Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Ena Vrček

**OPTIMIZACIJA PRIPRAVE ZLATNIH NANOČESTICA ZA CILJANU ISPORUKU LIJEKA L-DOPE**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za farmakologiju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Petre Turčić i na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada pod neposrednim vodstvom Nikoline Kalčec, mag. app. chem., te je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

**POPIS KRATICA**

µe elektroforetska provodljivost

AAS  atomska apsorpcijska spektrometrija

Ad L-adamantin

Ad-AuNP sferične nanočestice zlata funkcionalizirane s L-adamantinom

AuNP  zlatne nanočestice

citAuNP sferične AuNP obložene citratom

COMT katehol-O-metiltransferaza

DDK  dopa dekarboksilaza

*d*H hidrodinamički promjer

DLS dinamičko raspršenje svjetlosti

*d*TEM promjer AuNP određen pomoću TEM-a

GF-AAS atomska apsorpcijska spektrometrija s grafitnom tehnikom

*K*b konstanta vezanja L-dope na različite AuNP

KMB  krvno-moždana barijera

*k*q konstanta brzine gašenja

*k*q konstanta brzine gašenja fluorescencije

*K*SV Stern-Volmerove konstante

LSPR  lokalizirana površinska plazmonska rezonancija

LT Lewyjeva tjelešca

*n* Hillov koeficijent

NP nanočestice

PDI  indeks polidisperznosti

PEG polietilen glikol

PEG-AuNP sferične AuNP stabilizirane PEG polimerom

PGM peptidoglikan

PGM-AuNP sferične AuNP funkcionalizirane PGM-om

R opća plinska konstanta

TEM transmisijska elektronska mikroskopija

ΔG promjena Gibbsove slobodne energije

ΔH promjena entalpije

ΔS promjena entropije

**SADRŽAJ RADA**

[1. UVOD 1](#_Toc75803599)

[1.1. PARKINSONOVA BOLEST 1](#_Toc75803600)

[1.2. TERAPIJA PARKINSONOVE BOLESTI 3](#_Toc75803601)

[1.3. ZLATNE NANOČESTICE 4](#_Toc75803602)

[1.4. METODE PRIPRAVE NANOČESTICA 7](#_Toc75803603)

[2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA 9](#_Toc75803604)

[3. MATERIJALI I METODE 10](#_Toc75803605)

[3.1. KEMIKALIJE I REAGENSI 10](#_Toc75803606)

[3.2. PRIBOR I OPREMA 10](#_Toc75803607)

[3.3. SINTEZA RAZLIČITIH AuNP 11](#_Toc75803608)

[3.4. ODREĐIVANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA PRIPRAVLJENIH AuNP 12](#_Toc75803609)

[3.4.1. ODREĐIVANJE UKUPNE KONCENTRACIJE Au U RAZLIČITIM AuNP 12](#_Toc75803610)

[3.4.2. OSLIKAVANJE RAZLIČITIH AuNP TRANSMISIJSKOM ELEKTRONSKOM MIKROSKOPIJOM 13](#_Toc75803611)

[3.4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE I SPECIFIČNE POVRŠINE AuNP 14](#_Toc75803612)

[3.4.4. ODREĐIVANJE HIDRODINAMIČKOG PROMJERA I DISTRIBUCIJE VELIČINA RAZLIČITIH AuNP 15](#_Toc75803613)

[3.4.5. ODREĐIVANJE ζ POTENCIJALA RAZLIČITIH AuNP 15](#_Toc75803614)

[3.5. ODREĐIVANJE VEZANJA L-DOPE NA RAZLIČITE AuNP BEZ I UZ PRISUSTVO ALBUMINA 16](#_Toc75803615)

[4. REZULTATI 20](#_Toc75803616)

[4.1. OPTIMIZACIJA SINTEZE I KARAKTERIZACIJA RAZLIČITIH AuNP 20](#_Toc75803617)

[4.2. VEZANJE L-DOPE NA RAZLIČITE AuNP 23](#_Toc75803618)

[4.3. UČINAK PRISUSTVA ALBUMINA NA VEZANJE L-DOPE NA RAZLIČITE AuNP 29](#_Toc75803619)

[5. RASPRAVA 33](#_Toc75803620)

[6. ZAKLJUČAK 35](#_Toc75803621)

[7. ZAHVALE 36](#_Toc75803622)

[8. POPIS LITERATURE 37](#_Toc75803623)

[9. SAŽETAK 41](#_Toc75803624)

[10. SUMMARY 43](#_Toc75803625)

# 1. UVOD

Neurodegenerativne bolesti su karakterizirane patološkim stanjima u središnjem živčanom sustavu koja dovode do progresivne degeneracije i/ili smrti živčanih stanica. Na taj način se javlja niz poremećaja koji utječu na razmišljanje, vješte pokrete, osjećaje, kognitivne funkcije i pamćenje. Primjeri neurodegenerativnih bolesti uključuju Parkinsonovu, Alzheimerovu i Huntingtonovu bolest. U današnje vrijeme neurodegenerativne bolesti su četvrti vodeći uzrok smrti u razvijenim zemljama svijeta nakon bolesti srca, raka i moždanog udara (1). Vrlo je mali broj lijekova uspješan u liječenju neurodegenerativnih bolesti, a terapijska učinkovitost uvelike je ograničena mnogim faktorima, među kojima je najveći izazov neučinkovit transport lijekova preko krvno-moždane barijere. Zbog toga je razvoj sustava za isporuku lijekova koji mogu učinkovito prelaziti preko te barijere od presudne važnosti u liječenju neurodegenerativnih bolesti. Taj se razvoj uvelike može unaprijediti primjenom nanotehnologije, a nanomaterijali se sve više razvijaju za ciljanu isporuku lijekova i gena zbog brojnih prednosti kao što su relativno visoki kapacitet nosača, kontrolirano otpuštanje lijeka, transport do ciljanih stanica i tkiva bez da se lijek razgradi na tom putu, farmakološka stabilnost, biorazgradivost te niska toksičnost. Uz to, nanomaterijali kao nosači lijekova mogu značajno poboljšati isporuku lijekova preko krvno-moždane barijere (2).

## 1.1. PARKINSONOVA BOLEST

Parkinsonovu bolest, drugu najčešću neurodegenerativnu bolest, karakterizira progresivni gubitak dopaminergičnih neurona unutar crne tvari (*substantia nigra pars compacta*) srednjeg mozga što uzrokuje masovno gubljenje dopamina u tom dijelu mozga.

Klinički simptomi se dijele na motoričke i nemotoričke. Motorički simptomi su tremor, ukočenost mišića, bradikinezija te posturalna nestabilnost; a u nemotoričke spadaju depresija, delirij, kognitivna oštećenja, poremećaj spavanja, demencija, bradikardija, sialoreja, smanjen osjet mirisa, umor te psihoza. Motorički simptomi nastaju tek kada oko 80% dopaminergičnih neurona u crnoj tvari propadne (4, 8).

Lijekovi pružaju pacijentima samo privremeno simptomatsko olakšanje, dok pristup njezi i liječenju uvelike ovisi o financijskim, profesionalnim i tehnološkim mogućnostima zdravstvenog sustava (5).

Pojavnost Parkinsonove bolesti ovisi o spolu pri čemu su muškarci su skloniji obolijevanju od žene, vjerojatno zbog neuroprotektivnog učinka estrogena. Pojavnost ovisi i o rasi i etničkoj pripadnosti, te je utvrđeno da je stopa učestalosti najviša među hispanoamerikancima, zatim među bijelcima, pa azijatima, dok je među crncima najmanja prevalencija. Razlike u pojavnosti ovise i o čimbenicima okoliša poput profesionalne izloženosti (pesticidi, teški metali) i pušenje cigareta, dijetalnim čimbenicima (unos antioksidanasa poput vitamina E, nezasićenih masnih kiselina, željeza itd.), genetskim čimbenicima poput gena za α-sinuklein (PARK1) i Parkin (PARK2) koji sudjeluju u metabolizmu dopamina i homocisteina, i sl. (6). Oštećeni metabolizam željeza uočen je u patogenezi Parkinsonove bolesti, bilo sporadične ili obiteljske. Nusproizvodi mitohondrija (peroksid i superoksid) mogu reagirati sa željezom generirajući štetne hidroksilne radikale koji uzrokuju dopaminergičnu staničnu smrt u crnoj tvari. Kronične studije na miševima koji su bili liječeni 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinom (MPTP) dovode u korelaciju razine željeza sa selektivnom degeneracijom dopamina kroz agregaciju lipofuscina i α-sinukleina, a to se događa jer MPTP iz kojeg nastaje 1-metil-4-fenilpiridinij (MPP+), preteča monoaminooksidaze-B, utječe na metabolizam u mitohondrijima uzrokujući nastanak slobodnih radikala (4).

Neuropatološko obilježje bolesti je prisutnost Lewyjevih tjelešaca (LT) u crnoj tvari, koja su zapravo citoplazmatske inkluzije koje se sastoje od fibrila, ubikvitina i α-sinukleina. Glavna komponenta LT-a, α-sinuklein, je mali protein koji u mozgu regulira promet sinaptičkih vezikula i oslobađanje neurotransmitora (4, 8). Prisutnost LT-a dovodi do iscrpljenja dopamina iz neurona zbog stalne inervacije dopaminskih neurona u globusu pallidusu.

Precizna dijagnoza igra važnu ulogu u preciznom upravljanju Parkinsonove bolesti. Trenutno se dijagnoza Parkinsonove bolesti postavlja na temelju različitih kliničkih simptoma parkinsonizma poput bradikinezije, tremora, posturalne neravnoteže, demencije, poremećaja spavanja, sialoreje, sindroma suhih očiju i poremećaja mirisa, umora te promjena tjelesne težine. Prisutnost LT u crnoj tvari, hipotalamusu, bazalnim jezgrama i kranijalnom motornom živcu i njegovim jezgrama važan je biomarker za dijagnozu Parkinsonove bolesti. Identifikacija genetskih mutacija otkrila je da su α-sinuklein, NURR1, LRRK2 i UCH-L1 odgovorni za autosomno-dominantno nasljeđivanje, dok su DJ1, Parkin i PINK1 odgovorni za autosomno-recesivno nasljeđivanje. CT mozga, MRI i PET (DOPA s oznakom fluor-18), SPECT (*single-photon emission computed tomography*) i transkranijalno ultrazvučno slikanje vrijedne su tehnike za diferencijaciju i dijagnozu Parkinsonove bolesti od ostalih neurodegenerativnih poremećaja (4).

## 1.2. TERAPIJA PARKINSONOVE BOLESTI

Za liječenje Parkinsonove bolesti uglavnom se koriste lijekovi koji povećavaju razinu dopamina ili oponašaju njegove učinke, ali niti jedan nije premašio kliničku učinkovitost L-dope koja je biološki prekursor dopamina, a djeluje protiv motoričkih simptoma obnavljanjem nedostatka nigrostrijatalne razine dopamina. Od uvođenja ovog lijeka u terapiju Parkinsonove bolesti krajem 1960-ih, ovaj lijek je i dalje zlatni standard s kojim se uspoređuju sve ostale terapije. Međutim, dugotrajno liječenje L-dopom dovodi do raznih nuspojava poput mučnine, povraćanja te diskinezije (oblik motoričke disfunkcije karakteriziran nehotičnim i neritmičnim korejskim ili koreo-distoničnim pokretima) koja se pripisuje diskontinuiranoj isporuci L-dope u mozak. Uz to, L-dopa ima kratak poluživot (oko 60 minuta) zbog svoje brze i opsežne dekarboksilacije u dopamin i metilacije u 3-O-metildopu pomoću dopa dekarboksilaze (DDK) i katehol-O-metiltransferaze (COMT) (6, 7). Stoga se u kliničkoj praksi L-dopa primjenjuje zajedno s karbidopom koja je inhibitor DDK. Karbidopa sama ne prelazi krvno-moždanu barijeru (KMB), ali smanjuje pretvorbu L-dope u dopamin u perifernom živčanom sustavu i time povećava njegovu isporuku u mozak. Smanjenje pulsirajuće stimulacije dopaminergičnih neurona će smanjiti rizik od diskinezije izazvane L-dopom, a jedna od mogućih pristupa jest razvoj funkcionaliziranih nano-nosača u svrhu produženog i kontroliranog oslobađanja terapijski aktivnih tvari (4).

Farmakoterapija Parkinsonove bolesti, uz L-dopu, uključuje liječenje lijekovima poput agonista receptora dopamina, inhibitora katehol-O-metiltransferaze, antagonista monoaminooksidaze B (MAO-B) i glutamata te amantadina. COMT inhibitori (npr.entakapon) su neučinkoviti kada se primjenjuju samostalno, stoga se primjenjuju kao pomoćna sredstva s L-dopom i karbidopom. Rani simptomi Parkinsonove bolesti liječe se MAO-B inhibitorima poput selegilina ili razagilina. Agonisti dopamina, kao što su pramipeksol, ropinirol i rotigotin, koriste se kod starijih od 60 godina. Međutim, liječenje agonistima dopamina dovodi do nuspojava poput zbunjenosti, halucinacija i psihoza. Glutamat, ekscitatorni neurotransmiter u mozgu, ima značajnu ulogu u patogenezi Parkinsonove bolesti; stoga se antagonisti glutamatnih receptora (podtipovi glutamatnih receptora poput N-metil-D-asparaginske kiseline (NMDA) i α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline (AMPA)) mogu istodobno davati s L-dopom za ublažavanje diskinezije i ostalih motoričkih simptoma. Međutim, antagonisti glutamatnih receptora povezani su s različitim nuspojavama poput umora i gastrointestinalnih simptoma. Različiti antioksidansi (koenzim Q10 i N-acetil-cistein) koji uklanjaju reaktivne kisikove vrste mogu imati potencijal u prevenciji oksidacijskog stresa i dopaminergičke neuronske degeneracije u nigrostrijatalnom putu (4).

Problemi u liječenju Parkinsonove bolesti su brojni, a ona osnovna ograničenja i problemi su prikazani na Slici 1.



