

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Sergej Z. Tomić

**BIOKOMPATIBILNOST I
IMUNOMODULATORNE OSOBINE
NANOMATERIJALA NA BAZI
NANOČESTICA ZLATA I UGLJENIČNIH
NANOCEVI, I NAPREDNIH
BIOMATERIJALA NA BAZI NiTi I CuAlNi
LEGURA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014

UNIVERSITY IN BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Sergej Z. Tomić

**BIOCOMPATIBILITY AND
IMMUNOMODULATORY PROPERTIES
OF NANOMATERIALS BASED ON GOLD
NANOPARTICLES AND CARBON
NANOTUBES, AND NiTi- AND CuAlNi
ALLOY-BASED ADVANCED
BIOMATERIALS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentori:

Dr Miodrag Čolić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu i redovni član SANU

Dr Biljana Božić, vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Komisija u sastavu:

Dr Miodrag Čolić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu i redovni član SANU

Dr Biljana Božić, vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Dr Petar Uskoković, redovni profesor Tehnološko-Metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Ova doktorska disertacija je urađena na Institutu za biomedicinska istraživanja, Vojnomedicinske Akademije u Beogradu, pod rukovodstvom akademika Miodraga Čolića. Sinteza i karakterizacija, NiTi i CuAlNi legura i nanočestica zlata su sprovedeni u saradnji sa dr Rebekom Rudolf, dr Ivan Anžel i saradnicima sa Mašinskog fakultetu, Univerziteta u Mariboru, Slovenija, dr Bernd Fridrihom i saradnicima sa Instituta za Metalušku obradu i reciklažu metala, RWTH Aachen, Nemačka, i dr Albert C. Kneissl i saradnicima sa Instituta za Fizičku metalurgiju i testiranje metala, Univerziteta u Leobenu, Austrija. Sinteza i karakterizacija MWCNT je urađena u saradnji sa dr Petrom Uskokovićem i saradnicima sa Tehnološko-Metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Disertacija je realizovana u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Razvoj i standardizacija imunodijagnostičkih testova (ELISA i WESTERN BLOT) za dijagnostiku infekcija životinja i ljudi sa hemotropnim mikoplazmama“ (rukovodilac profesor dr Branislav Lako, br. 20124); i „Primena funkcionalizovanih ugljeničnih nanocevi i nanočestica zlata za pripremu dendritskih ćelija u terapiji tumora“ (rukovodilac akademik Miodrag Čolić, br. 175102), projekta Ministarstva odbrane Republike Srbije “Istraživanja biokompatibilnosti nanomaterijala” (rukovodilac akademik Miodrag Čolić br. VMA/06-10/B.2), EUREKA projekta „Synthesis of gold nano-particles for dental/medicine applications“ (rukovodilac dr Rebeka Rudolf, br. E!4953 GoNaNo), EUREKA projekta “Biomedical shape memory alloys” (rukovodilac dr Vojkan Lazić, br. E!3971 BIO-SMA), Bilateralnog projekta “Production Technology and Biocompatibility Studies of Au Nanoparticles” između Republike Srbije i Republike Slovenije (rukovodioci akademik Miodrag Čolić i dr Rebeka Rudolf), Projekta Evropske zajednice za integrisanu aktivnost (SPIRIT- Support of Public and Industrial Research Using Ion Beam Technology, br. 227102), i projekta „Production technologies of Au nanoparticles“ Nacionalne agencije za istraživanja Republike Slovenije (ARRS br. L2-4212)

Duboku zahvalnost dugujem svom mentoru **akademiku prof. dr Miodragu Čoliću** koji me je naučio svemu što znam, i što ne znam, a najvažnije, kako da na pouzdan način definišem tu granicu i dođem do naučne istine. Hvala mu i na neizmernoj podršci i ukazanom poverenju i strpljenju od prvih dana rada u laboratoriji.

Hvala **prof. dr Biljani Božić**, što mi je omogućila ulazak u svet imunologije, na svesrdnoj pomoći u toku realizacije diplomskog i doktorskog rada, kao i na važnim profesionalnim i životnim lekcijama.

Hvala **prof. dr Petru Uskokoviću** na svesrdnoj pomoći i korisnim savetima vezanim za izradu ove disertacije, a pre svega na produktivnoj istraživačkoj saradnji u ispitivanju bioloških svojstava ugljeničnih nanocevi. Zahvalnost dugujem **dr Goranu Vukoviću i doc. dr Aleksandru Marinkoviću** koji su mi svesrdno pomogli tokom ovih istraživanja.

Hvala **prof. dr Rebeki Rudolf** što mi je omogućila stručno usavršavanje u Sloveniji, upoznala me sa svetom materijala, a posebno legurama koje pamte oblik i nanočesticama zlata. Hvala joj i na svesrdnom gostoprimstvu, prijateljstvu i prilici da upoznam njenu divnu porodicu **Živu Ramšak i Rajka Bobeka**.

Hvala i **prof. dr Marjanu Rupniku** što mi je omogućio izvođenje eksperimenata na dvofotonskom mikroskopu u njegovoj laboratoriji. U tom smislu veliku zahvalnost dugujem i saradnicima sa Instituta za fiziologiju Medicinskog fakulteta u Mariboru **Rudiju Mlakaruu, Andraž Stožeru, Juriju Dolenšekuu i Janezu Prešernuu**.

Hvala **prof. dr Primož Peliconu** što mi je omogućio boravak na Institutu Jožef Štefan, i rad na protonskom mikroskopu. Veliku pomoć u ovim istraživanjima su mi pružili i **Nina Ogrinc, Primož Vavpetič i Luka Jeromel** kojima se takođe zahvaljujem

Hvala **prof. dr Ivan Anželu i Igoru Orožimu** sa Instituta za tehnologiju materijala Mašinskog fakulteta u Mariboru što su mi omogućili rad na FIB/SEM-u i pružali neprocenjive savete. Takođe hvala i saradnicima ovog Instituta **Lidiji Zorko, Niku Rozmanu, Janiju Ferčecu i Tjaši Zupančić Hartner** na srdačnom gostoprimstvu, saradnji i druženju tokom boravka u Sloveniji.

Takođe se zahvaljujem **prof. dr Albert C Kneisslu, Kambiz Mehrabiju i Mihaelu Brunčku** sa Univerziteta u Leobenu na odličnoj saradnji na polju materijala koji pamte oblik.

Hvala prof. dr Bernd Friedrichu i dr Srećku Stopiću sa RWTH Univerziteta u Ahenu na odličnoj saradnji na polju nanočestica zlata.

Hvala prof. dr Moniki Jenko, dr Dariji Jenko i dr Djordju Mandrinu sa Instituta za kovinske materijale i tehnologije, Univerziteta u Ljubljani na saradnji tokom mikrostrukture legura koje pamte oblik i nanočestica zlata.

Hvala prof. dr Dragani Vučević, dr Saši Vasiljić, Ivani Majstorović i dr Petru Milosavljiću što su me primili u svoj tim, naučili različitim laboratorijskim veštinama, i pružili brojne prijateljske i stručne savete od početka rada u laboratoriji.

Hvala Srđi Jankoviću na velikoj pomoći oko izvođenja eksperimenata na protočnom citometru I na brojnim naučnim i životnim diskusijama

Hvala dr Tanji Džopalić, dr Ani Dragičević, Ivanu Rajkoviću, Dušanu Mihajloviću i Milanu Markoviću, i Jeleni Rajković na velikoj pomoći tokom izvođenja eksperimenata i još boljem druženju.

Hvala svim prijateljima na svesrdnoj podršci i razumevanju.

Hvala Miloradu, Milijani i Dejanu Đokić na svesrdnoj podršci, pomoći i razumevanju.

Hvala majci Branki, ocu Zlatku i sestri Sonji što su me podržavali u svemu što radim i zbog kojih sam kakav sam.

Najveću zahvalnost dugujem Jeleni Đokić na neprocenjivoj pomoći pri osmišljavanju i izvođenju eksperimenata, analizi i tumačenju rezultata, sugestijama tokom pisanja radova i ove teze, sugestijama oko kuvanja ručkova, merenja temperature, stavljanja obloga, nošenja čarapa i papuča, svoj brizi, suzama i osmesima, strpljenju, ljubavi, Barbari i njenoj divnoj ličnosti, i deljenju svih najtežih i najboljih trenutaka u mom životu...i dugovaću dok postojim.

*Mojim roditeljima,
Branki i Zlatku Tomić*

SADRŽAJ	Str.
SPISAK SKRAĆENICA	i
SAŽETAK	v
ABSTRACT	viii
1. UVOD	1
1.1 DEFINICA BIOMATERIJALA	1
1.2 DEFINICIJA NANOMATERIJALA	2
1.3 DEFINICIJA BOKOMPATIBILNOSTI	4
1.4 KARAKTERISTIKE IMUNSKOG ODGOVORA NA BIOMATERIJALE I NANOMATERIJALE	8
1.4.1 Imunski odgovor na biomaterijale	8
1.4.2. Makrofagi	10
1.4.2.1 Klasično aktivirani makrofagi	12
1.4.2.2 Alternativno aktivirani makrofagi	13
1.4.2.3 Uloga makrofaga u odgovoru na biomaterijale	14
1.4.3 Dendritske ćelije.....	15
1.4.3.1 Inflamacijske dendritske ćelije	18
1.4.3.2 Tolerogene dendritske ćelije	20
1.4.3.3 Uloga dendritskih ćelija u odgovoru na biomaterijale.....	21
1.4.4 Specifičnosti imunskog odgovora na nanomaterijale.....	22
1.4.4.1 Mehanizmi preuzimanja nanomaterijala	23
1.4.4.2 Efekti nanomaterijala na imunski sistem	27
1.4.4.3. Efekti nanomaterijala na makrofage	29
1.4.4.4 Efekti nanomaterijala na dendritske ćelije	30
1.5 KARAKTERISTIKE BIOMATERIJALA	31
1.5.1 Napredni biomaterijali	31
1.5.2 Karakteristike legura koje pamte oblik	32
1.5.2.1 Fazne transformacije SMA.....	33
1.5.2.2 Efekat pamćenja oblika i superelastičnost.....	35
1.5.2.3. Efekat amortizacije	35
1.5.2.4 Upporedne mikrostrukturne karakteristike NiTi i CuAlNi SMA	36
1.5.2.5 Primena SMA u medicini	38
1.5.2.6 Priprema SMA konvencionalnim metodama i brzim otvrdnjavanjem valjanjem rastopine.....	40

1.5.3 Biokompatibilnost legura koje pamte oblik.....	42
1.5.3.1 Karakteristike površine SMA.....	43
1.5.3.2 Korozivnost SMA.....	44
1.5.3.3 Biokompatibilnost CuAlNi i NiTi legura.....	46
1.5.3.4 Toksičnost metalnih jona.....	48
1.5.3.5 Imunski odgovor na jone metala.....	50
1.6 KARAKTERISTIKE NANOMATERIJALA	52
1.6.1 Istorijski razvoj nanomaterijala.....	52
1.6.2 Karakteristike nanočestica zlata.....	55
1.6.2.1 Kvantni efekti nanočestica.....	56
1.6.2.2 Površinska plazmon rezonanca.....	56
1.6.2.3 Sinteza nanočestica zlata.....	59
1.6.2.4 Sinteza nanočestica zlata ultrasoničnom sprej pirolizom	60
1.6.3 Biološka primena nanočestica zlata.....	61
1.6.3.1 Vizuelizacija i oslikavanje bioloških struktura pomoću GNP ...	62
1.6.3.2 Analitičke metode na bazi nanočestica zlata	64
1.6.3.3 Primena nanočestica zlata u fototermalnoj terapiji	65
1.6.3.4 Primena nanočestica zlata kao terapeutika	68
1.6.3.5 Primena nanočestica zlata kao nosača biomolekula	68
1.6.4. Biokompatibilnost nanočestica zlata.....	69
1.6.4.1 Citotoksičnost in vitro.....	69
1.6.4.2 Citotoksičnost in vivo.....	71
1.6.4.3 Imunološki efekti nanočestica zlata.....	72
1.6.5. Karakteristike ugljeničnih nanocevi	74
1.6.5.1 Struktura i morfologija ugljeničnih nanocevi	75
1.6.5.2 Sinteza ugljeničnih nanocevi	76
1.6.6. Biološka primena ugljeničnih nanocevi	77
1.6.6.1. Funkcionalizacija ugljeničnih nanocevi	77
1.6.6.2 Primena ugljeničnih nanocevi kao nosača biomolekula	79
1.6.7. Biokompatibilnost ugljeničnih nanocevi	82
1.6.7.1 Citotoksičnost in vitro	82
1.6.7.2 Citotoksičnost in vivo	83
2. HIPOTEZE I CILJEVI ISPITIVANJA	85
3. MATERIJALI I METODE	87
3.1. NAPREDNI BIOMATERIJALI.....	87

3.1.1. NiTi RS SMA	87
3.1.1.1 Priprema NiTi RS traka i kontrolnih NiTi pločica	87
3.1.1. 2 Priprema NiTi legura za testove biokompatibilnosti i kondicioniranje	88
3.1.1.3 Mikrostrukturna analiza NiTi RS traka i dubinski profil	89
3.1.1.4 Ispitivanje korozivnih osobina NiTi RS traka	89
3.1.2 CuAlNi LEGURE	90
3.1.2.1 Priprema CuAlNi RS traka i kontrolnih CuAlNi pločica	90
3.1.2.2 Priprema CuAlNi legura za testove biokompatibilnosti i kondicioniranje	90
3.1.2.3 Ispitivanje korozivnih osobina CuAlNi legura	91
3.2. NANOMATERIJALI.....	91
3.2.1 Nanaočestice zlata.....	91
3.2.1.1 Priprema nanaočestica zlata iz sekundarnih zlatnih sirovina ...	91
3.2.1.2 Teorijske pretpostavke u sintezi nanaočestica USP metodom ...	92
3.2.1.3 Karakterizacija nanaočestica zlata	92
3.2.2 Ugljenične nanocevi	96
3.2.2.1 Priprema i oksidacija ugljeničnih nanocevi	96
3.2.2.2 Funkcionalizacija o-MWCNT dapsonom, 7-TOG agonistom i FITC-om	97
3.2.2.3 Karakterizacija uzoraka MWCNT	98
3.3. IZOLACIJA I KULTIVACIJA ĆELIJA	99
3.3.1. Kultivacija L929 i HEp-2 ćelijskih linija	99
3.3.2. Brojanje ćelija	100
3.3.3 Izolacija peritoneumskih makrofaga pacova	100
3.3.4. Izolacija timocita i splenocita pacova	101
3.3.5. Izolacija perifernih humanih mononuklearnih ćelija	101
3.3.6 Izdvajanje monocita i T limfocita iz PBMC	102
3.3.7 Diferencijacija DC iz monocita	103
3.4. EKSPERIMENTALNE ĆELIJSKE KULTURE	104
3.4.1 Citotoksičnost CuAlNi SMA legura u kulturi PMØ	104
3.4.2 Citotoksičnost CuAlNi i NiTi legura u kulturi humanih PBMC	104
3.4.3 Citotoksičnost NiTi legura u kulturi humanih DC	105
3.4.4. Maturacija DC u prisustvu NiTi SMA	105

3.4.5. Citotoksičnost nanočestica zlata u kulturi pacovskih timocita i splenocita i L929 ćelija	105
3.4.6. Maturacija DC u prisustvu GNP i nekrotičnih HEp-2 ćelija ...	106
3.4.7 Citotoksičnost dap-MWCNT uzoraka u kulturi sa PMØ	107
3.4.8 Citotoksičnost dap-MWCNT u kulturi humanih DC	107
3.4.9. Maturacija DC u prisustvu uzoraka MWCNT	107
3.5. ANALIZE CITOTOKSIČNOSTI	108
3.5.1. Testovi vijabilnosti	108
3.5.2. Testovi apoptoze	109
3.5.3 Merenje metaboličke aktivnosti ćelija	109
3.5.4 Merenje oksidativnog stresa	110
3.6 FENOTIPSKE ANALIZE	111
3.6.1 Fenotipska analiza protočnom citometrijom	111
3.6.2 Citohemijska i imunocitohemijska analiza	111
3.6.3. Morfološka analiza pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije	114
3.7 ANALIZA INTERNALIZACIJE NANOMATERIJALA	115
3.7.1 Analiza internalizacije GNP od strane DC	115
3.7.1.1 Analiza internalizacije konfokalnom mikroskopijom	115
3.7.1.2. Analiza internalizacije transmissionom elektronskom mikroskopijom	115
3.7.1.3 Analiza internalizacije skenirajućom elektronskom mikroskopijom sa fokusiranim jonskim zrakom	116
3.7.1.4. Analiza internalizacije GNP protonskom mikroskopijom	118
3.7.1.4.1 Primpema uzoraka	118
3.7.1.4.2. Aproksimacija elementalne analize za tanke uzorke	119
3.7.2 Analiza internalizacije dap-MWCNT od strane PMØ	120
3.7.2.1. Analiza internalizacije protočnom citometrijom	121
3.7.2.2. Analiza internalizacije svetlosnom mikroskopijom	121
3.7.2.3. Analiza internalizacije konfokalnom mikroskopijom	121
3.7.2.4. Analiza internalizacije transmissionom elektronskom mikroskopijom	121
3.7.3. Analiza internalizacije MWCNT od strane DC	122
3.7.3.1. Analiza svetlosnom mikroskopijom i protočnom citometrijom	122

3.7.3.2. Kolokalizaciona analiza 7-TOG-MWCNT i TLR7	122
3.7.3.3. Analiza internalizacije MWCNT transmisionom elektronskom mikroskopijom	123
3.8. ANALIZE FUNKCIONALNIH OSOBINA ĆELIJA	123
3.8.1. Alogene mešane leukocitne reakcije	123
3.8.2 Citotoksična aktivnost T limfocita	124
3.8.3. Detekcija citokina i biomolekula	124
3.8.3.1. Određivanje citokina u kulturi PMØ i CuAlNi legura	124
3.8.3.2. Određivanje polarizacionog kapaciteta DC u kulturi sa NiTi legurama	124
3.8.3.3. Određivanje nivoa citokina u kulturi humanih PBMC i SMA legura	125
3.8.3.4. Određivanje nivoa citokina u kulturi aktiviranih splenocita ..	125
3.8.3.5. Određivanje polarizacionog kapaciteta DC u kulturi sa GNP	125
3.8.3.6. Određivanje nivoa citokina u kulturi DC i dap-MWCNT	125
3.8.3.7. Određivanje produkcije NO i IL-6 od strane PMØ kultivisanih sa dap-MWCNT	126
3.8.4 Merenje oksidativnog praska u kulturi PMØ i dap-MWCNT ..	126
3.8.5 Merenje oscilacija kalcijuma u DC kultivisanim sa GNP	126
3.9. STATISTIČKA ANALIZA	128
4. REZULTATI.....	129
4.1. BIOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULATORNE OSOBINE NAPREDNIH BIOMATERIJALA.....	129
4.1.1. Biokompatibilnost CuAlNi SMA na modelu PMØ	129
4.1.1.1 Efekat CuAlNi legura na metaboličku aktivnost i vijabilnost PMØ	130
4.1.1.2. Efekat kondicioniranog medijuma CuAlNi legura na nekrozu, apoptozu, stvaranje ROS i produkciju citokina od strane PMØ.	133
4.1.1.3. Efekat ekstrakta CuAlNi legura na produkciju proinflamacijskih citokina od strane PMØ	136
4.1.1.4. Mikrostruktura površine CuAlNi RS traka.....	137
4.1.2. Biokompatibilnost CuAlNi SMA na modelu humanih PBMC.	139
4.1.2.1 Citotoksičnost CuAlNi RS SMA u kulturi humanih PBMC	139
4.1.2.2 Imunomodulatorni efekti CuAlNi RS SMA legura u kulturi aktiviranih PBMC	141
4.1.3 Biokompatibilnost NiTi RS SMA na modelu humanih PBMC.	144

4.1.3.1 Citotoksičnost NiTi RS SMA u kulturi humanih PBMC.....	144
4.1.3.2 Imunomodulatorni efekti NiTi RS SMA u kulturi aktiviranih PBMC	146
4.1.4 Biokompatibilnost NiTi RS SMA NA modelu humanih DC ...	149
4.1.4.1 Efekat NiTi RS traka i kontrolnih NiTi pločica na vijabilnost DC	149
4.1.4.2 Uticaj NiTi RS SMA na fenotipsko sazrevanje DC	153
4.1.4.3 Funkcionalne osobine DC kultivisanih sa NiTi RS trakama	155
4.1.4.4 Fenotipske i funkcionalne osobine DC aktiviranih LPS-om u kulturi sa NiTi RS trakama	157
4.1.5 Površinska mikrostruktura i dubinski profil NiTi RS traka	163
4.2. BOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULATORNE OSOBI NE NANOČESTICA ZLATA	169
4.2.1 Biokompatibilnost i imunomodulatorne osobine nanočestica zlata dobijenih USP metodom	169
4.2.1.1 Mikrostrukturna analiza frakcija GNP	170
4.2.1.2. Citotoksičnost frakcija nanočestica zlata na modelu pacovskih timocita i L929 ćelija	177
4.2.1.3. Citotoksičnost i imunomodulatorne osobine frakcija GNP na modelu splenocita aktiviranih sa Con-A	182
4.2.2 Efekat GNP na maturaciju i antitumorsku funkciju humanih dendritskih ćelija	192
4.2.2.1 Dozno zavisni efekti GNP na apoptozu i nekrozu DC	192
4.2.2.2 Efekti GNP na sazrevanje i funkciju DC stimulisanih LPS-om .	195
4.2.2.3. Uticaj GNP na oscilacije Ca ²⁺ DC u toku sazrevanja u prisustvu LPS-a	201
4.2.2.4 Internalizacija, kvantifikacija i intracelularna distribucija GNP unutar DC	204
4.2.2.5 Efekti GNP na maturaciju i funkciju DC stimulisanih nekrotičnim HEP-2 ćelijama	215
4.3. BOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULACIJSKE OSOBI NE UGLJENIČNIH NANOCEVI FUNKCIONALIZOVANIH DAPSONOM	225
4.3.1. Sinteza i karakterizacija funkcionalizovanih MWCNT	225
4.3.2. Internalizacija funkcionalizovanih MWCNT	233
4.3.2.1 Internalizacija dap-MWCNT od strane PMØ	233

4.3.2.2 Internalizacija dap-MWCNT od strane DC	239
4.3.2.3 Internalizacija 7-TOG-MWCNT od strane DC	243
4.3.3 Citotoksičnost i imunomodulatorne osobine MWCNT	
funkcionalizovanih dapsonom	249
4.3.3.1 Citotoksičnost dap-MWCNT u kulturi PMØ	250
4.3.3.2 Efekat dap-MWCNT na oksidativni prasak PMØ	254
4.3.3.3 Efekat dap-MWCNT na produkciju NO i IL-6 od strane PMØ	257
4.3.3.4 Citotoksičnost dap-MWCNT na modelu humanih DC	260
4.3.3.5 Efekat dap-MWCNT na fenotip i produkciju citokina od	
strane DC	262
4.3.3.6 Efekat dap-MWCNT na fenotip i produkciju citokina od	
strane DC u proinflamacijskom miljeu	268
5. DISKUSIJA	273
5.1. BIOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULATORNE	
OSOBINE NAPREDNIH BIOMATERIJALA	273
5.1.1 Citotoksični efekti CuAlNi legura na modelu PMØ pacova.....	273
5.1.2 Efekti CuAlNi i NiTi SMA na vijabilnost i produkciju	
citokina od strane humanih PBMC	278
5.1.3 Efekat NiTi RS traka i kontrolnih NiTi pločica na vijabilnost i	
fenotip DC	281
5.1.4. Funkcionalne osobine DC kultivisanih u prisustvu NiTi RS	
traka	284
5.1.5 Fenotipske i funkcionalne osobine DC aktiviranih LPS-om u	
kulturi sa NiTi RS trakama.....	287
5.1.6 Mikrostruktura NiTi RS traka	289
5.1.7 Potencijalni mehanizmi delovanja NiTi RS traka i njihova	
primena	292
5.2. BIOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULATORNE	
OSOBINE NANOČESTICA ZLATA	296
5.2.1. Mikrostruktorna analiza frakcija GNP dobijenih USP	
metodom	297
5.2.2 Citotoksičnost frakcija GNP na modelu timocita pacova i	
L929 ćelija	299

5.2.3. Citotoksičnost i imunomodulatorne osobine frakcija GNP na modelu splenocita aktiviranih pomoću Con-A	303
5.2.4. Efekat GNP na maturaciju i funkciju humanih DC stimulisanih LPS-om	306
5.2.5 Internalizacija, i intracelularna distribucija GNP unutar DC ...	309
5.2.6. Efekti GNP na maturaciju i funkcije DC stimulisanih nekrotičnim HEp-2 ćelijama	311
5.3. BOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULACIJSKE OSOBINE FUNKCIONALIZOVANIH UGLJENIČNIH NANOCEVI.....	312
5.3.1 Sinteza i karakterizacija dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT.....	313
5.3.2 Internalizacija dap-MWCNT u kulturi i 7-TOG-MWCNT.....	315
5.3.3 Citotoksičnost MWCNT.....	318
5.3.4 Efekat dap-MWCNT na redoks statusa i oksidativni prasak PMØ	320
5.3.5. Efekat dap-MWCNT na produkciju NO i IL-6 od strane PMØ	323
5.3.6 Imunomodulacijski efekat dap-MWCNT na nezrele DC	325
5.3.7. Imunomodulacijski efekti dap-MWCNT na DC u proinflamacijskom citokinskom miljeu	328
6. ZAKLJUČCI	330
6.1. BOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULACIJSKE OSOBINE CuAlNi I NiTi LEGURA	330
6.2. BOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULACIJSKE OSOBINE NANOČESTICA ZLATA	331
6.2. BOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULACIJSKE OSOBINE FUNKCIONALIZOVANIH UGLJENIČNIH NANOCEVI.....	332
Literatura	333
Prilozi	398
Biografija	509

SPISAK SKRAĆENICA

7-TOG-	7-tia-8-oksoguanozin
ADP-	adenozin difosfat
Af-	krajnja temperatura austenita
AFM-	Mikroskopija atomskih sila (engl. atomic force microscopy)
AKT-	protein kinza B
AP-1-	aktivirajući protein 1
As-	početna temperatura austenita
ATP-	adenozin trifosfat
BSE-	unazad odbijeni elektroni (engl. Backscattered electrons)
C-	Kapacitanca
cAMP-	ciklični adenzin modofosfat
CCD-	uređaj za konvertovanje šarže (engl. charge-coupled device)
CLIC-	klatrin- i dinamin-nezavisni nosači (engl. clathrin- and dynamin-independent carriers)
ConA-	konkanavalin A
COX2-	ciklooksigenaza 2
CTAB-	cetil trimetilamonium bromid
CTLA-4-	antigen 4 citotoksičnih T limfocita (engl. cytotoxic T lymphocytes antigen 4)
DAMP-	molekuli obrasci oštećenja (engl. damage associated molecular patterns)
dap-MWCNT-	dapsonom funkcionalizovane MWCNT
DHR-	dihidrorodamin 123
DIEA -	N,N-diizopropiletilamin
DLS-	dinamičko raspršivanje svetlosti (engl. dynamic light scattering)
DMF –	dimetilformamid
DSC-	diferencijalna skenirajuća kalorimetrija
dsDNK-	dvolančana DNK (engl. double strand DNA)
ECM-	ekstraćelijski matriks
EDX-	energija dispergovanog X zraka
EGF-	epidermni faktor rasta
EGFR-	receptor za epidermalni faktor rasta (engl. epidermal growth factor receptor)
ERK-	ekstracelularnim signalom regulisana kinaza

FIB-	fokusirani jonski zrak (engl. Focused ion beam)
FITC-	fluorescein izotiocijanat
fMLP-	formil-metionil-leucil-fenilalanin (engl. Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine)
FS-	svetlost raspršena u napred (engl. Forward scatter)
FT-IR	infracrvena spektroskopija sa Furijerovom transformacijom
GNP-	nanočestice zlata (engl. Gold nanoparticles)
GSH-	redukovana forma glutationa
GSSG-	oksidovana forma glutationa
HATU-O-R-	intermedijerni estar N-HATU i R
HIV-	virus humane imunodeficijencije (engl. human immunodeficiency virus)
HMGB-1-	engl. High-mobility group box 1
Hsp-	protein toplotnog stresa (engl. Heat shock protein)
HUVEC-	humane endotelne ćelije iz umbilikalne vene (engl. Human umbilical vein endothelial cells)
ICA-	Analiza korelacije intenziteta (engl. Intensity correlation analysis)
ICP-AES-	induktivno spreguta atomska emisiona spektroskopija
ICP-MS-	induktivno spreguta plazma masena spektroskopija
IFN-	interferon
IL-	interleukin
IRF-	faktor koji odgovara na interferon ili IFN-regulišući faktor (engl. Interferon responsive/regulating factor)
ITAM-	imunoreceptorski tirozinski aktivacioni motiv
JNK-	Jun N-terminalna kinaza
LPS-	lipopolisaharid <i>E.coli</i>
MCP-	makrofagni hemoatraktantni protein (engl. macrophage chemoattractant protein)
MEMS-	mikroelektromehanički sistem
Mf-	krajnja temperatura martenzita
MFI-	srednji intenzitet fluorescence (engl. mean fluorescence intensity)
MIP-	makrofagni inflamatorni protein
MLR-	mešana leukocitna reakcija.
MoDC-	monocitne dendritske ćelije (engl. Monocyte-derived Dendritic Cells)
MPO-	mijeloperoksidaza
Ms-	početna temperatura martenzita

MWCNT -	primarne višeslojne ugljenične nanocevi (engl. multi-walled carbon nanotubes)
MyD88-	mijeloidni faktor diferencijacije protein 88
NADPH-	redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NALP3-	engl. Nacht Domain-, Leucine-Rich Repeat-, and PYD-Containing Protein 3
NEMO-	NF-κB esencijalni modulator
NF-κB-	jedarni faktor pojačivač (enhancer) kappa lakog lanca aktiviranih B ćelija (engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
N-HATU-	O-(7-azabenzotriazol-1-il)- N, N, N0, N0 - tetrametiluronijum heksafluorofosfat
NK-	ćelije prirodne ubice (engl. natural killer cells)
NO-	azot oksid
NOS-	azot oksid sintaza
o-MWCNT –	oksidovane MWCNT
PAMP-	molekulski obrasci patogena (engl. pathogen associated molecular patterns)
PBMC-	mononuklearne ćelije periferne krvi (engl. peripheral blood mononuclear cells)
PBS-	fosfatni pufer (engl. phosphate buffered saline)
PD-1-	protein 1 programirane ćelijske smrti (engl. programmed cell death-1)
PDE-	fosfodiesteraza
PEG-	polietilen glikol
PI3K–	fosfatidil inozitol 3 kinaza
PI-	propidiju jodid
PIXE-	protnoska mikroskopija (engl. particle induced X ray emission)
PKC-	protein kinaza C
PMA-	forbol miristat acetat (engl. phorbol myristate acetate)
PMMA-	polimetilmetaakrilat
PMØ-	peritoneumski makrofagi
PTFE-	politetrafluoroetilen
redoks-	redukciono-oksidaciono
ROS-	reaktivne vrste kiseonika (engl. reactive oxigen species)
RS-	brzo stvrdnute (engl. rapidly solidified)
SCM-	materijali koji menjaju oblik (engl. shape change materials)
SD-	standardna devijacija

SDH-	sukcinat dehidrogenaza
SE-	sekundarni elektroni
SE-	standardna greška
SEM-	skenirajuća elektronska mikroskopija
SERCA-	sarko/endoplazmatično retikulumska Ca ²⁺ ATPaza
siRNK-	male intereferirajuće RNK (engl. small interfering RNA)
SMA-	legure koje memorišu oblik (engl. Shape-memory alloys)
SMC-	keramike koje memorišu oblik (engl. shape memory ceramics)
SMc-	kompoziti koji memorišu oblik (engl. shape memory composites)
SMG-	gelovi koji memorišu oblik (engl. shape memory gels)
SMM-	materijali koji memorišu oblik (engl. shape memory materials)
SMP-	polimeri koji memorišu oblik (engl. shape memory polymers)
SOCS-	inhibitor citokinske signalizacije (engl. suppressor of cytokine signalling)
SOD-	superoksid dismutaza
SRM- materials)	materijali koji odgovaraju na stimulus (engl. stimulus-responsive materials)
SS-	svetlost raspršena u stranu (engl. Side scatter)
ssDNK-	jednolančana DNK (engl. single strand DNA)
SWCNT-	primarne jednoslojne ugljenične nanocevi (engl. single-walled carbon nanotubes)
TEM-	transmisiona elektronska mikroskopija
TGA-	Termogravimetrijska analiza
TIR-	domen homologan TLR i IL-1βR
TLR-	tolu slični receptori (engl. Toll-like receptors)
TNF-	faktor nekroze tumora (engl. tumour necrosis factor)
TRIF-	TIR sadržući adaptor koji indukuje IFN-β
Trim 23-	tripartitni motiv 23
USP-	Ultrasonična sprej piroloza
VEGF-	vaskularni endotelni faktor rasta.
XPS-	fotoelektronska spektroskopija X-zracima (X-ray photoelectron spectroscopy)

Biokompatibilnost i imunomodulatorne osobine nanomaterijala na bazi nanočestica zlata i ugljeničnih nanocevi, i naprednih biomaterijala na bazi NiTi i CuAlNi legura

Napredni biomaterijali na bazi NiTi i CuAlNi legura koje memorišu oblik (SMA) su vrlo atraktivni za izradu biomedicinskih implantata i uređaja. Međutim, biokompatibilnost NiTi i CuAlNi legura proizvedenih konvencionalnim metodama je često loša usled njihove neodgovarajuće površinske mikrostrukture koja omogućava oslobađanje metalnih jona u okolni medijum. U ovom radu je primenjen nov metod sinteze brzo stvrdnutih (RS) SMA valjanjem rastopine. Biokompatibilnost i imunomodulacijske osobine SMA legura su ispitane na modelima peritoneumskih makrofaga pacova (PMØ) i humanih dendritskih ćelija monocitnog porekla (DC), i na humanim mononuklearima periferne krvi (PBMC) izolovanim iz 20 različitih donora. Pokazano je da RS SMA, za razliku od kontrolnih SMA pripremljenih konvencionalnim metodama istog sastava, ne ispoljavaju citotoksičnost prema ispitivanim ćelijama. Osnovni razlog tome je što je na površini RS SMA formiran tanak homogeni sloj oksida koji štiti SMA od korozije, a inkubiranjem u medijumu dolazi do njegovog zadebljavanja. Međutim, pokazano je da CuAlNi RS SMA stimulišu produkciju IL-6 i izazivaju oksidativni stres kod PMØ, ali ne menjaju produkciju proinflamacijskih citokina u većini kultura PBMC stimulisanih mitogenom. Sa druge strane, NiTi RS SMA stimulišu produkciju IL-10 u 25% kultura stimulisanih kultura PBMC. U skladu sa tim je pokazano da NiTi RS SMA stimulišu fenotipsko sazrevanje DC koje produkuju veći nivo IL-10 i IL-27, i stimulišu produkciju IL-10 i TGF- β u ko-kulturi sa CD4⁺T ćelijama. Međutim, DC kultivisane na NiTi RS SMA u prisustvu LPS-a poseduju veći alostimulatorni kapacitet i stimulišu Th1 imunski odgovor *in vitro*. Ovi rezultati ukazuju na to da se RS SMA mogu bezbedno iskoristiti kao implantati kod većine pacijenata, ali je neophodno razmotriti i da li bi imunomodulacijske osobine ovih legura mogle izazvati neželjene posledice kod nekih pacijenta.

Nanočestice zlata (GNP) su vrlo atraktivne za primenu u dijagnostici i fototermalnoj terapiji tumora. Međutim, njihova biokompatibilnost i imunomodulacijske osobine nisu dovoljno ispitane, što je neophodno za njihovu bezbednu primenu u biomedicini. U ovom radu je primenjen nov metod sinteze GNP ultrasoničnom sprej pirolizom (USP). Pri tome je sintetisano 5 različitih frakcija GNP različitih mikrostrukturnih odlika. Citotoksičnost GNP

sintetisanih USP metodom je ispitivana u kulturi L929 ćelija, timocita i splenocita pacova, a imunomodulacijske osobine u modelu konkanavalinom A (ConA) stimulisanih splenocita. Pokazano je da frakcije 1 i 2, sastavljene od čistog zlata, ne izazivaju citotoksičnost ispitivanih ćelija. Ostale frakcije GNP izazivaju citotoksičnost u zavisnosti od koncentracije mikrolegirajućih elemenata u njihovom sastavu i osetljivosti ispitivane ćelijske linije. Frakcija 2, koja je sintetisana pod većom ultrasoničnom frekvencijom i sadrži partikule manje veličine u poređenju sa frakcijom 1, ispoljava anti-proliferativni efekat, inhibira produkciju IL-2 i stimuliše produkciju IL-10 u kulturi splenocita stimulisanih pomoću ConA. Sličan imunosupresivni efekat je potvrđen i u kulturi humanih DC kultivisanih u prisustvu GNP veličine 10 nm ili 50nm. Naime, pokazano je da DC internalizuju GNP mehanizmima koji dominantno zavise od dinamina. Oba tipa GNP inhibiraju maturaciju i alostimulacijsku sposobnost DC stimulisanih LPS-om, s tim da su efekti GNP₁₀ izraženiji. GNP₁₀ suprimiraju produkciju IL-12p70 od strane DC stimulisanih LPS-om, i potenciraju njihovu Th2 polarizacijsku sposobnost u ko-kulturi sa CD3⁺ T ćelijama, dok GNP₅₀ potenciraju Th17 imunski odgovor *in vitro*. Ovakvi efekti GNP₁₀ koreliraju sa snažnijom inhibicijom promena u oscilaciji Ca²⁺ koje indukuje LPS, ali i sa većim brojem internalizovanih nanočestica, kao i njihovom češćom ekstra-endozomalnom lokalizacijom. GNP₁₀ inhibiraju maturaciju i funkcije DC i kada se oslobode iz nekrotičnih tumorskih HEp-2 ćelija. Na ovom modelu je pokazano da GNP₁₀, za razliku od GNP₅₀, potenciraju Th2/Th17 polarizacijsku sposobnost DC, i suprimiraju njihov kapacitet da indukuju citotoksične T ćelije prema HEp-2 ćelijama. Na osnovu ovih rezultata je zaključeno da GNP₁₀, delovanjem na DC, mogu potencijalno indukovati više nepoželjenih efekata na imunski sistem, u odnosu na GNP₅₀.

Funkcionalizovane višeslojne ugljenične nanocevi (MWCNT) su veoma pogodne za primenu kao nosači lekova i biomolekula do ciljnih ćelijskih odeljaka. Međutim, njihova biokompatibilnost i imunomodulacijske osobine zavise od prirode biomolekula koji je za njih vezan. U tom smislu je ispitana mogućnost internalizacije, citotoksičnost i imunomodulacijske osobine MWCNT konjugovanih sa dapsonom (dap), lekom protiv intracelularnih bakterija, ili 7-tia-8-oksoguanizinom (7-TOG), agonistom Toll-u sličnog receptora (TLR)-7, na modelu PMØ pacova i humanih DC. Konjugacija dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT je potvrđena infracrvenom spektroskopijom sa Fourierovom transformacijom, transmisionom elektronskom mikroskopijom, termogravimetrijskom i

elementalnom analizom. Analiza na svetlosnoj, konfokalnoj, elektronskoj mikroskopiji i protočnoj citometriji je potvrdila da PMØ i DC internalizuju dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT. Pri tome je pokazano da se dap-MWCNT akumuliraju u endozomima PMØ i DC u sličnoj meri kao i kontrolne oksidovane (o)-MWCNT. Sa druge strane, 7-TOG-MWCNT se akumuliraju u endozomima DC u znatno većoj meri nego o-MWCNT, pri čemu 7-TOG-MWCNT interaguju sa TLR7 u endozomima DC. Ispitivanjem bioloških svojstava dap-MWCNT, pokazano je da ovaj konjugat poseduje manju citotoksičnost prema PMØ i DC u poređenju sa kontrolnim o-MWCNT, koje izazivaju oksidativni stres u PMØ. Solubilni dapson indukuje manji oksidativni stres kod PMØ, i sam inhibira apoptozu PMØ, dok u prisustvu o-MWCNT snažno potencira njegova dejstva. U skladu sa tim, o-MWCNT, za razliku od dap-MWCNT, inhibiraju oksidativni prasak PMØ, produkciju NO i IL-6 od strane PMØ. Sa druge strane, dap-MWCNT u prisustvu LPS-a inhibira produkciju IL-6. U netoksičnim koncentracijama o-MWCNT stimulišu sazrevanje i produkciju proinflamacijskih citokina od strane DC. dap-MWCNT, za razliku od solubilnog dapsona, ne smanjuju ekspresiju HLA-DR i ne povećavaju produkciju IL-23 od strane nezrelih DC. U prisustvu proinflamacijskih citokina (IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE2), dap-MWCNT stimulišu ekspresiju CD86, a inhibiraju ekspresiju CCR7 i produkciju IL-10 i IL-27 od strane DC u poređenju sa kontrolom. Ovi rezultati ukazuju na to da se, akumulacijom u endozomima PMØ i DC i stimulacijom povoljnih imunomodulatornih efekata kod ovih ćelija, dap-MWCNT mogu iskoristiti u terapiji visoko-rezistentnih intracelularnih patogena, dok se 7-TOG-MWCNT mogu iskoristiti u stimulaciji DC u anti-tumorskoj terapiji.

Ključne reči: *Biomaterijali, biokompatibilnost, legure koje pamte oblik, NiTi legure, CuAlNi legure, nanomaterijali, nanočestice zlata, ugljenične nanocevi, funkcionalizacija, imunski odgovor, dendrične ćelije, makrofagi, citotoksičnost, Th polarizacija, antitumorska terapija*

Naučna oblast: Fiziologija životinja i čoveka

Uža naučna oblast: Imunologija

UDK: 66.017:[576.32/.36+612.013+612.112]:57.083.3(043.3)

Biocompatibility and immunomodulatory properties of nanomaterials based on gold nanoparticles and carbon nanotubes, and NiTi- and CuAlNi alloy-based advanced biomaterials

Advanced biomaterials based on NiTi CuAlNi shape memory alloys (SMAs) are very attractive for the production of biomedical implants and devices. However, the biocompatibility of NiTi and CuAlNi alloys, prepared by conventional methods, is often poor due to their inadequate surface microstructure causing the release of toxic metal ions into the surrounding medium. Therefore, we applied a novel method for the preparation of SMAs using Rapid Solidification (RS) via Melt-Spinning. Biocompatibility and immunomodulatory properties of SMA alloys were studied using the *in vitro* models of rat's peritoneal macrophages (PMØs), human monocyte-derived dendritic cells (DCs), and mitogen-stimulated human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from 20 different donors. It was shown that RS SMAs, in contrast to control SMAs of the same composition but prepared by conventional methods, do not exhibit cytotoxicity towards the tested cells. The main reason for this phenomenon is the formation of a thin homogeneous oxide layer on the surface of RS SMAs that protects the SMAs from corrosion, and the conditioning in cell culture medium leads to its thickening. However, CuAlNi RS SMAs induce the production of IL-6, cause oxidative stress in PMØ, but do not modify the production of pro-inflammatory cytokines in most of the mitogen-stimulated PBMCs cultures. In contrast, NiTi RS SMAs stimulate the production of IL-10 in 25 % of the stimulated PBMC cultures. Accordingly, we showed that NiTi RS SMAs stimulate the phenotypic maturation of DCs, which produce higher levels of IL-10 and IL-27, and stimulate the production of IL-10 and TGF- β in co-culture with CD4⁺ T cells. However, in the presence of LPS, DCs cultivated on RS NiTi SMA possess a stronger allostimulatory capacity, and potentiate the development of Th1 immune response *in vitro*. These results indicate that RS SMAs can be safely used as implants for most patients, but special care should be taken as to whether the immunomodulatory properties of these alloys would cause some adverse effects in some patients.

Gold nanoparticles (GNP) are quite promising for the use in diagnostics and photo-thermal cancer therapy. However, their biocompatibility and immunomodulatory properties have not been investigated sufficiently for their safe use in biomedicine. In this paper we applied

Ultrasonic Spray Pyrolysis (USP) as a novel method for the synthesis of GNP. USP enabled the synthesis of 5 different fractions of GNP, and their cytotoxicity was evaluated *in vitro* using of L929, rats' thymocytes and splenocytes, whereas a model of concanavaline A (ConA) - stimulated splenocytes was used for the evaluation of the GNP-mediated immunomodulatory properties. We found that fractions 1 and 2, composed of pure gold nanoparticles, do not cause the cytotoxicity of the tested cells. The cytotoxicity of other GNP fractions depends on the concentration of micro-alloying elements in their composition, and susceptibility of the tested cell. Fraction 2, produced using a higher ultrasonic frequency, contains smaller particles compared to fraction 1, exhibits an anti-proliferative effect on ConA-treated splenocytes, inhibits IL-2, and stimulates IL-10 production in these cultures. A similar immunosuppressive effect was observed in culture of DC treated with 10 nm- or 50nm- sized GNP. Namely, we showed that DC internalise GNP predominantly via dynamin-dependent mechanisms. Both GNPs impair the maturation and allostimulatory capacity of these cells in presence of LPS, but the effects of GNP₁₀ are more prominent. Furthermore, GNP₁₀ inhibit LPS-stimulated production of IL-12p70 by DC, and potentiate their Th2 polarisation capacity in co-culture with CD3⁺ T cells, whereas GNP₅₀ potentiate Th17 immune response *in vitro*. Such effects of GNP₁₀ correlate with a stronger inhibition of LPS-induced changes in Ca²⁺ oscillations, their higher number per DC, and more frequent extra-endosomal localization. Even when released from heat-killed necrotic HEp-2 cells, GNP₁₀ inhibit the necrotic tumour cell-induced maturation and functions of DCs. Using this model, we showed that GNP₁₀, unlike GNP₅₀, potentiate DCs' Th2/Th17 polarisation capacity, and thus, impair their capacity to induce T cell-mediated anti-HEp2 cytotoxicity *in vitro*. Based on these results we concluded that GNP₁₀ could potentially induce more adverse DC-mediated immunological effects, compared to GNP₅₀.

Functionalised multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) represent very suitable system for the targeted-delivery of drugs and biomolecules to specific cellular compartments. However, their biocompatibility and immunomodulatory properties depend on the nature of the attached biomolecules. Therefore, we investigated the internalization, cytotoxicity and immunomodulatory properties of MWCNTs conjugated with dapsone (dap) or 7-thia-8-oxoguanosine (7-TOG), used as a drug against intracellular bacteria or Toll-like receptor (TLR)-7 agonist, respectively, using a model of rats' PMØ and human DC. Conjugation of dap-MWCNT and 7-TOG-MWCNT was confirmed by using Fourier transformed infrared

spectroscopy, transmission electron microscopy, thermogravimetric and elemental analysis. By using light-, confocal-, and electron microscopy, and flow cytometry, we confirmed that PMØ and DC internalize dap-MWCNTs and 7 TOG-MWCNTs. Thereby, dap-MWCNTs accumulated within the endosomes of PMØ and DC to a similar extent as control, oxidized (o)-MWCNTs. In contrast, 7 TOG-MWCNTs accumulate in DCs' endosomes to a much higher extent as compared to o-MWCNTs, thereby 7-TOG-MWCNTs co-localise with TLR7 within the endosomes of DCs. The biological examination of dap-MWCNTs revealed their lower cytotoxicity to PMØ and DCs, as compared to the control o-MWCNTs that potentiate the oxidative stress in PMØ. Soluble dapsone induces a weak oxidative stress in PMØ, and inhibits their apoptosis, but potentiates strongly the effects of o-MWCNTs in its presence. Accordingly, o-MWCNTs inhibit oxidative burst of PMØ, and production of NO and IL-6 by these cells, unlike dap-MWCNTs. In contrast, dap-MWCNTs inhibit the production of IL-6 in the presence of LPS. The non-toxic concentrations of o-MWCNTs stimulate the maturation and production of pro-inflammatory cytokines by DC. In contrast to soluble dapsone, dap-MWCNTs do not down-regulate the expression of HLA-DR, nor stimulate the production of IL-23 by immature DCs. In the presence of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α and PGE2), dap-MWCNTs stimulate the expression of CD86, and inhibit the expression of CCR7, and the production of IL-10 and IL-27 by the DC, as compared to the control. These results suggest that, by accumulating in endosomes of PMØs and DCs, and by stimulation of favourable immunomodulatory effects, dap-MWCNTs and 7-TOG-MWCNTs could be beneficial for the treatment of highly resistant intracellular pathogens, and the stimulation of DCs in anti-tumour therapy, respectively.

Key words: *Biomaterials, biocompatibility, shape memory alloys, NiTi alloys, CuAlNi alloys, nanomaterials, gold nanoparticles, carbon nanotubes, functionalisation, immune response, dendritic cells, macrophages, cytotoxicity, Th polarisation, anti-tumour therapy*

Scientific field: Animal and human physiology

Narrower scientific field: Immunology

UDC: 66.017:[576.32/.36+612.013+612.112]:57.083.3(043.3)

1. UVOD

1.1. DEFINICIJA BIOMATERIJALA

Nauka o biomaterijalima je najmultidisciplinarnija nauka, obzirom da obuhvata znanja iz mnogih oblasti nauke i tehnologije, inženjerstva i medicine [1]. Sama definicija reči biomaterijal je do danas izazvalo brojne debate [2], a ovde ćemo uzeti definiciju Williams-a iz 2009. godine koja glasi:

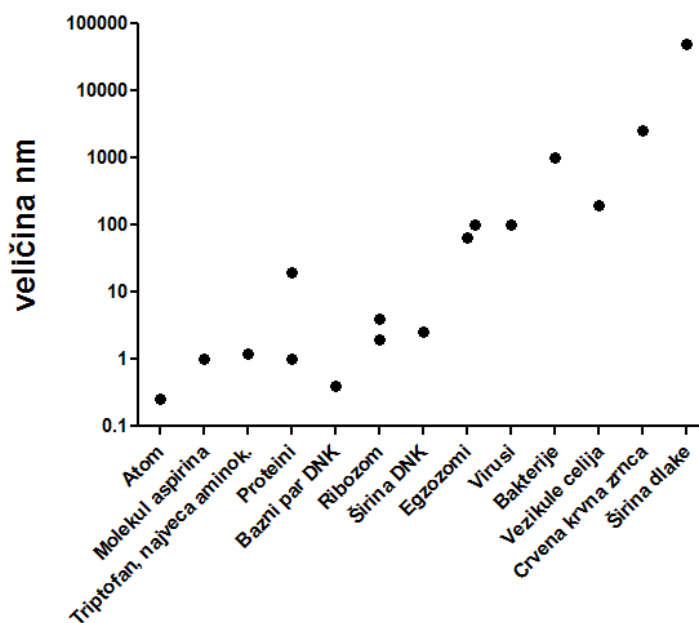
„Biomaterijal predstavlja supstancu koja je konstruisana u takvoj formi da, sama ili kao deo kompleksnog sistema, usmerava tok neke terapijske ili dijagnostičke procedure u okviru humane medicine i veterine, time što kontroliše interakciju sa komponentama živih sistema“. [2].

Ovakva definicija uzima u obzir klasični koncept biomaterijala kao „*supstanci od kojih su stvari napravljene*“, kao što su legure na bazi titanijuma, hidroksiapatit, visoko aktivne nanočestice, hidrogelovi, samosklapajući biološki sistemi kao što je virusni genetski materijal u katjonskom polimeru, ili čak čitav konstruisan organ. Termin supstanca implicira sve što ima masu i zauzima određeni prostor, što omogućava da biomaterijale posmatramo znatno šire, od homogenih monolita, hibrida i kompozita, do biomimetičkih i multifunkcionalnih struktura. Ono što je ključno za biomaterijal jeste ima dijagnostičku ili terapijsku primenu u medicini, kontrolišući interakciju sa biološkim komponentama pacijenta kod kog se primenjuje. Obzirom da je nepoznato mnogo mehanizama kojima biomaterijal deluje na biološke sisteme, iz današnje perspektive je precizna kontrola ovih interakcija skoro nemoguća. Međutim, važno je da ove nepoznanice ne sprečavaju upotrebu biomaterijala ukoliko je krajnji ishod njihove primene povoljan za pacijenta. Interakcija biomaterijala sa živim sistemom može aktivirati specifičan sled događaja, kao na primer kod procedura za oslikavanje bioloških struktura, ili mogu sprečiti određene pojave, kao što su biomaterijali sa antimikrobnom funkcijom. Čest je, međutim, slučaj da je ishod ove

interakcije kombinacija ova dva događaja, obzirom da biološka aktivnost biomaterijala može biti delimično kompromitovana njihovom citotoksičnošću.

1.2. DEFINICIJA NANOMATERIJALA

Nanotehnologija (nano *grčki*- mali, patuljak) je stvaranje, korišćenje i sistem kontrole materijala na nanometarskoj skali, pre svega na atomskom, molekulskom, i supramolekulskom nivou. Osim toga, nanotehnologija se zasniva na razumevanju i kontroli materije koja je dimenzija 1 - 100nm. Nanometar (10^{-9} m) je samo 4 puta veći od pojedinačnih atoma, a veza između 2 atoma je oko 0.15 nm (**Grafikon 1.2.1**).



Grafikon 1.2.1 Dimenzije različitih objekata na nanometarskoj skali.

Pripremljeno prema Jain KK[3].

Ključna karakteristika nanomaterijala je kvantni efekat koji je povezan sa njihovom veličinom i velikim odnosom površine prema zapremini. Na nanometarskoj skali materijal ima nove osobine koji u prvom redu zavise od njihove veličine. Na primer, dve grupe

nanočestica zlata mogu imati veoma različite osobine, drugačiju tačku topljenja, električnu provodljivost, boju itd., samo ako se međusobno razlikuju po veličini, što omogućava novi vid kontrole osobina materijala. Prihvaćeno je mišljenje da dimenzije nanočestica reda veličine 100nm i manje podležu ovim karakteristikama. Stoga je na sastanku Evropske komisije predloženo da nanomaterijali budu veličine 100nm i manji [4]. Iako etimološki reč nanomaterijal nema smisla, i bolje je da se koristi termin nanostrukturirani materijal, pragmatičnim pristupom nanomaterijal bi se definisao kao:

„...bilo koja forma materiala koja je sastavljena iz diskretnih funkcionalnih delova od kojih većina ima jednu ili više dimenzija reda veličine 100nm ili manje“ [4].

Unutrašnja struktura većine supstanci, koju čine molekuli, kristali ili domeni, je svakako nanometarske veličine. Međutim, ovo ih ne nominuje za nanomaterijale *a priori*. Postoje izvesne rasprave o tome da li su fulereni nanomaterijali ili molekuli [4]. Bitno je to nanomaterijal ima značajno različite osobine od makroskopskog materijala istog sastava, a da su nove osobine isključivo posledica njihovih malih dimenzija. Neki od fenomena biokompatibilnosti, koju ćemo kasnije definisati, su posledica nanosutrkture površine makroskopskog materijala. Obzirom da je interakcija između ćelija i površine biomaterijala posredovana molekulima, strukturama ćelijske membrane, signalnim molekulima u citoplazmi, od kojih su svi nanoveličine, očekuje se i da nanotopografija značajno utiče na biološki efekat biomaterijala. Takođe, iako će nanotehnologija značajno unapredi kvalitet medicinske prakse i kvaliteta života, već sada je jasno da neki nanomaterijali mogu imati štetan efekat po zdravlje. Nanomaterijali nisu novost, već su vrlo čest produkt brojnih prirodnih procesa u ekosferi. Međutim, posebno treba voditi računa o novim nanomaterijalima čiji je uticaj na okolinu i čoveka nepoznat.

1.3 DEFINICIJA BOKOMPATIBILNOSTI

Najvažniji faktor koji odvaja biomaterijale od drugih materijala je njihova sposobnost da opstanu u kontaktu sa živim sistemima, a da pri tome ne izazivaju štetan efekat. Način na koji živi sistemi i biomaterijal mogu ko-egzistirati je predmet interesa mnogih naučnika iz oblasti biomaterijala i korisnika medicinskih uređaja i sredstava. Jasno je da postoji mnogo načina na koji biomaterijal može interagovati sa živim sistemom na neodgovarajući način. Stoga je cilj da se proučavanjem ove interakcije konstruišu biomaterijali koji pružaju najbolji mogući ishod za korisnika. U tom kontekstu se govori o biokompatibilnosti biomaterijala, iako još postoje brojna sporenja oko toga šta biokompatibilnost zapravo znači [5].

Tradicionalno se biokompatibilnost odnosila na uređaje koji su ugrađivani u organizam i prisutni u organizmu tokom dužeg vremenskog perioda. Još od prve generacije implantata u periodu od 1940 – 1980. godine je postalo jasno da najbolje biološke osobine imaju materijali koji su najmanje hemijski reaktivni. Stoga su metalni implantati na bazi vanadijenskog čelika, koji ispoljava jaku korozivnost, zamenjeni nerđajućim čelikom, a zatim legurama od kobalta i hroma, titanijumskim legurama, i na kraju legurama na bazi platine. U skladu sa ovim pristupom, kriterijumi za odabir biomaterijala namenjenih za implantaciju su definisani na osnovu osobina koji ovi biomaterijali ne poseduju. Najvažniji među njima su osobine koji se odnose na oslobađanje produkata korozije i degradacije biomaterijala, stabilizirajućeg agensa, aditiva ili kontaminanata. Na osnovu tih kriterijuma bi biomaterijali bi trebalo da budu netoksični, netrombogeni, nekarcinogeni, neiritirajući itd., čime je delimično i definisana njihova biokompatibilnost. Međutim, bar tri faktora je promenilo tadašnju definiciju biokompatibilnosti. Prvo, biokompatibilnost biomaterijala ne zavisi samo od njegovih osobina već i mesta aplikacije u organizmu. Drugo, od biomaterijala se zahteva da specifično interaguje sa biološkim sistemom, a ne da ga biološki sistem ignoriše. Treće, primena nekih materijala zahteva njegovu razgradnju u izvesnom vremenskom periodu a ne večitu perzistenciju u organizmu. Uzimajući u obzir ova tri argumenta je na konferenciji Evropskog društva za biomaterijale 1987 biokompatibilnost je definisana kao:

„sposobnost materijala da obavi zadatak za koji je namenjen pri čemu će izazvati odgovarajući dogovor domaćina u specifičnoj situaciji“ [6].

Iako ova definicija ima svojih dobrih strana, očigledno je da ona previše opšta i ne doprinosi dovoljno unapređivanju znanja o biokompatibilnosti [7]. Jedan od najvažnijih principa u interakciji bioloških sistema i materijala je da se mehanizmi odgovora ćelija i materijala na tu interakciju kreću u okviru prirodnih procesa svojstvenih njima samima.

Tabela 1.1.1. Karakteristike biomaterijala koje su najvažnije za odgovor biološkog sistema

Sastav biomaterijala, mikro ili nano struktura, morfologija;
Kristalinitet i kristalografija;
Elastične konstante (Jungov modul, modul stresta i Poisonov odnos);
Sadržaj vode, balans hidrofobnosti i hidrofilnosti;
Makro-, mikro- i nano-poroznost;
Hemijska kompozicija površine, hemijski gradijent, mobilnost molekula na površini;
Topografija površine;
Energija površine;
Električne osobine površine;
Parametri korozije, profil oslobađanja jona, toksičnost metalnih jona (za metalne materijale);
Profil degradacije i toksičnost degradacionih produkata, aditiva, kontaminanata katalizatora (za polimerne materijale);
Profil oslobađanja debrisa materijala

Drugim rečima, materijal će se u biološkom sistemu imati osobine koje postoje i u ne biološkim sredinama, dok će se odgovor biološkog sistema na biomaterijal biti u okvirima već postojećih fizioloških mehanizama. Stoga je ključno za razumevanje biokompatibilnosti odrediti koji su hemijski, biohemijski, fizički ili neki drugi mehanizmi presudni u ovim visoko specifičnim uslovima koji se odvijaju tokom interakcije biološkog sistema i biomaterijala, a pogotovo je važno precizno predvideti koji je ishod ove interakcije. Pri tome se ne sme isključiti i varijabilnost odgovora biološkog sistema koji zavisi od stupnja razvića i diferencijacije, pola, starosti i drugih uticaja sredine u kome se ova interakcija odvija [8-10]. Takođe, varijabilnost u odgovoru biomaterijala zavisi od

metoda i protokola njihove sinteze, kao i kompleksnosti samog biomaterijala [11, 12]. Karakteristike materijala koje presudno utiču na odgovor biološkog sistema su prikazane u **Tabeli 1.3.1.**

Imunski sistem predstavlja ključnu komponentu u odgovoru organizma na biomaterijal. Nakon interakcije biomaterijala sa organizmom sledi niz događaja koji slede jedan za drugim, kao što su interakcija proteina i drugih makromolekula sa biomaterijalom, inicijacija inflamacijskog i imunskog odgovora i mehanizmi popravke i regeneracije tkiva, što na kraju dovodi do stabilne ravnoteže koje se uspostavlja između materijala i domaćina [13](**Tabela 1.3.2.**).

Tabela 1.3.2 Osnovne karakteristike odgovora organizma na biomaterijal

Karakteristike adsorpcije i desorpcije proteina za materijal
Opšta citotoksičnost
Aktivacija neutrofila
Aktivacija makrofaga, formiranje džinovskih ćelija, formiranje granuloma
Aktivnost fibroblasta i fibroza
Promene u mikrovaskulaturi
Tkivno specifični odgovor ćelija (aktivnost osteoblasta i osteoklasta u kosti, proliferacija endotela
Aktivacija koagulacione kaskade
Adhezija trombocita, njihova aktivacija i agregacija
Aktivacija sistema komplementa
Produkcija antitela, ćelijski imunski odgovor
Akutna hipersenzitivnost i anafilaksa
Kasna hipersenzitivnost
Mutageni odgovor, genotoksičnost
Gametotoksičnost
Kancerogenost

Definisanje biokompatibilnosti biomaterijala, kao izraza njegove sposobnosti da izvrši određeni zadatak u specifičnoj situaciji, je važan podsetnik da biomaterijal mora imati određenu funkciju zbog koga se primenjuje, a nju može izvršiti jedino ako izazove

odgovarajući odgovor biološkog sistema sa kojim interaguje. Pri tome je osnovni princip biokompatibilnosti da ovu funkciju biomaterijal vrši štetnosti po organizam, u skladu sa prvim Hipokratovim principom da doktor ne nanosi štetu pacijentu tokom lečenja. Stoga bi definicija biokompatibilnosti u tok kontekstu bila:

„...sposobnost biomaterijala da izvrši funkciju zbog koje je primenjen i da se u prihvatljivom stepenu integriše u domaćina, bez izazivanja neželjenih lokalnih ili sistemskih efekata po domaćina“.

Biomaterijal, je po svojoj definiciji, stran za organizam, bilo da je to hirurški uređaj, sistem za dostavu lekova ili gena, ili nosač materijala za dijagnostiku i ćelijsko oslikavanje. Koja god da je funkcija ili svrha tog uređaja, a time i materijala od kojih je izrađen, on ne sme indukovati klinički značajne nepoželjne efekte kod domaćina. Međutim, očekuje se da biomaterijal na pasivan ili aktivan način kod domaćina indukuje evidentne efekte, bilo da stimuliše diferencijaciju matičnih ćelija, potpomaže održavanje određenog fenotipa ćelija, olakšava endotelijalizaciju intravaskularnih uređaja, ili omogućava farmakološku kontrolu nepoželjnih odgovora, kao što je hiperplazija intime krvnog suda u koji je ugrađen intravaskularni stent ili osteoliza zbog oslobađanja debrisa od materijala kod zglobnih proteza. Na osnovu toga možemo definisati biokompatibilnost kao:

„, sposobnost biomaterijala da izvrši željenu funkciju zbog koje se primenjuje za lečenje, bez izazivanja nepoželjnih lokalnih ili sistemskih efekata kod primaoca te terapije, već da indukuje stimulaciju najboljeg odgovora ćelija ili tkiva domaćina, čime se optimalizuju klinički relevantne performanse te terapije“.

1.4. KARAKTERISTIKE IMUNSKOG ODGOVORA NA BIOMATERIJALE I NANOMATERIJALE

Odgovor biološkog sistema na materijal se odvija isključivo unutar već postojećih fizioloških okvira, i ne uključuje nove, nefiziološke mehanizme. Biološki odgovor na makroskopski materijal uključuje različite tipove ćelija koje međusobno komuniciraju posredstvom bioloških medijatora, dok u odgovoru na nanomaterijal ključni značaj imaju ćelijski proteini, kao i komunikacija između ćelijskih odeljaka i organela. Međutim, međućelijska i intraćelijska signalizacija su usko povezane i koordinišu odgovor organizma na svaki biomaterijal, bez obzira na njegovu veličinu.

1.4.1 Imunski odgovor na biomaterijale

Nekoliko nanosekundi nakon kontakta sa biološkim tečnostima, plazmom ili medijumom za kultivaciju ćelija, proteini ovih bioloških sistema adsorbuju za površinu biomaterijala. U zavisnosti od vrste adsorbovanih proteina zavisi i aktivacija koagulacione kaskade, trombocita i imunskih ćelija, što omogućava formiranje prelaznog matriksa i početak inflamacijskog odgovora na biomaterijal [14, 15]. Faktor XII (FXII) i tkivni faktor (TF) su inicijatori unutrašnjeg, odnosno spoljašnjeg puta koagulacione kaskade. Negativno naelektrisane površine biomaterijala aktiviraju FXII čime se pokreće oslobađanje trombina [15, 16], što predstavlja prvu reakciju na biomaterijale [17]. Međutim, za formiranje tromba na biomaterijalu su neophodni i drugi stimuli koje pokreću adhezija i aktivacija trombocita [18, 19]. Ukoliko ima dovoljno trombina, aktiviraće se trombociti, ispoljiti fosfatidilserin i time stimulisati koagulacionu kaskadu preko FVa i FXa [20]. Trombin inicira razgradnju fibrinogena do fibrina čime se formira fibrozna mreža na biomaterijalu [21]. Fibrinogen, bilo da je adsorbovan za biomaterijale ili aktiviran od strane trombocita, ispoljava dva vezivna mesta za integrine i omogućava adheziju fagocitnih ćelija [22, 23]. Pored koagulacione kaskade, biomaterijal aktivira i sistem komplementa alternativnim, klasičnim ili lektinskim putem aktivacije, i omogućava formiranje C3 konvertaze i oslobađanja anafilatoksina C3a i C5a [24-26]. Anafilatoksini započinju inflamacijski odgovor na mestu implantacije, povećavaju vaskularnu permeabilnost, stimulišu

ekstravazaciju i aktivaciju granulocita i monocita [27]. Adhezioni proteini, kao što su fibronektin i vitronektin aktiviraju infiltrirajuće makrofage i dovode do njihove fuzije u džinovske ćelije na površini biomaterijala, koje dodatno potenciraju inflamacijski odgovor ili stimulišu zarastanje i regeneraciju tkiva nakon implantacije [28, 29]. U adheziji fagocitnih ćelija na površinu biomaterijala najvažniju ulogu imaju integrini [30], koji se vezuju za fibrinogen, faktor X, iC3b, fibronektin, vitronektin i dr. [31, 32]. Inicijalna adhezija i širenje (engl. *spreading*) fagocita je posredovan $\beta 2$ integrinima [22, 33]. Adherentni monociti koji se diferenciraju u makrofage ispoljavaju $\beta 1$ integrin [34], koji nakon grupisanja (klasterisanja) sa $\beta 2$ integrinima učestvuju u fuziji makrofaga na površini biomaterijala [29, 33, 35]. Grupisanje integrina inicira pokretljivost, fagocitozu, degranulaciju kao i produkciju reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) i citokina od strane adherentnih ćelija.

Osim integrina, u odgovoru na biomaterijal učestvuju i drugi biomolekuli kao što su različiti receptori i ligandi. Sam proces implantacije biomaterijala neminovno stvarao opasne signale, alarmine, koji nastaju oštećenjem tkiva, a koji se drugačije nazivaju i molekularni obrasci oštećenja (engl. *damage associated molecular patterns*, DAMP), po analogiji sa molekulskim obrascima patogena (engl. *pathogen associated molecular patterns*, PAMP) [36]. DAMP koji se javljaju u odgovoru na biomaterijal uključuju proteine toplotnog stresa (engl. *heat shock proteins*, hsp), HMGB1 (engl. *high mobility group box 1*), ATP, mokraćnu kiselinu itd. Ovi faktori se brzo oslobađaju iz nekrotičnih ćelija i „signaliziraju“ oštećenje tkiva. DAMP molekule prepoznaju receptori za molekulske obrasce (engl. *pattern recognition receptors*, PRR) na makrofagima i dendritskim ćelijama (DC), kao što su Toll-u slični receptori (engl. *toll like receptors*, TLR), receptori čistači (engl. *scavenger receptor*, SR), C-tip lektini i dr., koji iniciraju inflamacijski odgovor na biomaterijal. Postoje brojni dokazi da DAMP mogu da nastanu i da se oslobode na površini biomaterijala i aktiviraju imunske ćelije [36, 37]. Iz ćelija oštećenih u toku implantacije se izlivaju proteolitički enzimi koji stimulišu dodatnu razgradnju ekstraćelijskog matriksa i produkuju nove DAMP. DAMP signali mogu poticati i od fibrinogena, isečenih komponenti ekstraćelijskog matriksa kao što su peptidi kolagena,

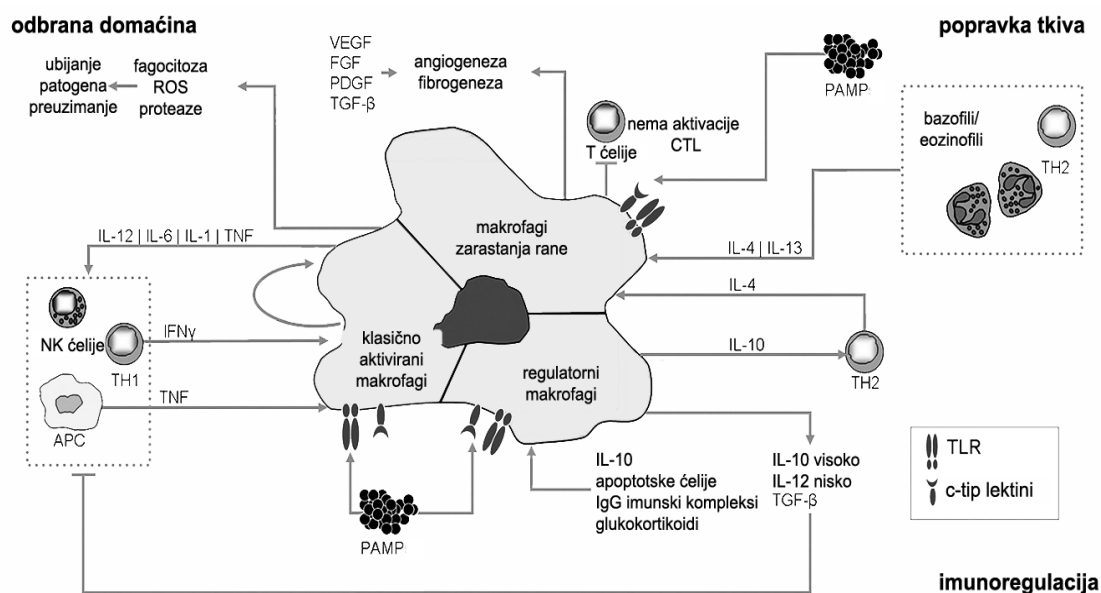
hijaluronska kiselina, fibronektin i lamini, i dr. Obzirom da se svi ovi produkti mogu adsorbovati na biomaterijal, to znači da i sam biomaterijal predstavlja opasan signal za imunski sistem. Solubilni ili vezani DAMP mogu interagovati sa PRR, pre svega TLR, na leukocitima i inicirati inflamacijski odgovor. Nedavno je pokazano da ključnu ulogu u odgovoru na biomaterijale *in vivo* i *in vitro* ima TLR4 [38, 39].

Prve adherentne ćelije koje se vezuju za površinu biomaterijala su granulociti [40]. Stimulus za ekstravazaciju granulocita na mesto implantacije su hemoatraktanti koje proizvode endotelne ćelije i nekrotične ćelije. Osim toga, i produkti degranulacije mastocita imaju značajnu ulogu u privlačenju monocita i granulocita na mesto implantacije [41, 42]. Ove ćelije se vezuju za proteinski omotač oko biomaterijala, čime se aktiviraju PRR, i stimuliše njihova fagocitorna funkcija, degranulacija i produkcija ROS [43, 44]. Faktori koje proizvode granulociti mogu biti značajni za koroziju površine biomaterijala [45]. Osim toga, ukoliko iz biomaterijala dođe do oslobađanja faktora koji deluju na nekrozu ćelija, čitav imunski odgovor na biomaterijal se pojačava i produžava. Problem može predstavljati i fiziološka iscrpljenost granulocita koji tada više ne mogu da oslobađaju ROS u odgovoru na mikrobe, što olakšava nastanak infekcije [46]. Granulociti proizvode i interleukin (IL)-8 koji dalje privlači neutrofile iz krvi, ali i makrofagni hemoatraktantni protein (MCP)-1 i makrofagni inflamacijski protein (MIP)-1 β [40] koji su uključeni u hemotaksu makrofaga, monocita, nezrelih DC i limfocita [47]. Granulociti brzo umiru nakon obavljene funkcije, i u kasnijem odgovoru na biomaterijal najvažniju ulogu imaju antigen prezentujuće ćelije (APC), a pre svega makrofagi [48] i DC [49].

1.4.2 Makrofagi

Makrofagi imaju značajnu ulogu u akutnom odgovoru, i dominantni su faktor u hroničnom odgovoru na biomaterijal [50]. Monociti koji dolaze na mesto implantata se diferenciraju u makrofage, a njihova aktivacija pojačava dalju produkciju hemoatraktanata. Makrofagi koji su adherirali za biomaterijal privlače druge inflamacijske ćelije produkcijom IL-8, MCP-1, MIP-1 β , faktor nekroze tumora (TNF)- α , IL-6, IL-1 β i dr. [51]. Makrofagi iniciraju ključne procese u regeneraciji tkiva fagocitozom debris i produkcijom

enzima koji su vrlo bitni za reorganizaciju ekstraćelijskog matriksa (ECM), citokina i faktora rasta koji stimulišu migraciju i proliferaciju fibroblasta [52]. Definisana su dva tipa makrofaga koji su označeni kao M1, klasično aktivirani, i M2, alternativno aktivirani makrofagi [53]. Postoji izuzetna plastičnost između podtipova makrofaga, i M1 tip se može diferencirati u M2 i obrnuto. Primarna uloga M1 makrofaga je uklanjanje patogena i destrukcija matriksa, dok je uloga M2 makrofaga u remodelovanju tkiva. Stoga možemo reći da makrofagi u realnosti nisu podeljeni u podtipove, već postoje u definisanom okviru fenotipskih i funkcionalnih kategorija. U skladu s tim je uvedena i alternativna podela na klasične, regulatorne, i makrofage zarastanja rana (engl. *wound-healing macrophages*) [54] (Slika 1.4.2.1).



Slika 1.4.2.1. Klasifikacija makrofaga.

Makrofagi predstavljaju heterogenu populaciju ćelija koja ima različit fenotip i obavlja različite funkcije u odgovoru domaćina, u zarastanju rana i imunskog regulaciji. Ova plastičnost omogućava makrofagama da adaptiraju svoje funkcije u skladu sa sredinom. Modifikovano na osnovu [54, 55]

1.4.2.1. Klasično aktivirani makrofagi

U prvobitnoj karakterizaciji makrofaga, klasični makrofagi su definisani kao efektorski makrofagi koji se aktiviraju kombinacijom interferonom (IFN)- γ i TNF- α , nakon čega proizvode veću količinu mikrobicidnih i tumorocidnih supstanci, kao i visok nivo proinflamacijskih citokina i medijatora [56, 57]. IFN- γ proizvode ćelije adaptivne imunosti ili ćelije prirodne ubice (engl. *natural killer cells*, NK), a njegova uloga je u stimulaciji makrofaga, koje tada proizvode veći nivo proinflamacijskih citokina i ROS [58]. NK ćelije mogu inicijalno da aktiviraju klasične makrofage, ali za trajnu aktivaciju je neophodna adaptivna komponenta imunosti, to jest T pomoćničke (engl. *T helper*, Th) ćelije koje proizvode IFN- γ . TLR ligandi, bilo da su u pitanju DAMP ili PAMP, aktiviraju TLR preko mijeloidnog faktora diferencijacije, proteina 88 (MyD88) koji indukuje prolazno povećanje produkcije TNF- α , a ovaj citokin tada deluje autokrino u sadejstvu sa IFN- γ . Osim MyD88, neki TLR ligandi aktiviraju adaptor sa TIR domenom koji indukuje IFN- β (TRIF)- zavisni put, a koji zatim sprovodi signal preko IFN-regulišućeg faktora 3 (IRF3), i stimuliše produkciju IFN- β [59]. Ovako proizveden IFN- β može zameniti ulogu IFN- γ u aktivaciji makrofaga. Na taj način oba signala koja su neophodna za aktivaciju klasičnih makrofaga se mogu javiti angažovanjem TLR. Produkcija proinflamacijskih citokina od strane makrofaga, koji su neophodni za odbranu domaćina, može izazvati i oštećenje tkiva domaćina. Na primer, IL-1 β , IL-6 i IL-23 proizvedeni od strane klasičnih makrofaga se mogu povezati sa razvojem i ekspanzijom Th17 ćelija [60-62]. Th17 ćelije proizvode IL-17 koji je povezan sa povećanim infiltratom granulocita u tkivu i inflamacijskim autoimunskim oboljenjima [62]. Klasični makrofagi su ključni faktor u destrukciji tkiva obzirom da proizvode različite enzime kao što su matriksne metaloproteinaze (MMP) [63], kolagenaze, elastaze i hijaluronidaze [64]. Sa druge strane, fagocitoza apoptotskih granulocita sa mesta inflamacije od strane makrofaga može inhibirati dalji imunski odgovor na biomaterijal, produkcijom transformišućeg faktora rasta- β (engl. *transforming growth factor*, TGF- β) [65].

1.4.2.2. Alternativno aktivirani makrofagi

Alternativno aktivirani makrofagi su ranije bili podeljeni u najmanje 3 podtipa, M2a (alternativni) koji se diferenciraju iz monocita u prisustvu IL-4 ili IL-13, M2b (tip II) koji se indukuju pomoću TLR agonista i IL-1 β , i M2c (inaktivirani) koji se indukuju sa IL-10 i glukokortikoidima. Za razliku od M1, M2 makrofagi proizvode povećanu količinu IL-10 i malu količinu IL-12. M2a i M2c imaju visoku ekspresiju neopsinirajućih receptora, ne proizvode azot oksid (NO) [66], proizvode malo IL-1 β , TNF- α i IL-6, i poseduju nisku ekspresiju CD86 [67]. M2c makrofagi imaju imunosupresivnu ulogu, kao i ulogu u remodelovanju ECM i formiranju fibrozne kapsule [53, 68]. Međutim, usled velike plastičnosti uvedene su funkcionalne podele alternativnih makrofaga, koje se odnose na njihove fiziološke funkcije. Makrofagi zarastanja rana (ranije M2a) se diferenciraju u prisustvu IL-4 koji se može osloboditi tokom povrede tkiva [69]. Bazofili i mastociti predstavljaju važan izvor ovog citokina u ranim fazama implantacije biopolimera ili infekcije [70]. Ključno je to što IL-4 indukuje ekspresiju arginaze kod ovih ćelija koja konvertuje arginin u ornitin, prekursor poliamina i kolagena, i tako stimuliše proizvodnju ECM [71]. Ovi makrofagi imaju indirektno imunosupresivno dejstvo, obzirom da proizvode poliamine koji utiču na produkciju citokina i klonsku ekspanziju limfocita u okruženju [72]. Još uvek nije jasna uloga ovih ćelija u imunskom odgovoru, iako je pokazano da mogu doprineti, mada ne direktno, uspešnom imunskom odgovoru protiv helminta i nematoda [73, 74]. Makrofage zarastanja rana proizvode i hitinazu koja učestvuje u degradaciji hitina kod nekih parazita [75], što može imati i značajnu ulogu u degradaciji polimernih biomaterijala. Osim anti-inflamacijskih efekata, makrofage zarastanja rana mogu imati i nepoželjne efekte po domaćina ukoliko su previše aktivirane, kao što je slučaj kod hronične šistosomijaze [76]. Ovaj tip makrofaga ne može zaustaviti postojeću inflamaciju, i za to su potrebni regulatorni makrofagi.

Regulatorni makrofagi se diferenciraju u toku urođenog ili adaptivnog imunskog odgovora, a njihovu diferencijaciju pokreću različiti signali, kao što su apoptotske ćelije, prostaglandini, IL-10, imunski kompleksi, glukokortikoidi i dr. [77]. Međutim, za potpunu aktivaciju ovih ćelija su neophodni i sekundarni signalni kao što su ligandi za PRR [77, 78].

Osnovna uloga regulatornih makrofaga je ograničavanje inflamacije i imunskog odgovora, što se postiže zahvaljujući visokoj produkciji IL-10, potentnog imunosupresivnog citokina [77, 78].

1.4.2.3 Uloga makrofaga u odgovoru na biomaterijale

Imunski odgovor na biomaterijale uključuje sve tipove makrofaga, klasične makrofage u ranom inicijalnom odgovoru, a regulatorne i makrofage zarastanja rana u završnim fazama odgovora na biomaterijal. Makrofagi koji interaguju sa biomaterijalom imaju tipičan odgovor klasično aktiviranih ćelija, proizvode inflamacijske citokine, ROS i degradativne enzime, kao i visoku fagocitnu sposobnost. Pojedinačni makrofag može fagocitovati partikule do veličine 5 μm [64]. Međutim, ukoliko je partikula veća, makrofagi se fuzionišu i formiraju džinovske ćelije. IL-4 i IL-13 mogu indukovati fuziju makrofaga na površini biomaterijala *in vivo* i *in vitro* [79-81], a pretpostavlja se da su glavni izvori ovih citokina *in vivo* Th2 ćelije na mestu implantata [82]. Pri tome, IL-4 i IL-13 međusobno dopunjuju funkcije [83]. Ključna stvar koja određuje fuziju makrofaga na površini biomaterijala je proteinski omotač koji je prethodno formiran. Pokazano je da od brojnih proteina ECM, samo vitronektin indukuje fuziju makrofaga [29]. U slučaju da džinovski makrofagi ne uspeju da fagocituju strani materijal, oni ostaju adherentni na površini biomaterijala. Tada se uočavaju dva funkcionalno izdvojena odeljka, jedan je između biomaterijala i ćelija, u kom dominiraju faktori degradacije biomaterijala, a u drugi je iznad površine džinovskih makrofaga, u kom dominiraju solubilni faktori pomoću kojih ove ćelije komuniciraju sa ostalim ćelijama. U ovom stupnju makrofagi imaju smanjenu fagocitnu, ali povećanu degradabilnu sposobnost posredovanu proteinima, enzimima i ROS [84], a ceo odgovor se još naziva i frustrirana fagocitoza. MMP takođe imaju važnu ulogu u degradaciji biomaterijala nakon implantacije, i njihova uloga je detaljno proučena u ovom procesu [84-87]. Fuzija makrofaga obično indukuje fenotipsku promenu iz klasičnog u alternativni fenotip. Fuzija indukovana sa IL-4 i IL-13 stimuliše zarastanje rana tokom inflamacije [88, 89], što se očitava i kao promena citokinskog profila na površini biomaterijala [51, 88-90], u smislu povećanja produkcije IL-10, TGF- β , antagonista IL-1 receptora i dr. Međutim, i pored ovih citokina, fuzionisani makrofag i dalje proizvode

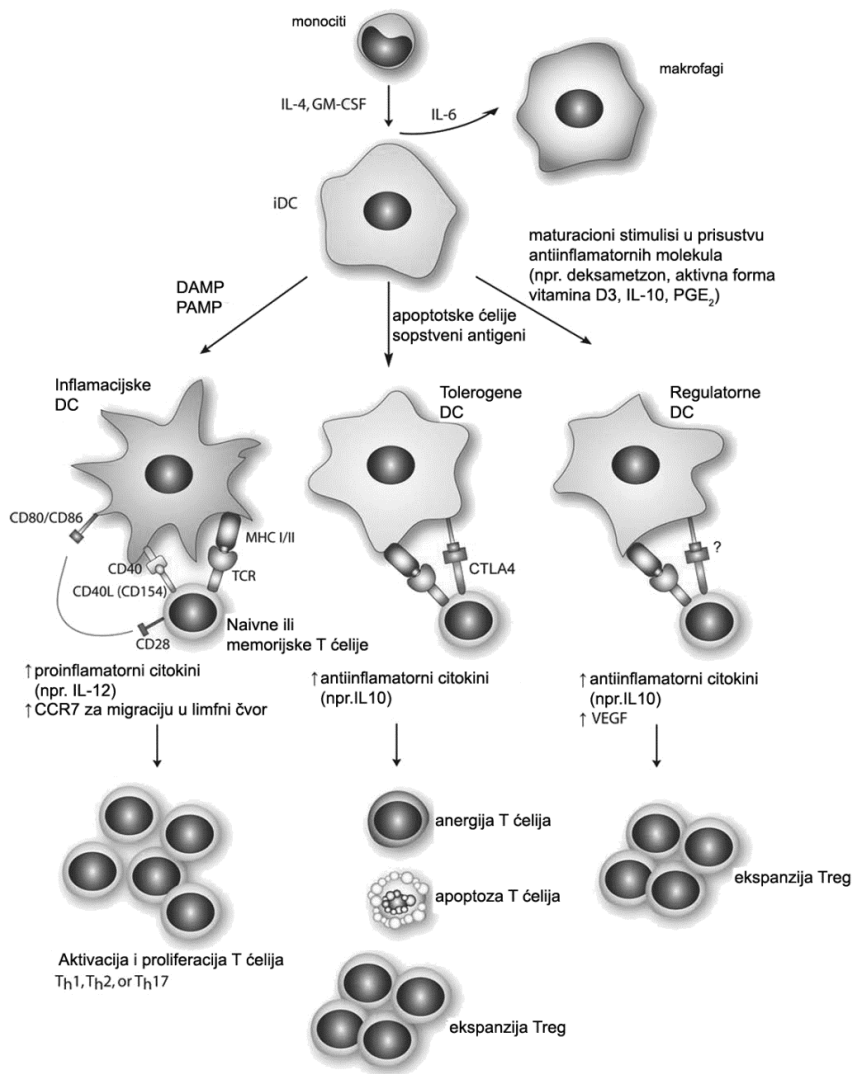
proinflamacijske citokine kao što je RANTES i MCP-1 [51], ROS i MMP. Za uspešno zarastanje rane oko biomaterijala je neophodno sprečavanje produkcije proinflamacijskih citokina i aktivacija regulatornih mehanizama [91]. Džinovski makrofagi mogu proizvoditi profibrotičke faktore kao što su TGF- β i faktor rasta trombocita (engl. platelets derived growth factor, PDGF), koji stimulišu aktivnost fibroblasta i endotelnih ćelija [88, 89]. Fibroblasti tada proizvode kolagenski sloj i enkapsuliraju biomaterijal [91, 92].

Od hemijskih osobina površine biomaterijala zavisi i odgovor makrofaga. U tom kontekstu su Smetana i sar. [93] pokazali da povećanje procenata anjonskih karboksilnih grupa u polimeru smanjuje adsorpciju humanog serumskog albumina i adheziju makrofaga *in vitro*. Pored toga, hidofilne i anjonske površine stimulišu visoku produkciju IL-10, i smanjenje produkcije IL-8 od strane makrofaga *in vitro* i *in vivo* [94, 95]. Topografija površine je takođe ključna u odgovoru makrofaga na biomaterijal. Naime, ćelije kultivisane na silikonskom supstratu, koji je poseduje nanometarska udubljenja, imaju više F-aktina, jaču adheziju i povećanu fagocitnu sposobnost u poređenju sa ćelijama na užim nanometarskim udubljenjima [96]. Slično tome, kod makrofaga kultivisanih na glatkoj titanijumskoj površini, LPS indukuje veću produkciju IL-1 β , ali manju produkciju IL-6, u odnosu na grubu titanijumsku površinu [97].

1.4.3. Dendritske ćelije

Još od otkrivanja DC od strane Steinman-a i Cohn-a [98], bilo je poznato da ove ćelije imaju ključnu ulogu u odgovoru domaćina na različite strane agense [99]. DC su APC hematopoetskog porekla specijalizovane za preuzimanje, transport, obradu i prezentaciju antigena T ćelijama [100-102]. Iako se smatralo da su monociti isključivo prekursori makrofaga, pokazano je da ove ćelije mogu migrirati u povređeno tkivo i diferencirati se u DC [103] u prisustvu granulocitnog makrofagnog faktora stimulacije kolonija (GM-CSF) i IL-4 [104, 105]. Međutim, u prisustvu fibroblasta koji proizvode IL-6, monociti se diferenciraju u makrofage, uprkos prisustvu GM-CSF i IL-4 [106]. Stoga možemo reći da IL-6 ima presudnu ulogu u diferencijaciji monocita u makrofage i DC. Slično podeli makrofaga na M1 i M2, DC mogu imati inflamacijski ili tolerogeni fenotip

[107] (**Slika 1.4.3.1**). U krvi čoveka ima najmanje 3 tipa mijeloidnih DC koji se mogu identifikovati na osnovu ekspresije površinskih antigena. CD1c⁺ (BDCA-1⁺) DC čine dominantni Lin⁻HLADR⁺CD11c⁺ podtip, dok BDCA-3⁺ Lin⁻HLADR⁺CD11c⁺ predstavljaju manje zastupljen podtip [108] koji ispoljava CLEC9A, C-tip lektin sa imunoreceptorskim tirozinskim aktivacionim motivom (ITAM) [109]. Treći podtip su mijeloidne DC koje ispoljavaju 6-sulfo LacNac, ugljenohidratnu modifikaciju glikoproteinskog liganda-1 P selektina (PSGL-1) [110]. Plazmocitoidne DC (pDC) vode poreklo od limfoidne loze i učestvuju u antivirušnom odgovoru organizma, ali se malo se zna o njihovoj ulozi u odgovoru na biomaterijale [49].



Slika 1.4.3.1. Različiti podtipovi DC, faktori njihove indukcije, i njihova funkcija.

PAMP i DAMP mogu aktivirati i diferencirati inflamacijske DC koje stimulišu imunski odgovor posredovan Th ćelijama, dok tolerogene i regulatorne DC stimulišu tolerancu preko indukcije T reg, anergije T ćelija i apoptoze autoreaktivnih T ćelija. Modifikovano prema [49].

1.4.3.1. Inflamacijske dendritske ćelije

U perifernim tkivima nezrele DC (iDC) konstantno preuzimaju antigen fagocitozom (partikularne agense) i makropinocitozom, ili receptor-posredovanom endocitozom (solubilne agense) [111, 112]. Receptori koji su uključeni u endocitozu patogena uključuju Fc receptore, C-tip lektinske receptore (CLR), receptore komplementa (CR) i dr., pri čemu ovi membranski molekuli interaguju jedan sa drugim u toku prenošenja signala u ćeliju [113]. CR3 (CD11b/CD18) i CR4 (CD11c/CD18) prepoznaju iC3b koji se stvara u odgovoru na biomaterijal, dok familija Fc receptora ima ključnu ulogu u internalizaciji u kojoj učestvuju antitela tokom maturacije DC [114]. iDC se karakterišu i visokim stepenom oscilacija Ca^{2+} [115]. Slične ciklične promene su uočavaju i kod drugih ćelija, na primer T ćelija kod kojih ove oscilacije dovode do aktivacije NFAT, NF- κ B i JNK [116], mezenhimskih matičnih ćelija [117], embrionalnih matičnih ćelija [118] kod kojih ove oscilacije regulišu stepen matičnosti, odnosno, diferenciranosti, i drugih. Pored toga, DC ispoljavaju različite hemokinske receptore u toku sazrevanja, kao što su CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1 i CXCR2 što im omogućava da dođu na mesto inflamacije.

Osim endocitoze antigena, prepoznavanje molekulskih struktura preko PRR inicira signalnu kaskadu unutar ovih ćelija (NF- κ B, AP-1, MAPK i dr.), što dovodi do njihove maturacije, povećanog stepena ispoljavanja MHC klase I i II, kostimulatornih molekula B7 familije (CD86 i CD80) i produkcije proinflamacijskih citokina [119]. Ovo je praćeno i smanjenjem endocitozne aktivnosti preko inaktivacije rhoGTPaze, poznate kao CDC42 [120]. Pored aktivacije NF- κ B, pokazano je da DC prolazno povećavaju intraćelijsku koncentraciju Ca^{2+} [119-121]. Ovaj važan sekundarni glasnik reguliše aktivnost NFAT i NF- κ B, koji dalje regulišu ekspresiju IL-2, IL-3, IL-4, TNF- α i IFN- γ od strane DC [122, 123]. U toku sazrevanja DC smanjuju ekspresiju inflamacijskih hemokinskih receptora i povećavaju ekspresiju CCR7, što im omogućava migraciju u regionalni limfni čvor gde mogu da aktiviraju naivne T ćelije. CCR7, koji reguliše hemotaksu i brzinu migracije DC, vezuje CCL21, ispoljenog na endotelnim ćelijama limfnih sudova, i CCL19, ispoljenog u T ćelijskim zonama limfnog čvora [124, 125]. DC ispoljavaju i adhezivne molekule koji su uključeni u interakciju ECM u tkivu ili na biomaterijalu. Na primer, tip I kolagena, za

razliku od fibronektina i laminina, indukuje potpunu maturaciju DC [126, 127]. Sa druge strane CD18, β 2 integrin, može imati regulatornu ulogu kod DC [128] u interakciji sa biomaterijalom.

U sekundarnim limfnim organima, zrele DC obezbeđuju tri ključna signala naivnim T limfocitima, čime se pokreće klonska ekspanzija. Prvi signal se stvara interakcijom antigen-MHC kompleksa i TCR-a i koreceptora, drugi kostimulatornim molekulima uključujući i CD40, a treći je posredovan citokinima [129]. Ovi signali regulišu razvoj T ćelija i polarizuju imunski odgovor u odgovarajućem smeru [130]. U zavisnosti od trećeg signala, zavisi i tip Th ćelija koji će se diferencirati (**Tabela 1.4.3.1.1**). IL-12 usmerava razviće Th1 ćelija povećavajući ekspresiju T-bet transkripcionog faktora i IFN- γ . Za razliku od toga, IL-4 indukuje Th2 odgovor, tako što stimuliše ekspresiju GATA 3 i sekreciju IL-4 od strane Th2 ćelija [131]. Proinflamacijski citokin IL-23 ima značajnu ulogu u ekspanziji Th17 ćelija koje proizvode IL-17 [132]. Navedene Th ćelije učestvuju u različitim tipovima imunskog odgovora, na primer, Th2 ćelije proizvode IL-4 i stimulišu produkciju antitela od strane B limfocita [129], dok Th1 ćelije potpomažu diferencijaciju i aktivnost citotoksičnih T ćelija [133]. Th17 ćelije su ključne u borbi protiv bakterijskih i gljivičnih infekcija [132]. Za razliku od Th ćelija, regulatorne T ćelije (Treg) kontrolišu prejak imunski odgovor i sprečavaju autoimunost [134]. Stoga se može reći da DC igraju ulogu u povezivanju urođene i adaptivne imunosti, ali i kontroli i usmeravanju svrsishodnog imunskog odgovora time što kontrolišu diferencijaciju Th ćelija.

Tabela 1.4.3.1.1. Uticaj citokinskog miljea na imunski odgovor posredovan DC. Preuzeto iz [135].

Očekivani odgovor	Aktivacija DC	Citokini DC	Citokini T ćelija	Efekti na druge ćelije	Prirodna indukcija
Treg ćelije	Visok TGF- β i IL-10; nizak IL-6 i IL-12	TGF- β	IL-10	Supresija proliferacije CD4+ i CD8+ T ćelija	Sopstveni antigeni
Th17 ćelije	IL-23, visok TGF- β i visok IL-6	TNF- α	IL-17, IL-22 i IL-6	Aktivacija fibroblasta da produkuju IL-6, G-CSF, GM-CSF, CXCL8 i CXCL12 što privlači neutrofile i makrofage stvarajući Th1-citokinsku mikrosredinu	Bakterijske i virusne infekcije
Th1 ćelije	IL-12, IL-18, IL-27	IL-12	IFN- γ , IL-2 i limfotoksin- α	Blokira razvoj Th17 i Th2. Aktivira B ćelije da produkuju IgG1 (kod ljudi)	Bakterijske i virusne infekcije
Th2 ćelije	IL-4 i IL-6	IL-1	IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 i IL-13	Indukuju proliferaciju B ćelija i prekopčavanje klase antitela; aktivira makrofage alternativnim putem	Infekcije helmintima

1.4.3.2. Tolerogene dendritske ćelije

Pored stranog antigena, DC iz okoline preuzimaju i sopstvene antigene, obrađuju ih i prezentuju T ćelijama. Ukoliko prezentacija sopstvenih antigena dovede do aktivacije adaptivnog imunskog odgovora, može doći do razvoja autoimunosti ili hroničnih inflamacijskih reakcija na sopstveni ili bezopasni antigen. Stoga su u toku evolucije pozitivno selektovani mehanizmi periferne tolerance. Ovi mehanizmi uključuju deleciju ili anergiju T limfocita i indukciju regulatornih T ćelija (Treg) [134]. Treg ispoljavaju visok stepen CD25 (visokoafinitetni receptor za IL-2), transkripcioni faktor Foxp3, o visok nivo IL-10, čime suprimiraju imunski odgovor [136-138]. DC koje ispoljavaju nizak nivo CD80 i CD86 mogu indukovati Foxp3⁺ Treg iz Foxp3⁻ prekursora, i indukovati visok nivo

produkcije IL-2 od strane T ćelija u prisustvu TGF- β [139]. Niske doze solubilnog antigena mogu indukovati perifernu tolerancu preko DC koje indukuju deleciju naivnih T ćelija [134]. Apoptotske ćelije, za razliku od nekrotičnih, takođe izazivaju apoptozu citotoksičnih ćelija i indukciju Treg i Th2 ćelija [140]. U *in vivo* modelu je pokazano da je indukcija tolerance perifernih CD8⁺T ćelija zavisi od ekspresije PD-1 (engl. *programmed cell death-1*) i citotoksičnog T limfocitnog antigena-4 (engl. cytotoxic T lymphocyte antigen, CTLA-4) [141] od strane DC. Stoga se može reći da su tolerogene DC ključne u formiranju Treg na periferiji, te da imaju centralnu ulogu u indukciji tolerance na sopstvene antigene.

Za razliku od PAMP, brojni agensi mogu inhibirati maturaciju i diferencijaciju DC kod ljudi i miševa. Regulatorne i poluzrele DC, koje nastaju u ovom procesu, imaju nisku alostimulatornu sposobnost i nezreo fenotip, uključujući nisku ekspresiju kostimulatornih molekula [134, 142]. IL-10 je poznat agens koji prevodi iDC u tolerogene koje ne mogu indukovati odgovarajući T ćelijski odgovor [143]. Mišije DC koje su tretirane sa IL-10 i TGF- β produkuju IL-10, indukuju Foxp3⁺ Treg i hiporesponsivnost T ćelija, kao i povećano preživljavanje grafta [144]. Humane DC koje sazrevaju u prisustvu PGE₂ ili IL-10 produkuju vaskularni endotelni faktor rasta (VEGF), što ukazuje na to da ove ćelije mogu učestvovati u zarastanju rana i stimulaciji angiogeneze [145].

1.4.3.3. Uloga dendritskih ćelija u odgovoru na biomaterijale

Pokazano je da se limfociti mogu naći na mestima implantacije [146, 147], što ukazuje na aktivaciju adaptivnog imuniteta u odgovoru na biomaterijal. Da li će DC inicirati imunogeni, ili tolerogeni odgovor T ćelija, zavisi od brojnih faktora, kao što je maturacioni status DC i citokinska sredina u kojoj se odigrava interakcija sa DC [148]. Polu zrele DC ispoljavaju nizak nivo MHC i kostimulatora, pri čemu ne produkuju proinflamacijske citokine, te polarizuju odgovor u pravcu diferencijacije i ekspanzije Treg i IL-10 produkujućih Th ćelija [149-151]. Indukcija tolerogenih DC na mestu implantacije predstavlja poželjan efekat koji vodi ka prihvatanju biomaterijala i brzom zarastanju rana. Uloga DC u interakciji sa biomaterijalom je uglavnom ispitivana u kontekstu imunogenosti. Pokazano je da biomaterijal može ispoljiti adjuvantne efekte i potencirati imunski odgovor

na antigen koji je dopremljen zajedno sa biomaterijalom [152]. Pretpostavlja se da biomaterijal aktivira DC preko PRR i signalnih kaskada koji tu učestvuju [146]. Na primer, albumin i serum mogu stimulisati DC da produkuju IL-10 i da diferenciraju Th2 ćelijski odgovor u zavisnosti od supstrata za koji su vezani [153]. Za razliku od toga, DC gajene na kolagenu i vitronektinu produkuju visok nivo IL-12 i stimulišu polarizaciju imunskog odgovora u Th1 pravcu [153]. Obzirom da kolagen i vitronektin predstavljaju DAMP signale i adhezione supstrate za integrine, pretpostavlja se da su oba signalna puta važna za aktivaciju DC biomaterijalom [127, 154]. Različiti biomaterijali (alginat, agaroz, hitrozan, hidroksiapatit, PLGA) mogu imati različite efekte na maturaciju i aktivaciju DC [146, 155, 156]. DC aktivirane u kontaktu sa biomaterijalom mogu razviti imunogeni fenotip, sličan onome koji se razvija nakon stimulacije ovih ćelija sa LPS-om [146, 157]. Ovakve DC mogu stimulisati proliferaciju T ćelija i proizvoditi proinflamacijske citokine (TNF- α , IL-6) koji dalje autokrino stimulišu maturaciju DC [146, 157]. Neki sintetski materijali, kao što su algina i hidroksiapatit mogu zaustaviti maturaciju DC [155]. Ove ćelije tada razvijaju tolerogeni fenotip [158], a nakon interakcije sa T ćelijama, mogu indukovati toleranciju. Stoga se može reći da u zavisnosti od aktivacije PRR na DC, zavisi i da li će imunski odgovor na biomaterijal voditi imunogenosti ili toleranciji [159]. U tom smislu imunogene DC mogu stimulisati odgovor na biomaterijal i odložiti zarastanje rana, dok tolerogene mogu inhibirati inflamaciju i pomoći zarastanju i regeneraciji tkiva.

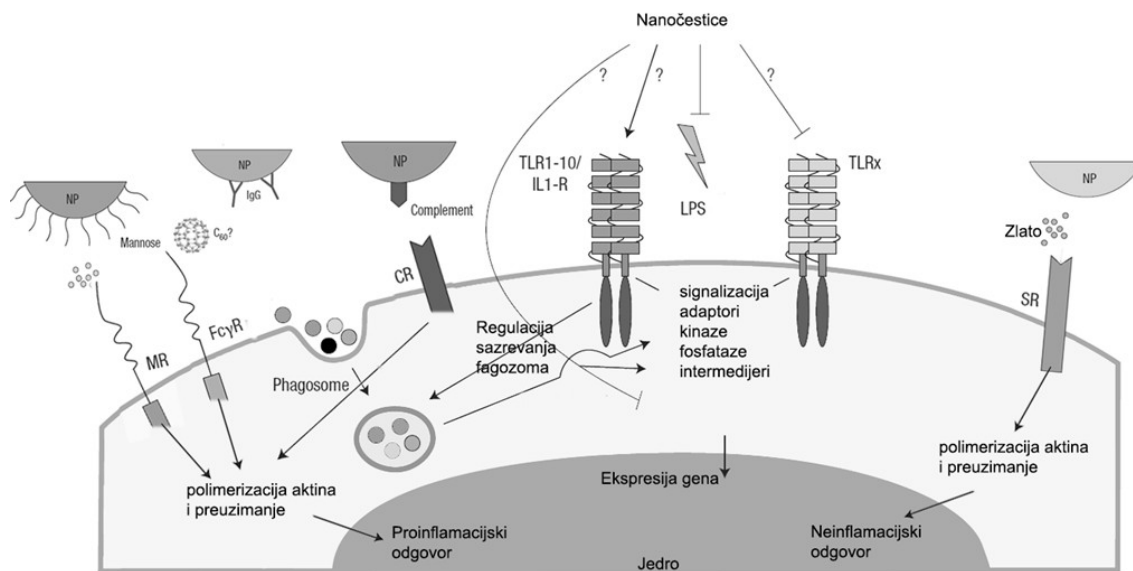
1.4.4. Specifičnosti imunskog odgovora na nanomaterijale

Za nanomaterijale je, slično makroskopskim materijalima, pokazano da od karakteristika površine, sastava i metoda pripreme [160, 161] zavisi i njihova interakcija sa proteinima bioloških tečnosti [162-164]. Ova interakcija je presudna za biodistribuciju nanomaterijala i njihovu eliminaciju iz organizma [165, 166]. Najčešće detektovani proteini vezani za biomaterijale u organizmu su albumini, apolipoproteini, imunoglobulini i fibrinogen [167-172], a pretpostavlja se da adsorpcija proteina primarno zavisi od hidrofobnosti površine nanomaterijala i njihovog naelektrisanja [167, 171]. Nedugo nakon kontakta sa proteinima krvi, na površini nanočestica se mogu aktivirati trombociti. Na primer, partikule polivinilhlorida mogu stimulisati koagulaciju krvi nakon izlaganja,

agregaciju i adheziju trombocita, dok iste partikule modifikovane sa poli-etilen glikolom (PEG), ne indukuju navedene procese [173]. I za druge nanočestice je pokazano da modifikacija PEG-om smanjuje vreme agregacije trombocita i koagulaciju krvi [174]. Međutim, nije samo disperzibilnost u vodenim rastvorima osobina koja određuje da li će se trombociti aktivirati ili ne, obzirom da i derivati fullerena koji su disperzibilni u vodi mogu ubrzati vreme koagulacije [175]. Osim aktivacije koagulacije, nanomaterijali mogu izazvati aktivaciju komplementa, klasičnim, alternativnim ili lektinskim putem, kako je pokazano za ugljenične nanocevi (CNT) [176]. Slično odgovoru organizma na makroskopske materijale, pokazano je da od proteina ekstraćelijskog matriksa, anafilatoksina, opsonina, imunoglobulina i drugih, zavisi na koji način će nanomaterijal biti preuzet od strane ćelija, a nakon toga, da li će se pokrenuti inflamacijski ili imunosupresivni odgovor na nanomaterijal.

1.4.4.1 Mehanizmi preuzimanja nanomaterijala

Nanomaterijali se lako preuzimaju od strane većine ćelija, pogotovo profesionalnih fagocita kakvi su makrofagi, DC i granulociti. Mehanizmi kojim se unose nanočestice su isti kao i za druge makromolekule: fagocitoza (posredovana manoznim receptorom, CR, Fc γ R, receptorom čistačom), makropinocitoza, kltrin-zavisna endocitoza, kaveolin-zavisna endocitoza i kltrin/kaveolin-nezavisna endocitoza [177-179] (**Slika 1.4.4.1.1**).



Slika 1.4.4.1.1 Preuzimanje nanomaterijala od strane profesionalnih fagocita.

Preuzimanje nanomaterijala zavisno od dinamina se može odvijati fagocitozom, makropinocitozom (nisu prikazani), ili receptor-posredovanom endocitozom, gde manozni receptor (MR), Fc γ receptor, receptor za komplement (CR) ili receptor čistač (SR) imaju najvažniju ulogu. Nanomaterijali utiču i na TLR koji posreduje u intraćelijskoj signalizaciji i sazrevanju fagozoma. Preuzimanje preko MR, Fc γ i CR korelira sa proinflamacijskim odgovorom, dok preuzimanje preko SR (nanočestice zlata) sa neinflamacijskim odgovorom.

Osim navedenih receptora, pokazano je i da ICAM-1 može povećati internalizaciju nanomaterijala [180]. Sa druge strane, 14nm CNT mogu interagovati sa EGF i β 1 integrinima [181]. Svaki od navedenih signalnih puteva ima specifične receptore koji deluju na određeni tip nanočestica i proteina adsorbovanih za njihovu površinu. Specifični proteini konjugovani za nanomaterijal, ili serumski proteini adsorbovani na nanomaterijal, mogu usmeriti internalizaciju nanomaterijala preko specifičnih receptora. Na primer, 50nm polistirenske nanočestice inkubirane u plazmi se internalizuju od strane Kupferovih ćelija preko SR [182]. Ove studije su pokazale da se lipidne nanočestice 100, 50 i 20nm nose preko CR [183], dok se derivati fullerena se mogu internalizovati preko Fc γ R [184, 185].

Ovi putevi internalizacije deluju na stimulaciju imunskog sistema i produkciju proinflamacijskih citokina. Koloidno zlato 35nm, i superparamagnetične nanočestice Fe-oksida, sa druge strane se unose preko SR [186, 187]. Ovaj način internalizacije se koristi i kod uklanjanja apoptotskih ćelija od strane makrofaga, i nije povezan sa produkcijom proinflamacijskih citokina [179].

Karakteristike nanomaterijala određuju koliko će ćelijskih receptora biti angažovano prilikom njihove internalizacije. Pokazano je da afinitet vezivanja receptora za ligande na nanočesticama raste proporcionalno veličini tih nanočestica [188]. Međutim i drugi faktori sem afiniteta liganda deluju na signalne puteve ćelija nakon vezivanja receptora. Na primer, afinitet vezivanja herceptina za ErbB2 receptor iznosi 10^{-10} M za solubilni herceptin, 5.5×10^{-12} M za herceptin- nanočestice zlata (engl. gold nanoparticles, GNP)-10nm, dok za GNP 70nm iznosi 1.5×10^{-13} . Međutim, najveći biološki efekat je uočen kod herceptin-GNP 40nm i GNP 50nm, koje imaju manji afinitet za ErbB2 receptor nego herceptin-GNP70nm [188]. Mehanizmi vezivanja nanomaterijala za receptore i njihova internalizacija su u velikoj meri nepoznati, obzirom da nisu do kraja ispitane interakcije nanomaterijala i proteina. Osim toga, elektronskim mikroskopima se mogu jasno proučavati samo nanomaterijali veće elektronske gustine (metalne nanočestice i sl.), ali ne i polimeri, dendrimeri i drugi nanomaterijali.

Kada su nanočestice vezane za membranu, nekoliko faktora određuju na koji način će se one internalizovati. PEG, i slični polimeri, mogu sprečiti internalizaciju nanočestica [189]. Pokazano je da se sa povećanjem zeta potencijala povećava i internalizacija nanomaterijala, tj. nanočestice sa zeta potencijalom od -3.8 mV (169nm) se manje preuzimaju od nanočestica sa potencijalom od -10.6 mV (171 nm) < -14.8 nm (172 nm), itd. [190], dok se one sa +0.1 mV (200nm) preuzimaju manje od nanočestica sa +40mV (200nm) [191]. Ćelijska membrana je blago elektronegativna, što može biti objašnjenje ovog fenomena [192, 193]. Pozitivno naelektrisane nanočestice mogu poremetiti membranski potencijal ćelije i izazvati influks Ca^{2+} [194]. Vezivanje negativno naelektrisanih nanočestica smanjuje fluidnost membrane, dok ga pozitivno povećava. Pri tome se ne sme i izostaviti činjenica da čim interaguju sa proteinima biološkog medijuma,

nanočestice menjaju naelektrisanje u skladu sa karakteristikama adsorbovanih proteina. Jedan od važnih faktora internalizacije nanomaterijala je njihov oblik. U tom smislu je pokazano da se štapići najviše internalizuju od strane ćelija, a zatim sfere, cilindri pa kocke [195]. Ovaj poredak važi samo za nanočestice veličine oko 100nm, dok za nanočestice manje od 100nm važi to da se nanosfere internalizuju više ili podjednako u poređenju sa nanoštapićima [196, 197]. Pored geometrije, veličina ključno određuje preuzimanje nanomaterijala od strane ćelija. Za sferične GNP, silikonske nanočestice, SWCNT i kvantumske tačke je pokazano da dijametar od 50nm predstavlja optimum koji maksimalizuje brzinu i količinu preuzimanja u sisarske ćelije [192, 198, 199]. Takođe, sam sastav nanomaterijala značajno deluje na brzinu preuzimanja, pa tako GNP i jednoslojne ugljenične nanocevi (SWCNT), veličine 50nm u dijametru, se preuzimaju $10^{-3}/\text{min}$, odnosno $10^{-6}/\text{min}$.

Vezivanje nanočestica za receptor proizvodi lokalno smanjenje slobodne Gibsove energije, koje indukuje uvrtnanje membrane oko nanočestice, nakon čega se formira zatvorena vezikularna struktura [200]. Ova vezikula se otkida od membrane u jednom trenutku, najčešće uz pomoć GTP-aze dinamina. Dinamin u tom smislu predstavlja ključni protein za sve procese internalizacije osim kod klatrin-kaveolin nezavisne endocitoze [201]. Nanočestice 5nm u dijametru mogu angažovati jedan ili dva receptora na površini membrane, dok nanočestice od 100nm mogu mnogo više. Nekoliko manjih nanočestica se moraju vezati blisko jedna drugoj da bi proizveli dovoljno slobodne energije za uvrtnanje membrane. U skladu sa principima termodinamike, nanočestice 40 i 50nm mogu vezati dovoljno receptora za lako uvrtnanje membrane. Iznad ove veličine, nanočestice angažuju više receptora čija je distribucija ograničena na površini, što se mora kasnije kompenzovati lateralnom difuzijom iz drugih delova membrane. Stoga vezivanje većih nanočestica za jedno mesto, smanjuje mogućnost da se druga nanočestica veže na drugo mesto, kako je i pokazano u matematičkom modelu internalizacije nanočestica [202].

Nakon fagocitoze nanočestice se uglavnom nalaze u fagozomu, ali se put prezentacije nanomaterijala razlikuje od puta prezentacije antigena. Podaci o tome šta se dešava sa nedegradabilnim nanočesticama (npr. metalne nanočestice ili ugljenične nanocevi) nakon

fagocitoze, u velikoj meri nedostaju. Postoje neki dokazi da se ligandi vezani za nanočestice isecaju proteazama unutar endozoma [203]. Kvantumske tačke mogu prilično dugo biti stabilne u intraćelijskim vezikulama makrofaga, sve dok degradacioni enzimi ne uspeju da razore srž ovih nanomaterijala [204]. Distribucija izvan endozoma takođe zavisi od veličine nanomaterijala, pa tako CdTe 2.1 nm ulaze u nukleus, dok one veličine od 4.4 nm ostaju u citoplazmi [205]. U zavisnosti od naelektrisanja, nanočestica može izaći iz endozoma (engl. *endosomal escape*) i interagovati sa brojnim proteinima citoplazme. U tom odeljku nanočestice mogu uticati na funkciju mitohondrija, produkciju ROS i aktivaciju signalnih puteva zavisnih od oksidativnog stresa [206]. Osim toga, unutar citoplazme nanočestice mogu remetiti proces mitoze nakon fosforilacije nukleusnih lamina [207]. Neki nanomaterijali mogu oštetiti DNK i dovesti do mutacija gena, zaustavljanja ćelijskog ciklusa, ćelijske smrti i karcinogeneze. U tom smislu je pokazano da hidrofilne partikule Ti-oksida mogu imati onkogeni potencijal [208]. Kada se nalaze u citoplazmi, nanočestice tamo ostaju sve dok se ponovo ne sortiraju u vezikule i uključe u egzocitotski put.

1.4.4.2 Efekti nanomaterijala na imunski sistem

U okviru inflamacijskog odgovora, nanomaterijal potencijalno može imati antigena svojstva. Međutim, gotovo da nema podataka koji pokazuju da se specifična antitela proizvode na sam nanomaterijal. Dve studije su pokazale da se mogu proizvoditi poliklonska antitela specifična na fulerene C₆₀ i C₇₀ [184, 185]. Međutim, druge dve studije nisu pokazale formiranje specifičnih antitela na C₆₀, čak ni u prisustvu kompletnog Freundovog adjuvansa [209, 210]. Za razliku od antigenosti koja nije do kraja ispitana, nanomaterijali se već dugo koriste kao adjuvansi. Pokazano je da GNP mogu indukovati visok titar antitela specifičnih na protein koji je za njih vezan [211]. Slično tome, imunizacija glikoproteinima virusa u polisaharidnoj nanočestici obmotanoj lipidima, indukuje stvaranje četiri pita više IgG antitela nego imunizacija standardnim adjuvansom sa česticama aluminijuma [212]. Slična ispitivanja su rađena i na drugim nanomaterijalima, kao što su fulereni i polilaktičnokoglikolična kiselina (PLGA) [213, 214]. Imunske ćelije mogu prepoznati proteine na površini nanomaterijala i pokrenuti inflamacijski odgovor.

Međutim, mnogo faktora je nepoznato u ovom procesu, pogotovo kako površinsko naelektrisanje, hidrofobnost i veličina deluju na inflamacijski odgovor organizma. Veća verovatnoća je da će katjonske nanočestice izazvati inflamacijsku reakciju nego anjonske ili neutralne nanočestice. U tom smislu su katjonski lipozomi mogu da indukuju znatnu produkciju TNF- α , IL-12 i IFN γ [215], za razliku od anjonskih dendrimera.

U odgovoru na nanomaterijal ključnu ulogu mogu igrati kontaminirajući metalni joni koji se javljaju u toku procesa proizvodnje, kao što je pokazano za CNT [216], gde kontaminanti mogu izazvati inflamacijsku reakciju iako same CNT nemaju takav efekat. Pretpostavlja se da je inflamacijski odgovor na nanomaterijale posredovan receptorima urođene imunosti. Obzirom da je poznato kako PAMP i DAMP deluju na PRR, dostava sintetičkih agonista do PRR, pre sve TLR agonista, predstavlja dobru strategiju za kontrolisanu modulaciju imunskog sistema u pravcu povećane antitumorske aktivnosti. Kada se TLR agonisti vežu za nanočesticu zajedno sa specifičnim antigenom, može se pokrenuti antitumorski odgovor posredovan citotoksičnim T ćelijama. Tako je pokazano da DC tretirane PLGA nanočesticama konjugovanih tetanus toksinom ili MUC1 antigenom, kancerskim markerom, stimulišu snažnu proliferaciju T ćelija koja je mnogo veća nego kada se indukuje samim tetanusnim toksinom ili tumorskim antigenom [213].

Nanomaterijali mogu imati i imunosupresivni efekat na imunski odgovor. Ovo može biti značajan nepoželjni efekat kod terapije kancera ili infekcija, ali dobar kod terapije inflamacijskih oboljenja. Dendrimeri konjugovani glukozaminima su pokazali snažan inhibicioni efekat na produkciju inflamacijskih citokina i hemokina od strane makrofaga i DC stimulisanih LPS-om, pri čemu ove nanočestice nemaju citotoksični efekat [217]. Autori su pretpostavili da se ovakve nanočestice mogu koristiti kod septičnog šoka izazvanim endotoksinom. Ove i druge studije su ukazale na to da nanočestice mogu imati i imunosupresivni i antiinflamacijski efekat, i kao takve se koristiti u terapiji. Međutim, treba imati u vidu nepoželjne efekte imunosupresije. Postavlja se pitanje da li će nanomaterijal namenjen za terapiju kancera ili oslikavanje, inhibirati imunski sistem koji se bori protiv kancera, bakterija ili virusa. Stoga je neophodno ispitati potencijalne nepoželjne imunosupresivne efekte nanočestica pre njihove primene u biomedicini.

1.4.4.3. Efekti nanomaterijala na makrofage

U kontekstu navedenih osobina nanomaterijala i njihovog efekta na imunski sistem, efekat različitih nanomaterijala je ispitivan na makrofagima. Lukarelli i sar. [218] su pokazali da metalne nanočestice u netoksičnim koncentracijama menjaju ekspresiju TLR i proinflamacijskih citokina kod U937 linije humanih makrofaga. Ovi autori su ukazali na to, da smanjenje ekspresije TLR9 nakon tretmana sa Ti i Si nanočesticama, može dovesti do neadekvatnog odgovora imunskog sistema na infekcije. Sa druge strane, povećanje ekspresije TLR7, TLR3 i proinflamacijskih citokina nakon tretmana nanočesticama Zr, i usmeravanje ka M1 fenotipu makrofaga, može predstavljati opasnost za uspostavljanje hronične inflamacije. I druge nanočestice su pokazale snažne efekte na promenu ekspresije MMP2, MMP9 i njihovih inhibitora od strane makrofaga modulacijom funkcije AP-1 i tirozinskih kinaza [219]. Makrofagi pluća su ključni za odgovor na inhalirane partikule. Ma i sar. [220], su pokazali da inhalacija CeO₂ nanočestica smanjuje produkciju NO i povećava produkciju IL-12 od strane alveolarnih makrofaga nakon stimulacije LPS-om. Pored toga, uočena je inflamacija, citotoksičnost, fosfolipidoza i uvećanje alveolarnih makrofaga nakon ovakvog tretmana. Nakon 28 dana, za ove ćelije je pokazano ad povećavaju ekspresiju arginaze-1, što upućuje na promenu fenotipa alveolarnih makrofaga u M2 tip. U eksperimentima u kojima su makrofage izlagane i infekciji i nanočesticama je pokazano da je fagocitna funkcija ovih ćelija znatno smanjena. Braydich-Stolle i sar. [221] su pokazali da Al₂O₃ partikule, sa ili bez prethodne stimulacije ćelija sa *Staphylococcus aureus*, inhibiraju ekspresiju NF-κB kod makrofaga, što dovodi do smanjenja produkcije proinflamacijskih citokina i hemokina od strane ovih ćelija. Takođe je pokazano da fulereni mogu smanjiti produkciju NO od strane makrofaga usled uklanjanja slobodnih radikala [222]. Slično tome, izlaganje alveolarnih makrofaga SWCNT (3-5nm debljine) može poremetiti imunski odgovor i uspešnu odbranu protiv *Listeria monocytogenes* kod C57BL/6 miševa [223], usled smanjenja respiratorne funkcije ovih ćelija. Ovaj i drugi radovi [224], su ukazali na to da izlaganje makrofaga SWCNT, može onemogućiti odbranu domaćina od infekcija, te je neophodno detaljno ispitivanje efekta CNT na fenotip i funkcije makrofaga.

1.4.4.4. Efekti nanomaterijala na dendrijske ćelije

Iako su DC ključne u pokretanju i regulaciji imunskog odgovora na nanomaterijale, mali broj studija je ispitivao efekte nanomaterijala na DC, pogotovo efekte GNP i CNT. U studijama sa polistirenskim nanočesticama je pokazano da se veće nanočestice (500nm) transportuju do limfnog čvora pomoću DC, dok se manje nanočestice (20nm) transportuju pasivno putem limfe, a preuzimaju ih rezidentne DC u limfnom čvoru (CD8a⁺), CD8a⁻ i pDC [225]. Neki nanomaterijali, kao što su ugljenikom obložene nanočestice Fe-oksida [226] i magnetne nanopartikule [225], u većim koncentracijama mogu biti toksični za DC, ali u manjim koncentracijama predstavljaju dobar sistem za ciljanu dostavu tumorskih antigena za terapiju kancera. Nanočestice, kao što su magnetne partikule obložene dekstranom ne indukuju proinflamacijski odgovor DC [227], dok druge (Si ili TiO₂), mogu aktivirati inflamozom i dovesti do aktivacije ovih ćelija [228]. DC predstavljaju ključne ćelije koje će u toku inflamacije aktivirati adaptivnu imunost i usmeriti njihovu diferencijaciju u Th1, Th2, Th17 ili Treg. Pokazano je da mikročestice (>1µm) indukuju Th1 odgovor, dok manje (<500nm) Th2 [229]. Sa druge strane, PLGA nanočestice indukuju jak Th1 odgovor, iako su nanometarske veličine [230, 231]. Stoga je ispitivanje efekta nanomaterijala na DC, i njihov efekat na polarizaciju od velike važnosti za njihovu kontrolisanu primenu, bilo u borbi protiv kancera ili u terapiji autoimunskih oboljenja.

1.5. KARAKTERISTIKE BIOMATERIJALA

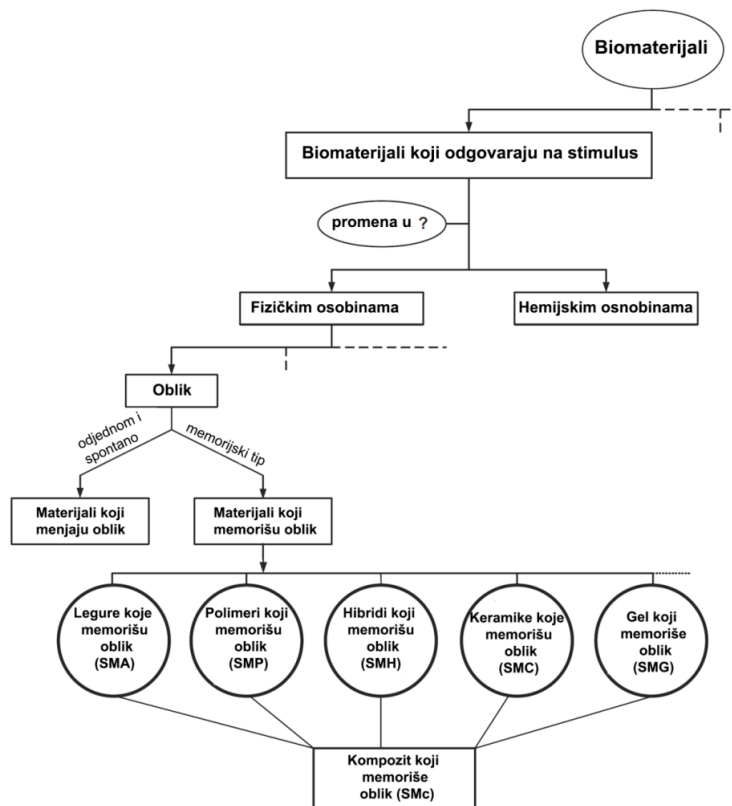
Razvoj biomaterijala neminovno korelira sa unapređenjem kvaliteta života, bilo da je on iskorišćen kao zamena za nefunkcionalni organ, stent u aterosklerotskim arterijama, ili materijal koji potpomaže oporavak povređenog tkiva kao što je hrskavica, koža i sl. U tom smislu su pravu revoluciju doneli napredni biomaterijali [232].

1.5.1 Napredni biomaterijali

Iako su napredni i pametni materijali opisivani još ranije [233-235], nema jasne definicije ovih materijala. Moglo bi se reći da su to biomaterijali koji imaju instruktivni/induktivni efekat na ćelije i tkiva nakon interakcije sa unutrašnjim ili spoljnim stimulusima kao što je promena pH, temperature, jonske jačine ili magnetizma [232]. Dakle, vidi se da napredni biomaterijal ima bioaktivni efekat koji je podložan modifikaciji po dejstvom drugih stimulusa. Sa kliničke tačke gledišta, napredni materijal/implant se može definisati kao materijal koji aktivno učestvuje u regeneraciji oštećenog tkiva i odgovara i reaguje na stimulse iz svoje okoline. Površinske karakteristike, kao što su hrapavost, topografija i hemijske osobine, imaju ključnu ulogu u ćelijskom odgovoru na napredni biomaterijal, pogotovo na ćelijsku adheziju, proliferaciju i funkcije [236].

Za napredne materijale je ključno da mogu odgovoriti na određeni stimulus, time što menjaju svoje fizičke ili hemijske osobine. Takvi stimulusi mogu biti termalni, mehanički, električno-voltažni, magneti, pH, vlažnost i fotosenzitivni. Zajednički naziv za ove materijale je da su to materijali koji odgovaraju na nadražaj iz okruženja (engl. *stimulus-responsive materials*, SRM) (**Slika 1.5.1.1**). U okviru ovih biomaterijala se mogu izdvojiti i legure koje pamte oblik (SMA) [237, 238], sa jedinstvenim efektom pamćenja (SME) oblika koji se definiše kao:

„...sposobnost da se originalni oblik vrati u prvobitno stanje u prisustvu odgovarajućeg stimulusa, nakon što je prethodno bio kvazi-plastično deformisan [239].



Slika 1.5.1.1 Različiti tipovi SMM u okviru biomaterijala.

Preuzeto iz [240]

1.5.2. Karakteristike legura koje pamte oblik

Fazna transformacija SMA je otkrivena 1932. godine od strane švedskog fizičara Olander-a, koji je pokazao da Au-Cd legura može biti plastično deformisana kada se ohladi, i vraćena u originalni oblik zagrevanjem [241]. Nakon toga su 1938. godine Greninger i Mooradian pokazali sličan efekat za Cu-Zn , odnosno Cu-Sn leguru [242]. Fundamentalni fenomen u osnovi memorijskog efekta koji se bazira na termoelastičnom ponašanju martenzitne faze je detaljno opisan 10 godina kasnije od strane Kurdjumov-a i Khandros [243], i Chang i Read [244]. Slični efekti su bili zapaženi i kod NiTi i CuAlNi legura 1950-tih. Ova otkrića su zainteresovala mnoge istraživače i investitore, ali je industrijska primena ovih legura bila onemogućena usled velike cene i kompleksnosti njihove proizvodnje, kao i

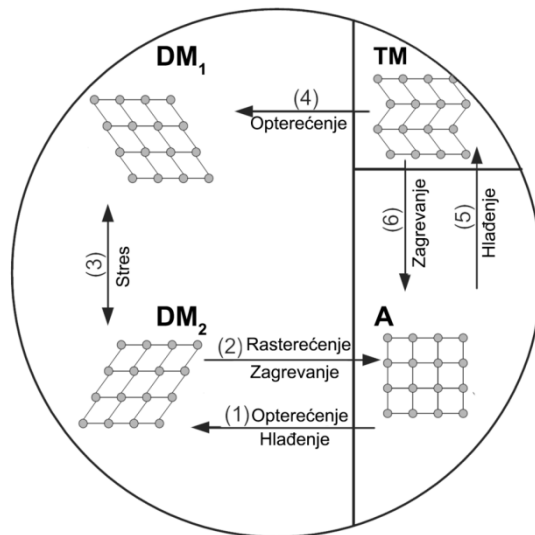
zbog neatraktivnih mehaničkih osobina. Iako je NiTi legura otkrivena od strane William Buehler-a 1959. godine [245], potencijal za njenu komercijalizaciju je ostvaren tek nakon što su W. Buegler i F. Wang dokazali SME kod NiTi legura 1963. godine [246]. Kao ekspert za intermetalne legure, Buehler se fokusirao na legure sa prostom stehiometrijskom kompoziciom koje imaju visoke tačke topljenja. Od početnih 60 legura, istraživanja je suzio na ekvatomsku smešu nikla i titanijuma. Njegova istraživanja su pokazala da NiTi ima značajno bolju rezistenciju, optimalnu žilavost i rezistenciju na zamor u poređenju sa drugim legurama. Materijal je nazvan nitinol od (Ni-nikl, Ti-titanijum NOL-Naval Ordnance Laboratory). Prva biomedicinska aplikacija nitinola je bila u endovaskularnoj hirurgiji kao šireći intravaskularni filter. Nitinol je kao napredni materijal sve češće korišćen u biomedicinskim uređajima usled SME, superelastičnosti, odlične rezistencije na zamaranje i visokog kapaciteta za amortizaciju mehaničkih udaraca.

1.5.2.1 Fazne transformacije SMA

SMA imaju specifičnu sposobnost da se fazno transformišu termomehaničkim stimulusima. SMA se mogu transformisati između dve čvrste faze [247]. Dinamička reverzibilnost kristalografske strukture dve čvrste faze daje SMA jedinstveni SME, superelastičnost i visok amortizacioni kapacitet, što ih čini vrlo atraktivnim za izradu biomedicinskih uređanja i termomehaničkih senzora.

Roditeljska faza najčešće korišćene NiTi legure, koja se naziva austenitna faza, ima B2 kubičnu kristalnu strukturu. Austenit postoji samo u jednoj kristalografskoj orijentaciji atoma koja je stabilna u čvrstom stanju samo na višim temperaturama. Sekundarna faza, nazvana martenzit, ima B19' monoklinastu ili ortorombičnu kristalnu strukturu. Za razliku od austenita, martenzit je stabilan samo na niskim temperaturama i lako se deformiše pri mehaničkom opterećenju. Martenzit se transformiše iz austenita bilo hlađenjem ili pod dejstvom stresa. Transformacija bez difuzije atoma, između ova dva čvrsta stanja se odvija na račun kompleksnog preuređenja atoma pod dejstvom termomehaničkih stimulusa. Međutim, za razliku od martenzitne transformacije čelika, transformacija SMA se odvija na temperaturama oko sobne [239].

Martenzitna fazna transformacija daje kristalografsku orijentaciju koja zavisi od načina indukcije martenzita (**Slika 1.5.2.1.1**). Termalna indukcija martenzita hlađenjem formira visoko uređene udružene (*engl. twinned*) polidomene sa 24 različite orijentacije kristala [248]. Mehanička stimulacija preraspoređuje ove različite tipove kristalografija u smeru jedne dominantne razdružene (*engl. detwinned*) varijante čija se kristalografska orijentacija poklapa sa pravcem primenjenog mehaničkog stresa [249]. Sve transformacije ovog tipa omogućavaju samoprilagođavanje materijala, obzirom da promena oblika u jednoj grupi inicira polja stresa u susednim delovima, što favorizuje formiranje određene strukturne varijante [250].



Slika 1.5.2.1.1. Tri faze i 6 transformacija SMA.

A-austenit, TM- udruženi martenzit, DM- razdruženi martenzit. Indeksi 1 i 2 se odnose na različite varijante razdruženog martenzita (preuzeto iz [251], modifikovano).

Početna temperatura martenzita (M_s) je temperatura na kojoj se austenit počinje transformisati u martenzit, dok je krajnja temperatura martenzita (M_f) temperatura na kojoj je ova transformacija kompletna. Početna temperatura austenita (A_s) je temperatura na kojoj započinje reverzibilna transformacija iz martenzita u austenit, dok se završetak ove

transformacije označava kao krajnja austenitna temperatura (Af). Temperature na kojima se odvijaju ove promene u jednu i drugu fazu ne koincidiraju, a razmak između Ms i As se naziva histereza. Ms, Mf, As i Af SMA, kao i opseg histereze se mogu podešavati stehiometrijskim odnosima Ni i Ti, ili CuAlNi i dr., kao i tehnikama završne obrade materijala.

1.5.2.2. Efekat pamćenja oblika i superelastičnost

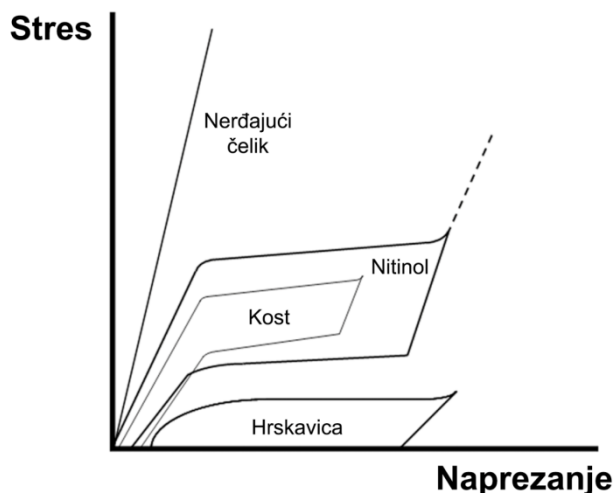
SME odlikava jedinstven efekat reverzibilne austenitno-martenzitne fazne transformacije. Prvo memorisanje oblika se fiksira u austenitnom stanju. Transformacija u martenzitnu fazu omogućava laku deformaciju materijala. Zagrevanjem se indukuje povratna transformacija, i materijal se vraća u atomski uređenu austenitnu strukturu, a time i u pređašnji oblik. Osim toga što može zapamtiti austenitni oblik, SMA mogu naučiti i sekundarni, martenzitni oblik [252]. U martenzitnoj fazi, SMA se može trenirati kroz ponovljene cikluse SME nametanjem i uklanjanjem sila u martenzitnoj fazi. Nakon nekoliko takvih ciklusa, mikrostrukturne dislokacije se unose u materijal, tako da je sekundarni oblik memorisan i može se indukovati termalno, bez dodatnog nametanja mehaničkog stresa (dvosmerni SME).

Na temperaturi višoj od Af, materijal ima kompletno austenitnu faznu konfiguraciju. Favorizovana razdružena varijanta sada ima mali modus elastičnosti. U toku mehaničkog opterećenja se održava martenzitna faza i materijal se može lako deformisati, što se naziva superelastičnost SMA. Rasterećenje uzrokuje klizanje atoma u stabilnu strukturu austenitne faze. Rasterećenje pri temperaturama većim od Af dovodi do kompletne reverzije austenitne faze, pri čemu je do 8% deformacije, ova reverzija potpuna potpuno. Veće naprezanje uzrokuje plastične deformacije i pucanje materijala.

1.5.2.3 Efekat amortizacije

Nitinol ima visok amortizacioni kapacitet, što je naročito korisno za biomedicinske implantate. Ovaj kapacitet predstavlja sposobnost materijala da transformiše mehaničku energiju, nastalu usled primene sile, u termalnu energiju. Transfer i rasipanje mehaničke

energije u toplotnu energiju omogućava implantatu da bude rezistentan na šokove i vibracije. Na taj način materijal štiti tkiva od jakih mehaničkih sila na mestu interakcije. Dugi materijali koji se koriste kao implantati imaju mali amortizacioni kapacitet. Kao rezultat toga, ponavljajući mehanički stimuli mogu da oštete ćelije na mestu kontakta sa biomaterijalom. Visok amortizacioni kapacitet nitinola, sa druge strane, omogućava kvazistatičnu apsorpciju mehaničkog stresa, što je slično ponašanju bioloških sistema (biomimetičko ponašanje), i podudara se drugim biološkim strukturama (kost, mišić, ligamenti, hrskavica (Slika 1.5.2.3.1) [253].



Slika 1.5.2.3.1 Odnos stresa i naprezanja nerđajućeg čelika, nitinola i tkiva.

Odnos stresa i naprezanja nitinola je sličan onome kod kostiju i tetiva i bolji je od nerđajućeg čelika. Preuzeto iz [254].

1.5.2.4 Uporedne mikrostrukturne karakteristike NiTi i CuAlNi SMA

Pored NiTi, u praksi se najčešće koriste SMA na bazi Cu, kao što su CuZnAl, CuAlNi i druge. Osnovna mana polikristalinskih CuAlNi je mala reverzibilna deformacija koja za jednosmerni SME iznosi oko 4%, dok za dvosmerni SME 1.5% usled intergranularnog slamanja materijala. Sa druge strane, CuAlNi legure su značajno jeftinije od NiTi legura, i trenutno su jedino one u opciji ako su neophodne visoke temperature transformacije (Tabela 1.5.2.4.1).

Tabela 1.5.2.4.1. Uporedne osobine NiTi i CuAlNi SMA.

		NiTi	CuAlNi
Specifična toplota (J/kg°C)		450-620	373-574
Termalna konduktivnost (20°C)(W/mK)		8.6-18	30-75
Gustina (kg/m ³)		6400-6500	7100-7200
Latentna toplota (J/kg)		19000-32000	7000-9000
Električna rezistentnost (10 ⁶ Ωm)		0.5-1.1	0.1-0.14
Termalni koeficijent širenja (10 ⁻⁶ /K)		6.6-11	17
Maksimalni stres praćen oporavkom (Mpa)		500-900	300-600
Radni stres (Mpa)		100-130	70
Otpornost na zamaranje (N=10 ⁶)(Mpa)		350	350
Maksimum naprezanja u transformaciji (%)	N=1	6-8	5-6
	N<10 ²	6-8	4
	N<10 ⁵	2-4	/
Uobičajen broj termalnih ciklusa		>10 ⁵	>5 x 10 ³
Jungov modul (Gpa)		28-83	80-100
Temperature fazne transformacije		-200-200	-200-200
Histereza (°C)		2-50	20-40
Temperatura pregrevanja (°C)		400	300
Amortizacioni kapacitet (SDC%)		15-20	10-20
Veličina zrna (μm)		1-100	25-100
Kontrola topljenja, livenja i sastava		Teška	Laka
Formiranje		Teško	Teško
Rad na hladnom		Lako	Veoma teško
Mašinska obrada		Teška	Laka
Odnos cene		10-100	1.5-2

Preuzeto iz [239, 255]

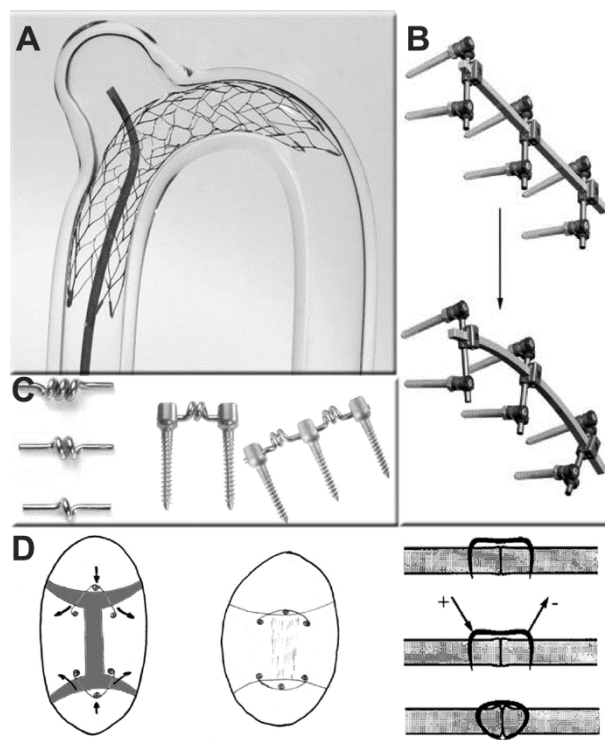
Temperature transformacije NiTi i CuAlNi su slične. Međutim, što se tiče histereze, NiTi imaju znatno manju širinu od CuAlNi [256]. Kada se upoređi ukupan rad ovih legura, ispoljen kao volumetrijski rad (stres x naprezanje)/ gustina SMA, NiTi legure imaju bolje osobine u poređenju sa CuAlNi [256]. Takođe, NiTi legure imaju veću energetska efikasnost u poređenju sa CuAlNi SMA. Sa druge strane, CuAlNi imaju bolju termalnu konduktivnost, znatno su jeftinije za proizvodnju, i imaju bolji amortizacioni kapacitet [256].

1.5.2.5 Primena SMA u biomedicini

SMA imaju široku primenu u biomedicini, a najčešće se upotrebljavaju za izradu stentova, kalemova, žica za navođenje, ortopedskih proteza i sl. Stent se primarno upotrebljava u tretmanu ekstrakranijalnih ili intrakranijalnih aterosklerotskih oboljenja, ili kao potpora za endovaskularni kalem kod intrakranijalne aneurizme (**Slika 1.5.2.5.1**). Ovakav uređaj se primenjuje radi ponovnog uspostavljanja protoka kroz krvni sud koji je sužen ili kod koga postoji turbulentno kretanje. Problem kod primene ovakvih uređaja je dostaviti stent na odgovarajuće mesto u organizmu kroz brojne krvne sudove, i pri tom ih ne oštetiti. SMA legure, usled svoje superelastičnosti i SME, su idealne za intravaskularne stentove i u tom smislu su bolje od nerđajućeg čelika i kobalta koji su ranije korišćeni [253].

Stent od nitinola se može lako skupiti u toku dopremanja kroz krvne sudove i zatim rašiti na odgovarajućem mestu. Nakon toga ovaj samošireći stent vrši kontinuirani pritisak na krvni sud. Stent od nitinola se priprema tako da fazne transformacije (Af) bude u okviru telesne temperature, a obzirom da se još uvek zadržava u martenzitnoj formi usled mehaničkog pritiska suda, nitinol ima veliki amortizacioni kapacitet koji može sprečiti dalja oštećenja krvnih sudova usled turbulentnog kretanja krvi. Kod tretmana aneurizmi, cilj je da stent nitinola premosti delove suda oko aneurizme, pri čemu njegova superelastičnost i SME omogućavaju izvršenje ovog zadatka. Kalemovi se često koriste za okluziju intrakranijalne aneurizme, a izrađuju se od platine sa PLGA, hidrogelovima i sl. Nedavno je izrađen kalem od nitinola i platine, i pokazano je da njegove SME karakteristike

omogućavaju bolju potporu krvnom sudu i veću rezistenciju na sakupljanje u poređenju sa drugim kalemovima [257].



Slika 1.5.2.5.1 Primena nitinola u biomedicini.

A) In vitro model samoširećeg stenta od nitinola koji premošćava delove krvnog suda oko aneurizme. B) Uređaj za korekciju deformiteta kičme kod kojih šipka od nitinola omogućava konstantan pritisak na kičmeni stub na telesnoj temperaturi nakon ugrađivanja C) Sistem za dinamičku stabilizaciju pokreta koji se sastoji od dva šrafa od titanijuma, a između njih je element od nitinola. D) žice od nitinola koje omogućavaju zarastanje sutura lobanje kod kraniosinostoze. Preuzeto iz [258], modifikovano.

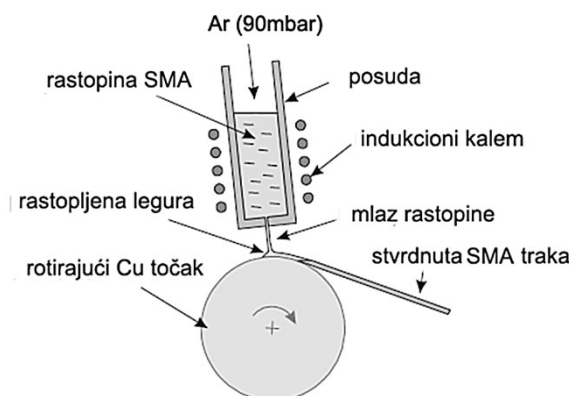
Mirkožice za navođenje se upotrebljavaju za vođenje mikrokatereta u anatomski nepristupačna mesta, pri čemu se uglavnom prave od nerđajućeg čelika sa Pt-W omotačem. Obzirom da nitinol ima znatno veću superelastičnost (podnosi 8% naprezanja u odnosu na

0.5% kod nerđajućeg čelika) razmatra se njihova upotreba u ove svrhe. Osim toga, mikrožice za navođenje od nitinola bolje distribuiraju stres, što sprečava lomljenje mikrožica u toku postupka navođenja [259]. Upotreba nitinola kao ortopedskog uređaja se zasniva na SME karakteristikama koje mogu omogućiti konstanti pritisak kod, npr. korekcije deformiteta kičme [260-262]. Osim toga, ispituje se i njegova primena kod uređaja za dinamičku stabilizaciju i za stimulaciju srastanja kostiju. Uređaji za dinamičku stabilizaciju od nitinola omogućavaju očuvanje pokreta struktura zahvaćenih artrodezom kostiju u fiziološkim okvirima usled njegovih superelastičnih osobina koje imaju biomimetičke osobine u poređenju sa ranijim tretmanima [262, 263]. Potrebe različitih uređaja su veoma različite i zahtevaju različite načine pripreme uređaja od SMA. Međutim zajedničko za sve je da to finalni uređaj mora biti biokompatibilan.

1.5.2.6 Priprema SMA konvencionalnim metodama i brzim otvrdnjavanjem valjanjem rastopine

Termomehaničke osobine SMA, kao što su temperature transformacije zavise od brojnih aspekata intermetalne kompozicije i obrade ingota. Na primer, nitinol ima jako mali opseg variranja sastava, gde i najmanje varijacije u odnosu nikla i titanijuma značajno utiču na temperature transformacije nitinola. 1% razlike u odnosu Ni i Ti menja temperaturu transformacije za 100°C [247]. Nečistoće u leguri, kao što su kiseonik, azot ili ugljenik, reaguju sa Ti i formiraju precipitate što rezultuje u relativno većem odnosom Ni u finalnoj leguri i pomeranja temperature transformacije. Za biomedicnisku primenu, temperature fazne transformacije SMA ne smeju da variraju više od 5 °C, što se izjednačava sa dozvoljenim varijacijama u sastavu NiTi legure od 0.05%. Stoga se za precizni sastav legura koriste visoko prečišćeni primarni materijali (Ni > 99.94% i Ti >99.99%) i koristi se topljenje temperaturom, ili električno topljenje u vakumu [247]. Nakon formiranja ingota često je neophodno ponovno pretopljavanje u cilju homogenizacije strukture, što se odvija na 600°C do 900°C, pri čemu se dizajnira i željeni oblik materijala, tj. austenita forma SMA. Finalno prekalupljivanje (engl. annealing) omogućava precizniju kontrolu temperatura faznih transformacija kao što je Af.

Jedan od načina kojim može da se proširi primena SMA jeste primena alternativnih metoda livenja. Brzo otvrdnjavanje legura (engl. *rapid solidification*, RS) valjanjem rastopine (entl. *melt-spinning*) predstavlja takvu jednu metodu (**Slika 1.5.2.6.1**), koja omogućava proizvodnju SMA traka, kojima nije neophodan dodatni termomehanički tretman. Međutim, RS metoda unosi značajne mikrostrukturne promene u SMA u poređenju sa kontrolnim materijalom.



Slika 1.5.2.6.1. Šema procedure pravljenja RS SMA traka valjanjem rastopine.

Preuzeto iz [12]

Najčešće opisivana promena je redukcija u veličini zrna SMA. Ova promena mikrostrukture SMA korelira sa smanjenjem temperature transformacije i boljim mehaničkim i funkcionalnim svojstvima SMA, kao što su superelastičnost i amortizacioni kapacitet [264]. Brojne fizičke osobine traka dobijenih valjanjem rastopine, kao i njihova mikrostruktura, u velikoj meri zavise od vrednosti parametara u procesu proizvodnje [265]. U raniji studijama je naša grupa [12] pokazala da RS valjanjem rastopine omogućava proizvodnju SMA traka sa boljim SME u odnosu na legure istog sastava proizvedene konvencionalnim metodama. Međutim, ostalo je nepoznato da li RS metoda proizvodnje SMA menja njihovu biokompatibilnost u odnosu na legure istog sastava ali proizvedene konvencionalnim metodama.

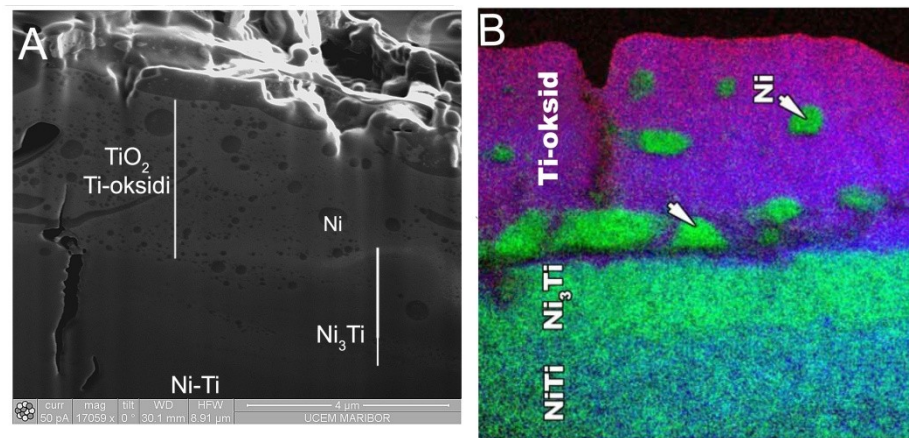
1.5.3. Biokompatibilnost legura koje pamte oblik

U poslednje tri decenije biokompatibilnost konvencionalnih NiTi je detaljno proučena u *in vitro* i *in vivo* sistemima [266, 267], međutim slične studije sa RS NiTi SMA, kao i konvencionalnim i RS CuAlNi SMA ne postoje [268]. Usled velike količine potencijalno toksičnih jona u ovim legurama, koje mogu izazvati citotoksičnost, kacenrogenost, mutagenost, iritaciju, alergiju i hipersenzitivnost, neophodno detaljno ispitivanje njihove biokompatibilnosti. Ovakva ispitivanja su posebno važna kada se uzmu u obzir značajne razlike u površinskom oksidnom sloju SMA koje nastaju kao posledica različitih procedura njihove pripreme [266, 267].

Biološki odgovor na implantate direktno zavisi od osobina površine tog implantata. Ključne karakteristike površine, koje su od presudnog značaja za biološki odgovor na implantat, su hemijski sastav, kristalnost, heterogenost, hrapavost i kvašljivost (hidrofobnost/hidrofilnost) [269, 270]. SMA imaju izvrstan potencijal za primenu u biomedicini kao što je ranije napomenuto. Međutim, biomedicinska aplikacija ovih materijala uključuje direktan kontakt sa tkivima, pa se uvek postavlja pitanje kakva je biokompatibilnost SMA. Prva reakcija brojnih inženjera, kliničara, stomatologa i ortopeda je da se SMA odbace kao potencijalan biomaterijal zbog velike količine toksičnih jona kakvi su Ni i Cu, obzirom da ovi joni mogu izazvati alergijski odgovor kod domaćina. Ovakva skepsa je nastala usled slabog razumevanja korozivnih osobina SMA i njihove biokompatibilnosti. Naime, pokazano je da je biokompatibilnost NiTi SMA slična biokompatibilnosti implantata od čistog Ti, i mnogo bolja od biokompatibilnosti konvencionalnih CoCrMo legura. Međutim, pre analize biokompatibilnost SMA, ukratko će biti pojašnjene njihove površinske i korozivne karakteristike, pre svega na primeru NiTi legura, obzirom da su slični fenomeni opisani i kod CuAlNi legura [268].

1.5.3.1 Karakteristike površine SMA

Ni u ekvatomskoj NiTi leguri je u intermetalnoj vezi sa Ti. Regularna kristalna rešetka se održava jakim atomskim vezama koje su između intermetalne i kovalentne veze, što znači da je za oslobađanje Ni i Ti iz ove rešetke potrebna relativno velika energija [266]. Pored toga, pokazano da Ti ima tendenciju da oksiduje na površini NiTi legura [267]. Ovo je u skladu sa činjenicom da slobodna entalpija Ti-oksida ima negativan predznak i prevazilazi entalpiju formiranja Ni-oksida [271]. Kao rezultat toga, Ni je uglavnom u elementarnom stanju na površini NiTi. Nakon izlivanja, NiTi su izložene vazduhu, ili atmosferi bogatoj kiseonikom, što potencira spontano formiranje pasivnog Ti-oksidnog filma na njihovoj površini.



Slika 1.5.3.1.1 Površina NiTi legura kondicioniranih na vazduhu nakon izlivanja.

Prikazana je reprezentativna FIB/SEM analiza, pomoću BSE detektora, gde se uočava površinski svetliji sloj oksida Ti, a ispod njega zona bogata Ni₃Ti (Neobjavljeni rezultati Rudolf i sar). Slična struktura je dobijena i TEM sa filtriranom energijom [272].

Detaljna analiza XPS i difrakciometrija X zracima [273, 274] je pokazala da je dominantan oksid na NiTi TiO₂, ali su prisutni i drugi oksidi Ti i Ni, kao i elementalni Ni, obzirom da na sobnoj temperaturi oksidacija Ti i Ni nije kompletna. Heterogenost u sastavu

oksida doprinosi većoj podložnosti NiTi legura na koroziju. Ovo je naročito izraženo kod NiTi legura kod kojih se ispod površinskog sloja formira sloj bogat Ni_3Ti , koji se može osloboditi nakon pucanja krhkog površinskog sloja Ti-oksida [273, 274]. Na **slici 1.5.4.1.1** je prikazana tipična površina NiTi legura koje su izložene vazduhu.

Na osnovu analize 1s orbitale O pomoću XPS-a moguće je utvrditi detaljan hemijski sastav NiTi legura [267]. Uočeno je da je Ti^{4+} dominantan oblik na površini NiTi, što odgovara TiO_2 , a u manjem procentu se Ti nalazi u obliku TiO i Ti_2O_3 , ili hidratisanog Ti jona. Ni, iako prisutan u malim količinama, može biti u obliku Ni(OH)_2 i NiO [275]. U tom obliku se Ni može osloboditi u okolni rastvor i dovesti do različitih bioloških efekata [276]. Slične studije o detaljnoj karakterizaciji površine NiTi RS SMA ne postoje, dok za CuAlNi legure, bilo da su konvencionalne ili RS, postoje samo delimični podaci [268].

1.5.3.2 Korozivnost SMA

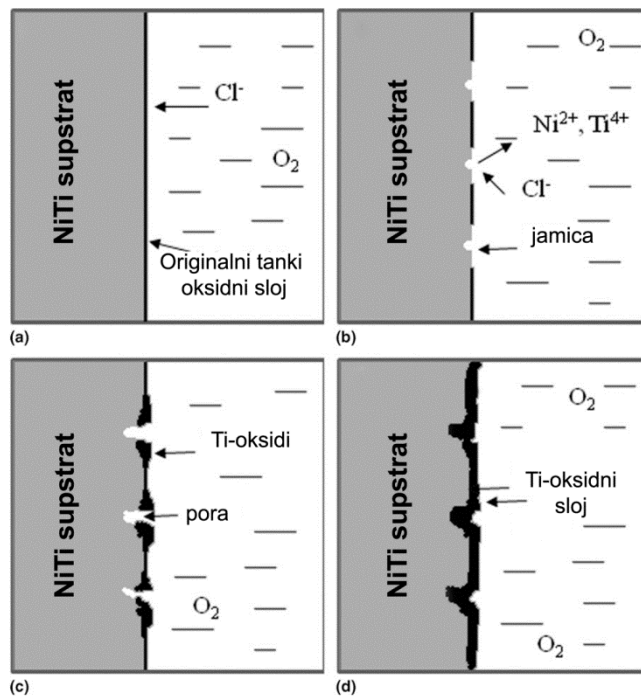
Procesi korozije u rastvorima kakvi se nalaze u organizmu se odvijaju posredstvom transfera elektrona između površine metala i elektrolita. Sila koja indukuje ovaj transfer je razlika u potencijalu između mesta koja imaju ulogu katode i anode [266]. Osnovni faktori koji utiču na proces korozije su: 1) karakteristike medijuma u kom je SMA (pH, temperatura i hemijski sastav) i 2) osobine površine SMA (kao što su hrapavost nastala tokom obrade materijala, homogenost sastava površine, stanje stresa materijala koji dovodi do veće podložnosti za napade H^+ , i dr.). ISO regulativa 10993-15/17, 17475 i ASTM F2129-01 definiše osnovne testove kojima se meri korozivni potencijal metalnih legura. Jedan od testova korozivnosti materijala koji se primenjuje *in vivo* i *in vitro*, se zasniva na merenju koncentracije oslobođenih jona spektroskopskim metodama. Naime, uzorci se izlažu različitim biološkim medijumima (krv, serum, fiziološki rastvor, itd) tokom različitog vremena, nakon čega se određuje korozivnost.

Test potapanja NiTi u fiziološki rastvor tokom 72 sata je pokazao da dinamika korozije u ovim okolnostima iznosi oko 0.001 mm godišnje [277]. Pokazano je da je oslobađanje Ni najveće oko 48-og sata, a da zatim se smanjuje na niske vrednosti [278]. Takođe je pokazano da NiTi u obliku dentalnih lukova potopljen u salivu oslobađa oko

13.05 mg dnevno, što je značajno manje od dnevnog unosa ovog metala, koji iznosi oko 200-300 mg/dan[279]. Ako se uporedi sa CoCr, NiTi SMA ima bolju rezistenciju na koroziju [280], ali je manje rezistentna od AISI316L i Ti-6Al-4V legura [252, 266]. Manja rezistencija NiTi na koroziju u odnosu na ove Ti-legure najverovatnije se zasniva na sporijoj kinetici repasivizacije NiTi legura. Testovi u kojima je mehanički oštećena površina NiTi, su pokazali da se repasivizacija NiTi zaista odigrava sporije nego kod Ti-legura, usled jakih atomskih veza koje postoje u mikrostrukturi NiTi [266, 280]. Za razliku od NiTi, za korozivne osobine CuAlNi SMA postoji relativno malo podataka. Naša grupa je nedavno pokazala da CuAlNi SMA u 0.5 M NaCl može osloboditi Cu u obliku CuCl_2^- jona koji difunduje u medijum. Dužim kondicioniranjem se povećava pasivizacioni sloj Cu_2O koji smanjuje dalje oslobađanje Cu. Osim oksida Cu, oksidi se formiraju i sa Ni i Al na površini CuAlNi legura [281]. Ovi rezultati su u skladu sa činjenicom da od kvaliteta površinskog sloja oksida na SMA zavisi i efikasnost barijere za otpuštanje toksičnih jona kao što su Ni i Cu.

Fundamentalna karakteristika površinskog oksidnog sloja je i njena dinamičnost. Naime, površinski sloj Ti-oksida se aktivno formira u kontaktu sa biološkim medijumom tokom korozije i repasivizacije. Na primer, nakon izlaganja NiTi legure rastvoru NaCl, inicijalni površinski sloj Ti-oksida je podložan napadu od strane Cl^- jona (**Slika 1.5.3.2.1**). Inicijalna korozija ima jamičast izgled i raspoređena je na mnogo mesta po površini. Najverovatnije se inicijalna korozija odvija na mestima defekata, i uključuje inicijalnu razgradnju originalnog oksidnog sloja i veze između Ti i Ni. Ovaj proces dovodi do oslobađanja Ni jona. Kako vreme prolazi jamičasta korozija se širi i mogu se uočiti pore na površini NiTi legura. Ni oslobođen sa površine materijala smanjuje lokalnu koncentraciju Ni na površini, dok slobodni Ti reaguje sa rastvorenim kiseonikom i formira Ti-oksidni sloj oko jamica i pora. Kako korozija napreduje Ti-oksidni sloj raste i širi se preko čitave površine NiTi. Pored toga, pore koje su formirane korozijom se mogu zatvoriti Ti-oksidom nastalim unutar pore. Kao rezultat toga, formira se gusti oksidni sloj na površini NiTi SMA. Nastali sloj Ti-oksida ima sada ulogu pasivizacionog filma koji sprečava dalji proces korozije. Brojne studije su pokazale da Ti-oksidni film na NiTi legurama služi kao barijera

za difuziju metalnih jona van legura. Iako Ti-oksidi ima dobru biokompatibilnost, biološke osobine NiTi SMA zavise i od kvaliteta ovog filma, kao što su površinski defekti, jačina vezivanja filma za površinu NiTi, i dr. [282].



Slika 1.5.3.2.1. Mehanizam formiranja korozivnih jamica i pora kod NiTi i repasivizacija Ti-oksidnog sloja [282].

1.5.3.3. Biokompatibilnost CuAlNi i NiTi legura

Većina radova koja je procenjivala biokompatibilnost konvencionalnih NiTi je zaključila da ove legure imaju dobru biokompatibilnost *in vitro* i *in vivo*. U različitim tipovima ćelijskih kultura NiTi ispoljava malu ili nikakvu citotoksičnost [266]. Međutim, jedna studija je ukazala na umerenu citotoksičnost NiTi, koja se može uporediti sa CoCrMo legurama [283]. U brojnim drugim radovima [276, 280, 284-288] je jasno pokazano da

rezistencija NiTi na koroziju zavisi od kvaliteta površine, kao što je topografija i hemijski sastav. Grube i nehomogene površine često sadrže kontaminante iz mehaničke obrade nakon livenja, kao što su metalne čestice, i osetljivije su na koroziju nego uzorci koji imaju obrađenu površinu. Zaštitni površinski sloj NiTi koji se sastoji od gustog homogenog sloja Ti-oksida bez elementalnog Ni ima dobru rezistenciju na koroziju i time bolju biokompatibilnost.

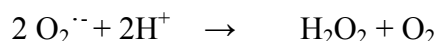
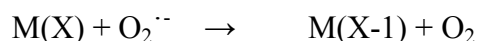
In vivo studije urađene na različitim životinjskim modelima i humanim implantatima od NiTi [289-295]. Testovi biokompatibilnosti u ovim ispitivanjima su pokazali da NiTi imaju odličnu biokompatibilnost. Ureteralni stentovi od NiTi SMA ne iniciraju reakciju na strano telo kod pasa, čak ni 18 meseci nakon implantacije [296]. Slično tome, pacijenti sa implantiranim uređajima od NiTi nisu imali značajan rast nivoa Ni u krvi nakon 5 meseci [297]. Kliničke studije na pacijentima kojima su ugrađeni NiTi su pokazale da se histološke reakcije na ove legure ne razlikuju od reakcija na druge implantate kao što je Ti [298]. Međutim, treba napomenuti incidentne slučajeve pacijenata kojima je ugrađen NiTi [299, 300], a koji su razvili simptome alergije na Ni, iako im u krvi nije detektovana povećana količina Ni. I pored toga, postoje dokazi da NiTi legure mogu oslobađati i veliku količinu Ni *in vivo* [301]. Tako su detektovani tragovi Ni u krvi pacijenata, salivi, i bukalnoj sluznici koja je bila u kontaktu sa NiTi SMA [279, 293, 297, 299]. U jednoj studiji [299] je pokazano da je količina Ni kod pacijenata sa NiTi veća nego vrednosti koje su propisane od strane WHO za dnevni unos Ni putem hrane. Stoga je pre svake primene legura NiTi kod pacijenata neophodno detaljno ispitivanje njihovih korozivnih osobina i efekti na imunski sistem.

Biokompatibilnost CuAlNi legura, pogotovo onih koje su pripremljene RS metodom nije poznata. Nedavno su Čolić i sar. [268] pokazali da CuAlNi SMA takođe mogu biti upotrebljene u biomedicini, ali da je prethodno neophodna njihova obrada RS valjanjem rastopine. Naime, RS CuAlNi su značajno rezistentnije na koroziju u poređenju sa konvencionalnim CuAlNi legurama, obzirom da se značajno manje Cu i Ni oslobađa u medijum u toku kondicioniranja.

1.5.3.4 Toksičnost metalnih jona

Biokompatibilnost metalnih legura u velikoj meri zavisi od njihovog elementalnog sastava i prisustva kontaminanata na površini unetih tokom njihove metalurške obrade [267]. Metalni joni se mogu osloboditi u biološke sisteme i narušiti delikatan balans mikroelemenata u okruženju bioloških tkiva, kao i u celom organizmu [302]. Elementi kao što su Si, V, Cr, Fe, Co, Cu, Ni, Zn i Mo su prisutni u različitoj meri u implantatima, a predstavljaju i esencijalne elemente u ljudskom organizmu. Sa druge strane, nije pokazana nikakva funkcija metalnih jona Ti, Zr i Al u fiziološkim usovima [302], i njihovo prisustvo u organizmu je posledica slučajnog unošenja iz spoljnje sredine. Razlike u toksičnosti pojedinih jona metala su u vezi sa njihovom solubilnošću, apsorpciji, načinu transporta, hemijskoj reaktivnosti, i kompleksima koje formiraju u organizmu. Osim toga, kristalnost jedinjenja se takođe mora uzeti u obzir kada se razmatra njegova toksičnost. Na primer, NiS je kristal koji izaziva kancer u 100% slučajeva, dok u amorfnom stanju Ni nije karcinogen [303].

Osnovi efekat metala na biološke sisteme je stimulacija oksidativnog stresa, a mehanizmi su slični za različite metale. Joni kao što su Fe, Cu i Cr mogu direktno uticati na formiranje ROS po tipu Fentonove reakcije:



gde je M predstavlja pomenute metalne jone, a X njihovu valencu.

Fe je esencijalni nutrijent i vezan je u FeII obliku, dok FeIII nije dostupan u organizmu. Sposobnost Fe da vrši katalizu je povezana sa njegovom osobinama da menja valencu, na osnovu čega su joni Fe potentni generatori ROS. Menjajući valencu Fe može preuzeti elektron od jednog kiseoničkog radikala, kakav je superoksidni anjon ($O_2^{\cdot -}$), i predati ga vodonik peroksidu, čime se generiše hidroksil radikal ($\cdot OH$). Fe je važan

katalizator u različitim homeostatskim i sintetskim reakcijama. Pokazano je da lipidna peroksidacija zahteva prisustvo FeIII i FeII, koji su vezani u kompleksu preko kiseonika [304]. Stvaranje slobodnih radikala i lipidna peroksidacija od strane Fe posredstvom Fentonove reakcije je snažno potencirana u prisustvu ADP, histidina, citrata i drugih helatora [305]. Prekomerno unošenje Fe je povezano sa biomineralizacijom, aterosklerozom, bolestima srca, fibrozom i kancerom [306, 307]. Osim toga, Fe ishranjuje patogene bakterije uzrokujući nepoželjne efekte po odbrambeni sistem domaćina. Stoga legure koje oslobađaju jone Fe mogu imati brojne nepoželjne efekte po pacijenta.

Co, Cr, Fe, Ni, Ti i Cu su elementi koji se smatraju izuzetno karcinogenim [302, 305, 308]. Delovanje Ni na proizvodnju ROS je posredno, obzirom da Ni dovodi do deplecije glutationa i sulfidriila, te ima značajan ukupan efekat na stvaranje ROS koje stimulišu drugi faktori. Ni izaziva povećanu lipidnu peroksidaciju, smanjenje aktivnosti glutation peroksidaze i porast nivoa Fe u tkivima [309]. NiII u kulturi 3T3 ćelija izaziva smanjenje sulfhidriila u citoskeletu i glutationu na dozno zavistan način [310]. Okazaki i sar.[311] su pokazali da Co, Ni i Fe imaju sličan efekat na proliferaciju fibroblasta i osteoblasta u kulturi. Ni jedan od ovih jona ne utiče na proliferaciju ćelija u koncentraciji manjoj od 2ppm, dok svi inhibiraju proliferaciju u koncentracijama većim od 20 ppm. Međutim, i dalje je nepoznato da li medicinski implantati na bazi ovih elemenata izazivaju tumor. Opisani su slučajevi pacijenata kod kojih se razvitak kancera mogao povezati da dugotrajnom implantacijom legura [302, 308]. Do sada, NiTi SMA nisu pokazale mutagene efekte *in vitro* [312], kao ni karcinogene efekte *in vivo*, dok za CuAlNi legure ne postoje ovakvi podaci.

Cr je čest kontaminant legura korišćenih u biomedicini i poznat alergen kod ljudi i životinja [313]. CrVI ima karcinogene efekte, dok CrIII nema [302]. Cr se u vodenim rastvorima nalazi u obliku CrO_4^{2-} jona i lako prelazi ćelijske membrane preko nespecifičnih nosača. Pokazano da CrVI ima značajno veću citotoksičnost od Ni [314]. Najvažniji antioksidativni sistemi protiv toksičnosti izazvane Cr su vitamin E, C, B2 i glutation.

Postoji vrlo malo podataka o tkivnoj distribuciji Ti [302]. Ti se već dugo vremena smatra metalom koji ima najbolju biokompatibilnost, usled bioinertnosti površinskog oksidnog filma [315]. Međutim, stav o Ti i njegovim legurama je značajno promenjen u današnje vreme. Naime, nekoliko radova je pokazalo da Ti rastvoren u ljudskom telu može izazvati oslobađanje osteolitičkih citokina koji dovode do slabljenja implantata [316, 317]. Pokazano je i da uzorci Ti mogu značajno inhibirati proliferaciju pacovskih limfocita [276], i povećati proliferaciju fibroblasta [278]. Uzimajući u obzir visoku trošljivost Ti i Ti6Al4V legura, i inhibitorni efekat na rast kostiju, Black [318] zaključuje da ovi materijali nisu potpuno pogodni za dugotrajnu primenu *in vivo*.

Cu je kofaktor brojnih enzima kao što su oksidaze i oksigenaze [319], ali kada je u obliku Cu-sulfata i drugih soli može dovesti do akutnog trovanja i nekroze hepatocita [305], kao i oštećenja DNK [320]. Pokazano je da većina ovih metala inicira produkciju reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) koji dovode do peroksidacije lipida, oštećenja DNK, deplecije sulfhidrila i poremećenu homeostazu kalcijuma [305]. Cu-acetat povećava mutagenost ksenobiotika više od 700%, što je u skladu dokazima da se kompleks metala i ksenobiotika direktno vežu za DNK i doprinose genotoksičnosti [320]. Cu u prisustvu hidrokinona indukuje formiranje dvolančanih prekida DNK preko formiranja ROS [321], a glutation je najvažniji antioksidacioni agens u zaštiti genotoksičnosti indukovane sa Cu. Za razliku od Cu, FeIII, MnII, CdII i ZnII ne povećavaju oksidaciju hidrokinona i ne stvaraju dvolančane prekide DNK [321]. I drugi elementi kao što su Ag, Zn, Mn, Mo i dr. imaju značajne biološke efekte kao kontaminanti na površini legura, i deluju preko sličnih mehanizama kao već navedeni elementi u zavisnosti od primenjene doze.

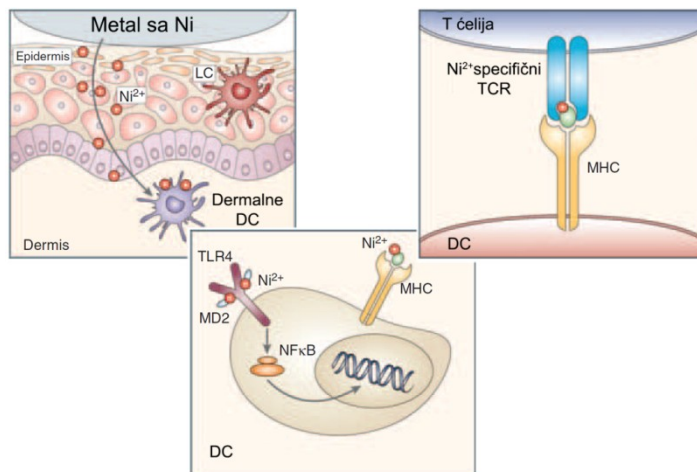
1.5.3.5. Imunski odgovor na jone metala

Patološki efekti Ni, Co i Cr su povezani sa njihovom sposobnošću da izazovu alergijsku reakciju [302, 322-324]. Co i Ni imaju sličnu sposobnost da indukuju kontakti dermatitis [323]. Za razliku od ovih metala, smatra se da Cu retko izaziva alergijski kontaktni dermatitis, obzirom da ima mali potencijal za senzitivizaciju [325, 326]. Međutim, postoje podaci koji govore suprotno [327, 328]. U stomatologiji se Cu navodi kao

relevantan alergen [329, 330]. Međutim, postoji malo podataka o alergijskim reakcijama izazvanih medicinskim uređajima, bilo da su u obliku dentalnih ili tkivnih implantata [302, 323] u kojima je prisutan Cu. Al-Waheidi [331] je pokazao da je moguća ozbiljna alergijska reakcija na NiTi ortodontsku žicu kod pacijenta koji je već alergičan na Ni. Evans je pokazao da od 14 slučajeva kod kojih se razvila na alergija na protezu sa Co, 9 je već bilo alergično na Co [332]. Ostalo je nejasno, zašto su samo neke individue podložne senzitivizaciji sa metalnim jonima. Opisani su ozbiljni nepoželjni efekti, kao što je tromboza, inflamacija i iznenadna smrt [333], kod nekih pacijenata sa implantatima od NiTi, što se može objasniti njihovom hipersenzitivnošću na Ni. Ovi rezultati ukazuju na to da funkcionalnost metalnih implantata zavisi od sposobnosti prisutnih metalnih jona da izazovu alergiju. U tom smislu je ključno unapred odrediti individue koje su osjetljive na pojedinačne metalne jone. U skladu sa tim, Grimsdottier je ukazao na to da je test stimulacije limfocita bolji za detekciju senzitivnih osoba nego test kožne/oralne zakrpe [324].

Mehanizam senzitivizacije posredovan Ni je dobro proučen. Naime Ni se vezuje za protein, čime se formira haptenski kompleks koji ima imunogene osobine. Dakle, senzitivizacija Ni posredstvom haptena može dovesti do formiranja autoantigena ispoljenih kao strani antigeni na MHC molekulima APC, kakve su DC [334] (**Slika 1.5.3.5.1**). DC migriraju u lokalni limfni čvor i prezentuju antigen Ni-specifičnim T ćelijama. Ove ćelije proliferišu i nakon ponovnog izlaganja haptenu pokreću inflamacijsku reakciju u koži. Opisani su i $CD4^+$ i $CD8^+$ Ni^{2+} -specifični T limfociti u krvi pacijenata koji su alergični na Ni. Aktivirane T ćelije proizvode visok nivo IFN- γ pri ponovnom susretu sa Ni^{2+} *in vitro* [335]. Odavno je poznato da Ni, sam ili u obliku haptena, može izazvati inflamacijski odgovor. U ovoj reakciji keratinociti imaju važnu ulogu, obzirom da proizvode IL-1 β nakon ekspozicije jonu Ni^{2+} [336], a signalni mehanizmi koji su uključeni u ovu aktivaciju zavise od aktivnosti NF- κ B [337]. Međutim, do nedavno nije bilo poznato zašto Ni-protein aktivira DC, ali ne može indukovati senzitivizaciju DC miševa bez dodatne aktivacije sa adjuvansom [338]. Schmidt i sar. [339] su nedavno pokazali da humani TLR4 može prepoznati kompleks Ni-proteina i pokrenuti signalnu kaskadu preko NF- κ B unutar DC. Pri

tome je istovremeno isključena uloga Langerhansovih ćelija kože koje nemaju ispoljen TLR4 na površini, već je proces senzitivacije posredovan isključivo TLR4⁺ dermalnim DC.



Slika 1.5.3.5.1 Odgovor dermalnih DC na Ni²⁺ jone.

DC pomoću TLR4 i MD2 prepoznaju Ni²⁺, sam ili vezan u haptenu, aktiviraju se, obrađuju haptenu i ispoljavaju ga Ni²⁺-specifičnim T ćelijama u lokalnom limfnom čvoru. Preuzeto iz [334].

1.6. KARAKTERISTIKE NANOMATERIJALA

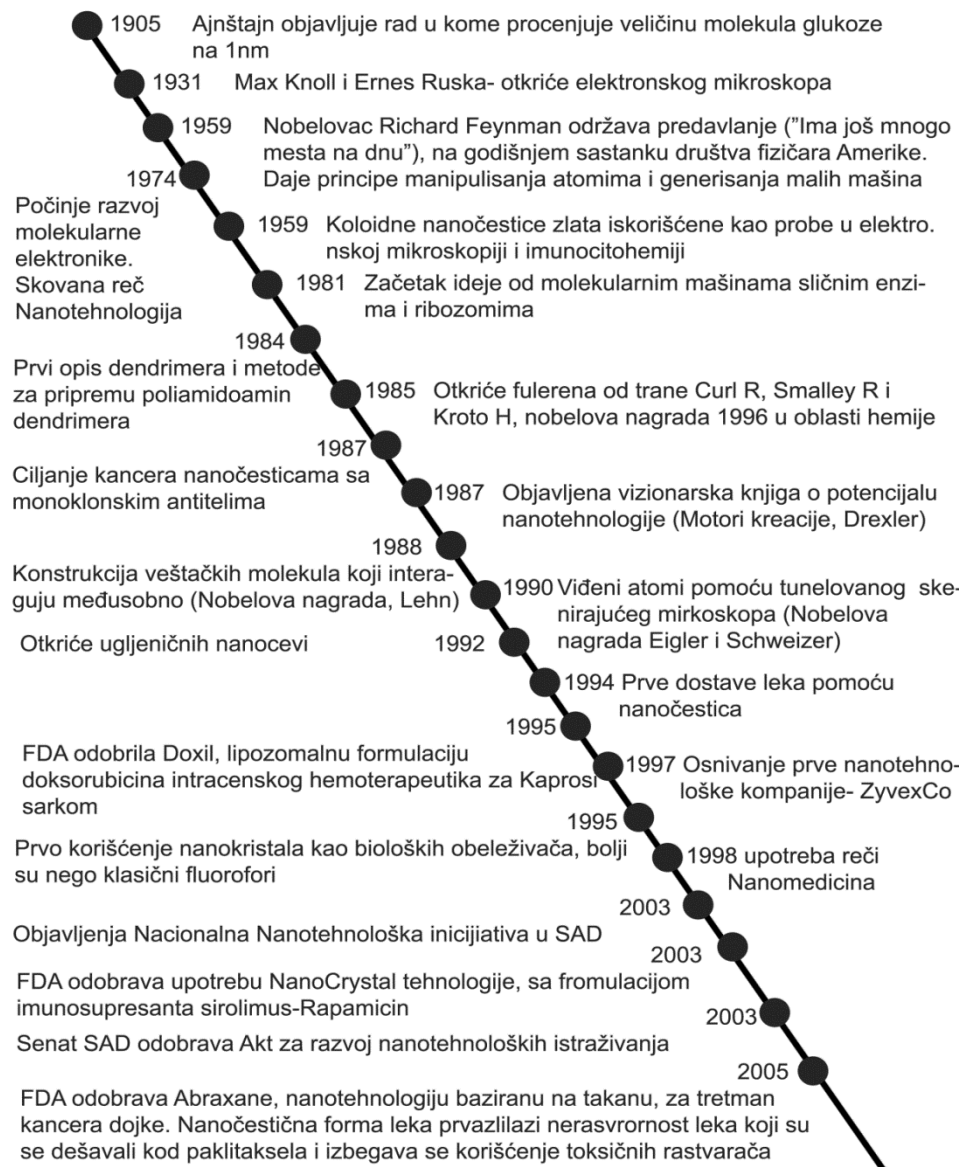
1.6.1. Istorijski razvoj nanomaterijala

Nobelovac Richard P. Feynman je 29. decembra 1959. godine na Kalifornijskom institutu za tehnologiju u okviru godišnjeg sastanka Američkog društva fizičara održao vizionarsko predavanje koje će kasnije postati jedno od najuticajnijih predavanja 21 veka, a može se smatrati početkom moderne nanotehnologije. Inspiracija za ovo predavanje je proistekla iz osnove funkcionisanja bioloških sistema:

„Biološki sistemi mogu biti ekstremno mali. Iako je većina ćelija prilično mala, one su veoma aktivne, proizvode različite supstance, idu naokolo, migolje se, i rade sve te divne stvari, a sve u okviru veoma malih dimenzija. Osim toga, one skladište informaciju.

Zamislite mogućnost da i mi možemo napraviti tako male stvari koje rade ono što im kažemo, da napravimo objekat kojim se može upravljati na tom nivou.“ - iz predavanja RP Feynman „Ima još obilje prostora tamo dole“ [340].

Da je uticaj njegove vizije bio ogroman govori i činjenica o velikom broju otkrića novih nanoobjekata i metoda njihove izrade od 1980-2005. godine (**Slika 1.6.1.1**). Nanomedicina predstavlja primenu nanotehnologije u medicini, i zasniva se na tri osnovne i moćne molekularne tehnologije koje su još u povoju [341] (**Tabela 1.6.1.1**): nanomaterijalima i nanouređajima (razvijaju se kao dijagnostički biosenzori, nosači za ciljanu dostavu lekova, i pametni lekovi), molekularnoj medicini (bazira se na principima genomike, proteomike, i dizajnu veštačkih mikroorganizama), i molekulskim mašinama – nanorobotima (omogućiće istovremenu dijagnostiku i uništavanje uzroka nastanka patologije, hromozomskih rearanžamana, i ćelijsku hirurgiju *in vivo*). Stoga je neophodno bliže upoznati se sa karakteristikama najperspektivnijh nanomaterijala koji se aktivno razvijaju za upotrebu u biomedicini, bilo kao alat za dijagnostičke procedure ili kao nosači za ciljanu dostavu lekova.



Slika 1.6.1.1 Razvoj nanotehnologije i nanomedicine od 1905-2005.

Modifikovano prema [3].

Tabela 1.6.1.1 Predmeti proučavanja oblasti nanomedicine u XXI veku

Oblast nanomedicine	Predmet proučavanja
Nanodijagnostika	Molekularna dijagnostika Nanoendoskopija Nanooslikavanje
Nanotehnoška dostava lekova	Lekovi sa boljom dostavom u organizam
Regenerativna medicina	Tkivni inženjering na bazi nanotehnologije
Transplantaciona medicina	Egzomi donorski dendritskih ćelija za transplantaciju organa bez upotrebe lekova
Nanorobotika	Vaskularna hirurgija nanorobotima Nanoroboti za detekciju i uništavanje kancera
Implantati	Biokompatibilni senzori koji premošćuju vezu između elektronskog i nervnog strujnog kola Trajni veštački organi i tkiva rezistentna na odbacivanje Implantacija obloženih stentova u koronarne arterije koje oslobađaju lek i sprečavaju ponovnu okluziju Implantacija nanopumpi za dostavu lekova
Neinvazivna hirurgija kateterima	Minijaturni nanosenzori implantirani u kateter koji omogućavaju sakupljanje podataka u realnom vremenu Nanohirurgija bazirana na interakciji nanočestica i spoljašnje energije (npr. infracrveno svetlo).

1.6.2. Karakteristike nanočestica zlata

Nanočestice zlata (engl. *gold nanoparticles*, GNP) imaju brojne fascinantne osobine uključujući električne, magnetne i optičke osobine koje zavise od njihove veličine (kvantni efekat), a mogu se iskoristiti u najrazličitijim oblastima, od tehnologije nanomaterijala i katalizatora do biološke primene kao nosača lekova. Daniel i Astruc [342] su bili u pravu kada su rekli da će GNP predstavljati ključne materijale na početku 21 veka.

1.6.2.1 Kvantni efekat nanočestica

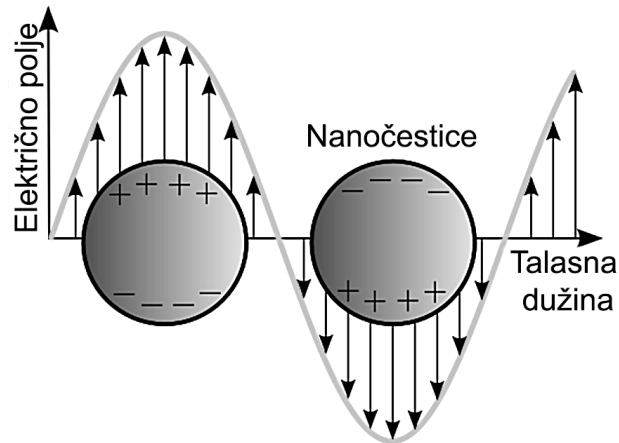
Fizičaru su još ranije predvideli da nanočestice veličine 1-10nm imaju elektronsku strukturu koja je, u skladu sa pravilima kvantne mehanike, veoma specifična [343]. Naime, fizičke osobine nanočestica zlata se značajno razlikuju od osobina koje ima makroskopski metal zlata, i od osobina koje imaju atomi zlata, a u velikoj meri zavise od veličine partikula, distance između partikula, tipa zaštitnog omotača oko partikula i njihovog oblika [344]. Nekoliko slobodnih elektrona zlata koji su preostali u nanočestici, podležu procesu tunelovanja između susednih nanočestica, što se može detektovati merenjem njihove impedance. Efekat kvantne veličine se dobija kada je De Broglieva talasna dužina valentnih elektrona istog reda veličine kao i sama veličina čestice. Tada se partikule ponašaju kao električne, nulto-dimenzionalne kvantne tačke, u skladu sa zakonima kvantne mehanike. Slobodni elektroni su zarobljeni u okvirima nanočestica i pokazuju karakteristična kolektivna kretanja određene frekvencije, što je definisano kao plazmon.

1.6.2.2 Površinska plazmon rezonanca

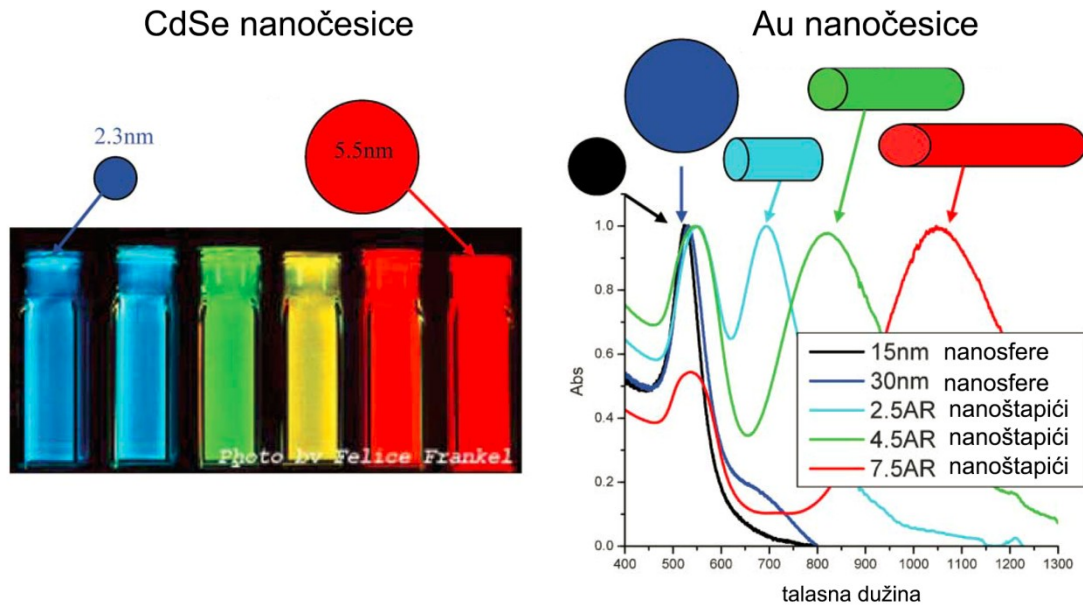
Plazmon je definisan kao kolektivno oscilatorno kretanje slobodnih elektrona preko metalne strukture ekscitirane elektromagnetnim talasom. Kao što se uočava na **slici 1.6.2.2.1**, slobodni elektroni nisu vezani u nukleus, već osciluju u pravcu delovanja EM polja, u fizičkim okvirima metalnog materijala, dajući pri tome naizmeničnu struju. Usled sudara elektrona sa metalnom rešetkom, energija kretanja slobodnih elektrona podleže otporu i kinetička energija elektrona se rasipa. Kao i kod drugih oscilacija, i ovde postoji rezonantni mod kada je ovo rasipanje energije minimalno. Ako je rezonanca plazmona istog reda veličine kao i frekvencija EM talasa, oscilacije elektrona formiraju optički dipol koji može da reemituje apsorbovanu svetlost. Na osnovu ovih osobina su nanočestice zlata upotrebljavaju u dijagnostičnom oslikavanju ćelijskih struktura. Nanočestice imaju specifičnu plazmon rezonancu (engl. *plasmon resonance band*, PRB) koja se uočava blizu 530nm kod GNP veličine 5-20nm.

Kod semikonduktorskih CdSe nanočestica, promena veličine znači i promenu optičkih osobina, dok kod sferičnih GNP promena veličine neznatno menja optičke

osobine. Sa druge strane, promena odnosa dužine i širine nanoštapića zlata, drastično menjaju optičke osobine ovih nanočestica (Slika 1.6.2.2.2). Obzirom da se slobodni elektroni kroz GNP mogu kretati i kroz unutrašnjost nanočestice i po površini, samo površinski elektroni doprinose optičkim osobinama GNP. Stoga se za nanočestice definiše površinska plazmon rezonanca. Kako se menja oblik i veličina nanočestica menja se i ukupna geometrija nanočestica koja uzrokuje promenu u oscilatornoj frekvenciji elektrona.



Slika 1.6.2.2.1. Šematski prikaz Plazmona, oscilacije elektrona u okviru GNP po uticajem elektromagnetnog zračenja [345].

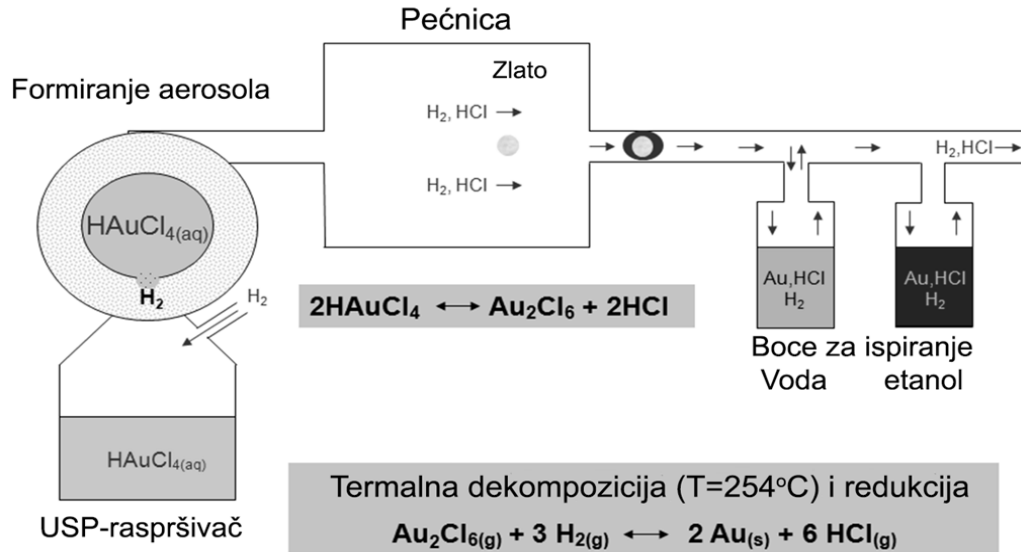


Slika 1.6.2.2.2 Emisija fluorescence od strane (CdSe)ZnS kvantnih tačaka različitih veličina (levo), i apsorpcija svetla od strane GNP različitih oblika i veličina (desno)[345].

