

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Nauk o Zdrowiu

Anna Lizoń

**Nanocząstki srebra jako narzędzie do badania oddziaływań  
międzybiałkowych**

*Praca doktorska*

Promotor: dr hab. Ryszard Drożdż

Pracę wykonano w Zakładzie Diagnostyki Medycznej, Wydział  
Farmaceutyczny Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik jednostki: dr hab. Ryszard Drożdż

Kraków, 2021 rok

*Promotorowi,  
Panu dr. hab. Ryszardowi Drożdżowi dziękuję  
za pomoc na każdym z etapów powstawania tej pracy.*

## Spis treści

Alfabetyczny wykaz skrótów .....	5
1. Wstęp .....	7
1.1. Właściwości nanocząstek metali.....	8
1.1.1. Zlokalizowany powierzchniowy rezonans plazmonowy (LSPR).....	8
1.1.2. Funkcjonalizacja nanocząstek.....	9
1.1.3. Oddziaływania nanocząstki - białka, tworzenie korony białkowej wokół nanocząstek.....	13
1.2. Synteza nanocząstek metali.....	19
1.2.1. Metody fizyczne .....	20
1.2.2. Metody chemiczne .....	21
1.2.3. Metody biologiczne .....	22
1.3. Wykorzystanie nanocząstek w medycynie.....	23
1.3.1. Zastosowanie nanocząstek złota i srebra w diagnostyce laboratoryjnej.....	23
1.3.2. Zastosowania terapeutyczne nanocząstek.....	26
1.3.3. Przeciwbakteryjne działanie nanocząstek.....	28
1.4. Immunoglobuliny, wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin .....	29
2. Cel pracy i problemy badawcze .....	35
3. Materiał i metody badawcze .....	36
3.1. Synteza nanocząstek srebra.....	36
3.2. Ocena stabilności nanocząstek.....	36
3.3. Funkcjonalizacja nanocząstek srebra .....	36
3.4. Badanie oddziaływań opłaszczonych na nanocząstkach srebra przeciwciał anty-lambda z komplementarnym antygenem – FLC lambda.....	37
3.5. Metody badania oddziaływań międzybiałkowych z wykorzystaniem nanocząstek srebra.....	38
3.5.1. Pomiar spektrofotometryczny .....	38
3.5.2. Transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM) .....	38
3.5.3. Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) .....	38
3.5.4. Rozpraszanie światła laserowego .....	39

4.	Wyniki .....	40
4.1.	Synteza i charakterystyka nanocząstek srebra .....	40
4.1.1.	Rozmiary nanocząstek .....	40
4.1.2.	Ocena stabilności nanocząstek.....	43
4.2.	Wykorzystanie nanocząstek srebra do badania procesu sprzęgania białek w modelu antygen – przeciwciało .....	44
4.2.1.	Funkcjonalizacja nanocząstek srebra przeciwciałami .....	44
4.2.2.	Oddziaływanie przeciwciał anty-lambda opłaszczonych na nanocząstkach srebra z komplementarnym antygenem – wolnymi łańcuchami lekkimi lambda .....	47
4.3.	Wykorzystanie nanocząstek srebra do badania procesu wzajemnego oddziaływania wolnych monoklonalnych łańcuchów lekkich immunoglobulin .....	55
5.	Dyskusja.....	61
6.	Wnioski .....	78
7.	Streszczenie .....	80
8.	Abstract.....	82
9.	Piśmiennictwo.....	84

## Alfabetyczny wykaz skrótów

- ADCC - cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał
- ADDLs - ligandy będące pochodnymi amyloidu  $\beta$
- AgNP/AgNPs - nanocząstka/nanocząstki srebra
- Amyloidoza AL - amyloidoza łańcuchów lekkich
- AuNPs - nanocząstki złota
- BLA - (*bovine lactalbumin*); laktoalbumina bydłęca
- BPEI - rozgałęziona polietylenoimina
- BSA - (*bovine serum albumin*); albumina bydłęca
- CD - (*circular dichroism*); dichroizm kołowy
- CIT - cytrynian
- CTAB - bromek heksadecylotrimetyloamoniowy
- DCS - (*differential centrifugal sedimentation*); wirowanie różnicowe
- DLS - (*dynamic light scattering*); dynamiczne rozpraszanie światła
- DMF - dimetyloformamid
- Dnp - dinitrofenol
- EHEC - enterokrwotoczna *Escherichia coli*
- Fab - (*antigen binding fragment*); fragment wiążący antygen
- Fc - (*crystallizable fragment*); fragment krystalizowalnego
- FCS - (*fluorescence correlation spectroscopy*); spektroskopia korelacji fluorescencji
- FLC - (*free light chain*); łańcuchy lekkie immunoglobulin
- FQT - (*fluorescence quenching titration*); metoda wygaszania fluorescencji
- FRET - (*Förster resonance energy transfer*); transfer energii rezonansu Förstera
- FTIR - (*fourier transform infrared spectroscopy*); spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera
- GNRs - nanopręty złota
- HBV - (*hepatitis B virus*); wirus zapalenia wątroby typu B
- hCG - (*human chorionic gonadotropin*); ludzka gonadotropina kosmówkowa
- HIV - (*human immunodeficiency virus*); ludzki wirus niedoboru odporności
- HRE - (*high resolution electrophoresis*); elektroforeza o podwyższonej rozdzielczości
- IFN- $\gamma$  - interferon gamma
- ITC - (*isothermal titration calorimetry*); izotermiczna kalorymetria miareczkowa
- LCDD - (*light chain deposition disease*); choroba depozytów łańcuchów lekkich

LCMM - (*light chain multiple myeloma*); choroba łańcuchów lekkich

LSPR - (*localized surface plasmon resonance*); zlokalizowany powierzchniowy rezonans plazmonowy

MGUS - (*monoclonal gammopathy of undetermined significance*); gammapatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu

MRI - (*magnetic resonance imaging*); obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego

NMR - (*nuclear magnetic resonance*); magnetyczny rezonans jądrowy

NP/NPs - nanocząstka/nanocząstki

OEG - glikol oligoetylenowy

PDI - wskaźnik polidispersji

PEG - glikol polietylenowy

PEI - polieteroimid

PMAA - kwas polimetakrylowy

PSA - (*prostate specific antigen*); antygen gruczołu krokowego

PVA - polialkohol winylowy

PVP - poliwinylpirolidon

QCM - (*quartz crystal microbalance*); mikrowaga z oscylatorem kwarcowym

RSV - (*respiratory syncytial virus*) - syncytialny wirus oddechowy

SD - (*standard deviation*); odchylenie standardowe

SDS - sól sodowa kwasu dodecylosiarkowego

SEC - (*size exclusion chromatography*); chromatografia na sitach molekularnych

SPR - (*surface plasmon resonance*); powierzchniowy rezonans plazmonowy

TEM - (*transmission electron microscopy*); transmisyjny mikroskop elektronowy

TGF- $\beta$ 1 - (*transforming growth factor  $\beta$* ); transformujący czynnik wzrostu beta

TSC - cytrynian sodu

VEGF - (*vascular endothelial growth factor*); naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu

WZW B - wirusowe zapalenie wątroby typu B

Z-pot - potencjał zeta

## 1. Wstęp

Nanotechnologia to intensywnie rozwijająca się w ostatnich latach dziedzina nauki łącząca osiągnięcia z pogranicza fizyki, inżynierii materiałowej, biotechnologii molekularnej i medycyny. Nanocząstki, czyli struktury, których co najmniej jeden wymiar mieści się w przedziale między 1 a 100 nanometrów cechują się unikalnymi właściwościami fizykochemicznymi i optycznymi [1].

