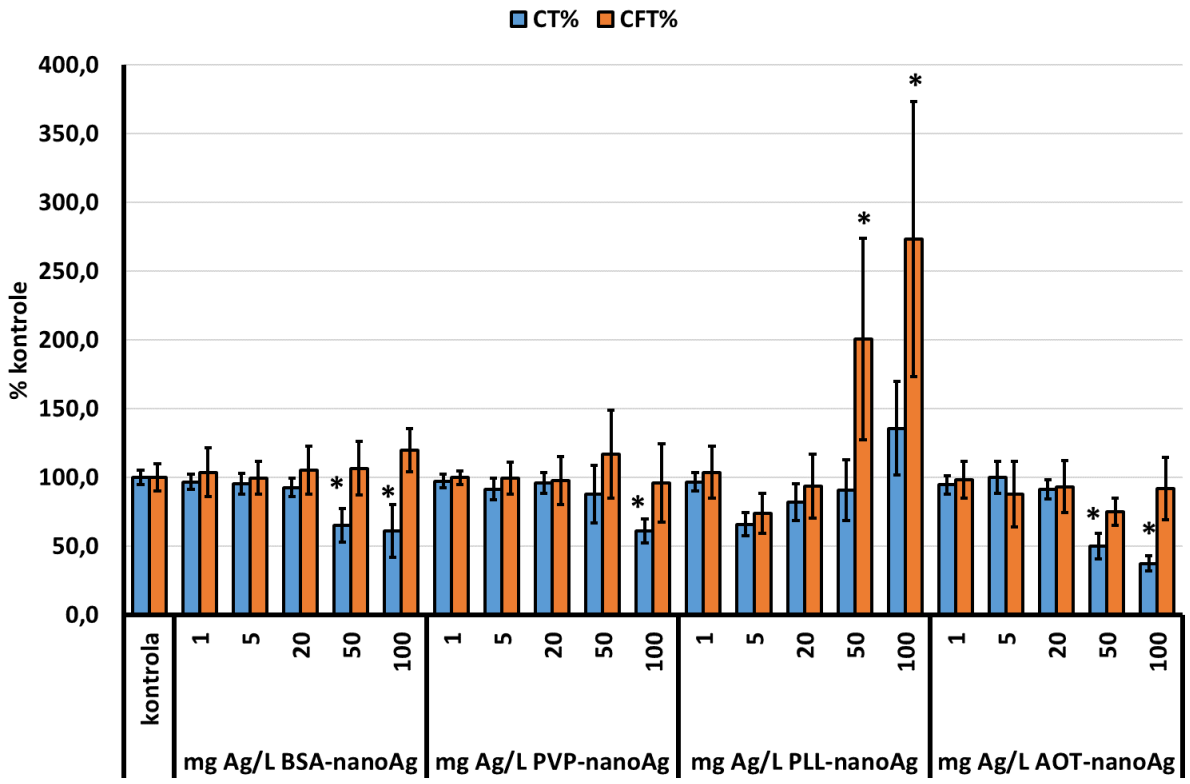


Slika 5.14. Učinak omotača korištenih za stabilizaciju ispitivanih nanoAg (PVP 0,0075 %, PLL 0,0025 % i AOT 0,00125 mM) i ionskog Ag na stvaranje trombina u plazmi. Uzorci plazme prikupljeni od 6 donora tretirani su s PVP-om, PLL-om i AOT-om. Izmjereni su endogeni trombinski potencijal (ETP) iz površine ispod krivulje nastanka trombina (AUC) i maksimalna brzina nastanka trombina (Cmax), a rezultati su izraženi kao postotak u odnosu na negativnu kontrolu (netretirana plazma). Prikazane su srednje vrijednost sa standardnim devijacijama. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označena je asteriksom (*).

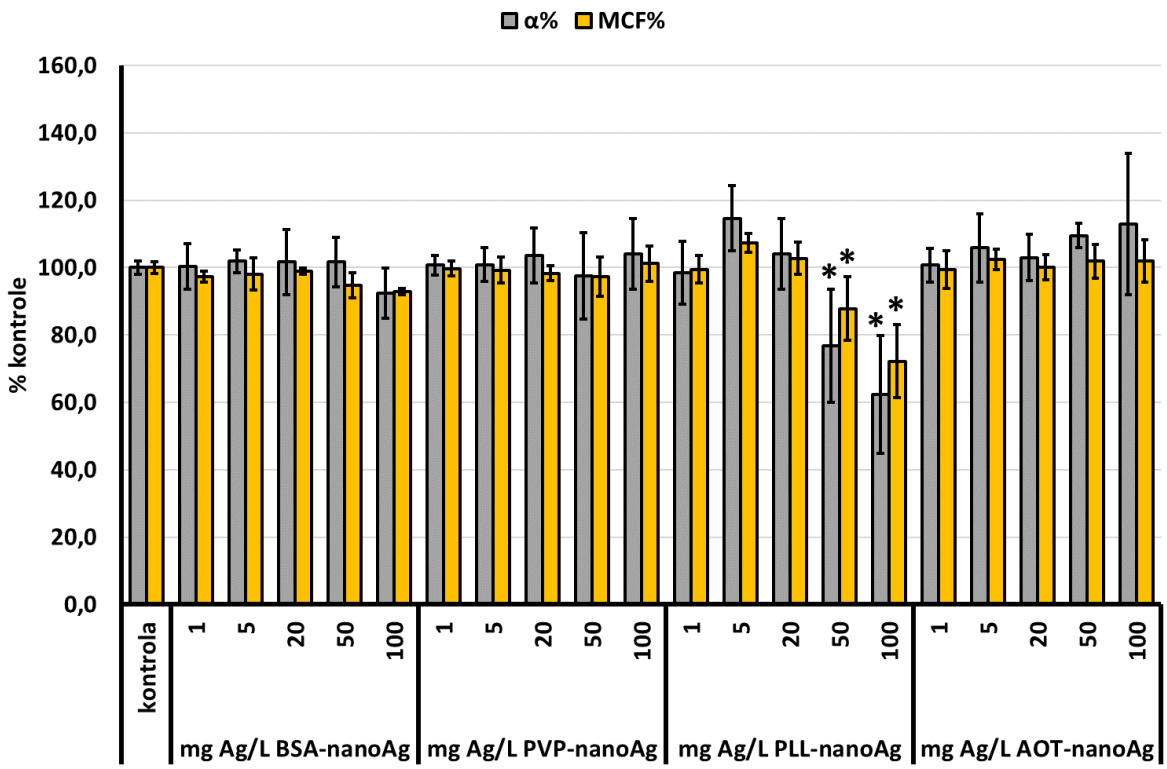
5.3.3. Učinak nanočestica srebra na globalnu hemostazu u punoj krvi

Globalna hemostaza istražena je pomoću rotacijske tromboelastometrije koja predstavlja vrijedan klinički test za brzu dijagnostiku i praćenje terapije obilnih krvarenja. Njime se ispituje globalna hemostaza u punoj krvi, odnosno interakcija, ne samo koagulacijskih čimbenika i njihovih inhibitora, već i interakcija trombocita i drugih stanica krvi. Nakon inkubacije pune krvi s nanoAg-om, tromboelastometrijskom analizom omogućen je uvid u nastanak i razgradnju ugruška mjerenjem vremena potrebnoga za inicijaciju i formiranje ugruška, maksimalnu čvrstoću ugruška i razgradnju ugruška. Sve ispitivane vrte nanoAg-a osim PLL-nanoAg-a su pri koncentraciji od 100 mg Ag/L skratile vrijeme potrebno za nastanak ugruška (CT). Kad je

puna krv tretirana s nižim koncentracijama AOT-nanoAg, PVP-nanoAg i BSA-nanoAg, CT se nije promijenio u odnosu na netretirani uzorak krvi (Slika 5.15). Nasuprot ovome, PLL-nanoAg je uzrokovao produženje CT za 35 % u odnosu na vrijednost izmjerenu za netretirani uzorak (Slika 5.15.). Uz to, PLL-nanoAg je ometao formiranje ugruška jer je 2-3 puta produžio CFT (Slika 5.15.), smanjio kut α i smanjio je maksimalnu čvrstoću ugruška što je vidljivo iz sniženih MCF vrijednosti za uzorke tretirane s 50 i 100 mg Ag/L PLL-nanoAg (Slika 5.16.). Sve promjene u hemostazi bile su ovisne o dozi i vrsti nanoAg-a kojima su uzorci krvi bili izloženi.

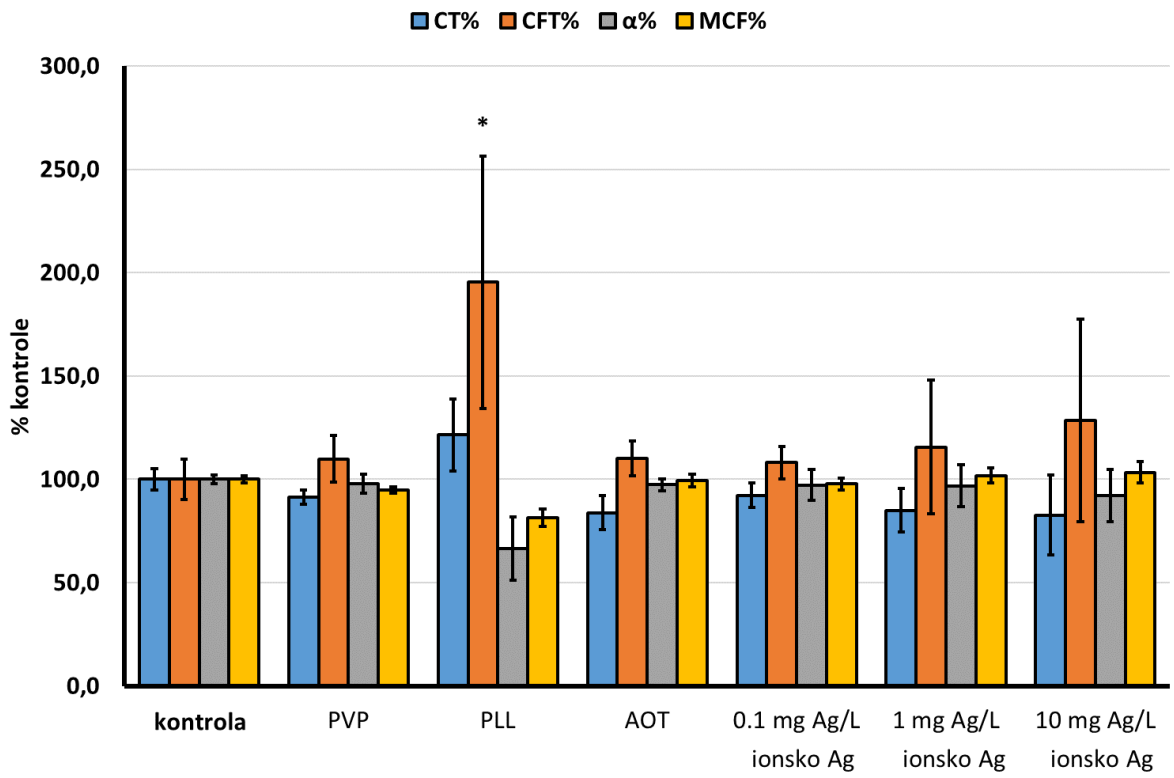


Slika 5.15. Učinak BSA-, PVP-, PLL- i AOT-nanoAg-a na viskoelastična svojstva pune krvi mjeren rotacijskom tromboelastometrijom nakon izlaganja pune krvi različitim koncentracijama nanoAg-a tijekom 30 minuta. Izmjereno vrijeme zgrušavanja (CT) i vrijeme stvaranja ugruška (CFT) izraženo je kao postotak u odnosu na negativnu kontrolu (netretirana puna krv). Prikazane su srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama rezultata dobivenih u punoj krvi od 6 dobrovoljna davatelja. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*).



Slika 5.16. Učinak BSA-, PVP-, PLL- i AOT-nanoAg-a na viskoelastična svojstva pune krvi mjerena rotacijskom tromboelastometrijom tehnikom nakon izlaganja pune krvi različitim koncentracijama nanoAg tijekom 30 minuta. Određeni su kut α i maksimalna čvrstoća ugruška (MCF) te su izraženi kao postotak u odnosu na negativnu kontrolu (netretirana puna krv). Prikazane su srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama rezultata dobivenih u punoj krvi od 6 dobrovoljnih davatelja. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*).

Ispitivanja provedena za učinak ionskog srebra i stabilizacijskih omotača pokazala su da samo PLL značajno produžuje CFT, smanjuje kut α i MCF (Slika 5.17.). Budući da je i sam PLL na isti način kao i PLL-nanoAg produžio CT, antikoagulantni učinak PLL-nanoAg-a je vjerojatno uzrokovan djelovanjem PLL omotača.



Slika 5.17. Učinak omotača korištenih za stabilizaciju ispitivanih nanoAg (PVP 0,0075 %, PLL 0,0025 % i AOT 0,00125 mM) i ionskog srebra na viskoelastična svojstva pune krvi mjerena ROTEM tehnikom nakon izlaganja krvi prikupljene od 6 donora tijekom 30 minuta. Prikazani su CT, CFT, kut α i MCF vrijednosti koje su izražene kao postotak u odnosu na negativnu kontrolu (netretirana puna krv). Prikazane su srednje vrijednost sa standardnim devijacijama. Statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označena je asteriksom (*). CT - vrijeme zgrušavanja, CFT - vrijeme stvaranja ugruška, α - kut alfa, MCF - maksimalna čvrstoća ugruška

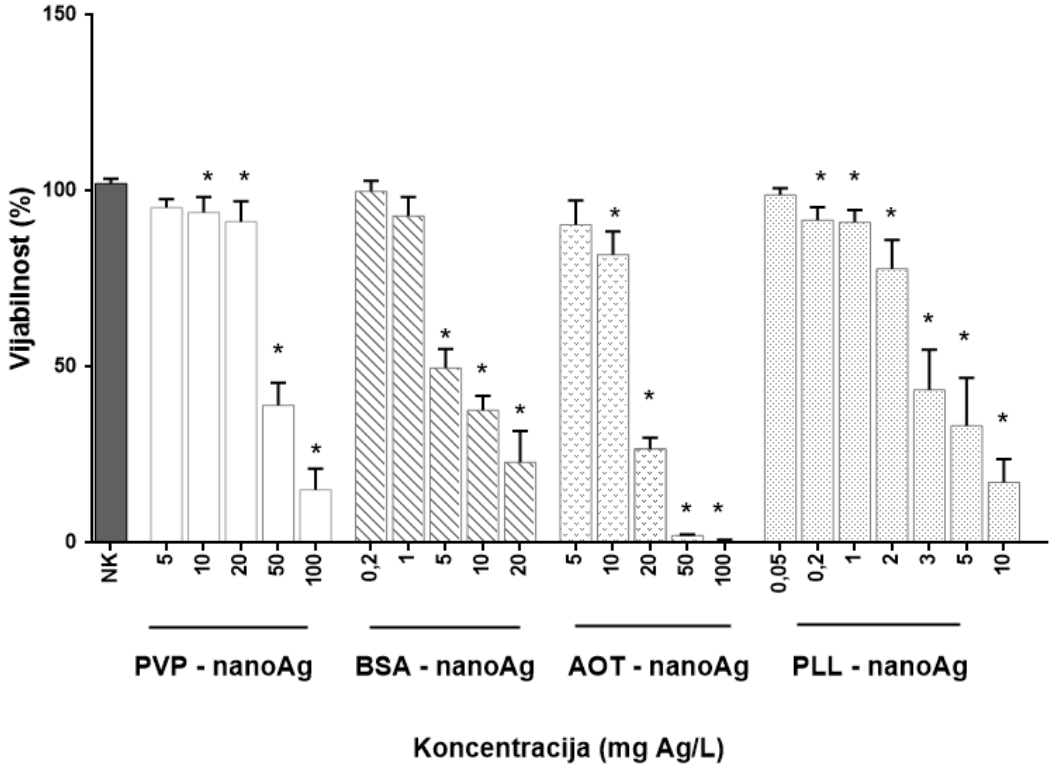
5.4. Interakcija nanočestica srebra s trombocitima

Drugi dio ovoga doktorskoga istraživanja bio je usmjeren na ispitivanje interakcije nanoAg-a s trombocitima, pri čemu su ispitani citotoksični učinci različitih nanoAg vrsta, njihov ulazak u stanicu, sposobnost izazivanja oksidativnog stresa u trombocitima, te aktivacije trombocita.