Nanoštapići imaju dve plazmon rezonance, jednu transferzalnu, na oko 520nm, i drugu, longitudinalnu plazmon rezonancu, na većim talasnim dužinama. Transverzalna površinska plazmon rezonanca ne zavisi od odnosa dužine i širine, i ista je kao plazmon rezonanca sferičnih GNP. Longitudinalna površinska plazmon rezonanca se povećava sa povećavanjem odnosa dužine i širine nanoštapića [346]. Trouglaste nanočestice se mogu sintetisati fotohemijским i hemijским metodama [347], a optičke osobine ovih nanočestica u velikoj meri zavise od geometrije njihovih uglova i ivica. Skraćivanje ivica izaziva pomeraj površinske plazmon rezonance ka plavom spektru [346-348]. Diskovi takođe pokazuju zavisnost plazmon rezonance od odnosa veličina koje ga definišu [349]. Bez obzira na krajnji oblik nanočestica, svi imaju osnovnu strukturu gusto pakovanih atoma zlata u određenom prostornom rasporedu koji omogućavaju njihove specifične optičke osobine.

1.6.2.3. Sinteza nanočestica zlata

Definisane su brojne metode za generisanje nanočestica. U osnovi postoje dva pristupa za dobijanje materijala nanometarske veličine [350]. Prvi pristup polazi od atoma koji se grupišu i generišu nanostrukture, dok drugi pristup polazi od makroskopskog materijala kod koga se uklanja višak materijala i ostaje samo nanostrukturirani materijal. Uobičajene tehnike koje koriste prvi pristup su fotolitografija i litografija elektronskim zracima [345, 351]. Drugi pristup uključuje hemijske, elektrohemijske, sonohemijske, termalne i fotohemijske redukcione tehnike [342, 347, 352]. Kod ovih metoda se koriste agensi koji stopiraju rast čestica na kontrolisan način [353]. Ovi agensi, kao što su surfaktanti ili polimeri, se koriste i u cilju prevencije agregacije i precipitacije metalnih nanočestica. Kontrolisanjem vremena redukcije i koncentracije stopirajućeg agensa moguće je relativno lako odrediti veličinu i oblik nanočestica. Sfere [342, 347, 352], štapići [354], kocke, diskovi [352], žice, cevi [355], razgranate strukture, trouglaste prizme [356] i tetraedarne nanočestice su sintetisane od Au, Ag i Pt različitim metodama redukcije uz pomoć stabilizirajućih agenasa. Zapremine u kojima se vrše sinteze nanočestica su prilično male, pa se često dobijaju različite nanočestice u svakom eksperimentu. Osim toga, ove nanočestice mogu biti kontaminirane i hemikalijama koje se koriste u sintetskoj proceduri. Najpoznatiji metod sinteze GNP je redukcija HAuCl_4 pomoću citrata [342]. Ovakav protokol omogućava sintezu GNP oko 20nm. Variranjem odnosa redukujućeg i stabilizirajućeg agensa moguće je sintetisati GNP različitih veličina (16-147 nm) [357]. Citrati prvo redukuju so zlata i indukuju nukleaciju, a nakon toga adsorbuju za površinu nanočestica i daju im koloidnu stabilnost [358].

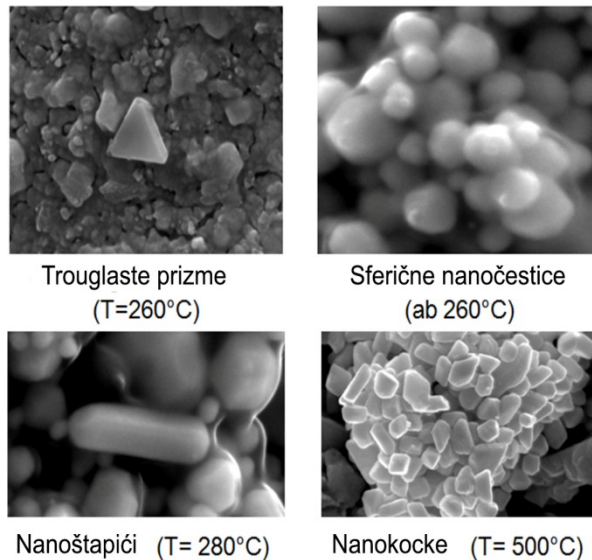


Slika 1.6.2.4.1. Šematski prikaz sinteze GNP iz $HAuCl_4$ rastvora USP metodom.

USP generator formira aerosol koji se redukcionom atmosferom prenosi do pećnice i tamo termalno dekomponuje i redukuje, nakon čega se ispira i stabilizuje u vodenom ili etanolnom rastvoru. Preuzeto od Stopic i sar. (neobjavljeno).

1.6.2.4. Sinteza nanočestica zlata ultrasoničnom sprej pirolizom

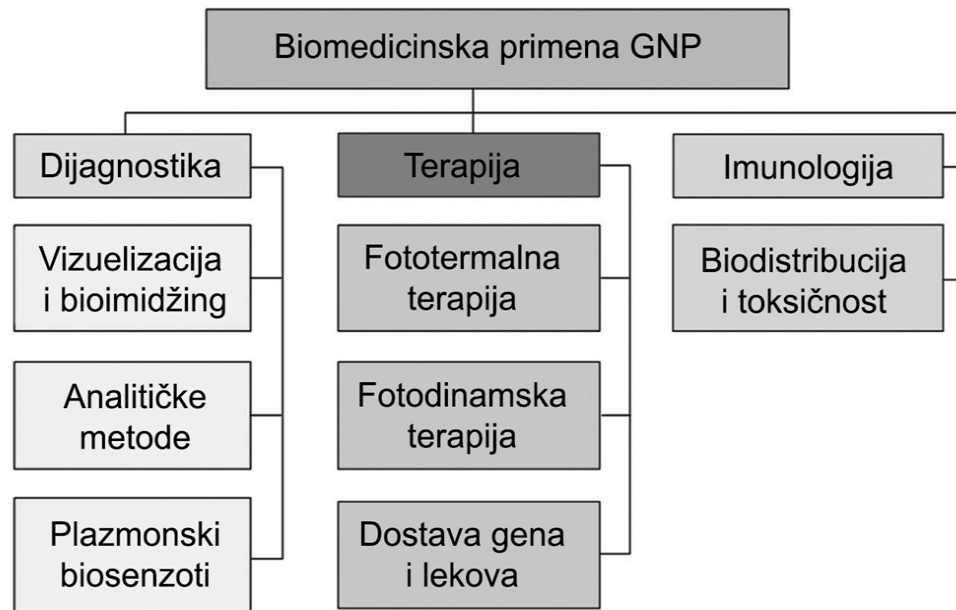
Naša grupa je opisala novi metod sinteze nanočestica zlata iz različitih prekursora pomoću ultrasonične sprej pirolize (USP). Prvi korak u ovoj sintezi je rastvaranje zlata u kiselini, pri čemu je moguće koristiti reciklirani zlatni nakit. U osnovi se metoda zasniva na tome da se rastvor zlata prevede u aerosol pomoću ultrasoničnog generatora, a zatim se prenosi putem vodonične i azotne atmosfere u komore za termalnu dekompoziciju. Redukcioni agens u ovom procesu je sam gas vodonika, a veličina i oblik nanočestica se mogu odrediti frekvencijom ultrasoničnog generatora, odnosno kontrolisanjem temperature (Slika 1.6.2.4.1). Ovom metodom je moguće generisati najrazličitije oblike GNP (Slika 1.6.2.4.2) [11]. Međutim, biokompatibilnost i imunomodulatorne osobine nanočestica zlata dobijenih ovom metodom nisu do sada ispitivani.



Slika 1.6.2.4.2. Nanočestice zlata generisane USP pirolizom pod dejstvom različitih temperatura [11].

1.6.3. Biološka primena nanočestica zlata

Primena GNP u medicinskim i biološkim istraživanjima je izuzetno široka. Ovo se posebno odnosi na oblast genomike, biosenzora, imunoeseja, kliničke hemije, detekcije i fototermolize mikroorganizama i ćelija kancera, ciljane dostave lekova, peptida, DNK i antigena, optički oslikavanje bioloških struktura i praćenje ćelija i tkiva pomoću najsavremenijih nanofotonskih sistema. Primena GNP je moguća u različitim medicinskim procedurama, dijagnostičkim, terapijskim, profilaktičkim i higijenskim (npr. prečišćavanje vode) [359]) (Slika 1.6.3.1).



Slika 1.6.3.1 Primena GNP u medicini u dijagnostici i terapiji, i u modulaciji imunoloških osobina u zavisnosti od biodistribucije i toksičnosti [211].

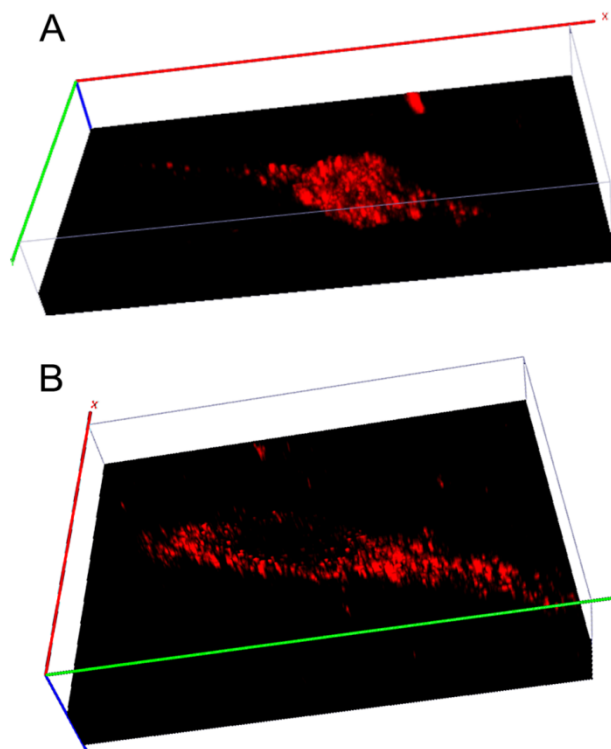
1.6.3.1 Vizuelizacija i oslikavanje bioloških struktura pomoću GNP

Prvobitna primena GNP je bila u elektronskoj mikroskopiji, pre svega u TEM za detekciju biospecifičnih interakcija [360] usled njihove visoke elektronske gustine. Iako GNP mogu intenzivno da rasprše i emituju sekundarne elektrone, primena u SEM nije toliko raširena [361]. Danas se GNP u imunoelektronskoj mikroskopiji primenjuju za identifikaciju infektivnih agenasa i njihovih površinskih antigena [362]. Tokom poslednjih nekoliko godina se pored GNP upotrebljavaju i nanoštapići, nanoškolkje, nanokavezi, nanozvezde i drugi tipovi čestica u svetlosnoj mikroskopiji [363].

Posebno je popularna primena GNP u laserskoj konfokalnoj mikroskopiji [364]. Ova metoda omogućava detektovanje objekata mikroveličine uz pomoć optičkog sistema koji omogućava snimanje objekata koji dolaze samo iz ravni fokusa. Antitelima obeležene GNP

su omogućile analizu internalizacije GNP u žive ćelije (kao što su ćelije kancera) u realnom vremenu, kao i procenu njihovog broja po ćeliji [364-368]. Konfokalne mikrografije se mogu dobiti detekcijom fluorescentne emisije ili dvofotonskog (multifotonskog) raspršivanja plazmonskih nanočestica. Ova druga metoda se zasniva na detekciji objekata kod kojih se luminescenca eksituje simultanom apsorpcijom dva ili više fotona, pri čemu je energija svakog fotona upola manja od one koja je potrebna za fluorescentnu ekscitaciju. Dvofotonska luminescenca GNP omogućava vizuelizaciju molekulskih markera kancera na ili unutar ćelija [369-371], spora *Bacillus*-a [372] i sl. Na **slici 1.6.3.1.1.** je demonstriran ovaj primer, gde je prikazan makrofaga sa intracelularnim, ili membranski vezanim GNP, koja je snimljena u realnom vremenu iz serijskih konfokalnih slika pomoći dvofotonskog izvora.

Mikroskopija sa tamnim poljem na bazi GNP je iskorišćena za detekciju mikrobijskih ćelija i njihovih metabolita [373], biooslikavanje kancerskih ćelija [374] i receptora na njihovoj površini [375], u istraživanju mehanizama endocitoze [376], i u druge svrhe. Osim toga, razvijene su i druge koje se mogu objediniti nazivom biofotonske metode. Biofotonika uključuje sva ispitivanja koja su vezana za interakciju svetlosti sa ćelijama i tkivima. Neke od ovih metoda su optička koherentna tomografija, X-zracima posredovana i magnetna rezonanta tomografija, fotoakustična mikroskopija i tomografija, mikroskopija korelacije fluorescence i druge koje su detaljno opisane u [377]. Biofotoničke metode na bazi GNP imaju veliki potencijal za biooslikavanje *in vivo* [378, 379].



Slika 1.6.3.1.1. Primena GNP u analizi fagocitozne aktivnosti živih makrofaga dvofotonskom mikroskopijom.

GNP (crveno), su kultivisane sa makrofagima tokom 24 sata na A) 37°C, ili B) 4°C i zatim analizirane na osnovu plazmanskog raspršivanja svetlosti od strane GNP u realnom vremenu serijskim 2D konfokalnim snimcima u xyz t modu. Nakon analize je rekonstruisan 3D prikaz ćelija za svaki trenutak t (jedan trenutak predstavlja 1-2 sekunde u realnom vremenu), od kojih je jedan prikazan. Površinski sloj ćelija je uklonjen sa obe slike radi jasnijeg prikaza membranskih GNP na uzorcima kultivisanim na 4 °C (B), u poređenju sa intracelularnim GNP kod uzoraka kultivisanih na 37°C (A). (neobjavljeni rezultati).

1.6.3.2 Analitičke metode na bazi nanočestica zlata

U poslednje vreme je razvijen ogroman broj analitičkih i dijagnostičkih procedura na bazi GNP [211]. Imunoanalitički metod SPIA (*engl. sol particle immunoassay*) koji se trenutno najčešće koristi za kolorimetrijsku detekciju DNK razvili su Mirkin i sar. [380]. SPIA za detekciju DNK i proteina se zasnivaju na dva principa, a to su da se boja rastvora i

apsorpcioni spektar se promene kada biopolimeri adsorbuju za nanočestice [211] i da se boja rastvora i apsorpcioni spektri pomere ka crvenom regionu kada nanočestice pridju jedna drugoj na distancu koja je manja od 0.1 dela njihovog dijametra [381], što se može detektovati na spektrofotometru ili vizuelno. Ove metode se uglavnom zasnivaju na GNP konjugovanim specifičnim monoklonskim antitelima.

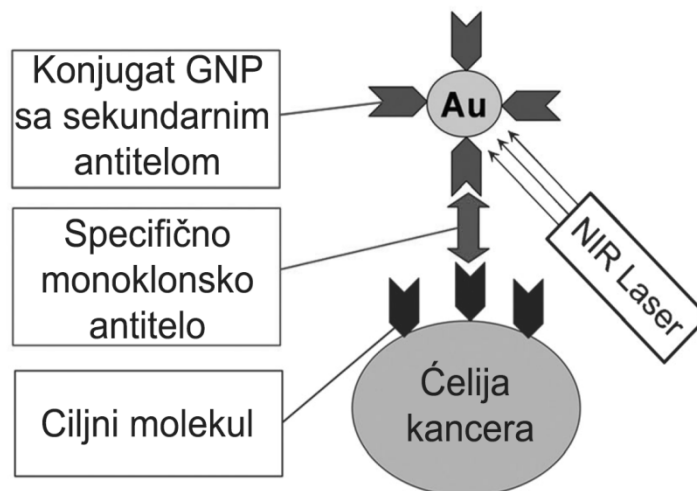
1.6.3.3. Primena nanočestica zlata u fototermalnoj terapiji

Fototermalno oštećenje ćelija je jedno od najatraktivnijih oblasti istraživanja terapije kancera i infektivnih bolesti [382]. U osnovi ovog fenomena je činjenica da GNP imaju maksimum apsorpcije u vidljivom spektru ili spektru blizu infracrvenog spektra (engl. near-infrared, nIR), i jako se zagrevaju kada se osvetle ovim EM zracima. Ukoliko se tada nađu unutar ili oko ciljnih ćelija, npr. konjugacijom GNP antitelima ili biomolekulima, te ćelije umiru usled termalnog oštećenja. Termalna terapija kancerskih ćelija je poznata od XVIII veka i tada su primenjivana lokalna toplotna zračenja (mikrotalasi, ultrasonični ili radio talasi) ili opšta hipertermija (zagrevanje do 41-47°C) [383]. Za lokalno ozračivanje do 70°C se može koristiti tretman od 3-4 min. Lokalna i opšta hipertermija dovodi do nepovratnog oštećenja ćelija uzrokovanih oštećenjem ćelijske membrane i denaturacijom proteina. Ovakav proces, očekivano, pogađa i zdrave ćelije i tkiva, zbog čega ovakva terapija ima brojne neželjene posledice.

Prva revolucija u termalnoj terapiji kancera je povezana sa primenom laserskog ozračivanja, što je omogućilo kontrolisanu i usmerenu povredu tumorskog tkiva [384]. Kombinacija laserskog zračenja i optičkih vlakana je dala odlične rezultate. Međutim, problem kod ovakve terapije je mala selektivnost usled potrebe da se koriste laseri visoke energije [385]. Stoga je predložena selektivna fototermalna terapija koja se zasniva na selektivnoj fototermolizi biološkog tkiva koje ima hromofor, prirodnu ili veštačku supstancu sa visokim koeficijentom za svetlosnu apsorpciju. GNP su prvi put iskorišćene u fototermalnoj terapiji 2003 [386, 387]. Pitsillides i sar. [388] su prvi opisali metodu za selektivno ubijanje ciljnih ćelija pomoću 20 i 30nm GNP ozračenih sa 20ns laserskim pulsom (532nm) u cilju lokalnog podizanja temperature tkiva. Posebno atraktivan pristup je

primena GNP u fototermalnoj terapiji tumora koji su rezistentni na hemoterapiju [389]. Sukcesivno ozračivanje sa nekoliko pulseva laserom, omogućava precizno uklanjanje tumora bez traumatskih posledica. Dalji razvoj fototermalne terapije i njihova primena u kliničkoj praksi zavisi od brojnih problema kao što su: izbor nanočestica sa odgovarajućim optičkim osobinama, upućivanje i akumulacija GNP u tumorskom tkivu, čime bi se sprečila potencijalna toksičnost, razvoj metoda za dostavu zračenja do ciljnih ćelija i, traženje alternativnih izvora zračenja koji mogu zagrejati GNP. Iako sferične nanočestice same po sebi ne apsorbuju svetlost u nIR spektru, unutar ćelija i na membrani se formiraju klasteri GNP koji mogu apsorbovati ovo zračenje [390]. U skladu sa tim, Huang je pokazao da mali aglomerati GNP 30nm omogućavaju uništavanje tumorskih ćelija pri zračenju koje je 20 puta manje nego zračenje koje je potrebno za ubijanje tumorskih ćelija bez GNP [391].

Brzo zagrevanje GNP ili agregata GNP stvara mehure vodene pare koji mogu uzrokovati oštećenje ćelija koje su ozračene vidljivim ili nIR svetlom [392]. Formiranje mehura se značajno povećava kada nanočestice formiraju agregate [390]. Stoga izgleda da je ovaj efekat ključan za oštećenje ćelija, a ne povećana apsorpcija zračenja od strane GNP. Ključni aspekt ove terapije je ciljana dostava GNP do tumora, obzirom da se tada očekuje veća akumulacija GNP u ćelijama tumora. Pokazano je da se PEG-om konjugovane GNP dominantno akumuliraju u tumorskom tkivu usled povećane propustljivosti krvnih sudova tumora [393], i tamo se zadržavaju usled smanjenog oticanja limfe. GNP locirane u tumorskom tkivu su i manje vidljive za imunski sistem. Ovo je tzv. pasivna dostava GNP do tumora, za razliku od aktivne koja se zasniva na korišćenju antitela [394] (**Slika 1.6.3.3.1**).



Slika 1.6.3.3.1. Strategija aktivnog ciljanja GNP do tumorskih ćelija u okviru fototermalne terapije [211].

Aktivni metod, koji se zasniva na korišćenju antitela, je mnogo pouzdaniji i efektivniji, pri čemu se mogu ciljati markeri kao što su epidermalni faktor rasta (EGFR), Her2 [395] ili TNF [396]. Osim antitela, mogu se upotrebljavati i folna kiselina koja predstavlja ligand za brojne folatne receptore tumorske ćelije [397], ili hormoni [398]. Apsorpcija vidljivog dela spektra od strane bioloških hromofora je oko dva puta veća nego apsorpcija nIR spektra [382], pa upotreba ovakvog zračenja omogućava dublji prodor u tumorsko tkivo. I pored toga, dubina penetracije ne prelazi 5-10 mm [399], pa je neophodno pronaći alternativne izvore zračenja. Jedna varijanta je korišćenje pulsnoeg izvora, gde se može primeniti veća snaga lasera bez povećanja nepoželjnih efekata. Drugi je korišćenje optičkih vlakana za endoskopske i intratktivne dostave zračenja.

Od fototermalne terapije se, osim direktnog ubijanja tumorskih ćelija, očekuje da aktivira imunski odgovor. U tom smislu je pokazano da stimulisan imunski odgovor posredovan T ćelijama nakon radio i hemoterapije korelira sa povoljno prognozom po pacijenta [400]. Ključne ćelije koje aktiviraju ovaj imunski odgovor su DC koje ispoljavaju

TLR4 [401]. U skladu s tim je pokazano da DAMP oslobođen tokom zračenja tumora stimuliše DC preko TLR4 i omogućava pokretanje imunskog odgovora na tumor [402]. Međutim, nije još uvek poznato da li GNP primenjene u fototermalnoj terapiji pospešuju ili inhibiraju proces aktivacije DC i pokretanja imunskog odgovora na tumor.

1.6.3.4 Primena nanočestica zlata kao terapeutka

Abraham i Himmel [403] su 1997. godine pokazali da koloidno zlato može da se upotrebi u terapiji reumatoidnog artritisa. Isti autori su kasnije pokazali obilje kliničnih podataka o upotrebi Aurasol-a, oralnog preparata za terapiju reumatoidnog artritisa [404]. Tsai i sar. [405] su ukazali na pozitivan efekat terapije pacova sa GNP na modelu artritisa indukovanog kolagenom, pri čemu je koloidno zlato primenjivano intraperitonealno. Ovaj efekat je objašnjen antiangiogenetskom aktivnošću GNP koje se vezuju za vaskularni faktor rasta i smanjuju infiltraciju makrofaga na mesto inflamacije. Antiangiogenetski efekat GNP je pokazan i u drugim studijama [406, 407] usled toga što interaguju sa heparin vezujućim glikoproteinima, što takođe može smanjiti rast tumora usled slabije angiogeneze. GNP su iskorišćene i kao sistem za dostavu TNF u solidni tumor pacova [408]. Medicinski preparat na bazi GNP-TNF, nazvan AurImmune je namenjen za intravensku upotrebu i trenutno se nalazi u trećoj fazi kliničkih ispitivanja. Nedavno su Wang i sar. [409], pokazali da PEG-om konjugovane GNP mogu da se akumuliraju u tumorskoj ćeliji, i to u mitohondriji čime uzrokuju ćelijsku smrt ovih ćelija. Za razliku od toga, kod normalnih ćelija se ovaj proces ne dešava.

1.6.3.5. Primena nanočestica zlata kao nosača biomolekula

Primena GNP za ciljanu dostavu lekova se danas najintenzivnije istražuje. GNP su do sada konjugovane za brojne antitumorske supstance kao što su pacilitaksel [410], metotreksat [405], daunorubicin [411], gemcitabin [412], 6-merkaptopurin [413], dodecilcistein [414], 5-fluorouracil [415], cisplatin [416], oksaliplatin [417], kahalalid F [418], tamoksifen [419], herceptin [420], β -lapahon [421], doksorubicin [422], prospidin [423] i dr. Konjugacija se obično vrši fizičkom adsorpcijom ili pomoću alkentiolnih linkera, nakon čega se vrši ispitivanje *in vitro* i *in vivo*. Većina ovih preparata je pokazala da GNP

mogu uspešno dostaviti antitumorski lek do tumora i indukovati njegovu smrt. Pored antitumorskih supstanci, GNP se mogu koristiti i kao nosači antibiotika i drugih antimikrobnih lekova. Gu i sar. [424] su uspešno primenili stabilni konjugat GNP-vankomicin u cilju terapije enteropatogenog i vankomicin rezistentnog soja *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*. Selvaraj i Alagar [425] su uočili da konjugat GNP-5-fluorouracil, anti-leukemik, ima i značajnu antibakterijsku i antigljivičnu aktivnost. Stabilnost ovih konjugata je potvrđena specifičnim optičkim spektrom koji ovi konjugati poseduju. Osim toga, GNP se mogu konjugovati sa antioksidansima, kao što je tokoferol [426], ili antivirusnim lekovima kao što je TAK779 protiv HIV [427]. Na kraju ne treba zaboraviti primenu GNP u genskoj terapiji. Pokazano je da ove nanočestice mogu efikasno dostaviti siRNK u citoplazmu i jedro ćelija [428-430].

1.6.4. Biokompatibilnost nanočestica zlata

1.6.4.1 Citotoksičnost *in vitro*

Ubrzan razvoj nanotehnologija neminovno nameće pitanja o sigurnosti novosintetisanih nanomaterijala. S tim u vezi su definisani termini kao što su „nanotoksikologija“, „toksičnost nanomaterijala“ i „nanosigurnost“ [431]. Podaci o toksičnosti GNP su i dalje kontradiktorni usled brojnih razlika u eksperimentalnom dizajnu, veličini nanočestica, obliku, metodama funkcionalizacije, *in vitro* i *in vivo* sistema ispitivanja, kao i načina administracije GNP.

Studije citotoksičnosti *in vitro* su u velikoj meri koristile tumorske fibroblaste (HeLa), ćelije leukemije (K562), ćelije humanog hepatokarcinoma (HepG2), ćelije humanog karcinoma dojke (SK-BR-3), i druge, a toksični efekti su najčešće proučavani MTT esejom. U ovim radovima je pokazano da su površinske karakteristike GNP od presudne važnosti za njihovu citotoksičnost. U tom smislu je pokazano je da nanočestice koje su funkcionalizovane kvaternanim aminima, izazivaju 7 puta veću toksičnost nego anjonske partikule u kojima su amino grupe zamenjene karboksilnim [432]. Slično tome, Niidome i sar. [433] su pokazali da nanoštapići obloženi CTAB om nanoštapići imaju

visoku citotoksičnost, dok nanoštapići istih dimenzija obloženi sa PEG-SH nemaju toksični efekat ni pri 10 puta većim koncentracijama.

Veličina nanočestica takođe predstavlja ključan faktor koji određuje efikasnost endocitoze GNP [188], i vezivanje za B-formu DNK [434]. Stoga se može reći da je toksičnost GNP u velikoj meri zavisna od njihove veličine. Pan i sar. [435] su detaljno ispitivali zavisnost veličine GNP i njihove toksičnosti na 4 ćelijske linije (HeLa, SK-Mel-28, L929, J774A1) koristeći 0.8 nm (8 atoma zlata), 1.2nm (35), 1.4 nm (55) i 1.8 nm (150), i 15 nm GNP stabilizovane derivatima trifenilfosfina. Na osnovu MTT eseja je zaključeno da 1.4 nm izazivaju najveću citotoksičnost (IC_{50} 30-46 μ M), dok 0.8, 1.2 i 1.8 imaju manju toksičnost (IC_{50} 140-250 μ M), a GNP 15 nm nisu bile toksične ni pri koncentracijama koje su 100 puta veće. Klasteri 1.4 nm su indukovali nekrozu ćelija dok su klasteri 1.2 nm izazivali apoptozu ćelija. Toksičnost 1.4 nm klastera je pokazana i ranije [436], a razlog tome je što se Au_{55} klasteri vezuju za B-formu DNK obzirom da po veličini odgovaraju velikom žlebu dsDNK.

Za razliku od navedenih studija, pokazano je da funkcionalizovane GNP imaju značajno manju toksičnost *in vitro*. Citotoksičnost GNP veličine 20nm obloženih sa BSA nije uočena u kulturi HeLa ćelija i 3T3/NIH ćelija [437]. Slično tome, PEG-om obložene GNP 15 nm nisu toksične za MDA-MB-231 u koncentraciji do 100 μ g/ml [438], kao što nisu ni GNP 30nm obložene PEG-om u kulturi HepG2 ćelija [439]. Khan i sar. [440] su pokazali da 18nm GNP nemaju toksični efekat na HeLa ćelije, ali i to da ne menjaju transkripcioni procese u ovim ćelijama. Isti pristup i veličinu GNP su koristili i Li i sar. [441] koji su pokazali da GNP obložene folnom kiselinom takođe nisu citotoksične. Salmaso i sar. [442] su pokazali da nefunkcionalizovane i poliakrilamin funkcionalizovane GNP 18nm nisu toksične za ćelije adenokarcinoma dojke. Čak je i u ispitivanjima citotoksičnih efekata koloidnog GNP u modelu mišijih DC pokazano da GNP veličine 10nm ne menjaju vijabilnost ovih ćelija [443]. Shukla i sar. [186] su se fokusirali na citotoksičnost i imunogeničnost GNP 3.5nm u kulturi RAW264.7 makrofagne linije. Pokazali su da GNP prodiru u intraćelijski prostor, ali nisu citotoksične niti imunogene u koncentracijama do 100 μ M, te je zaključeno da su GNP potpuno biokompatibilne.

Funkcionalizacija GNP značajno može uticati na njihovu citotoksičnost. Ryan i sar. [444] su analizirali toksičnost 5nm GNP u zavisnosti od broja peptida koji za njih adsorbovani. Pokazali su da se sa povećanjem adsorbovanih molekula sa 30-150, preživljavanje ćelija smanjuje sa 98% na 66%. Sun i sar. [445] su proučavali toksičnost 13-, 30-, i 60nm GNP konjugovanih CALNN peptidima koji povećavaju intraćelijsku penetraciju. Ovi autori su uočili da 0.02-0.08 nM GNP ne izazivaju značajno smanjenje vijabilnosti HeLa ćelija (80-95%). Međutim, 0.16 nM GNP smanjuje vijabilnost na 60%, dok 0.32nM na čak 10%. Na osnovu navedenih studija se uočava da citotoksičnost GNP može zavistiti od brojnih parametara koje je neophodno ispitati pre njihove biomedicinske primene.

1.6.4.2 Citototoksičnost *in vivo*

Cho i sar. [446] su pokazali da se 13nm PEG-GNP, primenjene u jednoj dozi intravenski u miševima, nakon 7 dana akumuliraju u jetri i slezini, i da dugo cirkulišu u krvi. TEM analiza je pokazala da se ove nanočestice nalaze u citoplazmatskim vezikulama i lizozomima Kupferovih ćelija i slezinskih makrofaga, što je bilo povezano za povećanom inflamacijom i apoptozom hepatocita kod ovih životinja. 5 nm GNP su primenjivane i intraperitonealno kod miša i pacova u dozi od 2 µg/kg. Nakon različitog vremenskog perioda, životinje su žrtvovane i histološka analiza je pokazala da se GNP najviše nakupljaju u slezini kod miševa, dok se kod pacova najveći broj nalazio u Kupferovim ćelijama jetre. 4 sata nakon primene GNP je uočena povećana mitotska aktivnost hepatocita [447]. Cho i sar. [448] su izvršili genetičku analizu hepatocita miševa kojima su intravenski date PEG-GNP 4 i 100nm, i pokazali da se nakon 4 sata značajno menja ekspresija gena u ovim ćelijama. Promenjena ekspresija je uočena kod gena vezanih za apoptozu, ćelijski ciklus, inflamaciju i metabolizam. Druge studije su pokazale da GNP izazivaju kod hepatocita povećanu ekspresiju gena za detoksifikaciju, lipidni metabolizam, ćelijski ciklus i cirkadijalni ritam [449]. Chen i sar. [450] su na modelu BALB/C miševa pokazali da 3-, 5-, 50- i 100nm GNP primenjene intraperitonealno ne izazivaju štetne efekte, dok su 8-, 12-, 17-, 37nm GNP izazvale gubitak apetita, promenu boje krzna i gubitak na težini kod ovih miševa. Patološka analiza jetre je pokazala povećanje broja Kupferovih ćelija, gubitak

strukturnog integriteta pluća i difuziju bele pulpe u slezini. Lasagna-Reeves i sar. [451] su pokazali da koncentracija GNP u krvi ne raste sa povećanjem intravenske doze, dok u svim drugim organima raste proporcionalno. Iako je u mozgu koncentracija GNP bila najmanja, autori su pretpostavili da je akumulacija GNP u moždanom tkivu moguća usled propustljivosti krvno-moždane barijere za GNP. Vrlo je važan podatak ovih autora da nije detektovana nikakva akutna toksičnost, uključujući brojne parametre kao što je preživljavanje, telesna masa, morfologija organa, biohemijski parametri krvi i tkivna histologija. Kim i sar. [452] su intravenski aplikovali 20nm GNP koje su mogle da prođu krvno-retinalnu barijeru i da se distribuiraju u svim ćelijama retine, pri čemu nisu izazvale citotoksičnosti. Stoga možemo reći da GNP mogu predstavljati potencijalan hazard za ljudsko zdravlje, ali da same GNP ili konjugati nisu toksični *a priori*, što ukazuje na neophodnost da se sve GNP detaljno ispituju pre upotrebe kod ljudi.

1.6.4.3 Imunološki efekti nanočestica zlata

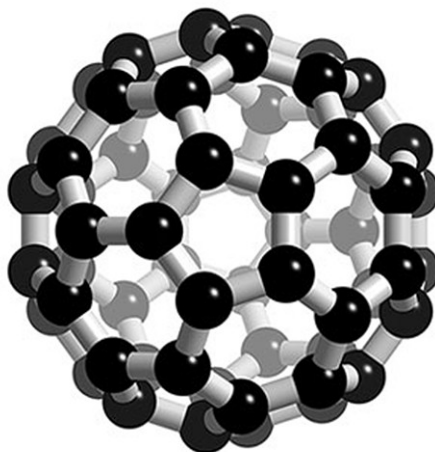
Još od 1920. godine su imunološke osobine koloidnih metala, pogotovo zlata, predstavljale atraktivnu oblast istraživanja. Zilber i Friese su 1929. godine uspešno dobili aglutinirajući serum na koloidno zlato, nakon čega je prvi sledeći pokušaj urađen 80 godina kasnije 2006. godine [423]. Dykman i sar. [453] su predložili tehnologiju za proizvodnju antitela na različite antigene, pri čemu su antigeni adsorbovani direktno na površinu GNP bez direktnog vezivanja. Naime, pokazano je da imunizacija životinja konjugatom GNP-antigen, sa ili bez Freund-ovog adjuvansa, izaziva specifičnu, visokotitarsku produkciju antitela na različite antigene i to bez kontaminirajućih antitela. GNP mogu stimulisati produkciju antitela kod zečeva, pacova, miševa, pri čemu je količina neophodnog antigena značajno manja u poređenju sa onom koja je potrebna u konvencionalnim metodama imunizacije.

GNP mogu predstavljati nosač antigena koji aktivira fagocitnu aktivnost makrofaga. Pokazano je da GNP i njihovi konjugati stimulišu respiratornu aktivnost ćelija retikuloendotelnog sistema i aktiviraju mitohondrijske enzime makrofaga [454]. Ova stimulacija najverovatnije predstavlja uzročni faktor za adjuvantne osobine koloidnog zlata.

GNP konjugovane antigenima indukuju aktivaciju T ćelija i njihovu proliferaciju *in vivo*. Međutim do sada ni jedan rad nije pokazao koji su mehanizmi adjuvantnog delovanja GNP. Moguće objašnjenje su dali Pow i Crook [455] ukazujući na to da je odgovor makrofaga na korpuskularne antigene odgovoran za ovakav efekat. Ovo su potvrdili i drugi istraživači koji su ispitivali mehanizam delovanja DNK vakcina na bazi GNP [456], a uloga Kupferovih i Langerhanovih ćelija u razvoju imunskog odgovora je takođe pokazana. Vallhov i sar. [457] su ukazali da efekat GNP na DC i razvoj imunskog odgovora zavisi od LPS na površini GNP. Naime, kontaminirane GNP su izazivale fenotipsku i funkcionalnu maturaciju DC, ali GNP bez LPS nisu. Slični rezultati su potvrđeni i od strane Villiers i sar. [443]. Bastus i sar. [458] su pokazali da GNP sa peptidima prolaze u citoplazmu makrofaga i indukuju njihovu aktivaciju. Naime, ovi autori su pokazali su da konjugovane GNP interaguju sa TLR4 na makrofagima, nakon čega nanočestice prolaze u ćeliju i indukuju sekreciju proinflamacijskih citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6). Franca i sar. [459] su pokazali da bez obzira na veličinu, GNP bivaju internalizovane od strane makrofaga različitim putevima, uključujući tu i fagocitozu i pinocitozu. Ako se jedan od ovih puteva blokira, GNP ulaze drugim putem. GNP, čija je hidrodinamička veličina ispod 100nm, se mogu fagocitovati. Fagocitoza anjonskih GNP od starne RAW264.7 ćelija je posredovana SR A [460]. Pokazano je da PEG-om obložene GNP inhibiraju LPS indukovanu produkciju NO i ekspresiju iNOS kod makrofaga. Yen i sar. [461] su pokazali da GNP smanjuju broj makrofaga i povećavaju njihovu veličinu, što je praćeno povećanjem produkcije IL-1, IL-6 i TNF- α . Pokazano je da nekonjugovane GNP izazivaju proliferaciju limfocita i NK ćelija, kao i da povećavaju produkciju IL-2 [211]. Uzimajući u obzir navedene studije, možemo istaći da su imunomodulacijski efekti GNP još nedovoljno proučeni, pogotovo mehanizmi njihove interakcije sa APC. Rezultati koji ukazuju na adjuvantne efekte GNP, ukazuju na potencijalnu opasnost dugotrajne primene GNP kao nosača za ciljanu dostavu lekova, što je neophodno nezavisno ispitati.

1.6.5. Karakteristike ugljeničnih nanocevi

Do nedavno su bile poznate samo dve alotropske ugljenične strukture, dijamant i grafit. Avgusta 1985.godine su Smaley i sar. počeli čuvene eksperimente na isparavanju grafita i odmah naišli na iznenađujuće rezultate. U gasnoj fazi ugljeničnih klastera, detektovanih masenom spektroskopijom, našli su da je C_{60} klaster najčešći. Ključni momenat je bio kada su ustanovili da je klaster od 60 C atoma zatvoren, i da ima jedinstvenu stabilnost i simetriju (**Slika 1.6.5.1**). Iako nisu uspjeli da dokažu ovu strukturu, naredni radovi su potvrdili strukturu C_{60} klastera [462]. Otkriće C_{60} je objavljeno u Nature 1985. godine, što je označilo novu eru u nauci o ugljeniku [463]. Wolfgang Kratschmer i Donald Huffman su sa saradnicima razvili nov metod isparavanja grafita koji je vodio znatno većoj produkciji C_{60} , što je omogućilo dalja istraživanja ovih materijala u mnogim laboratorijama. C_{60} je nazvan po Buckminster Fuller-u, arhitekti koji je gradio geodetske kupole u Diznijevnom svetu, Orlando, Florida, SAD [464].



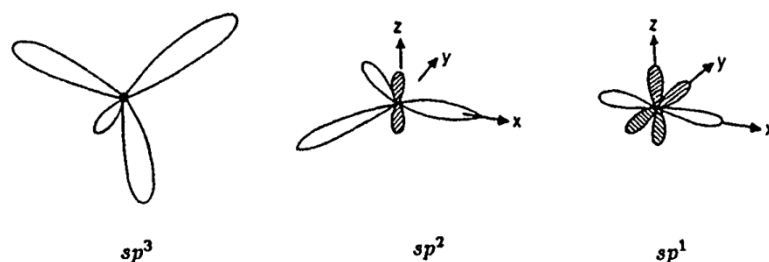
Slika 1.6.5.1. Model C_{60} Bakminsterfulerena (Baki lopta)

Sumio Ijima, oduševljen radom Kratschmer i Huffman-a, se odlučio da uradi detaljnu mikroskopu analizu produkata metode koju su oni otkrili. Početne slike dobijene pomoću

TEM-a visoke rezolucije su bile loše, čađ koju je sakupio sa zidova suda za električnu evaporaciju su izgledali kompletno amorfno i bez jasne strukture. Ijima je tada obratio pažnju na čvrsti cilindričan depozit koji se formirao na katodi nakon električne evaporacije grafita. Umesto amorfne mase, katodna čađ je sadržala potpuno nove grafitne strukture od kojih su najinteresantnije bile šuplje ugljenične nanocevi. Njegovim radom objavljenim u Nature 1991. godine [465] su naučnici koji su proučavali fullerene su odjednom počeli da obraćaju pažnju na grafit na katodi koji je ranije odbacivan kao prljavština. Ovaj rad, 23 godine posle objavljivanja, ima preko 31696 citata, što upućuje na značaj ovog pronalaska.

1.6.5.1. Struktura i morfologija ugljeničnih nanocevi

C ima 4 elektrona u spoljnjem elektronskom omotaču i u osnovnom stanju ima $2s^2 2p^2$ konfiguraciju. Dijamant i grafit su dve prirodne kristalne forme čistog ugljenika. U dijamantu, ugljenik ima sp^3 hibridizovane atome, gde su 4 veze usmerene u uglove pravilnog tetraedra. Ishodna trodimenzionalna mreža (dijamant) je izuzetno rigidna, što je jedan od razloga za njegovu tvrdoću. Veza između sp^3 je 1.56 angstrema. sp^2 hibridizacija C atoma formira heksagonalnu rešetku kakva se nalazi u jednoslojnom grafitu. p_z orbitala je odgovorna za slabe veze i van der Waals-ove veze. Razmak između ugljeničnih slojeva je 3.35 angstrema. Slobodni elektroni u p_z orbitali se kreću slobodno unutar elektronskog oblaka i nisu više lokalni za pojedinačan ugljenikov atom, tj. delokalizovani su. Ovaj fenomen je razlog zbog čega grafit ima električnu provodljivost. Dijamant se, sa druge strane, ponaša kao izolator jer su mu svi elektroni lokalizovani u veze (**Slika 1.6.5.1.1**).



Slika 1.6.5.1.1 Shema sp^3 , sp^2 i sp^1 vezujućih hibridizacija ugljenika.

Neosenčene orbitale doprinose snažnoj vezi, dok osenčene doprinose slabim vezama.

Ugljениčne nanocevi (CNT) se mogu predstaviti kao jednoslojna uvijena heksagonalna mreža ugljenika koja je zatvorena u cev. Dumitrica i sar. [466] su pokazali da se savijanjem grafenskog sloja u CNT unosi asimetrija u π orbitale, što razmešta elektronski oblak na stranu suprotnu od savijanja sp^2 veza. Fizičke osobine CNT zavise od načina na koji je grafenski sloj uvijen, dijametra i dužine cevi, morfologije i nanostrukture.

Ugljениčne nanocevi postoje kao jednoslojne (SWCNT) ili višeslojne (MWCNT) strukture koje su sastavljene od više koncentričnih SWCNT. Ove koncentrične nanocevi se drže sekundarnim, van der Waals-ovim silama. Dimenzije dijametra se razlikuju i kreću se od 0.5-1.5nm (SWCNT) i 2-100nm (MWCNT), dok dužina varira između 20-1000nm (SWCNT), odnosno 1-50 μm (MWCNT). SWCNT su bolje za ispitivanje fundamentalnih i strukturnih osobina CNT, obzirom da druge interakcije mogu ometati analizu CNT.

1.6.5.2 Sinteza ugljениčnih nanocevi

MWCNT su prvobitno otkrivene u čađi metodom električnog pražnjenja [465]. Ovaj metod je korišćen mnogo pre toga za produkciju karbonskih vlakana i fulerena. Ijimi i Ichihashi-u [467] je trebalo 2 godine da sintetišu SWCNT pomoću metalnog katalizatora metodom električnog pražnjenja, a ovaj metod je značajno unapređen kasnije [468], što je omogućilo sintezu znatno veće količine CNT. Napredna metoda se svodi na električno pražnjenje između dve grafitne elektrode u reaktoru u He atmosferi (660mbar). Anoda ima rupu na svoj kraju koja je napunjena katalizatorima (Ni-Co, Co-Y, ili Ni-Y) i grafitnim prahom. TEM analiza je potvrdila da se ovom metodom dobija oko 80% karbonskih vlakana dijametra 5-20nm.

Značaj progres je postignut primenom laserske ablacije svežnjeva SWCNT, čime se dobijaju nanocevi malog dijametra [469]. I u ovoj metodi se koriste katalizatori kao što su Ni i Co, a reakcija se odvija na 1200°C. Pokazano je da se ovom metodom dobija više od 70% SWCNT i da je dominantna forma (10,10) metalnog karaktera. Pretpostavlja se da je

rast nanocevi kod ove metode posredovan Ni i Co atomima koji hemisorbuju na otvoren kraj nanocevi, čime sprečavaju formiranje fulerena.

Katalitički rast nanocevi se vrši hemijskom dekompozicijom iz pare (engl. *chemical vapour decomposition CVD*), metodom koji su prvi koristili Yacaman i sar. [470]. CVD metoda uključuje dekompoziciju ugljenih hidrata pomoću katalizatora, obično etilena ili acetilena, u reakcionoj cevi na 550-750°C. Najbolji rezultati se dobijaju ako su Fe, Ni ili Co prisutni kao katalizatori [471, 472].

Uzimajući u obzir ranija razmatranja o potencijalnoj toksičnosti metalnih koji se koriste za sintezu CNT, može se dovesti u pitanje biološka primena CNT nakon ovakve sinteze, i skrenuti pažnja na neophodnu zaštitu zdravlja ljudi koji vrše sintezu CNT usled opasnosti od akcidentalne inhalacije.

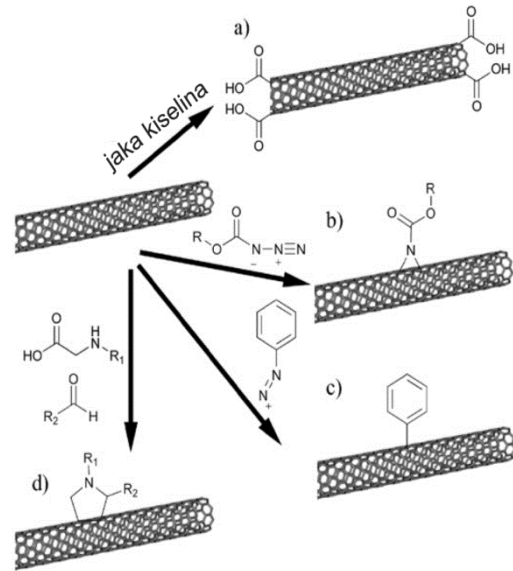
1.6.6. Biološka primena ugljeničnih nanocevi

1.6.6.1. Funkcionalizacija ugljeničnih nanocevi

U toku sinteze, primarne CNT imaju izuzetno hidrofobne osobine. Stoga je za biomedicinsku primenu neophodna njihova funkcionalizacija, tj. hemijska modifikacija u cilju povećanja rastvorljivosti, a time i biokompatibilnosti. Postoje tri osnovna pristupa za hemijsku modifikaciju površine CNT, kovalentno vezivanje, nekovalentno vezivanje i hibridni pristup gde se u prvom koraku pomoćni molekul vezuje nekovalentno nakon čega se biomolekul od interesa vezuje kovalentno. Definisane su različite procedure za kovalentnu modifikaciju CNT, od kojih je najčešća oksidacija. Oksidacija CNT se izvodi oksidujućim agensima kao što je azotna kiselina [473, 474]. Tokom ovog procesa, formiraju se karboksilne grupe na krajevima cevi i na bočnim zidovima. Zeng i sar. [475] su pokazali da C atomi u oksidovanim SWCNT imaju sp^3 hibridizaciju. Iako su oksidovane CNT solubilne u vodi, u prisustvu soli agregiraju usled efekata promene šarže, pa se ne mogu direktno koristiti u medicini zbog visoke koncentracije soli u većini bioloških rastvora. Dalja modifikacija se može postići vezivanjem hidrofilnih polimera kakav je PEG, što CNT čini stabilnim u biološkom okruženju [476-478]. Osim hemijske oksidacije koja

omogućava slabiju funkcionalizaciju bočnih zidova, uvedene su cikloadicione reakcije na aromatičnim prstenovima bočnih zidova. 2+1 cikloadicije se mogu sprovesti fotohemijским reakcijama CNT u prisustvu azida [479, 480], ili karbena što omogućava formiranje jedinjenja Bingel-ovom reakcijom [481, 482]. 1,3-dipolarna cikloadicija CNT je razvijena od strane Prato i sar., [483, 484] i danas se često koristi. Azometinilidne grupe sintetisane kondenzacijom α -amino kiselina i aldehida se dodaju na površinu CNT, nakon čega se formiraju pirolidiniski prstenovi na bočnim zidovima CNT. Funkcionalne grupe uvedene modifikacijom α -aminokiselina se mogu iskoristiti za dalju modifikaciju sa biološkim molekulima kao što su peptidi i lekovi [485, 486] (**Slika 1.6.6.1.1**). Treba istaći da kovalentna funkcionalizacija narušava unutrašnje fizičke osobine CNT, kao što je fotoluminescenca i Ramanovo rasipanje. Intenzitet Ramanovog rasipanja i fotoluminescence SWCNT se drastično smanjuje nakon kovalentne funkcionalizacije, što smanjuje potencijal za njihovu istovremenu upotrebu kao optičkih uređaja [487]. U tom smislu, kao što je navedeno, je bolje koristiti MWCNT koje imaju veću površinu slobodnu za hemijske reakcije funkcionalizacije.

Nekovalentna funkcionalizacija CNT se može sprovesti pomoću amfifiličnih surfaktanata ili polimera. Obzirom da je tada sačuvana π mreža CNT, fizičke osobine CNT su potpuno sačuvane. Poliaromatična površina CNT je dostupna za vezivanje aromatičnih molekula π - π interakcijama [488, 489]. Ovi autori su pokazali da se proteini mogu imobilizirati za površinu aminoreaktivnog pirenskog konjugata glikodendrimeri koji služi da disperguje CNT u vodenom rastvoru [490]. Osim pirena, često se koristi jednolančana DNK u cilju funkcionalizacije SWCNT, takođe π - π interakcijama [491-493]. Međutim, pokazano je da DNK molekuli oko SWCNT mogu biti isečeni nukleazama iz seruma, što ukazuje da funkcionalizacija SWCNT pomoću DNK nije stabilna u biološkim okruženjima [494]. Pokazano je i da fluorescein izotiocijanat (FITC) može adsorbovati aromatičnim prstenom za površinu CNT i služiti kao dobar obeleživač za praćenje i oslikavanje ovih nanočestica [495]. Slično tome, definisane su procedure za funkcionalizaciju CNT pomoću SDS i Triton X-100 [496], i PEG-ilovanim fosfolipidima, koji predstavljaju posebno interesantan metod za sigurnu biološku primenu ovih materijala [476, 497, 498].



Slika 1.6.6.1.1. Uobičajene metode hemijske funkcionalizacije CNT.

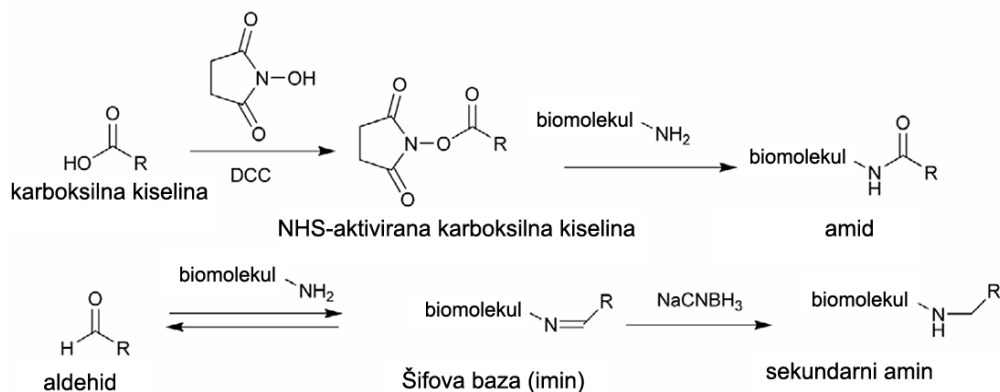
A) Oksidacija jakom kiselnom B) cikloadicija, C) Arilacija diazonijumskim solima, i D) 1,3-dipolarna cikloadicija. Preuzeto iz [499].

1.6.6.2. Primena ugljeničnih nanocevi kao nosaša biomolekula

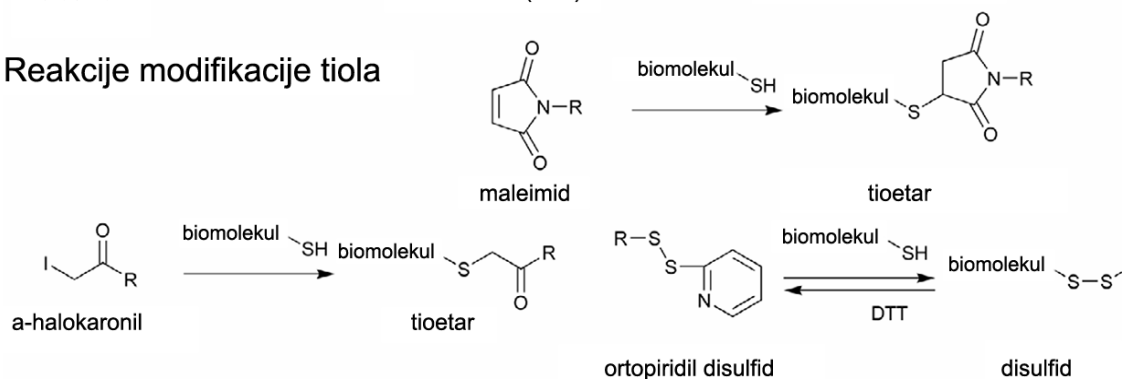
Zbog svojih izvrsnih fizičkih i hemijskih osobina, CNT, pogotovo MWCNT, mogu biti upotrebljene kao nosač biomolekula (lekova, peptida, gena, nukleinskih kiselina i sl.). Biološki aktivni molekuli se mogu vezati kovalentno za CNT i iskoristiti u vakcinaciji za dostavu peptida. Ovi molekuli se mogu na različite načine transformisati i aktivirati, i nakon toga vezati za slobodne grupe uvedene funkcionalizacijom CNT (**Slika 1.6.6.2.1**). Bianco i sar. [500, 501] su razvili sistem da dostavu različitih peptida kovalentno vezanih preko amino grupe za CNT. Naime, B ćelijski epitop iz VP1 proteina virusa bolesti usta i stopala (engl. foot-and-mouth disease virus, FMDV) je vezan za maleimidni ostatak mono i bisderivatizovanih CNT. Ovaj peptid je zadržao sekundarnu strukturu, obzirom da su ga specifična monoklonska i poliklonska antitela prepoznavala u ELISA testu. Nakon primene samih CNT *in vivo*, nije pokrenut imunski odgovor, što ukazuje na to da funkcionalizovane

CNT nemaju imunogene osobine. Sa druge strane, peptid-CNT je indukovao visok titar antitela specifičnih za VP1, što potvrđuje mogućnost korišćenja CNT u dostavi peptida.

Reakcije modifikacije amina



Reakcije modifikacije tiola



Slika 1.6.6.2.1 Ključne metode za hemijsku modifikaciju biomolekula koji ima amino- ili tiolnu grupu [502].

Do danas su CNT konjugovane i sa antikancerskim lekovima kakav je metotreksat (MTX) [486]. MTX se slabo preuzima od strane ćelija [503, 504], međutim ako se MTX konjuguje sa CNT, ne gubi se njegova aktivnost, a značajno se povećava preuzimanje ovog leka u ćelije [505]. Konjugat CNT i doksocilina (DOX-CNT) pokazuje citotoksičnost u kulturi kancerskih ćelija, i dobru solubilnost ukoliko se CNT prethodno konjuguju sa

Plunoric F127 [506] ili PEG-om [476]. Venkastesan i sar. [507] su vezivali eritropoetin za CNT u okviru sistema za oralnu dostavu ovog glikoproteinskog hormona, međutim ovaj način primene rezultuje malom bioraspoloživošću eritropoetina, ali ne ako se ovaj faktor nekovalentno veže zajedno sa kazeinom i labrosolom.

Razvoj konjugata CNT i nukleinskih kiselina je još u povoju, i za sada su detaljno istražene hemijske interakcije između DNK i CNT [508]. Međutim, rad Lacerda i sar. [509] dokazuje da CNT mogu da se koriste za dostavu gena ili siRNK *in vivo*. Slično tome, Bianco i sar. [510, 511] su pokazali da se DNK-CNT internalizuje od strane ćelije i ispoljava u ćeliji značajno više nego nekonjugovana DNK za isti protein. Većina radova ukazuje na to da nekovalentno vezane DNK za CNT daju bolju transfekciju ćelija [508]. Kam i sar. [497] su pokazali da siRNK-CNT konjugat može da se sintetiše pomoću PEG-ilovanih lipida na površini CNT, pri čemu se ova nekovalentna veza lako raskida u ćeliji i omogućava stišavanje specifičnih gena pomoću siRNK. Na sličan način su Zhang i sar. [512] iskoristili CNT za dostavu siRNK u tumorsku ćeliju za stišavanje TERT gena koji je ključan za razvoj i rast tumora.

Biološki efekti brojnih lekova bi se mogli unaprediti povećanjem njihove rastvorljivosti u biološkim sredinama, čime bi se i smanjila njihova biodegradabilnost. U tom smislu je pripremljen konjugat CNT-amfotericin B, anti-fungalnog leka koji je u solubilnom stanju jako toksičan za sisarske ćelije [513] usled formiranja agregata [514]. Pokazano je da CNT-amfotericin B smanjuje toksičnost ovog antifungalnog leka koji i dalje poseduje anti-fungalni efekat [478]. Dapson (4,4'diaminodifenilsulfon) je efikasan lek za borbu protiv malarije i lepre izazvane *Mycobacterium leprae*, kao i kod pacijenata sa SIDA-om koji boluju i od *Pneumocystis jirovecii* i *Toxoplasma gondii*, kao i za Kaposijev sindrom [515, 516]. Ovaj lek inhibira rast *Mycobacterium avum in vitro*, što ukazuje da se može koristiti u terapiji različitih infekcija *Mycobacterium sp* [516]. Mehanizam dejstva ovog leka je dobro poznat [517], za razliku od njegovih imunomodulacijskih efekata. Međutim, dapson je liposolubiln, i u jetri se pomoću citohroma p450, CYP2E1, CYP2C9, CYP3A [518], konvertuje u citotoksični N-acetilni i N-hidroksilni metabolit koji uzrokuje methemoglobinemiju i hemolitičku anemiju [519], agranulocitozu i hipersenzitivnost [517].

Stoga bi vezivanje dapsona za CNT omogućilo njegovu veću solubilnost i manje neželjenih efekata uz sačuvanje njegovog biološkog efekta.

Agonisti TLR, kao što su nemetilovani citozin-fosfodiester-guanin (CpG), predstavljaju odlične stimulatore imunskog odgovora protiv različitih patogena [520, 521]. Međutim, biološka aktivnost solubilnih TLR agonista je prolazna i potrebne su visoke doze u cilju postizanja željenog efekta [522]. Bianco i sar. [523] su pripremili više tipova CpG-CNT i uočili su da visok odnos funkcionalizovanih CNT prema koncentraciji specifičnih CpG, povećava imunopotentnost *in vitro*, pri čemu se smanjuje produkcija proinflamacijskog IL-6. Pored toga, nekoliko sintetskih jedinjenja može aktivirati TLR7, kao što je 7-alil,7,8-dihidro-8-oksoguanozin (loksoribin) i 7-tia-8-oksoguanozin (7-TOG) [524]. 7-TOG ima široko antiviralno dejstvo i stimuliše NK ćelije, makrofage i B limfocite u animalnim modelima [525]. Ranije je naša grupa pokazala da 7-TOG i loksoribin mogu stimulisati DC [526, 527], ali su za aktivaciju neophodne visoke koncentracije TLR agonista, a njihova stabilnost *in vivo* je upitna. Na osnovu toga se može pretpostaviti da bi vezivanje 7-TOG za CNT omogućilo njegovu ciljanu dostavu od TLR7 i odgovarajuću stimulaciju imunskog odgovora sa značajno manjom koncentracijom agonista.

1.6.7. Biokompatibilnost ugljeničnih nanocevi

1.6.7.1 Citotoksičnost *in vitro*

Brojne ispitivanja su sprovedena u prethodnim godinama u cilju otkrivanja toksičnih efekata CNT. Kao i u ranijim razmatranjima, zaključci iz ovih studija su veoma različiti u zavisnosti od tipa CNT i procedura njihove funkcionalizacije. *In vitro* i *in vivo* studije su pokazale da nakon odgovarajuće funkcionalizacije CNT ne ispoljavaju toksičnost [477, 490, 528, 529]. U tom smislu su Cui i sar. [530] pokazali da SWCNT inhibiraju proliferaciju HEK293 ćelija, dok su Ding i sar. [531] uočili da MWCNT stopiraju ćelijski ciklus i indukuju apoptozu i nekrozu humanih fibroblasta. U ovim studijama nisu korišćene funkcionalizovane CNT. U skladu sa tim, primarne CNT su toksične za miševе nakon inhalacije [528, 532-534]. Pored toga je pokazano da primarne, nefunkcionalizovane CNT

imaju i kancerogeni potencijal [535]. Metalni katalizatori se takođe moraju ispitati tokom određivanja toksičnosti CNT [536], a u citotoksičnim esejima je potrebno izbeći interferenciju CNT za reagensima samog eseja [537, 538]. Osim toga, surfaktanti koji su prisutni u rastvoru CNT mogu biti veoma toksični za ćelije [539].

Nakon odgovarajuće funkcionalizacije CNT ne ispoljavaju toksičnost *in vitro* [476, 540-543]. Za PEG-fosfolipid CNT konjugat nije pokazano da indukuje apoptozu i nekrozu, a ne smanjuje ni ćelijsku proliferaciju [476, 497]. 1.3-dipolarna cikloadicija CNT takođe je sigurna za ćelije, uključujući i primarne imunske ćelije [478, 529]. Biomimetički omotač oko CNT takođe doprinosi smanjenoj citotoksičnosti ovih nanomaterijala [544, 545]. Jin i sar. [546] su pokazali da funkcionalizovane SWCNT preuzete od strane ćelija endocitozom, mogu izaći iz ćelija egzocitozom bez uticaja na njihovu vijabilnost. Stoga se može zaključiti da primarne CNT i CNT bez stabilne funkcionalizacije u serumu ispoljavaju toksičnost, dok CNT koje su funkcionalizacijom stabilne u serumu ne ispoljava toksičnost ni u visokim dozama.

1.6.7.2. Citotoksičnost *in vivo*

Toksikološki aspekti CNT su detaljno ispitivani na animalnim modelima. Nefunkcionalizovane CNT, aplicirane intratrahealno, su izazvale očiglednu pulmonarnu toksičnost, inflamaciju i fibroznu reakciju usled nakupljanja agregata hidrofobnih CNT u plućima ispitivanih životinja [528, 532-534]. Ovo takođe ukazuje na opasnosti kod izlaganja CNT na radnom mestu. Međutim, ovo malo govori o toksikološkom profilu funkcionalizovanih CNT, pogotovo onih koji unose intraperitonealno ili intravenski. Poland i sar. [535], su uočili reakciju sličnu onoj na azbest, kao što je mezotelioma, nakon izlaganja mezotelijalnog dela telesne šupljine velikim količinama MWCNT tokom intraperitonealne injekcije. Pokazana je i zavisnost dužine MWCNT od njihovog toksikološkog profila. Manje MWCNT (1-20 μm , dijametra 10-14nm) nisu imali uočljive toksične efekte. Međutim, u studijama sa funkcionalizovanim SWCNT, uglavnom se koriste CNT 50-300nm dužine i 1-2nm debljine, što predstavlja potpuno drugačiju geometriju u odnosu na onu koju su koristili Poland i sar. [535]. Pri korišćenju PEG-

SWCNT, Gambhir i sar. [477] su nakon intravenskog tretmana miševa (3mg/kg) uočili da nema značajne promene u sistolnom krvnom pritisku, hematokritu i tkivnoj histologiji 4 meseca nakon tretmana. Druga studija je pokazala da se PEG-SWCNT polako ekskretuje iz tela nakon sistemske distribucije bez vidljivih toksičnih efekata [547]. Čak i ako se rastvore u Tween-80, SWCNT ne izazivaju značajnu toksičnost ni pri visokim dozama (40 mg/kg, i.v.), iako je uočeno povećanje oksidativnog stresa u plućima i jetri [548]. Ista grupa je pokazala da PEG-SWCNT mogu dugo opstati u cirkulaciji miša, bez toksičnih efekata [549]. Trenutno nema dovoljno studija o imunološkim efektima funkcionalizovanih CNT *in vivo*, pogotovo u vezi aktivacije komplementa, koji čini prvu liniju odbrane od patogena [176].

2. HIPOTEZE I CILJEVI ISPITIVANJA

Uzimajući u obzir sve navedeno može se pretpostaviti da biokompatibilnost naprednih biomaterijala na bazi CuAlNi i NiTi SMA, i nanomaterijala na bazi GNP i MWCNT u velikoj meri zavisi od metoda njihove pripreme i funkcionalizacije. U tom smislu bi nova metoda pripreme SMA brzim otvrdnjavanjem valjanjem rastopine, značajno poboljšala površinske osobine NiTi i CuAlNi legura, a time i njihovu biokompatibilnost u odnosu na legure istog sastava pripremljene konvencionalnim metodama. Primenom ultrasonične sprej pirolize bi se iz recikliranog zlata mogle sintetisati GNP sa prihvatljivom biokompatibilnošću i potencijalno primenjive u medicini. Sa druge strane, funkcionalizacija MWCNT bi značajno smanjila njihovu citotoksičnost i time omogućila njihovu primenu kao nosača lekova ili agonista TLR do endozoma ćelija. Novosintetisani / funkcionalizovani biomaterijali i nanomaterijali, iako necitotoksični, ne moraju biti inertni u biološkom okruženju već, menjajući svoje fizičko-hemijske karakteristike u interakciji sa proteinima bioloških okruženja, mogu delovati na različite ćelije i modifikovati njihovu unutarćelijsku signalizaciju i funkciju. Ključne ćelije u odgovoru na biomaterijale i nanomaterijale su APC, pre svega makrofagi i DC, koje mogu potencirati imunski odgovor produkcijom proinflamacijskih citokina i biomolekula, stimulacijom proliferacije T limfocita i usmeravanjem imunskog odgovora u pravcu Th1 i Th17. Sa druge strane, iste ćelije mogu inhibirati imunski odgovor sekrecijom antiinflamacijskih citokina i usmeravanjem odgovora u pravcu Th2 i Treg. U oba slučaja dodatni stimuli poreklom iz inflamacije, kao što su citokini i TLR agonisti, mogu imati značajan efekat na odgovor ovih ćelija na biomaterijale i nanomaterijale. Stimulacija imunskog odgovora posredstvom APC bi bila poželjna kod primene GNP i funkcionalizovanih MWCNT u anti-tumorskoj terapiji. Sa druge strane inflamacijska reakcija bi bila kontraindikovana kod primene SMA implantata jer bi potencijalno mogla da dovede do odbacivanja biomaterijala.

Stoga smo postavili sledeće ciljeve za ispitivanje ovih hipoteza:

1. Ispitati citotoksičnost CuAlNi RS SMA traka i njene mehanizme na modelu PMØ pacova, kao i njihov uticaj na produkciju proinflamacijskih citokina od strane PMØ u poređenju sa kontrolnim CuAlNi legurama
2. Ispitati citotoksičnost i imunomodulacijske osobine CuAlNi i NiTi RS SMA u kulturi humanih PHA-stimuliranih PBMC
3. Ispitati citotoksičnost, imunomodulatorne osobine i korozivnost NiTi RS SMA na modelu humanih monocitnih DC, kao i njihov uticaj na sazrevanje i Th polarizacionu funkciju ovih ćelija
4. Ispitati citotoksičnost GNP pripremljenih USP metodom u kulturi L929 ćelija i timocita i splenocita pacova, i mehanizme citotoksičnosti analizom mikrostrukturne GNP
5. Ispitati imunomodulacijski efekat i citotoksičnost GNP pripremljenih USP metodom u kulturi stimuliranih pacovskih splenocita.
6. Ispitati uticaj veličine GNP na proces maturacije i anti-tumorske funkcije humanih monocitnih DC stimuliranih LPS-om ili tumorskim nekrotičnim ćelijama. Analizirati mehanizme internalizacije i unutarćelijsku distribuciju GNP u DC, kao i efekte na signalizaciju posredovanu Ca^{2+} .
7. Ispitati mehanizme internalizacije o-MWCNT funkcionalizovanih dapsonom ili 7-TOG agonistom na modelu PMØ pacova i humanih DC.
8. Ispitati citotoksične efekte MWCNT funkcionalizovanih dapsonom na modelima PMØ pacova i humanih DC.
9. Na modelu PMØ pacova ispitati uticaj dap-MWCNT na oksidativni prasak, produkciju NO i IL-6 od strane ovih ćelija.
10. Na modelu humanih DC ispitati efekat dap-MWCNT na fenotipsku maturaciju i produkciju citokina od strane DC.

3. MATERIJALI I METODE

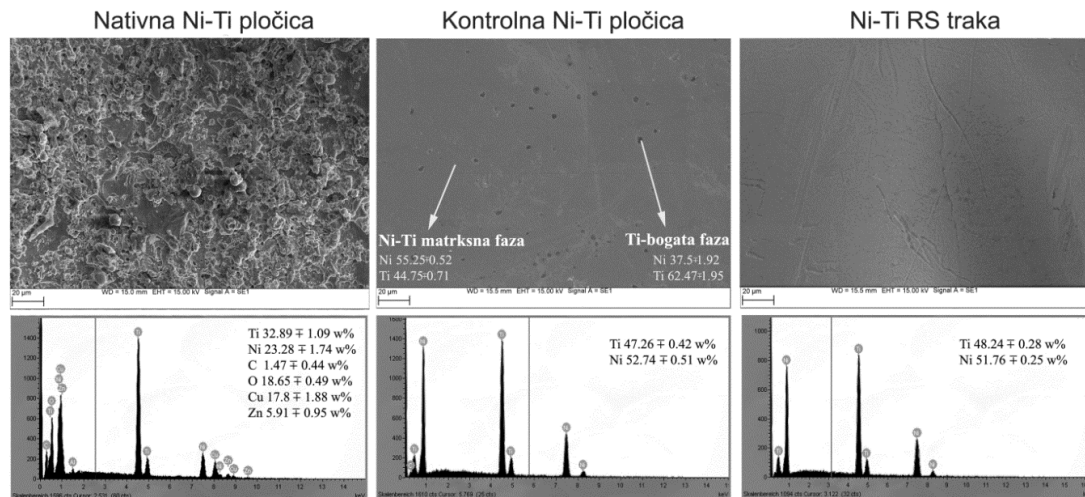
3.1. NAPREDNI BIOMATERIJALI

3.1.1. NiTi RS SMA

3.1.1.1. Priprema NiTi RS traka i kontrolnih NiTi pločica

NiTi (sa 50.3% Ti) ingoti su pripremljeni metodom električnog topljenja pod vakuumom na podlozi od bakra ohlađenog vodom u redukovanoj Ar atmosferi. U cilju dobijanja homogenih SMA, električno topljenje je ponavljano po tri puta za svaku leguru. NiTi RS trake su napravljene pretopljavanjem primarnog NiTi ingota, a sam proces je izvođen u He atmosferi pod 200 mbar u kvarcnom sudu pomoću prskalice dijametra 0.9 mm. Zbog problema vezanih za lepljenje otopine za sud, on je obložen sa unutrašnje strane sa Y_2O_3 u cilju povećanja rezistentnosti suda na agresivne hemijske tretmane na visokim temperaturama. Ovo je posebno pogodna metoda za visokoreaktivne otopine kakva je otopina Ti. Primenjujući pritisak Ar iznad suda od 90 mbar, otopina je istisnuta na površinu poliranog valjka od Cu (200mm u dijametru) koji je rotirao brzinom od 15 m/s. Razdaljina između prskalice i površine valjka je bila 2mm. NiTi RS trake su pripremljene kao trake dimenzija 5mm x 5mm x 0.1mm, i analizirane su na SEM sa EDX sistemom (Sirion 400 NC, FEI, Hillsboro, OR, SAD), nakon čišćenja u ultrasoničnom kupatilu.

Kontrolne NiTi pločice su pripremljene iz istog NiTi ingota kao i NiTi RS trake nakon sečenja materijala na pločice 5mm x 5mm x 1mm pomoću elektroerozije. Nakon toga je izvršena SEM/EDX analiza koja je pokazala hrapavu površinu pločica sa kontaminirajućim elementima kao što su Cu, Zn i C. Stoga su nativne NiTi pločice išmirglane na papirima od silikonskog karbida, čija je veličina mrežice povećavana od 80 do 4000, a zatim su polirane dijamantskom suspenzijom čije su partikule dijametra 3 μ m i 1 μ m. SEM/EDX analiza, izvedena nakon poliranja i čišćenja u ultrasoničnom kupatilu nije pokazala kontaminante na površini materijala (**Slika 3.1.1.1.1.**), pa su nakon pripreme ovakve NiTi pločice korišćene u studijama biokompatibilnosti.



Slika 3.1.1.1. SEM/EDX analiza uzoraka NiTi SMA.

NiTi uzorci su pripremljeni kao što je opisano u materijalima i metodama. Reprezentativne EDX analize svakog od uzoraka su prikazane ispod slika SEM. Težinski procenat elemenata (wt.%) ± SD unutar EDX spektra su prikazani na osnovu merenja 8 površina 50 x 50 μm^2 . Dve intermetalne faze detektovane na kontrolnoj NiTi pločici su identifikovane pomoću tačkaste EDX analize, i prikazane su kao srednja vrednost wt% ± SD, n=9.

3.1.1.2. Priprema NiTi legura za testove biokompatibilnosti i kondicioniranje

Nakon pripreme, NiTi RS trake (5mm x 5mm x 0.1mm) i kontrolne pločice (5mm x 5mm x 1mm) su isprane u destilovanoj vodi i očišćenje u ultrasoničnom kupatilu (5 x 3 min u vodi). Nakon toga su uzorci osušeni 1 sat i dezinfikovani 96% alkoholom 5 min. Nakon sušenja, uzorci su korišćeni za direktni i indirektni esej citotoksičnosti. Direktan esej podrazumeva kultivaciju ćelija (humanih perifernih mononukleara (PBMC) i humanih DC) u direktnom kontaktu sa test materijalom, dok se ćelije u indirektnom eseju kultivisu u kondicioniranom medijumu (ekstraktu legure). Osušeni uzorci su postavljeni u ploče sa 24 mesta (Costar Sigma, Minhen, Nemačka) u šestoplikatima, koje su već sadržale kompletni medijum za ćelijske kulture. Medijum za ćelijske kulture činio je RPMI medijumu (Sigma, Minhen, Nemačka) sa 10% fetalnim telećim serumom (FCS, ICN, Costa Mesa, CA), 2mM L-glutaminom, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicina, 100 U/ml penicilina, 100 mg/ml streptomicina (ICN,

Costa Mesa, CA, SAD), 50 μ M 2-merkaptetanol (2-ME, Sigma). Osim NiTi legura korišćene su i pločice od čistog Ti ili Ni istog odnosa površine i zapremine medijuma ($2\text{cm}^2/\text{ml}$). Inkubacija uzoraka je izvršena na 37°C , 5% CO_2 . Uslovi kondicioniranja su bili u skladu sa ISO standardima testiranja biokompatibilnosti za medicinske i dentalne materijale (ISO, 1997), i trajali su 2 dana, ili 7 dana do 5 nedelja. Medijum za menjan svake nedelje i oni koji su sakupljeni posle prve i četvrte nedelje su korišćeni u testovima biokompatibilnosti sa humanih mononuklearima periferne krvi (PBMC). Kontrolni medijum činio je kompletni medijum inkubiran bez legura pod istim uslovima.

3.1.1.3. Mikrostruktorna analiza NiTi RS traka i dubinski profil

Mikrostruktorna analiza NiTi RS traka je analizirana pre i posle kondicioniranja ovih materijala u medijumu 2 dana, kako je već opisano. SEM, Auger elektronska spektroskopija (AES) i fotoelektronska spektroskopija X-zracima (XPS) su korišćeni u cilju karakterizacije površine NiTi RS traka pomoću VG-Scientific Microlab 310F SEM/AES/XPS sistema. Primarni elektronski zrak je podešen na 10 nA, i kinetičku energiju od 10 keV, što je omogućilo rezoluciju analize od 10nm. XPS i AES analize su izvršene nakon čišćenja uzoraka jonima Ar^+ ($E= 2\text{keV}$, $r= 12\text{mA}/\text{m}^2$, $Q= 47$) u cilju uklanjanja površinskog sloja adsorbovanih kontaminanata (rasprašivanje). Pri svim merenjima XPS-om korišćena je Mg $K\alpha$ radijacija od 1486.6 eV pomoću anode pri voltaži od 12.5 kV i struji emisije od 16mA, što je generisalo snagu od 200 W. XPS analiza je izvršena nakon što je površina uzorka rasprašena pomoću jona Ar^+ na 3keV tokom 5 min. Za dubinski AES profil su uzorci rasprašivani pomoću 3keV Ar^+ jonima, brzinom od 1.2nm / min i analiza je urađena pre i posle svakog ciklusa rasprašivanja. Brzina rasprašivanja je procenjena na osnovu prosečne brzine rasprašivanja SiO_2 pod sličnim uslovima [550].

3.1.1.4. Ispitivanje korozivnih osobina NiTi RS traka

Nakon kondicioniranja NiTi RS traka je sakupljen medijum i centrifugiran na 3000 rpm 10 min nakon čega je određena koncentracija metalnih jona u supernatantu pomoću induktivno spregnute plazma atomske emisije spektroskopije (ICP-AES). Očitavanja apsorbanse su izvršena u triplikatu za svaki ispitivani uzorak.

3.1.2. CuAlNi legure

3.1.2.1. Priprema CuAlNi RS traka i kontrolnih CuAlNi pločica

Primarna legura je napravljena topljenjem čistog Al, Cu i Ni, i Al 3wt % B pod vakuumom u indukcionoj peći. Nakon topljenja je pušten Ar (1.03 bar), i otopina je izlivena u trajnu leguru. Korišćeni metali su bili industrijske čistoće i izliveni su u obliku cilindričnih poluga. Poluge su bile 47 mm u dijametri i visine 270 mm. Hemijski sastav legure je ispitan ICP-AES metodom (Perken-Elmer) u triplikatu, i pokazano je da legura ima 81.3 wt.% Cu, 13.1 wt.% Al, 3.8 wt% Ni, i 0.04 wt% B. Detektovano je Fe (0.007 wt%) i Co (0.002 wt%), dok su ostali elementi bili ispod granice detekcije (0.001 wt%). CuAlNi poluge su obrađene mašinski u pločice 5mm x 5mm x 1mm, za testove biokompatibilnosti kao kontrolne CuAlNi legure, i za generisanje CuAlNi RS traka.

Priprema CuAlNi SMA traka je opisana ranije [551]. Trake su izlivenne pomoću slobodnog mlaza rastopine preko Cu valjka u zaštitnoj atmosferi Ar (5.1). Izabrane su relativno male brzine rotacije valjka (12.4-11.8 m/s) u cilju dobijanja traka sa optimalnim dimenzijama za testove biokompatibilnosti. U cilju definisanja austenitnog oblika i optimalnih SMA osobina, trake su zagrevane na 900 °C tokom 2 min, ohlađene u vodi, zagrevane na 300 °C 2 sata i potom ponovo ohlađene u vodi.

3.1.2.2. Priprema CuAlNi legura za testove biokompatibilnosti i kondicioniranje

Nakon pripreme, CuAlNi RS trake (5mm x 5mm x 0.1mm) i kontrolne pločice (5mm x 5mm x 1mm) su isprane u destilovanoj vodi i očišćenje u ultrasoničnom kupatilu (5 x 3 min u vodi). Nakon sušenja i sterilizacije, kao što je to opisano za NiTi legure, uzorci su korišćeni za direktni i indirektni esej. Ekstrakti su pripremljeni inkubacijom uzoraka u kompletnom medijumu za ćelijske kulture i inkubirani u standardnim uslovima pri čemu je odnos površine i zapremine medijuma bio 1cm²/ml. Trajanje kondicioniranja, u skladu sa ISO standardima (ISO, 1997), je iznosilo 7 dana do 5 nedelja. Medijum za menjan nakon svake nedelje i oni koji su sakupljeni posle prve i poslednje nedelje su korišćeni u ispitivanju biokompatibilnosti u kulturi pacovskih PMØ, dok je medijum sakupljen posle

prve i četvrte nedelje korišćen u testovima biokompatibilnosti sa humanih mononuklearima periferne krvi (PBMC). Kontrolni medijum činio je kompletni medijum inkubiran bez legura pod istim uslovima.

3.1.2.3. Ispitivanje korozivnih osobina CuAlNi legura

Mikrostrukturna analiza površine CuAlNi legura, i dubinski profil pre i nakon kondicioniranja ovih legura je određen u našim ranijim ispitivanjima [268]. Nakon kondicioniranja CuAlNi RS traka je sakupljen medijum, i centrifugiran na 4000rpm 10 min, nakon čega je određena koncentracija metalnih jona u supernatantu pomoću ICP-AES. Očitavanja apsorbance su izvršena u triplikatu za svaki ispitivani uzorak.

3.2. NANOMATERIJALI

3.2.1. Nanočestice zlata

3.2.1.1. Priprema nanočestica zlata iz sekundarnih zlatnih sirovina

Sekundarne zlatne sirovine iz recikliranog nakita (wt% 58.5 Au; 8.11 Ni; 24.35 Cu; 8.37 Zn; 0.67 ostalo) iz Zlatarne Celje, Slovenija, su rastvoreni u vodenom rastvoru koji sadrži hlornu i azotnu kiselinu. Ovakav rastvor je korišćen u sintezi GNP pomoću USP pomoću ultrasoničnog atomizera (Gapusol 9001, RBI, Francuska). Sinteza je urađena na Centru za metalrušku obradu i recikliranje metala RWTH Univerziteta u Ahenu, Nemačka. Slična metoda za druge metale je primenjena i ranije u okviru naše istraživačke grupe [552]. Rastvor zlata je čuvan preko noći i nakon toga premešten u ultrasonični atomizer. Temperatura i pritisak su podešeni pomoću termostata i vakumske pumpe. Produkcija aerosoli, koja je nastala ultrasoničnom frekvencijom od 2.5 i 0.8 MHz, je prebačena pomoću azotne/vodonične atmosfere u vrući reaktor, gde su kapljice aerosoli podvrgnute termalnoj dekompoziciji, skupljanju i precipitaciji u rastvor, termolizi i sinterovanju, na osnovu čega su se formirale nanočestice. Termalna dekompozicija dobijenog rastvora je obavljena na 300°C i 800°C, i nanočestice su sakupljene u reakcionoj cevi i u boci sa vodom i alkoholom.

3.2.1.2. Teorijske pretpostavke u sintezi nanočestica USP metodom

Očekivani dijametar nanočestica je dobijen na osnovu kombinacije dve jednačine koju su objavili Peskin i Raco [553] i Messing i sar. [554]:

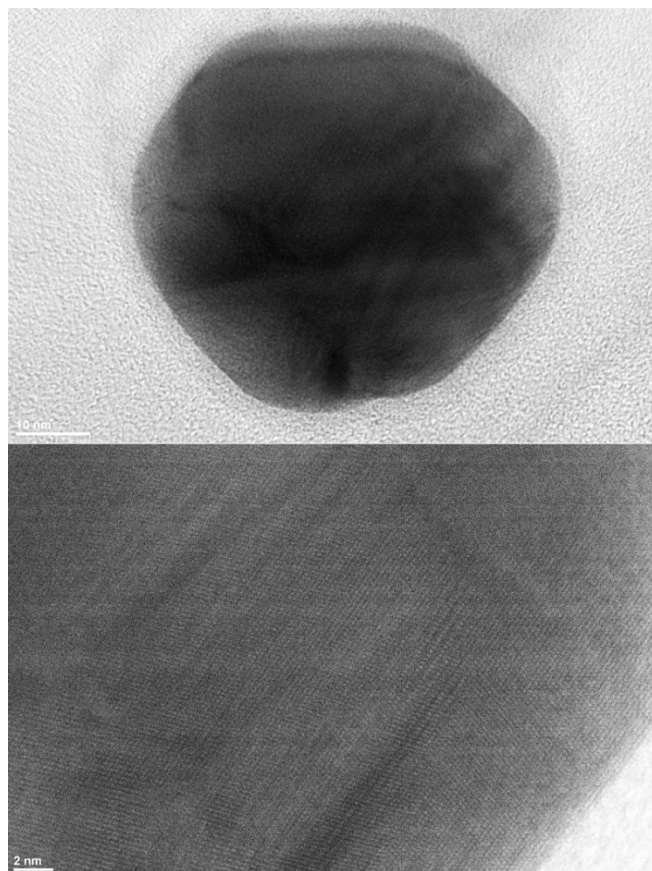
$$D_{Au} = 0.34 \cdot \left(\frac{8 \cdot \pi \cdot \gamma}{\rho_{sol} \cdot f^2} \right)^{1/3} \cdot \left(\frac{C_{sol} \cdot M_{Au}}{\rho_{Au} \cdot M_{sol}} \right)^{1/3}$$

gde je D_{Au} dijametar nanočestice (m), γ -površinski napon (N/m), f - frekvencija ultrazvuka (Hz), C_{sol} - koncentracija početnog rastvora (g/l), M_{sol} - molarna masa početnog rastvora (g/mol), M_{Au} - molarna masa zlata (g/mol), ρ_{sol} - gustina atomiziranog rastvora, a ρ_{Au} - gustina zlata (g/cm³). Pod pretpostavkom da su osobine vode slične osobinama prekursorog rastvora, parametri u našim eksperimenta su iznosili: $\gamma=72.9 \cdot 10^3$ N/m, $\rho=1$ g/cm³, $M_{Au}=196.97$ g/mol, $M_{sol}=339.8$ g/mol, $\rho_{Au}=19.3$ g/cm³. Obzirom da očekivani srednji dijametar nanočestica dobijen nakon hidrogenske redukcije zavisi od koncentracije inicijalnog rastvora, korišćena je ista inicijalna koncentracija rastvora recikliranog zlata u svim eksperimentima ($C_{Au}=5$ g/l). Finalni dijametar je izračunat na osnovu navedene jednačine pod pretpostavkom da je svaka kapljica transformisana u jednu partikulu tokom atomizacije i da nije bilo srastanja kapljica i aglomeracije.

3.2.1.3. Karakterizacija nanočestica zlata

Morfologija površine i hemijski sastav nanočestica koji je formiran pod različitim parametrima je analiziran FEI Sirion SEM koji ima EDX detektor, INCA 359 System (Oxford Instruments, UK). Uzorci za SEM/EDX su pripremljeni tako što su primarni rastvori 5 frakcija nanočestica nakopavani na adhezivnu ugljeničnu traku, osušene u desikatoru, nakon čega je postupak ponovljen nekoliko puta. Ova procedura je primenjivana u cilju smanjenja pozadinskog signala koji može kompromitovati EDX analizu. Osim toga, izvršena je TEM analiza pomoću JOEL JEM-2100 HR TEM. Za karakterizaciju nanočestica pomoću TEM-a, na bakarnu mrežicu je nanet sonifikovani rastvor nanočestica koji je osušen na sobnoj temperaturi. Analiza je vršena na različitim uveličanjima (do 2000000 puta) što je omogućilo analizu rasporeda atoma zlata u nanočesticama (**Slika 3.2.1.3.1.**). Slike sa TEM i SEM su korišćene za merenja veličine

nanočestica pomoću NIS-element D 2.3 programa. Distribucija frekvencije dijametra nanočestica zlata iz frakcije 1 i frakcije 2 je izvršena u Graph Pad Prism 5.0 programu. GNP pripremljene USP metodom su korišćene u kulturama sa L929 ćelijama, pacovskim timocitima i splenocitima.



Slika 3.2.1.3.1. Atomska struktura nanočestica zlata pripremljena USP metodom.

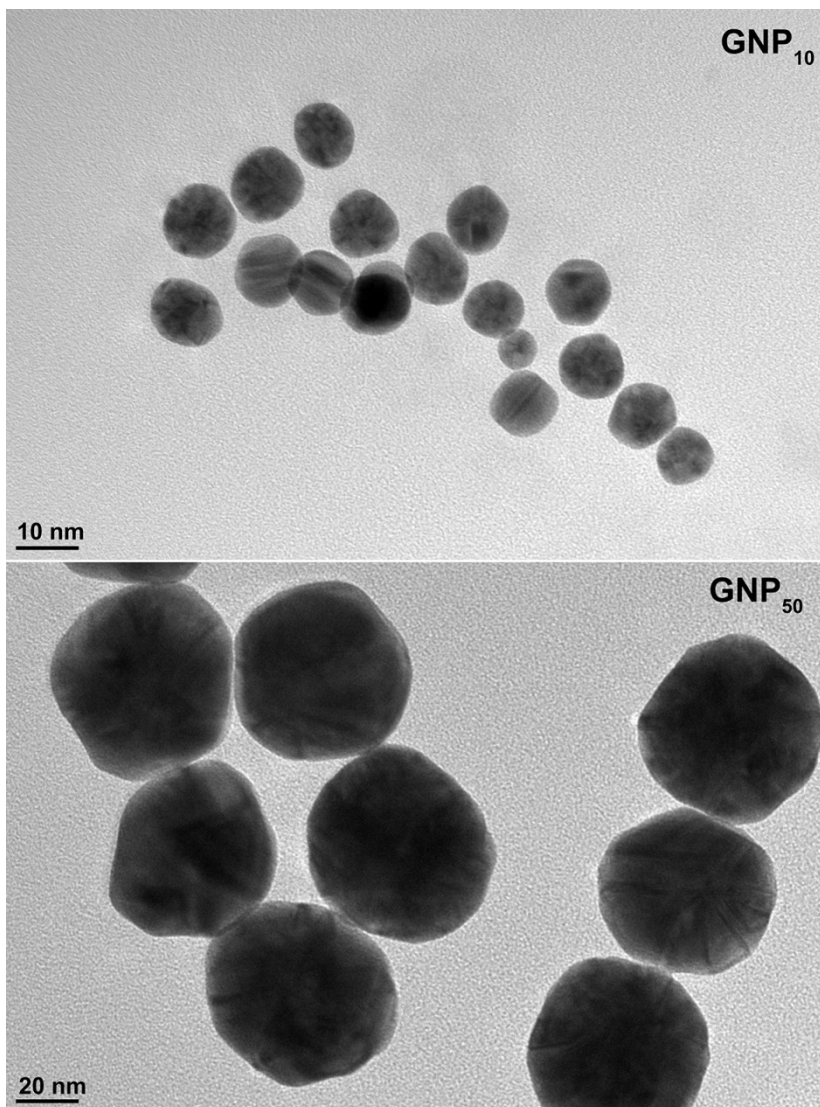
Analiza nanočestica je izvršena TEM-om visoke rezolucije. Prikazana je nanočestica zlata 45 nm u dijametru (gore), koja je sastavljena iz atoma zlata raspoređenih u pravilnu rešetku (dole).

Osobine GNP 50nm (GNP₅₀) i 10nm (GNP₁₀) u dijametru koje su nabavljene od firme Nanopartz (LA, CA, SAD) je prikazana u **tabeli 3.2.1.3.1.**

Tabela 3.2.1.3.1 Osobine nanočestica zlata okarakterisane od strane kompanije Nanopartz

Osobina (metod merenja) (mera)	GNP ₁₀	GNP ₅₀
LOT	SPA62C	SPA4C
Rastvarač	18 MEG DI voda	18 MEG DI voda
Dijametar (DLS) (nm)	10	50
SPR (UV-VIS) (OD)	50	50
Disperzija veličine (DLS) (stdev/veličina)	20%	7%
SPR maksimum (UV-VIS) (nm)	523	535
pH štoka (pHmetar, Orion)	9.4	8.9
Zeta potencijal (DLS) mV	-20	-32
Koncentracija Au štoka (ICP-MS) (μg/ml)	2500	2500
Udeo Au po nanočestici	>99.9%	>99.9%
Stabilizirajući karboksilni ligand (Da)	<300	<300
Broj nanočestica / ml štoka	2.67 x 10 ¹⁴	2.24 x 10 ¹²
Molaritet (nM) štoka	427.6	3.5844

U cilju provere ovih osobina, nanočestice su pripremljene u vodenom rastvoru i u kompletnom medijumu, i nakapane su na Cu mrežicu u cilju analize na TEM-u visoke rezolucije (JOEL JEM-2100 HR TEM) pod različitim uveličanjima. Na **slici 3.2.1.3.2.** je prikazan izgled ovih GNP u vodi, a njihov dijametar nije značajno promenjen kompletnom medijumu.



Slika 3.2.1.3.2. Izgled GNP na TEM-u

Hidrodinamički dijametar GNP₁₀ i GNP₅₀ je određen pomoću Malvern Zetasizer NANO ZS, koji omogućava analizu veličine i agregacije na osnovu DLS, i opremljene detektorom za zeta potencijal. Uzorci su pripremljeni u vodi i medijumu u koncentraciji od 20 µg/ml, a zatim sonifikovani 15 sekundi pre merenja na uređaju. Uzorci su temperirani do 25°C i nakon toga mereni tokom 20 minuta, 4 puta na uzorku nakon čega određena z-veličina, i z-potencijal. Polidisperzioni indeks (PDI) je urađen u cilju detekcije monodisperzibilnosti nanočestica u medijumu i vodi, pri čemu je za PDI= 0 za idealno

monodisperzne nanosfere, a PDI=1- za različito aglomerirane sfere, nanoštapiće, trouglove, cilindre itd. PDI od se 0.20 uzima kao prihvatljiva mera za monodisperzne sferične GNP. U **tabeli 3.2.1.3.2.** su prikazane karakteristike GNP izmerene u našim eksperimentima.

Tabela 3.2.1.3.2. Osobine GNP izmerene u našim eksperimentima

Osobine (metod merenja)(jedinica)	GNP ₁₀	GNP ₅₀
Veličina (TEM) (nm)	11.3 ± 2.5 (n=200)	51.9 ± 3.7 (n=200)
Hidrodinamička veličina (DLS) (nm)	Voda: 10.2 ± 0.8	Voda: 50.9 ± 0.7
	Medijum: 17.6 ± 1.8	Medijum: 73.8 ± 0.8
Polidisperzioni indeks (DLS)(nm)	Voda: 0.203 ± 0.02	Voda: 0.084 ± 0.01
	Medijum: 0.327 ± 0.05	Medijum: 0.278 ± 0.02
z-potencijal (mV)	Voda: -23.775 ± 0.547	Voda: -30.375 ± 0.642
	Medijum: -12.835 ± 2.203	Medijum: -12.250 ± 1.147

Komercijalne GNP₅₀ i GNP₁₀ su korišćene u kulturi humanih DC monocitnog porekla.

3.2.2. Ugljenične nanocevi

3.2.2.1. Priprema i oksidacija ugljeničnih nanocevi

MWCNT su pripremljene CDV metodom i korišćene su bez daljeg prečišćavanja. Čistoća MWCNT je bila veća od 95 wt.% sa spoljnim dijametrom 20-30nm i unutrašnjim 5-10nm, dok je dužina iznosila od 5 do 200 µm. Dimetilformamid (DMF) je prečišćen i osušen da ne sadrži ostatke vode [555]. Svi drugi reagensi, kao što su 4,4'-diaminodifenilsulfon (dapson), 7-TOG, DIEA, N-HATU, koncentrovana sumporna kiselina

(H₂SO₄), koncentrovana azotna kiselina (HNO₃), metanol i FITC su korišćeni bez pripreme. Dejonizovana voda (DI) (18 MΩ cm) je korišćena za ispiranje i pripremu rastvora. Sve hemikalije su kupljene od kompanije Sigma-Aldrich.

Primarne MWCNT su prvo tretirane sa 3:1 (V/V) smeše koncentrovane sumporne i azotne kiseline. Ova smeša MWCNT je sonifikovana 3 sata na 40°C u ultrasoničnom kupatilu u cilju uvođenja karboksilnih grupa na površinu MWCNT. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi, oksidovane MWCNT (o-MWCNT) su dodavane kap po kap u 300ml hladne DI vode i filtrirane pod vakumom preko PTFE membranskog filtera sa veličinom pore od 0.05 μm. Filtrand je nakon toga ispran u DI vodi dok mu pH nije bio neutralan. Uzorak je osušen u vakumskoj peći na 80°C tokom 8 sati.

3.2.2.2. Funkcionalizacija o-MWCNT dapsonom, 7-TOG agonistom, i FITC-om

Pripremljena je smeša od 100mg o-MWCNT, 8mg N-HATU, 10 μl DIEA (molarni odnos N-HATU i DIEA je bio 1:3) i 3ml anhidrovanog DMF, u cilju aktivacije karboksilnih grupa od strane DIEA. Nakon 15 min aktivacije, dapson ili 7-TOG rastvoreni u anhidrovanom DMF (20g amina / 100ml DMF) su dodavani u smešu, nakon čega je dobijena smeša sonifikovana 4 sata na 40°C. Produkt je rastvoren u 300ml DMF i filtriran pod vakumom preko PTFE membrane. Filtrand je ispiran nekoliko puta viškom DMF i metanola. Dobijeni dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT su osušeni u vakumskoj peći na 60°C 8 sati.

U cilju konjugacije dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT sa FITC-om, rastvor od 2mg FITC i 2 mg dap-MWCNT ili 7-TOG-MWCNT u 1ml DMF su sonifikovani na sobnoj temperaturi tokom 5 sati. Nakon uklanjanja DMF, crna tečnost je podvrgnuta dijalizi vodom tokom 3 dana u 12-14K MWCO dijaliznoj cevi. Nakon toga su dap-MWCNT-FITC i 7-TOG-MWCNT izolovani liofilizacijom. Uzorci Dap-MWCNT su ispitivani u kulturi PMØ, dok je efekat 7-TOG-MWCNT ispitivan u kulturi sa humanih DC.

3.2.2.3. Karakterizacija uzoraka MWCNT

Fourier-ova transformacija infracrvenog spektra (FTIR) je dobijena u transmissionom modu pomoću BOMEM spektrometra (Hartmann & Braun, Vermont, Australia). Elementalna analiza je izvršena pomoću VARIO EL III Elementalnog analizera. TEM analiza je izvršena pomoću TECNAI-FEG F20 elektronskog mikroskopa (FEI Evropa, Ajnhoven, Holandija) koristeći elektronski snop pod naponom od 200kV. Za ovu analizu svi MWCNT uzorci su sonifikovani u koncentrovanoj HNO₃ tokom 3 sata na 40 °C (5mg MWCNT u 10ml HNO₃). Nakon hlađenja do sobne temperature, uzorci MWCNT su filtrirani pod vakuumom kako je opisano ranije. Filtrat je korišćen za analizu sadržaja metala pomoću Agilent Technologies 7500 ce ICP-MS sistema (Agilent Technologies, Inc. Santa Klara, Kalifornija, SAD) koji je opremljen oktopolnom koliziono-reaktorskom ćelijom, Agilent 7500 ICP-MS ChemStation programom, i MicroMist nebulizerom sa kvarcnom dvostrukom komorom Scott-tipa koja je ohlađena pomoću Peltier-ovog uređaja na 2 °C. Instrument je optimizovan u smislu senzitivnosti, nivoa oksida i dvovalentnih jona pomoću rastvora za podešavanje koji se sastoji od 1 µg/L Li, Y, Tl, Ce, Co i Mg u 2% HNO₃ (w/v). Standardizacija procedure optimizacije je urađena po uputstvu proizvođača.

Termogravimetrijska analiza (TGA) je urađena pomoću TA Instruments SDT Q600 (Eschborn, Nemačka) koristeći temperature između 20°C i 800°C, pri čemu je brzina zagrevanja iznosila 20°C/min pri protoku azota brzinom od 200ml/min. UV-vis spektar je snimljen na SHIMADZU UV1700 spektrofotometru (Shimadzu, Duizburg, Nemačka).

Zeta potencijal primarnih MWCNT, o-MWCNT, dap-MWCNT i dap-MWCNT:FITC je izvršena pomoću zeta-sizer Nano 2s koji je opremljen sa 633nm Ne-Ne laserom (Malvern). Suspenzije uzoraka u koncentraciji od 100mg/l u DI vodi su sonifikovana 5 minuta pH vrednosti suspenzija su izmerena nakon merenja zeta potencijala [556].

U cilju provere stabilnosti konjugata dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT, konjugovani uzorci su rastvoreni u 300m DMF i filtrirani u vakumu preko PTFE membranskog filtera (0.05µm pora), nakon čega je filtrand rastvoren u 150 ml DMF, sonifikovan 30 min i filtriran. Procedura primenjena sa DMF je ponovljena i sa metanolom i vodom. Sva tri

rastvora su nakon toga analizirana na prisustvo 7-TOG i dapsona pomoću UV-vis spektrofotometrije, pri čemu je nađeno manje od 0.3% 7-TOG i manje od 0.2% dapsona u DMF, dok u metanolu i vodi nisu detektovani oslobođeni biomolekuli.

3.3. IZOLACIJA I KULTIVACIJA ĆELIJA

3.3.1. Kultivacija L929 i HEp-2 ćelijskih linija

U testovima citotoksičnosti korišćene su L929 ćelije (NCTC klon, ATCC, Rockwell, MD, SAD) uskladu sa ISO standardima za ispitivanje biokompatibilnosti medicinskih i dentalnih uređaja. U funkcionalnim testovima sposobnosti DC da indukuju anti-tumorski odgovor *in vitro* korišćene su HEp-2 ćelije humanog epidermalnog karcinoma larinksa (ATCC). Kompletna procedura izvođenja testa citotoksičnosti se zasniva na principima dobre laboratorijske prakse [557]. Ovi principi uključuju i regularnu proveru kultura na odsustvo kontaminacije na mikoplazme (Mycoalert kolorimetrijski test) kao i odsustvo promena u morfologiji ćelija i hromozomskih aberacija, odnosno odstupanja od uobičajenog ciklusa deoba ćelija.

L929 i HEp2 ćelije su čuvane u tečnom azotu. Nedelju dana pre eksperimenta ćelije su odmrznute, i isprane u od dimetil-sulfoksida (DMSO) u kome su bile smrznute, a zatim su kultivisane u plastičnim bočicama za kulture u termostatu na 37°C i 5% CO₂. Medijum za kulturu je bio kompletni RPMI medijum. L929 i HEp-2 ćelije rastu u obliku adherentnog sloja. U početku su izduženog, vretenastog izgleda. Kada postanu konfluentne poprimaju tipičan izgled kaldrme. Takve konfluentne ćelije su rasađene u serije flaskova i kultivisane u kompletnom RPMI medijumu 1-2 dana, dok konfuentnost nije dostigla dostigne 80-90% od svog maksimuma.

Rasađivanje je vršeno tripsinizacijom. Naime, semikonfluentne ćelije su isprane od kompletnog RPMI medijuma odlivanjem kompletnog medijuma i nalivanjem rastvora 0.02% Na EDTA (Sigma) u RPMI, sa antibioticima (penicilin, streptomycin i gentamicin) u istim koncentracijama kao i u kompletnom medijumu. 6% štok NaEDTA je bio pripremljen u fosfatnom puferu (3 mM NaH₂PO₄, 7 mM Na₂HPO₄, 0.27 M NaCl, PBS). Nakon

ispiranja, na ćelije je dodat rastvor 0.2% tripsina (izolovan iz goveđeg pankreasa, Sigma) u 0.02% Na EDTA, i one su inkubirane 5 min u inkubatoru, pri čemu je disocijacija ćelija od podloge potvrđena pod svetlosnim mikroskopom. Na ćelijsku suspenziju je dodat 1ml kompletnog medijuma i suspenzija je isprana centrifugiranjem na 1000 rpm 7 min na hladnom u cilju zaustavljanja dejstva tripsina. Na ćelijski pelet je dodat medijum i ćelije su brojane pomoću tripan plavog.

3.3.2. Brojanje ćelija

Ćelije dobijene na različite načine su izbrojane pre postavljanja u ćelijsku kulturu. Nakon ispranja centrifugiranjem, deo ćelija je obojen 0.1% rastvorom tripan-plavog u PBS-u što je omogućilo brojanje ćelija u komori po Bürker-Türk-u na svetlosnom mikroskopu. Tokom brojanja nisu računane ćelije koje su se usled oštećenja membrane obojile plavo. Konačan broj ćelija je izračunat kao:

$$N(ml) = \frac{\sum 4 \text{ brojanja}}{4} \times \text{faktor razblaženja u tripanu} \times 10^4$$

Nakon brojanja, podešavana je zapremina ćelija potrebna za zahteve kultivacije.

3.3.3. Izolacija peritoneumskih makrofaga pacova

PMØ su izolovane iz Albino Oxford (AO) mužjaka pacova starih 10 nedelja čija je telesna masa iznosila 200-220g. Sve životinje su prethodno gajene u vivarijumu na Institutu za medicinska istraživanja VMA, u standardnim uslovima koji su u skladu sa regulativama za upotrebu eksperimentalnih životinja koji je odobrio Etički komitet VMA septembra 2001, a koji striktno prati Direktivu evropske zajednice o upotrebi laboratorijskih životinja u eksperimentima [558].

U cilju izolacije PMØ pacovi su anestetizirani u etru, nakon čega im je u peritoneumsku šupljinu dodato 20ml hladnog RPMI medijuma, u cilju brze konstrikcije creva i smanjenja opasnosti od povrede unutrašnjih organa. Životinja je blago pritisnuta u

predelu abdomena u cilju boljeg raspoređivanja RPMI medijuma. Peritoneumske ćelije su sakupljene aspiracijom medijuma pomoću šprica 20ml pažljivim izvlačenjem iz donjeg desnog dela peritoneuma. Ćelijska suspenzija je zatim isprana centrifugiranjem na 1000 rpm 7 min na hladnom, a na ćelijske pelet je dodat medijum, nakon čega su ćelije brojane u tripan plavom, kako je već opisano. Vijabilnost peritonealnih ćelija, od kojih su 80% činili makrofagi, je bila veća od 95%.

3.3.4. Izolacija timocita i splenocita pacova

U izolaciji timocita i splenocita pacova, korišćeni su mužjaci AO pacova, starosti do 2 meseca, eutanizovani u etru. Životinje su prethodno gajene u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja kako je već opisano. Timusi su izvađeni u sterilnim uslovima pravljenjem ventralnog reza od ksifoidnog nastavka bočno kroz grudni koš. Otvaranjem grudnog koša izolovan je timus. Slezina je izdvojena nakon ventrolateralnog reza sa desne strane tela neposredno ispod rebara. Nakon odvajanja vezivnog omotača od timusa i slezine, napravljene su suspenzije ćelija blagim gnječenjem sterilnim klipom plastičnog šprica, koje su zatim filtrirane kroz najlonsku mrežicu da bi se odstranili krupniji agregati ćelija i strome. Tako pripremljene suspenzije ćelija su centrifugirane na 1200 rpm tokom 10 minuta na sobnoj temperaturi, a ćelije su isprane dva puta u RPMI medijumu sa dodatkom 5% FCS. Vijabilnost i broj ćelija su određeni korišćenjem 0.1% rastvora tripan plavog.

3.3.5. Izolacija perifernih humanih mononuklearnih ćelija

Mononuklearna frakcija ćelija izolovana je iz koncentrovanih ćelijskih elemenata periferne krvi (Buffy coat), zdravih dobrovoljaca čija se plazma izdvajala na Institutu za transfuziologiju VMA, u kliničke svrhe. Svi dobrovoljni davaoci su bili informisani sa procedurom i načinom upotrebe njihovih krvnih produkata, na šta su dali pismenu saglasnost. Mononuklearne ćelije periferne krvi (PBMC) su izolovane prateći proceduru priloženu u uputstvu proizvođača Lymphoprep gradijenta, gustine 1.077 g/ml (Nycomed, Oslo, Norway). Pre postavljanja na gradijent, suspenzija ćelija je razblažena u 0.02% NaEDTA u PBS (1:2 - 1:4 v/v). Prvo je 2 ml gradijenta naliveno u epruvete, nakon čega je po 8ml suspenzije naneto na površinu gradijenta, pažljivo, kako bi se sprečilo mešanje

suspenzije i gradijenta. Zatim je mononuklearna frakcija ćelija izdvajana centrifugiranjem na 2200 rpm, 20 minuta na sobnoj temperaturi. Tokom centrifugiranja formiraju se slojevi ćelija. Prvo je odbačen gornji sloj plazme, vodeći računa da se ne pomeri sloj PBMC koji je formiran na površini gradijenta. Zatim je sakupljen sloj PBMC, vodeći računa da se umanju aspiracija slojeva gradijenta i eritrocita koji se nalaze ispod prstena PBMC. Sakupljene ćelije su zatim isprane u 0.02% NaEDTA u PBS-om centrifugiranjem na 1400 rpm, 10 minuta kako bi se odstranili ostaci gradijenta. Nakon odstranjivanja gradijenta, suspenzija ćelija je ispirana još četiri puta centrifugiranjem na 800 rpm, 8 minuta, uz postupno povećavanje udela medijuma za kultivaciju u rastvoru za ispiranje, tako da je na kraju ova ćelijska suspenzija isprana i od tragova NaEDTA. Vijabilnost i broj ćelija je zatim utvrđen bojenjem tripan plavim.

3.3.6. Izdvajanje monocita i T limfocita iz PBMC

U cilju dobijanja monocitne frakcije PBMC primenjivan je metod adherence ili magnetnog sortiranja. U prvom metodu su PBMC ($30 \times 10^6 / 25 \text{ cm}^2$) postavljeni u polistirenske flaskove ili ploče od 6 mesta. Nakon inkubacije ćelija 1h i 15 min, neadherentna frakcija je ispirana toplim RPMI medijum 4-5 puta. Ovim metodom se zadržava oko 3×10^6 adherentnih monocita / 25 cm^2 , pri čemu je procenat limfocita <5%.

U cilju dobijanja monocita veće čistoće primenjen je metod magnetnog sortiranja pomoću kita (Human Monocytes Isolation Kit II, Mylteni Biotec, Bergisch Gladback, Nemačka), koji sadrži koktel antitela na CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 i CD235a, čime je omogućena negativna selekcija CD14⁺ monocita. Na ovaj način, iz ukupne frakcije PBMC dobijeni su i ukupni CD3⁺ T limfociti, pomoću kita (Pan-T cell Isolation Kit, Myltenil) koji sadrži antitela na CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, CD235a, kao i CD4⁺ T limfociti (CD4⁺ T cell Isolation Kit, Myltenil) koji sadrži antitela na CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ , CD235a, a koji su korišćeni u eksperimentima u kojima su ispitivane osobine DC dobijenih iz monocita. Čistoća dobijenih frakcija bila je uvek preko 90%.

Korišćena procedura je uključivala nekoliko uzastopnih koraka koji su vodili sortiranju ćelija. Nakon brojanja ćelija, izdvojen je odgovarajući broj ćelija na osnovu čega je izračunata zapremina antitela potrebna za izolaciju. Ćelije prvo isprane u PBS-u centrifugiranjem na 1000 rpm, 10 minuta, i nakon toga su inkubirane 10 minuta u određenoj zapremini pufera (PBS sa dodatkom 2mM EDTA i 0.5% BSA) sa odgovarajućom koncentracijom koktela antitela konjugovanih biotinom, koji sadrži antitela specifična za sve ćelijske tipove u PBMC osim za one koji se izoluju. Nakon isteka ove inkubacije, ćelije u suspenziji su tokom 15 min inkubirane u prisustvu anti-biotin antitela konjugovanih sa magnetnim mikrokuglicama. Koktel koji je u ovom koraku korišćen za izolaciju CD4+ T limfocita sadržao je i anti-CD61 antitelo za dodatno uklanjanje trombocita. Po isteku ove inkubacije, ćelije su isprane i resuspendovane u PBS/EDTA/BSA puferu, nakon čega su postavljene na kolonu za magnetno sortiranje ćelija koja je postavljena na magnet (kolone i magneti su kupljeni od Mylteni Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Nakon dodatnog ispiranja kolone postavljene na magnetu, ćelije koje nisu zaostale u koloni privučene magnetom su sakupljene i isprane prvo u PBS/EDTA/BSA puferu, a zatim i u medijumu za kultivaciju.

3.3.7. Diferencijacija DC iz monocita

Monociti izolovani imunomagnetnim sortiranjem ili aderencom su korišćeni za dobijanje monocitnih DC. Naime, ćelije ($0.5-1 \times 10^6$ /10cm²/2ml) su kultivisane u kompletnom medijumu za ćelijske kulture sa dodatkom 100ng/ml humanog rekombinantnog GM-CSF (Leucomax, Bazel, Švajcarska) i humanog rekombinantnog IL-4 (Roche Diagnostics, Manhajm, Nemačka), tokom 5-6 dana, pri čemu je trećeg dana zamenjeno 25% medijuma svežim medijumom sa citokinima. Nakon kultivacije, iDC su sakupljene, brojane u tripan-plavom i analizirana je njihova ekspresija CD1a, CD14 i HLA-DR pomoću protočne citometrije. Nezrele DC su korišćene dalje u testovima biokompatibilnosti.

3.4. EKSPERIMENTALNE ĆELIJSKE KULTURE

3.4.1. Citotoksičnost CuAlNi SMA legura u kulturi PMØ

U cilju određivanja toksičnosti CuAlNi SMA, korišćeni su direktni i indirektni testovi. U direktnim testovima PMØ su kultivisane u ploči sa 24 mesta. Uzorci legura (šestoplikati), prethodno kondicionirani u kompletnom medijumu kako je opisano ranije, ili ne, su prvo postavljeni u sredinu ploče. Nakon toga je dodato 1×10^6 PMØ po bazenu, pri čemu je ukupna površina legure prema zapremini medijuma iznosila $2 \text{ cm}^2/\text{ml}$. Ćelije su kultivisane 24 sata u inkubatoru, nakon čega je izmerena njihova vijabilnost i metabolička aktivnost MTT testom. Kontrolne ćelije su kultivisane bez CuAlNi legura, a pored toga, kao dodatne kontrole su korišćene legure u medijumu bez ćelija.

U indirektnom eseju PMØ su kultivisane u medijumu koji je kondicioniran sa legurama, kako je opisano, bilo u nerazblaženom kondicioniranom medijumu ili razblaženom 1:4 u kompletnom RPMI medijumu. U ovim eksperimentima su PMØ kultivisani u ploči sa 96 mesta (2×10^5 ćelija po bazenu). Nakon 24 sata, ploča je centrifugirana u cilju izdvajanja supernatanta koji su smrznuti na -40°C , u cilju detekcije citokina i NO, dok je ćelijama izmerena vijabilnost ili metabolička aktivnost.

Sposobnost CuAlNi legura da indukuju apoptozu i nekrozu PMØ (1×10^6 ćelija po bazenu) je izmerena nakon 24 sata kultivacije, dok je njihova sposobnost da indukuju produkciju ROS određena nakon 30 minuta kulture sa CuAlNi trakama ili kontrolnim pločicama. Kao pozitivan tretman u ovim esejima je korišćen $0.5 \text{ mM H}_2\text{O}_2$, dok kontrolne ćelije nisu bile tretirane.

3.4.2. Citotoksičnost CuAlNi i NiTi legura u kulturi humanih PBMC

Humane PBMC iz 20 dobrovoljaca su izolovane kako je opisano. Ćelije (2×10^6 ćelija/ml) su kultivisane u kompletnom RPMI medijumu 48h su prisustvu CuAlNi ili NiTi legura, ili same. Odnos površine legura u odnosu na zapreminu medijuma je iznosio 1 cm^2 . Nakon kultura je određena vijabilnost i apoptoza PBMC. U cilju određivanja efekata legura

na produkciju citokina od strane ovih ćelija, PBMC su dodatno stimulisane sa fitohemaglutininom (32 µg/ml, Difco, Lawrence, SAD; PHA). Proliferacija ovih ćelija je određena ugradnjom radioaktivnog timidina, dok je koncentracija citokina određena u supernatantima kultura.

3.4.3. Citotoksičnost NiTi legura u kulturi humanih DC

U cilju određivanja citotoksičnosti NiTi SMA RS traka i kontrolnih NiTi legura, DC su kultivisane 2 ili 5 dana, nakon čega su ćelije sakupljene i određena je njihov broj i vijabilnost bojenjem sa tripan plavim, i apoptoza i nekroza pomoću protočnog citometra.

3.4.4. Maturacija DC u prisustvu NiTi SMA

Nakon diferencijacije iDC iz monocita dobijenih metodom adherence, ćelije su premeštene u ploče sa 24 mesta (1×10^5 ćelija/ml) u koje su već bili postavljeni sterilisane NiTi SMA RS trake, ili kontrolne NiTi pločice u koncentraciji kao u studijama kondicioniranja. Kontrolne kulture su sadržale DC kultivisane na plastičnoj pokrovnoj ljsupi 8mm u dijametru. DC su kultivisane 2 ili 5 dana u ovim uslovima. U nekim eksperimentima, maturacija DC je dodatno izazvana LPS-om (0.5 µg/ml), u prisustvu NiTi SMA RS traka ili kontrolnih plastičnih pokrovnih ljuspica, tokom 2 dana.

3.4.5. Citotoksičnost nanočestica zlata u kulturi pacovskih timocita i splenocita i L929 ćelija

U ispitivanju citotoksičnosti GNP dobijenih USP metodom korišćeni su pacovski timociti (5×10^5 /ml), splenociti (5×10^5 /ml) i L929 mišiji fibroblasti (5×10^4 /ml) postavljeni u ploče sa 96 mesta u 200 µl. Ćelije su zatim tretirane sonifikovanim rastvorom 5 različitih frakcija nanočestica zlata (25 i 100 µg/ml, u kulturama L929 ćelija i timocita, ili 10 i 50 µg/ml u kulturi splenocita) i kultivisane 24 sata ili 3 dana. Različiti brojevi ćelija su korišćeni obzirom da je njihova veličina značajno različita, a ranije smo pokazali da ovakav broj ćelija formira konfluentni sloj ćelija [268]. Nakon kultivacije je procenjena

metabolička aktivnost ovih ćelija, njihova vijabilnost i procenat apoptotskih i nekrotskih ćelija.

Proliferacija L929 ćelija kultivisanih sa ili bez frakcija nanočestica zlata tokom 48 sati je određena na osnovu ugradnje ^3H -timidina. Slično tome, proliferativna sposobnost splenocita u prisustvu ili odsustvu frakcija GNP, je određena nakon njihovog tretmana sa konkanavalinom A (ConA, 2.5 $\mu\text{g/ml}$, Sigma) u trodnevnoj ćelijskoj kulturi. Tokom poslednjih 18 sati kulture dodat je radioaktivni timidin (1 $\mu\text{Ci/}$ bazenu, 6.7 Ci/mM, Amersham), a na kraju kulture su L929 ćelije tripsinizovane i skinute pomoću skidača za ćelijske kulture. Radioaktivnost je izmerena pomoću scintilatnog brojača (Beckman, LKB-1219 Rackbeta, Finska). Rezultati su izraženi kao broj otkucaja u minutu (engl. *counts per minute*, cpm) \pm SD triplikata. Supernatant kultura splenocita aktiviranih sa ConA je korišćen za detekciju citokina.

3.4.6. Maturacija DC u prisustvu GNP i nekrotičnih HEp-2 ćelija

iDC diferencirane iz monocita dobijenih imunomagnetnim sortiranjem su postavljene u ploče sa 24 mesta (0.5×10^6 ćelija/ml) i ostavljene 2 sata da adheriraju u inkubatoru. Nakon toga su dodate sonifikovane GNP₁₀ ili GNP₅₀ u različitim koncentracijama (5-200 $\mu\text{g/ml}$ zlata) i ćelije su inkubirane 4-48 sati u inkubatoru, u cilju određivanja netoksične koncentracije GNP. Ćelijska vijabilnost nakon kulture je određena brojanjem ćelija u tripan-plavim, kao i protočnom citometrijom, gde je određen procenat apoptotskih i nekrotičnih ćelija.

Maturacija DC je indukovana LPS-om (Sigma) tokom 4-48 sati, u cilju ispitivanja funkcionalnih i fenotipskih svojstava ovih ćelija. Osim toga, sazrevanje DC je indukovano nekrotičnim HEp-2 ćelijama ($1 \times 10^6/\text{ml}$) koje su prethodno kultivisane sa GNP₁₀ ili GNP₅₀ (10 $\mu\text{g/ml}$) tokom 24 sata. HEp-2 ćelije su nakon toga sakupljene tripsinizacijom, isprane na 1600 rpm 8 minuta i zatim ubijene toplotom u kompletnom RPMI medijumu na 63°C tokom 30 minuta, kao što je ranije opisano [559]. Ovakvi uslovi se postižu i kod fototermalne terapije pomoću GNP [560]. Nakon svakog tretmana DC ili HEp-2 ćelija su pripremljeni citospinovi ($1 \times 10^4/\text{uzorku}$) koji su korišćeni za imunocitohemijsku analizu na

osnovu bojenja sa May-Grunwald-Giemsom (MGG), specifičnim bojama, ili konjugovanim antitelima.

3.4.7 Citotoksičnost dap-MWCNT uzoraka u kulturi sa PMØ

PMØ (2.5×10^5 ćelija po bazenu ploče sa 96 mesta i ravnim dnom) su postavljene da adheriraju za podlogu, nakon čega je dodat dap-MWCNT u 2 koncentracije (50 i 10 µg/ml). U cilju određivanja direktnog efekta dapsona korišćene su 2 koncentracije solubilnog dapsona (7.5, i 1.5 µg/ml), što odgovara koncentraciji dapsona vezanog za dap-MWCNT u odgovarajućim koncentracijama. Odgovarajuće koncentracije o-MWCNT (42.5, i 8.5 µg/ml) su korišćene kao kontrola. Takođe su korišćene i smeše u kojima su o-MWCNT pomešane sa odgovarajućim koncentracijama dapsona. Nakon 24 sata kultivacije, ćelije su odvojene od plastike grubim pipetiranjem i ispiranjem sa 0.02% NaEDTA u RPMI. Sakupljene ćelije su korišćene u analizi njihove vijabilnosti i određivanja procenta apoptotskih ćelija.

3.4.8 Citotoksičnost dap-MWCNT u kulturi humanih DC

iDC (5×10^5 bazenu ploče sa 6 mesta) su postavljene da adheriraju za podlogu, nakon čega je dodat dap-MWCNT u 3 koncentracije (75, 50 i 10 µg/ml). U cilju određivanja direktnog efekta solubilnog dapsona korišćeno je 3 koncentracije (12.5, 8.5 i 1.5 µg/ml), što odgovara koncentraciji dapsona vezanog za dap-MWCNT u odgovarajućim koncentracijama. Odgovarajuće koncentracije o-MWCNT (63, 42.5, i 8.5 µg/ml) su korišćene kao kontrola za efekat dap-MWCNT. Takođe su korišćene i smeše u kojima su o-MWCNT pomešane sa odgovarajućim koncentracijama dapsona. Nakon 24 sata kultivacije, ćelije su odvojene od plastike grubim pipetiranjem i ispiranjem sa 0.02% NaEDTA u RPMI. Sakupljene ćelije su korišćene u analizi njihove vijabilnosti i % apoptotskih ćelija.

3.4.9. Maturacija DC u prisustvu uzoraka dap-MWCNT

Nakon diferencijacije DC iz monocita dobijenih adherencom, ćelije su postavljene u bazene ploča sa 6 mesta (5×10^5 ćelija/bazenu) i nakon toga su kultivisane same u

medijumu ili u prisustvu dap-MWCNT, i odgovarajućih kontrola: o-MWCNT, solubilnog dapsona ili kombinacije o-MWCNT sa solubilnim dapsonom. U eksperimentima sa dap-MWCNT, DC su bile tretirane proinflamacijskim citokinima (IL-1 β - 10 ng/ml; PGE2- 1 μ g/ml; IL-6- 10ng/ml; i TNF- α - 10ng/ml; RnD Systems). Nakon 48 sati kultivacije, DC su sakupljene, isprane i korišćene u fenotipskoj i/ili funkcionalnoj analizi. Supernatanti bez ćelija su sakupljeni i smrznuti na -40°C radi kasnije analize nivoa citokina.

3.5. ANALIZA CITOTOKSIČNOSTI

3.5.1. Testovi vijabilnosti

Vijabilnost ćelija je određena bojenjem u 1% rastvoru Tripan plavog. Nevijabilne ćelije, pretežno nekrotične, se boje Tripan plavim i analizirane su na svetlosnom mikroskopu. Vijabilnost je određena na osnovu broja obojenih ćelija u odnosu na ukupan broj ćelija, a izračunata je kao % vijabilnosti = 100% ukupnih ćelija - % mrtvih ćelija, pri čemu je brojano najmanje 500 ćelija po uzorku. Svi rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD triplikata.

Drugi način određivanja vijabilnosti je na osnovu % nekrotičnih ćelija određenih pomoću protočne citometrije. Naime, ćelije su nakon kultura isprane u PBS-u centrifugiranjem na 1000 rpm 8 min, a ćelijski pelet je resuspendovan u 300 ul PBS sa 0.1 % NaN₃ (PBS1). U ćelijsku suspenziju je zatim dodat propidijum jodid (PI, Sigma) u finalnoj koncentraciji 40 μ g/ml, nakon čega je uzorak analiziran na protočnom citometru (Coulter, XL-MCL, Krefeld, Nemačka). DNK ćelija čija je membrana permeabilna, pretežno nekrotičnih ćelija, se boji PI, što se detektuje kao jak signal u FL2 kanalu citometra pri ekscitaciji laserom od 488nm. Procenat nekrotičnih ćelija je određen na osnovu jasno uočljivog diploidnog pika u FL2 kanalu, u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija.

3.5.2. Testovi apoptoze

Procenat apoptotskih ćelija je određen na osnovu kvantifikacije ćelija u krajnjem stadijumu apoptoze koji se karakteriše fragmentacijom DNK i oslobađanjem apoptotskih tela. Ovakve ćelije imaju manju količinu DNK. Nakon kultura sa biomaterijalima i nanomaterijalima, ćelije su isprane u PBS-u centrifugiranjem i ćelijski pelet je resuspendovan u hipotonom rastvoru (0.1% Na-citrat, 0.1% Triton X u destilovanoj vodi) koji omogućava permeabilizaciju svih ćelija. U 300 µl ćelijske suspenzije je dodat PI (40 µg/ml) i uzorci su inkubirani 6 sati na sobnoj temperaturi ili preko noći u frižideru. Nakon inkubacije, ćelije su analizirane na protočnom citometru, a ćelije sa hipodiploidnim nukleusom (sub-G₀ pik) su identifikovane kao apoptotske ćelije.

Drugi metod za detekciju apoptoze ćelija u najranijem stadijumu je određen pomoći Apoptosis Detection Kit (R&D Systems). Sveže ili kultivisane ćelije su isprane u hladnom PBS-u i nakon toga resuspendovane u 1x vezujućem puferu (10mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl₂), a zatim centrifugirane 10 min na 1000 rpm. Nakon centrifugiranja, na 50µl ćelijske suspenzije je dodat propidijum jodid (40µg/ml) i Aneksin V FITC-a (10-100 µg/ml u skladu sa uputstvom proizvođača). Ćelije su zatim inkubirane u mraku na sobnoj temperaturi 15 min. Po isteku inkubacije, ćelijama je dodat vezujući pufer do ukupne zapremine od 300 µl, i uzorci su odmah analizirani na protočnom citometru. Kontrolne ćelije su bile obojene samo Annexin-V FITC-om ili samo PI u cilju određivanja prelivanja signala u susedne FL kanale. Nakon podešavanja protokola, određen je procenat vijabilnih ćelija (Annexin V FITC⁻/PI⁻), rano apoptotskih (Annexin V FITC⁺/PI⁻), kasno apoptotskih/sekundarno nekrotičnih (Annexin V FITC^{*}/PI^{*}) i primarno nekrotičnih ćelija (Annexin V FITC⁻/PI^{*}).

3.5.3 Merenje metaboličke aktivnosti ćelija

Metabolička aktivnost ćelija je procenjena na osnovu aktivnosti sukcinat dehidrogenaze. Naime, nakon kultura sa uzorcima biomaterijala i nanomaterijala, medijum za ćelijske kulture je uklonjen, a bazeni su napunjeni sa 100 µl 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijum bromid (MTT, Sigma, 0.5 mg/ml) u kompletnom RPMI medijumu bez

fenol crvenog. Kao kontrole testa su korišćeni bazeni sa test materijalima bez ćelija. U toku inkubacije od 3-4 sata, sukcinat dehidrogenaza konvertuje MTT u nerastvorni formazan koji precipitira u toku sinteze. U cilju kvantifikacije formazanskog precipitata u bazene je dodat 10% natrijum dodecil sulfat (SDS) sa 0.1N HCl (Serva, Heidelber, Nemačka) u vodi, koji rastvara formazan i ćelijske membrane. Uzorci su inkubirani preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon toga, je određena optička gustina (OD) rastvora na spektrofotometru (Behring ELISA Processor II, Heidelberg, Nemačka) na 570nm (referentna 650nm) talasne dužine. Svi uzorci su rađeni u šestoplikatima, a rezultati su izraženi kao relativna metabolička aktivnost u odnosu na odgovarajuće kontrolne ćelije. Procenat metaboličke aktivnosti u direktnim esejima je računat kao:

$$\text{metabolička aktivnost (\%)} = \left(\frac{OD \text{ ćelija sa materijalom} - OD \text{ materijala}}{OD \text{ kontrolnih ćelija} - OD \text{ medijuma}} \right) \times 100$$

dok je metabolička aktivnost u indirektnim esejima izračunata kao

$$\text{metabolička aktivnost (\%)} = \left(\frac{OD \text{ ćelija sa kondicioniranim medijumom}}{OD \text{ ćelija u kontrolnom medijumu}} \right) \times 100$$

3.5.4 Merenje oksidativnog stresa

U cilju detekcije intracelularnih ROS, ćelije su kultivisane sa biomaterijalima i nanomaterijalima kao što je opisano, tokom 30min. Nakon inkubacije, ćelije su sakupljene u Ependrof epruvete i inkubirane sa dihidrorodaminom 123 (DHR, 20 μ M, Sigma) tokom 15 minuta [561]. Ćelije su zatim analizirane na protočnom citometru u FL1 kanalu. Porast intenziteta fluorescence (MFI) DHR je bio indikator povećanih intracelularnih ROS. U nekim eksperimentima je kao pozitivna kontrola korišćena 0.5 mM H₂O₂, dok su ćelije bez test materijala korišćene kao negativna kontrola.

3.6. FENOTIPSKE ANALIZE

3.6.1. Fenotipska analiza protočnom citometrijom

DC kultivisane sa SMA legurama i nanomaterijalima 48 sati su sakupljene i isprane u PBS sa dodatkom 2% FCS i 0.1% NaN₃ (PBS2). Nakon toga su ćelije u inkubirane sa primarnim antitelima (**Tabela 3.6.1.1**), u razblaženjima koja su preporučena od strane proizvođača, tokom 0.5-1 sat na +4°C. Ako je primarno antitelo bilo obeleženo biotinom, dodavan streptavidin-fluorohrom i ćelije su inkubirane 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, uzorci su isprani u PBS1 i odmah analizirani na protočnom citometru, ili su bili fiksirani u formaldehidu/ PBS1 i analizirani u roku od 5 dana. Na osnovu rasipanja svetlosti u napred (engl. *forward scatter*, FS) i u stranu (engl. *side scatter*, SC) specifične ćelije su uokvirene i analizirane u FL1, FL2 i FL3 kanalima. U nekim eksperimentima specifične ćelije su bile obeležene sa anti-CD45 antitelom, pa je ekspresija ostalih markera analizirana samo u okviru CD45⁺ ćelija. Pre svake analize izvršena je kompenzacija signala za svaki par antitela, a specifična fluorescencija u FL1 kanalu je određena na osnovu ćelija obojenih pojedinačnim markerima u fluorohromu za FL2 kanal i izotipskim antitelom obeleženim fluorohromom za FL1 kanal. Na sličan način je određena specifična fluorescencija u FL2 kanalu.

3.6.2 Citohemijska i imunocitohemijska analiza

Ćelije su nakon inkubacije sa test materijalima sakupljene, isprane u PBS i pripremljene za pravljenje citospin preparata. 1x10⁴ ćelija po uzorku je resuspendovano u 100 µl PBS sa 2% FCS. Ovakva ćelijska suspenzija je nalivena u levak citospin centrifuge (Thermo scientific Shandon) koji je preko filter papira pričvršćen za mikroskopsku pločicu, premazanu poli L lizinom (100 µg/ml). U toku centrifugiranja na 500 rpm 5 minuta ćelije su se rasporedile po mikroskopskoj pločici a višak tečnosti je sakupljen na filter papir.

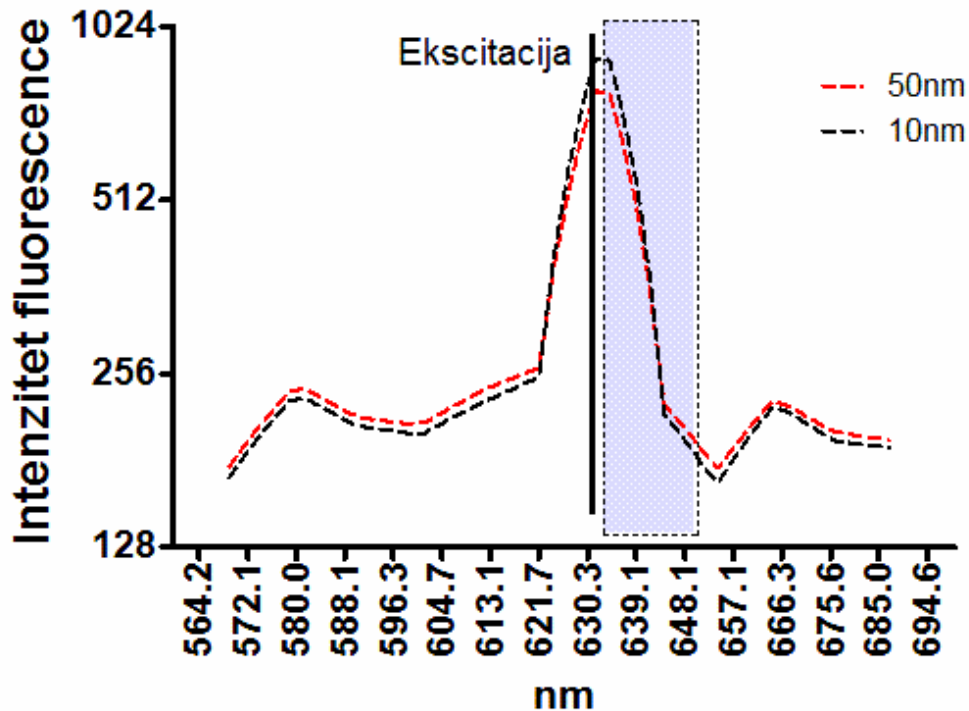
Tabela 3.6.1.1 Primarna antitela korišćena u fenotipskoj analizi DC

Antitelo/reagens (specifičnost)	Klon/ kat. broj	Poreklo	Konjugat	Proizvođač	Test materijal
CD14	TUK4	Miš	FITC	Serotec	Svi
CD1a	NA/34HLK	Miš	PE	Serotec	Svi
HLA-DR	LN3	Miš	Biotin	Serotec	Svi
CD86	BU63	Miš	FITC ili PE	Serotec	Svi
CD83	HB15e	Miš	Alexa 488	Biolegend	Svi
CD40	5C3	Miš	FITC	Imunotools	NiTi SMA
CD45	HI30	Miš	PeCy5	eBioscience	GNP
IgG1a izotip	MCA928	Pacov	Biotin	Serotec	Svi
IgG1a izotip	MCA928PE	Pacov	PE	Serotec	Svi
IgG1a izotip	MCA 928F	Pacov	FITC	Serotec	Svi
IgG1a izotip	P36281	Pacov	PeCy5	eBioscience	Svi
Biotin	STAR2A	Streptavidin-Alexa 488		Serotec	Svi
Biotin	STAR2P	Streptavidin-PE		Serotec	Svi

Deo uzoraka je obojen May-Grunwald-Giemsa metodom koja se zasniva na selektivnom vezivanju nespecifičnih boja za hromatin i nehromatinske strukture. Na osušene citospin preparate je naneta koncentrovana May-Grunwald boja koja je inkubirana sa uzorcima 5 minuta. Nakon ispiranja vodom, naneta je Giemsa boja razblažena u vodi 10 puta i uzorci su inkubirani narednih 20 minuta. Nakon ispiranja u vodi i sušenja preko noći, uzorci su prelivevi Kanada balsamom i analizirani pod uspravnim svetlosnim mikroskopom (Nikon eclipse 5i) sa opremljenom kamerom (Nikon DXM1200C Camera).

Za konfokalnu mikroskopiju, citospin preparati su isprani u PBS, obrisani pažljivo papirnim maramicama radi uklanjanja viška tečnosti i zatim fiksirani 4% pararozanilinom 5-10min pre bojenja sa primarnim specifičnim antitelima (**Tabela 3.6.1.1**). Primarna antitela su inkubirana sa uzorcima 1 sat u vlažnoj komori. Nakon ispiranja u PBS, u nekim eksperimentima su obojena jedra ćelija pomoću PI ili DAPI (4 µg/ml) 15 minuta. Nakon poslednjeg ispiranja, uzorci su prelivevi rastvorom 2% glicerola u PBS, prekriveni pokrovnim stakalcima, i zalepljeni providnim lakom. Uzorci su analizirani na konfokalnom mikroskopu (Zeiss LSM 510/Axiovert 200 M, Jena, Nemačka ili Leica TCS SP5) koristeći lasere (od 488nm-650nm) različitih intenziteta, i imerzione objektivne (Leica HCX APO L 20x ili Zeiss APO L 63x), a signali su detektovani na detektorima za odgovarajuće fluorohrome.

Nanočestice zlata su detektovane zahvaljujući površinskoj plazmon rezonanci i apsorpciji svetla u nIR spektru. Nakon inicijalnog određivanja spektra apsorpcije GNP, ekscitacija pomoću 633nm lasera je najbolje detektovana u pomoću 660/30nm detektora (HyD Leica HyD, Leica microsystems GmbH, Wetzlar, Nemačka, ili Zeiss 510, GaAsP detectors) (**Grafikon 3.6.1.1**). Sličan sistem je podešen i za detekciju MWCNT, s tim da je rasipanje bilo znatno slabije.



Grafikon 3.6.1.1. Detekcija površinske plazmon rezonance GNP₁₀ i GNP₅₀ pomoću konfokalnog mikroskopa.

Crna linija predstavlja talasnu dužinu lasera a siva traka opseg detekcije GNP. Spektar je određen na osnovu suspenzije GNP bez prisustva ćelija.

3.6.3. Morfološka analiza pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije

DC kultivisane na NiTi RS trakama ili plastičnim pokrovnim ljustama, sa ili bez LPS (100 ng/ml), kako je opisano ranije, pripremljene za analizu SEM-om. Uzorci su isprani u PBS i fiksirani su preko noći na +4°C u 2% glutaraldehidu rastvorenom u Miloning puferu. Uzorci su zatim isprani 3 puta u Miloning puferu, pri čemu je svako ispiranje trajalo 10 minuta. Sekundarna fiksacija je urađena pomoću 1% osmijum tetroksida rastvorenim u destilovanoj vodi tokom 1 sat. Sve hemikalije su kupljene od Sigma. Nakon toga su uzorci isprani u vodi 3 puta i dehidratirani u rastućoj koncentraciji etanola (30-100%), pri čemu je uzorak u svakoj od koncentracija etanola inkubiran 5 minuta. Nakon toga su uzorci osušeni pomoću sušača na temperaturi tečnog CO₂ i montirani na ugljeničnu adhezivnu traku na

aluminijumskom nosaču. U cilju povećavanja konduktivnosti, uzorci su napršeni zlatom (JFS-1100E) pri 10mA tokom 5 minuta i analizirani na SEM JSM5300 (Jeol, Tokijo, Japan) koristeći primarni elektronski zrak na 10-30 kV.

3.7. ANALIZA INTERNALIZACIJE NANOMATERIJALA

3.7.1. Analiza internalizacije GNP od strane DC

Internalizacija GNP od strane DC je proučavana konfokalnom mikroskopijom živih ćelija, TEM, SEM, FIB/SEM, i protonskom mikroskopijom koja je omogućila kvantifikaciju intracelularnih GNP.

3.7.1.1 Analiza internalizacije konfokalnom mikroskopijom

iDC (1×10^5 /ml) su postavljene na plastične pokrovne ljuste prekrivene PLL-om da adheriraju 20 minuta, nakon čega su premeštene na $+4^\circ\text{C}$ tokom 10 min, i nakon toga tretirane sa GNP₁₀ ili GNP₅₀ (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). U nekim eksperimentima je dodavan Dinador, inhibitor dinamina I, (80 μM , Sigma). Obzirom da se Dinador rastvara u DMSO, kontrolni uzorci su tretirani ekvivalentnom koncentracijom DMSO (0.05%). Ćelije su inkubirane 30 minuta sa Dinadorom ili DMSO pre dodavanja GNP. Nakon toga je dodata boja za membrane FM 4-64 (10 μM) koja se rastvara u membranama živih ćelija, i uzorci su premešteni u komore za oslikavanje na Leica TCS SP5 sistemu. Uzorci su kontinuirano praćeni u XYZT modu tokom 4 sata.

3.7.1.2. Analiza internalizacije transmisionom elektronskom mikroskopijom

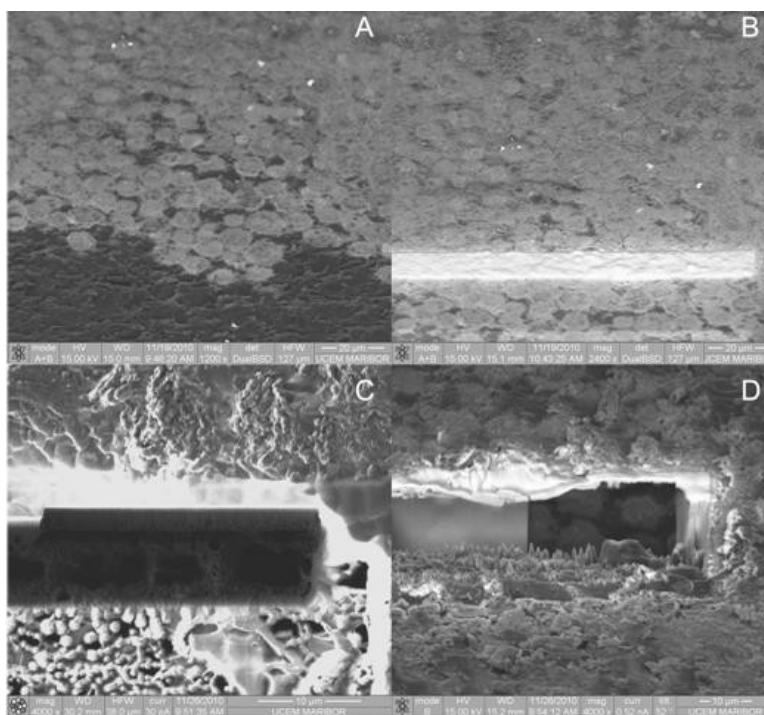
iDC i GNP su inkubirani 4 sata kako je opisano ranije. Nakon toga su DC sakupljene snažnim pipetiranjem, isprane od medijuma u fosfatnom puferu i fiksirane gluteraldehidom. Rastvor 2% gluteraldehida u Miloning puferu je pažljivo promešan sa koncentrovanom ćelijskom suspenzijom i ćelije su sedimentirane centrifugiranjem na 800 rpm 10 min u Ependorf epruveti na komad mišije jetre koja je služila kao nosač. Jetra je izolovana iz miša BALB/C soja starog 10 nedelja pod sterilnim uslovima i iseckana skalpelom na male komade koji su stavljeni na dno Ependorf epruvete. Višak krvi iz jetre je ispran fiziološkim

rastvorom. Ovako pripremljeni uzorci su inkubirani sa navedenim rastvorom glutaraldehida 24 sata na +4°C, isprani Miloning puferom 2 puta i sačuvani na +4°C do sekundarne fiksacije osmijum tetroksidom. Čelije su prvo isprane 2 puta u fosfatnom puferu, a zatim fiksirane 1% osmijum tetroksidom. Nakon ovoga su čelije isprane destilovanom vodom, a svako ispiranje je trajalo 10 minuta. Zatim je usledilo bojenje 3% rastvorom uranil acetata u trajanju od 3.5 sati. Uzorci su isprani, a zatim dehidrirani u seriji vodenih rastvora etanola sve veće koncentracije (30%, 50%, 75%, 96%, 100%, 100% etanol) po 10 minuta, i na kraju u 100% acetonu. Nakon dehidratacije, uzorci su ukalupljeni u Epon medijum (Sigma) prateći uputstva proizvođača. Od preparata su napravljene ultratanki preseki pomoću ultramikrotoma koji su sakupljeni na bakarne mrežice obložene ugljenikom. Uzorci su nakon sušenja analizirani na TEM-, (JEM100 CX- JEOL, Tokijo, Japan) pri voltazama od 100 kV.

3.7.1.3 Analiza internalizacije skenirajućom elektronskom mikroskopijom sa fokusiranim jonskim zrakom

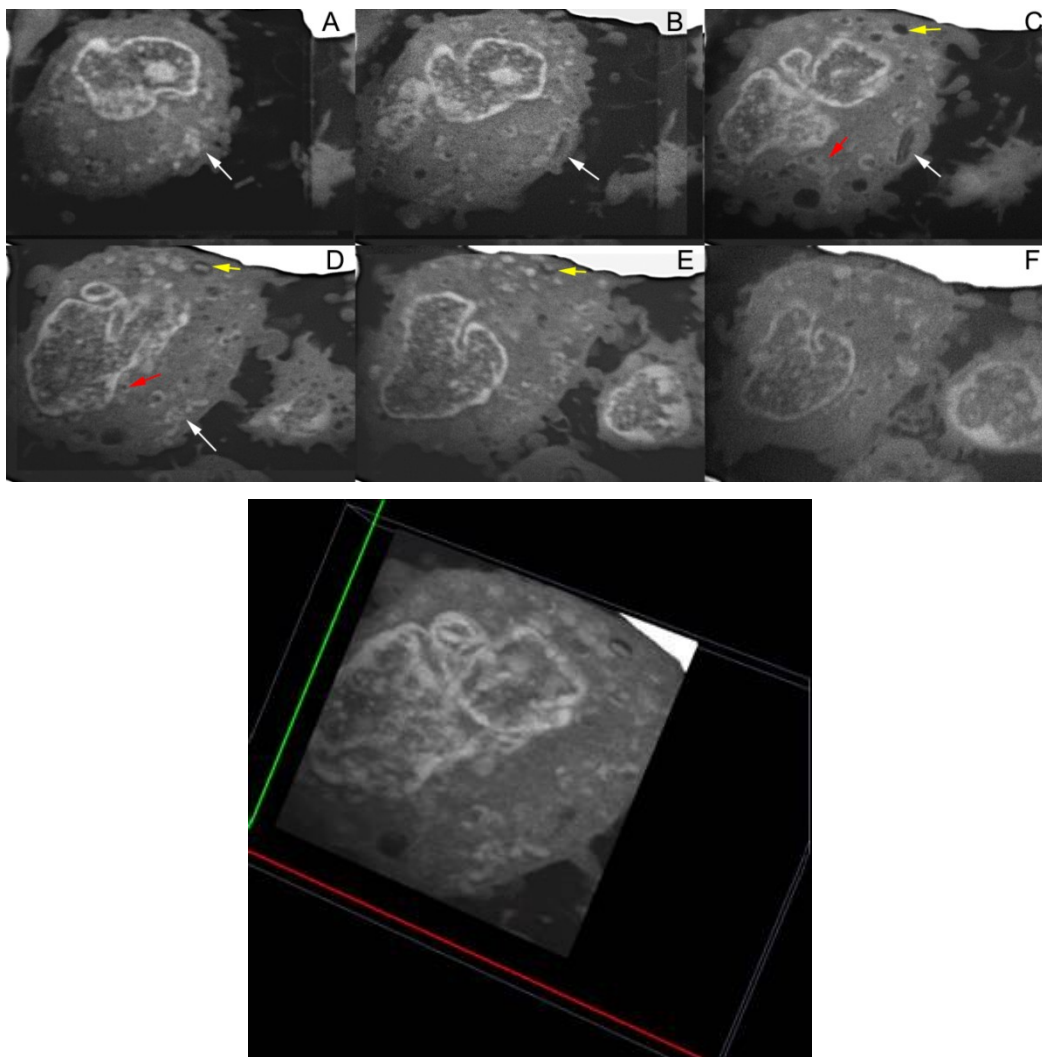
Za pripremu uzorka za FIB/SEM, DC su kultivisane sa GNP, kako je prethodno opisano za TEM proceduru. Čelije su obojene po OTO (osmijum tetroksid-tetrakarbohidrazid-osmijum tetroksid) protokolu. Nakon fiksacije u glutaraldehydu, čelije su isprane jednom u fosfatnom puferu i fiksirane 1% osmijum tetroksidom 1 sat. Nakon ispiranja u destilovanoj vodi, usledila je inkubacija sa zasićenim vodenim rastvorom tetrakarbohidrazida 30 minuta. Nakon ispiranja, uzorci su inkubirani 1 sat sa 1% osmijum tetroksidom i zatim isprani. Usledila je dehidratacija u seriji vodenih rastvora etanola sve veće koncentracije (30%, 50%, 75%, 96%, 100%, 100% etanol) po 10 minuta. Uzorci su osušeni heksametildistilazanom (HMDS, Sigma) tako što su sukcesivno tretirani rastvorima HMDS u etanolu (50%, 75%, 100% i 100%), gde je svaka inkubacija trajala 10 minuta. Uzorci su zatim brzo premešteni u desikator i ostavljeni su da se osuše pod vakumom. Pokrovne ljušpice sa čelijama su postavljene na nosač sa karbonskom trakom i napršene zlatom radi povećanja provodljivosti. Svi uzorci su analizirani na SEM (Quanta 200 3D) u koji je ugrađena FIB kolona. Nakon odabira mesta od interesa, uzorak je zakrenut za 52°, tako da FIB bude normalan na površinu uzorka. Na uzorke je potom nanet zaštitni sloj

platine debljine 0.5-1 μ m, pri struji FIB-a od 1nA i voltaži 30KeV. Nakon toga je napravljen grubi rez FIB-om podešenim na 5-7 nA, a zatim je usledilo poliranje bočnog zida uzorka FIB-om na manjim strujama (0.3 nA) (Slika 3.7.3.1). Nakon svakog ciklusa sečenja i čišćenja uzorci su analizirani SEM-om koristeći detektore za sekundarne elektrone (SE) ili unazad odbijene elektrone (BSE). Najmanje 10 poprečnih preseka razmaknutih 0.5-1 μ m, je napravljeno po ćeliji, a analizirano je najmanje 10 ćelija po uzorku, na osnovu čega su rekonstruisan 3D izgled ćelija (Slika 3.7.3.2).



Slika 3.7.3.1. Procedura obrade uzorka sa FIB.

Elektronskom kolonom je analiziran izgled A) uzorka zakrenutog za 52⁰ od elektronske kolone. B) Izgled sloja platine nanese gasnom depozicijom na uzorak pre obrade FIB-om. C) Široki prorez napravljen FIB-om i vizuelizovan FIB kolonom na malim strujama (30pA). D) Izgled bočnog zida širokog proreza analiziran elektronskom kolonom, pri čemu se uočava strana koja nije očišćena (levo) i ona koja je očišćena FIB-om (desno).



Slika 3.7.3.2. Serijski preseki kontrolnih DC dobijenih FIB/SEM metodom (A-F). Strelicama su obeležene ćelijske organele koje se pojavljuju u više serijskih preseka. Bela strelica pokazuje Goldžijev aparat, žuta intracelularne vezikule sa internalizovanim sadržajem, dok crvena pokazuje na endoplazmatski retikulum. Iz serijskih slika je rekonstruisan 3D izgled ćelija (slika dole).

3.7.1.4. Analiza internalizacije GNP protonskom mikroskopijom

3.7.1.4.1. Priprema uzoraka

U cilju kvantifikacije GNP internalizovanih od strane DC nakon 4 sata kulture, primenjena je spektroskopija emisije X-zraka indukovana protonima (engl. *proton-induced X-ray emission spectroscopy*, micro-PIXE). U tom smislu su DC kultivisane sa GNP₁₀ ili

GNP₅₀ (10 µg/ml) 4 sata na sterilisanim Mylar folijama obloženim prethodno 2% rastvorom goveđeg želatina (Sigma). Nakon ćelijskih kultura, uzorci su isprani u PBS-u, a zatim u vodi 2s u cilju uklanjanja ostataka fosfata, nakon čega su brzo uronjeni u tečni azot 20s. Uzorci na aluminijumskim nosačima su nakon toga premešteni u epruvete sa silika gelom i sušene na -40°C 2 nedelje, nakon čega su analizirane na micro-PIXE. U analizi su korišćeni protonski zraci 2.5-3 MeV, dijametra 1.2-2 µm na različitim površinama uzorka. Dva PIXE spektra su dobijena pomoću para detektora X-zraka i čopera, a elementalna masa po ćeliji je izračunata na osnovu aproksimacije za tanke uzorke.

3.7.1.4.2. Aproksimacija elementalne analize za tanke uzorke

Protoni koji se emituju sa uzorka ozračenog protonskim snopom se karakterišu protonskim prinosom dY_i , gde i predstavlja element od interesa, a dz debljinu uzorka. Protonski prinos zavisi od atomske gustine uzorka i koji se analizira (n_{at}^i) i može se izračunati na osnovu:

$$dY_i = \frac{\Delta\Omega}{4\pi} N_p n_{at}^i \varepsilon_i \eta_i \sigma_i^x(z) e^{-\mu\varepsilon(z)} dz,$$

gde $\Delta\Omega$ predstavlja ugao detektora, ε_i - efikansost detektora, η_i -transmitancu apsorbera ispred detektora, a N_p -broj protona koji pogodi uzorak tokom merenja. Produkcija karakterističnih X-zraka detektovana u odabranoj spektralnoj liniji X zraka se definiše odgovarajućom produkcijom X zraka na poprečnom preseku $\sigma_i^x(z)$, a $e^{-\mu\varepsilon(z)}$ predstavlja verovatnoću da X-zrak ne bude apsorbovan od strane samog materijala koji je na putu ka detektoru. μ predstavlja koeficijent usporavanja protona na izlaznom delu $\varepsilon(z)$ ka detektoru X zraka.

Obzirom da su uzorci DC kultivisani u jednom sloju i nakon sušenja na hladnom najverovatnije nisu bili debljine veće od 50 µm, pa se deo koji uračunava gubitak energije X zraka apsorpcijom od strane uzorka se može zanemariti:

$$dY_i = \frac{\Delta\Omega}{4\pi} N_p n_{at}^i \varepsilon_i \eta_i \sigma_i^x(z) (E_0) t,$$

gde je t debljina uzorka. Protonski prinos se stoga može izračunati smenom n_{at}^i gustinom područja $\frac{N_{at}^i}{S}$, pa je protonski prinos:

$$dY_i = \frac{\Delta\Omega}{4\pi} N_p \frac{N_{at}^i}{S} \varepsilon_i \eta_i \sigma_i^x(z),$$

Obeležavanjem ćelija od interesa na elementalnim mapama, i određivanjem doze protona koji su pali na uzorak, moguće je aproksimirati elementalni inventar na homogenu tanku ravan, i u okviru nje odrediti koncentracije elementa od interesa na osnovu atomske gustine na području $\frac{N_{at}^i}{S}$, površine odabranog regiona S_{roi} (ćelije), molarne mase elementa i , i Avogadrovog broja (A):

$$m_i = \left(\frac{N_{at}^i}{S} \right) \frac{M^i}{A} S_{roi}$$

Na osnovu podataka o masi Au u odabranom regionu S_{roi} , izračunat je broj nanočestica zlata u ovom području, uzimajući u obzir dijametar GNP (10 ili 50nm) i gustinu zlata ($\rho=19.3 \text{ g/cm}^3$) na osnovu formule

$$N_{gnp} = \frac{M}{m_{gnp}} = \frac{M [g]}{\frac{4}{3\pi r^3 [\frac{g}{cm^3}]} * \rho_{Au} [\frac{g}{cm^3}]}$$

gde je m_{gnp} - masa jedne nanočestice zlata a M - masa izmerena mikro-PIXE metodom u S_{roi} .

3.7.2 Analiza internalizacije dap-MWCNT od strane PMØ

Fagocitoza MWCNT od strane PMØ je analizirana konfokalnom, svetlosnom mikroskopijom i protočnom citometrijom. Štokovi o-MWCNT i dap-MWCNT (1mg/ml u RPMI) su sonifikovani 15 minuta, i centrifugirani 5 minuta na 500 rpm u cilju uklanjanja velikih agregata. Liofilizovan dapson je rastvoren u DMSO (štok 20mg/ml), a neposredno

pre korišćenja, u RPMI medijumu do koncentracije 1mg/ml, tako da finalna koncentracija DMSO u kulturi nije iznosila više od 0.075%.

3.7.2.1. Analiza internalizacije protočnom citometrijom

PMØ (2.5×10^5 ćelija/ml) su kultivisani 24 sata u prisustvu dap-MWCNT ili dap-MWCNT:FITC u koncentraciji 25 µg/ml. Pored toga, ćelije su kultivisane u Ependorf epruvetama na 4 °C u istim koncentracijama. Nakon toga je u svaki uzorak dodato 100 µl NaEDTA i inkubacija je nastavljena još 15 minuta. Ćelije su premeštene u plastične epruvete, pošpricane i analizirane na protočnom citometru. PMØ su identifikovane pomoću FS i SS parametara, a preuzimanje od strane ćelija je detektovano kao porast SS parametra ili fluorescence u FL1 kanalu.

3.7.2.2. Analiza internalizacije svetlosnom mikroskopijom

U ovom eseju su PMØ (1×10^6 po bazenu ploče od 24 mesta u 1ml kompletnog medijuma) adherirali za plastične pokrovne ljustice. Nakon toga su dodate o-MWCNT i dap-MWCNT:FITC (25 µg/ml), i ćelije su inkubirane narednih 24 sata. Nakon toga su uzorci isprani PBS-om, osušeni pod vakumom i obojeni Turkom.

3.7.2.3. Analiza internalizacije konfokalnom mikroskopijom

PMØ su kultivisane na plastičnim pokrovnim ljusticama (2.5×10^5 ćelija po ljustici u zapremini od 100 µl po ljustici) tokom 24 sata u prisustvu da-MWCNT:FITC (25 µg/ml). Nakon toga su uzorci isprani PBS-om i obojeni anti pacovskim CD11b antitelom konjugovanim sa PE (Serotec), ili OX3 antitelom:Alexa 546, tokom 45 minuta na 4 °C. Ćelije su fiksirane 1% paraformaldehidom i analizirane na konfokalnom mikroskopu (Zeiss).

3.7.2.4. Analiza internalizacije transmisionom elektronskom mikroskopijom

PMØ (4×10^6) su kultivisani u ploči sa 6 mesta sa ili bez dap-MWCNT, i ćelije su sakupljene u PBS, isprane i centrifugirane na 3000 rpm 10 minuta. Nakon toga su fiksirane 2.5% glutaraldehidom u Miloning puferu 10 minuta na sobnoj temperaturi. Ćelije su

fiksirane 1% osmijum tetroksidom na 4°C 3 sata, dehidratisane u etanolu i ukalupljeni u smolu. Uzorci su isečeni pomoću ultramikrotoma, sakupljeni na bakarne mrežice i obojene uranil acetatom i olovo citratom, nakon čega su analizirani na TEM-u (JEM100 CX-JEOL) na 100 kV.

3.7.3. Analiza internalizacije MWCNT od strane DC

3.7.3.1. Analiza svetlosnom mikroskopijom i protočnom citometrijom

Internalizacija MWCNT uzoraka od strane DC je analizana nakon kultura. Čelije su isprane PBS-om i pripremljeni su citospinovi (1×10^4 ćelija/citospinu) koji su obojeni MGG metodom. Osim toga, suspenzije ćelija su analizirane na protočnom citometru pri čemu je praćen SS parametar.

3.7.3.2. Kolokalizaciona analiza 7-TOG-MWCNT i TLR7

Nakon pripreme citospinova, uzorci DC kultivisani sa ili bez MWCNT, su pripremljeni za konfokalnu mikroskopiju. U tu svrhu su 7-TOG-MWCNT:FITC (25 µg/ml) kultivisane sa DC 24 sata. Nakon toga su citospinovi obojeni pomoću anti-HLA-DR-Alexa 548 antitela (Serotec) ili pomoću kozijeg anti-humanog TLR7 antitela (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Nemačka). Anti-TLR7 antitelo je vizuelizovano pomoću sekundarnog donkey-anti-goat IgG:biotin Alexa: 546 antitelom (Serotec), po uputstvu proizvođača. Nukleusi su obojeni sa DAPI (Sigma). U cilju detekcije lizozoma, neke kulture DC su tranfektovane sa CellLight Lysosomes-red fluorescence protein (RFP), BacMam 2.0 reagensom (Invitrogen) tokom poslednjih 16 sati kulture, u skladu sa uputstvom proizvođača. Nakon toga su ćelije fiksirane 4% formaldehidom i pripremljeni su citospinovi. Uzorci su analizirani konfokalnom mikroskopijom, a kasnije je izvršena korekcija jačine signala i kontrasta. Kolokalizaciona analiza između 7-TOG-MWCNT i TLR7, i između 7-TOG-MWCNT i lizozoma je urađena u ImageJ programu pomoću analize korelacije intenziteta (engl. Intensity correlation analysis) u skladu sa Li i sar. [562].

3.7.3.3. Analiza internalizacije MWCNT transmisionom elektronskom mikroskopijom

MWCNT i DC (1×10^6 po bazenu ploče sa 6 mesta) su kultivisane kako je opisano i premeštene u Ependorf epruvete. Uzorci su centrifugirani, a supernatant odbačen, nakon čega je usledila primarna fiksacija u glutaraldehidu i sekundarna u osmijum tetroksidu, kako je ranije objašnjeno.

3.8. ANALIZE FUNKCIONALNIH OSOBINA ĆELIJA

3.8.1. Alogene mešane leukocitne reakcije

U cilju određivanja alostimulatorne sposobnosti DC kultivisanih sa NiTi SMA, GNP, ćelije su sakupljene i isprane od navedenih biomaterijala centrifugiranjem na 800 rpm 8 min. Responderi u MLR su bili $CD3^+$ T limfociti (u eksperimentima sa GNP) ili $CD4^+$ T limfociti izolovani negativnim imunomagnetnim sortiranjem, kako već opisano. Prečišćeni T limfociti (1×10^5 ćelija po bazenu ploče od 96 mesta sa U dnom) su kokultivisani sa različitim brojem DC (1×10^4 , 0.5×10^4 , 0.25×10^4 , ili 0.125×10^4), to jest u različitim brojnim odnosima DC/T limfocita 1:10-1:80. Ćelije su kokultivisane 5 dana, a tokom poslednjih 18 sati je dodat 3H - timidin ($1\mu Ci$ /bazenu, Amersham, Buckinghamshire, UK). Obeležene ćelije su sakupljene pomoću skidača ćelijskih kultura na staklene fibrozne filtere i radioaktivnost je izmerena pomoću Beckman-ovog scintilatnog brojača (LKB-1219 Rackbeta, Finska). Rezultati su izraženi kao broj otkucaja u minutu (cpm) \pm SD triplikata.

Istovetne DC/T ćelijske kulture su postavljene u cilju određivanja produkcije citokina u kokulturi i određivanja Th polarizacione sposobnost DC. Nakon 5 dana, u kokulture je dodat forbol miristat acetat (PMA, 20ng/ml, Sigma) i jonomicin (500 ng/ml, Sigma) tokom poslednjih 8 sati kulture u cilju povećavanja oslobađanja citokina. Nakon toga su sakupljeni supernatanti kokultura i smrznuti su na -40 °C sve do analize. Kulture sa odgovarajućim brojem DC i T limfocita su kultivisane odvojeno i korišćene su kao kontrole.

3.8.2 Citotoksična aktivnost T limfocita

U cilju određivanja sposobnosti DC da indukuju tumor specifične T limfocite, CD3⁺T limfociti (1×10^5 ćelija po bazenu ploče sa 96 mesta) su kultivisani sa DC koje su prethodno bile tretirane nekrotičnim HEp-2 ćelijama, bilo da su HEp-2 sadržale GNP₁₀ i GNP₅₀ ili ne, tokom 3 dana. CD3⁺T ćelije su zatim sakupljene, sortirane pomoću magnetnog sortiranja na način kako je opisano, i indukovane da proliferišu pomoću IL-2 (2 ng/ml, R&D) još 2 dana. Ovakve CD3⁺T ćelije (2×10^4 , 4×10^4 ili 8×10^4) su zatim kultivisane sa živim HEp-2 ćelijama (1×10^4) tokom 24 sata u šestplaktima. Citotoksična aktivnost u kulturama je nakon toga izmerena MTT testom. CD3⁺T ćelije i HEp-2 ćelije kultivisane odvojeno u odgovarajućem broju, su korišćene kao kontrola.

3.8.3. Detekcija citokina i biomolekula

3.8.3.1. Određivanje citokina u kulturi PMØ i CuAlNi legura

Supernatant PMØ kultivisanih sa CuAlNi legurama ili ekstraktom legura tokom 24 sata, su analizirani u cilju detekcije citokina. Koncentracija IL-1 β , TNF- α i MCP-1 su određeni u supernatantima kultura makrofaga pomoću fluorescentnih mikrokuglica koje za sebe imaju konjugovana specifična antitela, u okviru kita (6-plex, Bendermed Systems, Beč, Austrija). Kuglice su prvo razdvojene na osnovu veličine (kuglice A 5.5 μ m, B: 4.4 μ m), a nakon toga po nivou konstantne fluorescence u FL2 kanalu. Intenzitet vezivanja citokina, koji zavisi od njegove koncentracije u rastvoru, je vizuelizovan u FL1 kanalu. Koncentracije citokina su izračunate na osnovu rastvora poznatih koncentracija inkubiranih sa fluorescentnim mikrokuglicama. IL-6 je određen komercijalnim ELISA kitom za pacovski IL-6, u skladu sa uputstvom proizvođača.

3.8.3.2. Određivanje polarizacionog kapaciteta DC u kulturi sa NiTi legurama

Supernatanti kultura nakon maturacije DC (DC supernatanti) su korišćeni za analizu citokina koji su ključni za polarizaciju imunskog odgovora. U eksperimentima sa NiTi RS SMA, u DC supernatantima su određivani IL-10, IL-12, IL-23 i IL-27 pomoću specifičnih sendvič ELISA kitova (R&D Systems), u skladu sa uputstvima proizvođača. U istim

eksperimentima, gde su DC kokultivisani sa T limfocitima sakupljeni su supernatanti nakon stimulacije kultura poslednjih 8 sati sa PMA i jonomicinom kao što je opisano (Th profili). U Th profilima su određeni nivoi IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α i TNF- β . Ovi citokini su određeni protočnom citometrijom pomoću fluorescentnih mikrokuglica (Flow Cytomix Human Th1/Th2 11-plex kit, Bendermed Systems). Nivo IL-17 i TGF- β u ovim kokulturama je određen standardnim ELISA testom (R&D), po uputstvu proizvođača.

3.8.3.3. Određivanje nivoa citokina u kulturi humanih PBMC i SMA legura

Na sličan način su analizirani citokini u kulturama PBMC tretiranih SMA legurama u prisustvu PHA. Supernatanti su inkubirani sa smešom fluorescentnih kuglica obloženih antitelima za detekciju specifičnih citokina (IL-1 β , IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α i TNF- β) (Flow Cytomix Human Th1/Th2 11-plex kit, Bendermed Systems).

3.8.3.4. Određivanje nivoa citokina u kulturi aktiviranih splenocita

Produkcija citokina od strane splenocita aktiviranih sa 2.5 μ g/ml ConA, u prisustvu ili odsustvu nanočestica zlata pripremljenih USP metodom je analizirana nakon 24 sata iz supernatanta kultura. Koncentracija IL-2, IFN- γ , IL-4 i IL-10 je određena standardnim komercijalnim ELISA kitom, računajući koncentracije na osnovu standardne krive.

3.8.3.5. Određivanje polarizacionog kapaciteta DC u kulturi sa GNP

U eksperimentima gde su DC kultivisane sa komercijalnim GNP₁₀ i GNP₅₀, određeni su citokini u DC supernatantima (IL-12p70, IL-10 i IL-23), kao i u kokulturama DC i CD3⁺T ćelija (IFN- γ , IL-4 i IL-17) standardnim ELISA testom.

3.8.3.6. Određivanje nivoa citokina u kulturi DC i dap-MWCNT

U eksperimentima gde su DC kultivisane sa dap-MWCNT (50 μ g/ml), određeni su citokini u DC supernatantima (IL-12, IL-10, IL-23 i IL-27) standardnim ELISA testovima (R&D Systems, Mineapolis, SAD), po uputstvu proizvođača.

3.8.3.7. Određivanje produkcije NO i IL-6 od strane PMØ kultivisanih sa dap-MWCNT

IL-6 je u kulturi PMØ i dap-MWCNT, o-MWCNT, dapson i njihovom kombinacijom, određen pomoću komercijalnog ELISA kita za pacovski IL-6, u skladu sa uputstvom proizvođača.

Koncentracija nitrita u supernatantima je određena Griess-ovom reakcijom. Na 50 µl supernatanta je dodan supstrat, tj. 50µl Griess-ovog reagensa (0.1% N-1-naftil-etilen-diamin dihidrohlorid i 1% P-aminobenzensulfonamida u 5% H₃P0₄) koji se sprema u odnosu 1:1, neposredno pre testa. Nakon 10 min je izmeren intenzitet razvijene boje, koji se srazmeran koncentraciji nitrita, pomoću spektrofotometra na talasnoj dužini od 570 nm (referentna 650 nm). Koncentracija NO je izračunata korišćenjem standardne krive dobijene na osnovu uzoraka poznatih koncentracija NaNO₂ (od 125 µM do 0.774 µM, u dvostruko opadajućim koncentracijama).

3.8.4 Merenje oksidativnog praska u kulturi PMØ i dap-MWCNT

PMØ (2.5 x 10⁵ ćelija po bazenu ploče sa 96 mesta) su kultivisani sa dap-MWCNT, o-MWCNT, dapsonom i njihovom kombinacijom u različitim koncentracijama tokom 24 sata, nakon čega su ćelije prebačene u bazene crnih ploča sa 96 mesta u koje je dodato 140ul KRB. Nakon toga je dodato 20ul 250uM luminola i ploča je postavljena u SinergyHT i temperirana do 37 °C. Intenzitet luminescence u bazenima sa uzorcima je meren 1-2min (na svakih 5-10s) (*E_{max}*: 440nm), a nakon toga je dodato 20 µl PMA u finalnoj koncentraciji od 500uM. Kinetika luminescence je zatim merena narednih 60 min. Analiza krive oksidativnog praska je urađena u Graph Pad Prism programu.

3.8.5 Merenje oscilacija kalcijuma u DC kultivisanim sa GNP

U eksperimentima sa komercijalnim GNP, iDC (1x10⁵/ml) su kultivisane na PLL (10 µg/ml)-pokrivenim pokrovnim ljusticama 15 min, nakon čega su isprane Krebs-Ringerovim rastvorom (KRB) (119m NaCl, 2.5 mM KCl 2,5 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1.3 mM, NaH₂PO₄ 1mM, HEPES 20mM, D-glukoza 11mM, pH 7.3 sa NaOH). Nakon

ispiranja, ćelije su obojene Fluo-3, indikatorom Ca^{2+} (4 μM , Invitrogen), tokom 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega su uzorci isprani i inkubirani na 37°C tokom 20 minuta radi deesterifikacije viška boje iz ćelija. U nekim eksperimentima je u toku bojenja sa Fluo-3 korišćen 2 μM thapsigargin, inhibitor Ca^{2+} ATP-aze sarkoplazmatskog retikuluma (SERCA), u 0.5 mM EGTA/PBS. Pokrovne ljupe su nakon toga premeštene u KRB u komoru za analizu i analizirane pomoću Leica TCS SP5 pomoću Leica HCX APO L imerzionog vodenog objektiva (20x uvećanje). Nakon inicijalnog snimanja oscilacija Ca^{2+} kod iDC, dodate su GNP (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ili LPS (100ng/ml). GNP su detektovane zahvaljujući površinskoj plazmon rezonanci, kako je opisano ranije. Optoakustični razdvojn timer laserskog zraka je omogućio snimanje uzoraka brzinom od 2 Hz po kanalu u rezoluciji 1024 x 1024 u XYT ili XYZT modu. Snimanje oscilacija kalcijuma je trajalo 5-10 minuta po uzorku, nakon čega su pojedinačne slike sačuvane za kasniju analizu. Ista analiza je urađena i sa DC kultivisanim u prisustvu LPS ili GNP (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) tokom 24 ili 48 sati. U kasnijoj analizi, fluorescentni signali u svakoj od analiziranih ćelija (20-50 po jednom snimanju od ukupno 3 snimanja po uzorku/tretmanu) su preračunati kao $\Delta F_t/F_0$, gde je ΔF_t razlika između fluorescentnog signala u datom trenutku t i u početnom trenutku t_0 , gde je intenzitet F_0 . Za F_0 uzeta je srednja vrednost fluorescence u toku prvih 5 sekundi snimanja. Pozadinski fluorescentni signal u je svakom trenutku određen sa mesta gde nema ćelija, i oduzet od F_t . Na osnovu dobijenih krivi oscilacija, izračunata je površina ispod krive i frekvencija oscilacija u Graph Pad Prism programu (La Jolla, CA, USA).

3.9. STATISTIČKA ANALIZA

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD ili SE iz najmanje 3 nezavisna eksperimenta, ukoliko nije napomenuto drugačije. Za upoređivanje efekta tretmana u odnosu na odgovarajuću kontrolu su korišćeni parametarski testovi (studentovi T-testovi, jednostruke ili dvostruke ANOVA sa Bonferoni post-testom) ukoliko raspodela izmerenih vrednosti nije značajno odstupala od Gausove raspodele na osnovu Kolmogorov-Smirnov testa sa Dallal-Wilkinson-Lillefor-ovom P vrednošću. Ukoliko je raspodela vrednosti značajno odstupala od Gausove raspodele na osnovu datih kriterijuma, ili je broj analiziranih vrednosti bio ≤ 5 , korišćeni su neparametarski testovi (Mann-Witney, Wilcoxon parni ili neparni testovi, Fridmen-ov test). Vrednosti $p < 0.05$, uzimajući obe strane raspodele vrednosti, su smatrane statistički značajnim. Sva statistička analiza je urađena u Graph Pad Prism (La Jolla, Kalifornija, SAD).

4. REZULTATI

4.1. BIOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULATORNE OSOBINE NAPREDNIH BIOMATERIJALA

Ranije je pokazano da biokompatibilnost naprednih SMA biomaterijala u velikoj meri zavisi od metoda njihove pripreme i mikrostrukturnih odlika njihove površine [267]. U tom smislu je naša grupa razvila nov metod pripreme SMA brzim otvrdnjavanjem valjanjem rastopine [551], i pokazala da se ovim metodom značajno poboljšavaju fizičke odlike SMA, kao što su SME, žilavost, histereza i dr. [12]. Osim toga, na primeru CuAlNi legura smo, koristeći model L929 ćelija i pacovskih timocita, pokazali da CuAlNi RS trake imaju značajno manju citotoksičnost od kontrolnih CuAlNi legura istog sastava, ali pripremljenih konvencionalnim metodama [268]. Međutim, ostalo je nepoznato kakav odgovor CuAlNi i NiTi legure indukuju kod makrofaga i DC, ključnih ćelija u odgovoru na biomaterijale *in vivo*.

4.1.1. Biokompatibilnost CuAlNi SMA na modelu PMØ

Prvi cilj ove studije je bio ispitiati biokompatibilnost CuAlNi legura u modelu PMØ, pre sve ga njihovu metaboličku aktivnost, preživljavanje, produkciju ROS i imunomodulacijske osobine. U tu svrhu su u testovima korišćene CuAlNi RS SMA trake 5mm x 5mm x 0.1mm pripremljene brzim otvrdnjavanjem valjanjem primarne rastopine kako je opisano u **odjeljku 3.1.2**. Kao kontrola su korišćene CuAlNi pločice 5mm x 5mm x 1mm izlivenne iz primarne rastopine istog sastava, ali bez definisane austenitne forme. U svim testovima je površina kontrolnih i RS legura u odnosu na zapreminu medijuma iznosila 1cm²/ml.

4.1.1.1 Efekat CuAlNi legura na metaboličku aktivnost i vijabilnost PMØ

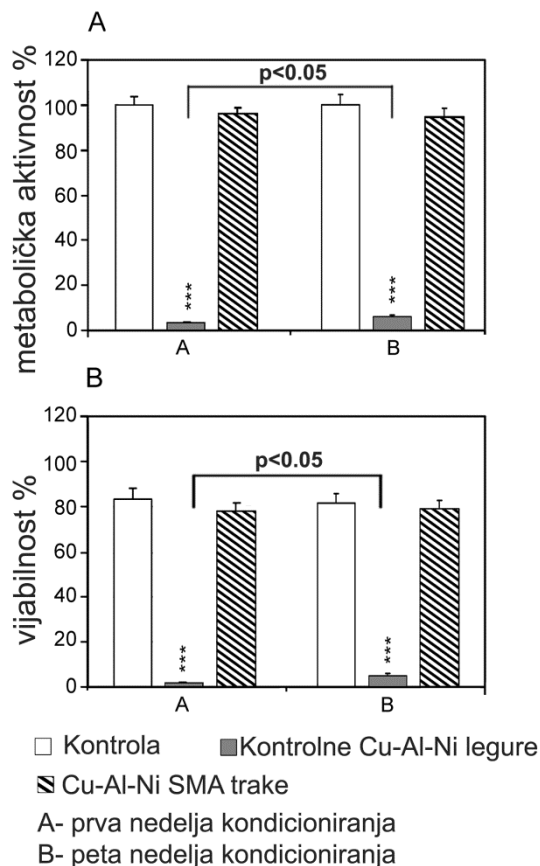
Prvo je ispitano da li CuAlNi legure u direktnom kontaktu modifikuju metaboličku aktivnost i vijabilnost PMØ. CuAlNi legure su prethodno kondicionirane u medijumu za ćelijske kulture 7 dana ili 5 nedelja, pri čemu je svake nedelje dodavan svež medijum.

Kao što je pokazano na **grafikonu 4.1.1.1.a**, uzorci kontrolnih CuAlNi legura, bez obzira na dužinu kondicioniranja, značajno inhibiraju metaboličku aktivnost PMØ u odnosu na kontrolu. Produženim kondicioniranjem kontrolnih legura u medijumu (5 nedelja) se uočava značajno manji inhibitorni efekat na metaboličku aktivnost PMØ ($p < 0.05$). Za razliku od toga, RS trake neznatno ($p > 0.05$) suprimiraju metaboličku aktivnost PMØ (10% inhibicije) u poređenju sa kontrolnim uzorcima. Testovi vijabilnosti su pokazali da je inhibicija metaboličke aktivnosti PMØ u kulturi sa kontrolnim CuAlNi legurama posledica citotoksičnog efekta ovih legura. U skladu sa tim, CuAlNi RS SMA trake ne modifikuju značajno vijabilnost PMØ (**Grafikon 4.1.1.1.b**).

U cilju proučavanja odnosa između korozivnih osobina CuAlNi legura i njihove citotoksičnosti, kontrolne legure i RS trake su kondicionirane u medijumu za ćelijske kulture (**odjeljak 3.1.2.**), a ekstrakti medijuma su korišćeni u testovima citotoksičnosti. Kako je prikazano na **grafikonu 4.1.1.1.2.**, koncentrovani ekstrakti kontrolnih legura, koji su sakupljeni posle 7 dana kondicioniranja, kompletno inhibiraju metaboličku aktivnost PMØ. Citotoksičnost takođe izaziva i 25% ekstrakt, bez obzira da li je sakupljen u prvoj ili petoj nedelji kondicioniranja. Nakon pet nedelja kondicioniranja uočava se značajno manji supresivni efekat ekstrakta kontrolnih legura na metaboličku aktivnost PMØ. Kondicionirani medijumi RS traka pod istim uslovima ne ispoljavaju značajan efekat na metaboličku aktivnost PMØ (**Grafikon 4.1.1.1.2.**).

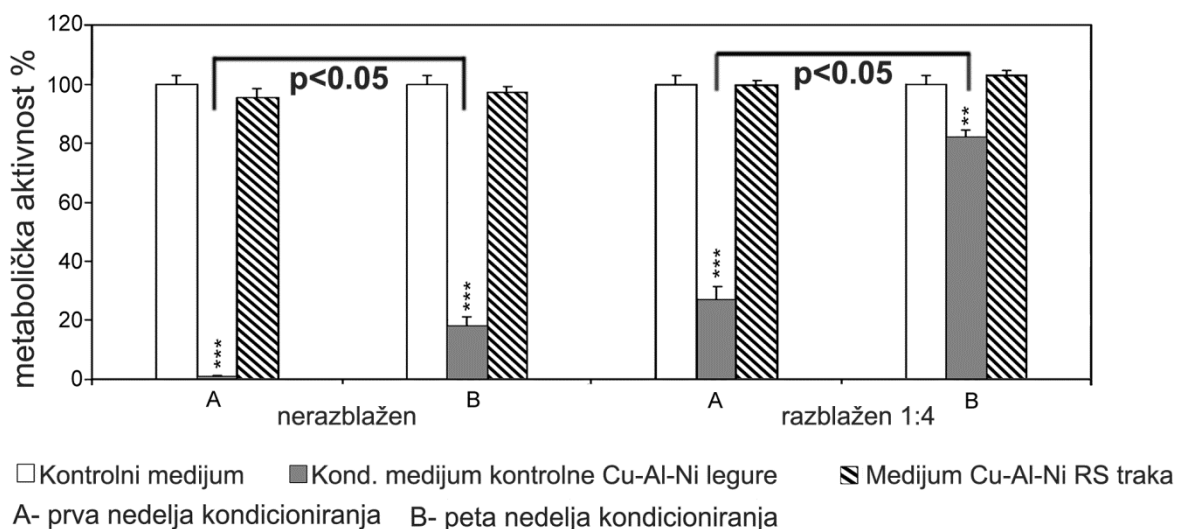
Rezultati citotoksičnosti CuAlNi legura su u skladu sa rezultatima dobijenim ICP-AES metodom. **Tabela 4.1.1.1.** prikazuje da je u kondicioniranom medijumu kontrolnih legura koncentracija Cu (84 ppm) i Ni (2.4 ppm) za oko 10-12 puta veća nego koncentracija ovih jona u ekstraktu CuAlNi RS traka (8.0 ppm Cu i 0.2 ppm Ni). Koncentracije Cu i Ni kod kontrolnih legura i RS traka su značajno smanjene posle 5 nedelja kondicioniranja za

više od 60% (Cu) i 50% (Ni i Al), u poređenju sa koncentracijama ovih jona nakon prve nedelje kondicioniranja.



Grafikon 4.1.1.1.1. Efekat CuAlNi legura na metaboličku aktivnost i vijabilnost PMØ.

PMØ su kultivisani sa kontrolnom legurom ili RS trakama posle kondicioniranja, kako je opisno u poglavlju 3. A) Direktna efekat CuAlNi legura na metaboličku aktivnost ćelija. Metabolička aktivnost je određena MTT testom B) direktna efekat CuAlNi legura na ćelijsku vijabilnost. Vijabilnost je određena na osnovu bojenja ćelija Tripan plavim. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti (srednji % ± SD) šestoplikata u odnosu na odgovarajuće kontrole 100% (ćelije kultivisane bez legura). ***p<0.005 u poređenju sa odgovarajućim kontrolama.



Grafikon 4.1.1.1.2. Efekat kondicioniranog ekstrakta CuAlNi legura na metaboličku aktivnost PMØ.

PMØ su kultivisani u kontrolnom medijumu ili kondicioniranom medijumu CuAlNi legura, nerazblaženom ili razblaženo 4 puta, kako je opisno u poglavlju 3. Metabolička aktivnost je određena MTT testom. Rezultati su prikazani kao relativne vrednosti (srednji % ± SD) šestoplikata u odnosu na odgovarajuće kontrole 100% (ćelije kultivisane u kontrolnom medijumu). *** $p < 0.005$ u poređenju sa odgovarajućim kontrolama.

Tabela 4.1.1.1.1 ICP-AES analiza metala u kondicioniranom medijumu legura

Kondicionirani medijum	Cu(ppm)		Al(ppm)		Ni(ppm)	
Kontrolni kondicionirani medijum	< 0.1		< 0.1		< 0.1	
Kondicionirani medijum kontrolne legure	A: 84.0	B:28.2	A:0.2	B:0.1	A:2.4	B:1.1
Kondicionirani medijum RS traka	A: 8.0	B: 3.0	A:0.3	B:0.1	A:0.2	B:0.1

A-Uzorci legura kondicionirani 7 dana, nakon čega je sakupljen medijum

B-Uzorci legura kondicionirani 5 nedelja. Kondicionirani medijum je sakupljan od 28-og do 35-tog dana.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost 3 merenja.

4.1.1.2. Efekat kondicioniranog medijuma CuAlNi legura na nekrozu, apoptozu i stvaranje ROS od strane PMØ

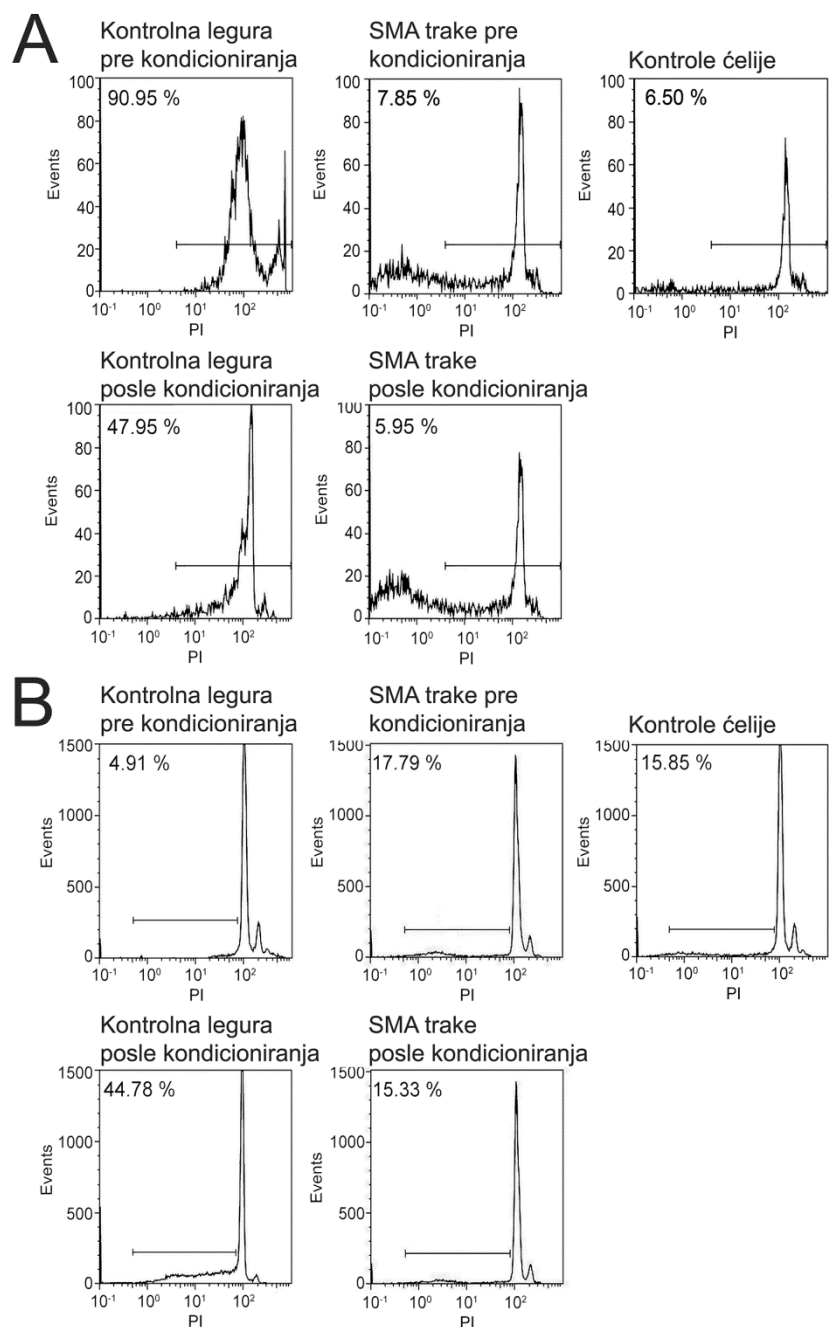
Naredni cilj je bio ispitati mehanizme koji su uključeni u citotoksičnost CuAlNi legura. Rezultati prikazani u **tabeli 4.1.1.2.1.** i na **grafikonu 4.1.1.2.1.** pokazuju da kontrolne legure pre kondicioniranja izazivaju nekrozu, dok kondicionirane legure izazivaju i nekrozu i apoptozu PMØ. CuAlNi RS trake ne indukuju ni nekrozu niti apoptozu PMØ.

Tabela 4.1.1.2.1. Efekat CuAlNi legura na nekrozu, apoptozu i stvaranje ROS kod PMØ

	Nekroza (%)	Apoptoza (%)	Produkcija ROS (MFI)
Kontrolne ćelije	5.8±1.2	16.2±2.1	6.4±1.2
Kontrolna legura	A: 92.4±4.6 ^{***}	A: 4.9±1.0 ^{***}	A: 17.2±1.8 ^{***}
	B: 48.4±3.9 ^{***}	B: 48.2±4.4 ^{***}	B: 16.0±2.1 ^{***}
RS traka	A: 7.1±1.9	A: 17.8±1.7	A: 10.8±1.3 ^{**}
	B: 5.9±1.8	B: 15.3±1.4	B: 8.1±1.0

A-pre kondicioniranja, B- posle kondicioniranja.

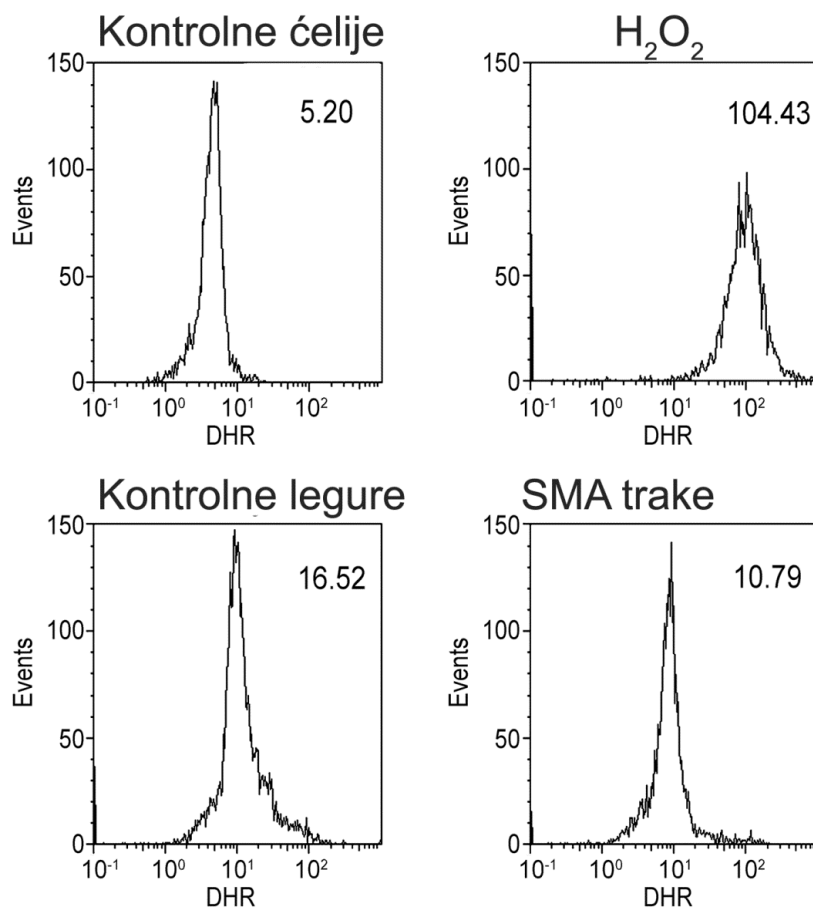
PMØ su kultivisane sa kontrolnim CuAlNi legurama ili RS trakama pre i posle kondicioniranja (5 nedelja), kako je opisano u poglavlju 3. Nekroza i apoptoza su određene nakon 24 sata, dok je produkcija ROS detektovana nakon 30 minuta. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD triplikata jednog reprezentativnog eksperimenta od tri sa sličnim rezultatima. *p<0.05, **p<0.01, ***p< 0.005 u poređenju sa kontrolnim ćelijama.