Nanocząstki mogą być wytwarzane ze: złota, srebra, platyny, węgla, kobaltu, miedzi, krzemu i wielu innych materiałów [2]. Wśród nanocząstek metali szlachetnych szczególnie dużo badań poświęconych jest nanocząstkom srebra (AgNPs). Wynika to z ich wyjątkowych właściwości fototermicznych, chemicznych i optycznych. Wśród tych wyróżniających je cech wymienić można m.in.: pasmo absorpcji zlokalizowane w zakresie światła widzialnego, łatwość syntezy, możliwość kontroli nad ich kształtem i rozmiarem, stabilność chemiczną oraz łatwość modyfikacji powierzchni [3]. Nanocząstki srebra wykazują też właściwości bakteriobójcze, grzybobójcze, przeciwwirusowe, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe [4,5]. Ze względu na wszystkie te cechy AgNPs są coraz powszechniej wykorzystywane w zastosowaniach biomedycznych. Prowadzone są liczne prace mające na celu wykorzystanie nanocząstek w szeroko pojętej diagnostyce laboratoryjnej, do tworzenia biosensorów i wykrywania określonych substancji (np.: alfa-fetoproteiny, hCG, PSA) czy też diagnostyki chorób zakaźnych (np. grypy, SARS-CoV-2, hepatitis B) [6-11]. W oparciu o nanotechnologię rozwija się diagnostyka obrazowa i przemysł farmaceutyczny. Wykorzystanie nanocząstek do celowanego transportu leków a także bezpośrednie działanie przeciwbakteryjne, grzybo- i wirusobójcze nanocząstek otwiera nowe możliwości terapeutyczne w przypadku wielu chorób [3,12].

Uwzględniając diagnostyczne i terapeutyczne, a czasami oba równocześnie zastosowania nanocząstek niezwykle istotne jest badanie nanomateriałów w kontekście oddziaływań z biomolekułami. Szczególnie istotną rolę odgrywają tu białka ze względu na złożoność budowy, właściwości i pełnionych funkcji. Wykorzystanie nanocząstek w połączeniu z białkami stanowi ciekawy i skomplikowany, ale dający równocześnie szereg obiecujących wyników obszar badań [13,14].

## 1.1. *Właściwości nanocząstek metali*

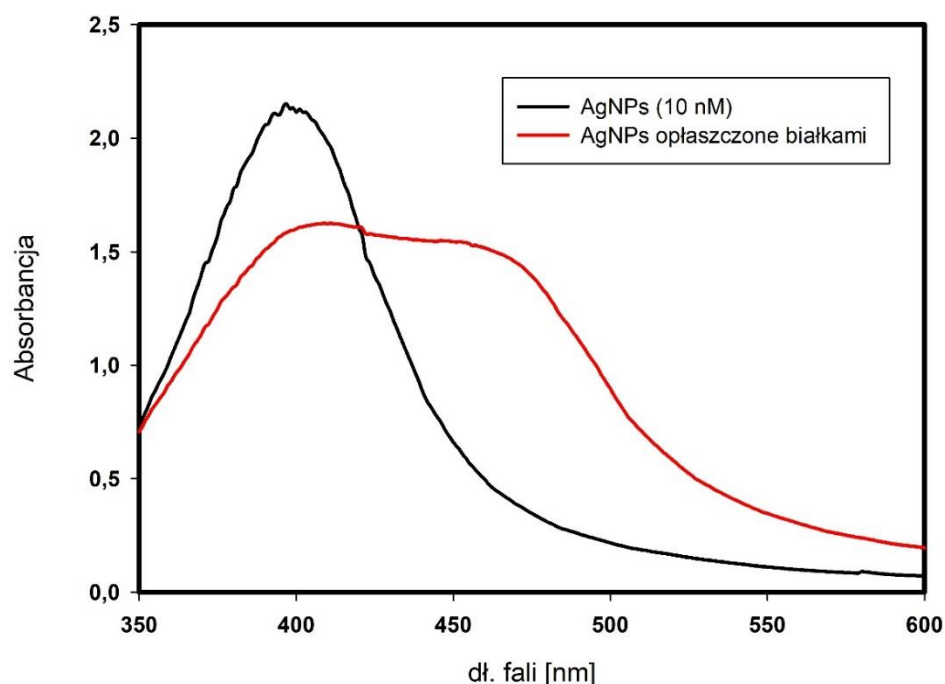
### 1.1.1. Zlokalizowany powierzchniowy rezonans plazmonowy (LSPR)

Nanocząstki metali posiadają zdolność silnego rozpraszania i absorpcji światła. Wynika to ze zjawiska tzw. zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmonowego (LSPR) polegającego na interakcji padającego światła i plazmonów (wolnych elektronów) nanometrowych struktur metalicznych. Dobierając światło o określonej długości fali (długość fali wzbudzającej plazmon dla nanoczątek srebra leży w zakresie światła widzialnego) można spowodować rezonansowe wzbudzenie chmury elektronowej. Skutkuje to silnym rozproszeniem promieniowania oraz jego absorpcją, co daje charakterystyczny obraz widma absorpcji [15].

LSPR silnie zależy od rozmiaru, kształtu, stałej dielektrycznej nanostruktur, ale także od właściwości dielektrycznych otaczającego je środowiska [16]. Nawet niewielkie zmiany współczynnika refrakcji w warstwie dielektryka leżącej bezpośrednio przy powierzchni metalu wynikające np. z agregacji cząstek czy też adsorpcji związków chemicznych na ich powierzchni skutkują zmianą długości fali wzbudzającej plazmon i pochłanianej w tym procesie, a co za tym idzie - poszerzenie pasma absorpcji i przesunięcie maksimum widma (Ryc. 1).

W praktyce przesunięcie LSPR wykorzystywane może być jako metoda wykrywania oddziaływań molekularnych blisko powierzchni nanocząstek [17]. Prowadzone są liczne prace nad tworzeniem testów diagnostycznych opartych o zmiany LSPR. Testy te, zawierające odpowiednio funkcjonalizowane nanocząstki, mogą służyć do wykrywania określonych substancji (np. troponiny T) czy też diagnostyki zakażeń (hepatitis B, wirus Denga, wirus grypy H5N1) [18-20].





**Ryc. 1.** Zmiany absorpcji światła wynikające ze zjawiska zlokalizowanego powierzchniowego rezonansu plazmowego (LSPR) dla 10 nM roztworu nanocząstek srebra po opłaszczeniu białkami. Zwraca uwagę wysoka wartość absorbancji dla roztworu o niskim stężeniu molowym [21].