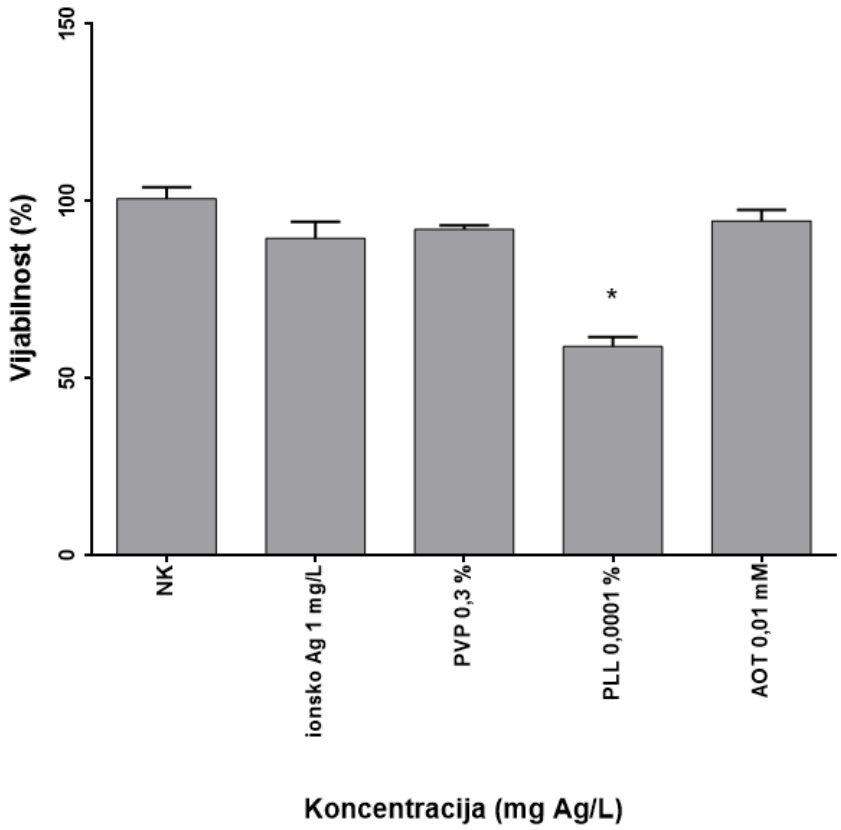
5.4.1. Citotoksični učinci nanočestica srebra

Nakon izlaganja izoliranih trombocita PVP-, BSA-, AOT- i PLL-nanoAg-u tijekom 30 minuta određen je udio živih, odnosno vijabilnih trombocita primjenom bojenja calcein AM bojom

koja samo u vijabilnim stanicama prelazi u florescentni spoj čiji se intenzitet mjeri na protočnom citometru. Povećanje koncentracije svih nanoAg vrsta značajno je smanjilo udio vijabilnih trombocita što je vidljivo iz rezultata prikazanih na Slici 5.18. Pri tome je najmanja citotksičnost opažena kod PVP-nanoAg-a, zatim kod AOT-nanoAg-a, a najveća kod tretmana s BSA- i PLL-nanoAg-a. Kod koncentracije od 5 mg Ag/L tretman s PVP- i AOT-nanoAg-om nije izazvao značajan pad broja vijabilnih stanica, dok su BSA- i PLL-nanoAg smanjili udio vijabilnih stanica za 50 %. Citotoksičnost je ispitana i za ionski oblik srebra i omotače korištene za stabilizaciju nanoAg vrsta. Pri primijenjenim koncentracijama, samo je PLL statistički značajnije smanjio udio živih trombocita (Slika 5.19).



Slika 5.18. Ispitivanje citotoksičnosti PVP-, BSA-, AOT- i PLL-nanoAg-a na trombocite metodom protočne citometrije. Udio vijabilnih trombocita određen je bojenjem calceinom AM nakon izlaganja opranih trombocita nanoAg vrstama tijekom 30 minuta. Negativna kontrola (NK) su netretirani oprani trombociti. Rezultati su izraženi kao % vijabilnih stanica u odnosu na NK. Prikazane su srednje vrijednosti iz 5 zasebnih pokusa s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na NK označene su asteriksom (*).

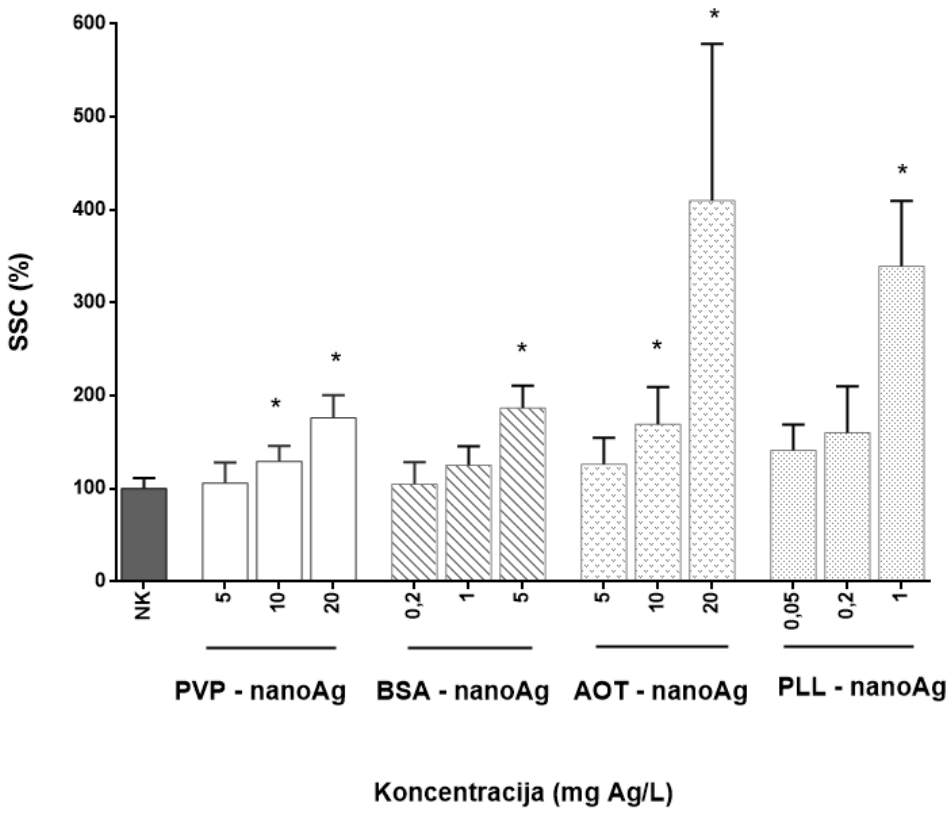


Slika 5.19. Ispitivanje citotoksičnosti PVP, AOT i PLL stabilizacijskih omotača i ionskog Ag-a na trombocite metodom protočne citometrije. Udio vijabilnih trombocita određen je bojenjem calceinom AM nakon izlaganja opranih trombocita stabilizacijskim omotačima i ionskom srebru tijekom 30 minuta. Negativna kontrola (NK) su netretirani oprani trombociti. Rezultati su izraženi kao % vijabilnih stanica u odnosu na NK. Prikazane su srednje vrijednosti iz 5 zasebnih pokusa s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na NK označene su asteriksom (*).

5.4.2. Ulazak nanočestica srebra u trombocite

U pokusima citotksičnosti metodom protočne citometrije istovremeno je provedeno mjerenje bočno raspršene svjetlosti (SSC) na tretiranim trombocitima iz čega su dobiveni podatci o udjelu trombocita čija je granuliranost povećana, a što može ukazivati na ulazak nanoAg-a u stanice. Ispitane su samo one koncentracije nanoAg-a kod kojih je vijabilnost trombocita bila > 80 %. Rezultati su pokazali da se intenzitet SSC za tretirane trombocite povećava s povećanjem doze nanoAg-a u odnosu na kontrolne stanice (Slika 5.20.). Za PLL-nanoAg

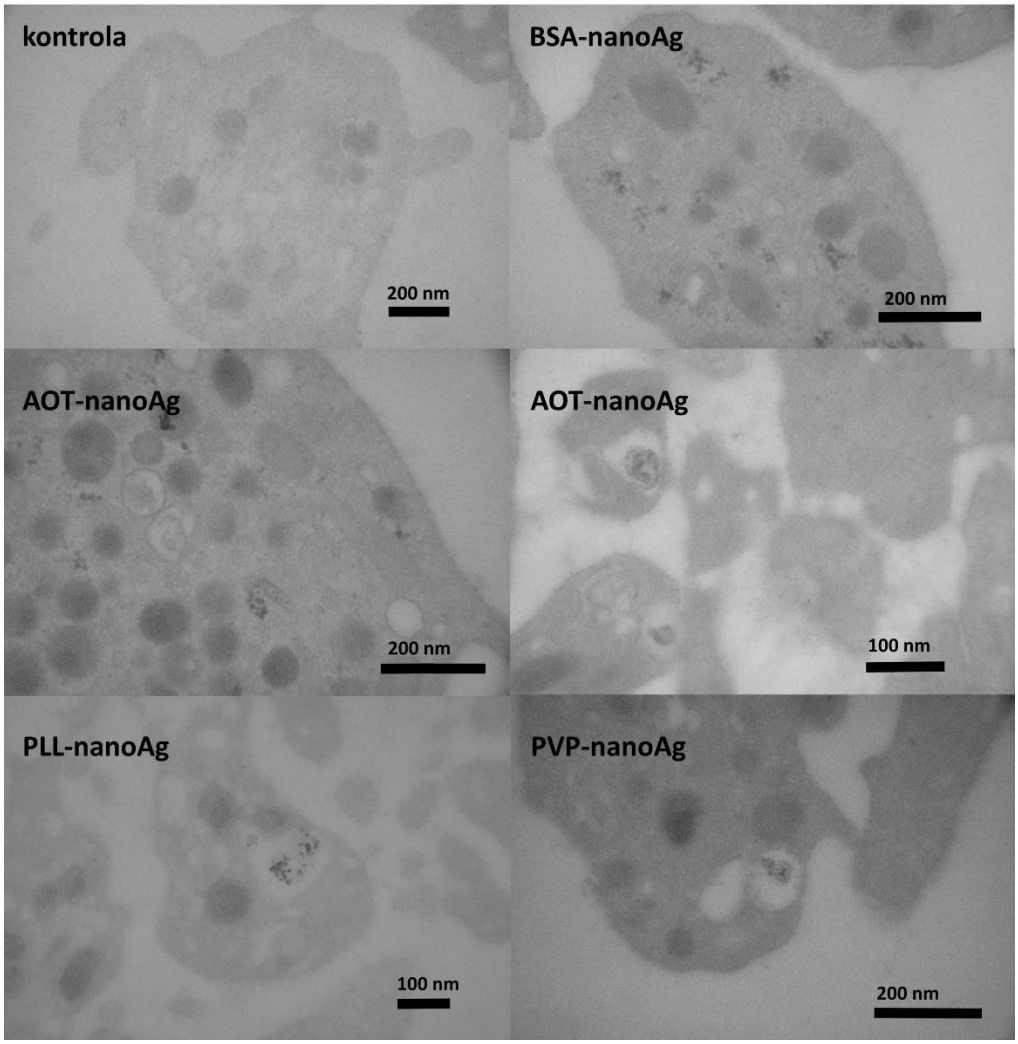
uočeno je značajno povišenje SSC vrijednosti već pri koncentraciji od 1 mg Ag/L, zatim slijedi BSA-nanoAg > AOT-nanoAg > PVP-nanoAg (Slika 5.20).



Slika 5.20. Ispitivanje ulaska PVP-, BSA-, AOT- i PLL-nanoAg-a u trombocite mjerenjem bočno raspršene svjetlosti (SSC) na trombocitima metodom protočne citometrije. Izolirani trombociti su tretirani s navedenim nanoAg vrstama tijekom 30 minuta. Relativni ulazak nanoAg-a u trombocite izražen je kao postotak SSC-a u odnosu na negativnu kontrolu (NK). Prikazane su srednje vrijednosti 5 neovisnih pokusa s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*).

Međutim, metodom protočne citometrije nije moguće utvrditi povećava li se granuliranost trombocita nakon tretmana s nanoAg-om uslijed njihova ulaska u stanice ili su oni ostali adsorbirani na površinu trombocita. Stoga su trombociti tretirani različitim nanoAg-ima fiksirani i pripremljeni za TEM snimanje. Vizualizacija tretiranih trombocita jasno je pokazala da su sve nanoAg vrste ušle u stanicu (Slika 5.21.), a pažljivim pretraživanjem TEM slika nisu

pronađene stanice na kojima bi nanoAg bili adsorbirani na površini. Slika 5.21. pokazuje da se u tretiranim trombocitima nalaze vakuole ispunjene nanoAg-om.

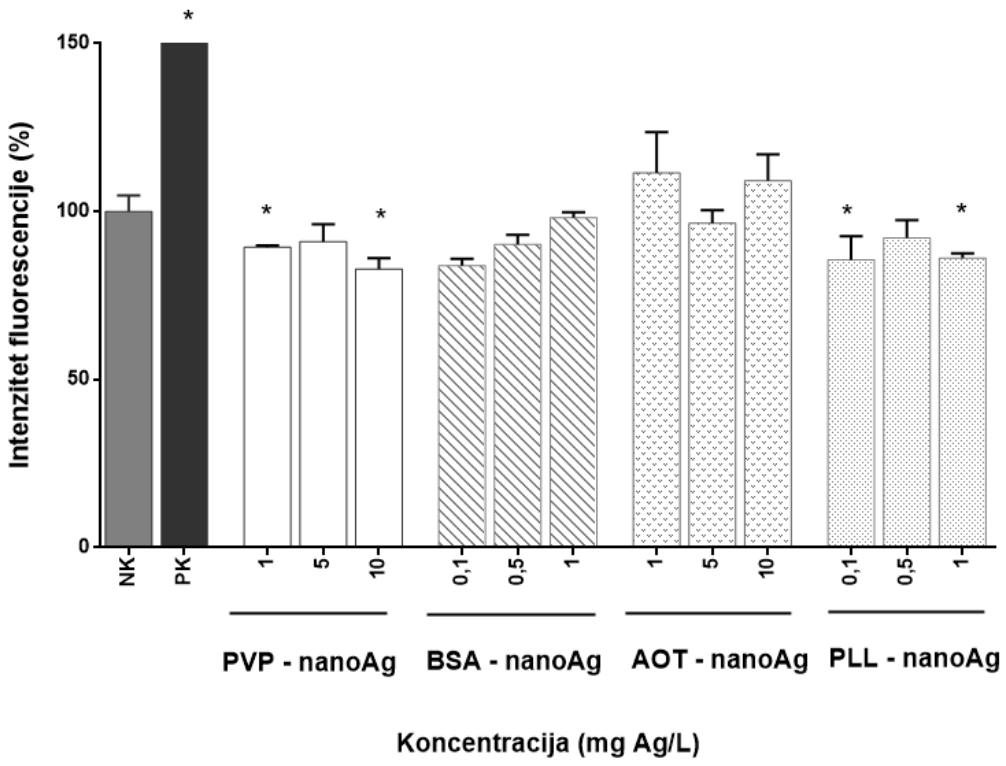


Slika 5.21. Snimke načinjene transmisijskim elektronskim mikroskopom netretiranih trombocita i trombocita tretiranih s PVP-nanoAg-om, AOT-nanoAg-om, PLL-nanoAg-om i BSA-nanoAg-om.

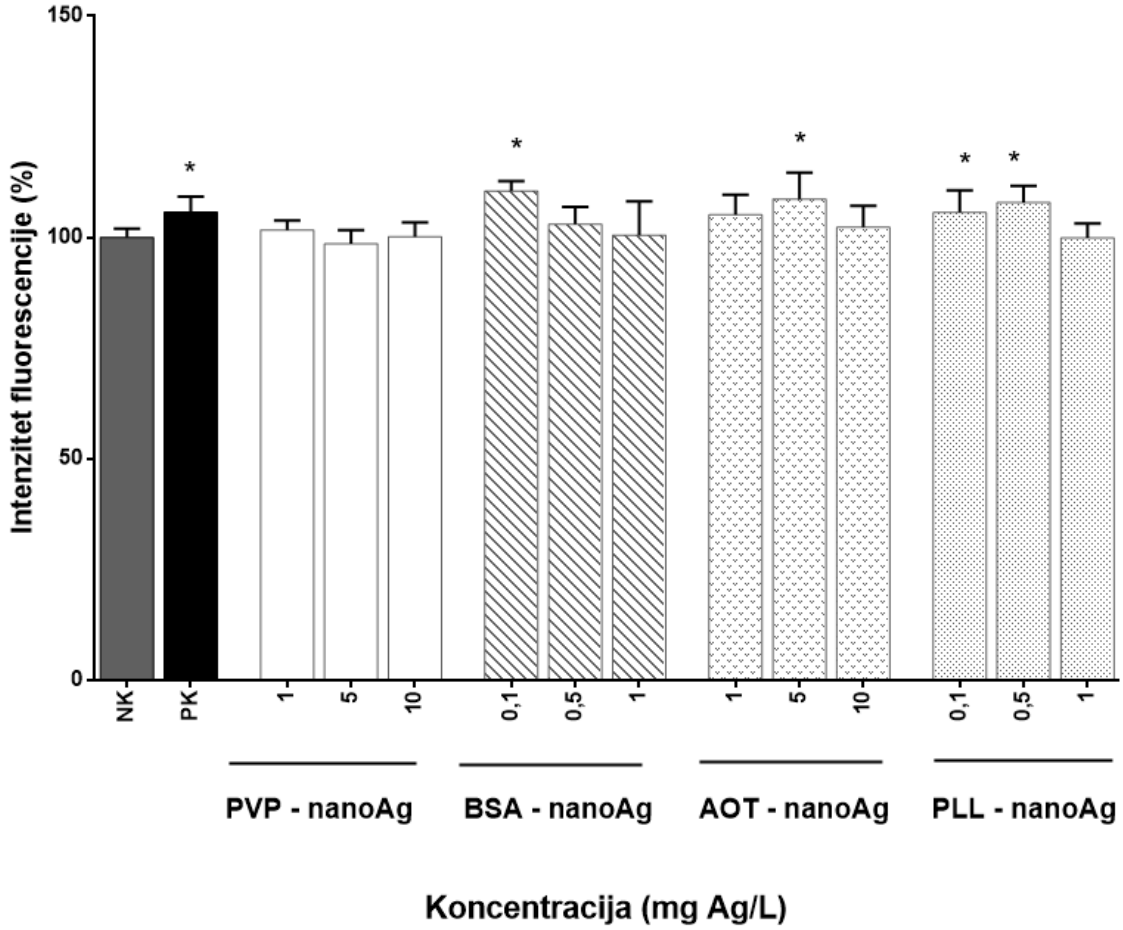
5.4.3. Oksidacijski stres u trombocitima

Razina oksidacijskog stresa u trombocitima tretiranim s različitim nanoAg vrstama ispitana je fluorometrijskom metodom pomoću boja DCFH-DA i DHE kojima se dokazuje prisutnost ROS-ova u stanici, a potrošnja antioksidansa GSH ispitana je bojenjem MBCM-om.