Grafikon 4.1.1.2.1. Efekat CuAlNi legura na A) nekrozu i B) apoptozu PMØ.

PMØ su kultivisane sa nekoncidioniranom i kondicioniranim legurama tokom 24 sata. A) Procenat nekrotičnih ćelija je određen bojenjem nepermeabilizovanih ćelija sa PI. B) Procenat apoptotičnih ćelija je određen bojenjem permeabilizovanih ćelija sa PI, kako je objašnjeno u poglavlju 3. Prikazani su reprezentativni histogrami dobijeni protočnom citometrijom.

Međutim, analizom redoks statusa ćelija je utvrđeno da i SMA RS trake i kontrolne legure indukuju stvaranje ROS u PMØ. U tom smislu je utvrđeno da je efekat SMA RS traka manji nego efekat kontrolnih legura, ili H₂O₂ koji je korišćen kao pozitivna kontrola (**Grafikon 4.1.1.2.2.**). Uočeno je i da se produkcija ROS u PMØ smanjuje nakon kondicioniranja CuAlNi RS traka (**Tabela 4.1.1.2.1.**).

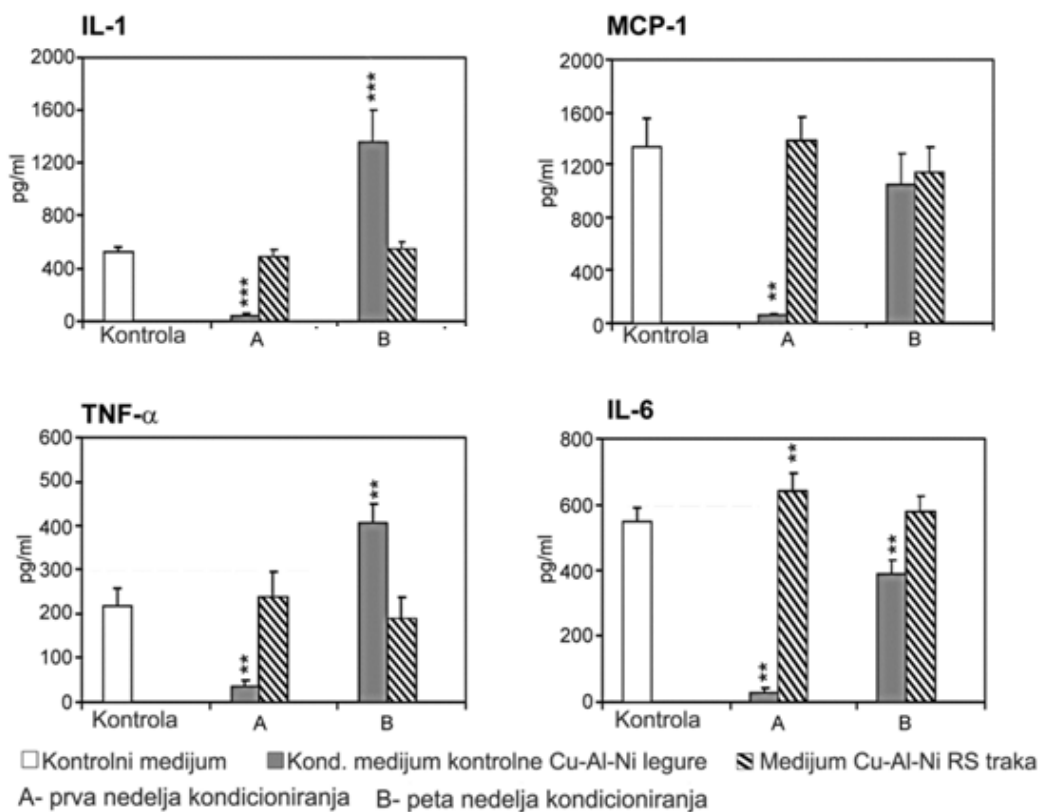


Grafikon 4.1.1.2.2. Efekat CuAlNi legura na produkciju intracelularnih ROS kod PMØ.

PMØ su kultivisani sa nekondicioniranim legurama tokom 30 min. Negativna kontrola su bile ćelije kultivisane bez legura, dok su pozitivnu kontrolu činile ćelije tretirane sa 0.5 mM H₂O₂. Ćelije su obojene DHR kako je opisano u poglavlju 3, i analizirane na protočnom citometru. Prikazani su reprezentativni histogrami sa MFI u gornjem desnom uglu svakog.

4.1.1.3. Efekat ekstrakta CuAlNi legura na produkciju proinflamacijskih citokina od strane PMØ

Naredni cilj je bio ispitati kako kondicionirani medijum CuAlNi legura utiče na produkciju citokina od strane PMØ. U tom smislu su PMØ kultivisani sa ekstraktima legura tokom 24 sata, nakon čega je izmerena produkcija IL-1 β , TNF- α , MCP-1 i IL-6 (**Grafikon 4.1.1.3.1.**).



Grafikon 4.1.1.3.1. Efekat kondicioniranog medijuma CuAlNi legura na produkciju citokina od strane PMØ.

PMØ su kultivisane sa kondicioniranim medijumom CuAlNi (sakupljenim posle prve ili pete nedelje kondicioniranja) tokom 24 sata, i nakon toga je izmeren nivo citokina u supernatantima kultura, kako je opisano u poglavlju 3. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD (n=4). **p<0.01, ***p<0.005 u poređenju sa kontrolnim kondicioniranim medijumom.

Pokazano je da ekstrakt kontrolnih legura, sakupljen tokom prve nedelje kondicioniranja, kompletno blokira, ili značajno smanjuje, produkciju svih ispitivanih

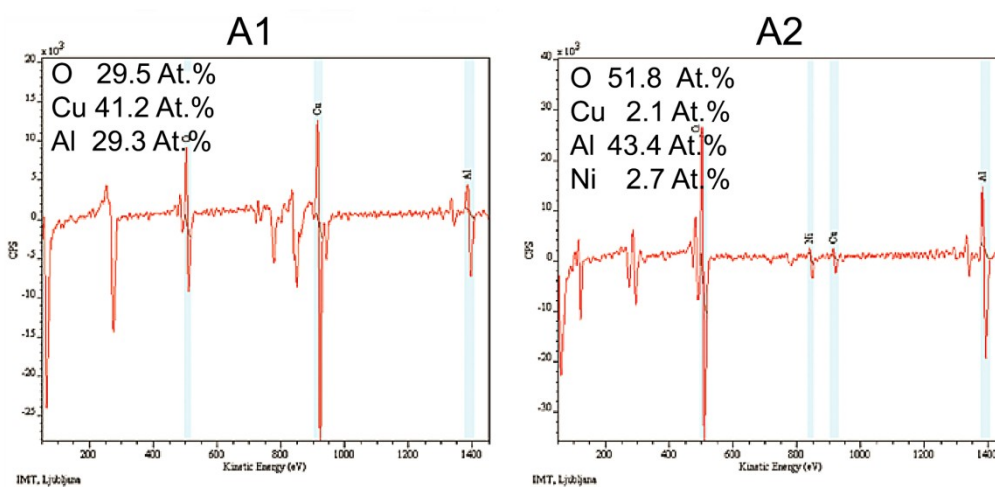
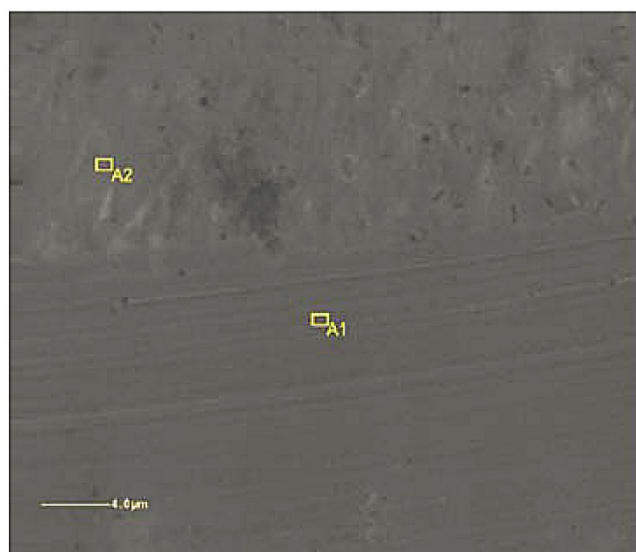
citokina. Kondicionirani medijum kontrolnih legura koji je sakupljen posle 5 nedelja kondicioniranja, ima stimulatorni efekat na produkciju IL-1 β i TNF- α . Ekstrakt RS traka sakupljen nakon prve nedelje kondicioniranja indukuje povećanje produkcije IL-6, ali ne utiče na produkciju IL-1 β , TNF- α i MCP-1. Ekstrakt RS traka koji je sakupljen nakon poslednje nedelje kondicioniranja ne modifikuje značajno produkciju citokina od strane PMØ.

4.1.1.4. Mikrostruktura površine CuAlNi RS traka

Obzirom da od osobina površine legura zavise i njene korozivne karakteristike, a potencijalno i njihovi imunomodulatorni efekti, detaljnije je poroučena mikrostruktura CuAlNi RS SMA traka pomoću SEM/EDX i AES analize, nakon kondicioniranja ovih legura u medijumu 7 dana.

SEM analiza je pokazala da je površina CuAlNi RS traka relativno glatka, ali i da sadrži različite tačkaste inkuzije oko 2 mikrometra u prečniku (**Slika 4.1.1.4.1.**). Ove inkluzije su distribuirane po čitavoj površini CuAlNi RS traka, a EDX analiza je pokazala da ove partikule predstavljaju boride (podaci nisu prikazani).

AES analiza je pokazala da se na površini CuAlNi RS traka nalaze samo Cu, Al i O, dok Ni nije detektovan (**Slika 4.1.1.4.1. A1 spektar**). Spektralne linije AES-a za Cu i Al, na kineričkim energijama od 930 eV (Cu) i 1390 eV (Al), ukazuju da su ovi elementi dominantno vezani u okside. Nakon rasprašivanja površinskih slojeva jonima Ar⁺, AES analizom je detektovan Ni (2.7 At.%) na dubini od 6 nm. Takođe, na ovoj dubini je uočena značajno veća koncentracija Al i O, a manja koncentracija Cu, u odnosu na koncentracije ovih elemenata na samoj površini CuAlNi RS SMA (**Slika 4.1.1.4.1. A2 spektar**).



Slika 4.1.1.4.1. Mikrostrukturna analiza CuAlNi RS SMA traka.

CuAlNi RS SMA trake su kondicionirane u medijumu 2 dana i nakon toga analizirane SEM-om (gore) i AES-om. U AES analizi, uzorci su prvo rasprašeni Ar^+ (3keV) u cilju uklanjanja površinski adsorbovanih molekula, a zatim analizirani (spekar A1). Nakon toga su uzorci rasprašeni Ar^+ 3keV brzinom od 1.2 nm/min tokom 5 minuta nakon čega je ponovljena AES analiza (A2 spekar). Prikazani su reprezentativni spektri dobijeni na površinama $5 \times 5 \mu\text{m}$.

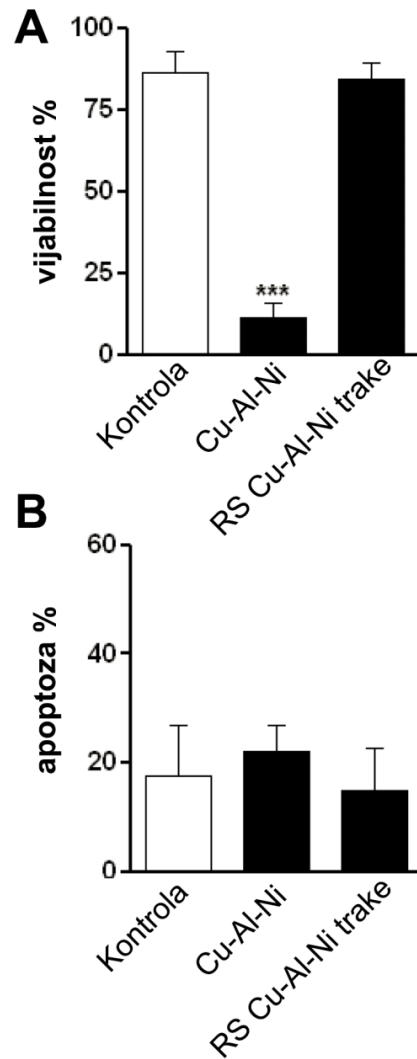
4.1.2. Biokompatibilnost CuAlNi SMA na modelu humanih PBMC

Prethodni rezultati su pokazali da brzo otvrdnjavanje CuAlNi SMA legura i njihovo kondicioniranje u medijumu poboljšavaju rezistenciju ovih legura na koroziju, a time i njihovu biokompatibilnost u kulturi sa PMØ. Dobra biokompatibilnost je osnovni preduslov za potencijalnu upotrebu ovih legura u klinici. U skladu s tim, cilj naredne studije je bio da se ispita citotoksični i imunomodulatorni efekat CuAlNi legura u kulturi humanih PBMC. Obzir da u humanoj populaciji postoji velika varijabilnost u odgovoru na različite metalne jone, u ovim ispitivanjima su korišćene PMBC izolovane iz 20 zdravih donora koji nisu u direktnom srodstvu.

4.1.2.1 Citotoksičnost CuAlNi RS SMA u kulturi humanih PBMC

PBMC su kultivisane sa CuAlNi RS SMA trakama ili sa kontrolnim CuAlNi pločicama tokom 2 dana, pri čemu je površina ispitivanih legura u odnosu na zapreminu medijuma, kao i u prethodnim ispitivanjima, iznosila 1 cm²/ml. Citotoksičnost CuAlNi legura je nakon toga utvrđena merenjem vijabilnosti i procenta apoptotičnih PBMC, na načine koji su opisani u poglavlju 3. PBMC kultivisane bez CuAlNi legura su korišćene kao kontrola.

Rezultati pokazuju da CuAlNi RS trake nisu citotoksične za humane PBMC, obzirom da se ni vijabilnost ni procenat apoptotičnih ćelija ne razlikuju značajno u odnosu na kontrolu (**Grafikon 4.1.2.1.1a i b**). Suprotno tome, pokazano je da kontrolne CuAlNi pločice ispoljavaju jak citotoksični efekat na PBMC, obzirom da je detektovano smanjenje vijabilnosti PBMC iznosilo više od 70%. Ispitivanjem mehanizama citotoksičnosti kontrolnih CuAlNi pločica je utvrđeno da je nekroza dominantni uzrok smanjenja vijabilnosti PBMC, pošto nije detektovan porast procenta apoptotičnih ćelija u kulturama sa CuAlNi pločicama (**Grafikon 4.1.2.1.1b**).



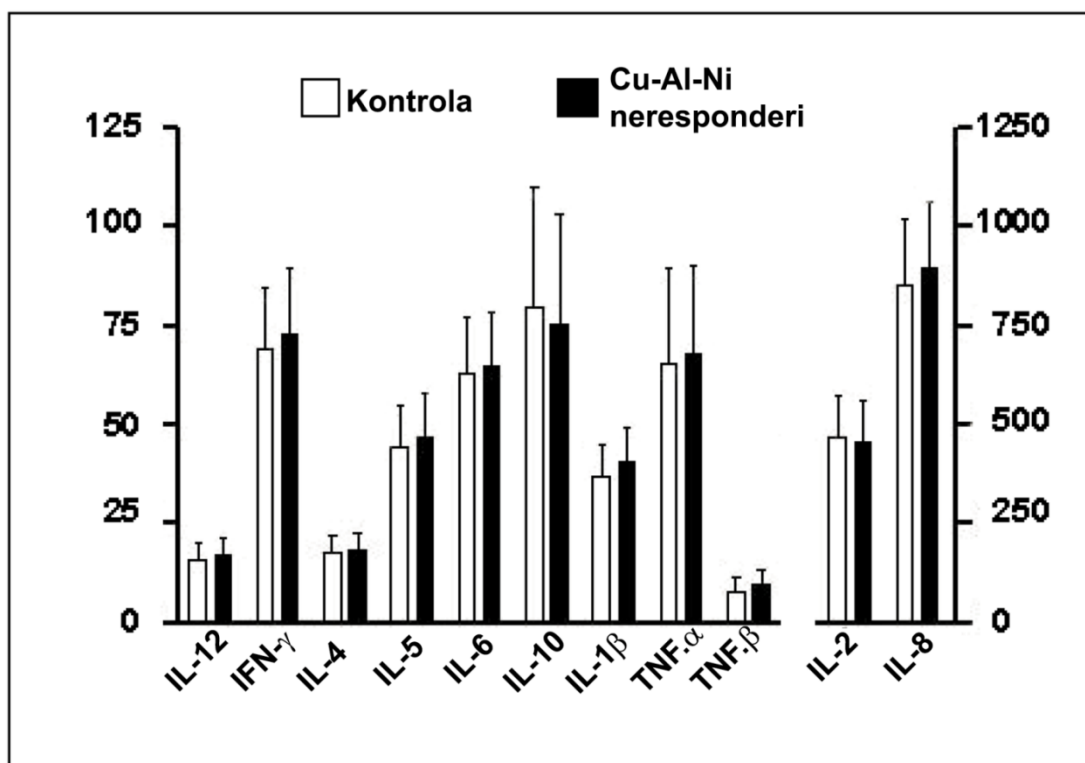
Grafikon 4.1.2.1.1. Citotoksičnost CuAlNi legura za humane PBMC.

PBMC su kultivisane sa CuAlNi RS SMA trakama ili kontrolnim CuAlNi legurama istog sastava tokom dva dana, nakon čega je određena A) vijabilnost i B) procenat apoptotskih ćelija. A) Vijabilnost je određena bojenjem ćelija Tripan plavim. B) Apoptotične ćelije su detektovane bojenjem sa PI u hipotonom rastvoru, kao što je opisano u poglavlju 3. Prikazani podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD iz 20 kultura sa različitim PBMC.

4.1.2.2 Imunomodulatorni efekti CuAlNi RS SMA legura u kulturi aktiviranih PBMC

Obzirom da CuAlNi RS SMA nisu toksične za humane PBMC, ispitano je da li ove legure mogu modifikovati imunski odgovor kod potencijalnih recipijenata implantata na bazi ovih legura. Za ova ispitivanja je korišćen model PBMC aktiviranih sa PHA, koji je široko prihvaćen za ispitivanje efekata biomaterijala na imunski odgovor *in vitro* [563]. Imunomodulatorni efekat CuAlNi RS traka je meren upoređivanjem nivoa citokina produkovanih od strane PBMC stimulisanih sa PHA u toku kultivacije sa CuAlNi RS legurama, sa nivoom citokina produkovanih od strane aktiviranih PBMC od istog donora, kultivisanih bez prisustva legura (kontrolne kulture). Kontrolne CuAlNi pločice nisu korišćene u ovim ispitivanjima zbog njihovog snažnog citotoksičnog efekta na PBMC.

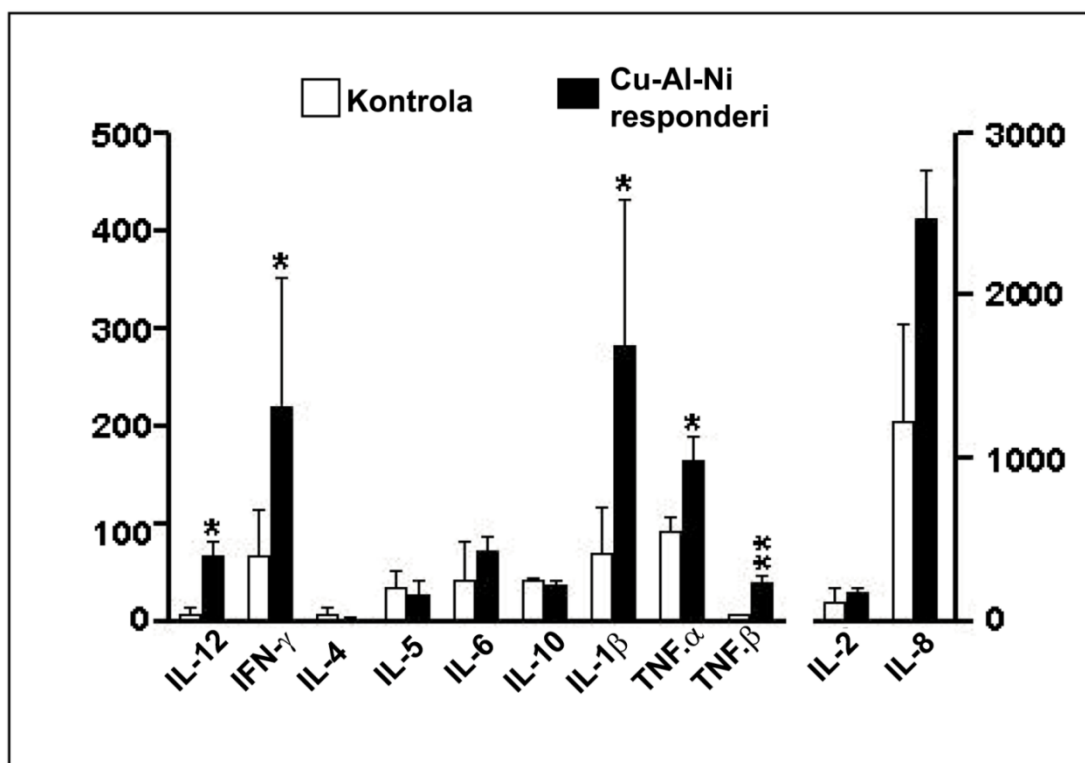
U 18, od ukupno 20 ispitivanih kultura, nije detektovana razlika u nivou Th1 (IL-12, IFN- γ , IL-2), Th2 (IL-4, IL-5 i IL-10) i proinflamacijskih citokina (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , TNF- β) produkovanih od strane PBMC stimulisanih sa PHA u toku kultivacije sa CuAlNi legurama, u odnosu na kontrolne kulture (**Grafikon 4.1.2.2.1.**).



Grafikon 4.1.2.2.1. Efekat CuAlNi SMA traka na produkciju citokina od strane PBMC aktiviranih sa PHA (kulture nerespondera).

Supernatanti kultura aktiviranih PBMC od 18 donora (neresponderi), kultivisanih sa ili bez CuAlNi RS SMA traka, su korišćeni za detekciju prikazanih citokina pomoću multipleks imunoeseja na protočnom citometru. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SE (n=18).

Međutim, u 2 kulture (responderi) sa CuAlNi legurama je uočen značajno veći nivo Th1 (IL-12 i IFN- γ) i proinflamacijskih citokina (TNF- α , TNF- β i IL-1 β) u odnosu na odgovarajuće kontrolne kulture (**Grafikon 4.1.2.2.2.**). Produkcija ostalih analiziranih citokina nije značajnije modifikovana pod uticajem CuAlNi RS SMA traka.



Grafikon 4.1.2.2.2. Efekat CuAlNi SMA traka na produkciju citokina od strane PBMC aktiviranih sa PHA (kulture respondera).

Supernatanti kultura aktiviranih PBMC od 2 donora (responderi), kultivisanih sa ili bez CuAlNi RS SMA traka, su korišćeni za detekciju prikazanih citokina pomoću multipleks imunoseja na protočnom citometru. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SE (n=18). *p<0.05, **p<0.01 u poređenju sa kontrolom.

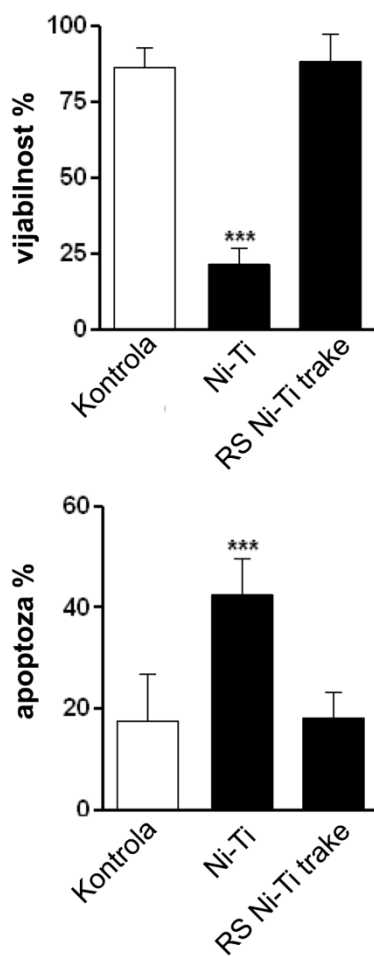
4.1.3 Biokompatibilnost NiTi RS SMA na modelu humanih PBMC

Iako je cena proizvodnje i neke od fizičkih karakteristika CuAlNi SMA bolja nego kod NiTi SMA, većina ih je lošija (**Tabela 1.5.3.8.1**), što je i osnovni razlog znatno češće upotrebe NiTi SMA u biomedicini. Pokazali smo da RS metoda značajno poboljšava biokompatibilnost CuAlNi legura, ali i da ovakva legura u izvesnim slučajevima može izazvati nepoželjan proinlamacijski odgovor. Obzirom da biokompatibilnost NiTi RS SMA nije do sada ispitivana, cilj ovog dela studije je bio ispitati citotoksičnost i imunomodulatorne osobine ovih legura na modelu humanih PBMC. Efekat NiTi RS SMA na ove osobine je poređen sa efektom kontrolnih NiTi RS pločica istog sastava koje su nakon izlivanja obrađene elektroerozijom, a zatim mašinski polirane u cilju uklanjanja kontaminirajućih elemenata kao što su Cu i Zn (**odjeljak 3.1.1.**). U svim testovima je površina kontrolnih i RS NiTi legura u odnosu na zapreminu medijuma takođe iznosila 1cm²/ml.

4.1.3.1 Citotoksičnost NiTi RS SMA u kulturi humanih PBMC

PBMC su kultivisane sa NiTi RS SMA ili sa kontrolnim NiTi pločicama tokom 2 dana, nakon čega je izmerena vijabilnost PBMC bojenjem ćelija Tripan plavim, a procenat apoptotičnih ćelija bojenjem permeabilizovanih ćelija sa PI i analizom na protočnom citometru. PBMC kultivisane bez NiTi legura su korišćene kao kontrola.

Rezultati prikazani na **grafikonu 4.1.3.1.1.** pokazuju da NiTi RS trake nisu toksične za humane PBMC, obzirom da ni vijabilnost ni procenat apoptotičnih ćelija nije modifikovan značajno u odnosu na kontrolu. Kontrolne NiTi pločice ispoljavaju jak citotoksični efekat na PBMC, obzirom da smanjuju vijabilnost ovih ćelija za oko 60%. Ispitivanjem mehanizama citotoksičnosti kontrolnih NiTi pločica je utvrđeno da je apoptoza dominantni uzrok smanjenja vijabilnosti PBMC, pošto je detektovan 2 puta veći procenat apoptotičnih PBMC u kulturama sa kontrolnim NiTi pločicama, u odnosu na kontrolne kulture ili kulture sa NiTi RS SMA (**Grafikon 4.1.3.1.1.**).



Grafikon 4.1.3.1.1. Citotoksičnost NiTi legura za humane PBMC.

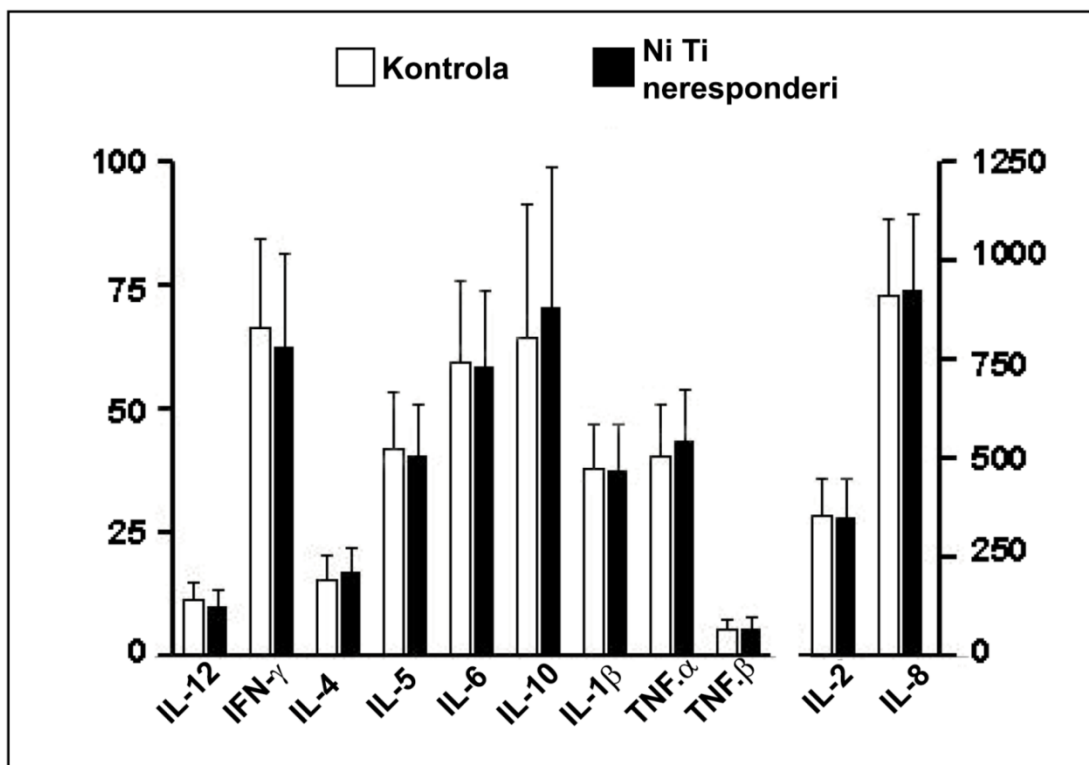
PBMC su kultivisane sa NiTi RS SMA trakama ili kontrolnim NiTi legurama istog sastava tokom dva dana, nakon čega je određena A) vijabilnost i B) procenat apoptotskih ćelija. A) Vijabilnost je određena bojenjem ćelija Tripan plavim. B) Apoptotične ćelije su detektovane bojenjem sa PI u hipotonom rastvoru, kao što je opisano u poglavlju 3. Prikazani podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD iz 20 kultura sa različitim PBMC.

4.1.3.2 Imunomodulatorni efekti NiTi RS SMA u kulturi aktiviranih PBMC

Naredni cilj je bio ispitati da li NiTi RS legure poseduju imunomodulatorni efekat u modelu aktiviranih PBMC. Kao i u ispitivanjima CuAlNi RS legura, u ovim studijama su korišćene PBMC izolovane iz 20 donora, a stimulacija *in vitro* je vršena pomoću PHA (32 µg/ml).

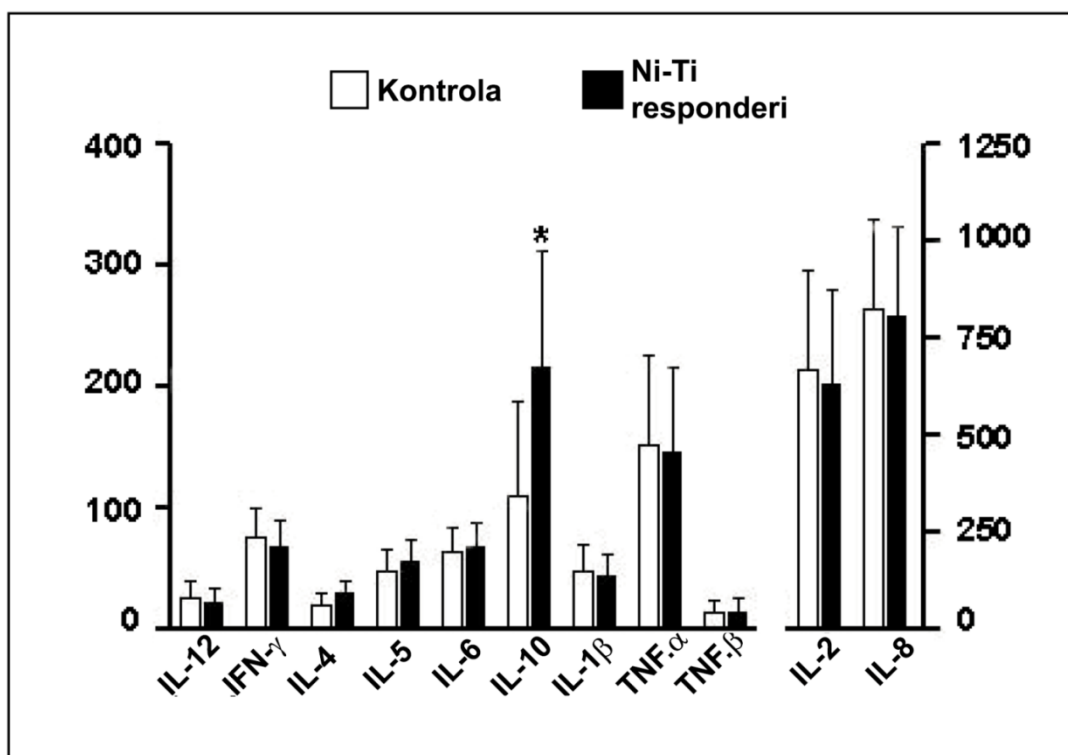
Utvrđeno je da NiTi RS SMA ne modifikuju produkciju Th1 (IL-12, IFN- γ , IL-2) i proinflamacijskih citokina (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , TNF- β) citokina od strane PBMC stimulisanih sa PHA, u odnosu na kontrolne stimulisane kulture u kojima nije bilo legura. Slično tome, ni u jednoj od 20 kultura nije detektovana promena u produkciji IL-4 i IL-5 (**Grafikoni 4.1.3.2.1. i 4.1.3.2.2.**).

Međutim, u 5 stimulisanih kultura PBMC (responderi) je uočeno značajno povećanje produkcije IL-10, u poređenju sa kontrolnim kulturama PBMC od istih donora (**Grafikon 4.1.3.2.2.**).



Grafikon 4.1.3.2.1. Efekat NiTi SMA traka na produkciju citokina od strane PBMC stimulisanih sa PHA (kulture nerespondera).

Supernatanti kultura aktiviranih PBMC od 15 donora (neresponderi), kultivisanih sa ili bez CuAlNi RS SMA traka, su korišćeni za detekciju prikazanih citokina pomoću multipleks imunoseja na protočnom citometru. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SE.



Grafikon 4.1.3.2.2. Efekat NiTi SMA traka na produkciju citokina od strane PBMC stimulisanih sa PHA (kulture respondera).

Supernatanti kultura aktiviranih PBMC od 5 donora (responderi), kultivisanih sa ili bez CuAlNi RS SMA traka, su korišćeni za detekciju prikazanih citokina pomoću multipleks imunoeseja na protočnom citometru. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SE. * $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom.

4.1.4 Biokompatibilnost NiTi RS SMA na modelu humanih DC

Uzimajući u obzir da produkcija citokina na modelu PBMC aktiviranih sa PHA zavisi od prisustva APC u populaciji PBMC [564], naredni cilj ove studije je bio da se detaljnije prouče mehanizmi imunomodulatornog dejstva NiTi RS SMA na modelu humanih DC monocitnog porekla. Obzirom da sazrevanje i funkcionalni odgovor DC u velikoj meri zavisi od broja ćelija koje se koriste u testu [565], prvi cilj je bio ispitati efekat NiTi RS SMA na vijabilnost i procese apoptoze i nekroze DC. Kao pozitivna kontrola su korišćene NiTi pločice istog sastava koje nemaju osobinu pamćenja oblika, dok su kao negativna kontrola korišćene DC kultivisane na plastičnim pokrovnim ljuspicama.

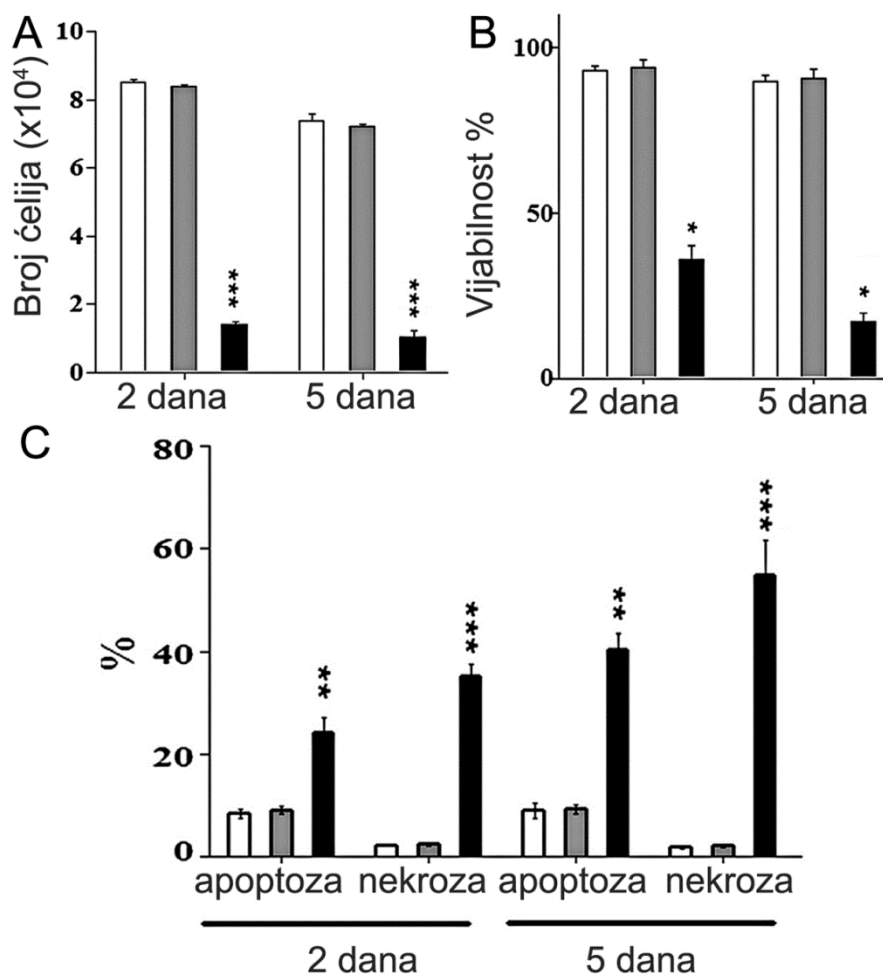
4.1.4.1 Efekat NiTi RS traka i kontrolnih NiTi pločica na vijabilnost DC

DC su kultivisane u prisustvu NiTi RS SMA ili kontrolnih NiTi pločica 2 ili 5 dana, nakon čega je određen broj vijabilnih ćelija u kulturi bojenjem sa Tripan plavim. Rezultati prikazani na **grafikonu 4.1.4.1.1.**, pokazuju da je broj DC kultivisanih sa kontrolnim NiTi pločicama, u oba ispitivana termina, značajno manji u odnosu na kontrolu, usled smanjene vijabilnosti DC. Smanjenje vijabilnosti DC pod uticajem kontrolnih NiTi pločica je posledica nekroze i apoptoze ovih ćelija, što je detektovano obeležavanjem ćelija sa PI u rastvoru u PBS-a (nekroza) ili hipotonom rastovru (apoptoza). Dužim inkubiranjem kontrolnih NiTi legura sa DC (5 dana) je uočen snažniji citotoksični efekat.

Za razliku od toga, NiTi RS SMA nemaju citotoksični efekat na DC, ni posle 2 ni posle 5 dana inkubacije sa DC, obzirom da broj DC, njihova vijabilnost i procenat apoptotskih i nekrotičnih ćelija u kulturi sa NiTi RS trakama nije značajno promenjen u odnosu na kontrolne ćelije kultivisane na plastičnim pokrovnim ljuspama.

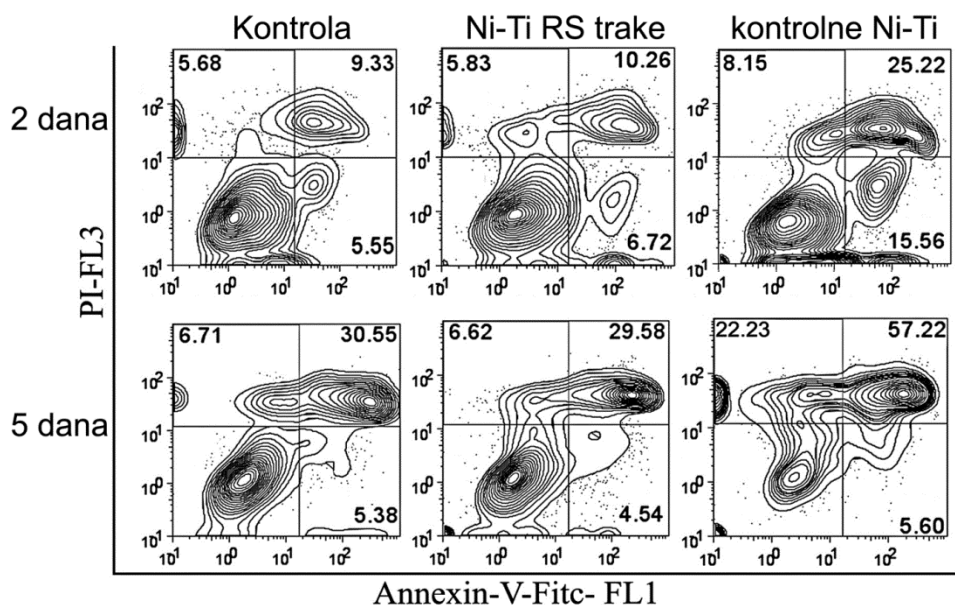
Ovi rezultati su potvrđeni i obeležavanjem DC pomoću Aneksin-V:FITC i PI (**Grafikon 4.1.4.1.2.**). Uočeno je da je procenat PI⁺ (nekrotičnih) ćelija, i PI⁺/Aneksin-V⁺ (kasno apoptotskih, sekundarno nekrotičnih) ćelija, veći nego Aneksin V⁺ (rano apoptotskih) ćelija, naročito nakon 5 dana kulture.

Veza između uočenog efekta NiTi legura i njihovih korozivnih osobina je ispitana ICP-AES metodom, pomoću koje je određena količina jona Ni i Ti oslobođenih u medijum tokom 48-časovnog kondicioniranja ovih legura u kompletnom medijumu (**Tabela 4.1.4.1.1.**). Kao pozitivna kontrola su korišćene pločice od čistog Ti ili Ni u istom odnosu površine i zapremine medijuma ($1 \text{ cm}^2/\text{ml}$) kao i NiTi legure. Pokazano je da se joni Ti ne oslobađaju u medijum tokom kondicioniranja. Sa druge strane, uočeno je značajno oslobađanje jona Ni (118.93 mg/l) sa kontrolnih NiTi pločica. Dvostruko više Ni je oslobođeno kondicioniranjem čistih Ni pločica (281.93 mg/l). Za razliku od toga, koncentracija Ni jona u kondicioniranom medijumu NiTi RS traka (0.02 mg/l) je slična količini Ni jona u kontrolnom medijumu (0.01 mg/l). Slične korozivne osobine NiTi legura su detektovane i u prisustvu DC (podaci nisu prikazani).



Grafikon 4.1.4.1.1. Citotoksični efekat NiTi legura na DC nakon 2 ili 5 dana u kulturi.

DC su kultivisane sa NiTi RS trakama (sivi stubići) ili kontrolnim NiTi legurama (crni stubići), dok su kontrolne ćelije kultivisane na plastičnim pokrovnim ljuspama (beli stubići). Nakon kultura je određen A) broj i B) vijabilnost ćelija obeležavanjem sa Tripan plavim, i C) Procenat apoptotičnih i nekrotičnih ćelija obeležavanjem uzoraka sa PI, kako je opisano u poglavlju 3. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD iz četiri nezavisna eksperimenta, od kojih je svaki urađen u šestoplikatu. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, u poređenju sa kontrolnim ćelijama (Kruskal-Wallis-ov test).



Grafikon 4.1.4.1.2. Citotoksični Efekat NiTi legura na DC nakon 2 ili 5 dana u kulturi.

Procenat apoptotičnih i nekrotičnih DC je određen je nakon kultura, obeležavanjem ćelija sa Aneksin-V-FITC i PI, kako je opisano u poglavlju 3. Prikazan je reprezentivni eksperiment od ukupno 4 sa sličnim rezultatima.

Tabela 4.1.4.1.1. Koncentracije Ni i Ti oslobođenih sa uzoraka u toku kondicioniranja u medijumu

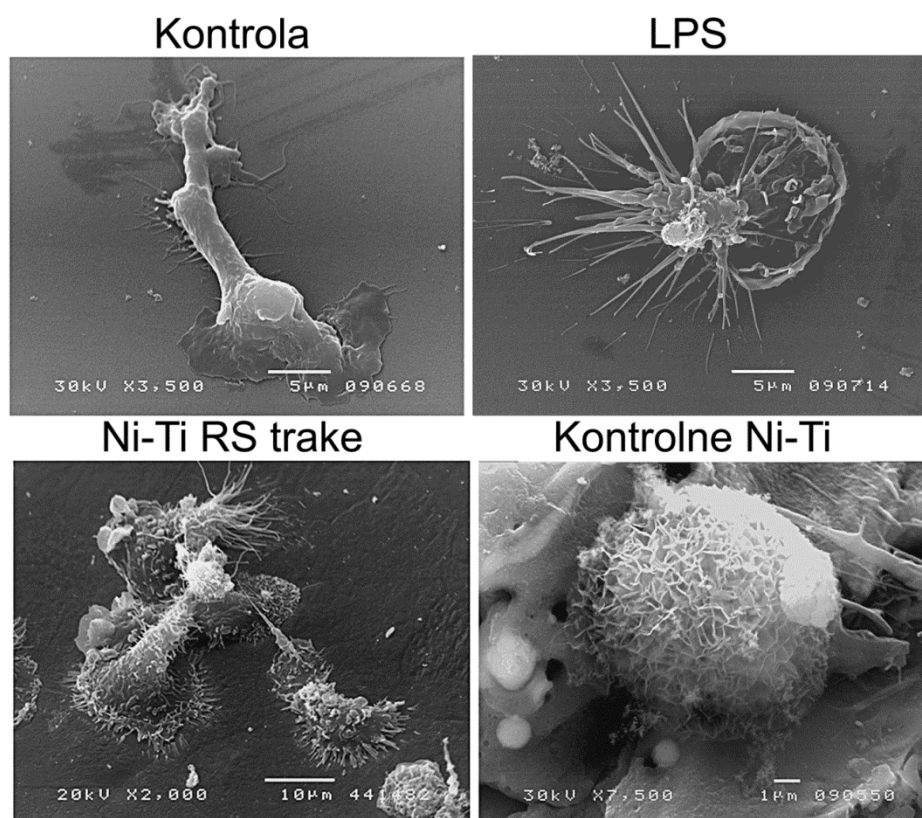
Uzorak	Ti (mg/l)	Ni (mg/l)
Kontrolni medijum	0.02	0.01
Ni pločice	n. d.	261.91
Ti pločice	0.02	n. d.
Kontrolne NiTi pločice	0.02	118.93
NiTi RS trake	0.02	0.02

n.d.- nije detektabilno.

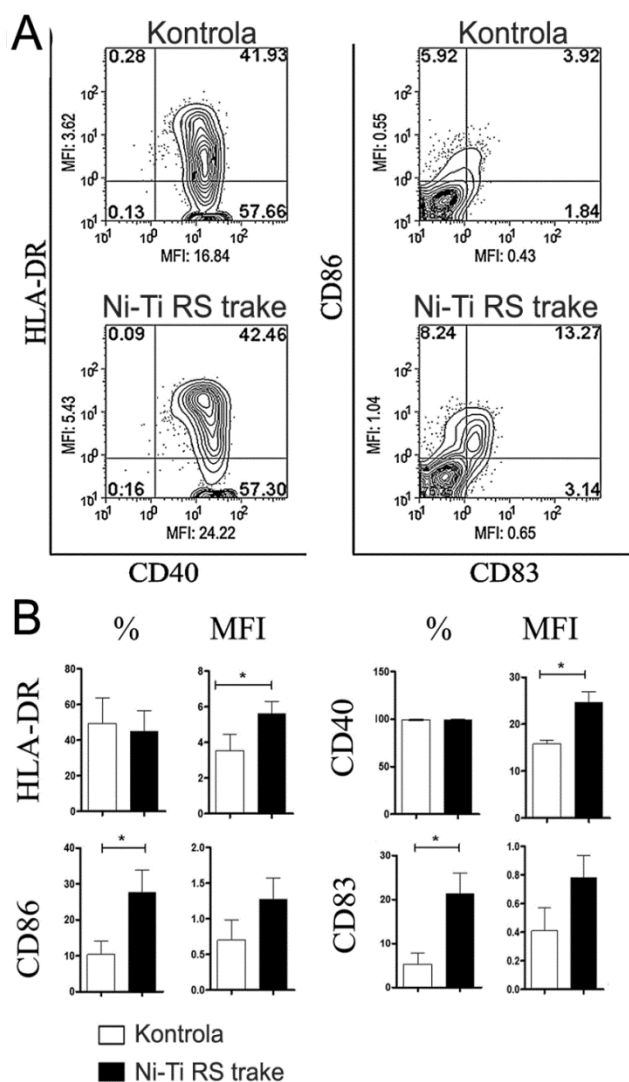
Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti izračunate iz triplikata očitavanja apsorbance, pri čemu SD u svim merenjima iznosi <0.01 mg/l.

4.1.4.2. Uticaj NiTi RS SMA na fenotipsko sazrevanje DC

U narednom segmentu studije je ispitan efekat NiTi RS SMA i kontrolnih NiTi pločica na morfološke i fenotipske odlike nezrelih DC. Isptivane karakteristike DC kultivisanih na NiTi legurama su upoređivane sa karakteristikama kontrolnih ćelija kultivisanih na plastičnim pokrovnim ljustama. Morfologija DC kultivisanih na NiTi legurama 48 sati je ispitana pomoću SEM-a, a rezultati ove analize su prikazani na **slici 4.1.4.2.1.**



Slika 4.1.4.2.1. SEM analiza nezrelih DC kultivisanih tokom 2 dana na polistirenskim pokrovnim ljustama (Kontrola), polistirenskim ljustama u prisustvu LPS (0.5mg/ml), ili uzorcima NiTi legura.



Grafikon 4.1.4.2.1. Fenotipska analiza nezrelih DC kultivisanih na NiTi trakama 2 dana.

A) Prikazani su konturni dijagrami koji pokazuju procenat pozitivnih ćelija i MFI za navedene površinske molekule. Prikazani su podaci iz jednog eksperimenta. B) Podaci iz sva četiri eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. * $p < 0.05$, u poređenju sa kontrolom (Wilcoxon-ov parni test).

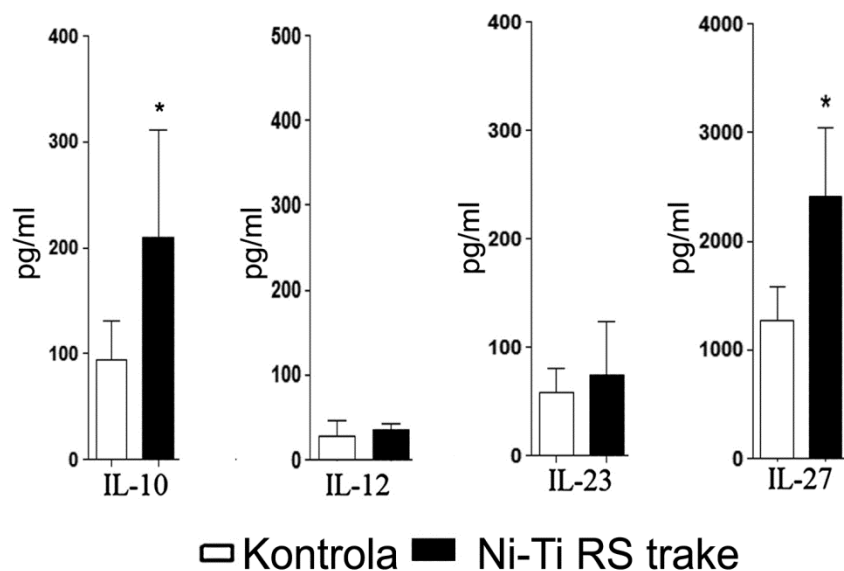
Uočeno je da kontrolne DC imaju tipičnu morfologiju adherentnih nezrelih DC, kao što je vretenast oblik i prisustvo mikrovila. Međutim, ćelije kultivisane na NiTi RS trakama imaju više mikrovila i talasastih nastavaka. Slične promene u morfologiji DC su detektovane nakon aktivacije DC LPS-om. Naime, DC aktivirane LPS-om imaju izražene mikrovile i talasaste nastavke, za razliku od kontrolnih DC, ali su nastavci znatno duži nego

kod DC kultivisanih sa NiTi RS trakama. Suprotno tome, ćelije kultivisane na kontrolnim NiTi pločicama su zaokrugljene i imaju mrežastu membranu, što je karakteristika nekrotičnih ćelija.

U cilju proučavanja fenotipskih osobina DC kultivisanih sa NiTi RS trakama, analizirana je ekspresija HLA-DR, CD86, CD83 i CD40 molekula na DC pomoću protočne citometrije. Rezultati prikazani na **grafikonu 4.1.4.2.1.** potvrđuju da kontrolne DC imaju nezreli fenotip, obzirom da imaju nisku ekspresiju CD86 i CD83 molekula. Kultivacija DC na NiTi RS trakama tokom 2 dana indukuje povećanje ekspresije svih analiziranih markera, što je zaključeno na osnovu povećanja procenta CD86⁺ i CD83⁺ ćelija, i gustine ekspresije HLA-DR i CD40 po ćeliji (MFI). Kontrolne NiTi pločice su citotoksične, pa stoga nije analiziran njihov efekat na sazrevanje i funkciju DC u ovim i naredim segmentima studije.

4.1.4.3 Funkcionalne osobine DC kultivisanih sa NiTi RS trakama

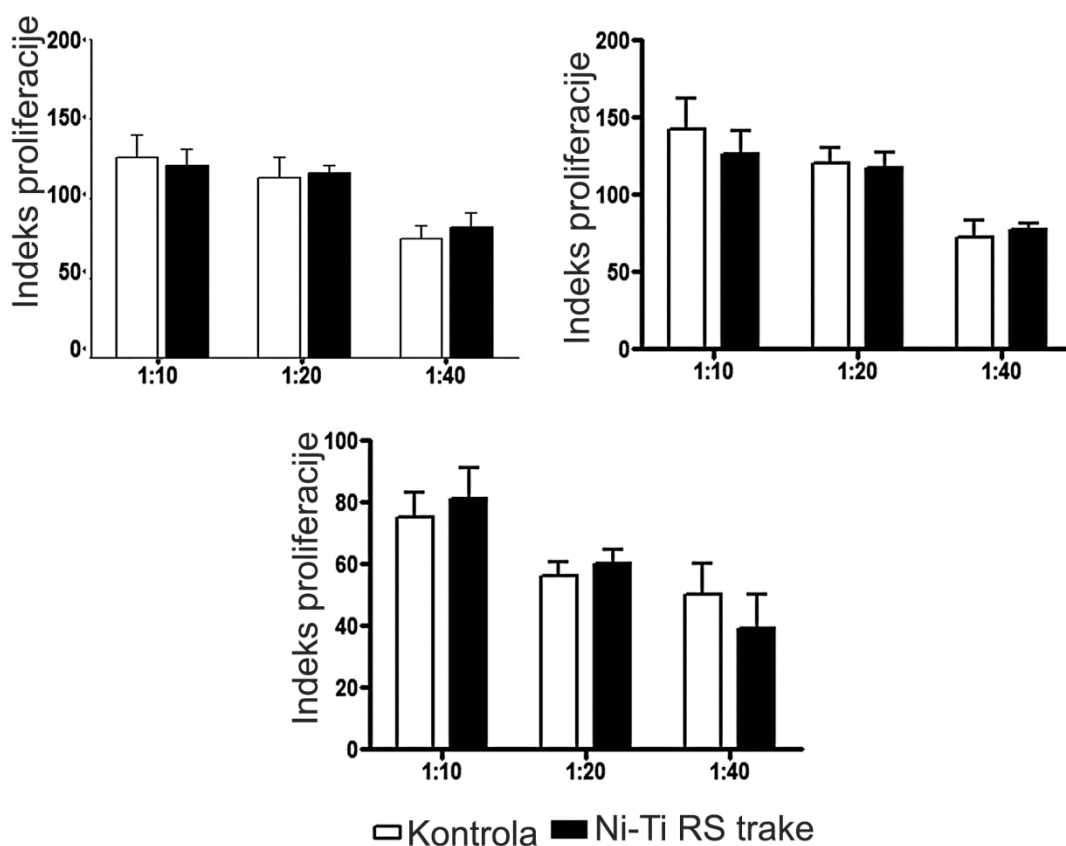
Funkcionalne osobine DC su ispitane na osnovu njihove sposobnosti da produkuju citokine, indukuju proliferaciju Th ćelija (alostimulatorni kapacitet), i polarizuju Th odgovor. U supernatantima kultura DC izmeren je nivo IL-10, IL-12, IL-23 i IL-27 (**Grafikon 4.1.4.3.1.**). Pokazano je da NiTi RS trake stimulišu produkciju IL-10 i IL-27 u poređenju sa kontrolnim kulturama bez legura. Sa druge strane, produkcija IL-12 i IL-23 nije značajnije modifikovana.



Grafikon 4.1.4.3.1. Funkcionalni odgovor nezrelih DC kultivisanih u prisustvu NiTi RS traka.

DC su kultivisane same (Kontrola) ili u prisustvu NiTi RS traka 2 dana. Nakon toga su sakupljeni supernatanti u kojima su određivane koncentracije IL-10, IL-12 IL-23 i IL-27 ELISA metodom. Podaci su prikazani kao srednja vrednost koncentracije citokina \pm SD iz 4 eksperimenta, od kojih je svaki rađen u duplikatu. * $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom (Wilcoxon-ov parni test).

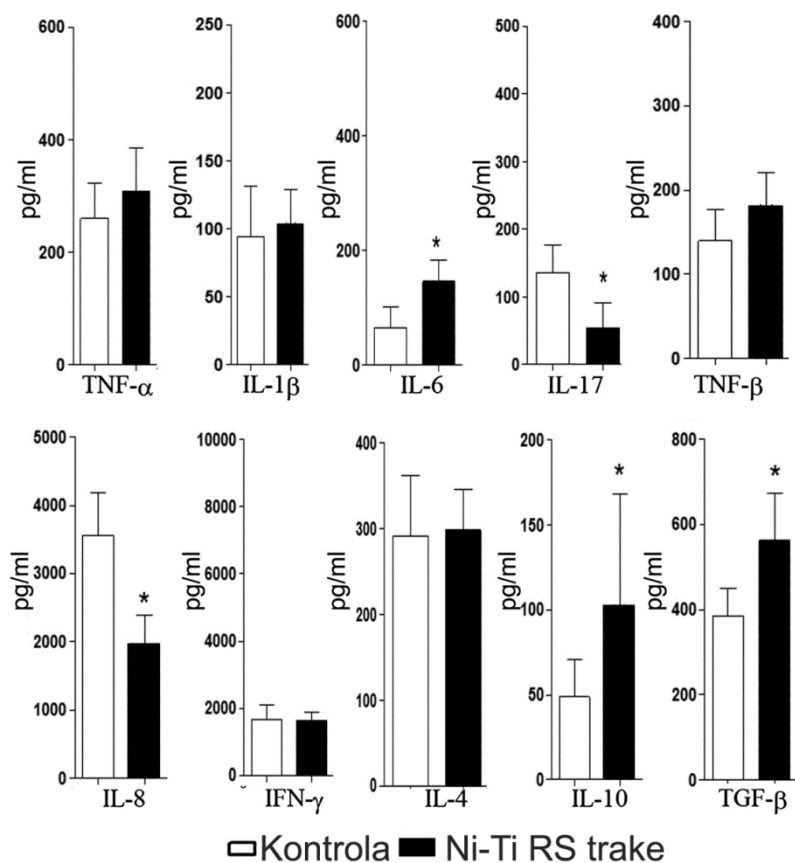
Nakon toga je ispitan alostimulatorni kapacitet DC, prethodno kultivisanih u prisustvu ili odsustvu NiTi RS traka, u alogenoj MLR koristeći prečišćene CD4⁺T ćelije kao respondere. Kao što je prikazano da **grafikonu 4.1.4.3.2.**, DC iz tri donora kultivisane sa NiTi RS trakama imaju sličan alostimulatorni kapacitet kao i kontrolne ćelije.



Grafikon 4.1.4.3.2. Funkcionalni odgovor nezrelih DC kultivisanih u prisustvu NiTi RS traka.

DC su kultivisane same (Kontrola) ili u prisustvu NiTi RS traka 2 dana. Nakon toga su sakupljene ćelije i kokultivisane sa alogenim CD4⁺T ćelijama koristeći različite odnose između dva tipa ćelija. Nakon 5 dana kokulture određena je proliferacija alogenih CD4⁺T ćelija. Prikazani su podaci iz 3 nezavisna eksperimenta, a svaki je predstavljen kao srednji indeks proliferacije ± SD šestoplikata (jednofaktorska ANOVA).

Međutim, analizom citokina u supernatantima DC/CD4 kokultura uočeni su drugačiji rezultati (**Grafikon 4.1.4.3.3.**). Utvrđeno je da je nivo TGF-β, IL-10 i IL-6 značajno viši, dok je nivo IL-8 i IL-17 značajno niži u kokulturama u kojima su DC prethodno kultivisane sa NiTi RS trakama, u poređenju sa kontrolnim CD4⁺/DC kokulturama. Drugi analizirani citokini (IFN-γ, TNF-α, IL-1β i IL-4) nisu značajnije promenjeni.



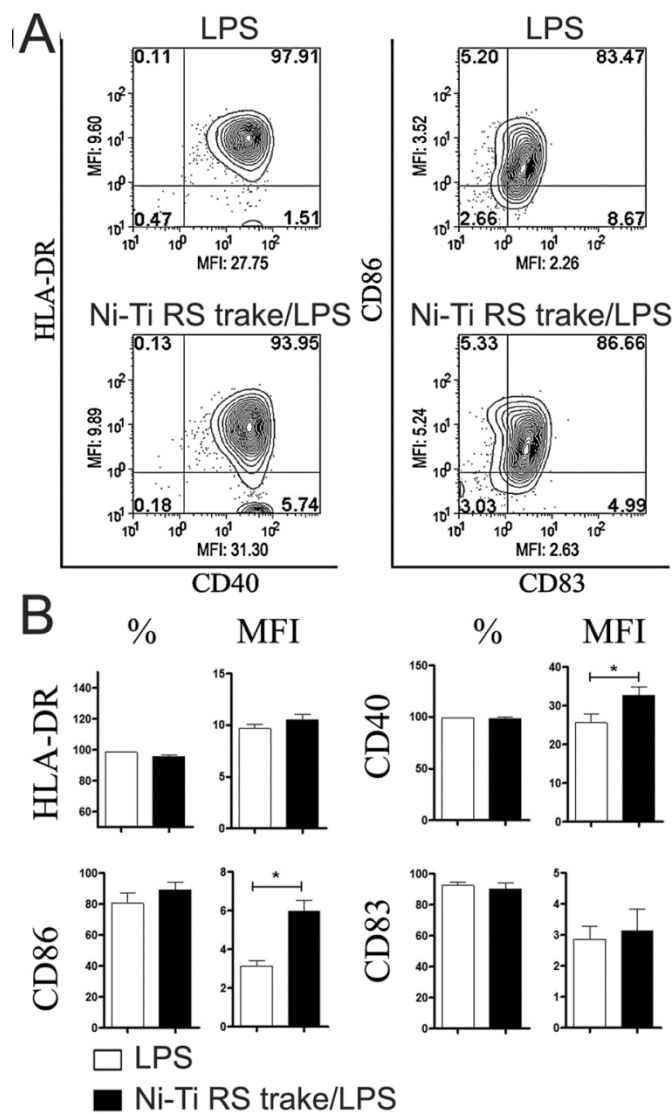
Grafikon 4.1.4.3.3. Funkcionalni odgovor nezrelih DC kultivisanih u prisustvu NiTi RS traka.

DC su kultivisane same (Kontrola) ili u prisustvu NiTi RS traka 2 dana. Nakon toga su sakupljene ćelije i kokultivisane sa alogenim CD4⁺T ćelijama koristeći 1:20 odnos između dva tipa ćelija. Nakon 5 dana kokulture, pri čemu je u poslednjih 8 sati kultura stimulisana sa PMA i jonomicinom, sakupljeni su supernatanti i određen je nivo citokina u ovim kokulturama. Podaci su prikazani kao srednja vrednost citokina \pm SD iz četiri nezavisna eksperimenta, a u svakom su uzorci rađeni u duplikatu.

4.1.4.4 Fenotipske i funkcionalne osobine DC aktiviranih LPS-om u kulturi sa NiTi RS trakama

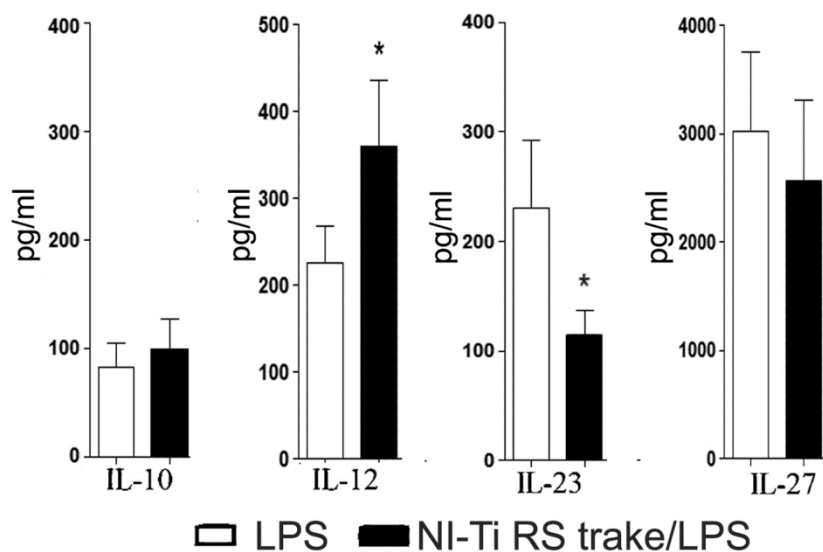
Imunostimulacijska funkcija DC se može postići njihovom maturacijom. Stoga je ispitan efekat NiTi RS traka na imunogeni potencijal DC aktiviranih LPS-om, standardnim maturacionim agensom. Ekspresija HLA-DR, CD86, CD83 i CD40 molekula je praćena nakon 2 dana kultivacije DC u prisustvu LPS-a ili kombinacije LPS i NiTi RS traka (**Grafikon 4.1.4.4.1.**). LPS očekivano indukuje sazrevanje DC, obzirom da povećava ekspresiju svih analiziranih markera. Pokazano je da NiTi RS trake delimično smanjuju ekspresiju HLA-DR, dok značajno povećavaju ispoljavanje CD40 i CD86 kostimulatornih molekula na DC, u poređenju sa kontrolnim ćelijama tretiranim LPS-om.

Analizom supernatanta ovih kultura, uočeno je povećanje produkcije IL-12 od strane DC kultivisanih sa LPS i NiTi RS trakama. Istovremeno je detektovana niža produkcija IL-23 od strane ovih ćelija, u poređenju sa kontrolom (**Grafikon 4.1.4.4.2.**). Osim toga, uočena je veća proliferacija alogenih Th ćelija u kokulturi sa DC kultivisanih na NiTi RS trakama u 1:40 DC/CD4⁺ odnosu kokultivisanih ćelija, u poređenju sa kontrolom (**Grafikon 4.1.4.4.3.**).



Grafikon 4.1.4.4.1. Fenotipska analiza DC kultivisanih u prisustvu NiTi RS traka i LPS-a.

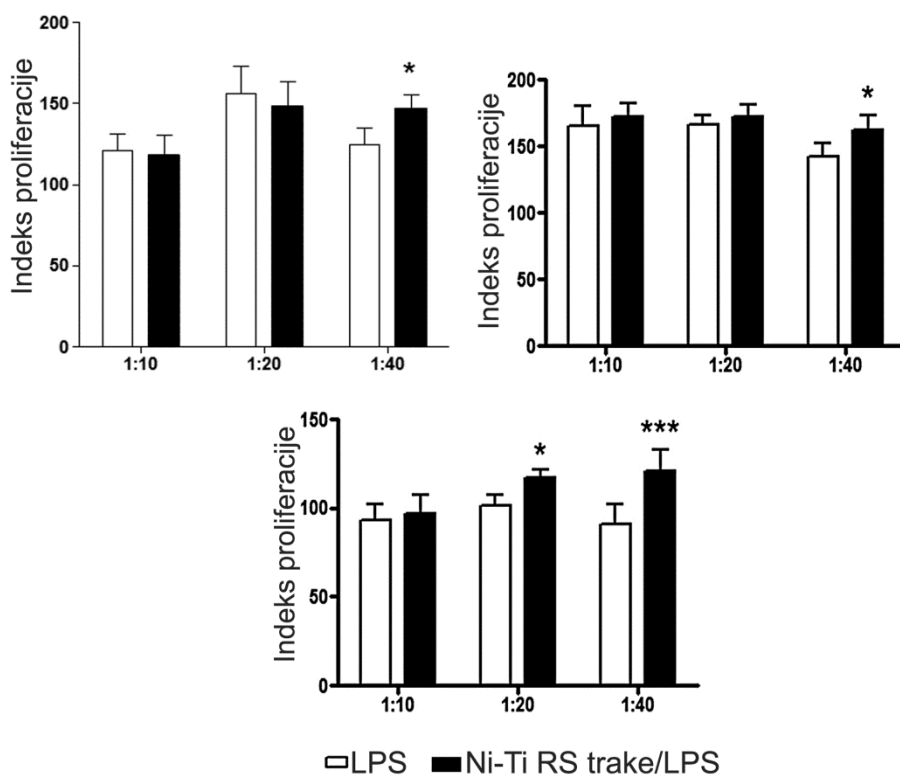
A) Prikazani su konturni dijagrami koji pokazuju procenat pozitivnih ćelija i MFI za navedene površinske molekule. Prikazani su podaci iz jednog eksperimenta. B) Podaci iz sva četiri eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost % ili MFI ± SD. *p<0.05, u poređenju sa kontrolom (Wilcoxon-ov parni test).



Grafikon 4.1.4.4.2. Funkcionalni odgovor DC kultivisanih u prisustvu NiTi RS traka i LPS-

a.

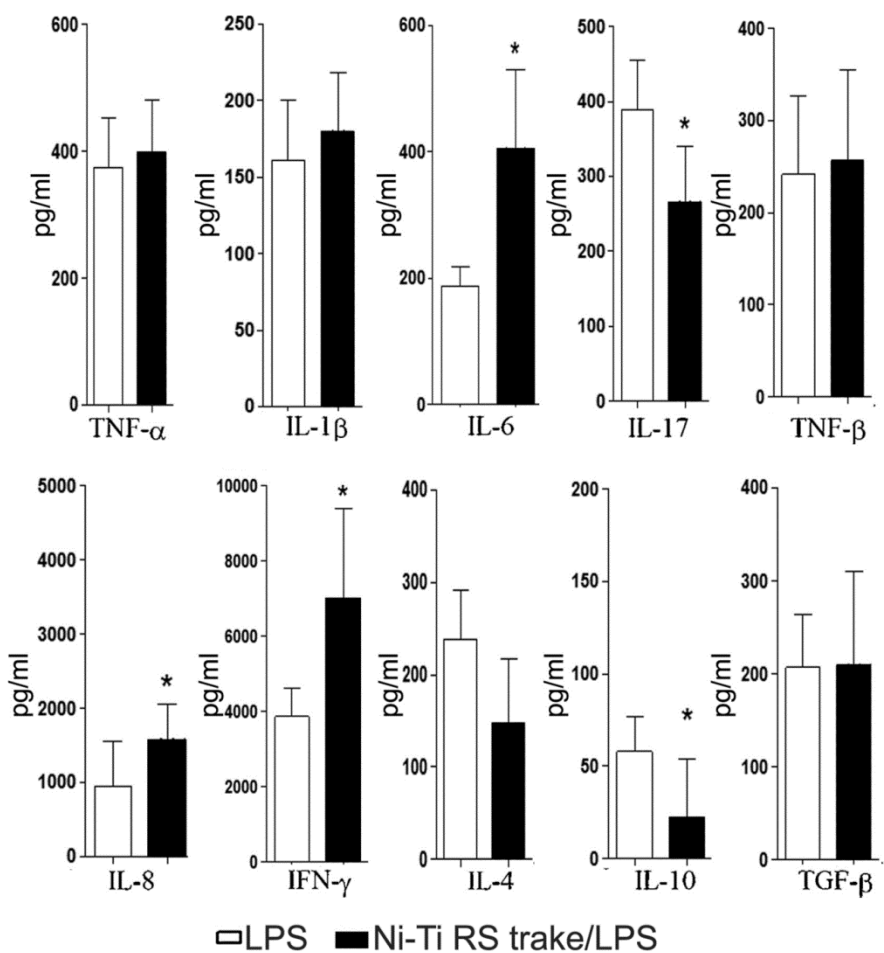
DC su kultivisane u prisustvu LPS-a ili u prisustvu NiTi RS traka i LPS-a tokom 2 dana. Nakon toga su sakupljeni supernatanti u kojima su određivane koncentracije IL-10, IL-12 IL-23 i IL-27 ELISA metodom. Podaci su prikazani kao srednja vrednost koncentracije citokina \pm SD iz 4 eksperimenata, od kojih je svaki rađen u duplikatu. * $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom (Wilcoxon-ov parni test).



Grafikon 4.1.4.4.3. Funkcionalni odgovor DC kultivisanih u prisustvu NiTi RS traka i LPS-a.

DC su kultivisane u prisustvu LPS-a ili u prisustvu NiTi RS traka i LPS-a tokom 2 dana. Nakon toga su sakupljene ćelije i kokultivisane sa alogenim CD4⁺T ćelijama koristeći različite odnose između dva tipa ćelija. Nakon 5 dana kokulture određena je proliferacija alogenih CD4⁺T ćelija. Prikazani su podaci iz 3 nezavisna eksperimenta, a svaki je predstavljen kao srednji indeks proliferacije ± SD šestoplikata (jednofaktorska ANOVA).

Analiza citokina u supernatantima kokultura DC i CD4⁺T ćelija je prikazana na **grafikonu 4.1.4.4.4**. DC kultivisane u prisustvu LPS-a i NiTi RS traka imaju izražen Th1 polarizacioni potencijal u poređenju sa kontrolnim ćelijama stimulisanim LPS-om, obzirom da stimulišu produkciju IFN- γ , IL-6 i IL-8 u kokulturi sa CD4⁺T ćelijama. Za razliku od toga, nivo IL-17 i IL-10 je u ovim kokulturama značajno manji od nivoa u kontrolnim kokulturama. Nivo IL-4 nije značajno promenjen u ovim kokulturama, iako je uočena tendencija smanjenja ovog citokina u odnosu na kontrolu.



Grafikon 4.1.4.4.4. Funkcionalni odgovor nezrelih DC kultivisanih u prisustvu NiTi RS traka i LPS-a.

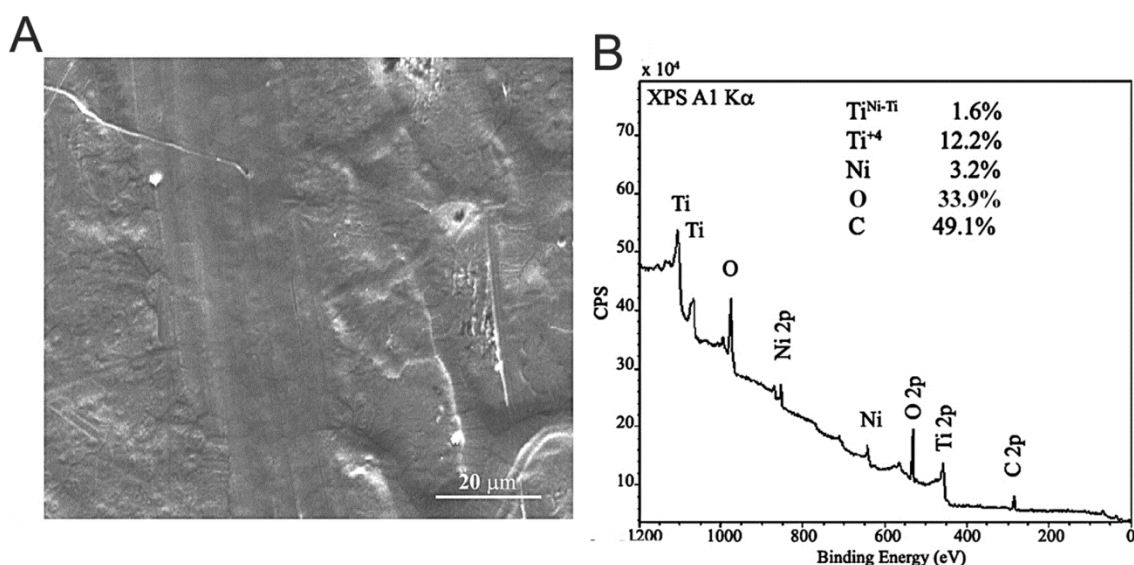
DC su kultivisane u prisustvu LPS-a ili u prisustvu NiTi RS traka i LPS-a tokom 2 dana. Nakon toga su sakupljene ćelije i kokultivisane su sa alogenim CD4⁺T ćelijama koristeći 1:20 odnos između dva tipa ćelija. Nakon 5 dana kokulture, pri čemu je u poslednjih 8 sati kultura stimulisana sa PMA i jonomicinom, sakupljeni su supernatanti i određen je nivo citokina u ovim kokulturama. Podaci su prikazani kao srednja vrednost citokina \pm SD iz četiri nezavisna eksperimenta, a u svakom su uzorci rađeni u duplikatu.

4.1.5 Površinska mikrostruktura i dubinski profil NiTi RS traka

Promene u morfologiji, fenotipu i funkcijama DC nakon kontakta sa NiTi RS trakama su nas motivisale na detaljnija istraživanja mikrostrukture površine ovih legura pre i nakon

kondicioniranja u medijumu za ćelijske kulture. Analiza je sprovedena pomoću SEM, AES i XPS analize. SEM analiza je pokazala da je površina NiTi RS traka relativno glatka na većini analiziranih područja, iako su uočene sporadične izbočine na nekoliko mesta (**Slika 4.1.5.1a**).

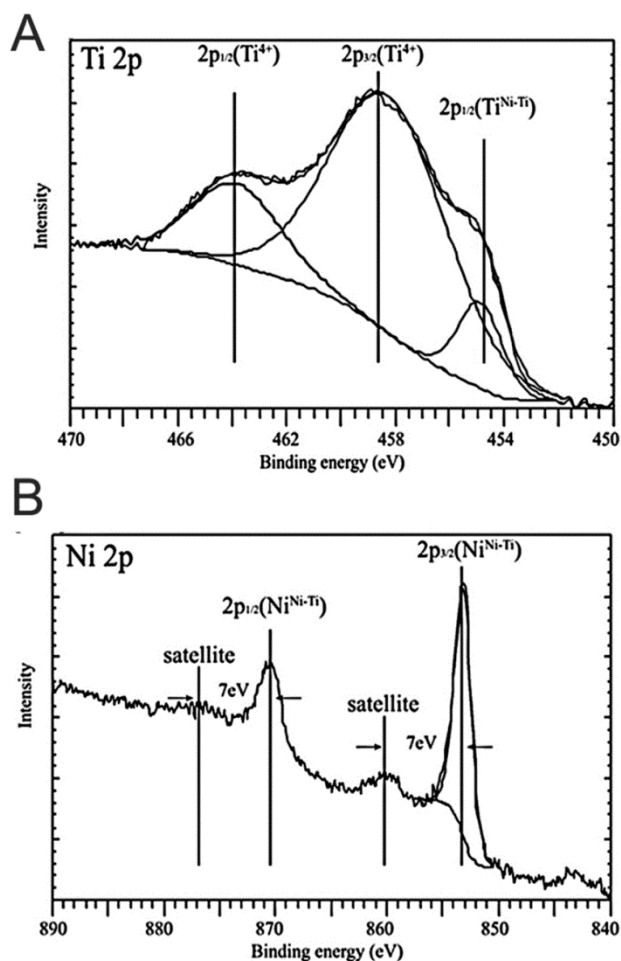
XPS analiza NiTi RS traka je izvršena nakon 5 minutnog rasprašivanja površinskih kontaminanata Ar⁺ jonima na 3 keV. XPS analiza je pokazala da su dominantni elementi na površini NiTi RS traka Ni, Ti, O i C (**Slika 4.1.5.1b**). Pokazano je da je površina NiTi RS traka prekrivena kontinuiranim slojem Ti-oksida. Na osnovu sprektra vezujućih energija elektrona ekscitiranih X zracima, uočeno je da su Ni i Ti u intermetalnoj vezi prisutni u koncentracijama od 3.2 at.% (Ni), odnosno, 1.6 at.% (Ti).



Slika 4.1.5.1. Površina NiTi RS traka A) analizirana SEM metodom pre kondicioniranja B) XPS metodom male rezolucije.

Zatim je primenjena XPS analiza visoke rezolucije u cilju preciznijeg određivanja energija vezivanja Ni i Ti. Ti 2p XPS spektar (**Grafikon 4.1.5.1a**) se najbolje uklapa u 3 teorijske krive. Dve poklapajuće krive imaju maksimum energije vezivanja na 458.7 ± 0.4 eV i 463.9 ± 0.5 eV, što odgovara Ti⁴⁺ (TiO₂) 2p_{3/2}, odnosno Ti⁴⁺ (TiO₂) 2p_{1/2}. Treća kriva

sa maksimalnom energijom vezivanja na 454.7 ± 0.7 eV odgovara Ti u intermetalnoj vezi (Ti^{NiTi}) $2p_{1/2}$. XPS visoke rezolucije za Ni 2p (**Grafikon 4.1.5.1b**) se najbolje uklapa sa 2 teorijske krive. Energije vezivanja na 858.8 ± 0.3 eV i 870.5 ± 0.4 eV, odgovaraju Ni^{NiTi} $2p_{3/2}$ i $2p_{1/2}$ u intermetalnoj vezi. Treba istaći da nije detektovan pik koji odgovara oksidu Ni (≈ 875 eV) na površini NiTi RS traka. Detektovana je i mala satelitska struktura, karakteristična za NiTi legure [566], koja je odvojena od glavnih pikova za oko 7 eV.

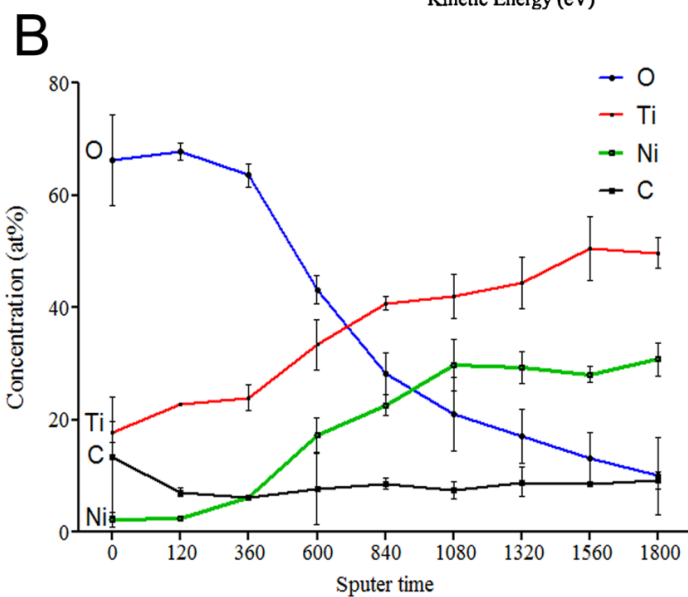
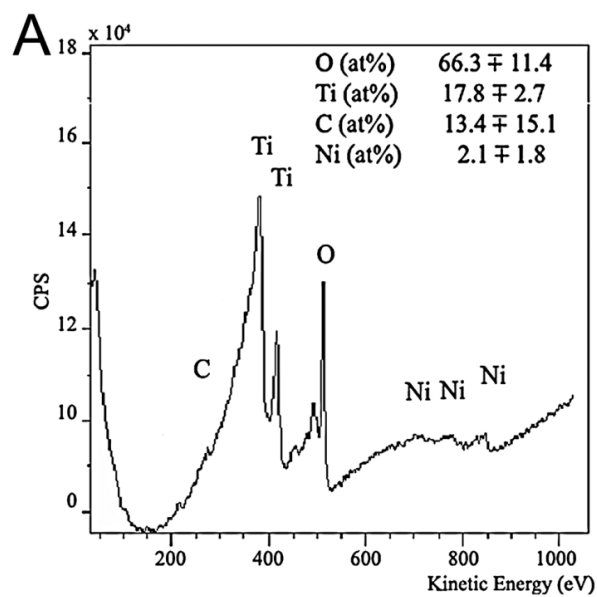


Grafikon 4.1.5.1. Površina NiTi RS traka analizirana XPS-om visoke rezolucije.

A) XPS Spektar Ti2p vezivne energije je uklopljen sa 3 teorijske krive. Linijama je označena pozicija vrhova ovih kriva. B) XPS Spektar Ni2p vezivnih energija je najbolje uklopljen sa 2 teorijske krive. Linijama je označena pozicija vrhova ovih krivi.

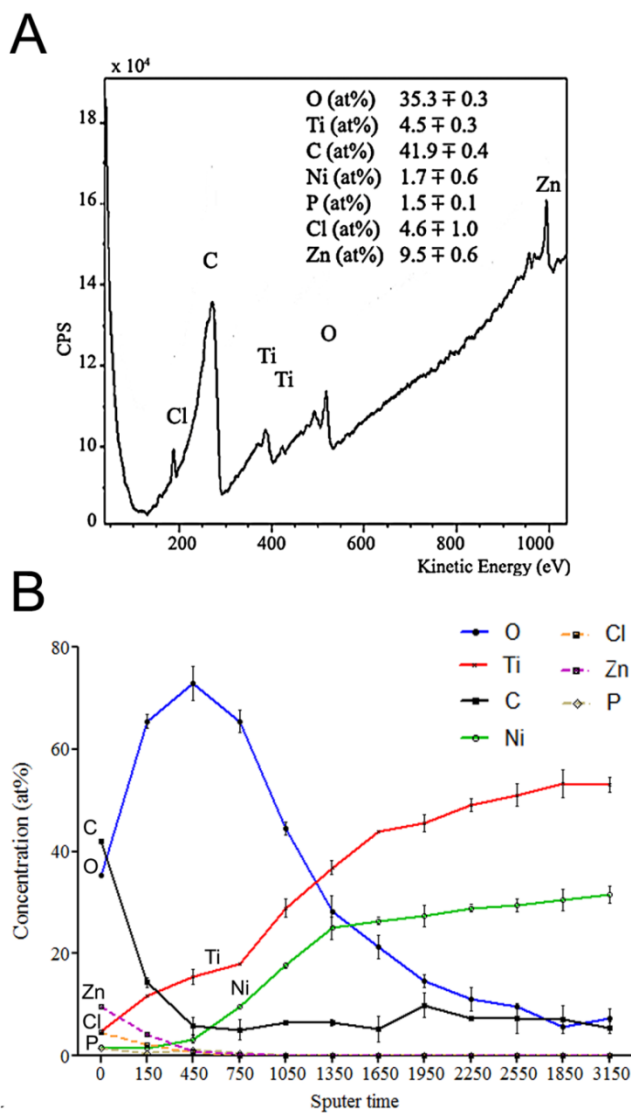
Dubinski profil NiTi RS traka je određen AES metodom u cilju definisanja debljine oksidnog sloja. Nekondicionirani uzorci nisu rasprašeni Ar^+ pre analize, pa je koncentracija Ni jona na površini traka znatno manja, a koncentracija O veća, nego ona koja je dobijena XPS analizom (**Grafikon 4.1.5.2a**). Dubinski profil kiseonika je pokazao da je njegova koncentracija najveća na površini NiTi RS legura. Na ovim mestima su Ni i Ti prisutni u malim koncentracijama. Sa dubinom, koncentracija O se smanjuje, dok se koncentracije Ni i Ti povećavaju do stabilnog nivoa nakon 30 minuta raspršivanja (**Grafikon 4.1.5.2b**). Debljina Ti-oksidnog sloja NiTi RS traka, uzimajući onu dubinu na kojoj se koncentracija O smanji za 50% od maksimalne vrednosti, iznosi oko 12 nm. Tačkasta analiza AES-om nije pokazala značajne razlike u sastavu između ravnih delova legura i onih koji su izbočeni.

Nakon 2 dana kondicioniranja NiTi RS traka u potpunom medijumu ponovljena je AES analiza. Pokazano je da je koncentracija O, Ti i Ni na površini znatno manja, a koncentracija C znatno veća od onih koje su detektovane pre kondicioniranja. Na više od 70% površine NiTi RS traka nije detektovan Ni, a **grafikon 4.1.5.3a** pokazuje takav jedan primer. Međutim, nakon kondicioniranja je detektovano prisustvo novih elemenata na površini, kao što su P, Cl, i Zn. Nakon rasprašivanja površinskih slojeva kondicioniranih legura jonima Ar^+ tokom 7.5 minuta, koncentracije ovih elemenata su postale nedetektabilne (**Grafikon 4.1.5.3b**). Na osnovu toga, procenjena debljina adsorbovanog sloja iznosi oko 9 nm. Dubina oksidnog sloja, počevši od mesta sa najvećom koncentracijom O, iznosi oko 15nm.



Grafikon 4.1.5.2. Dubinski profil NiTi RS traka pre kondicioniranja u medijumu za ćelijske kulture u toku 2 dana.

A) Reprezentativni AES profil. B) Odgovarajući AES dubinski profil legure pre kondicioniranja, gde je svaka tačka dobijena nakon jednog ciklusa raspršivanja Ar^+ jonima. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost koncentracije \pm SD iz 3 različita AES spektra dobijena tokom jedne analize.



Grafikon 4.1.5.3. Dubinski profil NiTi RS posle kondicioniranja u medijumu za ćelijske kulture u toku 2 dana.

A) Reprezentativni AES profil. B) Odgovarajući AES dubinski profil legure posle kondicioniranja, gde je svaka tačka dobijena nakon jednog ciklusa raspršivanja Ar^+ jonima. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost koncentracije \pm SD iz 3 različita AES spektra dobijena tokom jedne analize.

4.2. BIOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULATORNE OSOBINE NANOČESTICA ZLATA

Zbog male veličine nanomaterijala, koja je ekvivalentna subćelijskim komponentama i makromolekulskim sistemima ćelija, nanomaterijali su vrlo atraktivni u biomedicini kao sistemi za dostavu lekova i biomolekula i kontrastni agensi u dijagnostici. Biokompatibilnost nanomaterijala ne zavisi samo od fizičko-hemijskih karakteristika samog materijala, već i od njihove nanometarske veličine. Naime, iako je zlato inertno za biološke sisteme [567], nanočestice zlata (GNP) mogu interagovati sa različitim ćelijskim komponentama i indukovati različite biološke efekte, od toksičnog [568] do imunomodulatornog efekta [569]. Loša biokompatibilnost GNP može posledica i citotoksičnih redukujućih/stabilizirajućih agenasa koji se koriste pri njihovoj sintezi [570], zbog čega se konstantno razvijaju nove metode sinteze GNP. U ovom radu je po prvi put korišćena ultrasonična sprej piroliza (USP) za sinzetu GNP iz recikliranog zlatnog nakita, u kojoj je H₂ korišćen kao redukujući agens (**odjeljak 1.6.2.5. i 3.2.1.**). Obzirom da su mikrostruktura, biokompatibilnost i imunomodulatorni efekti GNP dobijenih USP metodom nepoznati, cilj je bio ispitati ove osobine GNP radi njihove potencijalne primene u biomedicini.

4.2.1 Biokompatibilnost i mikrostrukturne osobine GNP dobijenih USP metodom

Kao što je opisano u **odjeljku 3.2.1**, sekundarni zlatni nakit je rastovren u azotnoj i hlornoj kiselini, nakon čega je ultrasoničnim generatorom od 2.5 ili 0.8 MHz generisan aerosol. Aerosol je pomoću vodonične/azotne atmosfere prenesen u vrući reaktor u kome su kapljice aerosoli redukovane do nanočestica. Nanočestice su nakon termalne dekompozicije na različitim temperaturama sakupljene iz reakcione cevi i u boci sa vodom i alkoholom (5 frakcija GNP). Nakon sinteze, mikrostruktura GNP je ispitivana SEM/EDX, dok je biokompatibilnost ispitivana u kulturama timocita i splenocita pacova, i L929 ćelija koristeći različite koncentracije GNP (10-100 µg/ml).

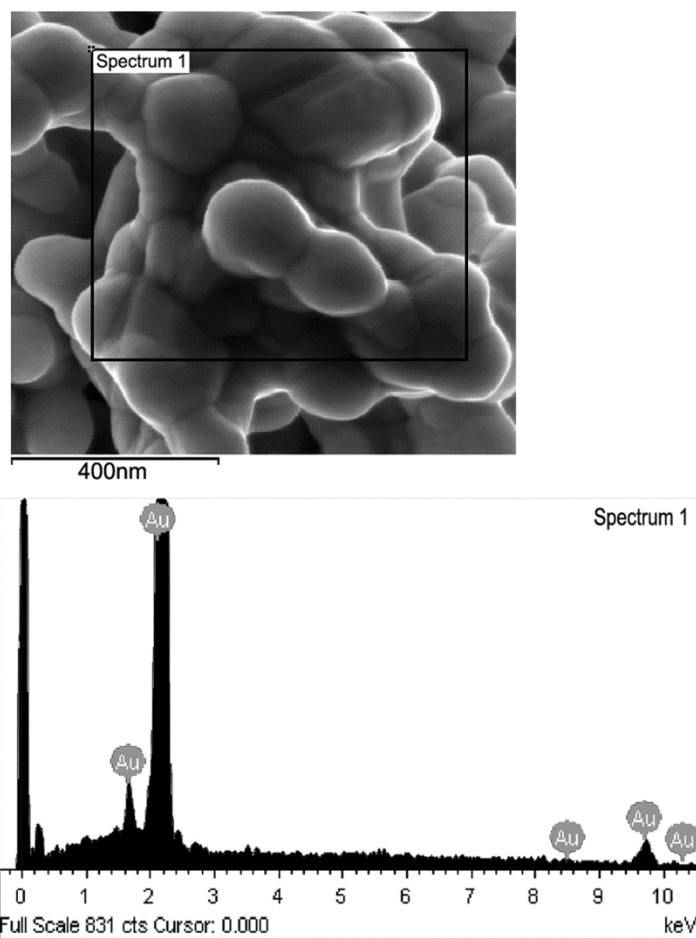
4.2.1.1 Mikrostruktorna analiza frakcija GNP

U narednom koraku je ispitana mikrostruktura 5 dobijenih frakcija GNP. Rezultati mikrostrukturne i elementalne analize ovih frakcija (SEM/EDX) su prikazani u **Tabeli 4.2.1.1.1** i na slikama **4.2.1.1.1-4.2.1.1.5**.

Tabela 4.2.1.1.1 Sadržaj metala u frakcijama GNP

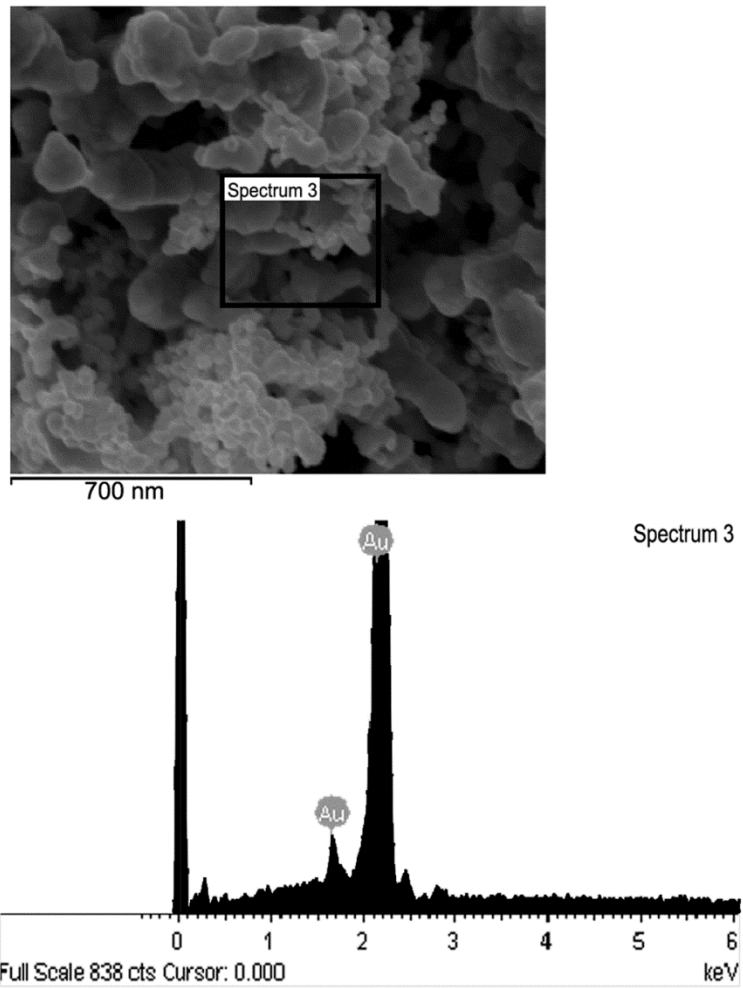
Elementi	Fr. 1 (Wt% / At%)	Fr. 2 (Wt% / At%)	Fr. 3 (Wt% / At%)	Fr. 4 (Wt% / At%)	Fr. 5 (Wt% / At%)
Au	100.0 / 100.0	100.0 / 100.0	99.1 / 97.3	61.6 / 59.4	57.8 / 28.7
Cu			0.9 / 2.7		19.2 / 28.1
Ag				35.4 / 31.5	
Ni					14.5 / 24.3
Zn					1.9 / 2.7
Fe					0.2 / 0.6
Na				0.2 / 1.2	
In					0.2 / 0.2
Cl				2.7 / 7.8	2.9 / 4.1
O					1.5 / 5.3
C					1.7 / 5.9

Date vrednosti predstavljaju srednje vrednosti 20 različitih merenja. Wt%-maseni procenat ; At%-atomski procenat



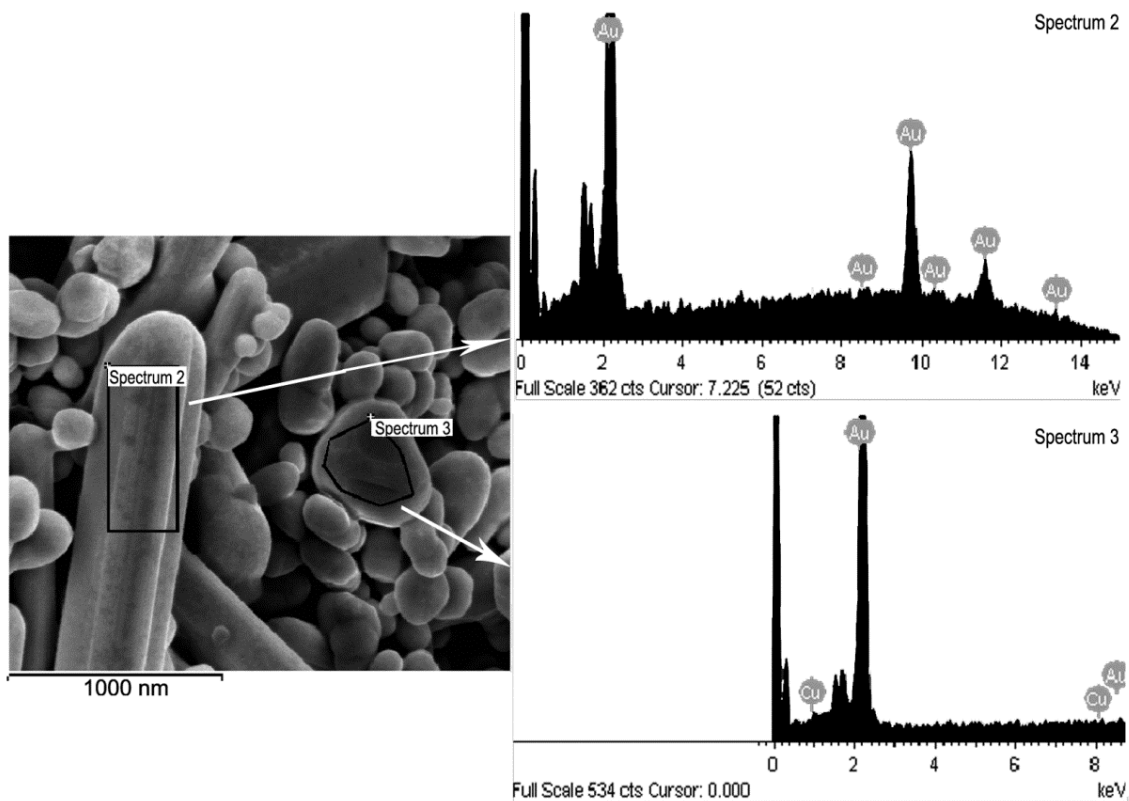
Slika 4.2.1.1.1 Frakcija 1 GNP.

SEM slika i EDX elementalna analiza jednog reprezentativnog spektra.



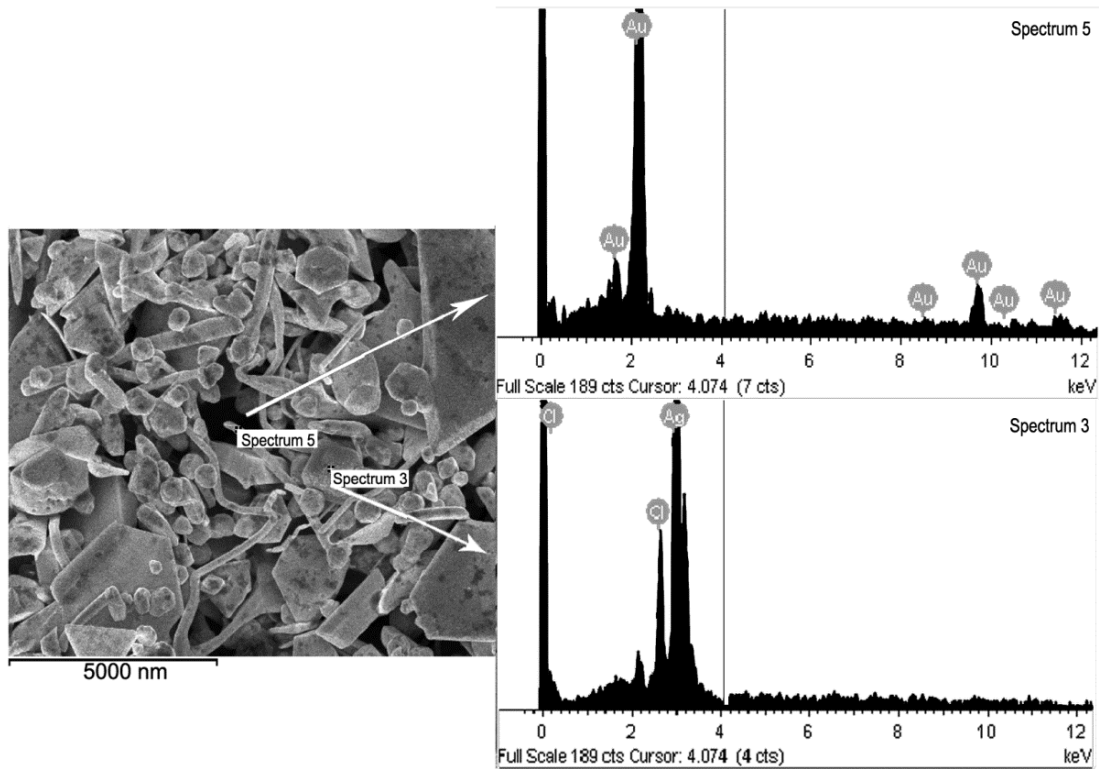
Slika 4.2.1.1.2. Frakcija 2 GNP.

SEM slika i EDX elementalna analiza jednog reprezentativnog spektra.



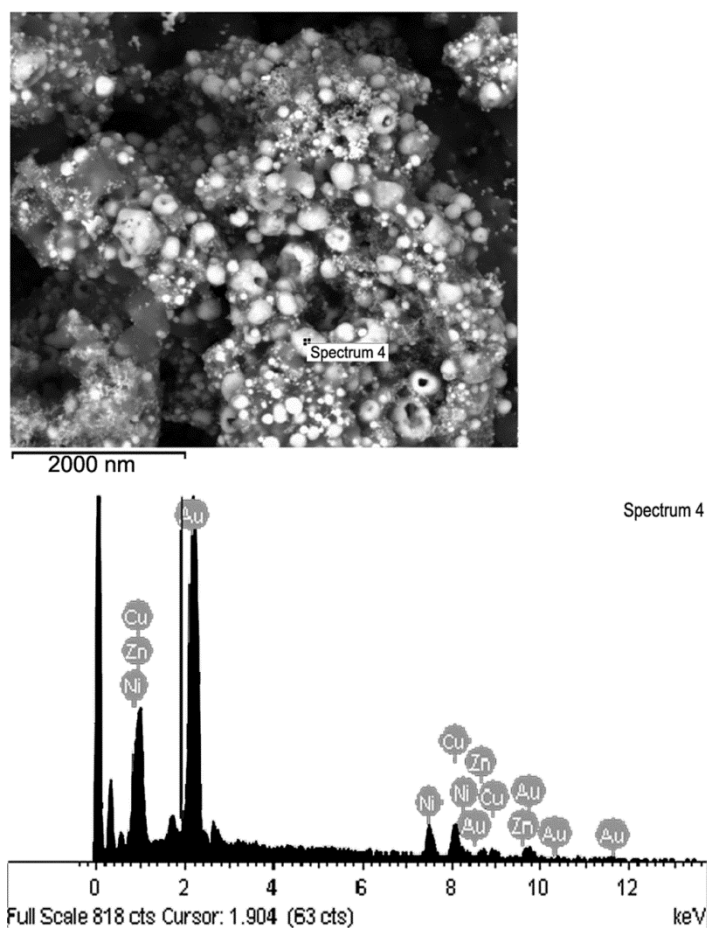
Slika 4.2.1.1.3. Frakcija 3 GNP.

SEM slika i EDX elementalna analiza jednog reprezentativnog spektra.



Slika 4.2.1.1.4. Frakcija 4 GNP.

SEM slika i EDX elementalna analiza jednog reprezentativnog spektra.



Slika 4.2.1.1.5. Frakcija 5 GNP.

SEM slika i EDX elementalna analiza jednog reprezentativnog spektra.

Fizički opis dobijenih frakcija GNP je sumiran je u **Tabeli 4.2.1.1.2**. Uočeno je da frakcija 1, koja je sintetisana na 300°C u vodoničnoj atmosferi, sadrži čiste aglomerirane GNP (120 ± 51 nm). Ova frakcija je sakupljena je sa zida reakcione cevi. Frakcija 2 je sintetisana pod dejstvom veće ultrasonične frekvencije, i sakupljena je na sličan način. Frakcija 2 takođe sadrži samo čiste zlatne, delimično aglomerirane, nanočestice koje su manje po veličini u odnosu na frakciju 1 (97.3 ± 49.8 nm). Frakcija 3, sintetisana na 800°C u vodoničnoj atmosferi, sadrži štapičaste nanočestice (dužine $3570 \text{ nm} \pm 1960 \text{ nm}$ i širine $700.5 \text{ nm} \pm 200.3 \text{ nm}$) od čistog zlata, sferične nanočestice od čistog zlata ($362.0 \pm 169 \text{ nm}$) i neke nanočestice zlata legirane sa Cu. Frakcija 4 se sastoji od partikula zlata mikronske

veliĉine, nepravilnog oblika, i sadrži je kontaminante AgCl. Ova frakcija je precipitirala pre termalne dekompozicije / atomizacije. Frakcija 5 sadrži sferiĉne ĉestice ($253 \text{ nm} \pm 178.3 \text{ nm}$), sakupljena je iz boce sa vodom i alkoholom i sadrži legirajuće elemente (Cu, Zn, Ni, Fe, In) kao i kontaminante kao što su Cl, O i C, koji potiču iz azotne i hloridne kiseline.

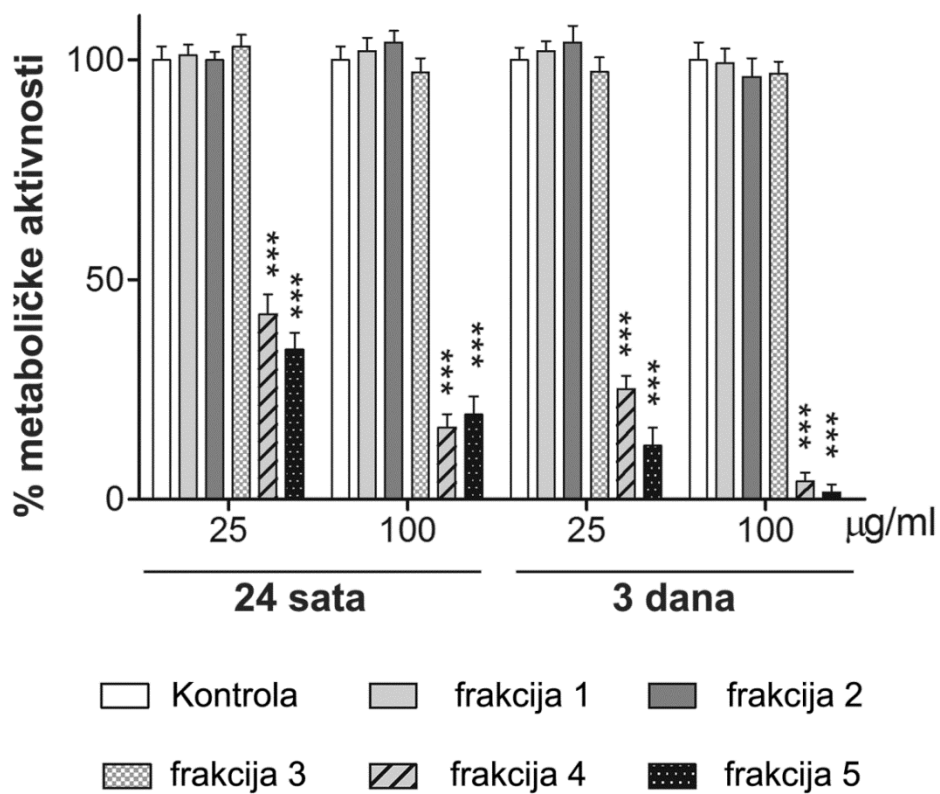
Tabela 4.2.1.1.2. Morfološke i hemijske osobine 5 frakcija GNP dobijenih USP

Naziv	Oblik	Veliĉina	Aglomeracija	Sastav (At%)
Frakcija 1	Sferiĉne	D: $120.1 \pm 51.0 \text{ nm}$	aglomerirane	Au (100 %)
Frakcija 2	Sferiĉne	D: $97.3 \pm 49.8 \text{ nm}$	Delimiĉno aglomerirane	Au (100 %)
Frakcija 3	Štapiĉaste	L: $3570 \pm 1960 \text{ nm}$ W: $700.5 \pm 200.3 \text{ nm}$	Nisu	Au (100%)
	Sferiĉne	D: $362.0 \pm 169.0 \text{ nm}$	aglomerirane	Au (97.1%); Cu (2.7%)
Frakcija 4	Sferiĉne	D: $1.003 \pm 0.237 \mu\text{m}$	Nisu aglomerirane	Au (59.4%); Ag (31.5%); Na (1.2%); Cl (7.8%)
	Štapiĉaste	L: $6.291 \pm 2.275 \mu\text{m}$ W: $0.682 \pm 0.191 \mu\text{m}$		
	Diskoidalne	A: $125.676 \pm 99.966 \mu\text{m}^2$		
Frakcija 5	Sferiĉne	D: $253.0 \pm 178.3 \text{ nm}$	Delimiĉno aglomerirane	Au (28.7%); Cu (28.1%); Ni (24.3%); Zn (2.7%); Fe (0.6%); In (0.2%); Cl (4.1%); O (5.3%); C (5.9%)

D-dijametar; L-dužina; W-Širina; A-površina; At%- atomski procenat. Analiza je urađena na osnovu SEM/EDX analize najmanje 100 nanoĉestica.

4.2.1.2. Citotoksičnost frakcija GNP na modelu pacovskih timocita i L929 ćelija

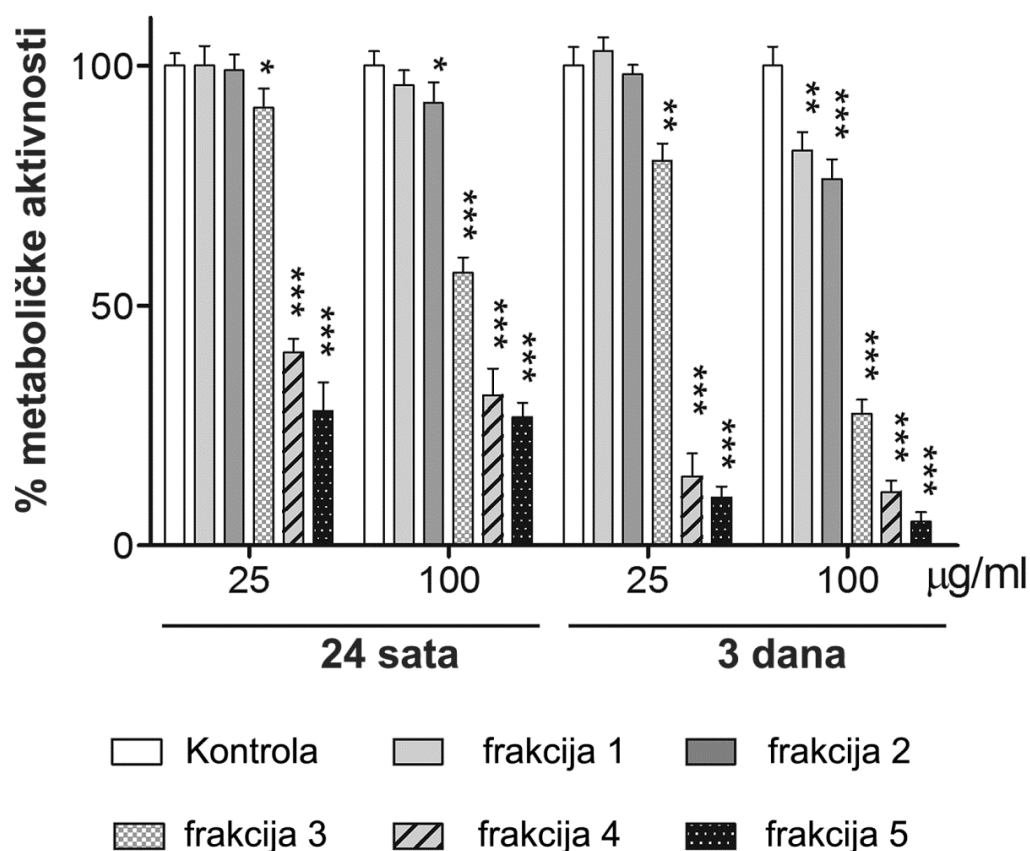
Citotoksičnost frakcija GNP je proučavana na pacovskim timocitima, kao modelu neproliferišućih ćelija, i mišijim L929 ćelijama, kao modelu proliferišućih ćelija. MTT test je pokazao da frakcije 1, 2 i 3, u obe primenjene koncentracije (25 µg/ml i 100 µg/ml) nisu citotoksične za timocite (**Grafikon 4.2.1.2.1**).



Grafikon 4.2.1.2.1. Efekti različitih frakcija GNP na metaboličku aktivnosti pacovskih timocita.

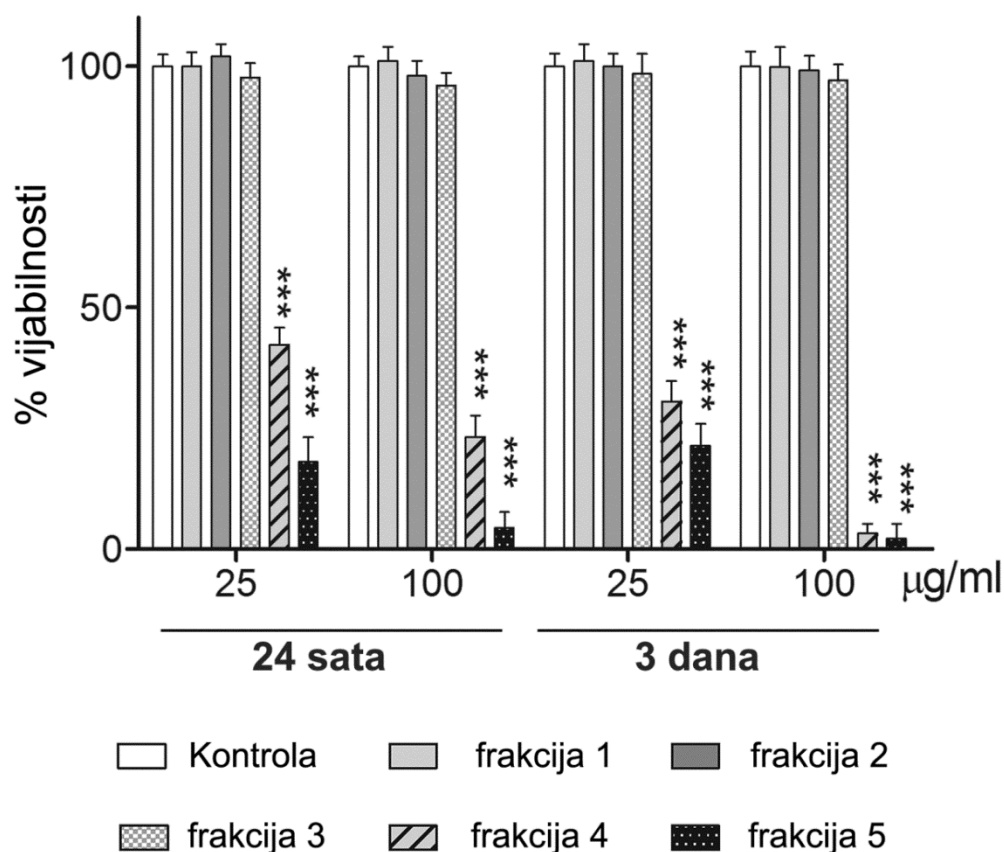
Timociti su kultivisani u prisustvu 5 frakcija GNP (25 ili 100 µg/ml) tokom 24 sata ili 3 dana, nakon čega je urađen MTT test. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD procenta metaboličke aktivnosti šestoplikata iz jednog reprezentativnog eksperimenta. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ u poređenju sa kontrolom.

Veće koncentracije frakcija 1 i 2, i manje koncentracije frakcije 3, imaju umereni inhibitorski efekat na metaboličku aktivnost L929 ćelija, naročito nakon produžene kultivacije (3 dana) (**Grafikon 4.2.1.2.2**). Inhibitorski efekat frakcije 2 na metaboličku aktivnost L929 ćelija je jači nego efekat frakcije 1. Veća koncentracija frakcije 3 smanjuje metaboličku aktivnost ćelija do 80% trećeg dana, u poređenju sa kontrolom. Frakcija 4 i 5 značajno smanjuju metaboličku aktivnost i timocita i L929 ćelija, a jači efekat je postignut sa većim koncentracijama GNP i dužim kultivisanjem ovih ćelija sa frakcijama 4 i 5.



Grafikon 4.2.1.2.2. Efekti različitih frakcija GNP na metaboličku aktivnost L929 ćelija. L929 ćelije su kultivisane u prisustvu 5 frakcija GNP (25 ili 100 µg/ml) tokom 24 sata ili 3 dana, nakon čega je urađen MTT test. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD procenta metaboličke aktivnosti šestoplikata iz jednog reprezentativnog eksperimenta. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005 u poređenju sa kontrolom.

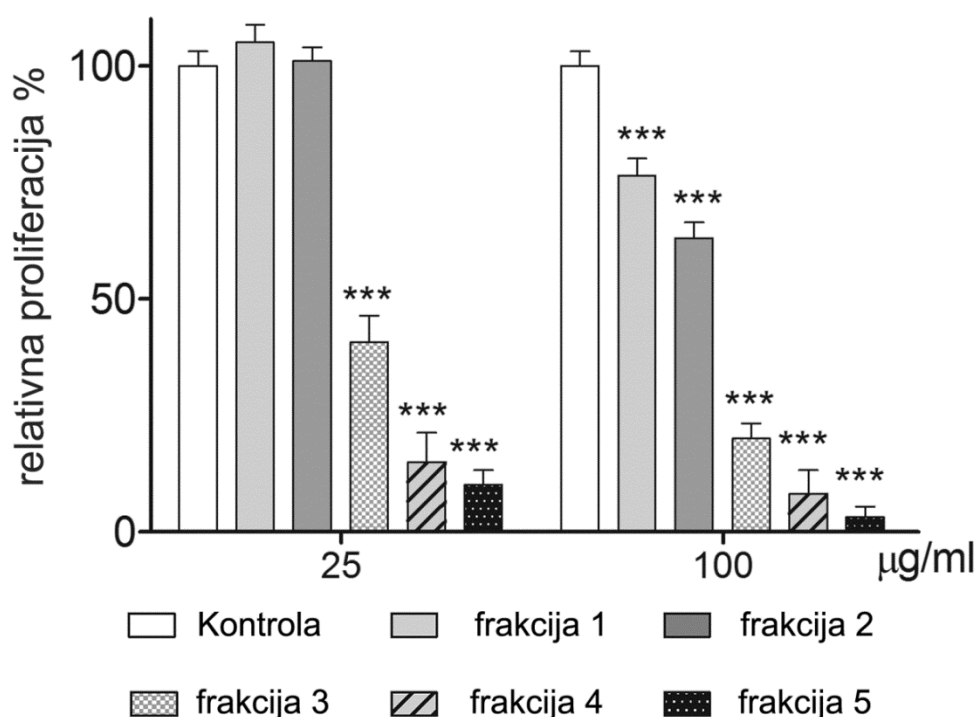
Da bismo proverili da li je inhibicija metaboličke aktivnosti L929 ćelija posledica citotoksičnosti ili antiproliferativnog efekta GNP, urađeni su testovi proliferacije i vijabilnosti. Rezultati prikazani na **grafikonu 4.2.1.2.3** ukazuju na to da nijedna od koncentracija frakcije 1, 2 i 3 nije toksična za L929 ćelije, obzirom da je vijabilnost ovih ćelija nije promenjena u odnosu na kontrolu. Međutim, obe koncentracije frakcije 4 i 5 ispoljavaju citotoksični efekat, obzirom da je ćelijska vijabilnost značajno smanjena (25 µg/ml) ili potpuno redukovana (100 µg/ml) u ovim kulturama L929 ćelija.



Grafikon 4.2.1.2.3. Efekti različitih frakcija GNP na vijabilnost L929 ćelija.

L929 ćelije su kultivisane u prisustvu 5 frakcija GNP (25 ili 100 µg/ml) tokom 24 sata, nakon čega vijabilnost izmerena bojenjem ćelija Tripan plavim. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD procenta vijabilnosti triplikata u odnosu na kontrolu (100%). ***p<0.005 u poređenju sa kontrolom.

U proliferativnom testu je nađeno da veće koncentracije svih frakcija GNP suprimiraju ćelijski rast, pri tome GNP frakcije 1 imaju najmanji, a GNP frakcije 5 najveći inhibitorski efekat (**Grafikon 4.2.1.2.4**). Niže koncentracije frakcije 1 i 2 nisu inhibitorne, dok veće koncentracije ovih GNP, kao i manje doze frakcija 3, 4 i 5, ispoljavaju jak anti-proliferativni efekat.



Slika 4.2.1.2.4. Efekti različitih frakcija GNP na proliferativnu sposobnost L929 ćelija.

L929 ćelije su kultivisane u prisustvu 5 frakcija GNP (25 ili 100 µg/ml) tokom 3 dana, a tretirane su ^3H timidinom poslednjih 18 sati kulture. Proliferacija je izmerena na scintilatnom β brojaču i izražena je kao srednja vrednost relativne proliferacije u odnosu na kontrolu (100%) \pm SD triplikata iz reprezentativnog eksperimenta *** $p < 0.005$ u poređenju sa kontrolom.

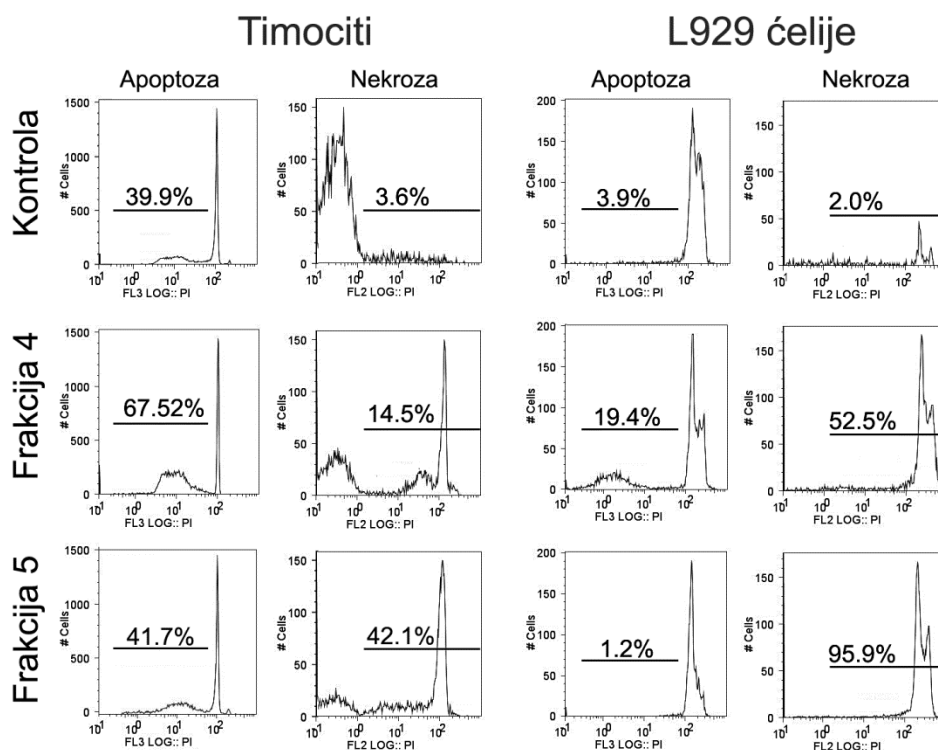
Nakon toga je ispitano da li je citotoksični efekat frakcija GNP na timocite i L929 ćelije posledica nekroze ili apoptoze ćelija. U **tabeli 4.2.1.2.1** i na **grafikonu 4.2.1.2.5**, je pokazano da je spontana apoptoza timocita u kontrolnim kulturama relativno visoka, dok je

procenat nekrotičnih ćelija nizak. Frakcije 1, 2 i 3 ne indukuju ni nekrozu ni apoptozu timocita. Frakcija 4 izaziva uglavnom apoptozu ovih ćelija, dok je frakcija 5, pogotovo u visokim koncentracijama, indukuje primarno nekrozu timocita. Apoptoza i nekroza kontrolnih L929 ćelija je niska, i nije značajno modifikovana sa GNP frakcijama 1, 2 i 3. Niske koncentracije frakcije 4 izazivaju apoptozu i nekrozu L929 ćelija. Veće koncentracije frakcije 4, i obe koncentracije frakcije 5, izazivaju nekrozu skoro svih L929 ćelija.

Tabela 4.2.1.2.1. Efekti različitih frakcija GNP na apoptozu i nekrozu pacovskih timocita i L929 ćelija.

	Timociti		L929 ćelije	
	Apoptoza (%)	Nekroza (%)	Apoptoza (%)	Nekroza (%)
Kontrola	35.1 ± 3.2	5.0 ± 1.6	1.1 ± 0.1	3.6 ± 1.0
Frakcija 1 (25 µg/ml)	33.9 ± 3.0	4.5 ± 1.6	0.8 ± 0.1	4.1 ± 1.0
(100 µg/ml)	34.5 ± 2.9	5.0 ± 1.4	1.2 ± 0.0	2.8 ± 0.1
Frakcija 2 (25 µg/ml)	37.2 ± 2.8	5.2 ± 1.7	1.0 ± 0.0	3.8 ± 1.2
(100 µg/ml)	36.9 ± 3.0	5.7 ± 1.3	0.9 ± 0.1	5.5 ± 0.8
Frakcija 3 (25 µg/ml)	40.0 ± 2.8	6.3 ± 1.5	1.4 ± 0.1	4.8 ± 1.2
(100 µg/ml)	43.5 ± 4.5	6.2 ± 0.7	1.3 ± 0.2	3.8 ± 2.2
Frakcija 4 (25 µg/ml)	70.2 ± 3.6 ***	13.1 ± 2.9 **	18.2 ± 1.4 ***	56.2 ± 4.0 ***
(100 µg/ml)	59.9 ± 3.0 ***	16.3 ± 2.5 ***	2.0 ± 0.0	96.2 ± 0.1 ***
Frakcija 5 (25 µg/ml)	61.2 ± 2.4 ***	20.2 ± 2.7 ***	0.5 ± 0.0	96.8 ± 0.2 ***
(100 µg/ml)	45.7 ± 4.2 ***	46.1 ± 2.5 ***	0.2 ± 0.0	100.0 ± 0.0 ***

Ćelije su kultivisane sa različitim koncentracijama GNP frakcija. Kontrolne ćelije su kultivisane bez GNP. Nakon 24 sata (timociti) ili 3 dana (L929), ćelije su obojene PI kako je opisano u poglavlju 3, i detektovana je nekroza ili apoptoza. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost ± SD šestoplikata (timociti) li triplikata (L929 ćelije). **p<0.01, ***p<0.005 u poređenju sa kontrolom



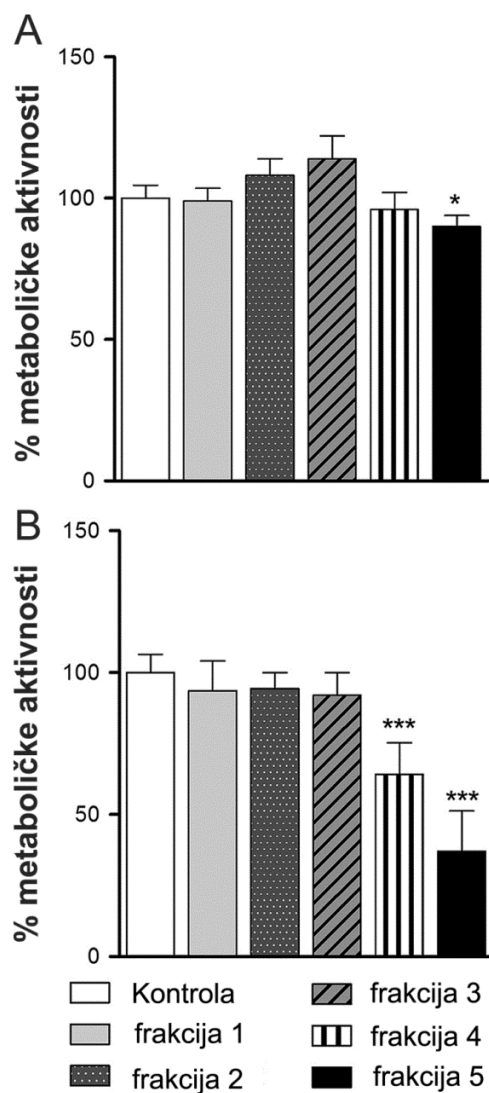
Grafikon 4.2.1.2.5 Efekti frakcije 4 i 5 GNP na apoptozu i nekrozu pacovskih timocita i L929 ćelija.

Ćelije su kultivisane sa frakcijom 4 (25µg/ml) ili frakcijom 5 (100 µg/ml) tokom 24 sata (timociti) ili 3 dana (L929 ćelije). Kontrole su kultivisane na isti način samo bez GNP. Ćelije su obojene sa PI kako je opisano u poglavlju 3 i detektovana je nekroza ili apoptoza pomoću protočne citometrije. Prikazan je deo reprezentativnog eksperimenta.

4.2.1.3. Citotoksičnost i imunomodulatorne osobine frakcija GNP na modelu splenocita aktiviranih sa ConA

Uzimajući u obzir prethodne rezultate na timocitima i L929 ćelijama, sledeći cilj je bio ispitati toksičnost i imunomodulatorne osobine GNP frakcija na modelu splenocita stimuliranih sa ConA. Splenociti su kultivisani u prisustvu GNP tokom 24 sata, nakon čega je izmerena metabolička aktivnost ćelija MTT testom (**Grafikon 4.2.1.3.1**), i vijabilnost bojenjem Tripan plavim (**Grafikon 4.2.1.3.2**). MTT test je pokazao da frakcije 1, 2 i 3 u

obe primenjene koncentracije (10 $\mu\text{g/ml}$ i 50 $\mu\text{g/ml}$) nisu citotoksične za splenocite stimulisane sa ConA. Sa druge strane, frakcija 4 inhibira metaboličku aktivnost splenocita u većim koncentracijama, dok je frakcija 5 inhibira metaboličku aktivnost u obe korišćene koncentracije, na dozno zavisian način.

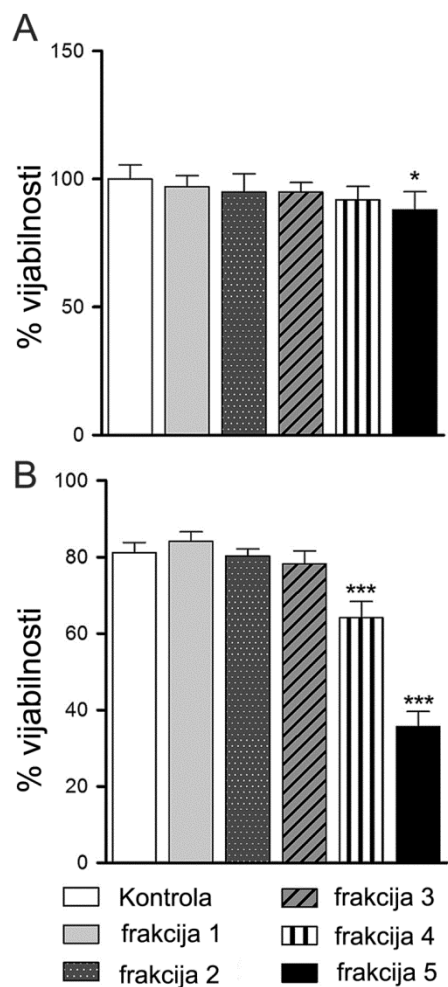


Grafikon 4.2.1.3.1 Efekat A) 10 $\mu\text{g/ml}$ i B) 50 $\mu\text{g/ml}$ GNP frakcija na metaboličku aktivnost splenocita tretiranih ConA.

Splenociti su kultivisani sa frakcijama GNP 24 sata nakon čega je metabolička aktivnost ovih ćelija izmerena MTT testom. Rezultati testa su prikazani kao srednja vrednost \pm SD iz 3 eksperimenata * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ u poređenju sa odgovarajućom kontrolom.

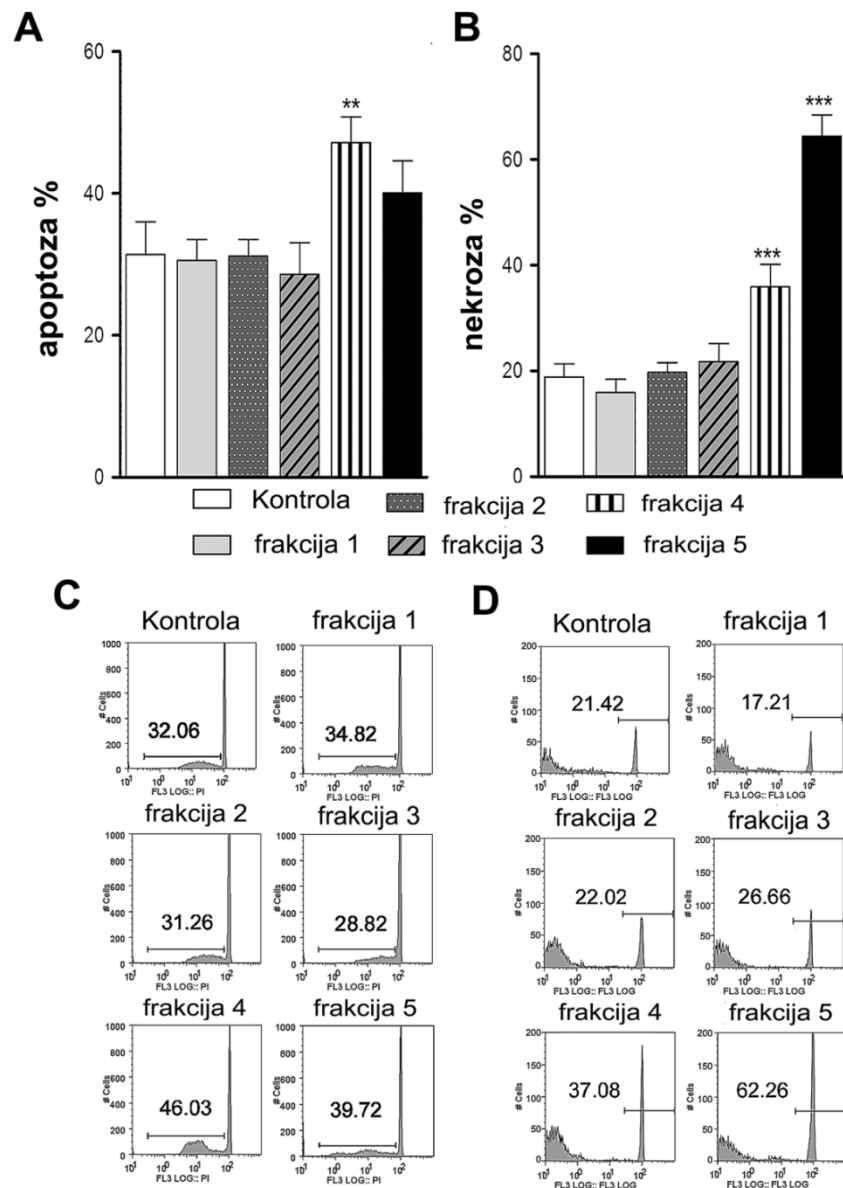
Slični rezultati su dobijeni bojenjem ćelija sa Tripan plavim (**Grafikon 4.2.1.3.2**). Frakcije 1,2 i 3 u obe koncentracije, i frakcija 4 u manjoj koncentraciji, ne izazivaju toksični efekat kod splenocita tretiranih sa ConA, obzirom da je kod ovih ćelija sačuvana vijabilnost. Veće koncentracije frakcije 4 i obe koncentracije frakcije 5 su citotoksične, obzirom da je vijabilnost ćelija značajno redukovana, posebno u kulturi sa frakcijom 5. Citotoksični efekat nanočestica je uočljiviji pri većim koncentracijama, zbog čega su u narednim eksperimentima korišćene GNP u koncentraciji 50 µg/ml.

Nakon toga je analizirano da li je smanjenje vijabilnosti splenocita u kulturi sa frakcijama 4 i 5 posledica nekroze ili apoptoze. Rezultati prikazani na **grafikonu 4.2.1.3.3** pokazuju da je oko 30% kontrolnih splenocita spontano ušlo u apoptozu nakon 24-časovne kultivacije ($31.4 \pm 4.6\%$). Frakcije 4 i 5 indukuju različite moduse ćelijske smrti. Naime, frakcija 4 značajno povećava apoptozu splenocita u poređenju sa kontrolom, za razliku od svih ostalih frakcija. Frakcija 4 i frakcija 5 nekrozu splenocita, ali je citotoksični efekat frakcije 5 jači (**Grafikon 4.2.1.3.3**).



Grafikon 4.2.1.3.2 Efekat A) 10 µg/ml i B) 50 µg/ml GNP frakcija na vijabilnost splenocita tretiranih sa ConA.

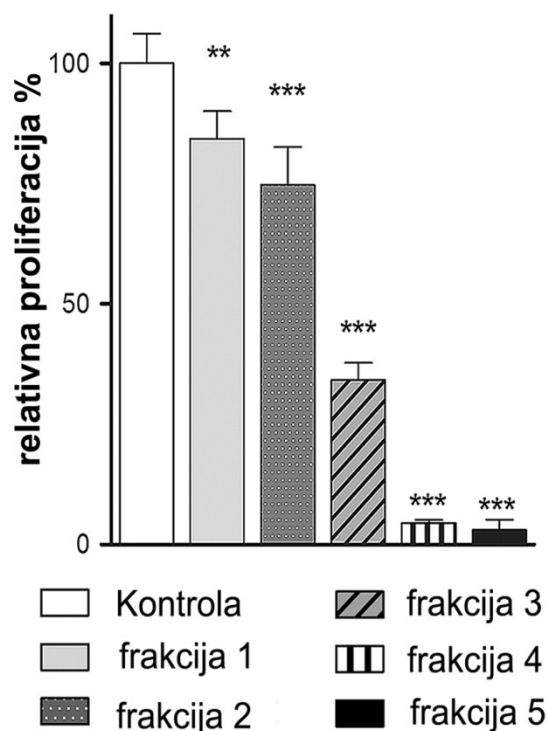
Splenociti su kultivisani sa 5 frakcija GNP tokom 24 sata nakon čega je vijabilnost ćelija izmerena obeležavanjem ćelija Tripin plavim. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ u poređenju sa odgovarajućom kontrolom.



Grafikon 4.2.1.3.3. Efekat frakcija GNP (50 $\mu\text{g/ml}$) na apoptozu i nekrozu splencita stimuliranih sa ConA.

Splenciti aktivirani sa ConA su kultivisani 24 sata u prisustvu 5 frakcija GNP, nakon čega je analiziran procenat apoptotičnih i nekrotičnih ćelija protočnom citometrijom, kao što je opisano u poglavlju 3. Prikazan je A) procenat apoptotskih i B) nekrotičnih ćelija iz tri nezavisna eksperimenta. Podaci dobijeni protočnom citometrijom iz jednog reprezentativnog eksperimenta za detekciju C) apoptoze i D) nekroze su takođe prikazani. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.005$ u poređenju sa odgovarajućom kontrolom

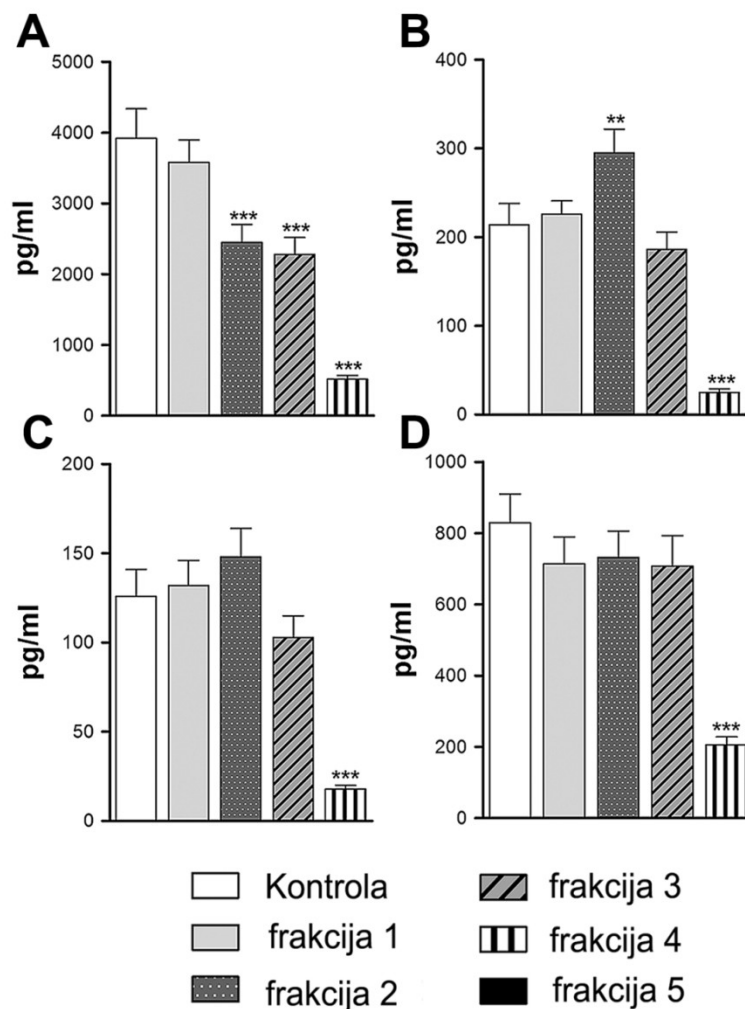
Obzirom da frakcije 1, 2 i 3 ne ispoljavaju citotoksični efekat na modelu splenocita aktiviranih sa ConA, ispitan je efekat ovih nanočestica na proliferaciju ovih ćelija nakon 3 dana kulture. Rezultati prikazani na **grafikonu 4.2.1.3.4** ukazuju da sve frakcije GNP suprimiraju proliferaciju splenocita. U tom kontekstu frakcija 1 ima najmanji, dok frakcije 4 i 5 imaju najveći inhibitoryni efekat.



Grafikon 4.2.1.3.4. Efekat GNP frakcija (50 $\mu\text{g/ml}$) na proliferaciju splenocita stimuliranih ConA.

Splenociti aktivirani ConA su kultivirani u prisustvu 5 frakcija GNP tokom 3 dana, a tretirane su ^3H timidinom poslednjih 18 sati kulture. Proliferacija je izmerena na scintilatom β brojaču i izražena je kao srednja vrednost relativne proliferacije u odnosu na kontrolu (100%) \pm SD triplikata iz tri nezavisna eksperimenta. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ u poređenju sa kontrolom.

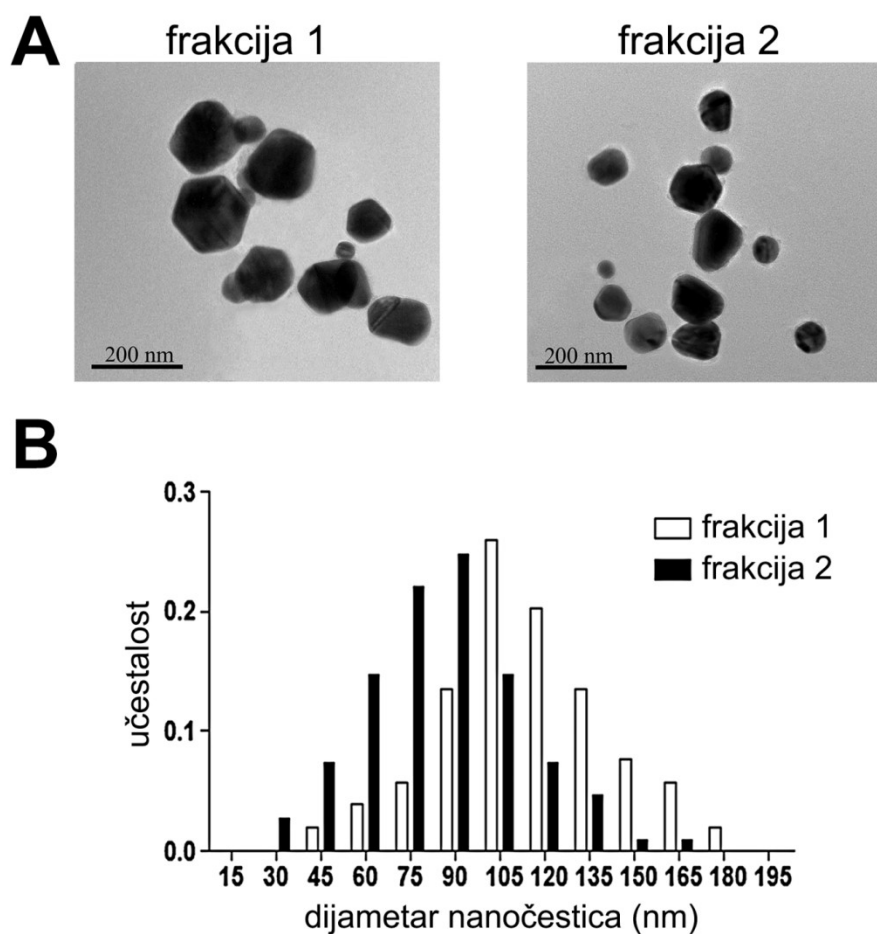
Uzimajući u obzir da frakcije 1 i 2 nemaju citotoksični efekat na ConA-tretirane splenocita, a inhibiraju proliferaciju ovih ćelija, ispitane su njihove imunomodulatorne osobine. Naime, iz supernatanta splenocita kultivisanih sa frakcijama GNP je određen nivo IFN- γ , IL-4, IL-2, i IL-10 (**Grafikon 4.2.1.3.5**). Rezultati su pokazali da frakcija 1 ne menja značajno produkciju navedenih citokina. Sa druge strane, frakcija 2 inhibira značajno produkciju IL-2 i stimuliše produkciju IL-10. Frakcija 3 inhibira produkciju IL-2, i ne modifikuje produkciju drugih citokina, dok je u kulturi sa frakcijom 4 pronađen značajno manji nivo svih ispitivanih citokina. Obzirom da frakcija 5 izaziva najveću citotoksičnost, i to uglavnom nekrozu, nije ispitivan njihov efekat na produkciju citokina.



Grafikon 4.2.1.3.5. Efekat GNP frakcija (50 $\mu\text{g/ml}$) na produkciju citokina od strane splenocita stimuliranih sa ConA.

Splenociti aktivirani sa ConA su kultivisani sa 5 frakcija GNP, kao u testu proliferacije. Pre dodavanja radioaktivnog timidina je sakupljen supernatant ovih kultura i određen je nivo A)IL-2 B) IL-10, C)IL-4 i D)IFN- γ ELISA metodom. Podaci iz tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost koncentracije citokina \pm SD. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ u poređenju sa odgovarajućom kontrolom.

U cilju objašnjavanja razlika u imunomodulatornom efektu frakcije 1 i 2, detaljnije je ispitano koje su ključne razlike u njihovoj morfologiji i veličini. Obe frakcije su sastavljene od čistog zlata (**Tabela 4.2.1.1.2**) i sakupljene su sa zidova reakcione cevi. Jedina razlika u sintezi ovih frakcija GNP je bila različita ultrasonična frekvencija tokom USP. Na osnovu inicijalnih pretpostavki, pri frekvenciji od 0.8 MHz, izračunata vrednost dijametra kapi dispergovane u aerosol iznosi $D=4.79 \mu\text{m}$. Povećanje frekvencije sa $f=0.8 \text{ MHz}$ na $f=2.5 \text{ MHz}$ smanjuje veličinu aerosolne kapljice na $D=2.26 \mu\text{m}$. Stoga je izračunata srednja veličina partikula u frakciji 1 oko 112.7 nm. Pod istim uslovima izračunat dijametar pri frekvenciji od $f=2.5 \text{ MHz}$ za frakciju 2 iznosi 53.2 nm. U cilju provere izračunatih vrednosti, nanočestice frakcije 1 i 2 su analizirane na TEM-u (**Slika 4.2.1.3.1**). Analiza je potvrdila da su nanočestice frakcije 1 veće u dijametru (115.1 ± 28.1), i više aglomerirane u odnosu na čestice frakcije 2 (83.7 ± 25.8). Uopšte gledano, veličina nanočestica dobijena analizom na TEM je bila manja, i aglomeracija manje zastupljena u poređenju sa rezultatima dobijenih SEM-om. Uporedna analiza dijametra frakcije 1 i 2 (**Slika 4.2.1.3.1b**) pokazuje da frakcija 2 ima veći broj nanočestica koje su manje od 100nm, dok frakcija 1 ima više nanočestica koje su veće od 100nm. T-test je pokazao da je veličina frakcije 2 značajno različita od vrednosti koja je očekivana na osnovu teorijskih pretpostavki ($p<0.05$).



Slika 4.2.1.3.1. Razlike u mikrostrukтури između GNP frakcije 1 i 2.

A) Prikazane su reprezentativne slike analize na TEM-u. B) Prikazana je distribucija učestalosti veličine frakcija GNP, pri čemu je izmereno više od 150 GNP u svakoj frakciji.

4.2.2 Efekat GNP na maturaciju i antitumorsku funkciju humanih dendritskih ćelija

Prethodni rezultati dobijeni ispitivanjem imunomodulatornog efekta frakcija 1 i 2 GNP na modelu splenocita aktiviranih ConA su pokazali da veličina GNP može imati presudan uticaj na imunomodulatorne efekte GNP. Obzirom da proliferacija i produkcija citokina u ovom modelu prevashodno zavise od prisustva akcesornih ćelija u populaciji splenocita [571], može se pretpostaviti da je ovakav efekat GNP uzrokovan modulacijom funkcije akcesornih ćelija, pre svega DC.

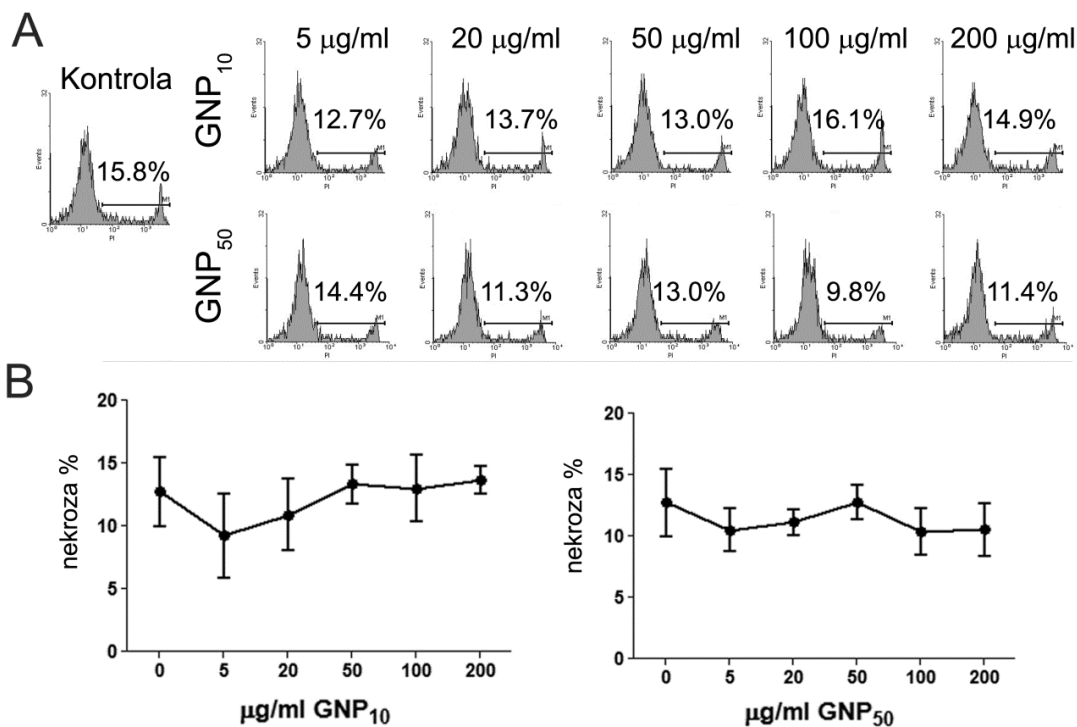
U tom smislu je naredni cilj studije bio da se ispita imunomodulatorni efekat GNP na modelu humanih DC u zavisnosti veličine GNP. Ovakva ispitivanja su posebno važna ako se uzme u obzir da DC predstavljaju ključne ćelije u kontroli imunskog odgovora na sopstveno (normalno, oštećeno ili tumorkso tkivo) i strano (patogeni, alergeni i dr.) [100]. Pored toga, sve veća upotreba GNP u fototermalnoj terapiji i dijagnostici maligniteta, nameće potrebu da se ispitaju potencijalno nepoželjni imunski efekti ovakvih procedura. Obzirom da frakcije 1 i 2 imaju veliku disperziju veličine (**Slika 4.2.1.3.1.**), u ovim ispitivanjima su korišćene komercijalne nanočestice 10nm (GNP₁₀) i 50 nm (GNP₅₀) u dijametru, čije su karakteristike prikazane u poglavlju 3 (**Tabela 3.2.1.3.1.**, **Tabela 3.2.1.3.2.** i **Slika 3.2.1.3.2.**). Obzirom da sazrevanje i funkcionalni odgovor DC u velikoj meri zavisi od broja ćelija koje se koriste u testu [565], prvi cilj je bio ispitati efekat GNP₁₀ i GNP₅₀ na procese apoptoze i nekroze DC.

4.2.2.1 Dozno zavisni efekti GNP na apoptozu i nekrozu DC

Većina protokola za maturaciju DC uključuje stimulaciju ovih ćelija TLR agonistima i/ili proinflamacijskim citokinima 2 dana [572]. Stoga je ispitano da li GNP (5-200 µg/ml) izazivaju citotoksičnost u kulturi DC u toku 48 sati.

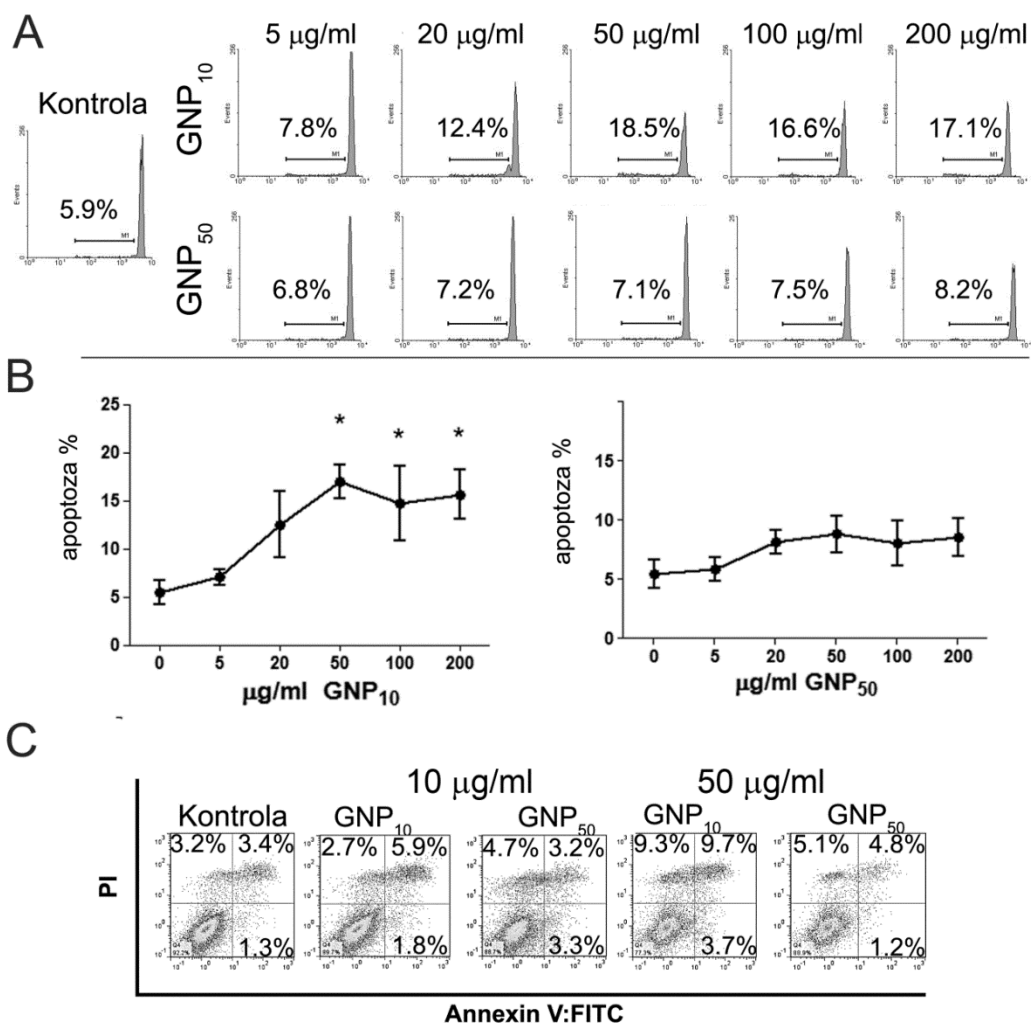
Rezultati su pokazali da ispitivane GNP ne izazivaju nekrozu DC, čak ni u najvećim primenjenim koncentracijama (200 µg/ml) (**Grafikon 4.2.2.1.1.**). Međutim, testovi

apoptoze su pokazali da GNP₁₀ indukuju veći procenat apoptotskih ćelija, i to u koncentracijama većim od 20 µg/ml (**Grafikon 4.2.2.1.2.**).



Grafikon 4.2.2.1.1. Dozno zavisni efekat GNP₁₀ i GNP₅₀ na nekrozu DC.

DC su kultivisane sa GNP (5-200 µg/ml) tokom 48 sati nakon čega analiziran A) procenat nekrotičnih DC, obeležavanjem ćelija PI u PBS-u. Prikazani su rezultati iz jednog reprezentativnog eksperimenta ili B) kao srednja vrednost % nekroze ± SD iz 4 nezavisna eksperimenta. *p<0.05 u poređenju sa 0 µg/ml (Fridmanova jednofaktorska ANOVA).

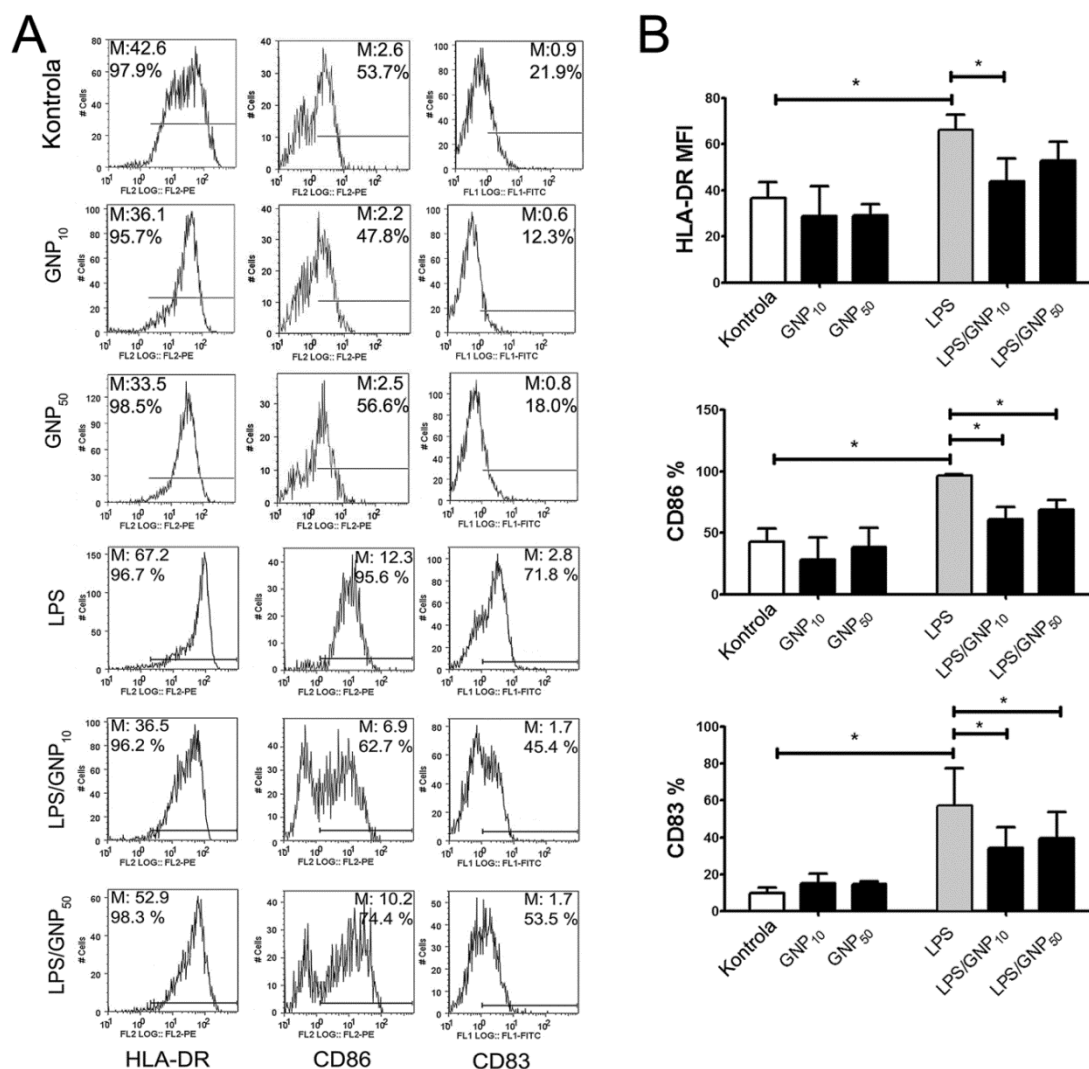


Grafikon 4.2.2.1.2. Dozno zavisni efekat GNP₁₀ i GNP₅₀ na apoptozu DC.

DC su kultivisane sa GNP (5-200 µg/ml) tokom 48 sati nakon čega analiziran A) procenat apoptotičnih DC, obeležavanjem ćelija PI u hipotonom rastvoru. Prikazani su rezultati iz jednog reprezentativnog eksperimenta ili B) kao srednja vrednost % apoptoze ± SD iz 4 nezavisna eksperimenta. C) Različiti stupnjevi apoptoze DC su analizirani nakon 24-časovne kulture ovih ćelija sa GNP (10 ili 50 µg/ml), obeležavanjem ćelija Annexin V FITC/PI. *p<0.05 u poređenju sa 0 µg/ml (Fridmanova jednofaktorska ANOVA).

4.2.2.2 Efekti GNP na sazrevanje i funkciju DC stimulisanih LPS-om

U narednom segmentu studije je ispitivan efekat GNP₁₀ i GNP₅₀ na sazrevanje i funkcije DC stimulisanih LPS-om. U ovim eksperimentima GNP₁₀ i GNP₅₀ su korišćene u netoksičnim koncentracijama (10 µg/ml). Rezultati prikazani na **grafikonu 4.2.2.2.1** ukazuju da LPS stimuliše fenotipsku maturaciju DC, obzirom da povećava ekspresiju HLA-DR, CD86 i CD83 od strane DC. Sa druge strane, same GNP ne modulišu ekspresiju ovih molekula. Međutim, i GNP₁₀ i GNP₅₀ značajno inhibiraju fenotipsku maturaciju DC, obzirom da inhibiraju povećanje ekspresije CD86 i CD83 indukovano LPS-om. Osim toga, GNP₁₀ inhibiraju i stimulaciju ekspresije HLA-DR molekula od strane DC u kulturi sa LPS-om (**Grafikon 4.2.2.2.1**).

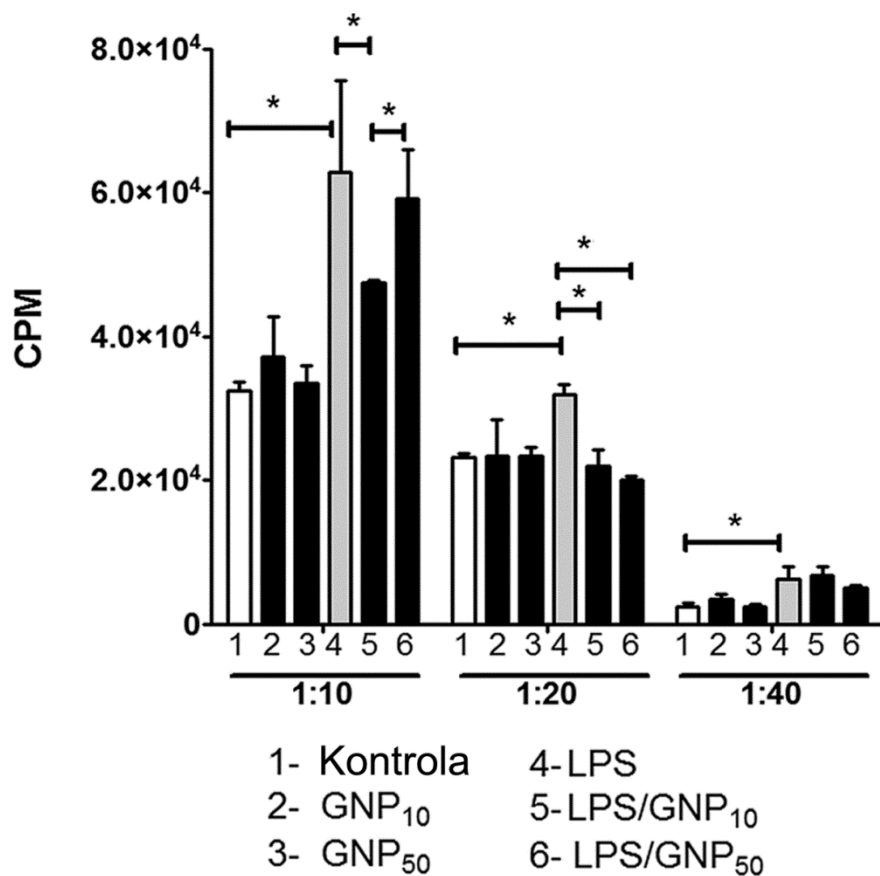


Grafikon 4.2.2.2.1. Efekti GNP na fenotipsko sazrevanje DC indukovano LPS-om.

DC su kultivisane u prisustvu GNP (10 μ g/ml), sa ili bez LPS-a (100ng/ml), nakon čega je analizirana ekspresija HLA-DR, CD86 i CD83 protočnom citometrijom. A) Prikazana je fenotipska maturacija DC iz jednog reprezentativnog eksperimenta; Marker koji pokazuju specifičnu fluorescencu su podešeni na osnovu korišćenja irelevantnih izotipskih antitela. B) Zbirni podaci iz 4 nezavisna eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost % ili MFI \pm SD. * p <0.05 (Fridmanova dvofaktorska ANOVA)

U skladu sa ovim rezultatima, DC kultivisane sa LPS-om i GNP imaju slabiju alostimulatornu aktivnost u kokulturi sa alogenim CD3⁺T ćelijama, u poređenju sa DC stimulisanih samo LPS-om. Pri tome, GNP₁₀ imaju snažniji inhibični efekat, obzirom da

je inhibicija alostimulatorne aktivnosti indukovane sa LPS-om detektovana u više različitih DC/CD3⁺T odnosa u četiri nezavisne MLR. Reprezentativna MLR je prikazana sa grafikonom 4.2.2.2.



Grafikon 4.2.2.2.2. Efekat GNP na alostimulatornu sposobnost DC indukovanu LPS-om. DC su kultivisane u prisustvu GNP (10µg/ml), sa ili bez LPS-a (100ng/ml), nakon čega su sakupljene i kultivisane sa prečišćenim CD3⁺T ćelijama (1 x 10⁵/bazenu) u različitim brojnim odnosima (1:10-1:40). Nakon 5 dana kulture je izmerena proliferacija CD3⁺T ćelija na osnovu ugradnje ³H timidina na scintilatnom β brojaču. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost CPM ± SD šestoplikata iz jednog reprezentativnog eksperimenta. *p<0.05 (Fridmanova dvofaktorska ANOVA)

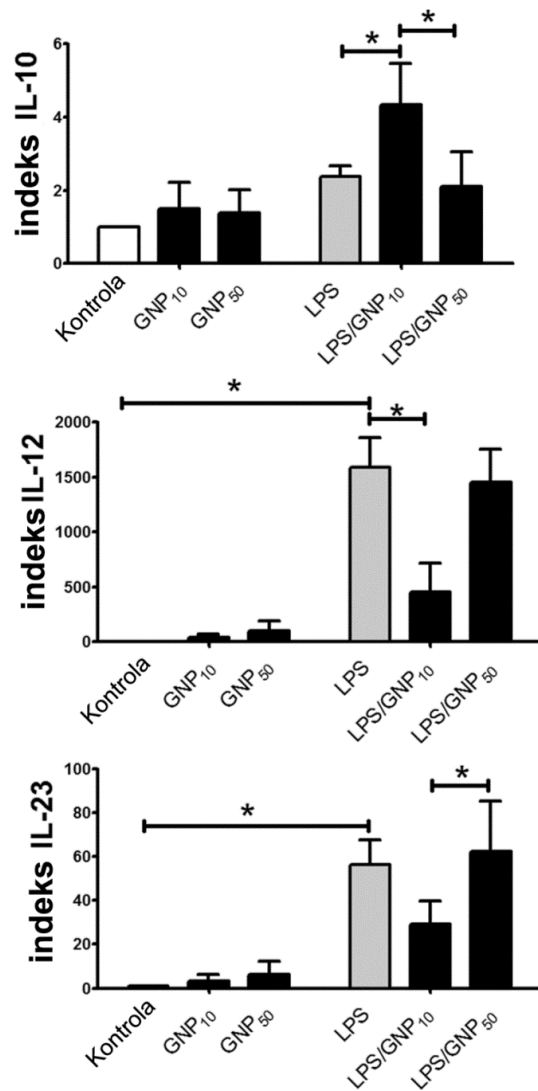
Supernatanti kultura DC kultivisanih 2 dana sa GNP su sakupljeni u cilju određivanja koncentracija IL-10, IL-12 i IL-23, dok je iz kokultura DC i CD3⁺T ćelija nakon 5 dana sakupljen supernatant u kom je određivana koncentracija IL-4, IFN γ i IL-17. Obzirom da je nivo citokina varirao između različitih donora korišćenih u eksperimentima (**Tabela 4.2.2.2.1.**), nivoi citokina koje proizvode DC (**Grafikon 4.2.2.2.3.**) i nivoi citokina koje proizvode CD3⁺T ćelije u kokulturi sa DC (**Grafikon 4.2.2.2.4.**) su prikazani kao indeksi u odnosu na kontrolne nestimulisane DC (1.0).

Rezultati su pokazali da GNP₅₀ ne modifikuju značajno produkciju IL-12, IL-23 i IL-10 od strane DC. Efekat GNP₁₀ se značajno razlikuje od GNP₅₀, obzirom da ove nanočestice stimulišu produkciju IL-10, inhibiraju produkciju IL-12p70 i imaju tendenciju smanjenja produkcije IL-23 od strane DC stimulisanih LPS-om, u poređenju sa kontrolnim DC kultivisanim samo u prisustvu LPS-a (**Grafikon 4.2.2.2.3.**).

Tabela 4.2.2.2.1. Produkcija citokina od strane DC (IL-10, IL-12 i IL-23) i od strane CD3⁺T ćelija (IL-4, IFN- γ , IL-17) u kokulturi.

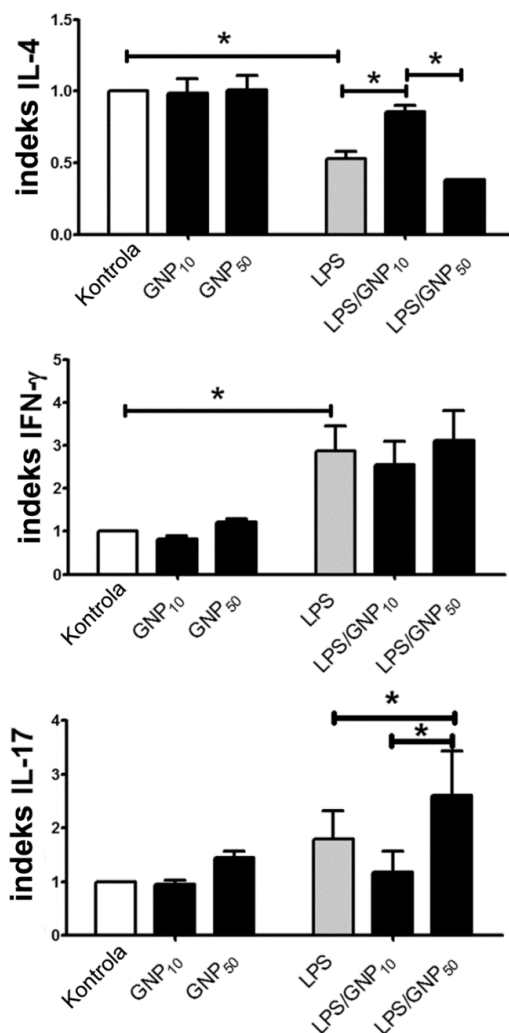
Uzorci	IL-10	IL-12	IL-23	IL-4	IFN- γ	IL-17
*Kontrola	68.9 (4.4-122.0)	3.4 (<2.0-4.2)	60.1 (<2-87.2)	140.6 (20.6-169.9)	7909.2 (3220.0-18900.1)	328.8 (81.9-621.4)
*GNP₁₀	49.8 (4.6-106.5)	10.7 (<2.0-14.5)	40.4 (<2-99.6)	110.2 (24.6-150.1)	5989.0 (2991.4-15889.9)	391.1 (65.5-832.2)
*GNP₅₀	55.5 (5.2-95.0)	27.7 (<2-55.5)	65.3 (<2-98.1)	111.6 (25.0-158.4)	9498.1 (4211.1-19844.5)	411.4 (95.4-669.0)
LPS	113.1 (9.8-169.3)	4447.1 (128.4-8522.4)	656.3 (46.1-1350)	45.4 (10.4-105.9)	29399.4 (8467.7-38299.0)	555.1 (85.4-1159.4)
LPS/GNP₁₀	242.2 (11-434.3)	1618.4 (4.5-3067)	482.7 (9.0-702.0)	120.1 (16.3-141.9)	24399.2 (7546.1-32440.9)	328.9 (64.3-723.3)
LPS/GNP₅₀	105.9 (<2-228.2)	3992.2 (102.7-8163.6)	920.7 (10.1-1640.0)	49.4 (7.8-64.2)	32838.2 (9122.1-38991.7)	740.4 (141.9-975.0)

DC su kultivisane sa GNP (10 μ g/ml), sa ili bez LPS, tokom 48 sati, nakon čega je iz supernatanta određena koncentracija IL-12p70, IL-23 i IL-10 ELISA metodom, dok je iz supernatanta kokultura DC i CD3⁺T ćelija određena koncentracija IL-4, IL-17 i IFN- γ na isti način. Rezultati su prikazani kao medijam (opseg) iz 4 nezavisna eksperimenta ili 8 nezavisnih eksperimenata (*).



Grafikon 4.2.2.2.3. Efekat GNP na produkciju citokina od strane DC stimulisanih LPS-om. DC su kultivisane sa GNP (10 μ g/ml), sa ili bez LPS, tokom 48 sati, nakon čega je iz supernatanta određena koncentracija IL-12p70, IL-23 i IL-10 ELISA metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost indeksa koncentracije citokina u odnosu na kontrolne nezrele DC (1.0) \pm SD iz 4 nezavisna eksperimenta. *p<0.05 (Fridman-ova dvofaktorska ANOVA)

Analiza citokina u supernatantima kokultura DC i CD3⁺T ćelija je ukazala na povećanje IL-17 od strane alogenih CD3⁺T ćelija kokultiviranih sa DC tretiranim LPS-om i GNP₅₀. Za razliku od toga, uočeno je da DC tretirane sa LPS/GNP₁₀ stimulišu veću produkciju IL-4 u odnosu na kontrolne DC kultivisane samo sa LPS-om. Nivoi IFN- γ nisu bitnije modifikovani u kokulturama pod uticajem GNP (**Slika 4.2.2.2.4**).



Grafikon 4.2.2.2.4. Efekat GNP na polarizacionu sposobnost DC stimuliranih LPS-om.

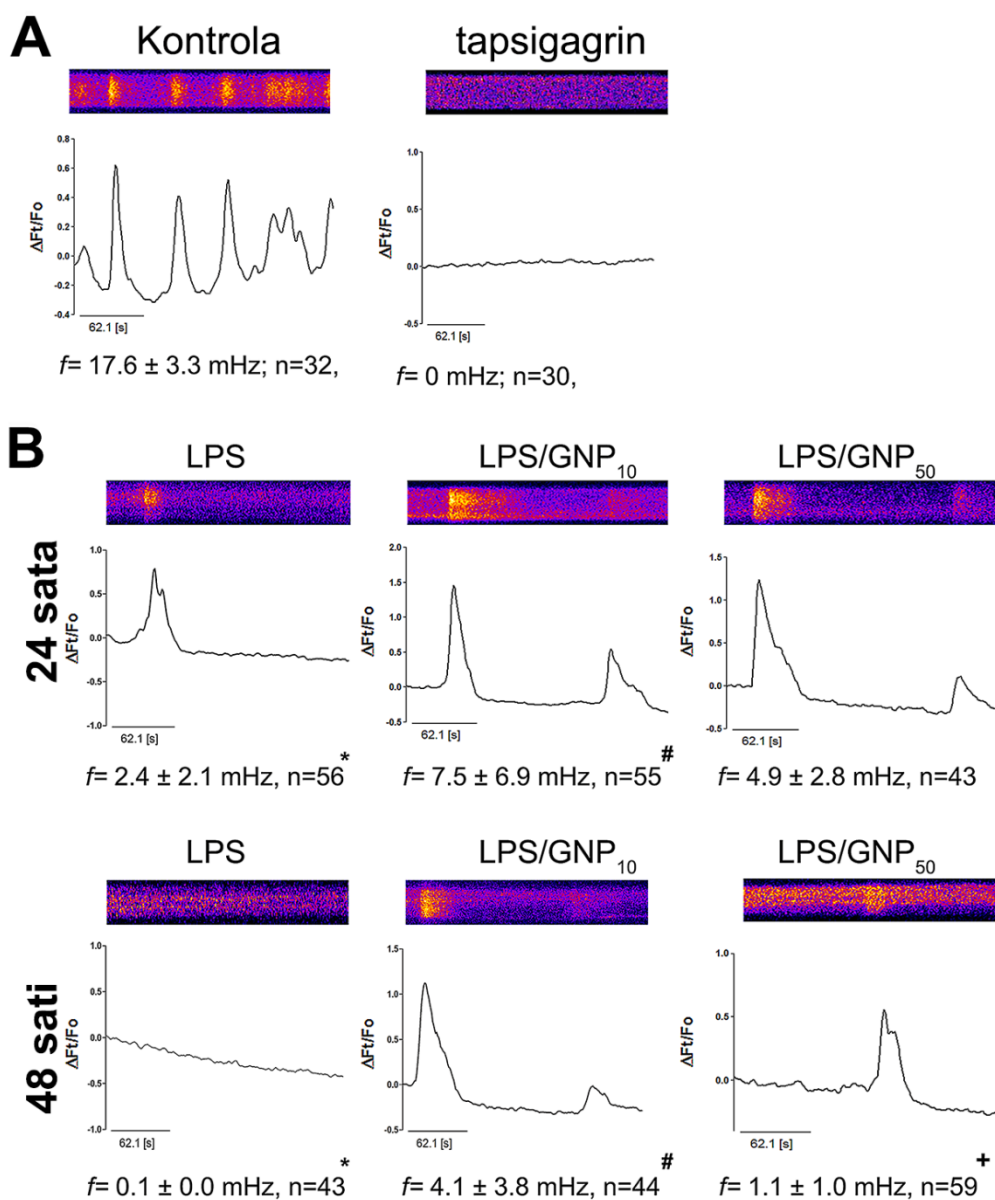
DC su nakon kultivacije sa GNP (10 μ g/ml), sa ili bez LPS-a, kokultivisane 5 dana sa CD3⁺T ćelijama u odnosu DC:CD3⁺T ćelije 1:20. U supernatantima ovih kokultura je određena koncentracija IFN- γ , IL-23 i IL-10 ELISA metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost indeksa koncentracije citokina u odnosu na kontrolne nezrele DC (1.0) \pm SD iz 4 nezavisna eksperimenta. *p<0.05 (Fridmanova dvofaktorska ANOVA)

4.2.2.3. Uticaj GNP na oscilacije Ca^{2+} DC u toku sazrevanja u prisustvu LPS-a

Vukcevic i sar. [115] su pokazali da LPS smanjuje spontane Ca^{2+} oscilacije kod nezrelih DC, a time i traslokaciju NFAT u njihov nukleus. Stoga je ispitano da li GNP imaju uticaj na Ca^{2+} signalizaciju kod DC u toku sazrevanja sa LPS-om.

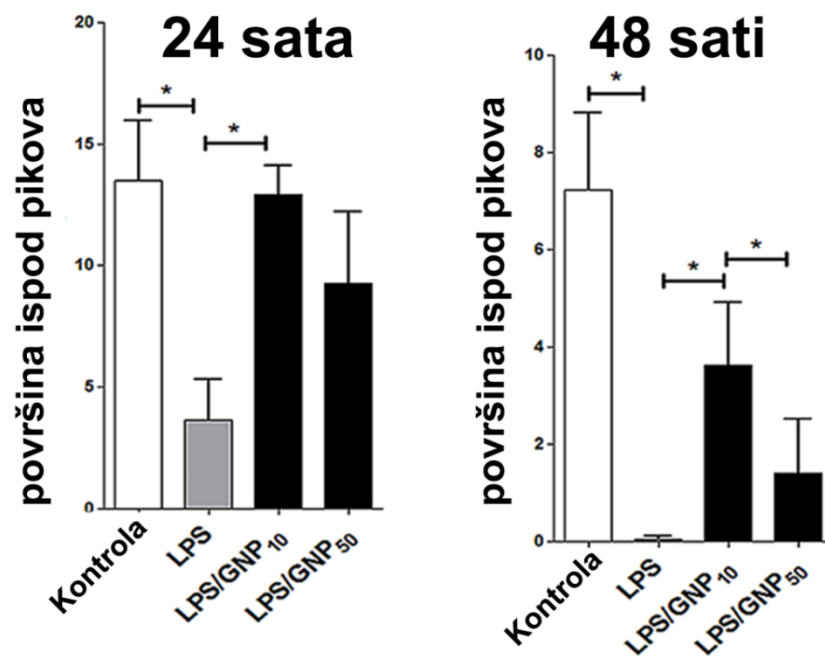
Analiza oscilacija Ca^{2+} je ukazala da nezrele DC, obeležene sa Fluo-3, ispoljavaju visok stepen fluktuacija Ca^{2+} (**Grafikon 4.2.2.3.1.**), što odgovara prosečnoj površini ispod pikova Ca^{2+} od 18.6 ± 6.2 (**Grafikon 4.2.2.3.2.**). Ove oscilacije se mogu kompletno blokirati tapsigagrinom, inhibitorom SERCA. U toku 48 sati kulture, kontrolne netretirane DC spontano smanjuju oscilacije Ca^{2+} (**Grafikon 4.2.2.3.3.**).

LPS i GNP ne modifikuju značajno oscilacije Ca^{2+} kod nezrelih DC neposredno nakon dodavanja (podaci nisu prikazani). Uočeno je da LPS značajno inhibira fluktuacije Ca^{2+} nakon 24 i 48 sati kulture, u poređenju sa fluktuacijama u kontrolnim ćelijama (**Grafikoni 4.2.2.3.1. i 4.2.2.3.2.**). Međutim, u ćelijama koje su tretirane i sa LPS-om i sa GNP_{10} , uočena je značajna inhibicija ovog fenomena. Nakon 48 sati kulture, kod DC tretiranih sa LPS/ GNP_{10} je detektovano značajno više oscilacija Ca^{2+} u poređenju sa ćelijama tretiranim sa LPS/ GNP_{50} , što je zaključeno analizom frekvencije oscilacija Ca^{2+} (**Grafikon 4.2.2.3.1.**) i površine ispod pikova Ca^{2+} (**Grafikon 4.2.2.3.2.**). Same GNP, nisu ispoljile značajan efekat na modulaciju oscilacija Ca^{2+} ni posle 24 ni posle 48 sati kulture (**Grafikon 4.2.2.3.3.**).



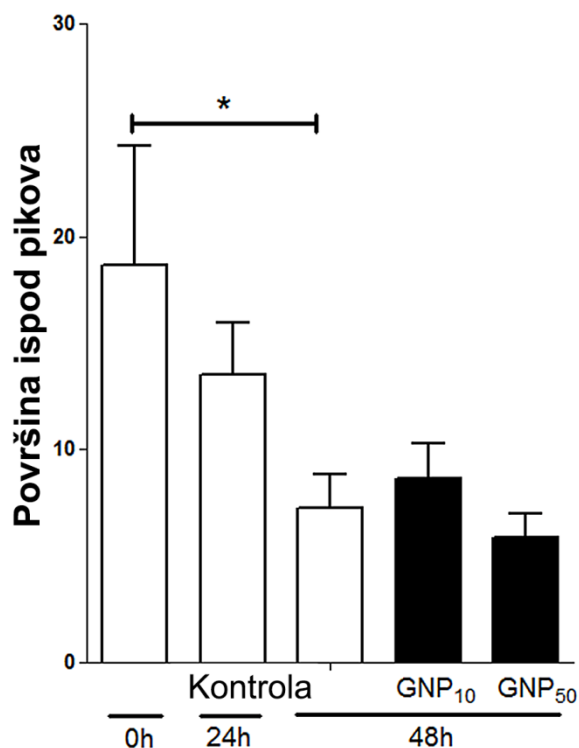
Grafikon 4.2.2.3.1. Efekat GNP na oscilacije Ca^{2+} unutar DC.

Nezrele DC obeležene sa Fluo-3 su analizirane A) neposredno nakon obeležavanja, sa ili bez prisustva tapsigagrina ($2\mu\text{M}$), ili B) 24 i 48 sati u prisustvu LPS i GNP ($10 \mu\text{g/ml}$). Prikazani su reprezentativni kimografi i odgovarajući zapisi na $\Delta F_t/F_o$ osi, kao frekvencije svih analiziranih ćelija (f). * $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom $^\#p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom tretiranom LPS-om, $^+p < 0.05$ u poređenju sa GNP₁₀ (Kruskal-Wallis-ov test).



Grafikon 4.2.2.3.2. Efekat GNP na oscilacije Ca^{2+} unutar DC.

DC su kultivisane 24 ili 48 sati u prisustvu LPS i GNP (10 $\mu\text{g/ml}$) a zatim obeležene sa Fluo-3 i analizirane konfokalnom mikroskopijom. Rezultati dobijeni analizom oscilacija Ca^{2+} su prikazani kao srednja vrednost površine ispod pikova $\text{Ca}^{2+} \pm \text{SD}$, svih analiziranih ćelija. * $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom (Kruskal-Wallis-ov test).



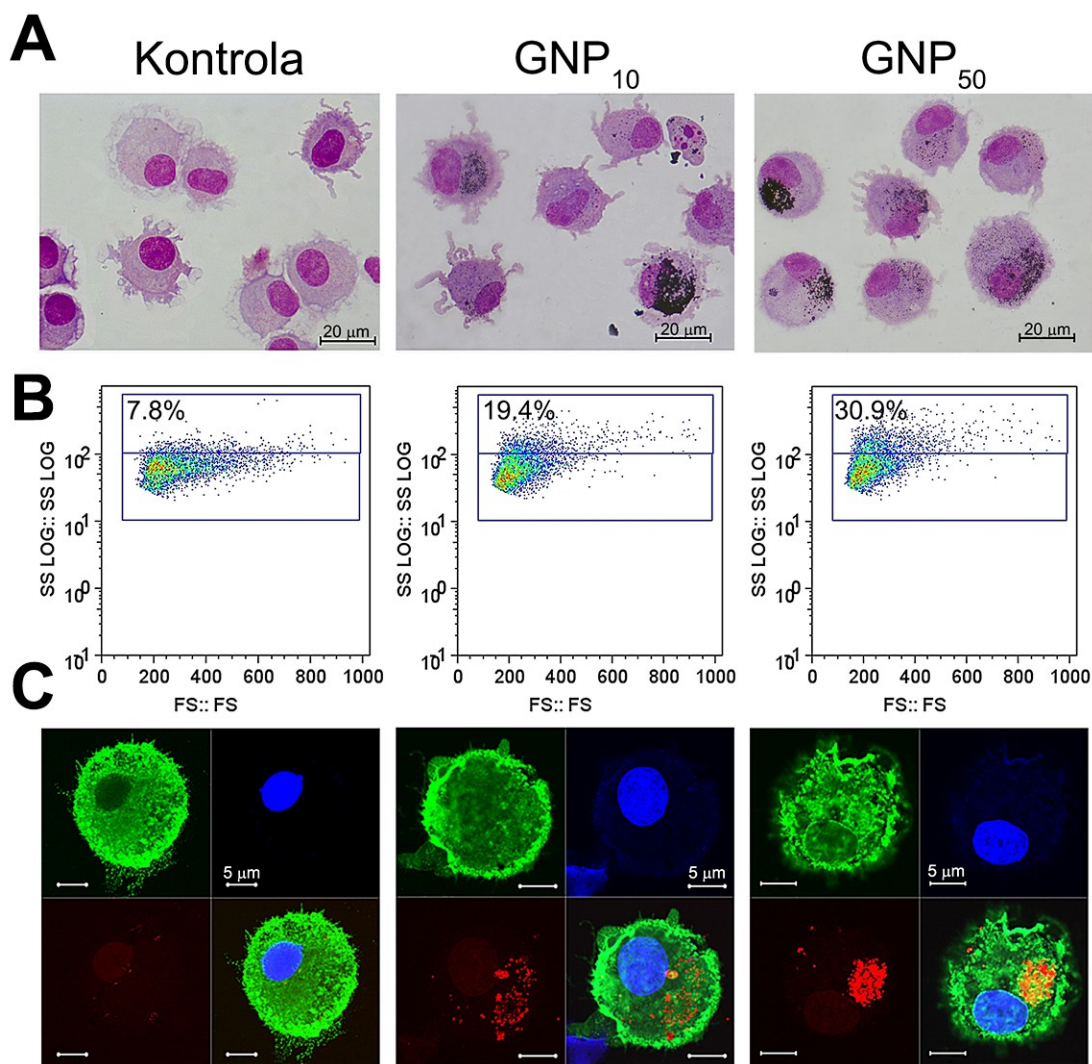
Grafikon 4.2.2.3.3. Efekat GNP na oscilacije Ca^{2+} u DC.