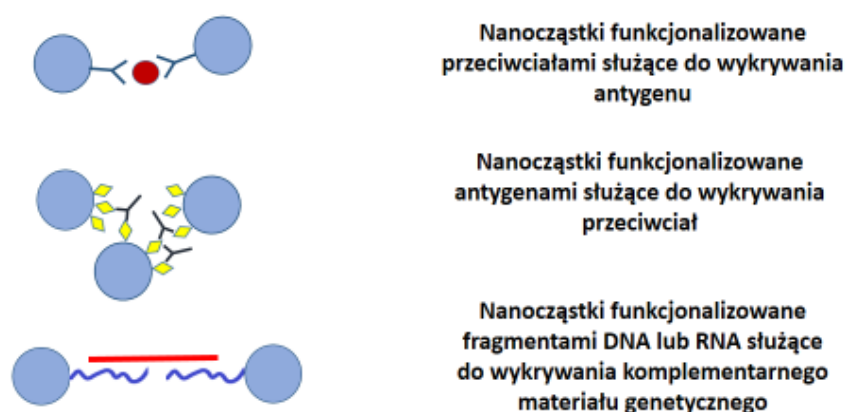
### 1.1.2. Funkcjonalizacja nanocząstek

Charakterystyczną cechą nanocząstek jest wysoki stosunek powierzchni do objętości i w związku z tym duża powierzchnia reaktywna. Stosunek ten jest tym większy im mniejsza jest średnica nanocząstki. Kuliste nanocząstki o rozmiarach w zakresie od 1-100 nm mają objętość od  $0.5 \text{ nm}^3$  do  $500\,000 \text{ nm}^3$ , pola powierzchni od  $3 \text{ nm}^2$  do  $30\,000 \text{ nm}^2$  z czego wynika, że ich stosunek powierzchnia/objętość waha się od 6 do  $0.06 \text{ nm}^{-1}$  [22]. Dla porównania w przypadku kuleczki lateksowej o średnicy  $1 \text{ }\mu\text{m}$  stosowanej powszechnie w diagnostyce laboratoryjnej wynosi on  $0.006 \text{ nm}^{-1}$ .

Kolejną ważną cechą nanocząstek srebra z punktu widzenia zastosowań biomedycznych jest ich chemiczna reaktywność. Aby wytworzyć cząstki o pożądanym własnościach fizycznych i chemicznych ich powierzchnię można poddać funkcjonalizacji czyli chemicznej modyfikacji. Funkcjonalizacja – często równocześnie kilkoma różnymi związkami - wpływa na zdolność oddziaływania nanocząstek z określonymi substancjami chemicznymi. Pozwala też na wykorzystanie nanocząstek jako nośników nierozpuszczalnych materiałów (leków, izotopów radioaktywnych), a także zapewnia długotrwałą stabilność chemiczną i odporność na

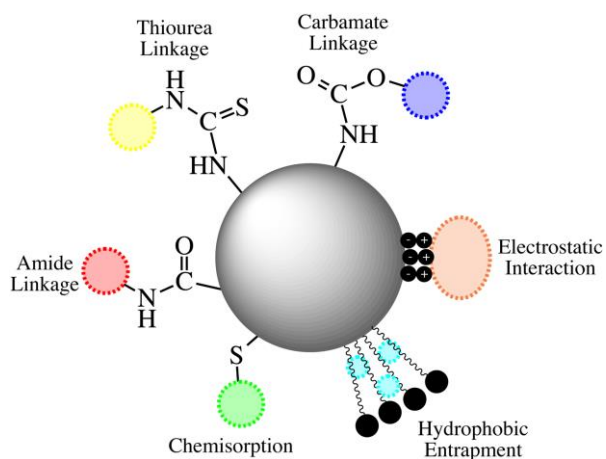
foto- i chemiczną degradację. Wytworzenie wielofunkcyjnych nanokompozytów umożliwia stosowanie nanocząstek równocześnie jako narzędzia diagnostycznego i terapeutycznego [2].

Do czynników funkcjonalizujących zaliczyć możemy szerokie spektrum związków: DNA i RNA (często w formie aptamerów), antygeny białkowe, enzymy, przeciwciała, lipidy, leki, barwniki, związki kontrastowe. Przyłączane molekuly mogą być funkcjonalnie aktywne oferując aktywność katalityczną, terapeutyczną czy detekcyjną (np. przeciwciała czy enzymy) ale też mogą stanowić bierny element strukturalny [22]. Wybór odpowiedniego związku podyktowany jest przeznaczeniem nanocząstek (Ryc. 2).

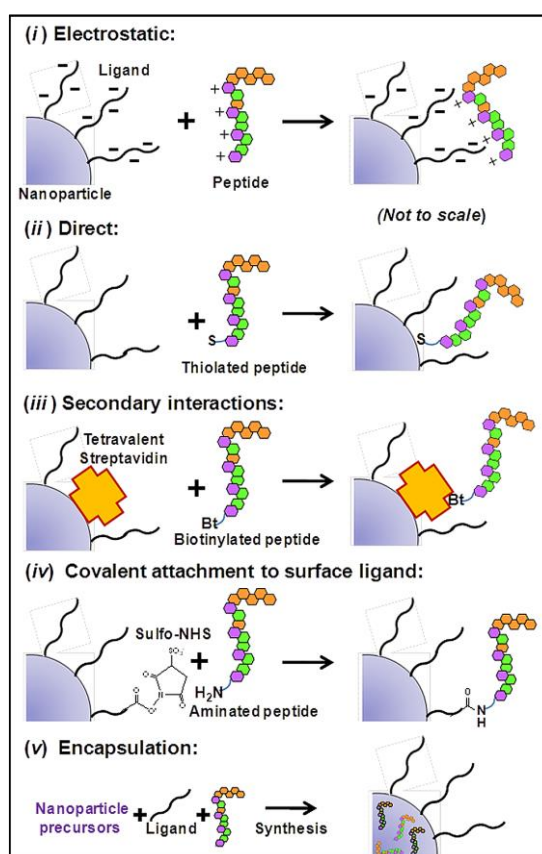


**Ryc. 2.** Przykłady funkcjonalizacji nanocząstek przeznaczonych do wykrywania wybranych analitów [21].

Modyfikacja powierzchni nanocząstek może odbywać się na drodze kowalencyjnego wiązania ligandów (chemisorbcja, wiązania siarczkowe, amidowe, itp.) ale również niekowalencyjnych oddziaływań elektrostatycznych, hydrofobowych lub sił van der Wallsa [3] (Ryc. 3, Ryc. 4).



**Ryc. 3.** Metody funkcjonalizacji nanocząstek [3].



Ryc. 4. Przykłady typowych metod funkcjonalizacji nanocząstek za pomocą peptydów [22].

Wybór strategii funkcjonalizacji zależy od wielu czynników. Wśród nich wymienić należy rozmiar, kształt nanocząstek, ich strukturę, ligandy powierzchniowe i grupy funkcjonalne a także rodzaj przyłączanej molekuly, jej rozmiar, strukturę chemiczną, a wreszcie sam końcowy cel biokonjugacji [22].

#### *Oddziaływania niekowalencyjne*

Wśród oddziaływań niekowalencyjnych do funkcjonalizacji nanocząstek srebra molekułami takimi jak DNA, peptydy, przeciwciała powszechnie wykorzystywane są interakcje elektrostatyczne. Ten sposób funkcjonalizacji polega na przyciąganiu między dwoma przeciwnie naładowanymi powierzchniami. Dodatnio naładowane biomolekuły adsorbowane są dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym na stabilizowanych anionowymi ligandami (cytryniany, askorbiniany) nanocząstkach [16]. Białka, a w szczególności przeciwciała, używane są do funkcjonalizacji nanocząstek w ten właśnie sposób od czasu prac Faulka i Taylora w 1971r. [23]. Zaletą takiej metody jest uniknięcie chemicznej modyfikacji biomolekuly, która mogłaby wpłynąć na jej aktywność. Wykorzystując jednak ten sposób

funkcjonalizacji należy wziąć pod uwagę wpływ siły jonowej otaczającego środowiska, jego pH oraz stężenia reagentów [3].