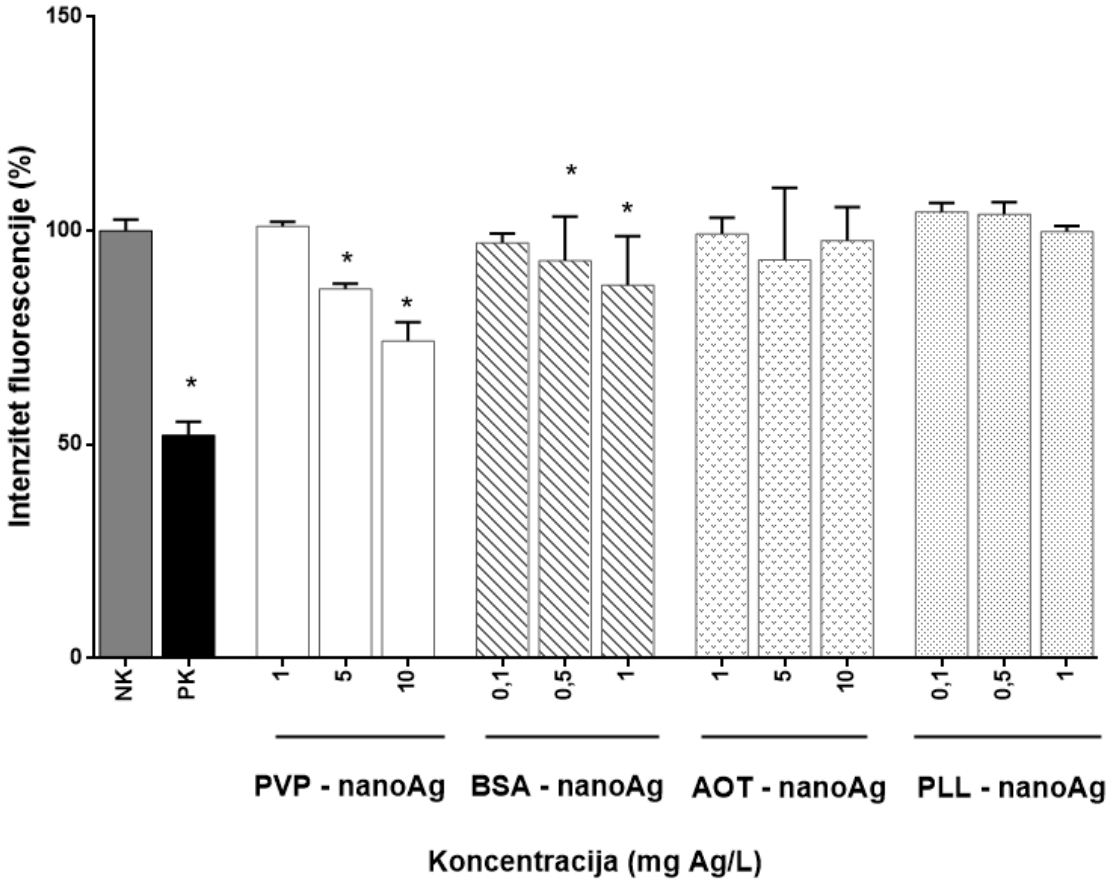
Upotrijebljene su koncentracije nanoAg-a kod kojih je vijabilnost trombocita bila > 80 % na temelju podataka dobivenih ispitivanjem citotoksičnosti nanoAg-a. Pokusi su provedeni na uzrocima opranih trombocita prikupljenim od 5 donora. Rezultati bojenja DCFH-DA bojom su pokazali da niti jedna nanoAg vrsta pri primijenjenim koncentracijama ne uzrokuje pojačano stvaranje peroksidnih radikala u trombocitima (Slika 5.22.), dok je DHE bojenjem utvrđeno pojačano stvaranje superoksidnih radikala kod tretmana trombocita s nižim dozama BSA-, AOT- i PLL-nanoAg-a. (Slika 5.23.). Istovremeno je bojenjem MBCM-om utvrđena pojačana potrošnja GSH s povećanjem nanoAg doza što je indirektni dokaz oksidativnog stresa (Slika 5.24.).



Slika 5.22. Stvaranje peroksidnih radikala u trombocitima izloženim PVP-, BSA-, AOT- i PLL-nanoAg-u ispitano bojenjem DCFH-DA bojom. Oprani trombociti, izolirani iz pune krvi 5 donora, tretirani su tijekom 30 minuta. Negativna kontrola (NK) bili su netretirani trombociti, a pozitivna kontrola (PK) trombociti tretirani s 50 μM tert-butil hidroksidom. Rezultati su izraženi kao postotak intenziteta fluorescencije u odnosu na NK. Prikazane su srednje vrijednosti 3 mjerenja za svaki od 5 uzoraka s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*).



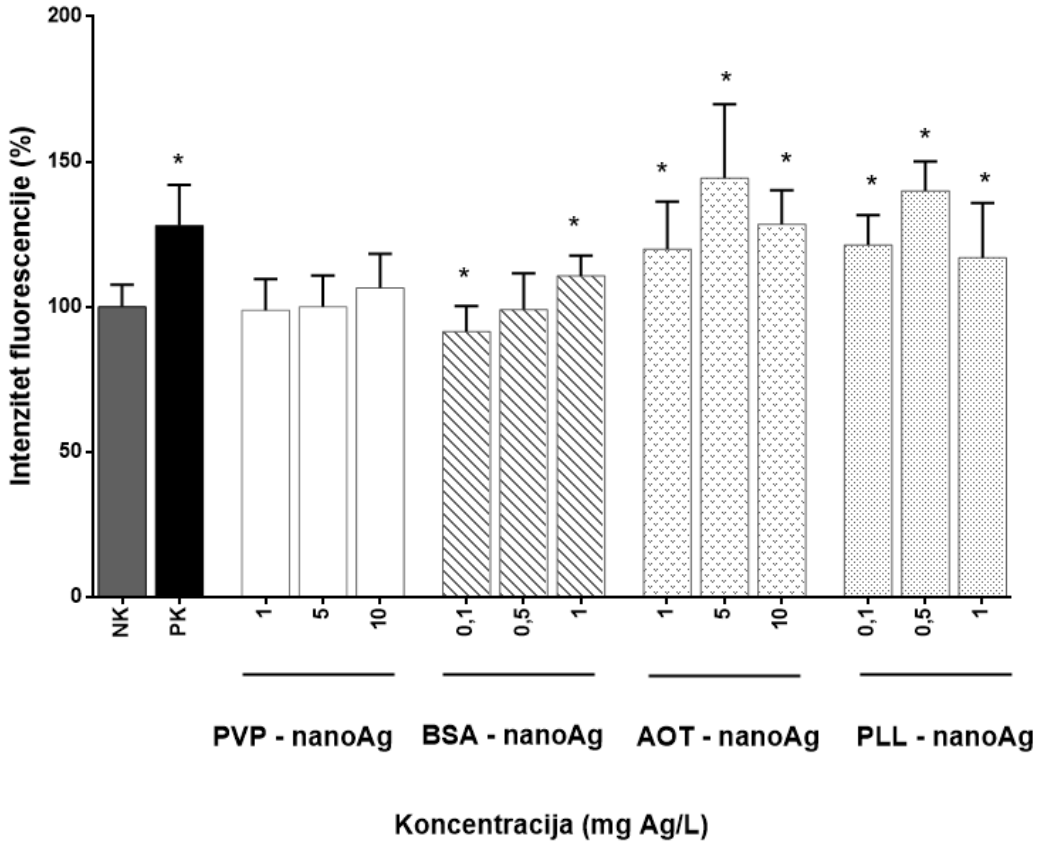
Slika 5.23. Stvaranje superoksidnih radikala u trombocitima izloženim PVP-, BSA-, AOT- i PLL-nanoAg-u ispitano bojenjem DHE bojom. Oprani trombociti, izolirani iz pune krvi 5 donora, tretirani su tijekom 30 minuta. Negativna kontrola (NK) bili su netretirani trombociti, a pozitivna kontrola (PK) trombociti tretirani s 50 μM tert-butil hidroksidom. Rezultati su izraženi kao postotak intenziteta fluorescencije u odnosu na NK. Prikazane su srednje vrijednosti 3 mjerenja za svaki od 5 uzoraka s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*).



Slika 5.24. Potrošnja GSH u trombocitima tretiranim s PVP-, BSA-, AOT- i PLL-nanoAg-om ispitana bojenjem MBCM bojom. Oprani trombociti, izolirani iz pune krvi 5 donora, su tretirani tijekom 30 minuta. Negativna kontrola (NK) bili su netretirani trombociti, a pozitivna kontrola (PK) trombociti tretirani s 50 μM tert-butil hidroksidom. Rezultati su izraženi kao postotak intenziteta fluorescencije u odnosu na NK. Prikazane su srednje vrijednosti 3 mjerenja za svaki od 5 uzoraka s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*).

5.4.4. Oštećenja mitohondrijske membrane u trombocitima

Učinak različitih nanoAg vrsta na stanično disanje u trombocitima ispitan je mjerenjem promjena u potencijalu mithondrijske membrane ($\Psi\Delta m$) bojenjem $DiOC_6$ bojom. Zabilježen porast fluorescencije u trombocitima s povećanjem nanoAg doza ukazuje na hiperpolarizaciju membrane mitohondrija. Za sve vrste nanoAg-a primijećen je statistički značajan porast $\Psi\Delta m$ u odnosu na netretirane trombocite osim za PVP-nanoAg (Slika 5.25.).



Slika 5.25. Ispitivanje promjena potencijala mitohondrijske membrane u trombocitima izloženim PVP-, BSA-, AOT- i PLL-nanoAg bojenjem $DiOC_6$ bojom. Oprani trombociti, izolirani iz pune krvi 5 donora, tretirani su tijekom 30 minuta. Negativna kontrola (NK) bili su netretirani trombociti, a pozitivna kontrola (PK) trombociti tretirani s 50 μM tert-butil hidroksidom. Rezultati su izraženi kao postotak intenziteta fluorescencije u odnosu na NK. Prikazane su srednje vrijednosti 3 mjerenja za svaki od 5 uzoraka s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*).

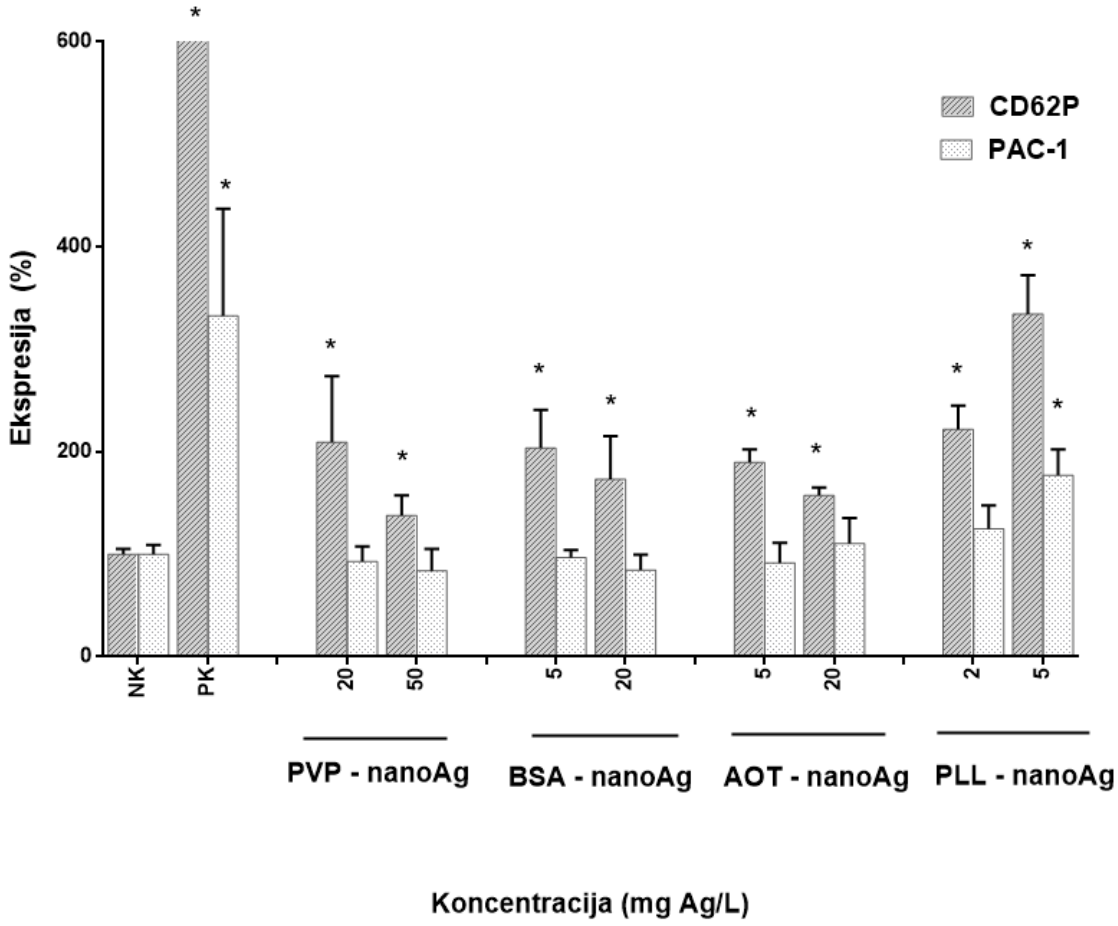
5.4.5. Učinak nanočestica srebra na aktivaciju trombocita

Aktivacija trombocita pod utjecajem različitih nanoAg-a ispitana je dokazivanjem biljega aktivacije (CD 62P i PAC-1) na površini trombocita metodom protočne citometrije. U preliminarnim pokusima ispitivanja aktivacije trombocita upotrijebljeni su oprani trombociti kao i u prethodnim pokusima citotoksičnosti, ulaska nanočestica u trombocite, razine oksidativnog stresa i promjena u staničnom disanju. Međutim, primijećeno je da niti jedna doza nanoAg-a nije kod takvih opranih trombocita izazvala aktivaciju (Slika 12.1. u Prilozima).

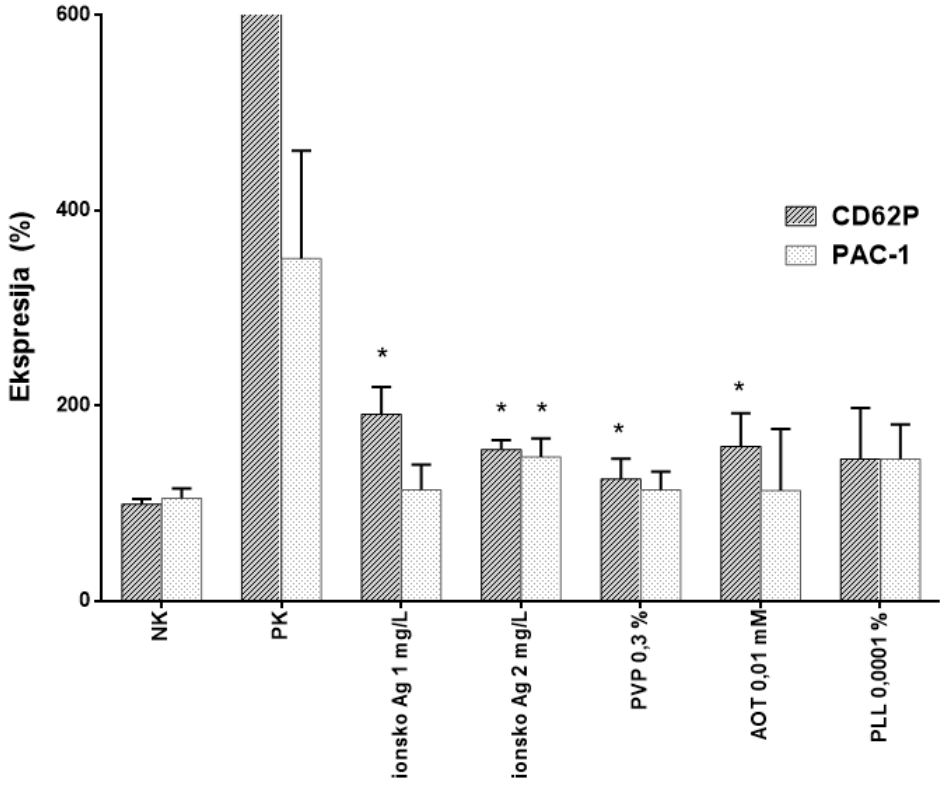
Izostanak aktivacije kod opranih trombocita može se objasniti premalenom razlikom izražaja aktivacijskih biljega koja će se očitovati izlaganjem opranih trombocita nanoAg vrstama s obzirom na to da postupak pranja značajno aktivira trombocite. Osim toga, pranjem trombocita nastaju agregati trombocita u uzorku koji onemogućuju analizu protočnim citometrom. Agregati trombocita, odnosno ugrušci, osim što mogu izazvati začepljenje protočnice citometra, čine uzorak opranih trombocita nereprezentativnim. Stoga je aktivacija trombocita ispitana u uzorcima pune krvi kako bi se izbjeglo začepljenje na protočnom citometru, kao i dodatno aktiviranje trombocita tijekom postupka priprave uzoraka. Koncentracije nanoAg-a koje su upotrijebljene pri tretmanu pune krvi bile su nešto više nego kod tretmana opranih trombocita, jer se u uzorku pune krvi dio nanoAg doze „potroši“ i na reakciju s eritrocitima i limfocitima (33)(88). Osim toga, ispitivanje učinka nanoAg-a na uzorcima pune krvi bolje odgovara realnim fiziološkim uvjetima u kojima trombociti mogu doći u kontakt s medicinskim materijalima i/ili terapijskim sustavima s nanoAg-om, te se aktivirati u takvom mediju.