Oscilacije Ca^{2+} kod DC obeleženih sa Fluo-3 su detektovane neposredno nakon obeležavanja (0h), nakon 24h, i nakon 48h kulture u prisustvu GNP (10 $\mu\text{g/ml}$) ili njihovom odsustvu. Oscilacije su izražene kao srednja vrednost površine ispod pikova $\text{Ca}^{2+} \pm \text{SD}$ svih analiziranih ćelija * $p < 0.05$ (Fridmanova jednofaktorska ANOVA).

4.2.2.4 Internalizacija, kvantifikacija i intracelularna distribucija GNP unutar DC

U narednom delu je ispitano koje su razlike u internalizaciji između GNP₁₀ i GNP₅₀. Svetlosna mikroskopija je pokazala da postoji velika varijabilnost između DC u kapacitetu za internalizaciju GNP. I pored toga, značajno veći procenat DC internalizuje GNP₅₀ (82.1% \pm 4.35; n=500) nego GNP₁₀ (68.5% \pm 3.1%; n=500)($p=0.013$) (Slika 4.2.2.4.1a). Slični rezultati su dobijeni protočnom citometrijom, gde je analizirana granuliranost DC pomoću SS parametra (Slika 4.2.2.4.1b). Intracelularna distribucija GNP je analizirana

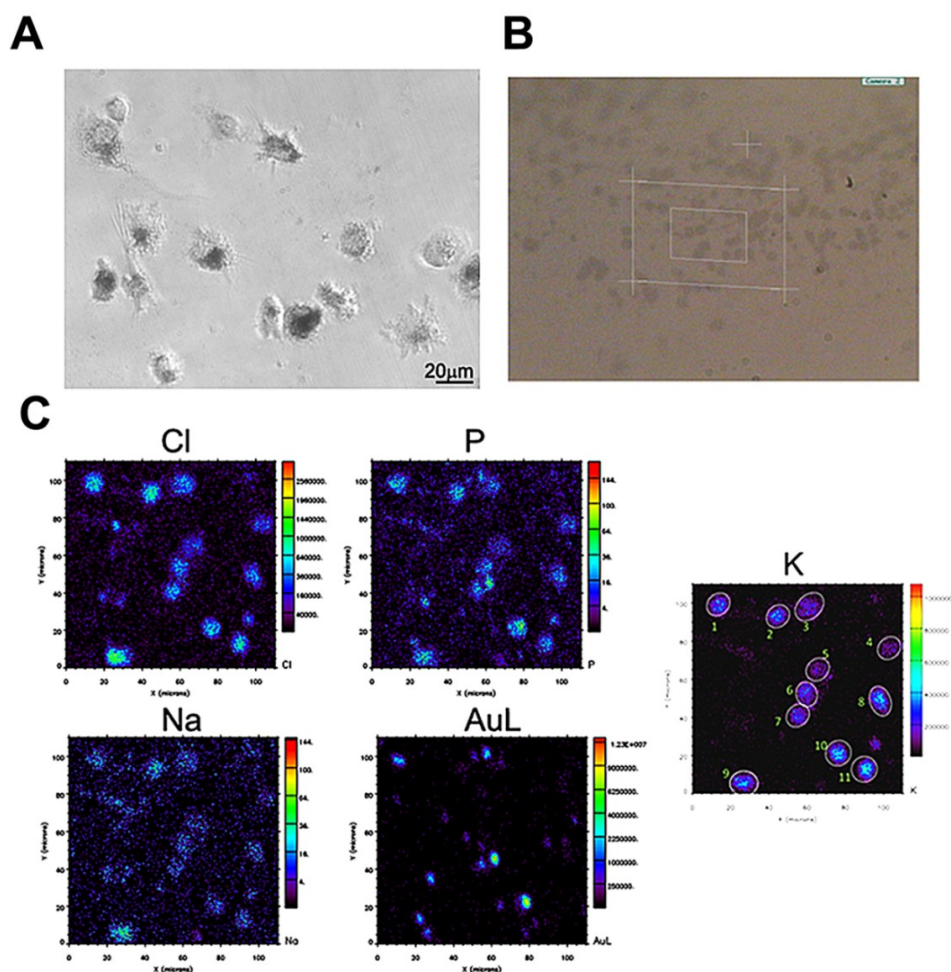
konfokalnem mikroskopijom, pri čemu je pokazano da GNP imaju isključivo perinuklearnu lokalizaciju (Slika 4.2.2.4.1c).



Slika 4.2.2.4.1. Internalizacija GNP od strane DC.

Intrnalizacija GNP od strane DC je analizirana nakon 48 sati kulture A) nakon bojenja uzoraka MGG metodom B) protočnom citometrijom i C) konfokalnem mikroskopijom, nakon obeležavanja DC sa anti-HLA-DR: Aleksa 488 antitelom (zelena fluorescenca) i PI (plava fluorescenca). GNP su detektovane na osnovu raspršivanja svetlosti 630 nm talasne dužine. Prikazane su reprezentativne slike i tačkasti dijagrami iz 3 eksperimenata sa sličnim rezultatima.

U cilju kvantifikacije intracelularnog zlata primenjena je mikro-PIXE analiza. U tu svrhu su DC kultivisane sa GNP (10 $\mu\text{g/ml}$) 4 sata, nakon čega su detektovane protonskom mikroskopijom na osnovu elementalnih mapa kalijuma, hlora, fosfora i natrijuma (**Slika 4.2.2.4.2.**). **Tabela 4.2.2.4.1.** prikazuje primer analize elementalnih mapa K, Cl i Au sa 3 područija koja su obeležena kao DC, u kojima je masa elemenata izračunata na osnovu formula datih u **odjeljku 3.7.1.**, u Geopixe i Gupix programu.



Slika 4.2.2.4.2. Pripreman DC za mikro-PIXE analizu.

DC su kultivisane sa GNP na Mylar folijama tokom 4 sata i nakon toga analizirane A) fazno-kontrastnim mikroskopom. Nakon brzog zamrzavanja i sušenja na -40°C uzorci su montirani u vakumsku komoru i analizirani CCD kamerom (B). C) Elementalne mape su snimljene mikro-PIXE metodom u uokvirenom mestu, a na mapama K su ćelije od interesa uokvirene elipsama

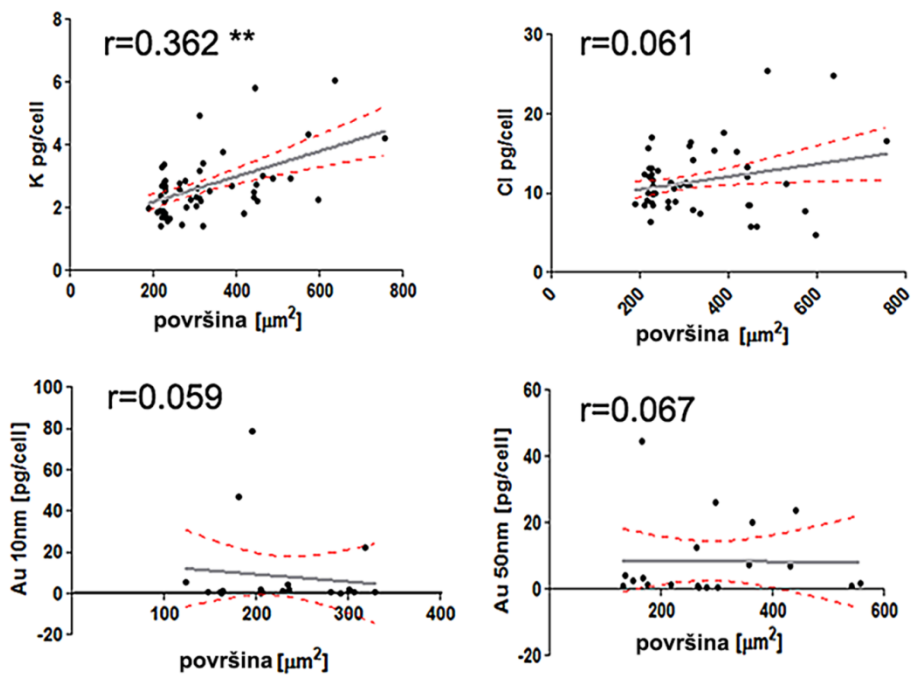
Tabela 4.2.2.4.1. Primer elementalne analize K, Cl i Au u tri DC mikro-PIXE analizom

Element	Program	DC 1			DC 2			DC 3		
		Masa	LOD	Greška	Masa	LOD	Greška	Masa	LOD	Greška
		[pg]	[pg]	[%]	[pg]	[pg]	[%]	[pg]	[pg]	[%]
K	Geopixe	3,77	< 0,1	14,1	3,30	< 0,1	13,9	5,94	< 0,1	9,26
	Gupix	4,15	0,88	17,0	3,93	0,84	15,7	5,40	0,75	13,0
Cl	Geopixe	1,67	< 0,1	21,0	1,65	< 0,1	22,4	3,52	< 0,1	12,5
	Gupix	1,78	0,74	26,6	2,76	0,69	16,3	3,75	0,73	13,6
Au	Geopixe	14,2	0,4	12,7	21,9	0,4	8,22	0,40	0,4	0,3
	Gupix	13,1	3,0	19,8	21,4	2,8	12,2	0	0,9	75

U analizi su korišćena 2 različita softwera, Geopixe i Gupix. koji imaju različitu grešku i granicu detekcije (LOD).

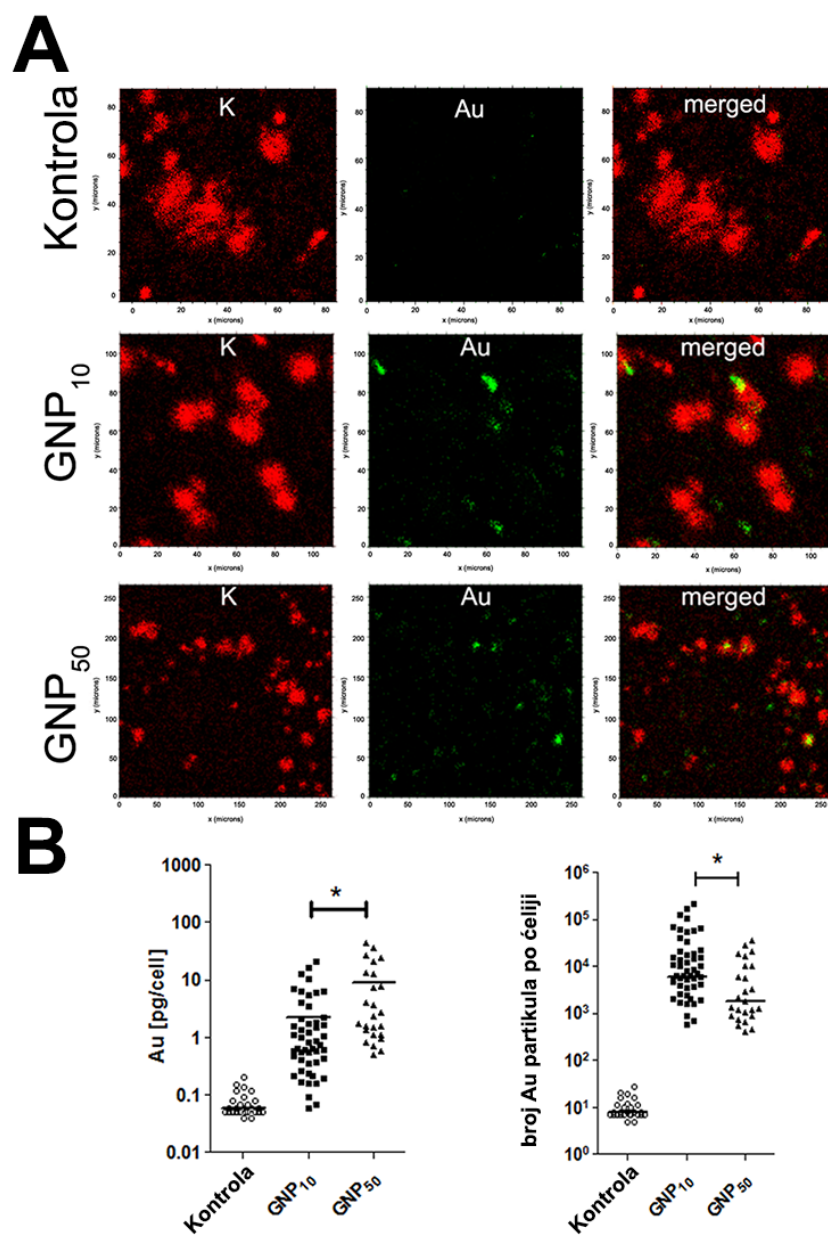
Obzirom da je analiza u Geopixe programu imala manju grešku i granicu detekcije za navedene elemente u odnosu na analizu u Gupix programu, Geopixe je korišćen za kvantifikaciju Au unutar DC. Osim toga, nije uočena značajna korelacija između veličine analizirane površine i mase Cl na tim područjima, dok je korelacija bila pozitivna kada je u ovoj analizi korišćen K (**Grafikon 4.2.2.4.1.**). Stoga je količina intracelularnog Au određivana isključivo na područjima koja sadrže K.

Kao i u slučaju svetlosne mikroskopije, mikro-PIXE analiza je pokazala da količina intracelularnog zlata varira između samih DC. I pored toga, detektovana je značajno veća prosečna masa GNP₅₀ po DC, u odnosu na GNP₁₀ (**Slika 4.2.2.4.3.**). Međutim, nakon preračunavanja broja GNP po ćeliji (**odjeljak 3.7.1.**), dobijeno je da je značajno veći prosečan broj GNP₁₀ po DC, nego GNP₅₀.



Grafikon 4.2.2.4.1. Korelacija veličine ćelija i elementalnog sastava.

Količina K, Cl, GNP₁₀ i GNP₅₀ je korelisana sa veličinom elipsastog područja (ćelije) u Graph Pad Prism programu.



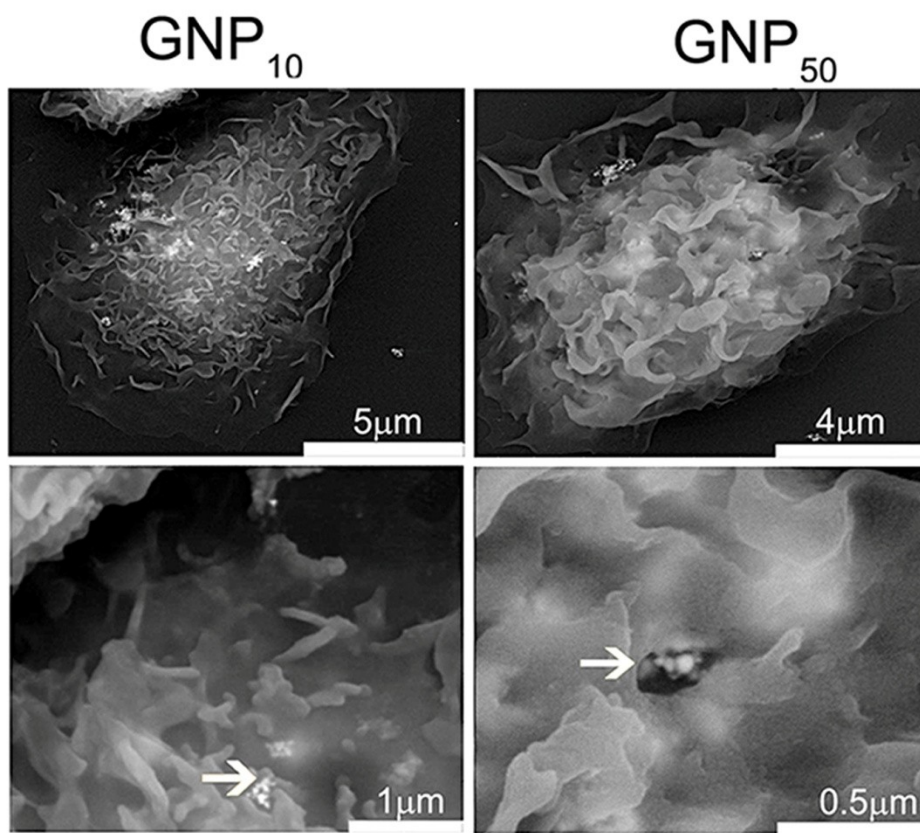
Slika 4.2.2.4.3. Kvantifikacija intracelularnog zlata pomoću mikro-PIXE metode.

A) mape K, obeležene zeleno, su korišćene za određivanje količine zlata (crveno) u ovim područjima. B) Podaci o količini zlata po ćeliji su prikazani kao pg/ćeliji. Ovi podaci su korišćeni za preračunavanje broja GNP po DC kako je opisano u odeljku 3.9.1. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney test).

Nakon toga su ispitane razlike u mehanizmima internalizacije i intraćelijske distribucije GNP u DC. SEM analiza je pokazala da se GNP preuzimaju kao mali klasteri pomoću filopodija DC koje se zatvaraju oko GNP i formiraju rani endozom (**Slika 4.2.2.4.4.**). GNP nisu internalizovane u kulturi DC na +4°C (podaci nisu prikazani).

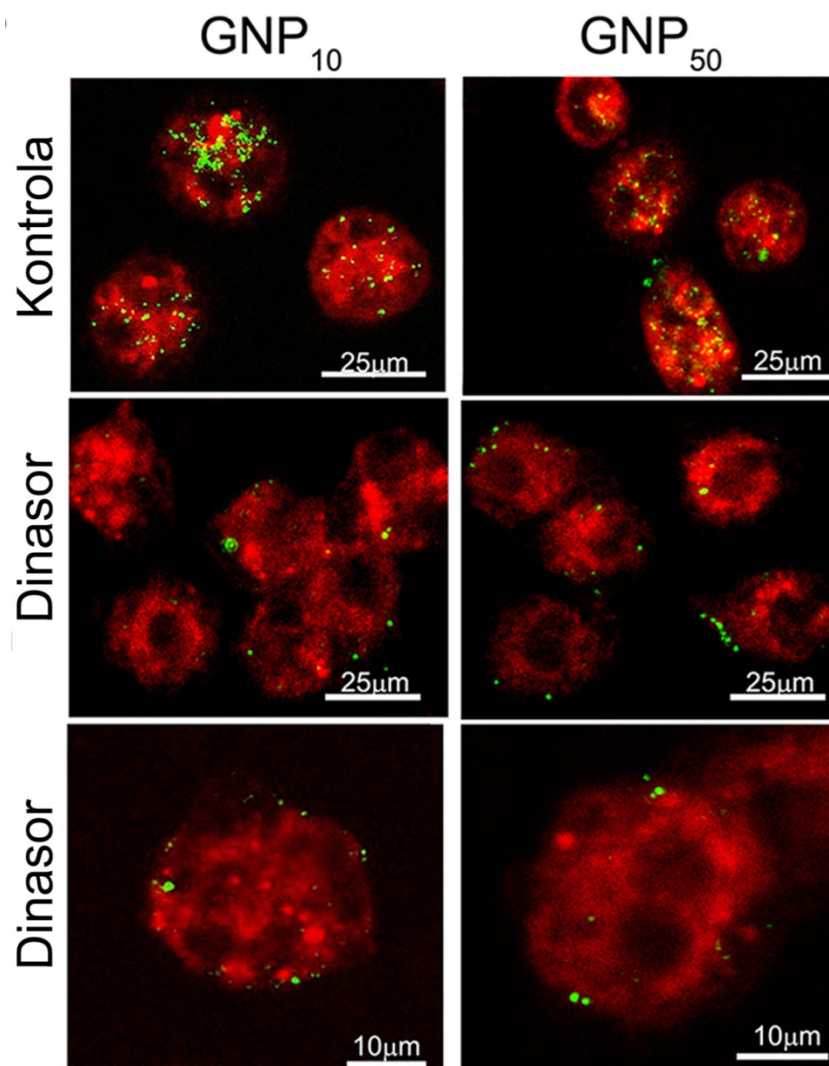
Tretman dinasorom, inhibitorom dinamina I, skoro kompletno blokira internalizaciju oba tipa nanočestica, što je potvrđeno konfokalnom mikroskopijom (**Slika 4.2.2.4.5.**) i FIB/SEM analizom (**Slika 4.2.2.4.6.**). Međutim, detaljnija trodimenzionalna analiza uzoraka pomoću FIB/SEM-a je ukazala da DC tretirane dinasorom sadrže više aglomerata GNP₁₀ intracelularno, a samo nekoliko nanočestica GNP₅₀ (**Slika 4.2.2.4.6.**). Signali koji su detektovani na BSE detektoru, za razliku od onih koji su detektovani na SE detektoru, nisu kristalno jasni usled male dubinske rezolucije koju ima BSE detektor. Međutim, EDX analiza je potvrdila da se u svetlim poljima unutar DC, nalazi isključivo zlato (podaci nisu prikazani).

TEM analiza je potvrdila da su GNP nakon internalizacije locirane u endozomu. Međutim, FIB/SEM i TEM analiza je ukazala da su neke partikule locirane i izvan endozoma (**Slika 4.2.2.4.7.**). U tim slučajevima su GNP locirane unutar citoplazmatskih cevastih struktura, u aglomeriranom obliku (GNP₁₀), ili pojedinačno (GNP₅₀).



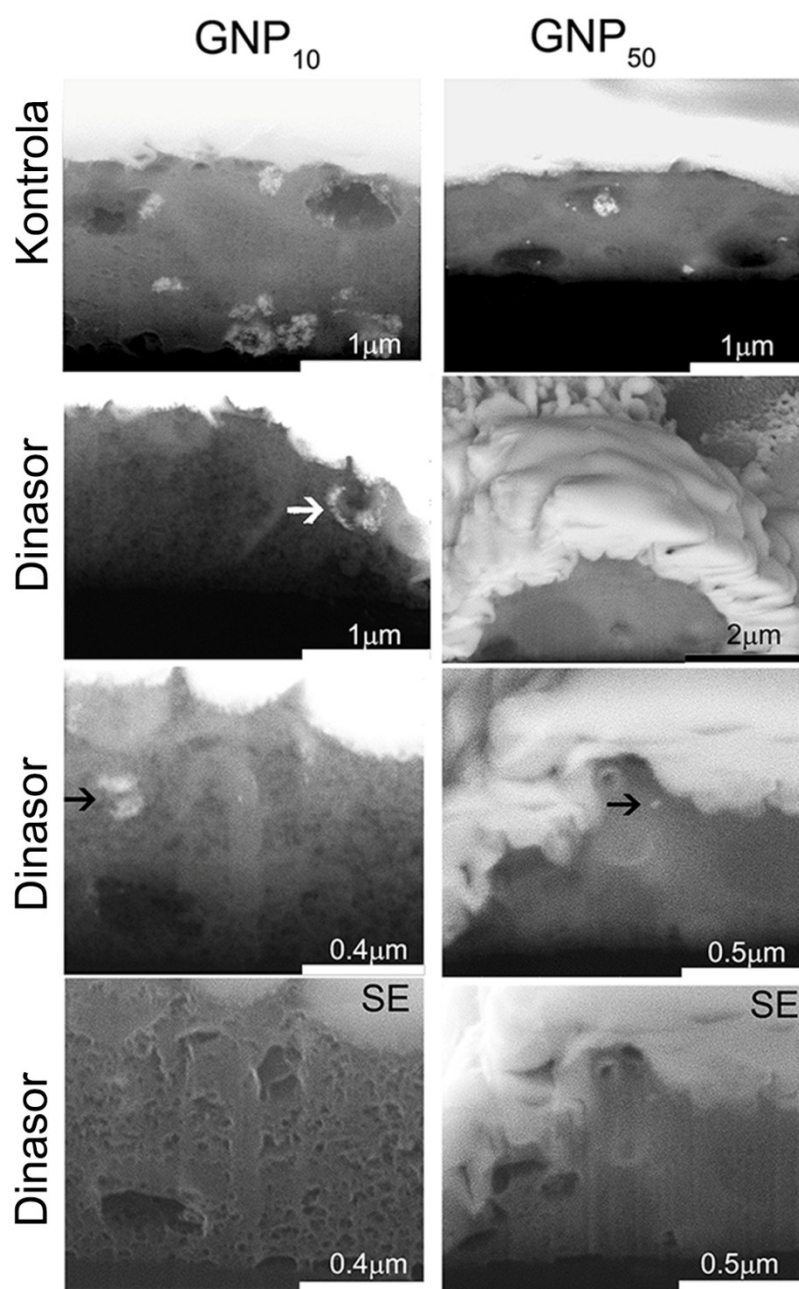
Slika 4.2.2.4.4. Mehanizmi internalizacije GNP od strane DC.

DC su kultivisane sa GNP₁₀ i GNP₅₀ (10 μg/ml) 4 sata. Nakon toga su uzorci pripremljeni za SEM analizu i analizirani pod različitim uveličanjima koristeći BSE detektor. Bele strelice pokazuju interakcije GNP sa membranom DC.



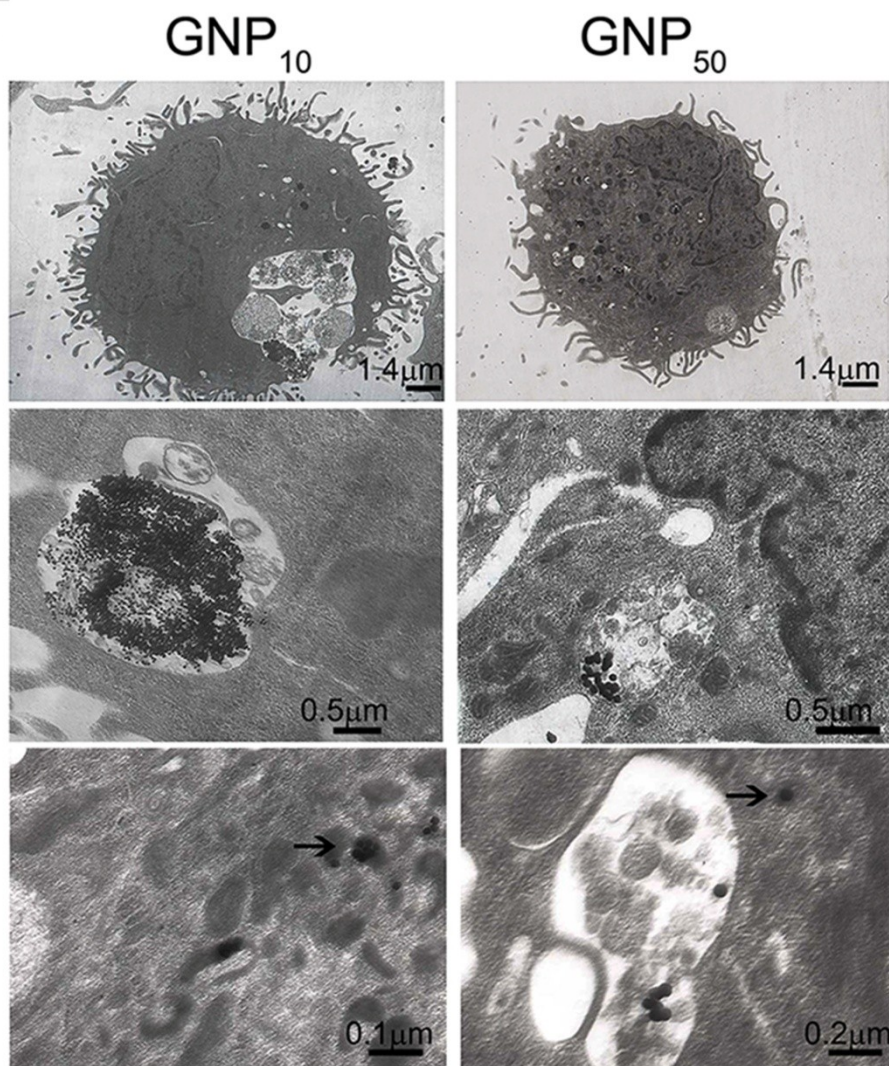
Slika 4.2.2.4.5. Mehanizmi internalizacije GNP od strane DC.

DC su kultivisane sa GNP_{10} i GNP_{50} ($10\mu\text{g/ml}$) 4 sata u prisustvu Dinasora ili njegovom odsustvu (kontrola), kako je opisano u poglavlju 3. Nakon kultivacije, ćelije su obeležene sa FM4-64 i su analizirane konfokalnom mikroskopijom pod različitim uveličanjima.



Slika 4.2.2.4.6. Mehanizmi internalizacije GNP od strane DC.

DC su kultivisane sa GNP_{10} i GNP_{50} (10 $\mu g/ml$) 4 sata u prisustvu Dinadora ili u njegovom odsustvu (kontrola), kako je opisano poglavlju 3. Nakon kultivacije, ćelije su isprane i pripremljene za SEM analizu. Postolje sa uzorkom je nagnuto 52° u odnosu na SEM detektor i uzorci su prekriveni platinom. Zatim je napravljen poprečni presek pomoću FIB zraka, a uzorci su analizirani SEM-om koristeći SE i BSE detektore. Bela strelica pokazuje citoplazmatsku vezikulu sa GNP_{10} koja je spojena sa spoljnom membranom. Crne strelice pokazuju intracelularne aglomerate GNP_{10} i pojedinačne čestice GNP_{50}



Slika 4.2.2.4.7. Mehanizmi internalizacije GNP od strane DC.

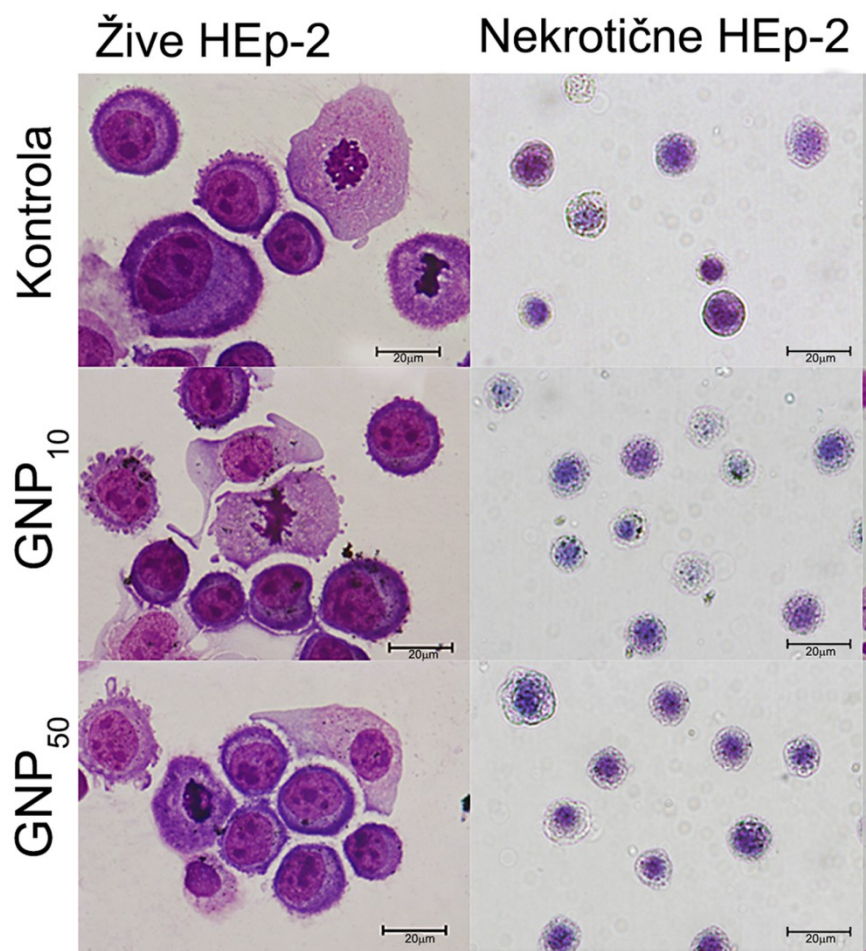
DC su kultivisane sa GNP₁₀ i GNP₅₀ (10 μg/ml), kako je opisano u poglavlju 3. Nakon kultivacije, ćelije su isprane i pripremljene za TEM analizu. Crne strelice pokazuju intraćelijske aglomerate GNP₁₀ i pojedinačne nanočestice GNP₅₀ van endozoma

4.2.2.5. Efekti GNP na maturaciju i funkcije DC stimulisanih nekrotičnim HEp-2 ćelijama

Prethodni rezultati ukazuju na to da GNP, inhibirajući sazrevanje DC, mogu potencijalno indukovati nepoželjne efekte u toku primene u fototermalnoj terapiji. U cilju provere ove hipoteze, HEp-2 ćelije su kultivisane sa GNP 24 sata, a zatim ubijene zagrevanjem na 63 °C 30 minuta. Slične temperature u timorskim ćelijama se postižu primenom fototermalne terapije uz korišćenje GNP [559, 560]. Indukcija nekroze visokom temperaturom je izabrana zbog toga što kontrolne HEp-2 ćelije nisu jednako podložne nekrozi nakon laserskog ozračenja kao HEp-2 ćelije koje su internalizovale GNP (podaci nisu prikazani) [560]. Obzirom da su nekrotične tumorske ćelije važni stimulatori sazrevanja DC u hemo i radio terapiji [401], ispitan je efekat nekrotičnih tumorskih HEp-2 ćelija, prethodno tretiranih sa GNP (10 µg/ml), na maturaciju i antitumorske funkcije DC.

Tretman HEp-2 ćelija kultivisanih u 24 sata u prisustvu GNP₁₀ ili GNP₅₀ indukuje kompletnu nekrozu ovih ćelija, obzirom da je nakon bojenja ćelija Tripan plavim uočeno više od 98% nekrotičnih HEp-2 ćelija. I u živim i u nekrotičnim HEp-2 ćelijama su detektovane GNP (**Slika 4.2.2.5.1**).

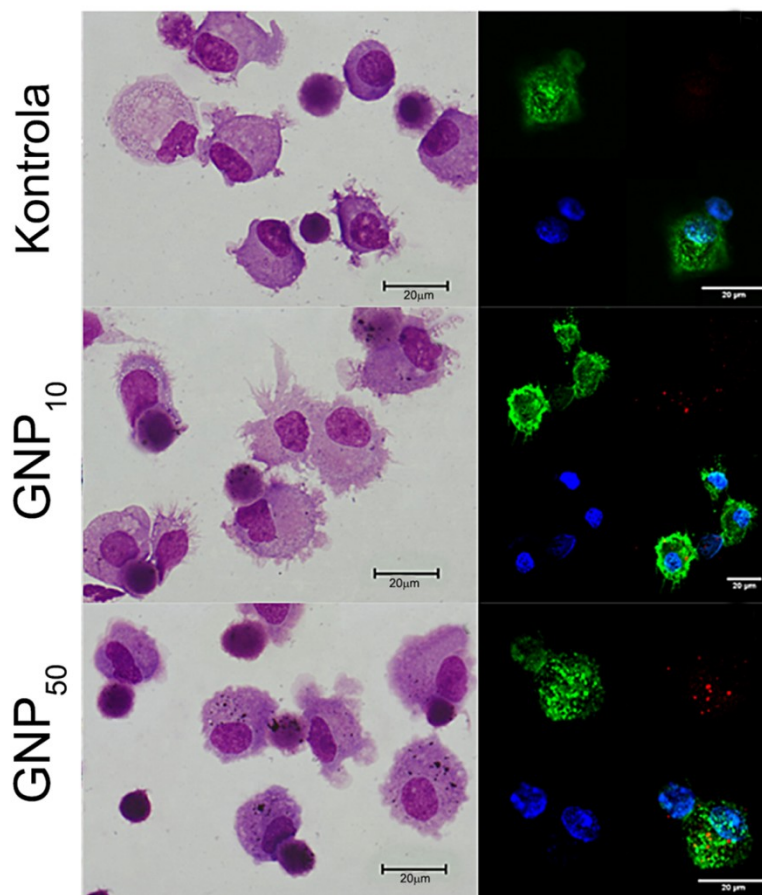
Nakon toga su nezrele DC tretirane ovako pripremljenim nekrotičnim HEp-2 ćelijama tokom 48 sati. Nakon kultura je pomoću analize svetlosnom i konfokalnom mikroskopijom detektovano prisustvo GNP unutar DC (**Slika 4.2.2.5.2**).



Slika 4.2.2.5.1. Internalizacija GNP od strane HEp-2 ćelija i indukcija nekroze temperaturom.

HEp-2 su kultivisane tokom 24 sata sa GNP₁₀ ili GNP₅₀ (10µg/ml), a zatim sakupljene i obojene na MGG metodom (leva kolona). Sakupljene HEp-2 ćelije su ubijene na 63 °C tokom 30 minuta, nakon čega su uzorci obojeni Tripan plavim i analizirani na svetlosnom mikroskopu (desna kolona).

Kokultura nekrotičnih HEp-2 i MoDC

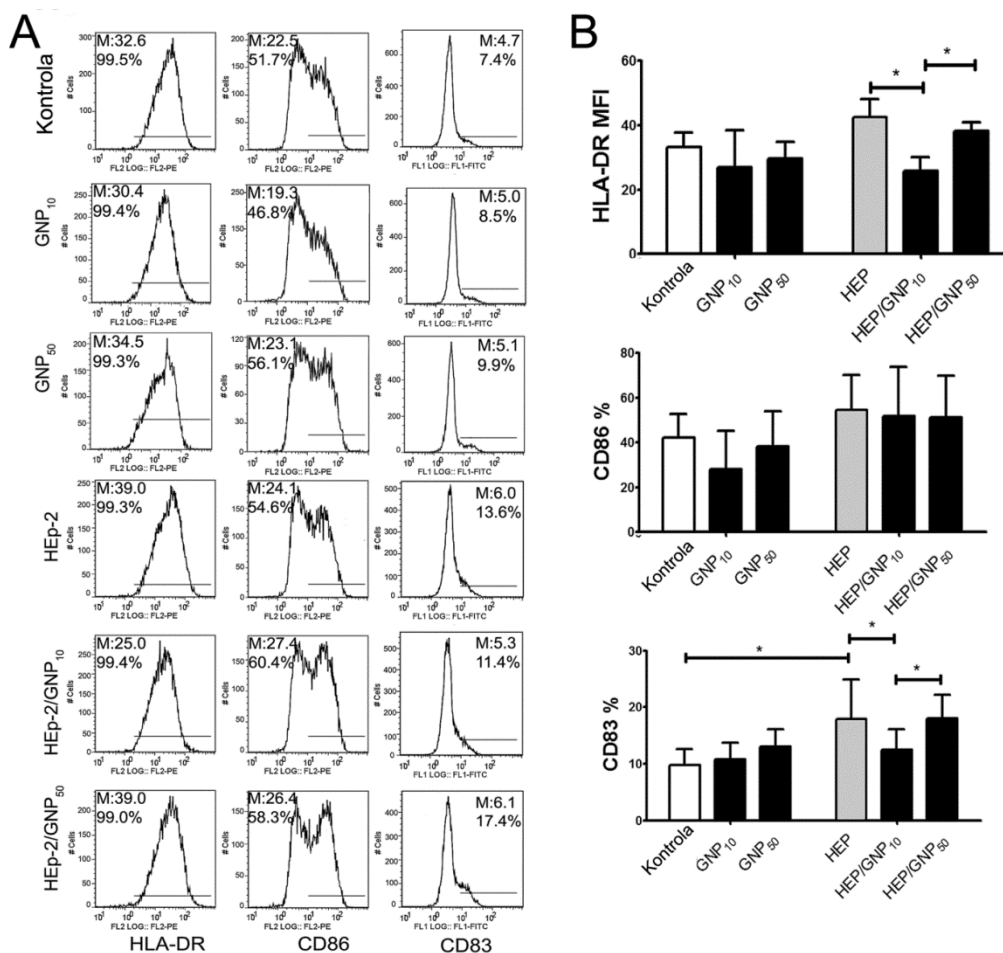


Slika 4.2.2.5.2. Kokultura nekrotičnih HEp-2 ćelija i DC.

Nekrotične HEp-2 ćelije, prethodno tretirane sa GNP ili bez prisustva GNP (kontrola), su kultivisane sa nezrelim DC tokom 48h, nakon čega su ćelije sakupljene i pripremljeni su citospinovi. Uzorci su obojeni MGG metodom (leva kolona), ili sa HLA-DR:Alexa 488 i PI, i analizirani na konfokalnom mikroskopu. GNP su detektovane na osnovu raspršenog 633nm laserskog svetla.

Rezultati fenotipske analize su pokazali da nekrotične HEp-2 ćelije indukuju blago povećanje ekspresije HLA-DR i CD86, ali značajno povećanje CD83 molekula (**Grafikon 4.2.2.5.1.**). Međutim, kada su nekrotične HEp-2 ćelije prethodno tretirane sa GNP₁₀, uočeno je da DC poseduju značajno nižu ekspresiju HLA-DR i CD83, u poređenju sa DC tretiranim kontrolnim nekrotičnim HEp-2 ćelijama i DC tretiranim HEp-2/GNP₅₀. Same

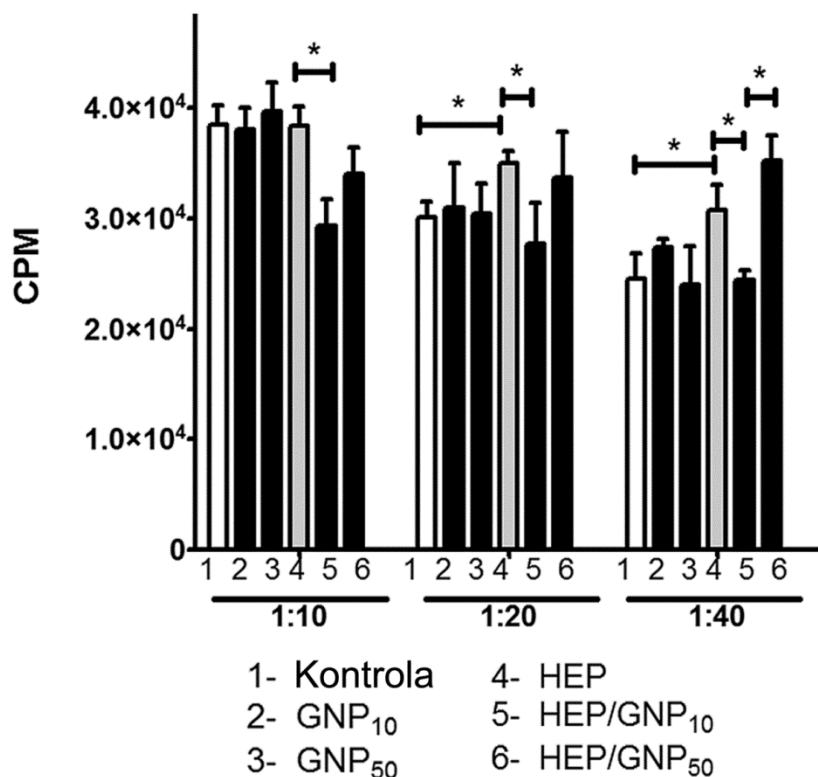
GNP, kao i u prethodnim ispitivanjima, nisu modifikovale ekspresiju ovih molekula u odsustvu nekrotičnih HEP-2 ćelija.



Grafikon 4.2.2.5.1. Efekat GNP na fenotipsku maturaciju DC indukovanu sa nekrotičnim HEP-2 ćelijama.

DC su kultivisane u prisustvu nekrotičnih HEP-2 ćelija, pretodno tretiranih sa GNP (10 μ g/ml) kao što je opisano u poglavlju 3, nakon čega je analizirana ekspresija HLA-DR, CD86 i CD83 protočnom citometrijom. A) Prikazana je fenotipska maturacija DC iz jednog reprezentativnog eksperimenta; Marker koji pokazuju specifičnu fluorescencu su podešeni na osnovu korišćenja irelevantnih izotipskih antitela. B) Zbirni podaci iz 4 nezavisna eksperimenta su prikazani kao srednja vrednost % ili MFI \pm SD. * p <0.05 (Fridmanova dvofaktorska ANOVA)

U skladu sa ovim rezultatima, DC kultivisane sa nekrotičnim HEp-2/GNP₁₀, ali ne sa HEp-2/GNP₅₀, imaju smanjenu alostimulatornu sposobnost u MLR sa prečišćenim CD3⁺T ćelijama. Ovakav fenomen je uočen u najmanje dva različita odnosa DC i CD3⁺T ćelija u 4 alogene MLR, od kojih je reprezentativna prikazana na **grafikonu 4.2.2.5.2**.



Grafikon 4.2.2.5.2. Efekat GNP na alostimulatornu sposobnost DC indukovanu nekrotičnim HEp-2 ćelijama.

DC su kultivisane u prisustvu nekrotičnih HEp-2 ćelija, pretodno tretiranih sa GNP (10µg/ml) kao što je opisano u poglavlju 3, nakon čega su sakupljene i kultivisane sa prečišćenim CD3⁺T ćelijama (1 x 10⁵/bazenu) u različitim brojnim odnosima (1:10-1:40). Nakon 5 dana kulture je izmerena proliferacija CD3⁺T ćelija na osnovu ugradnje ³H timidina na scintilatnom β brojaču. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost CPM ± SD šestoplikata iz jednog reprezentativnog eksperimenta. *p<0.05 (Fridmanova dvofaktorska ANOVA)

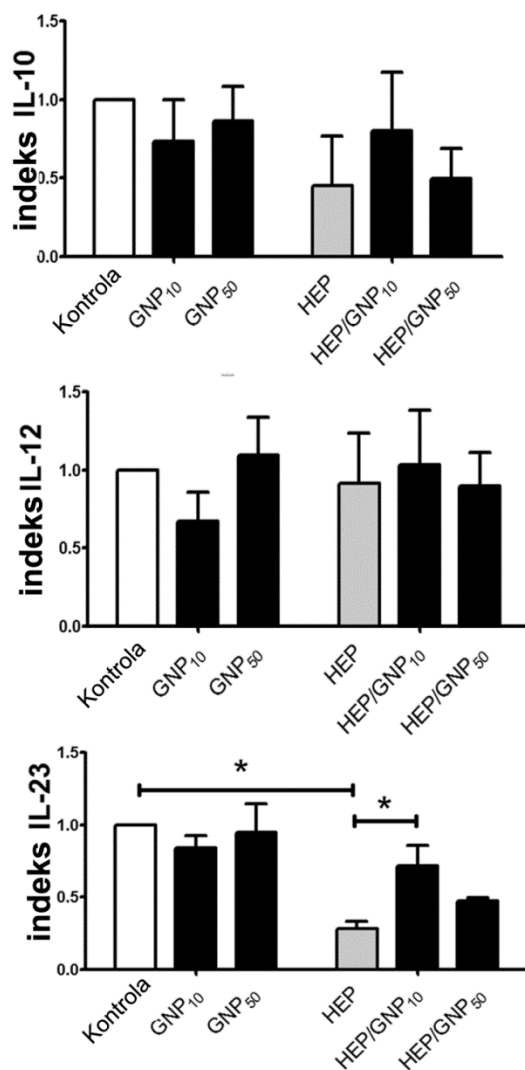
Supernatanti kultura DC kultivisanih 2 dana sa GNP su sakupljeni u cilju određivanja koncentracija IL-10, IL-12 i IL-23, dok je iz kokultura DC i CD3⁺T ćelija nakon 5 dana sakupljen supernatant u kom je određivana koncentracija IL-4, IFN γ i IL-17. Obzirom da je nivo citokina varirao između različitih donora korišćenih u eksperimentima, rezultati su prikazani kao indeksi u odnosu na kontrolne nezrele DC (1) (**Tabela 4.2.2.5.1.**).

Tabela 4.2.2.5.1. Produkcija citokina od strane DC aktiviranih nekrotičnim HEp-2 ćelijama (IL-10, IL-12 i IL-23) i od strane CD3⁺T ćelija (IL-4, IFN- γ , IL-17) u kokulturi sa DC.

Uzorci	IL-10	IL-12	IL-23	IL-4	IFN- γ	IL-17
*Kontrola	68.9 (4.4-122.0)	3.4 (<2.0-4.2)	60.1 (<2-87.2)	140.6 (20.6-169.9)	7909.2 (3220-18900)	328.8 (81.9-621.4)
*GNP₁₀	49.8 (4.6-106.5)	10.7 (<2.0-14.5)	40.4 (<2-99.6)	110.2 (24.6-150.1)	5989.0 (2991.4-15889.9)	391.1 (65.5-832.2)
*GNP₅₀	55.5 (5.2-95.0)	27.7 (<2-55.5)	65.3 (<2-98.1)	111.6 (25.0-158.4)	9498.1 (4211.1-19844.5)	411.4 (95.4-669.0)
HEp-2	38.1 (14.4-110.3)	4.1 (<2-8.3)	17.6 (12.9-32.2)	190.9 (66-243)	6144.5 (3780.0-19224.4)	152.5 (54.7-435.4)
HEp/GNP₁₀	58.3 (17.4-124.3)	4.5 (<2-9.1)	47.8 (35.9-73.9)	359.0 (121-445)	5167.5 (2441.1-22134.4)	425.3 (247.9-718.2)
HEp/GNP₅₀	45.4 (15.8-90.2)	3.3 (<2-8.2)	31.2 (20.7-59.3)	215.2 (54-250.4)	5898.8 (3909.4-17332.0)	319.4 (99.8-549.4)

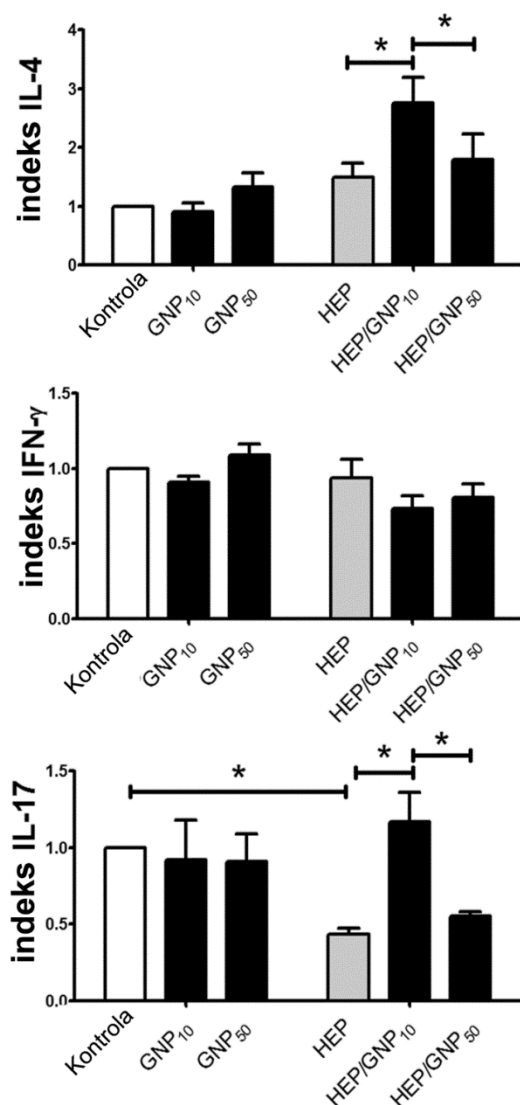
DC su kultivisane sa nekrotičnim HEP-2 ćelijama prethodno tretiranim GNP (10 μ g/ml), kao što je opisano u poglavlju 3, nakon čega je iz supernatanta određna koncentracija IL-12p70, IL-23 i IL-10 ELISA metodom, dok je iz supernatana kokultura DC i CD3⁺T ćelija određena koncentracija IL-4, IL-17 i IFN- γ na isti način. Rezultati su prikazani kao medijam (opseg) iz 4 nezavisna eksperimenta ili 8 nezavisnih eksperimenata (*).

Pokazano je da DC tretirane kontrolnim nekrotičnim HEp-2 ćelijama, kao i HEp-2 ćelijama koje su prethodno kultivisane sa GNP₅₀, značajno manje indukuju produkciju IL-17 od strane CD3⁺T ćelija u kokulturi. Ovi rezultati su u korelaciji sa smanjenom produkcijom IL-23 koja je detektovana u kulturi DC sa HEp-2 ćelijama i HEp-2/GNP₅₀ (**Grafikoni 4.2.2.5.3. i 4.2.2.5.4.**). Ovakav efekat nekrotičnih HEp-2 ćelija na produkciju IL-17 je inhibiran ako su u kulturi prisutne GNP₁₀. Osim toga, pokazano je da HEp-2/GNP₁₀ potenciraju sposobnost DC da stimulišu IL-4 od strane CD3⁺T ćelija.



Grafikon 4.2.2.5.3. Efekat GNP na produkciju citokina od strane DC indukovanu nekrotičnim HEp-2 ćelijama.

DC su kultivisane sa nekrotičnim HEp-2 ćelijama prethodno tretiranim sa GNP (10 μ g/ml), kao što je opisano u poglavlju 3, nakon čega je iz supernatanta određen nivo IL-12p70, IL-23 i IL-10 ELISA metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost indeksa koncentracije citokina u odnosu na kontrolne nezrele DC (1.0) \pm SD iz 4 nezavisna eksperimenta. * $p < 0.05$ (Fridmanova dvofaktorska ANOVA)

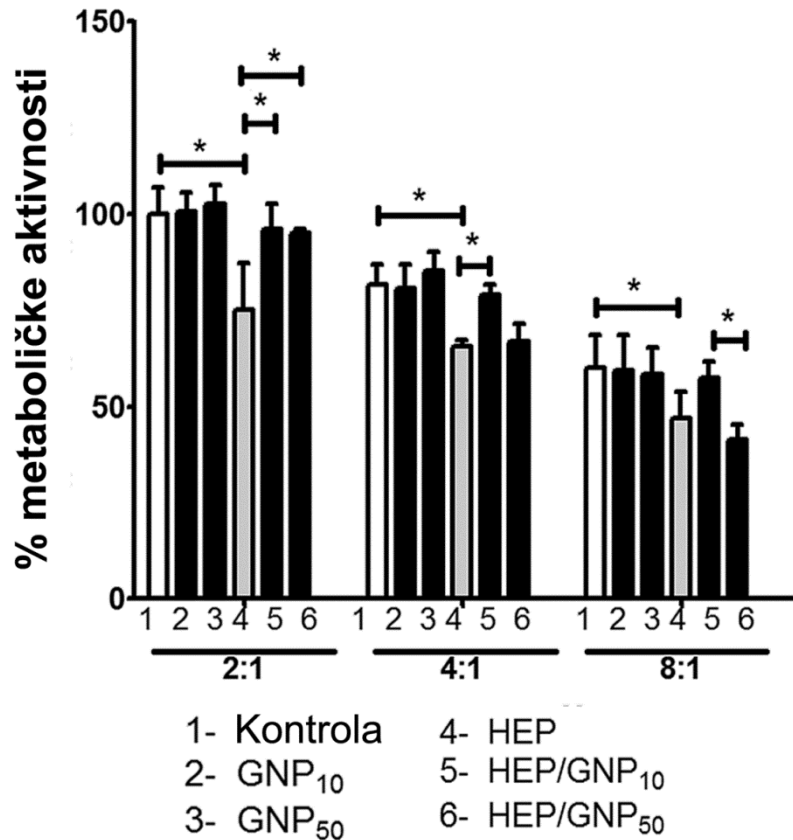


Grafikon 4.2.2.5.4. Efekat GNP na polarizacionu sposobnost DC indukovanu sa nekrotičnim HEp-2 ćelijama.

DC su nakon kultivacije sa nekrotičnim HEp-2 ćelijama, prethodno tretiranim sa GNP (10 μ g/ml), kokultivisane sa CD3⁺ T ćelijama u brojnom odnosu 1:20, kao što je opisano u poglavlju 3. Nakon toga je u supernatantu kokultura određena koncentracija IFN- γ , IL-23 i IL-10 ELISA metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost indeksa koncentracije citokina u odnosu na kontrolne nezrele DC (1.0) \pm SD iz 4 nezavisna eksperimenta. *p<0.05 (Fridmanova dvofaktorska ANOVA)

U poslednjoj fazi ove studije je ispitano kakav citotoksični efekat prema HEp-2 ćelijama imaju CD3⁺T ćelije kokultivisane sa DC, maturiranim u prisustvu HEp-2, HEp-2/GNP₁₀ ili HEp-2/GNP₅₀, kao što je ranije opisano. CD3⁺T ćelije su kultivisane sa HEp-2 u tri odnosa CD3/HEp-2 (2:1,4:1 i 8:1). Citotoksičnost CD3⁺T ćelija u kulturi sa vijabilnim HEp-2 ćelijama je izmerena MTT testom, pri čemu su kao kontrolne kulture korišćene HEp-2 i odgovarajuće CD3⁺T ćelije kultivisane odvojeno.

Uočeno je da CD3⁺T ćelije, koje su aktivirane sa DC tretiranim kontrolnim nekrotičnim HEp-2 ćelijama ispoljavaju citotoksičnost prema HEp-2 ćelijama na dozno zavisni način. Međutim, CD3⁺T ćelije kultivisane sa DC koje su inkubirane sa HEp-2/GNP₁₀ imaju značajno manju citotoksičnu aktivnost u odnosu na DC tretirane kontrolnim HEp-2 ćelijama. Razlike u ovakvom efektu između GNP₁₀ i GNP₅₀ su bile značajne samo pri većim odnosima CD3⁺T/HEp-2 ćelija (**Grafikon 4.2.2.5.5**). Kao i u ranijim ispitivanjima, GNP ne modifikuju sposobnost DC da indukuju citotoksične CD3⁺T ćelije bez prisustva HEp-2 ćelija.



Grafikon 4.2.2.5.5. Efekat GNP na sposobnost DC da pokrenu antitumorski odgovor in vitro posredstvom CD3⁺T ćelija.

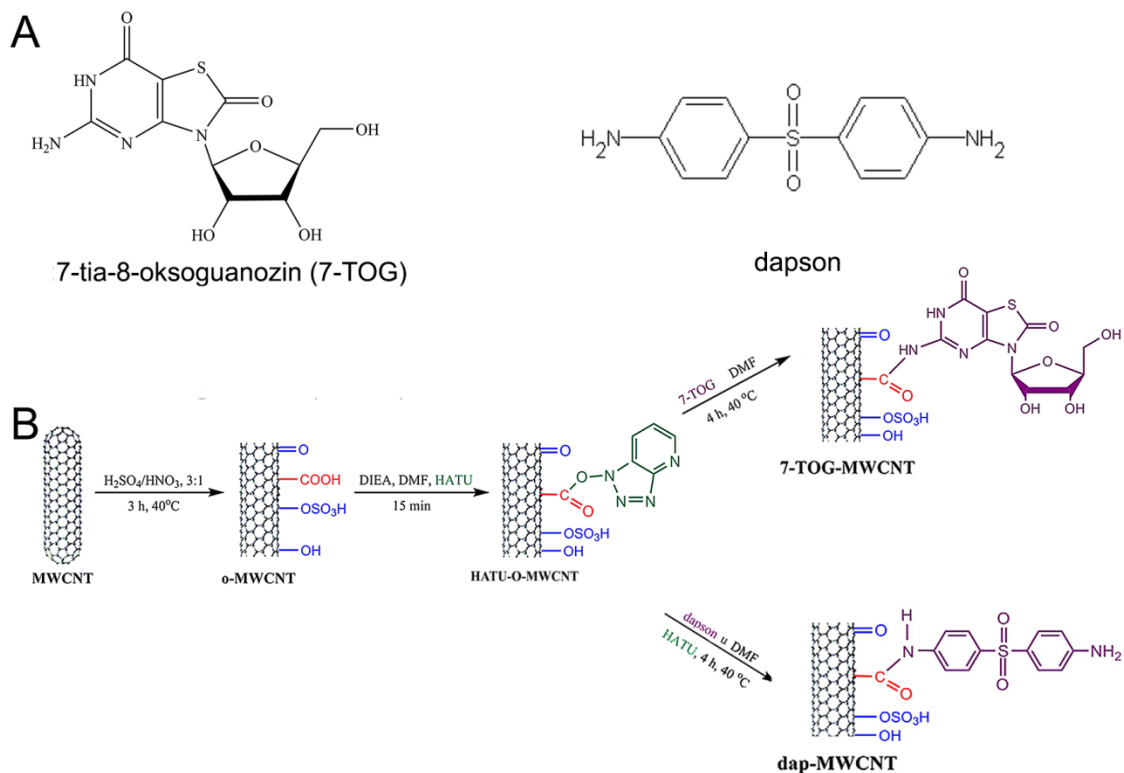
DC su kultivisane sa nekrotičnim HEP-2 ćelijama, prethodno tretiranim sa GNP, 2 dana. Nakon toga su DC sakupljene i kultivisane sa CD3⁺T ćelijama 3 dana, kao što je opisano u poglavlju 3. Aktivirane CD3⁺T ćelije su tretirane 2 dana sa IL-2 a zatim kokultivisane sa živim HEP-2 ćelijama u 3 odnosa (CD3/HEP-2 2:1, 4:1 i 8:1). Metabolička aktivnost je određena nakon 24 časovne kultivacije CD3⁺T ćelija i HEP-2 ćelija MTT testom. Kao dodatne kontrolne su korišćene HEP-2 i odgovarajuće CD3⁺T ćelije kultivisane odvojeno a njihove optičke gustine su oduzete od optičkih gustina u odgovarajućim kokulturama. Prikazani su reprezentativni rezultati MTT testa koji su predstavljeni kao srednja vrednost % metabolične aktivnosti u odnosu na kontrolne kulture u kojima su CD3⁺T ćelije kultivisane sa nezrelim DC ± SD šestoplikata *p<0.05 (Fridmanova dvofaktorska ANOVA).

4.3. BIOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULACIJSKE OSOBINE UGLJENIČNIH NANOCEVI FUNKCIONALIZOVANIH DAPSONOM I 7-TOG AGONISTOM

Višeslojne ugljenične nanocevi (MWCNT) su zbog svoje velike površine u odnosu na zapreminu, i sposobnosti da prodru u ćelije, vrlo atraktivne za upotrebu kao nosači lekova i biomolekula u ciljanoj ćelijskoj terapiji [510, 511]. Lekovi kao što je dapson, primenjeni u solubilnoj formi, mogu ispoljiti brojne neželjene sistemske efekte nakon metaboličke obrade u jetri [517-519]. Sa druge strane, za postizanje terapijskog efekta imunostimulatornim biomolekulima, kao što je 7-TOG agonist, često je neophodno primeniti visoke koncentracije ovih biomolekula. Stoga je u narednom delu studije ispitivana mogućnost kovalentnog vezivanja dapsona i 7-TOG agonista za MWCNT, efikasnost akumulacije ovih konjugata u endosome PMØ i DC, i njihov uticaj na funkcije ovih APC.

4.3.1 Sinteza i karakterizacija funkcionalizovanih MWCNT

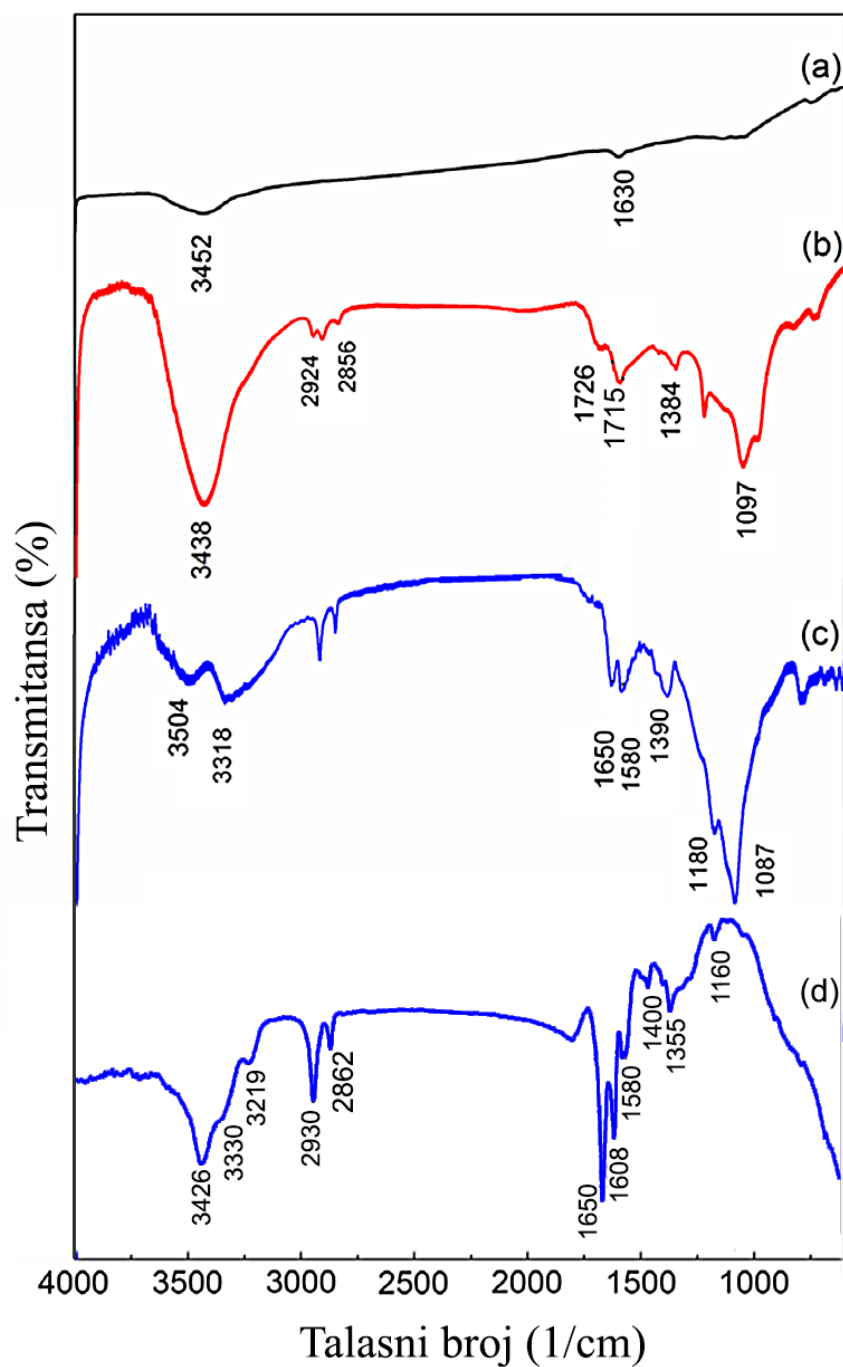
Pre kovalentnog vezivanja dapsona ili 7-TOG za MWCNT, primarne MWCNT su oksidovane pomoću H_2SO_4 i HNO_3 (zapreminski odnos 3:1), kako je to opisano u poglavlju 3 (**Slika 4.3.1.1a**). Nakon toga je primenjen originalni metod konjugacije o-MWCNT sa dapsonom ili 7-TOG, pri čemu je formiranje amidne veze omogućeno korišćenjem N-HATU i DIEA u rastvoru DMF [555, 573].



Slika 4.3.1.1. Šematizovan prikaz konjugacije MWCNT dapsonom i 7-TOG.

Prikazane su **A**) strukturne formule molekula 7-TOG i dapsona koji su korišćeni u reakciji sa oksidovanim MWCNT. **B**) Primarne MWCNT su oksidovane do o-MWCNT, a nakon toga konjugovane sa dapsonom ili 7-TOG-om preko HATU-O-MWCNT intermedijera.

Karakterizacija primarnih MWCNT, o-MWCNT i dap-MWCNT je urađena FT-IR spektroskopijom. FT-IR spektar, prikazan na **grafikonu 4.3.1.1.**, pokazuje da su oksidacijom primarnih MWCNT uvedene karboksilne grupe na površini MWCNT, što je potvrđeno detekcijom traka na ≈ 3438 i $\approx 1726 \text{ cm}^{-1}$, koje odgovaraju vibracijama istezanja $\nu(\text{OH})$, odnosno $\nu(\text{C}=\text{O})$ (**Grafikon 4.3.1.1b**).



Grafikon 4.3.1.1. FT-IR transmisioni spektar **a)** primarnih MWCNT **b)** o-MWCNT, **c)** dap-MWCNT, i **d)** 7-TOG-MWCNT.

Karakteristična traka na $\approx 1097 \text{ cm}^{-1}$ potiče od vibracije istezanja $\nu(\text{C-O})$ u karboksilnim grupama, dok traka na $\approx 1384 \text{ cm}^{-1}$ potiče od vibracije istezanje $\nu(\text{SO}_3\text{H})$ kisele sulfatne grupe, čiji se signal preklapa sa $\delta(\text{OH})$ deformacionim vibracijama karboksilne grupe [574]. Asimetrične vibracije istezanja $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$ sp^3 hibridizovanog ugljenika su locirane na $\approx 2924 \text{ cm}^{-1}$, dok su simetrične $\nu_{\text{s}}(\text{CH}_2)$ locirane na $\approx 2858 \text{ cm}^{-1}$.

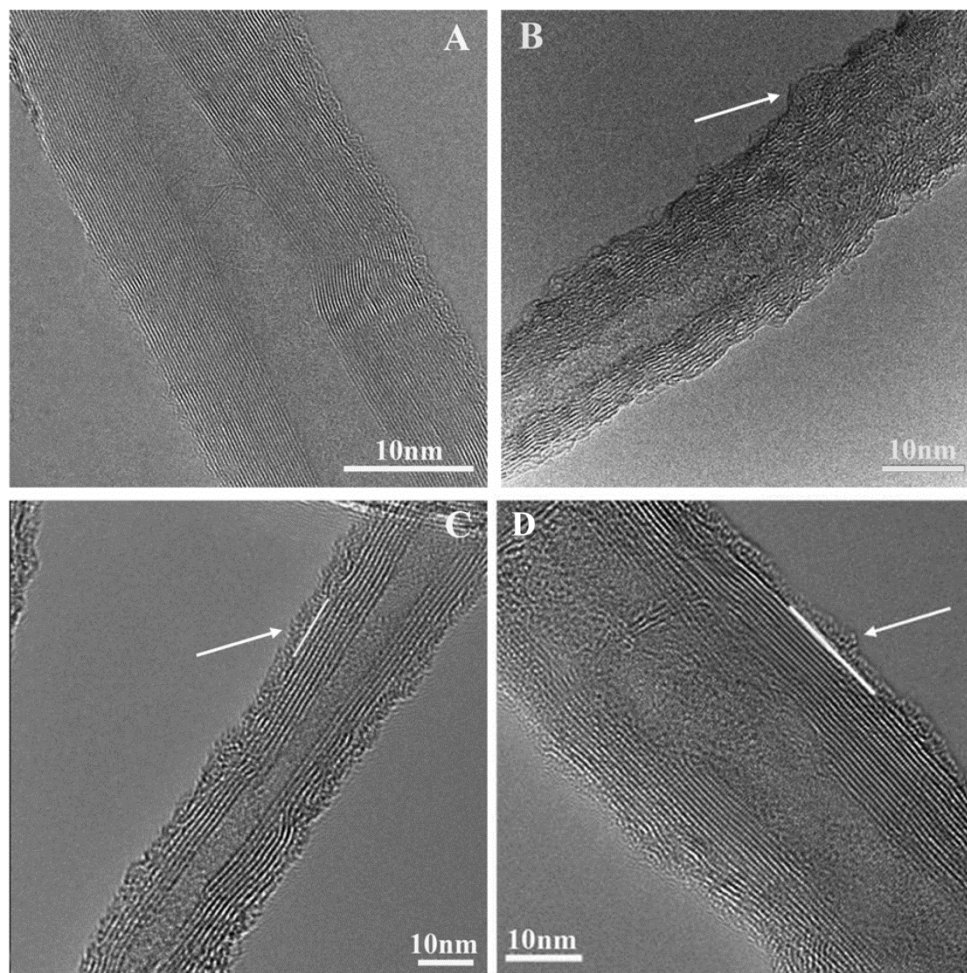
FT-IR spektar dap-MWCNT (**Grafikon 4.3.1.1c**) je jasno pokazao da se između amino grupe dapsona i karboksilne grupe o-MWCNT formira amidna veza. Ovo je zaključeno na osnovu karakterističnih traka na ≈ 1650 i $\approx 1580 \text{ cm}^{-1}$, koje odgovaraju vibracijama istezanja $\nu(\text{C=C})$ unutar aromatičnog prstena, odnosno, deformacionim vibracijama amidne karbonilne N-H grupe. Trake na $\approx 3300\text{-}3600 \text{ cm}^{-1}$ potiču od simetričnog i asimetričnog $\nu(\text{NH}_2)$ istezanja amidne grupe, koja se preklapa sa $\nu(\text{O-H})$ vibracijom istezanja. Trake na ≈ 1390 i $\approx 1180 \text{ cm}^{-1}$ potiču od simetričnih i asimetričnih vibracija sulfonske grupe, preklapljene sa trakom odgovarajuće sulfatne grupe.

FT-IR transmisioni spektar 7-TOG-MWCNT (**Grafikon 4.3.1.1d**) je takođe potvrdio kovalentnu vezu između amino grupa 7-TOG i karboksilnih grupa o-MWCNT. Na ovo ukazuje gubitak traka na $\approx 1726 \text{ cm}^{-1}$ i 1715 cm^{-1} na o-MWCNT, i pojavljivanje ovih traka na nižim frekvencijama $\approx 1650 \text{ cm}^{-1}$ i $\approx 1580 \text{ cm}^{-1}$ u 7-TOG-MWCNT [555, 556]. Trake na $\approx 1650 \text{ cm}^{-1}$ i $\approx 1580 \text{ cm}^{-1}$, koje se preklapaju sa $\nu(\text{C=C})$ vibracijama istezanja aromatičnih prstenova, potiču od vibracija istezanja i savijanja karbonila amida i N-H veza. Traka na $\approx 3426 \text{ cm}^{-1}$ potiče od vibracije istezanja $\nu(\text{O-H})$ primarne i sekundarne hidroksilne grupe koja je prisutna na karbohidratnom prstenu guanozil amidne grupe. Trake na ≈ 2930 i $\approx 2862 \text{ cm}^{-1}$ potiču od asimetričnih i simetričnih vibracija istezanja C-H metilenske grupe.

U cilju potvrde analize dobijene FT-IR-om, analizirana je morfologija primarnih MWCNT, o-MWCNT, dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT TEM-om, dok je hemijski sastav ovih nanocevi analiziran pomoću ICP-MS metode.

Rezultati dobijenim TEM-om prikazani na **slici 4.3.1.2** ukazuju na to da su bočni zidovi primarnih MWCNT glatki. Za razliku toga, bočni zidovi o-MWCNT, dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT su talasasti, sa karboksilovanim karbonatnim fragmentima u spoljnjem

grafenskom sloju i unutar nanocevi (**Slika 4.3.1.2.**). Merenjem dužine primarnih MWCNT, o-MWCNT, dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT pomoću TEM-a je uočeno j da se oksidacijom MWCNT značajno skraćuju, nakon čega se njihova dužina ne menja značajno funkcionalizacijom (rezultati nisu prikazani).



Slika 4.3.1.2. Reprezentativne mikrografije dobijene TEM analizom **A)** primarnih MWCNT, **B)** o-MWCNT, **C)** dap-MWCNT i **D)** 7-TOG-MWCNT

ICP-MS analiza ispitivanih nanocevi je ukazala na niži sadržaj ugljenika i povećan sadržaj vodonika i kiseonika kod o-MWCNT, u poređenju sa primarnim MWCNT, kao i na prisustvo male količine azota (0.49%) i sumpora (0.64%), što potvrđuje da o-MWCNT sadrže nove funkcionalne grupe (**Tabela 4.3.1.1.**). Elementalna analiza dap-MWCNT je

ukazala na uvođenje atoma azota i sumpora na površinu nanocevi. Na osnovu količine azota i sumpora u slobodnom dapsonu, procenjeno je da količina dapsona kovalentno vezanog za MWCNT iznosi oko 15 wt.%. Na osnovu razlike u procentu azota u o-MWCNT i 7-TOG-MWCNT, izračunato je da povećanje procentualne mase azota u prisustvu 7-TOG iznosi 11.3%. Slično tome, kada se sumpor koristi za izračunavanje procentualnog povećanja mase, uočava se da je 10.85% ukupnog 7-TOG vezano za površinu MWCNT.

ICP-MS analiza je pokazala da se oksidacijom i funkcionalizacijom MWCNT značajno smanjuje sadržaj metala (**Tabela 4.3.1.2.**)

Tabela 4.3.1.1. Elementalna analiza MWCNT u procesu funkcionalizacije dapsonom

Uzorak	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)	O (%)	O/C
MWCNT	97.46	0.32	0	0	2.22	0.023
o-MWCNT	82.13	1.13	0.49	0.64	15.56	0.189
dap-MWCNT	80.71	1.73	2.21	2.51	12.84	0.159
7-TOG-MWCNT	77.49	1.49	2.49	1.74	16.79	0.22

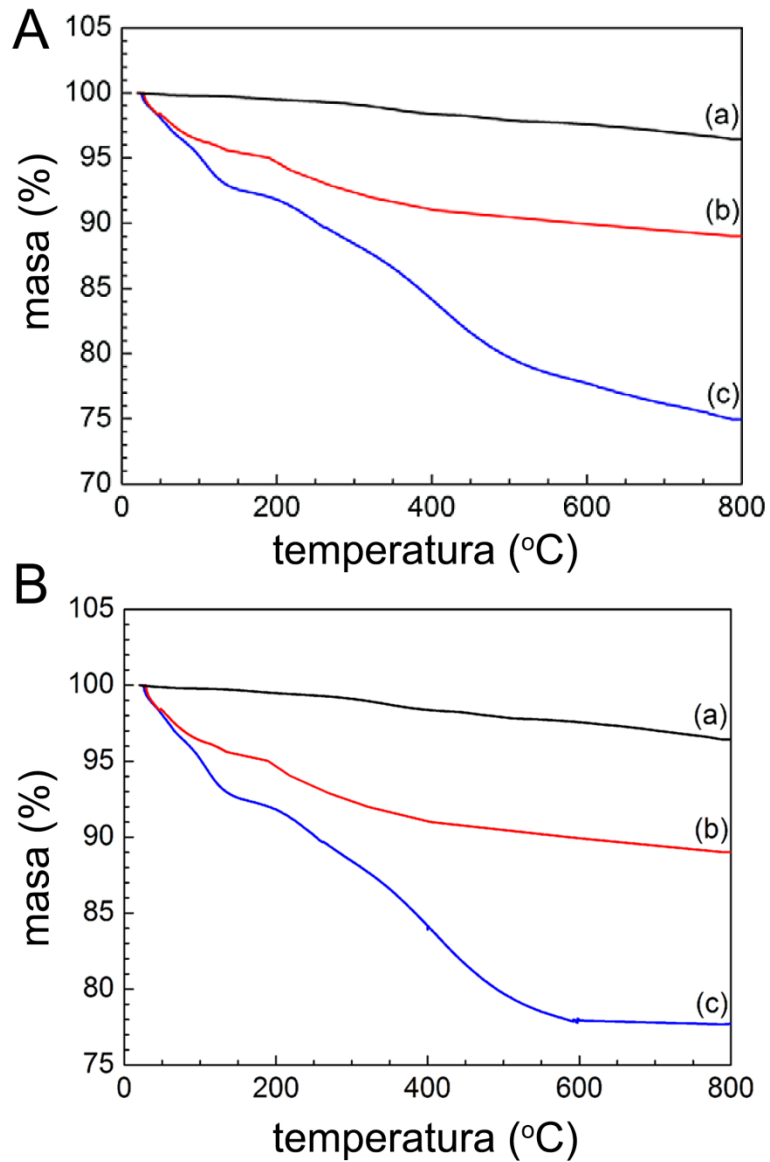
Tabela 4.3.1.2. Sadržaj metala u uzorcima MWCNT

Uzorak	Sadržaj metala ($\mu\text{g/g}$)							
	Fe	Ni	Co	Cr	V	Pb	Cd	As
MWCNT	2240	980	2.84	13.20	0.068	50	0.68	<i>n.d.</i>
o-MWCNT	21.66	47.30	0.28	3.60	0.062	9.17	0.084	<i>n.d.</i>
dap-MWCNT	14.57	14.11	0.27	3.65	0.028	10.22	0.092	<i>n.d.</i>
7-TOG-MWCNT	11.35	10.59	0.27	3.01	0.02	5.16	0.05	<i>n.d.</i>

n.d.-nije detektovano

U cilju procene stabilnosti dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT, sintetisani produkti su rastvarani u DMF i filtrirani pod vakumom. Slična procedura je primenjena i rastvaranjem dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT u metanolu i vodi. Nakon toga su sva tri filtrirana uzorka (DMF, metanola i vode) analizirana UV/VIS spektroskopijom, i pronađeno je manje od 0.3% adsorbovanog dapsona i 7-TOG u DMF, dok u vodi i metanolu nisu detektovani ovi molekuli.

Termogravimetrijska analiza (**Grafikon 4.3.1.2.**) je pokazala da su primarne MWCNT stabilne i da se teško razgrađuju na temperaturama ispod 800 °C. o-MWCNT na toj temperaturi gube oko 12 wt.%. Termalna degradacija o-MWCNT, dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT se odvija u više koraka usled različitih funkcionalnih grupa na njihovoj površini. Inicijalni gubitak na težini u intervalu do 200°C se pripisuje isparavanju adsorbovane vode [555, 575]. Na višim temperaturama, gubitak na težini se pripisuje termalnoj razgradnji bočnih grupa. Prema TGA, količina dapsona kovalentno vezanog za o-MWCNT takođe iznosila oko 15 wt.% (**Grafikon 4.3.1.2a**), dok količina 7-TOG vezanog za o-MWCNT iznosi oko 11 wt.% (**Grafikon 4.3.1.2b**), što potvrđuje pretpostavke dobijene ICP-MS analizom.



Grafikon 4.3.1.2. Krive TGA A) primarnih MWCNT (a), o-MWCNT (b) i dap-MWCNT (c) i B) A) primarnih MWCNT (a), o-MWCNT (b) i 7-TOG-MWCNT (c)

Funkcionalizacija MWCNT je značajno pospešila njihovu disperzibilnost u vodi, obzirom da primarne MWCNT, ubrzo nakon sonifikovanja agregiraju u vodi, dok su

funkcionalizovane o-MWCNT, 7-TOG-MWCNT i dap-MWCNT stabilne u vodenom rastvoru.

Merenjem zeta potencijala je pokazano da su o-MWCNT, dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT izrazito negativno naelektrisani (**Tabela 4.3.1.3.**).

Tabela 4.3.1.3. Zeta potencijal MWCNT

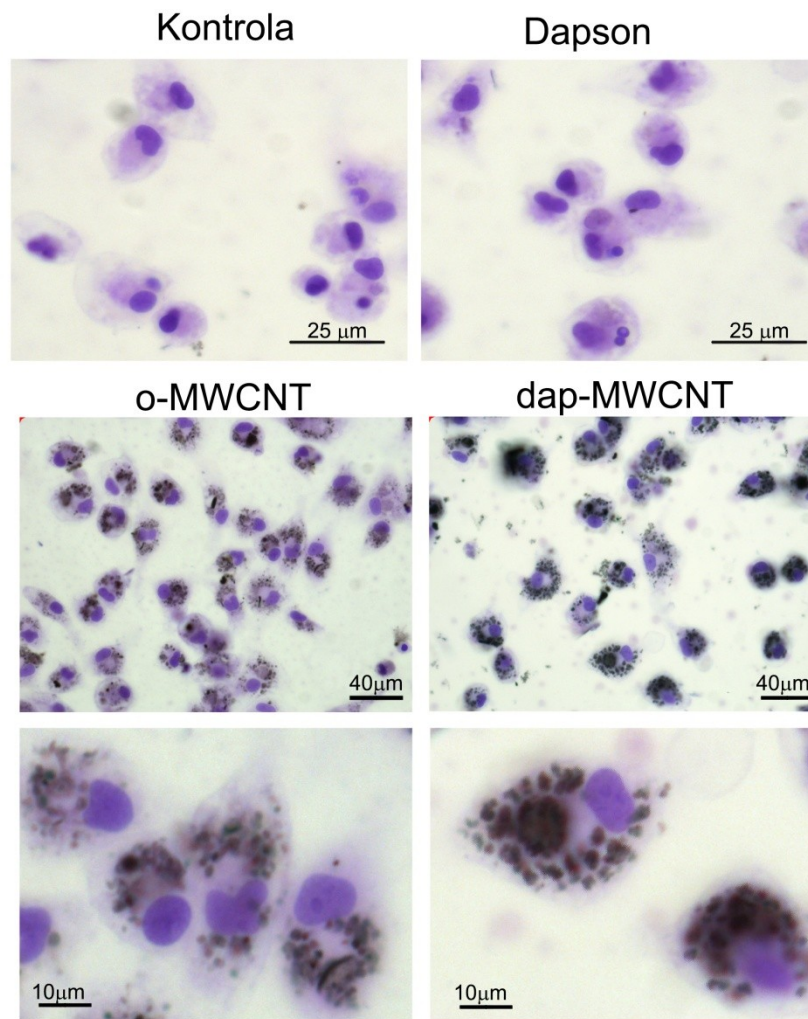
Uzorak	Zeta potencijal (mV)
MWCNT	-13.7±0.45 (pH 5.30)
o-MWCNT	-50.0±2.22 (pH 3.98)
dap-MWCNT	-47.2±1.96 (pH 7.33)
7-TOG-MWCNT	-50.1±2.24 (pH 8.31)

4.3.2. Internalizacija funkcionalizovanih MWCNT

Makrofagi i DC predstavljaju prirodne rezervoare intacelularnih patogena, kao što su vrste iz roda Mycobacterium. Zahvaljujući endozomnim TLR, ove ćelije mogu prepoznati intracelularne infekcije i pokrenuti odgovarajući imunski odgovor. Stoga je u sledećem delu ove studije je ispitana sposobnost PMØ i DC da fagocituju dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT, i kakva je intraćelijska lokalizacija funkcionalizovanih MWCNT nakon fagocitoze.

4.3.2.1 Internalizacija dap-MWCNT od strane PMØ

Dap-MWCNT (25µg/ml), ili odgovarajuće koncentracije kontrolnih o-MWCNT, su tokom 24 časa inkubirane sa PMØ, nakon čega je internalizacija dap-MWCNT proučavana svetlosnom mikroskopijom. Analiza je pokazala da PMØ podjednako fagocituju dap-MWCNT i kontrolne o-MWCNT (**Slika 4.3.2.1.1.**).



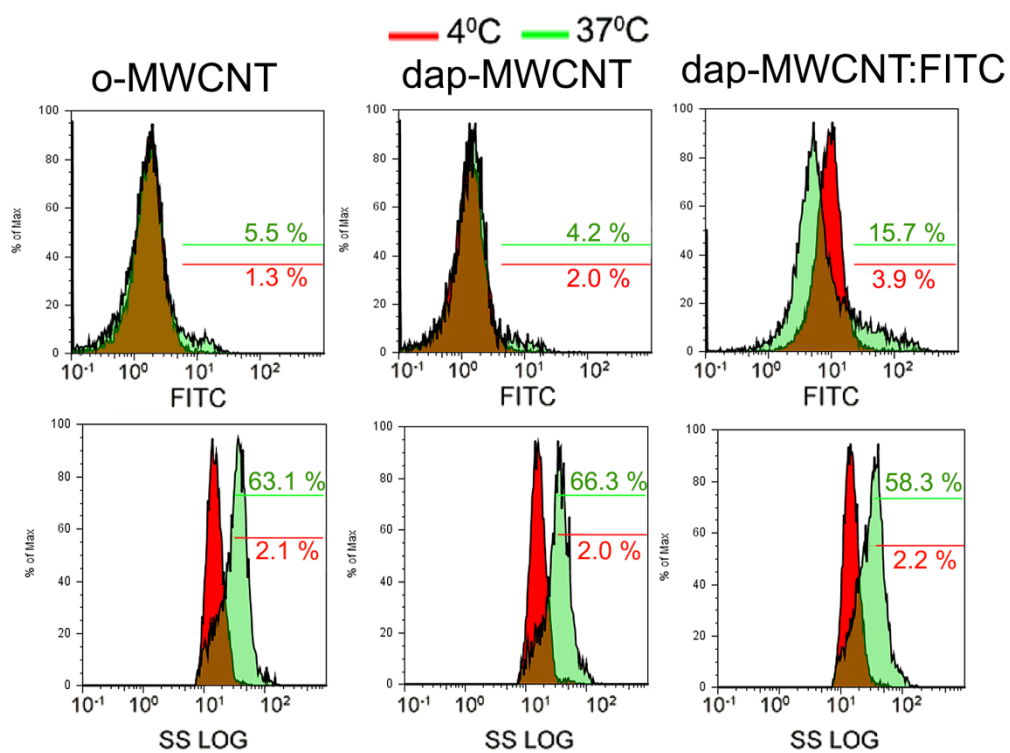
Slika 4.3.2.1.1. Analiza fagocitoze MWCNT od strane PMØ svetlosnom mikroskopijom. PMØ su kultivisani tokom 24 sata sa dap-MWCNT (25 μg/ml), kontrolnim o-MWCNT (21.3 μg/ml), dapsonom (3.75 μg/ml) ili u kontrolnom medijumu. Čelije su zatim obojene Turk-om, i analizirane pod različitim uveličanjima.

Solubilni dapson u koncentraciji 3.75 μg/ml, koja je ekvivalentna koncentraciji dapsona vezanog za 25 μg/ml MWCNT, ne utiče značajno na morfologiju makrofaga u poređenju sa kontrolnim, netretiranim PMØ. Uočeno je da o-MWCNT i dap-MWCNT imaju isključivo ekstranuklearnu lokalizaciju, i nalaze se u obliku malih aglomerata unutar izdvojenih endozomalnih odeljaka.

U cilju kvantifikacije intracelularnih MWCNT, i detaljnije analize interakcije dap-MWCNT i PMØ, korišćena je protočna citometrija, a nanočestice dap-MWCNT su obeležene FITC-om. Kao kontrole su korišćene PMØ tretirane neobeležanim o-MWCNT i dap-MWCNT, na 4°C ili 37°C.

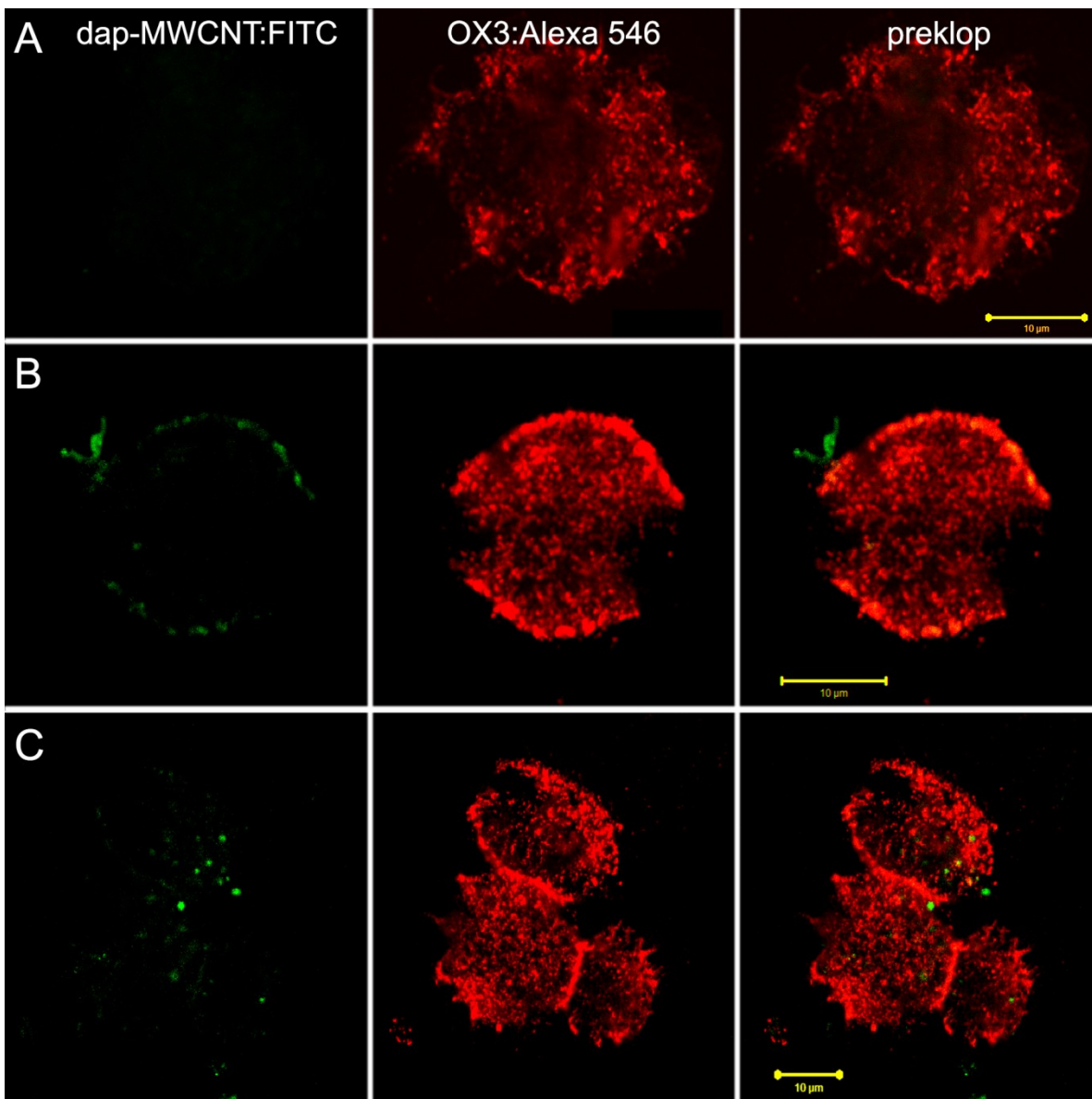
Uočeno je da neobeležene MWCNT ne doprinose značajno povećanju fluorescence u FL1 kanalu (FITC), bez obzira na temperaturu kultivacije. Do značajnog porasta fluorescence dolazi tek nakon kultivacije PMØ sa dap-MWCNT-FITC na 37°C. Sa druge strane, kultivacija PMØ sa sva tri tipa MWCNT na 37°C, indukuje je dodatno povećanje granuliranosti ćelija, što se očitava kao porast fluorescence u SS kanalu na logaritamskoj X osi (**Grafikon 4.3.2.1.1.**). Analizom SS parametra uočen je porast intenziteta fluorescence makrofaga koji su prethodno inkubirani sa dap-MWCNT-FITC na 4°C, u odnosu na PMØ tretirane neobeležanim dap-MWCNT na istoj temperaturi.

Analiza konfokalnom mikroskopijom (**Slika 4.3.2.1.2.**) je pokazala da se za PMØ, obeležene OX3 antitelom, specifičnim za molekule MHC klase II pacova, kultivisane na 4°C, dap-MWCNT:FITC isključivo vezuju za membranu (**Slika 4.3.2.1.2b**). Kultivacija PMØ na 37°C dovodi do kompletne internalizacije dap-MWCNT:FITC od strane ovih ćelija (**Slika 4.3.2.1.2c**). Dodatna analiza konfokalnom mikroskopijom je pokazala da su dap-MWCNT:FITC unutar CD11b⁺ PMØ isključivo lokalizovane ekstranuklearno (**Slika 4.3.2.1.3.**).



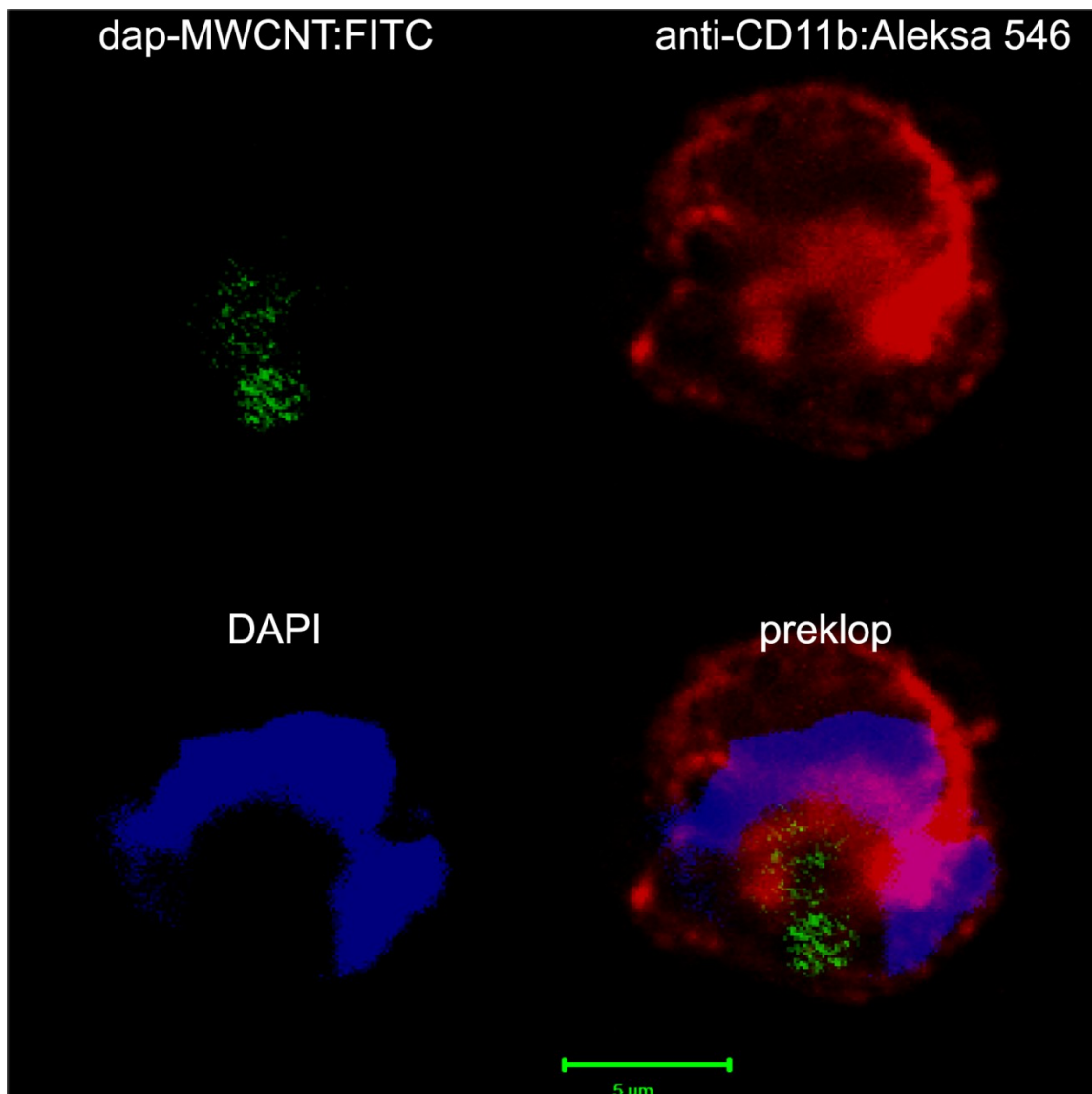
Grafikon 4.3.2.1.1. Analiza internalizacije MWCNT od strane PMØ na protočnom citometru.

PMØ su kultivisani tokom 24h sa o-MWCNT (21.3µg/ml), dap-MWCNT i dap-MWCNT:FITC (25µg/ml) na 4°C ili 37°C i zatim analizirani. Analiza fluorescence u FL1 kanalu (gornji red) i u SS kanalu (donji red) nakon kultivacije sa MWCNT.



Slika 4.3.2.1.2. Vezivanje i internalizacija dap-MWCNT:FITC za PMØ.

PMØ su kultivisane na oktospot pločicama same (A) ili u prisustvu dap-MWCNT:FITC na 4°C (B) ili na 37°C (C) tokom 24h. Čelije su zatim isprane u PBS, fiksirane u 4% formaldehidu i obojene pomoću OX3 antitela. Zelena fluorescenca je poreklom od dap-MWCNT:FITC.

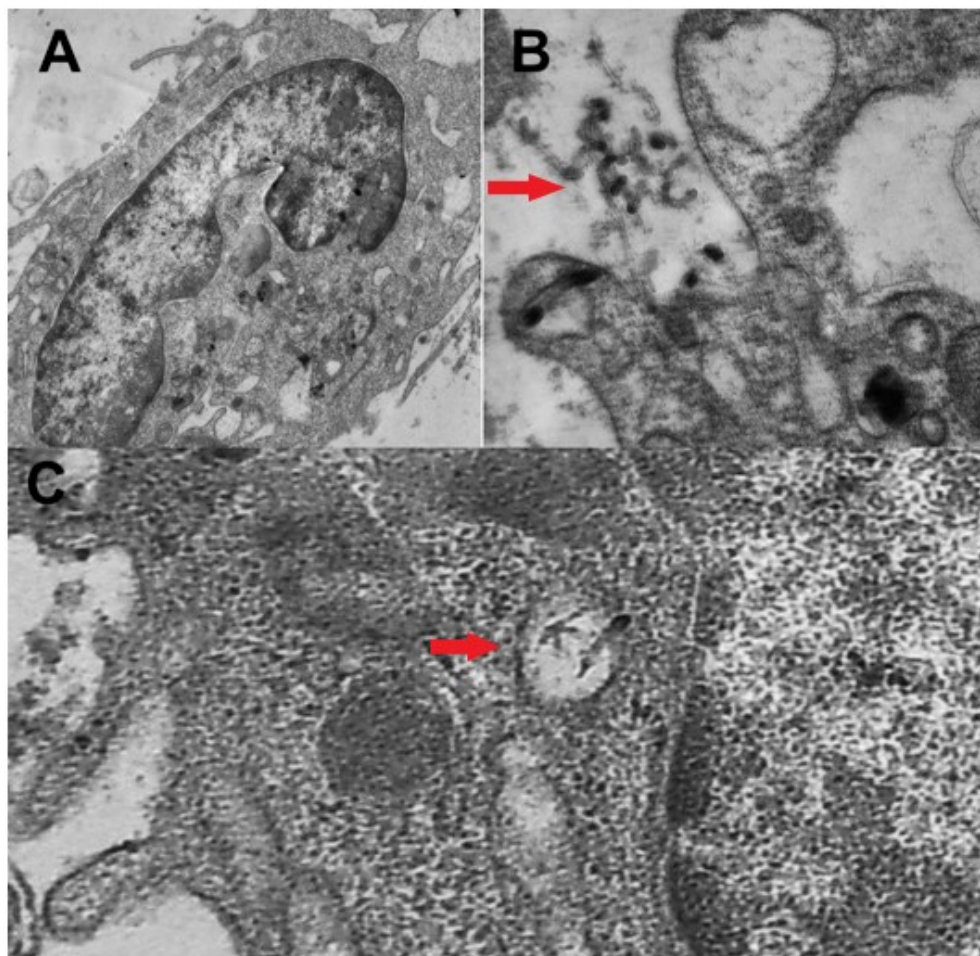


Slika 4.3.2.1.3. Analiza internalizacije dap-MWCNT:FITC od strane PMØ konfokalnom mikroskopijom.

PMØ su kultivisane sa dap-MWCNT:FITC (25µg/ml) tokom 24 sata i zatim obojene sa anti-CD11b:PE Ab i DAPI, i analizane konfokalnom mikroskopijom.

Detaljna analiza TEM-om je pokazala da PMØ fagocituju dap-MWCNT, što je zaključeno na osnovu prisustva pseudopodija koje se formiraju oko aglomeriranih dap-MWCNT (Slika 4.3.2.1.4b). Nakon toga, dap-MWCNT se nalaze u endozomi (4.3.2.1.4c) i

isključivo izvan nukleusa. Takođe je pokazano da nanocevi koje su deblje u dijametru, mogu probiti endozomalnu membranu PMØ.



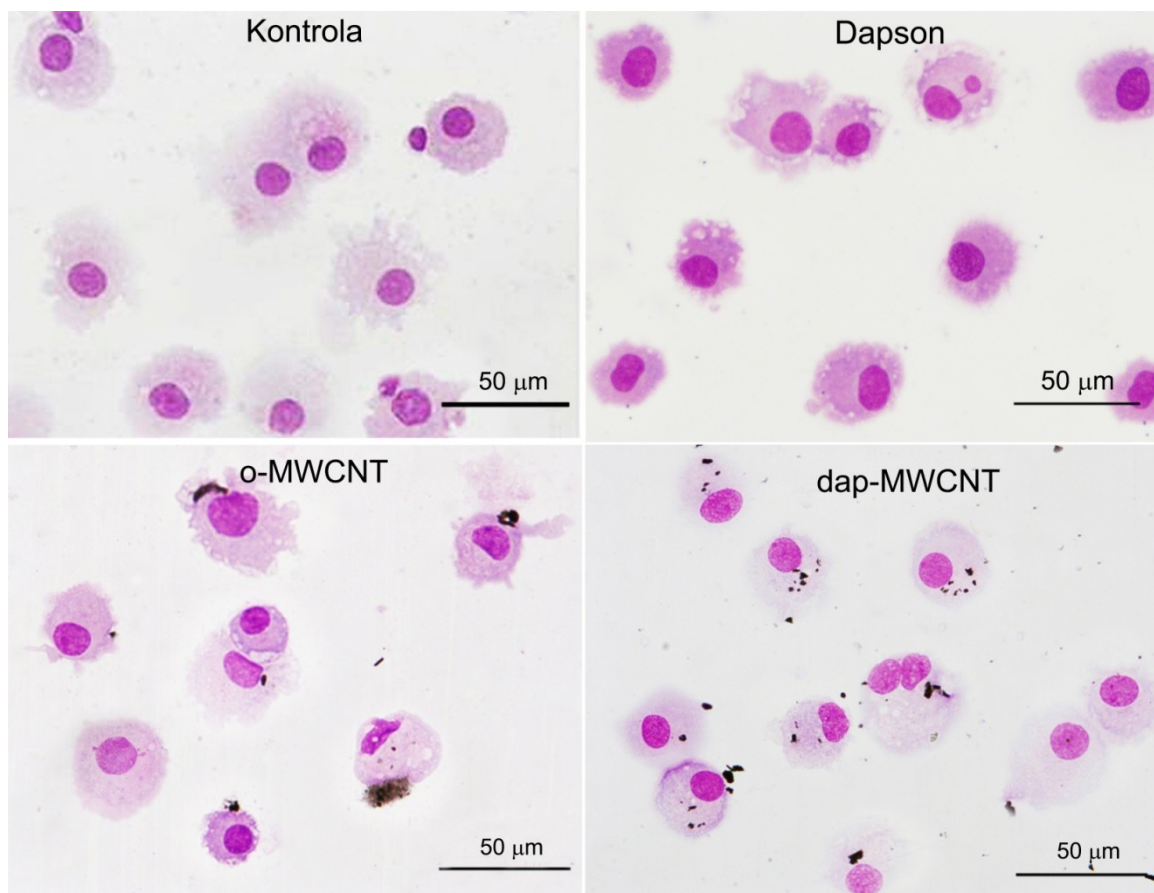
Slika 4.3.2.1.4. Analiza fagocitoze dap-MWCNT od strane PMØ pomoću TEM.

A) Izdvojeni makrofag na malom uvećanju. B) pseudopodije PMØ pomoću kojih se internalizuju dap-MWCNT C). Mali endozom sa dap-MWCNT od kojih jedan prolazi endozomalnu membranu. Crvene strelice upućuju na dap-MWCNT van ćelije (B) ili u endozomu (C)

4.3.2.2. Internalizacija dap-MWCNT od strane DC

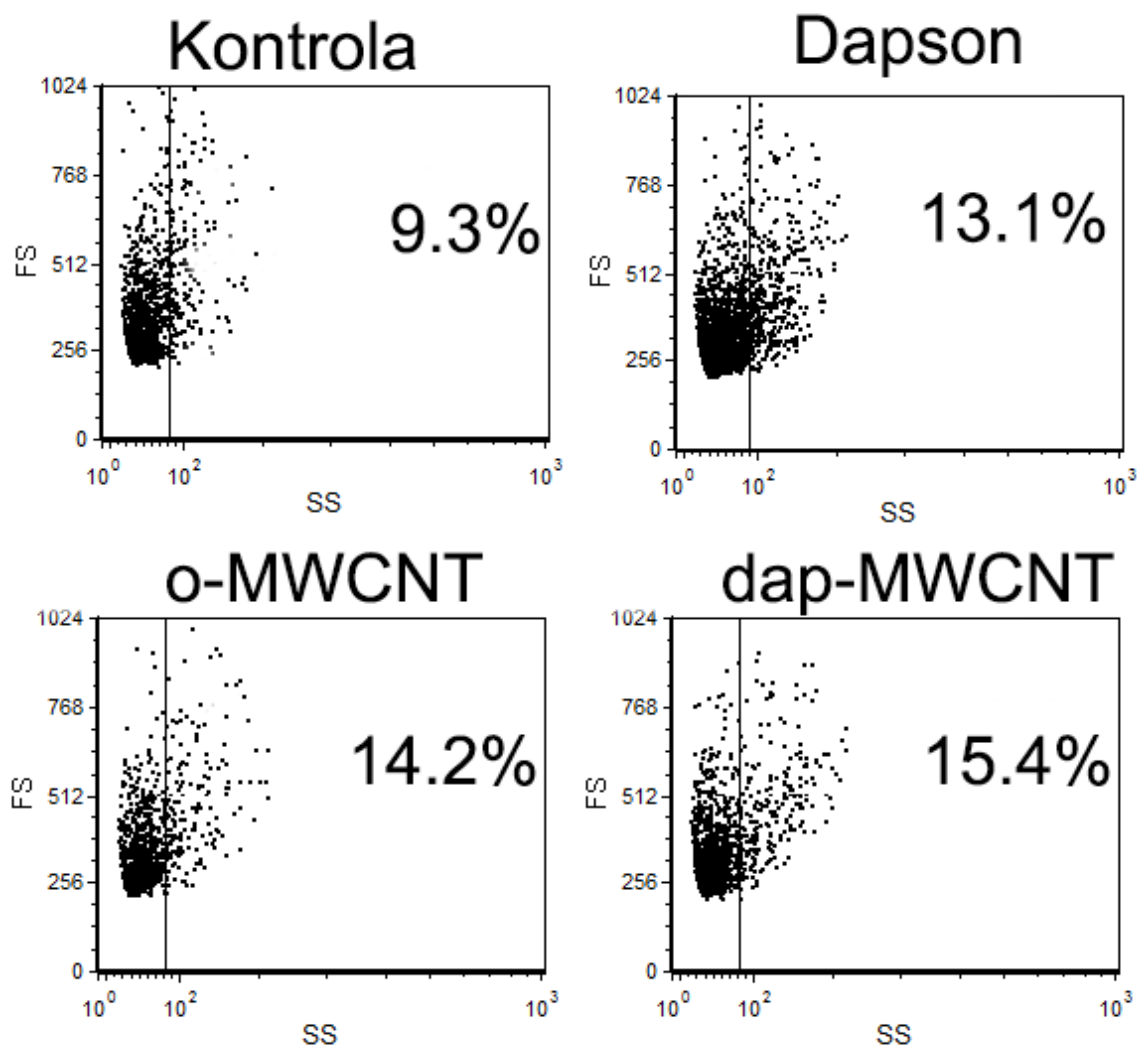
Nezrele DC su kultivisane u prisustvu dap-MWCNT (50 µg/ml), o-MWCNT (42.5 µg/ml) ili solubilnog dapsona (7.5 µg/ml) 24 sata nakon čega su analizirane svetlosnom

mikroskopijom (**Slika 4.3.2.2.1.**). Uočava se da nezrele DC fagocituju dap-MWCNT i o-MWCNT, ali u značajno manjoj meri nego PMØ. Čelije tretirane o-MWCNT imaju sličan izgled kao kontrolne DC, dok čelije tretirane dap-MWCNT imaju manje nastavaka i zaobljeniji izgled. DC tretirane solubilnim dapsonom su imale zaobljen oblik i brojne citoplazmatske vezikule.



Slika 4.3.2.2.1. Analiza internalizacije MWCNT od strane DC svetslosnom mikroskopijom. Nezrele DC su kultivisane 24 sata u prisustvu dapsona (7.5 µg/ml), o-MWCNT (42.5 µg/ml) i dap-MWCNT (50 µg/ml), nakon čega su napravljeni citospinovi (1×10^4 ćelija po citospinu) i obojeni MGG metodom.

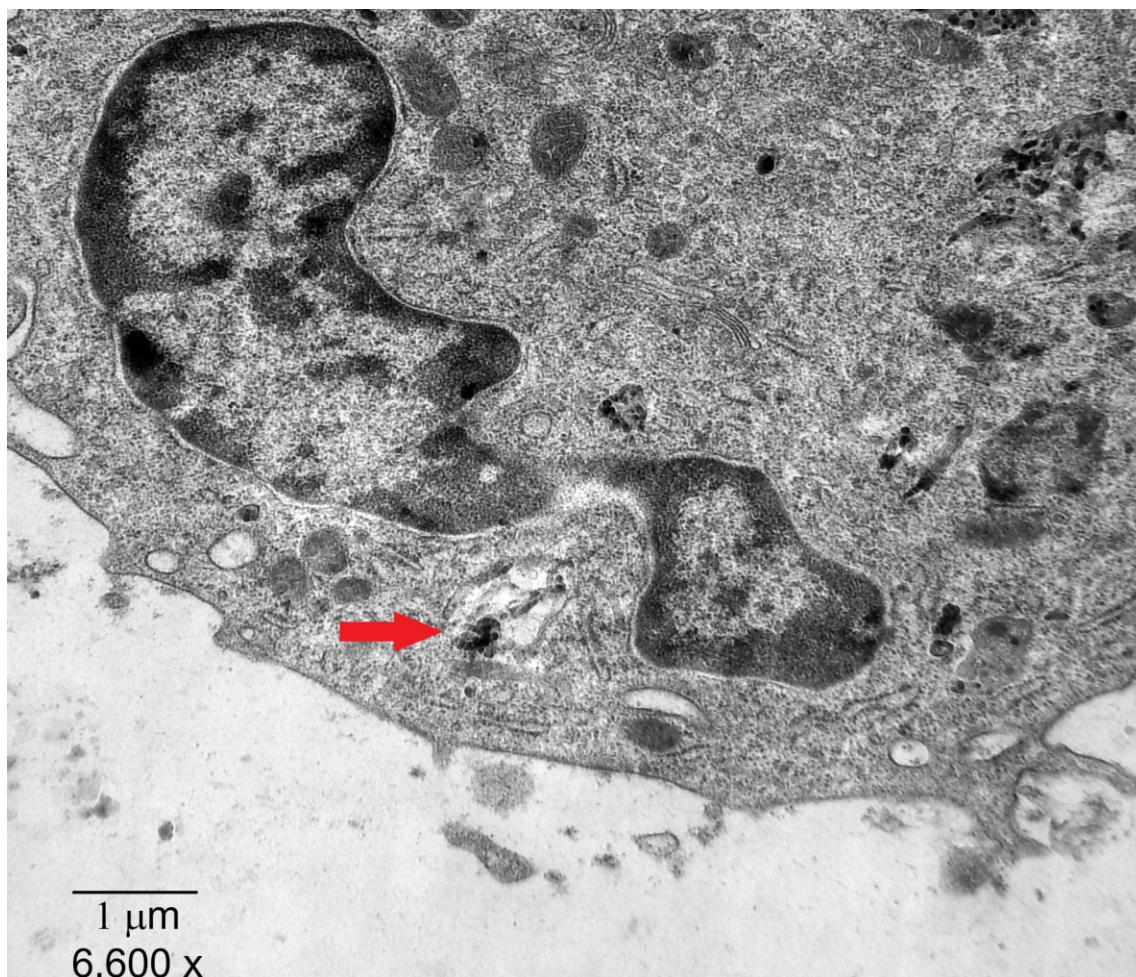
U cilju relativne kvantifikacije internalizacije dap-MWCNT i o-MWCNT od strane DC, fagocitoza je merena protočnom citometrijom na osnovu SS parametra koji detektuje granularnost ćelija (**Grafikon 4.3.2.2.1.**).



Grafikon 4.3.2.2.1. Analiza internalizacije MWCNT od strane DC protočnom citometrijom. Nezrele DC su kultivisane 24 sata u prisustvu dapsona (7.5 $\mu\text{g/ml}$), o-MWCNT (42.5 $\mu\text{g/ml}$) i dap-MWCNT (50 $\mu\text{g/ml}$), nakon čega su ćelije analizirane na protočnom citometru na osnovu SS parametra.

U odnosu na kontrolne DC, uočeno je značajno povećanje granuliranosti DC tretiranih o-MWCNT (42.5 $\mu\text{g/ml}$) i dap-MWCNT (50 $\mu\text{g/ml}$), pri čemu nije uočena značajna razlike između ova dva tipa MWCNT. Međutim, DC tretirane solubilnim dapsonom (7.5 $\mu\text{g/ml}$) takođe imaju veću granuliranost u odnosu na kontrolne DC, što je u skladu sa rezultatima dobijenim svetlosnom mikroskopijom.

Intraćelijska lokalizacija dap-MWCNT je analizirana i TEM-om (Slika 4.3.2.2.2.), pri čemu je pokazano da se internalizovane dap-MWCNT nalaze u endozomima.



Slika 4.3.2.2.2. Analiza internalizacije dap-MWCNT od strane DC TEM-om.

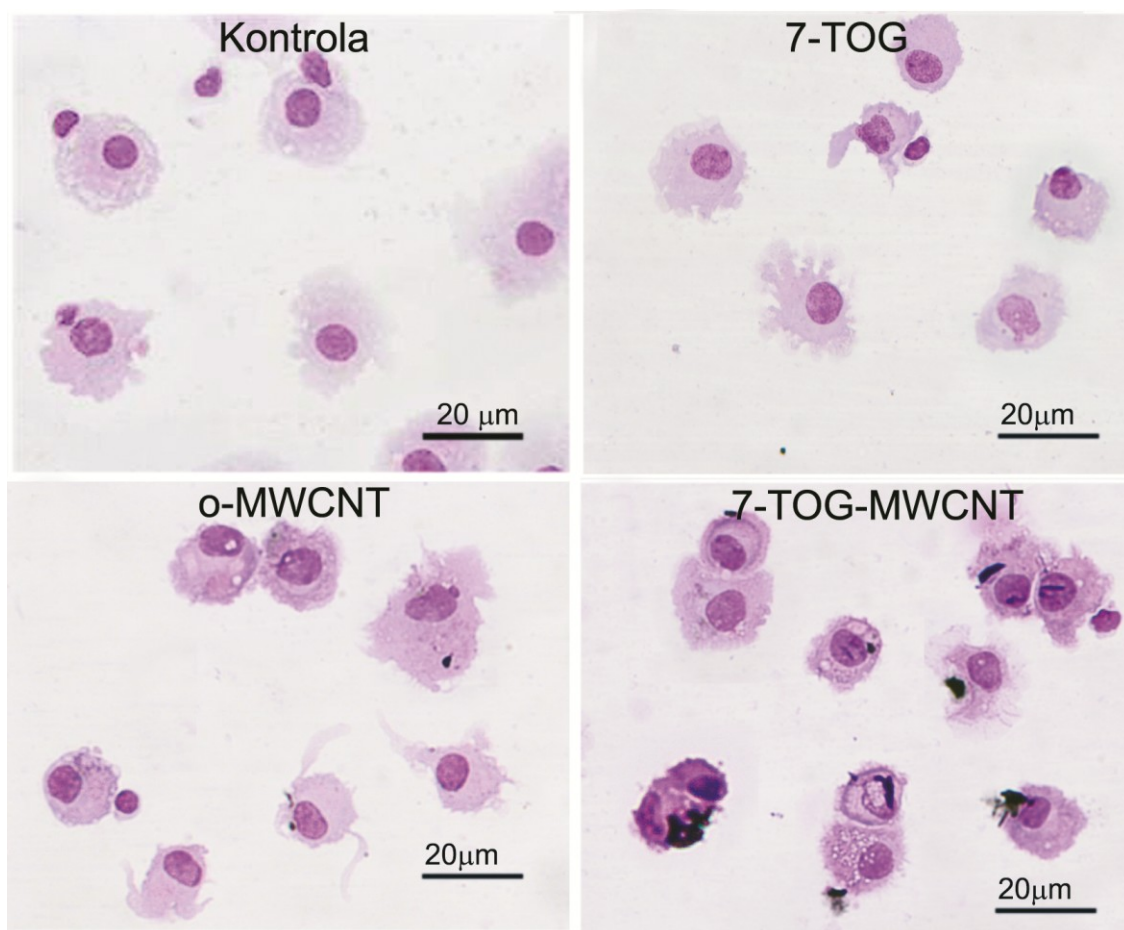
Nezrele DC su kultivisane 24 sata u prisustvu dap-MWCNT (50 μg/ml), nakon čega su analizirane TEM-om. Crvena strelica upućuje na endozom sa dap-MWCNT.

4.3.2.3 Internalizacija 7-TOG-MWCNT od strane DC

U narednom delu studije je ispitano da li 7-TOG-MWCNT može dopremiti 7-TOG do svog receptora, TLR7, u endozomu DC. U tu svrhu su nezrele DC kultivisane 24 sata sa 7-TOG-MWCNT (50 µg/ml) ili kontrolnim o-MWCNT u ekvivalentnim koncentracijama (42.5 µg/ml). Rezultati su pokazali da DC internalizuju oba tipa nanocevi, ali je uočena velika varijabilnost u fagocitnoj sposobnosti pojedinih ćelija.

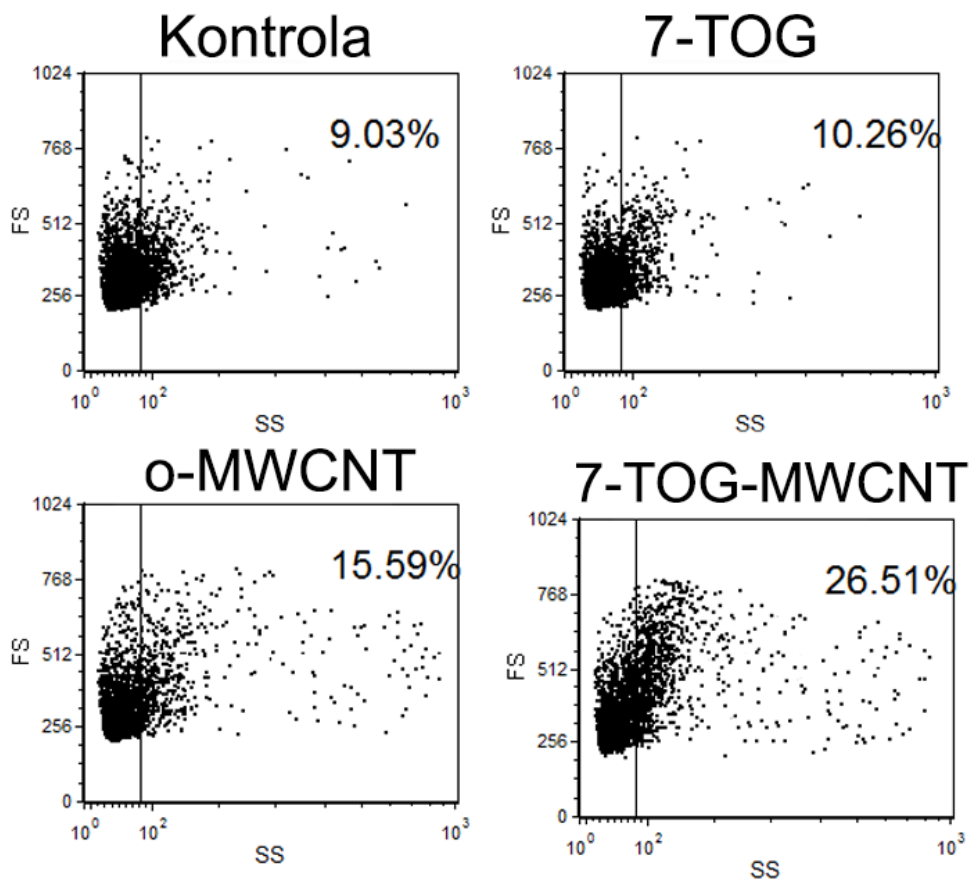
Analiza svetlosnom mikroskopijom je ukazala na to da se 7-TOG-MWCNT internalizuju u nešto većoj meri u poređenju sa o-MWCNT (**Slika 4.3.2.3.1**). Solubilni 7-TOG (7.5 µg/ml) i o-MWCNT (42.5 µg/ml) indukuju formiranje dugih i retkih dendritskih nastavaka na DC, koji na kontrolnim ćelijama nisu uočljivi u istoj meri. Sa druge strane, 7-TOG-MWCNT indukuju formiranje većeg broja manjih nastavaka na DC, kao i formiranje talasastih nastavaka kod DC.

U cilju potvrde hipoteze da se 7-TOG-MWCNT preuzimaju u većoj meri nego o-MWCNT, urađena je analiza ćelija kultivisanih u prisustvu funkcionalizovanih MWCNT ili 7-TOG protočnom citometrijom (**Grafikon 4.3.2.3.1**). Pokazano je da solubilni 7-TOG ne poveća značajno procenat granulisanih DC (srednja vrednost ± SD iz dva eksperimenta, 13.4 ± 5.3%) u odnosu na kontrolu (10.6 ± 4.6 %). Sa druge strane, i o-MWCNT (16.1 ± 3.7 %) i 7-TOG-MWCNT (30.1 ± 5.1) značajno povećavaju granuliranost DC u odnosu na kontrolu, a uočena je i statistička značajnost između 7-TOG-MWCNT i o-MWCNT (p<0.05).



Slika 4.3.2.3.1. Internalizacija funkcionalizovanih MWCNT od strane DC.

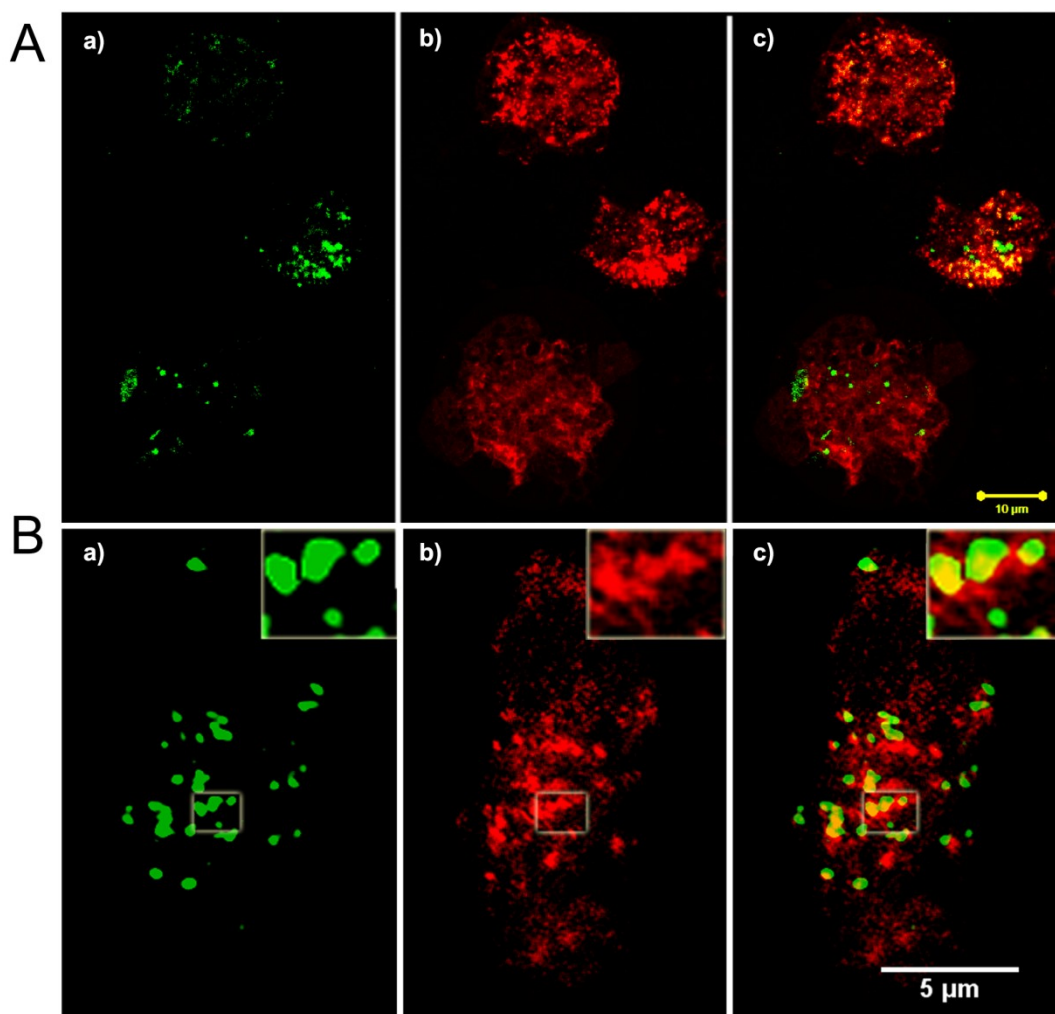
Nezrele DC su kultivisane sa solubilnim 7-TOG (7.5 $\mu\text{g/ml}$) i sa funkcionalizovanim o-MWCNT (42.5 $\mu\text{g/ml}$) ili 7-TOG-MWCNT (50 $\mu\text{g/ml}$) tokom 48 sati, kako je opisano u materijalim i metodama.Ćelije su zatim obojene MGG metodom i analizirane svetlosnom mikroskopijom. Prikazane su reprezentativne slike.



Grafikon 4.3.2.3.1. Internalizacija funkcionalizovanih MWCNT od strane DC.

Nezrele DC su kultivisane sa solubilnim 7-TOG i sa funkcionalizovanim MWCNT tokom 48 sati, kako je opisano u poglavlju 3. Nakon toga je analizirana granularnost ćelija protočnom citometrijom pomoću SS parametra. Prikazani su reprezentivni rezultati jednog eksperimenta od dva sa sličnim rezultatima.

U daljim istraživanjima je proučavana internalizacija MWCNT pomoću konfokalne mikroskopije. MWCNT su obeležene FITC-om i kultivisane sa DC 24 sata. Analizom HLA-DR⁺ DC je uočeno da se 7-TOG-MWCNT:FITC nalaze unutar ovih ćelija (**Slika 4.3.2.3.2a**). Uočeno je da su nanocevi lokalizovane u citoplazmi i u perinukleusnom regionu ćelija. Nakon bojenja lizozoma/kasnih endozoma, transfekcijom DC specifičnom LAMP-1-RFP sekvencom preko bakulovirusnog vektora, nađeno je da je većina MWCNT lokalizovana unutar lizozoma/kasnog endozoma (**Slika 4.3.2.2.2b**).

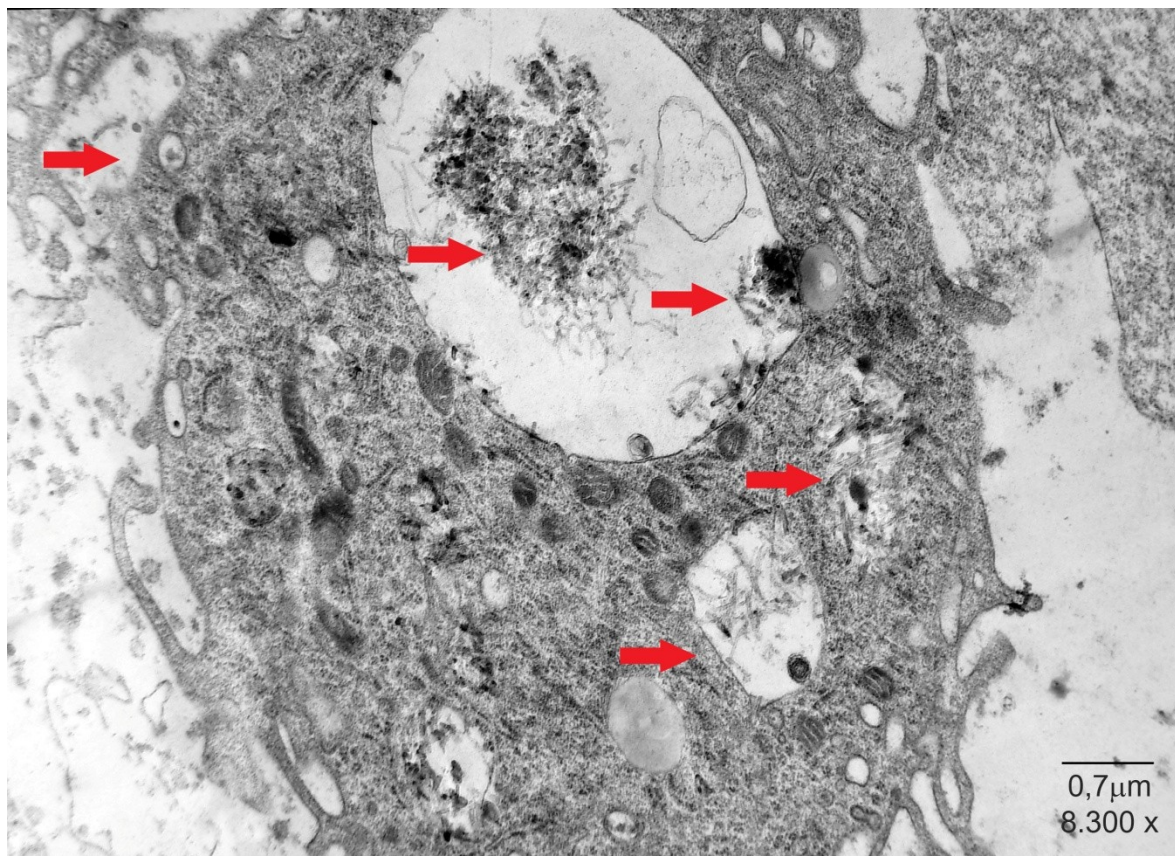


Slika 4.3.2.3.2. Internalizacija funkcionalizovanih MWCNT od strane DC.

iDC su kultivisane sa funkcionalizovanim 7-TOG-MWCNT tokom 48 sati, kako je opisano u poglavlju 3. A) Citospinovi DC, kultivisanih sa 7-TOG-MWCNT:FITC, su obojeni sa anti-HLADR:Alexa 546 antitelom, isprani PBS-om, montirani i analizirani na konfokalnom mikroskopu a) zelena fluorescenca 7-TOG-MWCNT b) crvena fluorescenca HLA-DR:Alexa 546 i c) preklopljeni kanali. B) Citospinovi DC fiksiranih formaldehidom nakon kultivacije sa MWCNT, su obojeni CellLight Lysosomes-RFP BacMam 2.0 reagensom tokom poslednjih 16 sati kulture. a) 7-TOG-MWCNT-FITC b)LAMP-1-RFP i c) preklopljeni kanali gde žuta boja ukazuje na kolokalizaciju. Inkorporirane slike su uveličane digitalno 2.5 puta.

TEM analiza je takođe potvrdila da se 7-TOG-MWCNT nalaze u endozomu (Slika 4.3.2.3.3.). DC internalizuju MWCNT agregate fagocitozom, što je zaključeno na osnovu prisustva ćelijskih nastavaka oko ekstraćelijskih aglomerata 7-TOG-MWCNT. Neposredno

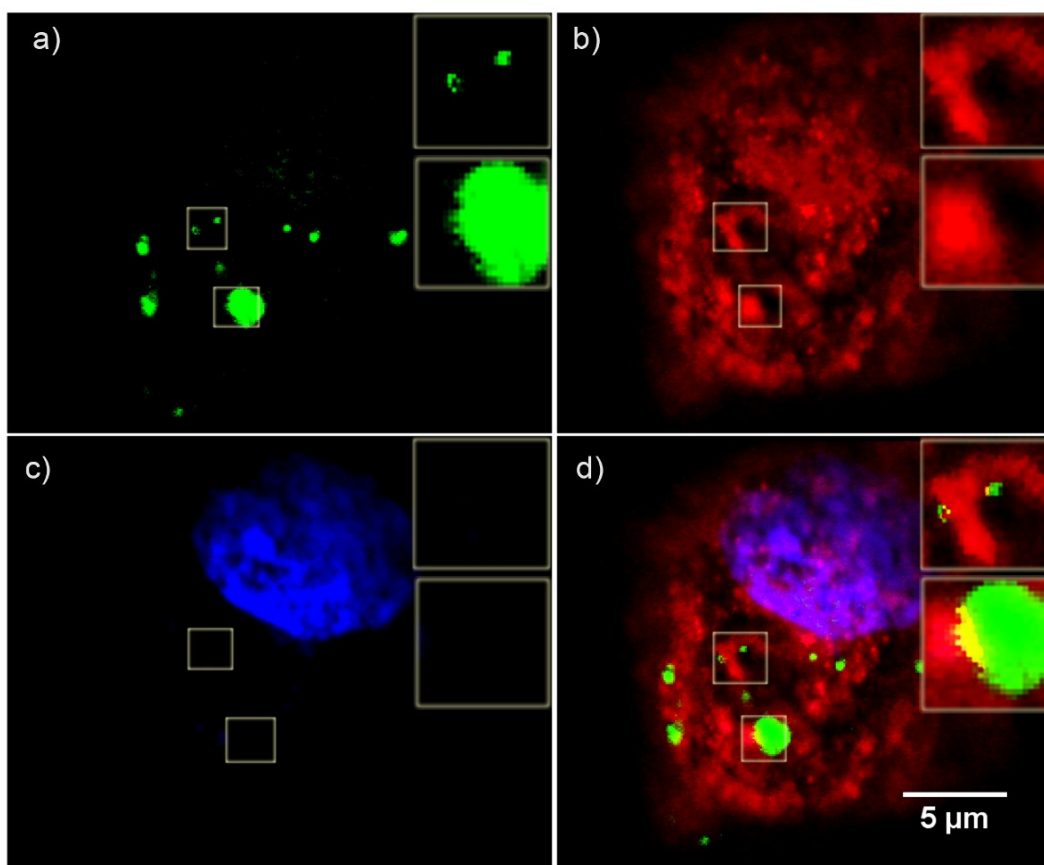
ispod površine membrane mogu se uočiti manji endozomi sa pojedinačnim partikulama. Unutar endozoma, deo 7-TOG-MWCNT je grupisan na unutrašnjoj membrani endozoma, što upućuje na njihovu potencijalnu interakciju sa transmembranskim endozomalnim receptorom TLR7.



Slika 4.3.2.3.3. Analiza internalizacije 7-TOG-MWCNT TEM-om.

Nezrele DC su kultivisane sa 7-TOG-MWCNT (50 μg/ml) 48 sati, nakon čega su uzorci pripremljeni i analizirani TEM-om. Crvene strelice upućuju na 7-TOG-MWCNT u različitim delovima ćelije.

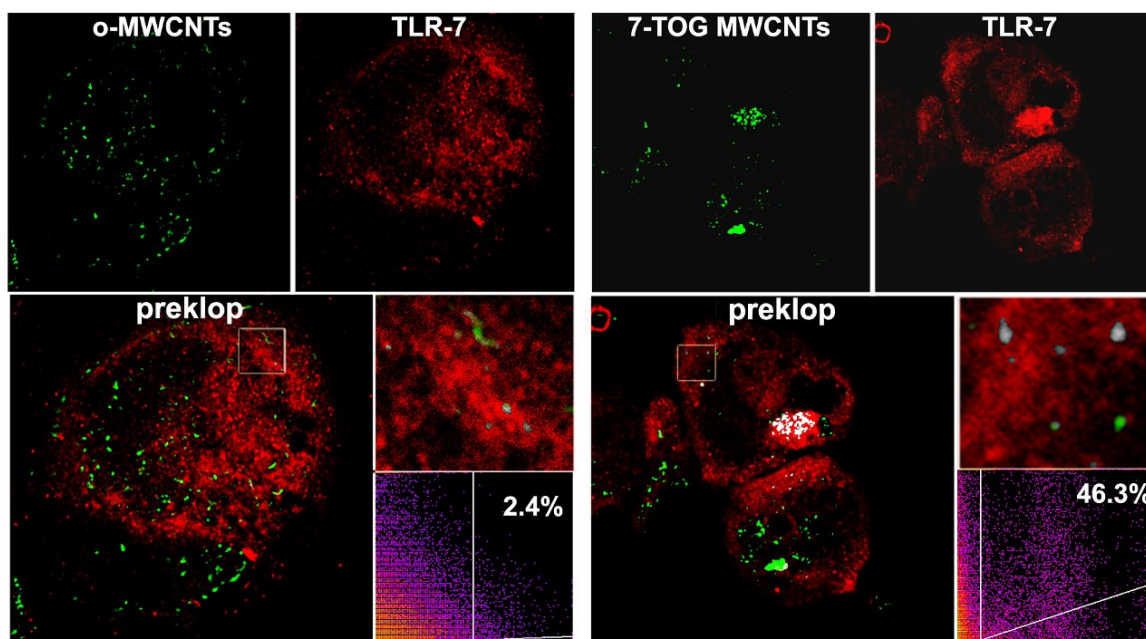
U cilju potvrde ove hipoteze, citospinovi DC kultivisanih sa o-MWCNT:FITC ili 7-TOG-MWCNT:FITC su obojeni anti-TLR7 antitelom, i analizirani konfokalnom mikroskopijom. Uočeno da su 7-TOG-MWCNT obmotane TLR-7⁺ endozomima, a kolokalizacija je uočena na mestu međusobnog preklapanja (Slika 4.3.2.3.4.).



Slika 4.3.2.3.4. Internalizacija funkcionalizovanih MWCNT od strane DC.

Nezrele DC su kultivisane sa funkcionalizovanim MWCNT tokom 48 sati, kako je opisano u poglavlju 3. Citospinovi DC su obojeni ovčijim anti-humanim TLR7 antitelom, što je vizuelizovano pomoću sekundarnog magarećeg anti-ovčijeg IgG:biotin antitela i streptavidin alekse 546. a) 7-TOG-MWCNT:FITC b) TLR7:Alexa 546 c) DAPI i d) preklapljeni kanali, gde žuta boja označava kolokalizaciju. Inkorporirane slike su uvećane digitalno 2.2 puta. Prikazane su reprezentativne slike ćelija iz dva eksperimenta, a u svakom je analizirano najmanje 500 ćelija po uzorku.

Analiza konfokalnom mikroskopijom je pokazala da se oko 50% 7-TOG-MWCNT nalazi kolokalizovano sa TLR7, dok o-MWCNT kolokalizuju sa TLR7 u malom procentu (Slika 4.3.2.3.5.).



Slika 4.3.2.3.5. Kolokalizacija 7-TOG-MWCNT i TLR7 unutar DC.

Nezrele DC su kultivisane sa o-MWCNT:FITC ili 7-TOG-MWCNT:FITC, kako je opisano u poglavlju 3, i analizirane konfokalnom mikroskopijom. Citospinovi DC su obojeni ovčijim anti-humanim TLR7 antitelom, što je vizuelizovano pomoću sekundarnog magarećeg anti-ovčijeg IgG:biotin antitela i streptavidin alekse 546. Inkorporirane slike su uvećane 2.5 puta. Analiza je urađena u ImageJ programu pomoću, ICA (intensity correlation analysis) aplikacije [562].

4.3.3. Citotoksičnost i imunomodulatorne osobine MWCNT funkcionalizovanih dapsonom

Obzirom da je pokazano da se funkcionalizovane MWCNT internalizuju od strane PMØ i DC, sledeći cilj je bio ispitivanje njihovih bioloških osobina. Citotoksičnost i imunomodulatorne osobine MWCNT konjugovanih dapsonom su ispitivani na modelu PMØ i DC. U tom cilju korišćene su različite koncentracije dap-MWCNT, a kao kontrola

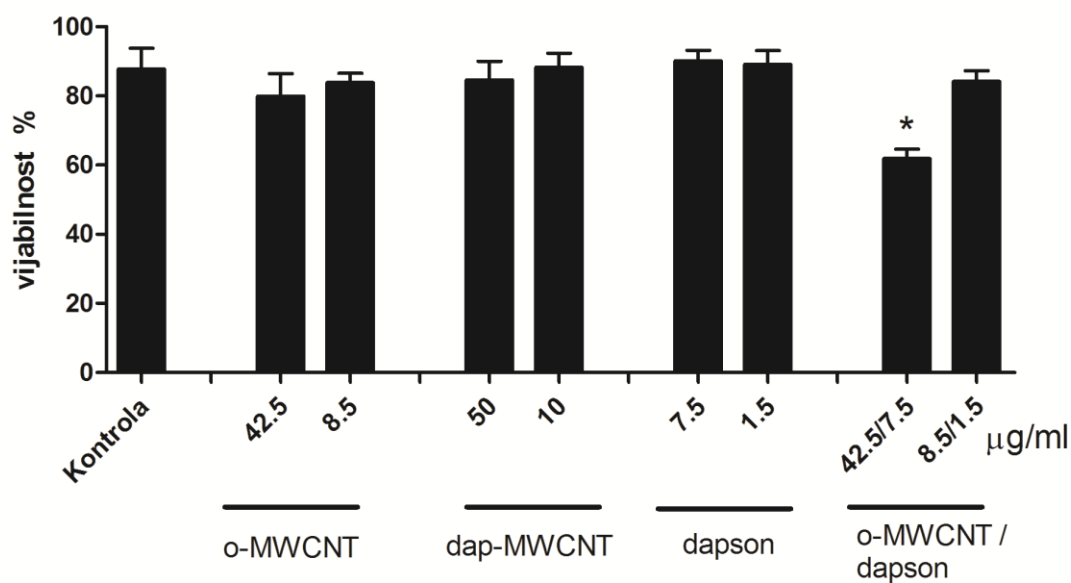
korišćene su o-MWCNT, solubilni dapson i kombinacija o-MWCNT i solubilnog dapsona u koncentracijama koje su ekvivalentne onima u dap-MWCNT.

4.3.3.1. Citotoksičnost dap-MWCNT u kulturi PMØ

U ispitivanjima citotoksičnosti MWCNT, PMØ su kultivisane u prisusvu dve koncentracije dap-MWCNT (50 i 10 µg/ml), i odgovarajućih koncentracije kontrolnih o-MWCNT tokom 24 sata. Rezultati su pokazali da vijabilnost PMØ, kultivisanih sa dap-MWCNT i o-MWCNT, nije značajno smanjena u poređenju sa kontrolom, bez obzira na primenjenu koncentraciju MWCNT (**Grafikon 4.3.3.1.1**). Solubilni dapson takođe ne utiče na vijabilnost PMØ. Međutim, vijabilnost PMØ se značajno smanjuje u kulturi u kojoj je solubilni dapson (7.5 µg/ml) dodat zajedno sa većom koncentracijom o-MWCNT (42.5 µg/ml).

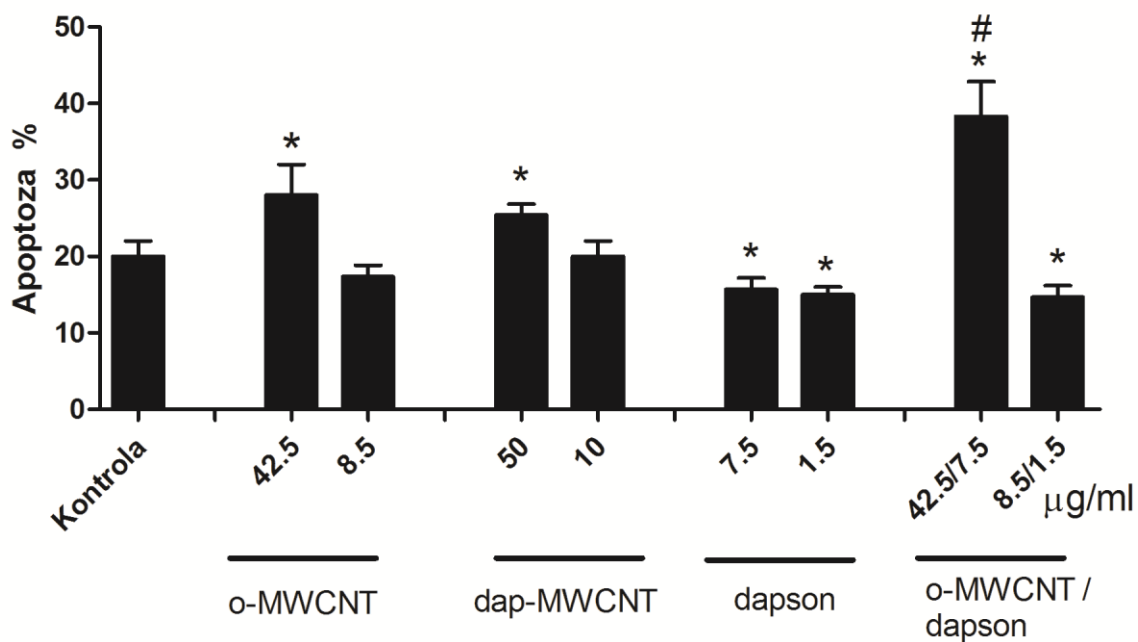
U cilju detaljnijeg proučavanja ćelijske smrti makrofaga pod dejstvom dap-MWCNT, PMØ su kultivisane sa MWCNT tokom 24 sata u prisustvu ili odsustvu LPS (**Grafikoni 4.3.3.1.2 i 4.3.3.1.3**). Kao što se može uočiti na **grafikonu 4.3.3.1.2**, oko 20% kontrolnih PMØ je ušlo u proces apoptoze nakon 24 sata kultivacije. o-MWCNT, u koncentraciji ekvivalentnoj 50 µg/ml dap-MWCNT, potenciraju apoptozu PMØ, dok manje koncentracije o-MWCNT ne modifikuju značajno apoptozu ovih ćelija. Obe koncentracije dapsona inhibiraju apoptozu PMØ nakon 24 sata kulture. Slično rezultatima dobijenim u testu vijabilnosti, veće koncentracije solubilnog dapsona (7.5 µg/ml) potenciraju pro-apoptotski efekat o-MWCNT nakon 24 sata kulture. Za razliku od toga, manje koncentracije dapsona (1.5 µg/ml) u kombinaciji sa 8.5 µg/ml o-MWCNT i dalje imaju anti-apoptotski efekat.

Rezultati su takođe pokazali da sam LPS potencira apoptozu PMØ (**Grafikon 4.3.3.1.3**). Veće koncentracije o-MWCNT povećavaju procenat apoptotskih PMØ u prisustvu LPS-a nakon 24 sata kulture. Međutim, ni jedna od primenjenih koncentracija solubilnog dapsona ne modifikovala apoptozu PMØ indukovanu LPS-om.



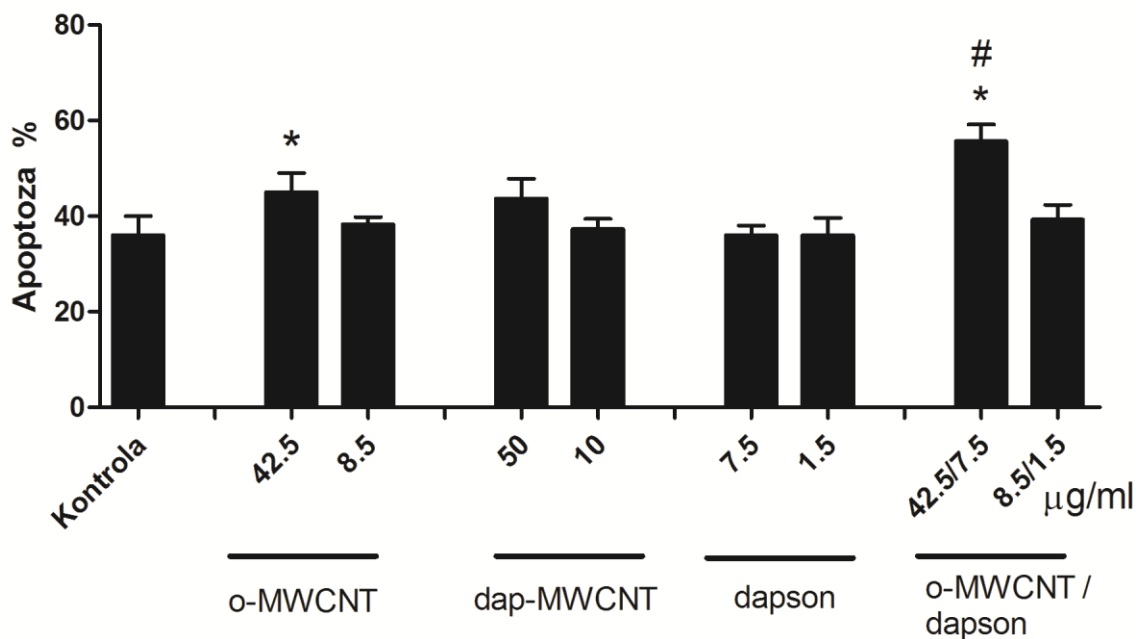
Grafikon 4.3.3.1.1. Vijabilnosti PMØ kultivisanih sa MWCNT, dapsonom ili njihovom kombinacijom.

PMØ su kultivisane 24 sata u prisustvu o-MWCNT (42.5 i 7.5 µg/ml), dap-MWCNT (50 i 10 µg/ml), dapsona (7.5 i 1.5 µg/ml), i kombinacije o-MWCNT (42.5 i 7.5 µg/ml) i dapsona (7.5, 1.5 µg/ml), nakon čega je procenjena njihova vijabilnost. Procenat vijabilnih ćelija je izračunat kao 100% - % nevijabilnih (PI pozitivnih) ćelija. Kulture su analizirane u triplikatima. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD (n=3). * p<0.05 u poređenju sa kontrolom.



Grafikon 4.3.3.1.2 Uticaj MWCNT, dapsona i njihove kombinacije na apoptozu nestimuliranih PMØ.

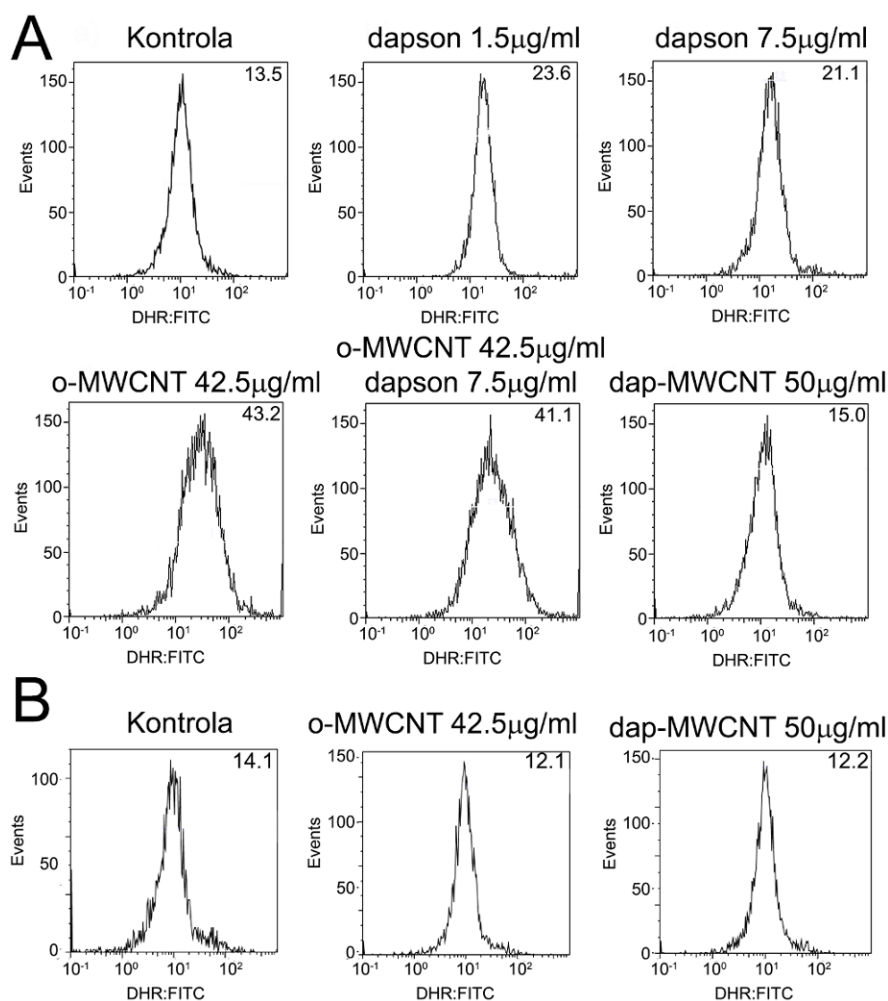
PMØ su kultivisane 24 sata u prisustvu o-MWCNT (42.5 i 7.5 µg/ml), dap-MWCNT (50 i 10 µg/ml), dapsona (7.5 i 1.5 µg/ml), i kombinacije o-MWCNT (42.5 i 7.5 µg/ml) i dapsona (7.5, 1.5 µg/ml), nakon čega je analiziran procenat apoptotskih ćelija na protočnom citometru nakon obeležavanja ćelija sa PI u hipotonom rastvoru. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od 5 eksperimenata. * p<0.05 u poređenju sa kontrolom, # p<0.05 u poređenju sa dap-MWCNT 50µg/ml.



Grafikon 4.3.3.1.3 Uticaj MWCNT, dapsona i njihove kombinacije na apoptozu PMØ stimulisanih LPS-om.

Procenat apoptotskih PMØ u kulturi sa LPS-om je određen nakon 24- časovne kultivacije sa o-MWCNT (42.5 i 7.5 µg/ml), dap-MWCNT (50 i 10 µg/ml), dapsonom (7.5 i 1.5 µg/ml), i kombinacijom o-MWCNT (42.5 i 7.5 µg/ml) i dapsona (7.5, 1.5 µg/ml). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD od 5 eksperimenata. * p<0.05 u poređenju sa kontrolom, # p<0.05 u poređenju sa dap-MWCNT 50µg/ml.

Nakon toga je ispitivan uticaj MWCNT i dapsona na oksidativni status PMØ, obeležavanjem ćelija DHR. Uočeno je da u fiziološkim uslovima kulture (37°C), dapson u koncentracijama 7.5 i 1.5 µg/ml indukuje oksidativni stres PMØ (**Grafikon 4.3.3.1.4a**). Značajno jači efekat na indukciju oksidativnog stresa PMØ imaju o-MWCNT (42.5 µg/ml), same ili u kombinaciji sa dapsonom (7.5 µg/ml). Sličan efekat o-MWCNT (42.5 µg/ml) i dapsona (7.5 µg/ml) ne postoji na 4°C (**Grafikon 4.3.3.1.4b**). Suprotno tome, dap-MWCNT (50 µg/ml), ne menjaju značajno oksidativni status PMØ.



Grafikon 4.3.3.1.4. Efekat MWCNT, dapsona i njihove kombinacije na oksidativni stres PMØ.

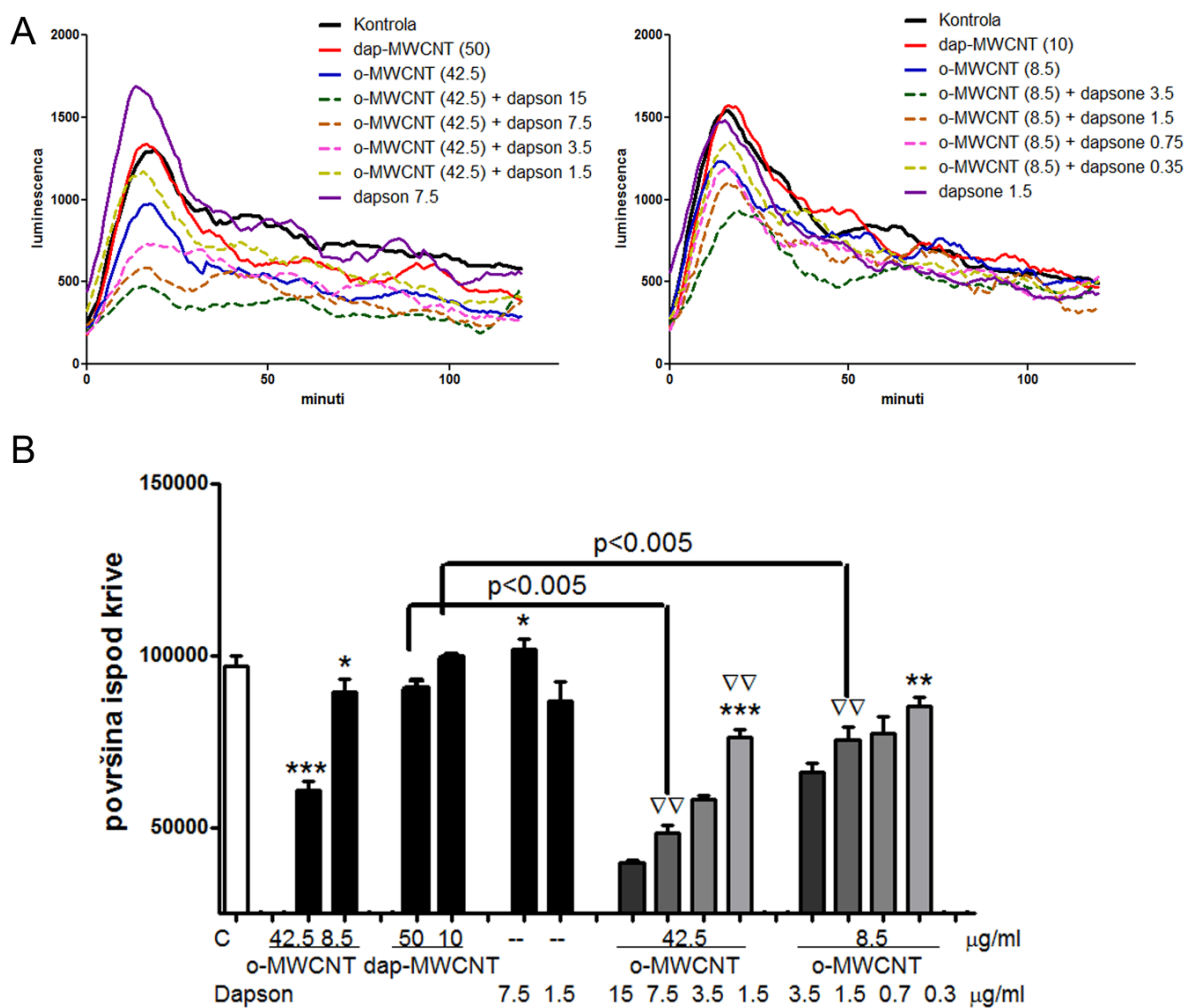
Ćelije su kultivisane sa MWCNT i dapsonom 24 sata na A) 37°C ili B) 4°C, nakon čega su obeležene sa DHR i analizirane na protočnom citometru, kao što je opisano u poglavlju 3. Gornji levi ugao svakog histograma predstavlja MFI DHR signala.

4.3.3.2 Efekat dap-MWCNT na oksidativni prasak PMØ

Jedna od ključnih anti-mikrobnih funkcija makrofaga je oksidativni prasak, to jest, generisanje ROS nakon aktivacije NADPH oksidaze [576]. Ova funkcija makrofaga je ključna za uništavanje internalizovanih i intracelularnih mikroba. Efekat MWCNT na

oksidativni prasak PMØ je ispitivan nakon 24-časovne kultivacije, kinetičkim merenjem luminescence nakon tretmana sa PMA pomoću luminola.

Rezultati prikazani na **grafikonu 4.3.3.2.1.** su ukazali da dap-MWCNT (50 ili 10 µg/ml) ne modifikuje značajno oksidativni prasak PMØ. Sa druge strane, obe koncentracije o-MWCNT značajno smanjuju produkciju ROS od strane PMØ stimulisanu pomoću PMA. Veće koncentracije solubilnog dapsona (7.5 µg/ml) potenciraju oksidativni prasak izazvan sa PMA. Međutim, u kombinaciji sa 42.5 µg/ml o-MWCNT, veće koncentracije dapsona (15 µg/ml i 7.5 µg/ml) dodatno inhibiraju oksidativni prasak PMØ, dok su manje koncentracije (1.5 µg/ml) smanjuju ovaj inhibitorski efekat o-MWCNT. Inhibitorski efekat većih koncentracija dapsona (3.5 i 1.5 µg/ml) je uočen i u kombinaciji sa 8.5 µg/ml o-MWCNT, dok manje koncentracije daspona (0.3 µg/ml) nisu dodatno modifikovale inhibitorski efekat 8.5 µg/ml o-MWCNT na produkciju ROS indukovanu sa PMA.

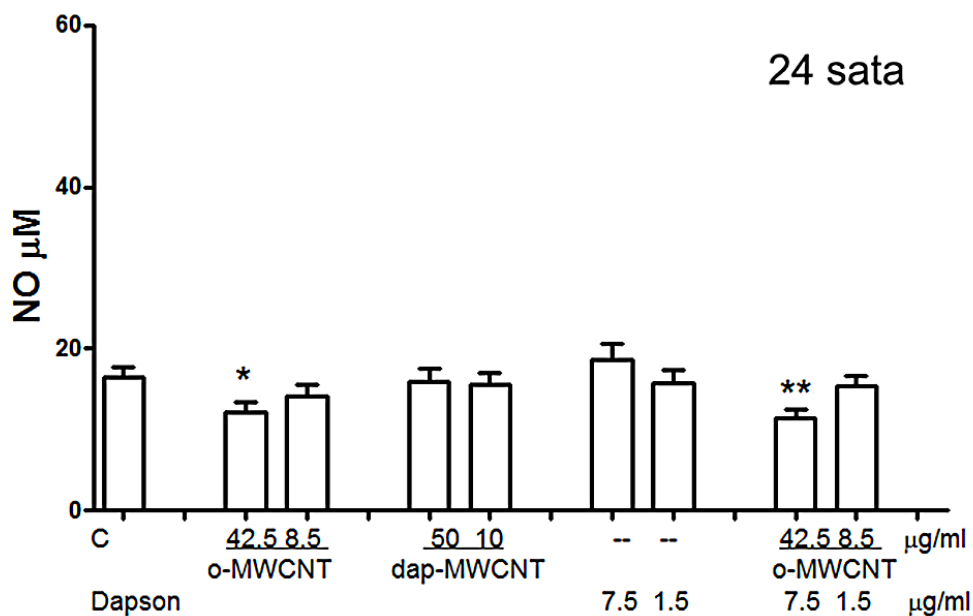


Grafikon 4.3.3.2.1. Efekat MWCNT, dapsona i njihovih kombinacija na oksidativni prasak PMØ.

PMØ su kultivisane sa nanocevima i dapsonom 24 sata, a nakon toga su tretirane sa PMA (25 ng/ml) u prisustvu luminola, i zatim analizirane pomoću hemiluminescence. A) Prikazan je reprezentativni eksperiment, gde je luminescenca očitavana svaki minut tokom 120 minuta, a prikazane krive su dobijene usrednjavanjem po 12 susednih tačaka. B) Prikazana je srednja vrednost \pm SD površine ispod krive dobijenih iz 3 eksperimenta. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ u poređenju sa kontrolom (C) ∇∇- $p < 0.01$ u poređenju sa o-MWCNT iste koncentracije.

4.3.3.3 Efekat dap-MWCNT na produkciju NO i IL-6 od strane PMØ

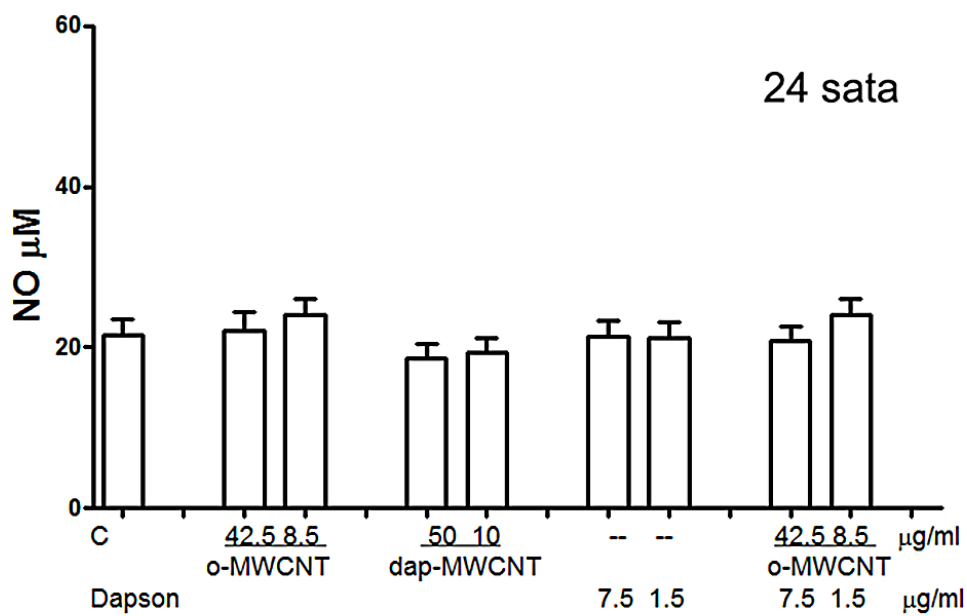
Osim NADPH oksidaze, ključnu ulogu u borbi protiv intracelularnih patogena ima i NO sintaza. Stoga je u sledećem koraku ispitivan efekat dap-MWCNT, o-MWCNT, dapsona, i kombinacije dapsona i o-MWCNT, na produkciju NO od strane PMØ nakon 24 sata (**Grafikon 4.3.3.3.1.**).



Slika 4.3.3.3.1. Efekat MWCNT, dapsona i njihove kombinacije na produkciju NO od strane nestimulisanih PMØ.

PMØ su kultivisane sa nanocevima i dapsonom u naznačenim koncentracijama tokom 24 sata. Nakon kultura, iz supernatanta je određena koncentracija NO Grisovom metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD triplikata iz jednog reprezentativnog eksperimenta, od ukupno tri. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, u poređenju sa kontrolom

Isti tretman je sproveden i u prisustvu LPS, kao stimulatora produkcije NO (Grafikon 4.3.3.3.2.).

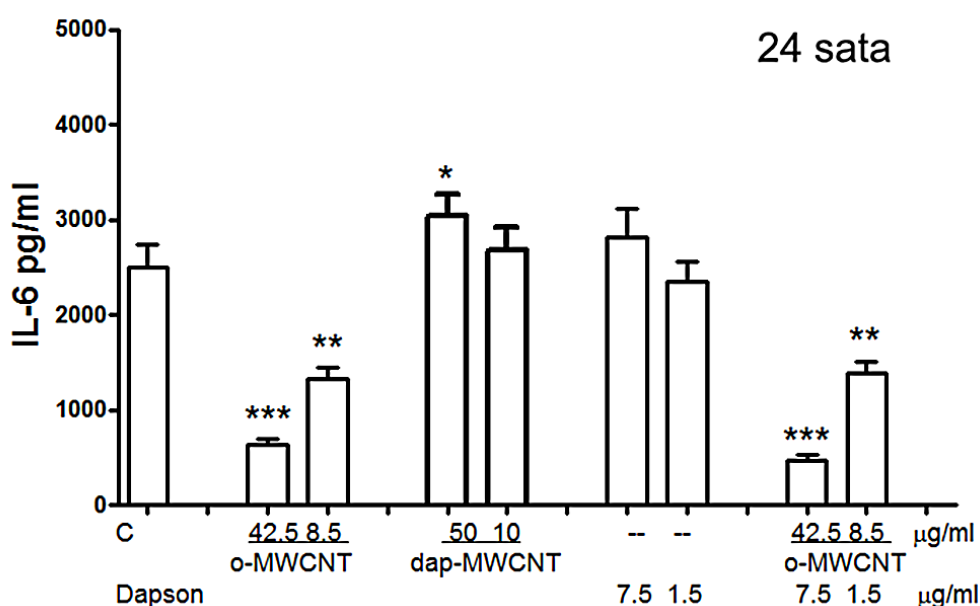


Grafikon 4.3.3.3.2. Efekat MWCNT, dapsona i njihove kombinacije na produkciju NO od strane PMØ stimulisanih LPS-om (200ng/ml).

PMØ su kultivisane sa nanocevima i dapsonom u naznačenim koncentracijama tokom 24 sata u prisustvu LPS. Nakon kultura, iz supernatanta je određena koncentracija NO Grisovom metodom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD triplikata iz jednog reprezentativnog eksperimenta, od ukupno tri. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$, u poređenju sa kontrolom

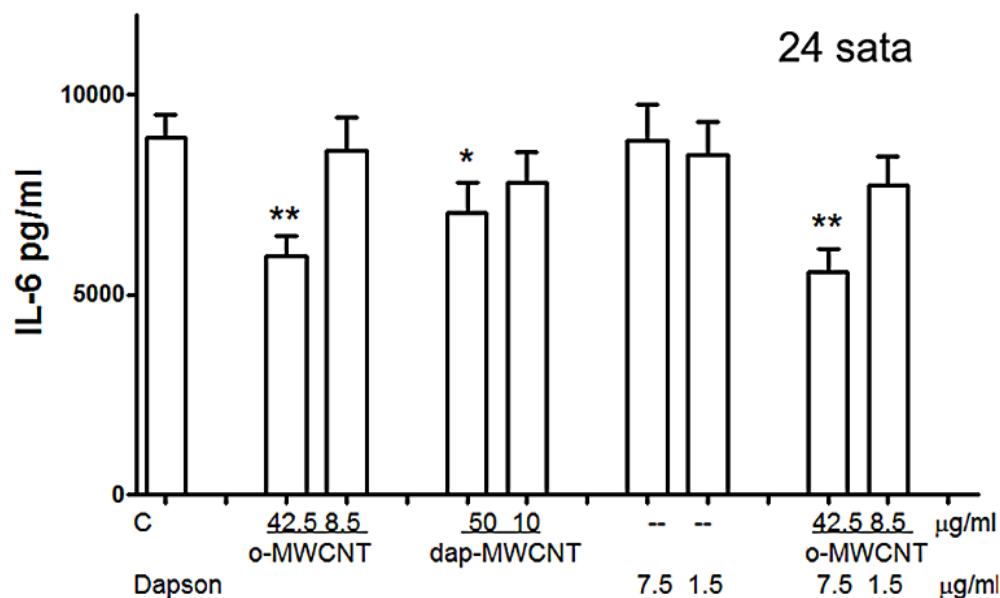
Nakon 24 časa kulture, uočeno je da kontrolne nestimulisane ćelije proizvode manje od 20 μM NO, dok je LPS delimično stimuliše njegovu produkciju posle 24 sata, a značajna stimulacija je uočena tek nakon 3 dana kulture (podaci nisu prikazani). dap-MWCNT, i solubilni dapson ne menjaju značajno sposobnost PMØ da proizvode NO ni u jednoj od ispitivanih koncentracija. Sa druge strane, o-MWCNT (42.5 $\mu\text{g/ml}$) i kombinacija dapsona (7.5 $\mu\text{g/ml}$) i o-MWCNT (42.5 $\mu\text{g/ml}$) inhibiraju spontanu produkciju NO, ali ne i produkciju NO indukovanu sa LPS (Grafikon 4.3.3.3.2.).

IL-6 predstavlja značajan citokin uključen u regulaciju intracelularnih infekcija. Stoga je proučavan efekat funkcionalizovanih nanocevi, dapsona i njihove kombinacije, na produkciju IL-6 od strane nestimulisanih PMØ (**Grafikon 4.3.3.3.3.**) i PMØ stimulisanih LPS-om (**Grafikon 4.3.3.3.4.**). Pokazano je da LPS dovodi do snažne stimulacije produkcije IL-6 od strane PMØ. o-MWCNT inhibiraju spontanu produkciju IL-6 od strane PMØ, pogotovo u većim koncentracijama, i u prisustvu solubilnog dapsona (7.5 µg/ml). Sa druge strane, dap-MWCNT u većim koncentracijama stimuliše produkciju ovog citokina. Međutim, u prisustvu LPS-a je uočen suprotan efekat većih koncentracija dap-MWCNT na produkciju IL-6, obzirom da je koncentracija ovog citokina značajno smanjena u kulturi stimulisanih PMØ u prisustvu dap-MWCNT (50 µg/ml). Solubilni dapson ne moduliše značajno produkciju IL-6 ni u jednoj od primenjenih koncentracija.



Grafikon 4.3.3.3.3. Efekat MWCNT, dapsona i njihove kombinacije na spontanu produkciju IL-6 od strane PMØ.

PMØ su kultivisane sa nanocevima i dapsonom u naznačenim koncentracijama tokom 24 sata. Nakon kultura iz supernatanta je određena koncentracija IL-6 ELISA. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD triplikata iz jednog reprezentativnog eksperimenta od ukupno tri. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ u poređenju sa kontrolom

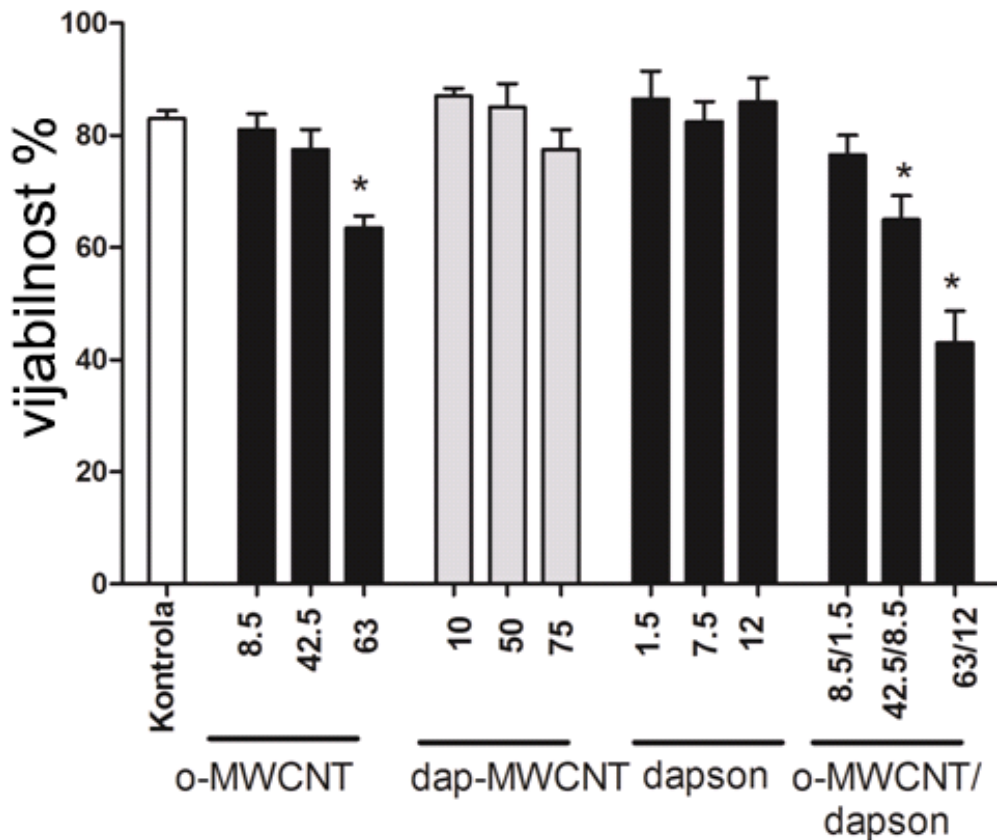


Grafikon 4.3.3.3.4. Efekat MWCNT, dapsona i njihove kombinacije na produkciju IL-6 od strane PMØ stimulisanih LPS-om (200ng/ml).

Ćelije su kultivisane sa nanocevima i dapsonom u naznačenim koncentracijama tokom 24 sata u prisustvu LPS. Nakon kultura, iz supernatanta je određena koncentracija IL-6 ELISA. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD triplikata iz jednog reprezentativnog eksperimenta od ukupno tri. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, u poređenju sa kontrolom

4.3.3.4 Citotoksičnost dap-MWCNT na modelu humanih DC

U cilju procene citotoksičnosti dap-MWCNT prema humanim DC, DC su kultivisane 2 dana u prisustvu 3 koncentracije dap-MWCNT (10, 50 i 75 $\mu\text{g/ml}$), ekvivalentnih koncentracija o-MWCNT (7.5, 42.5 i 63 $\mu\text{g/ml}$), solubilnog dapsona (1.5, 7.5 i 12 $\mu\text{g/ml}$), ili kombinacija o-MWCNT (7.5, 42.5 i 63 $\mu\text{g/ml}$) i solubilnog dapsona.

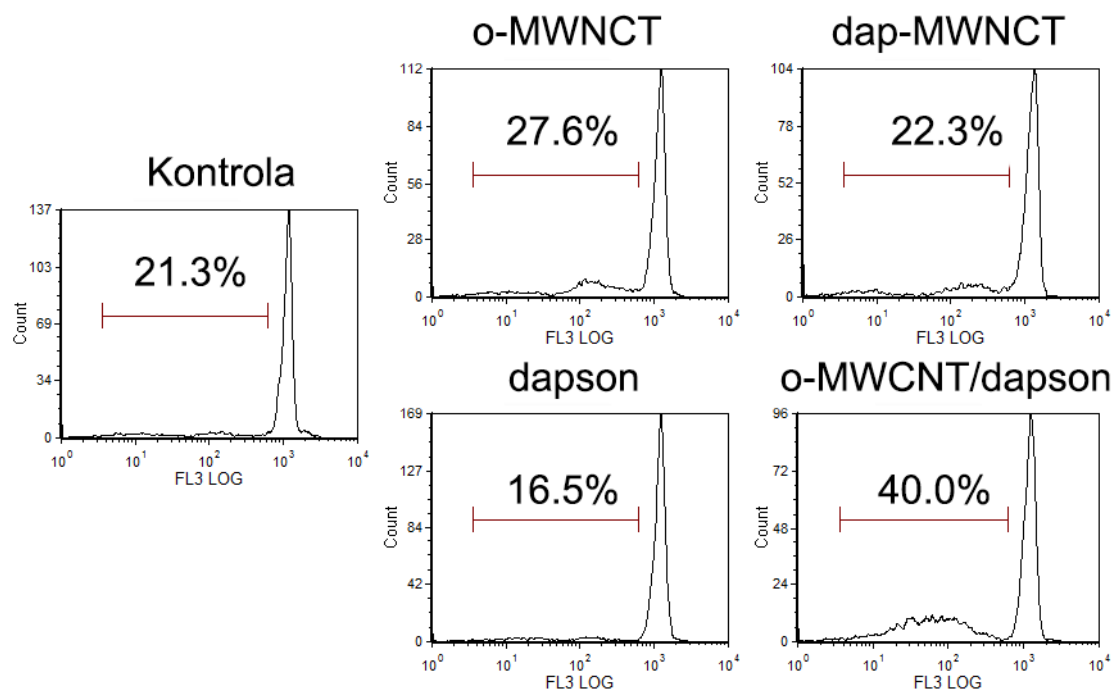


Grafikon 4.3.3.4.1. Vijabilnost DC u kulturi sa MWCNT i dapsonom.

DC su kultivisane 2 dana u prisustvu dap-MWCNT (10, 50 i 75 µg/ml), ekvivalentnih koncentracija o-MWCNT (7.5, 42.5 i 63 µg/ml), solubilnog dapsona (1.5, 7.5 i 12 µg/ml), ili kombinacije o-MWCNT (7.5, 42.5 i 63 µg/ml) i solubilnog dapsona. Vijabilnost DC je izračunata na osnovu ukupnog broja vijabilnih ćelija u kulturama, a rezultati su prikazani kao procenat % vijabilnosti u odnosu na zasađeni broj ćelija (100%).

Pokazano je da dap-MWCNT i solubilni dapson ne smanjuju vijabilnost DC u kulturi ni u jednoj od ispitivanih koncentracija (**Grafikon 4.3.3.4.1.**). Sa druge strane, o-MWCNT u najvećoj koncentraciji (63 µg/ml) ispoljava citotoksični efekat, obzirom da smanjuje preživljavanje ćelija za 20% u odnosu na kontrolu. Iako solubilni dapson nema efekta na vijabilnost DC, pokazano je da on potencira citotoksičnost o-MWCNT. U kombinaciji sa odgovarajućim koncentracijama dapsona, o-MWCNT smanjuju vijabilnost DC u dve najveće koncentracije (42.5 i 63 µg/ml).

Slični rezultati su dobijeni merenjem apoptoze DC nakon 2 dana kultivisanja u prisustvu MWCNT i dapsona (**Grafikon 4.3.3.4.2.**). Uočeno je da samo kombinacija o-MWCNT i dapsona (42.5 µg/ml / 7.5 µg/ml) ima značajan proapoptotski efekat na DC.



Grafikon 4.3.3.4.2. Efekat MWCNT i dapsona na apoptotzu DC.

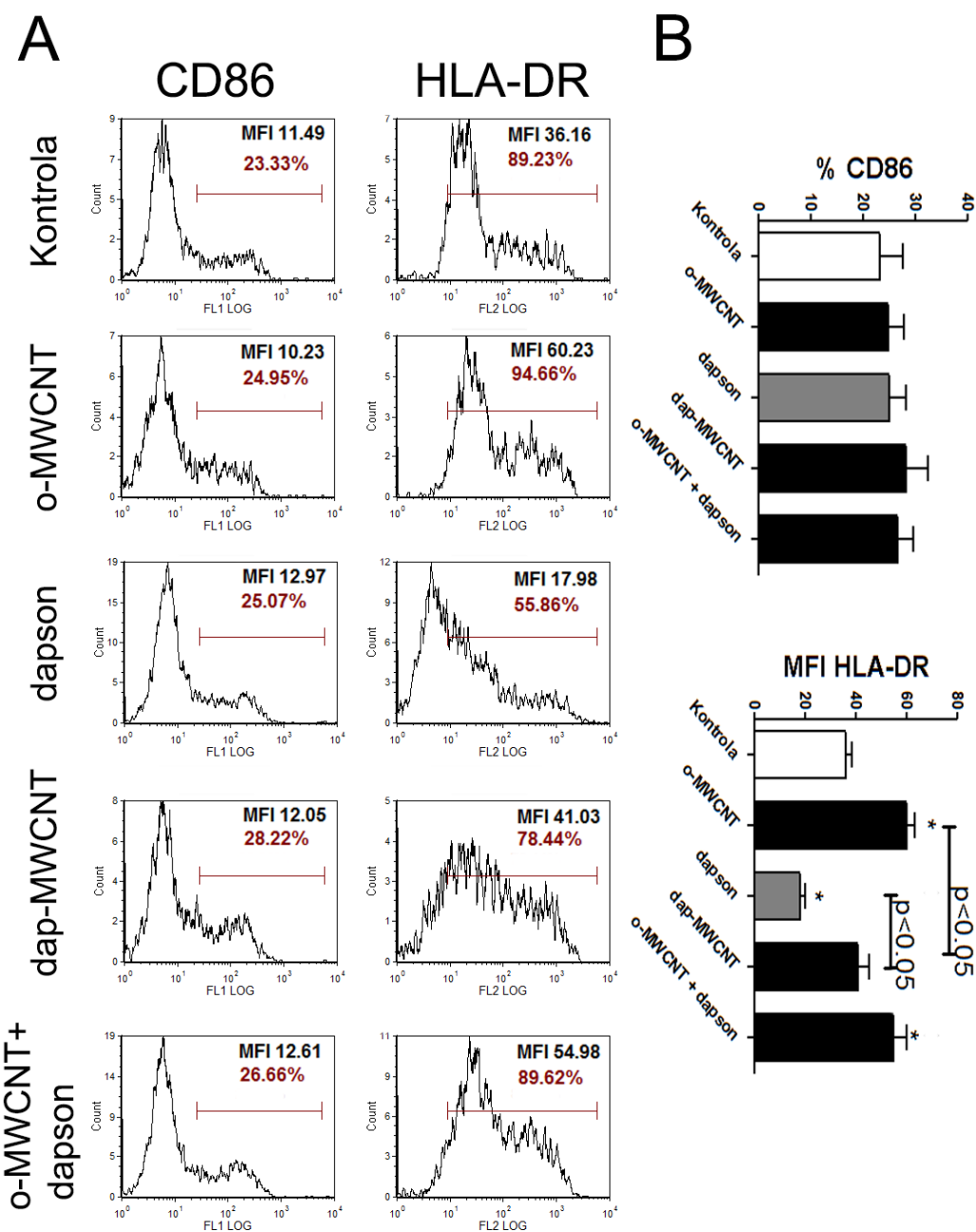
DC su kultivisane u prisustvu o-MWCNT (42.5 µg/ml), dap-MWCNT (50 µg/ml), solubilnog dapsona (7.5 µg/ml) ili kombinacije o-MWCNT (42.5 µg/ml) i dapsona (7.5 µg/ml). Procenat apoptoze je određen obeležavanjem ćelija sa PI u hipotonom rastvoru. Prikazan je reprezentativni eksperiment od tri sa sličnim rezultatima.

4.3.3.5 Efekat dap-MWCNT na fenotip i produkciju citokina od strane DC

Naredni cilj ove studije je bio ispitati imunomodulatorna dejstva MWCNT na DC. Imunomodulatorni efekat ovih nanocevi je procenjen na osnovu fenotipske ekspresije HLA-DR, CD86, CD54 i CCR-7 molekula na DC i produkcije citokina ključnih za Th polarizacionu sposobnost ovih ćelija (IL-12p70, IL-23, IL-27 i IL-10) nakon 48h kulture. U tom smislu su korišćene netoksične koncentracije o-MWCNT (42.5 µg/ml) i dapsona (7.5

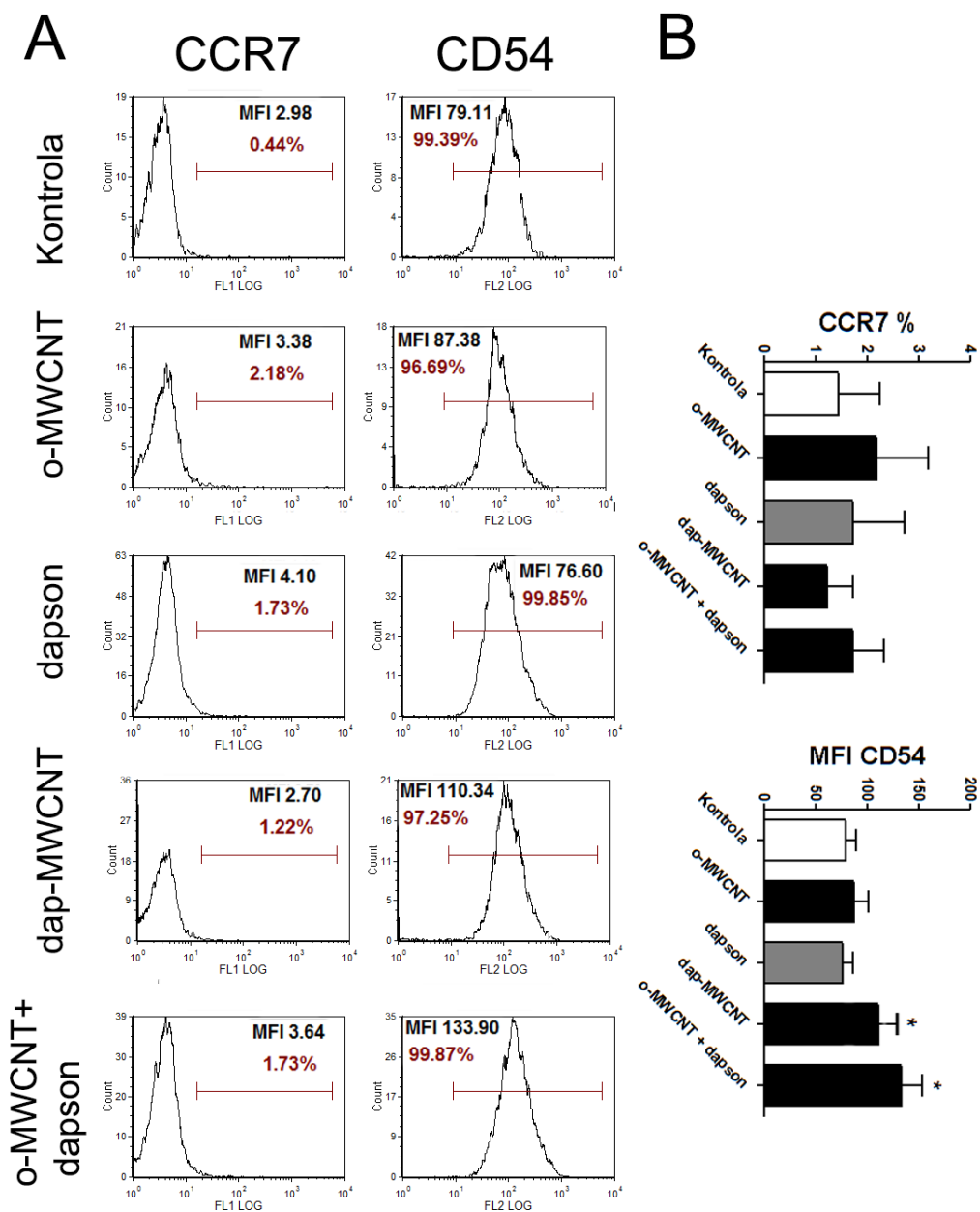
$\mu\text{g/ml}$), koje odgovaraju koncentraciji MWCNT i za njih vezanog dapsona u $50 \mu\text{g/ml}$ dap-MWCNT. Kao dodatna kontrola je korišćena kombinacija o-MWCNT ($42.5 \mu\text{g/ml}$) i dapsona ($7.5 \mu\text{g/ml}$).