Następnym rodzajem oddziaływań niekwalencyjnych, które mogą być wykorzystywane do funkcjonalizacji nanocząstek są oddziaływania hydrofobowych fragmentów białek z hydrofobową powierzchnią nanocząstek metalicznych lub też z hydrofobowymi grupami ligandów trwale umocowanych na powierzchni NPs. Z kolei interakcje hydrofobowo-hydrofilowe wykorzystywane są często do sekwestracji leków czy innych substancji biologicznie aktywnych w matrycach nanocząsteczkowych. Enkapsulacja z wykorzystaniem nanostruktur pozwala na opracowanie nowoczesnych systemów dostarczania leków i kosmetyków w osiąganiu różnorodnych celów, m.in. kontrolowane i ukierunkowane uwalnianie określonych substancji o wysokim stężeniu, biokompatybilność, wysoka stabilność oraz przedłużone działanie [22].

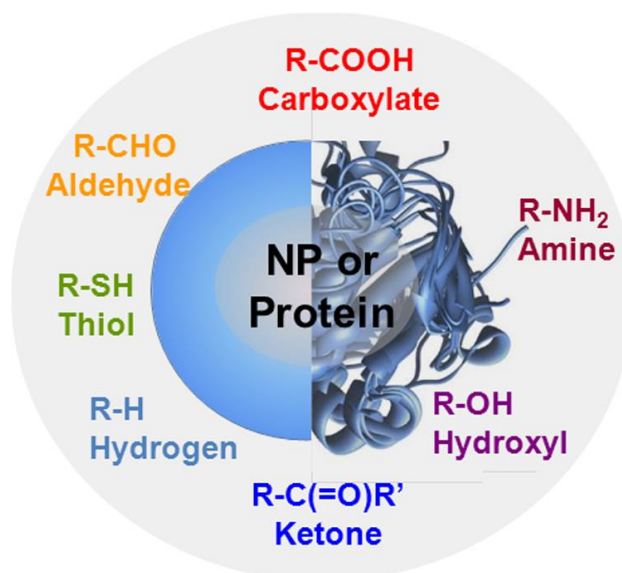
Drugorzędowe interakcje między grupami funkcyjnymi kowalencyjnie przyłączonymi do powierzchni NPs i określonych ligandów tworzą kolejną grupę niekwalencyjnych oddziaływań. Najbardziej typowym przykładem znajdującym szerokie zastosowanie w technikach laboratoryjnych jest kompleks awidyna-biotyna uznawany za jedno z najsilniejszych niekwalencyjnych oddziaływań występujących w przyrodzie, ze stałą asocjacji ( $K_a$ ) wynoszącą  $10^{15}M^{-1}$  [22]. Łatwość wiązania awidyny (lub jej analoga streptawidyny) z biotyną i szeroka gama dostępnych na rynku odczynników zawierających te białka powoduje, że kompleks ten jest niemalże rutynowo stosowany w badaniach nad wykorzystaniem NPs.

### *Oddziaływania kowalencyjne*

W porównaniu do oddziaływań niekwalencyjnych wiązania kowalencyjne zapewniają większą stabilność i powtarzalność funkcjonalizacji. W zależności od konkretnych właściwości i budowy nanocząstek oraz przyłączanych biomolekuł wiązanie może zachodzić bezpośrednio między biomolekułą a powierzchnią nanocząstki lub też przyłączonym do niej ligandem.

Bezpośrednie łączenie jest zwykle wynikiem wiązań koordynacyjnych (chemisorpcja). Przykładem tego jest oddziaływanie nanocząstek metali z grupami tiolowymi białek, peptydów lub modyfikowanych cząstek DNA. Wiązania kowalencyjne mogą ulegać dalszym zmianom pod wpływem zmiany pH, utleniania czy podmiany podstawników. Można je jednak wzmocnić przez zwiększenie liczby interakcji (np. stosowanie ligandów wielotiolowych) [22].

Do grup funkcyjnych wykorzystywanych w reakcjach sprzęgania należą grupy aminowe, tiolowe, karboksylowe, aldehydowe, hydroksylowe (Ryc. 5).



**Ryc. 5. Grupy funkcyjne najczęściej wykorzystywane do sprzęgania nanocząstek z białkami [3].**

Ponieważ bezpośrednie wiązanie biomolekuł do nanocząstek może wywoływać zmiany wpływające na ich aktywność biologiczną, wiele systemów funkcjonalizacji nanocząstek wykorzystuje dwufunkcyjne łączniki (linkery). Do powszechnie stosowanych linkerów należą glikol oligoetylenowy (OEG) i polimery PEG modyfikowane grupami aminowymi ( $-\text{NH}_3^+$ ), karboksylowymi ( $-\text{COO}^-$ ), izotiocyanianowymi ( $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ ) lub maleimidowymi ( $\text{H}_2\text{C}_2(\text{CO})_2\text{NH}$ ). Dzięki obecności tych grup możliwe jest zachodzenie konwencjonalnych reakcji sprzęgania, takich jak estryfikacja czy amidacja [2].

### 1.1.3. Oddziaływania nanocząstki - białka, tworzenie korony białkowej wokół nanocząstek

Grupą związków szeroko badanych i opisywanych w piśmiennictwie w kontekście oddziaływań z nanocząstkami są białka. Ze względu na swoją złożoność strukturalną i wszechstronne znaczenie biologiczne (enzymy, przeciwciała, białka strukturalne, sygnałowe, transportowe) są one wyróżniającą się grupą wśród innych biomolekuł [16]. Szczególnie rolę odgrywają tu przeciwciała. Białka te są częścią układu immunologicznego, biorą udział w neutralizacji toksyn i patogenów oraz w modulacji odpowiedzi odpornościowej. Mają zdolność specyficznego i selektywnego rozpoznawania konkretnych komórek, antygenów

dzięki czemu pozwalają m.in. na umieszczenie skoniugowanych z nimi nanocząstek w odpowiednim miejscu (np. tkance nowotworowej) [24].

Zainteresowanie białkami w kontekście funkcjonalizacji nanocząstek wynika z kilku faktów. Białka składają się z łańcuchów aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi. Ich masa cząsteczkowa wynosi od około 6 kDa do kilku megadaltonów. W zależności od masy cząsteczkowej i konformacji przestrzennej mają one rozmiary rzędu kilku nanometrów. Własności białek wynikają z ich struktury pierwszorzędowej (sekwencja aminokwasów), struktury drugorzędowej (fałdowanie łańcuchów peptydowych, na przykład  $\alpha$ -helisa lub  $\beta$ -harmonijka), trzeciorzędowej (trójwymiarowe fałdowanie) i czwartorzędowej (dla kompleksów więcej niż jednego białka). Złożoność strukturalna białek pozwala na wykorzystanie w procesach funkcjonalizacji różnorodnych grup funkcyjnych występujących w aminokwasach. Interakcje między powierzchnią białek a innymi molekułami czy strukturami zachodzą głównie dzięki niekowalencyjnym wiązaniom wodorowym, oddziaływaniom elektrostatycznym i hydrofobowym [14]. Badania eksperymentalne ułatwia fakt, że białka i ich koniugaty są komercyjnie dostępne. Przygotowanie nanocząstek opłaszczonych białkami jest łatwe, szybkie i możliwe na różne sposoby. Pozwala to na syntezę stabilnych i funkcjonalnych nanocząstek wykorzystywanych zarówno w diagnostyce laboratoryjnej, diagnostyce obrazowej jak i terapii [24].

W ogólnych, „idealnych” założeniach, funkcjonalizacja NPs białkami powinna przebiegać z kontrolą następujących właściwości (Ryc. 6):

1) Stosunku molowego ilości przyłączanych biomolekuł przypadających na jedną nanocząstkę. Różne zastosowania biomedyczne zwykle wymagają innego stosunku molarnego. Ważnym następstwem możliwości kontroli nad ilością przyłączanych biomolekuł jest możliwość dokładnego przewidywania liczby dostępnych miejsc koniugacji na danej NP.