Tretman pune krvi s različitim vrstama nanoAg-a uzrokovao je oslobađanje sadržaja alfa granula iz trombocita što je dokazano povećanom ekspresijom CD62P (P-selektina) na membrani trombocita (Slika 5.26.). PLL-nanoAg je najintenzivnije aktivirao trombocite, a statistički značajno jači izražaj CD62P biljega kod trombocita tretiranih s PLL-nanoAg-om uočen je pri koncentraciji 10 puta manjoj nego kod tretmana s PVP-nanoAg-om i AOT-nanoAg-om (Slika 5.26.). Učinci na izražaj CD62P slični PLL-nanoAg zabilježeni su i za BSA-nanoAg. Pojačan izražaj PAC-1 biljega na trombocitima, kojim se detektira vezno mjesto za fibrinogen, zabilježen je samo pod utjecajem PLL-nanoAg-a pri koncentraciji od 5 mg Ag/L. Ostale ispitane nanoAg vrste nisu uzrokovale pojačan izražaj PAC-1 biljega niti pri većim koncentracijama (Slika 5.26.).

Ispitana je i aktivacija trombocita nakon izlaganja trombocita ionskom Ag i omotačima korištenim za stabilizaciju nanoAg vrsta kako bi se utvrdila uloga samih omotača ili oslobođenih Ag iona s površine nanoAg-a. Ionsko srebro je izazvalo pojačan izražaj biljega CD62P i PAC-1 pri koncentraciji 2 mg Ag/L (Slika 5.27.). Omotači primijenjeni za stabilizaciju nanoAg-a također su izazvali aktivaciju trombocita, ali pojačavajući izražaj samo CD62P (Slika 5.27.).



Slika 5.26. Izražaj biljega aktivacije trombocita CD62P i PAC-1 određen metodom protočne citometrije nakon izlaganja pune krvi PVP-, BSA-, AOT- i PLL-nanoAg-u tijekom 30 minuta. Negativna kontrola (NK) je puna krv tretirana s PBS-om, a pozitivna kontrola (PK) je puna krv tretirana s agonistom aktivacije trombocita heksapeptidnim aktivatorom receptora trombina (TRAP-6). Rezultati su izraženi kao % ekspresije biljega u odnosu na NK. Prikazane su srednje vrijednosti 4 neovisna pokusa s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*).



Slika 5.27. Izražaj biljega aktivacije trombocita CD62P i PAC-1 određen metodom protočne citometrije nakon izlaganja pune krvi ionskom srebru i omotačima PVP, AOT, PLL. Negativna kontrola (NK) je puna krv tretirana s PBS-om, a pozitivna kontrola (PK) je puna krv tretirana s agonistom aktivacije trombocita heksapeptidnim aktivatorom receptora trombina (TRAP-6). Rezultati su izraženi kao % ekspresije biljega u odnosu na NK. Prikazane su srednje vrijednosti 4 neovisna pokusa s pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu označene su asteriksom (*).

6. RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitana je hemokompatibilnost različitih nanoAg vrsta, a jedan od glavnih ciljeva bio je utvrditi kako primjena različitih stabilizacijskih omotača utječe na parametre hemokompatibilnosti s posebnim naglaskom na hemostazu i interakciju s trombocitima. Istraživanje je bilo sistematsko te je primijenjeno više metodoloških pristupa kako bi se dokazalo da stabilizacijski omotač mijenja učinak nanoAg-a na eritrocite (hemolizu), na trombocite (citotoksičnost i aktivaciju) i na hemostazu (prokoagulantno ili antikoagulantno svojstvo). U svrhu istraživanja pripremljene su male sferične nanoAg veličine 10 nm s različitim vrstama stabilizacijskih omotača. Prema rezultatima pretrage citatnih baza podataka Web of Science na dan 18. siječnja 2018., utvrđeno je da su najčešće korišteni stabilizacijski omotači u nanomedicini: PVP, AOT, PLL i BSA, pa su oni odabrani za ovo istraživanje. Za sve pripravljene nanoAg vrste napravljena je detaljna fizikalno-kemijska karakterizacija (Tablica 5.1. i Tablica 5.2.) kako bi se dokazalo da su primijenjenim sintetskim protokolom dobivene nanočestice željenih svojstava (24). Stabilnost ovih nanoAg-a u mediju bogatom proteinima pa tako i u krvi, ispitana je u prethodnim istraživanjima čiji su rezultati objavljeni (24).

Sve ispitane nanoAg su u kontaktu s punom krvi izazvale hemolizu eritrocita što je u skladu s ranije objavljenim rezultatima drugih autora (89)(90). Metodom prema Drabkinu dokazano je da su hemolizu izazvale nanoAg vrste pri koncentracijama $\geq$ 50 mg Ag/L. Hemolitična svojstva nanoAg-a posljedica su interakcije s membranom eritrocita zbog koje dolazi do denaturacije proteina, stvaranja pora u membrani i reorganizacije fosfolipida membrane i u konačnici do osmotske lize. Reakcija nanočestica s tiolnim skupinama proteina u membrani jedna je od važnijih uzroka poremećaja funkcije membrane eritrocita. Usprkos metodološkim ograničenjima metode po Drabkinu, kao što je objašnjeno u opisu metode, iz rezultata je vidljivo da hemolitička aktivnost nanoAg-a ne ovisi značajno o naboju nanočestica niti o stabilizacijskom omotaču.

Prilikom dizajna medicinskoga pribora koji će biti u kontaktu s krvi izuzetno je važan podatak o hemolitičkoj aktivnosti materijala od koje će pribor biti načinjen kako bi on bio siguran za zdravlje i ujedno djelotvoran. Jednako su tako važni podatci o učincima ovakvih materijala na hemostazu. Odavno je poznato da strani i umjetni materijali mogu aktivirati unutarnji put zgrušavanja krvi (91) i tako dovesti do nastanka ugruška, odnosno do tromboze, a posljedično i do embolije. Osim tromboze, nekontrolirana sistemska aktivacija unutarnjega puta

zgrušavanja u organizmu može dovesti i do nagloga pada krvnoga tlaka, angioedema, ubrzane fibrinolize i upalnog procesa (54). Ispitivanje učinaka pripravljenih nanoAg-a s različitim stabilizacijskim omotačima na hemostazu provedeno je korištenjem cijelog niza klinički relevantnih metoda. Agregacija trombocita s agonistima i bez njih ispitana je metodom impedancijske agregometrije, dok su vanjski, unutarnji i zajednički put zgrušavanja ispitani koagulacijskim testovima mjerenjem PV-a, APTV-a i TV-a. Potencijal plazme za stvaranjem trombina ispitan je TGT-om, a viskoelastična svojstva pune krvi tijekom procesa zgrušavanja ispitana su ROTEM tehnikom.

Mjerenja agregacije trombocita u punoj krvi pokazuju da učinak nanoAg-a ne ovisi samo o tipu nanoAg-a već i o upotrijebljenim agonistima. Budući da upotrijebljeni agonisti djeluju na različite receptore tj. biokemijske putove u trombocitima, rezultati agregacije trombocita su pokazali da, ovisno o stabilizacijskom omotaču, nanoAg vrste mogu interferirati u različitim fazama procesa agregacije trombocita. Agregacija trombocita potaknuta kolagenom i ADP-om nakon tretmana krvi s nanoAg-om nije bila statistički značajno niža u odnosu na negativnu kontrolu. Rezultati ispitivanja učinaka nanoAg-a na agregaciju trombocita koje su objavili Shrivastava i sur. (37) i (78) i Ragaseema sur. (78) ukazuju na smanjenu agregaciju trombocita, a u istraživanju Laloya i sur. (62) nije dokazan nikakav učinak na agregaciju trombocita. Međutim Laloy i sur. su upotrijebili metodu optičke agregometrije te zbog optičkih interferencija nanoAg-a, nisu mogli ispitati koncentracije više od 25 mg Ag/L (62). U ovom su istraživanju ispitane koncentracije do 100 mg/L primjenom impednacijske agregometrije u kojoj nisu zabilježene interferencije s nanoAg-om. Sva četiri tipa ispitivanih nanočestica smanjivala su pri visokim koncentracijama agregaciju trombocita koja je potaknuta ristocetinom, ali je statistički značajno smanjenje bilo zabilježeno samo kod PLL-nanoAg-a (Slika 5.7.). Ristocetin potiče vezanje vWF za receptor na trombocitima GP Ib-V-IX te je moguće da je ova interakcija ometena prisutnošću nanoAg-a. I ristocetin i PLL-nanoAg su pozitivno nabijene molekule te vjerojatno visoka koncentracija PLL-nanoAg-a kompetira za vezanje s ristocetinom. Pregledom znanstvene literature nije pronađeno niti jedno istraživanje u kojem je učinak nanoAg-a na agregaciju trombocita ispitan u kombinaciji s ristocetinom, a ova interakcija vWF i trombocita je izuzetno važna za adheriranje trombocita na oštećeni subendotel kod nastanka ozljede krvne žile.

Osim agregacije trombocita potaknute agonistima ispitano je mogu li same nanoAg, bez primjene agonista, uzrokovati agregaciju trombocita. Samo je PLL-nanoAg uzrokovao agregaciju trombocita, a sličan učinak imao je i sam stabilizacijski omotač PLL (Slika 5.8.).

PLL je kationski polipeptid, a za njih je već ranije dokazano da potiču agregaciju trombocita jer neutraliziraju negativan naboj na trombocitnoj membrani (92). Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima koja su proveli Jun i sur. (79). Međutim, Huang i sur. (48) su objavili da niti nanoAg stabiliziran s PVP-om niti stabiliziran s citratom ne utječe na agregaciju trombocita čak niti pri koncentracijama od 500 mg Ag/L.

Rezultati dobiveni ovim doktorskim istraživanjem mogli bi se objasniti na dva načina. U pokusu bez agonista agregacija trombocita mjerena je odmah nakon dodatka nanoAg-a punoj krvi, a u pokusu s agonistima agregacija je mjerena nakon 30 minutne inkubacije krvi s nanoAg-om. Budući da je nanoAg izazvao agregaciju trombocita, onda je nakon inkubacijskog perioda ostalo manje intaktnih trombocita na raspolaganju koji se mogu aktivirati agonistima i zbog toga je izmjerena smanjena agregacija. Drugo objašnjenje ovih rezultata je da nanoAg remete funkciju trombocita slično kao što je pokazano u istraživanju s makrofagima (93).

Objavljena istraživanja o učincima nanoAg-a na hemostazu prikazana u Prilogu u Tablici 12.1. kontradiktorna su. Uzroci kontradiktornih rezultata mogu biti:

- različite metode (optička agregometrija i impedancijska agregometrija)
- različiti predanalitički uvjeti (vrijeme inkubacije, temperatura inkubacije)
- različiti uzorci (puna krv, PRP, oprani trombociti).

Stoga je nužno prilikom ispitivanja hemokompatibilnosti nanomedicinskih proizvoda razviti standardizirani pristup, primijeniti više metoda koje su klinički relevantne, te uzeti u obzir sve moguće interferencije koje nanočestice mogu izazvati tijekom provođenja metode.

Aktivacija unutarnjega puta zgrušavanja s različitim nanoAg vrstama ispitana je mjerenjem APTV-a (Slika 1.4.). Skraćeno APTV ukazuje na trombogeno svojstvo, a produženo APTV na antikoagulantno svojstvo. Očekivano je da će PLL-nanoAg uzrokovati produženje APTV-a jer je pozitivno nabijena molekula, a poznati aktivatori unutarnjega puta zgrušavanja su negativno nabijene molekule poput kaolina i eleginske kiseline. Međutim, rezultati ispitivanja učinaka nanoAg-a na unutarnji put zgrušavanja pokazuju da sve ispitane nanočestice pri koncentraciji od 100 mg Ag/L produžavaju APTV otprilike 1,2 puta u odnosu na negativnu kontrolu (Slika 5.9.). Martinez-Gutierrez i sur. isto nalaze produženo APTV kod nanoAg-a stabiliziranih galnom kiselinom koncentracije 67 mg Ag/L, dok Huang i sur. nalaze produženo APTV tek kod jako visokih koncentracija (500 mg Ag/L) citratom stabiliziranih nanoAg. Blago antikoagulantno djelovanje je poželjno pri izradi medicinskog pribora koji će biti u kontaktu s krvi kao npr. venskih katetera jer je česta komplikacija njihove uporabe tromboza i infekcija.

Upravo bi se nanoAg-om mogle izbjeći obje navedene komplikacije ukoliko bi ono, uz već poznati antibakterijski učinak, imalo i blagi antikoagulantni učinak.

Učinak nanoAg-a na vanjski put zgrušavanja ispitan je mjerenjem PV-a. Vanjski put zgrušavanja krvi pokreće se nakon ozljede tkiva kada tkivni faktor dođe u kontakt s krvi jer on pokreće niz kaskadnih reakcija koje završavaju stvaranjem fibrinske mrežice (Slika 1.4.). U ovom istraživanju samo je PLL-nanoAg uzrokovao produženje PV-a (Slika 5.10.). S kliničkog stajališta za djelotvorni učinak antikoagulantne terapije potrebno je produženje PV-a ili APTV-a 1,5 - 2,5 puta. Stoga bi produženje PV-a uzrokovano PLL-nanoAg-om moglo biti klinički značajno, ali ne i produženje APTV-a koje smo izmjerili sa svim tipovima nanoAg-a. U kontrolnom pokusu u kojem je ispitan učinak stabilizacijskih molekula i Ag^+ na vanjski i unutarnji put zgrušavanja, samo je PLL produžio PV slično PLL-nanoAg-u (Slika 5.12.). Budući da PV-om i APTV-om mjerimo vrijeme potrebno za nastanak fibrinske mrežice koja je rezultat niza kaskadnih reakcija, nije moguće zaključiti u kojoj od reakcija PLL i PLL-nanoAg interferiraju i izazivaju antikoagulantni učinak (Slika 1.4.).

Posljednja reakcija u zajedničkom putu zgrušavanja je pretvorba fibrinogena u fibrin koja se odvija djelovanjem enzima trombina. Vrijeme potrebno da nastane fibrin nakon dodatka trombina, mjerimo TV-om (Slika 1.4.). Produženo TV ukazuje na inhibiciju djelovanja trombina ili poremećaje u formiranju fibrinske mrežice. PVP- i AOT-nanoAg djeluju kao inhibitori nastanka fibrina jer produžavaju TV, dok PLL-nanoAg skraćuje TV (Slika 5.11.), međutim oba ova učinka nisu klinički značajna s obzirom da se radi o promjeni 1,2 puta u odnosu na negativnu kontrolu. Dobiveni rezultati mogu se objasniti adsorpcijom fibrinogena na nanoAg. Budući da je fibrinogen jedan od proteina koji se nalazi u proteinskoj koroni nanočestica srebra (48), moguće je da je zbog interakcije s površinom nanočestice došlo do konformacijske promjene fibrinogena koja je omogućila bolju ili lošiju dostupnost reaktivnog mjesta za trombin ovisno o tipu nanoAg-a (94)(95)(96). Do sada je objavljeno samo jedno istraživanje u kojem je ispitan učinak nanoAg-a na TV u kojem su autori pokazali da PVP-nanoAg i citrat-nanoAg ne utječu na TV (48).

PV, APTV i TV su vrlo korisni testovi probira koji se upotrebljavaju u kliničke svrhe za otkrivanje deficita čimbenika zgrušavanja, njihovih inhibitora i praćenje antikoagulantne terapije. Iako su nezaobilazni testovi za prethodno nabrojane svrhe, oni ne koreliraju dovoljno dobro s rizikom od krvarenja i tromboze, odnosno ne odražavaju fiziološku niti patofiziološku hemostazu (82). Ovim testovima se mjeri vrijeme do trenutka kad se počne stvarati fibrinska

mrežica, a in vivo proces hemostaze ovdje ne staje. Ne postoji savršen koagulacijski test koji bi obuhvatio sve komponente hemostaze pa se neprestano pokušavaju razviti novi globalni testovi. Takvi su npr. TGT i ROTEM koji za razliku od PV-a, APTV-a i TV-a prate dinamiku stvaranja trombina, rast ugruška i njegovu lizu (82)(97).