Rezultati analize ekspresije HLA-DR i CD86 molekula su prikazani na **grafikonu 4.3.3.5.1.**, dok su rezultati ekspresije CD54 i CCR7 prikazani na **grafikonu 4.3.3.5.2.** Pokazano je da nezrele DC imaju karakteristično nisku ekspresiju CD86, odsustvo ekspresije CCR7, i pozitivne su za HLA-DR i CD54. Uočeno je da ni jedan od ispitivanih agenasa ne stimuliše ekspresiju CD86 i CCR7 od strane nezrelih DC u navedenim koncentracijama, dok je efekat na ekspresiju HLA-DR dramatično drugačiji. Naime, o-MWCNT ($42.5 \mu\text{g/ml}$), same ili u kombinaciji sa $7.5 \mu\text{g/ml}$ dapsona, značajno stimulišu ekspresiju HLA-DR od strane DC. Ovakva kombinacija o-MWCNT i dapsona ima stimulatoran efekat i na ekspresiju CD54 (**Grafikon 4.3.3.5.2.**). Solubilni dapson u primenjenoj koncentraciji snažno inhibira ekspresiju HLA-DR molekula, dok dap-MWCNT ne modifikuju značajno njegovu ekspresiju od strane DC.



Grafikon 4.3.3.5.1. Uticaj MWCNT i dapsona na ekspresiju CD86 i HLA-DR od strane nezrelih DC.

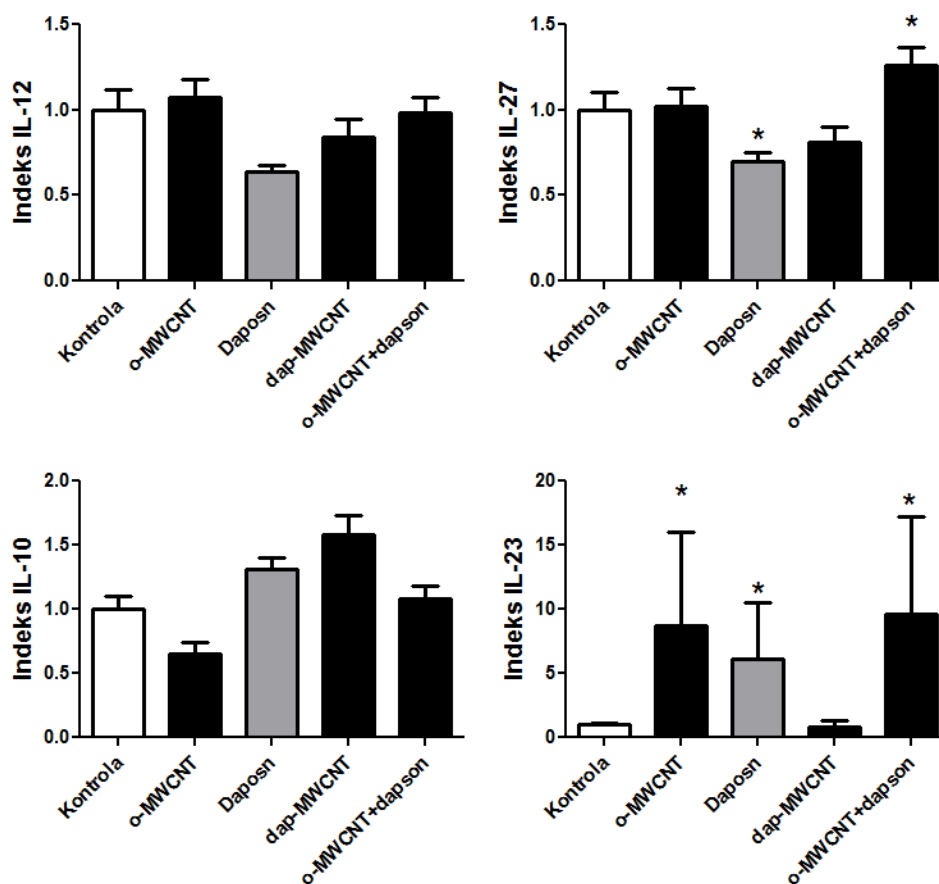
DC su kultivisane 2 dana u prisustvu o-MWCNT (42.5 µg/ml), dapsona (7.5 µg/ml), dap-MWCNT (50 µg/ml), ili kombinacije o-MWCNT i dapsona. Nakon toga su DC sakupljene i analizirana je ekspresija CD86 i HLA-DR protičnom citometrijom. Prikazan je A) jedan reprezentativni eksperiment i B) zbirni podaci iz 3 eksperimenta kao srednja vrednost ± SD. *p<0.05 u poređenju sa kontrolom.



Grafikon 4.3.3.5.2. Uticaj MWCNT i dapsona na ekspresiju CD54 i CCR7 od strane nezrelih DC.

DC su kultivisane 2 dana u prisustvu o-MWCNT (42.5 µg/ml), dapsona (7.5 µg/ml), dap-MWCNT (50 µg/ml), ili kombinacije o-MWCNT i dapsona. Nakon toga su DC sakupljene i analizirana je ekspresija CD54 i CCR7 protičnom citometrijom. Prikazan je A) jedan reprezentativni eksperiment i B) zbirni podaci iz 3 eksperimenata kao srednja vrednost ± SD. *p<0.05 u poređenju sa kontrolom.

U cilju ispitivanja efekata MWCNT i dapsona na produkciju citokina od strane nezrelih DC, analiziran je supernatant 48-časovne kulture DC kultivisanih sa MWCNT (**Grafikon 4.3.3.5.3.**). Obzirom da je postojala velika varijacija u produkciji citokina između donora, rezultati su prikazani kao indeksi u odnosu na kontrolu (1). Pokazano je da je koncentracija IL-12p70 u kontrolnim kulturama nezrelih DC relativno niska (srednja vrednost \pm SD; 22.3 ± 15.6 pg/ml), kao i koncentracija IL-10 (13.1 ± 10.3 pg/ml), pa podaci nisu statistički analizirani. Sa druge strane, je pokazano da kontrolne DC proizvode relativno visoke koncentracije IL-27 (2164.3 ± 1323.3 pg/ml), a uočeno je da dapson značajno inhibira produkciju ovog citokina od strane nezrelih DC (1517.4 ± 755.3 pg/ml). Sa druge strane, dapson u kombinaciji sa o-MWCNT stimuliše produkciju IL-27 od strane ovih ćelija (3677 ± 1544.3 pg/ml). o-MWCNT i dapson, sami ili u kombinaciji, značajno stimulišu produkciju IL-23 u odnosu na kontrolne DC (49.3 ± 35.3 pg/ml), dok dap-MWCNT ne moduliše njegovu produkciju (**Grafikon 4.3.3.5.3.**).



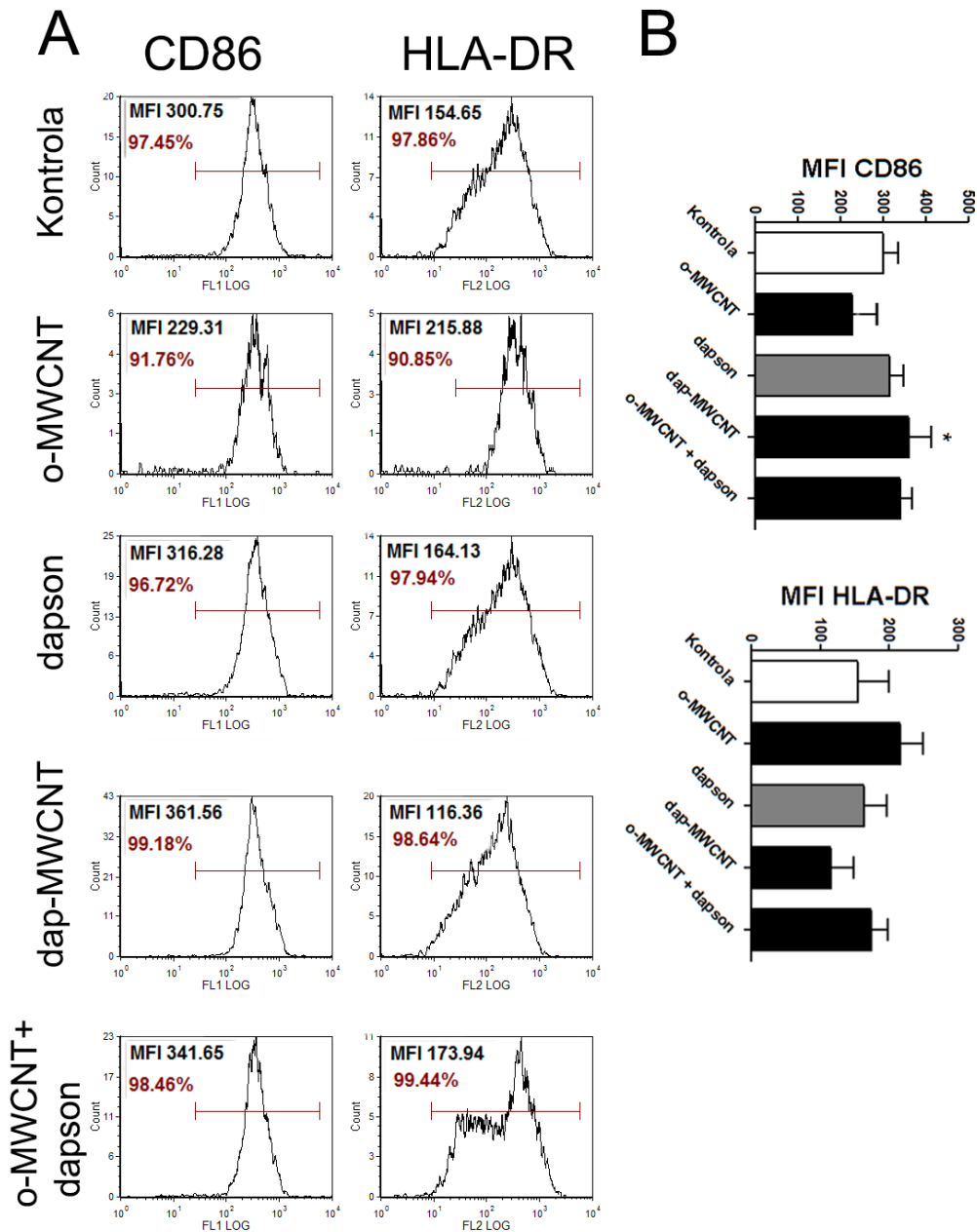
Grafikon 4.3.3.5.3. Uticaj MWCNT i dapsona na produkciju citokina od strane nezrelih DC.

DC su kultivisane 2 dana u prisustvu o-MWCNT (42.5 $\mu\text{g/ml}$), dap-MWCNT (50 $\mu\text{g/ml}$), dapsona (7.5 $\mu\text{g/ml}$) ili kombinacije o-MWCNT i odgovarajuće koncentracije dapsona. Nakon toga su sakupljeni supernatanti DC kultura i analiziran je nivo IL-12, IL-23, IL-27 i IL-10 ELISA metodom. Prikazani su zbirni podaci iz 3 eksperimenata kao srednja vrednost indeksa \pm SD. Indeks je prvobitno izračunat unutar svakog eksperimenata kao odnos tretmana i kontrole (1). * $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom.

4.3.3.6. Efekat dap-MWCNT na fenotip i produkciju citokina od strane DC u proinflamacijskom miljeu

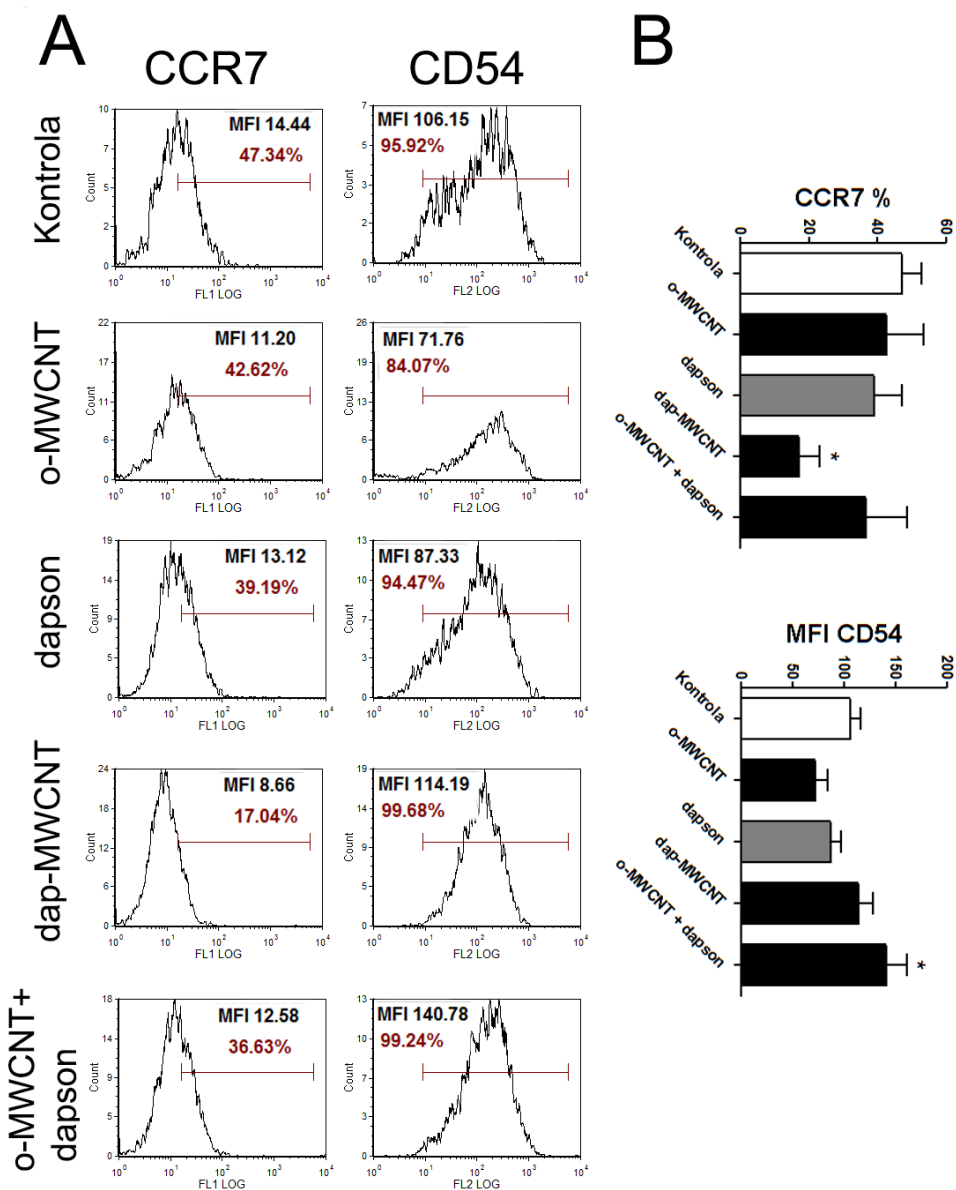
Nakon toga je ispitano da li se slični imunomodulatorni efekti MWCNT i dapsona mogu očekivati u kulturi sa proinflamacijskim citokinima (PGE-2, IL-6, IL-1 β i TNF- α). U tom kontekstu je ispitan uticaj dap-MWCNT (50 μ g/ml), i ekvivalentnih koncentracija o-MWCNT, dapsona, i kombinacije o-MWCNT i dapsona na fenotip i produkciju citokina od strane DC stimuliranih proinflamacijskim citokinima.

Uočeno je da dap-MWCNT, za razliku od o-MWCNT i dapsona, stimuliše ekspresiju kostimulatornog molekula CD86. Takođe, uočeno je da DC tretirane ovim konjugatom imaju tendenciju smanjenja ekspresije HLA-DR, ali nije uočena statistička značajnost kada se uzmu u obzir svi analizirani donori (**Grafikon 4.3.3.6.1.**). Uočeno je da dap-MWCNT u proinflamacijskom citokinskom miljeu smanjuju ekspresiju CCR7 od strane DC (**Grafikon 4.3.3.6.2.**), dok se takav efekat ne uočava nakon tretmana DC sa o-MWCNT ili dapsonom. Sa druge strane, kombinacija o-MWCNT i dapsona ima stimulatoran efekat na ekspresiju CD54 u proinflamacijskom miljeu.



Grafikon 4.3.3.6.1. Uticaj MWCNT i dapsona na ekspresiju HLA-DR i CD86 od strane DC u proinflamacijskom miljeu.

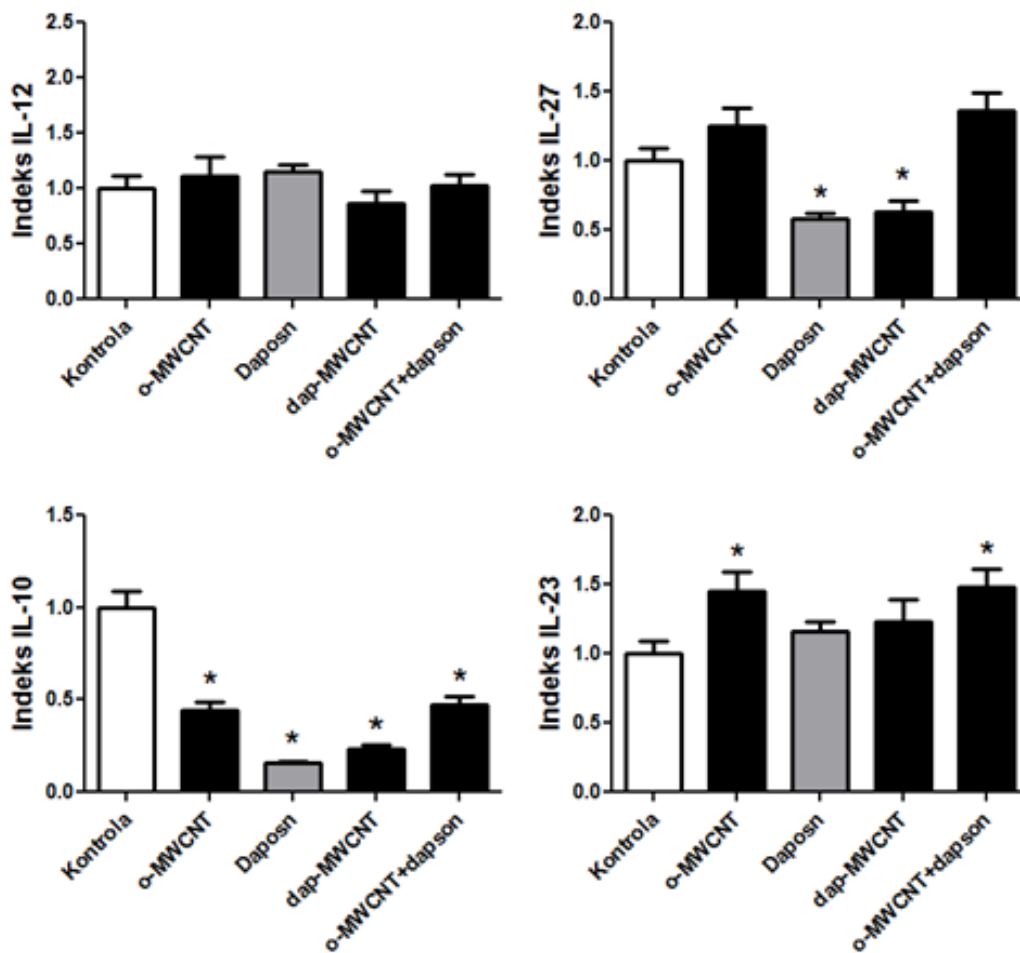
DC su kultivisane 2 dana u prisustvu o-MWCNT (42.5 $\mu\text{g/ml}$), dapsona (7.5 $\mu\text{g/ml}$), dap-MWCNT (50 $\mu\text{g/ml}$), ili kombinacije o-MWCNT i dapsona u prisustvu proinflamacijskih citokina (PGE-2, IL-1 β , IL-6 i TNF- α). Nakon toga su DC sakupljene i analizirana je ekspresija CD86 i HLA-DR protičnom citometrijom. Prikazan je A) jedan reprezentativni eksperiment i B) zbirni podaci iz 3 eksperimenata kao srednja vrednost \pm SD. * $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom.



Grafikon 4.3.3.6.2. Uticaj MWCNT i dapsona na ekspresiju CCR7 i CD54 od strane DC u proinflamacijskom miljeu.

DC su kultivisane 2 dana u prisustvu o-MWCNT (42.5 $\mu\text{g/ml}$), dapsona (7.5 $\mu\text{g/ml}$), dap-MWCNT (50 $\mu\text{g/ml}$), ili kombinacije o-MWCNT i dapsona u prisustvu proinflamacijskih citokina (PGE-2, IL-1 β , IL-6 i TNF- α). Nakon toga su DC sakupljene i analizirana je ekspresija CD54 i CCR7 protičnom citometrijom. Prikazan je A) jedan reprezentativni eksperiment i B) zbirni podaci iz 3 eksperimenta kao srednja vrednost \pm SD. * $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom.

Proinflamacijski citokini su značajno stimulisali produkciju IL-12p70 (281.5 ± 121.0 pg/ml), IL-10 (62.3 ± 44.4 pg/ml) i IL-23 (442.3 ± 223.9 pg/ml), dok je produkcija IL-27 ostala relativno visoka (2675.3 ± 1332 pg/ml), u poređenju sa nestimulisanim kontrolnim DC. Uočeno je da o-MWCNT ($42.5 \mu\text{g/ml}$) dodatno stimulišu produkciju IL-23 (618.9 ± 255.4 pg/ml) i inhibiraju produkciju IL-10 više od dva puta, dok produkcija IL-12 i IL-27 nije značajnije modifikovana (**Grafikon 4.3.3.6.3.**). Sličan efekat na produkciju IL-10 imaju i solubilni dapson ($7.5 \mu\text{g/ml}$), dap-MWCNT ($50 \mu\text{g/ml}$) i kombinacija o-MWCNT i dapsona u ekvivalentnim koncentracijama. Solubilni dapson, i dap-MWCNT imaju inhibitori efekat na produkciju IL-27 u poređenju sa kontrolom. Značajno drugačiji efekat je uočen u kulturama DC tretiranih o-MWCNT ili kombinacijom o-MWCNT i dapsona, koji delimično stimulišu produkciju IL-27, ali nije uočena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu.



Grafikon 4.3.3.6.3. Uticaj MWCNT i dapsona na produkciju citokina od strane DC u proinflamacijskom miljeu.

DC su kultivisane 2 dana u prisustvu o-MWCNT (42.5 $\mu\text{g/ml}$), dap-MWCNT (50 $\mu\text{g/ml}$), dapsona (7.5 $\mu\text{g/ml}$) ili kombinacije o-MWCNT i odgovarajuće koncentracije dapsona, u prisustvu proinflamacijskih citokina (PGE-2, IL-1 β , IL-6 i TNF- α). Nakon toga su sakupljeni supernatanti DC kultura i analiziran je nivo IL-12, IL-23, IL-27 i IL-10 ELISA metodom. Prikazani su zbirni podaci iz 3 eksperimenta kao srednja vrednost indeksa \pm SD. Indeks je prvobitno izračunat unutar svakog eksperimenta kao odnos tretmana i kontrole (1). * $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom.

5. DISKUSIJA

5.1. BIOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULATORNE OSOBINE NAPREDNIH BIOMATERIJALA

Biokompatibilnost SMA je detaljno proučavana u prethodnim radovima [266, 267], međutim slične studije sa RS NiTi SMA, kao i konvencionalnim i RS CuAlNi SMA ne postoje [268]. Usled velike količine potencijalno toksičnih jona u ovim legurama, koje mogu izazvati citotoksičnost, kancerogenost, mutagenost, iritaciju, alergiju i hipersenzitivnost, cilj ove studije je bio da se detaljno ispita biokompatibilnost SMA proizvedenih novom metodom. Ovakva ispitivanja su posebno važna kada se uzmu u obzir značajne razlike u površinskom oksidnom sloju SMA koje nastaju kao posledica različitih procedura njihove pripreme [266, 267]. U tom smislu je biokompatibilnost CuAlNi i NiTi traka ispitana na modelu PMØ pacova i humanih DC. Sistem monocita i makrofaga ima ključnu ulogu u odgovoru na biomaterijale [577, 578]. Brojni dokazi upućuju na to da izlivenne legure aktiviraju makrofage čime iniciraju nepoželjni odgovor tkiva koji se karakteriše hroničnom inflamacijom, oštećenjem tkiva, pa čak i osteolizom [317, 579]. Obzirom da su RS CuAlNi i NiTi trake potencijalan materijal za primenu u biomedicini, ispitivan je odgovor PMØ i DC na ove biomaterijale, kao i odgovor humanih PBMC izolovanih iz 20 donora koji nisu u direktnom srodstvu.

5.1.1 Citotoksični efekti CuAlNi legura na modelu PMØ pacova

Citotoksičnost CuAlNi legura je detaljno ispitana na modelu PMØ mereći njihovu vijabilnost, aktivnost SDH, nekrozu, apoptozu, generisanje intracelularnih ROS i produkciju proinflamacijskih citokina od strane ovih ćelija. Pokazano je da kontrolne CuAlNi legure izazivaju ozbiljnu citotoksičnost PMØ, a efekat je posredovan metalnim jonima oslobođenim u kondicionirani medijum. Citotoksični efekat je uočen kao kompletan gubitak vijabilnosti ovih ćelija, kao i aktivnosti SDH usled nekroze PMØ. Na osnovu merenja koncentracije Cu jona (84.0 ppm) uočeno je da je ona za 10 puta veća nego

koncentracija koja izaziva citotoksičnost kod različitih ćelija [580-582]. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Schedle i sar., koji su pokazali sličan odgovor L929 ćelija i gingivalnih fibroblasta na jone Cu u relativno visokim koncentracijama (0.33-1mM) [583], kao i sa našim ranijim rezultatima na L929 ćelijama i timocitima pacova [268]. Ispitivanjem citotoksičnosti kontrolne CuAlNi legure nakon kondicioniranja je pokazano da ona indukuje i nekrozu i apoptozu PMØ. Ovi rezultati su bili u skladu sa činjenicom da se u toku kondicioniranja sa kontrolnih CuAlNi pločica oslobađa značajna količina Cu u medijum (84ppm). Uloga drugih jona oslobođenih sa površine kontrolnih CuAlNi legura nije jasna, obzirom da je koncentracija Ni (2.4 ppm) i Al (0.2 ppm) mala da izazove citotoksičnost [580, 584, 585]. Iako je pokazano da Ni ima aditivni efekat na citotoksičnost Cu [585], detektovane koncentracije Ni u ekstraktu kontrolne legure mogu imati i inhibitoran efekat na različite ćelijske funkcije [267, 586, 587]. Međutim, obzirom na visoku detektovanu koncentraciju Cu može se pretpostaviti da je efekat ovog jona bio dominantan. Al se koristi za čišćenje veštačkih kukova i medicinskih uređaja, i pokazano je da ima relativno dobru citokompatibilnost [580]. Iako se Al ne nalazi u fiziološkim uslovima u organizmu, brojne studije su pokazale da se u mozgu mnogih pacijenata sa Alchajmerovom bolesti nalazi više Al nego u kontrolama istog pola i starosti. Ispitivanja su pokazala da Al doprinosi neurotoksičnosti tako što utiče na homeostazu Fe i produkciju ROS. Al ima fiksni oksidacioni broj, pa stoga ne učestvuje u redoks reakcijama. Međutim, Al može poremetiti membranske lipide i omogućiti lipidnu peroksidaciju koju inicira Fe [588]. Osim toga, Al se može vezati za feritin, nosač Fe, u mozgu i povećati katalitičku aktivnost Fe [589]. Obzirom da Cu može stimulisati oksidativni stres ćelija, neophodno je ispitati da li male koncentracije Al oslobođene sa CuAlNi legure dodatno doprinose oksidativno stresu kod PMØ.

Objašnjenje za različitu biokompatibilnost i korozivne osobine kontrolnih legura i RS SMA traka leži u njihovoj mikrostrukturi. Naime, naši prethodni rezultati [268] su pokazali da je kontrolna CuAlNi legura višefazna, dok je CuAlNi traka martenzitna. Razlog tome što nakon izlivanja, CuAlNi pločica nije dodatno termalno obrađena na 500-800°C što bi omogućilo formiranje austenitne rešetke i aktiviranje SME. SME CuAlNi legura se zasniva

na osobinama CuAl faze β koja formira centričnu kubičnu strukturu, za razliku od B2 strukture NiTi. Tokom hlađenja, ova faza prolazi eutektoidnu dekompoziciju $\beta \rightarrow \alpha + \gamma_2$ na 565°C. Velike brzine hlađenja mogu smanjiti eutektoidnu dekompoziciju i omogućiti martenzitnu transformaciju [590]. Osim toga, formiranje oksidnog sloja na površini ovih materijala nakon produženog kondicioniranja smanjuje oslobađanje metalnih jona sa površine. Hipoteza da je martenzitna struktura CuAlNi legura odgovorna za rezistenciju na koroziju je potvrđena mikrostrukturnom analizom CuAlNi legura koje su dva puta zagrevane i ohlađene. Ovakav tretman rezultuje delimičnim formiranjem martenzitne strukture CuAlNi legure, koja tada ima veći stepen rezistencije na koroziju u odnosu na netretirane CuAlNi. Osim martenzitne strukture CuAlNi RS trake [268], pokazali smo da se na površini ovih legura formira oksidni sloj Cu i Al, što je pokazno detekcijom traka na 930 eV (Cu) i 1390 eV (Al) Auger spektrom. Međutim za kompletnu analizu tipova oksida koji se nalaze na površini CuAlNi RS traka je neophodno dodatno uraditi i XPS analizu. I pored toga, uočeno je da se na samoj površini kondicioniranih legura ne nalazi Ni, koji je detektovan tek ispod 6nm dubine. Ovi rezultati ukazuju da se u interakciji sa medijumom prvo formiraju oksidi Cu i Al, koji kasnije predstavljaju barijeru za oslobađanje Ni iz legure.

Rezultati su pokazali da kontrolna CuAlNi pločica, za razliku od CuAlNi RS traka, pre kondicioniranja u medijumu stimuliše isključivo nekrozu PMØ, dok nakon kondicioniranja stimuliše i apoptozu i nekrozu ovih ćelija. Pri tome, samo kondicioniranje smanjuje oslobađanja svih metalnih jona sa ove legure. Apoptoza i nekroza su funkcionalno i morfološki različite forme ćelijske smrti. Međutim, ovaj koncept je doveden u pitanje otkrićem da u toku procesa apoptoze u ćelijama se može indukovati nekroza kada se istroše intracelularni depoi energije (deplecija ATP) [591]. U skladu sa ovim rezultatima, može se pretpostaviti da su visoke koncentracije Cu jona oslobođenih sa kontrolne legure blokirale stvaranje ATP u mitohondrijama i tokom glikolize, uzrokujući nekrozu PMØ. Smanjenjem koncentracije Cu nakon kondicioniranja, moguće je da je nivo ATP bio dovoljan da se završi apoptotski program. Stoga je neophodno izmeriti ATP u PMØ u budućim istraživanjima kako bi se potvrdila ova hipoteza.

Kondicioniranjem se, osim oksidnog sloja, formira i adsorpcioni sloj proteina i jona koji dodatno može smanjiti oslobađanje toksičnih jona metala. U tom smislu su razvijene i brojne metode za oblaganje površine SMA legura u cilju smanjenja njihove toksičnosti, ali i uvođenja biomimetičke funkcije ovog implantata. Naime, pokazano je da CaPO_4 na površini NiTi predstavlja dobru zaštitu površinskog sloja i ima biomimetičku funkciju obzirom da indukuje osteogenezu [592, 593]. Ovakav sloj omogućava i bržu repasivizaciju Ca-fosfata nakon oštećenja površine obloženih legura [286]. Pored toga, na modelu primarnih humanih leukocita i trombocita je pokazano da adsorpcioni sloj na NiTi omogućava adheziju ćelija i sprečava apoptozu neutrofila [592, 593]. Iako je u ovoj studiji CaPO_4 formiran pod kontrolisanim uslovima, sličan proces se može očekivati i kondicioniranjem CuAlNi legura u medijumu za ćelijske kulture ili *in vivo*.

Ključno je to što RS CuAlNi trake nemaju detektabilni citotoksični efekat na PMØ. Ovi rezultati su u skladu sa 10 puta manjom koncentracijom oslobođenog Cu (8.0 ppm) u ekstraktu nakon 7 dana kondicioniranja. Iako je nekoliko radova pokazalo da je Cu, u koncentracijama između 4 i 10 ppm, ima toksičan efekat prema fibroblastnim ćelijskim linijama, to nije potvrđeno u ovoj studiji. Naša ranija istraživanja su pokazala da iste koncentracije egzogeno dodatih Cu jona ne indukuju ni nekrozu ni apoptozu PMØ (podaci nisu prikazani). Objašnjenje ovog fenomena može biti u činjenici da je u našim studijama korišćen 10% FCS u medijumu za ćelijske kulture, za razliku od 3% FCS koji su koristili Wataha i sar. [584, 585] ili 5% koji su koristili Schmalz i sar. [581]. Naši neobjavljeni rezultati pokazuju da veće koncentracije FCS deluju protektivno, a njegovo smanjivanje čini ćelije osetljivijim na toksični efekat metalnih jona.

Najvažniji deo rezultata ove studije se odnosi na produkciju proinflamacijskih citokina od strane PMØ. Obzirom da Cu joni oslobođeni sa kontrolne legure izazivaju citotoksični efekat, produkcija svih proinflamacijskih citokina je značajno smanjena (TNF- α , IL-1, IL-6 i MCP-1) u kulturama sa kontrolnim CuAlNi pločicama. Suska i sar. [594] su pokazali da humani monociti kultivisani u prisustvu titanijuma obloženog sa Cu, proizvode niske koncentracije TNF- α i IL-10. Međutim, ekstrakt kontrolnih legura sakupljenog nakon produženog kondicioniranja, značajno smanjuje produkciju IL-1 i TNF- α . Suprotno tome,

uočeno je povećanje produkcije IL-6 u ekstraktima RS traka sakupljenih nakon 7 dana. Pri tome nisu uočene značajne promene u produkciji drugih citokina koji su analizirani u ekstraktu RS traka nakon produženog kondicioniranja. Ovi rezultati su u skladu sa činjenicom da nekondicionirane SMA trake, iako ne indukuju ni nekrozu ni apoptozu PMØ, stimulišu generisanje intracelularnih ROS, koji je detektovan obeležavanjem ćelija sa DHR. Prema našim saznanjima, do sada nije pokazano da Cu joni indukuju povećanje produkcije IL-6 bez povećanja produkcije ostalih proinflamacijskih citokina. Za razliku od toga je pokazano da Cu stimuliše produkciju mRNA za TNF- α od strane PBMC tretiranih sa Cu jonima [595]. Biološki značaj povećane produkcije IL-6 od strane RS traka treba da se ispita detaljnije, obzirom da IL-6 zajedno sa TNF- α može inicirati inflamaciju. U tom smislu bi proinflamacijski efekat CuAlNi traka bio nepoželjan nakon potencijalne primene kod pacijenata. Međutim, IL-6 poseduje i anti-inflamacijske osobine [596]. Do danas je pokazano da različite legure koje se koriste u izgradnji veštačkih zglobova, oslobađaju subtoksične koncentracije metalnih jona koji stimulišu makrofage. Fagocitoza partikula koje se pri tome oslobađaju sa ovih implantata može doprineti ovom procesu. Citokini koji su analizirani u ovoj studiji su povezani sa inflamacijom i osteolizom [579, 594, 597]. Stoga se može reći da su kontrolne CuAlNi legure primer nebiokompatibilnog materijala zbog proinflamacijskih efekata i citotoksičnosti, što nikako nije poželjno za biomedicinsku primenu. Međutim, RS trake, slično kao i NiTi SMA [254, 256, 598], se potencijalno mogu koristiti za izgradnju medicinskih uređaja kao što su kateteri ili aktuatori, koji su sa tkivom u kraćem vremenskom periodu. Da bi se potvrdila ova hipoteza potrebni su dodatni eksperimenti kojim bi se pokazale dugoročne korozivne osobine ovih materijala, kakva je interakcija CuAlNi SMA sa drugim ćelijama, i kako se ovi materijali ponašaju *in vivo* nakon implantacije.

5.1.2 Efekti CuAlNi i NiTi SMA na vijabilnost i produkciju citokina od strane humanih PBMC

Dobra biokompatibilnost SMA legura je osnovni preduslov za njihovu potencijalnu upotrebu u klinici. U skladu s tim, cilj narednog dela studije je bio da se ispita citotoksični i imunomodulatorni efekat CuAlNi legura u kulturi humanih PBMC. Obzirom da u humanoj populaciji postoji velika varijabilnost u odgovoru na različite metalne jone, u ovim ispitivanjima su korišćene PMBC izolovane iz 20 zdravih donora koji nisu u direktnom srodstvu. U istom modelu je ispitan i efekat NiTi RS traka, pošto njihova biokompatibilnost do sada nije proučavana. Fizičko-hemijske osobine CuAlNi i NiTi su prikazane ranije (**Tabela 1.5.3.4.1**) i pokazano je NiTi imaju znatno manju histerezu od CuAlNi [256]. Ovo ukazuje da je fazne transformacije NiTi SMA znatno teže kontrolisati nego CuAlNi. Međutim, prethodni radovi naše grupe su pokazali da se kontrolisanjem brzine valjka tokom RS metode može fino podešavati temperature Ms i Mf, čime se problem histereze lako prevazilazi [12]. Pored toga, NiTi SMA imaju značajno bolju otpornost na ciklične promene opterećenja [256], što ih čini pogodnim za izradu vaskularnih stentova. Međutim, ključni deo studije, koji se može odnositi i na procenu upotrebne vrednosti CuAlNi i NiTi legura za izradu stentova, odnosi se na ispitivanja imunomodulatornih osobina ovih legura. Prema našim saznanjima do sada nije ispitan uticaj SMA pripremljenih kao RS trake na humane ćelije. Prethodno je pokazano [268, 599] da CuAlNi SMA trake imaju blagi citotoksični efekat na limfocite pacova, makrofage i fibroblaste, a efekat se potpuno gubi nakon kondicioniranja ovih traka u medijumu za ćelijske kulture tokom 5 nedelja. Rezultati u ovom delu studije su sličan fenomen potvrdili i za NiTi legure. U skladu sa tim, smanjena citotoksičnost kondicioniranih CuAlNi RS traka je najverovatnije posledica manjeg oslobađanja Cu i Ni jona sa površine legure nakon kondicioniranja [268].

Pokazali smo da kondicionirane CuAlNi i NiTi trake nisu citotoksične za humane PBMC, što je utvrđeno testovima vijabilnosti i apoptoze. Za razliku od toga, kontrolne NiTi i CuAlNi ispoljavaju značajan citotoksični efekat. Pokazano je da kontrolne CuAlNi izazivaju nekrozu PBMC, obzirom da je zabeleženo smanjenje ćelijske vijabilnosti bez

vidljivog porasta u procentu apoptotskih ćelija. Suprotno tome, osnovni način ćelijske smrti indukovano kontrolnim NiTi legurama je apoptoza. Citotoksičnost kontrolnih CuAlNi i NiTi legura je najverovatnije posledica otpuštanja Cu, odnosno, Ni jona u medijum. Joni Cu u koncentracijama većim od 0.33 mM indukuju nekrozu različitih ćelija, dok niže koncentracije Cu jona indukuju i apoptozu i nekrozu ćelija [583]. Apoptoza i nekroza su funkcionalno i morfološki različite forme ćelijske smrti, i zavise od koncentracije ATP u njima [591]. U skladu sa ovim rezultatima, može se pretpostaviti da su visoke koncentracije Cu jona oslobođenih sa kontrolne CuAlNi legure blokirale stvaranje ATP u mitohondrijama i tokom glikolize, uzrokujući nekrozu PBMC. Apoptoza PBMC u kulturi sa kontrolnim NiTi legurama je najverovatnije uzrokovana oslobađanjem Ni jona, ili kombinacije Ni i Ti jona. Ova hipoteza je bazirana na već opisanim mehanizmima citotoksičnosti Ni oslobođenim sa nitinola [267].

Na osnovu ovih rezultata se može istaći da tehnologija brzog otvrdnjavanja legura, pored poboljšavanja mehaničkih osobina CuAlNi [551] i NiTi [12], značajno poboljšava i njihovu biokompatibilnost. Povećanje rezistencije na koroziju CuAlNi SMA RS traka je potvrđena i ranije [268], dok je sličan mehanizam povećanja rezistencije na koroziju kod NiTi SMA opisan od strane Rondelli i sar. [267, 600].

Ključni rezultati su dobijeni u odgovoru pojedinačnih donora PBMC na ispitivane RS SMA legure. Naime, pokazano je da 2 od 20 PBMC od različitih donora, u kulturi sa necitotoksičnim CuAlNi RS, produkuju više proinflamacijskih citokina (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , i TNF- β), kao i Th1 citokina (IL-12, IFN- γ i IL-2). IL-12 predstavlja ključni faktor u indukciji Th1 imunskog odgovora koji se karakteriše povećanjem produkcije IFN- γ [601, 602]. Stoga se može reći da je IFN- γ , i njegov stimulator IL-12, u grupi citokina koji stimulišu inflamacijski odgovor. U eksperimentalnom sistemu, gde su PBMC aktivirane sa PHA, glavni izvori proinflamacijskih citokina (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , i TNF- β) su najverovatnije monociti, a glavni izvor IFN- γ T limfociti. Obzirom da proliferacija i produkcija citokina od strane T ćelija u prisustvu PHA zavisi od APC u populaciji PBMC, uglavnom monocita, može se pretpostaviti da je su CuAlNi trake stimulisale produkciju proinflamacijskih citokina aktiviranjem APC. U skladu s tim je pokazano da subtoksične

koncentracije Cu stimulišu produkciju proinflamacijskih citokina aktiviranjem NF- κ B u APC [603]. Osim toga, pokazana je i povećana sinteza mRNK za TNF- α od strane PBMC u prisustvu Cu jona [595]. Za razliku od toga, Suska i sar. [594] su pokazali da humani monociti kultivisani sa Ti obloženim sa Cu, produkuju niske koncentracije TNF- α i IL-10. Iako je samo 2 od 20 kultura PBMC odgovorilo na CuAlNi RS SMA (responderi), potencijalni proinflamacijski efekat ovih legura je dokazan i na modelu PM \emptyset pacova. Stoga postoji izvesna verovatnoća da bi kontakt PBMC i CuAlNi RS traka, ili jonima oslobođenim sa površine legure, pokrenuo proinflamacijski odgovor kod nekih individua. Proinflamacijski citokini imaju ključnu ulogu u patogenezi ateroskleroze [604]. Iako postoje kontradiktorni rezultati u vezi Th ćelijskog tipa odgovornog za patogenezu ateroskleroze i aneurizme, generalni je stav da Th1 odgovor potencira razvoj ateroskleroze, dok je imunopatologija i progresija aneurizme posredovana Th2 ćelijama [605-607]. U tom kontekstu bi primena CuAlNi RS traka u vidu kardiovaskularnih stentova potencijalno indukovala nepoželjne imunološke efekte kod osetljivih individua.

Dobra biokompatibilnost NiTi legura je u skladu sa ranijim rezultatima [267]. Pored toga, pokazano je da NiTi SMA nemaju genotoksični efekat [283, 312]. Pokazali smo da, za razliku od CuAlNi RS traka, NiTi RS trake ne stimulišu proinflamacijski odgovor PBMC stimulisanih sa PHA. Sa druge strane, kod 5 donora je detektovano povećanje nivoa IL-10. IL-10 je potentan antiinflamacijski i imunosupresivni citokin koga produkuju Th2 ćelije, B ćelije, DC, makrofagi [608], Th1 ćelije [609], i Treg ćelije [610]. Ovaj citokin je važan u regulaciji periferne tolerancije i doprinosi mehanizmima sprečavanja razvoja autoimunosti [611]. IL-10 predstavlja veoma važan citokin za ograničavanje patoloških procesa u kome učestvuju Th1 ćelije u uslovima snažne inflamacije [612]. Može se pretpostaviti da su primarne ćelije u odgovoru na NiTi legure u modelu PBMC stimulisanih sa PHA adherentni monociti. Mehanizam aktivacije ovih ćelija može biti neravna površina ovih SMA traka. Ova hipoteza je u skladu sa rezultatima da humane DC, menjaju morfološka svojstva u kontaktu sa NiTi SMA trakama. Sličan efekat mogu imati i Ni joni oslobođeni sa NiTi SMA traka, obzirom da Ni poseduje imunomodulatorni efekat, čak i u niskim koncentracijama [613, 614].

Rezultati ispitivanja CuAlNi i NiTi RS traka na humanim PBMC imaju nekoliko implikacija. Prvo, koristeći jednostavan skrining test (PBMC stimulirani sa PHA) moguće je identifikovati pojedince koji razvijaju inflamacijski odgovor u kontaktu sa biomaterijalom, čime bi se predvideli potencijalni nepoželjni efekti nakon *in vivo* implantacije. Nakon otkrivanja respondera na ovakve biomaterijale, mogu se dalje proučiti genski polimorfizmi koji su povezani sa neželjenim imunskim odgovorom na biomaterijale. Povećanje produkcije IL-10 može značajno doprineti tolerogenosti na implantiran uređaj od NiTi RS SMA. Međutim, potrebno je ispitati i da li ovakva tolerancija postoji i nakon produženog izlaganja NiTi RS SMA u organizmu. Poznato je da površina NiTi SMA može biti oštećena u cirkulaciji, narušavanjem protektivnog sloja TiO₂ [267]. Ohrabrujući rezultati su dobijeni u nedavnim ispitivanjima gde su NiTi izlagane cikličnom opterećenju od 2 % pseudoelastične deformacije tokom 24 sata ili 7 dana [615]. Ovi autori su pokazali da i u dinamičkim uslovima NiTi SMA ima dobru biokompatibilnost, obzirom da ne utiču na vijabilnost humanih mezenhimskih matičnih ćelija.

5.1.3. Efekat NiTi RS traka i kontrolnih NiTi pločica na vijabilnost i fenotip DC

Povećanje produkcije IL-10 od strane PBMC stimuliranih sa PHA u kulturi sa NiTi RS SMA može biti potencijalno korisna u terapiji kardiovaskularnih oboljenja u kojima dominiraju proinflamacijski citokini. U skladu sa tim su detaljnije ispitani imunološki efekti koje NiTi RS trake poseduju na modelu humanih DC. Do sada su biološki efekti NiTi SMA proučavani na različitim životinjskim i humanim ćelijama [267, 616], ali nikada nisu proučavani na DC. Ispitivanja biokompatibilnosti konvencionalnih NiTi su pokazala da ove legure imaju dobru biokompatibilnost *in vitro* i *in vivo*. U različitim tipovima ćelijskih kultura je pokazano da NiTi ne ispoljava značajnu citotoksičnost [266]. Međutim, jedna studija je ukazala na umerenu citotoksičnost NiTi, koja se može uporediti sa CoCrMo legurama [283]. U studiji Assad i sar. [283] L929 ćelije su bile izložene direktnom kontaktu

sa čistim NiTi SMA ili legurama obrađenim plazmom. Međutim, autori su u direktnom kontaktu postavljali legure na konfluentni sloj L929 ćelija, iako je poznato da proliferacija ovih ćelija, kao i vijabilnost, može biti značajno smanjena usled težine samih uzoraka (1.1 g). U našim eksperimentalnim modelima, sve ćelije su kultivisane na uzorcima SMA, čime je izbegnuta opasnost od mehaničkog oštećenja ćelija. Osim toga, u studiji Assad i sar. [283] kontrolne NiTi legure su korišćene bez ikakve obrade, a podaci o njihovoj topografiji i sastavu površine nisu ispitivani. U brojnim drugim radovima [276, 280, 284-288] je jasno pokazano da rezistencija NiTi na koroziju zavisi od kvaliteta površine, kao što je topografija i hemijski sastav. Grube i nehomogene površine često sadrže kontaminante iz mehaničke obrade nakon livenja, kao što su metalne čestice, i osetljivije su na koroziju nego uzorci koji imaju obrađenu površinu. Ovo je potvrđeno i u našim pilot eksperimentima u kojima je pokazano da kondicionirani medijum nativnih NiTi (**Slika 3.1.1.1**) sadrži značajno više metalnih jona u poređenju sa kontrolnim NiTi pločicama (rezultati nisu prikazani). I pored toga, kontrolne NiTi RS trake, obrađene mehaničkim poliranjem, ispoljavaju citotoksični efekat prema DC.

Za razliku od toga, i u ovoj studiji je potvrđeno da NiTi RS trake nisu citotoksične za DC, za razliku od kontrolnih NiTi pločica. Uzrok toksičnog efekta kontrolnih pločica je najverovatnije oslobađanje jona Ni u kulturi ili delovanjem slobodnih jona Ni na površini pločica. Ni može pokrenuti stvaranje ROS, oštećenje DNK i inaktivaciju tumor supresorskih gena [617]. Nedavni radovi koji su koristili mikročip analizu su pokazali da joni Ni povećavaju ekspresiju niza gena koji kontrolišu ćelijsku diferencijaciju, ćelijsku smrt, metabolizam holesterola i apoptozu [618]. Kako je već napomenuto, apoptoza i nekroza su funkcionalno i morfološki različite forme ćelijske smrti, i zavisne od intraćelijske koncentracije ATP[591]. Stoga se može pretpostaviti da je Ni oslobođen sa kontrolne legure indukovao citotoksičnost DC, inhibirajući njihovu metaboličku aktivnost, indukujući generisanje ROS i oštećenje DNK. U skladu sa tim, Lifeng i sar. [619] su pokazali da neobložene NiTi legure, čija površina ima veliku koncentraciju Ni, povećavaju ekspresiju proapoptotskih gena, a smanjuju ekspresiju antiapoptotskih proteina, sintezu proteina, energetski metabolizam i popravku DNK.

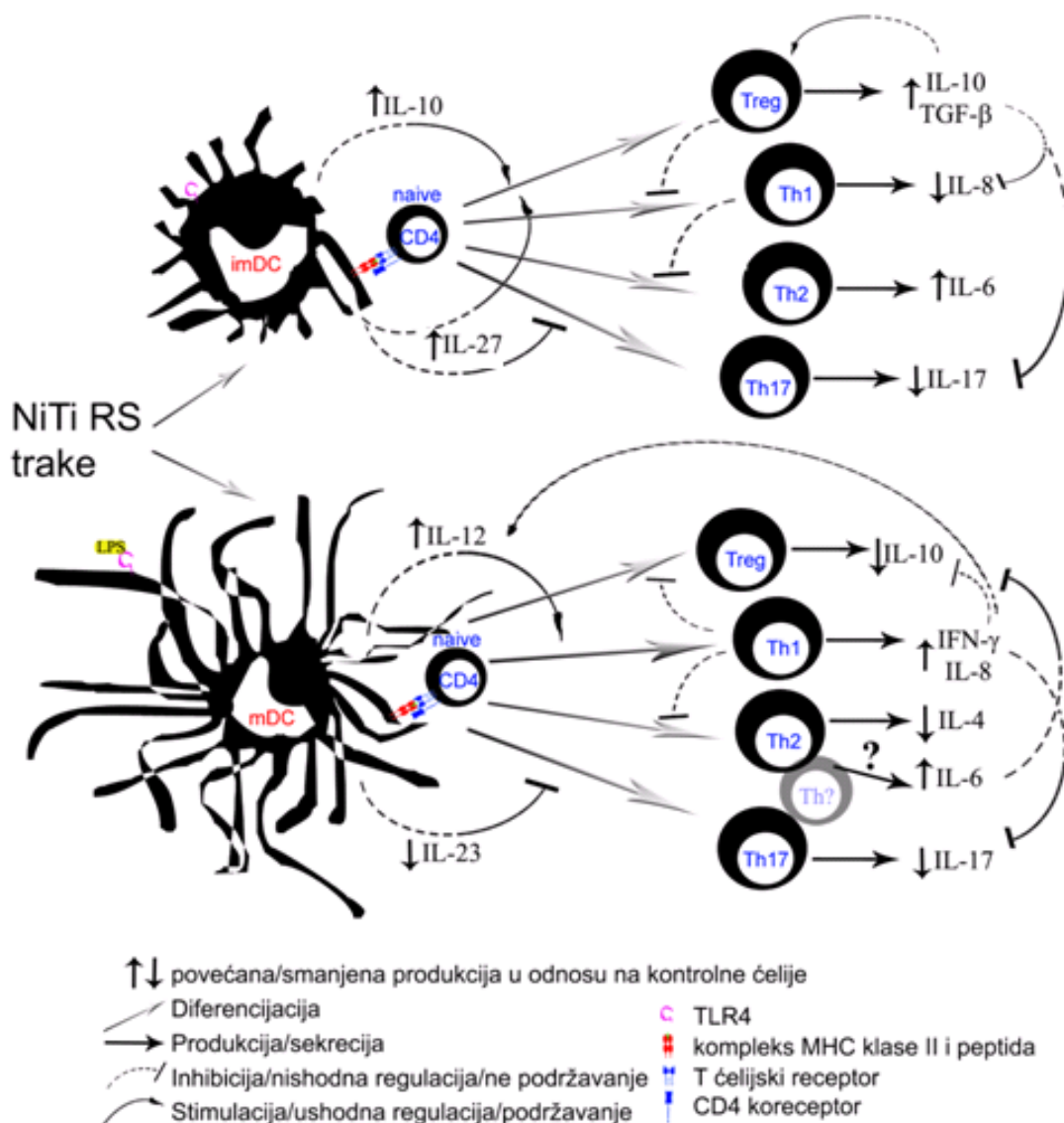
EDX analiza NiTi RS traka i kontrolnih NiTi je pokazala sličnu osnovnu strukturu. Međutim, površinska mikrostruktura kontrolnih NiTi pločica je bila drugačija i karakterisala se izraženijom intermetalnom fazom. Osim toga, dobro je poznato da mehaničko poliranje NiTi pločica narušava površinsku mikrostrukturu i biokompatibilnosti NiTi legura [620]. Međutim, Ni verovatno nije jedini faktor citotoksičnosti ovih legura, obzirom da se i drugi defekti u strukturi legura mogu indukovati mehaničkim poliranjem što bi moglo izazvati neželjene efekte NiTi pločica [620].

Iako NiTi RS trake nisu citotoksične, pokazano je da one deluju na promenu morfologije DC što ukazuje da NiTi RS trake nisu potpuno inertne za DC. Poznato je da DC tokom sazrevanja prolaze brojne morfološke i fenotipske promene, uključujući i formiranje talasastih nastavaka i dendrita [621] koji su uključeni u uspostavljanje odgovarajuće interakcije sa T ćelijama [112]. Stoga se može reći je morfologija DC kultivisanih na NiTi RS trakama bila slična morfologiji ćelija koje sazrevaju. Potvrda ovog fenomena je dobijena i fenotipskom analizom DC, gde je uočeno da NiTi RS trake stimulišu povećanje HLA-DR, kostimulatornih molekula (CD86 i CD40) i CD83, najvažnijeg maturacionog markera. Obzirom da su nastavci DC kultivisanih na NiTi RS trakama bili kraći nego nastavci DC kultivisanih sa LPS-om, za kog je poznato da stimuliše sazrevanje DC [112], može se pretpostaviti da NiTi trake indukuju delimičnu maturaciju DC [622]. Trenutno nisu jasni mehanizmi kojima NiTi RS trake izazivaju ove promene kod DC. Promena ćelijske morfologije zavisi od reorganizacije aktinskog citoskeleta (F-aktina), a ovaj proces može biti modifikovan jonima Ni. Gunaratnam i Grant [623] su pokazali da samo visoke koncentracije Ni mogu uticati na funkciju F-aktina, dovodeći do bubrenja membrane, kondenzacije F-aktina i smrti nekrozom. Ovi nalazi su u skladu sa morfologijom DC kultivisanih na kontrolnim NiTi pločicama. Obzirom da NiTi RS trake ne oslobađaju velike koncentracije Ni, promene u morfologiji DC najverovatnije nisu uzrokovane direktnim uticajem jona Ni na citoskelet, već kao posledica programiranih promena koje se odvijaju tokom sazrevanja DC.

5.1.4. Funkcionalne osobine DC kultivisanih u prisustvu NiTi RS traka

Ključan rezultat u ovoj studiji je da NiTi RS trake indukuju tolerogene osobine DC. Naime, DC kultivisane sa NiTi RS trakama imaju povećan kapacitet za indukciju tolerogenih citokina (IL-10 i TGF- β) od strane alogenih CD4⁺T ćelija. Ovo je u korelaciji sa povećanjem produkcije IL-10 i IL-27 od strane DC kultivisanih na NiTi RS trakama. Većina efekata IL-10 i IL-27 na citokinsku mrežu se može objasniti na osnovu poznatih imunoloških dejstava ovih citokina (**Slika 5.1.4.1**). Naime, IL-27 je uključen u inicijaciju Th1 odgovora, inhibiciju IL-17 i povećanje produkcije IL-10 od strane različitih T ćelijskih tipova kod miševa i ljudi [624]. Sa druge strane, IL-10 stimuliše diferencijaciju IL-10 sekretujućih Treg, a time i sopstvenu produkciju pozitivnom povratnom spregom, indukuje supresiju proliferacije T ćelija i smanjenje inflamaciju [625]. U skladu s tim, naši rezultati su pokazali da DC koje proizvode IL-10 i IL-27 stimulišu produkciju IL-10 i TGF- β , a snažno inhibiraju produkciju IL-17 i IL-8 u kokulturi sa CD4⁺T ćelijama. U skladu sa tim, alostimulatorna sposobnost DC u ovim kulturama nije stimulirana kontaktom sa NiTi RS trakama, i pored fenotipske maturacije ovih ćelije, najverovatnije usled povećane koncentracije tolerogenih citokina u ovoj mikrosredini. DC nakon kontakta sa NiTi RS trakama indukuju tolerogenu sredinu u kokulturi sa CD4⁺T ćelijama. Međutim, u istim kokulturama CD4⁺T ćelija i DC kultivisanih na NiTi RS trakama, uočeno je povećanje produkcije IL-6. Za ovaj citokin je pokazano da ima i proinflamacijske i antiinflamacijske efekte [626]. Izvori IL-6 u kulturi mogu biti i Th2 ćelije i DC [626]. Međutim, CD4⁺T ćelije, posebno Th2 limfociti, su najverovatnije dominantni proizvođači IL-6. Drugi citokini detektovani u kokulturi takođe potiču od CD4⁺T ćelija, obzirom da je broj DC u ovim kulturama bio veoma mali. Osim niske koncentracije IL-8 (do 100 pg/ml), ni jedan od ispitivanih citokina nije detektovan u kontrolnim supernatantima gde su DC kultivisane bez CD4⁺T ćelija (podaci nisu prikazani). Funkcionalni značaj ovog fenomena nije jasan. Međutim, pošto IL-6 ima ključnu ulogu u zarastanju rana, kako je pokazano na modelu ekscizije kože kod IL-6 „knock-out“ životinja u odnosu na miševu divljeg soja [627], može se pretpostaviti da bi ovaj citokin imao korisne efekte nakon implantacije NiTi RS traka.

Jedini autori koji su, pored nas opisali tolerogene osobine SMA, su Lifeng i sar. [619] koji su pokazali da biokompatibilne TiN-obložene NiTi SMA, za razliku od neobloženih NiTi SMA, indukuju ekspresiju IL-10 kod HUVEC ćelija. Međutim, osim detektovane promene u ekspresiji određenih gena, nisu dalje proučavani imunski aspekti tog nalaza u cilju objašnjenja njegove moguće implikacije. Imajući na umu da nezrele DC imaju tolerogene osobine, ključna osobina NiTi RS traka je pojačanje ove tolerogenosti. Takav nalaz može imati važne kliničke reperkusije za očuvanje i pojačanje tolerance prema ugrađenom uređaju na bazi NiTi SMA, kao i prema sopstvenim antigenima [628]. Međutim, potrebna su i dalja *in vivo* ispitivanja implantiranih NiTi RS traka u cilju potvrde jednog takvog efekta.



Slika 5.1.4.1. Pretpostavka o interakciji citokina u kokulturi DC tretiranih NiTi RS trakama i CD4 T limfocita.

Nezrele DC aktivirane NiTi RS trakama povećavaju produkciju IL-10 i IL-27, što može indukovati diferencijaciju Treg u kokulturi sa CD4 T ćelijama, a što je bilo praćeno povećanom produkcijom IL-10 i TGF- β . Ovi citokini dodatno indukuju nastanak novih Treg, čime povećavaju i sopstvenu produkciju. Sa druge strane, ovi citokini su najverovatnije uključeni u supresiju produkcije proinlamsijskih citokina, kao što su IL-8 i IL-17, i razvoja Th1 podtipa T ćelija. Inhibicija Th17 ćelija, može biti i direktna posledica dejstva IL-27 koje proizvode nezrele DC. Povećana produkcija IL-6 može biti posledica inhibirane diferencijacije Th1 ćelija od strane Treg, a poznato je da ovo stanje stimuliše razvoj Th2 ćelija. LPS koji

deluje preko TLR4, i indukuje sazrevanje DC, stimuliše produkciju IL-12 od strane zrelih DC u prisustvu NiTi RS traka, a ovo najverovatnije direktno indukuje diferencijaciju IFN- γ -produkujućih Th1 ćelija u kokulturi. IFN- γ stimuliše i dalje diferencijaciju Th1 ćelija pozitivnom povratnom spregom, a inhibira razvoj ostalih tipova Th, uključujući Th1, Th17 i Treg. Osim toga, smanjenje produkcije IL-23 od strane DC smanjuje podržavajuću funkciju ovog citokina u razvoju Th17 ćelija i produkciji IL-17. Ono što ostaje nejasno je, od čega zavisi produkcija IL-6 u ovim kulturama. Povećana produkcija IL-6 bi mogla biti posledica specifično regulisanog podtipa Th2 ćelija, ili su njegov izvor druge Th ćelije koje nisu suprimirane pod dejstvom IFN- γ .

5.1.5. Fenotipske i funkcionalne osobine DC aktiviranih LPS-om u kulturi sa NiTi RS trakama

Detekcijom opasnog signala, PAMP ili DAMP, DC sazrevaju i migriraju u regionalne limfne čvorove, gde aktiviraju antigen-specifične T ćelije i pokreću odgovarajući imunski odgovor [112]. Stoga je sledeći cilj bio provera da li NiTi RS trake imaju slične tolerogene osobine i u prisustvu LPS-a, poznatog PAMP-a [112]. U cilju boljeg razumevanja efekta NiTi RS traka na ovom modelu, treba jasno sagledati kakve efekte ima sam LPS. LPS aktivira TLR-4 na DC, i aktivira MyD88-zavisni i TRIF-zavisni signalni put. Ovo rezultuje aktivacijom NF- κ B, AP-1, IRF3 i IRF-5 transkripcione faktore koji dovode do povećanja ekspresije MHC i kostimulatornih molekula, proinflamacijskih citokina i gena koji odgovaraju na interferon [629]. Kao što je bilo i očekivano, LPS indukuje snažnu maturaciju DC, obzirom da je uočeno povećanje HLA-DR, CD40, CD86 i CD83 molekula. Osim toga, LPS stimuliše produkciju IL-12, IL-23 i IL-27 u odnosu na kontrolne nezrele DC. Kao posledica toga, uočeno je povećanje nivoa proinflamacijskih citokina od strane CD4⁺T ćelija u kokulturi, karakterističnih za Th1 i Th17 citokinski odgovor.

Najinteresantnije je to što su DC tretirane LPS-om u prisustvu NiTi RS traka imale još snažniji Th1 polarizacioni kapacitet u poređenju sa kontrolnim ćelijama kultivisanih samo u prisustvu LPS-a. Naime, nađeno je povećanje produkcije IL-12, smanjenje produkcije IL-23, a nije bilo promene u produkciji IL-27 od strane ovih DC. Pomenuti citokini spadaju u IL-12 familiju, gde IL-12p70 (p35/p40) stimuliše INF- γ od strane T

ćelija [630], IL-23 (p19/p40) stimuliše IL-17 [631], a IL-27 (p28/EBI3) stimuliše IFN- γ i IL-10 od strane T ćelije, a istovremeno inhibira produkciju IL-17 [624]. Povećanje IL-12, u našoj studiji, je bilo povezano sa povećanjem produkcije IFN- γ , dok je smanjenje produkcije IL-23 povezano sa smanjenjem produkcije IL-17. IL-23 ima značajnu ulogu u proliferaciji Th17 ćelija i stabilizaciji transkripcionih faktora koji su uključeni u razvoj Th17 ćelija (STAT3, ROR γ t, i ROR α). Th17 ćelije proizvode IL-17, IL-17F i IL-22, čime indukuju snažnu i obimnu tkivnu reakciju zahvaljujući širokoj distribuciji receptora za IL-17 i IL-22 [632]. U skladu sa tim, smanjenje produkcije IL-17 indukovanih od strane nezrelih i LPS stimuliranih DC, predstavljaju važan antiinflamacijski mehanizam koji se može indukovati nakon implantacije NiTi RS traka. Mikrosredina sa povećanom koncentracijom IL-12 i IFN- γ je najverovatnije uzrokovala smanjenje produkcije Th2 i Treg citokina (IL-4 i IL-10) u kokulturama. Naime pokazano je da IL-12 i IFN- γ preko Tbet inhibira GATA-3-zavisnu diferencijaciju i proliferaciju Th2 ćelija [633]. Osim toga, IFN- γ inhibira ERK- i p38-zavisnu produkciju IL-10 od strane makrofaga i DC, kao i TLR-indukovanu produkciju IL-10, time što antagonizuje PI3K-AKT signalni put [634]. Obzirom da nivo IL-27 nije značajnije promenjen, može se pretpostaviti da je njegov efekat na Th1/Th17 polarizaciju manji u poređenju sa efektom IL-12 i IL-23. Povećana alostimulatorna sposobnost DC pri 1:40 DC/CD4⁺ odnosu može biti posledica povećanog Th1 citokinskog miljea koji je uzrokovao smanjenje anti-proliferativnih citokina kao što je IL-10, a pri tome povećao ekspresiju kostimulatornih molekula. Kao što je ranije pomenuto, povećana produkcija IL-6 koja je detektovana i u kulturama CD4⁺T ćelija i LPS-stimuliranih DC, može imati značajne kliničke efekte na zarastanje rana i angiogenezu [626]. Međutim, u inflamacijskim uslovima, DC mogu biti dodatno aktivirane usled kontakta sa NiTi implantatima, što može dovesti do nepoželjnih efekata ili autoimunskog odgovora. Stoga je neophodno detaljnije proučiti efekte NiTi RS traka u inflamacijskim stanjima.

5.3.4 Mikrostruktura NiTi RS traka

Ranije smo opisali proces brzog otvrdnjavanja valjanjem otopine, kao i uticaj ovog procesa na mikrostrukturu i SME karakteristike NiTi legura [12, 635]. Obzirom da je površina legure ključni faktor koji određuje ishod interakcije materijala sa ćelijama [267], u ovoj studiji smo po prvi put ispitivali površinsku strukturu NiTi RS SMA u cilju boljeg razumevanja njihovog biološkog efekta. U našim ispitivanjima je pokazano da je površina NiTi RS traka relativno glatka sa nekoliko mestimičnih izbočina. Međutim AES spektroskopija nije ukazala na značajne razlike između hemijske strukture površine izbočina i površine ravnih delova, ukazujući na to da su izbočine lokalizovane ispod površinskog sloja, i najverovatnije potiču od metastabilnih procesa tokom otvrdnjavanja valjanjem otopine [636, 637].

U ovom radu je pokazano da je površina NiTi RS traka prekrivena tankim gustim Ti-oksidsnim filmom koji je u najvećoj meri sastavljena iz TiO_2 faza. Međutim, mala koncentracija Ni i Ti u intermetalnom stanju na površini može uticati na korozivnu stabilnost ovih traka tokom vremena. Stoga treba razmotriti i dodatne procedure obrade kao što je oblaganje (Ti, O, N)/Ti [638] ili TiN [619], kao i oksidacione procedure sa H_2O_2 [639], ili anodizacija ovih NiTi legura [566]. U cilju dobijanja boljeg sloja Ti-oksida na površini NiTi su uvedene brojne metode obrade kao što je hemijsko nagrizanje i sterilizacija u autoklavu [267]. Uočeno je da neke procedure značajno poboljšavaju odnos Ti/Ni na površini i smanjuju procenat slobodnog Ni [640, 641].

Ranije analize površine NiTi pomoću XPS-a [286, 550, 640] i Auger spektroskopije [287] su pokazale da se površina nitinola sastoji uglavnom od kiseonika (27-50%) i ugljenika (25-69%), dok su Ti (2-22%) i Ni (0-6%) prisutni u značajno manjem procentu. Kiseonik je uglavnom vezan za metale na površini u obliku oksida, dok je ugljenik čest kontaminant koji potiče iz atmosfere ili rastvora koji se koriste obradi [640]. Ovi rezultati su u skladu sa našim rezultatima dobijenim mikrostrukturnom analizom NiTi RS traka. Uzimajući u obzir da se Ni-oksidi može lako zameniti Cl^- jonima iz ekstraćelijske sredine posredstvom Ni-OH intermedijernih stanja [642], treba istaći da na površini NiTi RS traka

nije detektovan Ni-oksidi. Procenjena debljina Ti-oksidge sloja je iznosila 12nm, što je u skladu sa drugim podacima koji pokazuju da je oksidni sloj Ti između 7 i 70nm u zavisnosti od tretmana površine [276]. Međutim, gustina i struktura Ti-oksidge su mnogo važniji od njegove debljine. U skladu sa ovim, nekoliko radova je ukazalo na to da homogen gladak sloj Ti-oksidge pruža bolju rezistenciju na koroziju nego deblji sloj nativnih uzoraka [287, 616]. Osim toga, izlaganje NiTi SMA biološkim rastvorima utične značajno na njihovu površinu [286, 287]. Pokazali smo da se debljina oksidge sloja povećava nakon kondicioniranja u medijumu, pri čemu se donja granica oksidge sloja pomera do 10nm u dubinu, u poređenju sa nekondicioniranim NiTi RS trakama.

U skladu sa ranijim podacima [286, 287], kao i našim prethodnim rezultatima [268], detektovan je porast oksidge sloja na NiTi RS trakama, zajedno sa 6 nm depozicionim slojem. Kinetika rasta oksidge sloja na NiTi legurama u velikoj meri zavisi od mikrostrukture te legure, temperature i okolnog medijuma. Zadebljanje oksidge sloja se odvija po modelu adsorpcije kiseonika na površini NiTi legura gde se odvija reakcija između Ti^{4+} i O_2 , pri čemu se formira TiO_2 [643]. Tokom rane faze oksidge, stvaranje TiO_2 primarno doprinosi debljini sloja, pa je rast oksidge sloja relativno brz. Međutim, dominantna oksidge Ti, stvara zonu bogatu Ni na prelazu između Ti-Ni TiO_2 sloja. Formiranje Ni_3-Ti sloja povećava efektivnu distancu za slobodni Ti pa se oksidge kinetika usporava. Biološke tečnosti predstavljaju jake korozivne agense gde joni Cl^- mogu uzrokovati formiranje korozivnih jamica na površini NiTi implantata [644]. Korozija otpočinje na mestima površinskih defekata na tankom oksidge sloju, što dovodi do oslobađanja Ni. Preostali Ti reaguje sa kiseonikom iz rastvora i formira Ti-oksidi oko jamice i inicira rast oksidge sloja, i njegovu propagaciju duž čitave površine NiTi. Debljina sloja kiseonika se ne povećava linearno tokom vremena, već se smanjuje sa napredovanjem korozije, ukazujući na to da formirani Ti-oksidi može sprečiti dalju koroziju NiTi SMA u rastvoru NaCl [282]. Prema našim saznanjima, kinetika formiranja Ti-oksidge sloja u medijumu za ćelijske kulture do sada nije ispitivana. Na osnovu objavljenih studija o koroziji i rasta oksidge sloja na NiTi legurama u NaCl rastvoru, može se očekivati manja kinetika rasta oksidge sloja na NiTi RS trakama usled prisustva

serumskih proteina u medijumu. Istovremeno, proteini mogu zaštititi površinu NiTi RS traka od direktnog napada Cl^- jona

Jedno od najvažnijih pitanja na koje treba odgovoriti pre potencijalne primene NiTi RS traka je stabilnost oksidnog sloja u dinamičkim uslovima kulture. Naime ciklične promene NiTi mogu dovesti do pucanja TiO_2 i time do oslobađanja Ni jona. Drugim rečima, keramička priroda TiO_2 nije kompatibilna sa superelastičnim svojstvima NiTi legura, ili cikličnim pulsiranjem krvnih sudova [645]. Oksidni sloj je vrlo krut i lomljiv pod dejstvom stresa. Osim toga, što je deblji sloj, veća je tendencija da se formiraju pukotine. Razlog tome je što se keramičke strukture drže međusobno kovalentnim i jonskim vezama, koje mogu da se prekinu usled plastične deformacije [645]. Nekoliko radova je pokazalo da pseudoelastične NiTi SMA podnose deformaciju 0.6-3% nakon čega se razvijaju pukotine u debelom sloju TiO_2 , čime se faza bogata Ni izlaže okolnoj sredini, povećava se oslobađanje Ni jona [646, 647]. Sa druge strane, Kimura i Sohmura [648] su pokazali da je tanak oksidni sloj Ti bolji za očuvanje integriteta površinskog sloja i rezistencije na velike deformacije uzrokovane cikličnim promenama oblika SMA. Habijan i sar. [615] su nedavno pokazali da NiTi sa elektro-poliranom površinom imaju gust i nekoliko nm debeo sloj oksida, pri čemu oslobađaju malu količinu Ni (do 25ppm) bilo u statičkim ili dinamičkim uslovima, čak i nakon 7 dana kondicioniranja. Ovaj nalaz je ukazao na to da mali mehanički pritisci, nemaju dodatan efekat na otpuštanje Ni sa NiTi legura. Ovi autori su takođe zaključili da, obzirom da je sloj Ti-oksida vrlo krut, verovatnije je da se tokom kondicioniranja u dinamičkim uslovima kulture iznova regeneriše sloj Ti-oksida. U skladu sa tim, može se očekivati slično ponašanje NiTi RS traka, obzirom da je tokom kondicioniranja Ti-oksidni sloj je i dalje bio tanak.

Prisustvo deponovanih elemenata kao što su P i Cl nakon kondicioniranja je očekivano, obzirom da RPMI medijum sadrži visoku koncentraciju ovih elemenata. Međutim RPMI medijum ne sadrži jone Zn, pa se može pretpostaviti da je Zn poreklom od FCS. Messer i sar. [649] su još ranije pokazali da je koncentracija Zn u FCS oko 2.8 ppm. Obzirom da smo mi našli značajno veću koncentraciju ovog jona na površini NiTi RS traka, moguće je da je Zn apsorbovao iz medijuma za kulture na TiO_2 u procesu koji je detaljno

proučavan od strane Hasany i sar. [650]. Na pH7, Zn se nalazi dominantno u Zn^{3+} stanju (99.33%), što dovodi do njegove adsorpcije za negativno naelektrisanu površinu TiO_2 . Ovaj nalaz je vrlo interesantan, obzirom da Zn može imati različite biološke efekte u zavisnosti od koncentracije [651].

Pokazali smo da se Ti ne oslobađa sa površine legura u medijum za kulture, najverovatnije usled toga što brzo oksiduje i time gradi protektivan TiO_2 sloj. U tom kontekstu, poboljšana biokompatibilnost usled ovog biološki inertnog sloja je jedan od razloga za široku biomedicinsku primenu implantata na bazi Ti [266]. Kontrolne NiTi ploče su oslobađale do 120 mg/l Ni, a ova koncentracija je bila 50% manja od koncentracije Ni oslobođenog sa čistih Ni pločica. Najverovatnije objašnjenje za ovaj fenomen je da Ti ima mnogo veći afinitet za reakciju sa O u poređenju sa Ni, što dovodi do formiranja nerastvornog TiO_2 sloja koji deluje kao barijera za dalje oslobađanje Ni. Sa druge strane, kristalna rešetka NiTi ispoljava jake atomske vezivne sile koje su na prelazu između kovalentne i metalne veze, što znači da atomi teško napuštaju ovu kristalnu rešetku [266]. Za razliku od kontrolnih NiTi pločica, NiTi RS trake ne oslobađaju značajnu količinu Ni (20 μ g/l). Ova koncentracija Ni je mnogo manja od one koju je Svetska zdravstvena organizacija propisala u vodiču za dnevni unos Ni hranom (82-406 μ g/l), i odgovara koncentracijama Ni u pijaćoj vodi ili koncentraciji u ukupnoj krvi i plazmi zdravih osoba (5-25 μ g/l) [266]. Mikrostrukturalna analiza stoga ukazuje da je struktura površinskog sloja Ti-oksida na legurama dobijenim valjanjem otopina verovatno najvažniji faktor koji potpuno sprečava oslobađanje Ni sa površine NiTi RS traka.

5.3.5 Potencijalni mehanizmi delovanja NiTi RS traka i njihova primena

Koji su potencijalni mehanizmi imunomodulatornih delovanja NiTi RS traka? Pokazali smo da DC adheriraju za podlogu NiTi RS traka, što predstavlja važan signal za sazrevanje DC. Integrini su u velikoj meri uključeni u odgovoru ćelija na TiN-obložene NiTi SMA [619] i druge biomaterijale [652]. Stoga bi interesantno bilo ispitati koja je uloga integrina u odgovoru DC na NiTi RS trake. Međutim, drugi faktori, kao što su Ti i

Ni na površini NiTi RS traka, takođe mogu biti uključeni u ovaj proces. Ti joni, na primer, modifikuju značajno osobine DC povećavajući alostimulatorne sposobnosti i polarizaciju imunskog odgovora u pravu Th1 [653]. Pokazano je da Ni indukuje fosforilaciju ERK, JNK, i p38, čime se reguliše sazrevanje i ekspresija CD83, CD86, CCR7 i produkcija IL-12 od strane DC [654]. Nedavno je pokazano da Ni joni smanjuju ekspresiju Trim23 gena [618] koji predstavlja regulator NEMO [655], što može biti osnova za tolerogene funkcije NiTi RS traka. Iako u kondicioniranom medijumu ima vrlo malo ovih elemenata, Ni i Ti joni su detektovani sa površini NiTi RS traka, čak i posle kondicioniranja. Moguće je da je lokalna koncentracija dostupnog Ni i Ti na mestima bliskog kontakta između NiTi RS traka i DC veća nego ona koja je nađena u kondicioniranom medijumu, što potencijalno može dovesti do imunomodulatornih efekata.

Interesantan je rezultat da se je na površini NiTi RS traka, koje su kondicionirane u medijumu tokom 2 dana, izmerena veća koncentracija Zn. Zn predstavlja važan signalni molekul u imunskim ćelijama, pogotovo u odgovoru DC na LPS [651]. LPS reguliše ekspresiju različitih transportera za Zn [656] i Kitamura i sar. [657] su pokazali da modulacijski efekti Zn ima ogroman uticaj na DC, pri čemu slobodan Zn inhibira aktivaciju DC. Zn deluje na aktivnost PDE [658] i fosforilaciju IRAK [659], dovodi do smanjenja aktivacije NF- κ B i sekrecije proinflamacijskih citokina stimulisane LPS-om [660]. Obzirom da cAMP može da blokira povećanje ekspresije MHC stimulisane LPS-om [661], stimulacija cAMP od strane Zn može jedan od mehanizama odgovornih za smanjenje HLA-DR na DC kultivisanim na NiTi RS trakama. U svakom slučaju, mehanizmi uočenih efekata NiTi RS traka verovatno zavise od kompleksnog sinergističkog delovanja površinske mikrostrukture, Ni, Ti i Zn jona u dinamičkim uslovima kulture.

U odnosu na ove rezultate, postavlja se pitanje primene ovih materijala u medicini. NiTi legure predstavljaju revolucionarno sredstvo za unapređivanje kvaliteta dijagnostike i terapije [662]. NiTi stentovi ili graftovi se već primenjuju kod terapije vaskularnih aneurizmi ili vaskularnih okluzivnih bolesti uzrokovanih aterosklerozom [663]. Korišćenjem NiTi SMA u terapiji ovih oboljenja se može proširiti aterosklerotični krvni sud ili premostiti aneurizma krvnog suda. Studije u kojima je korišćen ovakav stent kod

životinja i ljudi [664, 665] su zaključile da NiTi stentovi vrše konstantan pritisak na zidove suda nakon ugrađivanja. Ovaj proces je veoma važan za prevenciju restenoze. Tanke NiTi legure mnogo bolje odgovaraju ovakvoj namerni, pogotovo ako su krvni sudovi manjeg promera [666].

Imunski sistem je važan faktor inicijacije i progresije aneurizmi i ateroskleroza, pri čemu je uloga DC u ovim procesima veoma važna [667, 668]. DC u aterosklerotskim plakovima i zidovima aneurizmi potiču od prekursora DC, monocita periferne krvi, koje se diferenciraju u DC nakon transmigracije [112]. Još uvek nije potpuno rasvetljena uloga imunskih mehanizama u razvoju ovih oboljenja. Iako postoje kontradiktorni rezultati u vezi Th ćelijskog tipa odgovornog za patogenezu ateroskleroze i aneurizme, izgleda da je Th1 odgovor važan za razvoj ateroskleroze, dok je imunopatologija i progresija aneurizme posredovana Th2 ćelijama [605-607]. Za razliku od toga, pretpostavlja se da Th17 ćelije potenciraju proinflamacijski odgovor u aterosklerozi ali postoje i kontradiktorni rezultati. Nedavno su Madhur i sar. [669] pokazali na mišijem modelu da IL-17 potencira ateroskleroza, ali da štiti aneurizmu od pucanja. Stoga možemo reći da protolerogena sredina može biti od koristi u terapiji i aneurizme i ateroskleroze. Tolerogene osobine NiTi RS traka u fiziološkim uslovima mogu sprečiti progresiju bolesti. Međutim, njihova primena može biti dovedena u pitanje ukoliko je bolest praćena prejakom inflamacijom. Naime, pokazali smo da DC tretirani LPS-om nakon kontakta sa NiTi RS trakama stimulišu Th1 i smanjuju Th2 i Th17 odgovor. Stoga bi NiTi RS trake mogle pogoršati stanje u kojoj preovlađuje Th1 imunopatologija. Međutim, ako je patologija posredovana sa Th17 ili Th2 citokinima, NiTi RS trake bi mogle ispoljiti antiinflamacijske efekte, pored mehaničkog doprinosa u popravci oštećenja. Druga potencijala primena NiTi RS traka je u izgradnji mikroprekidača i mikro-elektro-mehaničkih sistema. Što je SMA tanja, manja je i količina energije koja je potrebna da se ona zagreje i ohladi, što znači i da ona brže odgovara na određene stimulse. Pored dobrih mehaničkih osobina koje NiTi RS trake već poseduju [670], njihova tolerogenost može biti prednost ako se ovi uređaji implantiraju u organizam.

Senzibilizacija na Ni je povezana sa ispoljavanjem kompleksa Ni-hapten na MHC molekulima DC, pri čemu je hapten često autoantigen [334]. Kompleks Ni-protein

stimuliše ekspresiju kostimulatornih molekula (CD80, CD86 i CD40) i hemokinskog receptora CCR7 na DC [671]. Međutim, do nedavno nije bilo poznato zašto Ni-protein aktivira DC, ali ne može indukovati senzibilizaciju DC miševa bez dodatne aktivacije sa adjuvansom [338]. Schmidt i sar. [339] su nedavno pokazali da humane, ali ne i mišije, TLR prepoznaju kompleks Ni-proteina. Međutim, nije jasno zašto su samo pojedine osobe alergične na Ni. Opisani su ozbiljni nepoželjni efekti, kao što je tromboza, sistemska inflamacija i iznenadna smrt [333], kod nekih pacijenata sa implantatima od NiTi, što se može objasniti njihovom preosetljivošću na Ni. Smanjeno oslobađanje Ni sa NiTi SMA bi moglo ublažiti senzibilizaciju na NiTi. U tom kontekstu, NiTi RS trake oslobađanju Ni u zanemarljivoj količini, a njihov tolerogeni efekat na nezrele DC se može smatrati kao poželjan u implantologiji. Međutim, potrebno je ispitati i da li bi DC iz osoba koje su osetljive na Ni, mogle biti senzibilisane NiTi RS trakama.

Ispitivanje citokompatibilnosti je preduslov da se bilo koji materijal namenjen za implantaciju primeni *in vivo* [672]. Međutim čak i materijali koji se pokazu kao biokompatibilni *in vivo* mogu imati nepoželjne hronične efekte, koji se uglavnom odnose na aktivaciju imunskog sistema. Naša kompleksna studija o biokompatibilnosti i imunobiologiji DC, kao ključnih ćelija koje iniciraju i regulišu imunski odgovor, ukazuje na to da citokompatibilne NiTi RS trake mogu imati korisne, ali i neke neželjene efekte kod primene *in vivo*. Aplikacija NiTi RS traka kao stentova za vaskularne okluzivne bolesti može biti korisna kod pacijenata, usled njihovog potencijalnog tolerogenog efekta. Obično se DC ili njihovi prekursori u krvi se nalaze u nezrelom stanju [134] i poseduju tolerogene osobine [673]. Stoga bi kontakt nezrelih DC sa NiTi RS trakama mogao povećati tolerogenost ovih ćelija. DC koje bi bile u interakciji sa NiTi RS trakama, a nakon toga aktivirane proinflamacijskim citokinima u aterosklerotskoj leziji, mogle bi da zadrže tolerogeni potencijal. Naime, pokazano je da i drugi faktori, kao što su oksidovani fosfolipidi (dobro poznati proaterogeni faktor), sprečavaju sazrevanje i imunostimulatorni kapacitet DC [674]. Sa druge strane, NiTi RS trake bi mogle aktivirati DC tokom infekcije i dovesti do pojačanja inflamacijskog odgovora, što bi u tom slučaju imalo negativne posledice po pacijenta. Da bi se doneo odgovarajući zaključak o sigurnosti NiTi RS traka

kao bioimplantata, neophodno je još ispitivanja. Ove studije bi trebalo prvo da budu izvođene na životinjama. U nekoliko poslednjih godina je razvoj inbrednih i transgenih sojeva miševa i zečeva pružio značajan uvid u genetičke i imunološke osnove mnogih bolesti [604, 605, 675, 676]. Međutim, ateroskleroza i razvoj aneurizme, koji se inače tretiraju stentovima, nisu prirodne bolesti kod glodara, te se indukuju eksperimentalno na različite načine. Stoga, iako su eksperimentalni animalni modeli nezamenjivi u studijama koji ispituju mehanizme vaskularnih bolesti, postoje brojna ograničenja koja se moraju uzeti u obzir. Usled nepristupačnosti koronarnih, karotidnih i cerebralnih arterija, koji su najčešće zahvaćeni vaskularnim okluzivnim bolestima, studije na miševima se uglavnom fokusiraju na aorte i velike krvne sudove. Struktura i hidrodinamika ovih manjih mišićnih arterija, a čak i embrionalno poreklo njihovih mišićnih ćelija, se značajno razlikuje od velikih elastičnih arterija koje ne najčešće koriste u studijama na miševima [605, 677]. Osim toga, imunski sistem miša se značajno razlikuje od imunskog sistema ljudi. Poznato je da su rezidentne i inflamacijske DC, kao i druge komponente imunskog sistema miševa, drugačije nego kod ljudi [101, 605]. Stoga bi osim *in vivo* studija na miševima trebalo uraditi i komparativne *in vitro* studije na mišijim DC. Osim toga, ukoliko NiTi RS trake i ispune kriterijum koji je neophodan za njihovu bezbednu aplikaciju kod ljudi, dugoročne kliničke studije će jasnije pokazati imunološke efekte primene ovih biomaterijala.

5.2. BOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULATORNE OSOBINE NANOČESTICA ZLATA

Nanomaterijali na bazi GNP su vrlo atraktivni u medicini kao sistemi za dostavu lekova i biomolekula u ciljanoj ćelijskoj terapiji [405, 410-423], kontrastni agensi u dijagnostičkim procedurama [377], i u fototermalnoj terapiji tumora [386, 387]. Za primenu GNP u dijagnostici i fototermalnoj terapiji se očekuju posebne fizičko-hemijske karakteristike GNP, pre svega specifična površinska plazmon rezonanca, od koje zavise optičke osobine GNP. Pored toga, za svaku od navedenih primena GNP se očekuje njihova drugačija biokompatibilnost. Za ciljanu dostavu lekova u tumor, fotototermalnu terapiju i

dijagnostiku tumora je korisno ako GNP izazivaju citotoksičnost samo ovih ćelija. Sa druge strane, u oslikavanju bioloških struktura se ne očekuje citotoksični efekat GNP. Biokompatibilnost GNP zavisi od njenih fizičko-hemijskih karakteristika, ali i od njihove veličine. Iako je zlato inertno za biološke sisteme [567], pokazano je da nanočestice od čistog zlata mogu interagovati sa različitim ćelijskim komponentama i indukovati različite biološke efekte, od toksičnog [568] do imunomodulatornog efekta [569]. Loša biokompatibilnost GNP može posledica i citotoksičnih redukujućih/stabilizirajućih agenasa koji se koriste pri njihovoj sintezi [570], zbog čega se konstantno razvijaju nove metode sinteze GNP. U ovom radu je po prvi put korišćena ultrasonična sprej piroliza (USP) za sintezu GNP iz recikliranog zlatnog nakita, u kojoj je H₂ korišćen kao redukujući agens (**odeljak 1.6.2.4 i 3.3.1**). Pokazali smo da je ovom metodom moguće sintetisati GNP različitih veličina i oblika (nanosfere, nanoštapići, nanotrouglovi, nanokocke, nanodiskovi) [11], od kojih je svaki vrlo interesantan za oslikavanje ćelijskih struktura. Obzirom da biokompatibilnost ovakvih nanočestica nije poznata, cilj ovog rada je bio da se ispita biokompatibilnost i imunomodulacijske osobine GNP dobijenih USP metodom, u odnosu na njihove mikrostrukturne karakteristike.

5.2.1. Mikrostrukturna analiza frakcija nanočestica zlata dobijenih USP metodom

Pokazali smo da USP predstavlja inovativnu tehnologiju koja se može koristiti za sintezu GNP, čak i od recikliranog zlatnog nakita. EDX analiza ovih GNP je pokazala da su neke frakcije GNP kontaminirane legirajućim elementima. Frakcije od čistog zlata (1 i 2) su uglavnom bile sferične i produkovane su smanjenjem temperature od 800°C na 300°C. Međutim, oba tipa GNP su bile delimično aglomerirane. Za razliku od njih frakcija 3 je sadržala i sferične i štapičaste nanočestice, ali su čestice bile značajno manje aglomerirane nego u frakcijama 1 i 2. Ova razlika u aglomeraciji je najverovatnije posledica različite temperature na kojoj je vršena termalna dekompozicija/atomizacija primarnog rastvora recikliranog metalnog nakita (800°C za frakciju 3 a 300°C za frakciju 1 i 2). Ovo ukazuje

da USP može služiti i za generisanje štapićastih GNP, pored sferičnih, što može naći primenu u biomedicini [678]. Treguer-Delapierre i sar. [679] su pokazali da štapićaste GNP poseduju dve različite plazmon rezonance. Dve površinske plazmon rezonance nastaju usled oscilacije elektrona popreko i uzduž longitudinalne ose nanoštapića, a nazivaju se transversalna i longitudinalna plazmon rezonanca. Transverzalna površinska plazmon rezonanca ne zavisi od odnosa dužine i širine, i ista je kao plazmon rezonanca sferičnih GNP. Longitudinalna površinska plazmon rezonanca se povećava sa povećavanjem odnosa dužine i širine nanoštapića [346]. Tako je na primer uočeno da rezonantni pomeraj od oko 100 nm nastaje ako se odnos širine i dužine nanoštapića promeni za jedan [679]. Moderne metode izračunavanja površinske plazmon rezonance, bazirane na Mie-ovoj teoriji, pokazuju da longitudinalna plazmon rezonanca nanoštapića zlata ima maksimuma apsorpcije pri većem intenzitetu i talasnoj dužini, kako se povećava odnos dužine i širine nanočestica [346, 348]. U frakciji 4 su detektovani najrazličitiji oblici nanočestica, uključujući nanoštapiće, nanodiskove i nanotrouglove. Trouglaste nanočestice se mogu sintetisati fotohemijskim i hemijskim metodama [347], a optičke osobine ovih nanočestica u velikoj meri zavise od geometrije njihovih uglova i ivica. Skraćivanje ivica izaziva pomeraj površinske plazmon rezonance ka plavom spektru [346-348]. Diskovi takođe pokazuju zavisnost plazmon rezonance od odnosa veličina koje ga definišu [349]. Za razliku od toga, frakcija 5 je sadržala isključivo sferične nanočestice. U frakciji 4 i 5 su pronađeni brojni legirajući elementi. Na primer, frakcija 4 je pored Au sadržala i Ag, dok je frakcija 5 sadržala Ni, Zn i Cu, od koji svi imaju citotoksične efekte [680]. Frakcije 4 i 5 su formirane u boci sa vodom i alkoholom, a metalni joni detektovani u njihovom sastavu najverovatnije potiču iz interakcije zlata sa hloridima i nitratima u primarnom rastvoru, ili od mikrolegirajućih elemenata u sekundarnom zlatu.

Pokazano je da USP omogućava promenu veličine nanočestica promenom ultrasonične frekvencije. Naime, frakcije 1 i 2 su sintetisane na sličan način (300°C) i sakupljene sa zidova reakcione cevi, a korišćena je i ista koncentracija primarne reakcione smeše. Stoga se može zaključiti da je razlika nastala isključivo korišćenjem različitih ultrasoničnih frekvencija (0.8 MHz za frakciju 1 i 2.5 MHz za frakciju 2), pri čemu veća

frekvencija indukuje manju veličinu dispergovanih kapljica u atomizeru [554, 681]. Razlike između očekivane i dobijene veličine nanočestica ove dve frakcije mogu nastati usled razlika u površinskim tenzijama i gustinama vodenih rastvora, mikroporoznosti nanočestica, a pogotovo aglomeracijom kapljica aerosoli usled brzog protoka nosećeg gasa, tj. efekta turbulencije. Osim toga, uticaj temperature na srednji dijametar nanočestica nije uzet u obzir pri računanju. U cilju smanjivanja razlike između izračunate i dobijene veličine GNP, veličinu kapljica treba meriti metodom laserske difrakcije. Prisustvo nanoštapića i diskova u frakciji 4 je prilično interesantan novi nalaz, ali dodatno otežava računanje veličine nanočestica.

5.2.2 Citotoksičnost frakcija GNP na modelu timocita pacova i L929 ćelija

U testovima citotoksičnosti frakcija GNP su korišćena dva tipa ciljnih ćelija: L929 fibroblasti i timociti pacova. L929 ćelije su predložene od strane ISO standarda kao prvi test biokompatibilnosti biomaterijala [682]. U ranijim studijama smo pokazali da su timociti pacova osetljiviji u testovima citotoksičnosti različitih legura i oslobađanja jona metala u kondicionirani medijum [567, 683]. Frakcije 1 i 2 nisu izazivale direktnu citotoksičnost pacovskih timocita, ali su visoke koncentracije (100 µg/ml) smanjile proliferativnu aktivnost L929 ćelija. Odsustvo toksičnog efekta čistih GNP može se objasniti činjenicom da ove ćelije ne internalizuju GNP, i da se Au ne oslobađa sa partikula u medijum za kulture [567].

Za razliku od toga, L929 ćelije imaju sposobnost fagocitoze [555], i inhibitorni efekat GNP na metaboličku aktivnost ovih ćelija nakon produžene kultivacije (3 dana) je najverovatnije posledica manjeg broja ovih ćelija u kulturi usled njihove smanjenje proliferacije. Razlog tome može biti interferencija signalnih puteva uključenih u regulaciju proliferacije od strane internalizovanih GNP. Ova hipoteza je zasnovana na drugim studijama koje su pokazale da internalizovane GNP nisu citotoksične za fibroblaste, ali da redukuju njihovu proliferativnu sposobnost tako što povećavaju oksidativni stres ovih ćelija

[684], ili utiču na strukturu citoskeleta [685]. Osim toga, moguće je proliferacija bila modulirana usled uticaja GNP vezanih za membranu L929 ćelija, na međućelijski kontakt.

GNP su prethodnim radovima opisane kao netoksične u *in vitro* i *in vivo* uslovima [570, 686] usled hemijske stabilnosti Au. Međutim, postoje studije koje ukazuju na to da GNP mogu biti citotoksične, pogotovo ako im je hemijskom modifikacijom poboljšana disperzibilnost u vodi. Goodman i sar. [432] su ispitivali toksičnost anjonskih i katjonskih GNP na Cos-1 ćelijama i eritrocitima, pri čemu su Cos-1 ćelije i CV-1 fibroblasti bili transformisani pomoću SV40 virusa. Pokazano je da katjonske partikule, koje su funkcionalizovane kvaternanrim aminima, izazivaju 7 puta veću toksičnost nego anjonske partikule u kojima su amino grupe zamenjene karboksilnim. Connor i sar. [570] su koristili MTT esej za ispitivanje toksičnosti 18nm GNP na K562 ćelijama, pri čemu je površina GNP bila modifikovana sa nekoliko liganada, kao što je citrat, biotin i cetil trimetilamonium bromid (CTAB). GNP modifikovane citratom i biotinom nisu izazivale toksičnost i do 250 μM , dok su CTAB-GNP bile toksične već pri koncentraciji od 0.05 μM . Međutim, ispiranjem ovih nanočestica od CTAB, gubi se ovakav citotoksični efekat. Niidome i sar. [433] su koristili zlatne nanoštapiće i pokazali da CTAB-obloženi nanoštapići imaju visoku citotoksičnost, dok nanoštapići istih dimenzija obloženi sa PEG-SH nemaju toksični efekat ni pri 10 puta većim koncentracijama. Leonov i sar. [687] su u tom smislu pokazali da osim zamene CTAB polistiren sulfonatom, i ispiranje nanoštapića 3 puta, može značajno da smanji toksičnost ovih nanočestica. Poređenjem efekta slobodnog CTAB i drugih stabilizirajućih agenasa je pokazano da je efekat tripud ispiranih nanoštapića sličan efektu 10 μM CTAB. Međutim, problem je što se ispiranjem nanoštapića od CTAB gubi njihova stabilnost i čestice počinju da agregiraju, što je praćeno dodatnim oslobađanjem CTAB u okolni medijum. Slično tome, Alkilany i sar. [688] su pokazali da zamena CTAB sa poliakrilnom kiselinom i polialilamin hidrohloridom značajno smanjuje toksičnost nanoštapića zlata na ćelije humanog kolonorektalnog karcinoma (HT-29). Citotoksičnost drugih tipova nanočestica zlata je takođe ispitivana [689]. GNP dobijene USP metodom nisu stabilizovane ovakvim agensima, što je jedan od razloga odsustva njihovog citotoksičnog efekta, ali razlog njihove aglomeracije u kulturi. Uopšte uzev, niska

toksičnost GNP se može se objasniti niskim kapacitetom L929 ćelija za fagocitozu. Osim toga, GNP frakcije 1 i 2 sadrže aglomerirane čestice, a njihova ultrasonifikacija pre upotrebe nije bila potpuno efikasna u disperziji ovih nanočestica. Takođe, reagregacija u medijumu za ćelijske kulture je vodila formiranju mikronskih čestica, čime je dodatno smanjena fagocitoza. U budućim eksperimentima je neophodno optimizovati disperzibilnost GNP u cilju boljeg razumevanja mehanizama njihove fagocitoze i bioloških efekata.

Pan i sar. [435] su pokazali da GNP koje su stabilizovane derivatima trifenilfosfina, ispoljavaju citotoksičnost na epitelnim ćelijama, tkivnim fibroblastima, makrofagima i melanomskim ćelijama, u zavisnosti o njihove veličine. Nanočestice veličine 1.4 nm su bile toksičnije od većih nanočestica. Suprotno tome, manje čestice zlata, kakve su u Tauredonu koji se koristi za terapiju hroničnih inflamacijskih bolesti [690-692], i čestice zlata veće od 15nm, nisu ispoljavale citotoksičnost. Citotoksičnost GNP može zavistiti i od stepena preuzimanja od strane ćelija, ali i od vrste ćelija koja preuzimaju GNP. Naime, Patra i sar. [693] su pokazali da 33nm GNP nisu toksične za BHK21 ćelije ili HepG2, ali jesu za ćelije humanog hepatocelularnog karcinoma A549. Za razliku od studija u kojima su GNP okarakterisane kao netoksične, Fan i sar. [694] su pokazali da GNP 5, 15 i 30 nm jesu toksične za ćelije kostne srži i humanog hepatokarcinoma (HuH-7). Naime, 15nm i 30nm GNP u koncentraciji do 70 µg/ml, smanjuju metaboličku aktivnost ovih ćelija za 20% izmerenu MTT esejom, dok su 5nm GNP u koncentraciji 30 µg/ml smanjuju vijabilnost ćelija za 40%. Razlog tome je što se manje nanočestice se generalno bolje preuzimaju od većih. Osim toga, manje nanočestice imaju veći odnos površine i zapremine [188, 695]. U skladu sa ovim podacima se može pretpostaviti da je veći inhibicioni efekat frakcije 2 na proliferaciju L929 ćelija uzrokovan manjom veličinom ovih nanočestica, odnosno njihovom većom internalizacije.

Znatno veća citotoksičnost frakcija koje su bile kontaminirane metalima, može se objasniti toksičnim efektom internalizovanih nanočestica, ali i metalnih jona oslobođenih sa nanočestica u medijum za kulture, ili intracelularno nakon internalizacije. Naši rezultati ukazuju na to da citotoksičnost GNP frakcija 3, 4 i 5 zavisi od sastava partikula,

kontaminirajućih elemenata, i njihove koncentracije. Frakcija 3, koja je sadržala čiste GNP i nanoštapiće, sadržala je mali procenat kontaminirajuće Cu (do 3%). Upravo joni Cu^{2+} oslobođeni intracelularno, mogu biti razlog inhibitornog efekta ove frakcije na metaboličku aktivnost L929 ćelija. Odsustvo citotoksičnog efekta frakcije 3 na timocite se može objasniti činjenicom da koncentracija Cu^{2+} jona oslobođenih u medijum nije dovoljan da izazove citotoksičnost kod nefagocitnih ćelija. Pokazano je da su joni Cu toksični za L292 ćelije i gingivalne fibroblaste u relativno visokim koncentracijama (0.33-1mM) [583]. Naši prethodni rezultati ukazuju na to da koncentracije Cu manje od 8 ppm nisu citotoksične [683]. Takođe je poznato da količina oslobođenog Cu sa legure koja sadrže ovaj element ne zavisi od njegove količine u rastvoru nego od korozivnih osobina te legure. Da bi se doneo jasniji zaključak o mogućem toksičnom dejstvu Cu sa frakcije 3 GNP, neophodno je ispitati kinetiku oslobađanja Cu nakon internalizacije i njegovu intraćelijsku koncentraciju. Veća citotoksičnost frakcije 3 može biti i posledica njihove veće fagocitoze od strane L929 ćelija, u odnosu na frakciju 1 i 2. Ukoliko je antiproliferativni efekat frakcije 3 posledica internalizovanih GNP, najverovatnije je da je ovaj efekat bio posredovan nanočesticama sferičnog oblika a ne nanoštapićima. Naime pokazano je da se nanoštapići fagocituju veoma sporo usled mnogo većeg vremena koje je potrebno da ih obmota ćelijska membrana [696]. Stoga je neophodno primeniti mnogo osetljivije tehnike kako bi se izmerila internalizacija nanočestica različitih veličina.

Citotoksičnost frakcije 4 i 5, i na timocite i na L929 ćelije je najverovatnije rezultat efekta kontaminirajućih mikroelemenata čije je dejstvo sinergističko. Frakcija 4 sadrži Au i Ag, i mikronske je veličine, pa se može pretpostaviti da je oslobađanje Ag sa površine nanočestica najvažniji citotoksični faktor. Brojne studije su potvrdile da Ag oslobođen sa površine legure može izazvati citotoksičnost [586, 697]. Najveći toksični efekat su imale GNP iz frakcije 5, što se može objasniti sinergističkim efektom različitih kontaminirajućih elemenata kao što su Ni, Zn i Cu. Svi ovi elementi su toksični, a njihov efekat zavisi od tipa ćelija i koncentracije u kojoj se oslobađa sa legure, kao i dužine izlaganja ćelija [680, 698, 699]. Naši rezultati su pokazali da da niže koncentracije frakcije 5 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) indukuju i apoptozu i nekrozu, dok visoke koncentracije izazivaju isključivo nekrozu ćelija. Visoka

spontana apoptoza timocita u kulturi je u skladu sa drugim publikacijama [700], i rezultat je smrti zanemarivanjem timocita koji nisu pozitivno selekcionisani u kulturi. Apoptoza i nekroza su funkcionalno i morfološki različite forme ćelijske smrti. Međutim, ovaj koncept je doveden u pitanje otkrićem da ćelije koje su indukovane da uđu u apoptozu umiru nekrozom kada se istroše intracelularni depoi energije (deplecija ATP) [591]. Na osnovu toga se može pretpostaviti da visoke koncentracije Cu, Ni i Zn koje su oslobođene u medijum sa frakcije 5, blokiraju sintezu ATP u mitohondrijama ili u glikolizi, i uzrokuju nekrozu. U tom kontekstu, naši rezultati su pokazali veću osetljivost L929 ćelija na nekrozu, u poređenju sa timocitima. Kada je nivo ovih toksičnih jona niži, koncentracija ATP je i dalje dovoljna da se izvrši apoptotski program [591]. Mehanizmi toksičnosti GNP mogu biti posredovani indukovanjem oksidativnog stresa kod ćelija koje su internalizovale GNP. U skladu sa tim, Jia i sar. [701] su pokazali da GNP indukuje oslobađanje NO iz seruma, dok Li i sar. [702] ukazuju da ove nanočestice indukuju oksidativni stres koji može oštetiti ćelije *in vitro*. Osim toga, pokazano je da citratom obložene GNP stimulišu respiratornu aktivnost makrofaga i aktiviraju mitohondrijske enzime ovih ćelija [454]. Stoga bi trebalo ispitati i da li toksični joni oslobođen sa GNP frakcije 3, 4 i 5 intracelularno indukuju oksidativni stres L929 ćelija, i na taj način dovode do smanjenja njihove vijabilnosti i proliferacije u kulturi.

5.2.3. Citotoksičnost i imunomodulatorne osobine frakcija GNP na modelu splenocita aktiviranih pomoću Con-A

U ovom delu ispitivanja smo pokazali smo da čiste nanočestice zlata frakcije 1 i 2 ne ispoljavaju direktan citotoksični efekat na splenocite aktivirane sa ConA, obzirom da sačuvana vijabilnost i metabolička aktivnost ovih ćelija nakon 24 sata kultivacije. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim rezultatima na L929 ćelija i timocitima, kao i sa drugim publikacijama [186, 437, 570] koji pokazuju da čiste GNP nisu akutno toksične. Međutim, ove dve frakcije GNP nisu bile potpuno inertne u kulturi, obzirom da su redukovale proliferaciju ConA-aktiviranih splenocita. ConA predstavlja jak mitogen i poliklonski

aktivator T ćelija u prisustvu APC. Proliferacija T ćelija se pokreće premošćivanjem T ćelijskog receptora i drugih molekula na T ćelijama i APC [571]. U tom smislu se može pretpostaviti da su efekti frakcije 1 i 2 posredovani modulacijom funkcije ili vijabilnosti APC, kao što su DC. Fagocitne ćelije koje se nalaze u slezini su takođe prisutne u ukupnoj ćelijskoj suspenziji splenocita. Iako je zlato plemenit metal, on je i najelektronegativiji metal koga znamo. Shodno tome, površina ovih nanočestica se brzo oblaže u medijumu različitim molekulima [688], što olakšava njihovu internalizaciju endocitozom posredovanoj receptorima [178]. Pokazano je da nakon toga, GNP mogu unutar ćelija interagovati sa aktinskim filamentima [686], DNK [436], i remetiti redoks status ćelija [685], čime deluju na vijabilnost i proliferaciju.

Potvrda hipoteze da GNP frakcije 1 i 2 imaju imunomodulatorni, a ne citotoksični efekat, je dobijena analizom produkcije citokina u kulturi splenocita tretiranih sa ConA. Naime, nađeno je da je produkcija IL-2 manja u kulturama splenocita tretiranih sa GNP. IL-2 se ključan za indukciju i održavanje proliferacije limfocita [703]. Osnovni izvor IL-2 su sami limfociti, koji nakon stimulacije sa APC, proliferišu i povećavaju ekspresiju CD25 (α subjedinicu IL-2 receptora) [704]. Bez ovakve aktivacije, APC mogu indukovati toleranciju, to jest stanje neresponsivnosti na signale koji se ne smatraju opasnim [705]. Na osnovu toga, može se pretpostaviti da frakcije 1 i 2 povećavaju tolerogene osobine APC. Ova hipoteza je delimično potkrepljena rezultatima Villiers-a i sar. [443] koji su pokazali da čiste GNP smanjuju produkciju IL-12 od starne mišijih DC iz kostne srži, iako same nisu citotoksične za ove ćelije i ne indukuju njihovu aktivaciju.

Frakcije 1 i 2 su proizvedene pod različitim frekvencijama, a ova promena u njihovom dijametri je dramatično promenila imunomodulatorne osobine ovih nanočestica. Chithrani i sar. [197] su pokazali da se GNP 50 nm bolje preuzimaju od stane HeLa ćelija u poređenju sa GNP manjeg ili većeg dijametra. Osim toga, poznato je da manje nanočestice imaju veći odnos površine prema zapremini [188, 695], što im omogućuje da interaguju sa ćelijskim komponentama nakon internalizacije. TEM analiza je pokazala da frakcija 2 sadrži veći broj GNP manjih od 100nm, uključujući i 3.8 više nanočestica veličine 50nm, u odnosu na frakciju 1. Dijametri dobijeni TEM analizom su nešto manji nego oni dobijeni

SEM-om, što je u skladu sa literaturnim podacima [706]. Osim toga, SEM analiza je pokazala da nanočestice frakcije 1 imaju veću aglomeraciju nego nanočestice u frakciji 2. Ovo je potvrđeno studijama na TEM-u, s tim da su usled razlika u načinu pripreme uzoraka za analizu, nanočestice na TEM-u izgledale manje aglomerirane. Treba istaći da osobine nanočestica nisu analizirane u hidrodinamičkim uslovima, kakvi postoje u ćelijskoj kulturi. Disperzibilnost frakcija se delimično popravља u medijumu, što je u skladu sa pređašnjim publikacijama [707] koje su pokazale da komponente seruma smanjuju aglomeraciju GNP usled adsorpcije proteina za njihovu površinu.

Osim inhibicije produkcije IL-2, pokazano je da GNP frakcije 2 stimulišu produkciju IL-10, za razliku od GNP frakcije 1. Različiti efekti frakcije 1 i 2 na produkciju IL-10 mogu biti posledica kvantitativno različitog preuzimanja od strane APC i reaktivnosti ovih nanočestica. Takođe je moguće da se nanočestice frakcije 2 bolje preuzimaju, obzirom da im je bolja disperzibilnost u odnosu na čestice u frakciji 1. Dakle poboljšana disperzibilnost frakcija 1 i 2 GNP predstavlja imperativ za buduća ispitivanja imunomodulatornih efekata.

Citotoksični profili frakcija GNP su u skladu sa njihovim mikrostrukturnim svojstvima, veličinom i elementalnim sastavom. Pri tome, biološki efekat ovih frakcija GNP treba posmatrati iz dva ugla. Jedan je efekat internalizacije nanočestica, a drugi efekat oslobođenih jona sa njihove površine. Iako frakcija 3 ne izaziva toksičnost u kulturi splenocita, pokazano je da ove nanočestice imaju snažniji imunomodulatorni efekat nego frakcije 1 i 2. Razlog tome može biti mala količina oslobođenog Cu u medijum ili intracelularno. Pokazano je da veće koncentracije Cu izazivaju citotoksičnost usled sposobnosti da generiše ROS u Fentonovoj reakciji, čime se oštećuje DNK i drugi makromolekuli [708]. Koncentracija Cu u frakciji 3 verovatno nije dovoljna da izazove toksičnost usled postojanja kompenzatornih mehanizama u ćelijama, ali jeste da potencijalno izazove oksidativni stres i interaguje sa enzimima i DNK, čime modulira proliferaciju i produkciju citokina od strane splenocita aktiviranih sa ConA. Redukcija IL-2 od strane splenocita tretiranih GNP iz frakcije 3 je svakako doprinela anti-proliferativnom efektu ovih nanočestica. Frakcije 4 i 5 su usled kontaminacije mikrolegirajućim elementima bile citotoksične za splenocite tretirane sa ConA, što je u skladu sa prethodnim rezultatima

dobijenim na L929 ćelijama i timocitima pacova. Stoga se može zaključiti da je usled citotoksičnog efekta frakcije 4 na splenocite, u kulturama detektovano značajno manje citokina u odnosu na kontrolu.

5.2.4. Efekat GNP na maturaciju i funkciju DC stimulisanih LPS-om

Sve veća upotreba GNP u fototermalnoj terapiji i dijagnostici maligniteta, nameće potrebu da se ispituju potencijalno nepoželjni imunski efekti ovakvih procedura. Prethodni rezultati dobijeni ispitivanjem imunomodulatornog efekta frakcija 1 i 2 GNP na modelu splenocita aktiviranih ConA su ukazali na to da GNP, u zavisnosti od veličine, mogu imati imunosupresivni efekat, stimulacijom produkcije IL-10. Imunosupresivni efekti GNP su i ranije smatrani kao potencijalno nepoželjni kod terapije kancera [443, 709], ali do sada niko nije ispitao ovaj problem direktno. Obzirom da proliferacija i produkcija citokina u ovom modelu prevashodno zavise od prisustva akcesornih ćelija u populaciji splenocita [571], naredni cilj ove studije je bio ispitati zavisnost veličine GNP i njihovog imunomodulatornog efekta na modelu humanih DC. Ovakva ispitivanja su posebno važna ako se uzme u obzir da DC predstavljaju ključne ćelije u kontroli imunskog odgovora na tumor [710]. Obzirom da frakcije 1 i 2 imaju veliku disperziju veličine, u ovim ispitivanjima su korišćene komercijalne nanočestice 10nm (GNP₁₀) i 50 nm (GNP₅₀) u dijametru, čija disperzija veličine ne prelazi 2 nm.

U ispitivanju citotoksičnosti GNP u kulturi DC smo pokazali da veće koncentracije GNP₁₀ ispoljavaju pro-apoptotski efekat, što je zaključeno na osnovu 2 metode merenja apoptoze (PI u hipotonom rastvoru i Aneksin-VFITC/PI). Citotoksičnost GNP je opisivana i ranije [435, 461], pri čemu je zapaženi efekat jači nego što je dobijeno u našim istraživanjima. Interesantno je to da Villiers i sar. [443] nisu uočili citotoksični efekat GNP 10nm u dijametru na nezrele mišije DC pri koncentraciji od (0.5 mM), što može biti posledica različitog maturacionog stanja DC, i drugačijeg agensa za stabilizaciju koju su koristili u njihovoj studiji. Za razliku od toga, Qu i sar. [711] su koristeći MTT esej, pokazali da 10 i 50 nm GNP nisu toksične prema embrionalnim fibroblastima, čak ni pri

300 μM , iako GNP u ovim koncentracijama izazvaju promene u ćelijskoj morfologiji. Pernodet i sar. [685] su, koristeći 14 nm GNP (0.2-0.8 mg/ml) pokazali da visoke koncentracije GNP prolaze ćelijsku membranu i akumuliraju se u vezikulama, što je bilo praćeno oštećenjem aktinskih filamenata, njihove pokretljivosti, proliferacije i adhezije. Pored toga, na modelu dermalnih fibroblasta je pokazano da su 45nm GNP značajno toksičnije od GNP veličine 13nm [712]. Kao mogući razlog je navedeno da 45nm GNP više oštećuju vezikule i odlaze u citoplazmu oštećujući normalnu ćelijsku funkciju. Ovi rezultati su suprotnosti sa našim rezultatima gde je pokazano da manje nanočestice (GNP 10nm), u koncentraciji od 50 $\mu\text{g/ml}$ imaju proapoptotski efekat, za razliku od većih GNP₅₀, obzirom da je indukuju apoptozu kod 20% DC. Takođe, pokazali smo da se u DC nalazi značajno veći broj GNP₁₀, nego GNP₅₀, kao i to da GNP₁₀ češće napuštaju endozom DC od GNP₅₀. Razlike u dobijenom efektu mogu biti posledica korišćenja različitih modela za ispitivanje citotoksičnosti koloidnih GNP, i razlike u mehanizmima internalizacije GNP od strane fibroblasta i DC. Pokazali smo da se povećavanjem koncentracije GNP₁₀ (100 i 200 $\mu\text{g/ml}$) ne povećava procenat apoptotičnih DC, najverovatnije zbog toga što je maksimalni fagocitozni kapacitet DC dostignut i pri nižim koncentracijama GNP₁₀. Slično smanjenje vijabilnosti od 20% je uočeno u eksperimentima sa Hep-G2 ćelijama kultivisanim sa 10 nm GNP u koncentraciji 100 μM , što odgovara 2×10^{12} GNP/ml [713]. Slab proapoptotski efekat GNP₁₀ u kulturi DC je uočen korišćenjem mnogo veće koncentracije nanočestica (50 $\mu\text{g/ml}$), koji odgovara 5×10^{12} GNP/ml. Naši rezultati su u skladu sa zaključkom Khlebsova i Dykman-a, baziranom na brojnim drugim studijama [689], da GNP u koncentraciji od $1 \times 10^{12}/\text{ml}$ nisu citotoksične za različite ćelijske linije. U skladu sa tim, GNP₅₀ nisu citotoksične za DC pri koncentraciji od 200 $\mu\text{g/ml}$ ($0.2 \times 10^{12}/\text{ml}$), dok GNP₁₀ nisu citotoksične u koncentraciji od 10 $\mu\text{g/ml}$ ($1.1 \times 10^{12}/\text{ml}$).

Ključni rezultat dobijen u ispitivanju imunomodulatornog dejstva GNP je da netoksične koncentracije GNP₁₀ inhibiraju maturaciju i funkciju DC, kao i njihov kapacitet da indukuju T ćelijski antitumorski odgovor. U skladu sa rezultatima Villiers i sar. [443], efekat GNP je bio značajan jedino u prisustvu maturacionog stimulusa. Po prvi put je efekat GNP proučavan na modelu maturacije humanih DC stimulisane LPS-om i na modelu

maturacije ovih ćelija indukovane nekrotičnim tumorskim ćelijama. Pri tome su nekrotične tumorske ćelije generisane pod uslovima koji se postižu u fototermalnoj terapiji pomoću GNP [560]. Zajedničko za ova dva maturaciona stimulusa je to da i LPS i nekrotične ćelije aktiviraju TLR4 signalni put kod DC [401, 710, 714]. Nedavno su Tsai i sar. [569] pokazali da GNP mogu inhibirati maturaciju makrofaga stimulisanu sa CpG, ali ne sa LPS-om, tako što inhibiraju traslokaciju TLR9 do fagozoma dejstvom na HMGB-1. Suprotno tome, pokazali smo da GNP, pogotovo manje po dijametru, inhibiraju maturaciju i funkcije DC indukovanu sa LPS. Razlike u ovakvim nalazima su najverovatnije posledica različitog odgovora makrofaga i DC na LPS [715]. Pokazali smo da GNP inhibiraju povećanje ekspresije CD83 molekula kod DC, koji je ključan za stabilnost maturacije DC u tumorskoj imunosupresivnoj mikrosredini bogatoj IL-10 [716]. Značajno smanjenje ekspresije HLA-DR nakon stimulacije sa LPS-om je verovatno rezultovala slabijim alostimulatornim kapacitetom DC tretiranih sa GNP₁₀, obzirom da ovaj molekul predstavlja jedan od dva osnova signala koji su neophodni za proliferaciju CD3⁺T ćelija. Smanjena alostimulatorna sposobnost DC tretiranih sa LPS/GNP₁₀ može biti i posledica povećane produkcije imunosupresivnog citokina IL-10 od starne DC. IL-10 je takođe uključen i u stimulaciju razvoja Th2 ćelija [134]. U tom kontekstu je pokazano da Th2 ćelije stimulišu rast tumora, za razliku od Th1 ćelija koje su specifične za isti antigen [717]. Pored toga, GNP₁₀ inhibiraju produkciju IL-12p70 stimulisanu sa LPS-om. IL-12p70 je citokin sa Th1 polarizujućom sposobnošću i antitumorskim efektima [718]. U skladu sa tim, Villiers i sar.[443] su pokazali da GNP veličine 10nm suprimiraju produkciju IL-12 od strane mišijih DC stimulisanih sa LPS-om. Međutim, niža produkcija IL-12p70 od strane DC tretiranih sa LPS/GNP₁₀ nije bila praćena nižom produkcijom IFN- γ od strane CD3⁺T ćelija, ukazujući na to da i drugi citokini mogu biti uključeni u regulaciju njegove ekspresije [718]. Za razliku od GNP₅₀ koji stimulišu Th17 polarizacionu sposobnost DC, GNP₁₀ su delimično inhibirale ovu sposobnost kod DC. Prisustvo Th17 ćelija u tumorskom tkivu može imati kako antitumorski, tako i protumorski efekat. Međutim, simultana indukcija Th17 i Th1 odgovora su opisani kao poželjni u terapiji tumora [719]. Stoga bi se celokupan efekat GNP₁₀ na Th polarizacionu sposobnost DC mogla opisati kao nepoželjna u tumorskoj terapiji, za razliku od efekata GNP₅₀.

Uloga signalizacije zavisne od Ca^{2+} u sazrevanju DC je proučavana ranije [115]. U ovom radu smo po prvi put pokazali da GNP_{10} , za razliku od GNP_{50} , značajno moduliraju promene u oscilacijama Ca^{2+} koje indukuje LPS. Vukcevic i sar. [115] su pokazali da smanjenje fluktuacije Ca^{2+} pod dejstvom LPS-a dovodi do citoplazmatske lokalizacije NFAT. U skladu sa njihovim rezultatima, ni u našim eksperimentima nisu detektovane neposredne promene u influksu Ca^{2+} nakon stimulacije sa LPS-om. Pokazano je da Ca^{2+} oscilacije zavise od aktivnosti fosfolipaze C, SERCA i inozitol-3-fosfatnog receptora na endoplazmatičnom retikulumu. Međutim, pokazano je i da influks Ca^{2+} takođe ima ulogu u ovom procesu [115]. Interesantni rezultati su dobijeni u studiji Khan i sar. [440] koji su pokazali da GNP mogu smanjiti ekspresiju membranskog Ca^{2+} kanala. Na osnovu toga bi se moglo pretpostaviti da su GNP delovale direktno na oscilacije Ca^{2+} , modifikacijom influksa Ca^{2+} preko ovih kanala. Međutim, pokazali smo da bez prisustva LPSa, same GNP ne modifikuju oscilacije Ca^{2+} , tako da je delovanje GNP na ovaj signalni put verovatno nije direktno. Osim toga, eksperimenti u kojima su blokirane oscilacije Ca^{2+} u DC su pokazali da oscilacije same po sebi nisu jedini regulator nuklearne tranlokacije NF- κ B i sazrevanja DC [115]. Ovi rezultati takođe ukazuju na to da je mehanizam dejstva GNP na maturaciju DC značajno kompleksniji. U tom kontekstu se može pretpostaviti da su Ca^{2+} oscilacije centralni regulatorni faktor koji sinhronizuje sazrevanje DC, i može primiti različite druge signale koji dolaze iz same ćelije, a neke od njih modifikuju internalizovane GNP_{10} .

5.2.5 Internalizacija, i intracelularna distribucija GNP unutar DC

Imunomodulatorni efekti ispitivanih GNP mogu se pripisati razlikama u mehanizmima internalizacije, stepenu nakupljanja u DC i intracelularnoj distribuciji, što dovodi do razlika u modulaciji signalizacije u DC tokom sazrevanja. Naši podaci su u skladu sa drugim studijama koje su pokazale da je preuzimanje GNP energetski zavisian proces koji se odvija endocitozom [688]. Uočeno je da ovaj proces uglavnom zavisi od dinamina, ali i da DC više internalizuju GNP_{10} posredstvom mehanizama koji ne zavise od dinamina. Takvi mehanizmi internalizacije su ranije opisivani kod nefagocitnih ćelija, za

koje je pokazano da Dinador redukuje internalizaciju GNP 42% [409]. Moguće je da se GNP internalizuju od strane DC i alternativnim mehanizmima kao što su mehanizmi posredovani klatrin- i dinamin-nezavisnim nosačima (engl. *clathrin-, dynamin-independent carriers*, CLIC) koje reguliše CDC42 protein [201]. Analize na TEM-u su ukazale na to da su cevaste membranozne strukture po širini (50-80nm) slične CLIC strukturama. U tom smislu je moguće da, kada je funkcija dinamina u DC blokirana dinadorom, strukture slične CLIC-u imaju funkciju filtera koji više propušta GNP₁₀ u DC nego GNP₅₀. U skladu sa tom hipotezom, u cevastim strukturama sličnim CLIC-u kod DC tretiranih dinadorom su uočeni manji klasteri GNP₁₀, dok su GNP₅₀ uočene u ovim strukturama kao pojedinačne nanočestice. CDC42 je uključen u regulaciju makropinocitoze, fagocitoze i drugih signalnih mehanizama u DC [720]. Stoga je moguće da GNP₁₀ snažnije deluju na signalne puteve u toku sazrevanja DC upravo angažovanjem alternativnih puteva internalizacije u DC.

Uočeno je da su nakon internalizacije, GNP pretežno locirane unutar endozoma, što je u skladu sa drugim rezultatima [409, 688, 721]. Takva lokalizacija GNP omogućava potencijalno dopremanje agonista do endozomnih TLR unutar DC, kao što su CpG [709] ili 7-TOG [722]. Međutim, GNP su pronađene i izvan endozoma, što pogotovo važi za GNP₁₀. Izlazak GNP iz endozoma tumorskih ćelija je ranije opisan [409], ali do sada nije opisan kod DC. Izlazak GNP iz endozoma može biti potencijalno korisno za dostavu specifičnih agonista do citoplazmatskih receptora kod DC, kao što su MDA-5 i NOD-u slični receptori [119], čime bi se značajno poboljšala maturacija i funkcija ovih ćelija. Osim toga, izlazak GNP iz endozoma bi se mogao povećati funkcionalizacijom koja bi povećala površinsko naelektrisanje ovih nanočestica, i na taj način omogućila ubrzan izlazak iz endozoma DC mehanizmima „protonskog sunđera“ [135]. Obzirom da GNP, korišćene u ovoj studiji imaju negativnu površinsku šaržu, mehanizam protonskog sunđera je malo verovatan. Međutim, pokazano je da je izlaganje endozoma u kojima su GNP vidljivoj svetlosti, takođe omogućava izlazak ovih nanočestica iz endozoma u citoplazmu [723], što može biti i mehanizam izlaska GNP₁₀ iz endozoma u našim ispitivanjima. Unutar endo/lizozoma i citoplazme GNP mogu modifikovati aktivnost različitih proteina kao što su katepsini [724] ili HMBG-1 [569]. Ovi proteini predstavljaju važne regulatore sazrevanja i funkcije DC

[725, 726]. U skladu s tim, GNP₁₀ verovatno modifikuju više različitih proteina u poređenju sa GNP₅₀, obzirom da se internalizuju alternativnim načinima i više izlaze iz endozoma. Iako je protočna citometrija i svetlosna mikroskopija pokazala drugačije rezultate, merenja mikro-PIXE metodom su ukazala na to da je prosečan broj GNP₁₀ po DC veći nego broj GNP₅₀. Stoga se može zaključiti da je broj GNP po ćeliji, a ne njihova intracelularna masa, ili procenat ćelija koje su internalizovale GNP, ključan za imunomodulatorne efekte ovih nanočestica. Pokazano je da mikro-PIXE metoda, koja je po prvi put korišćena u ovakvim ispitivanjima, omogućava preciznu kvantifikaciju GNP unutar DC. Za razliku od ICP-MS metode [435], mikro-PIXE omogućava i analizu varijabilnosti internalizacije GNP od strane DC. Za razliku od drugih [409], u našoj studiji nije uočena značajna korelacija između veličine ćelija i količine zlata u njima. Stoga je uočena varijabilnost verovatnije posledica heterogenosti DC u smislu njihovog fenotipa i maturacionog stanja, pri čemu se fagocitna aktivnost DC smanjuje tokom njihove maturacije [134].

5.2.6. Efekti GNP na maturaciju i funkcije DC indukovanih nekrotičnim HEp-2 ćelijama

Ključni rezultati dobijeni u ovoj studiji se odnose na činjenicu da GNP₁₀ inhibiraju maturaciju i alostimulatornu aktivnost DC, čak i ako je ona stimulisana nekrotičnim tumorskim ćelijama. GNP₁₀, za razliku od GNP₅₀, stimulišu Th2/Th17 polarizacionu sposobnost DC. Uzimajući u obzir protumorske efekte Th2 ćelija [717], i činjenicu da sam IL-17 može stimulisati rast tumora i metastazu [719], i u ovom eksperimentalnom modelu je potvrđeno da GNP₁₀ mogu imati nepoželjan supresivni efekat na antitumorsku aktivnosti DC, što može biti relevantno za njihovu primenu u fototermalnoj terapiji tumora. Uočeno je da DC aktivirane sa nekrotičnim HEp-2/GNP₁₀ indukuju CD3⁺T ćelije sa lošom citotoksičnom aktivnošću prema HEp-2 ćelijama. Iako je pokazano da je odgovor DC na nekrotične ćelije zavisao od ekspresije TLR4 na njihovoj površini [559], u našim eksperimentima je uočeno da ovakva maturacija indukuje drugačiju Th polarizacionu sposobnost DC u odnosu na LPS. U skladu s tim, Kandil i sar. [559] su ukazali na to da, za

razliku od LPS-a, nekrotične ćelije ubijene toplotom mogu indukovati povećanje IL-12p40, ali ne i bioaktivnog IL-12p70. Stoga se može pretpostaviti da nekrotične ćelije pokreću alternativne signalne puteve kod DC, u odnosu na LPS *E. coli*. Na primer, pokazano je da i hsp60 i HMGB-1 aktiviraju TLR2 [727, 728], pored TLR4 [401]. U skladu sa tim je opisano da inhibicija produkcije IL-12 i IL-23 nakon stimulacije sa TLR4 ili TLR7/8 zavisi od ekspresije SOCS-1 molekula, i predstavlja važan kontrolni mehanizam koji ograničava preteranu inflamaciju [729]. Nedavno je pokazano da istovremeno aktiviranje TLR2 i TLR4 na DC potencira njihovu antitumorsku funkciju [730]. U skladu sa tim, naši rezultati ukazuju da ovaj proces može biti inhibiran sa GNP₁₀. Ovi rezultati, i prethodni rezultati dobijeni na modelu splenocita aktiviranih sa ConA, ukazuju na to da fenomen imunosupresije posredovane GNP ne zavisi od primenjenog eksperimentalnog modela ili metoda sinteze GNP.

5.3. BIOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULACIJSKE OSOBINE FUNKCIONALIZOVANIH UGLJENIČNIH NANOCEVI

MWCNT su zbog svoje velike površine koja se lako može funkcionalizovati, i sposobnosti da prođu u ćelije, vrlo atraktivne za biomedicinsku primenu kao nosači lekova i biomolekula u ciljanoj ćelijskoj terapiji. Do dana su MWCNT konjugovane funkcionalizovane sa nukleinskim kiselinama [510, 511], anti-tumorskim lekovima [486], hormonima [507] i dr. Ovakva strategija dostavljanja biomolekula do ciljnih ćelija omogućava da se biomolekul koristi u znatno manjim koncentracijama, čime se izbegavaju potencijalni nepoželjni efekti visokih doza ovih biomolekula, a da se u isto vreme pojačavaju lokalni efekti u ciljnim ćelijama. Dapson se koristi kao efikasan lek za borbu protiv intracelularnih infekcija izazvanih vrstama roda *Mycobacterium*, kao i za Kaposijevog sindroma [515, 516]. Međutim, nakon obrade u jetri, dapson ispoljava brojne neželjene sistemske efekte kao što je methemoglobinemija i hemolitička anemiju [519], agranulocitoza i hipersenzitivnost [517]. Stoga je ispitana mogućnost vezivanja dapsona za CNT čime bi se povećala njegova solubilnost, ali i omogućilo koncentrovanje ovog leka u

endozomu makrofaga i DC, u kojima su i najveće koncentracije ovih intracelularnih mikroorganizama u organizmu. Iako su agonisti TLR odlični stimulatori imunskog odgovora protiv različitih patogena [520, 521], njihova aktivnost je prolazna, a potrebne su i visoke doze ovih agonista u cilju postizanja željenog imunološkog efekta [522]. U tom smislu je odabran 7-TOG, agonist TLR7 receptora, za koji smo ranije pokazali da u solubilnom obliku indukuje sazrevanje i funkcije DC [526, 527, 731]

5.3.1 Sinteza i karakterizacija dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT

U prvom delu ovog ispitivanja je uspešno izvršena funkcionalizacija primarnih MWCNT pomoću azotne i sumporne kiseline, pri čemu se dobijene o-MWCNT. Cela reakcija funkcionalizacije MWCNT je obavljena pod dejstvom ultrasoničnih talasa koji proizvode mikroskopske mehuriće tečnosti čiji udarni talasi povećavaju kvašljivost nanocevi i omogućavaju odigravanje reakcija oksidacije. Karboksilne grupe, koje se pod ovim uslovima formiraju, predstavljaju pogodna mesta za dalju hemijsku modifikaciju nanocevi aminima. Promene detektovane na MWCNT su u skladu sa drugim publikacijama [473, 474] koje su pokazale da se tokom ovog procesa formiraju se karboksilne grupe na krajevima cevi i na bočnim zidovima MWCNT. Poređenjem FT-IR spektara MWCNT pre i posle oksidacije, jasno je uočeno formiranje traka koje vibracijama istezanja C-H, C=O, C-O i SO₃H grupa nakon tretmana MWCNT azotnom i sumpornom kiselinom. Prilikom funkcionalizacije MWCNT kiselinama uočeno je značajno smanjenje sadržaja potencijalno toksičnih metala u MWCNT. Snižavanje sadržaja metala je naročito važno za primenu MWCNT u biomedicini, obzirom da je pokazano da metalne čestice mogu biti odgovorne za toksičnost SWCNT unesenih inhalacijom [732].

o-MWCNT su nakon toga korišćeni kao prekurori za kovalentno vezivanje dapsona i 7-TOG-MWCNT. U funkcionalizaciji MWCNT dapsonom i 7-TOG-om je primenjen originalni metod konjugacije pri čemu je formirana amidne veza između dapsona ili 7-TOG i o-MWCNT pomoću N-HATU i DIEA u rastvoru DMF [555]. Sličan metod za funkcionalizaciju SWCNT je upotrebljen i ranije od strane Ramanathan i sar. [573]. N-

HATU je poznati agens za vezivanje koji aktivira karboksilnu grupu i omogućava formiranje OAt-estra koji se lako smenjuje u reakciji sa aminom, pri čemu se formira peptidna veza. Pored N-HATU, za brzu aktivaciju karboksilne grupe često se koristi tercijarni amin kao što je DIEA [555]. FT-IR analiza je potvrdila da se dapson ili 7-TOG nalaze vezani za površinu MWCNT, što je u skladu sa onim što je ranije uočeno za nanocevi funkcionalizovane preko amino grupa [555, 556, 733, 734]. TGA je ukazivala da je količina dapsona kovalentno vezanog za o-MWCNT iznosila oko 15 wt.%, dok je količina 7-TOG iznosila oko 12 wt.%, uzimajući u obzir razliku u gubitku na težini između o-MWCNT, dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT. Ovi rezultati potvrđuju pretpostavke dobijene ICP-MS elementalnom analizom uzoraka. U TGA analizi, prvi interval gubitka mase ispod 200°C kod svih uzoraka se može pripisati isparavanju adsorbovane vode [555]. Na višim temperaturama, gubitak težine je posledica termalne dekompozicije bočnih grupa. Stoga je ova metoda pogodna za procenu količine vezanih biomolekula za površinu MWCNT, koja uz ostale analize (FT-IR, TEM, ICP-MS) potvrđuje kovalentno vezivanje dapsona ili 7-TOG za MWCNT.

Ključna osobina MWCNT namenjenih za biomedicinsku primenu je njihova disperzibilnost u vodenim rastvorima. Kao što je i očekivano, oksidacija MWCNT i vezivanje biomolekula za MWCNT omogućava stabilnu disperzibilnost ovih konjugata u vodenim rastvorima. Sterne smetnje i rigidni segmenti hemijskih grupa u dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT, imaju slab bazni karakter i stvaraju intimne vodonične veze sa rastvaračem što dovodi do njihove odlične disperzibilnosti [555]. Činjenica da je apsorbancija dap-MWCNT dispergovanih u vodi direktno proporcionalna njihovoj koncentraciji, što je u skladu sa Lambert-Berovim zakonom, potvrđuje homogenu disperziju funkcionalizovanih MWCNT u vodi. Prisustvo brojnih negativno naelektrisanih kiselih grupa na o-MWCNT sigurno doprinosi boljoj stabilnosti i hidrofilnosti o-MWCNT. Stoga ovakva strategija otvara mogućnost transformacije fizičkih osobina različitih lekova kovalentnim vezivanjem za o-MWCNT, koje im omogućavaju bolju disperzibilnost u vodi. To, sa druge strane, omogućava drugačiju biodistribuciju, a time i potencijalno nove kliničke studije za upotrebu ovakvih biomolekula [732, 735, 736].

5.3.2 Internalizacija dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT

Kao što je napomenuto, biomedicinska primena CNT zahteva da one budu disperzibilne u vodi. Do sada je urađeno obilno ispitivanje internalizacije različito funkcionalizovanih CNT, od strane različitih ćelija pod različitim eksperimentalnim uslovima [540, 737, 738], i sva ispitivanja su pokazala da se funkcionalizovane CNT lako internalizuju, što je dobro za njihovu biomedicinsku aplikaciju kao nosača lekova, terapijika i za dijagnostiku. Naša ispitivanja na modelu PMØ pacova i humanim DC su u skladu sa ovim rezultatima. U tom smislu smo pokazali da se funkcionalizovane MWCNT internalizuju u sličnoj meri od strane PMØ i DC, koje predstavljaju profesionalne fagocite. Ovi rezultati su potvrđeni svetlosnom mikroskopijom i protočnom citometrijom. Povećanje granulosanosti PMØ i DC kultivisanih sa MWCNT je posledica porasta broja endozoma u ovim ćelijama, koji snažno raspršuju svetlost u stranu, dajući jači signal u SS kanalu [739]. Raniji rezultati ukazuju na to da je veličina MWCNT, bilo da su one funkcionalizovane [740] ili nefunkcionalizovane [741], važan faktor koji određuje u kojoj meri će se one preuzeti od strane ćelija. Pri tome se MWCNT manje veličine internalizuju značajno lakše. Obzirom da su dap-MWCNT sintetisane iz o-MWCNT, one imaju sličnu veličinu [742], što može biti jedan od razloga podjednake internalizacije ovih MWCNT. Nedavno su Delogu i sar. [740] ukazali na to da funkcionalne grupe (karboksilne ili amino grupe) MWCNT ne utiču na kvantitet internalizacije MWCNT od strane monocita, što je u skladu sa našim rezultatima.

Morfološka analiza ćelija na citospinovima je ukazala da DC fagocituju dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT, ali i da postoje značajne razlike u fagocitnom kapacitetu od strane pojedinačnih ćelija. Ovaj rezultat može biti objašnjen heterogenošću populacije DC u vidu njihovog fenotipa i maturacionog stanja. Ćelije sa najmanjom fagocitnom sposobnošću su najverovatnije zrele DC, koje obično imaju veću ekspresiju HLA-DR, kostimulatornih molekula i CD83 [622]. Sa druge strane, ćelije sa najvećom fagocitnom aktivnošću MWCNT su one koje se nalaze na prelazu između makrofaga i DC [743]. Za razliku od dap-MWCNT, pokazali smo da DC internalizuju 7-TOG-MWCNT u značajno većoj meri nego kontrolne o-MWCNT. Razlozi za ovaj fenomen trenutno nisu jasni. Raniji

rezultati ukazuju na to da je veličina MWCNT [740, 741], važan faktor koji određuje u kojoj meri će se MWCNT fagocitovati od strane ćelija, pri čemu se manje internalizuju značajno lakše. Obzirom da su 7-TOG-MWCNT sintetisane iz o-MWCNT, one imaju i sličnu veličinu [742], pa stoga razlika u veličini najverovatnije nije razlog razlike u internalizaciji ovih nanocevi. Takođe, pokazano je da funkcionalne grupe ne utiču na kvantitet internalizacije MWCNT od strane monocita [740]. Međutim, treba uzeti u obzir da je 7-TOG je aktivan agonist TLR7 receptora i moguće je da DC preferiraju njihovu internalizaciju. U skladu s tim, nedavno je pokazano da agonist TLR9 receptora ulazi u imunske ćelije posredstvom površinskog DEC205 receptora, koji ima ulogu čistača, a to je neophodno za efikasno dopremanje TLR9 do endozoma [744]. Ukoliko sličan receptor postoji i za TLR7 agonist, to bi verovatno omogućilo efikasniju internalizaciju 7-TOG-MWCNT u DC. Činjenica da PMØ i DC fagocituju dap-MWCNT i o-MWCNT u sličnoj meri, takođe potvrđuje našu hipotezu da je specifičan površinski receptor uključen u internalizaciju MWCNT funkcionalizovanih 7-TOG agonistom. Alternativa ovoj hipotezi je da je razlika u internalizaciji funkcionalizovanih MWCNT posledica razlike u disperzibilnosti i reagraciji ovih nanocevi. Naime, iako je disperzibilnost 7-TOG-MWCNT i kontrolnih o-MWCNT bila slična, uočeno je formiranje manjih agregata nanočestica o-MWCNT u kulturi, mnogo češće nego kod 7-TOG-MWCNT. Ovaj fenomen može biti posledica razlike u stabilnosti disperzije MWCNT i razlike u površinskoj šarži koja postoji između funkcionalnih grupa. Razlike u šarži na površini MWCNT značajno doprinose razlikama u preuzimanju MWCNT od strane ćelija i njihovog biološkog odgovora na MWCNT [745].

Mehanizmi internalizacije MWCNT nisu do kraja razjašnjeni. Naši rezultati ukazuju na to da se dap-MWCNT i 7-TOG-MWCNT unose u PMØ i DC isključivo fagocitozom, što je zaključeno na osnovu formiranih pseudopodija oko aglomerata MWCNT na membrani ćelija. Takođe, pokazali smo da je ovaj proces energetski zavisian, obzirom da se internalizacija ne odvija u nepermesivnim fiziološkim uslovima (+4 °C) iako se MWCNT mogu vezati za membranu u ovim uslovima. Ovi rezultati su u skladu sa drugim nalazima [746] koji su pokazali da ulazak CNT u ćelije zahteva potrošnju energije. Nakon

internalizacije, MWCNT su locirane u endozomu. Ovi rezultati su u skladu sa Cherukuri i sar. [540] koji su na modelu makrofaga pokazali da se funkcionalizovane CNT internalizuju fagocitozom, nakon čega su ove CNT locirane u endozomu. Slično su pokazali i Choi i sar. [747] i Heller i sar. [748, 749], koji su koristili CNT funkcionalizovane sa ssDNK. Međutim, postoje i drugačiji rezultati koji pokazuju da se CNT internalizuju i alternativnim mehanizmima. Na prime, Bianco i sar. [508] su pokazali da su funkcionalizovane CNT sposobne da prođu ćelijsku membranu pasivnim putem. Kasnije su Raffa i sar. [741] potvrdili da se MWCNT akumuliraju u lizozomima ćelija procesima koji ne zavise od endocitoze. Takođe, Pantarotto i sar. [485, 510], Wu i sar. [478], i Kostaarelos i sar. [738] su pokazali da se CNT funkcionalizovane 1.3 dipolarnom cikloadicijom internalizuju alternativnim putevima koji ne zavise od endocitoze. Kam i sar. [491, 497, 750] su pokazali da se CNT modifikovane ssDNK mogu naći i endozomu i u nukleusu HeLa ćelija. Nedavno je postala popularna hipoteza o CNT-nanoiglama, na osnovu eksperimentalnih rezultata da CNT mogu probušiti membranu ćelije i ući difuzijom. U skladu sa tim, u našim analizama TEM-om je uočeno da funkcionalizovane MWCNT, pogotovo one koje su deblje u dijametru, mogu probušiti membranu endozoma i izaći u citoplazmu DC i PMØ. Ovaj fenomen se sve češće potvrđuje u literaturi, a posebno je značajan za ciljanu dostavu biomolekula u citoplazmu i povećanu akumulaciju CNT i leka u ćelijama.

Endozomi predstavljaju mesto nakupljanja *Mycobacterium avium* i *Mycobacterium tuberculosis* koji su tokom evolucije razvili mehanizme inhibicije sazrevanja fagozoma i fuzije sa lizozomom, čiji bi enzimi degradirali ove intracelularne patogene [751]. Stoga je ključno što su dap-MWCNT dostavljene efikasno do ovog ćelijskog odeljka. Endozomi predstavljaju i mesto ekspresije TLR7 [752], a u ovom radu smo pokazali da 7-TOG-MWCNT kolokalizuju u endozomima sa TLR7. Međutim, nisu sve 7-TOG-MWCNT bile kolokalizovane sa TLR⁺ endozomima, ukazujući na to da je fuzija TLR7 sa endolizozomom precizno regulisana unutar DC. Ova hipoteza je potkrepljena nedavnim eksperimentima gde je otkrivena nova uloga za UNC93B1 u regulaciji prometa vezikula između endozomalnih TLR [753]. Ekspresija TLR7 je bila relativno slaba, što je u skladu

sa ranijim rezultatima dobijenim protočnom citometrijom [526]. Međutim, pokazano je da nakon internalizacije, intracelularni agregati 7-TOG-MWCNT kolokalizuju sa TLR7 tamo gde je jača njegova ekspresija. Ostalo je nejasno, međutim, da li su ovi intracelularni agregati formirani intracelularno, ili je agregacija MWCNT nastupila i pre fagocitoze. Jin i sar [192] su ukazali na to da GNP i CNT klasterišu na ćelijskoj membrani do veličine koja može da generiše dovoljno veliku entalpiju preko liganda sa receptorom, čime se prevazilazi entropijska barijera koja je potrebna za nastanak citoplazmatskih vezikula. Bez obzira na mehanizme internalizacije i intraćelijske distribucije MWCNT, kolokalizacija 7-TOG-MWCNT konjugata i TLR7 endocitotskog odeljka ukazuje na to da je 7-TOG dopremljen direktno do svog receptora, TLR7. Usled akumulacije 7-TOG-MWCNT partikula, lokalna intracelularna koncentracija 7-TOG je značajno porasla.

5.3.3 Citotoksičnost MWCNT

Do danas je nekoliko studija pokazalo da su primarne neobrađene CNT citotoksične, i da efekat zavisi od tipa CNT, načina njihove pripreme i ćelijskih tipova koji se koriste u testovima biokompatibilnosti [754-756]. Uzrok citotoksičnog efekta CNT može biti prisustvo kontaminirajućih metalnih katalizatora, koji se koriste u pripremi CNT, posebno Fe i Ni, ili njihova fagocitoza [754-756]. Međutim, čak i MWCNT funkcionalizovane jednostavnom oksidacijom mogu imati citotoksični efekat. U tom smislu je pokazano da o-MWCNT indukuju apoptozu T limfocita [757]. Autori su na osnovu ove studije zaključili da jednostavna oksidacija CNT nije dovoljna da one budu potpuno solubilne i stabilne u medijumu za ćelijske kulture. Sayes i sar. [758] su dalje pokazali da toksičnost CNT zavisi od gustine funkcionalizacije, gde je najmanja toksičnost uočena CNT koje su najviše funkcionalizovane fenil-SO₃X grupama. Ovi rezultati ukazuju da bez odgovarajuće funkcionalizacije, CNT imaju veliku hidrofobnu površinu koja može agregirati u medijumu za kulture i interagovati sa ćelijama vezujući se za proteine hidrofobnim interakcijama, a time i uzrokovati stres kod ćelija i ćelijsku smrt.

U skladu sa navedenim rezultatima, smo pokazali da u visokim koncentracijama (42.5 $\mu\text{g/ml}$ i 63 $\mu\text{g/ml}$) o-MWCNT imaju snažniji citotoksični efekat u kulturi PMØ i DC nego dap-MWCNT primenjeni u ekvivalentnim koncentracijama (50 $\mu\text{g/ml}$ i 75 $\mu\text{g/ml}$). Ovaj fenomen je korelirao sa sposobnošću o-MWCNT da indukuju oksidativni stress kod PMØ, za razliku od dap-MWCNT. Sličan citotoksični efekat primarnih MWCNT (u koncentraciji 20 $\mu\text{g/ml}$) je nedavno pokazan na modelu humanih makrofaga [759]. Ovi autori su ukazali na to da MWCNT mogu indukovati oksidativni stres i smrt makrofaga, usled nekompletne fagocitoze ili mehaničkog oštećenja plazma membrane, kao i to da kontaminacija Fe jonima nije odgovorna za ovaj efekat. Naši rezultati takođe idu u prilog činjenici da o-MWCNT ispoljavaju citotoksični efekat tek nakon fagocitoze od strane PMØ, obzirom o-MWCNT ne indukuju oksidativni stres PMØ na 4°C. Suprotno tome, Fiorito i sar. [760] nisu pokazali povećanje apoptoze mišije makrofagne ćelijske linije i humanih makrofaga tretiranih SWCNT u koncentracijama do 60 $\mu\text{g/ml}$, a efekat se može objasniti manjim preuzimanjem ovih nanocevi od strane ispitivanih makrofaga. Rezultati dobijeni u ovom radu su skladu sa našim ranijim nalazima koji su pokazali da MWCNT funkcionalizovane oksidima ili aminima nisu toksične za L929 ćelije, koje se karakterišu niskim kapacitetom za fagocitozu, dok su najveće koncentracije MWCNT (100 $\mu\text{g/ml}$) indukovale apoptozu L929 ćelija [555] i PMØ [742]. Ovi rezultati su u skladu i sa rezultatima drugih istraživačkih grupa [529, 732]. Niži proapoptotski efekat dap-MWCNT, u poređenju sa kontrolnim o-MWCNT je u skladu sa ranijim rezultatima na L929 ćelijama, gde je pokazano da citotoksični efekat u velikoj meri zavisi od strukture amina vezanog za MWCNT [555]. Ovakav efekat dap-MWCNT može biti posledica i anti-apoptotskog efekta dapsona nakon njegovog intracelularnog oslobađanja sa površine MWCNT, što je potkrepljeno činjenicom da dapson može imati antioksidativni i antiapoptotski efekat, kao što je pokazano na modelu ishemije-reperfuzije kod pacova [761].

Poznato je da LPS indukuje apoptozu makrofaga, koja zavisi od dva mehanizma. Jedan uključuje autokrinu sekreciju TNF- α , a drugi povećanje ekspresije p-53 i Bax nakon stimulacije makrofaga sa NO [762]. Potvrdili smo da koncentracije NO i TNF- α značajno rastu u kulturama PMØ nakon kultivacije sa LPS tokom 24 sata. LPS je korišćen kao

aktivator u ovim studijama zajedno sa MWCNT i dapsonom. Moguće interakcije LPS i ispitivanih supstanci su mogle potencijalno smanjiti efekat LPS na PMØ, ali ni dapson ni MWCNT nisu inhibirali proapoptotski efekat LPS. Ovo ukazuje na to da je biološki efekat LPS-a ostvaren bez obzira na potencijalne interakcije sa ispitivanim supstancama. Osim toga, brojni literaturni podaci ukazuju da LPS prisutan u tragovima kao kontaminant hemikalija ili nanočestica kako što su CNT [763], zadržava svoj biološki potencijal. Stoga je nalaz da dap-MWCNT, za razliku od o-MWCNT, ne modifikuje LPS-indukovanu apoptozu PMØ, može imati funkcionalni značaj za aktivaciju PMØ nakon dostavljanja dapsona preko MWCNT nosača.

5.3.4 Efekat dap-MWCNT na redoks status i oksidativni prasak PMØ

Suda i sar. [764] su pokazali na modelu neutrofila periferne krvni zdravih donora, da dapson može suprimirati produkciju superoksid anjona indukovanih sa fMLP i C5a, ali ne i sa PMA, posredstvom mehanizama koji zavise od kalcijuma. Suprotno ovim nalazima, pokazano je da dapson i njegovi metaboliti mogu imati prooksidativni i proapoptotski efekat na pacovske hepatocite *in vitro* i *in vivo* [765]. To ukazuje da dapson menja redukcionni status ćelija i indukuje različite efekte u zavisnosti doze koja se primenjuje u eksperimentalnom modelu. Naši rezultati su pokazali da dapson u koncentracijama 7.5 i 1.5 µg/ml, indukuje oksidativni stres PMØ, što najverovatnije nije dovoljno da pokrene apoptozu makrofaga, već inicira antiapoptotske mehanizme u ovim ćelijama. Međutim, interesantno je to da primenjene antiapoptotske koncentracije dapsona potenciraju apoptozu PMØ tretiranih sa o-MWCNT. Ovi rezultati ukazuju na to da efekat dapsona na apoptozu PMØ može biti različit ako je poremećen redoks status ćelija. MWCNT mogu indukovati formiranje ROS kod A549 ćelija, i aktivirati NF-κB i produkciju IL-8, a ovaj efekat se može inhibirati antioksidansima [766], što potvrđuje hipotezu da su ROS važni sekundarni glasnici u ćelijama.

Slični rezultati su dobijeni i u našim ispitivanjima, gde je pokazano da o-MWCNT indukuju značajno povećanje oksidativnog stresa u najvećim primenjenim koncentracijama

koje odgovaraju 50 µg/ml dap-MWCNT. Značajno manji oksidativni stres indukovano sa 50 µg/ml dap-MWCNT, se može objasniti činjenicom da dapson veže reaktivne COOH grupe na površinama o-MWCNT. Uzimajući u obzir centralnu ulogu redukovano GSH u redoks homeostazi ćelija, može se pretpostaviti da o-MWCNT smanjuje odnos GSH/GSSG u PMØ i indukuje prelazak ovih ćelija u prooksidativno stanje, zbog čega su one i mnogo osjetljivije na oštećenja indukovana reaktivnim vrstama kiseonika. Iako je pokazano da dapson ne menja značajno oksidativni stres kod PMØ tretiranih sa o-MWCNT, moguće je da pod izmenjenim uslovima unutar ćelija, dapson ispoljava citotoksični efekat posredstvom svojih metabolita, kao što je dapson-hidroksilamin. U skladu sa ovom hipotezom, Khan i sar. [767] su pokazali da dapson može biti konvertovan u dapson-hidroksilamin u prisustvu H₂O₂ koji se generiše u različitim procesima nakon aktivacije, kao što je oksidacija arahidonske kiseline pod dejstvom aktivacije COX2 u humanim keratinocitima. Činjenica da prooksidativni efekat o-MWCNT i dapsona ne postoji na 4°C, ukazuje na to da je povećanje ROS u PMØ metabolički indukovano. Naime, neaktivnost metaboličkih enzima na 4°C verovatno onemogućava konverziju netoksičnog dapsona u toksični dapson-hidroksilamin. Sa druge strane, odsustvo internalizacije o-MWCNT verovatno sprečava prooksidativni efekat slobodnih COOH grupa u interakciji sa drugim redoks enzimima.

Oksidativni prasak predstavlja ključni mehanizam makrofaga i granulocita, pogotovo u borbi protiv intracelularnih patogena [576, 768, 769]. Međutim, hronična produkcija ROS može dovesti do brojnih neželjenih efekata [576]. Naime, superoksid anjon radikal (O₂⁻), koji predstavlja direktan produkt NADPH oksidaze, se konvertuje u H₂O₂ posredstvom SOD, a zatim u HOCl pomoću MPO u prisustvu jona Cl. HOCl molekul je izuzetno toksičan i za mikrobe, ali i za tkiva domaćina. Još ranije je pokazano da dapson može reverzibilno inhibirati aktivnost MPO, i time smanjiti tkivna oštećenja [770-773], ali i njegov potencijalni antimikrobni efekat. Osim toga, pokazano je i da dapson deluje kao čistač oksidanasa, čime smanjuje indukciju H₂O₂, hidroksilnog radikala i singlet kiseonika [774]. Međutim, isti autori su pokazali da dapson može povećati ekstraćelijsku produkciju O₂⁻ od strane granulocita [774]. Ovo je u suprotnosti sa rezultatima koji su dobili Suda i sar.

[764], i Debol i sar. [775], koji su pokazali da dapson inhibira produkciju ROS od strane neutrofila nakon stimulacije sa fMLP [775] i C5a, ali ne i sa PMA [764]. Slično tome, pokazano je da dapson inhibira oksidativni prasak kod PMØ pacova nakon stimulacije zimozanom, ali isti efekat nije testiran nakon stimulusa sa PMA [776]. Suprotno ovim rezultatima, nekoliko studija je takođe pokazalo da dapson deluje kao prooksidans, a ne kao antioksidans [777, 778]. U kombinaciji sa ostalim anti-leproznim lekovima je pokazano da dapson potencira generisanje ROS i H₂O₂ *in vivo*, i time poboljšava funkciju fagocita [779]. Naizgled suprotni efekti dapsona na generisanje ROS su najverovatnije posledica različitih koncentracija koje su korišćene u navedenim studijama. Podaci ukazuju na to da veće koncentracije dapsona (>0.5 mM) deluju kao antioksidansi, i uklanjaju ekstracelularno produkovan O₂⁻, dok manje koncentracije mogu potencirati produkciju ovog radikala. U skladu rezultatima Debol i sar. [775] i Suda i sar. [764] dobijenim na neutrofilima, pokazali smo da solubilni dapson u koncentraciji od 7.5 µg/ml potencira formiranje ekstracelularnog O₂⁻ od strane PMØ indukovanog sa PMA, i deluje kao prooksidans intracelularno. PMA, kao agonist PKC, pokreće aktivaciju ekstracelularne i intracelularne NADPH oksidaze, [775, 780], a izgleda da dapson deluje na oba ova signalna puta [764] na dozno zavisani način.

Interesantno je to da dap-MWCNT ne modifikuju sposobnost PMØ da proizvode ROS intracelularno i ekstracelularno, iako je lokalno značajno povećana koncentracija ovog leka. Značaj ovakvog efekta dap-MWCNT u potencijalnoj u terapiji bolesti izazvanih intracelularnim mikrobima može biti u povećanju lokalne koncentracije leka, koji pri tome ne inhibira urođene mehanizme odbrane protiv intracelularnih patogena. Smanjenje sposobnosti PMØ da proizvode ROS nakon internalizacije o-MWCNT, je najverovatnije posledica smanjene vijabilnosti ovih ćelija. Pri tome, veće koncentracije dapsona mogu potencirati citotoksični efekat o-MWCNT, delujući kao prooksidans [765], kako je to ranije već diskutovano. Interesantno je to da male koncentracije dapsona mogu delimično oporaviti oksidativni prasak PMØ tretiranih sa o-MWCNT, što ukazuje da oksidativni status ćelije ključno određuje njeno preživljavanje i funkcionalni odgovor na stimulus.

5.3.5. Efekat dap-MWCNT produkciju NO i IL-6 od strane PMØ

Efekti CNT na produkciju citokina i aktivnih molekula od strane makrofaga su proučavani sa mnogo aspekata, a pre svega u cilju procene eventualnih nepoželjnih efekata nakon akcidentalne inhalacije [781]. Pri tome je važno posmatrati neto efekat na produkciju citokina, obzirom da detektovani nivoi citokina mogu biti posledica modulacije vijabilnosti ćelija koje ga proizvode, kao i direktnog imunomodulacijskog efekta materijala. Pokazano je da dugačke MWCNT aktiviraju NLRP3 inflamozom nakon internalizacije od strane humanih makrofaga, dok kratke MWCNT nemaju takav efekat [782]. Rezultat ove aktivacije je bila produkcija IL-1 β , produkcija ROS, izlazak katepsina B iz lizozoma u citoplazmu, i stimulacija P2X₇ receptora ekstracelularnog ATPa. Murphy i sar. [783] su pokazali da izlaganje dugih CNT makrofagima *in vitro* rezultuje povećanjem produkcije proinflamacijskih citokina (IL-1 β , TNF- α , IL-6 i IL-8) usled nemogućnosti da ih makrofagi fagocituju, a slični rezultati su potvrđeni *in vivo* od strane istih autora. Međutim, kao i u slučaju efekata CNT na vijabilnost, primarne i funkcionalizovane (-COOH) MWCNT se značajno razlikuju u sposobnosti da indukuju proinflamacijski odgovor makrofaga [784]. Naime, funkcionalizacija CNT značajno smanjuje uobičajeni proinflamacijski odgovor makrofaga na CNT, obzirom da je pokazano da disperzibilne SWCNT ne indukuju produkciju IL-6 i TNF- α od strane ovih ćelija. Osim toga, funkcionalizovane SWCNT, ne modifikuju odgovor mišijih makrofaga na kasniji tretman LPS-om [529]. Stoga je smanjenje spontane produkcije IL-6 i NO nakon tretmana sa o-MWCNT, ili o-MWCNT u kombinaciji sa ekvivalentnim koncentracijama dapsona, najverovatnije direktna posledica smanjena vijabilnosti PMØ. Za razliku od spontane produkcije ovih faktora, LPS indukuje povećanu produkciju NO [762] i IL-6 [785], pored toga što uvodi ove ćelije u apoptozu [762]. Pri tome se angažuju različiti signalni putevi koji uključuju ERK 1 i 2. Međutim kinetika aktivacije citokinske produkcije, zaustavljanja proliferacije i indukovanja apoptoze makrofaga preko ovih signalnih molekula se razlikuje [785]. U skladu sa tim, moguće je da je smanjena produkcija IL-6 pod uticajem većih koncentracija o-MWCNT, dap-MWCNT, i kombinacije o-MWCNT i dapsona, odraz balansa između aktivacije i apoptoze pod dejstvom LPS-a. Retki pojedinačni podaci pokazuju da produkcija IL-6, za razliku od IL-8,

od strane humanih epidermalnih keratinocita indukovanih BP180 antitelom, ne može da se inhibira dapsonom [786, 787]. Ovi rezultati su u skladu sa našima, obzirom da solubilni dapson nije modulirao produkciju IL-6 i NO od strane PMØ.

NO, predstavlja važan faktor u kontroli proliferacije intracelularnih patogena kao što je *Mycobacterium tuberculosis* i *M. leprae* [788]. Naime, antimikrobni odgovor IFN- γ -, TNF- α - ili GM-CSF-om stimuliranih mišijih i humanih makrofaga je blokiran u prisustvu NOS inhibitora [788-790]. Kod pacijenata sa leprom ili kutanom lešmainozom, smanjena tkivna ekspresija inducibilne NOS korelira sa težim oblikom bolesti [791-793]. Osim toga, kod pacijenata inficiranih *Plasmodium falciparum*, smrt usled cerebralne malarije korelira sa niskom ekspresijom iNOS kod perifernih mononukleara krvi, i visokom ekspresijom ovog enzima u mozgu [794-796]. U tom smislu je dobro što dap-MWCNT ne smanjuje produkciju NO od strane PMØ nakon 24 sata kulture. Efikasan odgovor makrofaga protiv intracelularnih patogena, kao što je *M. tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania donovani* i *Lgionella pneumophila*, zahteva visoku produkciju IFN- γ od strane Th1 ćelija. Nedavno je pokazano da IL-6 koji proizvode makrofagi inficirani sa *M. tuberculosis*, inhibiraju odgovore neinficiranih makrofaga na IFN- γ , čime se smanjuje ukupan odgovor na ovaj patogen [797]. Osim toga, IL-6 proizveden od strane makrofaga inficiranih sa različitim vrstama roda *Mycobacterium* suprimiraju T ćelijski odgovor [798]. Stimulacija produkcije IL-6 od strane nestimuliranih PMØ koji su tretirani dap-MWCNT, bi se mogla tumačiti kao nepoželjan efekat ovog konjugata. Međutim, tokom infekcije, PMØ skoro nikada nisu u nestimulisanom stanju već su aktivirani brojnim lokalnim TLR ligandima i proinflamacijskim citokinima, a pokazali smo da u ovim uslovima dap-MWCNT inhibira produkciju IL-6. Stoga bi inhibicija produkcije IL-6 od strane stimuliranih PMØ nakon tretmana sa dap-MWCNT, bilo usled smanjene vijabilnosti PMØ ili direktnog imunomodulacijskog delovanja, bila poželjna u terapiji infekcija izazvanih vrstama roda *Mycobacterium*. Da bi se odgovorilo na pitanje da li su efekti konjugata dap-MWCNT poželjni ili nepoželjni u terapiji infekcija izazvanih intracelularnim patogenima, osim samih makrofaga, neophodno je ispitati i efektne ovog konjugata na inficirane makrofage i na njihov odnos prema Th1 ćelijama.

5.3.6. Imunomodulacijski efekat dap-MWCNT na nezrele DC

Pokazali smo da se dapson konjugovan za MWCNT efikasno doprema do endozoma PMØ i DC, gde potencijalno može imati korisna antimikrobna i imunomodulacijska dejstva u borbi protiv intracelularnih parazita, kao što je *Micobacterium leprae*. DC i makrofage predstavljaju ključne ćelije u borbi protiv infekcije *Mycobacterium tuberculosis*-om, [799], *M. leprae*, *Plasmodium falciparum*-om [800], i drugim intracelularnim parazitima, gde je za uspešnu odbranu neophodna precizna koordinacija između ćelijske adaptivne i urođene imunosti. Na mestu infekcije, DC mogu preuzeti vrste roda *Mycobacterium*, obraditi antigene i prezentovati ih naivnim T ćelijama u lokalnom limfnom čvoru, indukujući pri tome njihovu diferencijaciju u Th1 pravcu [801-803]. Međutim, pokazano je da neki sojevi *M. tuberculosis* inhibiraju sazrevanje DC, koje tada proizvode IL-10, imaju slab imunostimulacijski kapacitet i sposobnost da indukuju specifičan T ćelijski odgovor [804]. Slično tome, imunski odgovor koji se razvija na *M. leprae*, može dovesti do razvijanja lepromatozne lepre karakteristične po sistemskej diseminaciji infekcije i lezija posredovanih humoralnom imunošću i Th2 citokinima. Sa druge strane, efikasna borba protiv ovog patogena je posredovana Th1 ćelijama i uključuje razvoj tuberkuloznog oblika lepre, koji se karakteriše lokalizacijom infekcije i formiranjem granuloma. Obzirom da DC predstavljaju ključne ćelije u kontroli imunskog odgovora protiv navedenih patogena sledeći cilj je bio ispitati imunomodulatorne efekte dap-MWCNT u kulturi DC.

U ovim ispitivanjima su korišćene nezrele DC, i DC stimulisane proinflamacijskim citokinima (IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE-2) koji se inače proizvode u toku infekcije intracelularnim mikrobima od strane DC i makrofaga [805]. Naši rezultati ukazuju na to da bi u slučaju infekcije intracelularnim mikrobom, konjugat dap-MWCNT je imao bolje imunomodulacijske efekte od solubilnog dapsona primenjenog u ekvivalentnoj koncentraciji. Naime, pokazali smo da solubilni dapson menja morfologiju DC i indukuje nastanak fenotipa koji je sličan makrofagima, obzirom da svetlosnom mikroskopijom i protočnom citometrijom uočena veća granuliranost DC tretiranih dapsonom u odnosu na kontrolne DC. U skladu sa tim smo pokazali da dapson značajno inhibira ekspresiju HLA-DR od strane nezrelih DC, za razliku od dap-MWCNT. Ovi rezultati ukazuju da dapson

može imati nepoželjne immunosupresivne efekte posredovane DC, sprečavajući efikasnu prezentaciju antigena T limfocitima. U skladu sa ovom hipotezom, još ranije je pokazano da limfociti životinja tretiranih dapsonom slabo proliferišu na stimulaciju mitogenima, a slično je pokazano i u *in vitro* modelu humanih PBMC [806]. Pri tome treba uzeti u obzir i činjenicu da u ovim modelima proliferacije ključnu ulogu imaju APC, a pre svega DC, obzirom da se njihovom deplecijom gubi efekat mitogena [571]. Prema našim saznanjima, trenutno nema podataka o direktnom imunomodulacijskom dejstvu dapsona na DC, a naši neobjavljeni rezultati potvrđuju da dapson na dozno zavisani način smanjuje fenotipsku maturaciju i funkcije DC.

Za razliku od solubilnog dapsona, dap-MWCNT imaju stimulatorni efekat na ekspresiju ICAM-1 (CD54). ICAM-1 se već duže smatra kostimulatornim molekulom DC, a ne samo adhezivnim molekulom uključenim u stvaranje sinapse sa T limfocitima. Naime, Dubey i sar. [807] su pokazali da naivni CD4 T limfociti transgenih miševa, čiji TCR prepoznaje I-E^k kompleks MHC-peptida, proliferišu u velikoj meri kada se kao stimulator koriste APC čiji MHC sadže peptid, a koje ispoljavaju samo ICAM-1, ali ne i CD86. Posebno je istaknuta uloga ovog molekula u aktivaciji naivnih T ćelija posredstvom egzozoma koje proizvode aktivirane DC i prenose antigen prezentujuću funkciju B limfocitima u limfnom čvoru [808]. Ovi autori su pokazali da su egzozomi koji nose MHC-peptid i ICAM-1, ali ne i CD80 ili CD86, ključni za imunogenost egzozoma *in vitro*. Stoga se može očekivati da bi u prisustvu stimulusa poreklom od patogena, DC tretirane sa dap-MWCNT imale bolju imunogenu sposobnost od DC tretiranih solubilnim dapsonom. Čak i nakon oslobađanja dapsona sa MWCNT, ovaj stimulatorni efekat na maturaciju DC bi najverovatnije opstao, obzirom da o-MWCNT, same ili u kombinaciji sa dapsonom, stimulišu ekspresiju ICAM-1 i HLA-DR.

Nezrele DC očekivano ne proizvode visok nivo IL-12p70, obzirom da su za stimulaciju njegove produkcije potrebni dodatni stimulusi, kao što je aktivacija preko TLR [100]. Slično je pokazano i za produkciju IL-10, antiinflamacijskog citokina [625], čija je produkcija stimulirana angažovanjem TLR i proinflamacijskim citokinima [809-811]. Dap-MWCNT nema značajan efekat na produkciju citokina od strane nezrelih DC. Suprotno

tome, o-MWCNT, zajedno sa dapsonom, ispoljavaju stimulatorni efekat na produkciju IL-23. Pored toga, smo pokazali da kombinacija ova agensa indukuje povećanu ekspresiju IL-27, dok same o-MWCNT i sam dapson nemaju takav efekat. IL-23 i IL-27 su citokini IL-12 familije [718], pri čemu IL-23 (p19/p40) podržava produkciju IL-17 od strane Th17 ćelija [631], dok IL-27 (p28/EBI3) stimuliše IFN- γ i IL-10 od strane T ćelije, a istovremeno inhibira produkciju IL-17 [624]. U osnovi ovog fenomena najverovatnije leži sposobnost o-MWCNT i dapsona da indukuju oksidativni stres ćelija, kako je potvrđeno u eksperimentima na PM \emptyset [742]. Naime, pokazano je da ROS predstavlja važan aktivator NF-kB u odgovoru na različite stimulse [123]. Na primer, aktivacija NF-kB angažovanjem CD28 molekula T limfocita, aktivira 5-lipooksigenazu koja generiše ROS i aktivira NF-kB [812], a slično je pokazano i kod aktivacije NF-kB indukovanih virusima [813]. U skladu sa ovim, Inoue i sar. [814] su pokazali da SWCNT dispergovane deterdžentom indukuju oksidativni stres i porast nivoa IL-23 u serumu životinja inhaliranih ovim nanocevima, i indukuju delimičnu maturaciju/funkciju DC poreklom iz kostne srži *in vitro*. Ovi autori su zaključili da SWCNT mogu dovesti do egzacerbacije inflamacije disajnih puteva aktivacijom Th17 imunskog odgovora i indukcijom oksidativnog stresa, što je delimično posledica neodgovarajuće aktivacije DC. Obzirom da nekontrolisan Th17 imunski odgovor, koji je podržan visokom produkcijom IL-23 [624], može dovesti do autoimunosti [718], može se zaključiti da je efekat o-MWCNT i dapsona na produkciju IL-23 nepoželjan. Ovo dodatno potvrđuje i činjenica da, u poređenju sa Th1 odgovorom, IL-23 i IL-17 imaju mali efekat na kontrolu imunskog odgovora protiv intracelularnih bakterija kao što je *M. tuberculosis*, ali predstavljaju ključne faktore koji dovode do oštećenja tkiva [815]. Za razliku od o-MWCNT i dapsona, dap-MWCNT ne stimulišu produkciju IL-23, što se može smatrati kao povoljan efekat ovog konjugata. IL-27 je ključni citokin u regulaciji preteranog Th17 odgovora [631]. Uzimajući u obzir da kombinacija dapsona i o-MWCNT stimuliše apoptozu DC u primenjenim koncentracijama, može se očekivati da bi stimulacija produkcije IL-23 u ovim kulturama bila i veća od izmerene. Stoga je moguće da je povećana produkcija IL-23 i oksidativni stres DC pod dejstvom kombinacije o-MWCNT i dapsona, doveo do aktivacije negativne povratne sprege i aktivacije anti-inflamatornih mehanizama povećanjem produkcije IL-27. Pri tome je važna i činjenica da apoptotske

ćelije imaju ključne anti-inflamacijske efekte na DC i moduliraju ekspresiju citokina IL-12 familije od strane ovih ćelija [816]. IL-27 je ključan u borbi protiv intracelularnih parazita kao što su vrste roda *Mycobacterium* [817, 818] i *Lysteria monocitogenes* [819], pre svega zahvaljujući sposobnosti da inhibira Th17 odgovor, a pokrene Th1 [718]. U tom smislu je neophodno ispitati da li bi dap-MWCNT, nakon produžene inkubacije sa DC i potencijalne razgradnje na o-MWCNT i dapson, takođe imale stimulatoran efekat na produkciju IL-27, i time dodatno doprinele boljem antimikrobnom dejstvu ovog konjugata.

5.3.7. Imunomodulacijski efekti dap-MWCNT na DC u proinflamacijskom citokinskom miljeu

Vrlo interesantni rezultati su dobijeni za imunomodulacijske efekte dap-MWCNT u proinflamacijskom citokonskom miljeu (IL-1 β , IL-6, TNF- α i PGE-2) kakav može postojati u toku infekcije intracelularnim mikrobima [805]. Naime dap-MWCNT u sadejstvu sa proinflamacijskim citokinima, indukuju povećanu ekspresiju CD86 kostimulatora, ali su istovremeno inhibiraju ekspresiju CCR7 od strane DC. CCR7 je ključan molekul koji vezuje CCL21, ispoljen na endotelnim ćelijama limfnih sudova, i CCL19, ispoljen u T ćelijskim zonama limfnog čvora [124, 125], što omogućava migraciju ovih ćelija u limfni čvor i prezentaciju antigena T limfocitima. Migracija DC u limfni čvor predstavlja i opasnost za diseminaciju infekcije. Ovo potvrđeno puno puta u slučaju virusnih infekcija (HIV-1 i CMV), a pretpostavlja se da isti mehanizmi mogu igrati važnu ulogu i kod diseminacije bakterijskih patogena kakvi su *Mycobacterium* i *Leishmania*, obzirom da i ovi patogeni koriste isti mehanizam ulaska u DC preko DC-SIGN, čime izbegavaju odgovarajući imunski odgovor [820]. U tom kontekstu bi DC tretirane dap-MWCNT ostale na mestu infekcije i imale ulogu efektorskih ćelija koje stimulišu sekundarni imunski odgovor kostimulacijom preko CD86, a pri tome bi se smanjila opasnost od diseminacije infekcije.

Stoga bi inhibitorni efekti dap-MWCNT i solubilnog dapsona na produkciju anti-inflamacijskih citokina IL-10 i IL-27, bez povećanja produkcije IL-23, mogli biti značajni

za efikasnu borbu protiv intracelularnih patogena na mestu infekcije. Međutim, ni dapson ni MWCNT nisu indukovali produkciju IL-12 u prisustvu proinflamacijskog koktela, što je neophodno za efikasno usmeravanje imunskog odgovora u Th1 i uspešne borbe protiv intracelularnih mikroba. Mogući razlog ovome je nedostatak odgovarajuće kombinacije TLR agonista za stimulaciju DC u našem eksperimentalnom modelu, koji pored proinflamacijskog koktela, čine neizostavan faktor infekcije intracelularnim mikrobima [821]. U tom smislu smo još ranije pokazali da proinflamacijski koktel ne stimuliše produkciju IL-12 od strane DC, i Th1 polarizaciju imunskog odgovora toliko dobro koliko ga stimulišu kombinacija TLR3 i TLR4 agonista, ili kombinacijom agonista TLR3 i C-tipa lektina [731]. Stoga bi u narednim ispitivanjima trebalo proveriti kakav je imunomodulacijski efekat dap-MWCNT na DC stimulisane TLR agonistima ili samim patogenima. Pored toga, dostava TLR agonista preko MWCNT bi mogla dodatno stimulisati sazrevanje i funkcije DC, što bi potencijalno prevazišlo probleme koji se odnose na produkciju IL-12 od strane ovih ćelija.

6. ZAKLJUČCI

6.1. BOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULACIJSKE OSOBINE CuAlNi I NiTi LEGURA

Napredni biomaterijali koji pamte oblik, izrađeni od CuAlNi i NiTi legura metodom brzog otvrdnjavanja (RS), su biokompatibilni ali menjaju imunski odgovor in vitro u zavisnosti od njihovog sastava, površinske mikrostrukture i modela biološkog ispitivanja. Ovaj zaključan potvrđuju sledeći ključni rezultati:

1) CuAlNi i NiTi RS trake koje pamte oblik, za razliku od kontrolnih legura istog sastava pripremljenih konvencionalnim metodama,

- ne indukuju nekrozu ni apoptozu L929 ćelija, timocita i PMØ pacova i humanih PBMC
- ne dovode do oksidativnog stresa PMØ pacova
- ne stimulišu produkciju proinflamacijskih citokina od strane PMØ, i najvećeg broja kultura humanih PBMC

2) Biokompatibilnost naprednih biomaterijala je posledica

- veće otpornosti na koroziju i sledstvenog manjeg oslobađanja metalnih jona sa površine legura
- formiranja Ti-oksidnog sloja na površini NiTi RS legura koje pamte oblik

3) NiTi RS trake koje pamte oblik

- aktiviraju humane DC u direktnom kontaktu, što je pokazano na osnovu fenotipske i SEM analize
- pojačavaju tolerogene osobine nezrelih DC stimulacijom produkcije IL-10 i TGF-β od strane CD4⁺T limfocita u kokulturi
- pojačavaju Th1 polarizacioni potencijal DC u prisustvu LPS-a, a inhibiraju Th17 i Th2 odgovor.

6.2. BOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULACIJSKE OSOBINE NANOČESTICA ZLATA

Nanočestice zlata ne ispoljavaju citotoksičnost, ali menjaju imunski odgovor *in vitro* u zavisnosti od načina njihove pripreme i veličine. Ovaj zaključak potkrepljuju sledeći ključni rezultati:

1) Nanočestice zlata proizvedene USP metodom iz recikliranog zlatnog nakita

- ne indukuju nekrozu ili apoptozu L929 ćelija, timocita i splenocita pacova, ako nisu kontaminirane legirajućim metalima iz nakita
- deluju anti-proliferativno i imunosupresivno u kulturi splenocita pacova stimuliranih pomoću ConA

2) Hemijski sintetisane nanočestice zlata, u prisustvu LPS-a, ili oslobođene iz nekrotičnih tumorskih ćelija

- inhibiraju fenotipsku maturaciju i alostimulatornu sposobnost DC
- modulišu produkciju citokina i Th polarizacionu sposobnost DC
- smanjuju sposobnost DC da stimulišu citotoksične T limfocite prema tumorskim ćelijama

3) Snažniji imunosupresivni efekat manjih nanočestice zlata u odnosu na veće nanočestice zlata, je povezan sa

- brojem akumuliranih čestica i njihovom distribucijom unutar DC
- snažnijim efektima na Ca^{2+} signalizaciju unutar DC
- stimulacijom produkcije imunosupresivnih citokina u kokulturi DC i $CD3^{+}T$ limfocita

6.3. BOKOMPATIBILNOST I IMUNOMODULACIJSKE OSOBINE FUNKCIONALIZOVANIH UGLJENIČNIH NANOCEVI

Biokompatibilnost ugljeničnih nanocevi se pospešuje funkcionalizacijom, ali njihov imunobiološki efekat zavisi od vrste biomolekula koji je za njih kovalentno vezan. Ovaj zaključak potkrepljuju sledeći ključni rezultati:

1) Oksidacija MWCNT omogućava

- njihovu veću disperziju u vodenim rastvorima
- smanjenje koncentracije metalnih jona u uzorcima MWCNT
- konjugaciju dapsonom i 7-TOG agonistom

2) MWCNT konjugovane dapsonom se internalizuju u istoj meri kao i oksidovane MWCNT od strane DC i PMØ. Međutim, za razliku od oksidovanih MWCNT i solubilnog dapsona, MWCNT konjugovane dapsonom

- ne ispoljavaju citotoksičnost u kulturi PMØ i DC
- ne utiču na oksidativni stres, oksidativni prasak i produkciju IL-6 i NO od strane PMØ
- ne utiču na sazrevanje i produkciju citokina od strane nezrelih DC
- inhibiraju ekspresiju CCR7 i stimulišu ekspresiju CD86 od strane DC u prisustvu proinflamacijskih citokina

3) Funkcionalizacija MWCNT 7-TOG agonistom omogućava

- bolju internalizaciju ovog konjugata od strane DC, u odnosu na o-MWCNT
- interakciju 7-TOG sa TLR7 u endozomu DC

Literatura

1. Balać I, Bugarski B, Ćosić I, Dramićanin M, Đorđević D, et al. (2010) Biomaterijali. Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti.
2. Williams DF (2009) On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 30: 5897-5909.
3. Jain KK (2012) *The handbook of nanomedicine*. Springer.
4. Williams D (2008) The relationship between biomaterials and nanotechnology. *Biomaterials* 29: 1737-1738.
5. Williams DF (2008) On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 29: 2941-2953.
6. Williams DF (1987) Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials, Chester, England, March 3-5, 1986. Elsevier Science Ltd.
7. Williams DF (1999) *The Williams dictionary of biomaterials*. Liverpool University Press.
8. Porter J and Von Fraunhofer J (2004) Success or failure of dental implants? A literature review with treatment considerations. *General dentistry* 53: 423-432; quiz 433, 446.
9. Montanaro L, Campoccia D and Arciola CR (2007) Advancements in molecular epidemiology of implant infections and future perspectives. *Biomaterials* 28: 5155-5168.
10. Gorbet MB and Sefton MV (2005) Endotoxin: the uninvited guest. *Biomaterials* 26: 6811-6817.
11. Stopić S, Rudolf R, Bogović J, Majerić P, Colić M, et al. (2013) SYNTHESIS OF Au NANOPARTICLES PREPARED WITH ULTRASONIC SPRAY PYROLYSIS AND HYDROGEN REDUCTION. *Materiali in tehnologije* 47: 577-583.
12. Mehrabi K, Bruncko M, McKay B and Kneissl A (2009) Influence of quenching rates on equiatomic NiTi ribbons fabricated by melt-spinning. *Journal of materials engineering and performance* 18: 475-478.
13. Williams DF (2003) *The inert-bioactivity conundrum*. CRC Press, FL, USA.
14. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI and Percy MJ (2005) Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue engineering* 11: 1-18.
15. Gorbet MB and Sefton MV (2004) Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials* 25: 5681-5703.
16. Schmaier A (1997) Contact activation: a revision. *Thrombosis and haemostasis* 78: 101-107.
17. Zhuo R, Siedlecki CA and Vogler EA (2006) Autoactivation of blood factor XII at hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Biomaterials* 27: 4325-4332.
18. Sperling C, Fischer M, Maitz MF and Werner C (2009) Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes. *Biomaterials* 30: 4447-4456.

19. Fischer M, Sperling C and Werner C (2010) Synergistic effect of hydrophobic and anionic surface groups triggers blood coagulation in vitro. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21: 931-937.
20. Heemskerk JW, Bevers EM and Lindhout T (2002) Platelet activation and blood coagulation. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART*- 88: 186-194.
21. Johne J, Blume C, Benz PM, Pozgajova M, Ullrich M, et al. (2006) Platelets promote coagulation factor XII-mediated proteolytic cascade systems in plasma. *Biological chemistry* 387: 173-178.
22. Hu W-J, Eaton JW, Ugarova TP and Tang L (2001) Molecular basis of biomaterial-mediated foreign body reactions. *Blood* 98: 1231-1238.
23. Tang L (1998) Mechanisms of fibrinogen domains: biomaterial interactions. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 9: 1257-1266.
24. Nilsson B, Ekdahl KN, Mollnes TE and Lambris JD (2007) The role of complement in biomaterial-induced inflammation. *Molecular immunology* 44: 82-94.
25. Lhotta K, Würzner R, Kronenberg F, Oppermann M and König P (1998) Rapid activation of the complement system by cuprophane depends on complement component C4. *Kidney international* 53: 1044-1051.
26. Hed J, Johansson M and Lindroth M (1984) Complement activation according to the alternate pathway by glass and plastic surfaces and its role in neutrophil adhesion. *Immunology letters* 8: 295-299.
27. Sarma JV and Ward PA (2011) The complement system. *Cell and tissue research* 343: 227-235.
28. Keselowsky BG, Bridges AW, Burns KL, Tate CC, Babensee JE, et al. (2007) Role of plasma fibronectin in the foreign body response to biomaterials. *Biomaterials* 28: 3626-3631.
29. McNally AK, Jones JA, MacEwan SR, Colton E and Anderson JM (2008) Vitronectin is a critical protein adhesion substrate for IL-4-induced foreign body giant cell formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 86: 535-543.
30. Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: 673-687.
31. Lowell CA and Berton G (1999) Integrin signal transduction in myeloid leukocytes. *Journal of leukocyte biology* 65: 313-320.
32. Jenney CR and Anderson JM (2000) Adsorbed serum proteins responsible for surface dependent human macrophage behavior. *Journal of biomedical materials research* 49: 435-447.
33. McNally A and Anderson J (1994) Complement C3 participation in monocyte adhesion to different surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 10119-10123.

34. Werr J, Eriksson EE, Hedqvist P and Lindbom L (2000) Engagement of β 2 integrins induces surface expression of β 1 integrin receptors in human neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 68: 553-560.
35. McNally AK and Anderson JM (2002) β 1 and β 2 integrins mediate adhesion during macrophage fusion and multinucleated foreign body giant cell formation. *The American journal of pathology* 160: 621-630.
36. Bianchi ME (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology* 81: 1-5.
37. Bennewitz NL and Babensee JE (2005) The effect of the physical form of poly (lactic-co-glycolic acid) carriers on the humoral immune response to co-delivered antigen. *Biomaterials* 26: 2991-2999.
38. Grandjean-Laquerriere A, Tabary O, Jacquot J, Richard D, Frayssinet P, et al. (2007) Involvement of toll-like receptor 4 in the inflammatory reaction induced by hydroxyapatite particles. *Biomaterials* 28: 400-404.
39. Rogers TH and Babensee JE (2010) Altered adherent leukocyte profile on biomaterials in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biomaterials* 31: 594-601.
40. Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C and DeLeo FR (2005) Neutrophils in the innate immune response. *ARCHIVUM IMMUNOLOGIAE ET THERAPIAE EXPERIMENTALIS-ENGLISH EDITION*- 53: 505.
41. Tang L, Jennings TA and Eaton JW (1998) Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 8841-8846.
42. Zdolsek J, Eaton JW and Tang L (2007) Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans. *J Transl Med* 5: 31-36.
43. Nimeri G, Öhman L, Elwing H, Wetterö J and Bengtsson T (2002) The influence of plasma proteins and platelets on oxygen radical production and F-actin distribution in neutrophils adhering to polymer surfaces. *Biomaterials* 23: 1785-1795.
44. Nimeri G, Majeed M, Elwing H, Öhman L, Wetterö J, et al. (2003) Oxygen radical production in neutrophils interacting with platelets and surface-immobilized plasma proteins: Role of tyrosine phosphorylation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 67: 439-447.
45. Labow RS, Meek E and Santerre JP (2001) Neutrophil-mediated biodegradation of medical implant materials. *Journal of cellular physiology* 186: 95-103.

46. Patel JD, Krupka T and Anderson JM (2007) iNOS-mediated generation of reactive oxygen and nitrogen species by biomaterial-adherent neutrophils. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 80: 381-390.
47. Yamashiro S, Kamohara H, Wang J-M, Yang D, Gong W-H, et al. (2001) Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *Journal of leukocyte biology* 69: 698-704.
48. Gilroy DW (2004) The endogenous control of acute inflammation—from onset to resolution. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 1: 313-319.
49. Kou PM and Babensee JE (2011) Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 96: 239-260.
50. Hamilton JA (2003) Nondisposable materials, chronic inflammation, and adjuvant action. *Journal of leukocyte biology* 73: 702-712.
51. Jones JA, Chang DT, Meyerson H, Colton E, Kwon IK, et al. (2007) Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 83: 585-596.
52. Broughton 2nd G, Janis JE and Attinger CE (2006) The basic science of wound healing. *Plastic and reconstructive surgery* 117: 12S-34S.
53. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, et al. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25: 677-686.
54. Mosser DM and Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* 8: 958-969.
55. Franz S, Rammelt S, Scharnweber D and Simon JC (2011) Immune responses to implants—a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials* 32: 6692-6709.
56. Mackaness G (1977) Cellular immunity and the parasite. *Immunity to Blood Parasites of Animals and Man*. Springer. pp. 65-73.
57. O'Shea JJ and Murray PJ (2008) Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28: 477-487.
58. Dale DC, Boxer L and Liles WC (2008) The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood* 112: 935-945.

59. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, et al. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640-643.
60. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM and Stockinger B (2006) TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24: 179-189.
61. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, et al. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-238.
62. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, et al. (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine* 201: 233-240.
63. Mariani TJ, Sandefur S, Roby JD and Pierce RA (1998) Collagenase-3 induction in rat lung fibroblasts requires the combined effects of tumor necrosis factor- α and 12-lipoxygenase metabolites: a model of macrophage-induced, fibroblast-driven extracellular matrix remodeling during inflammatory lung injury. *Molecular biology of the cell* 9: 1411-1424.
64. Xia Z and Triffitt JT (2006) A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomedical Materials* 1: R1.
65. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, et al. (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *Journal of Clinical Investigation* 101: 890.
66. Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G and Eichmann K (1995) Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH 1 and TH 2 cytokines. *European journal of immunology* 25: 1101-1104.
67. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA and Mosser DM (2006) Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Journal of leukocyte biology* 80: 1298-1307.
68. Rhoads JE (1983) *Cancer—Principles & Practice of Oncology*. *Annals of Surgery* 197: 116.
69. Gallagher I, Nair MG, Zang X, Brombacher F, Mohrs M, et al. (2007) Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4⁺ T cells to be sustained during chronic infection. *The Journal of immunology* 179: 3926-3936.
70. Reese TA, Liang H-E, Tager AM, Luster AD, Van Rooijen N, et al. (2007) Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* 447: 92-96.

71. Kreider T, Anthony RM, Urban Jr JF and Gause WC (2007) Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Current opinion in immunology* 19: 448-453.
72. Cordeiro-da-Silva A, Tavares J, Araújo N, Cerqueira F, Tomás A, et al. (2004) Immunological alterations induced by polyamine derivatives on murine splenocytes and human mononuclear cells. *International immunopharmacology* 4: 547-556.
73. Anthony RM, Urban JF, Alem F, Hamed HA, Rozo CT, et al. (2006) Memory TH2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nature medicine* 12: 955-960.
74. Zhao A, Urban Jr JF, Anthony RM, Sun R, Stiltz J, et al. (2008) Th2 cytokine-induced alterations in intestinal smooth muscle function depend on alternatively activated macrophages. *Gastroenterology* 135: 217-225. e211.
75. Kzhyshkowska J, Mamidi S, Gratchev A, Kremmer E, Schmuttermaier C, et al. (2006) Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway. *Blood* 107: 3221-3228.
76. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, et al. (2001) Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *The Journal of immunology* 167: 6533-6544.
77. Mosser DM (2003) The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology* 73: 209-212.
78. Gerber JS and Mosser DM (2001) Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fcγ receptors. *The Journal of immunology* 166: 6861-6868.
79. DeFife KM, Jenney CR, McNally AK, Colton E and Anderson JM (1997) Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression. *The Journal of immunology* 158: 3385-3390.
80. Kao WJ, McNally AK, Hiltner A and Anderson JM (1995) Role for interleukin-4 in foreign-body giant cell formation on a poly (etherurethane urea) in vivo. *Journal of biomedical materials research* 29: 1267-1275.
81. McNally AK and Anderson JM (1995) Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *The American journal of pathology* 147: 1487.