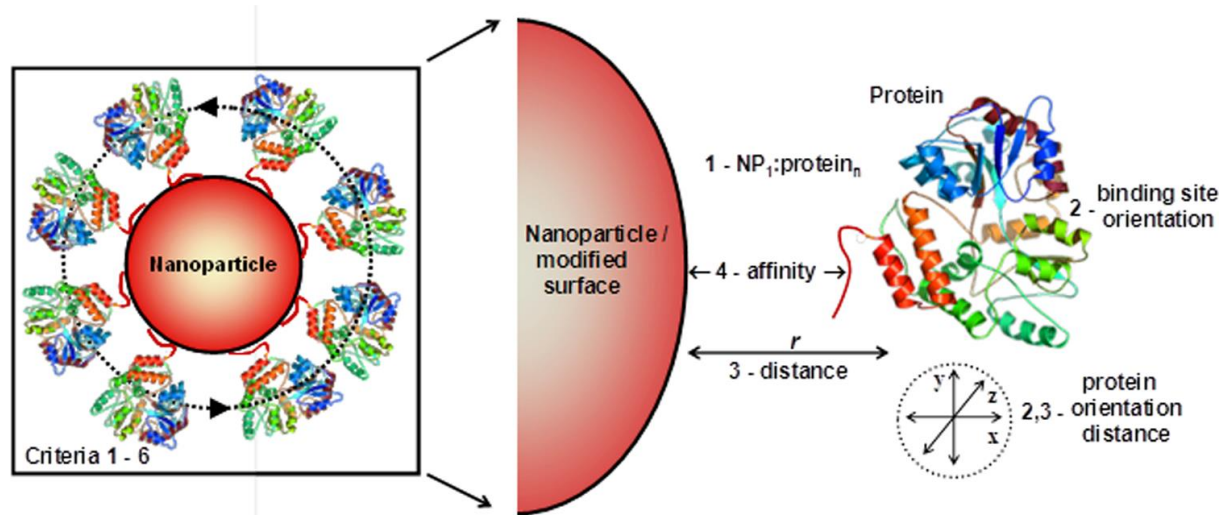
2) Orientacji przestrzennej przyłączanych ligandów i NPs. Aktywność białek, enzymów i przeciwciał zależy od dostępności ich centrów aktywnych lub miejsc wiązania. Nieswoiste reakcje chemiczne lub oddziaływania elektrostatyczne mogą powodować zmiany konformacyjne białek i tym samym zaburzać aktywność białek w końcowym koniugacie.

3) Względnej odległości ligandów od NPs. Niektóre zastosowania wymagają, aby była to ściśle określona odległość, np. schematy wykrywania wykorzystujące energię rezonansu Förstera lub transfer elektronów.

4) Powinowactwa (siły wiązania). W niektórych kompleksach nanocząstka - białko połączenie powinno być trwałe, podczas gdy w innych bardziej pożądane jest labilne połączenie, na przykład w przypadku dostarczania leków za pośrednictwem NPs.

5) Optymalnej funkcji i aktywności zarówno nanocząstek, jak i przyłączanych biomolekuł. Funkcjonalizacja nie powinna zmieniać właściwości strukturalnych i funkcjonalnych białek ani stabilności i właściwości optoelektrycznych samych NPs.

6) Odtwarzalności warunków reakcji [22].

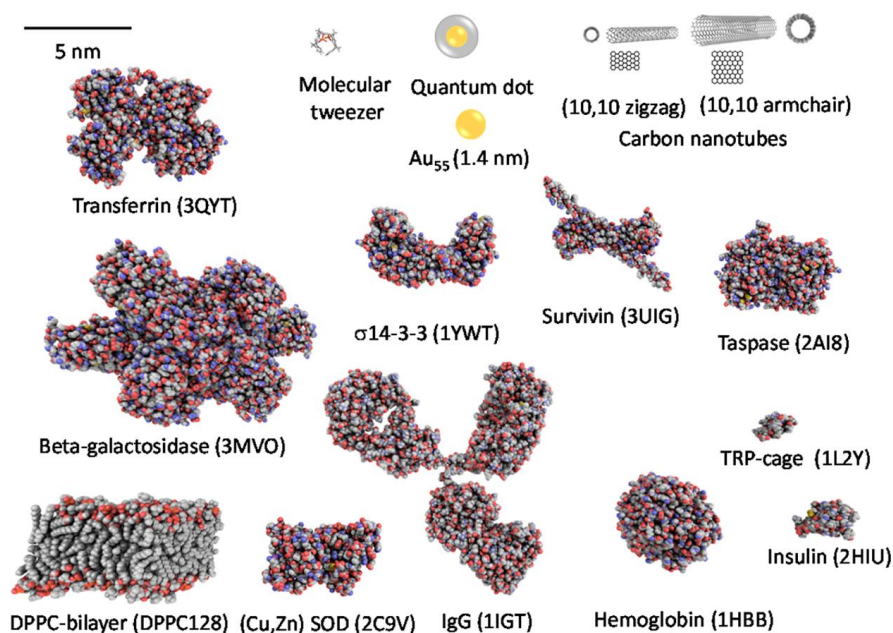


Ryc. 6. Schematyczne przedstawienie 6 podstawowych zasad skutecznej funkcjonalizacji [22].

Biorąc pod uwagę ww. założenia ważnym problemem często poruszonym w piśmiennictwie jest tworzenie tzw. korony białkowej w interakcjach nanocząstki – białka [25,26]. Jest to skomplikowany proces, którego przebieg zależy od wielu czynników. W zależności od materiału wyjściowego, rozmiarów nanocząstek, ich ładunku powierzchniowego a także rodzaju substancji stabilizujących nanocząstki, efekt oddziaływań nanocząstka – białko jest różny. Jest to istotne w kontekście wykorzystania nanostruktur do diagnostyki płynów ustrojowych.

Omawiając interakcje między nanocząstkami i białkami należy wziąć pod uwagę kilka ważnych czynników. Pierwszym z nich jest stosunek wielkości między nanocząstką a białkiem (Ryc. 7).





**Ryc. 7. Porównanie wielkości obiektów o rozmiarach nano [14].**

Białka mają rozmiary rzędu kilku nanometrów [27]. Przeciwciało o masie molekularnej 150 kD ma wielkość około  $14.5 \text{ nm} \times 8.5 \text{ nm} \times 4 \text{ nm}$  [28]. Wpływa to na sposób wzajemnego oddziaływania białek i nanocząstek. Jeśli nanocząstka jest dużo większa od białka wtedy we wzajemnych oddziaływaniach jest ona traktowana jak powierzchnia dwuwymiarowa. Jeśli rozmiary nanocząstki i białka są porównywalne prawdopodobnie będą one oddziaływać ze sobą jak dwa białka lub jak dwie nanocząstki. W przypadku bardzo małych nanocząstek i dużych białek możemy przewidzieć sytuację, w której nanocząstka może oddziaływać z konkretnym epitopem powierzchniowym lub miejscem wiążącym białka [14].

Rozmiar nanomateriałów jest ważnym czynnikiem przy określaniu jakościowego i ilościowego składu zaadsorbowanych białek na powierzchni nanocząstek. Podczas gdy niektóre raporty sugerują zmiany tylko w ilości związanego białka w zależności od wielkości nanocząstek to inne badania wskazują na zarówno ilościowe jak i jakościowe zmiany w koronach białkowych. Stwierdzono, że różnica średnicy nanocząstek rzędu 10 nm ma znaczący wpływ na kompozycję korony białkowej nanocząstek [29].