**Slika 1.** Ograničenja i problemi u liječenju Parkinsonove bolesti.

Farmakoterapijski interes u liječenju Parkinsonove bolesti usmjeren je na uvođenje novih pristupa za dobivanje kontinuirane dopaminergične stimulacije, dugoročne sigurnosti i podnošljivosti uz istovremeno smanjivanje pojave i ozbiljnosti motoričkih fluktuacija i diskinezija povezanih s L-dopom (1). Ovakav terapijski učinak može se postići primjenom oralnih agonista dopamina s dugim poluživotom, transdermalnim i potkožnim davanjem ili primjenom nanonosača. Da bi se omogućilo da veće koncentracije L-dope dođu do mozga i da bi se smanjile periferne nuspojave, terapijski pristup može biti istodobna primjena L-dope, karbidope i entakapona, standardne kombinacije L-dopa/karbidopa, L-dopa/benzerazid, L-dopa/entakapon, L-dopa/tolkapon ili različite formulacije s dugotrajnim djelovanjem koje kontrolirano oslobađaju L-dopu (1,7).

## 1.3. ZLATNE NANOČESTICE

Nanotehnologija i nanoznanost su interdisciplinarna područja koja uključuju razvoj nanomaterijala. Nanoznanost je načelno usmjerena prema manipulaciji materijalima na atomskoj ili subatomskoj razini dok nanotehnologija želi iskoristiti takve manipulirane materijale za projektiranje, karakterizaciju i proizvodnju poboljšane strukture, uređaja i sustava s kontroliranom veličinom (1-100 nm) i oblikom za razne primjene. Nanotehnologija je pronašla brojne primjene u biomedicinskim znanostima (nanomedicina). U svrhu nanomedicine, definicija nanomaterijala nije ograničena samo na one veličine ispod 100 nm, već se odnosi na različite materijale submikronske veličine. Ključni aspekt je iskorištavanje promjene svojstava submikronskih materijala ovisno o veličini koja se može iskoristiti za promijenjene stanične odgovore.

Nanostrukture se primijenjuju za dijagnozu bolesti, kao uređaji, za regeneraciju tkiva, kao i za isporuku lijekova i terapiju. Nanotehnologija koja uključuje manipulaciju različitim sustavima u nanorazmjerima može imati potencijal u liječenju Parkinsonove bolesti. U nastavku je navedeno nekoliko prednosti nanotehnoloških platformi u liječenju Parkinsonove bolesti:

1. Nanotehnologija može pomoći u razvoju senzora koji su sposobni osjetiti razne biomarkere pri niskim koncentracijama i u prisutnosti drugih analita te pomoći u razvoju pristupačnijih dijagnostičkih uređaja.

2. Platforme za isporuku lijekova temeljene na nanotehnologiji igraju važnu ulogu u postizanju bolje terapijske učinkovitosti i povećanju bioraspoloživosti širom KMB. Različite platforme poput aktivnog ciljanja korištenjem endo- ili transcitoze posredovanih receptorima, nano-nosačima koji reagiraju na podražaje i pasivnim ciljanjem posredovanim makrofazima, nekoliko su pristupa koji mogu poboljšati liječenje PB.

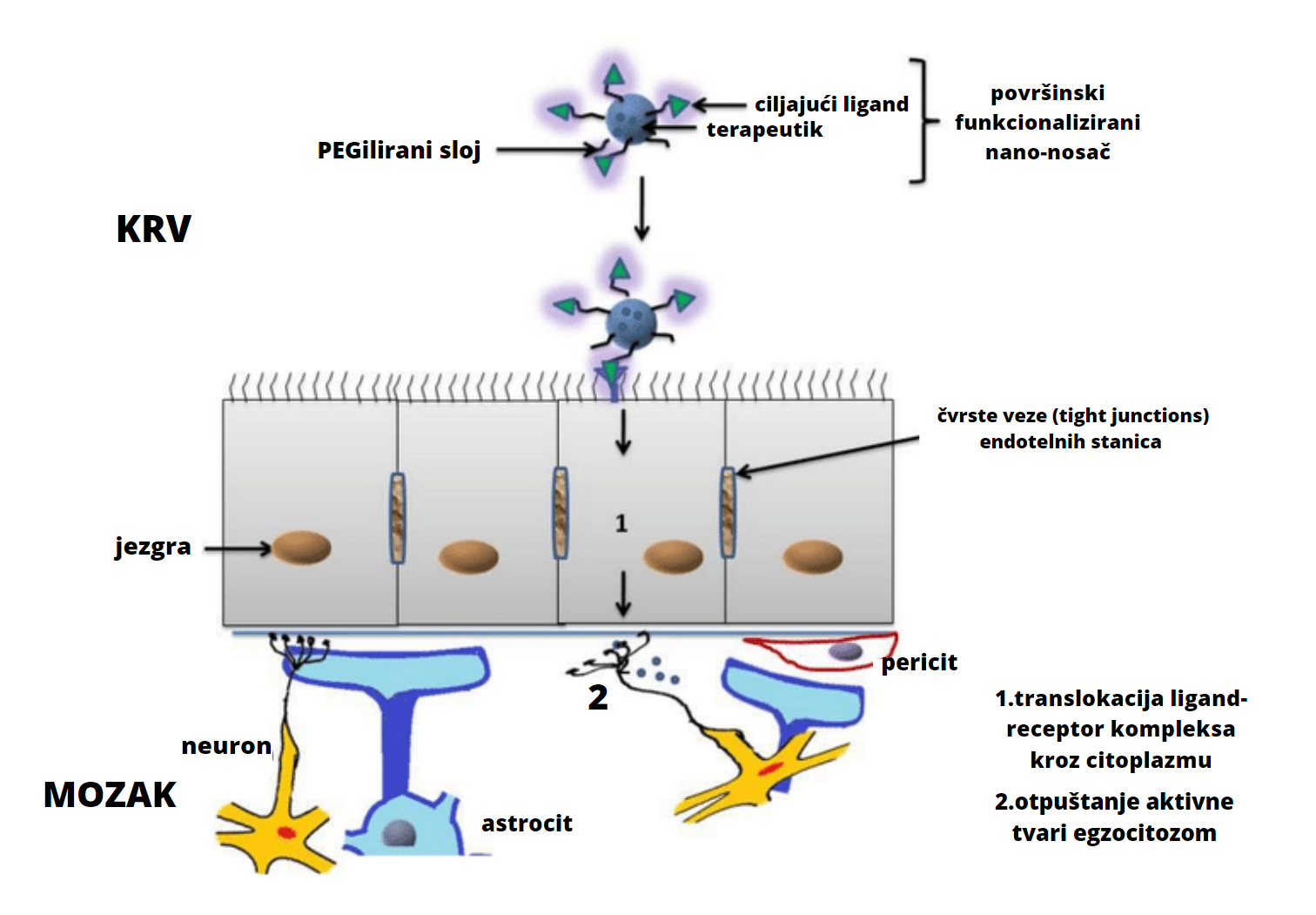
3. Nanotehnologija također može poboljšati neuronske prostetičke uređaje za duboku stimulaciju mozga boljim kontaktom s mozgom.

4. Nanotehnologija može pomoći u poboljšanju preciznosti u neurokirurgiji kroz preciznost laserskih aksotomija na nano razini.

5. Napokon, nanotehnologija se može koristiti za razvoj platformi za učinkovitu terapiju matičnim stanicama u tkivnom inženjerstvu.

Aktivno ciljanje temeljeno na nanotehnologiji igra presudnu ulogu u usmjeravanju neuroterapeutika na ciljno mjesto određenim putovima. Nanočestice mogu biti površinski funkcionalizirane specifičnim ligandima koji povećavaju bioraspoloživost lijeka vezanog u takvom kompleksu za dolazak u mozak. Ligand se na površini nano-nosača veže za receptore na površini KMB čime se potiče endocitoza takvog kompleksa, nakon čega slijedi translokacija kroz endotelnu membranu i egzocitoza neuroterapeutika (4). Taj proces prikazan je na Slici 2.

Nanotehnologija predstavlja golemi potencijal za unapređenje liječenja Parkinsonove bolesti dizajnom i primjenom nanočestica koje uz ulogu nano-nosača mogu imati i antioksidativnu i neuroprotektivnu aktivnost (1, 6-8). Nanočestice (NP, od eng. *nanoparticles*) mogu unaprijediti regeneraciju živaca, a zbog svojih malih veličina i fizikalno-kemijskih svojstava lako prodiru kroz KMB. Tako je pokazano da NP poboljšavaju diferencijaciju, regeneraciju i preživljavanje živčanih stanica, a također reguliraju električne aktivnosti. Svojstva električne provodljivosti metalnih NP i njihov potencijal reakcije s neuronskim stanicama mogu utjecati na električnu aktivnost neurona (9). U tom je smislu razvijeno nekoliko vrsta metalnih NP-a, uključujući NP zlata (AuNP), cinkovog oksida, manganovog ferita i ugljikove nanocijevi (9). Međutim, NP srebra i željezovog oksida su toksične za stanice neurona i nisu prikladne za ovakve primjene.



**Slika 2.** Korištenje funkcionaliziranih nano-nosača za ciljanu isporuku lijekova u mozak (4).

Zlato se u ljekovite svrhe koristilo od antike, posebno u Indiji i Kini, gdje je bilo povezano s dugovječnošću i plodnošću. I danas se koristi u Indiji u nekim ayurvedskim pripravcima. Tijekom srednjeg i modernog doba korišten je kod neuroloških oboljenja i sifilisa, a u 20. stoljeću se koristilo za tuberkulozu i reumatske bolesti.

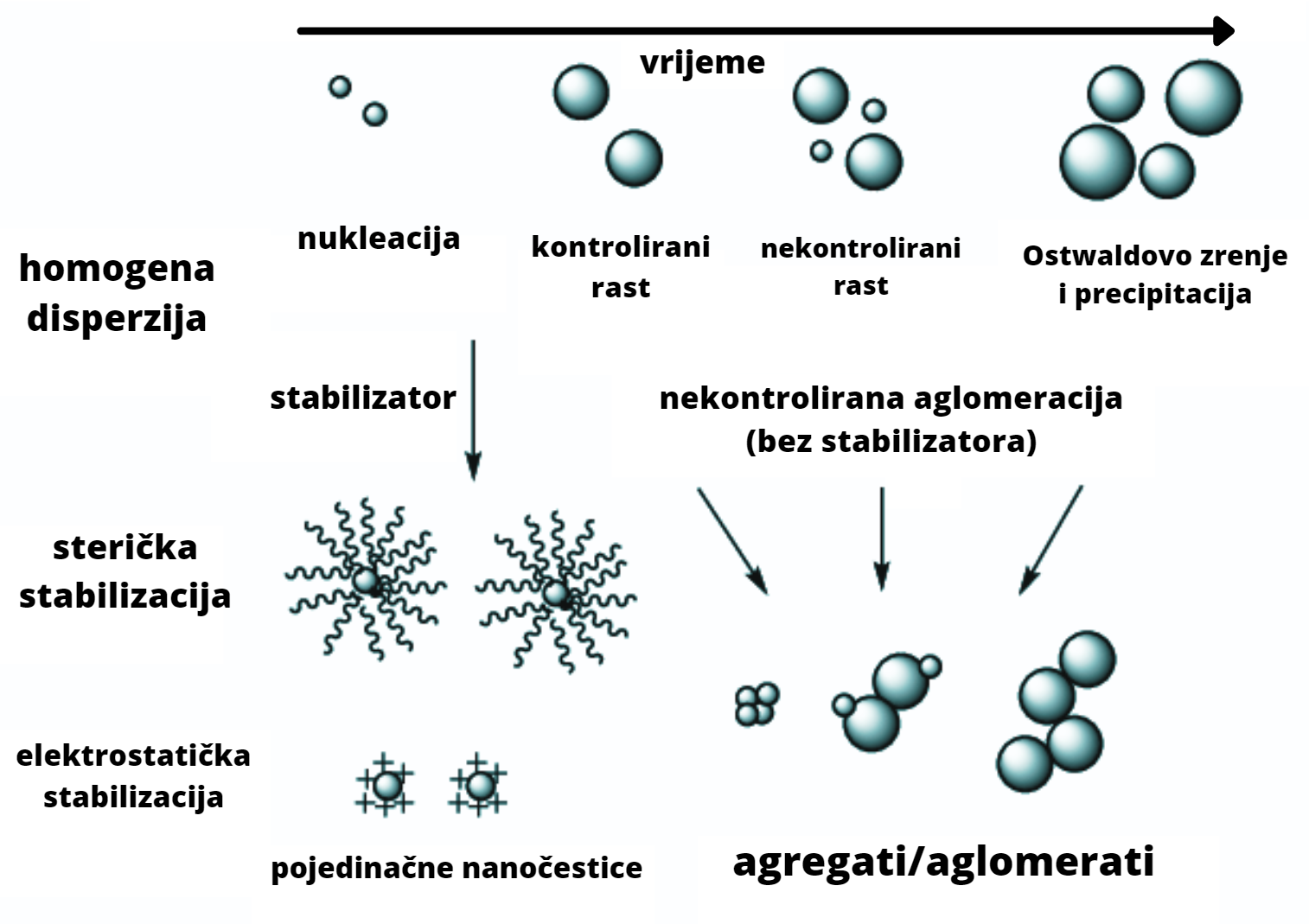
Zlato u obliku nanočestica zlata se sastoji od jezgre koja sadrži nakupine atomskog zlata okružene zaštitnim vanjskim slojem organskih liganada. Među metalnim nanočesticama AuNP su se pokazale kao najsigurnija i najmanje toksična vrsta metalnih NP te imaju iznimna optička, plazmonska i magnetska svojstva te veliku površinu. Jednostavnost kojom se mogu modificirati i mogućnost dizajna nano-nosača čine ih idealnim za dostavu lijekova. Sinteza AuNP kontrolirane veličine, oblika, koloidne stabilnosti i dodavanje multifunkcionalnih monoslojeva omogućeni su već nekoliko godina (10). Nadalje, upotreba reakcija zamjene liganda omogućava da ovi monoslojevi na površini AuNP sadrže više ciljnih tvari i/ili lijekova kao što su male molekule, peptidi, proteini, antitijela ili oligonukleotidi (10, 11). AuNP imaju široku primjenu u biomedicini, uključujući dijagnostičku primjenu, zbog posebnih svojstava. Nedavna istraživanja pokazala su da AuNP mogu imati i svojstva koja su povoljna za korisne kliničke učinke, iako je molekularni mehanizam za to nepoznat i zahtjeva daljnja istraživanja. Zlatne nanočestice su privlačan sustav za isporuku lijekova u mozak jer su biokompatibilne, a njihove površine se lako funkcionaliziraju omogućujući širok raspon strategija ciljanja i isporuke lijekova. Manjak specifičnosti AuNP za mozak može dovesti do neželjenih nuspojava u perifernim organima pa se zbog toga njihova površina funkcionalizira sa specifičnim ciljajućim ligandima kako bi se izbjegle te nuspojave i omogućio prolaz kroz KMB (11).