82. Brodbeck WG, MacEwan M, Colton E, Meyerson H and Anderson JM (2005) Lymphocytes and the foreign body response: lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and fusion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 74: 222-229.
83. Kyriakides TR, Foster MJ, Keeney GE, Tsai A, Giachelli CM, et al. (2004) The CC chemokine ligand, CCL2/MCP1, participates in macrophage fusion and foreign body giant cell formation. *The American journal of pathology* 165: 2157-2166.
84. Xia Z, Zhu T, Du J, Zheng Q, Wang L, et al. (1994) Macrophages in degradation of collagen/hydroxylapatite (CHA), beta-tricalcium phosphate ceramics (TCP) artificial bone graft. An in vivo study. *Chinese medical journal* 107: 845-849.
85. Luttkhuizen DT, van Amerongen MJ, de Feijter PC, Petersen AH, Harmsen MC, et al. (2006) The correlation between difference in foreign body reaction between implant locations and cytokine and MMP expression. *Biomaterials* 27: 5763-5770.
86. MacLauchlan S, Skokos EA, Meznarich N, Zhu DH, Raoof S, et al. (2009) Macrophage fusion, giant cell formation, and the foreign body response require matrix metalloproteinase 9. *Journal of leukocyte biology* 85: 617-626.
87. Zambuzzi WF, Paiva KB, Menezes R, Oliveira RC, Taga R, et al. (2009) MMP-9 and CD68+ cells are required for tissue remodeling in response to natural hydroxyapatite. *Journal of molecular histology* 40: 301-309.
88. Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Politz O, Orfanos C, et al. (2001) Alternatively Activated Macrophages Differentially Express Fibronectin and Its Splice Variants and the Extracellular Matrix Protein β IG-H3. *Scandinavian journal of immunology* 53: 386-392.
89. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Utikal J and Goerdts S (2005) Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodelling and phagocytosis in type-2 macrophages. *Scandinavian journal of immunology* 61: 10-17.
90. Rodriguez A, Meyerson H and Anderson JM (2009) Quantitative in vivo cytokine analysis at synthetic biomaterial implant sites. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 89: 152-159.
91. Eming SA, Krieg T and Davidson JM (2007) Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *Journal of investigative dermatology* 127: 514-525.
92. Ratner BD and Bryant SJ (2004) Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng* 6: 41-75.

93. Smetana K, Vacík J, Houska M, Součková D and Lukáš J (1993) Macrophage recognition of polymers: effect of carboxylate groups. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 4: 526-529.
94. Brodbeck W, Nakayama Y, Matsuda T, Colton E, Ziats N, et al. (2002) Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro. *Cytokine* 18: 311-319.
95. Brodbeck WG, Voskerician G, Ziats NP, Nakayama Y, Matsuda T, et al. (2003) In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 64: 320-329.
96. Schulte VA, Díez M, Möller M and Lensen MC (2009) Surface topography induces fibroblast adhesion on intrinsically nonadhesive poly (ethylene glycol) substrates. *Biomacromolecules* 10: 2795-2801.
97. Andersson A-S, Bäckhed F, von Euler A, Richter-Dahlfors A, Sutherland D, et al. (2003) Nanoscale features influence epithelial cell morphology and cytokine production. *Biomaterials* 24: 3427-3436.
98. Steinman RM and Cohn ZA (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* 137: 1142-1162.
99. Steinman RM and Banchereau J (2007) Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449: 419-426.
100. Banchereau J and Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.
101. Shortman K and Liu Y-J (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunology* 2: 151-161.
102. Shortman K and Naik SH (2007) Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature Reviews Immunology* 7: 19-30.
103. León B, López-Bravo M and Ardavin C (2005) Monocyte-derived dendritic cells. *Seminars in immunology*. Elsevier. pp. 313-318.
104. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kämpgen E, et al. (1996) Generation of mature dendritic cells from human blood an improved method with special regard to clinical applicability. *Journal of immunological methods* 196: 137-151.

105. Zhou L-J and Tedder TF (1996) CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 2588-2592.
106. Chomarat P, Banchereau J, Davoust J and Palucka AK (2000) IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature immunology* 1: 510-514.
107. Steinman RM, Hawiger D and Nussenzweig MC (2003) Tolerogenic dendritic cells*. *Annual review of immunology* 21: 685-711.
108. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, et al. (2000) BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *The Journal of immunology* 165: 6037-6046.
109. Huysamen C, Willment JA, Dennehy KM and Brown GD (2008) CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3⁺ dendritic cells and a subset of monocytes. *Journal of Biological Chemistry* 283: 16693-16701.
110. Schäkel K, Kannagi R, Kniep B, Goto Y, Mitsuoka C, et al. (2002) 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity* 17: 289-301.
111. Pulendran B, Palucka K and Banchereau J (2001) Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science* 293: 253-256.
112. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, et al. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* 18: 767-811.
113. Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart BA and van Kooyk Y (2004) Self-and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 22: 33-54.
114. Boruchov AM, Heller G, Veri M-C, Bonvini E, Ravetch JV, et al. (2005) Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *Journal of Clinical Investigation* 115: 2914-2923.
115. Vukcevic M, Zorzato F, Spagnoli G and Treves S (2010) Frequent calcium oscillations lead to NFAT activation in human immature dendritic cells. *J Biol Chem* 285: 16003-16011.
116. Lewis RS (2003) Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. *Biochem Soc Trans* 31: 925-929.
117. Kawano S, Otsu K, Kuruma A, Shoji S, Yanagida E, et al. (2006) ATP autocrine/paracrine signaling induces calcium oscillations and NFAT activation in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* 39: 313-324.

118. Sauer H, Hofmann C, Wartenberg M, Wobus AM and Hescheler J (1998) Spontaneous calcium oscillations in embryonic stem cell-derived primitive endodermal cells. *Exp Cell Res* 238: 13-22.
119. Trinchieri G and Sher A (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Reviews Immunology* 7: 179-190.
120. Garrett WS, Chen L-M, Kroschewski R, Ebersold M, Turley S, et al. (2000) Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* 102: 325-334.
121. Bagley KC, Abdelwahab SF, Tuskan RG and Lewis GK (2004) Calcium signaling through phospholipase C activates dendritic cells to mature and is necessary for the activation and maturation of dendritic cells induced by diverse agonists. *Clin Diagn Lab Immunol* 11: 77-82.
122. Rao A (1994) NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today* 15: 274-281.
123. Baeuerle PA and Henkel T (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141-179.
124. Cravens PD and Lipsky PE (2002) Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. *Immunology and cell biology* 80: 497-505.
125. Riol-Blanco L, Sánchez-Sánchez N, Torres A, Tejedor A, Narumiya S, et al. (2005) The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *The Journal of immunology* 174: 4070-4080.
126. Mahnke K, Bhardwaj RS, Luger TA, Schwarz T and Grabbe S (1996) Interaction of murine dendritic cells with collagen up-regulates allostimulatory capacity, surface expression of heat stable antigen, and release of cytokines. *Journal of leukocyte biology* 60: 465-472.
127. Brand U, Bellinghausen I, Enk AH, Jonuleit H, Becker D, et al. (1998) Influence of extracellular matrix proteins on the development of cultured human dendritic cells. *European journal of immunology* 28: 1673-1680.
128. Underhill DM (2003) Mini-review Toll-like receptors: networking for success. *European journal of immunology* 33: 1767-1775.
129. Kaliński P, Hilkens CM, Wierenga EA and Kapsenberg ML (1999) T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunology today* 20: 561-567.

130. Pulendran B (2004) Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunological reviews* 199: 227-250.
131. Murphy KM and Reiner SL (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nature Reviews Immunology* 2: 933-944.
132. Stockinger B and Veldhoen M (2007) Differentiation and function of Th17 T cells. *Current opinion in immunology* 19: 281-286.
133. Goldsby R, Kindt T and Osborne B (2000) *Kuby immunology*. 4th. USA W.
134. Steinman RM, Hawiger D and Nussenzweig MC (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21: 685-711.
135. Hubbell JA, Thomas SN and Swartz MA (2009) Materials engineering for immunomodulation. *Nature* 462: 449-460.
136. Sakaguchi S (2004) Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-562.
137. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, et al. (2004) Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 22: 929-979.
138. Shevach EM (2002) CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature Reviews Immunology* 2: 389-400.
139. Yamazaki S, Bonito AJ, Spisek R, Dhodapkar M, Inaba K, et al. (2007) Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- β for the differentiation of Foxp3⁺ CD4⁺ regulatory T cells from peripheral Foxp3⁻ precursors. *Blood* 110: 4293-4302.
140. Green DR, Ferguson T, Zitvogel L and Kroemer G (2009) Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nature Reviews Immunology* 9: 353-363.
141. Probst HC, McCoy K, Okazaki T, Honjo T and van den Broek M (2005) Resting dendritic cells induce peripheral CD8⁺ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nature immunology* 6: 280-286.
142. Anderson AE, Sayers BL, Haniffa MA, Swan DJ, Diboll J, et al. (2008) Differential regulation of naive and memory CD4⁺ T cells by alternatively activated dendritic cells. *Journal of leukocyte biology* 84: 124-133.
143. Müller G, Müller A, Tütting T, Steinbrink K, Saloga J, et al. (2002) Interleukin-10-treated dendritic cells modulate immune responses of naive and sensitized T cells in vivo. *Journal of investigative dermatology* 119: 836-841.
144. Lan YY, Wang Z, Raimondi G, Wu W, Colvin BL, et al. (2006) "Alternatively activated" dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3⁺ CD4⁺ T cells, and induce long-

- term organ allograft survival in combination with CTLA4-Ig. *The Journal of immunology* 177: 5868-5877.
145. Riboldi E, Musso T, Moroni E, Urbinati C, Bernasconi S, et al. (2005) Cutting edge: proangiogenic properties of alternatively activated dendritic cells. *The Journal of immunology* 175: 2788-2792.
146. Babensee JE (2008) Interaction of dendritic cells with biomaterials. *Seminars in immunology*. Elsevier. pp. 101-108.
147. Prantl L, Fichtner-Feigl S, Hofstaedter F, Lenich A, Eisenmann-Klein M, et al. (2008) Flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with silicone breast implants. *Plastic and reconstructive surgery* 121: 25-30.
148. Rutella S, Danese S and Leone G (2006) Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 108: 1435-1440.
149. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J and Enk AH (2000) Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4⁺ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 192: 1213-1222.
150. Menges M, Rößner S, Voigtländer C, Schindler H, Kukutsch NA, et al. (2002) Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor α induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 195: 15-22.
151. Vigouroux S, Yvon E, Biagi E and Brenner MK (2004) Antigen-induced regulatory T cells. *Blood* 104: 26-33.
152. Babensee JE, Stein MM and Moore LK (2002) Interconnections between inflammatory and immune responses in tissue engineering. *Annals of the New York Academy of Sciences* 961: 360-363.
153. Acharya AP, Dolgova NV, Clare-Salzler MJ and Keselowsky BG (2008) Adhesive substrate-modulation of adaptive immune responses. *Biomaterials* 29: 4736-4750.
154. Kohl K, Schnautz S, Pesch M, Klein E, Aumailley M, et al. (2007) Subpopulations of human dendritic cells display a distinct phenotype and bind differentially to proteins of the extracellular matrix. *European journal of cell biology* 86: 719-730.
155. Babensee JE and Paranjpe A (2005) Differential levels of dendritic cell maturation on different biomaterials used in combination products. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 74: 503-510.

156. Yoshida M and Babensee JE (2006) Differential effects of agarose and poly (lactic-co-glycolic acid) on dendritic cell maturation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 79: 393-408.
157. Yoshida M and Babensee JE (2004) Poly (lactic-co-glycolic acid) enhances maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 71: 45-54.
158. Frick J-S, Grünebach F and Autenrieth IB (2010) Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *International Journal of Medical Microbiology* 300: 19-24.
159. Padovan E, Landmann RM and De Libero G (2007) How pattern recognition receptor triggering influences T cell responses: a new look into the system. *Trends in immunology* 28: 308-314.
160. Lück M, Pistel K-F, Li Y-X, Blunk T, Müller RH, et al. (1998) Plasma protein adsorption on biodegradable microspheres consisting of poly (d, l-lactide-co-glycolide), poly (l-lactide) or ABA triblock copolymers containing poly (oxyethylene): influence of production method and polymer composition. *Journal of Controlled Release* 55: 107-120.
161. Göppert TM and Müller RH (2005) Protein adsorption patterns on poloxamer-and poloxamine-stabilized solid lipid nanoparticles (SLN). *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 60: 361-372.
162. Alivisatos AP, Gu W and Larabell C (2005) Quantum dots as cellular probes. *Annu Rev Biomed Eng* 7: 55-76.
163. Bala I, Hariharan S and Kumar MR (2004) PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems* 21.
164. Jeff WB and Kraitchman DL (2004) Monitoring cell therapy using iron oxide MR contrast agents. *Current pharmaceutical biotechnology* 5: 567-584.
165. Leu D, Manthey B, Kreuter J, Speiser P and Deluca PP (1984) Distribution and elimination of coated polymethyl [2-14C] methacrylate nanoparticles after intravenous injection in rats. *Journal of pharmaceutical sciences* 73: 1433-1437.
166. Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, et al. (1994) Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 263: 1600-1603.

167. Gessner A, Lieske A, Paulke BR and Müller RH (2002) Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: analysis by two-dimensional electrophoresis. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 54: 165-170.
168. Gessner A, Waicz R, Lieske A, Paulke B-R, Mäder K, et al. (2000) Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption. *International journal of pharmaceutics* 196: 245-249.
169. Lück M, Schröder W, Harnisch S, Thode K, Blunk T, et al. (1997) Identification of plasma proteins facilitated by enrichment on particulate surfaces: Analysis by two-dimensional electrophoresis and N-terminal microsequencing. *Electrophoresis* 18: 2961-2967.
170. Diederichs JE (1996) Plasma protein adsorption patterns on liposomes: establishment of analytical procedure. *Electrophoresis* 17: 607-611.
171. Peracchia M, Harnisch S, Pinto-Alphandary H, Gulik A, Dedieu J, et al. (1999) Visualization of in vitro protein-rejecting properties of PEGylated stealth[®] polycyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 20: 1269-1275.
172. Thode K, Lück M, Semmler W, Müller RH and Kresse M (1997) Determination of plasma protein adsorption on magnetic iron oxides: sample preparation. *Pharmaceutical research* 14: 905-910.
173. Balakrishnan B, Kumar D, Yoshida Y and Jayakrishnan A (2005) Chemical modification of poly (vinyl chloride) resin using poly (ethylene glycol) to improve blood compatibility. *Biomaterials* 26: 3495-3502.
174. Koziara J, Oh J, Akers W, Ferraris S and Mumper R (2005) Blood compatibility of cetyl alcohol/polysorbate-based nanoparticles. *Pharmaceutical research* 22: 1821-1828.
175. Wang J, Chen C, Li B, Yu H, Zhao Y, et al. (2006) Antioxidative function and biodistribution of [Gd@ C₈₂(OH)₂₂]_n nanoparticles in tumor-bearing mice. *Biochemical pharmacology* 71: 872-881.
176. Salvador-Morales C, Flahaut E, Sim E, Sloan J, H Green ML, et al. (2006) Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Molecular immunology* 43: 193-201.
177. Blander JM and Medzhitov R (2006) On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nature immunology* 7: 1029-1035.
178. Conner SD and Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37-44.
179. Aderem A and Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* 17: 593-623.

180. Muro S, Garnacho C, Champion JA, Lefterovich J, Gajewski C, et al. (2008) Control of endothelial targeting and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers. *Molecular Therapy* 16: 1450-1458.
181. Unfried K, Sydlik U, Bierhals K, Weissenberg A and Abel J (2008) Carbon nanoparticle-induced lung epithelial cell proliferation is mediated by receptor-dependent Akt activation. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 294: L358-L367.
182. Nagayama S, Ogawara K-i, Minato K, Fukuoka Y, Takakura Y, et al. (2007) Fetuin mediates hepatic uptake of negatively charged nanoparticles via scavenger receptor. *International journal of pharmaceutics* 329: 192-198.
183. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Simard P, Leroux J, et al. (2006) Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 78: 620-628.
184. Chen B-X, Wilson S, Das M, Coughlin D and Erlanger B (1998) Antigenicity of fullerenes: antibodies specific for fullerenes and their characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 10809-10813.
185. Braden BC, Goldbaum FA, Chen B-X, Kirschner AN, Wilson SR, et al. (2000) X-ray crystal structure of an anti-Buckminsterfullerene antibody Fab fragment: Biomolecular recognition of C60. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 12193-12197.
186. Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, et al. (2005) Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir* 21: 10644-10654.
187. von Zur Muhlen C, Von Elverfeldt D, Bassler N, Neudorfer I, Steitz B, et al. (2007) Superparamagnetic iron oxide binding and uptake as imaged by magnetic resonance is mediated by the integrin receptor Mac-1 (CD11b/CD18): implications on imaging of atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 193: 102-111.
188. Jiang W, Kim BY, Rutka JT and Chan WC (2008) Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotechnology* 3: 145-150.
189. Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P and Benoit J-P (2006) Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* 27: 4356-4373.
190. Fang C, Shi B, Pei Y-Y, Hong M-H, Wu J, et al. (2006) In vivo tumor targeting of tumor necrosis factor- α -loaded stealth nanoparticles: effect of MePEG molecular weight and particle size. *European journal of pharmaceutical sciences* 27: 27-36.

191. Kwon YJ, Standley SM, Goh SL and Fréchet JM (2005) Enhanced antigen presentation and immunostimulation of dendritic cells using acid-degradable cationic nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 105: 199-212.
192. Jin H, Heller DA, Sharma R and Strano MS (2009) Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles. *ACS nano* 3: 149-158.
193. Wang J, Tian S, Petros RA, Napier ME and DeSimone JM (2010) The complex role of multivalency in nanoparticles targeting the transferrin receptor for cancer therapies. *Journal of the American Chemical Society* 132: 11306-11313.
194. Arvizo RR, Miranda OR, Thompson MA, Pabelick CM, Bhattacharya R, et al. (2010) Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond. *Nano Letters* 10: 2543-2548.
195. Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, et al. (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 11613-11618.
196. Qiu Y, Liu Y, Wang L, Xu L, Bai R, et al. (2010) Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials* 31: 7606-7619.
197. Chithrani BD, Ghazani AA and Chan WC (2006) Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett* 6: 662-668.
198. Chithrani BD and Chan WC (2007) Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters* 7: 1542-1550.
199. Lu F, Wu SH, Hung Y and Mou CY (2009) Size Effect on Cell Uptake in Well-Suspended, Uniform Mesoporous Silica Nanoparticles. *Small* 5: 1408-1413.
200. Gao H, Shi W and Freund LB (2005) Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 9469-9474.
201. Mayor S and Pagano RE (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 603-612.
202. Yuan H, Li J, Bao G and Zhang S (2010) Variable nanoparticle-cell adhesion strength regulates cellular uptake. *Physical review letters* 105: 138101.
203. Sée V, Free P, Cesbron Y, Nativo P, Shaheen U, et al. (2009) Cathepsin L digestion of nanobioconjugates upon endocytosis. *ACS nano* 3: 2461-2468.

204. Fischer HC, Hauck TS, Gómez-Aristizábal A and Chan WC (2010) Exploring primary liver macrophages for studying quantum dot interactions with biological systems. *Advanced Materials* 22: 2520-2524.
205. Williams Y, Sukhanova A, Nowostawska M, Davies AM, Mitchell S, et al. (2009) Probing Cell-Type-Specific Intracellular Nanoscale Barriers Using Size-Tuned Quantum Dots. *Small* 5: 2581-2588.
206. AshaRani P, Low Kah Mun G, Hande MP and Valiyaveetil S (2008) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS nano* 3: 279-290.
207. Rees P, Brown MR, Summers HD, Holton MD, Errington RJ, et al. (2011) A transfer function approach to measuring cell inheritance. *BMC systems biology* 5: 31.
208. Onuma K, Sato Y, Ogawara S, Shirasawa N, Kobayashi M, et al. (2009) Nano-scaled particles of titanium dioxide convert benign mouse fibrosarcoma cells into aggressive tumor cells. *The American journal of pathology* 175: 2171-2183.
209. Masalova O, Shepelev A, Atanadze S, Parnes Z, Romanova V, et al. (1999) [Immunostimulating effect of water-soluble fullerene derivatives--perspective adjuvants for a new generation of vaccine]. *Doklady Akademii nauk/[Rossiiskaia akademii nauk]* 369: 411-413.
210. Andreev S, Babakhin A, Petrukhina A, Romanova V, Parnes Z, et al. (2000) Immunogenic and allergenic properties of fulleren conjugates with aminoacids and proteins. *Doklady biochemistry: proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biochemistry section/translated from Russian* 370: 4.
211. Dykman L and Khlebtsov N (2012) Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chemical Society Reviews* 41: 2256-2282.
212. Castignolles N, Morgeaux S, Gontier-Jallet C, Samain D, Betbeder D, et al. (1996) A new family of carriers (biovectors) enhances the immunogenicity of rabies antigens. *Vaccine* 14: 1353-1360.
213. Diwan M, Elamanchili P, Lane H, Gainer A and Samuel J (2003) Biodegradable nanoparticle mediated antigen delivery to human cord blood derived dendritic cells for induction of primary T cell responses. *Journal of drug targeting* 11: 495-507.
214. Cui Z, Han S-J, Vangasseri DP and Huang L (2005) Immunostimulation mechanism of LPD nanoparticle as a vaccine carrier. *Molecular pharmaceutics* 2: 22-28.

215. Tan Y, Li S, Pitt BR and Huang L (1999) The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression in vivo. *Human gene therapy* 10: 2153-2161.
216. Shvedova AA, Kisin ER, Mercer R, Murray AR, Johnson VJ, et al. (2005) Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 289: L698-L708.
217. Shaunak S, Thomas S, Gianasi E, Godwin A, Jones E, et al. (2004) Polyvalent dendrimer glucosamine conjugates prevent scar tissue formation. *Nature biotechnology* 22: 977-984.
218. Lucarelli M, Gatti AM, Savarino G, Quattroni P, Martinelli L, et al. (2004) Innate defence functions of macrophages can be biased by nano-sized ceramic and metallic particles. *European cytokine network* 15: 339-346.
219. Wan R, Mo Y, Zhang X, Chien S, Tollerud DJ, et al. (2008) Matrix metalloproteinase-2 and-9 are induced differently by metal nanoparticles in human monocytes: The role of oxidative stress and protein tyrosine kinase activation. *Toxicology and applied pharmacology* 233: 276-285.
220. Ma JY, Zhao H, Mercer RR, Barger M, Rao M, et al. (2011) Cerium oxide nanoparticle-induced pulmonary inflammation and alveolar macrophage functional change in rats. *Nanotoxicology* 5: 312-325.
221. Braydich-Stolle LK, Lucas B, Schrand A, Murdock RC, Lee T, et al. (2010) Silver nanoparticles disrupt GDNF/Fyn kinase signaling in spermatogonial stem cells. *Toxicological Sciences* 116: 577-589.
222. Chen Y-W, Hwang KC, Yen C-C and Lai Y-L (2004) Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287: R21-R26.
223. Shvedova AA, Fabisiak JP, Kisin ER, Murray AR, Roberts JR, et al. (2008) Sequential exposure to carbon nanotubes and bacteria enhances pulmonary inflammation and infectivity. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 38: 579.
224. Witasp E, Shvedova AA, Kagan VE and Fadeel B (2009) Single-walled carbon nanotubes impair human macrophage engulfment of apoptotic cell corpses. *Inhalation toxicology* 21: 131-136.

225. Marcos-Campos I, Asin L, Torres T, Marquina C, Tres A, et al. (2011) Cell death induced by the application of alternating magnetic fields to nanoparticle-loaded dendritic cells. *Nanotechnology* 22: 205101.
226. Goya G, Marcos-Campos I, Fernandez-Pacheco R, Saez B, Godino J, et al. (2008) Dendritic cell uptake of iron-based magnetic nanoparticles. *Cell biology international* 32: 1001-1005.
227. Kunzmann A, Andersson B, Vogt C, Feliu N, Ye F, et al. (2011) Efficient internalization of silica-coated iron oxide nanoparticles of different sizes by primary human macrophages and dendritic cells. *Toxicology and applied pharmacology* 253: 81-93.
228. Winter M, Beer H-D, Hornung V, Krämer U, Schins RP, et al. (2011) Activation of the inflammasome by amorphous silica and TiO₂ nanoparticles in murine dendritic cells. *Nanotoxicology* 5: 326-340.
229. Schanen BC, Karakoti AS, Seal S, Drake III DR, Warren WL, et al. (2009) Exposure to titanium dioxide nanomaterials provokes inflammation of an in vitro human immune construct. *ACS nano* 3: 2523-2532.
230. Cui Z and Mumper RJ (2002) Coating of cationized protein on engineered nanoparticles results in enhanced immune responses. *International journal of pharmaceutics* 238: 229-239.
231. Cui Z, Patel J, Tuzova M, Ray P, Phillips R, et al. (2004) Strong T cell type-1 immune responses to HIV-1 Tat (1–72) protein-coated nanoparticles. *Vaccine* 22: 2631-2640.
232. Holzapfel BM, Reichert JC, Schantz J-T, Gbureck U, Rackwitz L, et al. (2013) How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Advanced drug delivery reviews* 65: 581-603.
233. Anderson DG, Burdick JA and Langer R (2004) Smart biomaterials. *Science* 305: 1923-1924.
234. Furth ME, Atala A and Van Dyke ME (2007) Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials* 28: 5068-5073.
235. Mieszawska AJ and Kaplan DL (2010) Smart biomaterials-regulating cell behavior through signaling molecules. *BMC biology* 8: 59.
236. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M and Barbarisi A (2004) From cell–ECM interactions to tissue engineering. *Journal of cellular physiology* 199: 174-180.
237. Aschwanden M and Stemmer A (2006) Polymeric, electrically tunable diffraction grating based on artificial muscles. *Optics letters* 31: 2610-2612.
238. Lendlein A and Kelch S (2002) Shape-memory polymers. *Angewandte Chemie International Edition* 41: 2034-2057.
239. Otsuka K and Wayman CM (1999) Shape memory materials. Cambridge University Press.

240. Sun L, Huang W, Ding Z, Zhao Y, Wang C, et al. (2012) Stimulus-responsive shape memory materials: a review. *Materials & design* 33: 577-640.
241. Ölander A (1932) An electrochemical investigation of solid cadmium-gold alloys. *Journal of the American Chemical Society* 54: 3819-3833.
242. Wayman CM and Harrison JD (1989) The origins of the shape memory effect. *JOM Journal of the Minerals, Metals and Materials Society* 41: 26-28.
243. Kurdyumov G and Khandros L (1949) On the Thermoelastic Equilibrium in Martensitic Transformations. *Dokl Akad Nauk SSSR*. pp. 211-214.
244. Chang L and Read T (1951) Behavior of the elastic properties of AuCd. *Trans Met Soc AIME* 191: 47.
245. Kauffman GB and Mayo I (1997) The story of nitinol: the serendipitous discovery of the memory metal and its applications. *The chemical educator* 2: 1-21.
246. Buehler WJ, Gilfrich J and Wiley R (2004) Effect of Low-Temperature Phase Changes on the Mechanical Properties of Alloys near Composition TiNi. *Journal of Applied Physics* 34: 1475-1477.
247. Pelton AR, Russell SM and DiCello J (2003) The physical metallurgy of nitinol for medical applications. *JOM* 55: 33-37.
248. Zhu J and Liew K (2003) Description of deformation in shape memory alloys from DO₃ austenite to 18R martensite by group theory. *Acta materialia* 51: 2443-2456.
249. Christian J (1982) Deformation by moving interfaces. *Metallurgical Transactions A* 13: 509-538.
250. Zhu J, Huang W and Liew K (2003) Deformation energy in martensitic transformation. *Journal de Physique IV (Proceedings)*. EDP sciences. pp. 179-182.
251. Gao X and Huang W (2003) Thermomechanical behavior of shape memory alloys under non-proportional load. *Photonics Fabrication Europe*. International Society for Optics and Photonics. pp. 183-191.
252. Mantovani D (2000) Shape memory alloys: Properties and biomedical applications. *JOM* 52: 36-44.
253. Stoeckel D, Pelton A and Duerig T (2004) Self-expanding nitinol stents: material and design considerations. *European radiology* 14: 292-301.
254. Duerig T, Pelton A and Stöckel D (1999) An overview of nitinol medical applications. *Materials Science and Engineering: A* 273: 149-160.

255. Duerig T and Pelton A (1994) Ti-Ni shape memory alloys. *Materials properties handbook: Titanium alloys*: 1035-1048.
256. Huang W (2002) On the selection of shape memory alloys for actuators. *Materials & design* 23: 11-19.
257. Marks MP, Tsai C and Chee H (1996) In vitro evaluation of coils for endovascular therapy. *American journal of neuroradiology* 17: 29-34.
258. Hoh DJ, Hoh BL, Amar AP and Wang MY (2009) Shape memory alloys: metallurgy, biocompatibility, and biomechanics for neurosurgical applications. *Neurosurgery* 64: 199-215.
259. Morgan N (2004) Medical shape memory alloy applications—the market and its products. *Materials Science and Engineering: A* 378: 16-23.
260. Sanders JO, Sanders A, More R and Ashman R (1993) A preliminary investigation of shape memory alloys in the surgical correction of scoliosis. *Spine* 18: 1640-1646.
261. Schmerling M, Wilkov M, Sanders A and Woosley J (1976) Using the shape recovery of nitinol in the Harrington rod treatment of scoliosis. *Journal of biomedical materials research* 10: 879-892.
262. Veldhuizen A, Sanders M and Cool J (1997) A scoliosis correction device based on memory metal. *Medical engineering & physics* 19: 171-179.
263. Castleman L, Motzkin S, Alicandri F, Bonawit V and Johnson A (1976) Biocompatibility of nitinol alloy as an implant material. *Journal of biomedical materials research* 10: 695-731.
264. Wang S, Wu X and Jin J (1995) Phase transformations in rapidly solidified TiNi shape memory alloys. *Trans Nonferrous Met Soc China(China)* 5: 63-66.
265. Kim Y-w, Yun Y-m and Nam T-h (2006) The effect of the melt spinning processing parameters on the solidification structures in Ti–30at.% Ni–20at.% Cu shape memory alloys. *Materials Science and Engineering: A* 438: 545-548.
266. Es-Souni M, Es-Souni M and Fischer-Brandies H (2005) Assessing the biocompatibility of NiTi shape memory alloys used for medical applications. *Analytical and bioanalytical chemistry* 381: 557-567.
267. Shabalovskaya SA (2002) Surface, corrosion and biocompatibility aspects of Nitinol as an implant material. *Bio-medical materials and engineering* 12: 69-109.
268. Čolić M, Rudolf R, Stamenković D, Anžel I, Vučević D, et al. (2010) Relationship between microstructure, cytotoxicity and corrosion properties of a Cu–Al–Ni shape memory alloy. *Acta Biomaterialia* 6: 308-317.

269. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen F and Lemons JE (2004) *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. San Diego, California: 162-164.
270. Wen X, Wang X and Zhang N (1996) Microrough surface of metallic biomaterials: a literature review. *Bio-medical materials and engineering* 6: 173-189.
271. Firstov G, Vitchev R, Kumar H, Blanpain B and Van Humbeeck J (2002) Surface oxidation of NiTi shape memory alloy. *Biomaterials* 23: 4863-4871.
272. Tian H, Schryvers D, Shabalovskaya S and Van Humbeeck J (2009) TEM study of the mechanism of Ni ion release from Nitinol wires with original oxides. *European Symposium on Martensitic Transformations*. EDP Sciences. pp. 05027.
273. Chan CM, Trigwell S and Duerig T (1990) Oxidation of an NiTi alloy. *Surface and Interface analysis* 15: 349-354.
274. Chuprina V (1989) A study of the process of oxidation of titanium nickelide. II. Phase composition of the scale. *Powder Metallurgy and Metal Ceramics* 28: 468-472.
275. McIntyre N and Cook M (1975) X-ray photoelectron studies on some oxides and hydroxides of cobalt, nickel, and copper. *Analytical Chemistry* 47: 2208-2213.
276. Shabalovskaya SA (1996) On the nature of the biocompatibility and on medical applications of NiTi shape memory and superelastic alloys. *Bio-medical materials and engineering* 6: 267-289.
277. Duerig TW, Melton K, Stockel D and Wayman C (1990) *Engineering aspects of shape memory alloys*. Butterworth-Heinemann, Reed Books Services Ltd, P O Box 5, Rushden, Northants, NN 10 9 YX, UK, 1990 499.
278. Ryhänen J, Niemi E, Serlo W, Niemelä E, Sandvik P, et al. (1997) Biocompatibility of nickel-titanium shape memory metal and its corrosion behavior in human cell cultures. *Journal of biomedical materials research* 35: 451-457.
279. Barrett RD, Bishara SE and Quinn JK (1993) Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium in vitro. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 103: 8-14.
280. Rondelli G and Vicentini B (1999) Localized corrosion behaviour in simulated human body fluids of commercial Ni-Ti orthodontic wires. *Biomaterials* 20: 785-792.
281. Gojić M, Vrsalović L, Kožuh S, Kneissl A, Anžel I, et al. (2011) Electrochemical and microstructural study of Cu-Al-Ni shape memory alloy. *Journal of Alloys and Compounds* 509: 9782-9790.

282. Hu T, Chu C, Xin Y, Wu S, Yeung KW, et al. (2010) Corrosion products and mechanism on NiTi shape memory alloy in physiological environment. *Journal of Materials Research* 25: 350.
283. Assad M, Lombardi S, Berneche S, Desrosiers E, Yahia L, et al. (1993) [Assays of cytotoxicity of the Nickel-Titanium shape memory alloy]. *Annales de chirurgie*. pp. 731-736.
284. Es-Souni M and Fischer-Brandies H (2002) On the properties of two binary NiTi shape memory alloys. Effects of surface finish on the corrosion behaviour and in vitro biocompatibility. *Biomaterials* 23: 2887-2894.
285. Es-Souni M and Fischer-Brandies H (2003) On the in vitro biocompatibility of Elgiloy, a cobased alloy, compared to two titanium alloys. *J Orofac Orthop* 64: 16-26.
286. Wever D, Veldhuizen A, De Vries J, Busscher H, Uges D, et al. (1998) Electrochemical and surface characterization of a nickel–titanium alloy. *Biomaterials* 19: 761-769.
287. Trepanier C, Tabrizian M, Yahia LH, Bilodeau L and Piron DL (1998) Effect of modification of oxide layer on NiTi stent corrosion resistance. *Journal of biomedical materials research* 43: 433-440.
288. Venugopalan R, Weimer JJ, George MA and Lucas LC (2000) The effect of nitrogen diffusion hardening on the surface chemistry and scratch resistance of Ti-6Al-4V alloy. *Biomaterials* 21: 1669-1677.
289. Ryhanen J, Kallioinen M, Tuukkanen J, Junila J, Niemela E, et al. (1998) In vivo biocompatibility evaluation of nickel-titanium shape memory metal alloy: muscle and perineural tissue responses and capsule membrane thickness. *J Biomed Mater Res* 41: 481-488.
290. Assad M, Chernyshov A, Leroux MA and Rivard CH (2002) A new porous titanium-nickel alloy: part 2. Sensitization, irritation and acute systemic toxicity evaluation. *Biomed Mater Eng* 12: 339-346.
291. Assad M, Chernyshov A, Leroux MA and Rivard CH (2002) A new porous titanium-nickel alloy: Part 1. Cytotoxicity and genotoxicity evaluation. *Biomed Mater Eng* 12: 225-237.
292. Kujala S, Ryhanen J, Danilov A and Tuukkanen J (2003) Effect of porosity on the osteointegration and bone ingrowth of a weight-bearing nickel-titanium bone graft substitute. *Biomaterials* 24: 4691-4697.
293. Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M and Fracasso ME (2003) In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 124: 687-693; discussion 693-684.

294. Mugnolo G and Filliponi H (2001) Osseointegration of tissue functional rough TiO₂-blasted titanium implants: one-year follow-up of 100 implants. *Dent Implantol Update* 12: 9-15.
295. Kujala S, Pajala A, Kallioinen M, Pramila A, Tuukkanen J, et al. (2004) Biocompatibility and strength properties of nitinol shape memory alloy suture in rabbit tendon. *Biomaterials* 25: 353-358.
296. Latal D, Mraz J, Zerhau P, Susani M and Marberger M (1994) Nitinol urethral stents: long-term results in dogs. *Urological research* 22: 295-300.
297. Bishara SE, Barrett RD and Selim MI (1993) Biodegradation of orthodontic appliances. Part II. Changes in the blood level of nickel. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 103: 115-119.
298. Bensmann G, Baumgart F and Haasters J (1982) Osteosynthesis Clamps Made from NiTi: Manufacture, Preliminary Tests and Clinical Use. *Tech Mitt Krupp-Forschungsber* 40: 123-134.
299. Agaoglu G, Arun T, Izgi B and Yarat A (2001) Nickel and chromium levels in the saliva and serum of patients with fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod* 71: 375-379.
300. Schuster G, Reichle R, Bauer RR and Schopf PM (2004) Allergies induced by orthodontic alloys: incidence and impact on treatment. Results of a survey in private orthodontic offices in the Federal State of Hesse, Germany. *J Orofac Orthop* 65: 48-59.
301. Rahilly G and Price N (2003) Nickel allergy and orthodontics. *J Orthod* 30: 171-174.
302. Michel R (1987) TRACE-METAL ANALYSIS IN BIOCOMPATIBILITY TESTING. *CRC Critical Reviews in Biocompatibility* 3: 235-317.
303. Costa M (1980) Metal carcinogenesis testing: principles and in vitro methods. Springer.
304. Minotti G and Aust SD (1987) The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chemistry and physics of lipids* 44: 191-208.
305. Stohs S and Bagchi D (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 18: 321-336.
306. Ghio AJ, Piantadosi CA and Crumbliss AL (1997) Hypothesis: iron chelation plays a vital role in neutrophilic inflammation. *Biomaterials* 10: 135-142.
307. Salonen JT, Nyyssönen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppänen R, et al. (1992) High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation* 86: 803-811.
308. Sunderman Jr FW (1983) Carcinogenicity of nickel compounds in animals. *IARC scientific publications*: 127-142.

309. Athar M, Hasan SK and Srivastava RC (1987) Evidence for the involvement of hydroxyl radicals in nickel mediated enhancement of lipid peroxidation: implications for nickel carcinogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 147: 1276-1281.
310. Li W, Zhao Y and Cou I-N (1993) Alterations in cytoskeletal protein sulfhydryls and cellular glutathione in cultured cells exposed to cadmium and nickel ions. *Toxicology* 77: 65-79.
311. Okazaki Y, Rao S, Ito Y and Tateishi T (1998) Corrosion resistance, mechanical properties, corrosion fatigue strength and cytocompatibility of new Ti alloys without Al and V. *Biomaterials* 19: 1197-1215.
312. Assad M, Yahia LH, Rivard CH and Lemieux N (1998) In vitro biocompatibility assessment of a nickel-titanium alloy using electron microscopy in situ end-labeling (EM-ISEL). *J Biomed Mater Res* 41: 154-161.
313. Von Burg R and Liu D (1993) Chromium and hexavalent chromium. *Journal of applied toxicology* 13: 225-230.
314. McKay G, Macnair R, MacDonald C and Grant M (1996) Interactions of orthopaedic metals with an immortalized rat osteoblast cell line. *Biomaterials* 17: 1339-1344.
315. Williams DF (1981) *Biocompatibility of clinical implant materials*. CRC press Boca Raton, Florida.
316. Rogers SD, Howie DW, Graves SE, Percy MJ and Haynes DR (1997) In vitro human monocyte response to wear particles of titanium alloy containing vanadium or niobium. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 79: 311-315.
317. Wang JY, Wicklund BH, Gustilo RB and Tsukayama DT (1996) Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokines by human monocytes/macrophages in vitro. *Biomaterials* 17: 2233-2240.
318. Black J, Graham R, Laberge M, McGovern T and Jacobs J (1996) In vivo wear of Ti6Al4V femoral heads: a retrieval study. *Journal of biomedical materials research* 32: 447-457.
319. Gutteridge J (1983) Tissue damage by oxy-radicals: the possible involvement of iron and copper complexes. *Medical biology* 62: 101-104.
320. Yourtee DM, Elkins LL, Nalvarte EL and Smith RE (1992) Amplification of doxorubicin mutagenicity by cupric ion. *Toxicology and applied pharmacology* 116: 57-65.
321. Li Y and Trush MA (1993) DNA damage resulting from the oxidation of hydroquinone by copper: role for a Cu (II)/Cu (I) redox cycle and reactive oxygen generation. *Carcinogenesis* 14: 1303-1311.

322. Raap U, Stiesch M, Reh H, Kapp A and Werfel T (2009) Investigation of contact allergy to dental metals in 206 patients. *Contact dermatitis* 60: 339-343.
323. Lacy S, Merritt K, Brown S and Puryear A (1996) Distribution of nickel and cobalt following dermal and systemic administration with in vitro and in vivo studies. *Journal of biomedical materials research* 32: 279-283.
324. Rósa Grímsdóttir M, Hensten-Pettersen A and Kullmann A (1994) Proliferation of nickel-sensitive human lymphocytes by corrosion products of orthodontic appliances. *Biomaterials* 15: 1157-1160.
325. Karlberg AT, Boman A and Wahlberg JE (1983) Copper—a rare sensitizer. *Contact dermatitis* 9: 134-139.
326. Morris A and English J (1998) Copper is unlikely to cause contact allergy. *BMJ: British Medical Journal* 316: 1902.
327. Thomas P, Stauner K, Schraml A, Mahler V, Banke I, et al. (2013) Charakteristika von 200 Patienten mit Verdacht auf Implantatallergie im Vergleich zu 100 beschwerdefreien Endoprothesenträgern. *Der Orthopäde* 42: 607-613.
328. Wöhrl S, Hemmer W, Focke M, Götz M and Jarisch R (2001) Copper allergy revisited. *Journal of the American Academy of Dermatology* 45: 863-870.
329. Frykholm K, Frithiof L, Fernström A, Moberger G, Blohm S, et al. (1969) Allergy to copper derived from dental alloys as a possible cause of oral lesions of lichen planus. *Acta dermato-venereologica* 49: 268.
330. Nordlind K and Liden S (1992) Patch test reactions to metal salts in patients with oral mucosal lesions associated with amalgam restorations. *Contact dermatitis* 27: 157-160.
331. Al-Waheidi E (1995) Allergic reaction to nickel orthodontic wires: a case report. *Quintessence International* 26.
332. Evans EM, Freeman M, Miller A and Vernon-Roberts B (1974) Metal sensitivity as a cause of bone necrosis and loosening of the prosthesis in total joint replacement. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* 56: 626-642.
333. Das K, Das S and Dhundasi S (2008) Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *Indian Journal of Medical Research* 128.
334. Roediger B and Weninger W (2011) How nickel turns on innate immune cells. *Immunology and cell biology* 89: 1-2.
335. Cavani A, Mei D, Guerra E, Corinti S, Giani M, et al. (1998) Patients with allergic contact dermatitis to nickel and nonallergic individuals display different nickel-specific T cell

- responses. Evidence for the presence of effector CD8⁺ and regulatory CD4⁺ T cells. *Journal of investigative dermatology* 111: 621-628.
336. Picardo M, ZOMPETTA C, LUCA C, Cristaudo A, Cannistraci C, et al. (1990) Nickel-keratinocyte interaction: a possible role in sensitization. *British Journal of Dermatology* 122: 729-735.
337. Goebeler M, Roth J, Bröcker E, Sorg C and Schulze-Osthoff K (1995) Activation of nuclear factor-kappa B and gene expression in human endothelial cells by the common haptens nickel and cobalt. *The Journal of immunology* 155: 2459-2467.
338. Artik S, von Vultée C, Gleichmann E, Schwarz T and Griem P (1999) Nickel allergy in mice: enhanced sensitization capacity of nickel at higher oxidation states. *The Journal of immunology* 163: 1143-1152.
339. Schmidt M, Raghavan B, Müller V, Vogl T, Fejer G, et al. (2010) Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nature immunology* 11: 814-819.
340. Feynman RP (1960) There's plenty of room at the bottom. *Engineering and Science* 23: 22-36.
341. Freitas R (2002) The future of nanofabrication and molecular scale devices in nanomedicine. *Studies in health technology and informatics*: 45-60.
342. Daniel M-C and Astruc D (2004) Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews* 104: 293-346.
343. Leutwyler WK, Bürgi SL and Burgli H (1996) Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* 271: 933-937.
344. Brust M and Kiely CJ (2002) Some recent advances in nanostructure preparation from gold and silver particles: a short topical review. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 202: 175-186.
345. Eustis S and El-Sayed MA (2006) Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chemical Society Reviews* 35: 209-217.
346. Kelly KL, Coronado E, Zhao LL and Schatz GC (2003) The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *The Journal of Physical Chemistry B* 107: 668-677.
347. Jin R, Cao Y, Mirkin CA, Kelly K, Schatz GC, et al. (2001) Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. *Science* 294: 1901-1903.

348. Hao E, Schatz GC and Hupp JT (2004) Synthesis and optical properties of anisotropic metal nanoparticles. *Journal of Fluorescence* 14: 331-341.
349. Pileni M-P (2003) The role of soft colloidal templates in controlling the size and shape of inorganic nanocrystals. *Nature materials* 2: 145-150.
350. Shenhar R and Rotello VM (2003) Nanoparticles: scaffolds and building blocks. *Accounts of chemical research* 36: 549-561.
351. Haes AJ, Zhao J, Zou S, Own CS, Marks LD, et al. (2005) Solution-phase, triangular Ag nanotriangles fabricated by nanosphere lithography. *The Journal of Physical Chemistry B* 109: 11158-11162.
352. Pileni M (1997) Nanosized particles made in colloidal assemblies. *Langmuir* 13: 3266-3276.
353. Crooks RM, Zhao M, Sun L, Chechik V and Yeung LK (2001) Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles: synthesis, characterization, and applications to catalysis. *Accounts of chemical research* 34: 181-190.
354. Murphy CJ, Sau TK, Gole AM, Orendorff CJ, Gao J, et al. (2005) Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. *J Phys Chem B* 109: 13857-13870.
355. Xia Y, Yang P, Sun Y, Wu Y, Mayers B, et al. (2003) One-dimensional nanostructures: synthesis, characterization, and applications. *Advanced Materials* 15: 353-389.
356. Hao E, Bailey RC, Schatz GC, Hupp JT and Li S (2004) Synthesis and optical properties of “branched” gold nanocrystals. *Nano Letters* 4: 327-330.
357. Frens G (1973) Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature* 241: 20-22.
358. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, et al. (2006) Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *The Journal of Physical Chemistry B* 110: 15700-15707.
359. Pradeep T (2009) Noble metal nanoparticles for water purification: a critical review. *Thin solid films* 517: 6441-6478.
360. Faulk WP and Taylor GM (1971) An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* 8: 1081-1083.
361. Horisberger M, Rosset J and Bauer H (1975) Colloidal gold granules as markers for cell surface receptors in the scanning electron microscope. *Experientia* 31: 1147-1149.
362. Apicella MA, Post DM, Fowler AC, Jones BD, Rasmussen JA, et al. (2010) Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of *Francisella tularensis*. *PLoS One* 5: e11060.

363. Khlebtsov NG and Dykman LA (2010) Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* 111: 1-35.
364. Wang G, Stender AS, Sun W and Fang N (2010) Optical imaging of non-fluorescent nanoparticle probes in live cells. *Analyst* 135: 215-221.
365. Sokolov K, Follen M, Aaron J, Pavlova I, Malpica A, et al. (2003) Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer research* 63: 1999-2004.
366. Kho KW, Kah JCY, Lee CGL, Sheppard CJR, Shen ZX, et al. (2007) Applications of gold nanoparticles in the early detection of cancer. *Journal of Mechanics in Medicine and Biology* 7: 19-35.
367. Tsai S-W, Chen Y-Y and Liaw J-W (2008) Compound cellular imaging of laser scanning confocal microscopy by using gold nanoparticles and dyes. *Sensors* 8: 2306-2316.
368. Taylor U, Klein S, Petersen S, Kues W, Barcikowski S, et al. (2010) Nonendosomal cellular uptake of ligand-free, positively charged gold nanoparticles. *Cytometry Part A* 77: 439-446.
369. Wang H, Huff TB, Zweifel DA, He W, Low PS, et al. (2005) In vitro and in vivo two-photon luminescence imaging of single gold nanorods. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 15752-15756.
370. Park J, Estrada A, Sharp K, Sang K, Schwartz JA, et al. (2008) Two-photon-induced photoluminescence imaging of tumors using near-infrared excited gold nanoshells. *Optics Express* 16: 1590-1599.
371. Durr NJ, Larson T, Smith DK, Korgel BA, Sokolov K, et al. (2007) Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods. *Nano Letters* 7: 941-945.
372. He W, Henne WA, Wei Q, Zhao Y, Doorneweerd DD, et al. (2008) Two-photon luminescence imaging of bacillus spores using peptide-functionalized gold nanorods. *Nano research* 1: 450-456.
373. York J, Spetzler D, Hornung T, Ishmukhametov R, Martin J, et al. (2007) Abundance of Escherichia coli F1-ATPase molecules observed to rotate via single-molecule microscopy with gold nanorod probes. *J Bioenerg Biomembr* 39: 435-439.
374. He H, Xie C and Ren J (2008) Nonbleaching fluorescence of gold nanoparticles and its applications in cancer cell imaging. *Anal Chem* 80: 5951-5957.

375. Curry AC, Crow M and Wax A (2008) Molecular imaging of epidermal growth factor receptor in live cells with refractive index sensitivity using dark-field microspectroscopy and immunotargeted nanoparticles. *J Biomed Opt* 13: 014022.
376. Wang S-H, Lee C-W, Chiou A and Wei P-K (2010) Size-dependent endocytosis of gold nanoparticles studied by three-dimensional mapping of plasmonic scattering images. *J Nanobiotechnology* 8: 33-45.
377. Popescu G (2010) *Nanobiophotonics*. McGraw Hill Professional.
378. Chen J, Glaus C, Laforest R, Zhang Q, Yang M, et al. (2010) Gold nanocages as photothermal transducers for cancer treatment. *Small* 6: 811-817.
379. Hutter E, Boridy S, Labrecque S, Lalancette-Hebert M, Kriz J, et al. (2010) Microglial response to gold nanoparticles. *ACS Nano* 4: 2595-2606.
380. Mirkin CA, Letsinger RL, Mucic RC and Storhoff JJ (1996) A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* 382: 607-609.
381. Khlebtsov BN, Burygin GL, Matora LY, Shchyogolev SY and Khlebtsov NG (2004) A method for studying insoluble immune complexes. *Biochim Biophys Acta* 1670: 199-207.
382. Kennedy LC, Bickford LR, Lewinski NA, Coughlin AJ, Hu Y, et al. (2011) A New Era for Cancer Treatment: Gold-Nanoparticle-Mediated Thermal Therapies. *Small* 7: 169-183.
383. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH and El-Sayed MA (2008) Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in medical science* 23: 217-228.
384. Minton JP, Moody CD, Dearman JR, McKnight WB and Ketcham AS (1965) An Evaluation of the Physical Response of Malignant Tumor Implants to Pulsed Laser Radiation. *Surg Gynecol Obstet* 121: 538-544.
385. Sultan R (1990) Tumour ablation by laser in general surgery. *Lasers in medical science* 5: 185-193.
386. Hirsch LR, Stafford R, Bankson J, Sershen S, Rivera B, et al. (2003) Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 13549-13554.
387. Zharov VP, Galitovsky V and Viegas M (2003) Photothermal detection of local thermal effects during selective nanophotothermolysis. *Applied physics letters* 83: 4897-4899.
388. Pitsillides CM, Joe EK, Wei X, Anderson R and Lin CP (2003) Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles. *Biophysical journal* 84: 4023-4032.

389. Carpin LB, Bickford LR, Agollah G, Yu T-K, Schiff R, et al. (2011) Immunoconjugated gold nanoshell-mediated photothermal ablation of trastuzumab-resistant breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* 125: 27-34.
390. Lapotko DO, Lukianova-Hleb EY and Oraevsky AA (2007) Clusterization of nanoparticles during their interaction with living cells.
391. Huang X, El-Sayed IH, Qian W and El-Sayed MA (2006) Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *Journal of the American Chemical Society* 128: 2115-2120.
392. Lukianova-Hleb E, Hu Y, Latterini L, Tarpani L, Lee S, et al. (2010) Plasmonic nanobubbles as transient vapor nanobubbles generated around plasmonic nanoparticles. *ACS nano* 4: 2109-2123.
393. Jain RK and Booth MF (2003) What brings pericytes to tumor vessels? *J Clin Invest* 112: 1134-1136.
394. Nie S (2010) Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine (Lond)* 5: 523-528.
395. El-Sayed IH, Huang X and El-Sayed MA (2006) Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer letters* 239: 129-135.
396. Visaria RK, Griffin RJ, Williams BW, Ebbini ES, Paciotti GF, et al. (2006) Enhancement of tumor thermal therapy using gold nanoparticle–assisted tumor necrosis factor- α delivery. *Molecular cancer therapeutics* 5: 1014-1020.
397. Leamon CP and Low PS (1991) Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 5572-5576.
398. Lu W, Xiong C, Zhang G, Huang Q, Zhang R, et al. (2009) Targeted photothermal ablation of murine melanomas with melanocyte-stimulating hormone analog–conjugated hollow gold nanospheres. *Clinical cancer research* 15: 876-886.
399. Harris N, Ford MJ and Cortie MB (2006) Optimization of plasmonic heating by gold nanospheres and nanoshells. *The Journal of Physical Chemistry B* 110: 10701-10707.
400. Rahir G and Moser M (2012) Tumor microenvironment and lymphocyte infiltration. *Cancer Immunol Immunother* 61: 751-759.

401. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, et al. (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13: 1050-1059.
402. Pathak SK, Sköld AE, Mohanram V, Persson C, Johansson U, et al. (2012) Activated Apoptotic Cells Induce Dendritic Cell Maturation via Engagement of Toll-like Receptor 4 (TLR4), Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3 (ICAM-3)-grabbing Nonintegrin (DC-SIGN), and β 2 Integrins. *Journal of Biological Chemistry* 287: 13731-13742.
403. E. ABRAHAM PETER B. HIMMEL G (1997) Management of rheumatoid arthritis: rationale for the use of colloidal metallic gold. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine* 7: 295-305.
404. Abraham GE, McReynolds SA and Dill JS COLLOIDAL GOLD, IONIC GOLD.
405. Chen Y-H, Tsai C-Y, Huang P-Y, Chang M-Y, Cheng P-C, et al. (2007) Methotrexate conjugated to gold nanoparticles inhibits tumor growth in a syngeneic lung tumor model. *Molecular pharmaceutics* 4: 713-722.
406. Bhattacharya R, Mukherjee P, Xiong Z, Atala A, Soker S, et al. (2004) Gold nanoparticles inhibit VEGF165-induced proliferation of HUVEC cells. *Nano Letters* 4: 2479-2481.
407. Mukherjee P, Bhattacharya R, Wang P, Wang L, Basu S, et al. (2005) Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clinical cancer research* 11: 3530-3534.
408. Paciotti GF, Myer L, Weinreich D, Goia D, Pavel N, et al. (2004) Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug delivery* 11: 169-183.
409. Wang L, Liu Y, Li W, Jiang X, Ji Y, et al. (2010) Selective Targeting of Gold Nanorods at the Mitochondria of Cancer Cells: Implications for Cancer Therapy. *Nano Letters* 11: 772-780.
410. Paciotti GF, Kingston DG and Tamarkin L (2006) Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors. *Drug development research* 67: 47-54.
411. Li J, Wang X, Wang C, Chen B, Dai Y, et al. (2007) The Enhancement Effect of Gold Nanoparticles in Drug Delivery and as Biomarkers of Drug-Resistant Cancer Cells. *ChemMedChem* 2: 374-378.
412. Patra CR, Bhattacharya R, Wang E, Katarya A, Lau JS, et al. (2008) Targeted delivery of gemcitabine to pancreatic adenocarcinoma using cetuximab as a targeting agent. *Cancer research* 68: 1970-1978.

413. Podsiadlo P, Sinani VA, Bahng JH, Kam NWS, Lee J, et al. (2008) Gold nanoparticles enhance the anti-leukemia action of a 6-mercaptopurine chemotherapeutic agent. *Langmuir* 24: 568-574.
414. Migahed M, Azzam E and Morsy S (2009) Electrochemical behaviour of carbon steel in acid chloride solution in the presence of dodecyl cysteine hydrochloride self-assembled on gold nanoparticles. *Corrosion Science* 51: 1636-1644.
415. Agasti SS, Chompoosor A, You C-C, Ghosh P, Kim CK, et al. (2009) Photoregulated release of caged anticancer drugs from gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 131: 5728-5729.
416. Dhar S, Daniel WL, Giljohann DA, Mirkin CA and Lippard SJ (2009) Polyvalent oligonucleotide gold nanoparticle conjugates as delivery vehicles for platinum (IV) warheads. *Journal of the American Chemical Society* 131: 14652-14653.
417. Brown SD, Nativo P, Smith J-A, Stirling D, Edwards PR, et al. (2010) Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin. *Journal of the American Chemical Society* 132: 4678-4684.
418. Hosta L, Pla-Roca M, Arbiol J, López-Iglesias C, Samitier J, et al. (2008) Conjugation of Kahalalide F with gold nanoparticles to enhance in vitro antitumoral activity. *Bioconjugate chemistry* 20: 138-146.
419. Dreaden EC, Mwakwari SC, Sodji QH, Oyelere AK and El-Sayed MA (2009) Tamoxifen–poly (ethylene glycol)– thiol gold nanoparticle conjugates: enhanced potency and selective delivery for breast cancer treatment. *Bioconjugate chemistry* 20: 2247-2253.
420. Eghtedari M, Liopo AV, Copland JA, Oraevsky AA and Motamedi M (2008) Engineering of hetero-functional gold nanorods for the in vivo molecular targeting of breast cancer cells. *Nano Letters* 9: 287-291.
421. Park C, Youn H, Kim H, Noh T, Kook YH, et al. (2009) Cyclodextrin-covered gold nanoparticles for targeted delivery of an anti-cancer drug. *Journal of Materials Chemistry* 19: 2310-2315.
422. Asadishad B, Vossoughi M and Alemzadeh I (2010) Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin using polyethylene glycol-functionalized gold nanoparticles. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 49: 1958-1963.
423. LA D and NG K (2011) Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects. *Acta Naturae (англоязычная версия)* 3.

424. Gu H, Ho P, Tong E, Wang L and Xu B (2003) Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. *Nano Letters* 3: 1261-1263.
425. Selvaraj V and Alagar M (2007) Analytical detection and biological assay of antileukemic drug 5-fluorouracil using gold nanoparticles as probe. *International journal of pharmaceutics* 337: 275-281.
426. Nie Z, Liu KJ, Zhong C-J, Wang L-F, Yang Y, et al. (2007) Enhanced radical scavenging activity by antioxidant-functionalized gold nanoparticles: a novel inspiration for development of new artificial antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* 43: 1243-1254.
427. Bowman M-C, Ballard TE, Ackerson CJ, Feldheim DL, Margolis DM, et al. (2008) Inhibition of HIV fusion with multivalent gold nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 130: 6896-6897.
428. Oishi M, Nakaogami J, Ishii T and Nagasaki Y (2006) Smart PEGylated gold nanoparticles for the cytoplasmic delivery of siRNA to induce enhanced gene silencing. *Chemistry Letters* 35: 1046-1047.
429. Noh SM, Kim W-K, Kim SJ, Kim JM, Baek K-H, et al. (2007) Enhanced cellular delivery and transfection efficiency of plasmid DNA using positively charged biocompatible colloidal gold nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1770: 747-752.
430. Lee J-S, Green JJ, Love KT, Sunshine J, Langer R, et al. (2009) Gold, poly (β -amino ester) nanoparticles for small interfering RNA delivery. *Nano Letters* 9: 2402-2406.
431. Oberdörster G, Stone V and Donaldson K (2007) Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. *Nanotoxicology* 1: 2-25.
432. Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T and Rotello VM (2004) Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate chemistry* 15: 897-900.
433. Niidome T, Yamagata M, Okamoto Y, Akiyama Y, Takahashi H, et al. (2006) PEG-modified gold nanorods with a stealth character for *in vivo* applications. *Journal of Controlled Release* 114: 343-347.
434. Semmler-Behnke M, Kreyling WG, Lipka J, Fertsch S, Wenk A, et al. (2008) Biodistribution of 1.4- and 18-nm Gold Particles in Rats. *Small* 4: 2108-2111.
435. Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, et al. (2007) Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3: 1941-1949.

436. Tsoli M, Kuhn H, Brandau W, Esche H and Schmid G (2005) Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters. *Small* 1: 841-844.
437. Tkachenko AG, Xie H, Liu Y, Coleman D, Ryan J, et al. (2004) Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains. *Bioconjugate chemistry* 15: 482-490.
438. Shenoy D, Fu W, Li J, Crasto C, Jones G, et al. (2006) Surface functionalization of gold nanoparticles using hetero-bifunctional poly (ethylene glycol) spacer for intracellular tracking and delivery. *International journal of nanomedicine* 1: 51.
439. Kim D, Park S, Lee JH, Jeong YY and Jon S (2007) Antibiofouling polymer-coated gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo X-ray computed tomography imaging. *Journal of the American Chemical Society* 129: 7661-7665.
440. Khan JA, Pillai B, Das TK, Singh Y and Maiti S (2007) Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in HeLa cells. *Chembiochem* 8: 1237-1240.
441. Li G, Li D, Zhang L, Zhai J and Wang E (2009) One-Step Synthesis of Folic Acid Protected Gold Nanoparticles and Their Receptor-Mediated Intracellular Uptake. *Chemistry-a European Journal* 15: 9868-9873.
442. Salmaso S, Caliceti P, Amendola V, Meneghetti M, Magnusson JP, et al. (2009) Cell up-take control of gold nanoparticles functionalized with a thermoresponsive polymer. *Journal of Materials Chemistry* 19: 1608-1615.
443. Villiers C, Freitas H, Couderc R, Villiers M-B and Marche PN (2010) Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: effect on dendritic cell functions. *J Nanopart Res* 12: 55-60.
444. Ryan JA, Overton KW, Speight ME, Oldenburg CN, Loo L, et al. (2007) Cellular uptake of gold nanoparticles passivated with BSA-SV40 large T antigen conjugates. *Analytical Chemistry* 79: 9150-9159.
445. Sun L, Liu D and Wang Z (2008) Functional Gold Nanoparticle– Peptide Complexes as Cell-Targeting Agents. *Langmuir* 24: 10293-10297.
446. Cho W-S, Cho M, Jeong J, Choi M, Cho H-Y, et al. (2009) Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and applied pharmacology* 236: 16-24.
447. Khlebtsov N and Dykman L (2011) Biodistribution and toxicity of gold nanoparticles. *Nanotechnologies in Russia* 6: 17-42.

448. Cho W-S, Kim S, Han BS, Son WC and Jeong J (2009) Comparison of gene expression profiles in mice liver following intravenous injection of 4 and 100nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology letters* 191: 96-102.
449. Balasubramanian SK, Jittiwat J, Manikandan J, Ong C-N, Yu LE, et al. (2010) Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats. *Biomaterials* 31: 2034-2042.
450. Chen Y-S, Hung Y-C, Liao I and Huang GS (2009) Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscale Research Letters* 4: 858-864.
451. Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria M, Olmedo I, Clos A, et al. (2010) Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochemical and biophysical research communications* 393: 649-655.
452. Kim JH, Kim KW, Kim MH and Yu YS (2009) Intravenously administered gold nanoparticles pass through the blood-retinal barrier depending on the particle size, and induce no retinal toxicity. *Nanotechnology* 20: 505101.
453. Dykman L, Sumaroka M, Staroverov S, Zaitseva I and Bogatyrev V (2004) Immunogenic properties of colloidal gold. *Biology Bulletin of the Russian Academy of Sciences* 31: 75-79.
454. Staroverov S, Aksinenko N, Gabalov K, Vasilenko O, Vidyasheva I, et al. (2009) Effect of gold nanoparticles on the respiratory activity of peritoneal macrophages. *Gold Bulletin* 42.
455. Pow DV and Crook DK (1993) Extremely high titre polyclonal antisera against small neurotransmitter molecules: rapid production, characterisation and use in light and electron-microscopic immunocytochemistry. *Journal of neuroscience methods* 48: 51-63.
456. Chen D and Payne LG (2002) Targeting epidermal Langerhans cells by epidermal powder immunization. *Cell Res* 12: 97-104.
457. Vallhov H, Qin J, Johansson SM, Ahlborg N, Muhammed MA, et al. (2006) The importance of an endotoxin-free environment during the production of nanoparticles used in medical applications. *Nano Letters* 6: 1682-1686.
458. Bastús NG, Sánchez-Tilló E, Pujals S, Farrera C, López C, et al. (2009) Homogeneous conjugation of peptides onto gold nanoparticles enhances macrophage response. *ACS nano* 3: 1335-1344.
459. França A, Aggarwal P, Barsov EV, Kozlov SV, Dobrovolskaia MA, et al. (2011) Macrophage scavenger receptor A mediates the uptake of gold colloids by macrophages in vitro. *Nanomedicine* 6: 1175-1188.

460. Ma JS, Kim WJ, Kim JJ, Kim TJ, Ye SK, et al. (2010) Gold nanoparticles attenuate LPS-induced NO production through the inhibition of NF- κ B and IFN- β /STAT1 pathways in RAW264. 7 cells. *Nitric Oxide* 23: 214-219.
461. Yen HJ, Hsu SH and Tsai CL (2009) Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small* 5: 1553-1561.
462. Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF and Smalley RE (1985) C 60: buckminsterfullerene. *Nature* 318: 162-163.
463. Harris PJ and Harris PJF (2001) Carbon nanotubes and related structures: new materials for the twenty-first century. Cambridge university press.
464. Dresselhaus MS, Dresselhaus G and Eklund PC (1996) Science of fullerenes and carbon nanotubes: their properties and applications. Academic press.
465. Iijima S (1991) Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354: 56-58.
466. Dumitrică T, Landis CM and Yakobson BI (2002) Curvature-induced polarization in carbon nanoshells. *Chemical physics letters* 360: 182-188.
467. Iijima S and Ichihashi T (1993) Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter.
468. Journet C, Maser W, Bernier P, Loiseau A, De La Chapelle ML, et al. (1997) Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique. *Nature* 388: 756-758.
469. Thess A, Lee R, Nikolaev P, Dai H, Petit P, et al. (1996) Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition* 273: 483-487.
470. Jose-Yacaman M, Miki-Yoshida M, Rendon L and Santiesteban J (1993) Catalytic growth of carbon microtubules with fullerene structure. *Applied physics letters* 62: 202-204.
471. Ivanov V, Nagy J, Lambin P, Lucas A, Zhang X, et al. (1994) The study of carbon nanotubules produced by catalytic method. *Chemical physics letters* 223: 329-335.
472. t JB Nagy VI (1994) A formation mechanism for catalytically grown helix-shaped graphite nanotubes. *Science* 265: 635.
473. Niyogi S, Hamon M, Hu H, Zhao B, Bhowmik P, et al. (2002) Chemistry of single-walled carbon nanotubes. *Accounts of chemical research* 35: 1105-1113.
474. Rosca ID, Watari F, Uo M and Akasaka T (2005) Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. *Carbon* 43: 3124-3131.
475. Zeng L, Alemany LB, Edwards CL and Barron AR (2008) Demonstration of covalent sidewall functionalization of single wall carbon nanotubes by NMR spectroscopy: Side chain length dependence on the observation of the sidewall sp³ carbons. *Nano research* 1: 72-88.

476. Liu Z, Sun X, Nakayama-Ratchford N and Dai H (2007) Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery. *ACS nano* 1: 50-56.
477. Schipper ML, Nakayama-Ratchford N, Davis CR, Kam NWS, Chu P, et al. (2008) A pilot toxicology study of single-walled carbon nanotubes in a small sample of mice. *Nature Nanotechnology* 3: 216-221.
478. Wu W, Wieckowski S, Pastorin G, Benincasa M, Klumpp C, et al. (2005) Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition* 44: 6358-6362.
479. Lee KM, Li L and Dai L (2005) Asymmetric end-functionalization of multi-walled carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* 127: 4122-4123.
480. Moghaddam MJ, Taylor S, Gao M, Huang S, Dai L, et al. (2004) Highly efficient binding of DNA on the sidewalls and tips of carbon nanotubes using photochemistry. *Nano Letters* 4: 89-93.
481. Coleman KS, Bailey SR, Fogden S and Green ML (2003) Functionalization of single-walled carbon nanotubes via the Bingel reaction. *Journal of the American Chemical Society* 125: 8722-8723.
482. Umeyama T, Tezuka N, Fujita M, Matano Y, Takeda N, et al. (2007) Retention of intrinsic electronic properties of soluble single-walled carbon nanotubes after a significant degree of sidewall functionalization by the Bingel reaction. *The Journal of Physical Chemistry C* 111: 9734-9741.
483. Georgakilas V, Kordatos K, Prato M, Guldi DM, Holzinger M, et al. (2002) Organic functionalization of carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* 124: 760-761.
484. Tagmatarchis N and Prato M (2004) Functionalization of carbon nanotubes via 1, 3-dipolar cycloadditions. *Journal of Materials Chemistry* 14: 437-439.
485. Pantarotto D, Briand J-P, Prato M and Bianco A (2004) Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chemical Communications*: 16-17.
486. Pastorin G, Wu W, Wieckowski S, Briand J-P, Kostarelos K, et al. (2006) Double functionalisation of carbon nanotubes for multimodal drug delivery. *Chemical Communications*: 1182-1184.
487. Liu Z, Tabakman S, Welsher K and Dai H (2009) Carbon nanotubes in biology and medicine: in vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano research* 2: 85-120.

488. Chen RJ, Zhang Y, Wang D and Dai H (2001) Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. *Journal of the American Chemical Society* 123: 3838-3839.
489. Chen J, Liu H, Weimer WA, Halls MD, Waldeck DH, et al. (2002) Noncovalent engineering of carbon nanotube surfaces by rigid, functional conjugated polymers. *Journal of the American Chemical Society* 124: 9034-9035.
490. Wu P, Chen X, Hu N, Tam UC, Blixt O, et al. (2008) Biocompatible carbon nanotubes generated by functionalization with glycodendrimers. *Angewandte Chemie* 120: 5100-5103.
491. Kam NWS, O'Connell M, Wisdom JA and Dai H (2005) Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11600-11605.
492. Zheng M, Jagota A, Semke ED, Diner BA, McLean RS, et al. (2003) DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. *Nature materials* 2: 338-342.
493. Tu X and Zheng M (2008) A DNA-based approach to the carbon nanotube sorting problem. *Nano research* 1: 185-194.
494. Moon HK, Chang CI, Lee D-K and Choi HC (2008) Effect of nucleases on the cellular internalization of fluorescent labeled DNA-functionalized single-walled carbon nanotubes. *Nano research* 1: 351-360.
495. Nakayama-Ratchford N, Bangsaruntip S, Sun X, Welsher K and Dai H (2007) Noncovalent functionalization of carbon nanotubes by fluorescein-polyethylene glycol: supramolecular conjugates with pH-dependent absorbance and fluorescence. *Journal of the American Chemical Society* 129: 2448-2449.
496. Wang H, Zhou W, Ho DL, Winey KI, Fischer JE, et al. (2004) Dispersing single-walled carbon nanotubes with surfactants: a small angle neutron scattering study. *Nano Letters* 4: 1789-1793.
497. Kam NWS, Liu Z and Dai H (2005) Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing. *Journal of the American Chemical Society* 127: 12492-12493.
498. Liu Z, Cai W, He L, Nakayama N, Chen K, et al. (2007) In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nature Nanotechnology* 2: 47-52.
499. Yang W, Thordarson P, Gooding JJ, Ringer SP and Braet F (2007) Carbon nanotubes for biological and biomedical applications. *Nanotechnology* 18: 412001.

500. Pantarotto D, Partidos CD, Graff R, Hoebeke J, Briand J-P, et al. (2003) Synthesis, structural characterization, and immunological properties of carbon nanotubes functionalized with peptides. *Journal of the American Chemical Society* 125: 6160-6164.
501. Pantarotto D, Partidos CD, Hoebeke J, Brown F, Kramer E, et al. (2003) Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chemistry & biology* 10: 961-966.
502. Hermanson GT (2013) *Bioconjugate techniques*. Academic press.
503. Sirotnak F, Moccio D, Kelleher L and Goutas L (1981) Relative frequency and kinetic properties of transport-defective phenotypes among methotrexate-resistant L1210 clonal cell lines derived in vivo. *Cancer research* 41: 4447-4452.
504. Pignatello R, Toth I and Puglisi G (2001) Structural effects of lipophilic methotrexate conjugates on model phospholipid biomembranes. *Thermochimica acta* 380: 255-264.
505. Prato M, Kostarelos K and Bianco A (2007) Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *Accounts of chemical research* 41: 60-68.
506. Ali-Boucetta H, Al-Jamal KT, McCarthy D, Prato M, Bianco A, et al. (2008) Multiwalled carbon nanotube–doxorubicin supramolecular complexes for cancer therapeutics. *Chemical Communications*: 459-461.
507. Venkatesan N, Yoshimitsu J, Ito Y, Shibata N and Takada K (2005) Liquid filled nanoparticles as a drug delivery tool for protein therapeutics. *Biomaterials* 26: 7154-7163.
508. Bianco A, Kostarelos K, Partidos CD and Prato M (2005) Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes. *Chemical Communications*: 571-577.
509. Lacerda L, Soundararajan A, Singh R, Pastorin G, Al-Jamal KT, et al. (2008) Dynamic imaging of functionalized multi-walled carbon nanotube systemic circulation and urinary excretion. *Advanced Materials* 20: 225-230.
510. Pantarotto D, Singh R, McCarthy D, Erhardt M, Briand JP, et al. (2004) Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angewandte Chemie* 116: 5354-5358.
511. Singh R, Pantarotto D, McCarthy D, Chaloin O, Hoebeke J, et al. (2005) Binding and condensation of plasmid DNA onto functionalized carbon nanotubes: toward the construction of nanotube-based gene delivery vectors. *Journal of the American Chemical Society* 127: 4388-4396.

512. Zhang Z, Yang X, Zhang Y, Zeng B, Wang S, et al. (2006) Delivery of telomerase reverse transcriptase small interfering RNA in complex with positively charged single-walled carbon nanotubes suppresses tumor growth. *Clinical cancer research* 12: 4933-4939.
513. Zotchev SB (2003) Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy. *Current medicinal chemistry* 10: 211-223.
514. Szlinder-Richert J, Cybulska B, Grzybowska J, Bolard J and Borowski E (2004) Interaction of amphotericin B and its low toxic derivative, N-methyl-D-fructosyl amphotericin B methyl ester, with fungal, mammalian and bacterial cells measured by the energy transfer method. *Il Farmaco* 59: 289-296.
515. Zhu YI and Stiller MJ (2001) Dapsone and sulfones in dermatology: overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology* 45: 420-434.
516. Rastogi N, Goh K and Labrousse V (1993) Activity of subinhibitory concentrations of dapsone alone and in combination with cell-wall inhibitors against *Mycobacterium avium* complex organisms. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 12: 954-958.
517. Mancey-Jones B (1988) The mode of action of dapsone in leprosy and other disorders. *Essay on leprosy*, Alden Press, Oxford: 141-172.
518. Sago J and Hall RP (2002) Dapsone. *Dermatologic Therapy* 15: 340-351.
519. Jollow DJ, Bradshaw TP and Mcmillan DC (1995) Dapsone-induced hemolytic anemia. *Drug metabolism reviews* 27: 107-124.
520. Krieg AM, Yi A-K, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, et al. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374: 546-549.
521. Klinman DM, Yamshchikov G and Ishigatsubo Y (1997) Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *The Journal of immunology* 158: 3635-3639.
522. Mutwiri GK, Nichani AK, Babiuk S and Babiuk LA (2004) Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of Controlled Release* 97: 1-17.
523. Bianco A, Hoebeke J, Godefroy S, Chaloin O, Pantarotto D, et al. (2005) Cationic carbon nanotubes bind to CpG oligodeoxynucleotides and enhance their immunostimulatory properties. *Journal of the American Chemical Society* 127: 58-59.
524. Lee J, Chuang T-H, Redecke V, She L, Pitha PM, et al. (2003) Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 6646-6651.

525. Smee DF, Alaghamandan HA, Cottam H, Sharma B, Jolley W, et al. (1989) Broad-spectrum in vivo antiviral activity of 7-thia-8-oxoguanosine, a novel immunopotentiating agent. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 33: 1487-1492.
526. Dzopalic T, Dragicevic A, Vasilijic S, Vucevic D, Majstorovic I, et al. (2010) Loxoribine, a selective Toll-like receptor 7 agonist, induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells and stimulates their Th-1-and Th-17-polarizing capability. *International immunopharmacology* 10: 1428-1433.
527. Dzopalic T, Dragicevic A, Bozic B, Rajkovic I and Colic M (2012) Dose-dependent response of dendritic cells to 7-thia-8-oxo-guanosine and its modulation by polyinosinic: polycytidylic acid. *Experimental Biology and Medicine* 237: 784-792.
528. Shi Kam NW, Jessop TC, Wender PA and Dai H (2004) Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells. *Journal of the American Chemical Society* 126: 6850-6851.
529. Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, Marega R, Wu W, et al. (2006) Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Letters* 6: 1522-1528.
530. Cui D, Tian F, Ozkan CS, Wang M and Gao H (2005) Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicology letters* 155: 73-85.
531. Ding L, Stilwell J, Zhang T, Elboudwarej O, Jiang H, et al. (2005) Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. *Nano Letters* 5: 2448-2464.
532. Lam C-W, James JT, McCluskey R and Hunter RL (2004) Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicological Sciences* 77: 126-134.
533. Warheit DB, Laurence B, Reed KL, Roach D, Reynolds G, et al. (2004) Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicological Sciences* 77: 117-125.
534. Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier J-F, et al. (2005) Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicology and applied pharmacology* 207: 221-231.
535. Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WA, et al. (2008) Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nature Nanotechnology* 3: 423-428.

536. Plata D, Gschwend P and Reddy C (2008) Industrially synthesized single-walled carbon nanotubes: Compositional data for users, environmental risk assessments, and source apportionment. *Nanotechnology* 19: 185706.
537. Casey A, Herzog E, Davoren M, Lyng F, Byrne H, et al. (2007) Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. *Carbon* 45: 1425-1432.
538. Wörle-Knirsch J, Pulskamp K and Krug H (2006) Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Letters* 6: 1261-1268.
539. Dong L, Joseph KL, Witkowski CM and Craig MM (2008) Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes suspended in various surfactants. *Nanotechnology* 19: 255702.
540. Cherukuri P, Bachilo SM, Litovsky SH and Weisman RB (2004) Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells. *Journal of the American Chemical Society* 126: 15638-15639.
541. Liu Z, Winters M, Holodniy M and Dai H (2007) siRNA Delivery into Human T Cells and Primary Cells with Carbon-Nanotube Transporters. *Angewandte Chemie International Edition* 46: 2023-2027.
542. Chin S-F, Baughman RH, Dalton AB, Dieckmann GR, Draper RK, et al. (2007) Amphiphilic helical peptide enhances the uptake of single-walled carbon nanotubes by living cells. *Experimental Biology and Medicine* 232: 1236-1244.
543. Yehia HN, Draper RK, Mikoryak C, Walker EK, Bajaj P, et al. (2007) Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells. *J Nanobiotechnol* 5: 1-8.
544. Chen X, Lee GS, Zettl A and Bertozzi CR (2004) Biomimetic engineering of carbon nanotubes by using cell surface mucin mimics. *Angewandte Chemie International Edition* 43: 6111-6116.
545. Chen X, Tam UC, Czapinski JL, Lee GS, Rabuka D, et al. (2006) Interfacing carbon nanotubes with living cells. *Journal of the American Chemical Society* 128: 6292-6293.
546. Jin H, Heller DA and Strano MS (2008) Single-particle tracking of endocytosis and exocytosis of single-walled carbon nanotubes in NIH-3T3 cells. *Nano Letters* 8: 1577-1585.
547. Liu Z, Davis C, Cai W, He L, Chen X, et al. (2008) Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 1410-1415.

548. Yang S-T, Wang X, Jia G, Gu Y, Wang T, et al. (2008) Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice. *Toxicology letters* 181: 182-189.
549. Yang ST, Fernando K, Liu JH, Wang J, Sun HF, et al. (2008) Covalently PEGylated carbon nanotubes with stealth character in vivo. *Small* 4: 940-944.
550. Shabalovskaya S and Anderegg J (1995) Surface spectroscopic characterization of TiNi nearly equiatomic shape memory alloys for implants. *Journal of Vacuum Science & Technology A* 13: 2624-2632.
551. Lojen G, Anžel I, Kneissl A, Križman A, Unterweger E, et al. (2005) Microstructure of rapidly solidified Cu–Al–Ni shape memory alloy ribbons. *Journal of materials processing technology* 162: 220-229.
552. Stopić S, Friedrich B, Raić K, Volkov-Husović T and Dimitrijević M (2008) Characterization of nano-powder morphology obtained by ultrasonic spray pyrolysis. *Metalurgija* 14: 41-54.
553. Peskin RL and Raco RJ (2005) Ultrasonic atomization of liquids. *The Journal of the Acoustical Society of America* 35: 1378-1381.
554. Messing GL, Zhang SC and Jayanthi GV (1993) Ceramic powder synthesis by spray pyrolysis. *Journal of the American Ceramic Society* 76: 2707-2726.
555. Vuković G, Marinković A, Obradović M, Radmilović V, Čolić M, et al. (2009) Synthesis, characterization and cytotoxicity of surface amino-functionalized water-dispersible multi-walled carbon nanotubes. *Applied Surface Science* 255: 8067-8075.
556. Vuković GD, Marinković AD, Čolić M, Ristić MĐ, Aleksić R, et al. (2010) Removal of cadmium from aqueous solutions by oxidized and ethylenediamine-functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Chemical engineering journal* 157: 238-248.
557. Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, et al. (2005) Guidance on good cell culture practice. a report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Alternatives to laboratory animals: ATLA* 33: 261.
558. Directive C (1986) 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Off J Eur Commun* 29: L358.
559. Kandil H, Bachy V, Williams D, Helmi R, Gotch F, et al. (2005) Regulation of dendritic cell interleukin-12 secretion by tumour cell necrosis. *Clinical & Experimental Immunology* 140: 54-64.

560. Huang X, Jain PK, El-Sayed IH and El-Sayed MA (2006) Determination of the minimum temperature required for selective photothermal destruction of cancer cells with the use of immunotargeted gold nanoparticles. *Photochem Photobiol* 82: 412-417.
561. Rothe G, Oser A and Valet G (1988) Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* 75: 354-355.
562. Li Q, Lau A, Morris TJ, Guo L, Fordyce CB, et al. (2004) A syntaxin 1, G α , and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *The Journal of neuroscience* 24: 4070-4081.
563. Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L and Pizzoferrato A (1993) *In vitro* evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* 14: 359-364.
564. Lipsky PE, Ellner JJ and Rosenthal AS (1976) Phytohemagglutinin-Induced Proliferation of Guinea Pig Thymus-Derived Lymphocytes I. Accessory Cell Dependence. *The Journal of immunology* 116: 868-875.
565. Vremec D, O'Keeffe M, Wilson A, Ferrero I, Koch U, et al. (2011) Factors determining the spontaneous activation of splenic dendritic cells in culture. *Innate immunity* 17: 338-352.
566. Chu C, Wang R, Hu T, Yin L, Pu Y, et al. (2009) XPS and biocompatibility studies of titania film on anodized NiTi shape memory alloy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20: 223-228.
567. Colic M, Stamenkovic D, Anzel I, Lojen G and Rudolf R (2009) The influence of the microstructure of high noble gold-platinum dental alloys on their corrosion and biocompatibility in vitro. *Gold Bulletin* 42: 34-47.
568. Schmid G (2008) The relevance of shape and size of Au₅₅ clusters. *Chem Soc Rev* 37: 1909-1930.
569. Tsai CY, Lu SL, Hu CW, Yeh CS, Lee GB, et al. (2012) Size-dependent attenuation of TLR9 signaling by gold nanoparticles in macrophages. *J Immunol* 188: 68-76.
570. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ and Wyatt MD (2005) Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 1: 325-327.
571. Antic Stankovic J, Vucevic D, Majstorovic I, Vasilijic S and Colic M (2004) The role of rat Crp, a complement regulatory protein, in proliferation of thymocytes. *Life Sci* 75: 3053-3062.
572. Gilboa E (2007) DC-based cancer vaccines. *Journal of Clinical Investigation* 117: 1195-1203.

573. Ramanathan T, Fisher F, Ruoff R and Brinson L (2005) Amino-functionalized carbon nanotubes for binding to polymers and biological systems. *Chemistry of Materials* 17: 1290-1295.
574. Wang Y, Iqbal Z and Mitra S (2006) Rapidly functionalized, water-dispersed carbon nanotubes at high concentration. *Journal of the American Chemical Society* 128: 95-99.
575. Xu J, Yao P, Li X and He F (2008) Synthesis and characterization of water-soluble and conducting sulfonated polyaniline/*i>* para</i>-phenylenediamine-functionalized multi-walled carbon nanotubes nano-composite. *Materials Science and Engineering: B* 151: 210-219.
576. Bedard K and Krause K-H (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews* 87: 245-313.
577. Anderson JM and Miller KM (1984) Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials* 5: 5-10.
578. Anderson JM (1993) Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices. *Cardiovascular Pathology* 2: 33-41.
579. Goodman SB (2007) Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system. *Biomaterials* 28: 5044-5048.
580. Hornez J, Lefevre A, Joly D and Hildebrand H (2002) Multiple parameter cytotoxicity index on dental alloys and pure metals. *Biomolecular engineering* 19: 103-117.
581. Schmalz G, Langer H and Schweikl H (1998) Cytotoxicity of dental alloy extracts and corresponding metal salt solutions. *Journal of dental research* 77: 1772-1778.
582. Schmalz G, Bindslev DA, Pfüller S and Schweikl H (1997) Cytotoxicity of metal cations used in dental cast alloys. *Alternatives to Laboratory Animals* 25: 323-330.
583. Schedle A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan X, Franz A, Füreder W, et al. (1995) Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations. *Journal of dental research* 74: 1513-1520.
584. Wataha J, Lockwood P and Nelson S (1999) Initial versus subsequent release of elements from dental casting alloys. *Journal of oral rehabilitation* 26: 798-803.
585. Wataha JC, Hanks C and Craig RG (1992) In vitro synergistic, antagonistic, and duration of exposure effects of metal cations on eukaryotic cells. *Journal of biomedical materials research* 26: 1297-1309.

586. Wataha J, Lockwood P, Schedle A, Noda M and Bouillaguet S (2002) Ag, Cu, Hg and Ni ions alter the metabolism of human monocytes during extended low-dose exposures. *Journal of oral rehabilitation* 29: 133-139.
587. Craig R and Hanks C (1990) Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests. *Journal of dental research* 69: 1539-1542.
588. Gutteridge J, Quinlan GJ, Clark I and Halliwell B (1985) Aluminium salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* 835: 441-447.
589. Johnston H, Thomas S and Atterwill C (1993) Aluminium and iron induced metabolic changes in neuroblastoma cell lines and rat primary neural cultures. *Toxicology in vitro* 7: 229-233.
590. Kneissl AC, Unterweger E, Bruncko M, Mehrabi K, Lojen G, et al. (2008) Microstructure and properties of NiTi and CuAlNi shape memory alloys. *Metalurgija* 14: 89-100.
591. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S and Nicotera P (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *The Journal of experimental medicine* 185: 1481-1486.
592. Bogdanski D, Esenwein SA, Prymak O, Epple M, Muhr G, et al. (2004) Inhibition of PMN apoptosis after adherence to dip-coated calcium phosphate surfaces on a NiTi shape memory alloy. *Biomaterials* 25: 4627-4632.
593. Choi J, Bogdanski D, Koller M, Esenwein SA, Muller D, et al. (2003) Calcium phosphate coating of nickel-titanium shape-memory alloys. Coating procedure and adherence of leukocytes and platelets. *Biomaterials* 24: 3689-3696.
594. Suska F, Gretzer C, Esposito M, Tengvall P and Thomsen P (2005) Monocyte viability on titanium and copper coated titanium. *Biomaterials* 26: 5942-5950.
595. Scuderi P (1990) Differential effects of copper and zinc on human peripheral blood monocyte cytokine secretion. *Cellular immunology* 126: 391-405.
596. Opal SM and DePalo VA (2000) Anti-inflammatory cytokines. *CHEST Journal* 117: 1162-1172.
597. Granchi D, Verri E, Ciapetti G, Savarino L, Cenni E, et al. (1998) Effects of chromium extract on cytokine release by mononuclear cells. *Biomaterials* 19: 283-291.
598. Stice J (1990) The use of superelasticity in guidewires and arthroscopic instrumentation. *Butterworth-Heinemann, Engineering Aspects of Shape Memory Alloys(UK)*, 1990: 483-487.

599. Čolić M, Tomić S, Rudolf R, Anžel I and Lojen G (2010) The response of macrophages to a Cu-Al-Ni shape memory alloy. *Journal of Biomaterials Applications* 25: 269-286.
600. Rondelli G, Vicentini B and Cigada A (1990) The corrosion behaviour of nickel titanium shape memory alloys. *Corrosion Science* 30: 805-812.
601. Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, et al. (1999) Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *The Journal of experimental medicine* 189: 821-829.
602. Franke A, Lante W, Kollig E, Koeller M, Schinkel C, et al. (2009) Exogenous IL-12 and its effect on TH1/TH2 cell activity after cardiac surgery. *Shock* 32: 366-373.
603. Kanters E, Pasparakis M, Gijbels MJ, Vergouwe MN, Partouns-Hendriks I, et al. (2003) Inhibition of NF- κ B activation in macrophages increases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation* 112: 1176-1185.
604. Libby P, Ridker PM and Maseri A (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135-1143.
605. Libby P, Ridker PM and Hansson GK (2011) Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473: 317-325.
606. Schönbeck U, Sukhova GK, Gerdes N and Libby P (2002) T_H2 Predominant Immune Responses Prevail in Human Abdominal Aortic Aneurysm. *The American journal of pathology* 161: 499-506.
607. Xiong W, Zhao Y, Prall A, Greiner TC and Baxter BT (2004) Key roles of CD4⁺ T cells and IFN- γ in the development of abdominal aortic aneurysms in a murine model. *The Journal of immunology* 172: 2607-2612.
608. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL and O'Garra A (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology* 19: 683-765.
609. Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ and Sacks D (2007) CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine* 204: 285-297.
610. Grazia Roncarolo M, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, et al. (2006) Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological reviews* 212: 28-50.
611. Saraiva M, Christensen JR, Veldhoen M, Murphy TL, Murphy KM, et al. (2009) Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. *Immunity* 31: 209-219.

612. Jankovic D and Trinchieri G (2007) IL-10 or not IL-10: that is the question. *Nature immunology* 8: 1281-1283.
613. Michel R (1987) Trace metal analysis in biocompatibility testing. *CRC Crit Rev Biocomp* 3: 235-317.
614. Putters J, Sukul K, De Zeeuw G, Bijma A and Besselink P (1992) Comparative cell culture effects of shape memory metal (Nitinol®), nickel and titanium: a biocompatibility estimation. *European surgical research* 24: 378-382.
615. Habijan T, Glogowski T, Kühn S, Pohl M, Wittsiepe J, et al. (2011) Can human mesenchymal stem cells survive on a NiTi implant material subjected to cyclic loading? *Acta Biomaterialia* 7: 2733-2739.
616. Es-Souni M, Fischer-Brandies H and Es-Souni M (2007) Human gingival fibroblast response to electropolished NiTi surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 80: 159-166.
617. Klein CB, Frenkel K and Costa M (1991) The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. *Chemical research in toxicology* 4: 592-604.
618. Lü X, Bao X, Huang Y, Qu Y, Lu H, et al. (2009) Mechanisms of cytotoxicity of nickel ions based on gene expression profiles. *Biomaterials* 30: 141-148.
619. Lifeng Z, Yan H, Dayun Y, Xiaoying L, Tingfei X, et al. (2011) The underlying biological mechanisms of biocompatibility differences between bare and TiN-coated NiTi alloys. *Biomedical Materials* 6: 025012.
620. Shabalovskaya S, Anderegg J and Van Humbeeck J (2008) Critical overview of Nitinol surfaces and their modifications for medical applications. *Acta Biomaterialia* 4: 447-467.
621. Fisher PJ, Bulur PA, Vuk-Pavlovic S, Prendergast FG and Dietz AB (2008) Dendritic cell microvilli: a novel membrane structure associated with the multifocal synapse and T-cell clustering. *Blood* 112: 5037-5045.
622. Lutz MB and Schuler G (2002) Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in immunology* 23: 445-449.
623. Gunaratnam M and Grant MH (2004) Damage to F-actin and cell death induced by chromium VI and nickel in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Toxicology in vitro* 18: 245-253.
624. Yoshimura T, Takeda A, Hamano S, Miyazaki Y, Kinjyo I, et al. (2006) Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4⁺ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4⁺ T

- cells partially through STAT3-dependent mechanism. *The Journal of immunology* 177: 5377-5385.
625. Saraiva M and O'Garra A (2010) The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology* 10: 170-181.
626. Kishimoto T (2010) IL-6: from its discovery to clinical applications. *International immunology* 22: 347-352.
627. Lin Z-Q, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T and Mukaida N (2003) Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *Journal of leukocyte biology* 73: 713-721.
628. Hu J and Wan Y (2011) Tolerogenic dendritic cells and their potential applications. *Immunology* 132: 307-314.
629. Kawai T and Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* 11: 373-384.
630. Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu C-y, et al. (1996) IL-12-deficient mice are defective in IFN γ production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4: 471-481.
631. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie M-H, de Sauvage FJ and Gurney AL (2003) Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *Journal of Biological Chemistry* 278: 1910-1914.
632. Korn T, Bettelli E, Oukka M and Kuchroo VK (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* 27: 485-517.
633. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW and Hansbro PM (2008) Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123: 326-338.
634. Hu X, Paik PK, Chen J, Yamilina A, Kockeritz L, et al. (2006) IFN- γ suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* 24: 563-574.
635. Kneissl AC, Unterweger E and Lojen G (2006) Functional properties of wires and thin ribbons of several shape memory alloys. *Advanced Engineering Materials* 8: 1113-1118.
636. Anžel I, Kneissl AC, Rudolf R and Križman A (2009) Thermal Stability of a rapidly solidified Cu-Zr. *Practical Metallography* 46: 657-669.

637. Unterweger E, Lojen G and Kneissl AC (2004) Dunne Bänder aus Cu-Basis-Formgedächtnislegierungen hergestellt durch melt-spinning. SONDERBANDE DER PRAKTISCHEN METALLOGRAPHIE 36: 143.
638. Sun T, Wang LP and Wang M (2011) (Ti, O)/Ti and (Ti, O, N)/Ti composite coatings fabricated via PIIID for the medical application of NiTi shape memory alloy. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 96: 249-260.
639. Sun T and Wang M (2010) A comparative study on titania layers formed on Ti, Ti-6Al-4V and NiTi shape memory alloy through a low temperature oxidation process. *Surface and Coatings Technology* 205: 92-101.
640. Shabalovskaya SA, Anderegg J, Sachdeva R and Harmon B (1994) Preliminary XPS spectroscopic characterization of autoclaved TiNi shape memory alloys for implants. *Materials Research Society Symposium Proceedings*. Cambridge Univ Press. pp. 239-239.
641. Thierry B, Tabrizian M, Savadogo O and Yahia LH (2000) Effects of sterilization processes on NiTi alloy: surface characterization. *Journal of biomedical materials research* 49: 88-98.
642. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ and Lemons JE (1996) An introduction to materials in medicine. *Biomaterials Science* 484.
643. Trepanier C, Venugopalan R and Pelton AR (2000) Corrosion resistance and biocompatibility of passivated NiTi. *Shape memory implants*. Springer. pp. 35-45.
644. Pourbaix M (1984) Electrochemical corrosion of metallic biomaterials. *Biomaterials* 5: 122-134.
645. Shabalovskaya SA, Tian H, Anderegg JW, Schryvers DU, Carroll WU, et al. (2009) The influence of surface oxides on the distribution and release of nickel from Nitinol wires. *Biomaterials* 30: 468-477.
646. Undisz A, Schrempel F, Wesch W and Rettenmayr M (2009) In situ observation of surface oxide layers on medical grade Ni-Ti alloy during straining. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 88: 1000-1009.
647. Zhu L, Trépanier C, Pelton A and Fino J (2003) Oxidation of nitinol and its effect on corrosion resistance.
648. Kimura H and Sohmura T (1987) Surface coating on TiNi shape memory implant alloys. *The Journal of Osaka University Dental School* 27: 211-223.
649. Messer HH, Murray EJ and Goebel NK (1982) Removal of trace metals from culture media and sera for in vitro deficiency studies. *The Journal of nutrition* 112: 652.

650. Hasany SM, Chughtai FA and Ghaffar A (1991) Sorption behavior of microamounts of zinc on titanium oxide from aqueous solutions. *Separation Science and Technology* 26: 1131-1146.
651. Rink L and Haase H (2007) Zinc homeostasis and immunity. *Trends in immunology* 28: 1-4.
652. Rogers TH and Babensee JE (2011) The role of integrins in the recognition and response of dendritic cells to biomaterials. *Biomaterials* 32: 1270-1279.
653. Chan EP, Mhawi A, Clode P, Saunders M and Filgueira L (2009) Effects of titanium (iv) ions on human monocyte-derived dendritic cells. *Metallomics* 1: 166-174.
654. Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, et al. (2003) p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and 2, 4-dinitrochlorobenzene. *Journal of investigative dermatology* 120: 390-399.
655. McNab FW, Rajsbaum R, Stoye JP and O'Garra A (2011) Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Current opinion in immunology* 23: 46-56.
656. Ho LH, Ruffin RE, Murgia C, Li L, Krilis SA, et al. (2004) Labile zinc and zinc transporter ZnT4 in mast cell granules: role in regulation of caspase activation and NF- κ B translocation. *The Journal of immunology* 172: 7750-7760.
657. Kitamura H, Morikawa H, Kamon H, Iguchi M, Hojyo S, et al. (2006) Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. *Nature immunology* 7: 971-977.
658. von Bülow V, Rink L and Haase H (2005) Zinc-mediated inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and expression suppresses TNF- α and IL-1 β production in monocytes by elevation of guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate. *The Journal of immunology* 175: 4697-4705.
659. Wellinghausen N, Martin M and Rink L (1997) Zinc inhibits interleukin-1-dependent T cell stimulation. *European journal of immunology* 27: 2529-2535.
660. Zhou Z, Wang L, Song Z, Saari JT, McClain CJ, et al. (2004) Abrogation of nuclear factor- κ B activation is involved in zinc inhibition of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production and liver injury. *The American journal of pathology* 164: 1547-1556.
661. Kambayashi T, Wallin RP and Ljunggren H-G (2001) cAMP-elevating agents suppress dendritic cell function. *Journal of leukocyte biology* 70: 903-910.
662. Li Q, Zeng Y and Tang X (2010) The applications and research progresses of nickel-titanium shape memory alloy in reconstructive surgery. *Australasian Physical & Engineering Sciences in Medicine* 33: 129-136.

663. Duerig T, Tolomeo D and Wholey M (2000) An overview of superelastic stent design. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies* 9: 235-246.
664. Kobayashi Y, Honda Y, Christie LG, Teirstein PS, Bailey SR, et al. (2001) Long-term vessel response to a self-expanding coronary stent: a serial volumetric intravascular ultrasound analysis from the ASSURE trial. *Journal of the American College of Cardiology* 37: 1329-1334.
665. Roguin A, Grenadier E, Linn S, Markiewicz W and Beyar R (1999) Continued expansion of the nitinol self-expanding coronary stent: angiographic analysis and 1-year clinical follow-up. *American heart journal* 138: 326-333.
666. Chun Y, Levi DS, Mohanchandra K, Vinuela F, Vinuela Jr F, et al. (2009) Superelastic NiTi thin film small vessel graft for vascular repair. *SPIE Smart Structures and Materials+ Nondestructive Evaluation and Health Monitoring. International Society for Optics and Photonics*. pp. 728804-728804-728811.
667. Sharma R and Li D-Z (2006) Role of dendritic cells in atherosclerosis. *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals* 14: 166-169.
668. Jagadesham VP, Scott DJA and Carding SR (2008) Abdominal aortic aneurysms: an autoimmune disease? *Trends in molecular medicine* 14: 522-529.
669. Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, et al. (2010) Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* 55: 500-507.
670. Mehrabi K, Bruncko M and Kneissl A (2012) Microstructure, mechanical and functional properties of NiTi-based shape memory ribbons. *Journal of Alloys and Compounds* 526: 45-52.
671. Arrighi J-F, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V and Hauser C (2001) A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF- α , and contact sensitizers. *The Journal of immunology* 166: 3837-3845.
672. Richards R, Stiffanic M, Owen G, Riehle M, Ap Gwynn I, et al. (2001) Immunogold labelling of fibroblast focal adhesion sites visualised in fixed material using scanning electron microscopy, and living, using internal reflection microscopy. *Cell biology international* 25: 1237-1249.
673. Galkina E and Ley K (2009) Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annual review of immunology* 27: 165.

674. Blüml S, Kirchberger S, Bochkov VN, Krönke G, Stuhlmeier K, et al. (2005) Oxidized phospholipids negatively regulate dendritic cell maturation induced by TLRs and CD40. *The Journal of immunology* 175: 501-508.
675. Paigen B, Ishida BY, Verstuyft J, Winters RB and Albee D (1990) Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 10: 316-323.
676. Hoeg JM, Santamarina-Fojo S, Bérard AM, Cornhill JF, Herderick EE, et al. (1996) Overexpression of lecithin: cholesterol acyltransferase in transgenic rabbits prevents diet-induced atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 11448-11453.
677. Narayanaswamy M, Wright KC and Kandarpa K (2000) Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 11: 5-17.
678. Huang X, Neretina S and El-Sayed MA (2009) Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. *Advanced Materials* 21: 4880-4910.
679. Treguer-Delapierre M, Majimel J, Mornet S, Duguet E and Ravaine S (2008) Synthesis of non-spherical gold nanoparticles. *Gold Bull* 41: 195-207.
680. Wataha JC (2000) Biocompatibility of dental casting alloys: a review. *The journal of prosthetic dentistry* 83: 223-234.
681. Bendig L and Hofmann F (1989) Ultrasonic atomizer for liquids. Google Patents.
682. International Standards Organisation (1997) dentistry - preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry - test methods for dental materials. ISO 7404. Geneva : ISO.
683. Colic M, Tomic S, Rudolf R, Anzel I and Lojen G (2010) The response of macrophages to a Cu-Al-Ni shape memory alloy. *J Biomater Appl* 25: 269-286.
684. Soenen SJ, Illyes E, Vercauteren D, Braeckmans K, Majer Z, et al. (2009) The role of nanoparticle concentration-dependent induction of cellular stress in the internalization of non-toxic cationic magnetoliposomes. *Biomaterials* 30: 6803-6813.
685. Pernodet N, Fang X, Sun Y, Bakhtina A, Ramakrishnan A, et al. (2006) Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small* 2: 766-773.
686. Hainfeld JF, Slatkin DN and Smilowitz HM (2004) The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Physics in medicine and biology* 49: N309-315.
687. Leonov AP, Zheng J, Clogston JD, Stern ST, Patri AK, et al. (2008) Detoxification of gold nanorods by treatment with polystyrenesulfonate. *ACS nano* 2: 2481-2488.

688. Alkilany AM, Nagaria PK, Hexel CR, Shaw TJ, Murphy CJ, et al. (2009) Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: molecular origin of cytotoxicity and surface effects. *Small* 5: 701-708.
689. Khlebtsov N and Dykman L (2011) Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chemical Society Reviews* 40: 1647-1671.
690. De Wall SL, Painter C, Stone JD, Bandaranayake R, Wiley DC, et al. (2006) Noble metals strip peptides from class II MHC proteins. *Nature Chemical Biology* 2: 197-201.
691. Vlak T and Jajić I (1992) The effect of gold salts on rheumatoid factor dynamics in patients with rheumatoid arthritis]. *Reumatizam* 39: 11.
692. Bombardier C, Ware J, Russell IJ, Larson M, Chalmers A, et al. (1986) Auranofin therapy and quality of life in patients with rheumatoid arthritis. Results of a multicenter trial. *The American journal of medicine* 81: 565-578.
693. Patra HK, Banerjee S, Chaudhuri U, Lahiri P and Dasgupta AK (2007) Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 3: 111-119.
694. Fan J, Hung W, Li W and Yeh J (2009) Biocompatibility study of gold nanoparticles to human cells. 13th International Conference on Biomedical Engineering. Springer. pp. 870-873.
695. Thorek DL and Tsourkas A (2008) Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials* 29: 3583-3590.
696. Verma A and Stellacci F (2010) Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. *Small* 6: 12-21.
697. Wataha J, Lockwood P and Schedle A (2000) Effect of silver, copper, mercury, and nickel ions on cellular proliferation during extended, low-dose exposures. *Journal of biomedical materials research* 52: 360-364.
698. Wataha JC, Lockwood PE, Bouillaguet S and Noda M (2003) In vitro biological response to core and flowable dental restorative materials. *Dental Materials* 19: 25-31.
699. Schmalz G, Arenholt-Bindslev D, Hiller KA and Schweikl H (1997) Epithelium-fibroblast co-culture for assessing mucosal irritancy of metals used in dentistry. *European journal of oral sciences* 105: 86-91.
700. Medema JP and Borst J (1999) T cell signaling:: A decision of life and death. *Human Immunology* 60: 403-411.

701. Jia HY, Liu Y, Zhang XJ, Han L, Du LB, et al. (2008) Potential oxidative stress of gold nanoparticles by induced-NO releasing in serum. *Journal of the American Chemical Society* 131: 40-41.
702. Li JJ, Zou L, Hartono D, Ong CN, Bay BH, et al. (2008) Gold nanoparticles induce oxidative damage in lung fibroblasts in vitro. *Advanced Materials* 20: 138-142.
703. Mertelsmann R and Welte K (1986) Human interleukin 2: molecular biology, physiology and clinical possibilities. *Immunobiology* 172: 400-419.
704. Nelson BH and Willerford DM (1998) Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol* 70: 1-81.
705. Reis e Sousa C (2006) Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6: 476-483.
706. Iqbal MJ and Ashiq MN (2008) Physical and electrical properties of Zr-Cu substituted strontium hexaferrite nanoparticles synthesized by co-precipitation method. *Chemical engineering journal* 136: 383-389.
707. Mahl D, Greulich C, Meyer-Zaika W, Köller M and Epple M (2010) Gold nanoparticles: dispersibility in biological media and cell-biological effect. *Journal of Materials Chemistry* 20: 6176-6181.
708. Banu B, Ishaq M, Danadevi K, Padamavathi P and Ahuja Y (2004) DNA damage in leukocytes of mice treated with copper sulphate. *Food Chem Toxicol* 42: 1931-1936.
709. Lin AY, Almeida JPM, Bear A, Liu N, Luo L, et al. (2013) Gold Nanoparticle Delivery of Modified CpG Stimulates Macrophages and Inhibits Tumor Growth for Enhanced Immunotherapy. *PLoS One* 8: e63550.
710. Wathelet N and Moser M (2013) Role of dendritic cells in the regulation of antitumor immunity. *Oncoimmunology* 2: e23973.
711. Qu Y and Lu X (2009) Aqueous synthesis of gold nanoparticles and their cytotoxicity in human dermal fibroblasts-fetal. *Biomed Mater* 4: 025007.
712. Mironava T, Hadjiargyrou M, Simon M, Jurukovski V and Rafailovich MH (2010) Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 4: 120-137.
713. Singh S, D'Britto V, Prabhune A, Ramana C, Dhawan A, et al. (2010) Cytotoxic and genotoxic assessment of glycolipid-reduced and-capped gold and silver nanoparticles. *New Journal of Chemistry* 34: 294-301.
714. Trinchieri G (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 133-146.

715. Zanoni I and Granucci F (2010) Differences in lipopolysaccharide-induced signaling between conventional dendritic cells and macrophages. *Immunobiology* 215: 709-712.
716. Tze LE, Horikawa K, Domaschenz H, Howard DR, Roots CM, et al. (2011) CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med* 208: 149-165.
717. Ziegler A, Heidenreich R, Braumuller H, Wolburg H, Weidemann S, et al. (2009) EpCAM, a human tumor-associated antigen promotes Th2 development and tumor immune evasion. *Blood* 113: 3494-3502.
718. Hunter CA (2005) New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 5: 521-531.
719. Qi W, Huang X and Wang J (2013) Correlation between Th17 Cells and tumor microenvironment. *Cellular Immunology*.
720. Garrett WS, Chen LM, Kroschewski R, Ebersold M, Turley S, et al. (2000) Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* 102: 325-334.
721. Liu X, Huang N, Li H, Jin Q and Ji J (2013) Surface and size effects on cell interaction of gold nanoparticles with both phagocytic and nonphagocytic cells. *Langmuir* 29: 9138-9148.
722. Čolić M, Džopalić T, Tomić S, Rajković J, Rudolf R, et al. (2014) Immunomodulatory effects of carbon nanotubes functionalized with a Toll-like receptor 7 agonist on human dendritic cells. *Carbon* 67: 273-287.
723. Krpetić Z, Nativo P, See V, Prior IA, Brust M, et al. (2010) Inflicting controlled nonthermal damage to subcellular structures by laser-activated gold nanoparticles. *Nano Lett* 10: 4549-4554.
724. Speshock JL, Braydich-Stolle LK, Szymanski ER and Hussain SM (2010) Silver and Gold Nanoparticles Alter Cathepsin Activity In vitro. *Nanoscale Research Letters* 6: 17.
725. Magister S, Obermajer N, Mirkovic B, Svajger U, Renko M, et al. (2012) Regulation of cathepsins S and L by cystatin F during maturation of dendritic cells. *Eur J Cell Biol* 91: 391-401.
726. Dumitriu IE, Baruah P, Manfredi AA, Bianchi ME and Rovere-Querini P (2005) HMGB1: guiding immunity from within. *Trends Immunol* 26: 381-387.
727. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, et al. (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 276: 31332-31339.

728. Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, et al. (2001) An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* 166: 7128-7135.
729. Wenink MH, Santegoets KC, Broen JC, van Bon L, Abdollahi-Roodsaz S, et al. (2009) TLR2 promotes Th2/Th17 responses via TLR4 and TLR7/8 by abrogating the type I IFN amplification loop. *J Immunol* 183: 6960-6970.
730. Koido S, Homma S, Okamoto M, Namiki Y, Takakura K, et al. (2013) Combined TLR2/4-activated dendritic/tumor cell fusions induce augmented cytotoxic T lymphocytes. *PLoS One* 8: e59280.
731. Dzopalic T, Rajkovic I, Dragicevic A and Colic M (2012) The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. *Immunologic research* 52: 20-33.
732. Lacotte S, Garcia A, Décossas M, Al-Jamal WT, Li S, et al. (2008) Interfacing functionalized carbon nanohorns with primary phagocytic cells. *Advanced Materials* 20: 2421-2426.
733. Pompeo F and Resasco DE (2002) Water solubilization of single-walled carbon nanotubes by functionalization with glucosamine. *Nano Letters* 2: 369-373.
734. Shen J, Huang W, Wu L, Hu Y and Ye M (2007) Study on amino-functionalized multiwalled carbon nanotubes. *Materials Science and Engineering: A* 464: 151-156.
735. Liu Z, Robinson JT, Sun X and Dai H (2008) PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. *Journal of the American Chemical Society* 130: 10876-10877.
736. Yang X, Zhang X, Liu Z, Ma Y, Huang Y, et al. (2008) High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide. *The Journal of Physical Chemistry C* 112: 17554-17558.
737. Rojas-Chapana J, Troszczyńska J, Firkowska I, Morszeck C and Giersig M (2005) Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into *Escherichia coli* cells. *Lab on a Chip* 5: 536-539.
738. Kostarelos K, Lacerda L, Pastorin G, Wu W, Wieckowski S, et al. (2007) Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nature Nanotechnology* 2: 108-113.
739. Jersmann H, Ross KA, Vivers S, Brown SB, Haslett C, et al. (2003) Phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages: analysis by multiparameter flow cytometry. *Cytometry Part A* 51: 7-15.
740. Delogu LG, Venturelli E, Manetti R, Pinna GA, Carru C, et al. (2012) Ex vivo impact of functionalized carbon nanotubes on human immune cells. *Nanomedicine* 7: 231-243.

741. Raffa V, Ciofani G, Nitodas S, Karachalios T, D'Alessandro D, et al. (2008) Can the properties of carbon nanotubes influence their internalization by living cells? *Carbon* 46: 1600-1610.
742. Vuković GD, Tomić SZ, Marinković AD, Radmilović V, Uskoković PS, et al. (2010) The response of peritoneal macrophages to dapsone covalently attached on the surface of carbon nanotubes. *Carbon* 48: 3066-3078.
743. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, et al. (2010) Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327: 656-661.
744. Caminschi I, Meuter S and Heath WR (2013) DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *OncoImmunology* 2: 0--1.
745. Li R, Wang X, Ji Z, Sun B, Zhang H, et al. (2013) Surface Charge and Cellular Processing of Covalently Functionalized Multiwall Carbon Nanotubes Determine Pulmonary Toxicity. *ACS nano* 7: 2352-2368.
746. Kam NWS and Dai H (2005) Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *Journal of the American Chemical Society* 127: 6021-6026.
747. Choi JH, Nguyen FT, Barone PW, Heller DA, Moll AE, et al. (2007) Multimodal biomedical imaging with asymmetric single-walled carbon nanotube/iron oxide nanoparticle complexes. *Nano Letters* 7: 861-867.
748. Heller DA, Baik S, Eurell TE and Strano MS (2005) Single-Walled Carbon Nanotube Spectroscopy in Live Cells: Towards Long-Term Labels and Optical Sensors. *Advanced Materials* 17: 2793-2799.
749. Heller DA, Jeng ES, Yeung T-K, Martinez BM, Moll AE, et al. (2006) Optical detection of DNA conformational polymorphism on single-walled carbon nanotubes. *Science* 311: 508-511.
750. Kam NWS, Liu Z and Dai H (2006) Carbon nanotubes as intracellular transporters for proteins and DNA: an investigation of the uptake mechanism and pathway. *Angewandte Chemie* 118: 591-595.
751. Wagner D, Maser J, Lai B, Cai Z, Barry CE, et al. (2005) Elemental analysis of *Mycobacterium avium*-, *Mycobacterium tuberculosis*-, and *Mycobacterium smegmatis*-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *The Journal of immunology* 174: 1491-1500.

752. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S and e Sousa CR (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303: 1529-1531.
753. Lee BL, Moon JE, Shu JH, Yuan L, Newman ZR, et al. (2013) UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. *eLife* 2.
754. Smart S, Cassady A, Lu G and Martin D (2006) The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon* 44: 1034-1047.
755. Zhu L, Chang DW, Dai L and Hong Y (2007) DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells. *Nano Letters* 7: 3592-3597.
756. Grabinski C, Hussain S, Lafdi K, Braydich-Stolle L and Schlager J (2007) Effect of particle dimension on biocompatibility of carbon nanomaterials. *Carbon* 45: 2828-2835.
757. Bottini M, Bruckner S, Nika K, Bottini N, Bellucci S, et al. (2006) Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicology letters* 160: 121-126.
758. Sayes CM, Liang F, Hudson JL, Mendez J, Guo W, et al. (2006) Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicology letters* 161: 135-142.
759. Cheng C, Müller KH, Koziol KK, Skepper JN, Midgley PA, et al. (2009) Toxicity and imaging of multi-walled carbon nanotubes in human macrophage cells. *Biomaterials* 30: 4152-4160.
760. Fiorito S, Serafino A, Andreola F and Bernier P (2006) Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages. *Carbon* 44: 1100-1105.
761. Diaz-Ruiz A, Zavala C, Montes S, Ortiz-Plata A, Salgado-Ceballos H, et al. (2008) Antioxidant, antiinflammatory and antiapoptotic effects of dapsone in a model of brain ischemia/reperfusion in rats. *Journal of neuroscience research* 86: 3410-3419.
762. Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, López-Soriano F, et al. (2000) LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF- α . *Blood* 95: 3823-3831.
763. Esch RK, Han L, Foarde KK and Ensor DS (2010) Endotoxin contamination of engineered nanomaterials. *Nanotoxicology* 4: 73-83.
764. Suda T, Suzuki Y, Matsui T, Inoue T, Niide O, et al. (2005) Dapsone suppresses human neutrophil superoxide production and elastase release in a calcium-dependent manner. *British Journal of Dermatology* 152: 887-895.
765. Veggi LM, Pretto L, Ochoa EJ, Catania VA, Luquita MG, et al. (2008) Dapsone induces oxidative stress and impairs antioxidant defenses in rat liver. *Life sciences* 83: 155-163.

766. Ye S-F, Wu Y-H, Hou Z-Q and Zhang Q-Q (2009) ROS and NF- κ B are involved in upregulation of IL-8 in A549 cells exposed to multi-walled carbon nanotubes. *Biochemical and biophysical research communications* 379: 643-648.
767. Khan FD, Roychowdhury S, Nemes R, Vyas PM, Woster PM, et al. (2006) Effect of pro-inflammatory cytokines on the toxicity of the arylhydroxylamine metabolites of sulphamethoxazole and dapsone in normal human keratinocytes. *Toxicology* 218: 90-99.
768. Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DW, Lucia SM, et al. (2000) Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 287: 1655-1658.
769. Miller BH, Fratti RA, Poschet JF, Timmins GS, Master SS, et al. (2004) Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. *Infection and immunity* 72: 2872-2878.
770. van Zyl JM, Basson K, Kriegler A and van der Walt BJ (1991) Mechanisms by which clofazimine and dapsone inhibit the myeloperoxidase system: a possible correlation with their anti-inflammatory properties. *Biochemical pharmacology* 42: 599-608.
771. Kettle AJ and Winterbourn CC (1991) Mechanism of inhibition of myeloperoxidase by anti-inflammatory drugs. *Biochemical pharmacology* 41: 1485-1492.
772. Bozeman PM, Learn DB and Thomas EL (1992) Inhibition of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase by dapsone. *Biochemical pharmacology* 44: 553-563.
773. Kettle AJ, Gedye CA and Winterbourn CC (1993) Superoxide is an antagonist of anti-inflammatory drugs that inhibit hypochlorous acid production by myeloperoxidase. *Biochemical pharmacology* 45: 2003-2010.
774. Niwa Y, Sakane T and Miyachi Y (1984) Dissociation of the inhibitory effect of dapsone on the generation of oxygen intermediates—in comparison with that of colchicine and various scavengers. *Biochemical pharmacology* 33: 2355-2360.
775. Debol S, Herron M and Nelson R (1997) Anti-inflammatory action of dapsone: inhibition of neutrophil adherence is associated with inhibition of chemoattractant-induced signal transduction. *Journal of leukocyte biology* 62: 827-836.
776. Klegeris A and McGeer PL (1994) Inhibition of respiratory burst in macrophages by complement receptor blockade. *European journal of pharmacology* 260: 273-277.

777. Reilly TP, Woster PM and Svensson CK (1999) Methemoglobin formation by hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone: implications for differences in adverse drug reactions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 288: 951-959.
778. Bradshaw TP, McMillan DC, Crouch RK and Jollow DJ (1997) Formation of free radicals and protein mixed disulfides in rat red cells exposed to dapsone hydroxylamine. *Free Radical Biology and Medicine* 22: 1183-1193.
779. Sahu A, Saha K, Mukherjee A and Sehgal VN (1992) In vivo effects of anti-leprosy drugs on the rat peritoneal macrophages and lymphocyte subpopulations. *International journal of immunopharmacology* 14: 721-730.
780. Maher RJ, Cao D, Boxer LA and Petty HR (1993) Simultaneous calcium-dependent delivery of neutrophil lactoferrin and reactive oxygen metabolites to erythrocyte targets: Evidence supporting granule-dependent triggering of superoxide deposition. *Journal of cellular physiology* 156: 226-234.
781. Dumortier H (2013) When carbon nanotubes encounter the immune system: Desirable and undesirable effects. *Advanced drug delivery reviews* 65: 2120-2126.
782. Palomäki J, Välimäki E, Sund J, Vippola M, Clausen PA, et al. (2011) Long, needle-like carbon nanotubes and asbestos activate the NLRP3 inflammasome through a similar mechanism. *ACS nano* 5: 6861-6870.
783. Murphy FA, Schinwald A, Poland CA and Donaldson K (2012) The mechanism of pleural inflammation by long carbon nanotubes: interaction of long fibres with macrophages stimulates them to amplify pro-inflammatory responses in mesothelial cells. *Part Fibre Toxicol* 9.
784. Sager TM, Wolfarth MW, Andrew M, Hubbs A, Friend S, et al. (2013) Effect of multi-walled carbon nanotube surface modification on bioactivity in the C57Bl/6 mouse model. *Nanotoxicology*: 1-11.
785. Valledor AF, Comalada M, Xaus J and Celada A (2000) The differential time-course of extracellular-regulated kinase activity correlates with the macrophage response toward proliferation or activation. *Science Signaling* 275: 7403.
786. Schmidt E, Reimer S, Kruse N, Jainta S, Bröcker E-B, et al. (2000) Autoantibodies to BP180 associated with bullous pemphigoid release interleukin-6 and interleukin-8 from cultured human keratinocytes. *Journal of investigative dermatology* 115: 842-848.

787. Schmidt E, Reimer S, Kruse N, Bröcker EB and Zillikens D (2001) The IL-8 release from cultured human keratinocytes, mediated by antibodies to bullous pemphigoid autoantigen 180, is inhibited by dapsone. *Clinical & Experimental Immunology* 124: 157-162.
788. Adams L, Franzblau S, Vavrin Z, Hibbs J and Krahenbuhl J (1991) L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. *The Journal of immunology* 147: 1642-1646.
789. Denis M (1991) Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cellular immunology* 132: 150-157.
790. Chan J, Xing Y, Magliozzo R and Bloom B (1992) Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *The Journal of experimental medicine* 175: 1111-1122.
791. MacMicking J, Xie Q-w and Nathan C (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology* 15: 323-350.
792. Khanolkar-Young S, Snowden D and Lockwood D (1998) Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF- β) in leprosy lesions. *Clin Exp Immunol* 113: 438-442.
793. Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology* 2: 907-916.
794. Chiwakata CB, Hemmer CJ and Dietrich M (2000) High levels of inducible nitric oxide synthase mRNA are associated with increased monocyte counts in blood and have a beneficial role in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infection and immunity* 68: 394-399.
795. Weiss G, Thuma PE, Biemba G, Mabeza G, Werner ER, et al. (1998) Cerebrospinal fluid levels of biopterin, nitric oxide metabolites, and immune activation markers and the clinical course of human cerebral malaria. *Journal of Infectious Diseases* 177: 1064-1068.
796. Maneerat Y, Viriyavejakul P, Punpoowong B, Jones M, Wilairatana P, et al. (2000) Inducible nitric oxide synthase expression is increased in the brain in fatal cerebral malaria. *Histopathology* 37: 269-277.
797. Nagabhushanam V, Solache A, Ting L-M, Escaron CJ, Zhang JY, et al. (2003) Innate inhibition of adaptive immunity: *Mycobacterium tuberculosis*-induced IL-6 inhibits macrophage responses to IFN- γ . *The Journal of immunology* 171: 4750-4757.
798. VanHeyningen TK, Collins HL and Russell DG (1997) IL-6 produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. *The Journal of immunology* 158: 330-337.

799. Mihret A (2012) The role of dendritic cells in Mycobacterium tuberculosis infection. *Virulence* 3: 654-659.
800. Pinzon-Charry A, Woodberry T, Kienzle V, McPhun V, Minigo G, et al. (2013) Apoptosis and dysfunction of blood dendritic cells in patients with falciparum and vivax malaria. *The Journal of experimental medicine* 210: 1635-1646.
801. Sertl K, Takemura T, Tschachler E, Ferrans V, Kaliner M, et al. (1986) Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *The Journal of experimental medicine* 163: 436-451.
802. Holt P and Schon-Hegrad M (1987) Localization of T cells, macrophages and dendritic cells in rat respiratory tract tissue: implications for immune function studies. *Immunology* 62: 349.
803. Van Haarst J, Hoogsteden HC, de Wit HJ, Verhoeven GT, Havenith C, et al. (1994) Dendritic cells and their precursors isolated from human bronchoalveolar lavage: immunocytologic and functional properties. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 11: 344-350.
804. Kaufmann SH and Schaible UE (2003) A Dangerous Liaison between Two Major Killers Mycobacterium tuberculosis and HIV Target Dendritic Cells through DC-SIGN. *The Journal of experimental medicine* 197: 1-5.
805. Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, et al. (2001) Infection of human macrophages and dendritic cells with Mycobacterium tuberculosis induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *The Journal of immunology* 166: 7033-7041.
806. Viora M, De Luca A, D'Ambrosio A, Antinori A and Ortona E (1996) In vitro and in vivo immunomodulatory effects of anti-Pneumocystis carinii drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 40: 1294-1297.
807. Dubey C, Croft M and Swain SL (1995) Costimulatory requirements of naive CD4+ T cells. ICAM-1 or B7-1 can costimulate naive CD4 T cell activation but both are required for optimum response. *The Journal of immunology* 155: 45-57.
808. Segura E, Nicco C, Lombard B, Véron P, Raposo G, et al. (2005) ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* 106: 216-223.
809. Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M, Marques R, Asselin-Paturel C, et al. (2006) Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88-and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *The Journal of immunology* 177: 7551-7558.

810. Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, et al. (2004) A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *The Journal of immunology* 172: 4733-4743.
811. Häcker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu L-C, et al. (2006) Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 439: 204-207.
812. Los M, Schenk H, Hexel K, Baeuerle PA, Dröge W, et al. (1995) IL-2 gene expression and NF-kappa B activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5-lipoxygenase. *The EMBO journal* 14: 3731.
813. Sen CK and Packer L (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *The FASEB journal* 10: 709-720.
814. Inoue K-i, Yanagisawa R, Koike E, Nishikawa M and Takano H (2010) Repeated pulmonary exposure to single-walled carbon nanotubes exacerbates allergic inflammation of the airway: Possible role of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 48: 924-934.
815. Aujla SJ, Dubin PJ and Kolls JK (2007) Th17 cells and mucosal host defense. *Seminars in immunology*. Elsevier. pp. 377-382.
816. Chung EY, Kim SJ and Ma XJ (2006) Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells. *Cell research* 16: 154-161.
817. Hölscher C, Hölscher A, Rückerl D, Yoshimoto T, Yoshida H, et al. (2005) The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *The Journal of immunology* 174: 3534-3544.
818. Pearl JE, Khader SA, Solache A, Gilmartin L, Ghilardi N, et al. (2004) IL-27 signaling compromises control of bacterial growth in mycobacteria-infected mice. *The Journal of immunology* 173: 7490-7496.
819. Chen Q, Ghilardi N, Wang H, Baker T, Xie M-H, et al. (2000) Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature* 407: 916-920.
820. Kooyk Yv, Appelmelk B and Geijtenbeek TB (2003) A fatal attraction: Mycobacterium tuberculosis and HIV-1 target DC-SIGN to escape immune surveillance. *Trends in molecular medicine* 9: 153-159.
821. Heldwein KA and Fenton MJ (2002) The role of Toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection. *Microbes and infection* 4: 937-944.

Prilozi

Rezultati prikazani u tezi su objavljeni u sledećim člancima:

1. The Response of Macrophages to a Cu-Al-Ni Shape Memory Alloy. Miodrag Čolić, Rebeka Rudolf, Ivan Anžel, Sergej Tomić, Goražd Lojen. *Journal of Biomaterials Applications*. 2010; 25: 269-286.
2. The response of peripheral blood mononuclear cells to shape memory alloys. Rebeka Rudolf, Kambiz Mehrabi, Albert Kneissl, Mihael Brunčko, Ivan Anžel, Sergej Tomić, Tanja Džopalić, Miodrag Čolić. *International Journal of Immunological Studies*. 2010; 1(2):214-228
3. Response of monocyte-derived dendritic cells to Rapidly Solidified Nickel-Titanium ribbons with shape memory properties. Sergej Tomić, Rebeka Rudolf, Mihael Brunčko, Ivan Anžel, Vojin Savić, Miodrag Čolić. *European Cells and Materials*. 2012; 23:58-80.
4. Cytotoxicity of Gold Nanoparticles Prepared by Ultrasonic Spray Pyrolysis. Rebeka Rudolf, Bernd Friedrich, Srećko Stopić, Ivan Anžel, Sergej Tomić, Miodrag Čolić. *Journal of Biomaterials Applications*. 2012; 26(5):595-612
5. Immunomodulatory properties of nanoparticles obtained by ultrasonic spray pyrolysis from gold scrap. Jelena Đokić, Rebeka Rudolf, Sergej Tomić, Srećko Stopić, Bernd Friedrich, Bojan Budič, Ivan Anžel, Miodrag Čolić. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2012; 8:528-538
6. Quantitative assay of element mass inventories in single cell biological systems with micro-PIXE. Nina Ogrinc, Primož Pelicon, Primož Vavpetič, Mitja Kelemen, Nataša Grlj, Luka Jeromel, Sergej Tomić, Miodrag Čolić, Alfred Beran. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 2013.306: 121-124
7. Size-dependent effects of gold nanoparticles uptake on maturation and antitumor functions of human dendritic cells in vitro. Sergej Tomić, Jelena Đokić, Saša Vasilijić, Nina Ogrinc, Rebeka Rudolf, Primož Pelicon, Dragana Vučević, Petar Milosavljević, Srđa Janković, Ivan Anžel, Jelena Rajković, Marjan Slak Rupnik, Bernd Friedrich, Miodrag Čolić. *PlosOne*. 2014 DOI: 10.1371 / journal.pone.0096584.

The Response of Macrophages to a Cu–Al–Ni Shape Memory Alloy

MIODRAG ČOLIĆ* AND SERGEJ TOMIĆ

Institute of Medical Research, MMA, Crnotravska 17, 11002 Belgrade, Serbia

REBEKA RUDOLF, IVAN ANŽEL AND GORAZD LOJEN

University of Maribor, Faculty of Mechanical Engineering

Smetanova 17, SI- 2000 Maribor, Slovenia

ABSTRACT: Cu–Al–Ni shape memory alloys (SMAs) have been investigated as materials for medical devices, but little is known about their biocompatibility. The aim of this work was to study the response of rat peritoneal macrophages (PMØ) to a Cu–Al–Ni SMA *in vitro*, by measuring the functional activity of mitochondria, necrosis, apoptosis, and production of proinflammatory cytokines. Rapidly solidified (RS) thin ribbons were used for the tests. The control alloy was a permanent mold casting of the same composition, but without the shape memory effect. Our results showed that the control alloy was severely cytotoxic, whereas RS ribbons induced neither necrosis nor apoptosis of PMØ. These findings correlated with the data that RS ribbons are significantly more resistant to corrosion compared to the control alloy, as judged by the lesser release of Cu and Ni in the conditioning medium. However, the ribbons generated intracellular reactive oxygen species and upregulated the production of IL-6 by PMØ. These effects were almost completely abolished by conditioning the RS ribbons for 5 weeks. In conclusion, RS significantly improves the corrosion stability and biocompatibility of Cu–Al–Ni SMA. The biocompatibility of this functional material could be additionally enhanced by conditioning the ribbons in cell culture medium.

KEY WORDS: Cu–Al–Ni alloy, shape memory effect, macrophage, biocompatibility, cytokine.

*Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: vmaimi@eunet.rs

INTRODUCTION

Shape memory alloys (SMAs) belong to a group of functional, super-elastic materials, whose shape and stiffness can be controlled with temperature. The alloy undergoes a complex thermoelastic reversible phase transformation called martensite-austenite transformation. As the metal in the high-temperature condition (austenite) is cooled, the austenitic crystalline structure transforms into the low temperature phase (martensite), where it can be easily bent and shaped. As the metal is reheated, its original shape and stiffness are restored (memory effect). These characteristics make SMAs very attractive as materials for medical devices such as implants, actuators, stents, filters, and others [1–4].

Today, Ni-Ti-based SMAs are the most widely used functional materials in medical practice due to their excellent biomechanical and super-elastic properties, as well as their acceptable biocompatibility [3,5]. Cu-based SMAs, especially Cu-Al-Ni and Cu-Al-Mn are commercially available too. Their transformation temperature-range is similar to that for Ni-Ti and can be adjusted in the range between -200°C and 200°C [6]. Compared to Ni-Ti, the most important disadvantage of polycrystalline Cu-Al-Ni alloys is the small reversible deformation [7–9] due to the already intergranular breakdown at low average stress levels. The main causes for low failure stress are the high elastic anisotropy ($E_{\langle 111 \rangle} / E_{\langle 001 \rangle} = 13$) [10], large crystal grains, strong dependence of transformation strain on crystal orientation and segregations on grain boundaries. The first three reasons cause high shear stress concentrations at grain boundaries, and the fourth one results in weakening the grain boundaries [11]. On the other hand, Cu-Al-Ni alloys have some considerable advantages over Ni-Ti: Less difficult melting, casting, and composition control, higher Young's modulus, better machinability, better work/cost ratio [7,12–14] and, most importantly for designing actuators perhaps, the stability of the two-way shape memory effect is better [15]. Furthermore, additional advantages can be gained through rapid solidification (RS), including better stability of mechanical properties at elevated temperatures, lower coarsening rates during heat treatments and considerable ageing-resistance [13]. An improvement in the electrical properties, magnetic properties, and corrosion resistance is also possible [16]. In spite of these facts, Cu-based SMAs have not yet been investigated as a potential biomaterial because of the prevalent belief that the alloys with a high Cu content cause toxic effects *in vivo* [17,18].

In our previous paper [19], we have already presented an efficient method for producing RS Cu-Al-Ni thin ribbons directly from the melt, based on melt spinning technology. The optimal content of 13 wt% Al

enabled satisfactory shape memory properties and simpler thermal treatment. The Ni content suppresses diffusion of Al and Cu and helps the alloy to retain the single-phase structure on cooling efficiently, whereas a small quantity of B improves its ductility [14].

Based on the hypothesis that the above listed benefits of RS could sufficiently improve the properties of Cu–Al–Ni SMAs and thus establish them as a potential biomaterial, the aim of this work was to study the response of rat peritoneal macrophages (PMØ) to the RS Cu–Al–Ni SMA ribbons *in vitro*. The control alloy was a permanent mold casting of the same chemical composition, without the shape memory effect. This model was chosen because alloys in as-cast-condition, through activation of MØ, can initiate undesirable tissue reactions such as chronic inflammation and destruction of tissue [20].

MATERIALS AND METHODS

Preparation of the Cu–Al–Ni Permanent Mold-casting and RS Cu–Al–Ni Ribbons

The alloy was made by smelting pure Al, Cu, Ni, and an Al 3 wt% B master alloy under vacuum in an induction furnace. When smelted, argon was introduced (1.03 bar), and the melt was cast into a permanent mold. The metals used and the master alloy were of industrial purity and the mold was a triple cylindrical grey iron mold. The billets obtained had a diameter of 47 mm and a height of 270 mm. The analyzed chemical composition of the alloy, performed by inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometry (ICP-AES) (Perken–Elmer) in triplicate, showed 81.3 wt% Cu, 13.1 wt% Al, 3.8 wt% Ni and 0.04 wt% B. Minor elements were Fe (0.007 wt%) and Co (0.002 wt%), whereas other metals were below the detection limit (0.001 wt%). The cast Cu–Al–Ni billets were machined partially into platelets (5 mm × 5 mm × 1 mm) suitable for biocompatibility tests and partially into smaller cylindrical billets for melt spinning. The platelets machined from the mold castings were used as the control alloy.

The methodology for the preparation of the Cu–Al–Ni SMA ribbons was presented in detail in the previous paper [19]. Briefly, the ribbons were melt-spun in a free jet melt spinner under a protective atmosphere (Ar 5.1). Relatively low wheel speeds (12.4–11.8 m/s) were selected in order to obtain ribbons wide enough for the intended research. In order to ensure that the ribbons also had optimal shape memory properties, melt spun ribbons were heat-treated: solution annealed at 900°C for 2 min, water

quenched, post-quench annealed at 300°C for 2 h and finally, water quenched again.

Preparation of Cu–Al–Ni Samples for Biocompatibility Testing

RS ribbons (5 mm × 5 mm; thickness 0.1 mm) and control alloy platelets (5 mm × 5 mm; thickness 1 mm, were washed in distilled water and cleaned by an ultrasonic apparatus (5 × 3 min in distilled water). After that, the samples were air dried for 1 h and then disinfected in 96% alcohol for 5 min. After drying, the samples were used for direct or indirect contact with cells. Direct contact included the cultivation of cells together with the samples, whereas indirect contact involved the cultivation of cells in a trans-well system, or with different dilutions of alloy extracts. The extracts were prepared by incubating the samples in an RPMI medium (Sigma, Munich, Germany) with the addition of 10% fetal calf serum (FCS) (ICN, Costa Mesa, CA) for 7 days (incubation at 37°C; 5% CO₂; 1 cm²/mL medium). The conditioning process was in accordance with the ISO recommendations for the biocompatibility testing of medical and dental materials (ISO, 1997) and lasted for 5 weeks. The control-conditioning medium was RPMI + 10% FCS, cultivated without samples. The media were changed after each week and those collected in the first and the last week of conditioning were used for testing.

Preparation of PMØ

PMØ were prepared from Albino Oxford (AO) rats, male, 10 weeks old, body mass 200–220 g. The animals were bred in a vivarium at the Institute for Medical Research, MMA under standard conditions and their use for the experiments was according to the guidelines for the use of experimental animals, approved by the Ethical Committee of MMA, September 2001, which strictly follows the rules of the European Community Guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609 EEC).

For preparation of the PMØ, the rats were anaesthetized with ether and then 20 mL of cold RPMI medium was injected into their peritoneal cavity. Peritoneal cells were collected by aspiration of the medium, followed by washings and counting. The viability of peritoneal cells, of which 80% were macrophages, was higher than 95%.

MTT Assay

The metabolic activities of PMØ were evaluated by using direct and indirect methods. During the direct test, the cells were cultivated in 24-well

plates. The samples of alloys (6-plicates), prior to and after conditioning, were placed in the centers of the wells. After that, 1×10^6 PMØ/well in the volume of 1mL of RPMI medium + 10% FCS was added to the alloy-samples. The alloy surface area/volume of medium was $2 \text{ cm}^2/\text{mL}$. The cells were cultivated together with the alloys for 24 h in an incubator and after that their metabolic activity was evaluated. The controls were those cells cultivated without alloy-samples and, in addition, wells with alloy-samples immersed in the medium without cells

The indirect method was based on cultivating the cells with conditioning media (undiluted or diluted 1 : 4 in RPMI medium + 10% FCS). In these experiments the cells were cultivated in 96-well plates (2×10^5 /well). After a 24-h incubation period, the plates were centrifuged and the medium was carefully removed. The solution of 3-[4,5 dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma) ($100 \mu\text{L}/\text{well}$, final concentration $100 \mu\text{g}/\text{mL}$), was added. Wells with an MTT solution without cells served as blank controls. When the direct effects of the alloys were evaluated, MTT ($500 \mu\text{L}/\text{well}$; 24-well plates) was added directly to the cell cultures. The wells were incubated with MTT for 4 h in an incubator at 37°C . After that, 100 and $500 \mu\text{L}$ 0.1N HCl/10% sodium-dodecyl-sulphate (SDS) was added to each 96- and 24-well, respectively. The plates remained overnight and next day the optical density (OD) of the developed color was read at 570/650 nm (ELISA reader, Behring II). All examinations were in sextuplicate. The results were expressed as the relative metabolic activity compared to the corresponding controls.

In the direct assay the relative metabolic activity was determined as follows:

$$\text{Metabolic activity (\%)} = \left(\frac{\text{OD of cells cultivated with alloys} - \text{OD of alloys cultivated without cells}}{\text{OD of cells cultivated without alloys} - \text{OD of alloys cultivated without cells}} \right) \times 100$$

In the indirect assay the relative metabolic activity was calculated as follows:

$$\text{Metabolic activity (\%)} = (\text{OD of cells cultivated using the alloy conditioning medium} / \text{OD of cells cultivated with control conditioning medium}) \times 100.$$

Viability Tests

The viability of PMØ in cultures was determined by a 1% solution of Tripan blue, and propidium iodide (PI) (Sigma; $10 \mu\text{g}/\text{mL}$) was used in

certain experiments. The nonviable cells, stained by Tripian blue, were analyzed using light microscopy. The viability (%) was determined based on the number of stained and total cells. The cells stained with PI were analyzed using flow cytometry. The percentages of nonviable cells (PI⁺ cells) were determined directly on the flow cytometer (Coulter, XL-MCL, Krefeld Germany).

Apoptosis Test

Apoptosis was determined by using a DNA fragmentation method as a final stage of the apoptotic pathway. PMØ (1×10^6 cells/well) were cultivated with Cu–Al–Ni alloy-samples (prior to or after conditioning) in 24-well plates for 24 h, as described for the MTT assay. After washing in a phosphate buffer, the cells were stained with PI (10 µg/mL dissolved in hypotonic citric/Triton-X buffer). After a 6 h incubation period at room temperature in the dark, the cells were analyzed using flow cytometry. The cells with hypodiploid nuclei (sub- G_0 pick) represented apoptotic cells.

Detection of Intracellular Reactive Oxygen Species

In order to check whether Cu–Al–Ni alloy samples cause the generation of intracellular reactive oxygen species (ROS), PMØ (1×10^6 cells/well) were cultivated with Cu–Al–Ni alloy samples (prior to or after conditioning) in 24-well plates for 30 min, as described for apoptosis. After incubation, the cells were collected from the wells, transferred into Ependorf tubes and incubated with dihydroxyrodamine (DHR) (20 µM) for 15 min. The cells were analyzed using flow cytometry. An increase in the intensity of DHR fluorescence was the indicator of intracellular ROS formation. PMØ treated with 0.5 mM H₂O₂ served as a positive control, whereas PMØ cultivated without alloys were a negative control.

Cytokine Assays

PMØ were incubated with Cu–Al–Ni conditioning medium or control alloy conditioning medium for 24h, as described for the MTT assay. The supernatants were then removed. The concentrations of IL-1, tumor necrosis factor α (TNF- α) and macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) were determined in cell culture supernatants of macrophages by fluorescent microbeads technology (6-plex rat cytokine kit) (Bender MedSystems). The concentrations of cytokines were determined by using adequate software based on the fluorescence intensity of microbeads coated with different concentrations of anti-cytokine antibodies.

The levels of IL-6 were determined by a commercial ELISA kit for rat IL-6 (R&D), following the manufacturer's instructions.

Chemical Analysis

The concentrations of metal ions in the conditioning media were analyzed by ICP-AES (Perken–Elmer). Triplicate absorbance readings per element were recorded for each sample.

Statistical Analysis

All values are given as mean \pm SD (Standard Deviation). The number of samples was 4–6. The Student *t*-test and ANOVA tests were used for evaluating the differences between the experimental and corresponding control samples. The values ($p < 0.05$ or less) were considered statistically significant.

RESULTS

The Effect of Cu–Al–Ni Samples on the Metabolic Activity and Viability of PMØ

The first aim of this study was to examine the effect of the Cu–Al–Ni alloy on the metabolic activity of PMØ. As shown in Figure 1(a), the control alloy samples completely inhibited the metabolic activity of PMØ, independently of the conditioning process. On the other hand, nonconditioned RS ribbon samples only slightly suppressed the metabolic activity of PMØ (10% inhibition), compared to the control samples, but the difference was not statistically significant ($p > 0.05$).

The viability assay showed that the control alloy samples were cytotoxic, whereas RS ribbons did not significantly change the viability of PMØ (Figure 1(b)).

In order to examine the relationship between corrosion properties and cytotoxicity, control alloys, and RS ribbons were conditioned in a culture medium and the effect of extracts was assayed using the MTT test. As shown in Figure 1(c), the undiluted extract of the control alloy, collected after the first week of conditioning, completely inhibited the metabolic activity of PMØ. The 25% extract was still significantly cytotoxic. The conditioning medium of the RS ribbons, prepared under the same conditions, did not show any significant effect on PMØ. When the media collected in the fifth week of conditioning were tested, significantly less suppressive effects of the control alloy extract were observed (Figure 1(c)).

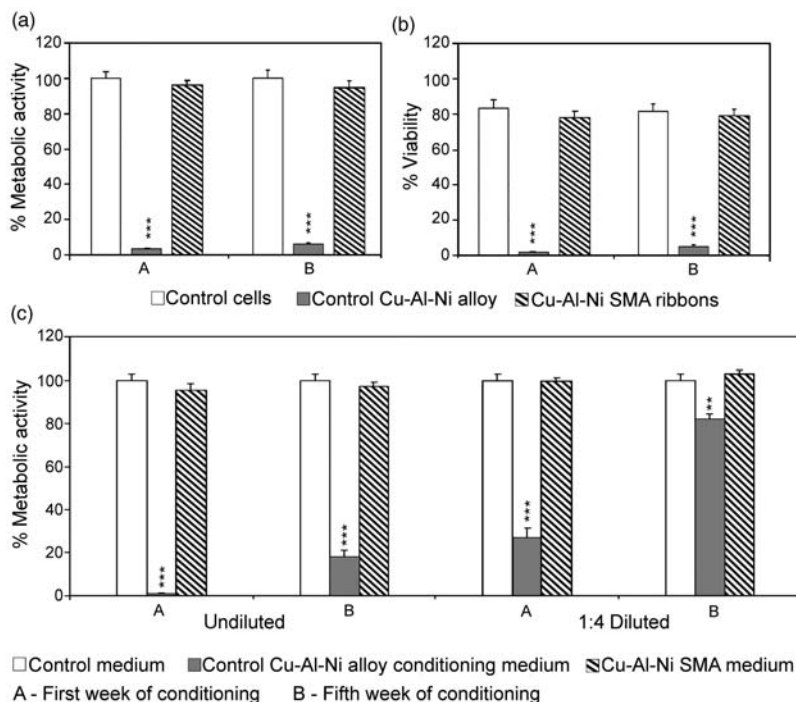


Figure 1. The effect of Cu–Al–Ni alloy on the metabolic activity and viability of PMØ: (a) direct effect of Cu–Al–Ni alloy on the metabolic activity of the cells; (b) direct effect of Cu–Al–Ni alloy on cell viability; (c) effect of Cu–Al–Ni conditioning medium on the metabolic activity of the cells.

Cells were cultivated together with the control alloy or RS ribbons (before or after conditioning) or alloy's conditioning medium, as described in the section 'Materials and Methods'. The metabolic activity was demonstrated by an MTT test and the viability was checked by Tripan blue dye exclusion. The results are expressed as relative values (mean % \pm SD) of sextuplicates using corresponding controls as 100% (cells cultivated alone without alloys or cells cultivated in control conditioning medium).

*** $p < 0.005$ compared to the corresponding controls.

These results are in accordance with the ICP-AES analysis. Table 1 demonstrates a significant release of Cu (84 ppm) from the control alloy sample, followed by Ni (2.4 ppm) and Al (0.2 ppm). The release of Cu and Ni from RS ribbons was about 10–12 times lower (8.0 ppm of Cu and 0.2 ppm of Ni, respectively), compared to the control alloy. The concentrations of Cu and Ni in both the control alloy and the RS ribbons' extracts collected in the fifth week of conditioning were reduced by more than 60% (Cu) and 50% (Ni and Al), compared to the concentrations of these metal ions after the initial conditioning period (Table 1).

Table 1. ICP-AES analysis of metals in the alloy's conditioning media.

Conditioning medium	Concentration of metals		
	Cu(ppm)	Al(ppm)	Ni(ppm)
Control conditioning medium	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Conditioning medium of control alloy	A: 84.0	A: 0.2	A: 2.4
	B: 28.2	B: 0.1	B: 1.1
Conditioning medium of RS ribbons	A: 8.0	A: 0.3	A: 0.2
	B: 3.0	B: 0.1	B: 0.1

A = Alloy samples were conditioned for 1 week and after that the medium was collected.

B = Alloy samples were conditioned for 5 weeks. The conditioning medium was collected from day 28 until day 35. Values are given as mean of three measurements.

Table 2. The effect of Cu–Al–Ni alloy on necrosis, apoptosis, and ROS generation in PMØ.

	Necrosis (%)	Apoptosis (%)	ROS generation (Mean FI)
Control cells	5.8 ± 1.2	16.2 ± 2.1	6.4 ± 1.2
Control alloy	A: 92.4 ± 4.6***	4.9 ± 1.0***	17.2 ± 1.8***
	B: 48.4 ± 3.9***	48.2 ± 4.4***	16.0 ± 2.1***
RS ribbon	A: 7.1 ± 1.9	17.8 ± 1.7	10.8 ± 1.3**
	B: 5.9 ± 1.8	15.3 ± 1.4	8.1 ± 1.0

A: Before conditioning; B: After conditioning.

PMØ were cultivated with control Cu–Al–Ni platelets or RS ribbons before or after conditioning (5 weeks) as described in section 'Materials and Methods'. Necrosis and apoptosis were determined after 24 h, whereas intracellular ROS generation was detected after 30 min.

Values are given as mean ± SD of triplicates (one representative experiment out of three with similar results).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$, compared to control cells.

FI = Fluorescence Intensity.

Effect of the Cu–Al–Ni Alloy-conditioning Medium on Necrosis, Apoptosis and ROS Generation in PMØ

The next step in this study was examination of the mechanisms involved in the cytotoxicity of the Cu–Al–Ni alloys. Table 2 and Figure 2 show that the control alloy, when tested before conditioning, caused necrosis, whereas the conditioned alloy caused both necrosis and apoptosis. SMA ribbons induced neither necrosis nor apoptosis of PMØ.

SMA ribbons triggered the generation of intracellular ROS as did the control alloy. However, their effect was lower compared to the mold-cast alloy, or H_2O_2 , used as a positive control, and ROS generation was further decreased after conditioning the ribbons (Table 2, Figure 3).

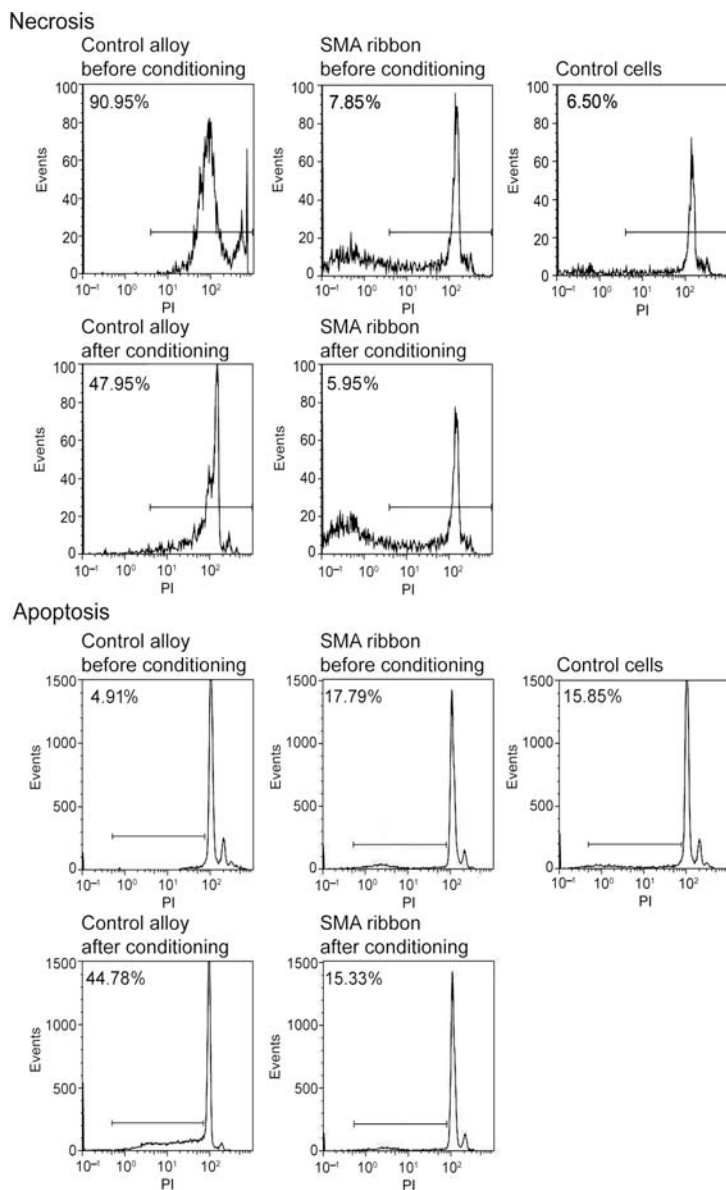


Figure 2. The effect of Cu–Al–Ni–alloy on necrosis and apoptosis of PMØ. PMØ were cultivated with nonconditioned or conditioned alloys for 24 h. Necrosis was determined by staining the nonpermeabilized cells with PI, whereas apoptosis was detected by staining the permeabilized cells with PI as described in section ‘Materials and Methods’. Representative histograms of fluorescence are presented.

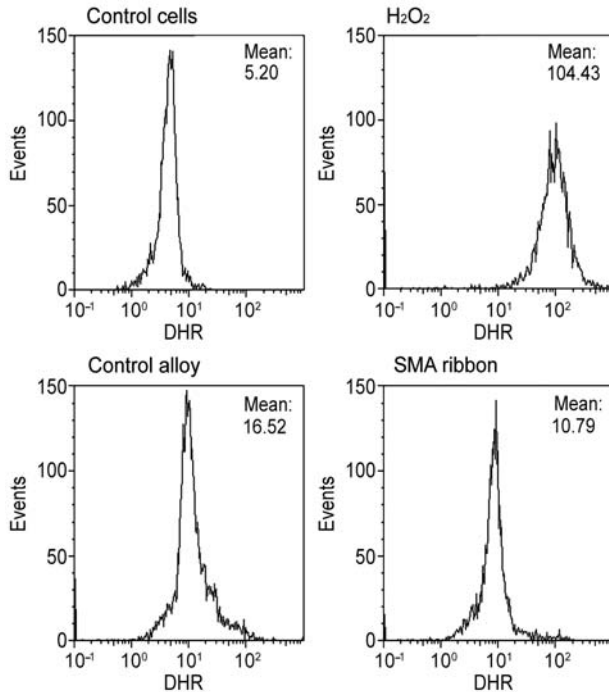


Figure 3. The effect of Cu–Al–Ni-alloy on the generation of intracellular ROS in PMØ. PMØ were cultivated with nonconditioned alloys for 30 min. The negative control was a culture without alloys, whereas the positive control was 0.5 mM H₂O₂. Cells were stained with DHR as described in the section ‘Materials and methods’ and analyzed by flow cytometry. Representative histograms of fluorescence are presented.

Effect of Cu–Al–Ni Alloy Conditioning Medium on Cytokine Production by PMØ

The final aim of this biocompatibility study was to check how Cu–Al–Ni alloy conditioning medium affected cytokine production by rat PMØ. PMØ were incubated with the alloy extracts, prepared as described before, for 24 h and the cytokine levels (IL-1 β , TNF- α , MCP-1, and IL-6) were determined. The results are given in Figure 4.

The control alloy medium, collected during the first conditioning period, almost completely blocked or significantly decreased the production of all cytokines. The conditioned control alloy medium, collected during the last week of conditioning, had a stimulatory effect on the production of IL-1 and TNF- α . The RS ribbon extract, collected during the first conditioning period, increased the production of IL-6,

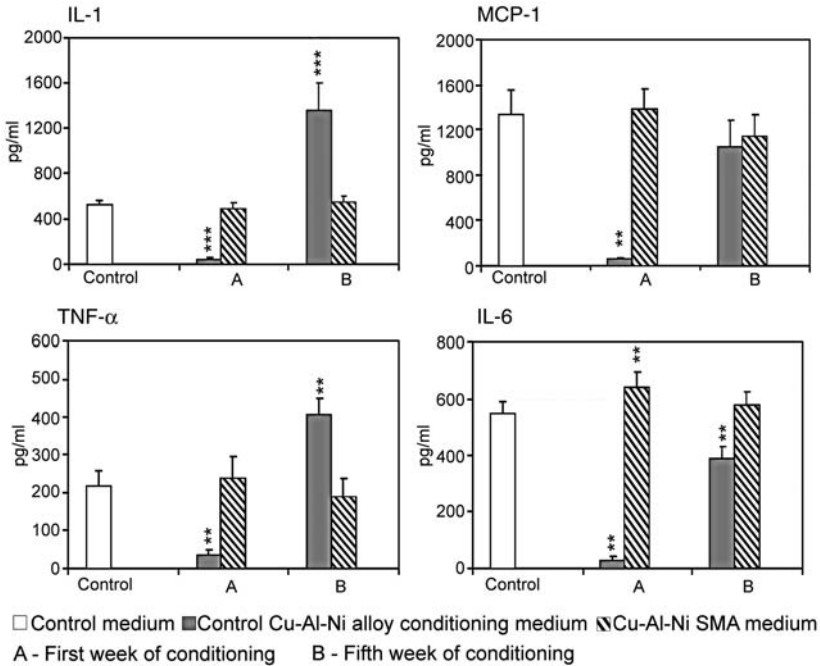


Figure 4. The effect of a Cu-Al-Ni conditioning medium on cytokine production by PM \emptyset . PM \emptyset were cultivated with a Cu-Al-Ni conditioning medium (collected after the first and the fifth week) for 24 h and after that the levels of cytokines were determined in culture supernatants as described in the section 'Materials and Methods'.

Results are given as mean \pm SD ($n = 4$).

** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$ compared to the control conditioning medium.

but did not modify the secretion of IL-1 β , TNF- α , and MCP-1. The RS ribbon extract, collected during the last conditioning period, did not significantly modify the production of all cytokines.

DISCUSSION

The monocyte/macrophage system plays an important role in any biological response to biomaterials [21,22]. There is ample evidence that cast alloys, through the activation of macrophages, can initiate undesirable tissue response, manifested as chronic inflammation and destruction of tissue, including osteolysis [20,23]. Since RS Cu-Al-Ni ribbons have been considered as a potential biomaterial, in this work we studied the response of rat PM \emptyset to the alloy by measuring their viability, SDH activity, necrosis, apoptosis, generation of intracellular ROS

and the production of pro-inflammatory cytokines. We found that the control alloy caused severe cytotoxicity of PMØ and the effect was confirmed with its conditioning medium. The cytotoxicity was manifested as almost complete loss of viability and mitochondrial SDH activity due to PMØ necrosis. Based on the concentrations of released metal ions in the extract collected 7 days after conditioning, it can be concluded that the concentrations of Cu ions (84.0 ppm) were more than 10 times higher than those causing LD50 on different cell lines [24–26]. These results are also in accordance with those of Schedle et al. [27], who showed similar response of L929 cells and gingival fibroblasts to Cu ions at relatively high concentrations (0.33–1 mmol/L), and with our previous results on L929 cells and rat thymocytes [28]. When mold-cast Cu–Al–Ni platelets were tested after conditioning, we observed both necrosis and apoptosis in PMØ cultures. These findings correlated with the significantly lower capability of the conditioned alloy to release Cu ions.

Cu has been demonstrated as inducing apoptosis in different cell types [29–31]. Possible mechanisms for Cu-induced cell death include Cu affinity to RNA and DNA and inhibition of the transcription process [32]. Another possible mechanism is that Cu suppressed activation of the transcription factor NF- κ B, suggested to be anti-apoptotic [29–33]. Furthermore, Cu enhances ROS production via a Fenton-like reaction and may induce apoptosis by oxidative stress or direct ROS damage to cellular components [34]. Zhai et al. [29] demonstrated that Cu induced intranucleosomal DNA fragmentation resulted partly from direct attack by ROS, and at least partly by endonuclease activity. Our results also confirmed the generation of intracellular ROS in PMØ in the presence of the control Cu–Al–Ni alloy.

Apoptosis and necrosis are considered functionally and morphologically distinct forms of cell death. However, observations that cells triggered to undergo apoptosis will die by necrosis when the intracellular energy level is low (depletion of ATP), change this concept [35]. Based on these results, published by Leist et al., it can be postulated that high concentrations of Cu released from our control alloy block mitochondrial or glycolytic ATP generation, and cause necrosis. When Cu concentrations are lowering (conditioned alloy), the threshold ATP concentrations are sufficient to execute the apoptotic program. Therefore, measurement of ATP content in PMØ is necessary to prove this hypothesis in our culture system.

The role of other metal ions in the cytotoxicity of the control Cu–Al–Ni alloy is not clear because the concentrations of released Ni (2.4 ppm) and Al (0.2 ppm) ions were below cytotoxic concentrations [24,36,37]. Although Ni has been shown to have an additive effect on the cytotoxicity

caused by Cu [36] and Ni concentrations detected in our extract of control alloy might have some inhibitory effect on cellular functions [5,27,38,39], the effect of Cu, due to its high concentrations, is probably the dominant one. Al, as a component of total hip replacement and as a cleaning powder for medical devices, have excellent cytocompatibility, as shown by Hornez et al. [24]. However, it remains to be tested whether the small quantity of Al ions released from Cu–Al–Ni samples modifies the activities of Cu and Ni ions.

One of the main findings of this study was that RS Cu–Al–Ni ribbons did not have a detectable cytotoxic effect on PMØ. Such results are in accordance with a 10-times lower release of Cu (8.0 ppm) in the extract during the initial conditioning period, compared to the control alloy. Although there are several reports showing that Cu at concentrations between 4 and 10 ppm is cytotoxic for fibroblast cell lines, similar results were not confirmed in this study. The same concentration of exogenous Cu ions induced neither necrosis nor apoptosis of PMØ (data not shown). One explanation might be that 10% FCS was used in the culture medium in contrast to the 3% used by Wataha et al. [36,37] or 5% Schmalz et al. [25]. Our unpublished data clearly showed that higher concentrations of FCS are protective and that lowering its content makes the cells more sensitive to the toxic effect of metal ions.

The explanation for the different biocompatibility and corrosion stability of the control alloy and SMA ribbons can be found in their different microstructures. Namely, our previous results [28] showed that control mold-cast Cu–Al–Ni alloy is a multiphase alloy, whereas Cu–Al–Ni ribbons are of martensitic structures. In addition, the formation of oxide layers on the surfaces of both materials after prolonged conditioning further decreases the release of metal ions. The hypothesis that martensitic structure of Cu–Al–Ni alloys is predominantly responsible for their corrosion resistance has been additionally favored by our unpublished results on mold-cast Cu–Al–Ni alloy. Namely, our microstructural analysis showed that similar treatment of control Cu–Al–Ni platelets (double heating/quenching) partly resulted in martensitic transformation of the alloy and its higher corrosion resistance compared to nontreated Cu–Al–Ni platelets.

An important finding in this study is related to the production of pro-inflammatory cytokines by PMØ. Due to the severe toxic effect of Cu ions released from the control alloy, the production of all pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6, and MCP-1) was significantly inhibited. Suska et al. [40] also demonstrated that human monocytes, cultivated on Cu-coated titanium, secreted low levels of TNF- α and IL-10. However, the extract of control alloy collected after prolonged conditioning,

significantly stimulated the production of IL-1 and TNF- α . In contrast, only the secretion of IL-6 was augmented by the extract of RS ribbons collected after an initial conditioning period. No significant changes in the production of all cytokines were observed using the extract of RS ribbons after prolonged conditioning. These findings correlated with the results that nonconditioned SMA ribbons, although causing neither apoptosis nor necrosis of PM \emptyset , stimulated the generation of intracellular ROS, as determined by an increase in the intensity of DHR fluorescence.

Up to now, the enhanced production of IL-6 in the absence of increased secretion of other pro-inflammatory cytokines by Cu ions has not been published. In contrast, the enhanced production of TNF mRNA in peripheral blood leukocytes by Cu ions has been detected [41]. The biological significance of an enhanced production of IL-6 by RS ribbons remains to be tested because IL-6, together with TNF- α , promotes inflammation, but this cytokine also possesses anti-inflammatory properties [42].

It has been published that different alloys, which are currently used in total joint arthroplasty, release subtoxic concentrations of metal ions, which stimulate macrophages. Phagocytosis of particulate debris released from implants may also contribute to these processes. All four cytokines studied in our work are involved in the promotion of inflammation and osteolysis [23,40,43]. Therefore, due to such a pro-inflammatory effect and manifested cytotoxicity, the control alloy, as expected, is an example of nonbiocompatible material, which is not recommendable for biomedical application. However, RS ribbons, similar to Ni–Ti SMAs, [3,4,7] might be considered as a potential biomaterial for constructing those medical devices such as catheters or actuators, which encounter living cells and tissues for a short period. However, many other experiments should be performed to confirm this hypothesis including long-term corrosion behavior of the material, cell/material interface interactions, interactions of the material with different cellular components *in vivo* and the biological response of the organism to Cu–Al–Ni SMA implants.

In conclusion, our results showed that RS enables the production of Cu–Al–Ni ribbons with the shape memory effect, which exhibit a significantly higher resistance to corrosion and improved biocompatibility than a mold-cast control alloy of the same composition. The biocompatibility of Cu–Al–Ni ribbons could be additionally enhanced by their conditioning in cell culture medium. The conclusion is based on biocompatibility assays showing preserved viability, absence of oxidative stress and proinflammatory response of PM \emptyset to the material *in vitro*.

ACKNOWLEDGMENTS

This article is part of Bilateral Project SLO/SCG: BI-RS/08-09-003: Biomedical SMAs and EUREKA Program E!3971 BIO-SMA. The authors thank Zlatarna Celje d.d., Celje, Slovenia, and associates from the Institute of Materials Technology, Faculty of Mechanical Engineering, University of Maribor; and the Institute of Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade, Serbia, for their support and assistance. The authors also gratefully acknowledge the Ministry of Higher Education, Science and Technology and Slovenian Research Agency and the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia.

REFERENCES

1. Otsuka, K. and Ren, X. Recent Developments in the Research of Shape Memory Alloys, *Intermetallics*, 1999: **7**: 511–528.
2. Miyazaki, S. (1998). Medical and Dental Applications of Shape Memory Alloys, In: Otsuka, K. and Wayman, C. (eds), *Shape Memory Materials*, Cambridge, Cambridge University Press, pp. 267–280.
3. Duerig, T., Pelton, A. and Stöckel, D. An Overview of Nitinol Medical Applications, *Mater Sci Eng A*, 1999: **273–275**: 149–160.
4. Stice, J. (1990). The Use of Superelasticity in Guidewires and Arthroscopic Instrumentation, In: Duerig, T., Melton, K., Stöckel, D. and Wayman C, (eds), *Engineering Aspects of Shape Memory Alloys*, London, Butterworth-Heinemann Ltd, pp. 483–487.
5. Shabalovskaya, S.A. Surface, Corrosion and Biocompatibility Aspects of Nitinol as an Implant Material, *Bio-Med. Mater. Eng.*, 2002: **12**: 69–109.
6. Hodgson, D.E., Wu, M.H. and Biermann, R.J. (1996). Available at: <http://web.archive.org/web/20030605085042/http://www.sma-inc.com/SMAPaper.html> (accessed November 13, 2009)
7. Huang, W. On the Selection of Shape Memory Alloys for Actuators, *Materials and Design*, 2002: **23**: 11–19.
8. Tadaki, T. (1998). Cu-based Shape Memory Alloys, In: Otsuka, K. and Wayman, C. (eds), *Shape Memory Materials*, Cambridge, Cambridge University Press, pp. 97–116.
9. Van Humbeeck, D., Van Hulle, L., Delaey, J., Ortín, CS. and Torra, V. (1990). The Two-staged Thermoelastic Martensitic Transformation (TMT) B2→R→B19' in Polycrystalline. In: Hornbogen, E. and Jost, N. (eds), *The Martensitic Transformation in Science and Technology*, London, Butterworth-Heinemann, pp. 15–25.
10. Donner, P. Die Herstellung von Bandern und Drahten aus Legierungen mit Formgedächtnis, *Fortschritt-Berichte VDI, Dusseldorf*, 1992: **5**: 259.

11. Miyazaki, S. (1996). Development and Characterization Of Shape Memory Alloys, In: Fremond, M. and Miyazaki, S. (eds), *Shape Memory Alloys*, Wien-New York, Springer Verlag, pp. 71–147.
12. Miyazaki, S. and Otsuka, K. Development of Shape Memory Alloys, *ISIJ Int.*, 1989: **29**: 353–376.
13. Bhattacharya, K. and Kohn, R.V. Symmetry, Texture and the Recoverable Strain of Shape-memory Polycrystals, *Acta Mater.*, 1969: **44**: 529–542.
14. Dunne, D.P. and Kennon, N.F. Ageing of Copper-based Shape Memory Alloys, *Met. Forum*, 1981: **4**: 176–183.
15. Shergell, H. and Kneissl, A.C. Generation, Development and Degradation of the Intrinsic Two-way Shape Memory Effect in Different Alloy Systems, *Acta Mater.*, 2002: **50**: 327–341.
16. Anantharaman, T.R. and Suryanarayana, C. (1987). *Rapidly Solidified Metals*, Aedermannsdorf, Trans Tech Publications.
17. McNamara, A. and Williams, D.F. The Response to the Intramuscular Implantation of Pure Metals, *Biomaterials*, 1981: **2**: 33–40.
18. Suska, F., Kalltorp, M., Esposito, M., Gretzer, C., Tengvall, P. and Thomsen, P. In Vivo/Ex Vivo Cellular Interactions with Titanium and Copper, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2001: **12**: 939–944.
19. Lojen, G., Anžel, I., Kneissl, A.C., Unterweger, E., Kosec, B. and Bizjak, M. Microstructure of Rapidly Solidified Cu-Al-Ni Shape Memory Alloy Ribbons, *J. Mat. Proc. Tech.*, 2005: **162/163**: 220–229.
20. Wang, J.Y., Wicklund, B.H., Gustilo, R.B., Tsukayama. and D.T. Titanium, Chromium and Cobalt Ions Modulate the Release of Bone-associated Cytokines by Human Monocytes/Macrophages In Vitro, *Biomaterials*, 1996: **17**: 2233–2240.
21. Anderson, J.M. and Miller, K.M. Biomaterial Biocompatibility and the Macrophage, *Biomaterials*, 1984: **5**: 5–10.
22. Anderson, J.M. Mechanisms of Inflammation and Infection with Implanted Devices, *Cardiovasc. Pathol.*, 1993: **2**: 33S–33S.
23. Goodman, S.B. Wear Particles, Periprosthetic Osteolysis and the Immune System, *Biomaterials*, 2007: **28**: 5044–5048.
24. Hornez, J.C., Lefevre, A., Joly, D. and Hildebrand HF. Multiple Parameter Cytotoxicity Index on Dental Alloys and Pure Metals, *Biomol. Eng.*, 2002: **19**: 103–117.
25. Schmalz, G., Langer, H. and Schweikl, H. Cytotoxicity of Dental Alloy Extracts and Corresponding Metal Salt Solutions, *J. Dent. Res.*, 1998: **77**: 1772–1778.
26. Schmalz, G., Arenholt-Bindslev, D., Pfiller, S. and Schweikl, H. Cytotoxicity of Metal Cations Used in Dental Cast Alloys, *Altern. Lab Anim.*, 1997: **25**: 323–330.
27. Schedle, A., Samorapoompichit, P., Rausch-Fan, X.H. et al. Response of L-929 Fibroblasts, Human Gingival Fibroblasts, and Human Tissue Mast Cells to Various Metal Cations, *J. Dent. Res.*, 1995: **74**: 1513–1520.
28. Čolić, M., Rudolf, R., Stamenković, R. et al. Relationship between Microstructure, Cytotoxicity and Corrosion Properties of a Cu-Al-Ni Shape Memory Alloy, *Acta Biomaterialia*, 2009. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.06.027.

29. Zhai, Q., Ji, H., Zheng, Z., Yu, X., Sun, L. and Liu, X. Copper Induces Apoptosis in BA/F3beta Cells: Bax, Reactive Oxygen Species, and NFkappaB are Involved, *J. Cell. Physiol.*, 2000: **184**: 161–170.
30. Sheline, C.T., Choi, E.H., Kim-Han, J.S., Dugan, L.L. and Choi, D.W. Cofactors of Mitochondrial Enzymes Attenuate Copper-induced Death In Vitro and In Vivo, *Ann. Neurol.*, 2002: **52**: 195–204.
31. Lundebye, A.K., Berntssen, M.H.G., Bonga, S.E.W. and Maage, A. Biochemical and Physiological Responses in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Following Dietary Exposure to Copper and Cadmium, *Mar. Poll. Bull.*, 1999: **39**(1–12): 137–144.
32. Niyogi, S.K., Feldman, R.P. and Hoffman, D.J. Selective Effects of Metal Ions on RNA Synthesis Rates, *Toxicology*, 1981: **22**: 9–21.
33. Kudrin, A.V. Trace Elements in Regulation of NF-kappaB Activity, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2000: **14**: 129–142.
34. Stohs, S.J. and Bagchi, D. Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal Ions, *Free Radic. Biol. Med.*, 1995: **18**: 321–336.
35. Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kuhnle, S. and Nicotera, P. Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch in the Decision between Apoptosis and Necrosis, *J. Exp. Med.*, 1997: **185**: 1481–1486.
36. Wataha, J.C., Hanks, C.T. and Craig, R.G. In Vitro Synergistic, Antagonistic, and Duration of Exposure Effects of Metal Cations on Eukaryotic Cells, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1992: **26**: 1297–1309.
37. Wataha, J.C., Lockwood, P.E. and Nelson, S.K. Initial Versus Subsequent Release of Elements from Dental Casting Alloys, *J. Oral Rehabil.*, 1999: **26**: 798–803.
38. Craig, R.G. and Hanks, C.T. Cytotoxicity of Experimental Casting Alloys Evaluated by Cell Culture Tests, *J. Dent. Res.*, 1990: **69**: 1539–1542.
39. Wataha, J.C., Lockwood, P.E., Schedle, A., Noda, M. and Bouillaguet, S. Ag, Cu, Hg and Ni Ions Alter the Metabolism of Human Monocytes during Extended Low-dose Exposures, *J. Oral Rehabil.*, 2002: **29**: 133–139.
40. Suska, F., Gretzer, C., Esposito, M., Tengvall, P. and Thomsen, P. Monocyte Viability on Titanium and Copper Coated Titanium, *Biomaterials*, 2005: **26**: 5942–5950.
41. Scuderi, P. Differential Effects Of Copper And Zinc On Human Peripheral Blood Monocyte Cytokine Secretion, *Cell. Immunol.*, 1990: **126**: 391–405.
42. Opal, S.M. and DePalo, V.A. Anti-inflammatory Cytokines, *Chest*, 2000: **117**: 1162–1172.
43. Granchi, D., Verri, E., Ciapetti, G. et al. Effects of Chromium Extract on Cytokine Release by Mononuclear Cells, *Biomaterials*, 1998: **19**: 283–291.

The response of peripheral blood mononuclear cells to shape memory alloys

Rebeka Rudolf*

Faculty of Mechanical Engineering,
University of Maribor,
Smetanova 17 SI-2000 Maribor, Slovenia
and
Zlatarna Celje d.d.,
Kersnikova 19, SI-3000 Celje, Slovenia
E-mail: rebeka.rudolf@uni-mb.si
*Corresponding author

Kambiz Mehrabi and Albert C. Kneissl

Department of Physical Metallurgy and Materials Testing,
University of Leoben,
Franz-Josef-Straße 18, 8700 Leoben, Austria
E-mail: kambiz.mehrabi@gmail.com
E-mail: kneissl@unileoben.ac.at

Mihael Bruncko and Ivan Anžel

Faculty of Mechanical Engineering,
University of Maribor,
Smetanova 17 SI-2000 Maribor, Slovenia
E-mail: mihael.bruncko@uni-mb.si
E-mail: ivan.anzel@uni-mb.si

Sergej Tomić

Institute of Medical Research, Military Medical Academy,
Crnotravska 17 11002 Belgrade, Serbia
E-mail: sergej.tomic@gmail.com

Tanja Džopalic and Miodrag Čolić

Institute of Medical Research, Military Medical Academy,
Crnotravska 17 11002 Belgrade, Serbia
and
Medical Faculty Niš, University of Nis,
Bulevar dr Zorana Đinđića, 81 18000 Niš, Serbia
E-mail: tanjche80@gmail.com
E-mail: vmaimi@eunet.rs

Abstract: The aim of this work was to study the response of human peripheral blood mononuclear cells (PB-MNCs) to Cu-Al-Ni and Ni-Ti shape memory alloys (SMAs). The alloys were prepared as rapidly solidified thin ribbons via melt spinning. It has been shown that the ribbons were non cytotoxic for PB-MNCs as determined by the viability and apoptosis assay. In 18 cultures out of 20 cultures of individual donor PB-MNCs cultivated with Cu-Al-Ni SMAs, no significant changes in the production of Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-5 and IL-10) and proinflammatory (IL-1 β , TNF- α , IL-6 and IL-8) cytokines were detected compared to controls. In two cultures out of 20, a significant increase in the production of Th1 and proinflammatory cytokines was observed. Microstructural analyses confirmed the formation of thin oxide on the surface of both SMA ribbons.

Keywords: shape memory alloys; SMAs; peripheral blood mononuclear cells; cytotoxicity; cytokines; microstructural analysis.

Reference to this paper should be made as follows: Rudolf, R., Mehrabi, K., Kneissl, A.C., Bruncko, M., Anžel, I., Tomić, S., Džopalic, T. and Čolić, M. (2010) 'The response of peripheral blood mononuclear cells to shape memory alloys', *Int. J. Immunological Studies*, Vol. 1, No. 2, pp.214–228.

Biographical notes: Rebeka Rudolf joined the Institute of Materials Technology in 1993. In 2002 she obtained her PhD in Mechanical Engineering. Among her positions are as Senior Researcher at the Institute of Materials Technology, and Development Manager and Head of the research group in Zlatarna Celje. Her fields of interest include noble metals and alloys for jewellery and dentistry, new production technologies.

Kambiz Mehrabi is a PhD student and Research Employee of the University of Leoben (Department of Physical Metallurgy and Materials Testing, University of Leoben, Austria) since 2006 working in the field of NiTi-base shape memory alloys. Her fields of interest include stability and optimisation of the two-way effect in niti-base shape memory alloys.

Albert C. Kneissl has been, since 1996, Full Professor of Material Science and Head of Chair of Metallography at the University of Leoben, Austria. He is a member of the editorial board and advisory board of the scientific journals *Practical Metallography* and *Zeitschrift für Metallkunde*.

Mihael Bruncko obtained his Doctoral thesis in 2004 at the University of Maribor entitled: 'The electrical resistance changes of metallic materials during high-temperature oxidation'. His post since 2006 is as aResearch Assistant at the University of Maribor and the University of Leoben in the field of microstructure characterisation and material testing.

Ivan Anžel obtained his PhD in Physical Metallurgy at the University of Ljubljana in 1996. Among his positions are as Professor in Materials Science, and Head of the Institute of Materials Technology, Faculty of Mechanical Engineering, University of Maribor. His main fields of research include high temperature and internal oxidation, electron microscopy and analysis and monitoring of phase transformations.

Sergej Tomić is a PhD student at the Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade. He graduated from the Faculty of Biology, University of Belgrade in 2008. His main fields of interest include cell biology, immunology, and biomaterials.

Tanja Dzopalić is a PhD student at the Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade. She graduated from the Medical Faculty, University of Niš in 2006, where she currently works as a Teaching Assistant at the Department of Immunology. Her main fields of interest include immunology and biomaterials.

Miodrag Čolić, is a Full Professor of Immunology at the Military Medical Academy (MMA), Belgrade, Serbia and at the Medical Faculty, University of Niš, Serbia. He is the Head of the Institute for Medical Research, MMA, and a member of the Serbian Academy of Sciences and Arts. His field of research is mainly focused on cellular immunology, inflammation, biotechnology and the biocompatibility of dental and medical implants. To date he has published over 100 scientific papers in SCI journals.

1 Introduction

Shape memory alloys (SMAs) have attracted considerable attention as biomaterials for medical devices, such as guide wires for catheters, stents, filters, actuators, implants and others. SMAs belong to a group of functional, smart materials, with their unique property to 'remember' the shape they had before the pseudo-plastic deformation. Such an effect is based on crystallographic reversible thermo-elastic martensitic transformation. Among them, Nickel-Titanium (Ni-Ti) SMAs have been mostly explored and applied in biomedicines because of their excellent flexibility and deformation behavior similar to that of living tissues. Cu-based SMAs, especially Cu-Al-Ni and Cu-Al-Mn are commercially available too, but their biomedical application has not been thoroughly investigated. One reason could be that many properties of Cu-Al-Ni SMA are inferior to that of Ni-Ti. The most important disadvantage of polycrystalline Cu-Al-Ni alloys is the small reversible deformation due to inter-granular break-down already at low average stress levels. The main reasons for low failure stress are the high elastic anisotropy ($E_{\langle 111 \rangle} / E_{\langle 001 \rangle} = 13$), large crystal grains, strong dependence of transformation strain on crystal orientation and segregations on grain boundaries. The first three reasons cause high shear stress concentrations at high boundaries, and the fourth one results in weakening the grain boundaries. On the other hand, the Cu-Al-Ni alloys are considerably cheaper than Ni-Ti alloys and, in addition, at present they are the only option if high transformation temperatures are required. The transformation temperatures of Ni-Ti alloys can be adjusted in the range between 200°C and 120°C, whereas the characteristic temperatures of martensitic transformation of Cu-Al-Ni alloys can lie between -200°C and 200°C, depending on the content of Al and Ni.

Ni-Ti SMAs have been considered as biocompatible (Saburi, 1998). In our previous paper we showed using L929 mouse fibroblasts and rodent lymphocytes that Cu-Al-Ni SMAs showed very low toxicity, which could be abrogated almost completely by conditioning the SMAs in culture medium for four weeks. In spite of these properties, there is great concern with regard to health when Ni-Ti and Cu-Al-Ni SMAs are implanted in the human body, because of high Ni and Cu contents respectively. Metallic biomaterials have a tendency to corrode in a physiological environment, thereby accelerating the release of Ni and Cu from SMAs. Both Ni and Cu are cytotoxic and the degree of cytotoxicity mostly depends on the concentration of released metallic ions. In addition, a sub-toxic concentration of metallic ions can alter different cellular functions.

The aim of this study was to test the response of human peripheral blood mononuclear cells (PB-MNCs) by measuring cytotoxicity and the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines following stimulation of the cells with phytohemagglutinin (PHA). For comparison, in some experiments, control alloys of the same composition but without shape memory effects were used.

2 Material and method

2.1 Preparation of Cu–Al–Ni and Ni–Ti permanent mould casting and SMA ribbons

Cu–Al–Ni alloy was made by smelting pure Al, Cu, Ni and Al-3 wt. % B master alloy under vacuum in an induction furnace. When smelted, argon was introduced (1.03 bar) and the melt was cast into a permanent mould. The metals used and the master alloy were of industrial purity and the mould was a triple cylindrical grey iron mould. The obtained billets had a diameter of 47mm and height of 270 mm. The cast Cu–Al–Ni billets (81.3 wt.% Cu, 13.1 wt.% Al, 3.8 wt.% Ni and 0.04 wt.% B) were machined, some into platelets (5 mm × 5 mm × 1 mm) and some into smaller cylindrical billets for melt spinning.

The methodology for preparation of Cu–Al–Ni SMA ribbons was presented in detail in the previous paper (Lojen et al., 2005). Briefly, the ribbons were melt spun in a free jet melt spinner under a protective atmosphere (Ar 5.1). Relatively low wheel speeds (12.4–11.8 m s⁻¹) were selected in order to obtain ribbons wide enough for the intended research. In order to ensure that the ribbons also had optimal shape memory properties, melt spun ribbons were heat treated, solution annealed at 900°C for 2 min, water quenched, post-quench annealed at 300°C for 2 h and finally water quenched again. The presence of shape memory is shown by the endothermic peaks during heating and the exothermic peaks upon cooling. These peaks prove the occurrence of martensitic transformation. The Ti-rich (at 50.3 % Ti) Ni–Ti alloy ingots were prepared by the vacuum arc-melting technique on a water-cooled copper crucible in a reduced Ar atmosphere. To ensure homogeneous SMAs, arc-melting was repeated three times for each alloy.

The melt-spun ribbons were produced under a 200 mbar He atmosphere, using quartz-glass crucibles with a nozzle diameter of 0.9mm and coated internally with Y₂O₃. By applying an Ar overpressure of 90 mbar within the crucible, the melt was ejected onto the surface of a polished Cu wheel (200 mm diameter) having a circumferential wheel speed of five to 30 ms⁻¹. The distance between the nozzle and the wheel surface was 2 mm.

2.2 Preparation of alloys for biocompatibility studies

Rapidly solidified SMA ribbons (5 mm × 5 mm, thickness 0.1 mm) and control alloy platelets (5 mm × 5 mm, thickness 1 mm), prepared as described above, were used for the biocompatibility studies. The samples were washed in distilled water and cleaned with an ultrasonic apparatus (5 × 3 min in distilled water). After that the samples were air dried for 1 h and then disinfected in 96% alcohol for 5 min. After drying, the samples were incubated in complete culture medium consisting of RPMI medium (Sigma, Munich,

Germany), with the addition of 10% fetal calf serum (FCS) (ICN, Costa Mesa, CA), 2mM L-glutamine (Sigma) and antibiotics for four weeks (incubation at 37 °C, 5% CO₂, 1 cm² ml⁻¹ medium). Following the incubation period, the samples were collected, washed in distilled water, air-dried and used for biological studies.

2.3 *Microstructural analysis*

After conditioning in culture media SMA ribbons were cleaned with Ar⁺ ions (E = 2 keV, r = 12 mA cm⁻², Q = 47) to remove surface contaminants. The alloy samples were examined under an optical microscope (OM-Nikon Epiphot 300 with a system for quantitative analysis) and by scanning electron microscopy (SEM) [FEI Quanta 200 3D and FEI Sirion 400NC equipped with an Oxford INCA 350 energy dispersive X-ray (EDX) system]. Auger electron spectroscopy (AES) [Microlab 310-F from THERMO Scientific, with field emission electron gun FE and additionally equipped with an X-ray photoelectron spectrometer (XPS) was used to characterise the alloy surfaces.

2.4 *Cell cultures*

PB-MNCs from 20 healthy volunteers were isolated using Lymphoprep gradient. Each donor gave an informed consent. For cytotoxicity assays, the cells (2×10^6 /ml) were cultivated in complete RPMI medium for 48 hours with or without alloy samples. In cultures with alloys the surface/volume ratio was 1 cm² ml⁻¹. When cytokines were analysed, PB-MNCs were additionally stimulated with PHA (32 µg/ml), Difco, Lawrence, USA.

2.5 *Viability tests*

The viability of PB-MNCs in culture was determined with a 1% solution of Trypan blue. Non-viable cells, stained with Trypan blue, were determined by light microscopy. Percent viability was determined from the number of stained cells and the total number of cells (at least 500 calculated cells in quadruplicates).

2.6 *Apoptosis tests*

Apoptosis of PB-MNCs was determined using propidium iodide (PI) staining, as described (Migita et al., 1994). The method is based on the detection of DNA fragmentation, as the final stage in the apoptotic pathway. The cells with hypodiploid nuclei (sub-G₀) represent apoptotic cells. After washing in a phosphate buffer, PB-MNCs were stained with PI (10 µg ml⁻¹ dissolved in hypotonic citric acid + Triton X-100 buffer). After 6 h incubation at room temperature in the dark the cells were analysed using flow cytometry (EPICS XL-MCL Beckman Coulter/Krefeld, Germany). All measurements were done in quadruplicate.

2.7 *Cytokine measurements*

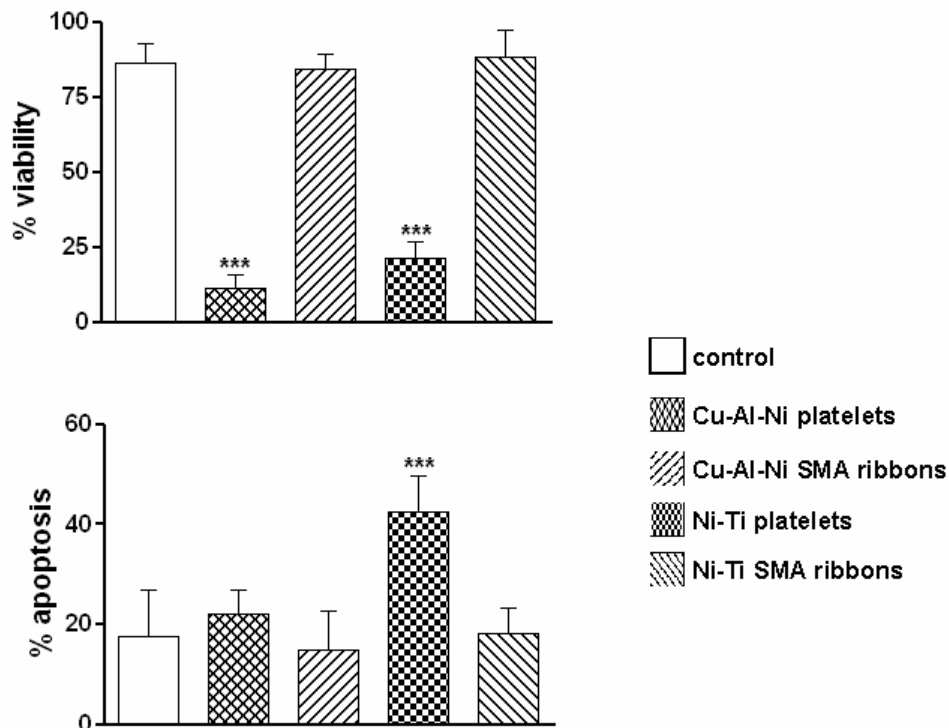
Cell free supernatants collected from PHA-stimulated PB-MNCs cultures were assayed to the presence of cytokines using multiplex immuno-bead assay and flow cytometry

(FlowCytomix Human Th1/Th2 11plex Kit, Bender MedSystems, Vienna, Austria). Supernatants were incubated with the mixture of fluorescent beads coated with antibodies specific for cytokines to be detected (IL-1 β , IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , TNF- β). The beads can be distinguished by their sizes (size A: 5.5 μm ; size B: 4.4 μm) and different intensities of a fluorescent dye in a single small volume sample using the same principle as ELISA. Samples are then analysed on a flow cytometer and results are calculated with BMS FlowCytomix Pro software included in the kit.

2.8 Statistics

Student's t-test and ANOVA were used to evaluate the differences between the experimental and corresponding control samples. Values at $P < 0.05$ or less were considered statistically significant.

Figure 1 Effect of Cu-Al-Ni and Ni-Ti alloys on viability and apoptosis of human PB-MNCs



Notes: Human PB-MNCs were incubated with Ni-Ti or Cu-Al-Ni SMA ribbons for two days and after that viability and apoptosis were determined. The viability was estimated with a 1% solution of Tripan blue. For detection of apoptosis, the cells were stained with PI (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ dissolved in hypotonic citric acid + Triton X-100 buffer). After 6 h incubation at room temperature in the dark, PB-MNCs were analyzed using flow cytometry. Data represent mean values of three experiments \pm standard deviations.

3 Results

3.1 Effect of SMAs on cytotoxicity of PB-MNCs

PB-MNCs, isolated from 20 different healthy donors, were incubated with Ni-Ti or Cu-Al-Ni SMA ribbons for two days and after that viability and apoptosis were determined. Cultures without alloys were used as a negative control. Cultures with Ni-Ti and Cu-Al-Ni platelets of the same size and composition, but without shape memory characteristics were used as positive controls. Results were presented in Figure 1. Both Ni-Ti and Cu-Al-Ni SMA ribbons were not cytotoxic, because neither viability nor apoptosis significantly differed from control cultures without alloys. In contrast, control Cu-Al-Ni platelets were significantly cytotoxic as judged by the reduction of cellular viability for about 90%. However, apoptosis was not a mode of cell death. Control Ni-Ti platelets also significantly reduced cell viability by stimulating apoptosis.

3.2 Effect of SMAs on cytokine production by PB-MNCs

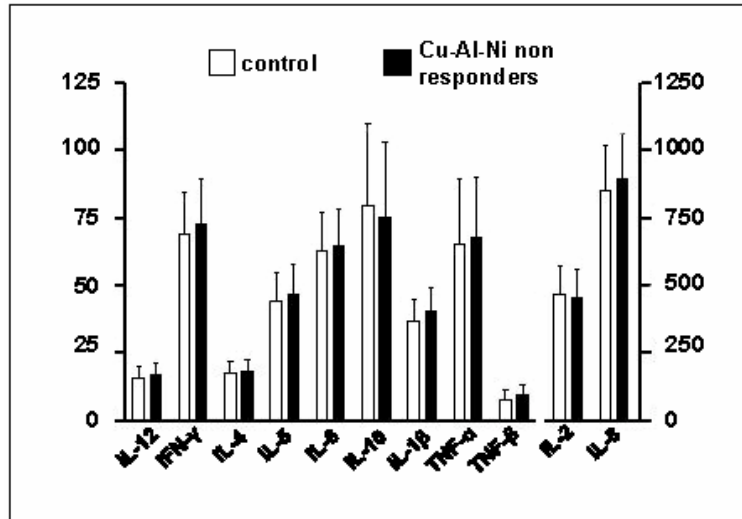
Cell free supernatants of PB-MNCs cultures with SMA ribbons from individual donors were assayed for the presence of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines using a multiplex immune-bead assay which determined 11 cytokines simultaneously. Controls were PB-MNCs cultures with medium alone. Results are presented in Figures 2 and 3. In 18 cultures (non-responders) out of 20 donors, with Cu-Al-Ni SMAs no significant changes in the production of Th1 (IL-12, IFN- γ , IL-2), Th2 (IL-4, IL-5 and IL-10) and pro-inflammatory (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , TNF- β) cytokines were observed (Figure 2a). In two cultures (responders) significant increase in the production of Th1 and pro-inflammatory cytokines was detected (Figure 2b).