Kolejnym ważnym czynnikiem mającym wpływ na tworzenie i skład korony białkowej są cechy powierzchni nanocząstek tzn. ich ładunek i hydrofobowość/hydrofilność [29].

Trzeba podkreślić, że powierzchnia nanocząstki zawsze jest pokryta substancjami stabilizującymi (użytymi w trakcie syntezy w celu utrzymania stabilności koloidalnej cząstek), które nadają jej określony ładunek [14].



Zgodnie z ogólnie przyjętą koncepcją ujemnie naładowane nanocząsteczki przyciągają dodatnio naładowane białka i odwrotnie. Białka o  $pI > 5,5$  wykazują powinowactwo do nanocząstek ujemnie naładowanych (nanocząstki z kwasowymi grupami funkcyjnymi np. powszechnie stosowane nanocząstki srebra stabilizowane jonami cytrynianowymi), natomiast białka o  $pI < 5,5$  mają powinowactwo do nanocząstek dodatnio naładowanych. W takich przypadkach oczekuje się, że adsorpcja białka na powierzchniach nanocząstek będzie spowodowana głównie oddziaływaniami kulombowskimi [30]. Ponieważ jednak większość białek osocza ma ładunek ujemny przy fizjologicznym pH (większość białek osocza ma  $pI$  w zakresie 4,5–8), oddziaływanie białek osocza z ujemnie naładowanymi nanocząstkami oparte na ładunku jest znacznie bardziej złożone. Możliwe są np. interakcje elektrostatyczne między specyficznymi domenami powierzchniowymi białek, które posiadają ładunek komplementarny do ładunku powierzchni nanocząstek. W badaniu Maffre et al. nad adsorpcją trzech białek ludzkiej surowicy - albuminy, apolipoproteiny A-I i apolipoproteiny E4 na ujemnie naładowanych (karboksylowanych) nanocząstkach FePt zaobserwowano wzrost promienia hydrodynamicznego nanocząstek w miarę wzrostu stężenia białka. Świadczyło to o utworzeniu korony białkowej wokół nanocząstek. Wyliczony współczynnik dysocjacji wskazywał na elektrostatyczne interakcje między białkiem a nanocząstkami. Badania strukturalne białek ujawniły obecność dodatnio naładowanych obszarów na ich powierzchni, co sugerowało, że cząsteczki białka oddziałują elektrostatycznie z powierzchnią nanocząstek [31]. Dodatkowo wykazano bezpośredni związek między gęstością ładunku powierzchniowego nanocząstek a profilami adsorpcji białek. Im wyższa gęstość ładunku powierzchniowego nanocząstek tym większa była adsorpcja białek surowicy [32].

Oprócz ładunku powierzchniowego na formowanie korony białkowej zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym wpływa hydrofobowość/hydrofilność nanocząstek. Białka osocza szybciej i łatwiej adsorbują się na nanocząstkach posiadających hydrofobowe powierzchnie. Jest to o tyle zrozumiałe, że szereg białek osocza (albumina, apolipoproteiny) ma struktury hydrofobowe zaangażowane w transport hydrofobowych substancji lipidowych [29].

Kolejnym czynnikiem mającym znaczenie przy tworzeniu korony białkowej jest czas. Można wyróżnić dwa etapy tworzenia się korony białkowej: „wczesny” – gdy na nanocząstkach opłaszczają się białka posiadające niską siłę wiązania lecz dużą ruchliwość, powstaje wtedy tak zwana „miękka” korona (soft). W drugim etapie - „późnym”- białka „miękkiej” korony są wypierane przez inne, o wysokiej sile wiązania w stosunku do nanocząstek i powstaje wówczas korona „twarda” (hard). Należy podkreślić, że badanie składu

korony białkowej jest trudne gdyż wymiana białek jest procesem dynamicznym [26]. Wykazano też, że najpierw adsorbują się białka wielko- i małowcząsteczkowe, a dopiero po przedłużonej inkubacji – średniocząsteczkowe. Istotne znaczenie ma też względna ilość białek w osoczu. Pierwszymi białkami zaadsorbowanymi na nanocząstkach są albumina, IgG i fibrynogen, które później są zastępowane apolipoproteinami i czynnikami krzepnięcia [33]. Badania wskazują też na istotny wpływ temperatury (grubość korony białkowej) i składu (stężenia) białek osocza na tworzenie się korony białkowej [34,35].

Nanocząstki wprowadzane są do organizmu w różnych celach: celowana terapia, bezpośrednie działanie bakteriobójcze, bakteriostatyczne, jako środki kontrastowe w obrazowaniu diagnostycznym. Wprowadzenie nanomateriałów do systemów biologicznych wiąże się z oddziaływaniem nanocząstek z obecnymi w płynach ustrojowych związkami: białkami, kwasami nukleinowymi, lipidami. Szczególne znaczenie mają tu białka, ponieważ ich adsorbcja na powierzchni nanocząstek (tworzenie korony białkowej) może skutkować wieloma zmianami dotyczącymi zarówno nanocząstek jak i samych białek.

Z molekularnego punktu widzenia efektem oddziaływań nanocząstki - białko może być: opsonizacja, formowanie korony białkowej, denaturacja białek, tworzenie kompleksów NP-białko zmieniających strukturę i funkcje białka, aktywacja szlaków sygnałowych czy też stymulowanie odpowiedzi immunologicznej [36].

Kompozycję korony białkowej uważa się za ważną dla interakcji NPs z różnymi typami komórek (pobieranie, akumulacja w narządach, usuwanie z komórki) i w efekcie odpowiedzi biologicznej organizmu (stan zapalny, reakcje immunologiczne).

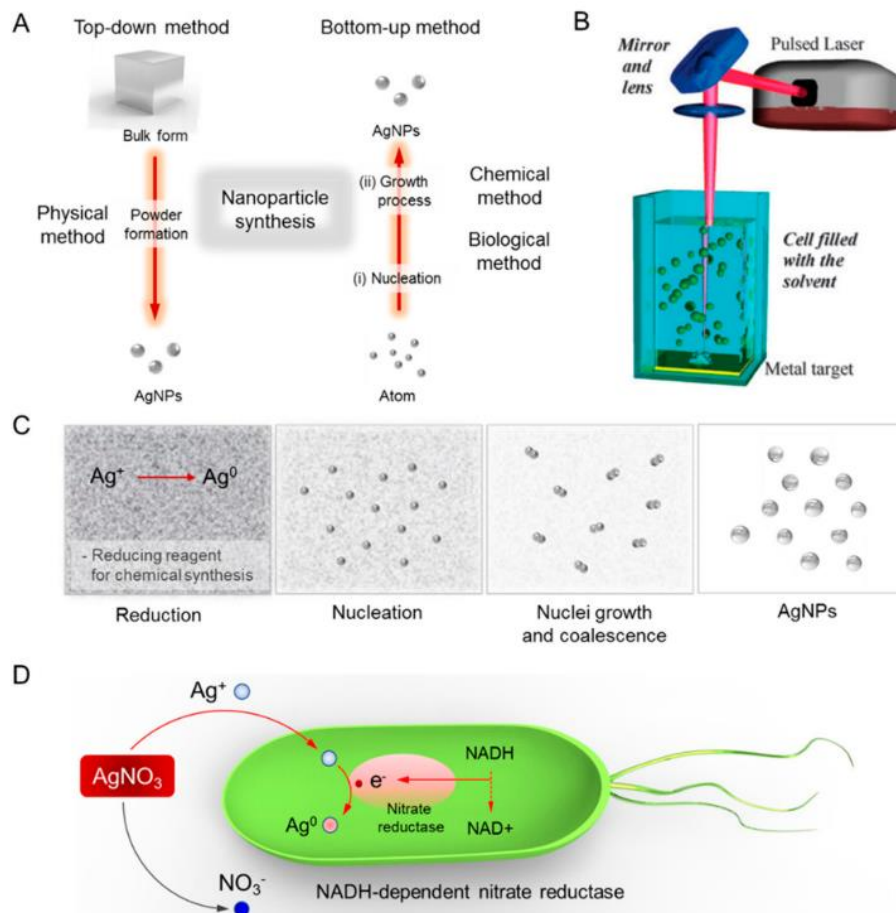
Prawidłowa struktura białek jest niezbędna do tego, aby pełniły one swoje funkcje [37]. Opisano tymczasem przypadki zmian konformacyjnych białek po ich przyłączeniu się do nanocząstek [37-39]. Zrozumienie mechanizmów tych zmian i procesu nieprawidłowego fałdowania się białek w wyniku interakcji z nanocząstkami jest bardzo ważne w kontekście biomedycznych zastosowań nanocząstek. Nieprawidłowe fałdowanie się białek prowadzić może do wytworzenia zagregowanych form białek (amyloidu) odpowiedzialnego za takie choroby jak: choroba Alzheimera, Parkinsona, cukrzyca typu II czy AL amyloidozę [37]. Biorąc pod uwagę fakt, że nanocząstki powodując zmianę konformacji białek mogą stymulować ich agregację niezwykle interesująca wydaje się możliwość wykorzystania nanocząstek jako narzędzia do wykrywania patologicznych form białek [40,41].