Prilikom dizajna nanonosača treba voditi i računa o tome da svaka vrsta NP kada je izložena biološkom sustavu stupa u interakcije s biomolekulama. Tako se proteini trenutno adsorbiraju na nanopovršinu, stvarajući proteinsku koronu, što može značajno utjecati i na farmakokinetiku i farmakodinamiku takvog nanonosača (12). Interakcija sa serumskim proteinima ključni je čimbenik koji se treba ispitati prilikom dizajna i razvoja nanonosača.

## 1.4. METODE PRIPRAVE NANOČESTICA

Napredak nanotehnologije omogućio je pripravljanje NP različitih oblika, veličina i površinskih svojstava. U literaturi je opisan velik broj metoda priprave, a mogu se podijeliti na fizikalne i na kemijske metode (13). Fizikalne metode uglavnom se temelje se na stvaranju izoliranih NP iz većih komada materijala koristeći tehnike poput mljevenja, rezanja, ponavljajućeg sudaranja ili fotolitografije. Problem ovih tehnika je prisutnost površinskih nedostataka na nanostrukturama koje značajno utječu na konačna svojstva nanomaterijala. Kemijske metode se obično odvijaju u otopinama u kojima se materijal prevodi od atomske, ionske ili molekulske razine procesom nukleacije i rasta do NP. Kod ovih tehnika potrebno je koristiti stabilizator kao što su surfaktanti, polielektroliti te polimeri, koji će prvenstveno stabilizirati nastale NP te omogućiti kontrolu veličine i oblika nastalih čestica. Glavni nedostatak kemijskih tehnika je nemogućnost masovne proizvodnje za industrijsku primjenu i akumulacija zaostalih kemikalija u suspenzijama NP. Pristupi sintezi također se mogu klasificirati kao “zeleni” i “ne-zeleni” obzirom na izbor ekološki prihvatljivih reagenasa poput šećera i biljnih ekstrakata. Mana “zelenog” pristupa je slabija kontrola morfologije stvorenih NP u odnosu na “ne-zelene” metode.

Nastajanje NP odvija se u tri faze: 1) nukleacija, 2) evolucija jezgri u klice i 3) rast klica u nanokristale kako je prikazano na Slici 3 (13,14).



**Slika 3.** Rast i stabilizacija nanočestica (15).

Nukleacija predstavlja prvi korak pri čemu polaganim porastom koncentracije atoma dolazi se do točke superzasićenja gdje se atomi počinju agregirati u male nakupine (jezgre) procesom samonukleacije. Jednom formirane jezgre zatim ubrzano rastu i koncentracija metalnih atoma u otopini pada. Jednom kada je nakupina čestica narasla do kritične veličine, strukturne fluktuacije postaju energetski nepovoljne i nakupina ostaje u dobro definiranoj strukturi koja se naziva klica. Stoga je za dobivanje NP točno određenog oblika ključno osigurati strogu kontrolu populacije klica različitim unutrašnjim strukturama. Osim rasta putem dodavanja pojedinačnih atoma, jezgre i NP mogu se spajati u veće čestice aglomeracijom (Slika 3). Aglomeracija NP je energetski favorizirana zbog smanjenja površine te zasićenja veznih i koordinacijskih mjesta. Stoga se površine nastalih čestica moraju odmah elektrostatski ili sterički stabilizirati kako bi se NP zaštitile od daljnjeg rasta i aglomeracije. Elektrostatska stabilizacija postiže se adsorpcijom iona na površinu čestice, a sterička stabilizacija se stvara adsorpcijom dugolančanih organskih molekula. Obje opcije su standardne metode u koloidnoj kemiji (14).

Lijekovi ili druge molekule mogu se vezati za NP i mogu se ciljati pasivno ili aktivno. U pasivnom ciljanju, lako nakupljanje NP u ciljnom tkivu ili organu postiže se efektom pojačanog prožimanja i zadržavanja, dok su u aktivnom ciljanju NP konjugirane s ligandima kao što su monoklonska antitijela ili peptidi. Ti ligandi zatim stupaju u interakciju sa svojim receptorima (specifičnim biomarkerima) na stanicama tumora, što omogućava endocitozu i isporuku lijeka (13).

# 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Zlatne nanočestice predstavljaju inovativan terapijski pristup za neurodegenerativne bolesti jer su biokompatibilne, stabilne u biološkim sustavima, lako se funkcionaliziraju i imaju sposobnost prodiranja kroz KMB te omogućuju širok raspon razvoja strategija za ciljanu isporuku lijekova u mozak.

Glavni cilj ovog rada bio je istražiti učinkovitu strategiju za razvoj multifunkcionalnih nanosustava za isporuku L-dope primjenom AuNP. U ranijim istraživanjima već je opisana funkcionalizacija AuNP s kateholima i L-dopom za koje je potvrđena stabilnost u biološkim tekućinama i sposobnost prolaska kroz KMB u in vitro uvjetima, a najčešće se za stabilizaciju AuNP koristi polietilen glikol (PEG) (9, 11). PEG je hidrofilni polimer kojeg je američka Uprava za hranu i lijekove (FDA, od engl. *Food and Drug Administration*) odobrila za korištenje za isporuku lijekova i stanica u mozak, kao i za regeneraciju živčanog tkiva jer je dokazano da ne izaziva upale i štetan učinak na mikrogliju u mozgu (18). PEG se može lako integrirati u membrane različitih vrsta stanica, a pokazano je i da PEG uzrokuje ograničavajuću i brzu fuziju oštećenog aksona te također prekid mijelinizacije aksona u in vitro uvjetima (19). Hidrofobna svojstva PEG-a također povećavaju biokompatibilnost i stabilnost, te inhibiraju agregaciju AuNP-a (11). U ovom istraživanju ispitana su dva inovativna pristupa korištenjem L-adamantina (Ad) i monomera peptidoglikana (PGM) kao stabilizacijskih tvari za pripravu AuNP vrsta koje će učinkovitije vezati L-dopu. Jedinstvena strukturna i kemijska svojstva Ad pružaju izuzetne mogućnosti u dizajniranju različitih sustava nosača za isporuku lijekova, ali su važna i svojstva biokompatibilnosti i netoksičnosti, kao i niska cijena i dostupnost. Derivati Ad pokazuju važnost u kontekstu neurodegenerativnih bolesti, posebno Parkinsonove bolesti, zbog njihove lipofilnosti i svojstava koja povećavaju prodiranje kroz KMB (20). S druge strane, PGM se također odlikuje biokompatibilnošću i stabilnošću u biološkim sustavima, a strukturno može značajno povećati učinkovitost vezanja lijeka na nanopovršinu (21). Pripravljene sferične AuNP funkcionalizirane s L-adamantinom (Ad-AuNP) i PGM-om (PGM-AuNP) uspoređene su s ranije istraživanim sferičnim AuNP stabiliziranim PEG polimerom (PEG-AuNP).

Da bi se postigao glavni cilj ovog istraživanja, definirani su sljedeći specifični ciljevi:

• Optimizacija sinteze različitih AuNP stabilizacijom pomoću PEG-a, Ad-a i PGM-a;

• Fizikalno-kemijska karakterizacija pripravljenih AuNP;

• Određivanje mehanizma vezanja L-dope na različito funkcionalizirane AuNP primjenom metode fluorescentnog gašenja;

• Procjena učinka serumskog albumina na vezanje L-dope na različito funkcionalizirane AuNP.

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. KEMIKALIJE I REAGENSI

U izradi ovog rada korištene su sljedeće kemikalije:

* vodikov tetrakloroaurat trihidrat (HAuCl4 x 3H2O), (Sigma-Aldrich Chemie, Njemačka)
* natrijev dodecil sulfat (SDS), (Sigma-Aldrich Chemie, Njemačka)
* L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-dopa), (Sigma-Aldrich Chemie, Njemačka)
* goveđi serumski albumin (kataloški broj A-7906), (Sigma-Aldrich Chemie, Njemačka)
* metoksi-PEG (Mr = 5000), (Sigma-Aldrich Chemie, Njemačka)
* octena kiselina (Sigma-Aldrich Chemie, Njemačka)
* natrijev borohidrid (NaBH4), (Alfa Aesar, Njemačka)
* natrijev citrat dihidrat (Alfa Aesar, Njemačka)
* natrijev hidroksid (NaOH), (Kemika, Hrvatska)
* Ad (od prof.dr.sc. Ruže Frkanec iz Centra za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu)
* PGM (od prof.dr.sc. Ruže Frkanec iz Centra za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu)

## 3.2. PRIBOR I OPREMA

U izradi ovog rada korišten je sljedeći pribor i oprema:

* Za pripravu AuNP - staklene okrugle tikvice s okruglim dnom i ubrušenim čepom volumena od 50 mL, pipete različitih volumena, metalni tronožni stalak, stezaljke za podešavanje, aluminijska folija, magnetska mješalica IKA RTC (IKA, Staufen, Njemačka), ultracentrifuga tip 5810R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Prije upotrebe, sav stakleni pribor je očišćen s 10% (v/v) HNO3 (Merck Suprapur, Darmstadt, Njemačka) i ispran ultračistom vodom.
* Za određivanje hidrodinamičkog promjera i zeta () potencijala AuNP - kivete od polistirena za jednokratnu upotrebu minimalnog volumena 1 ml, štrcaljka od 1 ml, najlonski filtri veličine pora 0,22 µm, i pipete različitih volumena Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical Ltd).
* Za određivanje ukupne količine Au u pripravljenim AuNP – plastične kivete za jednokratnu upotrebu ukupnog volumena od 1 mL, mikropipete različitih volumena, nastavci za mikropipete, atomski apsorpcijski spektrometar AAnalyst 600 (Perkin Elmer, Shelton, SAD) sa Zeemanovom korekcijom te HDL lampa za detekciju Au na valnoj duljini apsorbirane svjetlosti od 268 nm.
* Za oslikavanje AuNP - bakrena mrežica presvučena Formvar® membranom, pipeta (10 - 100 µL), filter papir, Petrijeva zdjelica te transmisijski elektronski mikroskop (TEM) 902A (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Njemačka).
* Za određivanje vezanja L-dope na različite AuNP bez i uz prisustvo albumina - epruvete od 2 ml (Eppendorf, Njemačka), mikropipete različitih volumena, nastavci za mikropipete, kvarcna kiveta za mjerenje fluorescencije duljine optičkog puta od 10 mm te fluorescentni spektrofotometar Cary Eclipse (Agilent, Santa Clara, Kalifornija, SAD).

## 3.3. SINTEZA RAZLIČITIH AuNP

Za pripravu sferičnih AuNP stabiliziranih PEG polimerom (PEG-AuNP), bilo je najprije potrebno sintetizirati male sferične AuNP obložene citratom (citAuNP). U tu je svrhu upotrijebljena ranije opisana metoda redukcije citrata (22) uz određene promjene. Masa od 79,5 mg HAuCl4 x 3H2O otopljena je u 183 ml ultračiste vode i zagrijavana uz stalno miješanje i refluks. Kad je otopina proključala, dodano je 5 ml 164 mM natrijevog citrata dihidrata. Smjesa je ključala 30 min dok se nije pojavila vinsko crvena boja, nakon čega je zagrijavanje zaustavljeno, smjesa se ohladila i čuvala pri 4 °C u mraku.

Priprava PEG-AuNP provedena je primjenom ranije opisanog postupka (23) na način da je u ukupnom volumenu od 50 mL pomiješano 10 nM citAuNP (pripravljenih kako je opisano gore), 0,028% SDS-a, 52 M PEG polimera i 25 mM NaOH. Smjesa je miješana na IKA magnetnoj mješalici 16 sati pri sobnoj temperaturi. Suvišak PEG polimera uklonjen je centrifugiranjem reakcijske smjese pri 14 000 okretaja/min tijekom 30 minuta na 4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant je odbačen, a talog PEG-AuNP je resuspendiran u ultračistoj vodi. Ovaj postupak pranja ponovljen je tri puta.

Sinteza sferičnih AuNP funkcionaliziranih s Ad (Ad-AuNP) provedena je miješanjem HAuCl4 x 3H2O, NaOH, Ad i NaBH4 u određenim omjerima na magnetnoj mješalici. Nakon dodavanja NaBH4, boja smjese prešla je iz blijedo žute u vinsko crvenu. Smjesa se još miješala na sobnoj temperaturi 90 minuta, a dobivena suspenzija Ad-AuNP se centrifugirala dva puta pri 8 000 okretaja/min tijekom 10 minuta. Dobiveni talog Ad-AuNP je resuspendiran u ultračistoj vodi i pohranjen u mraku na 4 °C.

Sferične AuNP funkcionalizirane PGM-om (PGM-AuNP) pripravljene su redukcijom HAuCl4 x 3H2O s NaBH4 u prisutnosti PGM-a u ultračistoj vodi uz konstantno miješanje na magnetskoj mješalici. Nastanak AuNP bio je vidljiv promijenom boje reakcijske smjese iz blijedo žute u tamnoljubičastu. Nakon što se smjesa 20 minuta miješala na sobnoj temperaturi, dobiveni PGM-AuNP se pročistio centrifugiranjem na 7 000 okretaja/min tijekom 10 minuta u 2 ciklusa. Dobiveni talog PGM-AuNP je resuspendiran u ultračistoj vodi i pohranjen u mraku na 4 °C.