Neither of the PB-MNCs cultures with Ni-Ti SMA ribbons responded in a way to produce pro-inflammatory cytokines. However, in five PB-MNCs cultures (responders) a significant increase in the production of IL-10 was detected compared to the levels of IL-10 either in control cultures or the PB-MNCs cultures with Ni-Ti SMA ribbons of 15 responders (Figure 3).

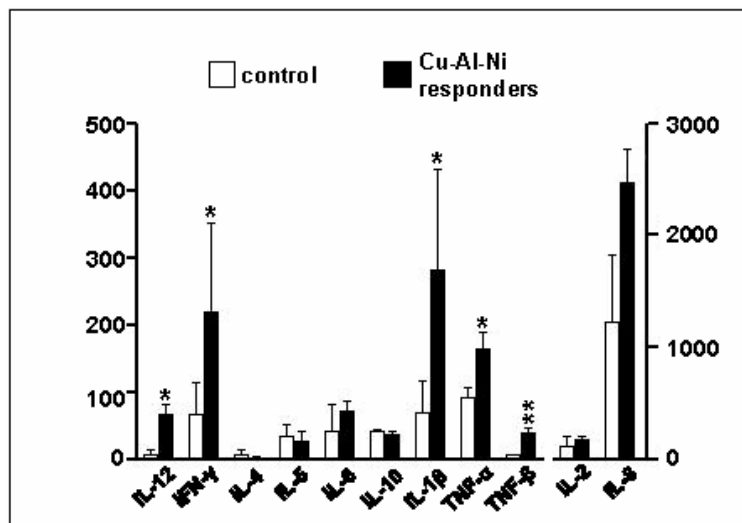
3.3 Microstructural analysis of SMAs

Microstructural analysis, performed by SEM in combination with EDX and AES, showed the formation of thin oxide layers on the surface of both SMA ribbons (Figures 4 and 5). The surface of a Cu-Al-Ni ribbon was non-homogeneous and contained many different point-shaped inclusions, approximately two micrometers in size, distributed throughout the whole surface of the ribbon (Figure 4). EDX-analysis showed that these particles belong to borides. AES spectroscopy, on the other hand, showed that the upper line of the surface consisted only of Cu, Al and O. The line and the position of the spectra was in accordance with the data showing that Cu and Al are bonded in oxide. The AES spectroscopy of the lower surface's line, which was about two micrometers below the upper surface, revealed the presence of about 2.7% of Ni, besides Cu, Al and O. This suggests that no further Ni release in this layer occurred after the biocompatibility assays were performed.

Figure 2 Effect of Cu-Al-Ni SMA ribbons on cytokine production by human PB-MNCs activated with PHA



(a)

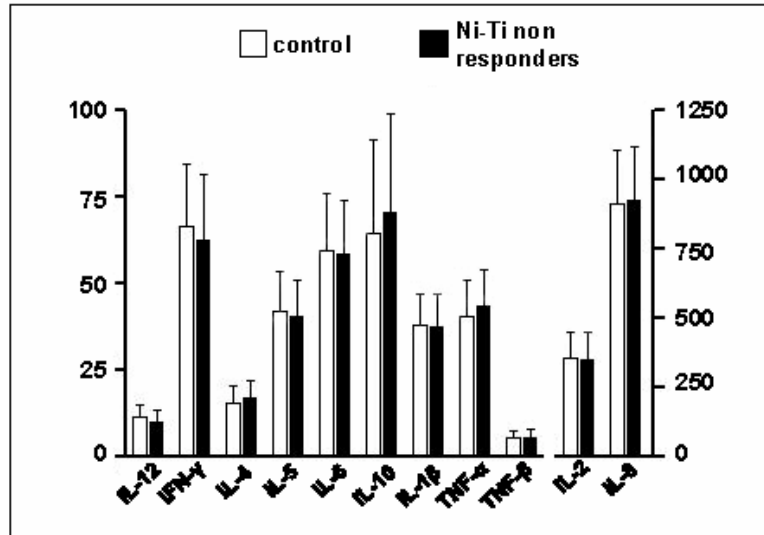


(b)

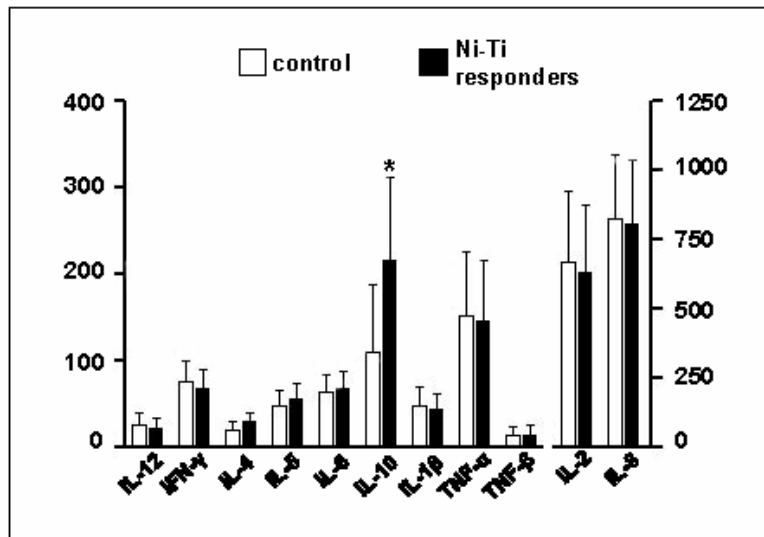
Notes: Cell free supernatants of activated PB-MNCs cultures with Cu-Al-Ni SMA ribbons from individual donors were assayed for the presence of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines using a multiplex immunobead assay. (a) levels of secreted cytokines from 18 cultures (non-responders) out of 20 were determined by flow cytometry. Values are given as $x \pm S.E.$ (b) Cytokine production from two cultures (responders) was detected by flow cytometry. Values are given as $x \pm S.E.$

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control

Figure 3 Effect of Ni-Ti SMA ribbons on cytokine production by human PB-MNCs activated with PHA



(a)

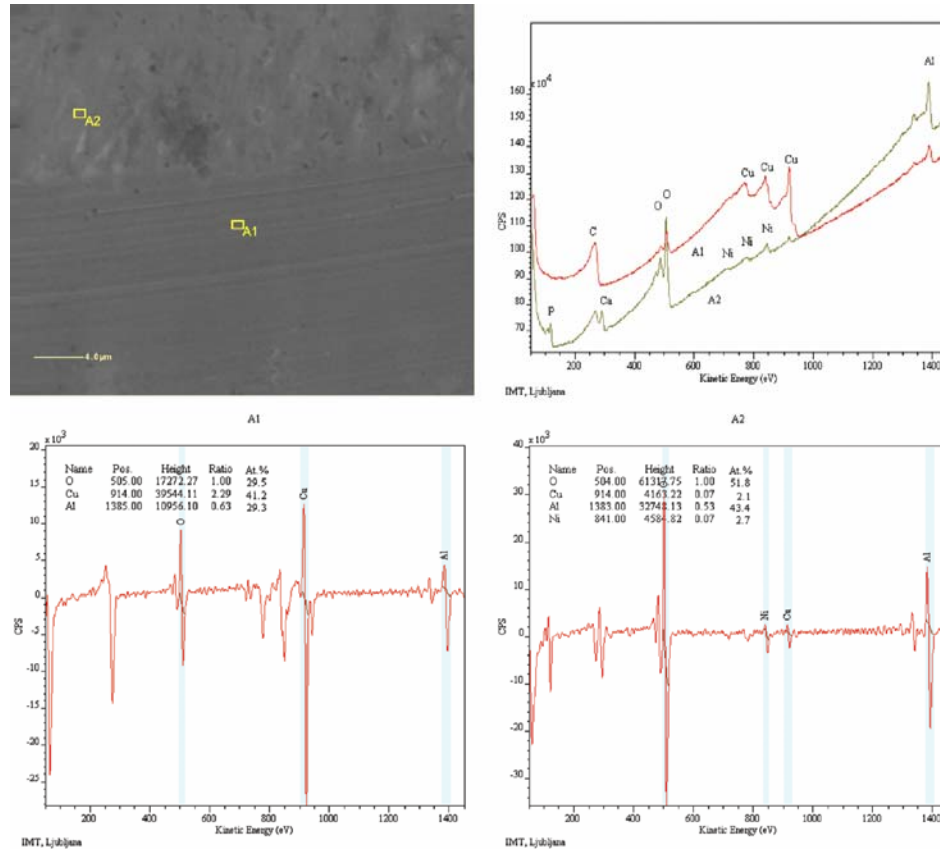


(b)

Notes: Cell free supernatants of PHA activated PB-MNCs cultures with Ni-Ti SMA ribbons were assayed for the presence of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines using a multiplex immunobead assay. (a) Cytokine levels of cultures from 15 donors (non-responders) were determined by flow cytometry. (b) Production of cytokines from 5 cultures (responders) out of 20 was presented as $\bar{x} \pm S.E.$

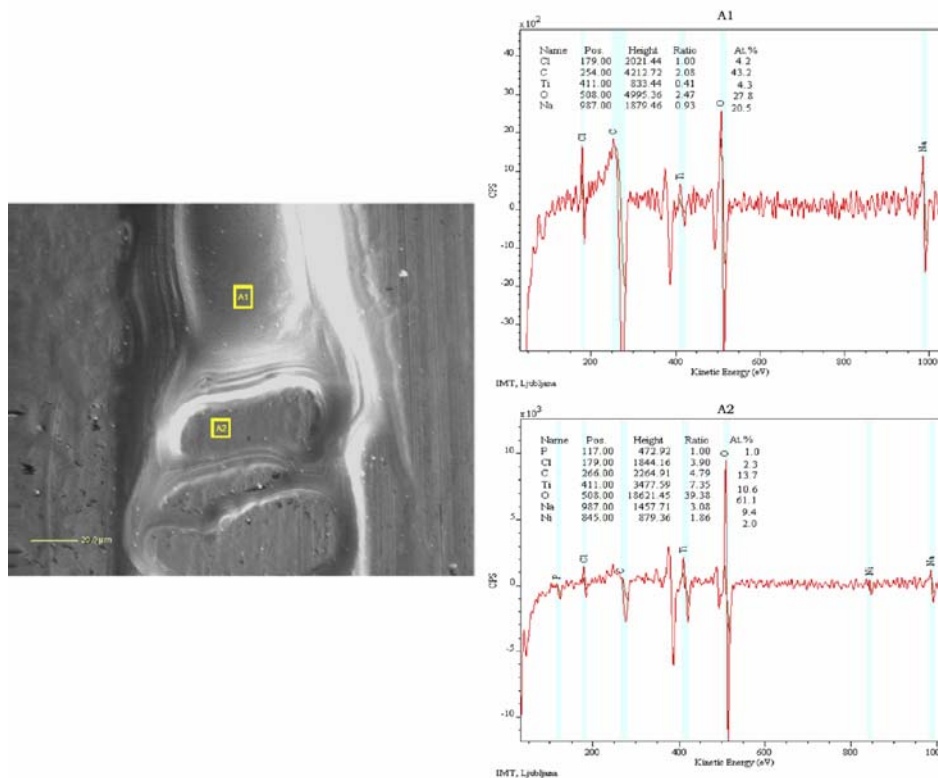
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to control

Figure 4 Microstructural analysis of conditioned Cu-Al-Ni ribbons (see online version for colours)



Notes: For Auger analysis the sample was sputtered with Ar^+ 3 keV for 5 min, then AES and XPS analysis was performed. For depth profile the sample was sputtered with Ar^+ 3 keV sputter rate about 1.2 nm/min. Analysis was performed before the first sputtering and after each sputter cycle. AES profile analysis was made on a small surface of $5 \times 5 \mu\text{m}$, while XPS profile analysis was made on a surface of $1 \times 3 \text{mm}$.

The surface of an Ni-Ti melt spun ribbon was significantly rough (Figure 5). AES spectra of the upper line of its surface showed the presence of the following elements: Cl, C, Ti, O and Na. The differentiated line of Ti suggested that Ti was bonded in oxide. AES spectra of the lower line showed that there were two additional elements, Ni and P. The shape and the position of Ni AES spectra clearly suggested that Ni was bonded to a non-stoichiometric oxide. These results suggested that the lower line contained oxides of Ni and Ti.

Figure 5 Microstructural analysis of conditioned Ni-Ti ribbons (see online version for colours)

Notes: For Auger analysis the sample was sputtered with Ar^+ 3 keV for 5 min, then AES and XPS analysis was performed. For depth profile the sample was sputtered with Ar^+ 3 keV sputter rate about 1.2 nm/min. Analysis was performed before the first sputtering and after each sputter cycle. AES profile analysis was made on a small surface of $5 \times 5 \mu\text{m}$, while XPS profile analysis was made on a surface of $1 \times 3 \text{mm}$.

4 Discussion

In this paper we examined the cytotoxic and immunomodulatory effects of two SMAs, Ni-Ti and Cu-Al-Ni, respectively, on human PB-MNCs in culture. To our knowledge, this is the first report showing the influence of SMA materials, produced as thin ribbons by spin melting technology, on human cells.

In our previous papers (Čolić et al., 2009, 2010.) we demonstrated that Cu-Al-Ni SMA ribbons showed a mild cytotoxic effect on rodent lymphocytes, macrophages and fibroblasts, which was abrogated almost completely by conditioning the ribbons in culture medium for four weeks. Since a similar investigation has not been performed for Ni-Ti SMA ribbons and in order to make exact comparisons between these two alloys, we conditioned both ribbons before examination of their biological effect. Reduced cytotoxic effect of conditioned Cu-Al-Ni ribbons could be a consequence of decreased

release of Cu and Ni ions due to the formation of oxide layers on the alloy surface (Čolić et al., 2010) as revealed by AES microstructural analysis and confirmed for both SMAs in this work. In line with this, both Cu-Al-Ni and Ni-Ti alloys contained Ni beneath the surface (the lower line from AES spectra) which was not released during the conditioning in the culture media. In addition, AES spectra of the upper line of Ni-Ti melt spun ribbon showed the presence of Cl, C, Ti, O and Na. Elements like Cl, C and Na are not typically present in Ni-Ti alloys and their presence probably originated from the culture media used for biocompatibility testing.

We showed that conditioned Cu-Al-Ni and Ni-Ti ribbons were not cytotoxic for human PB-MNCs, as judged by the viability and apoptosis assay. In contrast, control Ni-Ti and Cu-Al-Ni platelets were significantly cytotoxic. Cu-Al-Ni most probably induced necrosis of PB-MNCs, based on a significant decrease of cell viability without manifested apoptosis. In contrast, the dominant mode of cell death in cultures with Ni-Ti platelets was apoptosis. Cytotoxicity of control Cu-Al-Ni and Ni-Ti platelets was most probably caused by released Cu and Ni ions, respectively.

Cu ions at concentrations higher than 0.33 mmol l^{-1} have been shown to induce necrosis of different cells, whereas lower cytotoxic concentrations of Cu ions could induce both apoptosis and necrosis (Schedle et al., 1995). Apoptosis and necrosis are considered functionally and morphologically as distinct forms of cell death. However, the observation that cells triggered to undergo apoptosis will die by necrosis when the intracellular energy level is low (depletion of ATP) has altered this concept (Leist et al., 1997). Based on these results, it can be postulated that the high concentration of released Cu ions from control Cu-Al-Ni platelets blocked mitochondrial or glycolytic ATP generation and caused necrosis. Apoptosis of PB-MNCs in culture with control Ni-Ti alloy could be triggered by released Ni ions or a combination of Ni and Ti ions. This hypothesis is in line with the already described Ni cytotoxicity (reviewed by Shabalovskaya, 2002).

Melt spinning technology, used for the preparation of SMA ribbons, significantly changed the microstructure of the alloys to such an extent that a martensitic matrix was predominantly formed in which metal ions are more firmly bound in crystal structure, thus limiting their corrosion. An increase in the corrosion resistance of Cu-Al-Ni SMA ribbons was confirmed in our previous paper (Čolić et al., 2010), whereas the corrosion resistance of Ni-Ti SMA has already been published by others (Rondelli et al., 1990; Shabalovskaya, 2002).

Another important finding of our work was related to the different response of individual PB-MNCs to both SMAs. Namely, in two out of 20 individual donors Cu-Al-Ni ribbons, although non-cytotoxic, stimulated the production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , TNF- β), as well as Th1 cytokines (IL-12, IFN- γ and IL-2). IL-12 is a key inducer of the Th1 immune response manifested by increased production of IFN- γ (Franke et al., 2009; Cella et al. 1999). IFN- γ is the most potent activator of M Φ which, in turn, produces pro-inflammatory cytokines and other mediators (Ma et al., 2003; Watford et al., 2003). Therefore, IFN- γ and its inducer cytokine, IL-12, also belong to the group of cytokines which stimulate the inflammatory response. In our culture system monocytes, pre-activated by the addition of PHA, are most probably the main sources of pro-inflammatory cytokines, IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and TNF- β . PHA is a well-known mitogen for human T cells. The proliferation of T cells to PHA depends on accessory, antigen-presenting cells, mostly monocytes. At the moment it is not known why Cu-Al-Ni ribbons stimulated the production of

pro-inflammatory cytokines in some donors and what triggering mechanisms are responsible for this effect. We found no significant differences in the basal production of all examined cytokines between responders and non-responders. Therefore, it seems that the contact of PB-MNCs with the alloys or metallic ions released from the alloys could be a trigger of this process. We have previously shown that sub-cytotoxic concentrations of Cu could stimulate the release of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6) by rat peritoneal macrophages, (Čolić et al., 2009), most probably by activation of nuclear factor kappa- β (NF- κ β) (Kanters et al., 2003). The enhanced production of TNF mRNA in peripheral blood leukocytes by Cu ions has been reported too (Scuderi, 1990). In contrast, Suska et al. (2005) also demonstrated that human monocytes, cultivated on Cu-coated titanium, secreted low levels of TNF- α and IL-10.

The good biocompatibility of Ni-Ti alloys are in accordance with previous published results (reviewed by Shabalovskaya, 2002). Namely, except for the absence of manifested cytotoxicity in PB-MNCs cultures, Ni-Ti SMA ribbons did not induce the detectable pro-inflammatory response, even in cultures of donors which responded to Cu-Al-Ni alloys. However, in five donors we detected increased production of IL-10.

IL-10 is a potent anti-inflammatory and immune-suppressive cytokine, expressed by Th2 cells, B cells, DCs, and macrophages (Moore et al., 2001), also by Th1 cells (Anderson et al., 2007) and certain regulatory T cells (Roncarolo et al., 2006). This cytokine participates in regulation of the immune response (Saraiva et al., 2009), as well as the peripheral tolerance, by protecting against autoimmunity (Moore et al. 2001). Therefore, IL-10 is a very important cytokine for self-limiting Th1 cell-mediated immuno-pathology in conditions of strong inflammatory stimuli (Jankovic and Trinchieri, 2007).

We hypothesise that monocytes, as adherent cells, could be the primary target of the effect of Ni-Ti alloy. The activation mechanism could be the direct contact with the rough surface of the SMA ribbons. This hypothesis is supported by our unpublished data which demonstrated that monocyte-derived dendritic cells significantly changed their surface morphology in the contact with Ni-Ti SMA ribbons. A similar effect might be caused by released Ni ions, which possess immuno-modulatory activity, even at very low concentrations (Michel, 1987; Putters et al., 1992).

Our results might have several implications. At first, by using a simple screening test (PHA-stimulated PB-MNCs cultures) it is possible to identify the individuals who developed the inflammatory response in the contact with a biomaterial and thus predict undesired reactions in vivo following its implantation. In this context, such results could initiate the study of gene polymorphism associated with unpredictable immune/inflammatory response to a biomaterial. Finally, an increase in IL-10 production might be significant for tolerogenicity of the implanted Ni-Ti materials. As previously mentioned, Ni-Ti has been widely used for biomedical applications as stents, catheters or implants. Induction of tolerogenicity to Ni-Ti SMAs may be beneficial for biological acceptance of this material. However, it remains to be tested whether the tolerance exists after prolonged persistence of Ni-Ti implants in the organism. It is known that the surface of Ni-Ti SMA has been changed due to influences of shear forces in circulation, and the protective TiO₂ layer could be damaged (Shabalovskaya, 2002).

In conclusion, our results showed that the conditioned Ni-Ti and Cu-Al-Ni SMA ribbons did not exert a direct cytotoxic effect on human PB-MNCs in cultures, but changed the response of these cells in some donors, whereas Cu-Al-Ni stimulated the production of pro-inflammatory cytokines, Ni-Ti up-regulated IL-10. These results may

have functional implications such as prediction of the response of individual PB-MNCs to a material before its implantation in the body.

References

- Anderson, C.F., Oukka, M., Kuchroo, V.J. and Sacks, D. (2007) 'CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis', *J Exp Med*, Vol. 204, pp.285–297.
- Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I. and Lanzavecchia, A. (1999) 'Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA', *J Exp Med*, Vol. 189, pp.821–829.
- Čolić, M., Rudolf, R., Stamenković, D., Anžel, I., Vučević, D., Jenko, M., Lazić, V. and Lojen, G. (2010) 'Relationship between microstructure, cytotoxicity and corrosion properties of a Cu–Al–Ni shape memory alloy', *Acta Biomat*, Vol. 6, pp.308–317.
- Čolić, M., Stamenković, D., Anžel, I., Lojen, G. and Rudolf, R. (2009) 'The influence of the microstructure of high noble gold-platinum dental alloys on their corrosion and biocompatibility in vitro', *Gold Bull*, Vol. 42, pp.34–47.
- Franke, A., Lante, W., Kollig, E., Koeller, M., Schinkel, C. and Markewitz, A. (2009) 'Exogenous IL-12 and its effect on TH1/TH2 cell activity after cardiac surgery', *Shock*, Vol. 32, pp.366–373.
- Jankovic, D. and Trinchieri, G. (2007) 'IL-10 or not IL-10: that is the question', *Nat Immunol*, Vol.8, pp.1281–1283.
- Kanters, E., Pasparakis, M., Gijbels, M.J., Vergouwe, M.N., Partouns-Hendriks, I., Fijneman, R.J. et al. (2003) 'Inhibition of NF-kappaB activation in macrophages increases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice', *J Clin Invest*, Vol. 112, pp.1176–1185.
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kuhnle, S. and Nicotera P. (1997) 'Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis', *J Exp Med*, Vol. 185, pp.1481–1486.
- Lojen, G., Anžel, I., Kneissl, A.C., Unterweger, E., Kosec, B. and Bizjak, M. (2005) 'Microstructure of rapidly solidified Cu–Al–Ni shape memory alloy ribbons', *J Mat Proc Tech*, Vol. 162, No. 163, pp.220–229.
- Ma, J., Chen, T., Mandelin, J., Ceponis, A., Miller, N.E., Hukkanen, M., Ma, G.F. and Konttinen, Y.T. (2003) 'Regulation of macrophage activation', *Cell Mol Life Sci*, Vol. 60, pp.2334–2346.
- Michel, R. (1987) 'Trace metal analysis in biocompatibility testing', *CRC, Crit rev Biocompat*, Vol. 3, pp.235–317.
- Migita, K., Eguchi, K., Kawabe, Y., Mizokami, A., Tsukada, T. and Nagataki, S. (1994) 'Prevention of anti-CD3 monoclonal antibody-induced thymic apoptosis by protein tyrosine kinase inhibitors', *J. Immunol.*, Oct., Vol. 153, pp.3457–3465.
- Moore, K.W., Malefyt, R.W., Coffman, R.L. and O'Garra, A. (2001) 'Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor', *Annu Rev Immunol*, Vol.19, pp.683–765.
- Putters, J., Sukul, D., Zeeuw, G., Bijma, A. and Besselink, P. (1992) 'Comparative cell culture effect of shape memory metal (Nitinol), nickel and titanium: a biocompatibility estimation', *Eur Surg Res*, Vol. 24, pp.378–382.
- Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K. and Levings, M.K. (2006) 'Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans', *Immunol Rev*, Vol. 212, pp.28–50.
- Rondelli, G., Vicentini, B. and Cigada, A. (1990) 'The corrosion behavior of nickel titanium shape memory alloys', *Corr Sci*, Vol. 30, pp.805–812.
- Saburi T. (1998) 'Ti-Ni shape memory alloys', in *Shape Memory Materials*, (Eds.): K. Oztuka and C.M. Wayman, Cambridge University Press, pp.49–97.

- Saraiva, M., Christensen, J.R., Veldhoen, M., Murphy, T.L., Murphy, K.M. and O'Garra, A. (2009) 'Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP Kinase activation by high Antigen dose', *Immunity*, Vol. 31, pp.209–219.
- Schedle, A., Samorapoompichit, P., Rausch-Fan X.H., Franz, A., Fureder, W., Sperr, W.R. et al. (1995) 'Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations', *J Dent Res*, Vol. 74, pp.1513–1520.
- Scuderi, P. (1990): 'Differential effects of copper and zinc on human peripheral blood monocyte cytokine secretion', *Cell Immunol*, Vol. 126, pp.391-405
- Shabalovskaya, S.A. (2002) 'Surface, corrosion and biocompatibility aspects of Nitinol as an implant material', *Bio-Med Mat Eng*, Vol. 12, pp.69–109.
- Suska, F., Gretzer, C., Esposito, M., Tengvall, P. and Thomsen P. (2005) 'Monocyte viability on titanium and copper coated titanium', *Biomaterials*, Vol. 26, pp.5942–5950.
- Watford, W.T., Moriguchi, M., Morinobu, A. and O'Shea, J.J. (2003) 'The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses', *Cytokine Growth Factor Rev*, Vol. 14, pp.361–368.

RESPONSE OF MONOCYTE-DERIVED DENDRITIC CELLS TO RAPIDLY SOLIDIFIED NICKEL-TITANIUM RIBBONS WITH SHAPE MEMORY PROPERTIES

S. Tomić¹, R. Rudolf^{2,3}, M. Brunčko², I. Anžel², V. Savić⁴ and M. Čolić^{1,4*}

¹Institute for Medical Research, Military Medical Academy, Belgrade, 11000, Serbia

²Faculty of Mechanical Engineering, University of Maribor, 2000, Slovenia

³Zlatarna Celje d.d., Celje, 3000, Slovenia

⁴Faculty of Medicine, University of Niš, 18000 Serbia

Abstract

Ni-Ti Shape Memory Alloys (SMAs) have attracted considerable attention as biomaterials for medical devices. However, the biocompatibility of Ni-Ti SMAs is often unsatisfactory due to their poor surface structure. Here we prepared Rapidly Solidified (RS) Ni-Ti SMA ribbons by melt-spinning and their surface was characterised by Auger-electron spectroscopy, X-ray photoelectron spectrometry and scanning electron microscopy. The biocompatibility of the produced ribbons and their immunomodulatory properties were studied on human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs). We showed that melt-spinning of Ni-Ti SMAs can form a thin homogenous oxide layer, which improves their corrosion resistance and subsequent toxicity to MoDCs. Ni-Ti RS ribbons stimulated the maturation of MoDCs, as detected by changes in the cells' morphology and increased expression of HLA-DR, CD86, CD40 and CD83 molecules. However, Ni-Ti RS ribbons enhanced the tolerogenic properties of immature MoDCs, which produced higher levels of IL-10 and IL-27, driving the differentiation of IL-10- and TGF- β -producing CD4⁺T cells. On the other hand, in the presence of lipopolysaccharide, an important pro-inflammatory biomolecule, Ni-Ti RS ribbons enhanced the allostimulatory and Th1 polarising capacity of MoDCs, whereas the production of Th2 and Th17 cytokines was down-regulated. In conclusion, Ni-Ti RS ribbons possess substantial immunomodulatory properties on MoDCs. These findings might be clinically relevant, because implanted Ni-Ti SMA devices can induce both desired and adverse effects on the immune system, depending on the microenvironmental stimuli.

Keywords: Nickel-titanium alloy, biocompatibility, cytokines, immunomodulation, monocyte-derived dendritic cells.

Introduction

From their discovery in 1965 (Buehler and Wang, 1968) to the present day, the exciting properties of Shape Memory Alloys (SMAs) have preoccupied the interest of many investigators trying to understand, apply or improve these extraordinary "smart materials". The most frequently manufactured Ni-Ti SMAs are able to sense the changes in thermal and mechanical stimuli and respond through a complex thermoelastic reversible phase (martensite-austenite) transformation. This results in the remarkable properties of SMAs, such as shape memory effects and super elasticity. Ni-Ti SMAs also possess excellent fatigue resistance and a high damping capacity. These properties makes Ni-Ti SMAs an attractive tool for various types of biomedical devices (stents, actuators, filters, shape memory staples, inter-body fusion devices, endoprostheses etc.) (Hoh *et al.*, 2009).

Because of the high Ni content (50.8 at% in devices transformable at physiological temperatures) enthusiasm for the use of Ni-Ti based SMAs in biomedical engineering has been tempered by concern regarding its biocompatibility (Shabalovskaya, 2002). In contrast to pure Ni, which is known to induce carcinogenicity and toxicity of a wide spectra of living tissues (Das *et al.*, 2008), Ni-Ti SMAs demonstrated rather good biocompatibility (Shabalovskaya, 2002). This is because Ti is more readily oxidised than Ni, so the biologically inert Ti-oxide layer and extracellular-derived calcium-phosphate layer on the Ni-Ti surface prevent the release of Ni (Es-Souni and Fischer-Brandies, 2005). However, since Ti-oxide is a very brittle ceramic, it can be damaged during dynamic mechanical loading (Peitsch *et al.*, 2007) or under inflammatory conditions (Messer *et al.*, 2009), leading inevitably to the initiation of corrosion and increased release of Ni ions, causing local or systematic adverse health effects (Das *et al.*, 2008). This could lead to necrotic and apoptotic changes of the tissue surrounding the implant (Bogdanski *et al.*, 2004), increased expression of inflammatory mediators such as tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) and reduced proliferation of cells near the implant (Es-Souni and Fischer-Brandies, 2007). These studies indicate the necessity for developing strategies for improvement of corrosion resistance of Ni-Ti based alloys and prevention of Ni release from the alloy.

A variety of methods have been attempted to improve the mechanical properties of SMAs by producing finer-grained Ni-Ti alloys. Rapid Solidification (RS) is one such technique that enables the production of ribbon-shaped small-sized devices with improved ductility, transformation temperatures and hysteresis of Ni-Ti alloys (Santamarta

*Address for correspondence:

Miodrag Čolić
Military Medical Academy
Crnotravska 17
11000 Belgrade, Serbia

Telephone/FAX Number: +381112662722

E-mail: fakultet.vma@mod.gov.rs

et al., 2004). Earlier, our group described how the wheel speed (solidification rate) influences the microstructure and enhances the shape memory characteristics of Ni-Ti ribbons (Mehrabi *et al.*, 2009). Many properties of melt-spun Ni-Ti ribbons, including their microstructures, depend strongly on the processing parameters (Kramer *et al.*, 2007), so the characterisation of the material and its biocompatibility are needed for each new set of parameters.

In our latest study (Rudolf *et al.*, 2010) we showed that Ni-Ti RS ribbons were not cytotoxic for human peripheral blood mononuclear cells after 48 h exposure in culture. However, we found that the cells of some donors responded to Ni-Ti RS ribbons by increasing the production of IL-10, whereas no initiation of the production of pro-inflammatory cytokines was observed. Since IL-10 is a very important cytokine for self-limiting Th1 cell-mediated immunopathology in conditions of strong inflammatory stimuli (Saraiva and O'Garra, 2010), these exciting findings suggest that Ni-Ti RS ribbons may possess tolerogenic properties intrinsically, which could launch their wide clinical application quickly. The functional response of peripheral blood mononuclear cells (PB-MNCs) in our culture model depends strongly on accessory, antigen-presenting cells (APCs), among which dendritic cells (DCs) play a key role. So we hypothesise that DCs are the primary target of the tolerogenic effect of RS Ni-Ti ribbons. DCs are the most potent APCs, orchestrating and fine-tuning the whole immune response depending on the environmental stimuli (Banchereau *et al.*, 2000), including biomaterials (Rogers and Babensee, 2011). In steady state conditions, DCs are in an immature or semi-mature state and possess profound tolerogenic properties, which enable them to induce and support peripheral tolerance to self antigens (Steinman *et al.*, 2003). However, upon encountering dangerous signals, such as damage- or pathogens-associated molecular patterns, including lipopolysaccharide (LPS) (Sallusto and Lanzavecchia, 1994), and pro-inflammatory cytokines (Bender *et al.*, 1996), DCs mature by expressing high levels of Major Histocompatibility Complex (MHC) (Inaba *et al.*, 2000), co-stimulatory molecules (Inaba *et al.*, 1994) and CD83, a marker of DCs maturation (Tze *et al.*, 2011). Simultaneously, DCs migrate to the peripheral lymph nodes, activate naïve T cells (Steinman *et al.*, 1993) and direct their differentiation towards T helper (Th)1, Th2 (Constant and Bottomly, 1997), Th17 (McGeachy and Cua, 2008), or T regulatory (Vignali *et al.*, 2008) subsets. The differentiation of Th cells into these subsets is mediated by specific cytokines produced by DCs such as IL-12 (Trinchieri, 2003), IL-23, IL-27 (Hunter, 2005) and IL-10 (Steinman *et al.*, 2003), as well as co-stimulatory molecules (Banchereau *et al.*, 2000), all of which leads to an appropriate immune response. The importance of Th17 cells has just recently been recognised in clearing pathogens during host defence reactions, but also in inducing tissue inflammation in autoimmune diseases (McGeachy and Cua, 2008).

The key mechanisms by which Ni induces allergic reactions include the sensitisation of a subset of skin DCs (Langerhans' cells) by Ni-protein complexes and activation of effectors and memory T cells (Moulon *et al.*, 1995).

Whether similar mechanisms are involved in the local immune response to Ni-Ti implants is unknown currently. Therefore, the aim of our study was to investigate the cytotoxicity of Ni-Ti RS ribbons using a model of human monocyte derived (Mo)DCs and the functional response of MoDCs to such SMA samples in terms of their phenotypic changes, cytokines production, allostimulatory and Th polarisation capacity under normal and inflammatory conditions. These biological effects were correlated with the surface composition and microstructure of RS Ni-Ti ribbons, including characterisation of the oxide layer, and changes occurred at the alloy surface after conditioning of the ribbons in cell culture medium.

Materials and Methods

Preparation of Ni-Ti RS ribbons and control Ni-Ti plates

In our previous paper we described in detail the preparation of RS SMAs ribbons (Lojen *et al.*, 2005) including Ni-Ti RS ribbons (Rudolf *et al.*, 2010). Briefly, Ni-Ti (with 50.3 % Ti) ingots were prepared by the vacuum arc-melting technique on a water-cooled copper hearth in a reduced Ar atmosphere. To ensure homogeneous bulk SMAs, arc-melting was repeated three times for each alloy. The melt-spun ribbons were produced by re-melting bulk Ni-Ti and the process was undertaken in a 200 mbar He atmosphere in a quartz-glass crucible with a nozzle diameter of 0.9 mm. Because of melt stickiness problems, the crucible was coated internally with Y_2O_3 in order to increase resistance of the crucible to aggressive chemical attack at high temperatures when handling the most highly-reactive molten materials, including Ti. By applying an Ar overpressure of 90 mbar within the crucible, the melt was ejected onto the surface of a polished Cu wheel (200 mm in diameter) having a circumferential wheel speed of 15 ms^{-1} . The distance between the nozzle and the wheel surface was 2 mm. Ni-Ti RS ribbons were prepared as 5 mm x 5 mm x 0.1 mm plates and analysed by Scanning Electron Microscopy (SEM)/ Energy Dispersive X-ray (EDX) (Sirion 400 NC, FEI, Hillsboro, OR, USA) after cleaning in an ultrasonic bath (Fig. 1).

Control Ni-Ti plates were prepared from the same Ni-Ti ingots as Ni-Ti RS ribbons after cutting the material into plates 5 mm x 5 mm x 1 mm using electro-erosion. After that, SEM/EDX analysis was performed and revealed the rough surface of the plates, which was contaminated with elements such as Cu, Zn and C. Therefore, the native bulk Ni-Ti samples were ground on Silicon Carbide paper from 80 to a final mesh size of 4,000 and then polished with 3 μm and 1 μm C-suspensions. SEM/EDX analysis was performed after cleaning the polished samples in an ultrasonic bath (Fig. 1). Since the analysis showed no detectable contaminants, these plates were used as control Ni-Ti plates in the cytotoxicity tests.

Microstructure analysis of the surface of Ni-Ti RS ribbons

The surface of Ni-Ti RS ribbons was analysed before and after the conditioning in cell culture media for 2

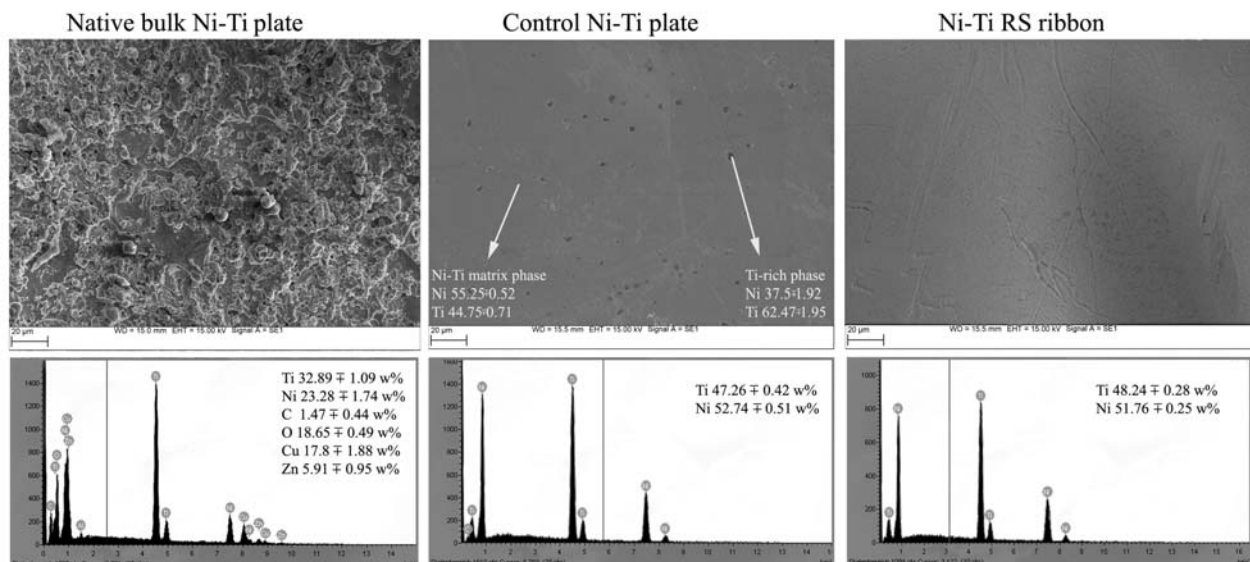


Fig. 1. SEM/EDX analysis of Ni-Ti samples. Ni-Ti samples were prepared as described in Materials and Methods. Representative EDX analyses of each Ni-Ti sample are shown below the images. The numbers on the EDX spectra represent mean weight (w) % \pm SD obtained by the EDX analyses taken from 8 areas $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ in size. The two detected intermetallic phases on the control Ni-Ti plates were identified using spot EDX analysis (values are given as mean w% \pm SD, $n = 9$).

days. SEM, Auger-Electron Spectroscopy (AES) and X-ray Photoelectron Spectrometry (XPS) were used to characterise the surface of Ni-Ti RS ribbons by using VG-Scientific Microlab 310F SEM/AES/XPS. A primary electron beam was at a current of 10 nA and kinetic energy of 10 keV, giving a resolution of 10 nm. For XPS and AES analysis, the samples were cleaned with Ar^+ ions ($E = 2 \text{ keV}$, $r = 12 \text{ mA cm}^{-2}$, $Q = 47$) to remove surface contaminants. For all XPS measurements Mg $K\alpha$ radiation at 1486.6 eV with anode voltage \times emission current = 12.5 kV \times 16 mA = 200 W power was used. The XPS analysis was performed after the sample was sputtered with Ar^+ 3 keV for 5 min. For AES depth profiles, the samples were sputtered with a 3 keV Ar^+ sputter rate of about 1.2 nm/min and the analysis was performed before the first sputtering and after each sputter cycle. The sputtering rate was estimated based on the average sputtering rate calculated from a SiO_2 reference under similar conditions (Shabalovskaya and Andereg, 1995).

Preparation of Ni-Ti samples for biocompatibility and conditioning studies

Ni-Ti RS ribbons and control Ni-Ti plates were used for the biocompatibility and conditioning studies. In conditioning experiments we also used pure Ni and Ti plates as positive controls, to evaluate the leaching of Ti and Ni ions. These plates were of the same size as the control Ni-Ti plates.

All the metal/alloy samples were washed in distilled water and cleaned with an ultrasonic apparatus (5 \times 3 min in distilled water). After that, the samples were air dried for 1 h and then disinfected in 96 % alcohol for 5 min. After drying, the ribbons and plates were placed in 24-well plates (6-plicates of each sample) (Costar Sigma, Munich, Germany) containing cell culture medium. The culture medium was complete RPMI 1640 medium

(Sigma, Munich, Germany) supplemented with 2 mM L-glutamine, 20 $\mu\text{g/mL}$ gentamicin, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin (ICN, Costa Mesa, CA, USA), 50 μmol 2-mercaptoethanol (2-ME) (Sigma), 10 % heat inactivated foetal calf serum (FCS; PAA Laboratories Vienna, Austria) (Fischer, 1975; Bannai, 1992). The metal/alloy samples were incubated (conditioned) in the medium for 2 days following the ISO recommendations for the biocompatibility testing of medical and dental materials (International Standards Organisation, 2009). The samples' surface area exposure to the medium was $2 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$. The control conditioning medium without the metallic samples was used as a blank control.

After conditioning, media were collected, centrifuged and used for the determination of metal ion release by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES). Triplicate absorbance readings per element were recorded for each sample.

Preparation of cell cultures

MoDCs were generated from PB-MNCs, as described previously (Colic *et al.*, 2003). Briefly, PB-MNCs were obtained from the buffy coats of healthy volunteers upon obtaining a signed informed consent. The cells were isolated by density-gradient centrifugation (Lymphoprep, PAA) and then resuspended in culture medium to allow their adherence to 6-well plates at 37 $^\circ\text{C}$. After that, the non-adherent cells were removed and the adherent cells, predominantly monocytes, were cultivated in 2 mL of DC differentiation medium for 5 days. The culture medium for the generation of human MoDCs consisted of the complete RPMI medium supplemented with 100 ng/mL of the human recombinant granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF, Leucomax, Basel, Switzerland) and 20 ng/mL of the human recombinant IL-4 (Roche Diagnostics,

Mannheim, Germany). On day 5, immature MoDCs were transferred to 24 well-plates (1 x 10⁵ cells/well/mL of medium) which already contained pre-sterilised Ni-Ti RS ribbons or control Ni-Ti plates at the size/volume ratio as indicated above. Control cultures included the cultivation of MoDCs on plastic, polystyrene cover slips 8 mm in diameter. MoDCs were then cultivated for 2 or 5 days in an incubator with 5 % CO₂. In the MoDC maturation experiments LPS (Sigma), at a concentration of 0.5 µg/mL, was added to the control and Ni-Ti RS ribbons-containing MoDC cultures, following the cultivation of the cells for 2 days.

Cytotoxicity study

After the two-day or five-day cultures, the viability of MoDCs was determined with a 1 % solution of Trypan blue. Non-viable cells, stained with Trypan blue, were determined by light microscopy and the percentage of viable cells was determined from the total cell count. The comparable results were obtained additionally by staining the cells with propidium iodide (PI) (10 µg/mL; Sigma). The percentage of stained, necrotic cells was determined by using a flow cytometer (EPICS XL-MCL; Coulter, Krefeld, Germany). Apoptosis was determined by staining the cells with PI (10 µg/mL dissolved in a permeabilisation buffer – hypotonic citric acid + Triton X-100 buffer), as described above. After 6 h incubation at room temperature in the dark, the cells were analysed and those with hypodiploid nuclei (sub-G₀) were considered apoptotic cells. The experiments were repeated four times and each was carried out in sixplicates. To confirm the results obtained from PI staining, the cells were labelled additionally with Annexin-V-Fitc/PI according to the manufacturer's instructions for the kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The test enabled identification of early apoptotic (Annexin-V-FITC⁺ / PI⁻) cells, late apoptotic/secondary necrotic (Annexin-V-FITC⁺ / PI⁺) cells, and primary necrotic (Annexin-V-FITC⁻ / PI⁺) cells. The experiment was carried out once in sixplicates.

Scanning electron microscopy analysis of MoDCs

After the culture the medium was removed and the samples of immature or LPS-matured MoDCs cultivated on plastic cover slips, Ni-Ti RS ribbons or control Ni-Ti plates were fixed overnight at +4 °C in a 2 % glutaraldehyde/Millonig buffer. The samples were then washed 3 times in Millonig buffer, for 10 min each time, and post-fixed in 1 % osmium-tetroxide in distilled water for 1 h. All these chemicals were obtained from Sigma. The samples were then washed three times in water and dehydrated in an increasing series of ethanol (30 % - 100 %) solutions, for 5 min each time. After that, the samples were critical point dried and placed on carbon adhesive tape on aluminium sample holders. Gold sputtering was performed (JFS-1100E) at 10 mA for 4 min and the samples were analysed on an SEM JSM5300 (Jeol, Tokyo, Japan) at 10-30 kV primary beam.

Flow cytometry

After two days of cultivation of MoDCs with Ni-Ti RS ribbons, the expression of key surface markers of immature and LPS-treated MoDCs was evaluated by flow cytometry. The following monoclonal antibodies (mAbs) were used:

CD86-phycoerythrin (PE), anti-HLA-DR-PE, mouse IgG1a negative control – fluorescein isocyanate (FITC) and mouse IgG1a negative control – PE (all from Serotec, Oxford, UK); anti-CD40-FITC and anti-CD83-FITC (Imunotools, Friesoythe, Germany). The cells were collected and washed once in a phosphate buffer solution (PBS) containing 2 % FCS and 0.1 % sodium azide. The cells were then incubated with primary mAbs labelled directly for 1 h at 4 °C, using the concentrations recommended by the manufacturer. The cells were then washed by centrifugation and analysed by flow cytometry. The cells were gated according to the cell-specific forward scatter/ side scatter (FS/SS) parameters. Before each analysis, signal compensation was performed for each pair of mAbs used in double-staining procedures, and the specific fluorescence was determined based on the single labelled controls.

Allogenic mixed leukocyte reaction

To assess the allostimulatory capacity of MoDCs cultivated with Ni-Ti RS ribbons, the cells were detached from the ribbons or control coverslips by pipetting. After that, MoDCs were washed in complete culture medium and used in the allogenic mixed leukocyte reactions (MLRs). CD4⁺ T cells, used as responders, were purified from PB-MNCs using a CD4⁺ T cell isolation kit (MACS technology, Miltenyl Biotech, Cologne, Germany), following the manufacturer's instructions. The purity of CD4⁺ T cells recovered in the negative fraction was usually higher than 95 %, as evaluated by anti-CD4 FITC (Serotec) staining and flow cytometry. The purified CD4⁺ T cells (1x10⁵ cells/well) were co-cultured in direct contact with immature or LPS-treated MoDCs (1x10⁴, 0.5x10⁴ or 0.25x10⁴ cells/well) in 96-well plates giving different MoDC/CD4⁺ T cell ratios (1:10, 1:20 and 1:40, respectively) in complete RPMI medium. Additional controls were CD4⁺ T cells or MoDCs, cultivated alone. After 5 days of MLR, the cells were pulsed with [³H]-thymidine for the last 18 h (1 µCi/well, Amersham, Bucks, UK) in order to assess their incorporation into DNA. The labelled cells were harvested onto glass fibre filters and the radioactivity was counted in a Beckman scintillation counter and expressed as counts per minute (cpm) ±SD of sixplicates.

To determine the T helper (Th) cytokine profiles, CD4⁺ cells were cultivated as in the proliferation assay. After the MLR, PMA 20 ng/mL (Sigma) and ionomycin 500 ng/mL (Merck, Vienna, Austria) were added to the co-cultures for the last 18 h to enhance the release of cytokines, after which supernatants were collected and frozen at -40 °C until the analysis. The levels of cytokines were determined in those co-cultures where the MoDC/CD4⁺ T cell ratio was 1:40. Additional controls were those as described above.

Detection of cytokines

The levels of IL-10, IL-12, IL-23 and IL-27 were determined in cell-free supernatants of MoDCs cultures using sandwich ELISA kits (R&D Systems), following the manufacturer's instructions. Levels of IL-1β, Interferon (IFN)-γ, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α and TNF-β were determined in CD4⁺ T /MoDCs co-culture supernatants using multiplex immunobead assay and flow cytometry (Flow Cytomix Human Th1/Th2 11plex Kit, Bender

MedSystems, Vienna, Austria). The levels of IL-17 and transforming growth factor (TGF)- β in these co-culture supernatants were determined by sandwich ELISA kits (R&D Systems).

Statistical analysis

The results are presented as the mean \pm standard deviation (SD) of four independent experiments, if not indicated otherwise. The Wilcoxon matched pairs test (non-parametric test) was used to evaluate the differences between the experimental (Ni-Ti RS ribbons) and corresponding control samples (Control). In cytotoxicity experiments, the three experimental groups (Control, Ni-Ti RS ribbons and Ni-Ti plates) were compared using the Kruskal-Wallis test with Dunnett post-test. Statistical analysis of the differences obtained in the proliferation assays were performed using one-way ANOVA with a Dunnett post-test, because the data within each experiment followed the Gaussian distribution according to the Kolmogorov-Smirnov test (with Dallal-Wilkinson-Lillefor P value). Values at $p < 0.05$ or less were considered significant statistically. All statistical analysis was performed in GraphPad (La Jolla, CA, USA) Prism 5 software.

Results

Cytotoxicity of Ni-Ti RS ribbons and control bulk Ni-Ti plates on MoDCs

In our previous paper we evaluated the cytotoxicity and immunomodulatory properties of Ni-Ti RS ribbons using human PB-MNCs. The effects of Ni-Ti RS ribbons were studied in comparison with control Ni-Ti plates which were shown to be highly cytotoxic for PB-MNCs (Rudolf *et al.*, 2010). To investigate further the mechanisms of the immunomodulatory properties of Ni-Ti RS ribbons, we first tested whether MoDCs respond to the Ni-Ti materials in a similar manner. As shown in Fig. 2, the number of MoDCs, their viability and the percentages of apoptotic and necrotic cells in cultures with Ni-Ti RS ribbons, at both 2 day and 5 day cultures, was similar to that of control samples cultivated on plastic cover slips, confirming that Ni-Ti RS ribbons were not cytotoxic for MoDCs. In contrast, Ni-Ti control plates showed relatively high cytotoxicity, as judged by a significantly lower number of MoDCs after the cultures due to reduced viability of the cells by more than 60 % (2

days) and 85 % (5 days). Both types of cell death (necrosis and apoptosis) were involved in such an effect of control Ni-Ti plates. The proportion of Pi^+ (necrotic) cells and Pi^+ /Annexin- V^+ (late apoptotic, secondary necrotic) cells were higher than Annexin- V^+ (early apoptotic) cells, especially after 5 days of cultivation.

To check how these effects of Ni-Ti alloys correlated with their corrosion behaviour, ICP-AES analysis was performed to determine the amount of released Ni and Ti ions after conditioning of the samples in cell-free culture medium for 48 h (Table 1). As positive controls we also used pure Ni or Ti plates with corresponding surface per volume size. As expected, Ti ions have not been released significantly into the culture medium from a single tested sample. On the other hand, a significant release of Ni ions (118.93 mg/L) was detected in the conditioning medium of control Ni-Ti plates. The release of Ni ions was more than 50 % lower than the release from the pure Ni plates (281.92 mg/L). In contrast, the concentrations of Ni ions in the conditioning medium of Ni-Ti RS ribbons was very close (0.02 mg/L) to the amount of Ni ions in the cell-free culture medium (0.01 mg/L). The corrosion properties of Ni-Ti samples were not modulated significantly in the presence of MoDCs (data not shown).

SEM analysis of MoDCs cultivated on Ni-Ti samples

Morphological changes induced by the Ni-Ti samples were assessed by SEM analysis (Fig. 3). The surface characteristics of MoDCs were compared with those cultivated on control, plastic cover slips. The typical morphology of adherent immature MoDCs was found on plastic cover slips after 48 h, including spindle-shaped morphology and the presence of microvilli. However, MoDCs cultivated on the Ni-Ti RS ribbons expressed more microvilli and veils were more prominent, suggesting that such cells are activated after contact with Ni-Ti RS ribbons. To confirm this hypothesis, immature MoDCs were grown on coverslips and activated with LPS for 2 days. As shown in Fig. 3, LPS-activated MoDCs also showed more prominent veils and microvilli compared to the control MoDCs, but the processes were more elongated compared to MoDCs cultivated on Ni-Ti RS ribbons. In contrast, the cells cultivated on Ni-Ti control plates possessed the characteristics of dead cells, mostly necrotic with the rounded shape and net-like morphology of the membrane.

Table 1. Ni and Ti release from Ni-Ti samples after 2 days of conditioning in cell-free culture medium.

Sample	Ti (mg/L)	Ni (mg/L)
Control medium	0.02	0.01
Ni plates	<i>n. d.</i>	261.91
Ti plates	0.02	<i>n. d.</i>
Control NiTi plates	0.02	118.93
NiTi RS ribbons	0.02	0.02

n. d. - non-detectable. The results are presented as mean values (one experiment) calculated from triplicate absorbance readings per element.

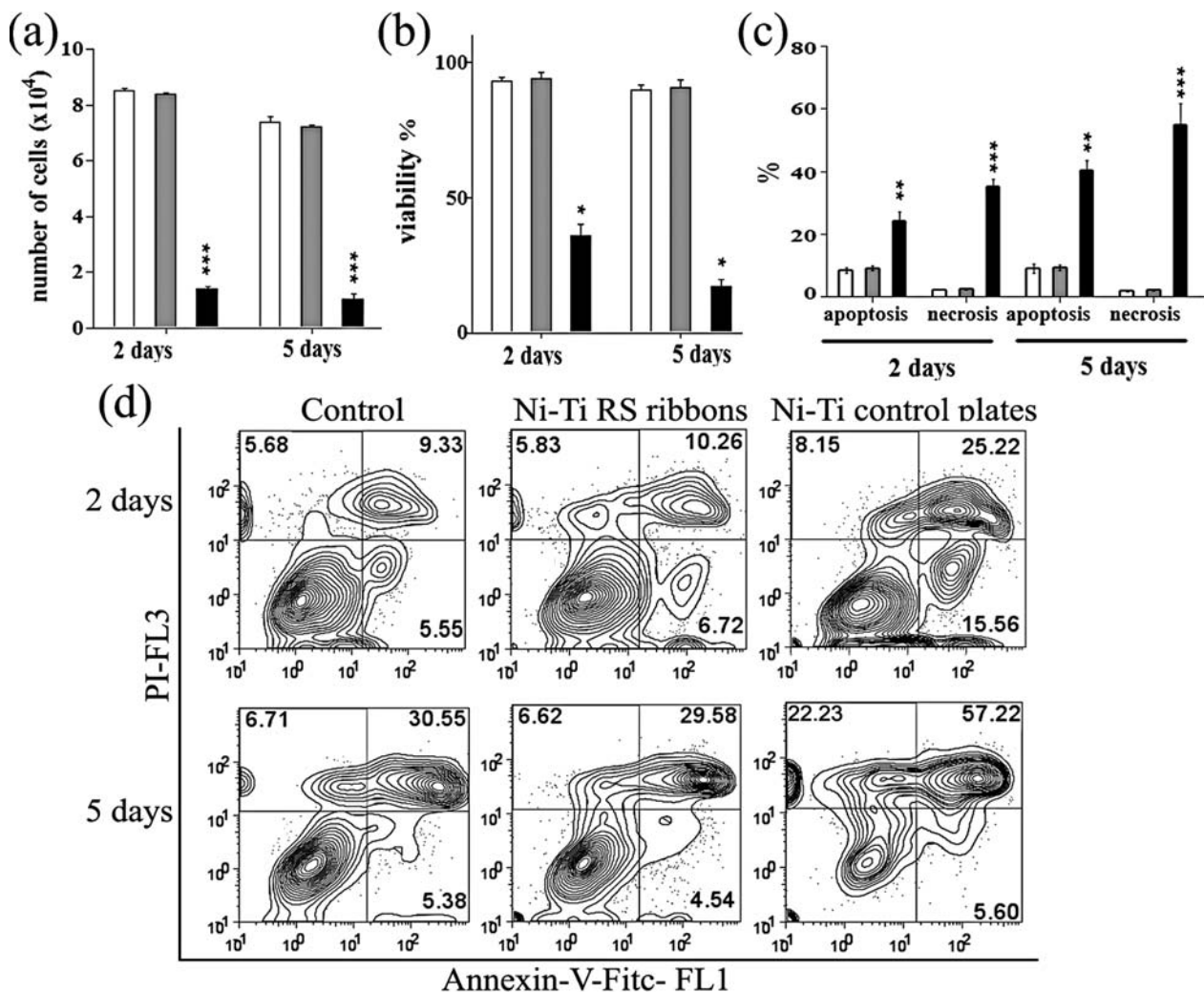


Fig. 2. The effect of Ni-Ti samples on the cytotoxicity of MoDCs after two or five days of exposure in cultures. (a) Number of cells; (b) Viability of cells; (c) Apoptosis and necrosis determined by PI staining; (d) Apoptosis and necrosis determined by Annexin-V-Fitc / PI double staining. White bars- control cells; Gray bars- MoDCs cultivated with Ni-Ti RS ribbons; Black bars-MoDCs cultivated with control Ni-Ti plates. The values represent mean \pm SD of four independent experiments, each carried out in sixplicates. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ compared to control cells (Kruskal-Wallis test).

Phenotypical changes of MoDCs induced by Ni-Ti RS ribbons

Activation of MoDCs observed by SEM at the Ni-Ti RS ribbons interface suggested that the cell-alloy interactions change the phenotypic properties of MoDCs. To confirm this hypothesis we analysed the expression of HLA-DR, CD86, CD83 and CD40. The results presented in Fig. 4 confirmed the immature phenotype of control MoDCs. The cultivation of MoDCs with Ni-Ti RS ribbons for 2 days showed up-regulation of all markers, indicating that Ni-Ti RS ribbons started to induce the maturation of MoDCs. Due to significant cytotoxicity, the MoDCs cultivated on control Ni-Ti plates were not used for the later experiments.

Functional properties of MoDCs cultivated with Ni-Ti RS ribbons

Functional capabilities of MoDCs were assessed on the basis of their cytokine production, allostimulatory and Th polarisation properties. In supernatants of MoDCs cultures

the levels of IL-10, IL-12, IL-23 and IL-27 were measured (Fig. 5a). We showed that Ni-Ti RS ribbons stimulated the production of IL-10 and IL-27 compared to control cultures without the ribbons. On the other hand, the production of IL-12 and IL-23 were not modified significantly.

The functional effects of MoDCs, previously cultivated for 2 days alone or in the presence of Ni-Ti RS ribbons, were tested in allogenic MLR using purified CD4⁺ T cells as responders. As shown in Fig. 5b, MoDCs cultivated with Ni-Ti RS ribbons had similar allostimulatory capacity as the control cells cultivated alone, in spite of the modified phenotype and changes in cytokine expression (see also Fig. 8).

However, when the levels of cytokines in supernatants of MoDC/CD4 co-cultures were analysed, different results were obtained (Fig. 5c). The level of TGF- β , IL-10 and IL-6 was significantly higher while the level of IL-8 and IL-17 was significantly lower in co-cultures with MoDCs experienced by Ni-Ti ribbons in comparison with co-cultures

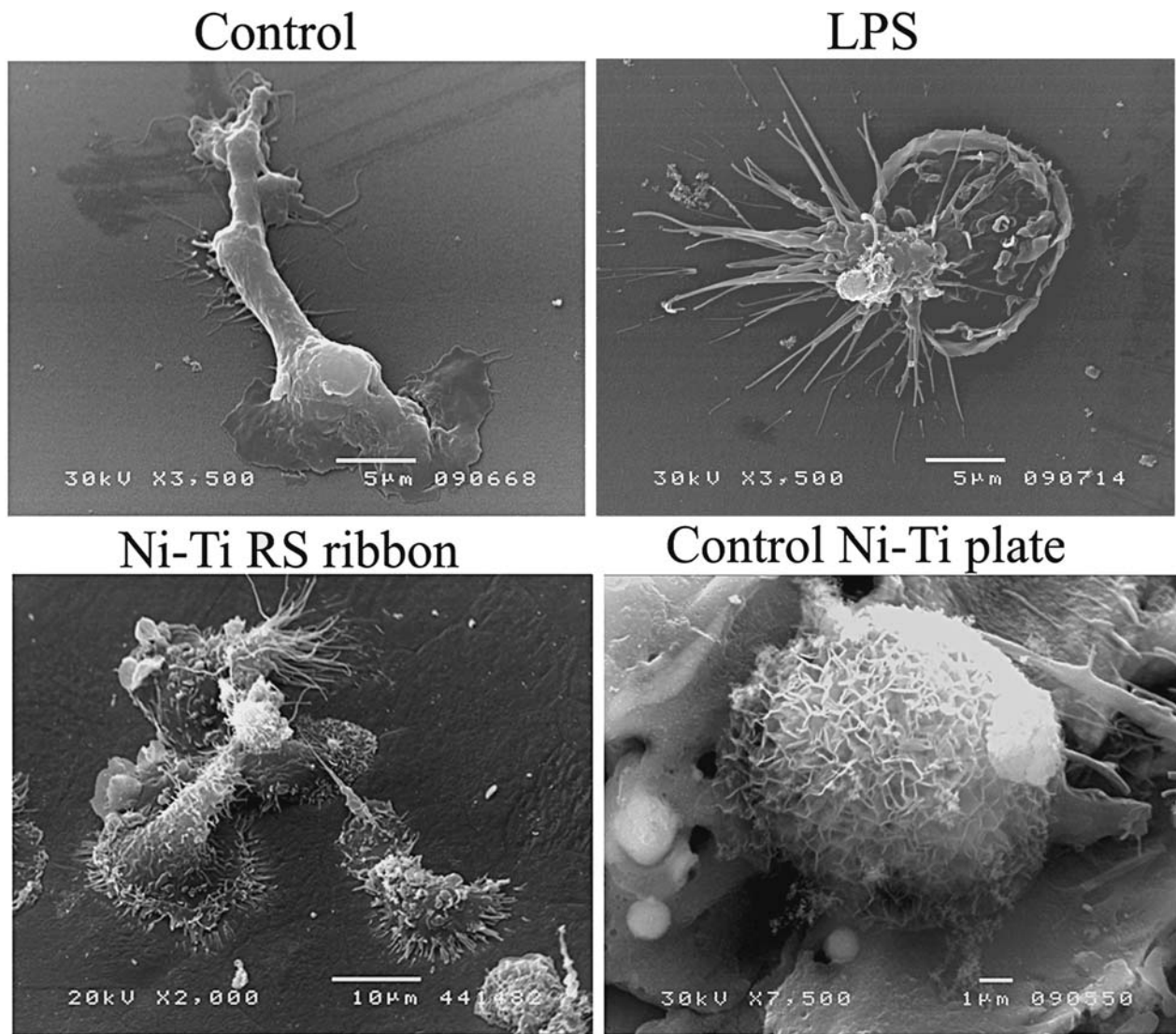


Fig. 3. SEM analysis of immature MoDCs cultivated for two days on polystyrene coverslips (Control), polystyrene coverslips in presence of LPS (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or Ni-Ti samples. The parameters of the analysis are indicated.

of CD4⁺ T cells with control MoDCs. Other cytokines analysed (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , TNF- β , and IL-4) were not modified significantly.

Phenotypal and functional changes of LPS-treated MoDCs induced by Ni-Ti RS ribbons

The immunostimulatory effect of MoDCs can be achieved upon their maturation. To investigate how Ni-Ti RS ribbons modulate the immunogenic properties of MoDCs we used LPS as a DCs maturation stimulus. At first, the expression of HLA-DR, CD86, CD83 and CD40 molecules were tracked after two days of cultivating MoDCs in the presence of LPS or a combination of LPS and Ni-Ti RS ribbons (Fig. 6). As expected, LPS led to phenotypic maturation of MoDCs, as judged by the strong up-regulation of all tested markers. We found that Ni-Ti RS ribbons lowered slightly the expression of HLA-DR, but increased the expression of CD40 and CD86 co-stimulatory molecules on MoDCs compared to LPS-treated, control MoDCs.

By analysing cell-free culture supernatants we found, unexpectedly, that Ni-Ti RS ribbons enhanced the production of IL-12 by MoDCs in the presence of LPS. Simultaneously,

the ribbons lowered the production of IL-23 (Fig. 7a). Additionally, we found a higher proliferation rate of allogenic CD4⁺ T cells in co-culture with Ni-Ti ribbons-treated MoDCs at 1:40 MoDC/CD4⁺T cell ratio, compared to LPS-treated control MoDCs (Fig. 7b, Fig. 8).

The analysis of cytokines from co-culture supernatants revealed the most intriguing results (Fig. 7c). MoDCs cultivated in the presence of a combination of LPS and Ni-Ti RS ribbons possessed a pronounced Th1 polarising capacity compared to LPS-treated control MoDCs, as judged by the higher production of IFN- γ , IL-6 and IL-8. In contrast, the levels of IL-17 and IL-10 were significantly lower. The levels of IL-4 were also lower in the co-cultures, but the differences were not statistically significant.

Surface microstructure and depth profiles of Ni-Ti RS ribbons

The changes of MoDCs morphology, phenotype and function occurring at the contact with Ni-Ti RS ribbons motivated us to analyse the surface microstructure and depth profiles of Ni-Ti RS ribbons before and after cultivation of the ribbons in cell-culture medium in order

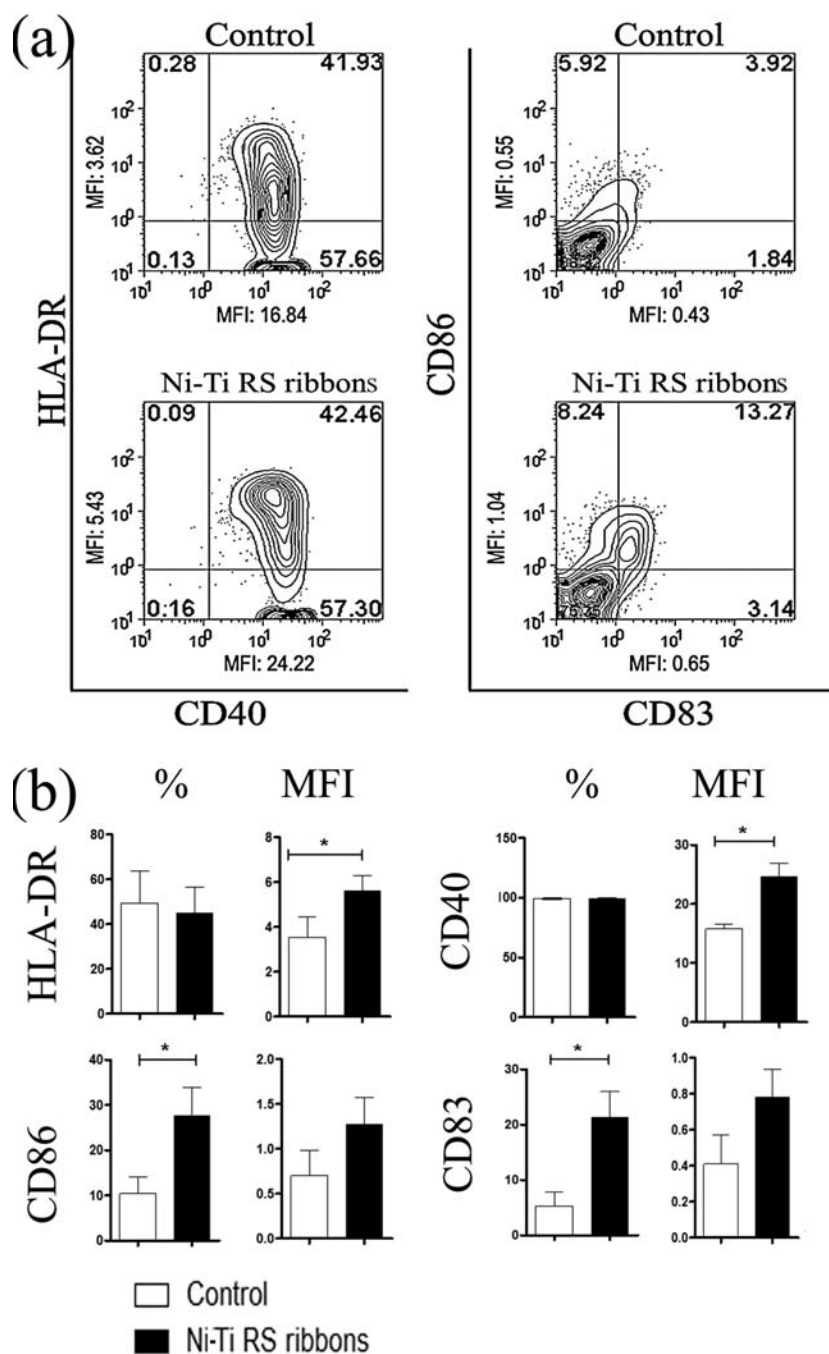


Fig. 4. Phenotypical analysis of immature MoDCs cultivated on Ni-Ti RS ribbons for two days. **(a)** Contour plots are presented, showing the percentage of positive cells and the Mean Fluorescence Intensities (MFI) for the indicated surface molecules. The data obtained from one representative experiment is shown. **(b)** The data is presented as mean \pm SD of four independent experiments. * $p < 0.05$ corresponding to control samples (Wilcoxon matched pairs test).

to understand better the possible mechanisms involved in the processes.

Therefore, the aim of this study was to investigate thoroughly the surface of Ni-Ti RS ribbons by using SEM, Auger spectroscopy and XPS analysis. Fig. 9a shows the SEM micrograph of the Ni-Ti RS ribbons surface. The micrograph depicts a relatively smooth surface of the ribbons usually found in most places analysed, although some irregularly appearing embossments could be observed in some places as well. XPS survey spectra

analysis on the Ni-Ti RS ribbons' surface was performed after 5 min of sputtering with Ar⁺ ions at 3 keV to remove surface contaminations. The spectra revealed the presence of Ni, Ti, O and C as dominant elements (Fig. 9b). We found that the surface of Ni-Ti RS ribbons is covered by a continuously dense Ti-oxide film, while C and O were still present on the surface, probably as contaminations. Ni and Ti were also found in an intermetallic state at the concentration of 3.2 at% and 1.6 at%, respectively.

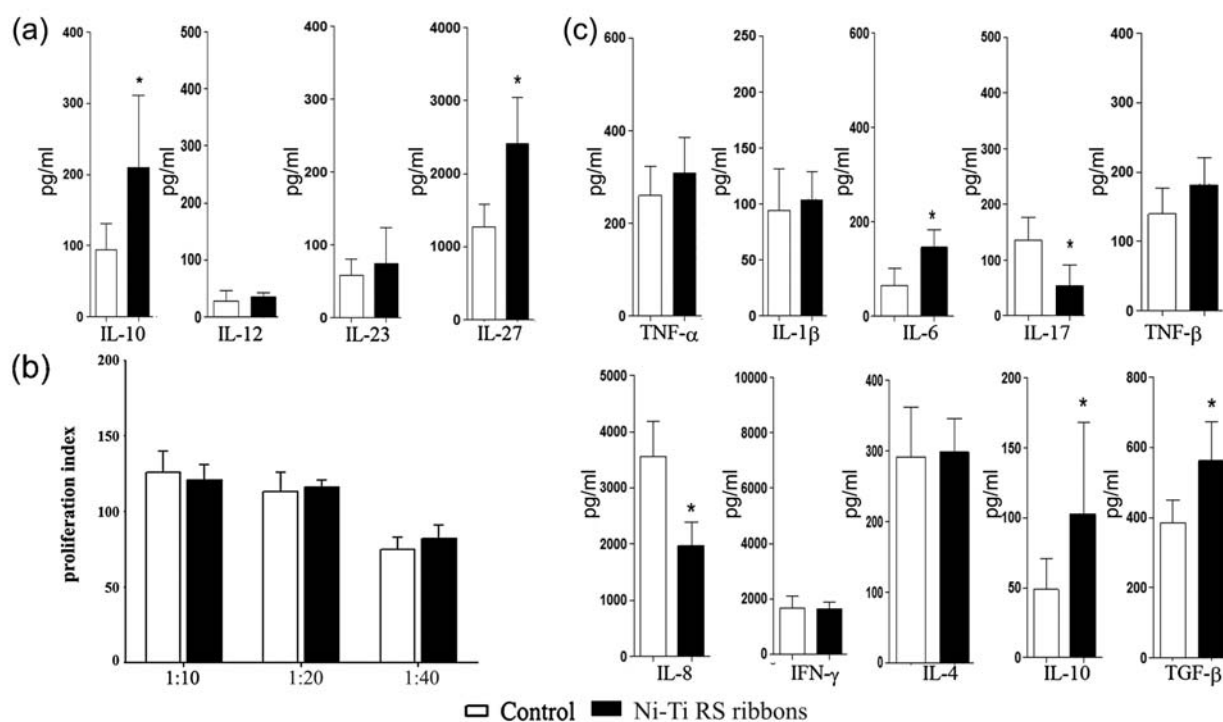


Fig. 5. Functional responses of immature MoDCs to Ni-Ti RS ribbons. MoDCs were cultivated in the absence (Control) or in the presence of Ni-Ti RS ribbons for two days. After that, the supernatants were collected and the cells were co-cultured with allogenic CD4⁺T cells using different cell-to-cell ratios, as indicated. After 5 days, the proliferation of cells and the cytokine production were assessed in the co-cultures. (a) Levels of cytokine in MoDC cultures. (b) Proliferation of allogenic CD4⁺ T cell in co-culture. (c) Levels of cytokines in the co-culture supernatants. The data shown in (a) and (c) represents mean \pm SD of four independent experiments, each carried out in duplicates. * $p < 0.05$ compared to control (Wilcoxon matched pairs test). (b) The data represent mean index of proliferation \pm SD of six replicates from one independent experiment out of three with similar results (One-way ANOVA). The other two experiments are provided in Fig. 8.

High resolution XPS spectra analysis was taken to investigate the Ti and Ni binding energies. The Ti 2p XPS spectrum (Fig. 9c) looked complex and was fitted best with three curves. Two of the fitting curves possess peaks with binding energies at 458.7 ± 0.4 eV and 463.9 ± 0.5 eV corresponding to Ti⁴⁺ (TiO₂) 2p_{3/2} and Ti⁴⁺ (TiO₂) 2p_{1/2}, respectively. The third fitted curve, with a peak at 454.7 ± 0.4 eV, corresponds to Ti in an intermetallic state (Ti^{Ni-Ti}) 2p_{1/2}. High resolution XPS spectra of Ni 2p (Fig. 9d) showed two peaks with binding energies at 853.8 ± 0.3 eV and 870.5 ± 0.4 eV associated with Ni^{Ni-Ti} 2p_{3/2} and 2p_{1/2} in the intermetallic state. It should be pointed out that no Ni-oxide peak (~ 857 eV) could be detected on Ni-Ti RS ribbons in our experiments. A small satellite structure, separated from the main peaks by about 7 eV was also present. A similar structure was detected on XPS spectra of Ni-Ti alloys (Chu *et al.*, 2009).

AES depth profiles were performed to determine the thickness of the surface oxide layer on Ni-Ti RS ribbons. No Ar⁺ sputtering was performed prior to analysis of the non-conditioned sample, so the concentration of Ni on the surface of the ribbons was much lower and concentration of O much higher compared to those obtained by XPS analysis (Fig. 10a). The oxygen depth profile shows a peak close to the top surface, whereas Ni and Ti profiles show

minimal concentrations. Afterwards, the concentration of O decreased and Ni and Ti concentrations increased to a steady state value after 30 min of sputtering (Fig. 10b). If the oxide thickness is estimated by taking the depth where the O signal drops to 50 % of the maximum value, the thickness of the Ti-oxide film on Ni-Ti RS ribbons was around 12 nm. In addition, AES spot analysis showed no significant differences in the chemical compositions between the embossments and the smooth surface layer, suggesting that a relatively uniform layer is placed on top of the Ni-Ti RS ribbons (Fig. 10a).

After 2 days of conditioning the Ni-Ti RS ribbons in the complete culture medium the AES depth analysis was repeated and we found very interesting results. The surface concentrations of O, Ti and Ni were much lower, and the concentration of C was much higher than before conditioning. Furthermore, many places analysed had no detectable level of Ni (Fig. 10c represents an example). However, the presence of new elements on the surface was detected, such as P, Cl and, intriguingly, Zn. Each of the detected elements returned to the basic level obtained before conditioning after 7.5 min of sputtering (Fig. 10d). The estimated thickness of the oxygen layer, calculating from the depth with the maximal O concentration, was around 15 nm.

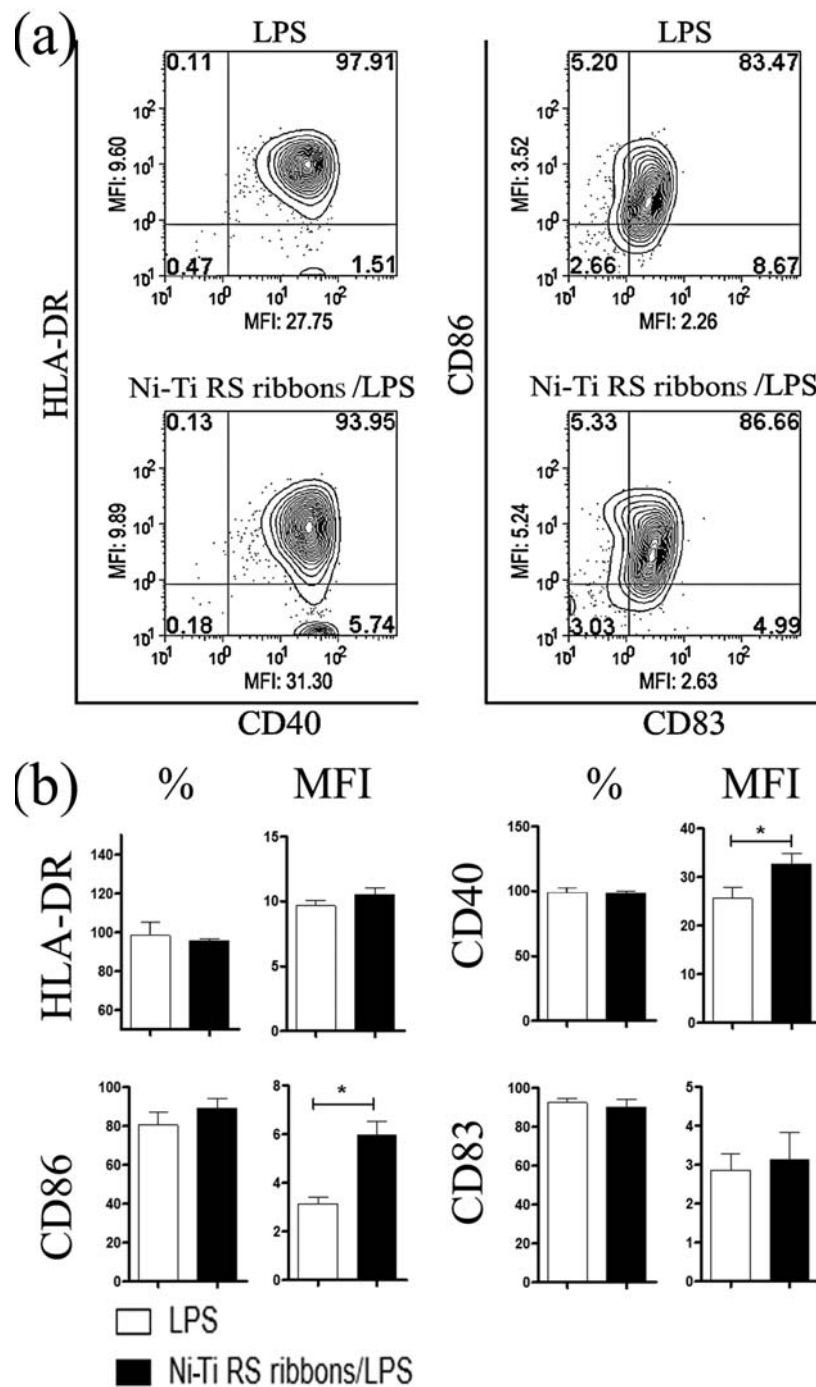


Fig. 6. Phenotypical analysis of MoDCs cultivated on Ni-Ti RS ribbons in the presence of LPS for two days. **(a)** Contour plots are presented, showing the percentage of positive cells and the Mean Fluorescence Intensities (MFI) for the indicated surface molecules. The data obtained from one representative experiment is shown. **(b)** The data are presented as mean \pm SD of four independent experiments. * $p < 0.05$ corresponding to control samples (Wilcoxon matched pairs test).

Discussion

Biocompatibility of Ni-Ti RS ribbons and their influence on the morphology and phenotype of MoDCs

We continued the biocompatibility assessment of Ni-Ti RS ribbons on MoDCs in cultures following the earlier paper on human PB-MNCs (Rudolf *et al.*, 2010). Up to now, the biological effects of Ni-Ti SMAs were studied on various

animal and human cells (Shabalovskaya, 2002; Es-Souni and Fischer-Brandies, 2005), but never on DCs. We confirmed that Ni-Ti RS ribbons were not cytotoxic for MoDCs, in contrast to highly cytotoxic control Ni-Ti plates, which induced both apoptosis and necrosis. A possible cause for such adverse effects of the plates could be released Ni ions in the MoDCs culture medium or free Ni on the surface of the plates. Ni can cause the formation of oxygen radicals, DNA damage and the inactivation of tumour

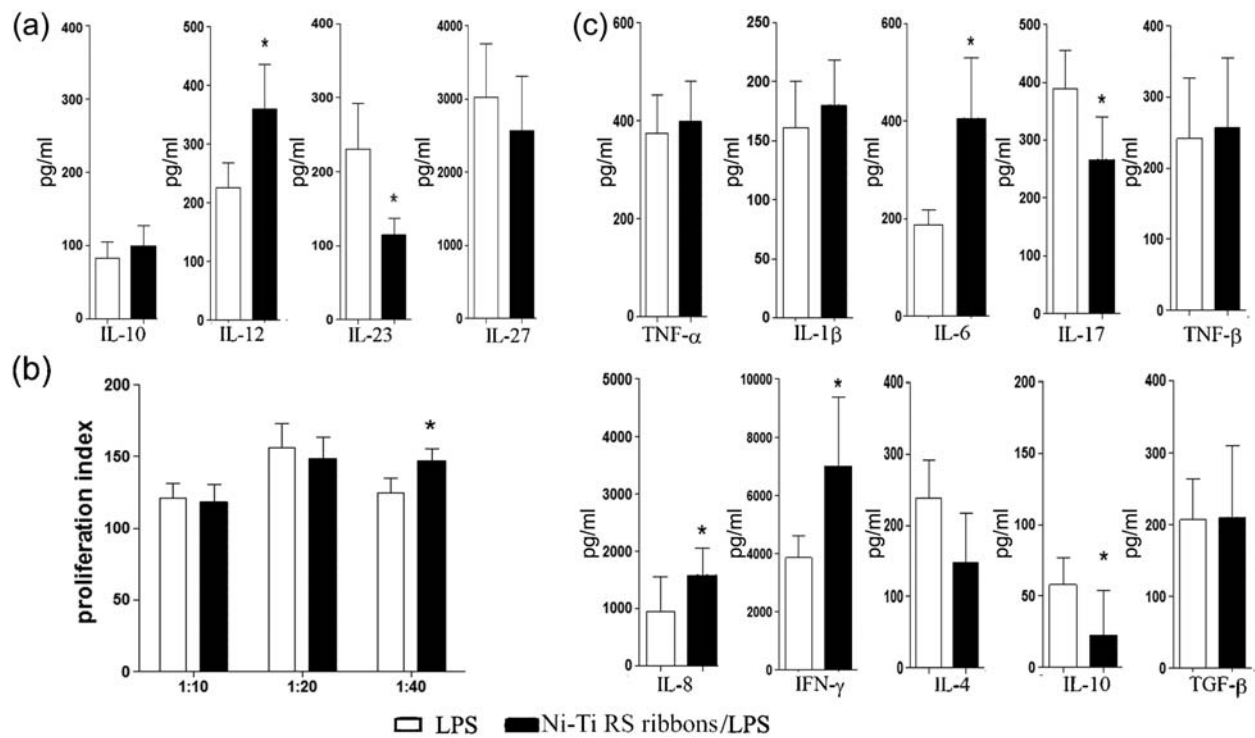


Fig. 8. Functional responses of MoDCs to Ni-Ti RS ribbons in the presence of LPS. MoDCs were cultivated in the absence (Control) or in the presence of Ni-Ti RS ribbons for two days. After that, the supernatants were collected and the cells were co-cultured with allogenic CD4⁺T cells using different cell-to-cell ratios, as indicated. After 5 days, the proliferation of cells and the cytokine production were assessed in the co-cultures. (a) Levels of cytokine in MoDC cultures. (b) Proliferation of allogenic CD4⁺ T cell in co-culture. (c) Levels of cytokines in the co-culture supernatants. The data shown in (a) and (c) represents mean \pm SD of four independent experiments, each carried out in duplicates. * $p < 0.05$ compared to control (Wilcoxon matched pairs test). (b) The data represent mean index of proliferation \pm SD of sixplices from one independent experiment out of three with similar results. * $p < 0.05$ compared to control (One-way ANOVA). The other two experiments are provided in Fig. 8.

suppressor genes (Klein *et al.*, 1991). Recent works utilising microarray analysis indicated that Ni ions can up-regulate a range of candidate genes controlling cell differentiation, death, cholesterol metabolism and apoptosis (Lu *et al.*, 2009). Apoptosis and necrosis are considered functionally and morphologically distinct forms of cell death, which is highly dependent on the energy metabolism of the cell. It was shown that cells triggered to undergo apoptosis will die by necrosis when the ATP level is low (Leist *et al.*, 1997). Based on these results it can be postulated that the released Ni ions from control Ni-Ti plates induced apoptosis as we demonstrated in this study; and by blocking the energy metabolism, causing the formation of oxygen radicals and DNA damage, induced necrosis as well. In line with this hypothesis, Lifeng *et al.* (Lifeng *et al.*, 2011) showed recently that bare Ni-Ti alloys, characterised by a high surface concentration of Ni, increased the expression of pro-apoptotic genes, and down-regulated genes controlling anti-apoptosis, protein biosynthesis, energy metabolism and DNA repair.

EDX analysis of Ni-Ti RS ribbons and control Ni-Ti plates revealed similar basic composition of the alloys. However, their surface microstructure was different and characterised by more pronounced intermetallic phases on control Ni-Ti plates. In addition, mechanical polishing

used for preparation of Ni-Ti plates is a well known factor which affects both the surface microstructure and biocompatibility of Ni-Ti alloys (Shabalovskaya *et al.*, 2008). Therefore, Ni could not be the only factor causing the cytotoxicity. It is possible that other factors introduced by mechanical polishing of Ni-Ti plates (Shabalovskaya *et al.*, 2008), in contrast to non-polished Ni-Ti RS ribbons, could contribute to such an adverse effect.

Morphological and phenotypical changes of MoDCs cultivated on Ni-Ti alloys

Even though Ni-Ti RS ribbons were non-cytotoxic, we found a changed morphology in MoDCs cultivated on the ribbons, suggesting that the ribbons are not completely inert for MoDCs. It is known that, during maturation, DCs undergo many programmed morphological and phenotypical changes, including the formation of veils and dendrites (Fisher *et al.*, 2008) involved in the establishment of appropriate DC-T cell interactions (Banchereau *et al.*, 2000). Therefore, the surface morphology of DCs cultivated on the ribbons, as revealed by SEM, resembled that of maturing DCs. These findings are in accordance with the up-regulated expression of key DC markers, such as HLA-DR, co-stimulatory molecules (CD86 and CD40) and CD83, the most important DC maturation marker. Since

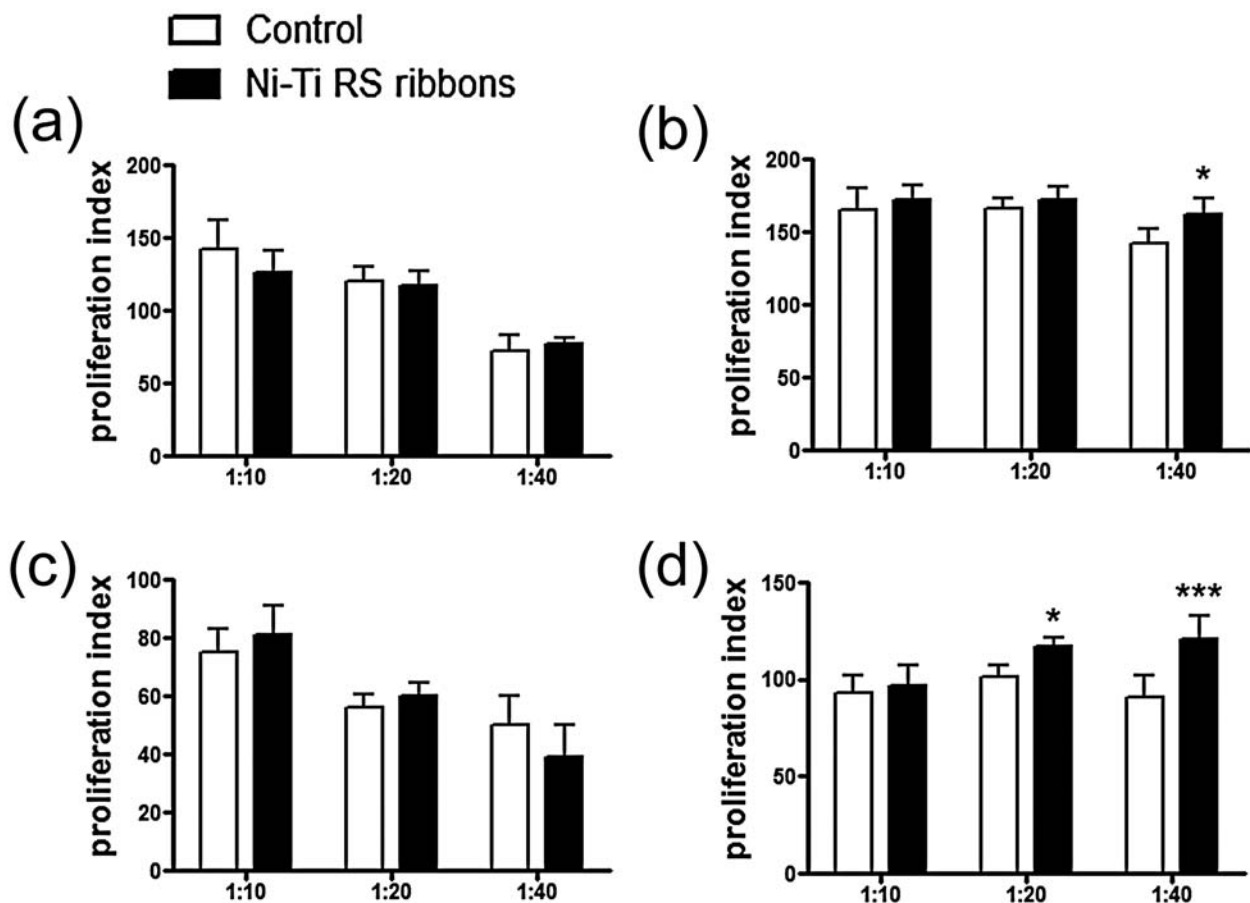


Fig. 6. Allostimulatory capacity of MoDC treated with Ni-Ti RS ribbons – additional data for the Figs. 5b and 7b. MoDCs were cultivated in the absence (Control) or in the presence of Ni-Ti RS ribbons for two days and then co-cultured with allogenic CD4⁺T cells at different cell-to-cell ratios, as described in Materials and Methods. The results of alloreactive CD4⁺ T cell proliferation from Experiment 2 (a and b) and Experiment 3 (c and d) are shown; (a) and (c): immature MoDCs as stimulators; (b) and (d) LPS-matured MoDCs as stimulators. The data are presented as the mean index of proliferation \pm SD of sixplicates. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ compared to control (one-way ANOVA).

we showed that their expression was significantly lower and dendrites were less elongated compared to mature MoDCs cultivated for 2 days with LSP, which is known to stimulate strong maturation of DCs, (Banchereau *et al.*, 2000), it can be postulated that Ni-Ti ribbons initiated a process of semi-maturation of MoDCs (Lutz and Schuler, 2002). It is not easy to explain the mechanisms of these changes to MoDCs. Modulation of cell morphology depends on the reorganisation of actin filaments (F-actin) and the process could be modulated by Ni ions. Gunaratnam and Grant (Gunaratnam and Grant, 2004) showed that only high concentrations of Ni can cause direct alteration in F-actin, leading to membrane blebbing, condensation of F-actin and death by necrosis. These findings are in accordance with our results regarding the morphology of MoDCs cultivated on control Ni-Ti plates. Accordingly, since Ni-Ti RS ribbons released an insignificant amount of Ni, the changes in the morphology of MoDCs are most probably not caused by the direct impact of Ni ions on the cytoskeleton, but as a consequence of programmed changes that occurred during maturation of the MoDCs.

Improvement of the tolerogenic properties of MoDCs by Ni-Ti RS ribbons

The most important functional capability of MoDCs cultivated on Ni-Ti RS ribbons was their potentiation of cytokine production with tolerogenic capability (IL-10 and TGF- β) by allogenic CD4⁺ T cells. The levels of these cytokines correlated with increased production of IL-10 and IL-27 by MoDCs cultivated with Ni-Ti RS ribbons. Most of the effects of IL-10 and IL-27 on the cytokine network might be explained in our culture model system (Fig. 11). IL-27 is involved in the initiation of the Th1 response, inhibition of IL-17 and up-regulation of IL-10 production from T cells subsets, both in humans and mice (Yoshimura *et al.*, 2006). On the other hand, IL-10 was shown to enhance the differentiation of IL-10-secreting T regulatory cells (Treg), thus providing a positive regulatory loop for its own induction, suppression of T cell proliferation and down-regulation of inflammation (Saraiva and O'Garra, 2010). Our results are in line with these observations showing that IL-10- and IL-27-producing MoDCs stimulated the production of IL-10 and TGF- β ,

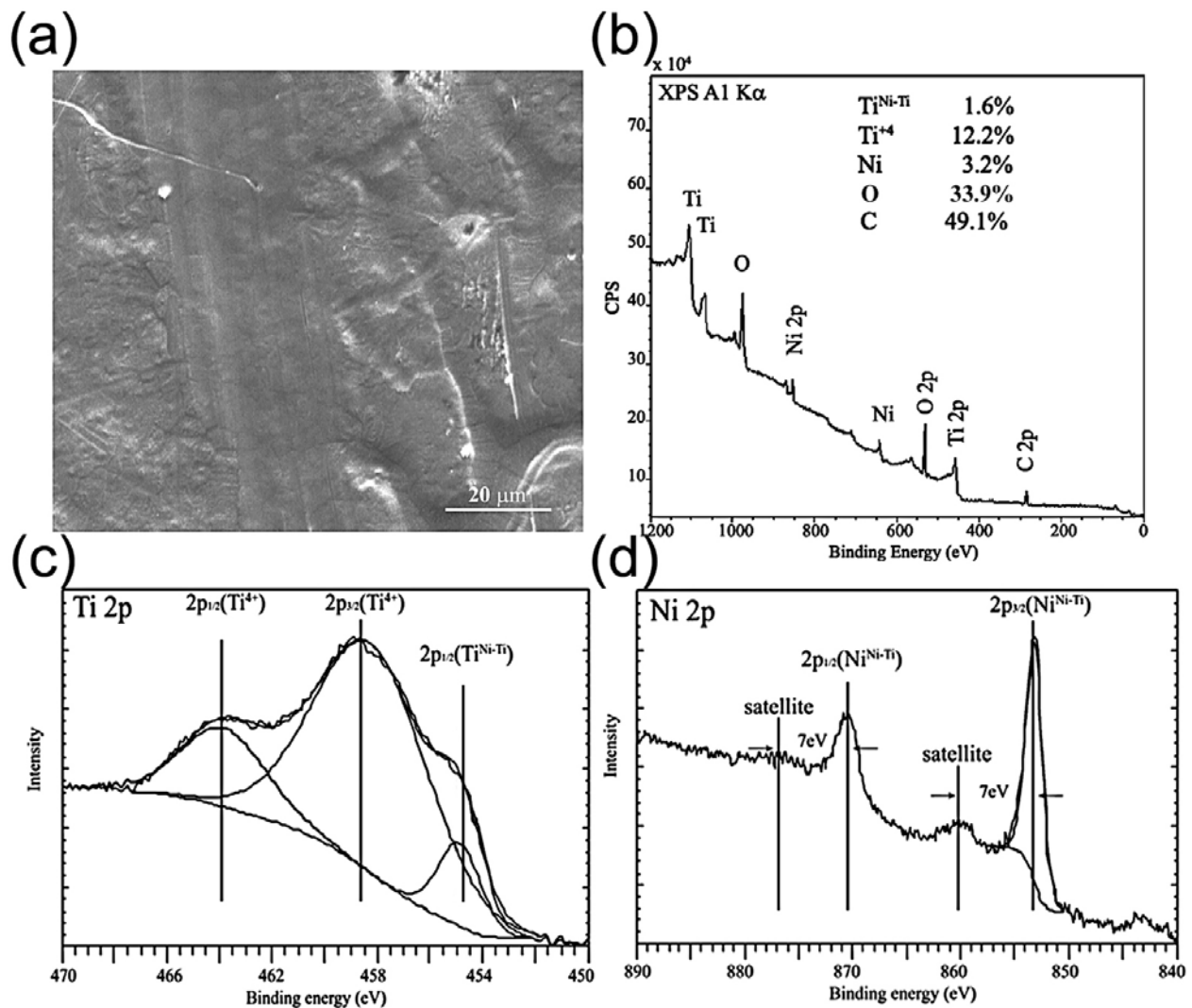


Fig. 9. Surface analysis of Ni-Ti RS ribbons. (a) The surface of Ni-Ti RS ribbons analysed by SEM. (b) XPS survey spectra. (c) High resolution XPS spectra of Ti2p and (d) Ni2p binding energies.

and inhibited strongly IL-17 and IL-8 production in MoDC/CD4⁺ T cells' co-cultures. Such a tolerogenic cytokine environment could be a major reason for the observed lack of allostimulation of CD4⁺ T cells, even though MHC class II and costimulatory molecules were up-regulated by Ni-Ti RS ribbons. These results indicate that MoDCs experienced by Ni-Ti RS ribbons induce a tolerogenic environment after the contact with CD4⁺ T cells.

However, we also found in co-cultures with MoDCs cultivated with Ni-Ti RS ribbons enhanced production of IL-6, a cytokine with both pro-inflammatory and anti-inflammatory properties (Kishimoto, 2010). The source of this cytokine in the cultures could be Th2 cells, DCs or both (Kishimoto, 2010). However, CD4⁺ T cells, particularly their Th2 subset was most probably the predominant source of IL-6. Other cytokines detected in the co-culture system could also originate from CD4⁺ T cells, because the number of MoDCs in the cultures was very low. Except for a very low level of IL-8 (up to 100 pg/mL), neither of the investigated cytokines were detected in the control supernatants with MoDCs cultivated alone (data not shown). The functional significance of this phenomenon

is not clear. However, since IL-6 was shown to have a crucial role in the wound healing process in a model of skin excisions on IL-6^{-/-} and wild type mice (Lin *et al.*, 2003), the potentially beneficial effects of this cytokine can be hypothesised upon implantation of Ni-Ti RS ribbons. The only paper describing the tolerogenic properties of SMAs, except for our previous one (Rudolf *et al.*, 2010), was the finding of Lifeng *et al.* (Lifeng *et al.*, 2011) who showed that biocompatible TiN-coated Ni-Ti SMAs, in contrast to bare Ni-Ti SMAs, can induce the expression of IL-10 anti-inflammatory pathways in HUVEC cells. However, except for the detected change in the expression of particular genes, no further immunological investigations were made to explain the possible implications of such findings. Bearing in mind that the immature MoDCs in this experiment possess tolerogenic capability, one of the key properties of Ni-Ti RS ribbons was the enhancement of this tolerogenicity. Such a finding could have significant clinical relevance in preserving and enhancement of tolerance to the implanted Ni-Ti SMA-based alloy and maintaining the peripheral tolerance to self antigens (Hu and Wan, 2011). However,

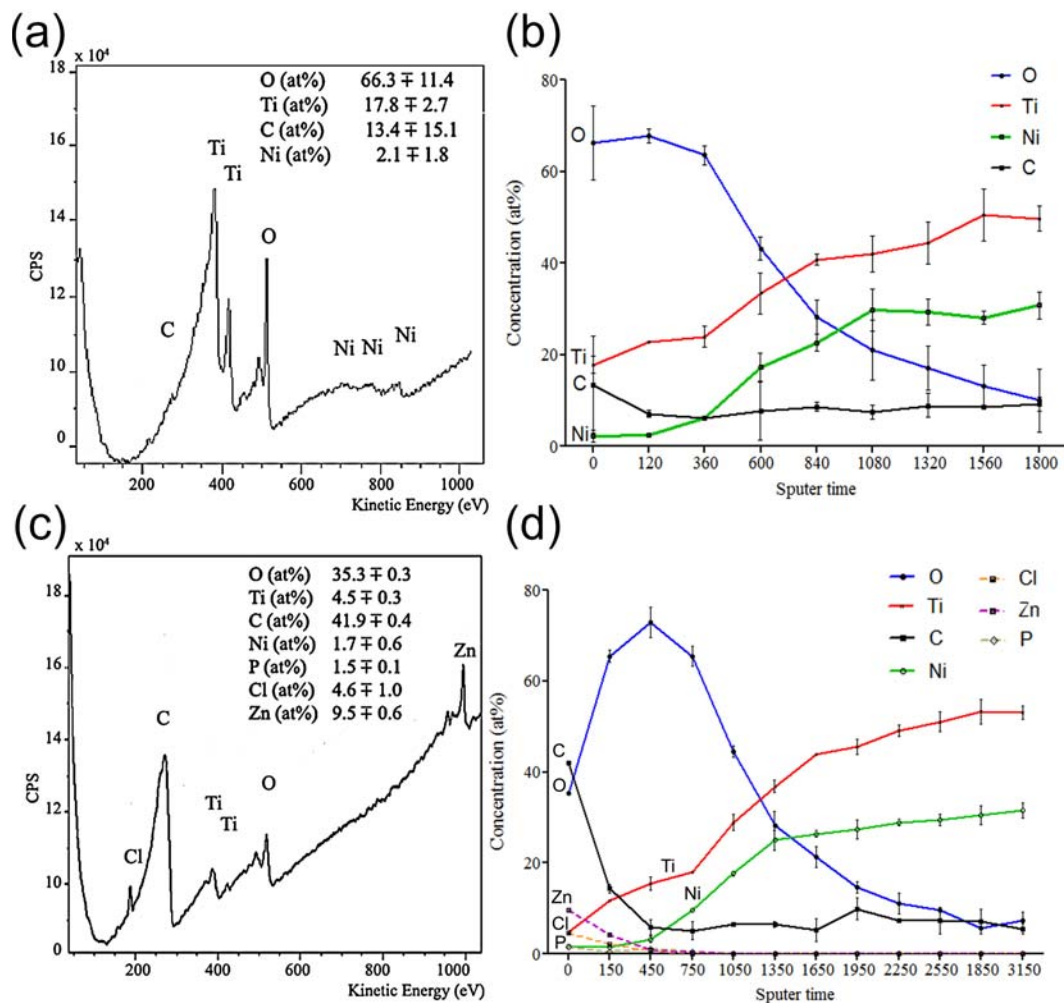


Fig. 10. Surface depth profile of Ni-Ti RS ribbons before and after conditioning in cell-free culture medium for 2 days. (a) A representative AES profile obtained before conditioning. (b) The corresponding AES depth profile showing compositional changes after each cycle of Ar⁺ ion sputtering. (c) A representative AES profile obtained after the conditioning. (d) The corresponding AES depth profile showing compositional changes after each cycle of Ar⁺ ion sputtering. Each value in depth profiles was made by averaging 3 places of AES analysis after each sputtering cycle.

more *in vivo* investigation of implanted Ni-Ti RS ribbons should be performed in order to confirm such an effect.

Modulation of MoDC functions by Ni-Ti RS ribbons under inflammatory conditions

Upon encountering dangerous signals, such as pathogens, DCs mature and migrate to regional lymph nodes, where they activate antigen-specific T cells leading to an appropriate immune response (Banchereau *et al.*, 2000). Therefore, our next goal was to investigate whether Ni-Ti RS ribbons possess similar tolerogenic effects in the presence of LPS, a pathogen-associated molecular pattern with known adjuvant properties (Banchereau *et al.*, 2000). To understand the possible modifications induced by the addition of Ni-Ti RS ribbons, we should rationalise the effects of LPS alone. LPS ligates TLR-4 on DCs, activating both Myeloid Differentiation protein 88 (MyD88)-dependent and TIR domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathways. The result is the activation of Nuclear Factor-kappa B (NF-

κB), Activating Protein 1 (AP1), Interferon Responsive Factor (IRF)-3 and IRF-5 transcription factors which lead to increased expression of MHC and co-stimulatory molecules, pro-inflammatory cytokines and interferon-responsive genes (Kawai and Akira, 2010). As expected, LPS induced the strong maturation of MoDCs in our experiments, as judged by the high up-regulation of HLA-DR, CD40, CD86 and CD83 molecules. Furthermore, LPS-treated MoDCs increased strongly the production of IL-12, IL-23 and IL-27, compared to the control immature MoDCs. Consequently, we observed a pro-inflammatory polarisation of CD4⁺ T cells in co-cultures, characterised by Th1 and Th17 cytokine responses (Cucak *et al.*, 2009; McAleer *et al.*, 2010), as concluded by the higher production of IL-1β, IL-6, IL-17, TNF-β and IFN-γ.

The most interesting finding was that LPS-treated MoDCs that were experienced additionally by Ni-Ti RS ribbons possessed more pronounced Th1 polarising capacity compared to the LPS-treated control. Namely, we found increased IL-12 production, down-regulated IL-23 and unchanged IL-27

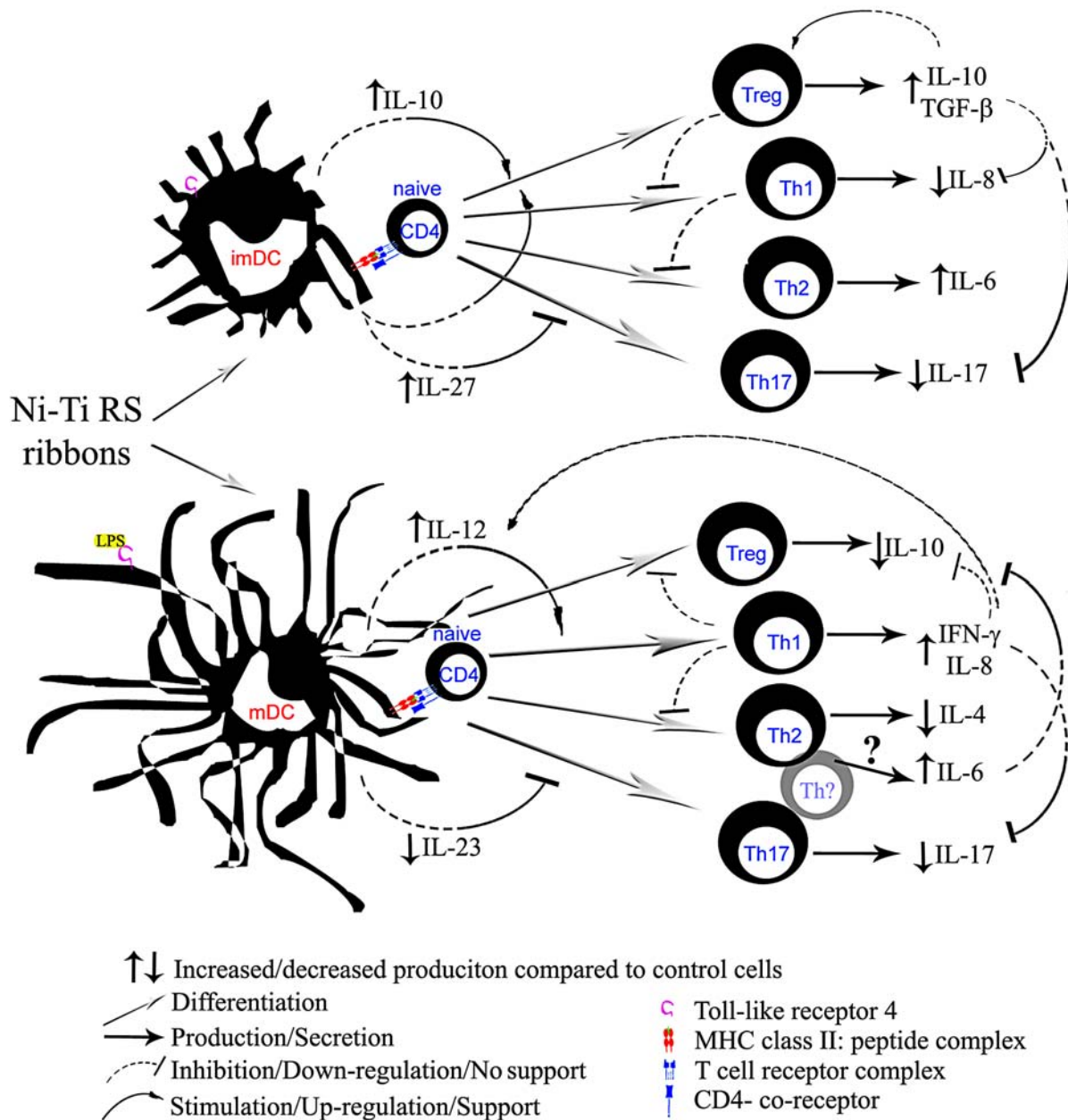


Fig. 11. Hypothetical interactions of cytokines in the co-culture of MoDCs treated with Ni-Ti RS ribbons and CD4⁺ T cells. Immature MoDCs (imDCs) activated by Ni-Ti RS ribbons increased the production of IL-10 and IL-27, which might have induced the differentiation of T regulatory cells (Treg) in co-culture with CD4⁺ T cells, which was followed by increased production of IL-10 and TGF-β. These cytokines promoted the development of additional Treg, thus increasing their own production. On the other hand, these cytokines are most probably involved in the suppression of pro-inflammatory cytokines' production, such as IL-8 and IL-17, and the development of a Th1 subset. Inhibition of a Th17 subset could also be a direct effect of IL-27 produced by the imDCs. The increased production of IL-6 might have been the consequence of the inhibited differentiation of Th1 by Treg, a state that is known to promote Th2 development. LPS acting on TLR4 induced the maturation of DCs. The increased production of IL-12 by LPS-matured DCs (mDCs) in the presence of Ni-Ti ribbons most probably promoted the differentiation of the IFN-γ-producing Th1 subset in the co-culture. IFN-γ is known to stimulate Th1 development further by a positive feedback loop, and to inhibit the differentiation of other Th subsets, including Th2, Th17 and Treg subsets. Furthermore, down-regulation of IL-23 production by MoDCs lowered the supporting effect of this cytokine on the Th17 differentiation and IL-17 production. What remains a mystery, however, is the production of IL-6 in those co-cultures. The increased production of IL-6 could either be regulated specifically by a Th2 subset, or its source could be some other Th subset that is not suppressed by IFN-γ.

production by these MoDCs. These cytokines belong to the IL-12 family, where IL-12 (p35/p40) was shown to stimulate IFN- γ production preferentially from T cells (Magram *et al.*, 1996), IL-23 (p19/p40) stimulates IL-17 (Aggarwal *et al.*, 2003), and IL-27 (p28/EBI3) stimulates IFN- γ and IL-10 production from T cells, while inhibiting IL-17 (Yoshimura *et al.*, 2006). In our study the increased IL-12 production correlated with IFN- γ production, whereas decreased production of IL-23 correlated with decreased production of IL-17 (Fig. 11). IL-23 has a significant role in the growth of Th17 cells and stabilisation of transcription factors (STAT3, ROR γ t, and ROR α) that are crucial for Th17 development. Th17 cells were shown to produce IL-17, IL-17F and IL-22, thereby inducing a massive tissue reaction owing to the broad distribution of the IL-17 and IL-22 receptors (Korn *et al.*, 2009). In line with this, down-regulation of IL-17 production mediated by both immature and LPS-matured MoDCs could represent an important anti-inflammatory mechanism that Ni-Ti RS ribbons could induce upon implantation. The IL-12/IFN- γ enriched environment most probably caused the lower production of Th2 and Treg cytokines (IL-4 and IL-10) in the co-cultures, since it was shown that IL-12 and IFN- γ through T-bet inhibit GATA-3-dependent differentiation and proliferation of Th2 cells (Kaiko *et al.*, 2008). Additionally, IFN- γ is shown to inhibit Extracellular Receptor Kinase (ERK)- and p38- dependent IL-10 production by macrophages and DCs, as well as TLR-induced IL-10 production, by antagonising the phosphatidylinositol-3-kinase - protein kinase B (PI3K-AKT) pathway (Hu *et al.*, 2006). Since the levels of IL-27 were not changed significantly, it can be postulated that its effect on Th1/Th17 polarisation was lesser, compared to IL-12 and IL-23. The increased allostimulatory capacity of MoDCs observed at 1:40 MoDC/CD4⁺ T cell ratio could be a consequence of the more pronounced Th1 cytokine environment which led to down-regulation of anti-proliferative cytokines, such as IL-10, as well as to increased expression of co-stimulatory molecules. As mentioned earlier, the increased IL-6 production, which was also detected in the co-cultures of MoDCs treated with Ni-Ti RS ribbons in the presence of LPS, could have beneficial clinical effects in the wound healing process and angiogenesis (Kishimoto, 2010). However, under inflammatory conditions DCs in the close contacts with Ni-Ti implants can be activated additionally, leading to the development of unwanted immune or autoimmune responses. Therefore, these effects should be investigated in more detail in further experiments.

Surface microstructure of Ni-Ti RS ribbons

In our previous papers (Kneissl *et al.*, 2006; Mehrabi *et al.*, 2009) we described the process of Rapid Solidification by melt spinning and its influence on the microstructure and improvement of the shape memory properties of Ni-Ti SMAs. Since the surface of an alloy is the predominant factor determining the outcome of any material-to-cell interaction (Shabalovskaya, 2002), in this work we investigated for the first time the surface of Ni-Ti RS ribbons aiming to understand its biological effects. We showed that the surface of Ni-Ti RS ribbons was relatively smooth with embossments appearing irregularly. Since AES spectroscopy showed no difference in chemical composition between the embossments and flat surfaces,

the embossments possibly lay beneath the surface layer and they most probably originate from the metastable solidification process of the melt spinning technique (Anzel *et al.*, 2009; Unterweger *et al.*, 2005).

We showed that the surface of Ni-Ti RS ribbons is covered by a thin, dense Ti-oxide film, composed predominantly of TiO₂ phase. However, the small amount of Ni and Ti in the intermetallic state present on their surface could affect the corrosion stability of the ribbons with the time. Therefore, possible additional coating procedures such as (Ti, O, N)/Ti (Sun *et al.*, 2011) or TiN (Lifeng *et al.*, 2011) coating, or oxidising procedures such as H₂O₂-oxidation (Sun and Wang, 2010) or anodisation (Chu *et al.*, 2009), as already applied for Ni-Ti alloys, should be considered. The presence of C on the surface of Ni-Ti RS ribbons may be attributed to the surface contamination by carbon containing molecules absorbed from the environment (Chu *et al.*, 2009). Knowing that Ni-oxide could be substituted easily with Cl⁻ ions from an extracellular solution through the Ni-OH intermediary state (Williams and Williams, 1996), it should be pointed out that no Ni-oxide was detected on Ni-Ti RS ribbons. The Ti-oxide thickness was estimated to be around 12 nm, which is in line with other reports showing that the Ti-oxide film thicknesses range between 7 and 70 nm, depending on the treatment (Shabalovskaya, 1996). However, the thickness of the Ti-oxide layer is not as important as the density and structure of the layer. In line with this, several papers suggest that a homogenous smooth thin oxide surface gives better corrosion protection than the thicker one encountered in native samples (Trepanier *et al.*, 1998; Es-Souni and Fischer-Brandies, 2005). Furthermore, the exposure of Ni-Ti SMAs to biological solutions was shown to influence significantly their surface properties (Trepanier *et al.*, 1998; Wever *et al.*, 1998). We found that the thickness of the oxygen layer after conditioning in a cell-free culture medium increased and the lower boundary of the oxygen layer was 10 nm deeper compared to a non-conditioned sample. In line with earlier findings (Trepanier *et al.*, 1998; Wever *et al.*, 1998), including our own with Cu-Al-Ni SMAs (Colic *et al.*, 2010), we detected a small increase in the thickness of the oxygen layer in Ni-Ti RS ribbons, along with a 6 nm increase in the deposition layer. The presence of deposited P and Cl ions after conditioning was well expected, since RPMI medium contains high levels of these elements. However, since the basal RPMI medium does not contain Zn ions, we suppose that the adsorbed Zn originates most probably from FCS. Messer *et al.* (Messer *et al.*, 1982) showed much earlier that the concentration of Zn in FCS is around 2.8 ppm. Since we found a much higher concentration of this ion on the surface of Ni-Ti RS ribbons, Zn could have been adsorbed from the culture medium onto the TiO₂ surface layer, through a process studied thoroughly by Hasany *et al.* (Hasany *et al.*, 1991). At pH7, Zn is predominantly in the form of Zn²⁺ (99.33 %), which drives its adsorption onto the negatively charged TiO₂ layer. This finding is very interesting, since Zn can have various biological effects depending on its concentration (Rink and Haase, 2007).

We found that Ti was not released into the culture medium from the samples, most probably owing to the fact

that it oxidises easily, building a protective TiO₂ surface layer. In this context, improved biocompatibility due to this biologically inert oxide layer is one of the reasons for the wide biomedical application of Ti-based implants (Es-Souni and Fischer-Brandies, 2005). Ni-Ti control plates released up to 120 mg/L of Ni, but this concentration was more than 50 % lower than the concentration of Ni ions released from the pure Ni plates. The most probable explanation for this observation is that Ti's tendency to react with O is much higher than Ni, which leads to the building of an insoluble TiO₂ surface layer acting as a barrier for further Ni release. On the other hand, the regular crystal lattice of Ni-Ti exhibits high atomic bonding forces with mixed covalent and metallic character, meaning that it is difficult for atoms to leave the bulk material easily (Es-Souni and Fischer-Brandies, 2005). In contrast to Ni-Ti plates, Ni-Ti RS ribbons showed insignificant Ni release in culture medium (20 µg/L). This level of Ni ions is much lower than the provisional WHO guideline value of daily intake of Ni by food (82-406 µg/L) and corresponds to the value for drinking water and for whole blood and plasma/serum content of Ni in healthy persons (5-25 µg/L) (Es-Souni and Fischer-Brandies, 2005). Therefore, according to the microstructure analysis, it seems that the surface Ti-oxide layer structured by the melt-spinning is the most important factor that almost entirely prevents the Ni leakage from the surface of Ni-Ti RS ribbons.

Possible mechanisms of the immunomodulatory properties of Ni-Ti RS ribbons

We showed that MoDCs adhered to the surface of Ni-Ti RS ribbons, which could represent an important signal for maturation of MoDCs. Integrins were shown to play particularly important roles in responses to TiN-coated Ni-Ti SMAs (Lifeng *et al.*, 2011) and other biomaterials (Rogers and Babensee, 2011), so further investigations are needed to evaluate their roles in the immunomodulatory effects of the Ni-Ti RS ribbons. However, other factors could also be involved, such as Ti and Ni ions on the surface of Ni-Ti RS ribbons. Ti ions, for example, were shown to alter significantly MoDCs' properties, resulting in an enhanced T lymphocyte reactivity and deviation towards a Th1 type immune response (Chan *et al.*, 2009). Ni was shown to induce the phosphorylation of ERK, Jun N-terminal kinase (JNK), and p38, thus regulating the maturation and expression of CD83, CD86, CCR7 and IL-12 production by DCs (Aiba *et al.*, 2003). Recently, an interesting study showed that Ni ions down-regulate strongly tripartite motif containing (Trim) 23 gene expression (Lu *et al.*, 2009), a regulator of the NF-κB essential modulator (NEMO) (McNab *et al.*, 2011), which could be an important mechanism for the tolerogenic behaviour in Ni-Ti SMAs. Even though the conditioned medium contained hardly detectable amounts of these elements, Ti and Ni ions were detected on the surface of Ni-Ti RS ribbons, even after conditioning. It is possible that the local concentration of available Ni and Ti ions at the place of close contact between MoDCs and Ni-Ti RS ribbons is higher than the one detected in the conditioned medium, leading to the observed immunomodulatory effects on MoDCs.

The most intriguing finding in our study was the presence of Zn ions after conditioning in complete culture medium after 2 days. Zn ions are proved as important signalling molecules in immune cells, particularly DCs in response to LPS (Rink and Haase, 2007). LPS regulate a differential expression of several Zn transporters (Ho *et al.*, 2004) and Kitamura *et al.* (Kitamura *et al.*, 2006) showed that the modulating Zn homeostasis has a profound impact on DCs, whereby available Zn diminishes DC activation. Zn acts on the level of phosphodiesterase (PDE) activity (von Bulow *et al.*, 2005) and IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) phosphorylation (Wellinghausen *et al.*, 1997), resulting in a decreased nuclear factor (NF)-κB activation and LPS-induced secretion of pro-inflammatory cytokines (Zhou *et al.*, 2004). Because the LPS-stimulated up-regulation of MHC is known to be blocked by cyclic adenosine monophosphate (cAMP) (Kambayashi *et al.*, 2001), a Zn-mediated rise in cyclic nucleotides could be the mechanism by which this metal down-regulated MHC expression in our experiments. In either case, the mechanisms for the observed effects of Ni-Ti RS ribbons probably include complex synergistic effects of the surface's microstructure and Ni, Ti and Zn ions in a dynamic cell culture condition. However, this hypothesis needs to be tested further.

Conclusion

In this study we showed that the melt-spinning technique can be a new approach for the production of Ni-Ti SMAs, which further form a thin homogenous TiO₂ surface layer that improves significantly the biocompatibility of Ni-Ti ribbons. However, we showed that the ribbons enhanced the tolerogenic properties of immature MoDCs *in vitro* by stimulating IL-10 and TGF-β production by CD4⁺ T cells. In the presence of LPS, on the other hand, Ni-Ti RS ribbons enhance the Th1 polarising capacity of MoDCs, while inhibiting Th17 and Th2 differentiation. Based on these findings, we conclude that Ni-Ti RS ribbons, used for example as stents to treat occlusive vascular diseases, could potentially induce desired tolerogenic effects upon implantation. However, in the case of infection or inflammation, at least those mediated by LPS, care should be taken as to whether Ni-Ti RS ribbons will induce a desired or adverse effect. Namely, in conditions with the pathological Th17- or Th2-mediated inflammation, the implantation of Ni-Ti RS ribbons could be beneficial. On the other hand, in the Th1 dominant immunopathology, implanted Ni-Ti ribbons could aggravate the inflammatory process. However, to prove this hypothesis, extensive *in vivo* studies on different animal models should be conducted, even though human and animal DCs differ in many aspects of their phenotype and functions.

Acknowledgments

This study was supported by the EUREKA Project E!3971 BIO-SMA and the Project of the Ministry of Science

and Technological Development of Serbia (Project no. 175102). The authors thank the University of Belgrade, High School of Dentistry (D. Stamenković, V. Lazić), University of Leoben, Department of Physical Metallurgy and Materials Testing (A.C. Kneissl, K. Mehrabi), Institute of Metals and Materials Ljubljana (M. Jenko, M. Pečar), the firm Zlatarna Celje d.d., an EUREKA Project E!3971 BIO-SMA collaborator, and other collaborators from Military Medical Academy, Belgrade (T. Džopalić, A. Dragičević, J. Đokić, I. Rajković, S. Vasiljić) and Faculty of Mechanical Engineering, Maribor (L. Zorko) for their helpful assistance during the experiments.

References

- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL (2003) Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* **278**: 1910-1914.
- Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, Tagami H (2003) p38 Mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl₂ and 2,4-dinitrochlorobenzene. *J Invest Dermatol* **120**: 390-399.
- Anzel I, Kneissl AC, Rudolf R, Krizman A (2009) Wärmebeständigkeit einer rasch erstarrten Cu-Zr-Legierung / Thermal stability of a rapidly solidified Cu-Zr alloys. *Prakt Metallogr* **46**: 657-670.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Bannai S (1992) Use of 2-mercaptoethanol in cell culture. *Hum Cell* **5**: 292-297.
- Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N (1996) Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* **196**: 121-135.
- Bogdanski D, Esenwein SA, Prymak O, Epple M, Muhr G, Koller M (2004) Inhibition of PMN apoptosis after adherence to dip-coated calcium phosphate surfaces on a NiTi shape memory alloy. *Biomaterials* **25**: 4627-4632.
- Buehler W, Wang F (1968) A summary of recent research on nitinol alloys and their potential application in ocean engineering. *Ocean Eng* **1**: 105-120.
- Chan EP, Mhawi A, Clode P, Saunders M, Filgueira L (2009) Effects of titanium(IV) ions on human monocyte-derived dendritic cells. *Metallomics* **1**: 166-174.
- Chu C, Wang R, Hu T, Yin L, Pu Y, Lin P, Dong Y, Guo C, Chung C, Yeung K, Chu P (2009) XPS and biocompatibility studies of titania film on anodized NiTi shape memory alloy. *J Mater Sci: Mater Med* **20**: 223-228.
- Colic M, Rudolf R, Stamenkovic D, Anzel I, Vucevic D, Jenko M, Lazić V, Lojen G (2010) Relationship between microstructure, cytotoxicity and corrosion properties of a Cu-Al-Ni shape memory alloy. *Acta Biomater* **6**: 308-317.
- Colic M, Stojic-Vukanic Z, Pavlovic B, Jandric D, Stefanoska I (2003) Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol* **134**: 63-69.
- Constant SL, Bottomly K (1997) Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* **15**: 297-322.
- Cucak H, Yrlid U, Reizis B, Kalinke U, Johansson-Lindbom B (2009) Type I interferon signaling in dendritic cells stimulates the development of lymph-node-resident T follicular helper cells. *Immunity* **31**: 491-501.
- Das KK, Das SN, Dhundasi SA (2008) Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *Indian J Med Res* **128**: 412-425.
- Es-Souni M, Fischer-Brandies H (2005) Assessing the biocompatibility of NiTi shape memory alloys used for medical applications. *Anal Bioanal Chem* **381**: 557-567.
- Es-Souni M, Fischer-Brandies H (2007) Human gingival fibroblast response to electropolished NiTi surfaces. *J Biomed Mater Res A* **80**: 159-166.
- Fischer AB (1975) Gentamicin as a bactericidal antibiotic in tissue culture. *Med Microbiol Immun* **161**: 23-39.
- Fisher PJ, Bulur PA, Vuk-Pavlovic S, Prendergast FG, Dietz AB (2008) Dendritic cell microvilli: a novel membrane structure associated with the multifocal synapse and T-cell clustering. *Blood* **112**: 5037-5045.
- Gunaratnam M, Grant MH (2004) Damage to F-actin and cell death induced by chromium VI and nickel in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro* **18**: 245-253.
- Hasany SM, Chughtai FA, Ghaffar A (1991) Sorption behavior of microamounts of zinc on titanium oxide from aqueous solutions. *Separation Science and Technology* **26**: 1131 - 1146.
- Ho LH, Ruffin RE, Murgia C, Li L, Krilis SA, Zalewski PD (2004) Labile zinc and zinc transporter ZnT4 in mast cell granules: role in regulation of caspase activation and NF-kappaB translocation. *J Immunol* **172**: 7750-7760.
- Hoh DJ, Hoh BL, Amar AP, Wang MY (2009) Shape memory alloys: metallurgy, biocompatibility, and biomechanics for neurosurgical applications. *Neurosurgery* **64**: 199-214; discussion 214-195.
- Hu J, Wan Y (2011) Tolerogenic dendritic cells and their potential applications. *Immunology* **132**: 307-314.
- Hu X, Paik PK, Chen J, Yarinina A, Kockeritz L, Lu TT, Woodgett JR, Ivashkiv LB (2006) IFN-gamma suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AP-1 proteins. *Immunity* **24**: 563-574.
- Hunter CA (2005) New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* **5**: 521-531.
- Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Linsley PS, Ikehara S, Muramatsu S, Hodes RJ, Steinman RM (1994) The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells *in situ* and during maturation *in vitro*. *J Exp Med* **180**: 1849-1860.
- Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis e Sousa C, Germain RN, Mellman I, Steinman RM (2000) The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* **191**: 927-936.

- International Standards Organisation (2009) Dentistry – preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials. ISO 10993-5: 2009 (E). Geneva.
- Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM (2008) Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* **123**: 326-338.
- Kambayashi T, Wallin RP, Ljunggren HG (2001) cAMP-elevating agents suppress dendritic cell function. *J Leukoc Biol* **70**: 903-910.
- Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**: 373-384.
- Kishimoto T (2010) IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* **22**: 347-352.
- Kitamura H, Morikawa H, Kamon H, Iguchi M, Hojyo S, Fukada T, Yamashita S, Kaisho T, Akira S, Murakami M, Hirano T (2006) Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. *Nat Immunol* **7**: 971-977.
- Klein CB, Frenkel K, Costa M (1991) The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. *Chem Res Toxicol* **4**: 592-604.
- Kneissl AC, Unterweger E, Lojen G (2006) Functional Properties of Wires and Thin Ribbons of Several Shape Memory Alloys. *Advanced Engineering Materials* **8**: 1113-1118.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, and Kuchroo VK (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Ann Rev Immunol* **27**: 485-517.
- Kramer MJ, Mecco H, Dennis KW, Vargonova E, McCallum RW, Napolitano RE (2007) Rapid solidification and metallic glass formation – Experimental and theoretical limits. *J. Non-Cryst. Solids* **353**: 3633-3639.
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* **185**: 1481-1486.
- Lifeng Z, Yan H, Dayun Y, Xiaoying L, Tingfei X, Deyuan Z, Ying H, Jinfeng Y (2011) The underlying biological mechanisms of biocompatibility differences between bare and TiN-coated NiTi alloys. *Biomed Mater* **6**: 025012.
- Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N (2003) Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol* **73**: 713-721.
- Lojen G, Anzel I, Kneissl A, Unterweger E, Kosec B, Bizjak M (2005) Microstructure of rapidly solidified Cu-Al-Ni shape memory alloy ribbons. *J Mat Proc Tech* **162**: 220-229.
- Lu X, Bao X, Huang Y, Qu Y, Lu H, Lu Z (2009) Mechanisms of cytotoxicity of nickel ions based on gene expression profiles. *Biomaterials* **30**: 141-148.
- Lutz MB, Schuler G (2002) Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* **23**: 445-449.
- Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu CY, Ferrante J, Stewart C, Sarmiento U, Faherty DA, Gately MK (1996) IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* **4**: 471-481.
- McAleer JP, Liu B, Li Z, Ngoi SM, Dai J, Oft M, Vella AT (2010) Potent intestinal Th17 priming through peripheral lipopolysaccharide-based immunization. *J Leukoc Biol* **88**: 21-31.
- McGeachy MJ, Cua DJ (2008) Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* **28**: 445-453.
- McNab FW, Rajsbaum R, Stoye JP, O'Garra A (2011) Tripartite-motif proteins and innate immune regulation. *Curr Opin Immunol* **23**: 46-56.
- Mehrabi K, Bruncko M, McKay BJ, Kneissl AC (2009) Influence of quenching rates on equiatomic NiTi ribbons fabricated by melt-spinning. *J Mater Eng Perform* **18**: 475-478.
- Messer HH, Murray EJ, Goebel NK (1982) Removal of trace metals from culture media and sera for *in vitro* deficiency studies. *J Nutr* **112**: 652-657.
- Messer RL, Tackas G, Mickalonis J, Brown Y, Lewis JB, Wataha JC (2009) Corrosion of machined titanium dental implants under inflammatory conditions. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **88**: 474-481.
- Moulon C, Vollmer J, Weltzien HU (1995) Characterization of processing requirements and metal cross-reactivities in T cell clones from patients with allergic contact dermatitis to nickel. *Eur J Immunol* **25**: 3308-3315.
- Peitsch T, Klocke A, Kahl-Nieke B, Prymak O, Eppe M (2007) The release of nickel from orthodontic NiTi wires is increased by dynamic mechanical loading but not constrained by surface nitridation. *J Biomed Mater Res A* **82**: 731-739.
- Rink L, Haase H (2007) Zinc homeostasis and immunity. *Trends Immunol* **28**: 1-4.
- Rogers TH, Babensee JE (2011) The role of integrins in the recognition and response of dendritic cells to biomaterials. *Biomaterials* **32**: 1270-1279.
- Rudolf R, Mehrabi K, Kneissl AC, Bruncko M, Anzel I, Tomic S, Dzopalic T, Colic M (2010) The response of peripheral blood mononuclear cells to shape memory alloys. *International Journal of Immunological Studies* **1**: 214 - 228.
- Sallusto F, Lanzavecchia A (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**: 1109-1118.
- Santamarta R, Cesari E, Pons J, Goryczka T (2004) Shape memory properties of Ni-Ti based melt-spun ribbons. *Metall Mater Trans A* **35**: 761-770.
- Saraiva M, O'Garra A (2010) The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* **10**: 170-181.
- Shabalovskaya SA (1996) On the nature of the biocompatibility and on medical applications of NiTi shape memory and superelastic alloys. *Biomed Mater Eng* **6**: 267-289.
- Shabalovskaya SA (2002) Surface, corrosion and biocompatibility aspects of Nitinol as an implant material. *Biomed Mater Eng* **12**: 69-109.
- Shabalovskaya SA, Anderegg JW (1995) Surface spectroscopic characterization of TiNi nearly equiatomic

shape memory alloys for implants. *J Vac Sci Technol A* **13**: 2624-2633

Shabalovskaya S, Anderegg J, Van Humbeeck J (2008) Critical overview of Nitinol surfaces and their modifications for medical applications. *Acta Biomater* **4**: 447-467.

Steinman RM, Witmer-Pack M, Inaba K (1993) Dendritic cells: antigen presentation, accessory function and clinical relevance. *Adv Exp Med Biol* **329**: 1-9.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **21**: 685-711.

Sun T, Wang LP, Wang M (2011) (Ti, O)/Ti and (Ti, O, N)/Ti composite coatings fabricated via PIIID for the medical application of NiTi shape memory alloy. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **96**: 249-260.

Sun T, Wang M (2010) A comparative study on titania layers formed on Ti, Ti-6Al-4V and NiTi shape memory alloy through a low temperature oxidation process. *Surf Coat Technol* **205**: 92-101.

Trepanier C, Tabrizian M, Yahia LH, Bilodeau L, Piron DL (1998) Effect of modification of oxide layer on NiTi stent corrosion resistance. *J Biomed Mater Res* **43**: 433-440.

Trinchieri G (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **3**: 133-146.

Tze LE, Horikawa K, Domaschewitz H, Howard DR, Roots CM, Rigby RJ, Way DA, Ohmura-Hoshino M, Ishido S, Andoniou CE, Degli-Esposti MA, Goodnow CC (2011) CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med* **208**: 149-165.

Unterwiesing E, Lojen G, Kneissl AC, Anzel I (2005) Dünne Bänder aus CuAlNi-Formgedächtnislegierungen hergestellt durch Melt-Spinning / Thin ribbons of CuAlNi shape memory alloys manufactured by melt-spinning. *Prakt Metallogr* **42**: 435-444.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ (2008) How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* **8**: 523-532.

von Bulow V, Rink L, Haase H (2005) Zinc-mediated inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and expression suppresses TNF-alpha and IL-1 beta production in monocytes by elevation of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *J Immunol* **175**: 4697-4705.

Wellinghausen N, Martin M, Rink L (1997) Zinc inhibits interleukin-1-dependent T cell stimulation. *Eur J Immunol* **27**: 2529-2535.

Wever DJ, Veldhuizen AG, de Vries J, Busscher HJ, Uges DR, van Horn JR (1998) Electrochemical and surface characterization of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials* **19**: 761-769.

Williams D, Williams R (1996) Degradative effects of the biological environment on metals and ceramics. In: *Biomaterials science; an introduction to materials in medicine* (B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, J. Lemons, eds), Academic Press, San Diego, pp 260-267.

Yoshimura T, Takeda A, Hamano S, Miyazaki Y, Kinjyo I, Ishibashi T, Yoshimura A, Yoshida H (2006) Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of pro-inflammatory

cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. *J Immunol* **177**: 5377-5385.

Zhou Z, Wang L, Song Z, Saari JT, McClain CJ, Kang YJ (2004) Abrogation of nuclear factor-kappaB activation is involved in zinc inhibition of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production and liver injury. *Am J Pathol* **164**: 1547-1556.

Discussion with Reviewers

Reviewer II: What could be the possible clinical applications of Rapid Solidified Ni-Ti Shape Memory Alloy, in relation to effects on dendritic cells and the immune system?

Authors: Ni-Ti alloys have revolutionised the field of metallic biomaterials since they improve significantly the quality of diagnostics, treatments and surgeries (Li *et al.*, 2010, additional reference). Ni-Ti stents or stent/grafts are already in use for the treatment of vascular aneurysms or vascular occlusive diseases caused by atherosclerosis (Duerig *et al.*, 2000, additional reference). The treatment exploits the ability of Ni-Ti stents to recover their trained shape, thus allowing the expansion of stenotic blood vessels or bypassing the dilated vessel wall of an aneurysm. Studies involving coronary self-expanding stents in animals and humans (Kobayashi *et al.*, 2001; Roguin *et al.*, 1999, additional references) have concluded that Ni-Ti stents expand continuously after placement. The process is important for the prevention of restenosis. Thin Ni-Ti alloys were shown to fit much better for such use, especially if the blood vessels are smaller in diameter (Chun *et al.*, 2009, additional reference). We think that Ni-Ti RS ribbons could meet the requirements for this type of stents.

The mechanisms involved in the development and progression of both aneurysms and atherosclerosis involve the immune system components, including Dendritic Cells (DC) (Sharma and Li, 2006; Jagadesham *et al.*, 2008, additional references). DCs in the atherosclerotic plaque and aneurysmal wall originate from blood DCs precursors, including monocytes, which transform into vascular DCs upon their transmigration (Banchereau *et al.*, 2000, text reference). The immunology of these vascular diseases is complex and not well understood. Although contradictory results have been published regarding the role of Th subsets in the pathogenesis of atherosclerosis and aneurysm development, it seems that the Th1 subset is more important for the progression of atherosclerosis, whereas the immunopathology of aneurysm progression is mediated by Th2 cells (Libby *et al.*, 2009; Schonbeck *et al.*, 2002; Xiong *et al.*, 2004, additional references). In contrast, the role of Th17 cells is just starting to emerge. Recently, Madhur *et al.* (2010, additional reference) showed in a mouse model that IL-17 could promote atherosclerosis, but protect against aneurysmal rupture.

A pro-tolerogenic environment could be beneficial for both diseases and various therapies are aimed to improve such tolerogenicity. Therefore, the tolerogenic properties of Ni-Ti RS ribbons under physiological conditions could be beneficial in preventing the disease progression. However,

their application could be questionable if the diseases are accompanied by extensive inflammatory reactions. Namely, we provided evidence that MoDCs upon contact with Ni-Ti RS ribbons under inflammatory conditions stimulated Th1 and down-regulated Th2 and Th17 responses. Therefore, Ni-Ti RS ribbons could aggravate the diseases mediated by pathologic Th responses. However, if the pathology is mediated by Th17 or Th2 cytokines, the ribbons, in addition to their mechanical repair properties, could exert anti-inflammatory effects.

Another possible state-of-the-art application of Ni-Ti RS ribbons could be in a promising new field of micro-actuators and micro-electro-mechanical systems. The thinner the SMA is, the smaller is the amount of thermal mass needed to heat or cool it, which means a lesser time for the response and the increased speed for a designed operation to occur. Besides the good mechanical properties of Ni-Ti RS ribbons required for such application, and which we have described recently (Mehabri *et al.*, 2011, in the press), their tolerogenicity could be advantageous if the devices are designed for implantation.

Reviewer II: May the reduction of the nickel release from Ni-Ti RS ribbons and the enhancement of the tolerogenic properties of MoDC reduce the occurrence of sensitisation?

Authors: Hapten-mediated contact sensitisation results from the binding of small molecules, in this case Ni ions, to larger proteins, thereby converting self-antigens to highly immunogenic 'foreign' peptides when presented in the context of MHC molecules by DCs (Roediger and Weninger, 2011, additional reference). Ni-protein complexes were shown to up-regulate the expression of CD83, co-stimulatory molecules (CD80, CD86 and CD40) and the chemokine receptor CCR7 (Arrighi *et al.*, 2001, additional reference). However, it was not known until recently why Ni-protein activates human DCs, but cannot induce mice DC sensitisation to nickel without an additional adjuvant (Artik *et al.*, 1999, additional reference). Schmidt *et al.* (2010, additional reference) showed recently that the human, but not mouse, Toll like receptor 4 (TLR4) can recognise Ni-protein complexes. However, it is not clear why only some individuals are prone to Ni-sensitisation. The serious adverse effects, including thrombosis, inflammation and even sudden death (Das *et al.*, 2008, text reference) in some patients with implanted Ni-Ti based alloy devices could be explained by their hypersensitivity to Ni. The decrease of Ni ion release from Ni-Ti SMAs may reduce the occurrence of Ni-Ti sensitisation. In this context, Ni-Ti RS ribbons showing negligible Ni release, together with the stimulation of tolerogenicity of DCs, could be desirable for implantation. However, it remains to be studied whether DCs from persons susceptible to Ni-Ti sensitisation respond to Ni-Ti RS ribbons in a similar manner.

Reviewer III: The authors mention in the discussion that the oxygen layer increase in thickness in the culture medium, did the authors look at the kinetics of this process? Will this continue with time or does this slow down resulting in passivation of the surface?

Authors: Prior to conditioning in cell culture medium, the thickness of the oxygen layer of Ni-Ti RS ribbons was estimated to be around 12 nm, mostly consisting of TiO₂. After two days of the conditioning it increased to around 15 nm. These results are consistent with our previous finding on Cu-Al-Ni RS ribbons (Colic *et al.*, 2010, text reference) showing that the conditioning of Cu-Al-Ni alloys in cell culture media can enhance their biocompatibility, reducing the release of potentially toxic ions due to thickening of the oxide layer. The studies performed by Kimura and Sohmura (1987, additional reference) and Trepanier *et al.* (1998, text reference), concerning the growth of an oxide layer on NiTi alloys in physiological solutions, are also in line with our results.

The kinetics of the growth of the oxygen layer on Ni-Ti alloys depend greatly on the microstructure of the alloy, temperature and surrounding environment. The growth of the oxide layers follows a model of oxygen absorption on the Ni-Ti surface that reacts with outward diffusing Ti⁴⁺ to form TiO₂ (Trepanier *et al.*, 2000, additional reference). During the early stages of oxidation the growth of TiO₂ is the primary contributor to thickness and therefore the oxide formation is relatively rapid. However, the preferential oxidation of Ti creates a Ni-rich zone at the Ti-Ni/TiO₂ interface. The formation of the Ni₃Ti layer increases the effective diffusion distance with an associated decrease in overall oxidation kinetics. Biological fluids, on the other hand, are strong corrosive environments where Cl⁻ ions can cause pitting corrosion on the surface of Ni-Ti implants (Pourbaix, 1984, additional reference). The early process of corrosion takes place on the surface defects and on thin oxide layers, which leads to Ni release. The remaining Ti reacts with dissolved oxygen in the solution to form Ti-oxides around the pitting sites and pores leading to oxide layer growth and propagation over the entire surface of the Ni-Ti specimen. The thickness of the oxygen layer does not increase linearly with time, but it decreases as corrosion proceeds, indicating that the as-formed Ti oxide layer may impede further corrosion of the Ni-Ti SMAs in the NaCl solution (Hu *et al.*, 2010, additional reference).

However, to our knowledge, there is no direct evaluation of the kinetics of the Ti-oxygen layer growth in cell culture media and the process has not been evaluated in this study. Based on the published corrosion studies and the oxide layer growth on Ni-Ti alloys in NaCl solution we would expect lower kinetics of the oxygen growth on Ni-Ti RS ribbons due to the presence of serum proteins in the medium. At the same time, the proteins could protect the surface of the Ni-Ti RS ribbons from a direct attack by Cl⁻ ions. Therefore, this problem deserves to be investigated thoroughly in further experiments.

Reviewer III: How well does the oxygen / oxide layer respond to loading, is it mechanically stable?

Authors: This is probably the most important question needing to be addressed prior to the potential use of Ni-Ti RS ribbons as stents or other kinds of implants. In contrast to static conditions, where the protective TiO₂ layer prevents leaching of Ni ions, the cyclic deformation may result in failure of the protective oxide layer. Therefore,

it should be emphasised that the ceramic nature of TiO₂ contradicts both Ni-Ti superelasticity and the cyclic pulsation of blood vessels (Shabalovskaya *et al.*, 2009, additional reference). Oxide layers are brittle and crack under tensile stress. In addition, the thicker the layers, the higher the tendency for crack formation. The reason for this is because ceramic materials are held together by ionic and covalent bonds, which tend to fracture before any plastic deformation (Shabalovskaya *et al.*, 2009, additional reference).

Several papers reported that pseudoelastic Ni-Ti SMA samples deformed 0.6-3 %, strain developed cracks in the relatively thick protective TiO₂ layer and exposed Ni-rich phases leading to increased Ni ion release (Undisz *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2004, additional references). On the other hand, as shown by Kimura and Sohmura (1987, additional reference), a thin oxide layer is preferable to maintain the integrity of the surface layer to sustain the large deformation induced by the shape memory effect. Habijan *et al.* (2011, additional reference) recently showed that Ni-Ti with an electro-polished surface which contains a dense and several nm thick oxide layer, released a small amount of Ni (up to 25 ppm) either in static or in mechanical loading conditions, even after 7 days of the conditioning. This finding suggests that small mechanical strains have no additional effect of the Ni release. The authors suggested that since the Ti-oxide layer is very brittle, it is more likely that the self-healing processes re-establish the Ti-oxide layer in biological medium during the mechanical cycling. In line with this finding, one can expect similar behaviour of our Ni-Ti RS ribbons, since during conditioning the Ti-oxide layer was still thin.

Reviewer IV: I am not an expert in metallurgy, but as someone who uses these devices for primary cell cultures, I found this article to be very interesting. It enables one to understand the complicating immune responses and limitations of the current technology in developing alloy metals. However, for clinical applications, their safety in the complex body system should be proven by further *in vivo* experiments, because any procedure or operation itself for the implantation of new materials could be inflammatory.

Authors: *In vitro* cytocompatibility studies are a prerequisite for any material intended to be implanted in the body (Richards *et al.*, 2001, additional reference). However, cytocompatible materials which passed additional biocompatible studies *in vivo* could have some adverse chronic reactions, mostly related to the activation of the immune system. Our complex cytocompatibility and immunobiology studies on DCs, as key initiators and regulators of the immune response, suggest that cytocompatible Ni-Ti RS ribbons might have some beneficial, but also may provoke some unwanted effects if applied as biomaterials. The using of Ni-Ti RS ribbons as potential stents to treat vascular occlusive diseases could be advantageous if the stents shift the immune response toward increased tolerogenicity. Usually, DCs or their precursors transmigrated from the blood through the vascular wall are in the immature state and possess tolerogenic properties (Galkina and Ley, 2009, additional

reference; Steinman *et al.*, 2003, text reference). Therefore, the contact of such DCs with Ni-Ti RS ribbons (used as stents) could make these cells even more tolerogenic. Even though Ni-Ti RS ribbons-experienced DCs subsequently encounter the pro-inflammatory cytokines milieu within the atherosclerotic lesion, these cells could still retain their tolerogenic potential. Namely, it has been shown that additional factors in atherosclerotic lesion, such as oxidised phospholipids (a well known pro-atherogenic factor), prevent maturation and immunostimulatory capability of DCs (Bluml *et al.*, 2005, additional reference). On the other hand, during infection/inflammation, Ni-Ti RS ribbons (used as any bioimplant) could activate local DCs leading to exacerbation and perpetuation of inflammatory responses with possible negative consequences related to implant rejection.

Therefore, to make an appropriate conclusion about the safety of Ni-Ti RS ribbons as bioimplants, a number of additional studies are necessary. The studies should at first be designed on animals. In recent years, the development of inbred and transgenic strains of mice and rabbits has provided insights into the genetic and immunological basis of many diseases (Hoeg *et al.*, 1996; Libby *et al.*, 2011; Paigen *et al.*, 1990, additional references). However, atherosclerosis, including the development of aneurisms, as a disease treated with stents, is not a natural disease in rodents and has to be induced dietarily, or in some other way. Therefore, although animal experiments have proven indispensable to studies of the mechanisms of vascular diseases, many limitations have to be considered thoroughly. Due to the difficult access to coronary, carotid and cerebral arteries, which are most important clinical consequences of vascular occlusive diseases in humans, mice studies focus generally on the aorta and proximal great vessels. The structure and hydrodynamics of these smaller muscular arteries, and even the embryonic origin of their smooth muscle cells, differ markedly from the large elastic arteries usually analysed in mouse studies (Libby *et al.*, 2011; Narayanaswamy *et al.*, 2000, additional references). In addition, the mouse immune system, although well understood and manipulated readily, diverges in many ways from that of humans. It is well known today that the subpopulations of resident and inflammatory dendritic cells (DCs), as well as other components of the immune system in mice, differ from that of humans, particularly in their phenotype and function (Shortman and Liu, 2002; Libby *et al.*, 2011, additional references).

Therefore, except for the *in vivo* animal studies with implanted Ni-Ti RS ribbons, the comparative *in vitro* studies on mouse and human immune cells are necessary. Finally, if Ni-Ti RS ribbons fulfil all the criteria necessary for implantation, then long-term clinical studies would be necessary to check the immunological consequences of the biomaterial.

Additional References

Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V, Hauser C (2001) A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic

cells induced by lipopolysaccharide, TNF- α , and contact sensitizers. *J Immunol* **166**: 3837-3845.

Artik S, von Vultee C, Gleichmann E, Schwarz T, Griem P (1999) Nickel allergy in mice: enhanced sensitization capacity of nickel at higher oxidation states. *J Immunol* **163**: 1143-1152.

Bluml S, Kirchberger S, Bochkov VN, Kronke G, Stuhlmeier K, Majdic O, Zlabinger GJ, Knapp W, Binder BR, Stockl J, Leitinger N (2005) Oxidized phospholipids negatively regulate dendritic cell maturation induced by TLRs and CD40. *J Immunol* **175**: 501-508.

Chun Y, Levi DS, Mohanchandra KP, Vinuela F, Fernando Vinuela J, Carman GP (2009) Superelastic NiTi thin film small vessel graft for vascular repair. *Active and Passive Smart Structures and Integrated Systems Proceedings Vol. 7288*.

Duerig TW, Tolomeo DE, Wholey M (2000) An overview of superelastic stent design. *Minim Invasive Ther Allied Technol* **9**: 235-246.

Galkina E, Ley K (2009) Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis *Annu Rev Immunol* **27**: 165-197

Habijan T, Glogowski T, Kuhn S, Pohl M, Wittsiepe J, Greulich C, Eggeler G, Schildhauer TA, Koller M (2011) Can human mesenchymal stem cells survive on a NiTi implant material subjected to cyclic loading? *Acta Biomater* **7**: 2733-2739.

Hoeg JM, Santamarina-Fojo S, Berard AM, Cornhill JF, Herderick EE, Feldman SH, Haudenschild CC, Vaisman BL, Hoyt RF, Jr., Demosky SJ, Jr., Kauffman RD, Hazel CM, Marcovina SM, Brewer HB Jr. (1996) Overexpression of lecithin:cholesterol acyltransferase in transgenic rabbits prevents diet-induced atherosclerosis *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11448-11453.

Hu T, Chu C, Xin Y, Wu S, Yeung K, Chu P (2010) Corrosion products and mechanism on NiTi shape memory alloy in physiological environment. *J Mat Res* **25**: 350-358.

Jagadeshram VP, Scott DJ, Carding SR (2008) Abdominal aortic aneurysms: an autoimmune disease? *Trends Mol Med* **14**: 522-529.

Kimura H, Sohmura T (1987) Surface coating on TiNi Shape memory implant alloys. *J Osaka Univ Dent Sch* **27**: 211-223.

Kobayashi Y, Honda Y, Christie GL, Teirstein PS, Bailey SR, Brown CL, 3rd, Matthews RV, De Franco AC, Schwartz RS, Goldberg S, Popma JJ, Yock PG, Fitzgerald PJ (2001) Long-term vessel response to a self-expanding coronary stent: a serial volumetric intravascular ultrasound analysis from the ASSURE Trial. *A Stent vs. Stent Ultrasound Remodeling Evaluation. J Am Coll Cardiol* **37**: 1329-1334.

Li Q, Zeng Y, Tang X (2010) The applications and research progresses of nickel-titanium shape memory alloy in reconstructive surgery. *Australas Phys Eng Sci Med* **33**: 129-136.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK (2009) Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* **54**: 2129-2138.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK (2011) Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis *Nature* **473**: 317-325.

Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, Guzik TJ, Harrison DG (2010) Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* **55**: 500-507.

Narayanaswamy M, Wright K C and Kandarpa K (2000) Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research *J Vasc Interv Radiol* **11**: 5-17

Paigen B, Ishida B Y, Verstuyft J, Winters R B and Albee D 1990 Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice *Arteriosclerosis* **10**: 316-23

Pourbaix M (1984) Electrochemical corrosion of metallic biomaterials. *Biomaterials* **5**: 122-134.

Richards RG, Stiffanic M, Owen GR, Riehle M, ap Gwynn I, Curtis AS (2001) Immunogold labelling of fibroblast focal adhesion sites visualised in fixed material using scanning electron microscopy, and living, using internal reflection microscopy. *Cell Biol Int* **25**: 1237-1249.

Roediger B, Weninger W (2011) How nickel turns on innate immune cells. *Immunol Cell Biol* **89**: 1-2.

Roguin A, Grenadier E, Linn S, Markiewicz W, Beyar R (1999) Continued expansion of the nitinol self-expanding coronary stent: angiographic analysis and 1-year clinical follow-up. *Am Heart J* **138**: 326-333.

Schmidt M, Raghavan B, Muller V, Vogl T, Fejer G, Tchaptchet S, Keck S, Kalis C, Nielsen PJ, Galanos C, Roth J, Skerra A, Martin SF, Freudenberg MA, Goebeler M (2010) Crucial role for human Toll-like receptor 4 in the development of contact allergy to nickel. *Nat Immunol* **11**: 814-819.

Schonbeck U, Sukhova GK, Gerdes N, Libby P (2002) T(H)2 predominant immune responses prevail in human abdominal aortic aneurysm. *Am J Pathol* **161**: 499-506.

Shabalovskaya SA, Tian H, Anderegg JW, Schryvers DU, Carroll WU, Van Humbeeck J (2009) The influence of surface oxides on the distribution and release of nickel from Nitinol wires. *Biomaterials* **30**: 468-477.

Sharma R, Li DZ (2006) Role of dendritic cells in atherosclerosis. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* **14**: 166-169. Shortman K, Liu YJ (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes *Nat Rev Immunol* **2**: 151-61

Trepanier C, Venugopalan R, Pelton AR (2000) Corrosion resistance and biocompatibility of passivated nitinol. In: *Shape Memory Implants* (Yahia LH ed), Nitinol, pp 35-45.

Undisz A, Schrempel F, Wesch W, Rettenmayr M (2009) In situ observation of surface oxide layers on medical grade Ni-Ti alloy during straining. *J Biomed Mater Res A* **88**: 1000-1009.

Xiong W, Zhao Y, Prall A, Greiner TC, Baxter BT (2004) Key roles of CD4+ T cells and IFN- γ in the development of abdominal aortic aneurysms in a murine model. *J Immunol* **172**: 2607-2612.

Zhu L, Trépanier C, Pelton AR, Fino J (2004) Oxidation of nitinol and its effect on corrosion resistance. Online 2009. Available from: http://www.nitinol.info/pdf_files/003.pdf.

Journal of Biomaterials Applications

<http://jba.sagepub.com/>

Cytotoxicity of Gold Nanoparticles Prepared by Ultrasonic Spray Pyrolysis

R. Rudolf, B. Friedrich, S. Stopic, I. Anzel, S. Tomic and M. Colic

J Biomater Appl published online 6 September 2010

DOI: 10.1177/0885328210377536

The online version of this article can be found at:

<http://jba.sagepub.com/content/early/2010/07/22/0885328210377536>

Published by:



<http://www.sagepublications.com>

Additional services and information for *Journal of Biomaterials Applications* can be found at:

Email Alerts: <http://jba.sagepub.com/cgi/alerts>

Subscriptions: <http://jba.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

Permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

Cytotoxicity of Gold Nanoparticles Prepared by Ultrasonic Spray Pyrolysis

R. RUDOLF,^{1,*} B. FRIEDRICH,² S. STOPIĆ,² I. ANŽEL,¹
S. TOMIĆ³ AND M. ČOLIĆ^{3,4}

¹*Faculty of Mechanical Engineering, University of Maribor
Smetanova 17, SI- 2000 Maribor, Slovenia*

²*IME Process Metallurgy and Metal Recycling
RWTH Aachen University, Intzestras 1, 52056 Aachen, Germany*

³*Institute of Medical Research, Military Medical Academy
Crnotravska 17, 11002 Belgrade, Serbia*

⁴*Medical Faculty, University of Niš, Blvd. Dr Zorana Đinđića 81
18000 Niš, Serbia*

ABSTRACT: The aim of this work was to study the cytotoxicity of different fractions of gold nanoparticles prepared by ultrasonic spray pyrolysis from gold scrap. The target cells were rat thymocytes, as a type of nonproliferating cells, and L929 mouse fibroblasts, as a type of continuous proliferating cells. Fractions 1 and 2, composed of pure gold nanoparticles, as determined by scanning electron microscopy with a combination of energy dispersive X-ray analysis, were nontoxic for thymocytes, but reduced moderately the proliferative activity of L929 cells. The inhibitory effect of fraction 2, containing particles smaller in size than fraction 1, was stronger. Fraction 3, composed of Au and up to 3% Cu was noncytotoxic for thymocytes, but was cytotoxic for L929 cells. Fraction 4, composed of Au and Ag nanoparticles, and fraction 5, composed of Au together with Cu, Ni, Zn, Fe, and In were cytotoxic for both thymocytes and L929 cells. These results suggest that USP enables the synthesis of pure gold nanoparticles with controlled size, even from gold scrap. However, microstructural analyses

*Author to whom correspondence should be addressed.
E-mail: rebeka.rudolf@uni-mb.si

and biocompatibility testing are necessary for their proper selection from more cytotoxic gold nanoparticles, contaminated with other elements of gold alloys.

KEY WORDS: gold nanoparticles, ultrasonic spray pyrolysis, microstructure, cytotoxicity, L929 cells, thymocytes.

INTRODUCTION

Gold nanoparticles are of high interest because of their potential application in electrochemistry and medicine as well as for the production of nanodevices [1,2]. Useful properties of nanoscale materials such as the minute size, similar to cellular components and macromolecules, may facilitate their use in medicine for the detection of biological structures and systems and for manipulation of cellular functions [2–4]. Nanoparticles are currently exploited in imaging [5,6], bio-sensing [7,8], and gene and drug delivery [9–11]. However, depending on their structure and physico-chemical properties, nanomaterials may cause adverse health effects. Due to the chemical stability of Au, gold nanoparticles were expected to be biocompatible, as documented in different publications [12–14]. In contrast, there were some reports showing that endocytosed gold nanoparticles may cause cytotoxic effects. Such results suggest that the use of gold nanoparticles as tracers in biomedical imaging and diagnostic tests or carriers for delivery of drugs or biomolecules may be dangerous for health. On the other hand, the cytotoxic effect of gold nanoparticles could be desirable if such materials are designed for the treatment of malignant tumors or the suppression of inflammation and immune response in chronic inflammatory diseases [15,16].

We used a new technology to produce gold nanoparticles from gold scrap by ultrasonic spray pyrolysis (USP). This method enables synthesis of gold nanoparticles of various sizes and shapes, including nanoparticles contaminated with metals from gold alloys. Therefore, the aim of this work was to characterize the different fractions of gold nanoparticles using scanning electron microscopy (SEM) with a combination of energy dispersive X-ray (EDX) analysis and to examine their cytotoxicity *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Gold Nanoparticles from Gold Scraps

A chemically dissolved gold scrap (wt: 58.5% Au; 8.11% Ni; 24.35% Cu; 8.37% Zn; 0.67% rest) from Zlatarna Celje, Slovenia, was used as

a precursor for the synthesis of gold nanoparticles by USP, using an ultrasonic atomizer (Gapusol 9001, RBI/France), containing a reactor with three separated heating zones and an electrostatic precipitator. The synthesis was performed at the IME process metallurgy and Metal Recycling of the RWTH Aachen University in Germany. A similar procedure for production of metal and gold nanoparticles was published previously [17,18]. Briefly, the gold scrap obtained was first dissolved in a water solution of chloric and nitric acid in order to prepare the solution for an aerosol production. The solution was kept overnight and after that passed over to the ultrasonic atomizer. The temperature and pressure control were adjusted using a thermostat and a vacuum pump.

The aerosol produced, resulting from a frequency of 2.5 MHz, was transported by nitrogen/hydrogen gas into a hot reactor, where the aerosol droplets underwent drying, droplet shrinkage, solute precipitation, thermolysis, and sintering to form nanoparticles. Thermal decomposition of the resulting solution was performed at 300°C and 800°C. The nanoparticles were collected in a reaction tube and in a bottle with water and alcohol.

Micro-Structural and Elemental Characterization of Gold Nanoparticles

A scanning electron microscope, Quanta 200 3D equipped with a focused ion beam (FIB) and Pt-gas deposition system, was used for the characterization of the obtained nanopowders. The EDX microanalysis system (EDS) – INCA 350 System was used for quantitative chemical analysis. SEM images were used to observe the surface morphology of particles formed at different parameter sets.

Cytotoxicity Testing

The cytotoxicity of gold nanoparticle fractions was tested using a standard method for measurement of mitochondrial succinic dehydrogenase (SDH) activity in rat thymocytes and L929 mouse fibroblasts. Thymocytes were isolated from the thymuses of Albino Oxford (AO) rats, male, 10 weeks old, bred at the Institute of Medical Research, MMA, Belgrade, Serbia as we previously described [19]. The use of animals for the experiments was in accordance with the Guideline for the Use of Experimental Animals, approved by the Ethical Committee of the Military Medical Academy, Belgrade, Serbia (282-12/2002), which strictly follows the rules of the European Community Guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC). Single cell suspensions of thymocytes

were prepared by teasing the thymuses in an RPMI medium through a steel-mesh. After washing, the thymocytes were counted and then used for cell cultures.

L929 cells, a continuous proliferating mouse fibroblast line (5×10^4 /mL), or thymocytes (5×10^6 /mL) were cultivated with different gold nanoparticle fractions in flat-bottom 96-well plates (ICN, Costa Mesa, CA; 200 μ L/well) in an incubator with CO₂ at 37°C, using complete RPMI medium for 24 h or 3 days. We used different number of cells because their size was significantly different. In addition, our previous results [20] showed that such number of cells formed confluent monolayers in culture. The complete RPMI medium consisted of basic RPMI 1640 medium (Sigma, Munich, Germany), 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS) (Sigma), 2 mM L-glutamine (Sigma), and antibiotics (Galenika, Zemun, Serbia) including gentamycin (10 μ g/mL), penicillin (100 units/mL), and streptomycin (125 μ g/mL). Before the experiment, gold nanoparticle fractions were sonificated using an ultrasonic bath for 1 h. The working concentrations of the fractions were 25 and 100 μ g/mL. The controls were cell cultures without gold nanoparticles.

The first cytotoxic test was based on the determination of succinate dehydrogenase activity (SDA) in thymocytes and L929 cells. After incubation of the cells for the indicated period of time, the medium was carefully removed and the wells were filled with 100 μ L of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, Munich, Germany) (1 mg/mL), dissolved in the complete RPMI medium. Wells with gold nanoparticle fractions without cells filled with 100 μ L of MTT served as controls. In addition, wells with 100 μ L of MTT solution served as blank controls. After a 3 h incubation period (37°C, 5% CO₂), 100 μ L/well of 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) – 0.1 N HCL (Serva, Heidelberg, Germany) was added to solubilize intracellularly stored formazan. The plates were incubated overnight at room temperature. The optical density (OD) of the color was then measured at 570 nm in a spectrophotometer (Behring ELISA Processor II, Heidelberg, Germany). The results were expressed as the percentage of OD (as a measure of metabolic activity) compared to the control (cultures without gold nanoparticle fractions), used as follows:

Metabolic activity (%) = (OD of cells cultivated with gold nanoparticles - OD of gold nanoparticles cultivated without cells) / (OD of cells cultivated alone - OD of gold nanoparticles cultivated alone) \times 100.

Apoptosis was detected by using propidium iodide (PI) (Sigma) and flow cytometry as we described previously [19]. The method is based on the detection of DNA fragmentation as revealed by the quantification of hypodiploid nuclei. For this purpose, thymocytes (2×10^5) were collected

from the wells by pipeting, then washed with PBS and incubated with 500 μL of PI (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dissolved in a hypotonic solution (0.1% sodium citrate + 0.1% Triton-X solution in distilled water). Cells were cultivated with PI for 4 h at room temperature and then analyzed by flow cytometry. L929 cells were detached from the plastic surface by using 0.25% trypsin (Serva, Heidelberg, Germany) before staining with PI, as described for thymocytes.

Cell death was determined by staining the thymocytes and L929 cells from cultures with 1% Trypan Blue. The positive cells, identified by light microscopy, were considered as dead, predominantly necrotic cells. The percentages of dead cells were determined on the basis of at least 500 total cells from one well. The percentage of viable cells was calculated as 100% of total cells - % of dead cells. All results were expressed as a mean of triplicates. Additionally, necrosis was confirmed as we previously described [21] using a staining protocol with PI without cell permeabilization and flow cytometry.

Proliferation Assay

L929 cells were cultivated alone or with different fractions of gold nanoparticles for 48 h as described. During the last 18 h of incubation, the cells were pulsed with 1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ [^3H] thymidine (6.7 Ci/mmol, Amersham, Bucks, UK). At the end of incubation time the cultures were treated with 0.25% trypsin (Serva, Heidelberg, Germany) in order to detach the cells from the plastic surface. After harvesting, the radioactivity was counted using a scintillation counter (Beckman). The results were expressed as mean counts per minute (cpm) of triplicates. Proliferation activity was presented in percentages calculated on the basis of the proliferation activity of control cultures.

RESULTS

Microstructural Analysis of Gold Nanoparticles

By using USP, five fractions of gold nanoparticles were produced from the gold scrap. The results of microstructural analysis of the fractions (SEM + EDX) are presented in Table 1 and Figures 1–5. The fraction 1 contained pure gold nanoparticles (120.1 ± 51.0 nm; $n = 29$ measurements) (Table 1, Figure 1), produced at 300°C in a hydrogen atmosphere. This fraction, which was partially agglomerated, was recovered from the reaction tube wall. The fraction 2 (Table 1, Figure 2), produced and recovered similarly, contained partially agglomerated pure

Table 1. Metal content analysis of the fractions of gold nanoparticles.

Elements	Fr. 1 (W%/A%)	Fr. 2 (W%/A%)	Fr. 3 (W%/A%)	Fr. 4 (W%/A%)	Fr. 5 (W%/A%)
Au	100.0/100.0	100.0/100.0	99.1/97.3	61.6/59.4	57.8/28.7
Cu			0.9/2.7		19.2/28.1
Ag				35.4/31.5	
Ni					14.5/24.3
Zn					1.9/2.7
Fe					0.2/0.6
Na				0.2/1.2	
In					0.2/0.2
Cl				2.7/7.8	2.9/4.1
O					1.5/5.3
C					1.7/5.9

Values are given as the mean of 20 different measurements.
W = Weight; A = Atomic.

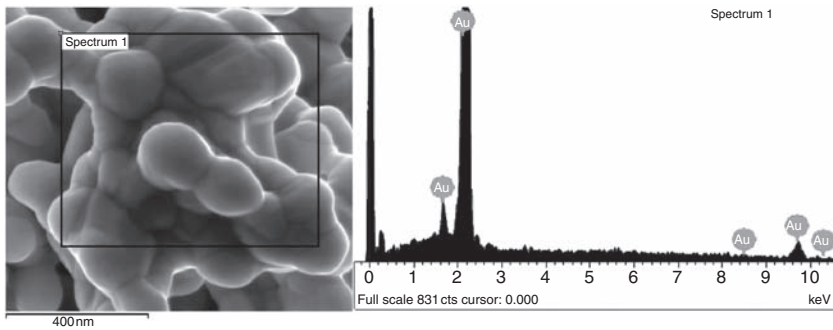


Figure 1. Fraction 1 of gold nanoparticles: SEM image and EDX analysis of elemental content within a representative spectrum.

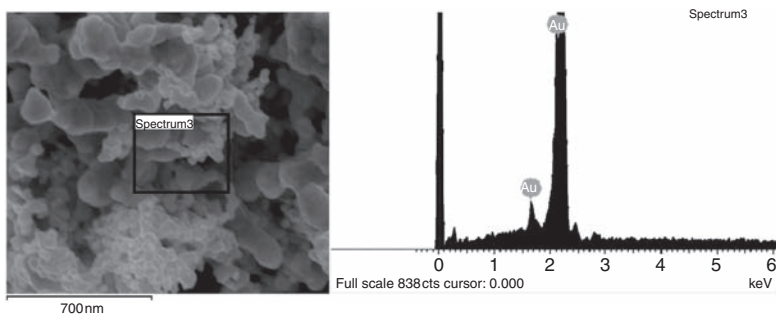


Figure 2. Fraction 2 of gold nanoparticles: SEM image and EDX analysis of elemental content within a representative spectrum.

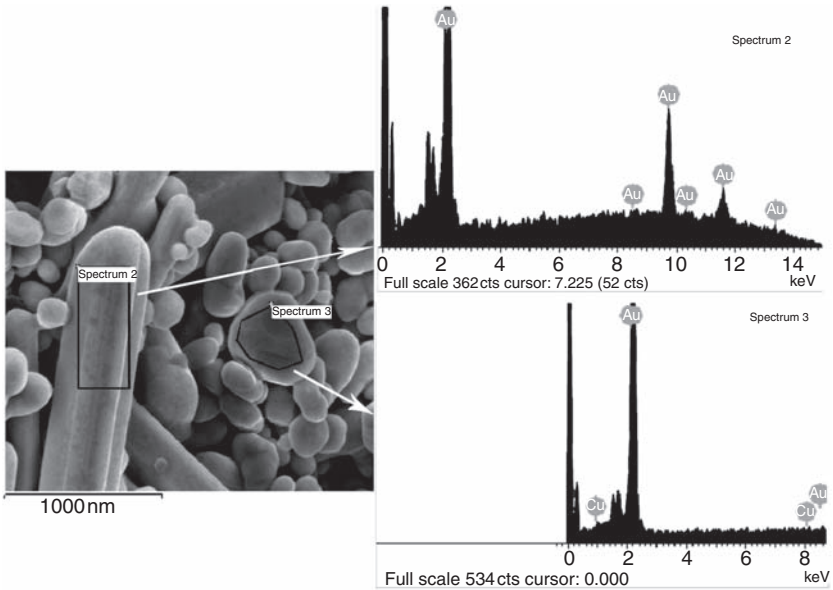


Figure 3. Fraction 3 of gold nanoparticles: SEM image and EDX analyses of elemental content within two marked spectra.

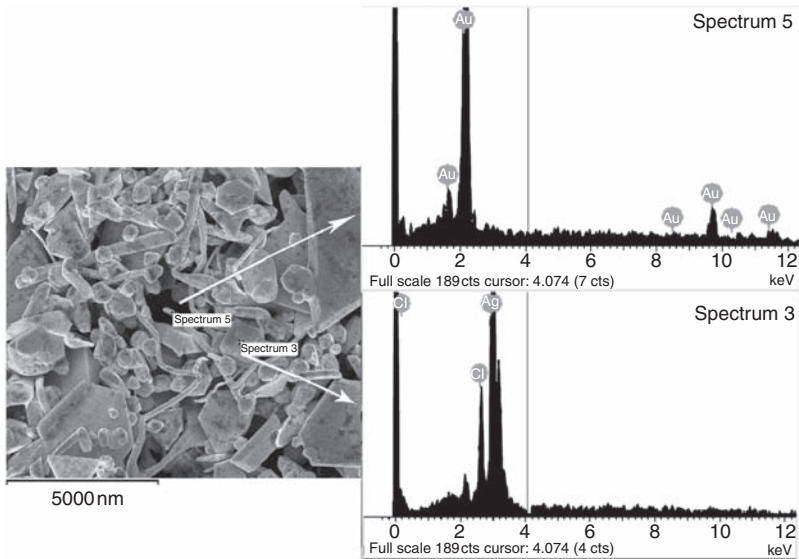


Figure 4. Fraction 4 of gold nanoparticles: SEM image and EDX analyses of elemental content within two marked spectra.

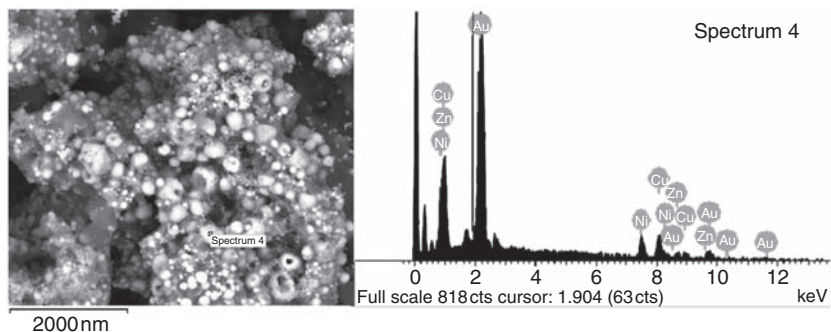


Figure 5. Fraction 5 of gold nanoparticles: SEM image and EDX analysis of elemental content within a representative spectrum.

gold nanoparticles, different in size, mostly spherical, which were smaller than fraction 1 (97.3 ± 49.8 nm; $n = 135$ measurements). Fraction 3, produced at 800°C in a hydrogen atmosphere, contained pure gold nanorods (length = 3570 ± 1960 nm; $n = 25$; width = 700.5 ± 200.3 ; $n = 25$), spherical-shaped pure gold nanoparticles (362.0 ± 169.0 nm; $n = 98$) and some spherical gold nanoparticles alloyed with Cu (Table 1, Figure 3). Fraction 4 was composed of gold particles micron in size, irregularly shaped, contaminated with AgCl powder. This fraction precipitated before thermal decomposition/atomization took place (Table 1, Figure 4). Fraction 5 (size of particles 253.0 ± 178.3 nm; $n = 100$), recovered from the bottle with water and alcohol, contained gold and alloying elements (Cu, Zn, Ni, Fe, In), as well as contaminations such as Cl, O, and C, originating from nitric and chloride acids (Table 1, Figure 5).

Effect of Gold Nanoparticles on Cellular Metabolic Functions

The cytotoxicity of gold nanoparticle fractions was tested using rat thymocytes as a type of non-proliferating cells and a mouse fibroblast cell line, L929 clone, as a type of proliferating cells. The first screening, MTT test, showed that fractions 1, 2, and 3, at both concentrations (25 and $100 \mu\text{g/mL}$) were noncytotoxic for thymocytes. A higher concentration of fractions 1 and 2, and lower concentration of fraction 3 reduced moderately the metabolic activity of L929 cells, especially after prolonged cultivation (3 days). The inhibitory effect of fraction 2 on the metabolic activity of L929 cells was stronger than fraction 1. A higher concentration of fraction 3 reduced the metabolic activity of the cells by about 80% (day 3), compared to the control. Fractions 4 and

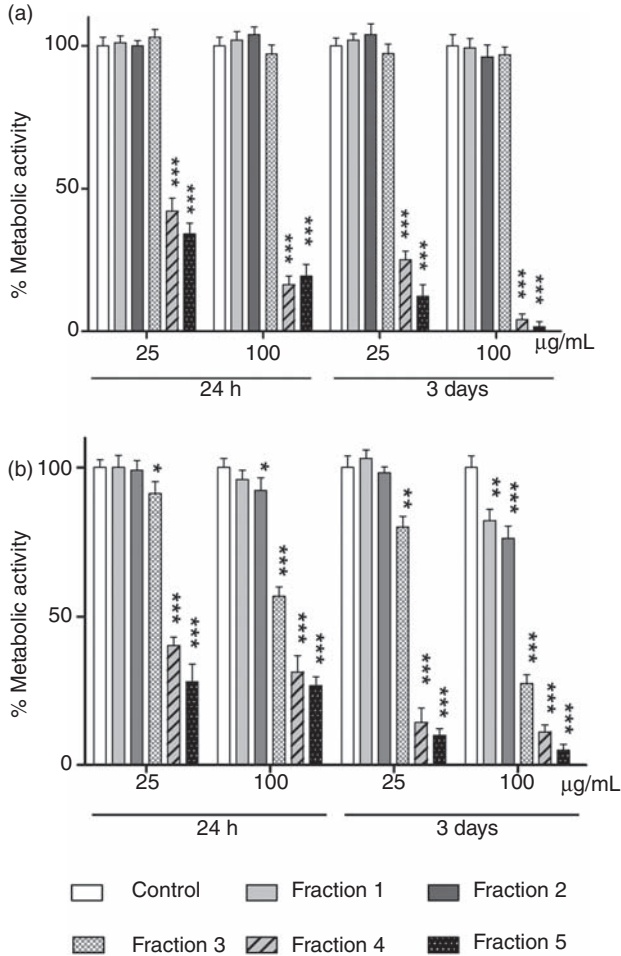


Figure 6. Effect of different fractions of gold nanoparticles on the metabolic activity of: (a) thymocytes and (b) L929 cells. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$ compared to corresponding control.

5 reduced significantly the metabolic activity of both thymocytes and L929 cells, and their effect was dose- and time-dependent (Figure 6).

Mechanisms of Cytotoxicity of Gold Nanoparticles

To study whether inhibition of the metabolic activity of L929 cells is due to the cytotoxic or anti-proliferative effect of gold nanoparticles,

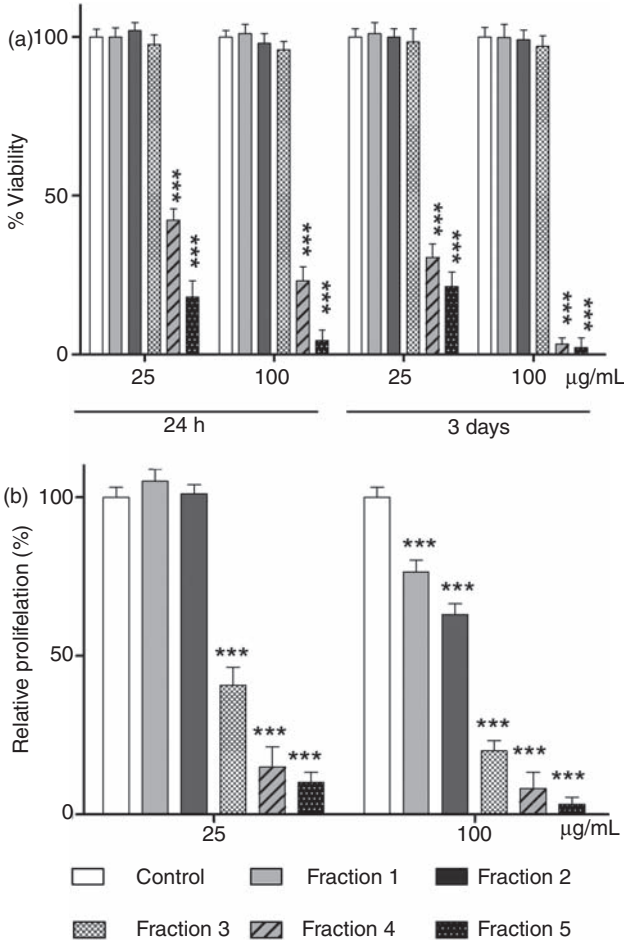


Figure 7. Effect of different fractions of gold nanoparticles on the (a) viability and (b) relative proliferation of L929 cells. *** $p < 0.005$ compared to corresponding control.

the viability and proliferative assays were performed. The results (Figure 7(a)) show that neither concentration of fractions 1, 2 and 3 was cytotoxic for L929 cells, as judged by the preserved viability of the cells. However, both concentrations of fractions 4 and 5 were cytotoxic, since cell viability was significantly decreased (25 µg/mL) or almost completely reduced (100 µg/mL).

When proliferation was studied (Figure 7(b)), it could be seen that higher concentrations of all fractions suppressed cell growth, insofar as fraction 1 showed the lowest and fraction 5 the highest inhibitory effect.

Table 2. Effect of different fractions of gold nanoparticles on apoptosis and necrosis of rat thymocytes and L929 cells.

	Thymocytes		L929 cells	
	Apoptosis (%)	Necrosis (%)	Apoptosis (%)	Necrosis (%)
Control	35.1 ± 3.2	5.0 ± 1.6	1.1 ± 0.1	3.6 ± 1.0
Fraction 1 (25 µg/mL)	33.9 ± 3.0	4.5 ± 1.6	0.8 ± 0.1	4.1 ± 1.0
(100 µg/mL)	34.5 ± 2.9	5.0 ± 1.4	1.2 ± 0.0	2.8 ± 0.1
Fraction 2 (25 µg/mL)	37.2 ± 2.8	5.2 ± 1.7	1.0 ± 0.0	3.8 ± 1.2
(100 µg/mL)	36.9 ± 3.0	5.7 ± 1.3	0.9 ± 0.1	5.5 ± 0.8
Fraction 3 (25 µg/mL)	40.0 ± 2.8	6.3 ± 1.5	1.4 ± 0.1	4.8 ± 1.2
(100 µg/mL)	43.5 ± 4.5	6.2 ± 0.7	1.3 ± 0.2	3.8 ± 2.2
Fraction 4 (25 µg/mL)	70.2 ± 3.6***	13.1 ± 2.9**	18.2 ± 1.4***	56.2 ± 4.0***
(100 µg/mL)	59.9 ± 3.0***	16.3 ± 2.5***	2.0 ± 0.0	96.2 ± 0.1***
Fraction 5 (25 µg/mL)	61.2 ± 2.4***	20.2 ± 2.7***	0.5 ± 0.0	96.8 ± 0.2***
(100 µg/mL)	45.7 ± 4.2**	46.1 ± 2.5***	0.2 ± 0.0	100.0 ± 0.0***

The cells were incubated with different concentration of gold nanoparticle fractions. Controls were cell cultures without gold nanoparticles. After 24 h (thymocytes) or 3 days (L929 cells), the cells were stained with propidium iodide as described in Materials and Methods to detect necrosis or apoptosis. Values are given as mean ± standard deviation of sixplicates (thymocytes) or triplicates (L929 cells).

** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$, compared to corresponding controls.

Lower concentrations of fractions 1 and 2 were non-inhibitory, whereas both higher and lower doses of fractions 3, 4, and 5 showed strong anti-proliferative activity. Finally, we examined whether the cytotoxic effect of gold nanoparticle fractions on thymocytes and L929 cells was due to apoptosis or necrosis. As shown in Table 2 and Figure 8, spontaneous apoptosis of thymocytes in control cultures was relatively high, whereas the percentage of necrotic cells was low. Fractions 1, 2, and 3 induced neither necrosis nor apoptosis of thymocytes. Fraction 4 caused primarily apoptosis, whereas fraction 5 (especially higher dose) induced primarily necrosis. Both apoptosis and necrosis in control L929 cultures were very low and were not significantly modulated by fractions 1, 2, and 3 of gold nanoparticles. Lower concentration of fraction 4 induced apoptosis and necrosis. Higher concentration of fraction 4 and both concentrations of fraction 5 triggered necrosis of almost all L929 cells.

DISCUSSION

In this article, we showed that USP is an innovative and appropriate technology for the synthesis of pure gold nanoparticles, even from the gold scrap. Additionally, some fractions of gold particles, contaminated with alloying elements were produced. Therefore, apart from SEM, EDX analysis of the nanoparticles is necessary for the explanation of biocompatibility tests.

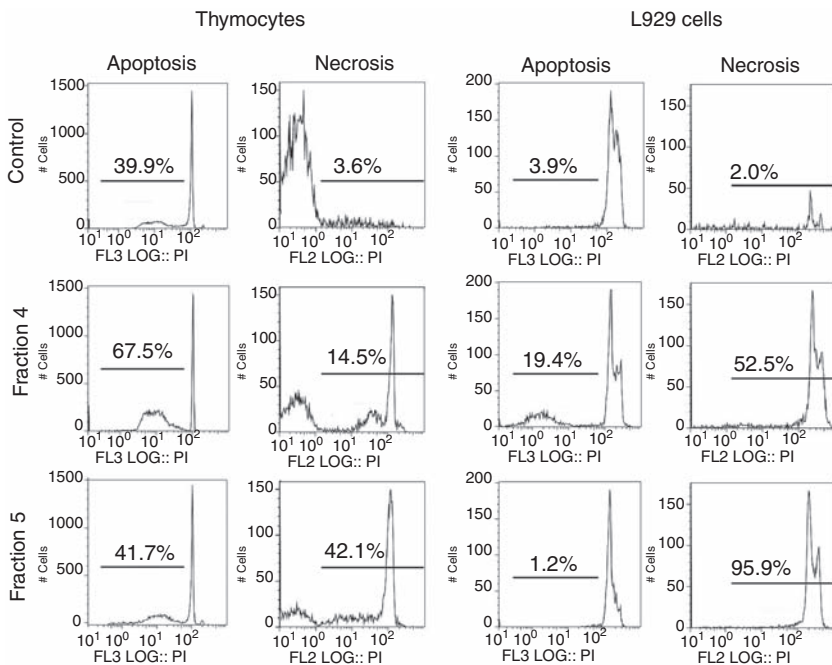


Figure 8. Effect of fractions 4 and 5 of gold nanoparticles on the apoptosis and necrosis of rat thymocytes and L929 cells. The cells were incubated with the fraction 4 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or fraction 5 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h (thymocytes) or 3 days (L929 cells). The control cells were cultivated likewise but without gold nanoparticles. The cells were stained with propidium iodide as described in Materials and Methods to detect necrosis or apoptosis and analyzed by flow cytometry.

We used two types of target cells for biocompatibility assays: L929 fibroblasts and rat thymocytes. L929 cells are recommended by ISO standards [22] as a first screening tool for biocompatibility studies of biomaterials. In our previous papers [19,20] we demonstrated that rodent thymocytes are an even more sensitive target for testing the cytotoxicity of different alloys and metal ions released from the alloys in culture medium during conditioning.

Pure gold nanoparticles (fractions 1 and 2), mostly spherical in size, were produced by USP in a hydrogen atmosphere, by decreasing the temperature from 800°C to 300°C. We showed that neither of these fractions of gold nanoparticles was directly cytotoxic for rat thymocytes, but at higher concentrations (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a reduction of the proliferative activity of L929 cells was observed. The absence of a toxic effect of pure gold nanoparticles on thymocytes may be explained by the fact that

these cells did not ingest gold nanoparticles and that Au was not released from the particles in the culture medium [19].

In contrast, L929 cells are phagocytic [23] and the inhibitory effect of particles on the metabolic activity of these cells, seen after prolonged cultivation (3 days) and which is most probably associated with lower number of cells in culture due to reduced proliferation, could be a consequence of the interference of ingested particles with the signaling mechanisms involved in cellular proliferation. Such a hypothesis is based on other studies, which demonstrated that ingested nanoparticles by fibroblasts in culture, although noncytotoxic, reduced cellular proliferation by inducing a transient oxidative stress [24], or affecting cytoskeleton architecture [25]. It is also possible that proliferation processes may be influenced by disturbing cell-cell contacts by gold nanoparticles attached to the surface of L929 cells.

Up to now, gold nanoparticles were described as nontoxic both *in vitro* and *in vivo* [12,26] due to the chemical stability of Au. However, some studies suggested that gold nanoparticles, especially those prepared by chemical modification to improve their water solubility, are toxic to different cells. Pan et al. [3] have shown that water-soluble gold nanoparticles, stabilized by triphenylphosphine derivatives, showed size-dependent cytotoxicity on epithelial cells, connective tissue fibroblasts, macrophages, and melanoma cells. Gold particles, 1.4 nm in size, were more toxic than larger size particles. In contrast, smaller gold compounds such as Tauredon, a drug used for the treatment of chronic inflammatory diseases [16,27,28], and gold nanoparticles larger than 15 nm were noncytotoxic. These authors also provided evidence that chemicals used for surface modification of gold nanoparticles did not induce the cytotoxic effect. The cytotoxicity of gold nanoparticles may also depend on their uptake. It has been shown that smaller particles are generally taken up better, reaching a maximum of about 40–50 nm. Smaller particles also have a higher surface over volume ratio, leading to a greater reactive surface when the same mass of gold is internalized [29,30]. Therefore, the higher inhibitory effect of fraction 2, (which contained gold nanoparticles lower in size than fraction 1) on the proliferation of L929 cells obtained in our study, is in line with these results. It is interesting that the mode of cell death also depended on the size of particles, in that 1.4 nm particles caused predominantly necrosis, whereas closely related particles 1.2 nm in diameter induced predominantly apoptosis [3].

Generally, the lower toxicity of gold nanoparticles in our culture model could be explained by the lower capability of L929 cells, which are not professional phagocytes, to internalize the particles. In addition, our

pure gold nanoparticle fractions were partially agglomerated and the ultrasonic treatment before their use in culture experiments was not sufficient to disperse them completely. Furthermore, a reaggregation process which occurred in the culture medium, leading to formation of some micron-sized particles, might have decreased phagocytosis. Therefore, in future experiments it is necessary to optimize the dispersibility of particles in order to understand better the mechanisms of their phagocytosis and biological effects.

The much higher toxicity of gold nanoparticles, which contained contaminated metals, could be explained by the toxic effect of not only ingested nanoparticles, but also metal ions released from the particles, either in the culture medium or intracellularly following phagocytosis. It seems that the cytotoxicity of these particles (fractions 3, 4, and 5) depends on the composition of the particles and the type of contaminating micro-alloying elements and their quantity.

Fraction 3 contained nanorods and spherical nanoparticles, much less aggregated than fractions 1 and 2. This difference was probably due to the different temperature used for decomposition/atomization of the gold scrap solution, 800°C (fraction 3 vs. 300°C, fractions 1 and 2). In this context, the use of gold nanorods in biomedicine could be beneficial [31]. Tréguer-Delapierre et al. [32], reported that gold nanorods possess two different resonance modes, in contrast to the single one developed for spherically symmetric gold particles, which is independent of size. These two, separate modes, are due to electron oscillation across and along the longitudinal axis of the nanorods and are termed the transverse and longitudinal modes, respectively. The latter is extremely sensitive to the aspect ratio of the rod (resonance shifts by approximately 100 nm for a change in aspect ratio of 1 unit) [32]. The significant inhibitory effect of fraction 3, which contained not only pure gold nanoparticles, but also some particles contaminated with a small amount of Cu (up to 3%), on L929 cells, could be a consequence of the additional influence of Cu^{2+} ions released intracellularly. The absence of cytotoxic effect of fraction 3 on thymocytes could be explained by the fact that the concentration of Cu^{2+} ions released in the culture medium was not sufficient to trigger cytotoxicity of nonphagocytic cells. It has been shown that Cu ions are toxic to L929 cells and gingival fibroblasts at relatively high concentrations (0.33–1 mmol L^{-1}) [33]. Our previous results showed that concentrations of Cu lower than 8.0 ppm were not cytotoxic [20]. It is known that the quantity of released Cu ions from a Cu-based alloy does not depend on its relative mass concentration but rather on corrosion behavior of Cu in the alloy. Therefore, to make clearer conclusion about possible Cu toxicity in our culture model it is necessary to know the

kinetics of Cu release after ingestion of the particles and its intracellular concentration. Additionally, the higher cytotoxicity of fraction 3 could be due to the higher phagocytosis of particles by L929 cells compared to the gold nanoparticles of fractions 1 and 2. If the anti-proliferative effect of fraction 3 is influenced by phagocytosed particles, it is likely that this does not come from the rod-shaped gold particles, but rather from the spherical ones, because rod-shaped particles are taken up very poorly in general due to greater membrane wrapping time required to enclose elongated particles [34]. Therefore, much more sensitive techniques should be additionally applied to measure intracellular uptake of nanogold particles of different shape and size.