TGT testom se mjeri stvaranje trombina u plazmi tijekom određenog vremena čiji je nastanak rezultat međudjelovanja prokoagulacijskih i antikoagulacijskih čimbenika u plazmi (82), a preporučen je kao zlatni standard za ispitivanje učinaka nanoAg-a na zgrušavanje (83). U ovom istraživanju dokazan je značajno smanjen ETP tj. antikoagulantno djelovanje visokih doza PLL-nanoAg-a. Ovakav učinak vjerojatno je posljedica svojstva stabilizacijskog omotača PLL-a jer je u kontrolnom pokusu pokazano da ima isti učinak na ETP kao nanočestice koje su stabilizirane tim omotačem (Slika 5.13. i Slika 5.14.). Međutim, Laloy i sur. su objavili sasvim drugačije rezultate dokazujući prokoagulantni učinak nanoAg-a stabiliziranih s PVP omotačem (62). Takva razlika mogla bi biti uzrokovana primjenom različitih metodoloških pristupa tijekom provođenja TGT testa. Laloy i sur. su koristili metodu za TGT s fluorogenim supstratom, aktivaciju unutarnjeg puta zgrušavanja i visoke koncentracije nanoAg-a (500 mg Ag/L), dok je u ovom doktorskom istraživanju upotrijebljena TGT metoda s kromogenim supstratom, te praćena aktivacija vanjskoga puta zgrušavanja uz primjenu nižih koncentracija nanoAg-a (do 100 mg Ag/L). Opažene nesukladnosti u učinku nanoAg-a primjenom različitih metoda upućuju na važnost standardizacije i validacije metoda koje se koriste za ispitivanje hemokompatibilnosti nanomaterijala.

Osim gore navedenih testova, učinak nanoAg-a na hemostazu ispitan je ROTEM-om koji je globalni test hemostaze. Ovom metodom mjere se viskoelastična svojstva pune krvi tijekom procesa zgrušavanja od početka stvaranja ugruška, njegovog rasta sve do razgradnje. ROTEM se koristi za testiranje uz bolesnike (POC, od engl. *point-of-care*) u operacijskim salama ili u kliničkim laboratorijima u svrhu brzog otkrivanja uzroka i praćenju uspješnosti terapije obilnih krvarenja (98). Vrlo je malo istraživanja u kojima je ispitan učinak nanomaterijala na hemostazu s ROTEM-om (99)(100), a niti jedno od tih istraživanja nije provedeno s nanoAg-om. Ovo doktorsko istraživanje stoga prikazuje rezultate prvi puta upotrijebljenog ROTEM testa u ispitivanju učinaka različitih tipova nanoAg-a na globalnu hemostazu. Od svih ispitanih tipova nanoAg-a samo je PLL-nanoAg uzrokovao produženje CT-a i još više CFT-a, te smanjio MCF što znači da je odgodio nastanak ugruška, usporio njegov rast i smanjio čvrstoću ugruška (Slika 5.15. i Slika 5.16.). Budući da je PLL-nanoAg izazvao agregaciju trombocita tijekom inkubacijskog perioda kako je pokazano ispitivanjem agregacije trombocita bez agonista,

vjerojatno je da je preostalo malo trombocita koji su se mogli ovdje aktivirati i međudjelovanjem sa sekundarnom hemostazom brzo stvoriti čvrst ugrušak. Produženje CT-a koji je uzrokovao PLL-nanoAg označava da je i sekundarna hemostaza bila poremećena tj. da je usporen početak stvaranja fibrinske mrežice. Antikoagulantni učinak PLL-nanoAg-a dokazan produženim CT-om u ROTEMU u skladu je s rezultatima koagulacijskih testova u plazmi (rezultatima za PV, APTV i TGT) gdje je za PLL-nanoAg također pokazan antikoagulantni učinak. Međutim, ostale ispitane vrste nanoAg-a uzrokovale su skraćenje CT-a (ubrzan početak stvaranja fibrinske mrežice) što nije u skladu s produženim APTV-om koji je izmjeren pod utjecajem BSA-nanoAg-a, PVP-nanoAg-a i AOT-nanoAg-a. Ipak, ovo produženje APTV-a nije klinički značajno jer je pri primjeni antikoagulacijske terapije potrebno izazvati produženje APTV-a za 1,5 - 2,5 puta.

Drugi dio ovoga doktorskoga istraživanja bio je usmjeren na proučavanje direktne inetrakcije različitih nanoAg vrsta s trombocitima koji su izolirani iz pune krvi donora, ili se, kao u slučaju ispitivanja aktivacije, ta interakcija pratila u mediju pune krvi. Najprije je ispitana citotoksičnost nanoAg-a metodom protočne citometrije primjenom boje calcein AM koja fluorescira samo u živim, vijabilnim trombocitima. Za sve četiri ispitane nanoAg vrste zabilježen je značajno manji udio vijabilnih trombocita pri koncentracijama ≥ 10 mg Ag/L nakon izloženosti tijekom 30 minuta. PLL-nanoAg je pokazao najizraženiji učinak, kao i kod gore opisanih ispitivanja, pa je ta nanoAg vrsta već pri koncentraciji 3 mg Ag/L uzrokovala smanjenje udjela vijabilnih trombocita > 50 %. Slična citotoksičnost opažena je i za BSA-nanoAg. Vuković i sur. su objavili da BSA- i PLL-nanoAg pokazuju jak citotoksičan učinak na mononukleare u perifernoj humanoj krvi (hPMBC) kod koncentracije 5 mg Ag/L nakon 1 h inkubacije (33). Pavičić i sur. dokazali su da PLL-, AOT-, BSA- i PVP-nanoAg veličine oko 10 nm pokazuju citotoksičnost ovisnu o dozi te da značajnu toksičnost izazivaju koncentracije već od 5 mg Ag/L na mišjim neuralnim matičnim stanicama (42). Vrček i sur. objavili su da nanoAg s citratnim omotačem pokazuje o dozi ovisnu citotoksičnost i smanjenje vijabilnosti > 50 % na HepG2 stanicama nakon 24 h inkubacije pri koncentraciji 50 mg Ag/L (20). I ovo je istraživanje potvrdilo visoku citotoksičnost nanoAg-a koja je ovisna o stabilizacijskom omotaču i o dozi.

Istraživanja citotoksičnosti nanoAg-a prema trombocitima su malobrojna. Shrivastava i sur. ispitali su citotoksičnost sferičnih nanoAg-a veličine 10 - 15 nm mjereći oslobađanje LDH iz

trombocita te su zabilježili da ne dolazi do lize trombocita pri koncentraciji od 5 mg Ag/L nanoAg (37). Istom metodom su Hajtuch i sur. pokazali da koncentracije od čak 100 mg Ag/L nanoAg veličine 2 - 3,5 nm, također ne uzrokuju lizu trombocita (49). Velike razlike u rezultatima ovih istraživanja mogu biti uzrokovane primjenom nanoAg-a različite veličine i različitih stabilizacijskih omotača. Hajtuch i sur. su kao stabilizacijske omotače upotrijebili GSH, PEG i lipoičnu kiselinu dok Shrivastava i sur. ne navode koji su stabilizacijski omotač upotrijebili. Ovo doktorsko istraživanje jasno pokazuje da su razlike u citotoksičnosti uzrokovane stabilizacijom nanoAg-a različitim površinskim omotačima. Međutim, uzrok nesukladnih rezultata može biti i primjena različitih metoda kojima se detektira citotoksičan učinak te je moguće da se kod mjerenja aktivnosti LDH dogodila inhibicija enzima s nanoAg-om ili Ag^+. Osim toga, poznato je da nanoAg može interferirati na brojne načine tijekom provođenja metode, a interferncije mogu biti optičke ili se događa direktna interakcija nanoAg-a s reagensima (80). U ovom su doktorskom istraživanju primjenjeni svi protokoli u kojima se interferencije svode na minimum, a koji su razvili istraživači s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada pod vodstvom I. Vinković Vrček (80) (101).

S obzirom na to da se pri različitim biološkim uvjetima na površini nanoAg-a mogu dogoditi različiti oksidacijski procesi i otpuštanje Ag^+ koje je vrlo toksično za stanicu (20), ispitan je učinak i ionskog oblika Ag-a na trombocite. U tu je svrhu upotrijebljen $AgNO_3$. Koncentracije Ag^+ koje možemo očekivati da su otopljene s nanoAg površine, ispitane su u nekoliko istraživanja. Količina slobodnih iona Ag-a u vodenim otopinama nanoAg-a bila je manja od 5 % (Tablica 5.2.). U PBS mediju prisutno je 0,1 - 0,8 % Ag^+ (33). Uzevši te podatke u obzir može se očekivati da je kod najviše primijenjene doze nanoAg-a od 100 mg Ag/L u ovom istraživanju, udio ionskog Ag-a bio najviše 0,8 mg Ag/L. Rezultati su pokazali da ionsko Ag pri dozi od 1 mg Ag/L nije značajno utjecalo na vijabilnost trombocita, pa se može zaključiti da Ag^+ vrlo malo pridonosi citotoksičnosti nanoAg-a na trombocite. Međutim, osim otpuštanja ionskog Ag s površine nanoAg-a u mediju, treba razmatrati i moguće otapanje nanoAg-a unutar stanice koje može uzrokovati tzv. toksični učinak trojanskog konja posredovan lizosomima (engl. *lysosome-enhanced trojan horse,* LETH) jer se razgradnjom nanoAg-a u lizosomima može otopiti veća količina ionskog srebra (102).

Ulazak nanočestica u stanice važan je čimbenik nanotoksičnosti. Najčešći način ulaska nanočestica u nefagocitne stanice je endocitoza (103). Različiti su načini na koji se može dokazati ulazak nanočestica u stanicu, a u ovom su istraživanju upotrijebljene metode TEM i protočna citometrija koje se međusobno nadopunjuju. Metoda protočne citometrije je

multiparametrijska i u vrlo kratkom vremenu analizira velik broj stanica. Priprema uzoraka za analizu protočnim citometrom je jednostavna i brza. Nedostatak ove metode je što se pomoću nje ne može razlučiti je li nanočestica ušla u stanicu ili se vezala na površinu stanice. Metoda elektronske mikroskopije je dugotrajna, s kompliciranom i dugotrajnom pripremom preparata, a nedostatak je mogućnost analize maloga broja stanica. Međutim, TEM metodom se jasno može utvrditi nalaze li se nanočestice u stanici ili samo na površini stanice (31)(104). U ovom istraživanju TEM slike su pokazale nazočnost svih nanoAg vrsta unutar trombocita (Slika 5.21.). Shrivastava i sur. su isto TEM-om vizualizirali nanoAg u trombocitima. Ulazak nanoAg-a praćen je metodom protočne citometrije koju su opisali Ibuki i Toyooka (84), a koja omogućuje istovremenu analizu vijabilnosti stanica i promjena u granuliranosti stanice. Ulazak nanočestica u stanicu mijenja granuliranost stanice što dovodi do porasta SSC vrijednosti. Zabilježen je porast SSC-a trombocita tretiranih sa svim nanoAg vrstama koji je bio ovisan o dozi. Najveće povećanje SSC-a je pokazano za PLL-nanoAg >>> BSA-nanoAg > AOT-nanoAg > PVP-nanoAg. SSC je značajno rastao kod koncentracija nanoAg-a od 10 mg Ag/L, ali je za PLL-nanoAg izrazit porast bio već kod koncentracije od 1 mg Ag/L. Slični rezultati objavljeni su za iste vrste nanočestica ispitanih na hPMBC za koje se pokazalo da najizraženije internaliziraju PLL-nanoAg (33). U istraživanju Brkić-Ahmed i suradnika dokazan je ulazak istih vrsta nanočestica na HepG2 stanicama te je također PLL-nanoAg uzrokovao najviši porast SSC-a (31). Pozitivan naboj PLL-nanoAg-a vjerojatno omogućuje intenzivniju interakciju s negativno nabijenom membranom trombocita. Ulazak ostalih nanočestica koje su blago (BSA-nanoAg i PVP-nanoAg) ili jače negativno nabijene (AOT-nanoAg) vjerojatno je omogućen proteinskom koronom koja se stvara oko nanočestica te omogućuje interakciju s membranom stanice usprkos elektrostatski nepovoljnoj početnoj interakciji. Povezanost citotoksičnosti i ulaska nanoAg-a u stanicu iz ovih rezultata je jasno vidljiv jer su PLL-nanoAg i BSA-nanoAg koje su najviše ulazile u trombocite bile i najtoksičnije.

Jedan od glavnih mehanizama toksičnosti nanoAg-a jest izazivanje oksidacijskog stresa u stanicama (42)(20)(102)(105)(106). Rezultati dobiveni primjenom DCFH-DA, DHE i MBCM boja pokazali su da se i u trombocitima događa oksidacijski stres nakon tretmana s nanoAg-om. Uspoređene su količine supoeroksidnog radikala i peroksi radikala nastalih u tretiranim i netretiranim trombocitima. Iako u tretiranim trombocitima nije nastalo značajno više radikala, zabilježili smo pojačanu potrošnju važnog antioksidansa u stanici GSH-a, koji je osigurao zaštitu stanicama. Kod tretmana s PVP-nanoAg-om zabilježena je najveća potrošnja GSH-a. Kod svih tretmana tijekom 30 minuta potrošnja GSH je bila ovisna o primijenjenoj dozi

nanoAg-a, pa se može zaključiti da se pod utjecajem nanoAg-a događa blagi oksidacijski stres koji trombociti još mogu kompenzirati svojim antioksidacijskim mehanizmima. Kroz duže vrijeme potrošnja antioksidacijskih mehanizma mogla bi dovesti do njihovog iscrpljenja i tada bi nastala značajna oksidacijska oštećenja u stanici. S obzirom na to da stvaranje ROS-ova u stanici može poremetiti stanično disanje i oštetiti mitohondrije, izmjerene su i promjene mitohondrijskog membranskog potencijala nakon izlaganja različitim nanoAg vrstama. Rezultati dobiveni primjenom DiOC6 boje ukazali su na hiperpolarizaciju mitohondrijske membrane pod utjecajem nanoAg-a koja je uočena i na mišjim neuralnim matičnim stanicama kao posljedica izloženosti istim nanoAg vrstama (42). Ovakva hiperpolarizacija se smatra prolaznim stanjem, odnosno ranim događajem tijekom izloženosti mitohondrija ROS-ovima, te se događa prije depolarizacije i daljnjih apoptotičkih događaja u stanici (107). S obzirom na reaktivnost trombocita, njihove aktivacijske mehanizme i sklonost agregaciji, nije bilo moguće provoditi duže tretmane. Objavljenih rezultata o nastanku oksidacijskog stresa u trombocitima pod utjecajem nanoAg-a nema u znanstvenoj literaturi, pa ovo predstavlja prvo takvo istraživanje.

U posljednjem dijelu doktorskog istraživanja istražen je izražaj aktivacijskih biljega na površini trombocita nakon izlaganja različitim nanoAg vrstama. U preliminarnim pokusima pokazalo se da oprani trombociti nisu najbolji uzorak za ispitivanje aktivacije trombocita jer se tijekom pripreme, izolacije i pranja dio trombocita značajno aktivira i agregira (Slika 12.1 u Prilozima). Stoga je kao uzorak za ispitivanje aktivacije izabrana puna krv kako bi se izbjegla dodatna aktivacije i agregacije trombocita. Blagu aktivaciju trombocita izazvale su sve vrste nanoAg-a pojačavajući izražaj P-selektina, a najveći izražaj zabilježen je kod tretmana s PLL-nanoAg-om, kod kojeg je i jedino zabilježen statistički pojačan izražaj PAC-1 biljega u odnosu na netretirane uzorke. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima dobivenim za agregaciju trombocita koja nije bila promijenjena pri koncentracijama nanoAg-a kod kojih je ispitivana aktivacija (2 i 5 mg Ag/L PLL-nanoAg, 5 i 20 mg Ag/L AOT- i BSA-nanoAg, 20 i 50 mg Ag/L PVP-nanoAg). Slične rezultate su objavili Krajewski i sur. koji su također ispitivali učinak nanoAg-a na aktivaciju trombocita u punoj krvi, a primijenili su imitaciju protoka krvi kroz Chandlerovu petlju. Dokazali su povećan izražaj P-selektina, ali ne i PAC-1 biljega kod koncentracije nanoAg-a od 30 mg Ag/L (64). Hajtuch i sur. su dokazali inhibiciju aktivacije trombocita kolagenom nakon tretmana PRP uzoraka s PEG-, GSH-, i LA-nanoAg veličine 2 - 3,5 nm pri koncentracijama 50 i 100 mg Ag/L. Izražaj oba biljega (P-selektin i PAC-1) je bio smanjen u njihovom istraživanju (49). Smanjenu aktivaciju trombocita su također našli i Shrivastava i sur.

(37) te Ragaseema i sur. (78) na opranim trombocitima nakon tretmana s nanoAg-om veličine 10-15 nm i 20 nm. U istraživanju Jun i sur. proagregatorni učinak nanoAg-a dokazan je pojačanim izražajem P-selektina (79). Uz dodatak trombina kao jakog agonista aktivacije trombocita taj učinak je bio još jači (79). Ovo doktorsko istraživanje je utvrdilo da su oba ispitivana biljega aktivacije bila izražena daleko manje nego kod pozitivne kontrole gdje je aktivacija izazvana TRAP-6 agonistom pa se može zaključiti da je aktivacija trombocita izazvana ispitivanim nanoAg vrstama bila blaga.