## 3.4. ODREĐIVANJE FIZIKALNO-KEMIJSKIH SVOJSTAVA PRIPRAVLJENIH AuNP

Sve pripravljene AuNP su prije daljnjih istraživanja karakterizirane primjenom metoda koje su opisane u Tablici 1.

**Tablica 1.** Instrumentalne metode fizikalno-kemijske karakterizacije AuNP.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Svojstvo AuNP** | **Analitička tehnika** | | **Kratki analitički opis** |
| **Oblik i struktura** | TEM (od engl. *transmission electron microscopy*) | Oslikavanje strukture | |
| **Veličina** | DLS (od engl. *dynamic light scattering*) | Određivanje promjene i raspodjele hidrodinamičkog promjera (*d*H) | |
| TEM | Određivanje primarne veličine (*d*TEM) | |
| **Naboj** | ELS (od engl. *electrophoretic light scattering*) | Određivanje  potencijala | |
| **Fluorescentna svojstva** | Spektrofluorimetrija | Određivanje fluorescencije | |
| **Sastav** | Atomska apsorpcijska spektroskopija | Određivanje elementarnog sastava AgNP | |

### 3.4.1. ODREĐIVANJE UKUPNE KONCENTRACIJE Au U RAZLIČITIM AuNP

Ukupna koncentracija Au u pripravljenim AuNP određena je atomskom apsorpcijskom spektrometrijom s grafitnom tehnikom (GF-AAS, od engl. *graphite furnace atomic absorption spectroscopy*) na instrumentu AAnalyst 600 (Perkin Elmer, Shelton, SAD) sa Zeemanovom korekcijom. Prije analize suspenzije AuNP su razrijeđene u 1% (v/v) HNO3 na koncentraciju koja je bila u rasponu kalibracijskog pravca i ukupnom volumenu od 1 mL. Korištena je HDL lampa za detekciju Au, na valnoj duljini apsorbirane svjetlosti od 268 nm. Kalibracija se provodila upotrebom standardnih otopina Au (1 000 mg/L u 5% HNO3, Merck, Darmstadt, Njemačka) u koncentracijskom rasponu od 10 do 500 µg/L za Au.

Atomska apsorpcijska spektroskopija (engl. *atomic absorption spectroscopy*, AAS) prihvaćena je kao standardna metoda za analizu metalnih i nemetalnih elemenata. Metoda pruža visoku analitičku osjetljivost i specifičnost, a temelji se na pretvorbi molekula analita u slobodne atome osnovne energetske razine metodom atomizacije, te na apsorpciji zračenja dobivenih slobodnih atoma. Količina apsorbiranog zračenja se primjenom Beer-Lambertova zakona dovodi u linearni odnos s koncentracijom (24). U ovom istraživanju korištena je metoda atomizacije na grafitnoj peći. Vrlo uski raspon valnih duljina koje apsorbiraju atomi, postiže se primjenom katodnih lampi koje sadrže isti element koji se analizira. Primjena Zeemanove korekcije dodatno eliminira interferencije, a temelji se na principu da se atomske linije analita mogu podijeliti u degenerirane spektralne linije različite polarizacije u primijenjenom magnetskom polju (24).

### 3.4.2. OSLIKAVANJE RAZLIČITIH AuNP TRANSMISIJSKOM ELEKTRONSKOM MIKROSKOPIJOM

Oslikavanje pripravljenih AuNP provedeno je transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM) na uređaju TEM 902A (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Njemačka), a dobivene slike su omogućile procjenu oblika i primarne veličine AuNP. Uzorci za oslikavanje pripremljeni su na način da je pojedina suspenzija AuNP razrijeđena u ultračistoj vodi na koncentraciju od 30 mg Au/L. Oko 10 L tako razrijeđene suspenzije naneseno je na bakrenu mrežicu obloženu Formavar® membranom te osušeno na zraku pri sobnoj temperaturi. Nakon sušenja uzorci su se snimali na TEM uređaju koji je radio u svijetlom polju pri naponu ubrzanja od 80 kV, a slike su snimljene kamerom Canon PowerShot S50 spojenom na mikroskop. Primarna veličina određena je iz površine presjeka AuNP te je pretvorena u promjer za NP korištenjem programa ImageJ. Primarne NP razlikovale su se od agregata ručnim praćenjem. Ukupno je analizirano najmanje 100 AuNP jedne vrste.

TEM metoda se temelji na snimanju uzorka primjenom zrake elektrona visoke energije, što omogućuje puno veću rezoluciju u odnosu na svjetlosni mikroskop. Mikroskop se sastoji od cilindrične kolone na čijem vrhu se nalazi volframov filament, koji emitira elektrone malih valnih duljina na visini od 2 metra. Snop elektrona fokusira se korištenjem magnetskih zavojnica, a slika se formira prolaskom elektrona kroz tanki transparentni uzorak, uvećava i fokusira na leću objektiva. Cijeli sustav se nalazi u vakuumu da bi se izbjegli sudari elektrona s molekulama zraka. Elektroni se dodatno ubrzavaju naponom anode. Uzorak koji se detektira korištenjem ove metode mora biti transparentan za elektrone. Dio elektrona se prilikom sudara s uzorkom rasprši, a preostali neraspršeni elektroni čine elektronsku sliku uzorka. Mjesta na slici gdje je prošlo manje elektrona prikazana su tamnije (kao što su to AuNP), dok su okolni dijelovi slike prikazani kao svijetlo polje (engl. *bright field*) (25).

### 3.4.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE I SPECIFIČNE POVRŠINE AuNP

Podaci dobiveni za masene koncetracije Au u dobivenim AuNP primjenom GF-AAS metode i za primarne veličine AuNP TEM metodom korišteni su za izračunavanje molarne koncentracije AuNP (26) prema jednadžbi:

(1)

gdje je [Au] molarna koncentracija Au dobivena GF-AAS mjerenjima kako je gore opisano, Ar je atomska masa Au (196,97 g/mol), *m* predstavlja masu u gramima jednog mola AuNP i *N*A je Avogadrov broj (6,022 x 1023 mol-1).

Masa jedne AuNP dobivena je iz jednadžbe :

(2)

gdje je *ρ* gustoća Au (1,93 x 10-20 g/nm3), a *V* je volumen jedne AuNP.

Volumen se za AuNP računao na temelju vrijednosti primarne veličine određene iz TEM slika:

(3)

gdje je *r* radijus AuNP izračunat kao polovica promjera AuNP dobivenog iz TEM slika (*d*TEM).

Specifična površina (engl, *specific surface area*, *SSA*) izračunata je dijeljenjem površine jedne AuNP s masom jedne AuNP prema sljedećoj jednadžbi:

(4)

Površina jedne AuNP izračunata je na temelju jednadžbe za kuglu:

(5)

### 3.4.4. ODREĐIVANJE HIDRODINAMIČKOG PROMJERA I DISTRIBUCIJE VELIČINA RAZLIČITIH AuNP

Metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) se koristi za određivanje raspodjele veličina NP u uzorku temeljem promjene intenziteta raspršene svjetlosti (27). Osnovno načelo je osvjetljenje uzorka laserskom zrakom, pri čemu čestice raspršuju svjetlost te se dobiva informacija o njihovom kretanju. NP suspendirane u mediju se neprestano gibaju tzv. Brownovim gibanjem koje je definirano kao nasumično gibanje čestica do kojeg dolazi zbog sudaranja s molekulama otapala. Brownovo gibanje čestica ili molekula u suspenziji uzrokuje raspršenje laserskog svjetla različitim intenzitetom. Što je NP veća, to je njeno gibanje sporije, suprotno, manje NP su ubrzane molekulama otapala te se kreću brže u odnosu na čestice većih veličina. Analizom promjena intenziteta raspršene svjetlosti računa se brzina Brownovog gibanja, a izmjerena brzina se preračunava u veličinu čestica koristeći translacijski difuzijski koeficijent pomoću Stokes-Einsteinove jednadžbe (12).

Veličina koja se dobije ovim postupkom je promjer kugle, a odnosi se na to kako NP difundira unutar tekućine te se stoga naziva i hidrodinamičkim promjerom (*d*H). Suvremena DLS tehnika automatski obavlja kumulativnu analizu koja određuje i indeks polidisperznosti (PDI od eng. *polidispersity index*) uzorka. PDI je bezdimenzijska veličina koja se nalazi između 0 i 1. Koloidna suspenzija NP je monodisperzna ako je vrijednost PDI ispod 0.05 (28). Podaci dobiveni DLS-om mogu biti izraženi kao raspodjela veličine NP u uzorku po intenzitetu, volumenu ili broju.

U ovom je istraživanju za DLS mjerenja korišten Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, UK) opremljen zelenim laserom (532 nm). Pripremljene su otopine AuNP u koncentraciji 10 mg Au/L. Intenzitet raspršenog svjetla detektiran je pod kutem od 173°. Vrijednosti za *d*H i PDI za pojedine AuNP dobivene su iz raspodjele po intenzitetu iz 10 mjerenja. Mjerenja su provedena na 25 °C i podaci su obrađeni u Zetasizer 6.32 programskom paketu (29).

### 3.4.5. ODREĐIVANJE ζ POTENCIJALA RAZLIČITIH AuNP

Zeta (ζ) potencijal se može definirati kao potencijal na kliznoj plohi između NP i otopine. Kada se čestica određenog površinskog naboja rasprši u otopini, ona privlači ione suprotnog naboja na svoju površinu, što rezultira formiranjem električnog dvosloja koji se sastoji od Sternovog i difuzijskog sloja. Sternov sloj čine ioni čvrsto vezani za NP i oni privlače suprotno nabijene ione iz otopine. Pri tome dolazi do stvaranja drugog difuzijskog sloja u kojemu su ioni slabije vezani. Unutar difuzijskog sloja nalazi se tzv. klizna ploha na kojoj NP i ioni formiraju stabilnu cjelinu. Prilikom gibanja NP u otopini, ioni unutar te cjeline gibaju se zajedno s NP, dok se potencijal na toj plohi naziva ζ potencijal (30). Ukoliko NP imaju veliku negativnu ili pozitivnu vrijednost ζ potencijala (apsolutne vrijednosti veće od 30 mV), međusobno će se odbijati, što je pokazatelj koloidne stabilnosti takvog sustava (30). ζ potencijal se ne može izravno mjeriti, već se određuje mjerenjem elektroforetske pokretljivosti koja se definira kao usmjereno gibanje nabijene NP pod utjecajem električnog polja prema suprotno nabijenoj elektrodi.

Mjerenja ζ potencijala pripravljenih AuNP su se provela na način da su se razrijeđene AuNP suspenzije koncentracije od 10 mg Au/L stavile u plastičnu kivetu, koja je imala integrirane elektrode, i obasjale laserom. Korišten je Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern, UK) opremljen zelenim laserom (532 nm). Zbog gibanja AuNP frekvencija raspršenog svjetla se mijenja u odnosu na početnu frekvenciju zbog Dopplerovog efekta, a pomak frekvencije se koristio za računanje elektroforetske provodljivosti (µe), pri čemu njegovo povećanje ili smanjenje govori o predznaku, odnosno je li ζ potencijal pozitivan ili negativan (31).

Svaki je uzorak izmjeren 3 puta. Rezultati za µe automatski su obrađeni primjenom programa Zetasizer 6.32 (Malvern Instruments), a dobivene vrijednosti ζ potencijala izražene su kao prosječne vrijednosti uz standardnu devijaciju.

## 3.5. ODREĐIVANJE VEZANJA L-DOPE NA RAZLIČITE AuNP BEZ I UZ PRISUSTVO ALBUMINA

Interakcije NP i lijekova mogu se opisati ligand – ligand interakcijama u kojima je koncentracija produkata ovisna o koncentraciji reaktanata i uvjetima reakcije. Ukoliko je jedan od liganada fluorofor, može se primijeniti metoda gašenja fluorescencije jer se vezanjem fluorofora na NP intenzitet fluorescencije tog fluorofora smanjuje što omogućuje određivanje konstante vezanja. Titracijom stalne koncentracije lijeka [L] ligandom NP povećava se koncentracija produkta L-NP do ravnotežnog stanja. Načelo vezanja L i NP može se prikazati bimolekularnom reakcijom:

*K*a

[L] + [NP] [L-NP] (6)

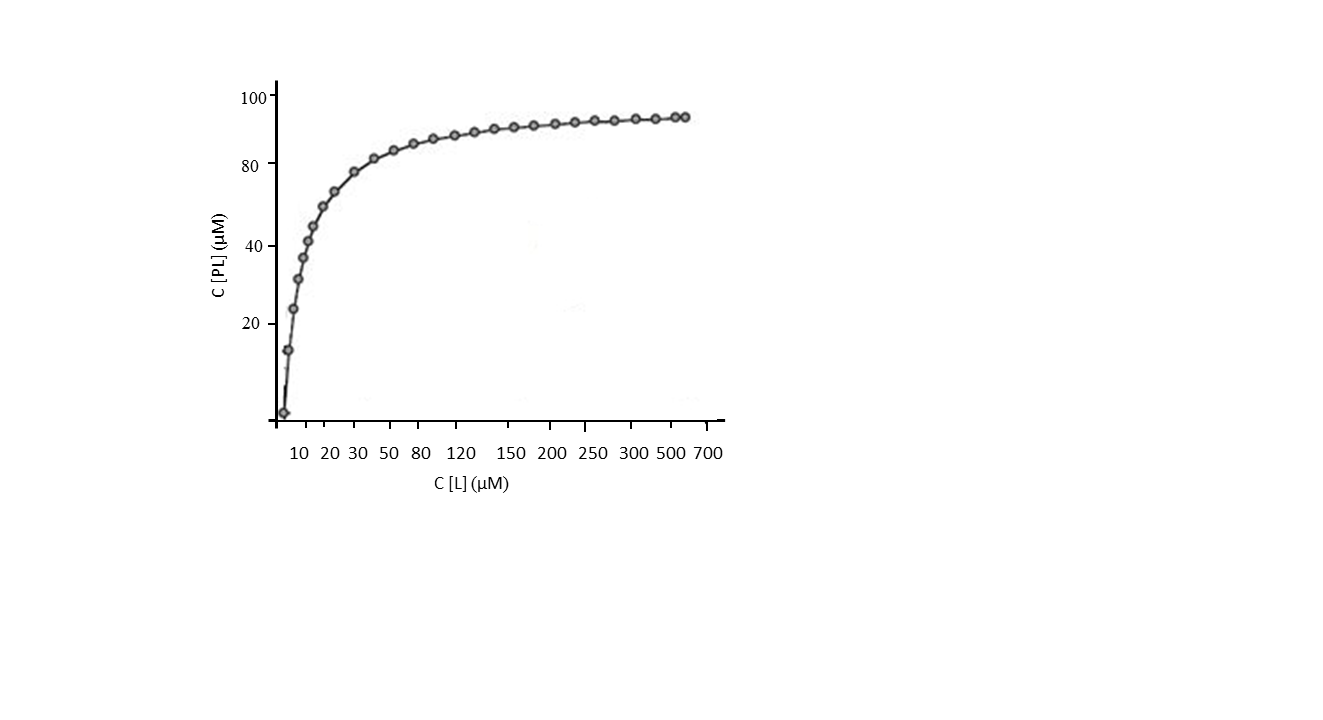
U stanju ravnoteže brzine nastanka i raspadanja kompleksa [L-NP] su izjednačene

(7)

(8)

pri čemu je *K*a konstanta vezanja. Za bimolekularne reakcije, mjerna jedinica za *K*a je koncentracija-1 (M-1). Promjenom konstante kemijske ravnoteže *K* promijenit će se i omjer između kompleksa L-NP i slobodnih frakcija NP, odnosno lijeka, što može rezultirati promjenom kliničkog učinka bilo lijeka bilo NP.