The manifested toxicity of fraction 4 and fraction 5, both on thymocytes and L929 cells, is most probably a result of the predominant effect of contaminating microelements which may act synergistically. Fraction 4 contained Au and Ag. Since this fraction is micron in size, one can postulate that Ag, released from the particles, is the dominant toxic compound. Numerous studies confirmed that Ag could be released from dental alloys and that Ag ions exert cytotoxicity [35,36]. The most toxic effect of fraction 5 could be explained by the synergistic effect of different elements such as Ni, Zn, and Cu. This fraction was formed in a bottle with water/alcohol, most probably as a consequence of the different composition temperature of chloride–nitrate mixture containing gold and microalloying elements. All these elements are toxic and their effect depends on the type of cells and concentrations of released ions from alloys as well as the duration of their exposure to cells in culture [37–39]. We demonstrated that the lower concentration of fraction 5 (25 µg/mL) induced both apoptosis and necrosis, whereas higher concentrations (100 µg/mL) caused predominantly necrosis. A relatively high spontaneous apoptosis of thymocytes in culture is in line with previous numerous publications (reviewed in [40]), as a result of death by neglect of non-positively selected thymocytes *in vivo*. Apoptosis and necrosis are considered functionally and morphologically distinct forms of cell death. However, the observation that cells triggered to undergo apoptosis will die by necrosis when the intracellular energy level is low (depletion of ATP) has altered this concept [41]. Based on these results, it can be postulated that high concentrations of Cu, Ni, and Zn released in the culture medium from this fraction blocked mitochondrial or glycolytic ATP generation and caused necrosis. In this context our results showed higher susceptibility of L929 cells to necrosis, compared to thymocytes. When the levels of these ions were lower, the threshold ATP concentration was sufficient to execute the apoptotic program [41].

CONCLUSION

In conclusion, our results suggest that USP enables the synthesis of pure gold nanoparticles with controlled sizes from gold scrap. However, further microstructural analysis and biocompatibility studies are necessary for their proper selection from more toxic gold nanoparticles, which are contaminated with other microelements. In addition, a detailed thermodynamic analysis is required in order to estimate the processes of thermal decomposition, depending on the gold scrap composition, and thus better separation and dispersion of pure gold nanoparticles.

ACKNOWLEDGMENTS

This article is part of EUREKA Programme E!4953 GoNano and Military Medical Academy, Belgrade project VMA/07-10/B.18.

REFERENCES

1. Xiong, X. and Busnaina, A. Direct Assembly of Nanoparticles for Large-scale Fabrication of Nanodevices and Structures, *J. Nanopart. Res.*, 2008: **10**: 947–954.
2. Chithrani, B.D., Ghazani, A.A. and Chan, W.C. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells, *Nano Lett.*, 2006: **6**: 662–668.
3. Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A. et al. Size-dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles, *Small* 2007: **3**: 1941–1949.
4. Huang, X., El-Sayed, I.H., Yi, X. and El-Sayed, M.A. Gold Nanoparticles: Catalyst for the Oxidation of NADH to NAD(+), *J. Photoch. Photobio. B.*, 2005: **81**: 76–83.
5. Chan, L.Y., Sung, J.J., Chan, F.K., To, K.G., Lau, J.Y. and Chung, S.C. Tissue Injury of Injection Gold Probe, *Gastrointest. Endosc.*, 1998: **48**: 291–295.
6. Bruchez Jr, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S. and Alivisatos, A.P. Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels, *Science*, 1998: **281**: 2013–2016.
7. Karhanek, M., Kemp, J.T., Pourmand, N., Davis, R.W. and Webb, C.D. Single DNA Molecule Detection Using Nanopipettes and Nanoparticles, *Nano Lett.*, 2005: **5**: 403–407.
8. Taton, T.A., Lu, G. and Mirkin, C.A. Two-Color Labeling of Oligonucleotide Arrays via Size-selective Scattering of Nanoparticle Probes, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001: **123**: 5164–5165.
9. Panyam, J. and Labhasetwar, V. Biodegradable Nanoparticles for Drug and Gene Delivery to Cells and Tissue, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003: **55**: 329–347.

10. Yang, P.H., Sun, X., Chiu, J.F., Sun, H. and He, Q.Y. Transferrin-mediated Gold Nanoparticle Cellular Uptake, *Bioconjugate Chem.*, 2005: **16**: 494–496.
11. Kohler, N., Sun, C., Wang, J. and Zhang, M. Methotrexate-modified Superparamagnetic Nanoparticles and their Intracellular Uptake into Human Cancer Cells, *Langmuir*, 2005: **21**: 8858–8864.
12. Connor, E.E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C.J. and Wyatt, M.D. Gold Nanoparticles are Taken up by Human Cells but do not Cause Acute Cytotoxicity, *Small*, 2005: **1**: 325–327.
13. Tkachenko, A.G., Xie, H., Liu, Y. et al. Cellular Trajectories of Peptide-modified Gold Particle Complexes: Comparison of Nuclear Localization Signals and Peptide Transduction Domains, *Bioconjugate Chem.*, 2004: **15**: 482–490.
14. Shukla, R., Bansal, V., Chaudhary, M., Basu, A., Bhonde, R.R. and Sastry, M. Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview, *Langmuir*, 2005: **21**: 10644–10654.
15. Tsoli, M., Kuhn, H., Brandau, W., Esche, H. and Schmid, G. Cellular Uptake and Toxicity of Au55 Clusters, *Small*, 2005: **1**: 841–844.
16. DeWall, S.L., Painter, C., Stone, J.D. et al. Noble Metals Strip Peptides from Class II MHC Proteins, *Nat. Chem. Biol.*, 2006: **2**: 197–201.
17. Stopic, S., Friedrich, B., Raic, K., Vulkov-Husovic, T. and Dimitrijevic, M. Characterisation of Nano-Powder Morphology Obtained by Ultrasonic Spray Pyrolysis, *Metalurgija*, 2008: **14**: 41–54.
18. Stopic, S., Friedrich, B., Rudolf, R. and Anžel, I. (2009). Gold Nanoparticles Produced by Ultrasonic Spray Pyrolysis, In: *Proceedings of the 5th International Conference on Gold Science Technology and its Applications*, Heidelberg, 26–29 July, p. 385.
19. Colic, M., Stamenkovic, D., Anzel, I., Lojen, G. and Rudolf, R. The Influence of the Microstructure of High Noble Gold-Platinum Dental Alloys on their Corrosion and Biocompatibility *In vitro*, *Gold Bull.*, 2009: **42**: 34–47.
20. Colic, M., Rudolf, R., Stamenkovic, D. et al. Relationship Between Microstructure, Cytotoxicity and Corrosion Properties of a Cu-Al-Ni Shape Memory Alloy, *Acta Biomater.*, 2009: **6**: 308–317.
21. Colic, M., Rudolf, R., Anzel, I., Tomic, S. and Lojen, G., The Response of Peritoneal Macrophages to Cu-Al-Ni Shape Memory Alloy, *J. Biomater. Appl.*, published online December 11, 2009: doi: 10.1177/0885328209354613.
22. International Standards Organisation. (1977). *Dentistry – Preclinical Evaluation of Biocompatibility of Medical Devices used in Dentistry – Test Methods for Dental Materials, ISO 7404-1, 1st edn*, Geneva, ISO.
23. Vukovic, G., Marinkovic, A., Obradovic, M. et al. Synthesis, Characterization and Cytotoxicity of Surface Amino-functionalized Water-dispersible Multi-walled Carbon Nanotubes, *Appl. Surf. Sci.*, 2009: **255**: 8067–8075.
24. Soenen, S.J.H., Illyes, E., Vercauteren, D. et al. The Role of Nanoparticle Concentration-dependent Induction of Cellular Stress in the Internalisation of Non-Toxic Cationic Magnetoliposomes, *Biomaterials*, 2009: **30**: 6083–6813.

25. Prnodet, N., Fang, X., Sun, Y. et al. Adverse Effects of Citrate/Gold Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts, *Small*, 2006:**2**: 766–773.
26. Hainfeld, J.F., Slatkin, D.N. and Smilowitz, H.M. The Use of Gold Nanoparticles to Enhance Radiotherapy in Mice, *Phys. Med. Biol.*, 2004:**49**: N309–N315.
27. Vlak, T. and Jajic, I. The Effect of 6 Months of Treatment with Tauredon on Clinical Indicators in Rheumatoid Arthritis, *Reumatizam*, 1992: **39**: 27–31.
28. Kean, W.F., Hart, L. and Buchanan, W.W. Auranofin, *Br. J. Rheumatol.*, 1997: **36**: 560–572.
29. Thorek, D.L. and Tsourkas, A. Size, Charge and Concentration Dependent Uptake of Iron Oxide Particles by Non-Phagocytic Cells, *Biomaterials*, 2008: **29**: 3583–3590.
30. Jiang, W., Kim, B.Y., Rutka, J.T. and Chan, W.C. Nanoparticle-mediated Cellular Response is Size-dependent, *Nat. Nanotechnol.*, 2008: **3**: 145–150.
31. Gesellschaft Deutscher Chemiker. (2008). Goldstäbchen Ohne Gift. Available at: <http://www.materialsgate.de/mnews/mn-3569.html> (accessed May 10, 2010)
32. Tréguer-Delapierre, M., Majimel, J., Mornet, S., Duguet, E. and Ravaine, S. Synthesis of Non-Spherical Gold Nanoparticles, *Gold Bull.*, 2008: **41**: 195–207.
33. Schedle, A., Samorapoompichit, P., Rausch-Fan, X.H. et al. Response of L929 Fibroblasts, Human Gingival Fibroblasts, and Human Tissue Mast Cells to Various Metal Cations, *J. Dent. Res.*, 1995: **74**: 1513–1520.
34. Verma, A. and Stellacci, F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions, *Small*, 2010: **6**: 12–21.
35. Wataha, J.C., Lockwood, P.E., Schedle, A., Noda, M. and Bouillaguet, S. Ag, Cu, Hg and Ni Ions Alter the Metabolism of Human Monocytes during Extended Low-dose Exposures, *J. Oral Rehabil.*, 2002: **29**: 133–139.
36. Wataha, J.C., Lockwood, P.E. and Schedle, A. Effect of Silver, Copper, Mercury, and Nickel Ions on Cellular Proliferation During Extended, Low-dose Exposures, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000: **52**: 360–364.
37. Wataha, J.C., Lockwood, P.E., Bouillaguet, S. and Noda, M. *In vitro* Biological Response to Core and Flowable Dental Restorative Materials, *Dent. Mater.*, 2003: **19**: 25–31.
38. Schmalz, G., Arenholt-Bindslev, D., Hiller, K.A. and Schweikl, H. Epithelium-Fibroblast Co-Culture for Assessing Mucosal Irritancy of Metals used in Dentistry, *Eur. J. Oral Sci.*, 1997: **105**: 86–91.
39. Wataha, J.C. Biocompatibility of Dental Casting Alloys: A Review, *J. Prosthet. Dent.*, 2000: **83**: 223–234.
40. Medema, J.P. and Borst J.T. Cell Signaling: A Decision of Life and Death, *Hum. Immunol.*, 1999: **60**: 403–411.
41. Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kuhnle, S. and Nicotera, P. Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis, *J. Exp. Med.*, 1997: **185**: 1481–1486.

Immunomodulatory Properties of Nanoparticles Obtained by Ultrasonic Spray Pyrolysis from Gold Scrap

Jelena Đokić¹, Rebeka Rudolf², Sergej Tomić¹, Srećko Stopić³, Bernd Friedrich³,
Bojan Budič⁴, Ivan Anžel², and Miodrag Čolić^{1,5,*}

¹Military Medical Academy Institute of Medical Research, 11000 Belgrade, Serbia

²University of Maribor, Faculty of Mechanical Engineering, 2000 Maribor, Slovenia

³IME Process Metallurgy and Metal Recycling, RWTH Aachen University, 52062-52080 Aachen, Germany

⁴National Institute for Chemistry, 1000 Ljubljana, Slovenia, ⁵University of Niš, Medical Faculty, 18000 Niš, Serbia

We prepared 5 different fractions of nanoparticles from the gold scrap, by using a new technology, Ultrasonic Spray Pyrolysis (USP). The aim of this study was to characterize the microstructure and cytotoxicity of the nanoparticles along with their immunomodulatory properties, using Concanavaline A (ConA)-treated rat splenocytes as a model of activated immune cells. Fractions 1 and 2, composed of pure gold nanoparticles, although non-cytotoxic, reduced cellular proliferation. Fraction 2, containing particles smaller in size and lesser agglomerated than fraction 1, up- and down-regulated the production of IL-2 and IL-10, respectively, by activated splenocytes. Fraction 3, containing nanoparticles composed of Au and up to 3 at.% Cu, was non-cytotoxic, but reduced IL-2 production and cell proliferation. Fractions 4 and 5, contaminated with alloying elements from the gold scrap, were cytotoxic. The extent of cytotoxicity and subsequent reduction of cytokine production, as well as the mode of cell death, depended on their composition. In conclusion, we showed that USP enables the synthesis of gold nanoparticles, which could be suitable for various biological applications, and that ConA-treated splenocytes represent a reliable model for fast and accurate evaluation of the immunotoxicological profiles of these particles. However, it is necessary to improve this technology and investigate further some of the immunomodulatory mechanisms using more specific immunological tests.

Keywords: Gold Nanoparticles, Ultrasonic Spray Pyrolysis, Cellular Proliferation, Cytotoxicity, Cytokines.

1. INTRODUCTION

The diagnosis and treatment of disease at the cellular level would be enhanced greatly by the ability to deliver labelling probes and therapeutic agents into specific cells or cellular compartments without inducing any adverse effects.¹ Gold nanoparticles have become recognized as a highly valuable tool for that task, as they are shown to be biocompatible, easy to conjugate with various macromolecules and to possess desirable optical properties.² In this context, gold nanoparticles were exploited in imaging,^{3–4} bio-sensing,^{5–7} and gene and drug delivery.^{8–10} Due to the chemical stability of Au, gold nanoparticles are expected to be biocompatible as we confirmed previously,¹¹ along with several other publications.^{12–14} On the other hand, there are few examples

of toxic effects, which might depend on the cell line,^{14–15} on surface chemistry¹⁶ and on the gold nanoparticle size,¹⁷ so the biocompatibility of gold nanoparticles is still a controversial issue.¹⁸ Moreover, interactions of nanoparticles and immune cells have been reported using several models, such as carbon nanotubes,¹⁹ poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) nanoparticles,²⁰ polybutyl cyanoacrylate nanoparticles,²¹ fullerenes²² etc., but similar studies using gold nanoparticles are quite rare.

In our previous paper we used a new methodology, Ultrasonic Spray Pyrolysis (USP), to produce gold nanoparticles from the gold scrap.¹¹ This method enabled the synthesis of pure gold nanoparticles of various sizes and shapes, but also those which were contaminated with various alloying and contaminating elements. The cytotoxicity of the nanoparticles was studied using L929

* Author to whom correspondence should be addressed.

cells and non-phagocytic thymocytes, but we evaluated no immunomodulatory effect. Here, we aimed to characterize the cytotoxicity of gold nanoparticles further by using activated immune cells. Additionally, we wondered whether gold nanoparticles possess some immunomodulatory effects in terms of cytokine production and how these effects correlate with the morphological and/or chemical properties of the nanoparticles. In contrast to biocompatibility testing, there is no general model or recommendation for the evaluation of the immunomodulatory properties of gold nanoparticles.²³ Therefore, one of the aims was to develop a fast and sensitive *in vitro* method to assess simultaneously the toxicological and immunomodulatory profiles of gold nanoparticles. As a model system we used Concanavaline A (ConA)-stimulated rat splenocytes. ConA is a well known mitogen and polyclonal activator of lymphocytes that acts in the presence of antigen presenting cells (APCs) within a particular cell population.²⁴

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Preparation of Gold Nanoparticles from Gold Scrap

Gold scrap (wt%: 58.5 Au; 8.11 Ni; 24.35 Cu; 8.37 Zn; 0.67 rest) from Zlatarna Celje, Slovenia, dissolved chemically, was used as a precursor for the synthesis of gold nanoparticles by UPS, using an ultrasonic atomizer (Gapsol 9001, RBI/France), as we described in our previous publication.¹¹ The synthesis was performed at the IME Process Metallurgy and Metal Recycling Centre of the RWTH Aachen University in Germany. A similar procedure for the production of metal nanoparticles was published previously.²⁵ Briefly, the gold scrap obtained was first dissolved in a water solution of chloric and nitric acids in order to prepare the solution for an aerosol production. The solution was kept overnight and after that transferred to the ultrasonic atomizer. The temperature and pressure control were adjusted using a thermostat and a vacuum pump. The aerosol produced, resulting from frequencies of 2.5 or 0.8 MHz, was transported by nitrogen/hydrogen gas into a hot reactor, where the aerosol droplets underwent drying, droplet shrinkage, solute precipitation, thermolysis and sintering, to form nanoparticles. Thermal decomposition of the obtained solution was performed at 300 °C and 800 °C and the nanoparticles were collected in a reaction tube and in a bottle with water and alcohol. The diameter of the produced nanoparticles was predicted from the Eq. (1), formed by combination of the two equations reported by Peskin and Raco²⁶ and Messing et al.²⁷

$$D_{\text{Au}} = 0,34 \cdot \left(\frac{8 \cdot \pi \cdot \gamma}{\rho_{\text{sol}} \cdot f^2} \right)^{1/3} \left(\frac{C_{\text{sol}} \cdot M_{\text{Au}}}{\rho_{\text{Au}} \cdot M_{\text{sol}}} \right)^{1/3} \quad (1)$$

where D_{Au} is the diameter of the nanoparticle (m), γ -surface tension (N m⁻¹), f -frequency ultrasound (Hz),

C_{sol} -concentration of the starting solution (g/l), M_{sol} -molar mass of the starting solution (g mol⁻¹), M_{Au} -molar mass of the gold (g mol⁻¹), ρ_{sol} -density of the atomized solution and ρ_{Au} -density of the gold (g cm⁻³). Assuming that the characteristics of water are close to those of the diluted precursor solution used, the parameters of our experiments amount to: $\gamma = 72,9 \cdot 10^{-3}$ Nm⁻¹, $\rho = 1,0$ g cm⁻³, $M_{\text{Au}} = 196,97$ g/mol, $M_{\text{sol}} = 339,8$ g/mol, $\rho_{\text{Au}} = 19,3$ g cm⁻³. Since the expected mean particle diameter of the gold powder obtained finally after hydrogen reduction depends especially on the initial concentration of the solution; the same initial concentration of gold scrap was used in all experiments ($C_{\text{Au}} = 5$ g/l). The final particle diameter was calculated using the formula (Eq. (1)) assuming that each droplet was transformed into one particle and that during atomization no coalescence occurred.

2.2. Characterization of Gold Nanoparticles

The surface morphology and chemical composition of the nanoparticles formed at different parameter sets were analyzed by FEI Sirion Scanning Electron Microscope (SEM) equipped with the EDX microanalysis system—INCA 350 System (Oxford Instruments, UK). The samples were prepared for SEM/EDX by dropping the stock solutions of gold nanoparticle fractions onto a carbon adhesive strip, allowing it to dry in a desiccators, and then repeating the procedure several more times. This procedure was applied in order to lower the background signal which compromises the EDX analysis. Additionally, Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis was made on a JEOL JEM-2100 HR TEM. For the TEM characterization a drop of sonified water solution of the nanoparticles was placed on a carbon-coated copper grid and dried at room temperature. The images from SEM and TEM were used for measurements of the size of nanoparticles using NIS-element D 2.3 software. Analysis of the frequency distribution of gold nanoparticles' diameters from Fraction 1 and Fraction 2 was carried out using the Graph Pad Prism 5.0 software.

2.3. Cells and Cultures

Splenocytes were isolated from the spleen of Albino Oxford (AO) rats, male, 10 weeks old, bred at the Institute of Medical Research, MMA, Belgrade, Serbia, as we described previously.²⁸ The use of animals for the experiments was in accordance with the Guidelines for the Use of Experimental Animals, approved by the Ethical Committee of the Military Medical Academy, Belgrade, Serbia (282-12/2002), which follows strictly the rules of the European Community Guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC). Single cell suspensions of splenocytes were prepared by teasing the spleen in an RPMI medium through a steel-mesh. After washing, the splenocytes were counted and then used for cell cultures.

Splenocytes (5×10^6 /ml) were cultivated with different gold nanoparticles' fractions in the presence of 2.5 μ g/ml Concanavaline A (ConA) in flat-bottom 96-well plates (ICN, Costa Mesa, CA) (200 μ l/well) in an incubator with CO₂ at 37 °C, using a complete RPMI medium. The complete RPMI medium consisted of basic RPMI 1640 medium (Sigma, Munich, Germany), 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS) (Sigma), 2 mM L-glutamine (Sigma) and antibiotics, including gentamycin (10 μ g/ml), penicillin (100 units/ml) and streptomycin (125 μ g/ml). Immediately before the experiment, gold nanoparticles' fractions were sonified in an ultrasonic bath for 1 hour. The working concentrations of the fractions were 10 μ g/ml and 50 μ g/ml. The controls were the cell cultures without gold nanoparticles.

2.4. Cytotoxicity Testing

The first cytotoxicity test was based on the determination of Succinate Dehydrogenase Activity (SDA) in splenocytes. After the cultivation of cells for 24 h the medium was removed carefully and the wells were filled with 100 μ l of 3-[4,5 dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, Munich, Germany) (1 mg/ml), dissolved in the complete RPMI medium. The wells filled only with 100 μ l of MTT solution served as blank controls. In addition, the wells with gold nanoparticles' fractions without cells, filled with 100 μ l of MTT, served as additional blank controls. After a 3-hour incubation period (37 °C, 5% CO₂), 100 μ l/well of 10% sodium—dodecyl sulphate (SDS)—0.1 N HCl (Serva, Heidelberg, Germany) was added to solubilize intracellularly stored formazan. Plates were incubated with an SDS solution overnight at room temperature. The optical density of the color was then measured at 540/670 nm in a spectrophotometer (Behring ELISA Processor II, Ingelberg, Germany). The results are expressed as the percentage of optical density (metabolic activity) compared to the control (cultures without gold nanoparticles' fractions). The percentage of metabolic activity was calculated using the formula: Metabolic activity (%) = (OD of cells cultivated with gold nanoparticles—OD of gold nanoparticles cultivated without cells)/(OD of cells cultivated alone—OD of gold nanoparticles cultivated alone) \times 100.

Apoptosis was detected by using Propidium Iodide (PI) (Sigma) and flow cytometry as we described elsewhere.²⁸ The method is based on the detection of DNA fragmentation as revealed by the quantification of hypodiploid nuclei. For this purpose, splenocytes (2×10^5) from 24-hour cultures were collected from the wells by pipetting, then washed with PBS and incubated with 500 μ l of PI (10 μ g/ml) dissolved in a hypotonic solution (0.1% sodium citrate +0.1% Triton-X solution in distilled water). The cells were incubated with PI for 4 hours at room temperature and then analyzed by flow cytometry.

Also, after a 24-hour cultivation time, cell death was determined by staining the splenocytes from cultures with 1% Trypan Blue. The positive cells, identified by light microscopy, were considered as dead, predominantly necrotic cells. The percentage of dead cells was determined on the basis of at least 500 total cells from one well. The percentage of viable cells was calculated as 100% of total cells—% of dead cells. All results were expressed as a mean of triplicates. Additionally, necrosis was confirmed by flow cytometry, staining the non-permeabilized cells with PI, as we described previously.²⁹

2.5. Proliferation Assay

Splenocytes were cultivated for 3 days in the presence of 2.5 μ g/ml ConA as described, alone or with different fractions of gold nanoparticles. During the last 8 hours of incubation the cells were pulsed with 1 μ Ci/well [3H] thymidine (6.7 Ci/mmol, Amersham, Bucks, U.K.). After harvesting, the radioactivity was counted using a scintillation counter (Beckman). The results were expressed as mean counts per minute (cpm) of triplicates. Proliferation activity was presented as percentages calculated on the basis of the proliferation activity of the control cultures.

2.6. Cytokine Detection

Splenocytes were cultivated with 2.5 μ g/ml ConA (control) and gold nanoparticles, as described for the proliferation assay. After 24 hours the supernatants were collected and frozen at -40 °C for a later analysis of the cytokines. Concentrations of IL-2, IFN- γ , IL-4 and IL-10 were determined from supernatants using the commercial ELISA kits (R&D Systems), calculating the unknown concentrations from the standard curves.

2.7. Statistical Analysis

All values are given as mean \pm standard deviation (SD). If not indicated otherwise, the number of samples was 3. The two-tailed unpaired *t* test or one-sample *t* test was used to evaluate the differences between the experimental and corresponding control samples or theoretical values, respectively. The values *p* < 0.05 were considered to be significant statistically. For non-parametric variables, we applied the one-way ANOVA test. Graphical presentation of the results was prepared using the Graph Pad Prism 5.0 software.

3. RESULTS

3.1. Morphological and Chemical Properties of Gold Nanoparticles' Fractions

The USP technique enabled the production of pure gold nanoparticles of various sizes and shapes, but also those

Table I. Morphological and chemical properties of five fractions of gold nanoparticles obtained by UPS.

Name	Shape	Size	Agglomeration	Composition (at.%)
Fraction 1	Spherical-shaped	D:120.1 ± 51.0 nm	Agglomerated	Au (100%)
Fraction 2	Spherical-shaped	D:97.3 ± 49.8 nm	Partially agglomerated	Au (100%)
Fraction 3	Rod-shaped	L:3570 ± 1960 nm W:700.5 ± 200.3 nm	Non-agglomerated	Au (100%)
Fraction 4	Spherical-shaped	D:362.0 ± 169.0 nm	Non-agglomerated	Au (97.1%); Cu (2.7%)
	Spherical-shaped	D:1.003 ± 0.237 μm		
	Rod-shaped	L:6.291 ± 2.275 μm W:0.682 ± 0.191 μm		
Fraction 5	Disc-shaped polyhedra	A:125.676 ± 99.966 μm ²	Partially agglomerated	Au (28.7%); Cu (28.1%); Ni (24.3%); Zn (2.7%); Fe (0.6%); In (0.2%); Cl (4.1%); O (5.3%); C (5.9%)
	Spherical-shaped	D:253.0 ± 178.3 nm		

D—Diameter; L—Length; W—width; A—Area; at.%—Atomic percentage.

which were contaminated with different alloying elements. The morphological and chemical properties obtained by SEM/EDX analysis of the five fractions of gold nanoparticles are summarized in Table I. Fraction 1 (120.1 ± 51.0 nm) contained pure agglomerated spherical gold nanoparticles (Fig. 1, Table I). Fraction 2 contained pure spherical gold nanoparticles as well, but less agglomerated and smaller in diameter (97.3 ± 49.8 nm) compared to Fraction 1. Fraction 3 contained non-agglomerated pure gold nanorods (length: 3570 ± 1960 nm; width: 700.5 ± 200.3 nm), spherically-shaped pure gold nanoparticles and some spherical gold nanoparticles alloyed with Cu (up to 3 at.%), (362.0 ± 169.0 nm). Fraction 4, contaminated with AgCl crystals (up to 39 at.%) from the

production process, was composed of spherically-shaped particles (1.003 ± 0.237 μm), rod-shaped nanoparticles (length: 6.291 ± 2.275 μm; width: 0.682 ± 0.191 μm) and disc-shaped polyhedra (125.676 ± 99.966 μm²). The spherical-shaped nanoparticles in Fraction 5 (253.0 ± 178.3 nm) contained gold (up to 29 at.%), alloying elements (Cu, Zn, Ni, Fe, In) (up to 6 at.%) and impurities such as Cl, O and C.

3.2. Cytotoxicity of Gold Nanoparticles' Fractions

We evaluated the cytotoxicity along with the immunomodulatory properties of five gold nanoparticles' fractions using ConA-treated splenocytes as a model of activated

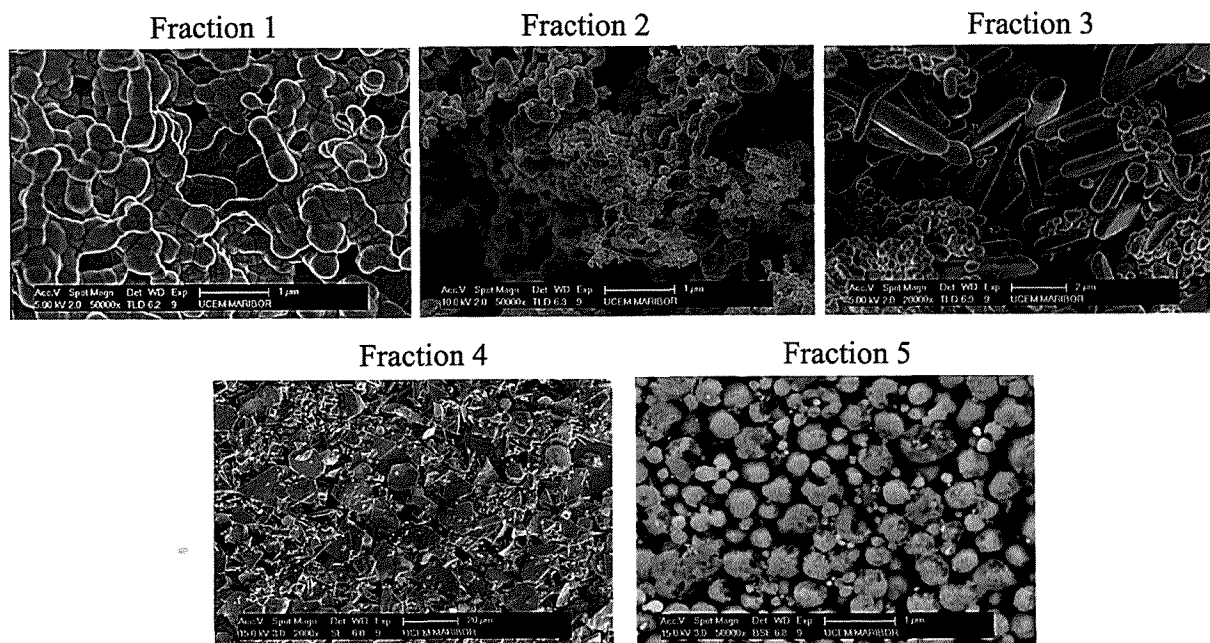


Fig. 1. Five fractions of gold nanoparticles obtained by USP. Representative images from SEM analysis are shown.

immune cells. Splenocytes were cultivated in the presence of the gold nanoparticles for 24 hours. This was followed by measurements of the metabolic activity and viability of the cells using the MTT assay and Trypan blue exclusion method, respectively. As shown in Figure 2, the MTT test showed that Fractions 1, 2 and 3 at both concentrations (10 $\mu\text{g/ml}$ and 50 $\mu\text{g/ml}$) were not cytotoxic for ConA-activated splenocytes. Fraction 4, however, inhibited moderately the metabolic activity of splenocytes only at the higher concentration, whereas Fraction 5 inhibited the metabolic activity of splenocytes at both concentrations, in a dose dependent manner.

Similar results were obtained by using the Trypan blue exclusion method (Fig. 3). It can be seen that Fractions 1, 2 and 3 at both concentrations and Fraction 4 at the lower concentration were not cytotoxic for ConA-treated splenocytes, as judged by the preserved viability of the cells. The higher concentration of Fraction 4 and both

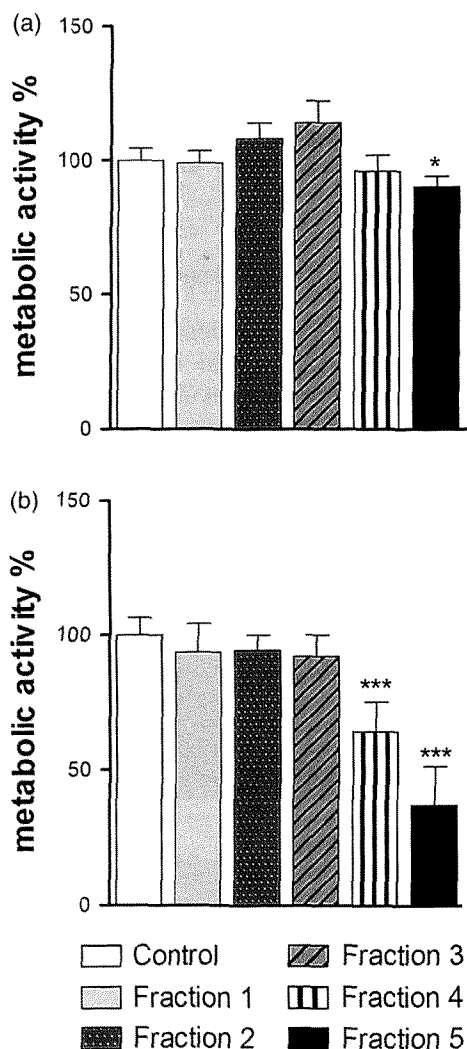


Fig. 2. Effect of (a) 10 $\mu\text{g/ml}$ and (b) 50 $\mu\text{g/ml}$ of gold nanoparticles' fractions on the metabolic activity of ConA-treated splenocytes after 24 hours in culture. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ compared to the corresponding control.

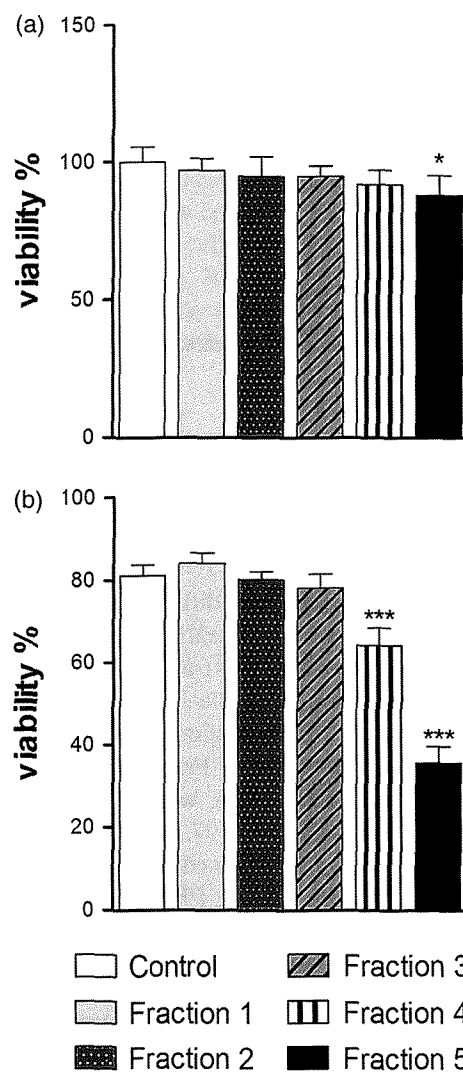


Fig. 3. Effect of (a) 10 $\mu\text{g/ml}$ and (b) 50 $\mu\text{g/ml}$ of gold nanoparticles' fractions on the viability of ConA-treated splenocytes after 24 hours in culture. * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$ compared to the corresponding control.

concentrations of Fraction 5 were cytotoxic, since cell viability was decreased significantly, especially in culture, with Fraction 5. The cytotoxic effects of the nanoparticles were easier to detect when the higher concentrations were used (as in the case of Fraction 4), so we decided to use the concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$ in all other experiments.

In the next step, we studied the mode of cell death (apoptosis and necrosis) induced by the cytotoxic fractions. As shown in Figure 4(a), the control splenocytes had a relatively high spontaneous apoptosis after 24 hour cultivation *in vitro* (31.4 \pm 4.6%). An interesting finding was that Fractions 4 and 5 induced different modes of cell death, namely, Fraction 4 increased the apoptosis of splenocytes significantly compared to the control in contrast to all other fractions. Both Fractions 4 and 5 induced necrosis but the cytotoxic effect of Fraction 5 was much stronger (Fig. 4(b)).

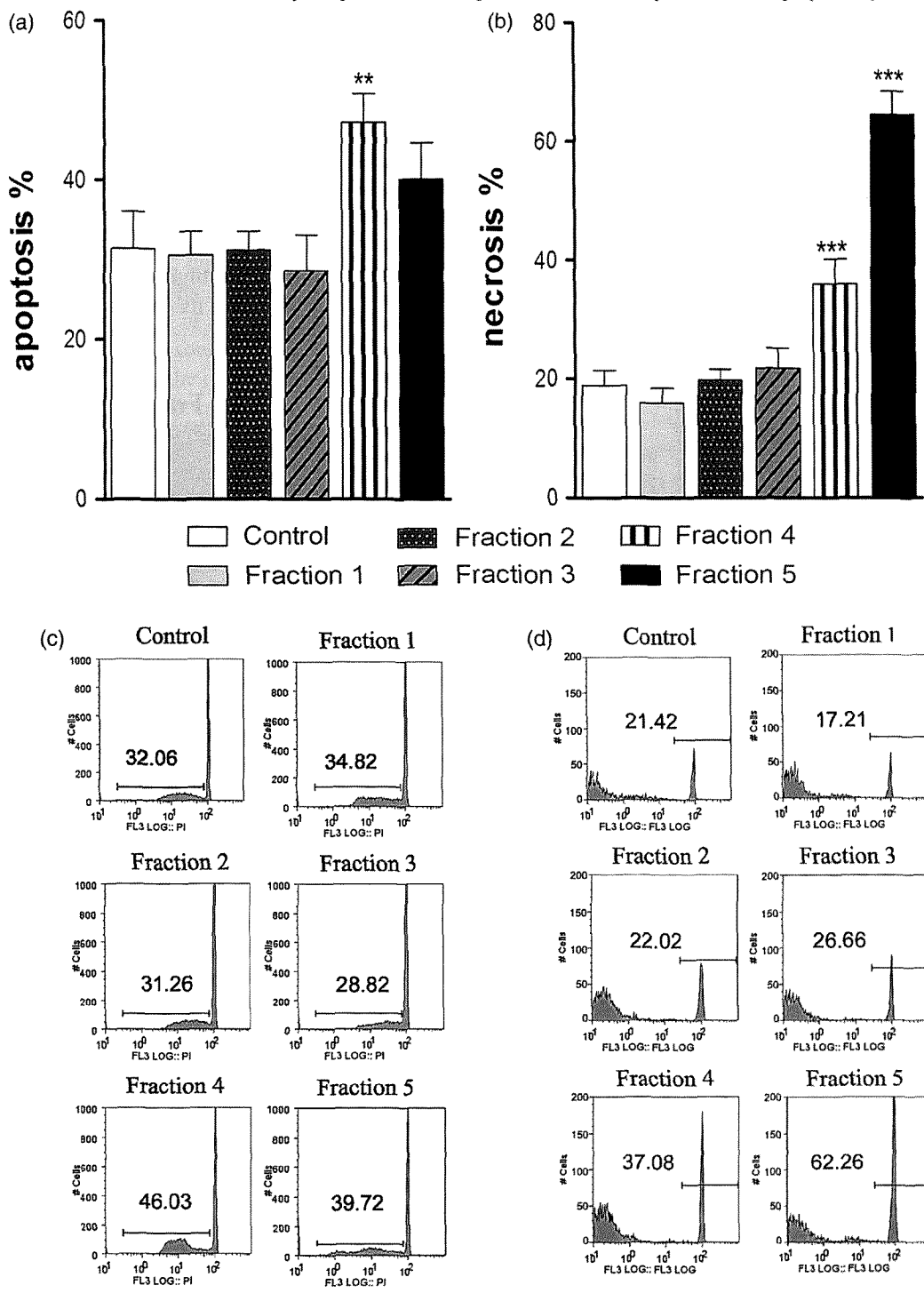


Fig. 4. Effect of gold nanoparticles' fractions (50 µg/ml), on the apoptosis and necrosis of ConA-treated splenocytes after 24 hours in culture. (a) The percentage of apoptotic and (b) necrotic cells is shown, summarizing the data from three independent experiments. The flow cytometry data from one representative experiment on (c) apoptosis and (d) necrosis is shown. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.005 compared to the corresponding control.

3.3. Effects of Gold Nanoparticles' Fractions on the Proliferation of Splenocytes

As Fractions 1, 2 and 3 did not exert acute cytotoxic effect on ConA-treated splenocytes we examined the effect of these fractions on the proliferation of these cells. As shown in Figure 5, all fractions suppressed cell proliferation,

though Fraction 1 showed the lowest and Fractions 4 and 5 the highest inhibitory effect.

3.4. Effects of Gold Nanoparticles' Fractions On Cytokines' Production by Splenocytes

To evaluate the immunomodulatory effects of the nanoparticles, the production of IFN-γ, IL-4, IL-2 and IL-10 was

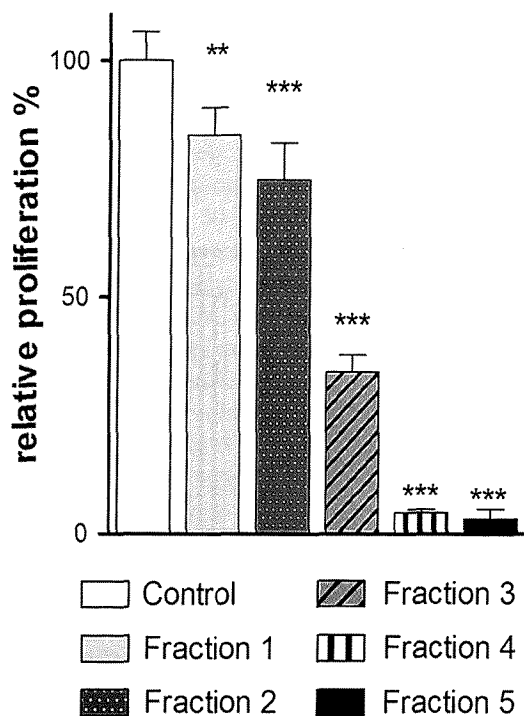


Fig. 5. Effect of 50 $\mu\text{g/ml}$ of gold nanoparticles' fractions on the proliferation of ConA-treated splenocytes. Data from three independent experiments are presented as relative proliferation compared to the control. $**p < 0.01$, $***p < 0.005$ compared to the corresponding control.

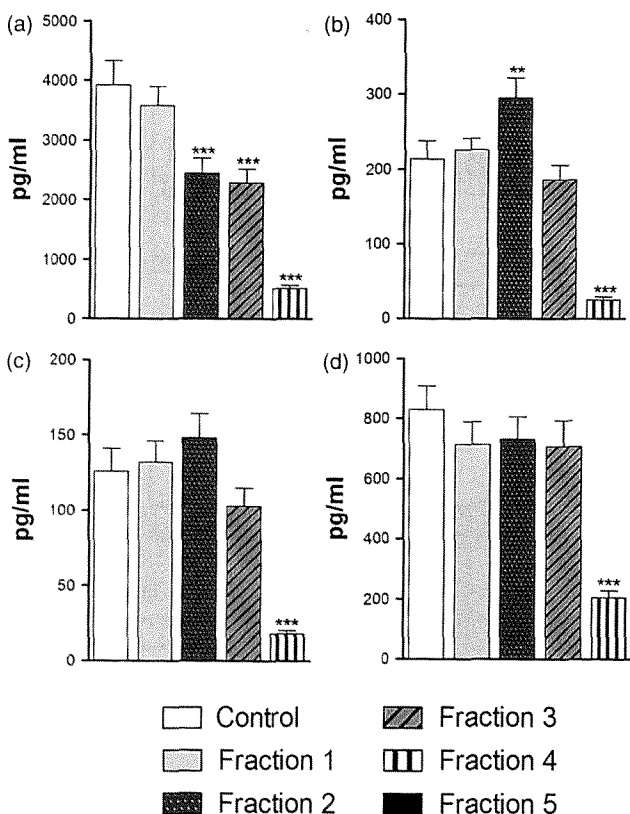


Fig. 6. Effect of 50 $\mu\text{g/ml}$ of gold nanoparticles' fractions on the production of (a) IL-2, (b) IL-10, (c) IL-4 and (d) IFN- γ by ConA-stimulated splenocytes. Data from three independent experiments are shown. $**p < 0.01$, $***p < 0.005$ compared to the corresponding control.

evaluated from the culture supernatants (Figs. 6(a-d)). The results showed that Fraction 1 did not modulate the production of the cytokines. On the other hand, Fraction 2 down-regulated significantly the production of IL-2 and stimulated the production of IL-10. Fraction 3 suppressed the production of IL-2, but did not alter the production of other cytokines (Figs. 6(a-d)), whereas Fraction 4 down-regulated the production of all tested cytokines. As Fraction 5 induced the highest cytotoxicity in this study, predominantly necrosis, its effect on the cytokine production was not evaluated.

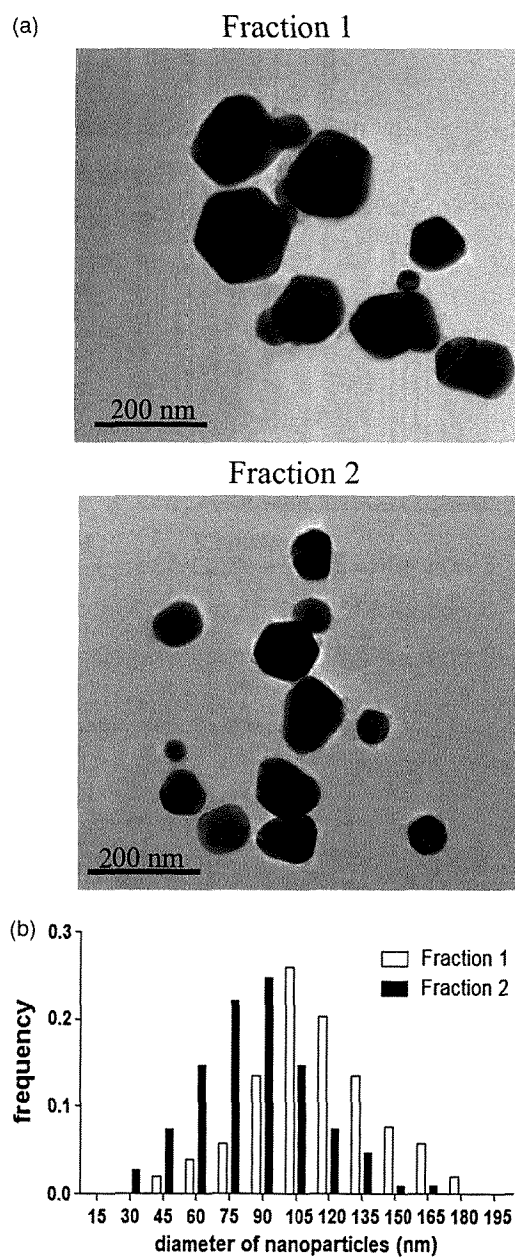


Fig. 7. Microstructural differences between gold nanoparticles from Fraction 1 and Fraction 2. (a) Representative TEM images are shown. (b) Frequency distribution of the diameter of nanoparticles is shown, calculated from the measurements of at least 150 nanoparticles of each fraction.

3.5. Effect of Ultrasonic Frequency on the Diameter of Pure Gold Nanoparticles

Finally, we studied what were the key differences between the nanoparticles of Fractions 1 and 2 in order to explain their different immunomodulatory behavior. Those two fractions were composed of pure gold, as confirmed by EDX analysis;¹¹ (Table I), but were produced under different ultrasonic frequencies during the USP process. Based on the initial assumptions (Materials and Methods, Section 2.1), at the frequency of 0.8 MHz, the calculated value of the ultrasonically dispersed droplet diameter is $D = 4.79 \mu\text{m}$. An increase of the operating frequency from $f = 0.8 \text{ MHz}$ to $f = 2.5 \text{ MHz}$ decreases the aerosol droplet size from $D = 4.79 \mu\text{m}$ to $2.26 \mu\text{m}$. Consequently, the calculated mean particle diameter for Fraction 1 amounts to 112.8 nm. Under the same conditions, for the frequency $f = 2.5 \text{ MHz}$, the calculated mean particle diameter for Fraction 2 decreased to 53.2 nm. To check the calculated values, we performed additional analysis of the nanoparticles from Fractions 1 and 2 by TEM (Fig. 7(a)). The analysis confirmed that the particles in Fraction 1 were larger in diameter (115.1 ± 28.1) and a little more agglomerated compared to the particles from Fraction 2 (83.7 ± 25.8). In general, the sizes of the nanoparticles obtained by the TEM analysis were smaller and the agglomeration was less noticeable compared to the results obtained by SEM. Comparative analysis of Fractions 1 and 2 diameters' (Fig. 7(b)) revealed that Fraction 2 contained a higher frequency of the nanoparticles sized up to 100 nm, whereas Fraction 1 contained a higher frequency of the nanoparticles larger than 100 nm. One sample *t* test stated that the size of Fraction 2 was significantly different from the predicted value ($p < 0.05$).

4. DISCUSSION

In our previous paper,¹¹ we found that USP is an innovative and appropriate technology for the synthesis of pure gold nanoparticles, even from gold scrap. Additionally, some fractions of nanoparticles were contaminated with alloying elements originating from the production process or the initial composition of the gold scrap. The aim of the present study was to examine further the toxicological and immunomodulatory profiles of the gold nanoparticles prepared by USP.

In general, the biological effects of nanoparticles could be related to the ions released from the nanoparticles, and thus these effects depend greatly on the composition of the nanoparticles. Alternatively, some of the effects could be a result of interactions between the nanoparticles and cellular macromolecules, and these are common even for nanoparticles made of inert material such as gold.² In this paper we showed that the pure gold nanoparticles of Fractions 1 and 2 did not cause a direct cytotoxic effect on ConA-treated splenocytes at the tested concentrations after

24 hours. This was confirmed by both the preserved viability and metabolic activity of these cells. These results are in accordance with our previous study on rat thymocytes and L929 cells,¹¹ as well as with other publications,¹²⁻¹⁴ showing that pure gold nanoparticles do not cause acute cytotoxicity. One of the reasons could be the fact that Au ions are hardly releasable in culture medium, as we showed previously using the high noble Au-based alloy.²⁸ Additionally, here we showed that these two fractions of gold nanoparticles are not completely inert in culture conditions, as they both reduced the proliferation of ConA-treated splenocytes. ConA is a strong mitogen and polyclonal activator of T cells in the presence of APCs. T cell proliferation is triggered by cross-linking T cell receptor and other molecules both on T cells and APCs.²⁴ We believe that the anti-proliferative effect of Fractions 1 and 2 is related to the modulation of APCs function and/or viability as a consequence of the prolonged occurrence of these gold nanoparticles inside phagocytic cells, including dendritic cells as key APCs. Phagocytic cells reside in the spleen and are present in the whole suspension of splenocytes. Although gold is the most noble metal, it is also the most electronegative metal we know, comparable with iodine. Consequently, the surface of these particles is coated quickly with various molecules from the surrounding media,³⁰ which facilitates their ingestion through the receptor-mediated endocytosis.³¹ Intracellularly, gold nanoparticles were shown to interact with actin fibres,³² DNA,³³ and to alter the redox status of cells,³⁴ affecting their viability or proliferation.

In support of the notion that our pure gold nanoparticles had predominantly immunomodulatory and not cytotoxic effect is the fact that both Fraction 1 and Fraction 2 reduced significantly the production of IL-2 in culture, a cytokine able to induce and support the proliferation of lymphocytes.³⁵ The main sources of IL-2 are lymphocytes themselves which, upon stimulation by activated APCs, proliferate and increase the expression of CD25 (α subunit of IL-2 receptor).³⁶ In the absence of activation, APCs can induce active tolerance, a state of unresponsiveness to signals considered not to be dangerous.³⁷ Based on these facts, it can be postulated that Fractions 1 and 2 enhanced the tolerogenic properties of APCs. This hypothesis finds its basis in a paper published recently showing that pure gold nanoparticles down-regulated the secretion of IL-12 by mouse bone marrow-derived DCs, although these nanoparticles were not cytotoxic, nor did they induce activation of DCs.³⁸

Although Fractions 1 and 2 were produced similarly, at 300 °C in a hydrogen atmosphere, they differed significantly in their diameter due to the different ultrasonic frequencies generated during their production (0.8 MHz and 2.5 MHz, respectively). Since the same starting concentration of gold scrap was used, the size of gold nanoparticles was decreased as a result of the reaction in a smaller

droplet produced under the higher frequency.²⁶⁻²⁷ Astonishingly, this change of the diameter resulted in completely different immunomodulatory properties of these particles in cell cultures. Chithrani et al.³⁹ showed that gold nanoparticles of 50 nm in size are better taken up by HeLa cells than the larger or smaller ones. In addition, it was also shown that smaller particles have a higher surface over volume ratio, leading to a greater reactive surface when the same mass of gold is internalized.⁴⁰⁻⁴¹ We showed using TEM analysis that Fraction 2 contained a higher frequency of nanoparticles sized up to 100 nm, including 3.8 times more particles 50 nm in size, compared to Fraction 1. The diameters obtained by TEM analysis were somewhat smaller compared to those obtained by SEM analysis, which is also known from the literature.⁴² Additionally, the SEM analysis showed that the nanoparticles from Fraction 1 were more agglomerated compared to Fraction 2. This was also confirmed by TEM, although both fractions of nanoparticles appeared much less agglomerated, most probably due to the different preparation procedure which was applied. However, it should be pointed out that the properties of nanoparticles from Fractions 1 and 2 were not analyzed in hydrodynamic conditions such as the cell culture medium. The dispersibility of both fractions, as observed by inverted microscopy, was improved in the complete RPMI medium containing FCS (data not shown). These results confirmed the previous observations⁴³ that serum components, such as bovine serum albumin (BSA) or FCS, decreased the agglomeration of gold nanoparticles due to the adsorption of proteins to their surface.

The different effects of gold nanoparticles from Fractions 1 and 2, especially on the production of IL-10 an anti-inflammatory cytokine, could be due to their quantitatively different uptake by phagocytic cells and/or size-dependent reactivity of its particles. It can also be hypothesized that the particles of Fraction 2, due to their better dispersibility were better taken up by the cells, since larger agglomerates, especially in Fraction 1, could not be phagocytosed. Therefore, the dispersibility improvement of gold nanoparticles is an imperative for better understanding of their immunomodulatory effects.

The differences between the calculated and experimentally obtained values of the diameters of gold nanoparticles could be due to the approximate values used for surface tension and density of the aqueous solution, micro-porosity of nanoparticles and, especially, due to the agglomeration of aerosol droplets at a high flow rate for the carrier gas (turbulence effects). Furthermore, the influence of temperature on the mean nanoparticle size was not taken into account. In order to decrease the difference between the calculated and experimentally obtained sizes of gold nanoparticles, the aerosol droplet size obtained from the initial solution should be measured precisely by laser diffraction and used in the above-mentioned calculations. Additionally, the presence of rods and discs in

some fractions of gold nanoparticles represents news interesting for an application. However, their presence makes the calculation and comparison of the particles' size more difficult than usual.

For the explanation of the toxicological profile of gold nanoparticles which contained metal impurities, one should consider not only the effect of ingested nanoparticles, but also the effect of metal ions released from the particles, either in the culture medium or intracellularly following phagocytosis. Fraction 3 contained not only pure gold nanorods and nanospheres, but also some spherical nanoparticles alloyed with Cu (3 at.%) as well. Fraction 3 was also not cytotoxic, but this fraction had a much stronger immunomodulatory activity. A small amount of Cu released in the culture medium, or intracellularly, could be one of the reasons. It was shown that the excess amounts of Cu may cause toxic effects due to their free radical generating ability through a Fenton type reaction which damages DNA and other macromolecules.⁴⁴ It was also shown that Cu ions are toxic to L929 cells and gingival fibroblasts only at relatively high concentrations (0.33–1 mmol l⁻¹).⁴⁵ Therefore, the absence of cytotoxic effect of Fraction 3 could be explained by the fact that the concentration of Cu ions released in the culture medium was not sufficient to trigger cytotoxicity due to compensating mechanisms already present in the cells (i.e., anti-oxidative protection). On the other hand, this Cu concentration could be high enough to inhibit cellular proliferation through its interactions with enzymes, DNA, or through alteration of the cellular oxidative status.

The anti-proliferative effect of Fraction 3 could also be due to the interactions of ingested particles with the cellular macromolecules, as in the case of Fractions 1 and 2. If the ingested particles are the cause of the inhibition of proliferation, it is likely that this does not come from the rod-shaped gold particles, but rather from the spherical ones (362 nm ± 169 nm), because micron-sized rod-shaped particles are taken up very poorly due to the greater membrane wrapping time required to enclose elongated particles.⁴⁶ Frequency analysis of particles' size from Fraction 3 (data not presented) showed that this fraction contained up to 20% of pure gold rod-shaped particles 3.6 μm ± 2.0 μm in length and 0.7 μm ± 0.2 μm in width. The reduction of IL-2 production in the splenocytes cultures surely contributed to the anti-proliferative effect of Fraction 3, but whether this is a primary or secondary property of this fraction as yet remains unknown. The toxicity of Fraction 4 and Fraction 5 is most probably a result of the predominant effect of contaminating micro-alloying elements, which could act synergistically. Fraction 4, which contained Au (59.4 at.%) and Ag (31.5 at.%), was micron in size and shaped irregularly. The most probable cause of the cytotoxicity of Fraction 4 was due to the Ag ions released from the particles. This hypothesis is based on several studies which confirmed that Ag

could be released from dental alloys and that Ag ions exert cytotoxicity.^{47–48} Fraction 4 also reduced the levels of all cytokines evaluated in this work and it is most likely that the cytotoxicity is the primary reason for such an effect.

The most toxic effect of Fraction 5 could be explained by the synergistic effect of different elements such as Ni, Zn, and Cu. All these elements are toxic and their effect depends on the type of cells and concentrations of released ions from alloys, as well as the duration of their exposure to cells in culture.^{49–51}

Fractions 4 and 5 induced different modes of cell death. Fraction 4 potentiated apoptosis, whereas Fraction 5 induced mostly necrosis of the splenocytes. It was shown that cells triggered to undergo apoptosis will die by necrosis when the intracellular energy level is low (depletion of ATP).⁵² Based on these results, it can be postulated that high concentrations of Cu and Ni released in the culture medium from Fraction 5 blocked the mitochondrial or glycolytic ATP generation and caused necrosis. When the levels of toxic ions were lower, the threshold ATP concentration was sufficient to execute the apoptotic program. The impure fractions of gold nanoparticles could be reintroduced easily in the USP recycling process, for which we are carrying out further investigations.

5. CONCLUSION

Our results suggest that the recycling of gold scrap by USP enables the production of pure gold nanoparticles with controlled sizes. A detailed micro-structural analysis and cytotoxicity studies were necessary for the proper selection of more toxic nanoparticles contaminated with micro-alloying elements. Apart from cytotoxicity, it was necessary to evaluate the immunomodulatory potential of gold nanoparticles, since non-cytotoxic gold nanoparticles can have various immunomodulatory effects, depending on their shape, size and purity.

We showed that ConA-stimulated rat splenocytes could be used easily as a reliable and sensitive screening model for both cytotoxicity and immunomodulatory studies. Pure gold nanoparticles were not cytotoxic, but they induced substantially different cytokine responses. As predicted from the theoretical model, the higher ultrasonic generating frequency caused the formation of nanoparticles that were smaller in diameter and less agglomerated. Astonishingly, this change in the nanoparticles' morphology and solubility resulted in different immunomodulatory properties. Therefore, these results could be a good starting point for improving the USP technology for gold nanoparticle production and for studying the mechanisms of their biological effects.

Acknowledgments: This article has been supported by the EUREKA Program GoNano E!4953 and by a Project of the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Project No. 175102). The

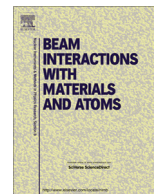
authors thank Zlatarna Celje d.d., Celje, Slovenia, working on the development of new gold nanoparticles. The authors thank Professor Dr. Monika Jenko and associates from the Institute of Metals and Technology, Ljubljana, Slovenia and RWTH Aachen, Germany. The authors also acknowledge gratefully the Ministry of Higher Education, Science and Technology of Slovenia, and the Slovenian Research Agency and Slovene Human Resources Development and Scholarship Fund for their contributing support.

References and Notes

1. V. Lukyanenko, Delivery of nano-objects to functional sub-domains of healthy and failing cardiac myocytes. *Nanomedicine (Lond)* 2, 831 (2007).
2. R. A. Sperling, P. Rivera Gil, F. Zhang, M. Zanella, and W. J. Parak, Biological applications of gold nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 37, 1896 (2008).
3. L. Y. Chan, J. J. Sung, F. K. Chan, K. G. To, J. Y. Lau, and S. C. Chung, Tissue injury of Injection Gold Probe. *Gastrointest Endosc* 48, 291 (1998).
4. M. Bruchez, Jr., M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, and A. P. Alivisatos, Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 281, 2013 (1998).
5. M. Karhanek, J. T. Kemp, N. Pourmand, R. W. Davis, and C. D. Webb, Single DNA molecule detection using nanopipettes and nanoparticles. *Nano Lett.* 5, 403 (2005).
6. T. A. Taton, G. Lu, and C. A. Mirkin, Two-color labeling of oligonucleotide arrays via size-selective scattering of nanoparticle probes. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 5164 (2001).
7. M. A. Syed and S. H. Bokhari, Gold nanoparticle based microbial detection and identification. *J. Biomed. Nanotechnol.* 7, 229 (2011).
8. J. Panyam and V. Labhasetwar, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55, 329 (2003).
9. P. H. Yang, X. Sun, J. F. Chiu, H. Sun, and Q. Y. He, Transferrin-mediated gold nanoparticle cellular uptake. *Bioconjug. Chem.* 16, 494 (2005).
10. N. Kohler, C. Sun, J. Wang, M. Zhang, Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. *Langmuir* 21, 8858 (2005).
11. R. Rudolf, B. Friedrich, S. Stopic, I. Anzel, S. Tomic, M. Colic, Cytotoxicity of Gold Nanoparticles Prepared by Ultrasonic Spray Pyrolysis. *J. Biomater. Appl.* (2010).
12. E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy, and M. D. Wyatt, Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* 1, 325 (2005).
13. A. G. Tkachenko, H. Xie, Y. Liu, D. Coleman, J. Ryan, W. R. Glomm, M. K. Shipton, S. Franzen, and D. L. Feldheim, Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains. *Bioconjug. Chem.* 15, 482 (2004).
14. R. Shukla, V. Bansal, M. Chaudhary, A. Basu, R. R. Bhonde, and M. Sastry, Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir* 21, 10644 (2005).
15. H. K. Patra, S. Banerjee, U. Chaudhuri, P. Lahiri, and A. K. Dasgupta, Cell selective response to gold nanoparticles. *Nanomedicine* 3, 111 (2007).
16. C. M. Goodman, C. D. McCusker, T. Yilmaz, and V. M. Rotello, Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjug. Chem.* 15, 897 (2004).
17. Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, M. Fischler, F. Wen, U. Simon, G. Schmid, W. Brandau, and W. Jahnen-Dechent, Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3, 1941 (2007).

18. S. Maiti, Nanotoxicity of gold and iron nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* 7, 65 (2011).
19. A. A. Shvedova, J. P. Fabisiak, E. R. Kisin, A. R. Murray, J. R. Roberts, Y. Y. Tyurina, J. M. Antonini, W. H. Feng, and C. Kommineni, J. Reynolds, A. Barchowsky, V. Castranova, and V. E. Kagan, Sequential exposure to carbon nanotubes and bacteria enhances pulmonary inflammation and infectivity. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 38, 579 (2008).
20. P. Elamanchili, M. Diwan, M. Cao, and J. Samuel, Characterization of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells. *Vaccine* 22, 2406 (2004).
21. T. Schneider, A. Becker, K. Ringe, A. Reinhold, R. Firsching, and B. A. Sabel, Brain tumor therapy by combined vaccination and anti-sense oligonucleotide delivery with nanoparticles. *J. Neuroimmunol.* 195, 21 (2008).
22. J. J. Ryan, H. R. Bateman, A. Stover, G. Gomez, S. K. Norton, W. Zhao, L. B. Schwartz, R. Lenk, and C. L. Kepley, Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response. *J. Immunol.* 179, 665 (2007).
23. M. Jenny, S. Schroecksadel, and D. Fuchs, Testing for immunomodulatory properties of nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* 7, 11 (2011).
24. J. Antic Stankovic, D. Vucevic, I. Majstorovic, S. Vasilijic, and M. Colic, The role of rat Crry, a complement regulatory protein, in proliferation of thymocytes. *Life Sci.* 75, 3053 (2004).
25. S. Stopic, B. Friedrich, K. Raic, T. Vulkov-Husovic, and M. Dimitrijevic, Characterisation of nano-powder morphology obtained by ultrasonic spray pyrolysis. *J. Metallurgy* 14, 41 (2008).
26. R. L. Peskin and R. J. Raco, Ultrasonic atomization of liquids. *J. Acoust. Soc. America* 35, 1378 (1963).
27. G. L. Messing, S. C. Zhang, and G. V. Jayanthi, Ceramic powder synthesis by spray pyrolysis. *Journal of the American Ceramic Society* 76, 2707 (1993).
28. M. Čolić, D. Stamenkovic, I. Anzel, G. Lojen, and R. Rudolf, The influence of the microstructure of high noble gold-platinum dental alloys on their corrosion and biocompatibility *in vitro*. *Gold Bulletin* 42, 34 (2009).
29. M. Čolić, S. Tomic, R. Rudolf, I. Anzel, and G. Lojen, The response of macrophages to a Cu-Al-Ni shape memory alloy. *J. Biomater. Appl.* 25, 269 (2010).
30. A. M. Alkilany, P. K. Nalaria, C. R. Hexel, T. J. Shaw, C. J. Murphy, and M. D. Wyatt, Cellular uptake and cytotoxicity of gold nanorods: Molecular origin of cytotoxicity and surface effects. *Small* 5, 701 (2009).
31. S. D. Conner and S. L. Schmid, Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37 (2003).
32. J. F. Hainfeld, D. N. Slatkin, and H. M. Smilowitz, The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys. Med. Biol.* 49, N309 (2004).
33. M. Tsoli, H. Kuhn, W. Brandau, H. Esche, and G. Schmid, Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters. *Small* 1, 841 (2005).
34. N. Pernodet, X. Fang, Y. Sun, A. Bakhtina, A. Ramakrishnan, J. Sokolov, A. Ulman, and M. Rafailovich, Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small* 2, 766 (2006).
35. R. Mertelsmann and K. Welte, Human interleukin 2: Molecular biology, physiology and clinical possibilities. *Immunobiology* 172, 400 (1986).
36. B. H. Nelson and D. M. Willerford, Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv. Immunol.* 70, 1 (1998).
37. C. Reis e Sousa, Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 476 (2006).
38. C. Villiers, H. Freitas, R. Couderc, M.-B. Villiers, and P. N. Marche, Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: Effect on dendritic cell functions. *J. Nanopart. Res.* 12, 55 (2010).
39. B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, and W. C. Chan, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 6, 662 (2006).
40. D. L. Thorek and A. Tsourkas, Size, charge and concentration dependent uptake of iron oxide particles by non-phagocytic cells. *Biomaterials* 29, 3583 (2008).
41. W. Jiang, B. Y. Kim, J. T. Rutka, and W. C. Chan, Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol.* 3, 145 (2008).
42. M. J. Iqbal and M. N. Ashiq, Physical and electrical properties of Zr-Cu substituted strontium hexaferrite nanoparticles synthesized by co-precipitation method. *Chem. Eng. J.* 136, 383 (2007).
43. D. Mahl, C. Greulich, W. Meyer-Zaika, M. Koller, and M. Epple, Gold nanoparticles: Dispersibility in biological media and cell-biological effect. *J. Mater. Chem.* 20, 6176 (2010).
44. B. Banu, M. Ishaq, K. Danadevi, P. Padamavathi, and Y. Ahuja, DNA damage in leukocytes of mice treated with copper sulphate. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1931 (2004).
45. M. Tréguer-Delapierre, J. Majimel, S. Mornet, E. Duguet, S. Ravaine, Synthesis of non-spherical gold nanoparticles. *Gold Bulletin* 41, 195 (2008).
46. A. Verma and F. Stellacci, Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small* 6, 12 (2010).
47. J. C. Wataha, P. E. Lockwood, A. Schedle, M. Noda, and S. Bouillaguet, Ag, Cu, Hg and Ni ions alter the metabolism of human monocytes during extended low-dose exposures. *J. Oral. Rehabil.* 29, 133 (2002).
48. J. C. Wataha, P. E. Lockwood, and A. Schedle, Effect of silver, copper, mercury, and nickel ions on cellular proliferation during extended, low-dose exposures. *J. Biomed. Mater. Res.* 52, 360 (2000).
49. J. C. Wataha, P. E. Lockwood, S. Bouillaguet, and M. Noda, *In vitro* biological response to core and flowable dental restorative materials. *Dent. Mater.* 19, 25 (2003).
50. G. Schmalz, D. Arenholt-Bindslev, K. A. Hiller, and H. Schweikl, Epithelium-fibroblast co-culture for assessing mucosal irritancy of metals used in dentistry. *Eur. J. Oral. Sci.* 105, 86 (1997).
51. J. C. Wataha, Biocompatibility of dental casting alloys: A review. *J. Prosthet. Dent.* 83, 223 (2000).
52. M. Leist, B. Single, A. F. Castoldi, S. Kuhnle, and P. Nicotera, Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: A switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* 185, 1481 (1997).

Received: 23 July 2011. Accepted: 9 October 2011.



Quantitative assay of element mass inventories in single cell biological systems with micro-PIXE



Nina Ogrinc^{a,e}, Primož Pelicon^{a,*}, Primož Vavpetič^a, Mitja Kelemen^a, Nataša Grlj^a, Luka Jeromel^a, Sergej Tomić^b, Miodrag Čolić^{b,c}, Alfred Beran^d

^a Jožef Stefan Institute, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

^b Medical Faculty of the Military Medical Academy, University of Defense, Crnotravska 17, Belgrade, Serbia

^c Medical Faculty, University of Niš, Boulevard of Dr. Zoran Djindjić 81, 18000 Niš, Serbia

^d Dipartimento di Oceanografia Biologica, Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, Via Auguste Piccard 54, 34151 Trieste, Italy

^e LOTRIČ Metrology, Selca 163, SI-4227 Selca, Slovenia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 July 2012

Received in revised form 29 November 2012

Accepted 5 December 2012

Available online 30 January 2013

Keywords:

Gold nanoparticles

Tintinnopsis radix

Zooplankton

Lorica

Element inventory

Dendritic cells

Particle induced X-ray emission-PIXE

Elastic backscattering spectroscopy-EBS

Scanning transmission ion microscopy-STM

Focused proton beam

Trace elements

Titanium dioxide particles

ABSTRACT

Elemental concentrations in micro-PIXE (Particle Induced X-ray Emission) maps of elements in biological tissue slices have been determined using auxiliary information on the sample matrix composition from EBS (Elastic Backscattering Spectroscopy) and STM (Scanning Transmission Ion Microscopy). The thin sample approximation may be used for evaluating micro-PIXE data in cases, where X-ray absorption in the sample can be neglected and the mass of elements in a selected area can be estimated. The resulting sensitivity amounts to an impressive 10^{-12} g of the selected elements. Two cases are presented as examples. In the first, we determined the total mass of gold nanoparticles internalized by human monocyte-derived dendritic cells (MDDC). In the second, an inventory of the mass of elements in the micro-particulate material adsorbed at the wall of the lorica of the microzooplankton species *Tintinnopsis radix* has been created.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Particle-Induced X-ray Emission Spectroscopy (PIXE) is a highly sensitive analytical technique used for measuring trace elements in various types of materials [1]. The method is usually run in parallel with the detection of elastically scattered protons from the sample (Elastically Backscattering Spectroscopy – EBS) and with the measurement of the energy loss of protons in the sample (Scanning Transmission Ion Microscopy – STM) [2]. These two methods provide essential information about the composition and the thickness of the sample matrix, which enables element concentrations to be quantified by micro-PIXE on various types of biological samples [3], including slices of biological tissue [4,5], prepared according to well-known shock-freezing and freeze-drying protocols.

Biological materials often feature heterogeneous structures, which cannot be described by any of the standard PIXE sample

geometries such as flat bulk sample, flat sample of intermediate thickness or thin uniform sample. Under such conditions, micro-PIXE results are in many cases provided on a qualitative basis only, in the form of a two-dimensional distribution of elements, which are of only limited use for researchers in biomedicine.

In general, the common characteristic of organelles located in a cell is their size – of the order of several tens of micrometers. The removal of water on freeze drying results in a mass reduction to typically 70–90% of the original. The remaining thickness of the biological material amounts to several micrometers, consisting predominantly of organic compounds containing light elements H, C, N, O, and other elements with total summed mass concentrations not exceeding 100,000 $\mu\text{g/g}$. The absorption of X-rays with energies above 4 keV by the latter can be neglected without major impact on the precision. Under such conditions, samples may be treated as thin homogenous objects by PIXE analytical software [6,7] when absolute mass inventories of single cell systems can be extracted.

In this work, we demonstrate the suitability of the method for two distinct cases. In the first, human monocyte-derived dendritic

* Corresponding author. Tel.: +386 1 5885 294; fax: +386 1 5885 377.

E-mail address: primoz.pelicon@ijs.si (P. Pelicon).

cells (MDDC) were grown on substrates under controlled conditions in a medium containing diluted gold nanoparticles (GNPs) [8]. After a defined time, the cells were shock-frozen and freeze-dried. A quantitative element inventory of all detected elements in cells, including the mass of gold nanoparticles ingested, was of main interest.

The second case presents a micro-PIXE analysis of micro particles adsorbed on the lorica of *Tintinnopsis radix*, a marine microzooplankton species. *T. radix* (IMHOF 1886) emended BRANDT 1907, together with other species within tintinnids, constitute an important part of the microzooplankton in the marine foodweb. *T. radix* has an agglutinated lorica (Fig. 1), which consists of an organic matrix with embedded inorganic particles [9]. This particulate matter could be absorbed casually from the environment, or the organic matrix could be selective for trace elements, essential for the metabolism of the cell, for example Fe, which is a growth-limiting factor in the sea. A qualitative distribution of lighter elements in *T. radix* has been presented by Kaulich et al. using low-energy X-ray fluorescence microscopy [10]. Using the presented methodology, we estimated quantitatively the mass inventory of micro-particulate material adsorbed to the lorica. In both cases, the impressive sensitivity of the micro-PIXE method became evident.

2. Thin sample approximation

The photons emitted from a sample irradiated by a proton beam are characterized by the photon yield dY_i where i denotes the element in the target and dz the thickness of the target. The photon yield depends on the atomic density of element i under consideration, labeled by n_{at}^i , and can be calculated from Eq. (1):

$$dY_i = \frac{\Delta\Omega}{4\pi} N_p n_{at}^i \varepsilon_i \eta_i \sigma_i^x(z) e^{-\mu_i \xi(z)} dz \quad (1)$$

where $\Delta\Omega$ is the detector solid angle, ε_i the detector efficiency, η_i the transmission of the absorbers in front of the detector, N_p the number of protons that hit the sample during the measurement. The production of characteristic X-rays detected in the selected X-ray spectral line is defined by the corresponding X-ray production cross section $\sigma_i^x(z)$ and the part $e^{-\mu_i \xi(z)}$ describes the probability of the X-rays surviving absorption process in the sample material on the way out of the sample. The quantity μ_i is the X-ray attenuation coefficient on the exit path $\xi(z)$ towards the X-ray detector.

In the case of a thin sample the energy loss of protons is only a small fraction of their initial energy and the absorption of excited X-rays in the sample material can be neglected. Thus we can write $e^{-\mu_i \xi(z)} = 1$ and Eq. (1) becomes:

$$Y_i = \frac{\Delta\Omega}{4\pi} N_p n_{at}^i \varepsilon_i \eta_i \sigma_i^x(E_0) t \quad (2)$$

where t represents the thickness of the target. The yield can also be calculated by supplementing n_{at}^i with the areal density $\frac{N_{at}^i}{S}$ in Eq. (2):

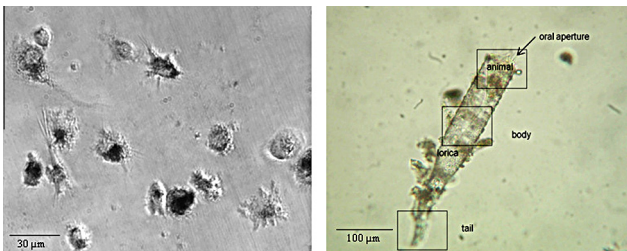


Fig. 1. Phase - contrast Microscopy image of MDDCs after ingestion of GNPs with an average size of 90 nm. Cells are deposited on mylar foil (left). Scanning Electron Microscopy (SEM) image of *Tintinnopsis radix* with indicated body parts (right).

$$n_{at}^i = \frac{N_{at}^i}{V} = \frac{N_{at}^i}{St}; \quad Y_i = \frac{\Delta\Omega}{4\pi} N_p \frac{N_{at}^i}{S} \varepsilon_i \eta_i \sigma_i^x(Z) \quad (3)$$

In the off-line analysis of the list-mode files, regions of interest enclosing a single cell could be selected in the element maps. Spectra are extracted from this region, as well as the proton dose N_p delivered to the region of interest. In the thin sample approximation, it is assumed that the distribution of the element inventory is in the form of a homogeneous thin target. The corresponding areal atomic density $\frac{N_{at}^i}{S}$ is calculated from the yield and the area S_{ROI} of the region of interest, where M^i is the molar mass of element i and A represents the Avogadro's number. The mass inventory m_i of the element i in the selected region of interest is:

$$m_i = \left(\frac{N_{at}^i}{S} \right) \frac{M^i}{A} S_{ROI} \quad (4)$$

3. Experimental

3.1. Sample preparation

4.4×10^5 MDDCs/mL were deposited on 1 μm thick sterilized mylar foils. The foils were pre-treated with a solution of gelatin to improve cell adhesion. They were then immersed in 20 μg/mL suspension of gold-nanoparticles of various sizes (10, 50, and 90 nm) and incubated for 2.5 h. The foils were then rinsed with polyphosphate buffered saline and pure water, dipped in liquid nitrogen for 20 s and moved into tubes. The samples were kept at -40°C prior to transporting to the micro-PIXE laboratory.

T. radix was isolated from net samples taken from the Gulf of Trieste, transferred into seawater filtered through 0.22 μm pore size filters (Millipore, Durapore GV) without the addition of food. Under these conditions the ciliates leave the lorica after about 3 days. Empty loricae were washed ($3 \times$) in ultrapure water, transferring them by micropipette, then dehydrated and fixed in a series of 30%, 50%, 70% ethanol, 10 min each. For observation, single loricae were pipetted in 80% ethanol, transferred and dried on a 100 nm thick Si_3N_4 window and scheduled for micro-PIXE analysis.

3.2. Micro-PIXE analysis

Micro-PIXE analysis was carried out with a nuclear microprobe at the Jožef Stefan Institute. Proton beams with 2.5 and 3 MeV energies were used and the beam diameter was varied between 1.2 μm and 2 μm, depending on the required proton current and the size of the scanning frame. Simultaneously, on-off axis STIM was applied as well as EBS [4,5]. Two PIXE spectra are extracted from a pair of X-ray detectors covering the energy range from 0.8 to 30 keV, as well as a spectrum from the chopper [11] to obtain the corresponding proton dose distributed over the selected area. The spectra are interpreted as thin targets within the PIXE analytical programs Geopix [6] and Gupix [7].

4. Results and discussion

Environmental pollution or human implantation can cause the cells to adsorb or engulf elements, either dissolved in the cellular media or in the form of particles, which do not normally occur *in vivo* conditions. The estimated mass inventories of these elements allow a quantitative insight into the dynamics of the specific element uptake processes, as well as the capacities of biological organisms to incorporate dosed materials or pollutants from their environment. In the case of MDDCs, GNPs are ingested by the cells from the surrounding media. GNPs have been the subject

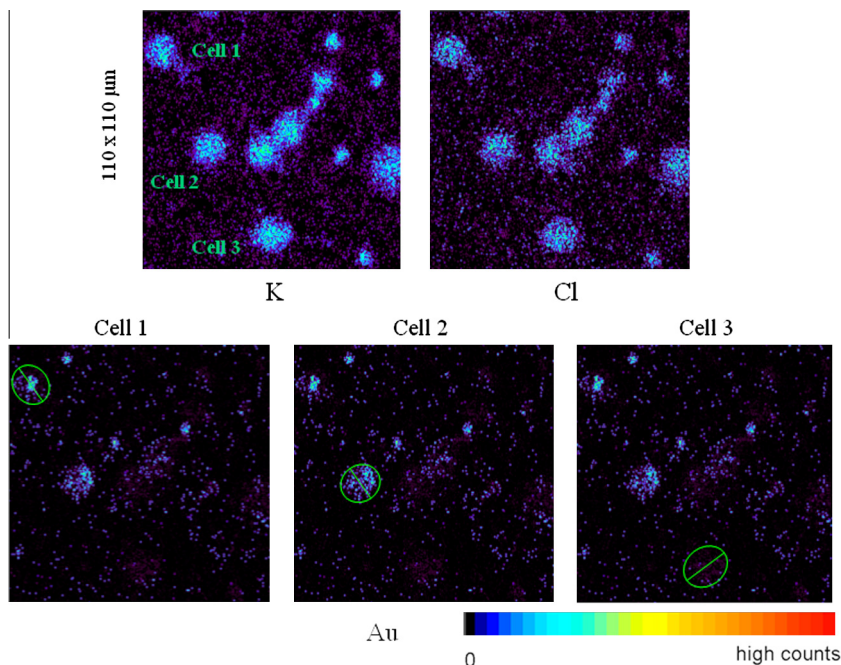


Fig. 2. Micro-PIXE distribution maps of elements in selected MDDCs containing 90 nm ingested GNPs, with the summed count rate below 500 Hz listed for all five detectors. The green ellipses indicate the selected areas.

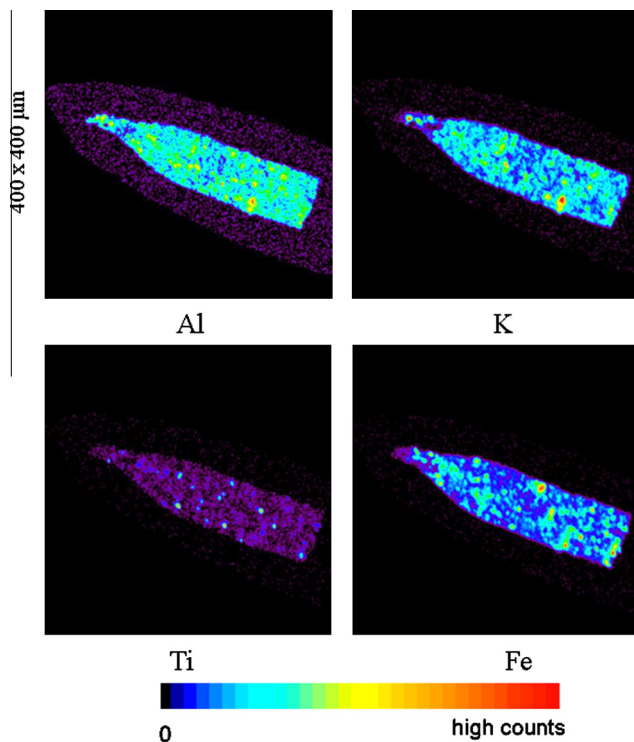


Fig. 3. Micro-PIXE distribution maps of elements on the lorica of the zooplankton species *Tintinnopsis radix*, with the summed count rate below 500 Hz listed for all five detectors.

of interest due to their biocompatibility and their medical applications as drug delivery systems.

As shown in Fig. 2, the shape and position of the cells can be observed from K and Cl element maps. The three selected cells are marked in the K map. The distribution of GNPs varies in the

selected cells, as is evident from the microscopic image of MDDC after ingestion of GNPs in Fig. 1. In cell No. 1 the gold has accumulated in a specific part of the cell, differently from cell No. 2 where the gold is distributed over the major part of the area covered by the cell. Table 1 lists the extracted masses of elements under consideration in the cells selected. As observed in Fig. 2 and Table 1, the quantity of ingested GNPs in cell No. 3 is below the limit of detection (LOD), estimated as 0.4 pg with Geopix and 0.9 pg with Gupix. The two programs agree well in the estimation for K and Cl inventories, with less than 1 pg difference. For heavier elements, such as Au, the difference between the calculations is between 0.5 and 1.1 pg, which is less than 10% of the total mass.

The quantitative elemental masses were also determined for the micro-particulate matter adsorbed at the lorica of zooplankton *T. radix*. Selected elements, indicating specific distributions of the micro-particulate particles attached to the lorica, were mapped (Fig. 3).

Apart from the detection of Na, Al, K, and Cl, which are abundant in seawater, there is evidence for an enrichment of trace elements including Fe, Mn, Cu, and Zn-essential for the co-enzymes in the matrix of the lorica. The mass inventories were calculated over the entire lorica area (Table 2). The predominant elements observed are K and Al. The large amount of Al are attributed to mineral weathering in sea water. A large content of Fe is also observed, which may be connected with the affinity of the organism for Fe-containing particles. The low concentration of Fe is a factor that limits growth of sea plankton and is essential for the activity of co-enzymes.

Some microparticles adsorbed on the lorica contain elements that are associated with anthropogenic impact on the environment. The presence of finely dispersed particles containing titanium may indicate the increasing environmental spread of titanium dioxide nanoparticles into the environment, including sea water [12]. Possible sources of titanium dioxide in the sea water include mineral washing into the sea and the extensive application, followed by dilution of sunscreens [13–15] containing TiO₂ in heavily populated touristic areas, such as Gulf of Trieste.

Table 1

Mass inventories, limits of detection and relative errors for the three MDDCs indicated in Fig. 2, and obtained using Geopix and Gupix analytical software.

Element		Cell 1			Cell 2			Cell 3		
		Mass (pg)	LOD (pg)	Error (%)	Mass (pg)	LOD (pg)	Error (%)	Mass (pg)	LOD (pg)	Error (%)
K	Geopix	3.8	<0.1	14	3.3	<0.1	14	5.9	<0.1	9.3
	Gupix	4.1	0.9	17	3.9	0.8	16	5.4	0.8	13
Cl	Geopix	1.7	<0.1	21	1.7	<0.1	22	3.5	<0.1	13
	Gupix	1.8	0.7	27	2.8	0.7	16	3.8	0.7	14
Au	Geopix	14.2	0.4	13	22.0	0.4	8.3	0.4	0.4	0.3
	Gupix	13	3	20	21	3	12	0.0	0.9	75

Table 2

Mass inventories, limits of detection and relative errors for the microparticulate matter adsorbed to the lorica of zooplankton species *Tintinopsis radix*, using Geopix software.

Element	<i>T. radix</i> lorica		
	Mass (pg)	LOD (pg)	Error (%)
Na	326	76	16
Al	6142	67	1.4
Cl	99	33	30
K	2158	19	2.7
Ti	152	3	1.7
Mn	21	3	8.8
Fe	2604	2	0.4
Cu	1.7	1.4	55
Zn	9.7	1.2	12

5. Conclusion

A method for determining element mass inventories in single-cell biological systems is presented that uses the thin sample approximation. The method is demonstrated on two systems: estimation of the mass of ingested gold nanoparticles by monocyte-derived dendritic cells and estimation of the mass of microparticulate matter adsorbed on the lorica of marine zooplankton species *T. radix*. The results underline the excellent sensitivity of micro-PIXE for determining elements, with LODs of the order of 1 pg.

Acknowledgments

This work has been supported by the European Community as an Integrating Activity 'Support of Public and Industrial Research Using Ion Beam Technology (SPIRIT)' under EC contract no. 227012. Support of the Slovenian Research Agency for the research

program P1-0112 and research infrastructure of the tandemron accelerator facility at the Microanalytical Centre is acknowledged. The participation of N.O. in the work has been financed by the European Union, European Social Fund. The nano-gold particle experiment was partially funded by Ministry of Education, Science and Technological Development, Serbia (p. no. 175102). We also thank Dr. R. Pain for editorial assistance.

References

- [1] S.A.E. Johansson, J.L. Campbell, PIXE, A novel Technique for Elemental Analysis, J. Wiley, Chichester, 1988.
- [2] J. Pallon, V. Auzelyte, M. Elfman, M. Gramer, P. Kristiansson, K. Malmqvist, C. Nilsson, A. Shariff, M. Wegdén, Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 219–220 (2004) 988–993.
- [3] A. Carmona, G. Deves, R. Ortega, Anal. Bioanal. Chem. 390 (2008) 1585–1594.
- [4] L. Lyubenova, P. Pongrac, K. Vogel-Mikuš, G. Kukec Mezek, P. Vavpetič, N. Grlj, P. Kump, M. Nečemer, M. Regvar, P. Pelicon, P. Schröder, Metallomics 4 (2012) 333–341.
- [5] B. Cestone, K. Vogel-Mikuš, M.K. Quartacci, N. Rascio, P. Pongrac, P. Pelicon, P. Vavpetič, N. Grlj, L. Jeromel, P. Kump, M. Nečemer, M. Regvar, F. Navari-Izzo, Sci. Total Environ. 427–428 (2012) 339–346.
- [6] C.G. Ryan, Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 181 (2001) 170–179.
- [7] J.L. Campbell, T.L. Hopman, J.A. Maxwell, Z. Nejedly, Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 170 (2000) 193–204.
- [8] R. Rudolf, B. Friederich, S. Stopić, I. Anžel, S. Tomić, M. Čolić, J. Biomater. Appl. 26 (2012) 595–612.
- [9] S. FondaUmani, A. Beran, Mar. Ecol. Prog. Ser. 247 (2003) 1–16.
- [10] B. Kaulich, A. Gianoncelli, A. Beran, D. Eichert, I. Kreft, P. Pongrac, M. Regvar, K. Vogel-Mikuš, M. Kiskinova, J. R. Soc. Interface 6 (2009) S641–S647.
- [11] K. Vogel-Mikuš, P. Pelicon, P. Vavpetič, I. Kreft, M. Regvar, Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B 267 (2009) 2884–2889.
- [12] N.C. Mueller, B. Nowack, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 4447–4453.
- [13] A.S. Foltête, J.F. Masfarau, E. Bigorgne, J. Nahmani, P. Chaurand, C. Botta, J. Labille, J. Rose, J.F. Férard, S. Cotelle, Environ. Pollut. 10 (2011) 2515–2522.
- [14] A. Menard, D. Drobne, A. Jemec, Environ. Pollut. 3 (2011) 677–684.
- [15] Nanomaterial case studies: nanoscale titanium dioxide in water treatment and in Topical Sunscreen (Final), United States Environmental Protection Agency, 2009. Available from: <http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=230972#Download>.



Size-Dependent Effects of Gold Nanoparticles Uptake on Maturation and Antitumor Functions of Human Dendritic Cells In Vitro

Sergej Tomić^{1,2}, Jelena Đokić¹, Saša Vasilijić^{1,2}, Nina Ogrinc^{3,4}, Rebeka Rudolf^{5,6}, Primož Pelicon³, Dragana Vučević^{1,2}, Petar Milosavljević², Srđa Janković⁷, Ivan Anžel⁵, Jelena Rajković⁸, Marjan Slak Rupnik⁹, Bernd Friedrich¹⁰, Miodrag Čolić^{1,8*}

1 Medical Faculty of the Military Medical Academy, University of Defense, Belgrade, Serbia, **2** Institute for Medical Research of the Military Medical Academy, University of Defense, Belgrade, Serbia, **3** Microanalytical Center, Jožef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia, **4** LOTRIČ Metrology, Selca, Slovenia, **5** Faculty of Mechanical Engineering, University of Maribor, Maribor, Slovenia, **6** Zlatarna Celje d.d., Celje, Slovenia, **7** University Children's Hospital, Belgrade, Serbia, **8** Medical Faculty, University of Niš, Niš, Serbia, **9** Medical Faculty, University of Maribor, Maribor, Slovenia, **10** Department of Process Metallurgy and Metal Recycling, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, Aachen University, Aachen, Germany

Abstract

Gold nanoparticles (GNPs) are claimed as outstanding biomedical tools for cancer diagnostics and photo-thermal therapy, but without enough evidence on their potentially adverse immunological effects. Using a model of human dendritic cells (DCs), we showed that 10 nm- and 50 nm-sized GNPs (GNP₁₀ and GNP₅₀, respectively) were internalized predominantly via dynamin-dependent mechanisms, and they both impaired LPS-induced maturation and allostimulatory capacity of DCs, although the effect of GNP₁₀ was more prominent. However, GNP₁₀ inhibited LPS-induced production of IL-12p70 by DCs, and potentiated their Th2 polarization capacity, while GNP₅₀ promoted Th17 polarization. Such effects of GNP₁₀ correlated with a stronger inhibition of LPS-induced changes in Ca²⁺ oscillations, their higher number per DC, and more frequent extra-endosomal localization, as judged by live-cell imaging, proton, and electron microscopy, respectively. Even when released from heat-killed necrotic HEp-2 cells, GNP₁₀ inhibited the necrotic tumor cell-induced maturation and functions of DCs, potentiated their Th2/Th17 polarization capacity, and thus, impaired the DCs' capacity to induce T cell-mediated anti-tumor cytotoxicity *in vitro*. Therefore, GNP₁₀ could potentially induce more adverse DC-mediated immunological effects, compared to GNP₅₀.

Citation: Tomić S, Đokić J, Vasilijić S, Ogrinc N, Rudolf R, et al. (2014) Size-Dependent Effects of Gold Nanoparticles Uptake on Maturation and Antitumor Functions of Human Dendritic Cells In Vitro. PLoS ONE 9(5): e96584. doi:10.1371/journal.pone.0096584

Editor: Salik Hussain, National Institute of Health (NIH), United States of America

Received: January 23, 2014; **Accepted:** April 8, 2014; **Published:** May 6, 2014

Copyright: © 2014 Tomić et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by the Ministry of Science, Serbia (No: 175102), Military Medical Academy, Serbia (MFVMA/8/12-14), EUREKA EI4953 GoNANO, Applied Project L2-4212, and the European Community's SPIRIT program (227012). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors declare no conflict of interests. in Nina Ogrc is employed by the LOTRIČ Metrology Company, Selca 163, SI-4227, Selca, Slovenia, and Rebeka Rudolf is employed by the Zlatarna Celje d.d. Kersnikova 19, 3000 Celje, Slovenia. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: fakultet.vma@mod.gov.rs

Introduction

Spontaneous anti-tumor T cell-mediated immune response upon radio- or chemo-therapy is associated with a favorable prognosis [1]. Toll-like receptor (TLR)4⁺ dendritic cells (DCs) are described as key factors regulating the initiation of such a response, since the release of endogenous adjuvant from dying tumor cells stimulates the maturation of DCs via TLR4 [2,3]. DCs are the most important professional antigen-presenting cells (APCs) regulating the development of adaptive anti-tumor response by presenting tumor antigens to T cells in an immunogenic or tolerogenic context [4]. Immature DCs take up and process antigens efficiently, but cannot prime T cells efficiently, leading to T cell anergy [5]. In contrast, activation of DCs' by lipopolysaccharide (LPS) [6] or high mobility group box (HMGB)-1 [3] via TLR4, leads to their phenotypic maturation and production of immune polarizing cytokines, such as IL-12p70, IL-23 [7], or IL-10 [5]. The signaling pathways leading to maturation of DCs

include the translocation of Ca²⁺-sensitive transcription factors, such as NF-κB and NFAT, through nucleopores. The regulation of this translocation was found to be dependent on spontaneous Ca²⁺ oscillations, which are present in immature DCs, but not in DCs stimulated to undergo maturation [8].

Gold nanoparticles (GNPs) are recognized as very perspective diagnostic and therapeutic agents in cancer fighting strategies. They are easy to functionalize with drugs, genes and biomolecules [9–12], and are generally described as biocompatible, which supports their potential use in diagnostics [13]. However, some reports suggest that the endocytosed GNPs may cause cytotoxic effects, which could be beneficial for the treatment of cancer [14] and inflammatory/autoimmune diseases. The size- and shape-dependent optical properties of GNPs conferred to their surface Plasmon resonance [13], have already been exploited in imaging [15] and bio-sensing [16]. Furthermore, the ability of GNPs to convert near-infrared light efficiently into thermal energy upon

absorption is being utilized for the development of targeted photo-thermal [17], or radio-sensitization cancer therapy [18].

However, it is still uncertain how the applied GNPs will alter the functions of immune cells, particularly DCs, upon application. *In vivo* investigations reported adjuvant properties of GNPs, and the involvement of Kupffer and Langerhans cells was implicated, but not clarified [19]. Once in circulation, GNPs were shown to be internalized by APCs via multiple routes [20,21], all of which include dynamin-dependent mechanisms [22]. However, the distribution of GNPs upon internalization, which crucially determines the cellular response to them [23,24], is still unclear and requires new methods of investigations, such as focused ion beam/scanning electron microscopy (FIB/SEM) [25]. Additionally, contradictory data exists on the immunological effects of GNPs once internalized by APCs. GNPs were shown to induce either pro-inflammatory [26] or anti-inflammatory effects [27,28], depending on their size, conjugation and hydrophobicity [29]. Recently we showed, using a model of a mitogen stimulated rat's splenocytes, that bare GNPs, although non-cytotoxic [30], possess immunosuppressive properties [31]. Since these effects depend exclusively on the presence of APCs within the splenocytes' population [32], we hypothesized that GNPs could actually suppress the maturation of DCs, causing their impaired ability to trigger the antitumor response. In the present study, we showed how differently sized GNPs, applied at the non-toxic concentrations, interfere with the maturation and antitumor functions of DCs induced either by LPS or heat-killed necrotic cancer cells, and how these immunomodulatory effects correlate with GNPs uptake, their intracellular distribution, and their effects on Ca^{2+} signaling in DCs.

Materials and Methods

Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of healthy donors (Table 1) were isolated in RPMI/0.02% NaEDTA on Lymphoprep gradient (PAA Laboratories) by density centrifugation (2200 rpm, 20 min, 20°C). Subsequently, PBMCs were used for the isolation of monocytes ($n = 10$) or $CD3^+$ T cells ($n = 9$), which were negatively sorted by MACS using the Human Monocytes Isolation Kit II or Pan-T cell Isolation Kits (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) respectively. The purity of the cells was always higher than 90%, as judged by flow cytometry after the staining of cells with anti-CD14 and anti-CD3 antibodies, respectively. Immature DCs were generated by cultivating monocytes (0.5×10^6 /ml) in complete RPMI 1640 medium (10% FCS, 2 mM L-glutamine, 50 μ M 2-mercapthoethanol (Sigma), penicillin/streptomycin/gentamicin, 1% each (ICN, Costa Mesa, CA, USA) with 100 ng/ml of human recombinant granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (Leucomax,

Basel, Switzerland) and 20 ng/ml of the human recombinant interleukin (IL)-4 for 6 days, as described [33]. Immature DCs, identified by flow cytometry as $CD14^{dim}$ or $CD14^{bright} CD14^- HLA-DR^+$ cells, were harvested and used in subsequent experiments.

HEp-2, larynx epidermoid carcinoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (Rockwell, MD, USA). The cells were plated at a density of 5,000 cells/cm² and cultured in complete RPMI medium until they reached 70% confluence, after which passaging was performed by trypsinization.

Ethics statements

Human PBMCs were isolated from healthy donors who signed Consent Forms, and the subjects' identities were kept confidential. All experiments were approved by the Ethical Board of the Military Medical Academy, Belgrade, Serbia (permission date: September 12th, 2012 in Belgrade), and the original documents are available upon request.

Cell cultures

Immature DCs (0.5×10^6 /ml) were allowed to adhere for 2 h, and then spherical gold nanoparticles (Nanopartz Inc., CO, USA), 10 nm or 50 nm in size (GNP₁₀ and GNP₅₀, respectively) were added to the cultures (Table 2). GNPs were added in different concentrations (5–200 μ g/ml of Au), followed by incubation at 37°C, 5% CO₂ and 90% humidity for 4–48 h. Maturation of DCs was triggered by a TLR4 agonist, LPS from *E. coli* 0.111:B4 (Sigma, 100 ng/ml) for 48 h. In some experiments, LPS (100 ng/ml) was incubated with GNPs (10 or 50 μ g/ml), or without them, in complete RPMI medium for 48 h, followed by centrifugation at 2000 g for 10 min. Control suspension was incubated likewise without LPS. Supernatant was collected by aspiration, and the pellet was re-suspended and washed two more times in complete RPMI medium. DCs were afterwards cultivated for 48 h in the supernatant, or in the washed pellet preparation which either contained the sonicated GNPs (10 or 50 μ g/ml) or not. Alternatively, the maturation of DCs was induced by necrotic HEp-2 cells (ATCC, Rockwell, MD, USA) (1×10^6 /ml), that were previously treated with GNP₁₀ or GNP₅₀ (10 μ g/ml each) for 24 h. After the culture, HEp-2 cells were collected and washed at 300 g for 8 min, and then heat-killed in complete RPMI medium at 63°C for 30 min, as described [34], which is similar to the temperatures achieved in GNP-based photo-thermal therapy [35]. After each treatment of DCs or HEp-2 cells, the cytopins were made (1×10^4 cells/sample), and stained with May-Grunwald-Giemsa (MGG), or used for immunocytochemistry analysis. Supernatants collected in DCs' cultures were centrifuged at 2000 g for 10 min, and frozen at -40°C prior to the cytokines analysis. Supernatants from cell-free cultures, containing the same concentrations of GNPs, were prepared similarly and used as blank controls.

Mixed leukocytes reactions

The allostimulatory potential of DCs was assessed in co-culture with MACS purified allogeneic $CD3^+$ T lymphocytes isolated from PBMCs. $CD3^+T$ cells (1×10^5 /well of 96-well plate) were co-cultivated with different numbers of DCs (1×10^4 , 0.5×10^4 and 0.25×10^4) for 5 days. The cytokines were detected in the supernatants of parallel DC/ $CD3^+T$ cell co-cultures that were treated with PMA (20 ng/ml) and A23187 (500 ng/ml) (Sigma, Munich, Germany) for the last 8 h. After the co-cultures, supernatants were collected, centrifuged at 2000 g for 10 min, and frozen at -40°C prior to the analysis of cytokines, whereas the cells were counted and the levels of cytokines were normalized to 1×10^5 cells/sample. Proliferation assays, performed in six

Table 1. Demographic characteristics of healthy volunteers who provided PBMCs.

Total number of volunteers	19
Males number (%)	14 (73.6%)
Mean age (range)	33 (24–52)
Ethnicity (%)	European (100)

The blood was collected at the Institute of Blood Transfusion and Hemobiology of the Military Medical Academy, Belgrade, Serbia.
doi:10.1371/journal.pone.0096584.t001

Table 2. Physicochemical properties of GNPs in water and medium.

Property	GNP ₁₀	GNP ₅₀
Size (nm)*	10	50
SRP peak (nm)*	532	535
Carboxylic acid-based capping agent (pending patent) (Da)*	<300	<300
Core size (TEM) (nm)	11.3±2.5 (n=200)	51.9±3.7 (n=200)
Hydrodynamic size (DLS) (nm)	Water: 10.2±0.8	Water: 50.9±0.7
	Medium: 17.6±1.8	Medium: 73.8±0.8
PDI (DLS) (nm)	Water: 0.173±0.02	Water: 0.084±0.01
	Medium: 0.327±0.05	Medium: 0.278±0.02
z-potential (mV)	Water: -23.775±0.547	Water: -30.375±0.642
	Medium: -12.835±2.203	Medium: -12.250±1.147
Au concentrations in stock solutions (ICP-MS) (µg/ml)	2500	2500

*- Claimed by the vendor.

The concentration of Au within the GNP stock solutions was determined by Agilent Technologies 7500 ce ICP-MS, and it corresponded to the concentrations of Au reported by the vendor. The samples of GNPs (20 µg/ml) were prepared in DI 18 MΩ water or complete medium, and sonicated for 20 s before the analysis by TEM or dynamic light scattering (DLS). The core size was analyzed on the preparations of GNPs added dropwise on the Cu-based grids and dried at room temperature, before the observation by JOEL JEM-2100 HR TEM (Tokyo, Japan) at 100 kV. The core size was similar in water and medium, so the average value from the measurements of GNPs in both solutions is shown as mean ± SD. Hydrodynamic size, polydispersion index (PDI), and z-potential in water and medium were analyzed by Zetasizer Nano ZS with non-invasive backscatter optics (NIBS). The samples were pre-warmed to 25°C for 120 s, and then analyzed for 15 min per run, for a total of 4 runs per sample, and the results are shown as mean ± SD (4).

doi:10.1371/journal.pone.0096584.t002

replicates, were pulsed with 3H-thymidine for the last 18 h (1 µCi/well, Amersham Books, UK) and the radioactivity was measured by β-scintillation counting (LKB-1219 Rackbeta, Finland). The results are presented as counts per minute (CPM). Control cultures for proliferation and cytokine assays included CD3⁺T cells and corresponding DCs cultivated alone.

Additionally, CD3⁺T cells were primed with immature control DCs, or those matured with necrotic GNPs-treated or GNP-untreated HEp-2 cells for 3 days. The primed CD3⁺T cells were then MACS-purified and expanded with IL-2 (2 ng/ml, R&D) for 2 days. T-cell cytotoxic activity was assessed by cultivating the primed CD3⁺T cells (2×10⁴, 4×10⁴, 8×10⁴) with live HEp-2 cells (1×10⁴) for 24 h. The cell cultures performed in six replicates were then treated with 3-[4,5 dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, 100 µg/ml) for 4 h, and 0.1 N HCl/10% sodium dodecyl sulphate (SDS) overnight. Cell-free cultures were used as blank controls. The absorbance was read at 570/650 nm (ELISA reader, Behring II), and the values measured in the wells with corresponding CD3⁺T cells cultivated alone were subtracted. The values measured in co-cultures of HEp-2 cells and CD3⁺T cells that were primed with control untreated DCs, were taken as 100%.

Flow cytometry and immunocytochemistry

The analysis of DCs on flow cytometer (Coulter, XL-MCL, Krefeld Germany) or confocal microscope (Zeiss LSM 510/Axiocvert 200 M, Jena, Germany) was performed upon labeling the cells with primary antibodies (Abs). The following Abs (clones) and reagents were used for the immunocytochemistry and flow cytometry: IgG1a negative control-biotin (MCA928), anti-CD1a-phycoerythrin (PE) (NA1/34HLK), IgG1 negative control-PE (MCA928PE), anti-CD14-Fluorescein isothiocyanate (FITC) (TUK4), anti-CD86-FITC (BU63), anti-CD3-FITC (UCHT1), IgG1 negative control-FITC (MCA928F) (all from Serotec, Oxford, UK), anti-CD45-PECy5 (HI30), anti-HLA-DR-biotin (LN3), IgG1a negative control-PECy5 (P.3.6.2.8.1) (all from eBioscience), streptavidin-Alexa 488, anti-CD83-Alexa 488 (all

from Biolegend). The expression of HLA-DR, CD86 and CD83 was analyzed within CD45⁺ DC population. Necrosis of DCs cultivated with GNPs (5–200 µg/ml) was measured after 48 h-cultures by staining the cells with propidium iodide (PI, 10 µg/ml Sigma) in phosphate buffer saline (PBS). Apoptosis was determined after 48 h by staining the cells with PI in hypotonic citric/Triton-X buffer, or after 24 h by Annexin-V-FITC/PI (R&D) labeling.

Calcium imaging

Immature DCs (1×10⁵/ml) were cultivated on poly-L-lysine (PLL, 10 µg/ml, Sigma) pre-treated cover-slips, washed with Krebs-Ringer Buffer (KRB), and loaded with Fluo-3 Ca²⁺-indicator (4 µM, Invitrogen) for 30 min at room temperature, followed by washing and incubation at 37°C for 20 min. In some experiments 2 µM thapsigargin, the inhibitor of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA), in 0.5 mM EGTA, was used during the loading. Cover-slips were then transferred on imaging-chambers in KRB and analyzed on Leica TCS SP5 using a Leica HX APO L water immersion objective. After initial recording of immature DCs, GNPs (10 µg/ml) and/or LPS were added. The light scattered from GNPs was detected upon excitation at 633 nm by a 660/30 nm Leica HyD hybrid detector (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). The images were acquired at a frequency of 2 Hz per channel for a total of 5 min. Similar analysis was performed on cells cultivated with LPS (100 ng/ml) and/or GNPs (10 µg/ml) for 24 h and 48 h. The fluorescence signals were expressed as ΔFt/F₀ ratios, ΔFt representing the fluorescence signal recorded at individual time points, minus F₀, the initial level of fluorescence. Areas under peaks and frequencies were calculated using Graph Pad Prism software (La Jolla, CA, USA).

Internalization studies

DCs (1×10⁵/ml) that adhered to the cover-slips were transferred to +4°C and treated with GNPs (10 µg/ml). In some experiments, the dynamin I inhibitor Dynasore (80 µM, Sigma), or DMSO as a vehicle, were added 30 min prior to GNPs. After

20 min, membrane stain FM 4-64 (10 μ M, Invitrogen) was applied and the cover-slips were transferred to imaging-chambers and analyzed on a Leica TCS SP5. The cells were monitored for up to 4 h.

Additionally, after the 4 h cultures of DCs with GNPs (10 μ g/ml), the cover-slips were washed in Millonig's buffer, fixed in 2% glutaraldehyde overnight at +4°C, and post-fixed with 1% osmium tetroxide for 1 h. After dehydration and resin embedding, ultra thin sections were made and collected on 200-mesh carbon-coated copper grids. The samples were then observed by TEM (JEM100 CX-JEOL, Tokyo, Japan) at 100 kV.

Alternatively, after the osmium tetroxide fixation, another post-fixation with 1% tetracarbohydrazide (TCH) for 30 min and osmium tetroxide for 1 h (OTO staining) was performed for the FIB/SEM analysis. The samples were then dried in serial dilutions of ethanol and hexamethyldistilazane (HMDS), gold sputtered for 3 min at 10 mA and then analyzed on an FIB/SEM FEI Quanta 3D 200 (Oregon, USA). The sample stage was angled to 52°, and the regions of interest were covered with a 1 μ m thick Pt layer at the Ga⁺²-sourced FIB current of 1 nA. Regular cross-sections were performed with FIB at 7 nA and 5 μ m depth, followed by the cleaning of cross-sections with a current of 300 pA. After each FIB milling/cleaning step, the cells were analyzed with SEM using detectors for secondary (SE) or backscattered electrons (BSE). At least 10 cross-sections/cell, 0.5–1 μ m apart were performed during the analysis, on a total of 10 cells/sample.

Quantification of GNPs (10 μ g/ml) within DCs after 4 h cultures was determined by Proton-Induced X-ray Emission Spectroscopy (micro-PIXE), as described by Ogrinc et al. [36]. Briefly, DCs were seeded on 1 μ m thick ethanol-sterilized gelatin coated Mylar foils. GNP₁₀ or GNP₅₀ (10 μ g/ml) were then added to DCs cultures for 4 h. The samples were washed, plunge-frozen in liquid nitrogen and freeze-dried at -40°C. The mounted samples were analyzed by proton beams (2.5–3 MeV; beam diameter 1.2–2 μ m) at different scan sizes. Two PIXE spectra were extracted from a pair of X-ray detectors and chopper, and the elemental mass inventories in single DCs were calculated by using thin sample approximation.

Cytokines

The levels of cytokines from culture supernatants were quantified by ELISA commercial kits (R&D), according to manufacturer's protocol. The unknown concentrations of cytokines from DCs cultures (IL-12p70, IL-10, IL-23) and DC/CD3⁺T cell co-cultures (IFN γ , IL-4, IL-17) were calculated from standard curves after the subtraction of blank controls.

Statistical analysis

To evaluate the differences between the experimental and corresponding control samples, the data was analyzed using Friedman's ANOVAs for Ranks, or repeated measures ANOVAs with Bonferroni posttests, if the data followed Gaussian distribution. Kruskal-Wallis or Mann-Whitney tests were used on data from Ca²⁺ oscillation measurements and micro PIXE analysis, respectively. All tests were two-sided and tested at $\alpha = 0.05$.

Results

Cytotoxicity of gold nanoparticles

Generation of monocyte-derived DC-based anti-tumor vaccines usually includes a 48 h maturation step with TLR agonists and/or pro-inflammatory cytokines [37]. Therefore, we first investigated whether GNPs (5–200 μ g/ml) were cytotoxic for DCs during that period. The examined GNPs did not induce necrosis, even at the

highest concentration applied (Figure 1A). However, the apoptosis studies revealed that GNP₁₀ increased slightly the percentage of end-stage apoptotic cells (up to 20%) at the concentrations of 50 μ g/ml, and the percentage did not increase further with the increase of GNP₁₀ concentrations, which pointed to their weak pro-apoptotic effect (Figure 1B). This was confirmed by Annexin-V:FITC/PI staining of DCs cultivated with GNPs (10 μ g/ml or 50 μ g/ml) for 24 h, where GNP₁₀ at a higher concentration (50 μ g/ml) increased significantly the percentage of early apoptotic (Annexin-V⁺/PI⁻) and late apoptotic/secondary necrotic cells (Annexin-V⁺/PI⁺), but not primary necrotic cells (Annexin-V⁻/PI⁺) (Figure 1C).

Effects of gold nanoparticles on maturation and functions of dendritic cells

Next, we studied whether GNPs applied at non-cytotoxic concentrations (10 μ g/ml), modulate the maturation of DCs induced by LPS. LPS stimulated significantly the expression of HLA-DR, CD86 and CD83 by DCs. Although GNPs alone did not modulate the expression of these molecules, both GNPs impaired significantly the LPS-induced expression of CD86 and CD83 by DCs. Additionally, GNP₁₀ suppressed the LPS-induced expression of HLA-DR. (Figure 2A, Figure S1A).

The impaired phenotypic maturation of DCs cultivated with LPS and GNPs correlated with their lower allostimulatory capacity in the co-culture with allogeneic CD3⁺T cells. Thereby, the inhibitory effect of GNP₁₀ was stronger and more consistent for different DC-to-CD3⁺T cell ratios in four allogeneic co-cultures performed. A representative allogeneic proliferation is shown in Figure 2B.

The levels of cytokines varied greatly with each donor used in the experiments (Table S1), so the levels of cytokines were analyzed as indexes of control (1.0) (Figure 2C and D). By analyzing the change in production of IL-12p70, IL-23 and IL-10 in DCs culture supernatants we found that GNP₅₀ had no effects on their production by DCs. The effects of GNP₁₀ differed significantly from that of GNP₅₀, since they stimulated significantly IL-10 production by LPS-treated DCs, inhibited significantly the LPS-induced production of IL-12p70, and tended to inhibit the up-regulation of IL-23 (Figure 2C). Consequently, compared to LPS/GNP₅₀-treated DCs which up-regulated the production of IL-17 by allogeneic CD3⁺T cells in co-culture, LPS/GNP₁₀-treated DCs had significantly higher capacity to induce IL-4. The levels of IFN- γ were not modified in those co-cultures (Figure 2D).

To assess whether LPS was inactivated upon interaction with GNPs, we incubated LPS with GNP₁₀ and GNP₅₀ for 48 h, as described in Materials and Methods, and afterwards cultivated DCs in the supernatant, or in washed pellet preparations that either contained GNPs or not. We found that the expression of HLA-DR, CD86 and CD83 by DCs (Table S2), and their allostimulatory capacity (data not shown), was not affected significantly by either the supernatant or washed pellet of LPS/GNPs (10 μ g/ml) preparations. However, the supernatant activity of the LPS preparation incubated with a higher concentration of GNP₅₀ (50 μ g/ml) was significantly lower, and the corresponding pellet activity was significantly higher, compared to corresponding controls, as judged by the expression of CD83 by DCs (Table S2). In contrast, the washed pellet preparations with GNPs incubated without LPS had no significant stimulatory effects on the expression of these markers by DCs (data not shown). These results suggested that there was no significant inactivation of LPS, even after potential adsorption to GNPs, and the effects rather occurred via the modulation of signaling mechanisms.

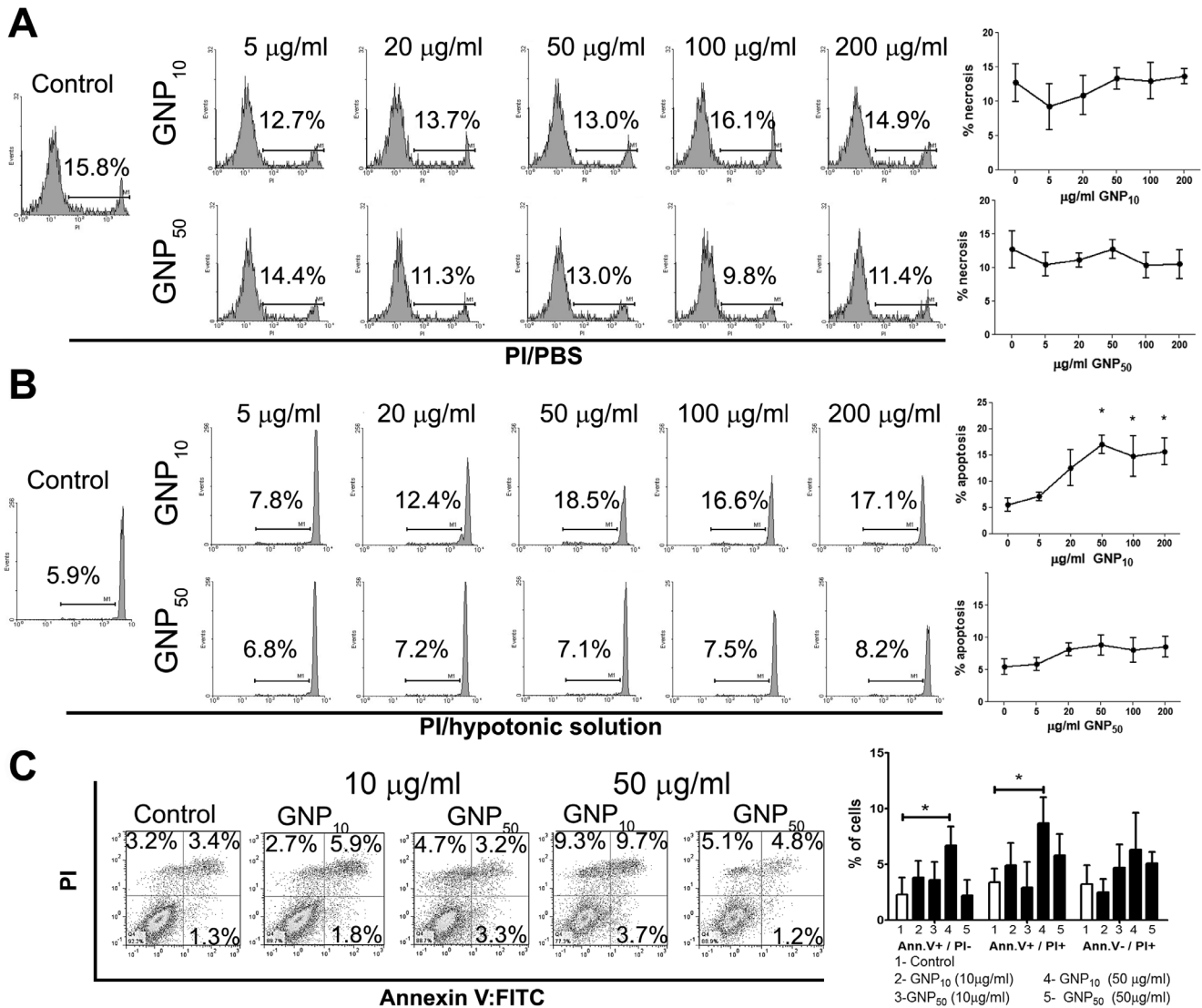


Figure 1. Dose-dependent effect of GNPs on death of DCs. (A) Necrosis and (B) apoptosis of DCs after 48 h cultures is shown from one representative experiment, or as mean \pm SD (n=4 experiments), after PI staining. (C) Different stages of DCs apoptosis were analyzed after 24 h cultures by annexin V:FITC/PI staining, and the results are presented from one representative experiment, or as mean \pm SD of three independent experiments. *p<0.05 compared to control (Friedman's one-way ANOVA). doi:10.1371/journal.pone.0096584.g001

Effects of gold nanoparticles on Ca²⁺ oscillations of dendritic cells

Vukcevic et al. [8] showed that LPS down-regulates spontaneous Ca²⁺ oscillations in DCs and transfer of NFAT to their nucleus. Accordingly, we investigated whether GNPs impair the Ca²⁺ signaling in DCs during maturation. Fluo-4-loaded immature DCs displayed high Ca²⁺ fluctuations, corresponding to the average area under peaks of 18.6 \pm 6.2, which could be blocked completely by thapsigargin (Figure 3A, Figure S2). Immediate changes in Ca²⁺ oscillation were not detected upon addition of LPS (data not shown) or GNPs (Videos S1–S3). Ca²⁺ fluctuations in control DCs declined progressively during 48 h cultivation (Figure S2), but LPS down-regulated significantly the Ca²⁺ fluctuations after both 24 h and 48 h (Figure 3B, 3C, Videos S4–S6). However, if DCs were treated with LPS/GNP₁₀, significant inhibition of such down-regulation was observed (Figure 3B and C). After 48 h, DCs treated with LPS/GNP₁₀

possessed significantly higher Ca²⁺ oscillations compared to those in LPS/GNP₅₀ treated DCs (Figure 3B). Such effects of GNPs were not observed in the absence of LPS (Figure S2).

Internalization of gold nanoparticles

Next, we investigated how the size-dependent differences in the immunomodulatory properties of GNPs correlate with their internalization by DCs. Light microscopy analysis showed a great variability in the internalization capacity of DCs. Still, a significantly higher percentage of DCs internalized GNP₅₀ (82.1% \pm 4.3%; n=500), compared to GNP₁₀ (68.5% \pm 3.1%; n=500) (p=0.013) (Figure 4A). Similar results were obtained when analyzing DCs' internal complexity as a side scattering parameter on the flow cytometer (Figure 4B). The intracellular distribution of GNPs analyzed by confocal microscopy showed that GNPs had exclusively perinuclear localization (Videos S7 and

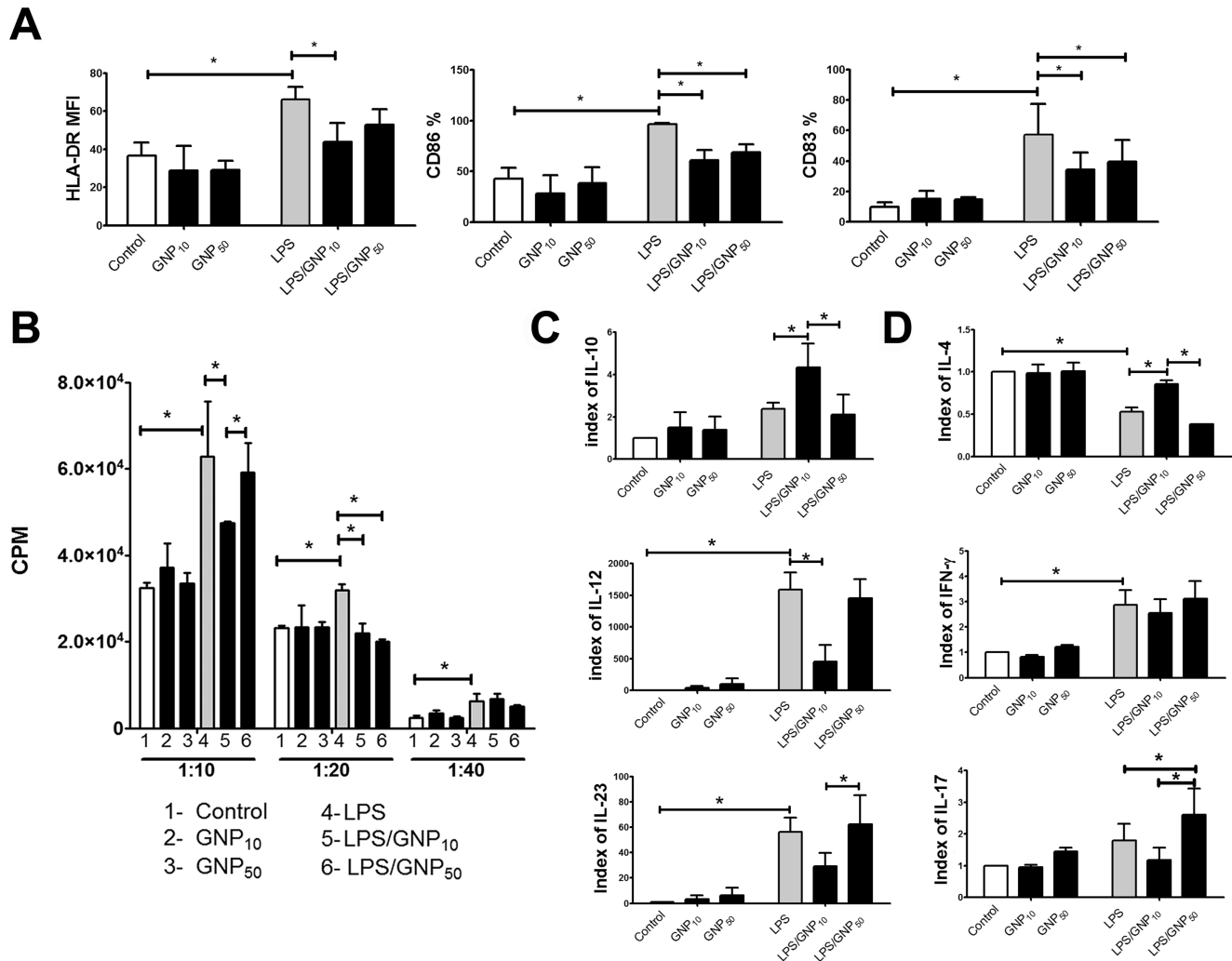


Figure 2. Effect of GNPs on LPS-induced maturation and functions of DCs. (A) Phenotypic maturation of DCs is shown as mean \pm SE ($n=4$ experiments); see also Figure S1; MFI-mean fluorescence intensity (B) DCs' capacity to stimulate the proliferation of allogeneic CD3⁺T cells, at 3 different DC/CD3⁺T ratios (X-axis), is shown as mean CPM \pm SD of six replicates, from one representative experiment. (C) DCs' ability to produce IL-12p70, IL-23 and IL-10 after 48 h; (D) DCs' ability to induce production of cytokines by CD3⁺T cells in co-culture. (C) and (D) are presented as mean indexes \pm SD ($n=4$ experiments). * $p<0.05$ (Friedman's two-way ANOVA). doi:10.1371/journal.pone.0096584.g002

S8), but GNP₅₀ appeared more clustered, and GNP₁₀ more dispersed (Figure 4C).

To quantify the intracellular GNPs, we applied the micro-PIXE analysis [36] (Figure S3). The cells were identified by potassium elemental maps, so the amount of gold was determined within these areas (Figure 4D). No correlation was observed between the potassium area size, corresponding to DCs size, and the amount of intracellular gold (Figure S3). Although the amount of intracellular gold varied greatly, we detected a significantly higher average mass of GNP₅₀ within DCs, compared to GNP₁₀ (Figure 4E). However, when the mass of gold was recalculated to the number of GNPs per cell, a significantly higher number of GNP₁₀ per cell was observed, compared to GNP₅₀ (Figure 4E).

Intracellular trafficking of gold nanoparticles

In addition to the quantitative differences, we explored the differences in the mechanisms of GNPs' internalization and intracellular distribution. SEM analysis suggested that both GNPs are captured as small clusters by DCs' filopodia predominantly,

followed by the membrane enclosing, which is a characteristic for phagocytosis and macropinocytosis (Figure 5A). Afterwards, GNPs were located in the endosomes. No such processes occurred if DCs were cultivated with GNPs at +4°C (data not shown). The Dynasore treatment almost completely blocked the internalization of both GNPs, according to the confocal microscopy (Figure 5B) and FIB/SEM (Figure 5C). However, cross-sectioning of the whole cells with FIB suggested that Dynasore-treated DCs contained more agglomerates of GNP₁₀ intracellularly, and only a few nanoparticles of GNP₅₀ (Figure 5C). BSE signals, unlike SE signals, were not completely clear due to low spatial resolution of this detector, but the gold composition of the bright intracellular fields was confirmed by EDX detector (data not shown). In addition to FIB/SEM, TEM analysis suggested also that some nanoparticles could reside outside the endosomes (Figure 4D). GNPs were found inside the cytoplasmic tubular membranous structures, either as small aggregates (GNP₁₀), or as single particles (GNP₅₀).

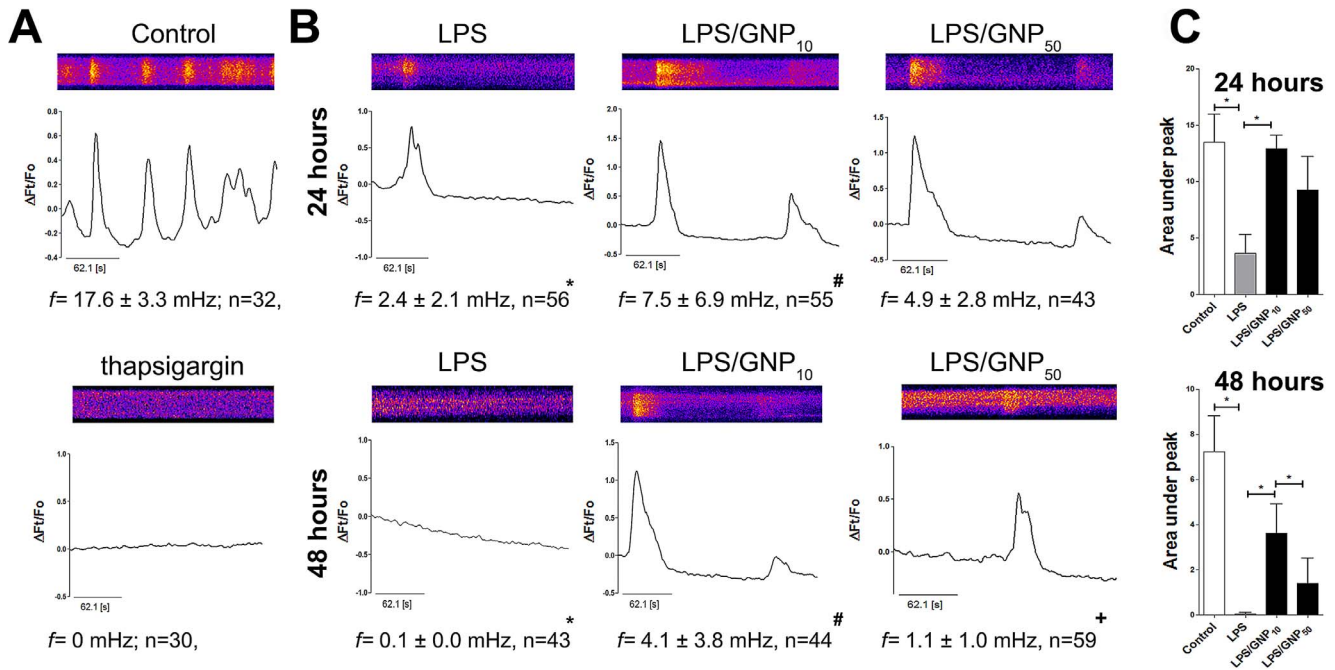


Figure 3. Effect of GNPs on Ca^{2+} oscillations in DCs. Fluo-3 loaded immature DCs were detected (A) immediately upon staining in the presence or absence of thapsigargin (2 μ M), or (B) after 24 h or 48 h in the presence of LPS and GNPs (10 μ g/ml), as indicated. Representative kymographs and corresponding $\Delta F/F_0$ records are shown. The frequency of oscillations and, (C) area under peaks, are presented as mean \pm SD of all analyzed cells. See also Figure S2. * $p < 0.05$, compared to control or as indicated; # $p < 0.05$ compared to LPS; + $p < 0.05$ compared to GNP₁₀ (Kruskal-Wallis test). doi:10.1371/journal.pone.0096584.g003

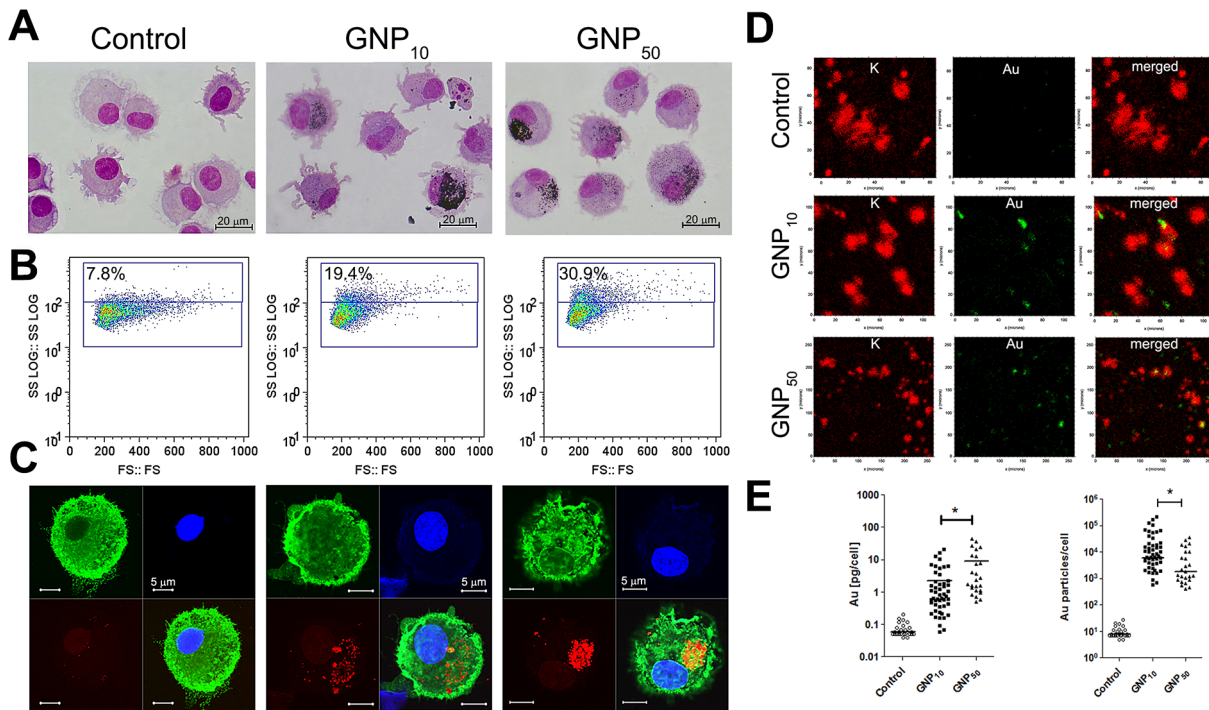


Figure 4. Internalization of GNPs by DCs. Intracellular GNPs were analyzed in 48 h-cultures (A) after staining with MGG, (B) by flow cytometry, or (C) confocal microscopy. (D) Micro-PIXE analysis was used for the quantification of potassium (red) and gold (green) after 4 h cultures. Representative elemental maps are shown. (E) All data from micro-PIXE analysis is presented either as the amount of gold [pg/ml] per cell, or as the number of GNPs per cell, calculated from GNPs' size and density of Au ($\rho = 19.3$ g/cm³). * $p < 0.05$ (Mann-Whitney test). doi:10.1371/journal.pone.0096584.g004

Effects of gold nanoparticles on DCs' maturation induced by heat-killed necrotic HEp-2 cells

By interfering with DCs maturation and signaling, GNPs could potentially induce adverse effects when used in photo-thermal therapy. To evaluate this hypothesis, we cultivated HEp-2 cells with GNPs for 24 h, killed them by heat, and treated DCs with the necrotic HEp-2 cells, after which GNPs were found inside the DCs (Figure S4). The induction of necrosis by heat was chosen since the laser ablation of control HEp-2 cells was not as efficient as for those which internalized GNPs (data not shown) [35].

Necrotic HEp-2 cells induced only slightly higher HLA-DR and CD86 expression, but significantly higher CD83 expression on DCs (Figure 6). However, if the necrotic HEp-2 cells were previously cultivated with GNP₁₀, DCs possessed significantly lower expression of HLA-DR and CD83, compared to both HEp-2-treated and HEp-2/GNP₅₀-treated DCs.

Impaired maturation of DCs cultivated with necrotic HEp-2 cells and GNP₁₀, but not GNP₅₀, was followed by their diminished

allostimulatory capacity in at least two different DC-to-CD3⁺T cell ratio per allogeneic co-culture of totally four performed (Figure 6B).

Control necrotic HEp-2 cells, and those loaded with GNP₅₀, lowered significantly the IL-17-inducing capacity of DCs, which correlated with the down-regulation of IL-23 production by DCs. Such an effect on IL-17 was inhibited by GNP₁₀ (Figure 6C, Table S1). GNP₁₀ also enhanced the ability of HEp-2-treated DCs to stimulate the production of IL-4 by CD3⁺T cells (Figure 6D), suggesting that HEp-2/GNP₁₀-treated DCs could have an impaired anti-tumor activity.

To investigate this hypothesis, CD3⁺T cells primed with DCs, were cultivated with live HEp-2 cells, as described. Indeed, CD3⁺T cells primed with DCs that were matured with necrotic HEp-2/GNP₁₀, had significantly lower cytotoxic activity compared to CD3⁺T cells primed with control HEp-2-treated DCs. The differences between GNP₁₀ and GNP₅₀ in such an effect were more significant at higher CD3⁺T/HEp-2 cell ratios. All these

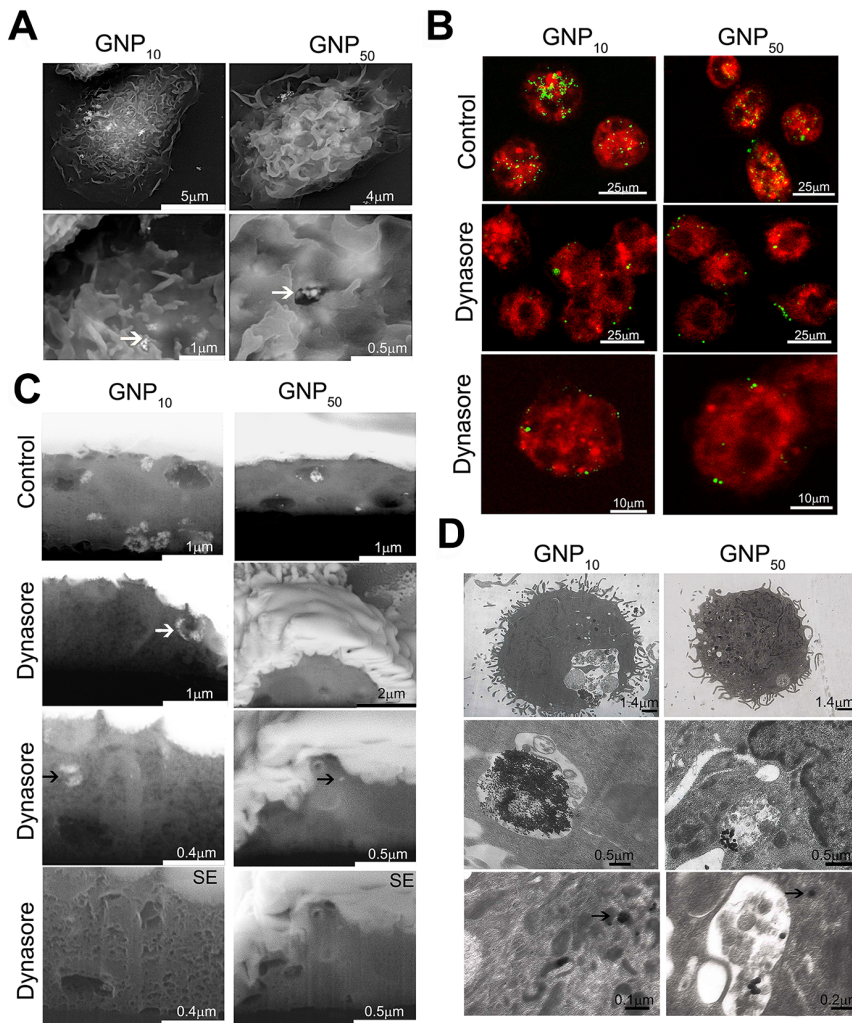


Figure 5. Mechanisms of GNPs internalization by DCs. The internalization was analyzed by (A) SEM, under different magnifications; white arrows point to GNPs-membrane interactions; (B) Confocal microscopy of live cells stained with FM4-64; or (C) FIB/SEM using BSE, or SE detectors where indicated. White arrow points to the GNP₁₀-loaded vesicle attached to the outer membrane, whereas black arrows point to intracellular presence of GNP₁₀ agglomerates and a single particle of GNP₅₀. The cells shown in (B) and (C) were cultivated with GNPs for 3 h in the presence or absence of Dynasore; (D) TEM, after 24 h-cultures under different magnifications. Back arrows indicate intracellular GNP₁₀ agglomerates and a single GNP₅₀ particle outside the endosome.
doi:10.1371/journal.pone.0096584.g005

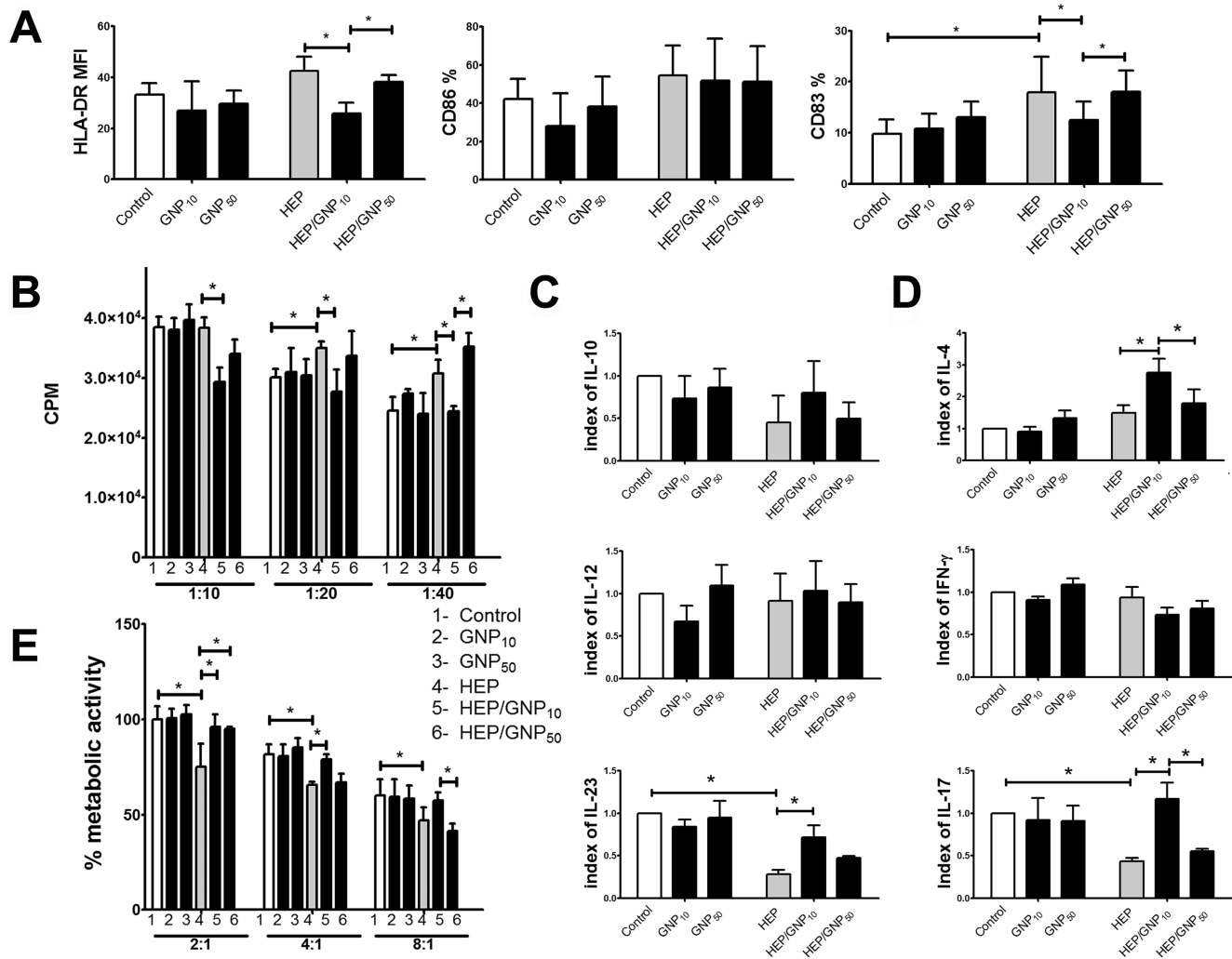


Figure 6. Effect of GNPs on necrotic HEP-2-induced maturation and functions of DCs. (A) Phenotypic maturation of DCs is shown, as mean \pm SE (n = 4 experiments); see also Figure S1; MFI-mean fluorescence intensity (B) DCs' capacity to stimulate the proliferation of allogeneic CD3⁺T cells, at 3 different DC/CD3⁺T ratios (X-axis), is shown as mean CPM \pm SD of six replicates, from one representative experiment. (C) DCs' ability to produce IL-12p70, IL-23 and IL-10 after 48 h; (D) DCs' ability to induce production of cytokines by CD3⁺T cells in co-culture. (C) and (D) are presented as mean indexes \pm SD (n = 4 experiments). (E) Metabolic activity of live HEP-2 cells co-cultivated with CD3⁺T cells, previously primed with DCs for 5 d. Results from a representative MTT assay are shown as mean \pm SD of six replicates *p<0.05 (Friedman's two-way ANOVA). doi:10.1371/journal.pone.0096584.g006

effects of GNPs were observed only in the presence of necrotic HEP-2 cells (Figure 6E).

Discussion

Many papers showing that GNPs accumulate in tumor cells, suggested enthusiastically that GNPs could be used as tumor-contrasting agents and in photo-thermal cancer therapy [14,17]. However, it remained unclear what could be the consequences of such application for the immune system, a crucial part of the successful anti-tumor therapy [1]. The immunosuppressive effects of GNPs have been suggested as potentially adverse in cancer therapy [11,27], but no one investigated this issue directly. To address this, we investigated the effects of GNPs on DCs, the key cells involved in the regulation of anti-tumor response [4]. The higher concentrations of GNP₁₀ (50 μ g/ml or higher) had a weak pro-apoptotic effect, since up to 20% of cells died by apoptosis in 24 h and 48 h cultures. We did not observe a further increase of apoptosis with higher concentrations of GNP₁₀ (100 and 200 μ g/

ml), probably because the maximal phagocytic capacity of DCs was already reached at the lower concentrations of GNP₁₀. The cytotoxicity of GNPs has been described previously [26,38], and the effect was stronger compared to our results. A similar reduction of viability of Hep-G2 cells (up to 20%) was observed after the treatment with 10 nm GNPs (100 μ M, corresponding to 2×10^{12} GNPs/ml), and the effect was described as non-cytotoxic [39]. The weak pro-apoptotic effect of GNP₁₀ in our experiments was observed at much higher concentrations, (50 μ g/ml corresponding to 5×10^{12} particles/ml and higher). These results are in accordance with the conclusion of Khlebsov and Dykman [40], that GNPs at concentrations up to 1×10^{12} /ml are non-cytotoxic for various cells. In line with this, GNP₅₀ had no cytotoxic effects on DCs up to 200 μ g/ml (corresponding to 0.2×10^{12} /ml), similarly to GNP₁₀ at a concentration of 10 μ g/ml (corresponding to 1.1×10^{12}). The described mechanisms of GNPs cytotoxicity included the alterations of proteins functions [41], or disruption of endosomal membrane [42]. Interestingly, Villiers et al. [27] did

not observe the cytotoxic effect of 10 nm-sized GNPs on immature DCs in a single evaluated dose (0.5 mM), which could be due to the different maturation state of DCs, or different capping agent used for GNPs' stabilization in their study.

The key findings in our study were that the non-toxic concentrations of GNP₁₀ can impair the maturation and functions of DCs, along with their capacity to induce T-cell mediated anti-tumor response. In line with Villiers et al. [27], the effects of GNPs were significant only in the presence of maturation stimuli. For the first time, the effects of GNPs were explored on the model of LPS-induced maturation of human DCs and the maturation induced by necrotic tumor cells generated at conditions similar to those induced in GNP-based photo-thermal therapy [35], both of which activate a TLR4 signaling pathway [2,3,6]. Recently, Tsai et al. [28] showed that GNPs could suppress CpG-induced, but not LPS-induced, maturation of macrophages by inhibiting the translocation of TLR9 to phagosomes via HMBG-1-dependent mechanisms. In contrast, we showed that GNPs, especially the smaller ones, inhibited the LPS-induced maturation and functions of DCs, and the effect did not occur due to LPS inactivation by GNPs, but rather by the modulation of cellular signaling. Such disagreements could be expected since macrophages and DCs respond differently to LPS [43]. Here, we showed that GNPs impaired the up-regulation of CD83 by DCs, which is crucial for the stability of their maturation in an IL-10-enriched immunosuppressive tumor micro-environment [44]. A significant down-regulation of LPS-induced HLA-DR expression probably resulted in more consistent impairment of allostimulatory capacity of these DCs, since HLA-DR is one of the two signals necessary for CD3⁺T cells' proliferation. The lower proliferative capacity of LPS/GNP₁₀-treated DCs could be a consequence of increased production of IL-10 immunoregulatory cytokine, which is also involved in the promotion of Th2 development [5]. In line with this, Th2 cells were shown rather to promote tumor growth, unlike Th1 cells specific for the same antigen [45]. In addition, GNP₁₀ impaired the LPS-induced up-regulation of IL-12p70, an Th1-inducing cytokine with anti-tumor effects [7]. In line with our results, Villiers et al. [27] showed that 10 nm-sized GNPs can suppress LPS-induced up-regulation of IL-12 production by mouse DCs. However, the lower production of IL-12p70 by LPS/GNP₁₀-treated DCs was not followed by lower production of IFN- γ by CD3⁺T cells, suggesting that additional cytokines might be involved in its expression [7]. Unlike GNP₅₀ which stimulated Th17 development, GNP₁₀ tended to down-regulate it. The presence of Th17 cells in tumor tissues was described either as antitumoral or protumoral, but simultaneous induction of Th17 and Th1 responses are described often as desirable in tumor therapy [46]. Therefore, the overall effect of GNP₁₀ on Th development, unlike that of GNP₅₀, could be interpreted as adverse in the tumor therapy.

Even when DCs maturation was induced by necrotic tumor cells, GNP₁₀ were able to suppress the maturation and allostimulatory capacity of DCs. Furthermore, GNP₁₀, unlike GNP₅₀, promoted the Th2/Th17 polarization capacity of DCs. Considering the protumoral effects of Th2 cells [45], and the fact that IL-17 alone can support tumor growth and metastasis [46], this experimental model also confirmed that GNP₁₀ could potentially have adverse immunomodulatory effects if used in photo-thermal tumor therapy. Indeed, we observed an impaired cytotoxic activity of CD3⁺T cells primed with DCs that were matured with GNP₁₀-loaded necrotic HEp-2 cells. Although the response of DCs to heat-killed necrotic tumor cells was shown to be dependent on TLR4 expression [34], we observed that the effects on Th polarization are different from that of LPS. In line

with this, Kandil et al. [34] suggested that, unlike LPS, heat-killed necrotic tumor cells can induce the production of IL-12p40 by DCs, but not the production of IL-12p70, a bioactive form of this cytokine. So, the different effects of necrotic cells on DCs maturation could be due to activation of additional signaling pathways. For example, both hsp60 and HMGB1 were shown to activate TLR2 [47,48], in addition to TLR4 [2]. The inhibitory role of TLR2-dependent SOCS-1 activation on TLR4- and TLR7/8-induced up-regulation of IL-12 and IL-23 production has been described as an important immune checkpoint suppressing the overwhelming inflammation [49]. The co-ligation of TLR2 and TLR4 on DCs was recently shown to potentiate their immunogenicity toward a tumor [50], and our results suggest that this process could be inhibited by GNP₁₀. These results, in line with our previous findings showing that the smaller GNPs potentiate production of IL-10, unlike the larger ones [31], suggest that the phenomenon of GNPs-mediated immunosuppression does not depend on the experimental model applied or the method of GNPs preparation.

The size-dependent immunomodulatory effects of GNPs could be attributed to different mechanisms of their internalization, levels of accumulation and intracellular distribution within DCs, leading to different modulation of maturational signaling. Upon interaction with the medium, various proteins and ions, including LPS, adsorb to the negatively charged surface of GNPs, as judged by the increase of GNPs' hydrodynamic size, polydispersion index (PDI) and decrease of zeta-potential in complete medium (Table 2), which facilitates their uptake by DCs, and activates downstream signaling pathways [51]. Our data is in agreement with other studies demonstrating that the uptake of GNPs is an energy dependent process occurring via endocytosis [20]. We showed that the process is predominantly dynamin-dependent, but also that GNP₁₀ were better in entering DCs via dynamin-independent mechanisms. The latter mechanisms seem to be more prominent in non-phagocytic cell lines, where Dynasore could reduce the internalization of GNPs by only 42% [23]. The alternative routes for GNPs internalization could be mediated by clathrin- and dynamin-independent carriers (CLICs), which are regulated by CDC42 protein [22]. The tubular membranous structures, 50–80 nm wide, that we observed by TEM resembled CLICs. The CLIC-like structures could have acted as size-selective filters for the preferential internalization of GNP₁₀ during dynamin blockage experiments. In support of this hypothesis, we observed that the tubular structures contained clusters of GNP₁₀, but only 1–2 GNP₅₀. CDC42 is involved in the regulation of macropinocytosis, phagocytosis and other signaling pathways in DCs [52]. Therefore, GNP₁₀ could have affected different signaling processes involved in the maturation of DCs, by utilizing additional routes of internalization.

GNPs were found predominantly within endosomes/lysosomes upon internalization, which is in line with the other reports [20,21,23]. Such localization could improve the GNPs-mediated delivery of endosomal TLR agonists into DCs, such as CpG [11] or 7-thia-8-oxoguanosine [53]. However, we also found GNPs outside the endosomes, especially the smaller ones. Endosomal escape of GNPs could be expected for tumor cells [23], but has never been described for DCs. Such an effect of GNPs could be beneficial if used for delivery of specific agonists to cytoplasmic receptors in DCs, such as MDA-5 and NOD-like receptors, thereby promoting their maturation and functions [6]. The endosomal escape of GNPs could even increase if such functionalization produces a positive surface charge enabling the "proton sponge" effect [54]. Since our GNPs were negatively charged, with similar z-potential in cell culture medium (Table 2),

the mechanism of endosomal escape via a “proton sponge” effect is highly unlikely, and rather occurred accidentally via exposure to light [24]. Within endo/lysosomes and cytoplasm, GNPs were shown to modify the activity of different proteins, such as cathepsins [55] or HMBG-1 [28], respectively, which are important regulators of DCs’ maturation and functions [56,57]. Therefore, GNP₁₀ has probably modified more different proteins compared to GNP₅₀, by utilizing additional routes of internalization and by endosomal escape. Even though the light microscopy and flow cytometry suggested different results, measurements on micro-PIXE showed that the number of GNPs per cell, and not their intracellular mass or the percentage of cells which internalized GNPs, could actually be a key factor determining their immunomodulatory effects. Micro-PIXE analysis, applied for the first time in such analysis, was proved as an accurate method for the quantification of GNPs within cells, as well as the variability of this process. In contrast to others [23], we did not observe a significant correlation between the cell size and the amount of gold within the cells. Such variability could rather be explained by the heterogeneity of DCs in phenotypic and maturation state, where the phagocytic activity correlates inversely with the level of their maturation [5].

The role of Ca²⁺ signaling in DCs’ maturation has been studied many times, and we showed, for the first time, that GNP₁₀, unlike GNP₅₀, inhibits significantly the changes in Ca²⁺ oscillations during LPS-induced maturation. Vukcevic et al. [8] showed that the down-regulation of Ca²⁺ fluctuations leads to the cytoplasmic localization of NFAT. In line with their observations, we did not observe immediate changes in Ca²⁺ influx upon stimulation by LPS. Ca²⁺ oscillations were found to be dependent on phospholipase C activity, SERCA, and endoplasmic reticulum’s inositol-3-phosphate receptor, but the role of Ca²⁺ influx has also been described [8]. Although it was shown that GNPs could alter the expression of proteins involved in Ca²⁺ oscillations [58], we could not detect a direct effect of GNPs on Ca oscillations in the absence of maturation stimuli. Furthermore, the experiments with blocking of Ca²⁺ oscillations in DCs showed that the oscillations alone are not the sole regulator of nuclear translocation of NF-κB and DCs’ maturation [8]. These results suggest that the mechanisms by which GNPs modulate maturation of DCs are more complex. Ca²⁺ fluctuations, in this context, could be a central regulatory factor synchronizing DCs’ maturation, which can sense the various signals within the cells, some of which are modulated by the internalized GNP₁₀.

In conclusion, our results showed that smaller GNP₁₀ have stronger inhibitory effects on maturation and antitumor functions of DCs, induced either by LPS or heat-killed tumor necrotic cells, compared to larger GNP₅₀. The molecular mechanisms, by which GNPs act on these processes, probably depend on the levels of particles’ accumulation and distribution within DCs, which affects calcium-dependent signaling differently. Consequently, the maturation of DCs induced by irradiation of a tumor could be compromised by smaller GNPs, leading to a poor T-cell mediated anti-tumor response. Cumulatively, these results point to potential adverse effects of smaller GNPs, if used in photo-thermal therapy and cancer diagnostics.

Supporting Information

Figure S1 Effect of GNPs on phenotypic maturation of DCs. Representative flow cytometry data on the effect of GNPs is shown, on the expression of HLA-DR, CD86 and CD83 by DC during maturation induced with (A) LPS, or (B) necrotic HEp-2 cells. The marker showing specific fluorescence was adjusted in

each experiment (n=4 per stimuli type) according to fluoro-chrome-labeled isotype control Abs. M-Mean fluorescence intensity.

(TIF)

Figure S2 Effect of GNPs on Ca²⁺ oscillations in DCs. Ca²⁺ oscillations in Fluo-3 loaded immature DCs were detected immediately upon staining (0 h), after 24 h, or 48 h in the presence or absence GNPs (10 μg/ml), as indicated. The oscillations were expressed as area under peaks, and presented as mean ± SD of all analyzed cells. *p<0.05 (Friedman’s one way ANOVA).

(TIF)

Figure S3 Micro-PIXE quantitative analysis of intracellular GNPs. DCs were cultivated with GNPs on Mylar foils for 4 h and observed by (A) phase contrast microscopy. (B) After plunge freezing and cryo-drying the samples were mounted in a vacuum chamber and observed by CCD camera. (C) The elemental maps were recorded with micro-PIXE on the indicated places of analysis, as described in Experimental details. (D) The cells of interest on the maps were marked by ellipses, and the cells’ size was correlated against the amount of potassium or chlorine. Since only the former correlated with area size, potassium maps were taken as markers for cells. The amount of gold was correlated against areas size to observe whether the cell size affected the level of GNP uptake. Correlation analyses were performed in Graph Pad Prism software.

(TIF)

Figure S4 Co-cultures of GNP-loaded necrotic HEp-2 cells and DCs. HEp-2 cells were cultivated for 24 h with GNPs (10 μg/ml), harvested and analyzed after staining with MGG by light microscopy (A, E and I). The cells were then heat killed, as described in Methods, and analyzed by light microscopy after staining with Trypan blue solution (B, F and J). The necrotic tumor cells were co-cultivated with immature DCs for 48 h, followed by cell harvesting and preparation of cytopins. The samples were then stained with MGG (C, G and K), or with HLA-DR: Alexa-488 and PI and analyzed by confocal microscopy (D, H and L). GNPs in those experiments were detected by strong light scattering properties with 660/30 nm detector.

(TIF)

Table S1 Cytokines production by LPS-treated DCs (IL-10, IL-12 and IL-23), and by CD4+T cells (IL-4, IFN-γ, IL-17) in subsequent co-culture. Summarized results are presented as median (range) of all experiments performed.

(DOC)

Table S2 Interference of GNPs with the effect of LPS on phenotypic maturation of DCs. GNP₁₀ and GNP₅₀ (10 or 50 μg/ml) were incubated with LPS (100 ng/ml) in complete RPMI medium for 48 h, after which the supernatant was isolated by centrifugation, and the pellet was washed two times in complete medium. DCs were cultivated in the supernatant or in washed pellet preparation for 48 h, and the expression of indicated markers was measured by flow cytometry. Results are shown as mean ± SD of two independent experiments. *p<0.05 compared to control.

(DOCX)

Video S1 Ca²⁺ imaging in immature DCs. The imaging was performed immediately after staining with Fluo-3.

(MOV)

Video S2 Immediate effect of GNP₁₀ on Ca²⁺ oscillations. Ca²⁺ imaging of Fluo-3 stained immature DCs was performed 10 minutes after addition of GNP₁₀ (10 µg/ml). (MOV)

Video S3 Immediate effect of GNP₅₀ on Ca²⁺ oscillations. Ca²⁺ imaging of Fluo-3 stained immature DCs was performed 10 minutes after addition of GNP₅₀ (10 µg/ml). (MOV)

Video S4 Ca²⁺ imaging in LPS-matured DCs after 24 h. Ca²⁺ imaging of Fluo-3 stained DCs cultivated for 24 h in the presence of LPS is shown. (MOV)

Video S5 Effect of GNP₁₀ on Ca²⁺ oscillations after 24 h. Ca²⁺ imaging of Fluo-3 stained DCs cultivated for 24 h in the presence of LPS and GNP₁₀ (10 µg/ml) is shown. (MOV)

Video S6 Effect of GNP₅₀ on Ca²⁺ oscillations after 24 h. Ca²⁺ imaging of Fluo-3 stained DCs cultivated for 24 h in the presence of LPS and GNP₅₀ (10 µg/ml) is shown. (MOV)

References

- Rahir G, Moser M (2012) Tumor microenvironment and lymphocyte infiltration. *Cancer Immunol Immunother* 61: 751–759.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, et al. (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13: 1050–1059.
- Pathak SK, Skold AE, Mohanram V, Persson C, Johansson U, et al. (2012) Activated apoptotic cells induce dendritic cell maturation via engagement of Toll-like receptor 4 (TLR4), dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), and beta2 integrins. *J Biol Chem* 287: 13731–13742.
- Wathelet N, Moser M (2013) Role of dendritic cells in the regulation of antitumor immunity. *Oncoimmunology* 2: e23973.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21: 685–711.
- Trinchieri G, Sher A (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Reviews Immunology* 7: 179–190.
- Hunter CA (2005) New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 5: 521–531.
- Vukcevic M, Zorzato F, Spagnoli G, Treves S (2010) Frequent calcium oscillations lead to NFAT activation in human immature dendritic cells. *J Biol Chem* 285: 16003–16011.
- Bamrungsap S, Zhao Z, Chen T, Wang L, Li C, et al. (2012) Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine* 7: 1253–1271.
- Chiodo F, Marradi M, Park J, Ram AF, Penadés S, et al. (2014) Galactofuranose-coated gold nanoparticles elicit a pro-inflammatory response in human monocyte-derived dendritic cells and are recognized by DC-SIGN. *ACS chemical biology* 9: 383–389.
- Lin AY, Almeida JPM, Bear A, Liu N, Luo L, et al. (2013) Gold Nanoparticle Delivery of Modified CpG Stimulates Macrophages and Inhibits Tumor Growth for Enhanced Immunotherapy. *PLoS One* 8: e63550.
- Heinemann D, Schomaker M, Kalies S, Schieck M, Carlson R, et al. (2013) Gold Nanoparticle Mediated Laser Transfection for Efficient siRNA Mediated Gene Knock Down. *PLoS One* 8: e58604.
- Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA (2007) Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. *Nanomedicine* 2: 681–693.
- Huang K, Ma H, Liu J, Huo S, Kumar A, et al. (2012) Size-dependent localization and penetration of ultrasmall gold nanoparticles in cancer cells, multicellular spheroids, and tumors in vivo. *ACS Nano* 6: 4483–4493.
- Hainfeld JF, Smilowitz HM, O'Connor MJ, Dilmanian FA, Slatkin DN (2012) Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice. *Nanomedicine* 20: 1–9.
- Chuang Y-C, Li J-C, Chen S-H, Liu T-Y, Kuo C-H, et al. (2010) An optical biosensing platform for proteinase activity using gold nanoparticles. *Biomaterials* 31: 6087–6095.
- Yuan H, Khoury CG, Wilson CM, Grant GA, Bennett AJ, et al. (2012) In vivo particle tracking and photothermal ablation using plasmon-resonant gold nanostars. *Nanomedicine* 8: 1355–1363.
- Joh DY, Sun L, Stangl M, Al Zaki A, Murty S, et al. (2013) Selective Targeting of Brain Tumors with Gold Nanoparticle-Induced Radiosensitization. *PLoS One* 8: e62425.
- Dykman L, Khlebtsov N (2012) Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. *Chem Soc Rev* 41: 2256–2282.
- Alkilany AM, Murphy CJ (2010) Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *J Nanopart Res* 12: 2313–2333.
- Liu X, Huang N, Li H, Jin Q, Ji J (2013) Surface and size effects on cell interaction of gold nanoparticles with both phagocytic and nonphagocytic cells. *Langmuir* 29: 9138–9148.
- Mayor S and Pagano RE (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 603–612.
- Wang L, Liu Y, Li W, Jiang X, Ji Y, et al. (2010) Selective Targeting of Gold Nanorods at the Mitochondria of Cancer Cells: Implications for Cancer Therapy. *Nano Letters* 11: 772–780.
- Krpetic Z, Nativo P, See V, Prior IA, Brust M, et al. (2010) Inflicting controlled nonthermal damage to subcellular structures by laser-activated gold nanoparticles. *Nano Lett* 10: 4549–4554.
- García CP, Sumbayev V, Gilliland D, Yasinska IM, Gibbs BF, et al. (2013) Microscopic Analysis of the Interaction of Gold Nanoparticles with Cells of the Innate Immune System. *Scientific Reports*.
- Yen HJ, Hsu SH, Tsai CL (2009) Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small* 5: 1553–1561.
- Villiers C, Freitas H, Couderc R, Villiers MB, Marche P (2010) Analysis of the toxicity of gold nano particles on the immune system: effect on dendritic cell functions. *J Nanopart Res* 12: 55–60.
- Tsai CY, Lu SL, Hu CW, Yeh CS, Lee GB, et al. (2012) Size-dependent attenuation of TLR9 signaling by gold nanoparticles in macrophages. *J Immunol* 188: 68–76.
- Moyano DF, Goldsmith M, Solfield DJ, Landesman-Milo D, Miranda OR, et al. (2012) Nanoparticle hydrophobicity dictates immune response. *J Am Chem Soc* 134: 3965–3967.
- Rudolf R, Friedrich B, Stopic S, Anzel I, Tomic S, et al. (2012) Cytotoxicity of gold nanoparticles prepared by ultrasonic spray pyrolysis. *J Biomater Appl* 26: 595–612.
- Dokic J, Rudolf R, Tomic S, Stopic S, Friedrich B, et al. (2012) Immunomodulatory properties of nanoparticles obtained by ultrasonic spray pyrolysis from gold scrap. *J Biomed Nanotechnol* 8: 528–538.
- Antic Stankovic J, Vucevic D, Majstorovic I, Vasiljic S, Colic M (2004) The role of rat Crpy, a complement regulatory protein, in proliferation of thymocytes. *Life Sci* 75: 3053–3062.
- Dokic J, Tomic S, Markovic M, Milosavljevic P, Colic M (2013) Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 43: 1862–1872.
- Kandil H, Bachy V, Williams D, Helmi R, Gotch F, et al. (2005) Regulation of dendritic cell interleukin-2 secretion by tumour cell necrosis. *Clinical & Experimental Immunology* 140: 54–64.
- Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA (2006) Determination of the minimum temperature required for selective photothermal destruction of cancer cells with the use of immunotargeted gold nanoparticles. *Photochem Photobiol* 82: 412–417.

36. Ogrinc N, Pelicon P, Vavpetić P, Kelemen M, Grlj N, et al. (2013) Quantitative assay of element mass inventories in single cell biological systems with microPIXE. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 306: 121–124.
37. Gilboa E (2007) DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest* 117: 1195–1203.
38. Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, et al. (2007) Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 3: 1941–1949.
39. Singh S, D'Britto V, Prabhune A, Ramana C, Dhawan A, et al. (2010) Cytotoxic and genotoxic assessment of glycolipid-reduced and-capped gold and silver nanoparticles. *New Journal of Chemistry* 34: 294–301.
40. Khlebtsov N, Dykman L (2011) Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chemical Society Reviews* 40: 1647–1671.
41. Soenen SJ, Manshian B, Montenegro JM, Amin F, Meerma B, et al. (2012) Cytotoxic effects of gold nanoparticles: a multiparametric study. *ACS Nano* 6: 5767–5783.
42. Mironava T, Hadjiargyrou M, Simon M, Jurukovski V, Rafailovich MH (2010) Gold nanoparticles cellular toxicity and recovery: effect of size, concentration and exposure time. *Nanotoxicology* 4: 120–137.
43. Zaroni I, Granucci F (2010) Differences in lipopolysaccharide-induced signaling between conventional dendritic cells and macrophages. *Immunobiology* 215: 709–712.
44. Tze LE, Horikawa K, Domasch H, Howard DR, Roots CM, et al. (2011) CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med* 208: 149–165.
45. Ziegler A, Heidenreich R, Braumuller H, Wolburg H, Weidemann S, et al. (2009) EpCAM, a human tumor-associated antigen promotes Th2 development and tumor immune evasion. *Blood* 113: 3494–3502.
46. Qi W, Huang X, Wang J (2013) Correlation between Th17 Cells and tumor microenvironment. *Cellular Immunology* 285: 18–22.
47. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, et al. (2001) Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem* 276: 31332–31339.
48. Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, et al. (2001) An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol* 166: 7128–7135.
49. Wenink MH, Santegoets KC, Broen JC, van Bon L, Abdollahi-Roodsaz S, et al. (2009) TLR2 promotes Th2/Th17 responses via TLR4 and TLR7/8 by abrogating the type I IFN amplification loop. *J Immunol* 183: 6960–6970.
50. Koido S, Homma S, Okamoto M, Namiki Y, Takakura K, et al. (2013) Combined TLR2/4-activated dendritic/tumor cell fusions induce augmented cytotoxic T lymphocytes. *PLoS One* 8: e59280.
51. Dobrovolskaia MA, McNeil SE (2007) Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature nanotechnology* 2: 469–478.
52. Garrett WS, Chen LM, Kroschewski R, Ebersold M, Turley S, et al. (2000) Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* 102: 325–334.
53. Čolić M, Džopalić T, Tomić S, Rajković J, Rudolf R, et al. (2014) Immunomodulatory effects of carbon nanotubes functionalized with a Toll-like receptor 7 agonist on human dendritic cells. *Carbon* 67: 273–287.
54. Hubbell JA, Thomas SN, Swartz MA (2009) Materials engineering for immunomodulation. *Nature* 462: 449–460.
55. Speshock JL, Braydich-Stolle LK, Szymanski ER, Hussain SM (2010) Silver and Gold Nanoparticles Alter Cathepsin Activity In vitro. *Nanoscale Research Letters* 6: 17.
56. Magister S, Obermajer N, Mirkovic B, Svajger U, Renko M, et al. (2012) Regulation of cathepsins S and L by cystatin F during maturation of dendritic cells. *Eur J Cell Biol* 91: 391–401.
57. Dumitriu IE, Baruah P, Manfredi AA, Bianchi ME, Rovere-Querini P (2005) HMGB1: guiding immunity from within. *Trends Immunol* 26: 381–387.
58. Khan JA, Pillai B, Das TK, Singh Y, Maiti S (2007) Molecular effects of uptake of gold nanoparticles in HeLa cells. *Chembiochem* 8: 1237–1240.

Supplementary data

Size-dependent effects of gold nanoparticles uptake on maturation and antitumor functions of human dendritic cells in vitro

Sergej Tomić^{a,b}, Jelena Đokić^a, Saša Vasilijić^{a,b}, Nina Ogrinc^{c,d}, Rebeka Rudolf^e, Primož Pelicon^c, Dragana Vučević^{a,b}, Petar Milosavljević^a, Srđa Janković^f, Ivan Anžel^e, Jelena Rajković^g, Marjan Slak Rupnik^h, Friedrich Berndⁱ and Miodrag Čolić^{a,g*}

^a Medical Faculty of the Military Medical Academy, University of Defense, Crnotravska 17, 11000 Belgrade, Serbia

^b Institute for Medical Research of the Military Medical Academy, Crnotravska 17, 11000 Belgrade, Serbia

^c Microanalytical Center, Jožef Stefan Institute, Jamova 39, SI-1001 Ljubljana, Slovenia.

^d LOTRIČ Metrology, Selca 163, SI-4227 Selca, Slovenia

^e Faculty of Mechanical Engineering, University of Maribor, Smetanova ulica 17, 2000 Maribor, Slovenia

^f University Children`s Hospital, Tiršova 10, 11000 Belgrade, Serbia

^g Medical Faculty, University of Niš, Blvd. dr. Zoran Đinđić, 18000 Niš, Serbia

^h Medical Faculty, University of Maribor, Slomškov trg 15, 2000 Maribor, Slovenia

ⁱ IME Process Metallurgy and Metal Recycling, RWTH Aachen University, Intzestrage 52056 Aachen, Germany

* **Correspondence author's address:** Medical Faculty of the Military Medical Academy, Crnotravska 17, Belgrade, Serbia; phone/fax: +381112663361; e-mail fakultet.vma@mod.gov.rs;

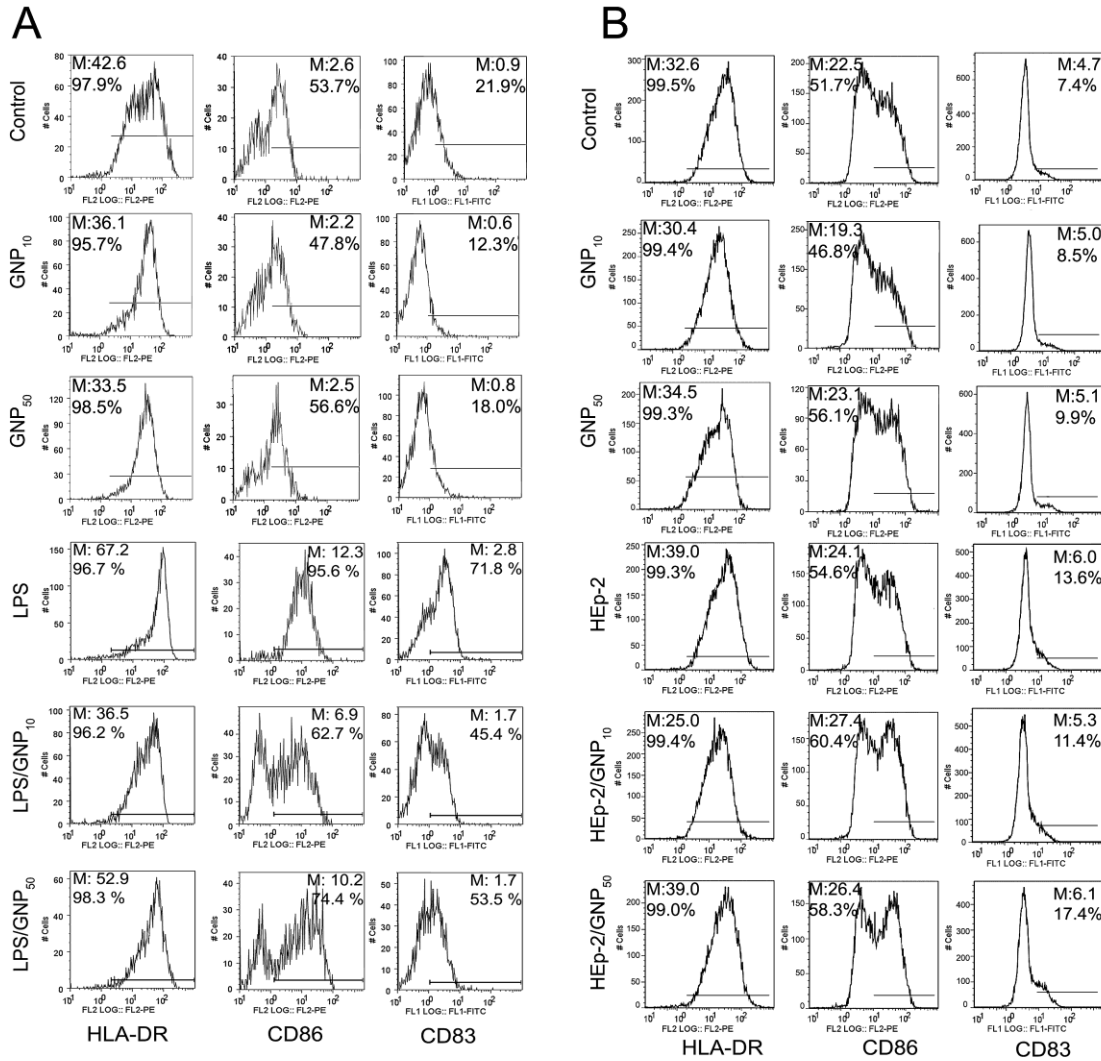


Figure S1. Effect of GNPs (10 μ g/ml) on the expression of HLA-DR, CD86 and CD83 by DCs, either in the absence or presence of (A) LPS, or (B) necrotic HEP-2 cells. Flow cytometry data from two representative independent experiments are shown, out of three (A) or four (B) with similar results. The marker showing specific fluorescence was adjusted in each experiment according to fluorochrome labeled isotype control Abs. M-Mean fluorescence intensity.

Table S1. Cytokines production by DCs (IL-10, IL-12 and IL-23) after maturation with LPS and by CD4⁺T cells (IL-4, IFN- γ and IL-17) in subsequent co-culture.

Median (range)	IL-10	IL-12	IL-23	IL-4	IFN-γ	IL-17
*Control	68.9 (4.4-122.0)	3.4 (<2.0-4.2)	60.1 (<2-87.2)	140.6 (20.6-169.9)	7909.2 (3220.0-18900.1)	328.8 (81.9-621.4)
*GNP₁₀	49.8 (4.6-106.5)	10.7 (<2.0-14.5)	40.4 (<2-99.6)	110.2 (24.6-150.1)	5989.0 (2991.4-15889.9)	391.1 (65.5-832.2)
*GNP₅₀	55.5 (5.2-95.0)	27.7 (<2-55.5)	65.3 (<2-98.1)	111.6 (25.0-158.4)	9498.1 (4211.1-19844.5)	411.4 (95.4-669.0)
LPS	113.1 (9.8-169.3)	4447.1 (128.4-8522.4)	656.3 (46.1-1350)	45.4 (10.4-105.9)	29399.4 (8467.7-38299.0)	555.1 (85.4-1159.4)
LPS/GNP₁₀	242.2 (11.9-434.3)	1618.4 (4.5-3067)	482.7 (9.0-702.0)	120.1 (16.3-141.9)	24399.2 (7546.1-32440.9)	328.9 (64.3-723.3)
LPS/GNP₅₀	105.9 (<2-228.2)	3992.2 (102.7-8163.6)	920.7 (10.1-1640.0)	49.4 (7.8-64.2)	32838.2 (9122.1-38991.7)	740.4 (141.9-975.0)
HEp-2	38.1 (14.4-110.3)	4.1 (<2-8.3)	17.6 (12.9-32.2)	190.9 (66.9-243.9)	6144.5 (3780.0-19224.4)	152.5 (54.7-435.4)
HEp-2/GNP₁₀	58.3 (17.4-124.3)	4.5 (<2-9.1)	47.8 (35.9-73.9)	359.0 (121.2-445.5)	5167.5 (2441.1-22134.4)	425.3 (247.9-718.2)
HEp-2/GNP₅₀	45.4 (15.8-90.2)	3.3 (<2-8.2)	31.2 (20.7-59.3)	215.2 (54-250.4)	5898.8 (3909.4-17332.0)	319.4 (99.8-549.4)

* Data pooled from 8 independent experiments, whereas other data was pooled from 4 independent experiments

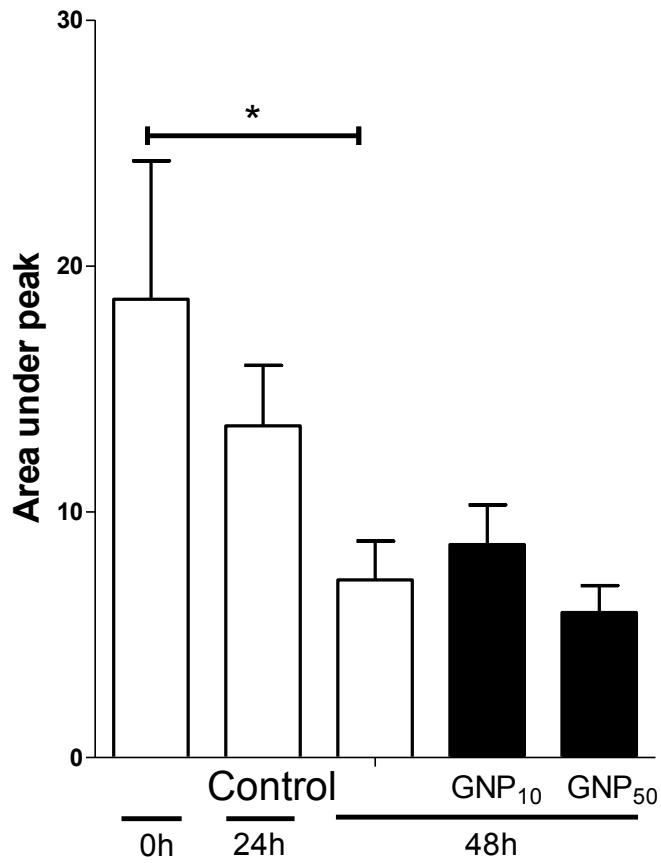


Figure S2. Ca²⁺ oscillations in Fluo-3 loaded immature DCs were detected immediately upon staining (0h), after 24h, or 48h in the presence or absence GNPs (10 µg/ml) as indicated. The oscillations were expressed as area under peaks and presented as mean ± SD of all analyzed cells (more than 30 in each group). *p<0.05 (Friedman's one way ANOVA).

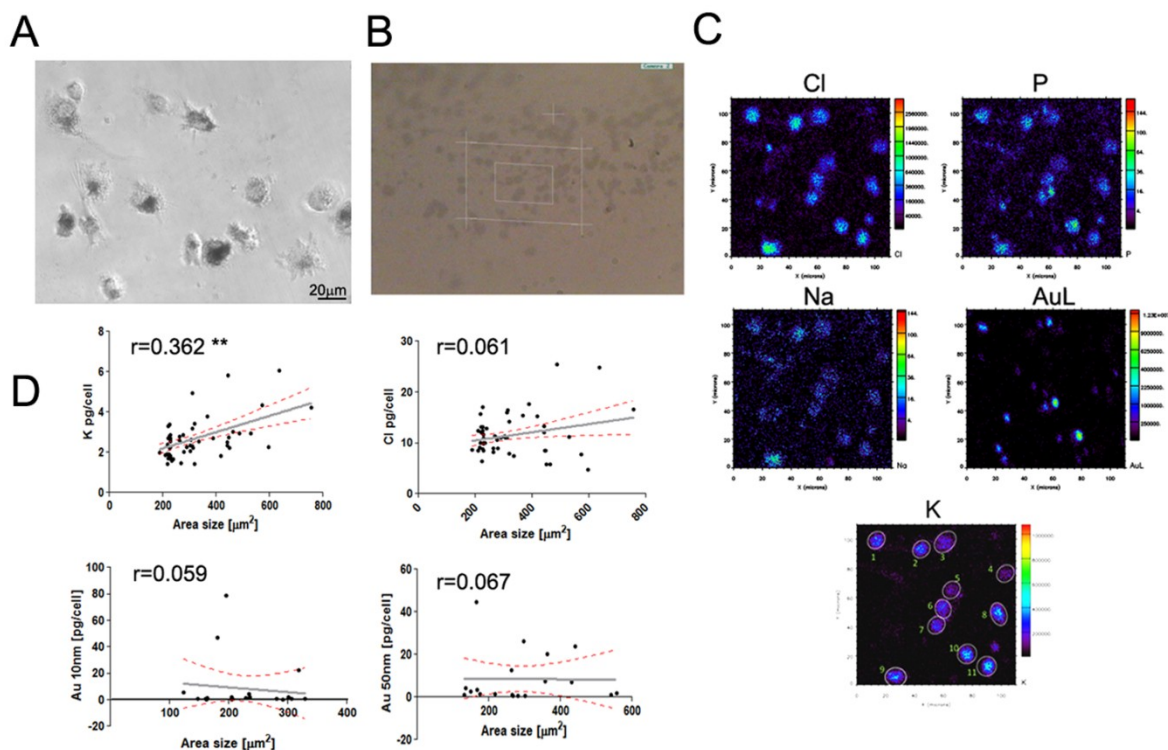


Figure S3. Stages of micro-PIXE analysis. DCs were cultivated with GNPs on Mylar foils for 4h and observed by **(A)** phase contrast microscopy. **(B)** After plunge freezing and cryo-drying the samples were mounted in a vacuum chamber and observed by CCD camera. **(C)** The elemental maps were recorded with micro-PIXE on the indicated places of analysis, as described in Experimental details. **(D)** The cells of interest on the maps were marked by ellipses, and the cells' size was correlated against the amount of potassium or chlorine. Since only the former correlated with area size, potassium maps were taken as markers for cells. The amount of gold was correlated against areas size to observe whether the cell size affected the level of GNP uptake. Correlation analyses were performed in Graph Pad Prism software.

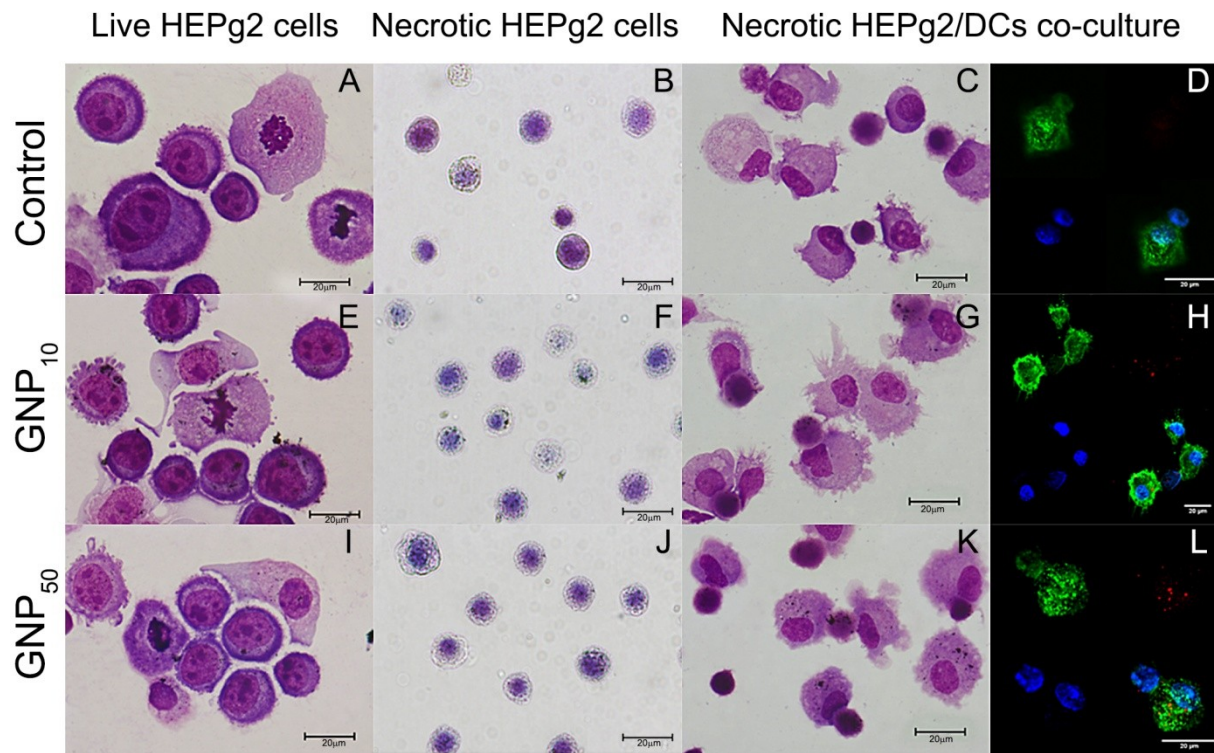


Figure S4. HEP-2 cells were cultivated for 24h with GNPs (10 μ g/ml), harvested and analyzed after staining with MGG by light microscopy (**A**, **E** and **I**). The cells were then heat killed, as described in Methods, and analyzed by light microscopy after staining with Trypan blue solution (**B**, **F** and **J**). The necrotic tumor cells were co-cultivated with immature DCs for 48h, followed by cell harvesting and preparation of cytopins. The samples were then stained with MGG (**C**, **G** and **K**), or with HLA-DR:Alexa-488 and PI and analyzed by confocal microscopy (**D**, **H** and **L**). GNPs in those experiments were detected as described in the main text.

Video Captions

Video 1. Ca^{2+} imaging of immature DCs performed immediately after staining with Fluo-3.

Video 2. Ca^{2+} imaging of Fluo-3 stained immature DCs performed 10 minutes after addition of GNP_{10} (10 $\mu\text{g/ml}$)

Video 3. Ca^{2+} imaging of Fluo-3 stained immature DCs performed 10 minutes after addition of GNP_{50} (10 $\mu\text{g/ml}$)

Video 4. Ca^{2+} imaging of Fluo-3 stained DCs cultivated for 24 h in the presence of LPS

Video 5. Ca^{2+} imaging of Fluo-3 stained DCs cultivated for 24 h in the presence of LPS and GNP_{10} (10 $\mu\text{g/ml}$)

Video 6. Ca^{2+} imaging of Fluo-3 stained DCs cultivated for 24 h in the presence of LPS and GNP_{50} (10 $\mu\text{g/ml}$)

Video 7. Animated 3D scan obtained by confocal microscopy of DCs cultivated with GNP_{10} (10 $\mu\text{g/ml}$) for 24h and stained with HLA-DR:Alexa 488 and PI.

Video 8. Animated 3D scan obtained by confocal microscopy of DCs cultivated with GNP_{50} (10 $\mu\text{g/ml}$) for 24h and stained with HLA-DR:Alexa 488 and PI.

Biografija

Sergej Z. Tomić je rođen 08.03.1984. godine. u Zagrebu. Nakon završetka gimnazije u Požarevcu 2002. godine je upisao studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu. U toku studija na ovom fakultetu je bio Student prodekan od 2004-2007. godine, i učestvovao na naučnim projektima Instituta za biologiju mora u Kotoru, Crna Gora. Diplomirao je 2008. godine (prosek 9.0), a dodeljena mu je nagrada za najbolji diplomski rad u toj godini od strane Fondacije Ljubijankić. Doktorske studije je 2008. godine. upisao na Biološkom fakultetu u okviru uže naučne oblasti Imunobiologija. Od 2009-2011. godine. je bio stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a od 2012. godine radi po ugovoru kao saradnik u nastavi na Medicinskom fakultetu Vojnomedicinske Akademije, Univerziteta odbrane u Beogradu.

Naučno istraživački rad Sergej Z. Tomića je realizovan kroz projekte Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (br. 175102) „Primena funkcionalizovanih ugljeničnih nanocevi i nanočestica zlata za pripremu dendritskih ćelija u terapiji tumora“, i projekte Ministarstva odbrane Republike Srbije „Biokompatibilnosti nanomaterijala i naprednih biomaterijala“ čiji je rukovodilac akademik prof. dr Miodrag Čolić, a pod čijim je mentorstvom i urađena ova doktorska disertacija. Učestvovao je na međunarodnim projektima (E!4953 GoNaNo; E!3971 BIO-SMA; E!C5831 Cell-T), Bilateralnom projektu SLO-SRB “Production Technology and Biocompatibility Studies of Au Nanoparticles”, Inovacionom projektu Zlatarne Celje „Razvoj novih sistema legura od plemenitih metala za proizvodnju nakita”, i kao podizvođač naručenih ispitivanja biokompatibilnosti biomaterijala. Nagrada za najbolju oralnu prezentaciju mu je dodeljena na međunarodnom kongresu 2010. godine u Sibiu, Rumunija. Bio je na 6-mesečnom usavršavanju na Mašinskom fakultetu i Medicinskom fakultetu Univerziteta u Mariboru u okviru Projekta L2-4121 Nacionalne agencije za istraživanja Republike Slovenije, i u Centru za Mikroanalizu Instituta Jožef Štefan u Ljubljani, u okviru SPIRIT Ion Beam projekta 227012. Sergej Z. Tomić je do sada bio autor i koautor u 17 naučnih publikacija u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja, 23 saopštenja na skupovima međunarodnog i 3 domaćeg značaja, i recenzent časopisa European cells and Materials, i drugih.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Сергеј Томић

број индекса 080903

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Биокомпатибилност и имуномодулаторне особине наноматеријала на бази наночестица злата и угљеничних наноцеви и напредних биоматеријалана на бази Ni-Ti и Cu-Al-Ni легура

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 25.04.2014.

Томић Сергеј

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сергеј Томић

Број индекса 080903

Студијски програм Физиологија животиња, Имунологија

Наслов рада Биокомпатибилност и имуномодулаторне особине наноматеријала на бази наночестица злата и угљеничних наноцеви и напредних биоматеријалана на бази Ni-Ti и Cu-Al-Ni легура

Ментор академик Миодраг Чолић, др Биљана Божић

Потписани/а Сергеј Томић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 25.04.2014.

Сергеј Томић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Биокомпатибилност и имуномодулаторне особине наноматеријала на бази наночестица злата и угљеничних наноцеви и напредних биоматеријалана на бази Ni-Ti и Cu-Al-Ni легура

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

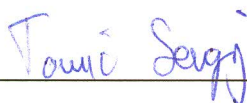
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 25.04.2014.



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.