## 1.2. *Synteza nanocząstek metali*

Nanocząstki srebra o różnych rozmiarach i kształtach wykorzystywane są w wielu dziedzinach medycyny. Specyficzne właściwości fizyczne, chemiczne i optyczne nanostruktur determinują ich konkretne zastosowanie. Własności te możemy modyfikować wybierając odpowiedni sposób syntezy.

Strategie syntezy nanocząstek możemy ogólnie podzielić na techniki „top – down” gdzie z materiału nierozdrobnionego otrzymuje się izolowane grupy atomów (cięcie, mielenie, ścieranie, fotolitografia) i techniki „bottom up”, w których ze związków prekursorowych powstają jądra (zarodki) ulegające następnie wzrostowi. Podstawowe wady technik “top-down” to niska wydajność i niedoskonałości struktury powierzchni powstających nanocząstek. Powszechniej stosowane są metody „bottom up”, w których standardowymi reagentami używanymi w procesie syntezy są: sole metali - jako związki prekursorowe, czynniki redukujące, czynniki opłaszczające (stabilizatory) oraz rozpuszczalnik. Metody te pozwalają na uzyskanie nanocząstek o ściśle określonych rozmiarach i kształtach [4,42].

Istnieje wiele metod syntezy nanocząstek. Do trzech głównych grup należą: metody fizyczne, chemiczne i biologiczne.



Ryc. 8. Zestawienie różnych metod syntezy nanocząstek srebra (AgNPs). A) Strategia top – down i bottom-up. B) Fizyczna metoda syntezy. C) Schemat syntezy metodą chemiczną. D) Prawdopodobne mechanizmy syntezy metodą „zielonej” chemii [43].

### 1.2.1. Metody fizyczne

W metodach fizycznych wykorzystywane są m.in. mikrofałe, ultradźwięki, naświetlanie, mechaniczne rozdrabnianie. Fizyczna synteza AgNPs obejmuje technikę odparowanie-kondensacja oraz technikę ablacji laserowej. Oba te podejścia pozwalają na wytwarzanie dużych ilości AgNPs o wysokiej czystości bez użycia odczynników chemicznych i wytwarzania toksycznych substancji zagrażających zdrowiu i środowisku. Ze względu jednak na brak użycia związków stabilizujących problemem staje się agregacja nanocząstek. Wadą tych metod jest też wysokie zużycie energii i konieczność użycia skomplikowanego sprzętu [4,43].

### 1.2.2. Metody chemiczne

Metody chemiczne są najpowszechniej stosowane do syntezy nanocząstek metali szlachetnych. Polegają one na redukcji chemicznej soli metali w roztworach wodnych lub w rozpuszczalnikach organicznych.

Reduktorami są związki zapewniające wolne elektrony do procesu redukcji jonów srebra. Do najczęściej wykorzystywanych reduktorów chemicznych należą: glukoza ( $C_6H_{12}O_6$ ), hydrazyna ( $N_2H_4$ ), askorbinian ( $C_6H_7NaO_6$ ), glikol etylenowy ( $C_2H_6O_2$ ), N-dimetyloformamid (DMF), wodór, dekstroza, cytrynian (metoda Turkevicha) i borowodorek sodu (metoda Brust – Schiffrin) [43]. Rodzaj reduktora wpływa na wielkość wytwarzanych nanocząstek. Użycie silnego reduktora (np. borowodoru) powoduje syntezę małych monodispersyjnych koloidów, natomiast zastosowanie słabszego reduktora, np. cytrynianu pozwala na syntezę większych nanocząstek, a równocześnie sprzyja kontrolowaniu kształtu i rozkładu wielkości AgNPs [44].

Najpowszechniejszą metodą syntezy nanocząstek złota jest tzw. metoda Turkevicha, w której źródłem jonów złota jest kwas chlorozłotowy a reduktorem cytrynian, uzyskuje się tym sposobem nanocząstki średnicy około 10 nm [45]. Do syntezy nanocząstek srebra stosuje się metodę Lee-Meisel (będącą modyfikacją metody Turkevicha), w której źródłem jonów metalu jest azotan srebra (metoda ta daje szeroki rozkład wielkości nanocząstek) [46]. Aby uzyskać nanocząstki srebra o średnicy około 10 nm wykorzystuje się często metodę Creightona polegającą na redukcji  $AgNO_3$  borowodorkiem sodu ( $NaBH_4$ ) [47].

Podczas syntezy AgNP niezwykle ważna jest stabilizacja zdyspergowanych nanocząstek. Czynniki opłaszczające (stabilizujące) są używane by zapewnić stabilność nanocząstek w roztworze i utrzymać nanocząstki w odległości zapobiegającej ich agregacji. Do związków stabilizujących należą substancje drobnocząsteczkowe jak i polimery. Najpowszechniejszymi stabilizatorami są cytrynian, poliwinylpirolidon (PVP), glikol polietylenowy (PEG), kwas polimetakrylowy (PMAA), chitozan, celuloza [48].

Wykorzystując konkretne związki opłaszczające może nadawać powierzchni nanocząstek odpowiedni ładunek. Dzięki obecności grup kwaśnych (siarczanowych, karboksylowych) w substancjach stabilizujących powierzchnia nanocząstek zyskuje ładunek ujemny. Z kolei grupy aminowe (bromek heksadecylotrimetyloamoniowy – CTAB, cystamina, PEI) nadają im ładunek dodatni. Dość często stosuje się także niejonowe czynniki stabilizujące zwiększające hydrofilowość powierzchni metalu. Należą do nich drobnocząsteczkowe detergenty niejonowe - mieszanina polioksyetylenowych pochodnych sorbitanu – Tween lub

wielkocząsteczkowe polimery hydrofilowe – glikol polietylenowy, celuloza, poliwinylpirolidon i inne [2].