Prvi korak u određivanju konstante ravnoteže je izrada titracijske krivulje pri čemu je koncentracija L stalna, a koncentracija NP titracijski se povećava dok koncentracija kompleksa ne dostigne ravnotežno stanje (Slika 4).



c [NP] (μM)

c [L-NP] (μM)

Slika 4. Titracijska krivulja

U ovom se istraživanju za određivanje konstanti vezanja L-dope na različite AuNP koristila metoda fluorescencijske spektroskopije temeljem fizikalnog svojstva gašenja fluorescencije L-dope uslijed njenog vezanja na površinu AuNP. Osim toga, ista metoda se koristila i za određivanje učinka prisutnosti proteina na vezanje L-dope na AuNP.

Fluorescencijska spektroskopija analizira fluorescentna svojstva molekula koje se obasjavaju elektromagnetskim zračenjem određene valne duljine pri čemu elektroni unutar molekule apsorbiraju energiju tog zračenja i ekscitiraju se iz osnovnog u pobuđeno stanje. Prelaskom elektrona iz pobuđenog nazad u osnovno stanje, emitira se višak energije u obliku fotona svjetlosti (32). Emitirano zračenje je većih valnih duljina, ali niže energije od ekscitiranoga zračenja.

Gašenje fluorescencije (engl. *steady state fluorescence quenching*) u ravnotežnom stanju je uobičajena metoda za određivanje konstanti vezanja između molekula, pa i između molekula i NP. Gašenje može biti statičko i dinamičko. Kod statičkog gašenja, smanjenje fluorescencije fluorofora posljedica je stvaranja nefluorescentnog kompleksa u osnovnom stanju (32). Dinamičko gašenje posljedica je prijenosa energije s fluorofora na prigušivač u ekscitiranom stanju. Pobuđivanjem fluorofora elektromagnetskim zračenjem, elektroni u višem energetskom stanju prenose dio energije na molekulu prigušivača. Razliku između dinamičkog i statičkog gašenja moguće je odrediti iz vrijednosti konstante brzine gašenja (*k*q) pri različitim temperaturama. Kod dinamičkog gašenja konstante će se povećavati s porastom temperature jer više temperature rezultiraju većim koeficijentima difuzije molekula (32). Suprotno tome, kod statičkog gašenja vrijednost konstante se smanjuje ​​s porastom temperature, jer je stabilnost kompleksa koji nastaje u osnovom stanju smanjena (32). Osim navedenog, statičko gašenje se pripisuje onom sustavu kod kojeg je vrijednost kq veća od 2 x 1010 Lmol-1s-1, što se smatra maksimalnom kolizijskom konstantnom brzine gašenja (33).

Prije izvođenja pokusa provedena su preliminarna mjerenja, kojima su definirani optimalni eksperimentalni uvjeti za izbjegavanje efekta unutarnjeg filtera. Budući da AuNP apsorbiraju na određenim valnim duljinama, određen je koncentracijski raspon u kojem apsorbancija AuNP neće utjecati na fluorescencijska mjerenja. Naime, ukoliko je apsorbancija AuNP na određenoj valnoj duljini previsoka, doći će do apsorpcije ekscitacijskog, odnosno emisijskog zračenja. Apsorpcija ekscitacijskoga zračenja naziva se primarnim, dok se apsorpcija emisijskog zračenja naziva sekundarnim efektom unutarnjeg filtera (34). Ukoliko je vrijednost intenziteta fluorescencije ispitivanog uzorka linearno ovisna o apsorbanciji uzorka na valnim duljinama ekscitacije i emisije, tada treba uzeti u obzir učinak unutarnjeg filtera i uvesti korekcijski faktor (34). Postojanje učinka unutarnjeg filtra ispitano je provođenjem eksperimenata u kojima su izmjereni fluorescencijski i UV-VIS spektri svih AuNP vrsta pri različitim koncentracijama (od 0 do 1 nm), te fluorescencijski i UV-VIS spektri L-dope (u rasponu od 1 do 100 M).

UV-Vis spektri snimani su na CARY 300 spektrofotometru (Varian Inc., Australia) korištenjem kvarcne kivete za UV duljine optičkog puta 10 mm. Fluorescencijski spektri snimani su na Agilent Cary Eclipse fluorescentnom spektrofotometru (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) korištenjem kvarcne kivete za fluorescenciju duljine optičkog puta 10 mm. Gašenje fluorescencije L-dope (fluorofora) određeno je inkubiranjem različitih koncentracija AuNP s konstantnom koncentracijom L-dope (15 M). Također su provedena mjerenja vezanja L-dope (15 M) u prisustvu albumina BSA (0.1 M). Tijekom mjerenja, širina pobude i emisijskog proreza postavljene su na 5 nm, odnosno na 10 nm. Valna duljina od 280 nm korištena je za pobuđivanje L-dope, a spektri emisije fluorescencije izmjereni su u rasponu od 300 do 450 nm. Prije mjerenja, reakcijska smjesa koja se sastojala od AuNP-a i fluorofora, uz ili bez prisustva albumina, inkubirana je 5 minuta na 288 K, 298 K i 308 K. Dobiveni rezultati prikazani su kao konstante vezanja izračunate primjenom Stern-Volmerove jednadžbe:

(15)

gdje je F0 ukupna fluorescencija L-dope (u odsutnosti AuNP), F je fluorescencija L-dope pri danoj koncentraciji AuNP, *k*q je konstanta brzine biomolekulskog gašenja, *K*sv je Stern-Volmerova konstanta, τ0 je poluvrijeme fluorescencije L-dope u odsutnosti prigušivača, a [AuNP] je molarna koncentracija AuNP.

Koncentracija AuNP u otopini povećava se do točke zasićenja, pri čemu će fluorescencija L-dope biti minimalna. Ako pretpostavimo gašenje fluorescencije pri čemu L-dopa i AuNP formiraju stabilan kompleks, *K*sv postaje konstanta vezanja, *K*b. Za izračunavaje *K*b upotrijebljena je Hillova jednadžba koja služi za kvantifikaciju odnosa između intenziteta fluorescencije i koncentracije AuNP:

(16)

gdje je n Hillov koeficijent, koji opisuje stupanj kooperativnosti vezanja liganda na površinu. Ako je n > 1, vezanje liganda se pojačava ako već postoje drugi ligandi adsorbirani na površinu. Ako je n < 1, vezanje liganda se smanjuje ako već postoje drugi ligandi adsorbirani na površinu. U slučajevima gdje je n = 1, vezanje liganda je neovisno od drugih liganada koji su već vezani na površini (35).

Sva mjerenja su provedena u ultračistoj vodi u kojoj su sve AuNP stabilne i ne dolazi do njihove aglomeracije. To je omogućilo pouzdano određivanje ukupne nanopovršine dostupne za vezanje L-dope.

# 4. REZULTATI

## 4.1. OPTIMIZACIJA SINTEZE I KARAKTERIZACIJA RAZLIČITIH AuNP

Sve metode priprave AuNP koje su korištene u ovom radu temeljile su se na redukciji ionskog oblika zlata (HAuCl4 x 3H2O). Ispitane su stoga različite metode priprave AuNP uz PEG, Ad i PGM kao stabilizatore. Koloidna stabilnost bila je glavni kriterij pri optimizaciji metode za pripravu AuNP vrsta za daljnja istraživanja vezanja L-dope uz i bez prisustva albumina. Za sintezu PEG-AuNP primijenjena je metoda ranije opisana u literaturi (23) kako je detaljno prikazano u poglavlju 3.3. U svrhu priprave stabilnih Ad-AuNP i PGM-AuNP ispitani su različiti omjeri reaktanata i brzina reakcije kako je prikazano u Tablici 2.

**Tablica 2**. Utjecaj različitih sintetskih uvjeta prilikom pripreme različitih AuNP.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Stabilizator** | **Koncentracija stabilizatora, mM** | **Koncentracija HAuCl4·3H2O, mM** | **Koncentracija NaBH4, mM** | **Opažanje** |
| Ad | 0.09 | 1.58 | 0.79 | tamno crvena boja, nereproducibilna sinteza, aglomeracija nakon 2-3 dana |
| Ad | 0.09 | 0.81 | 1.62 | stabilno, ali nakon pročišćavanja gubi stabilnost |
| Ad | 0.09 | 0.34 | 1.70 | neuspješna reakcija |
| Ad | 0.09 | 0.56 | 1.67 | stabilno, ali nakon pročišćavanja gubi stabilnost |
| Ad | 0.83 | 0.83 | 1.67 | neuspješna reakcija |
| Ad | 0.63 | 0.63 | 0.76 | neuspješna reakcija |
| Ad | 0.64 | 0.64 | 0.58 | neuspješna reakcija |
| Ad | 0.31 | 0.63 | 0.94 | neuspješna reakcija |
| Ad | 0.33 | 0.67 | 0.50 | stabilno, ali nakon pročišćavanja gubi stabilnost |
| Ad | 0.09 | 1.58 | 0.79 | stabilno, ali nakon pročišćavanja gubi stabilnost |
| Ad | 0.59 | 0.59 | 1.76 | aglomerira unutar nekoliko sati |
| Ad | 0.30 | 0.61 | 1.82 | aglomerira unutar nekoliko sati |
| **Ad** | 0.09 | 0.86 | 0.86 | **tamno crvena boja, stabilno više od 50 dana, reproducibilno** |
| Ad | 0.09 | 0.81 | 1.62 | tamno crvena boja, nereproducibilno, aglomeracija nakon 2-3 dana |
| PGM | 0.09 | 0.86 | 0.86 | tamno crvena boja, nereproducibilna sinteza |
| **PGM** | 0.12 | 1.58 | 0.79 | **tamno ljubičasta boja, stabilno više od 50 dana, reproducibilno** |

Koloidno stabilne AuNP vrste smatrale su se onima za koje je utvrđena reproducibilna sinteza, te koje nisu pokazivale znakove taloženja, aglomeracije i promjene boje tijekom razdoblja od dva mjeseca od sinteze. Kako se može vidjeti iz Tablice 2, najpovoljniji molarni omjer stabilizator:HAuCl4×3H2O:NaBH4 bio je za Ad-AuNP 0.09:0.86:0.86 tj. 0.1:1:1, dok je taj omjer za PGM-AuNP bio 0.12:1.58:0.79 tj. 0.076:1:0.5, te su se ti omjeri reaktanata primjenili kod priprave Ad-AuNP i PGM-AuNP za daljnja ispitivanja. Dobivene suspenzije prikazane su na Slici 5.

D:\Nextcloud\mentorstvo\rektorove\Ena\Slika 3.tiff

**Slika 5**. Fotografije sintetiziranih AuNP vrsta.

Provedenim ispitivanjem pokazalo se da se gore opisanim sintetskim postupcima mogu pripremiti stabilni, monodisperzni koloidi AuNP stabilizirani PEG-om, Ad-om i PGM-om. Važno je naglasiti da je ponavljanjem navedenih sintetskih postupaka utvrđena njihova reproducibilnost te ih je preporučljivo koristiti u situacijama kada je potrebno pripraviti koncentrirane koloide. Prije ispitivanja vezanja L-dope uz i bez prisustva albumina, sve 3 AuNP vrste karakterizirane su određivanjem hidrodinamičkog promjera (*d*H), primarne veličine (*d*TEM), ζ potencijala i indeksa polidisperznosti (PDI) kako je prikazano u Tablici 3, primjenom tehnika navedenim u Tablici 1.

Vrijednosti za PDI pripremljenih AuNP kreću se u rasponu od 0.27 do 0.39, što ukazuje na usku i homogenu raspodjelu njihove hidrodinamičke veličine, dok su vrijednosti  potencijala za sve AuNP bili negativni, u rasponu između -28.1 i -36.4 mV, što također ukazuje na koloidnu stabilnost novih AuNP uslijed elektrostatičkog odbijanja pojedinih čestica (36). Oslikavanje TEM-om omogućilo je, osim određivanja *d*TEM vrijednosti, i vizualizaciju oblika različitih AuNP koja je potvrdila da su sve nanočestice bile pravilnog, okruglog oblika (Slika 6).