Dakle, učinci ispitanih malih, kuglastih nanoAg-a veličine 10 nm na hemostazu razlikuju se s obzirom na vrstu površinskog omotača koji je primijenjen za koloidnu stabilizaciju tih nanočestica. Budući da pojačana agregabilnost trombocita i prokoagulantni učinak predstavljaju čimbenik rizika za trombozu (79), ovakve učinke nanoAg-a neophodno je poznavati pri izradi medicinskoga pribora i uređaja koji će se koristiti u kontaktu s krvi. Usporedba dobivenih rezultata i objavljenih rezultata o hemokompatibilnosti nanoAg-a dovodi do zaključka da je pri ispitivanju hemokompatibilnosti bitan odabir eksperimentalnih uvjeta, predanalitičkih uvjeta i metoda. Uporaba humane krvi, vađenja krvi s minimalnom stazom kako bi se izbjegla aktivacija trombocita te odabir dobrovoljaca koji nisu uzimali antitrombocitne i antikoagulacijske lijekove, važni su predanalitički uvjeti. Od eksperimentalnih uvjeta bitan je odabir uzorka na kojem će se ispitivanje raditi (plazma, PRP ili puna krv) jer on značajno može utjecati na pojavu interferncija prouzrokovanih ili ponašanjem samih trombocita u izabranim uvjetima, ili interakcijom nanoAg i trombocita. Preporučljiva je uporaba više metoda kojima će se učinak nanoAg-a na hemostazu i na trombocite ispitati s različitih stajališta jer ne postoji jedna metoda koja obuhvaća sve složene elemente hemostaze i ponašanja trombocita. Nužan preduvjet za ispitivanje hemokompatibilnosti nanomaterijala jest postojanje standardiziranih i validiranih protokola kakvih, na žalost, još uvijek nema.

Ograničenje ove studije je ispitivanje učinka nanoAg-a na hemostazu korištenjem *in vitro* eksperimentalnoga sustava. Sve *in vitro* studije imaju nisku snagu dokaza u odnosu na ispitivanja u *in vivo* uvjetima (114)(115). U slučaju ovoga doktorskoga istraživanja u obzir se trebaju uzeti sljedeća ograničenja:

1. Krv se uzimala na antikoagulans kako se krv ne bi zgrušala do analize. Antikoagulansom se neminovno mijenja sastav krvi i time se eksperimentalni uvjeti razlikuju od in vivo uvjeta. Izuzetno je malo metoda koje se mogu primijeniti bez uporabe antikoagulansa, a u praksi se takve metode vrlo rijetko upotrebljavaju jer se

analiza mora napraviti odmah po uzorkovanju. Osim toga, takve metode ne mogu otkriti fine promjene u mehanizmu hemostaze niti se mogu razlikovati slabi od jakih aktivatora zgrušavanja (47).

2. Pokusi su se provodili na određenom volumenu krvi pa dolazi do nakupljanja produkata aktivacije zgrušavanja što se u *in vivo* uvjetima ne događa jer ih struja krvi otplovljava i smanjuje njihovu lokalnu koncentraciju (47).

3. Korišten je stacionarni model inkubacije krvi koji se značajno razlikuje od *in vivo* uvjeta jer u stacionarnom modelu nema sile koja djeluje na stijenku krvne žile (krvni tlak), nema sile smicanja koje nastaju protokom krvi uz stijenku krvne žile i nema sloja endotela koji oblaže krvnu žilu. Endotel, tlak i sile smicanja također sudjeluju u procesu hemostaze. U stacionarnom modelu inkubacije krvi dolazi i do sedimentacije stanica tijekom inkubacije što također pridonosi nefiziološkim uvjetima (47).

4. Upotrijebljeni *in vitro* model ima dodatni nedostatak jer je krv u kontaktu sa zrakom pa izmjena plinova tijekom inkubacijskog vremena dovodi i do promjena u pH (47).

Unatoč postojanju unaprijeđenih *in vitro* modela poput Chandler-ove petlje, niti jedan model nije idealan jer niti jedan u potpunosti ne oponaša uvjete u krvnoj žili i niti jedan nema sloj endotela s kojim je krv u kontaktu u *in vivo* uvjetima. (47) *In vivo* životinjski modeli za ispitivanje hemokompatibilnosti također nisu idealni jer se hemostaza kod životinja razlikuje od hemostaze kod ljudi. Tako npr. miševi imaju tri puta veću brojčanu koncentraciju trombocita u krvi, trombociti su im manji, a što je najvažnije, različit im je odgovor na pojedine agoniste aktivacije trombocita u odnosu na ljudske trombocite. Zbog svega navedenoga rezultati ispitivanja na životinjama ne odgovaraju u potpunosti onima na ljudima (51).

7. ZAKLJUČCI

- Učinci nanočestica srebra na hemostazu razlikuju se ovisno o stabilizacijskom omotaču tj. površinskoj funkcionalizaciji.
- Hemolizu izazivaju sve nanočestice ovisno o dozi i površinskoj funkcionalizaciji, a učinak pozitivno nabijenih PLL-nanoAg-a je naijintenzivniji.
- Učinak nanoAg-a na primarnu hemostazu, odnosno agregaciju trombocita, različit je ovisno o o njihovoj površinksoj funkcionalizaciji, dozi i o agonistima.
- Učinak na sekundarnu hemostazu razlikuje se ovisno o površinskoj funkcionalizaciji, dozi i s obzirom na aktivaciju određenog koagulacijskog puta.
- Učinci na globalni test hemostaze ne koreliraju s testovima u plazmi kod svih nanočestica.
- Učinci na hemostazu nisu jednoznačni, a razlike nastaju pri uporabi različitih uzoraka (pune krvi ili plazme).
- Sve vrste nanoAg su citotoksične za trombocite, ulaze u trombocite, izazivaju blagi oksidacijski stres i blagu aktivaciju trombocita. Najtoksičnije djelovanje ima pozitivno nabijen PLL-nanoAg.
- Za buduća istraživanja učinaka nanočestica srebra i svih drugih vrsta nanomaterijala na hemostazu potrebno je odabrati, validirati i standardizirati metode, definirati predanalitičke uvjete i vrstu uzorka koje će korelirati s *in vivo* učincima nanočestica na hemostazu kako bi se ubrzala translacija novih nanomaterijala u kliničku uporabu sigurnih za primjenu.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Zbog svoga biocidnoga djelovanja, najviše upotrebljavane nanočestice u medicini su nanočestice srebra (nanoAg). S obzirom na nedostatak spoznaja o njihovim učincima na hemostazu, cilj ovoga istraživanja bio je ispitati učinke nanoAg-a ovisno o njihovoj površinskoj funkcionalizaciji.

Nacrt studije: In vitro studija na uzorcima krvi dobivenim od dobrovoljnih zdravih davatelja koji su tretirani s različitim vrstama nanoAg-a. Svaki pokus je uključivao negativnu kontrolu prema kojoj su rezultati normalizirani.

Materijal i metode: Sintetizirani su nanoAg-i s različitim stabilizacijskim omotačima: natrijevim bis(2-etilheksil)sulfosukcinatom (AOT), polivinilpirolidonom (PVP), poli-L-lizinom (PLL) i goveđim serumskim albuminom (BSA). Karakterizacija nanoAg-a napravljena je s DLS-om, ELS -om i TEM-om. Na uzorcima krvi zdravih dobrovoljaca ispitani su hemolitički učinci nanoAg-a Drabkinovom metodom, agregacija trombocita sa i bez agonista metodom impedancijske agregometrije, koagulacija plazme PV-om, APTV-om i TV-om, i analizirano je stvaranje trombina u plazmi TGT-om. Učinci nanoAg-a na viskoelastična svojstva pune krvi tijekom zgrušavanja ispitana su tromboelastometrijom. Ulazak nanoAg-a u trombocite vizualiziran je TEM-om i metodom protočne citometrije (PCM) mjerenjem bočnog rasapa svjetla. Citotoksičnost i oksidativni stres ispitani su fluorometrijski. Izražaj aktivacijskih biljega na trombocitima (P-selektin i PAC-1) određen je metodom PCM.

Rezultati: Sve vrste nanoAg-a izazivaju hemolizu ovisno o dozi. Najintenzivniju hemolizu izazivaju PLL-nanoAg, vjerojatno zbog njihovoga pozitivnoga naboja koji omogućuje jaču interakciju s membranom eritrocita. PLL-nanoAg pokazuju antikoagulantna svojstva u svim testovima osim u testu agregacije trombocita bez agonista. Ostale nanoAg (PVP-nanoAg, AOT-nanoAg i BSA-nanoAg) pokazuju antikoagulantno svojstvo samo u nekim testovima u plazmi, ali u testovima provedenim u punoj krvi pokazuju prokoagulantno djelovanje. Rezultati ispitivanja interakcija nanoAg-a s trombocitima pokazali su da su sve vrste citotoksične, da ulaze u stanice te da izazivaju blagi oksidativni stres i blagu aktivaciju trombocita tijekom 30 minuta. Najtoksičnije djelovanje je potvrđeno kod PLL-nanoAg vrste.

Zaključak: Učinci nanoAg-a na hemostazu, trombocite i eritrocite razlikuju se ovisno o površinskoj funkcionalizaciji. Učinci na hemostazu nisu jednoznačni te zahtijevaju uporabu više različitih metoda, standardizaciju metoda, vrste uzorka i predanalitičkih uvjeta.

Ključne riječi: nanočestice srebra; površinska funkcionalizacija; hemostaza, agregacija trombocita; citotoksičnost; nanomedicina

9. SUMMARY

Effect of different silver nanoparticles on haemostasis

Objectives: Silver nanoparticles (AgNPs) are among the most used nanomaterials for medical devices due to their biocidal activity, however detailed knowledge on their haemostatic effects is still lacking. This study aimed to evaluate AgNPs effect on haemostasis, in particular considering different types of nanosurface stabilization.

Study Design: This is in vitro study, using blood drawn from healthy donors, which was treated with different AgNPs. Every experiment included negative control and results were normalised to negative control.

Material and Methods: Differently stabilized AgNPs were prepared using sodium bis(2-ethylhexyl) sulphosuccinate (AOT), polyvinylpyrrolidone (PVP), poly-L-lysine (PLL) and bovine serum albumin (BSA) as coating agents. The careful characterization of each AgNPs was conducted by DLS, ELS and TEM. Venous blood was drawn from healthy volunteers not taking any drugs which might affect the haemostasis and platelets function. The study included haemolysis assay, which was performed according to the modified Drabkin's method, followed by impedance aggregometry to study the impact of AgNPs on spontaneous or induced platelet aggregation. The effect of AgNP on plasma coagulation activity was studied by measuring the clotting times in tests PT, APTT and TT, as well as the effect of AgNP on plasma potential to produce thrombin using thrombin generation test. Rotational thromboelastometry method was used to study effect of AgNPs on viscoelastic properties of whole blood clotting process. Furthermore, citotoxicity assay and oxidative stress in platelets were evaluated using fluorescent dyes. Additionally, platelet activation markers (P-selectin and PAC-1) were evaluated by flow cytometry (FCM). Uptake of AgNPs in platelets was visualised by transmission electron microscopy and determined using side-scattered light by FCM.

Results: All AgNPs were found to cause a dose-dependent haemolysis. The highest extent of haemolysis was observed for PLL-AgNPs, which may be explained by favoured interaction of positively charged AgNPs and erythrocyte's membrane. PLL-AgNPs are shown to be anticoagulants in all tests, except for platelet aggregation, whereas PVP-AgNPs, AOT- AgNPs and BSA-AgNPs displayed anticoagulant effects only when tested in plasma samples, but procoagulant effects in viscoelastometric whole blood tests. The results, studying interactions

of AgNP with platelets, showed uptake of all AgNP in the cells and that they are cytotoxic, causing mild oxidative stress and mild platelet activation. The most toxic effect was confirmed in PLL-AgNP species.

Conclusion: The effect of nanoparticles on haemostasis, platelets and erythrocytes is different, depending on nanosurface stabilization. However, the effect on haemostasis is not unambiguous and requires multimethodological approach. Overall, the results demonstrate the need to thoroughly assess the haemostatic effects of AgNPs, using a combination of different techniques, at the same time highlights the need for a standardised approach in sampling and procedure.

Keywords: silver nanoparticles; surface functionalization; haemostasis, platelet aggregation; cytotoxicity; nanomedicine

10. LITERATURA

1. Ebrahiminezhad A, Raee MJ, Manafi Z, Sotoodeh Jahromi A, Ghasemi Y. Ancient and Novel Forms of Silver in Medicine and Biomedicine. J Adv Med Sci Appl Technol. 2016;2(1):122.
2. Chernousova S, Epple M. Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal. Angew Chemie Int Ed. 2013;52(6):1636–53.
3. Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med. 2016;12(3):789–99.
4. Martínez-Gutierrez F, Thi EP, Silverman JM, de Oliveira CC, Svensson SL, Hoek A Vanden, et al. Antibacterial activity, inflammatory response, coagulation and cytotoxicity effects of silver nanoparticles. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med. 2012;8(3):328–36.
5. Look C-N, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-Y, Sun H, et al. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. JBIC J Biol Inorg Chem. 2007;12(4):527–34.
6. Nowack B, Krug HF, Height M. 120 years of nanosilver history: Implications for policy makers. Environ Sci Technol. 2011;45(4):1177–83.
7. Woodrow Wilson International Center. The Project on Emerging Nanotechnologies: Consumer Product. 2012. Dostupno na adresi: http://www.nanotechproject.org/. Datum pristupa: 29.10.2018.
8. Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF, Hull DR. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. Beilstein J Nanotechnol. 2015;21;6(1):1769–80.
9. Wright JB, Lam K, Hansen D, Burrell RE. Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens. Am J Infect Control. 1999;27(4):344–50.
10. Li Q, Wang M, Ge L, Li X, Ouyang J, Xing M. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. Int J Nanomedicine. 2014;9(1):2399.
11. Sun RWY, Chen R, Chung NPY, Ho CM, Lin CLS, Che CM. Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. Chem Commun. 2005;(40):5059–61.

12. 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.
13. Likus W, Bajor G, Siemianowicz K. Nanosilver-does it have only one face? Acta Biochim Pol. 2013;60(4):495–501.
14. 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.
15. International Organization For Standardisation. ISO/TS 80004-2:2015 Nanotechnologies -Terminology and definitions for nano-objects -Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. Dostupno na adresi: https://www.iso.org/standard/54440.html Datum pristupa: 28.10.2018.
16. European Commission. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial Text with EEA relevance. Official Journal of the European Union. Dostupno na adresi: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32011H0696. Datum pristupa: 13.11.2019.
17. Griffin S, Masood MI, Nasim MJ, Sarfraz M, Ebokaiwe AP, Schäfer KH, et al. Natural nanoparticles: A particular matter inspired by nature. 2018;7:3.
18. Kurajica S, Lučić Blagojević S. Uvod u nanotehnologiju.1.izd. Zagreb: Hrvatsko društvo kemijskih inženjera; 2017.
19. Wijnhoven SWP, Peijnenburg WJGM, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EHW, et al. Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. Nanotoxicology. 2009;3(2):109–38.
20. Vrček IV, Žuntar I, Petlevski R, Pavičić I, Dutour Sikirić M, Ćurlin M, et al. Comparison of in vitro toxicity of silver ions and silver nanoparticles on human hepatoma cells. Environ Toxicol. 2016;(6):679–92.
21. Li Y, Qin T, Ingle T, Yan J, He W, Yin JJ, et al. Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. Arch Toxicol. 2017;91(1).
22. Smith JN, Thomas DG, Jolley H, Kodali VK, Littke MH, Munusamy P, et al. All that is silver is not toxic: Silver ion and particle kinetics reveals the role of silver ion aging and dosimetry on the toxicity of silver nanoparticles. Part Fibre Toxicol. 2018;15(1):47.
23. Prakash J. Synthesis, Optical Properties and Surface Enhanced Raman Scattering Applications of Noble Metal Nanoparticles Embedded in Polymers U: Saylor Y, Irby V, urednici. Metal nanoparticles: Properties, synthesis and applications. New

York: Nova Science Publishers, Inc.; 2018. str. 105-111

24. Jurašin DD, Ćurlin 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;7:246–62.
25. McShan D, Ray PC, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. Journal of Food and Drug Analysis. 2014; 22:116–27.
26. Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, Haynes CL, Wolf SM, McCullough J. The big picture on nanomedicine: The state of investigational and approved nanomedicine products. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2013;9:1–14.
27. Villanueva-Flores F, Castro-Lugo A, Ramírez OT, Palomares LA. Understanding cellular interactions with nanomaterials: towards a rational design of medical nanodevices. Nanotechnology. 2020;31(13):132002.
28. Dakal TC, Kumar A, Majumdar RS, Yadav V. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. Front Microbiol. 2016;7:1831.
29. Marassi V, Di Cristo L, Smith SGJ, Ortelli S, Blosi M, Costa AL, et al. Silver nanoparticles as a medical device in healthcare settings: A five-step approach for candidate screening of coating agents. R Soc Open Sci. 2018;5(1):171113.
30. Graves JL, Tajkarimi M, Cunningham Q, Campbell A, Nonga H, Harrison SH, et al. Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in Escherichia coli. Front Genet. 2015;6:42.
31. 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.
32. Milić M, Leitinger G, Pavičić I, Zebić Avdičević M, Dobrović S, Goessler W, et al. Cellular uptake and toxicity effects of silver nanoparticles in mammalian kidney cells. J Appl Toxicol. 2015;35(6):581–92.
33. Vuković B, Milić M, Dobrošević B, Milić M, Ilić K, Pavičić I, et al. Surface Stabilization Affects Toxicity of Silver Nanoparticles in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. Nanomaterials. 2020;10(7):1390.
34. Lee J, Kim Y, Song K, Ryu H, Sung J, Park J, et al. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague–Dawley rats. Part Fibre Toxicol. 2013;10(1):36.
35. Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, et al. Twenty-eight-day oral

toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. Inhal Toxicol. 2008;20(6):575–83.