**Tablica 3.** Hidrodinamički promjer (*d*H), indeks polidisperznosti (PDI), zeta (ζ) potencijal i primarni promjer (*d*TEM) za PEG-AuNP, Ad-AuNP i PGM-AuNP. Svi podaci dobiveni su kod AuNP masene koncentracije 10 mg Au/L koje su bile dispergirane u ultračistoj vodi pri 25 °C.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Nanočestica | *d*H /nm (% u ukupnom volumenu) | PDI | | ζ/mV | *d*TEM/nm |
| PEG-AuNP | 11.9 ± 2.8 (100) | | 0.31 | -28.1 ± 2.6 | 9.2 ± 2.3 |
| Ad-AuNP | 29.8 ± 3.4 (100) | | 0.27 | -36.4 ± 3.1 | 29.4 ± 3.3 |
| PGM-AuNP | 26.5 ± 5.1 (100) | | 0.39 | -32.9 ± 2.2 | 26.9 ± 1.9 |

Y:\Mikroskopija\TEM\AuNP\AuNP-PEG 6000 13.5 [7].tifY:\Mikroskopija\TEM\AuNP\AuNP-PGM N.P [12].tifY:\Mikroskopija\TEM\AuNP\AuNP-Ad-NH2 N.P [3].tif

PGM-AuNP

Ad-AuNP

PEG-AuNP

**Slika 6**. TEM snimke za PEG-AuNP, Ad-AuNP i PGM-AuNP. Mjerilo veličine je 100 nm.

Prema TEM slikama, najmanji prosječni primarni promjer uočen je za PEG-AuNP (7.9 ± 1.8 nm), dok su Ad-AuNP i PGM-AuNP bile slične veličine (Tablica 3). Hidrodinamički promjeri dobiveni iz DLS-a bili su veći za sve AuNP vrste u usporedbi s primarnom veličinom dobivenom iz TEM slika, jer *d*H vrijednost uključuje i površinski omotač.

Dodatna karakterizacija provedena je korištenjem UV-Vis spektroskopske metode, pri čemu su izmjereni apsorbancijski spektri ispitivanih AuNP u rasponu valnih duljina od 200 nm do 800 nm (Slika 7).

D:\Nextcloud\mentorstvo\rektorove\Ena\Slika 5.tif

**Slika 7**. UV-Vis spektri dobiveni za PEG-AuNP, Ad-AuNP i PGM-AuNP.

Poznato je da se metalne NP odlikuju karakterističnim signalom u UV-Vis spektru zbog svojstva lokalizirane površinske plazmonske rezonancije (LSPR, od engl. *localized plasmon surface resonance*) koja ovisi o obliku i veličini nanočestica (37). Sve analizirane AuNP imale su karakterističan maksimum LSPR signala, koji je za Ad-AuNP i PGM-AuNP izmjeren na istoj valnoj duljini od 530 nm što je potvrdilo istu veličinu i oblik ovih AuNP. Obzirom da se valna duljina maksimuma LSPR signala smanjuje sa smanjivanjem promjera čestica, taj je maksimum za PEG-AuNP lokaliziran na 522 nm.

## 4.2. VEZANJE L-DOPE NA RAZLIČITE AuNP

Mehanizam vezanja L-dope na različite AuNP istraživan je u ovom radu metodom fluorescentne spektroskopije, odnosno metodom gašenja fluorescencije L-dope uslijed vezanja na nanopovršinu obzirom da je L-dopa flourofor za koju su maksimalne valne duljine pobude i emisije na 280 odnosno na 317 nm. Intenzitet fluorescencije L-dope dramatično se smanjio s povećanjem koncentracija AuNP (Slika 8), što ukazuje na to da se L-dopa veže na sve ispitivane AuNP.

c) 

b) 

a) 



**Slika 8**. Promjene emisijskog fluorescencijskog spektra 15 µM L-dope uz dodatak različitih koncentracija (a) PEG-AuNP (0, 0.045, 0.090, 0.13, 0.23, 0.36, 0.45, 0.59, 0.68 nM), (b) Ad-AuNP (0, 0.01, 0.02, 0.029, 0.039, 0.059, 0.079, 0.098, 0.118, 0.138 nM) i (c) PGM-AuNP (0, 0.012, 0.024, 0.037, 0.049, 0.073, 0.097, 0.122, 0.146, 0.171 nM).

Za koncentracijski raspon AuNP primijenjen u gore prikazanim titracijama, ispitano je postojanje učinka unutarnjeg filtera određivanjem proporcionalnosti intenziteta fluorescencije s koncentracijom AuNP na valnim duljinama ekscitacije i emisije L-dope. Opaženi intenzitet fluorescencije za PEG-AuNP nije bio proporcionalan koncentraciji na ispitivanim koncentracijama zbog apsorpcije upadnog i emisijskog zračenja koje prolaze kroz AuNP što je jasno ukazalo na postojanje učinka unutarnjeg filtra (34). Učinak unutarnjeg filtera može se isključiti odabirom niskih koncentracija kod kojih je taj učinak zanemariv. Ad-AuNP i PGM-AuNP su pokazale gašenje fluorescencije L-dope pri koncentracijama koje su bile dovoljno niske da se zanemari učinak unutarnjeg filtera, dok je za PEG-AuNP bilo potrebno primijeniti korekciju primjenom sljedeće jednadžbe:

(17)

gdje su Fobs i Fcorr vrijednosti opaženog i korigiranog intenziteta fluorescencije; Aex i Aem su vrijednosti apsorpcije PEG-AuNP na valnoj duljini ekscitacije, odnosno emisije; a dex i dem su duljina puta kivete na valnoj duljini ekscitacije, odnosno emisije (34).

Opaženo smanjivanje intenziteta fluorescencije L-dope s povećanjem koncentracije AuNP može se objasniti mehanizmom dinamičkog ili statičkog gašenja za čije je razlikovanje potrebno primijeniti Stern-Volmerovu jednadžbu kako je opisano u poglavlju 3.5. Korištenjem te jednadžbe izrađeni su Stern-Volmer grafovi kojima je prikazan odnos intenziteta fluorescencije L-dope na valnoj duljini 317 nm i ispitivanih koncentracija AuNP na temperaturama 288 K, 298 K i 308 K (Slika 9).

a) 

b)  c) 

**Slika 9**. Stern-Volmerovi pravci za fluorescentno gašenje L-dope uz različite koncentracije (a) PEG-AuNP (0, 0.045, 0.090, 0.13, 0.23, 0.36, 0.45, 0.59, 0.68 nM), (b) Ad-AuNP (0, 0.01, 0.02, 0.029, 0.039, 0.059, 0.079, 0.098, 0.118, 0.138 nM) i (c) PGM-AuNP (0, 0.012, 0.024, 0.037, 0.049, 0.073, 0.097, 0.122, 0.146, 0.171 nM).

Iz nagiba Stern-Volmerovih pravaca određene su vrijednosti Stern-Volmerovih konstanti (*K*SV) iz kojih su izračunate konstante brzine gašenja fluorescencije (*k*q) prema jednadžbi (15) u poglavlju 3.5. Rezultati za *K*SV i *k*q prikazani su u Tablici 4. Izmjerene *k*q vrijednosti (Tablica 4) su za sve AuNP vrste bile puno veće od maksimalne vrijednosti konstante gašenja fluorescencije kontrolirane difuzijom (2×1010 M-1s-1) što odgovara statičnom mehanizmu gašenja fluorescencije (38). Statički mehanizam gašenja fluorescencije nastaje kao rezultat stvaranja ne-fluorescentnog kompleksa osnovnog stanja između fluorofora i AuNP. S druge strane, dinamički mehanizam rezultat je difuznih susreta između fluorofora i AuNP tijekom životnog vijeka pobuđenog stanja.

**Tablica 4.** Stern-Volmerove konstante gašenja fluorescencije (*K*SV) dobivene nakon interakcije različitih AuNP s L-dopom. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti *K*SV i *k*q izračunate iz tri neovisna mjerenja.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **AuNP vrsta** | 308 K | 298 K | | 288 K |
| Ksv x 109(M-1) | Ksv x 109 (M-1) | kq x 1019 (M-1 s-1) | Ksv x 109 (M-1) |
| PEG-AuNP | 0.50 ± 0.01 | 0.46 ± 0.01 | 0.06 | 0.39 ± 0.01 |
| Ad-AuNP | 6.99 ± 0.08 | 7.30 ± 0.04 | 0.96 | 7.75 ± 0.05 |
| PGM-AuNP | 10.80 ± 0.00 | 11.30 ± 0.38 | 1.49 | 13.00 ± 0.60 |

Za izračunavanje konstanti vezanja (*K*b) L-dope na različite AuNP korištena je jednadžba (16) prema kojoj su izrađeni logaritamski grafovi prikazani na Slici 10. Iz odsječka dobivenih pravaca određene su log*K*b vrijednosti, dok su iz nagiba dobivene *n* vrijednosti Hillovih koeficijenata. Svi prikupljeni rezultati su prikazani u Tablici 5.

a)

b)

c)

**Slika 10**. Logaritamski prikazi gašenja fluorescencije L-dope uz dodatak različitih koncentracija (a) PEG-AuNP, (b) Ad-AuNP i (c) PGM-AuNP na temperaturama 288, 298 i 308 K.

**Tablica 5.** Konstante vezanja (*K*b) i Hillovi koeficijenti (*n*) dobiveni za interakciju različitih AuNP s L-dopom na temperaturama 288, 298 i 308 K. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti *K*b i *n* te odgovarajuće vrijednosti standardnih devijacija (SD) izračunate iz tri neovisna mjerenja.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Parametar** | **AuNP vrsta** | 308 K | 298 K | 288 K |
| *K*b x 1010(M-1) | PEG-AuNP | 0.24 ± 0.03 | 0.96 ± 0.20 | 2.43 ± 0.17 |
| Ad-AuNP | 1.34 ± 0.13 | 3.92 ± 0.29 | 8.40 ± 0.35 |
| PGM-AuNP | 5760 ± 285 | 23700 ± 4780 | 75200 ± 1040 |
| *n* | PEG-AuNP | 1.08 ± 0.004 | 1.14 ± 0.012 | 1.20 ± 0.003 |
| Ad-AuNP | 1.03 ± 0.004 | 1.08 ± 0.002 | 1.11 ± 0.002 |
| PGM-AuNP | 1.37 ± 0.002 | 1.43 ± 0.010 | 1.48 ± 0.003 |

Iz Tablice 5. uočava se da dolazi do smanjenja vrijednosti *K*b s porastom temperature, te su određeni i termodinamički parametri za te interakcije koji mogu pružiti informacije o silama odgovornim za interakciju i njihovoj prirodi (39). Upotrebom van't Hoffove jednadžbe:

(18)

i izraza za Gibbsovu energiju:

(19)

mogu se izračunati vrijednosti ΔG koji pružaju informacije o prirodi reakcijskog procesa, a predznak za ΔS i ΔH daje informacije o vrsti sila povezanim s interakcijama L-dope i AuNP. Ukoliko su ΔH> 0 i ΔS> 0 radi se o hidrofobnim silama, vrijednosti ΔH <0 i ΔS <0 podrazumijevaju Van der Waalsove interakcije ili vodikove veze, a vrijednosti ΔH <0 ili ΔH = 0 i ΔS> 0 sugeriraju elektrostatičke interakcije. U jednadžbama (18) i (19), R je opća plinska konstanta, ΔH predstavlja promjenu entalpije, ΔS promjenu entropije, dok je ΔG promjena Gibbsove slobodne energije za interakciju L-dope s različitim AuNP. Prema jednadžbi (18) su izrađeni grafikoni (Slika 11) iz kojih su dobivene ΔH i ΔS vrijednosti, dok su ΔG vrijednosti izračunate pomoću jednadžbe (19). Dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 6.

a)

b) 

c)

**Slika 11**. Van't Hoff graf za interakciju L-dope s (a) PEG-AuNP, (b) Ad-AuNP i (c) PGM-AuNP.

**Tablica 6.** Termodinamički parametri dobiveni za interakciju različitih AuNP s L-dopom na temperaturama 288, 298 i 308 K.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| AuNP vrsta | ΔH x 104 (kJmol-1) | ΔS (Jmol-1K-1) | ΔG x 104 (kJmol-1) | | |
| **288 K** | **298 K** | **308 K** |
| PEG-AuNP | -8.44 | -93.4 | -5.75 | -5.65 | -5.56 |
| Ad-AuNP | -6.76 | -25.1 | -6.04 | -6.01 | -5.99 |
| PGM-AuNP | -9.46 | -43.1 | -8.22 | -8.17 | -8.13 |

## 4.3. UČINAK PRISUSTVA ALBUMINA NA VEZANJE L-DOPE NA RAZLIČITE AuNP

Svi parametri prikazani u poglavlju 4.2. provedeni su i za interakciju L-dope s pripremljenim AuNP vrstama u prisustvu albumina kako bi se ispitao učinak biološkog medija u kojem su prisutni serumski proteini na ove interakcije. I u slučaju prisustva albumina intenzitet fluorescencije L-dope dramatično se smanjio s povećanjem koncentracija AuNP (Slika 12) kao i za interakcije bez prisustva albumina.



c) 

b) 

a) 

**Slika 12**. Promjene emisijskog fluorescencijskog spektra 15 µM L-dope uz dodatak različitih koncentracija (a) PEG-AuNP (0, 0.045, 0.090, 0.13, 0.23, 0.36, 0.45, 0.59, 0.68 nM), (b) Ad-AuNP (0, 0.01, 0.02, 0.029, 0.039, 0.059, 0.079, 0.098, 0.118, 0.138 nM) i (c) PGM-AuNP (0, 0.012, 0.024, 0.037, 0.049, 0.073, 0.097, 0.122, 0.146, 0.171 nM) u prisustvu albumina (0.1 mM).

Za ispitivanu koncentraciju albumina (0.1 mM) utvrđeno je nepostojanje učinka unutarnjeg filtera pa se na dobivene rezultate gašenja fluorescencije primijenila Stern-Volmerova jednadžba kako je opisano u poglavljima 3.5 i 4.2. Stern-Volmer grafovi za interakciju L-dope s različitim AuNP u prisustvu albumina na temperaturama 288 K, 298 K i 308 K prikazani su na Slici 13.



a) 



b) 



c) 

**Slika 13**. Usporedba Stern-Volmerovih pravaca za fluorescentno gašenje L-dope uz različite koncentracije (a) PEG-AuNP (0, 0.045, 0.090, 0.13, 0.23, 0.36, 0.45, 0.59, 0.68 nM), (b) Ad-AuNP (0, 0.01, 0.02, 0.029, 0.039, 0.059, 0.079, 0.098, 0.118, 0.138 nM) i (c) PGM-AuNP (0, 0.012, 0.024, 0.037, 0.049, 0.073, 0.097, 0.122, 0.146, 0.171 nM) bez i u prisustvu albumina (0.1 mM) na 298 K.

Iz nagiba Stern-Volmerovih pravaca određene su vrijednosti Stern-Volmerovih konstanti (*K*SV) iz kojih su izračunate konstante brzine gašenja fluorescencije (*k*q) prema jednadžbi (15) u poglavlju 3.5., a izmjerene *k*q vrijednosti su za sve AuNP vrste bile puno veće od maksimalne vrijednosti konstante gašenja fluorescencije kontrolirane difuzijom (2×1010 M-1s-1) što odgovara statičkom mehanizmu gašenja fluorescencije (38), kao i u slučaju interakcije L-dope s AuNP bez prisustva albumina. Iz logaritamskih grafova prikazanih na Slici 14, određene su log*K*b vrijednosti i vrijednosti Hillovih koeficijenata koje su prikazane u Tablici 7.



a) 



b) 



c) 

**Slika 14**. Usporedba logaritamskih prikaza gašenja fluorescencije L-dope uz različite koncentracije (a) PEG-AuNP, (b) Ad-AuNP i (c) PGM-AuNP bez i u prisustvu albumina (0.1 mM) na 298 K.

**Tablica 7.** Usporedba konstanti vezanja (*K*b) i Hillovih koeficijenata (*n*) dobivenih za interakciju različitih AuNP s L-dopom bez i u prisustvu albumina (0.1 mM) na 298 K. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti *K*b i *n* izračunate iz tri neovisna mjerenja.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Parametar** | **AuNP vrsta** | Albumin | L-dopa uz albumin | L-dopa bez albumina |
| *K*b x 1010(M-1) | PEG-AuNP | 2.85 ± 0.46 | 0.06 ± 0.01 | 0.96 ± 0.20 |
| Ad-AuNP | 186 ± 21.5 | 0.55 ± 0.04 | 3.92 ± 0.29 |
| PGM-AuNP | 476 ± 36 | 19900 ± 4990 | 23700 ± 4780 |
| *n* | PEG-AuNP | 1.19 | 1.03 | 1.14 |
| Ad-AuNP | 1.24 | 1.00 | 1.08 |
| PGM-AuNP | 1.28 | 1.43 | 1.42 |

# 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju ispitane su nove mogućnosti upotrebe AuNP kao nano-nosača za isporuku L-dope u liječenju Parkinsonove bolesti. Pripremljene su dvije nove vrste AuNP korištenjem Ad-a i PGM-a za stabilizaciju i funkcionalizaciju AuNP u svrhu učinkovitijeg vezanja L-dope. Mehanizam vezanja L-dope na Ad-AuNP i PGM-AuNP uspoređen je s interakcijom L-dope na PEG-AuNP, za koje postoje brojni literaturni podaci o primjeni u ciljanoj isporuci lijekova (9, 11, 18-19). Interakcija L-dope i AuNP procijenjena je uzimajući u obzir konstante vezanja (*K*b) L-dope na nanopovršinu, prosječni broj mjesta vezanja (*n*) kao i termodinamičke parametre tog vezanja (ΔH, ΔS, ΔG).

Određivanje Hillovog koeficijenta (*n*) omogućio je procjenu stupnja kooperativnosti L-dope koja se vezala na površinu AuNP. Kad je *n* = 1, nema interakcije između mjesta vezanja (nekooperativno vezanje), a ako su vrijednosti Hillovog koeficijenta manje ili veće od 1, sustav pokazuje negativnu, odnosno pozitivnu kooperativnost (40). Temperatura nije značajno utjecala na Hillov koeficijent, ali je došlo do blagog pada *n* vrijednosti s porastom temperature što je u skladu s izmjerenim *K*b vrijednostima. U skladu s tim, vrijednosti Hillovog koeficijenta su za PEG-AuNP i PGM-AuNP bile veće od 1 što ukazuje na pozitivnu kooperativnost kao rezultat povećanja afiniteta veznog mjesta zbog prethodnog vezanja liganda na drugo mjesto. Zanimljivo je da je kooperativost vezanja L-dope na Ad-AuNP bila ovisna o temperaturi pa su *n* vrijednosti bile ispod 1 pri 308 K što ukazuje na negativnu kooperativnost, dok je pozitivna kooperativnost uočena pri 288 K, a na temperaturi od 298 K vrijednosti Hillovog koeficijenta bile su blizu 1.

Konstante vezanja su se za sve AuNP vrste smanjivale s porastom temperature, što ukazuje da su dominantne sile u interakciji L-dope s nanopovršinom bile vodikove veze, a ne elektrostatičke interakcije, jer se s porastom temperature dogodila destabilizacija L-dopa-AuNP kompleksa uzrokovana smanjenjem broja vodikovih veza na višim temperaturama (41). Na to su ukazale i negativne vrijednosti promjena entalpije i entropije, jer je promjena entalpije i entropije nakon vezivanja rezultat formiranja i narušavanja mnogih pojedinačnih interakcija. Za sve interakcije dobivene su negativne vrijednosti ΔH i ΔS što upućuje da su interakcije vezanja L-dope na različite AuNP prvenstveno posljedica slabih van der Waalsovih i vodikovih veza, a negativan predznak za ΔG vrijednosti upućuju na spontanu prirodu reakcijskog procesa. Budući da se vezivanje L-dope na AuNP dogodilo u vodenom okolišu, molekule vode su stvorile vodikove veze i s L-dopom i s AuNP prije stvaranja L-dopa-AuNP kompleksa (42). Molekule vode moraju se osloboditi nakon stvaranja vodikovih veza između liganda i nanočestica, čime se povećava entropija sustava i remete energetski povoljne interakcije uzrokujući povećanje entalpije. Tada bi oslobođena molekula vode mogla stvoriti veze s drugim molekulama vode. Na taj je način nastalo točno onoliko novih vodikovih veza koliko ih je puklo, što je bio energetski povoljan proces (∆H<0). Slijedom toga, došlo je do smanjenja entropije sustava, jer je ukupan broj vodikovih veza ostao konstantan (43). Suprotno tome, u elektrostatičkim interakcijama između nabijenih AuNP i nabijenih liganada primijećene su pozitivne promjene u entropiji zbog oslobađanja vezanih molekula vode iz hidratiziranih nabijenih molekula kad su u interakciji (44). Osim toga, promjene Gibbsovih slobodnih energija su u svim slučajevima bile negativne što ukazuje na to da se vezivanje L-dope i AuNP dogodilo spontano kada je sustav postigao ravnotežno stanje pri konstantnom tlaku i temperaturi, dok je destabilizacija slabih veza, poput vodikovih veza, s porastom temperature dovela do toga da vrijednosti entalpije i Gibbsove slobodne energije postanu pozitivnije (45). Interakcije u L-dopa-AuNP kompleksu proizlaze iz hidroksilnih skupina L-dope koje su donatori vodika nakon dehidrogenacije, i atoma kisika ili dušika na površini AuNP koje su akceptori vodika. Najjača interakcija dobivena je za PGM-AuNP vjerojatno zbog ε-amino skupine peptidoglikana koja je visoko reaktivna i dostupna za kemijske reakcije kada je u preferencijalnoj konformaciji u vodenoj otopini (46). Stoga PGM-AuNP mogu tvoriti više vodikovih veza u usporedbi s Ad-AuNP i PEG-AuNP. Osim toga, PGM-AuNP ima pozitivnije nabijenu površinu u usporedbi s druge dvije AuNP vrste, pa se smanjuje elektrostatsko odbijanje između negativno nabijene L-dope i nanopovršine. Uz to, PGM omogućava vezanje i putem pozitivno nabijenog aminokiselinskog ostatka.

Osim primjene vrlo jednostavnog modelnog sustava interakcije L-dope na različite AuNP u vodi, ispitan je i učinak proteina. Naime, sudbina AuNP u sistemskoj cirkulaciji ovisit će o interakcijama s biomolekulama, posebno proteinima koji na nanopovršini stvaraju proteinsku koronu što posljedično može prouzročiti smanjenje učinkovitosti vezanja lijeka (47). U ovom se istraživanju ispitao učinak albumina kao najzastupljenijeg proteina krvne plazme. Pri tome su se određivale *K*b i n vrijednosti za interakciju L-dope s različitim AuNP uz dodatak 0.1 mM albumina što je poremetilo ravnotežu binarnog L-dopa-AuNP kompleksa. Naime, vezanje albumina na nanopovršinu smanjilo je afinitet AuNP za L-dopu zbog različite brzine difuzije albumina i L-dope. Smanjenje konstante vezanja između AuNP i L-dope nakon dodavanja albumina slijedilo je niz PEG-AuNP > Ad-AuNP > PGM-AuNP. Ovi se rezultati slažu s afinitetima vezanja obzirom na činjenicu da je manja konstanta vezanja L-dope na AuNP dovela do većeg smanjenja te konstante nakon dodavanja albumina. Na to ukazuje i rezultat najvećeg afiniteta L-dope prema PGM-AuNP u usporedbi s drugim ispitivanim AuNP vrstama. S druge strane, konstanta vezanja između albumina i PGM-AuNP pokazala je mnogo manju vrijednost u usporedbi s konstantom vezanja L-dope na PGM-AuNP. Slijedom toga, već vezana L-dopa nije se mogla lako odvojiti od površine PGM-AuNP te je albumin mnogo manje utjecao na to vezanje u usporedbi s vezanjem na PEG-AuNP i Ad-AuNP (17).

# 6. ZAKLJUČAK

Glavni rezultati ovog istraživanja su sljedeći:

* optimizirane su metode priprave stabilnih AuNP površinskom funkcionalizacijom s PEG-om, Ad-om i PGM-om;
* sve tri pripremljene AuNP vrste bile su sferičnog oblika, hidrodinamičkog promjera u rasponu od 10 do 30 nm, te negativno nabijene;
* interakcija L-dope i AuNP je spontani proces (na što su ukazale negativne ΔG vrijednosti) te se događa putem vodikovih i van der Waalsovih interakcija na što su ukazale negativne vrijednosti ΔH i ΔS;
* najjače vezanje L-dope primijećeno je za PGM-AuNP, a najslabije za PEG-AuNP
* prisustvo albumina značajno remeti vezanje L-dope na PEG-AuNP i Ad-AuNP, dok je taj učinak najmanji za PGM-AuNP.

# 7. ZAHVALE

*Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Petri Turčić na ukazanom povjerenju i mogućnosti izrade ovog znanstvenog rada, podršci, mentorstvu te strpljivosti. Zahvaljujem se i Nikolini Kalčec, mag. app. chem., na prijateljskom okruženju u laboratoriju te svim savjetima, podršci i pomoći prilikom izrade ovog rada. Želim se zahvaliti i svojoj braći na razumijevanju i podršci koju su mi pružili u obiteljskom okruženju tijekom pisanja ovog rada.*