36. Ji JH, Jung JH, Kim SS, Yoon JU, Park JD, Choi BS, et al. Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. Inhal Toxicol. 2007;19(10):857–71.
37. Shrivastava S, Bera T, Singh SK, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. Characterization of Antiplatelet Properties of Silver Nanoparticles. ACS Nano. 2009;3(6):1357–64.
38. Zhang XF, Shen W, Gurunathan S. Silver nanoparticle-mediated cellular responses in various cell lines: An in vitro model. International Journal of Molecular Sciences. 2016;17:1603.
39. Akter M, Sikder MT, Rahman MM, Ullah AKMKMA, Hossain KFB, Banik S, et al. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. Journal of Advanced Research. 2018;9:1–16.
40. Kruszewski M, Brzoska K, Brunborg G, Asare N, Dobrzyńska M, Dušinská M, et al. Toxicity of Silver Nanomaterials in Higher Eukaryotes. Advances in Molecular Toxicology. 2011;5:179-218.
41. Çiftçi H, Türk M, Tamer U, Karahan S, Menemen Y. Silver nanoparticles: cytotoxic, apoptotic, and necrotic effects on MCF-7 cells. Turkish J Biol. 2013;37(5):573–81.
42. Pavičić I, Milić M, Pongrac IM, Brkić Ahmed L, Matijević Glavan T, Ilić K, et al. Neurotoxicity of silver nanoparticles stabilized with different coating agents: In vitro response of neuronal precursor cells. Food Chem Toxicol. 2020;136:110935.
43. Gyulkhandanyan A V, Mutlu A, Freedman J, Leytin V. Markers of platelet apoptosis: Methodology and applications. J Thromb Thrombolysis. 2012;33(4):397-411.
44. Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. Biomed Res Int. 2013;2013:1–15.
45. Čepelak I. Sloboni radikali i antioksidansi. U: Čvorišćec D, Čepelak I, urednici. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 638–645.
46. International Organization For Standardisation. EN ISO 10993-4:2017 Biological evaluation of medical devices - Part 4: Selection of tests for interactions with blood. Dostupno na adresi: https://www.iso.org/standard/63448.html

47. Weber M, Steinle H, Golombek S, Hann L, Schlensak C, Wendel HP, et al. Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. Front Bioeng Biotechnol. 2018;6:99
48. Huang H, Lai W, Cui M, Liang L, Lin Y, Fang Q, et al. An Evaluation of Blood Compatibility of Silver Nanoparticles. Sci Rep. 2016;6:25518.
49. Hajtuch J, Hante N, Tomczyk E, Wojcik M, Radomski MW, Santos-Martinez MJ, et al. Effects of functionalized silver nanoparticles on aggregation of human blood platelets. Int J Nanomedicine. 2019;14:7399–417.
50. Key NS, Makris M, Lillicrap D, ur. Practical Hemostasis and Thrombosis. 2. izd. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2017.
51. Fröhlich E. Action of Nanoparticles on Platelet Activation and Plasmatic Coagulation. Curr Med Chem. 2016;23(5):408–30.
52. Fritsma GA. Antiplatelet Drugs And Platelet Function Testing. Platelet Structure and Function. Clin Lab Sci. 2015;28(2):125-131
53. Weller MA. Secondary Hemostasis and Fibrinolysis. U: McKenzie SB, urednik. Clinical Laboratory Hematology. New Jersey: Pearson Prentice Hall: 2004. str.675-703
54. Simak J, De Paoli S. The effects of nanomaterials on blood coagulation in hemostasis and thrombosis. Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology. 2017;9(5):e1448.
55. Sanfins E, Augustsson C, Dahlbäck B, Linse S, Cedervall T. Size-Dependent Effects of Nanoparticles on Enzymes in the Blood Coagulation Cascade. Nano Lett. 2014;14(8):4736–44.
56. Mayer A, Vadon M, Rinner B, Novak A, Wintersteiger R, Fröhlich E. The role of nanoparticle size in hemocompatibility. Toxicology. 2009;258:139–47.
57. Kushida T, Saha K, Subramani C, Nandwana V, Rotello VM. Effect of nano-scale curvature on the intrinsic blood coagulation system. Nanoscale. 2014;6(23).
58. Maitz MF, Sperling C, Wongpinyochit T, Herklotz M, Werner C, Seib FP. Biocompatibility assessment of silk nanoparticles: hemocompatibility and internalization by human blood cells. Nanomedicine: NBM. 2017;13:2633-2642
59. de la Harpe KM, Kondiah PPD, Choonara YE, Marimuthu T, du Toit LC, Pillay V. The Hemocompatibility of Nanoparticles: A Review of Cell-Nanoparticle Interactions and Hemostasis. Cells. 2019;8:1209.
60. Weisel JW, Litvinov RI. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and

thrombosis. J Thromb Haemost. 2019;17(2):271–82.

61. Cheng C, Liu C, Han B, Sun Z, Wang Y, Li Z, et al. Silver Nanoparticles Modified with Sodium Triphosphate: Antibacterial Activity, Hemocompatibility and Cytotoxicity. J Nanosci Nanotechnol. 2017;18(6):3816–24.
62. Laloy J, Minet V, Alpan L, Mullier F, Beken S, Toussaint O, et al. Impact of Silver Nanoparticles on Haemolysis, Platelet Function and Coagulation. Nanobiomedicine. 2014;22;1:4.
63. Chen LQ, Fang L, Ling J, Ding CZ, Kang B, Huang CZ. Nanotoxicity of silver nanoparticles to red blood cells: Size dependent adsorption, uptake, and hemolytic activity. Chem Res Toxicol. 2015;28(3):501–9.
64. Krajewski S, Prucek R, Panacek A, Avci-Adali M, Nolte A, Straub A, et al. Hemocompatibility evaluation of different silver nanoparticle concentrations employing a modified Chandler-loop in vitro assay on human blood. Acta Biomater. 2013;9(7):7460–8.
65. Kwon TW, Woo HJ, Kim YH, Lee HJ, Park KH, Park SK, et al. Optimizing hemocompatibility of surfactant-coated silver nanoparticles in human erythrocytes. Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 2012;12(8):6168-6175.
66. Gremmel T, Frelinger A, Michelson A. Platelet Physiology. Semin Thromb Hemost. 2016;42(03):191–204.
67. White JG. Platelets are covercytes, not phagocytes: Uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. Platelets. 2005;16(2):121-131.
68. Aseychev A V., Azizova OA, Beckman EM, Dudnik LB, Sergienko VI. Effect of gold nanoparticles coated with plasma components on ADP-induced platelet aggregation. Bull Exp Biol Med. 2013;155(5):685–8.
69. Wiwanitkit V, Sereemaspun A, Rojanathanes R. Gold nanoparticles and a microscopic view of platelets: A preliminary observation. Cardiovasc J Afr. 2009;20(2):141-142
70. Santos-Martinez MJ, Inkielewicz-Stepniak I, Medina C, Rahme K, Arcy D, Fox D, et al. The use of quartz crystal microbalance with dissipation (QCM-D) for studying nanoparticle-induced platelet aggregation. Int J Nanomedicine. 2012;7:243–55.
71. Deb S, Patra HK, Lahiri P, Dasgupta AK, Chakrabarti K, Chaudhuri U. Multistability in platelets and their response to gold nanoparticles. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med. 2011;7(4):376–84.

72. Dobrovolskaia MA, Patri AK, Simak J, Hall JB, Semberova J, De Paoli Lacerda SH, et al. Nanoparticle Size and Surface Charge Determine Effects of PAMAM Dendrimers on Human Platelets in Vitro. Mol Pharm. 2012;9(3):382–93.
73. Deb S, Raja SO, Dasgupta AK, Sarkar R, Chattopadhyay AP, Chaudhuri U, et al. Surface tunability of nanoparticles in modulating platelet functions. Blood Cells, Mol Dis. 2012;48(1):36–44.
74. Smyth E, Solomon A, Vydyanath A, Luther PK, Pitchford S, Tetley TD, et al. Induction and enhancement of platelet aggregation in vitro and in vivo by model polystyrene nanoparticles. Nanotoxicology. 2015;9(3):356–64.
75. Geys J, Nemmar A, Verbeken E, Smolders E, Ratoi M, Hoylaerts MF, et al. Acute toxicity and prothrombotic effects of quantum dots: impact of surface charge. EnvironHealth Perspect. 2008;116:1607–13.
76. Arora S, Rajwade JM, Paknikar KM. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. Toxicol Appl Pharmacol. 2012;258(2):151–65.
77. Rywaniak J, Luzak B, Podsedek A, Dudzinska D, Rozalski M, Watala C. Comparison of cytotoxic and anti-platelet activities of polyphenolic extracts from Arnica montana flowers and Juglans regia husks. Platelets. 2015;26(2):168–76.
78. Ragaseema VM, Unnikrishnan S, Kalliyana Krishnan V, Krishnan LK. The antithrombotic and antimicrobial properties of PEG-protected silver nanoparticle coated surfaces. Biomaterials. 2012;33(11):3083–92.
79. Jun EA, Lim KM, Kim K, Bae ON, Noh JY, Chung KH, et al. Silver nanoparticles enhance thrombus formation through increased platelet aggregation and procoagulant activity. Nanotoxicology. 2011;5(2):157–67.
80. Vinković Vrček I, Pavičić I, Crnković T, Jurašin D, Babič M, Horák D, et al. Does surface coating of metallic nanoparticles modulate their interference with in vitro assays? RSC Adv. 2015;5(87):70787–807.
81. Balasubramaniam P, Malathi A. Comparative study of hemoglobin estimated by Drabkin's and Sahli's methods. J Postgrad Med. 1992;38(1):8–9.
82. Tripodi A. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. Clin Chem. 2016;62(5):699–707.
83. Laloy J, Robert S, Marbehant C, Mullier F, Mejia J, Piret JP, et al. Validation of the calibrated thrombin generation test (cTGT) as the reference assay to evaluate the procoagulant activity of nanomaterials. Nanotoxicology. 2012;6(2):213–32.
84. Suzuki H, Toyooka T, Ibuki Y. Simple and easy method to evaluate uptake

potential of nanoparticles in mammalian cells using a flow cytometric light scatter analysis. Environ Sci Technol. 2007;41(8):3018-3024.

85. Socci DJ, Bjugstad KB, Jones HC, Pattisapu J V., Arendash GW. Evidence that oxidative stress is associated with the pathophysiology of inherited hydrocephalus in the H-Tx rat model. Exp Neurol. 1999;155(1):109–17.
86. Chen J, Rogers SC, Kavdia M. Analysis of kinetics of dihydroethidium fluorescence with superoxide using xanthine oxidase and hypoxanthine assay. Ann Biomed Eng. 2013;41(2):327–37.
87. Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BHJ. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. Anal Biochem. 2000;286(1):35–7.
88. Milić M, Vuković B, Barbir R, Pem B, Milić M, Šerić V, et al. Effect of differently coated silver nanoparticles on hemostasis. Platelets. 2020;1–11
89. Kwon T, Woo HJ, Kim YH, Lee HJ, Park KH, Park S, et al. Optimizing Hemocompatibility of Surfactant-Coated Silver Nanoparticles in Human Erythrocytes. J Nanosci Nanotechnol. 2012;12(8):6168–75.
90. Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. Crit Rev Toxicol. 2010;40(4):328–46.
91. Wu Y. Contact pathway of coagulation and inflammation. Thromb J. 2015;13(1):17.
92. de la Harpe K, Kondiah P, Choonara Y, Marimuthu T, du Toit L, Pillay V. The Hemocompatibility of Nanoparticles: A Review of Cell–Nanoparticle Interactions and Hemostasis. Cells. 2019;8(10):1209.
93. Prietl B, Meindl C, Roblegg E, Pieber TR, Lanzer G, Fröhlich E. Nano-sized and micro-sized polystyrene particles affect phagocyte function. Cell Biol Toxicol. 2014;30(1):1–16.
94. Sasidharan A, Riviere JE, Monteiro-Riviere NA. Gold and silver nanoparticle interactions with human proteins: Impact and implications in biocorona formation. J Mater Chem B. 2015;3(10):2075–82.
95. Bandyopadhyay D, Baruah H, Gupta B, Sharma S. Silver nano particles prevent platelet adhesion on immobilized fibrinogen. Indian J Clin Biochem. 2012;27(2):164–70.
96. Jaffer IH, Fredenburgh JC, Hirsh J, Weitz JI. Medical device-induced thrombosis:

what causes it and how can we prevent it? J Thromb Haemost. 2015;13(S1):S72–81.

97. Lancé MD. A general review of major global coagulation assays: thrombelastography, thrombin generation test and clot waveform analysis. Thromb J. 2015;13(1):1.
98. Görlinger K, Dirkmann D, Hanke AA. Rotational thromboelastometry (ROTEM®). U: Gonzalez E., Moore H., Moore E. urednici. Trauma Induced Coagulopathy. Cham: Springer International Publishing; 2016. str. 267–98.
99. Shankarraman V, Davis-Gorman G, Copeland JG, Caplan MR, McDonagh PF. Standardized methods to quantify thrombogenicity of blood-contacting materials via thromboelastography. J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater. 2012;100 B(1):230–8.
100. Ajdari N, Vyas C, Bogan SL, Lwaleed BA, Cousins BG. Gold nanoparticle interactions in human blood: a model evaluation. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med. 2017;13(4):1531–42.
101. Pem B, González-Mancebo D, Moros M, Oca a 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. 2019;7(1):014001.
102. 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.
103. Fröhlich E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. Int J Nanomedicine. 2012;7:5577-91.
104. Drasler B, Vanhecke D, Rodriguez-Lorenzo L, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. Quantifying nanoparticle cellular uptake: Which method is best? Nanomedicine. 2017;12:1095–9.
105. Shrivastava R, Kushwaha P, Bhutia YC, Flora SJS. Oxidative stress following exposure to silver and gold nanoparticles in mice. Toxicol Ind Health. 2016;32(8):1391–404.
106. Khanna P, Ong C, Bay B, Baeg G. Nanotoxicity: An Interplay of Oxidative Stress, Inflammation and Cell Death. Nanomaterials. 2015;5(3):1163–80.
107. Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential (δψm) in apoptosis; an update. Apoptosis. 2003;8(2):115–28.

108. Smock KJ, Schmidt RL, Hadlock G, Stoddard G, Grainger DW, Munger MA. Assessment of orally dosed commercial silver nanoparticles on human ex vivo platelet aggregation. Nanotoxicology. 2014;8(3):328–33.
109. Stevens KNJ, Crespo-Biel O, van den Bosch EEM, Dias AA, Knetsch MLW, Aldenhoff YBJ, et al. The relationship between the antimicrobial effect of catheter coatings containing silver nanoparticles and the coagulation of contacting blood. Biomaterials. 2009;30(22):3682–90.
110. De Mel A, Chaloupka K, Malam Y, Darbyshire A, Cousins B, Seifalian AM. A silver nanocomposite biomaterial for blood-contacting implants. J Biomed Mater Res - Part A. 2012;100 A(9):2348–57.
111. Makarov MS, Borovkova N V., Storozheva M V. Morphofunctional Properties of Human Platelets Treated with Silver Nanoparticles. Bull Exp Biol Med. 2017;164(2):241–6.
112. Lateef A, Ojo SA, Oladejo SM. Anti-candida, anti-coagulant and thrombolytic activities of biosynthesized silver nanoparticles using cell-free extract of Bacillus safensis LAU 13. Process Biochem. 2016;51(10):1406–12.
113. Harish BS, Uppuluri KB, Anbazhagan V. Synthesis of fibrinolytic active silver nanoparticle using wheat bran xylan as a reducing and stabilizing agent. Carbohydr Polym. 2015;132:104–10.
114. Süt N. Study Designs in Medicine. Balkan Med J. 2014;31:273-7.
115. Pandis N. The evidence pyramid and introduction to randomized controlled trials. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2011;140(3):446-7.

11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Marija Milić

Zvanje: mag.med.biochem, specijalist med.biokemije

Datum i mjesto rođenja: 28.11.1971., Osijek, Hrvatska

Kućna adresa i telefon: Crkvena 48, 31000 Osijek, mob: 091 5534776

E-mail: milic.marija@kbo.hr ; marija.milicgall@gmail.com

Zaposlenje: Odjel za hematološku dijagnostiku i koagulaciju, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Osijek, Huttlerova 4, 31000 Osijek

Školovanje:

- Od 2013. do danas doktorski studij biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J Strossmayer u Osijeku
- 2000. - 2003. specijalizacija iz medicinske biokemije, Odjel za medicinsku biokemiju, KBC Osijek
- 1996. - 1997. pripravnički staž iz medicinske biokemije, Odjel za medicinsku biokemiju, KB Osijek
- 1990. - 1996. diplomski integrirani studij medicinske biokemije, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 1986. - 1990. Kemijsko-tehnološka škola, ŠC Ruđer Bošković, Osijek

Radno iskustvo:

- Od 2009. Odjel za hematološku dijagnostiku i koagulaciju na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Osijek, specijalist medicinske biokemije
- Od 2016. - 2020. voditelj Odjela za kontrolu kvalitete na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Osijek
- 2013. - 2019. suradnik u zvanju asistenta na Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku
- Od 2005. - 2009. Odjel za hitnu laboratorijsku dijagnostiku na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Osijek

Članstva i aktivnosti u znanstvenim i strukovnim udrugama:

- Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, od 1996.
- Hrvatska komora medicinskih biokemičara, od 1998.
- tajnica podružnice Slavonije i Baranje Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, od 2011.

- nacionalna predstavnica u međunarodnom društvu Danubian League against Thrombosis and Haemorrhagic Disorders (DLTH) od 2015.
- član Radne grupe za laboratorijsku koagulaciju Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu od 2015.
- član međunarodnog društva International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) od 2016.