# 8. POPIS LITERATURE

1. Spuch, C., Saida, O., & Navarro, C. (2012). Advances in the Treatment of Neurodegenerative Disorders Employing Nanoparticles. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 6(1), 2-18.
2. Xie, J., Shen, Z., Anraku, Y., Kataoka, K., & Chen, X. (2019). Nanomaterial-based blood-brain-barrier (BBB) crossing strategies. *Biomaterials*, 224, 119491.
3. Kincses, Z.T., & Vecsei, L. (2011). Pharmacological therapy in Parkinson disease: Focus on neuroprotection. *CNS Neurosci Ther*, 17, 345-67.
4. Adhikary, R.R., Sandbhor, P., & Banerjee, R. (2015). Nanotechnology platforms in Parkinson’s Disease. *ADMET and DMPK*, 3 (3), 155-181.
5. Henchcliffe C., & Severt, W.L. (2011). Disease modification in Parkinson’s disease. *Drugs Aging*; 28, 605-15.
6. Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Bernstein, A. L., Fross, R. D., Leimpeter, A., Bloch, D. A., & Nelson, L. M. (2003). Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *American journal of epidemiology*, 157(11), 1015–1022.
7. Di Stefano, A., Sozio, P., Iannitelli, A., & Cerasa, L. S. (2009). New drug delivery strategies for improved Parkinson's disease therapy. *Expert opinion on drug delivery*, 6(4), 389–404.
8. Ozansoy, M., & Başak, A. N. (2013). The central theme of Parkinson's disease: α-synuclein. *Molecular neurobiology*, 47(2), 460–465.
9. Aghaie, T., Jazayeri, M.H., Manian, M., Khani, I., Erfani, M., Rezayi, M., Ferns, G.A., & Avan, A.(2019). Gold nanoparticle and polyethylene glycol in neural regeneration in the treatment of neurodegenerative diseases*. J. Cell. Biochem*., 120, 2749–2755.
10. Gholipourmalekabadi, M., Mobaraki, M., Ghaffari, M., Zarebkohan, A., Omrani, V.F., Urbanska, A.M., & Seifalian, A. (2017). Targeted Drug Delivery Based on Gold Nanoparticle Derivatives. *Curr Pharm Des*. 23(20), 2918-2929.
11. Gonzalez-Carter, D. A., Ong, Z. Y., McGilvery, C. M., Dunlop, I. E., Dexter, D. T., & Porter, A. E. (2019). L-DOPA functionalized, multi-branched gold nanoparticles as brain-targeted nano-vehicles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 15(1), 1–11.
12. De Paoli Lacerda, S. H. et al. (2010). Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins. *ACS Nano* 4, 365–379.
13. Xia, Y., Xiong, Y., Lim, B., & Skrabalak, S. E. (2009). Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics?. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 48(1), 60–103.
14. Goesmann, H., & Feldmann, C. (2010). Nanoparticulate functional materials. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 49(8), 1362–1395.
15. Wegner, S., & Janiak, C. (2017). Metal Nanoparticles in Ionic Liquids. *Topics in Current Chemistry*, 375, 1-32.
16. F Kura, A. U., Hussein Al Ali, S. H., Hussein, M. Z., Fakurazi, S., & Arulselvan, P. (2013). Development of a controlled-release anti-parkinsonian nanodelivery system using levodopa as the active agent. International journal of nanomedicine, 8, 1103–1110.
17. Hirsh, S.L. et al. (2013). The Vroman effect: Competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 103, 395–404
18. Bjugstad, K.B., Lampe, K., Kern, D.S., & Mahoney, M. (2010). Biocompatibility of poly (ethylene glycol)-based hydrogels in the brain: an analysis of the glial response across space and time. *J Biomed Mater Res A*. 95(1), 79- 91.
19. Bittner, G.D., Ballinger, M.L., & Raymond, M.A. (1986). Reconnection of severed nerve axons with polyethylene glycol. *Brain Res*. 367(1), 351- 355.
20. Wanka, L., Iqbal, K. & Schreiner, P. R. (2013). The lipophilic bullet hits the targets: Medicinal chemistry of adamantane derivatives. *Chem. Rev*. 113, 3516–3604.
21. Frkanec, R. et al. (2003). Entrapment of Peptidoglycans and Adamantyltripeptides into Liposomes: An HPLC Assay for Determination of Encapsulation Efficiency. *J. Liposome Res.* 13, 279–294.
22. Frens, G. (1973). Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci*. 241, 20–22.
23. Hernandez, Y. et al. (2019). Gold nanoparticle coatings as efficient adenovirus carriers to non-infectable stem cells. *RSC Adv*. 9, 1327–1334.
24. Lagalante A.F. (2004). Atomic Absorption Spectroscopy: A Tutorial Review \*. *Appl Spectrosc Rev.* 34(3), 173–89.
25. Asadabad, M.A., & Eskandari, M. (2015). Transmission Electron Microscopy as Best Technique for Characterization in Nanotechnology. *Synthesis and Reactivity in Inorganic Metal-organic and Nano-metal Chemistry*, 45, 323-326.
26. Zuber, A., Purdey, M., Schartner, E., Forbes, C., van der Hoek, B., Giles, D., et al. (2016). Detection of gold nanoparticles with different sizes using absorption and fluorescence based method. *Sensors Actuators B Chem*. 227, 117–27.
27. Kato, H. (2012). Size Determination of Nanoparticles by Dynamic Light Scattering, Nanomaterials: Processing and Characterization with Lasers, Subhash Chandra Singh, Haibo Zeng, Chunlei Guo, and Weiping Cai, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
28. Zetasizer Nano Series User manual. Worchestershire, UK: Malvern Instruments Limited; 2013.
29. Takagi T. (1993). Electrophoretic light scattering. *Electrophoresis*. 14(1), 1255–6.
30. Scarlett, B. (2002). Electrophoretic Light Scattering. *In book: Particle Characterization: Light Scattering Methods. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers*. 289–343
31. Doane, T.L., Chuang, C.H., Hill, R.J., & Burda, C. (2012). Nanoparticle ζ -Potentials. *Acc Chem Res*. 45(3), 317–326.
32. Lakowicz, J.R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy. *Springer*
33. Shang, L., Wang, Y., Jiang, J., & Dong, S. (2007). pH-dependent protein conformational changes in albumin:gold nanoparticle bioconjugates: a spectroscopic study. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 23(5), 2714–2721.
34. Wang, T., Zeng, L.H., Li, D.L. (2017). A review on the methods for correcting the fluorescence inner-filter effect of fluorescence spectrum. *Appl Spectrosc Rev*. 52(10), 883–908.
35. Boulos, S.P., Davis, T.A., Yang, J.A., Lohse, S. E., Alkilany, A.M., Holland, L. A., Murphy, C.J. (2013). Nanoparticle − Protein Interactions: A Thermodynamic and Kinetic Study of the Adsorption of Bovine Serum Albumin to Gold Nanoparticle Surfaces. *Langmuir* 29, 14984-14996.
36. Joseph, E. & Singhvi, G. (2019). Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier. *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*. 91–116.
37. Behzadi, S., Ghasemi, F., Ghalkhani, M., Ashkarran, A.A., Akbari, S.M., Pakpour, S., et al. (2015). Determination of nanoparticles using UV-Vis spectra. *Nanoscale*. 7(12), 5134–5139.
38. Liu, J. et al. (2018). Characterizing the binding interaction of astilbin with bovine serum albumin: A spectroscopic study in combination with molecular docking technology. *RSC Adv*. 8, 7280–7286.
39. Rout, J., Swain, B. C., Mishra, P. P. & Tripathy, U. (2020). Spectroscopic insight into the interaction of dopamine with spherical gold nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. B Biol*. 203, 111770
40. Cattoni, D. I., Chara, O., Kaufman., S. B. & Flecha, F. L. G. (2015). Cooperativity in binding processes: New insights from phenomenological modeling. *PLoS On*e 10, 1–14.
41. Mizan, T. I., Savage, P. E. & Ziff, R. M. (1996). Temperature Dependence of Hydrogen Bonding in Supercritical Water. *J. Phys. Chem.* 100, 403–408.
42. Ross, P. D. & Subramanian, S. (1981). Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. *Biochemistry* 20, 3096–3102.
43. Klebe, G. (2013). Drug Design: Methodology, concepts, and mode-of-action. *Drug Des. Methodol. Concepts, Mode-of-Action* 1–901.
44. Nancollas, G. (1970). The Thermodynamics of Formation of Metal Complexes and Ion-Pairs in Solution. *Croat. Chem. Acta* 42, 299–310.
45. Ross, P. D. & Rekharsky, M. V. (1996). Thermodynamics of hydrogen bond and hydrophobic interactions in cyclodextrin complexes. *Biophys. J.* 71, 2144–2154
46. Fehér, K., Pristovšek, P., Szilágyi, L., Ljevaković, Đ. & Tomašić, J. (2003). Modified glycopeptides related to cell wall peptidoglycan: conformational studies by NMR and molecular modelling. *Bioorg. Med. Chem*. 11, 3133–3140.
47. De La Cruz, G. G., Rodríguez-Fragoso, P., Reyes-Esparza, J., et al. (2018). Interaction of nanoparticles with blood components and associated pathophysiological effects. In: A. Ferriera & C. Gomez (Eds.). *Unraveling the safety profile of nanoscale particles and materials-from biomedical to environmental applications* (pp. 37-59). IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.69386.

# 9. SAŽETAK

**Ena Vrček**

**OPTIMIZACIJA PRIPRAVE ZLATNIH NANOČESTICA ZA CILJANU ISPORUKU LIJEKA L-DOPE**

Zbog svojih jedinstvenih fizikalnih i kemijskih svojstava, nanočestice zlata (AuNP) intenzivno se istražuju za različite primjene u biomedicini, uključujući dijagnostiku i ciljanu dostavu lijekova. Također predstavljaju atraktivnu platformu za ciljani transport lijekova u mozak jer mogu lako prodrijeti kroz krvno-moždanu barijeru te doprijeti do središnjeg živčanog sustava što je posebno zanimljivo za poboljšanje terapijske učinkovitosti lijekova koji se koriste za liječenje neurodegenerativnih bolesti. Parkinsonova bolest je druga najčešća neurodegenerativna bolest koju karakterizira smanjenje koncentracije dopamina u bazalnim ganglijima. Terapija Parkinsonove bolesti uglavnom se temelji na isporuci dopamina u mozak u obliku L-dope koja može proći krvno-moždanu barijeru. Međutim, L-dopa može izazvati nekoliko štetnih nuspojava, dok njezina dugotrajna primjena inducira toleranciju. Farmakoterapijski interes u liječenju Parkinsonove bolesti usmjeren je na uvođenje novih pristupa za postizanje kontinuirane dopaminergičke stimulacije, dugoročne sigurnosti i podnošljivosti terapijskih sustava koji istovremeno smanjuju nuspojave i težinu motoričkih fluktuacija i diskinezija povezanih s primjenom L-dope.

U ovom istraživanju ispitana su dva inovativna pristupa korištenjem L-adamantina (Ad) i monomera peptidoglikana (PGM) kao stabilizacijskih tvari za pripravu takvih AuNP sustava koje će učinkovitije vezati L-dopu. Jedinstvena strukturna i kemijska svojstva, biokompatibilnost i netoksičnost, kao i niska cijena i dostupnost Ad derivata pružaju izuzetne mogućnosti u dizajniranju različitih nosača za isporuku lijekova. Derivati Ad pokazuju važnost u kontekstu neurodegenerativnih bolesti, posebno Parkinsonove bolesti, zbog njihove lipofilnosti i svojstava koja povećavaju prodiranje kroz krvno-moždanu barijeru. S druge strane, PGM se također odlikuje biokompatibilnošću i stabilnošću u biološkim sustavima, a strukturno mogu značajno povećati učinkovitost vezanja lijeka na nanopovršinu.

Glavni cilj ovog istraživanja bio je ispitati nove strategije za razvoj multifunkcionalnih nanosustava za isporuku L-dope primjenom AuNP primjenom Ad-a i PGM-a, a nove Ad-AuNP i PGM-AuNP uspoređene su s dobro poznatim AuNP stabilizairanih s polietilen glikolom (PEG). Stoga je istraživanje utemeljeno na specifičnim ciljevima koji uključuju (a) optimizaciju sinteze različitih AuNP stabilizacijom pomoću PEG-a, Ad-a i PGM-a, (b) fizikalno-kemijsku karakterizaciju pripravljenih AuNP, (c) određivanje mehanizma vezanja L-dope na različito funkcionalizirane AuNP primjenom metode fluorescentnog gašenja, i (d) procjenu učinka serumskog albumina na vezanje L-dope na različito funkcionalizirane AuNP.

Istraživanjem su utvrđene optimizirane metode priprave stabilnih AuNP površinskom funkcionalizacijom s PEG-om, Ad-om i PGM-om. Sve tri pripremljene AuNP vrste bile su sferičnog oblika, negativno nabijene i hidrodinamičkog promjera u rasponu od 10 do 30 nm. Rezultati istraživanja su pokazali da je interakcija L-dope i različitih AuNP spontani proces jer su se interakcije odlikovale negativnim ΔG vrijednostima, dok su negativne vrijednosti ΔH i ΔS ukazale na to da se L-dopa veže na ispitivane AuNP putem vodikovih i van der Waalsovih interakcija. Najjače vezanje L-dope primijećeno je za PGM-AuNP, a najslabije za PEG-AuNP. Prisustvo albumina značajno je remetilo vezanje L-dope na PEG-AuNP i Ad-AuNP, dok je taj učinak bio najmanji za PGM-AuNP.

Uzimajući u obzir glavne izazove translacijskih istraživanja u neurodegenerativnim bolestima, ovo je istraživanje pokazalo važnost primjene novih nanotehnoloških sustava, kao i metodoloških pristupa u njihovom istraživanju, koji se mogu koristiti za poboljšanje učinkovitosti isporuke lijekova.

**Ključne riječi:** konstante vezanja, funkcionalizacija površine, spektrofluorimetrija

# 10. SUMMARY

**Ena Vrček**

**OPTIMIZATION OF GOLD NANOPARTICLE PREPARATION FOR TARGETED DELIVERY OF**

**L-DOPA**

Due to their unique physical and chemical properties, gold nanoparticles (AuNPs) have been extensively used in biomedical fields, including diagnostics, bio-imaging and targeted drug delivery. Moreover, they can be employed as an attractive platform for drug delivery into the brain as they can easily penetrate through the blood-brain barrier and interact with the central nervous system. Indeed, therapeutic efficacy of many drugs used for the treatment of neurodegenerative diseases has been challenged by the blood-brain barrier, which reduces the penetration to the central nervous system. Parkinson’s disease is the second most common neurodegenerative disease that is characterized by the decrease in dopamine concentration in basal ganglia. Therapy of Parkinson’s disease has been mostly based on the delivery of dopamine to the brain in the form of L-dopa that can pass the blood-brain barrier. However, L-dopa can induce several adverse side effects, while its long term administration induces tolerance. Pharmacotherapeutic interest in the treatment of Parkinson's disease is focused on the introduction of new approaches to obtain continuous dopaminergic stimulation, long-term safety and tolerability while reducing the occurrence and severity of motor fluctuations and dyskinesias associated with L-dopa

In this study, two innovative AuNP types as delivery system for L-dopa were investigated using L-adamantine (Ad) and peptidoglycan monomer (PGM) for AuNP functionalization. The unique structural and chemical properties of Ad provide exceptional capabilities in the design of different drug delivery system systems including biocompatibility and safety. Moreoevr, Ad derivatives showed importance in the context of neurodegenerative diseases, especially Parkinson’s disease, because of their lipophilicity and properties that increase penetration through blood-brain barrier. On the other hand, PGM also exhibit biocompatibility and stability in biological systems, while being structurally interesting to increase the binding efficiency of the drug to the nanosurface. Prepared spherical AuNPs functionalized with L-adamantine (Ad-AuNP) and PGM (PGM-AuNP) were compared with well known spherical AuNP stabilized with polyethylene glycol polymer (PEG-AuNP).

Specific goals of this study included (a) optimization of the synthesis of different AuNPs by using PEG, Ad and PGM, (b) physico-chemical characterization of prepared AuNPs, (c) determination of the binding mechanism of L-dopa to differently functionalized AuNP using the fluorescent quenching method, (d) evaluation of the effect of serum albumin on L-dopa binding to differently functionalized AuNPs.

Obtained results revealed that PEG-AuNP, Ad-AuNPs and PGM-AuNP, prepared by optimized and reproducible protocol, were spherical in shape, negatively charged and characterized with hydrodynamic diameter ranging from 10 to 30 nm. The interaction of L-dopa and all tested AuNP was a spontaneous process (indicated by negative ΔG values) that occured through hydrogen and van der Waals interactions as indicated by negative values of ΔH and ΔS. PGM-AuNP showed the highest and PEG-AuNP showed the lowest binding affinity for L-dopa. The presence of albumin significantly disrupted L-dopa binding to PEG-AuNP and Ad-AuNP, while this effect was minimal for PGM-AuNP.

Considering the major challenges of translational research in neurodegenerative diseases, this study demonstrated important methodological aspects in evaluating novel nanotechnological tools that may be used to enhance drug delivery efficacy.

**Key words:** binding constants, surface functionalization, spectrofluorimetry