Nagrade:

- 1996. Rektorova nagrada Sveučilišta u Zagrebu za najbolji studentski rad
- 2016. Dekanova nagrada Sveučilišta u Osijeku na Danima doktoranada

Istraživač-suradnik na istraživačkim projektima:

- Projekt HRZZ: Značaj interakcija metalnih nanočestica sa sumpornim biomolekulama za nano-bio sučelje, voditelj Ivana Vinković Vrček, 2017.-2021.
- Projekt HRZZ : Mehanizmi nastajanja kalcijevih fosfata na anorganskim nanomaterijalima. Biomimetski put priprave multifunkcionalnih kompozita za regeneraciju čvrstih tkiva. Voditelj: Maja Dutour Sikirić, 2018.-.2022.

Publikacije:

1. Bošnjak Z, Ćavar S, Klapec T, Milić M, Klapec-Basar M, Toman M. Selected markers of cardiovascular disease in a population exposed to arsenic from drinking water. Environ Toxicol Pharmacol. 2008;26(2):181–6.
2. Ćavar S, Bošnjak Z, Klapec T, Barišić K, Čepelak I, Jurasović J, i sur. Blood selenium, glutathione peroxidase activity and antioxidant supplementation of subjects exposed to arsenic via drinking water. Environ Toxicol Pharmacol. 2010 Mar;29(2):138–43.
3. Maričić L, Včeva A, Višević R, Včev A, Milić M, Šerić V, i sur. Assessment of Endothelial Dysfunction by Measuring Von Willebrand Factor and Exhaled Nitric Oxide in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Coll Antropol 2013;37(4):1153–60.
4. Bronić A, Coen Herak D, Margetić S, Milić M. Policies and practices in haemostasis testing among laboratories in Croatia: a survey on behalf of a Working Group for Laboratory Coagulation of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. Biochem Medica 2017;27(1):199–216.
5. Bronić A, Coen Herak D, Margetić S, Milić M. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: National recommendations for blood collection, processing, performance and reporting of results for coagulation screening assays prothrombin time, activated partial thromboplastin time, thr. Biochem medica. 2019;29(2):020503.
6. Barbir R, Goessler W, Ćurlin M, Micek V, Milić M, Vuković B, i sur. Protein Corona Modulates Distribution and Toxicological Effects of Silver Nanoparticles In Vivo. Part Part Syst Charact. 2019 Aug 19;36(8):1900174
7. Milić M, Vuković B, Barbir R, Pem B, Milić M, Šerić V, i sur. Effect of differently coated silver nanoparticles on hemostasis. Platelets. 2020;15:1–11.
8. Vuković B, Milić M, Dobrošević B, Milić M, Ilić K, Pavičić I, i sur. Surface stabilization affects toxicity of silver nanoparticles in human peripheral blood mononuclear cells. Nanomaterials. 2020;10(7):1–18.

12. PRILOZI

1. Tablica 12.1. Prikaz objavljenih rezultata ispitivanja učinaka nanoAg-a na hemostazu, upotrijebljenih metoda, vrsta uzoraka i segmenata hemostaze koji su ispitani
2. Slika 12.1. Citogrami preliminarnog ispitivanja aktivacije trombocita na opranim trombocitima

Tablica 12.1. Prikaz objavljenih rezultata ispitivanja učinaka nanoAg-a na hemostazu, upotrijebljenih metoda, vrsta uzoraka i segmenata hemostaze koji su ispitani.

Analiza	Metoda	Vrsta uzorka	Vrsta nanoAg-a	Učinak	Literatura
Primarna hemostaza					
Agregacija trombocita	Optička agregometrija (agonisti: ADP, kolagen, AA)	*2*. PRP *ex vivo*, ljudski *6*. PRP ljudski	*2*. nanoAg 32.8 nm, bez omotača *6*. PVP nanoAg 16 nm aglomerati oko 71 nm	Bez učinka	(108) (62)
		3. WP ljudski *12*. PRP ljudski	*3*. nanoAg 10-15 nm *12*. PEG NanoAg 20 nm	Smanjena agregacija	(37) (78)
	Impedancijska agregometrija	Puna krv štakora	NanoAg 10-100 nm	Pojačana agregacija (s trombinom i bez agonista)	(79)
		Puna krv štakora	NanoAg 10-15 nm	Smanjena agregacija	(37)
	Kvarcna mikro ravnoteža	PRP ljudski	GSH-nanoAg 2 nm, PEG-nanoAg 3.7 nm i LA-nanoAg 2.5 nm	Smanjena agregacija	(49)
	Broj trombocita	WP ljudski i WP štakora	nanoAg 10-100 nm	Pojačana agregacija (s	(79)

				trombinom i bez agonista)	
		PRP ljudski	PVP nanoAg i citrat-nanoAg 20 nm	Bez učinka (bez agonista)	(48)
Adhezija trombocita	TEM/SEM	*3*. WP ljudski *9*. PRP ljudski *12*. WP ljudski *14*. PRP ljudski	3. nanoAg 10-15 nm *9*. nanoAg 20 nm na površini katetera *12*. PEG nanoAg, 20 nm *14*. POSS-PCU-nanoAg nanokompozit nanoAg 11±6.75 nm	Smanjena adhezija	(37) (109) (78) (110)
		1. WP ljudski *6*. PRP ljudski	*1*. nanoAg 10-100nm *6*. PVP nanoAg 16 nm i aglomerati oko 71 nm	Pojačana adhezija	(79) (62)
	Fluorescentna mikroskopija	*3*. WP ljudski *11*. WP ljudski *13*. ljudski trombociti izolirani automatskom aferezom *14*. PRP ljudski	*3*. nanoAg, 10-15 nm *11*. nanoAg 13-45 nm *13*.nanoAg koloidna suspenzija Ag-bion2 *14*. POSS-PCU-nanoAg nanokompozit 11±6.75 nm	Smanjena adhezija	(37) (95) (111) (110)
Adhezija trombocita pri protoku	Broj trombocita prije i poslije protoka	WP ljudski	nanoAg 10-15 nm	Smanjena adhezija	(37)

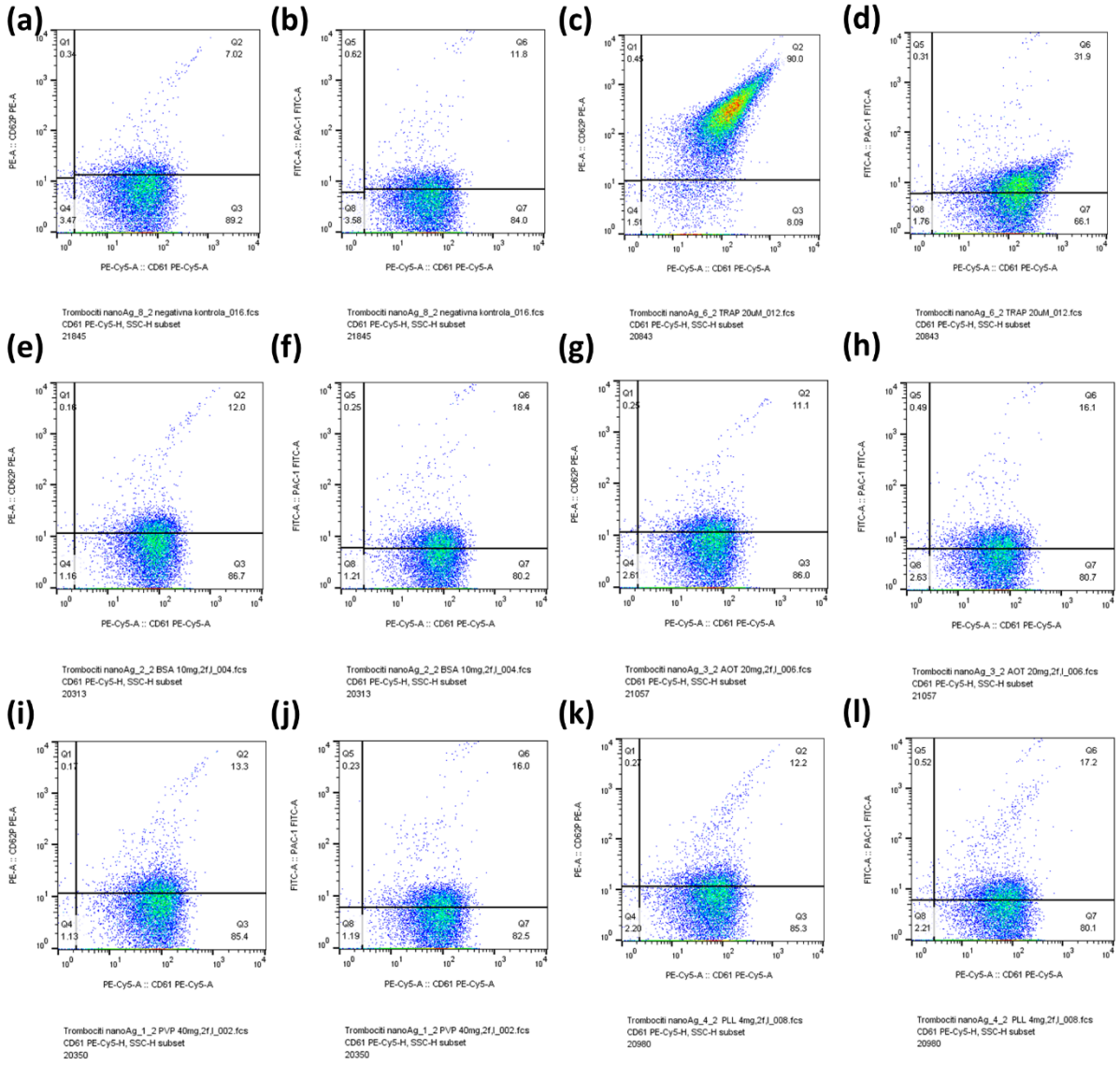
	preko imobiliziranog kolagena				
Prostiranje trombocita	fluorescentna mikroskopija fibrinogenom obloženih predmetnica	WP ljudski	nanoAg 10-15 nm	Bez učinka	(37)
		WP ljudski	nanoAg 13-45 nm	Smanjeno prostiranje	(95)
Biljezi aktivacije trombocita	Protočna citometrija (P-selektin, PAC, PS)	Puna krv, ljudska	nanoAg 10-15 nm	Pojačana aktivacija (samo P-selektin)	(64)
		WP ljudski	nanoAg 10-100 nm	Aktivacija (PS, P-selektin)	(79)
		3.i 12. WP ljudski *16.* PRP ljudski	*3*. nanoAg 10-15 nm *12*. PEG-nanoAg 20 nm *16.* GSH-nanoAg 2 nm, PEG-nanoAg 3.7 nm i LA-nanoAg 2.5 nm	Smanjena aktivacija	(37) (78) (49)
	ELISA: β-tromboglobulin	*5*. puna krv, ljudska *9*. PRP ljudski	*5*. nanoAg 10-15 nm *9*. nanoAg na površini katetera	Pojačana aktivacija	(64) (109)
	ELISA: trombocitni faktor PF4	PRP ljudski	POSS-PCU-nanoAg nanokompozit nanoAg 11±6.75 nm	Smanjena aktivacija	(110)

	ELISA: TXA_2	PRP ljudski	GSH-nanoAg 2 nm, PEG-nanoAg 3.7 nm i LA-nanoAg 2.5 nm	Smanjena aktivacija	(49)
Oslobađanje sadržaja gustih trombocitnih granula	Luminometrija ADP	WP ljudski	nanoAg 10-15 nm	Smanjeno otpuštanje ADP-a	(37)
	Radioaktivno obilježen serotonin	WP ljudski	nanoAg 10-100nm	Pojačano otpuštanje serotonina	(79)
	Fluorometrija: Fura-2 AM za Ca^{2+} u citosolu	WP ljudski	nanoAg 10-15 nm	Smanjeno otpuštanje Ca^{2+}	(37)
	Fluorometrija: Fluo-3 AM za Ca^{2+} u citosolu	WP ljudski	nanoAg 10-100 nm	Pojačano otpuštanje Ca^{2+}	(79)
Citotoksičnost-integritet membrane trombocita	Fluorometrija: ANS boja	WP ljudski	nanoAg 10-15 nm	Oštećenje membrane	(37)
	LDH	WP ljudski	nanoAg 10-15 nm	Bez učinka	(37)
		WP ljudski	GSH-nanoAg 2 nm, PEG-nanoAg 3.7 nm i LA-nanoAg 2.5 nm	Bez učinka	(49)
Proteini trombocita	Imunoblot: fosfotirozin	WP ljudski	nanoAg 13-45 nm	Smanjena fosforilacija tj. interakcija	(37) (95)

				integrina IIb/IIIa i fibrina	
	Fluorescentna mikroskopija: faloidin-FITC bojanje F-aktina	WP ljudski	nanoAg 10-15 nm	Smanjena polimerizacija F-aktina tj. reorganizacija citoskeleta	(37) (95)
Trombocitni signalni putovi	Metabolizam AA: malondialdehid	WP ljudski	PEG-nanoAg 20 nm	Smanjen metabolizam AA (antiagregacijski učinak)	(78)
	Western blot: fokalna adhezijska kinaza (FAK)	WP ljudski	PEG-nanoAg 20 nm	Smanjena aktivnost FAK	(78)
Prokoagulantna aktivnost trombocita	Generacija trombina na trombocitima	WP ljudski	nanoAg 10-100 nm	Prokoagulantni učinak	(79)
Ulazak nanoAg-a u trombocite	TEM	WP ljudski	nanoAg 10-15 nm	NanoAg-a u trombocitima	(37)
Sekundarna hemostaza					
Koagulacijska aktivnost plazme	Vanjski put zgrušavanja: PV	PPP ljudski	*4*. PVP-nanoAg i citrat-nanoAg 20nm *8*. Galat-nanoAg 24 nm	Bez učinka	(48) (4)

		PPP ljudski	nanoAg i Ag-STPP NP 70 nm	Prokoagulantno	(61)
	Unutarnji put zgrušavanja: APTT	PPP ljudski	PVP-nanoAg i citrat-nanoAg 20nm	Bez učinka	(48)
		PPP ljudski	*6*. nanoAg-PVP 16nm i aglomerati oko 71 nm *8*. Galat-nanoAg 24 nm	Antikoagulantno	(62) (4)
		PPP ljudski	nanoAg i Ag–STPP NPs 70 nm	Prokoagulantno	(61)
	Zadnji korak zajedničkog puta zgrušavanja: TV	PPP ljudski	PVP-nanoAg i citrate-nanoAg 20nm	Bez učinka	(48)
		PPP ljudski	nanoAg i Ag–STPP NPs 70 nm	Prokoagulantno	(61)
Biljezi aktivacije zgrušavanja plazme	ELISA: TAT	Puna krv, ljudska	nanoAg 10-15 nm	Prokoagulantno	(64)
nanoAg kao aktivator zgrušavanja plazme	koagulometrija	PPP ljudski	Galat-nanoAg 24 nm	Bez učinka	(4)
Globalna hemostaza					
Test generacije trombina u plazmi	TGT (fluorogeni ili kromogeni supstrat) i različiti aktivatori (vanjski ili unutarnji put)	*6*. PPP ljudski *9*. PRP ljudski	*6*. nanoAg-PVP 16 nm i aglomerati oko 71 nm *9*. nanoAg na površini katetera	Prokoagulantno	(62) (109)

Viskoelastična svojstva krvi tijekom zgrušavanja	Tromboelastografijs	PRP ljudski	14. POSS-PCU-nanoAg nanokompozit 11±6.75nm	Antikoagulantno	(110)
Zgrušavanje pune krvi	Vrijeme zgrušavanja	Puna krv, ljudska	Protein nanoAg 5–95 nm, (61–95 nm dominantne)	Antikoagulantno	(112)
Stvaranje fibrinskog ugruška	Vrijeme rekalcifikacije plazme	PPP ljudski	nanoAg i Ag–STPP NPs 70 nm	Prokoagulantno	(61)
Thromboliza/ Fibrinoliza	Liza ugruška pune krvi	Puna krv, ljudska	*7*.Protein nanoAg 5–95 nm *10*. WBX nanoAg 20-45 nm	Trombolitički	(112) (113)
	Liza fibrinske pločice	Fibrinska pločica	WBX nanoAg 20-45 nm	Fibrinolitički	(113)
Retrakcija ugruška	Fibrin-trombocitna retrakcija ugruška	WP ljudski	nanoAg 13-45 nm	Smanjena retrakcija ugruška	(95)



Slika 12.1. Citogrami preliminarnog ispitivanja aktivacije trombocita na opranim trombocitima. Izražaj biljega aktivacije trombocita određen je metodom protočne citometrije nakon izlaganja opranih trombocita različitim nanoAg vrstama. Negativna kontrola su trombociti tretirani s PBS-om, a pozitivna kontrola su trombociti tretirani s agonistom aktivacije trombocita heksapeptidnim aktivatorom receptora trombina (TRAP-6). (a) CD62P u negativnoj kontroli; (b) PAC-1 u negativnoj kontroli; (c) CD62P u pozitivnoj kontroli; (d) PAC-1 u pozitivnoj kontroli, (e) CD62P u trombocitima tretiranim s BSA-nanoAg-om; (f) PAC-1 u trombocitima tretiranim s BSA-nanoAg-om, (g) CD62P u trombocitima tretiranim s AOT-nanoAg-om; (h) PAC-1 u trombocitima tretiranim s AOT-nanoAg-om, (i) CD62P u trombocitima tretiranim s PVP-nanoAg-om; (j) PAC-1 u trombocitima tretiranim s PVP-nanoAg-om; (k) CD62P u trombocitima tretiranim s PLL-nanoAg-om; (l) PAC-1 u trombocitima tretiranim s PLL-nanoAg-om.