W metodach chemicznych syntezy nanocząstek jako rozpuszczalnik najczęściej stosowana jest woda, chociaż wykorzystuje się też rozpuszczalniki, które pełnią jednocześnie rolę reduktora i czynnika opłaszczającego, np.: N, N- dimetyloformamid (DMF) oraz glikol polietylenowy (PEG)[4].

Modyfikując warunki syntezy (rodzaj czynnika redukującego i jego potencjał redukcyjny, stosunek molowy czynnika redukującego do prekursora, obecność czynnika opłaszczającego oraz przez zmianę warunków reakcji: prędkość mieszania, temperaturę reakcji, oświetlenie, pH lub czas prowadzenia reakcji) możemy wpływać na, kształt oraz morfologia powierzchni uzyskanych cząstek [4].

### 1.2.3. Metody biologiczne

Biologiczne metody syntezy nanocząstek („green chemistry”) są odpowiedzią na obawy ekologów związane z potencjalnym ryzykiem związanym ze stosowaniem toksycznych środków chemicznych i powstawaniem niebezpiecznych produktów ubocznych w procesach syntezy nanocząstek. Wykorzystuje się w nich szeroką gamę przyjaznych dla środowiska środków redukujących, stabilizujących i rozpuszczalników. Należą do nich m.in. naturalne wyciągi roślinne (kawa, herbata) oraz ekstrakty grzybowe i bakteryjne, kwasy tłuszczowe (kwas cholowy, stearynowy, palmitynowy i laurylowy) [49]. Mikroorganizmy i ekstrakty roślinne stanowią cenną alternatywę dla innych reagentów stosowanych w syntezach fizykochemicznych. Podkreślane zalety tej metody to szeroka dostępność naturalnie występujących środków redukujących i stabilizujących, szybkość i stabilność powstających roztworów. Istnieją jednak sprzeczne doniesienia co do możliwości sprawowania kontroli nad kształtem i rozmiarem powstających nanocząstek związany z różnorodnością i dużą zmiennością składu naturalnych produktów biologicznych [4,18].

### 1.3. Wykorzystanie nanocząstek w medycynie

Nanomateriały wykorzystywane są w wielu obszarach medycyny. Wchodzą w skład platform (nośników) do celowanego transportu leków, a także - ze względu na właściwości bakteriobójcze i przeciwzapalne - wykorzystywane są w bezpośredniej terapii. Możliwość wygaszania oscylacji plazmonów i przekształcania energii fotonu w energię cieplną pozwala na użycie nanocząstek w fotothermalnej terapii plazmonowej związanej z termicznym niszczeniem tkanek nowotworowych [50].

Poza zastosowaniami terapeutycznymi nanotechnologia przyniosła szybki rozwój technologii diagnostycznych w dziedzinach medycznych, które można podzielić na 2 główne aspekty: diagnostyczne obrazowanie (wzmacnianie sygnałów rezonansu magnetycznego) i szeroko pojętą diagnostykę laboratoryjną.

#### 1.3.1. Zastosowanie nanocząstek złota i srebra w diagnostyce laboratoryjnej

Istnieją liczne prace eksperymentalne dotyczące zastosowania nanocząstek do konstrukcji laboratoryjnych testów diagnostycznych. Najczęściej wykorzystywane są nanocząstki złota i srebra ze względu na łatwość ich syntezy, biokompatybilność, zlokalizowanie pasma absorpcji w zakresie światła widzialnego, stabilność powierzchniową i łatwość modyfikacji ich powierzchni [3].

Zasady działania poszczególnych testów są zróżnicowane i wykorzystują czasem unikalne oddziaływania międzycząsteczkowe. Do najpowszechniejszych sposobów należą - oddziaływania enzym – substrat, antygen – przeciwciało, oddziaływania kwasów nukleinowych, reakcje redoks. Biorąc pod uwagę szerokie możliwości modyfikacji nanocząstek można je wykorzystać do detekcji różnego rodzaju związków [51]. Dodatkowo, współczynniki absorpcji molowej nanocząstek metali są o wiele rzędów wyższe od rutynowo stosowanych w diagnostyce fluoroforów (Ryc. 9), co powoduje, że czułość testów z wykorzystaniem nanocząstek jest bardzo duża [4,52].

Fluorofor	Molowy współczynnik absorbcji
AgNPs (10 nm)	556 000 000 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
AgNPs (20 nm)	4 180 000 000 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
AuNPs (nanopręty)	4 400 000 000 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
Dnp (2,4-Dinitrofenol)	17 300 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
Tyrozyna	1 490 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
Tryptofan	5 500 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
Cystyna	180 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>

**Ryc. 9. Przykłady współczynników absorbcji molowej różnych fluoroforów [6,53-56].**

Opisywano testy z nanocząstkami złota opłaszczonymi aptamerami - kilkunastonukleotydowymi fragmentami mającymi powinowactwo nie tylko do DNA czy RNA, ale też do białek - funkcjonalnie przypominającymi przeciwciał [16,57]. Testy wykorzystujące ogromną czułość układów nanocząsteczkowych funkcjonalizowanych oligonukleotydami służące do wykrywania genomowego DNA lub RNA. Testy te opierają się na wspomnianym już mechanizmie działania nanocząstek tj. wzmocnieniu rozpraszania światła. Co istotne sam proces detekcji nie wymaga wcześniejszej amplifikacji materiału genetycznego [58]. Testy takie służą m.in. do wykrywania wirusa grypy, określania wrażliwości pacjentów na warfarynę (genotypowanie), wykrywania infekcji układu oddechowego (wirusy RSV, grypy A/B), przewodu pokarmowego (*Clostridium difficile*) [9,59]. Trwają prace nad wykorzystaniem funkcjonalizowanych AuNPs w wykrywaniu onkogenów, markerów nowotworowych i broni biologicznej [3].

Jednym z najczęstszych sposobów funkcjonalizacji nanostruktur jest ich opłaszczanie przeciwciałami. Nanocząstki służą wtedy do wykrywania określonych, komplementarnych antygenów, np. HBsAg, alfa-fetoproteiny [6,7,11].

Wykorzystując klasyczne reakcje antygen - przeciwciało opracowano ilościowy test do wykrywania antygeny HBs stosowany w diagnostyce WZW B. Nanopręty złota (GNRs) znakowane są przeciwciałami anti-HBs. Połączenie się przeciwciał z antygenem powoduje zmianę grubości bezpośredniej warstwy otaczającej nanopręty. Pociąga to za sobą zmianę współczynnika refrakcji w bezpośrednim otoczeniu GNRs i przesunięcie LSPR monitorowane za pomocą metod spektrofotometrycznych [11].

To samo założenie metodyczne – reakcję immunologiczną - wykorzystano w teście do wykrywania alfa-fetoproteiny – markera guza wątrobowokomórkowego. Tutaj jednak efektem sprzężania antygen – przeciwciało jest agregacja nanostruktur złota powodująca przesunięcie LSPR monitorowane za pomocą spektroskopii UV-Vis i widoczna w mikroskopie elektronowym [6].



Podjmuje się prace zwiększające funkcjonalność testów opartych na nanocząstkach tak, by służyły one nie tylko do oznaczeń jakościowych czy ilościowych. Jednym ze sposobów okazało się użycie drugiej warstwy przeciwciał (zasada „kanapki”). To ciekawe rozwiązanie zastosowano w teście do wykrywania toksycznych oligomerów amyloidu  $\beta$  (ADDLs - ligandy będące pochodnymi amyloidu  $\beta$ ) – jako biomarkera choroby Alzheimera. Wykorzystując dwie warstwy przeciwciał (przeciwciało drugorzędowe wzmacniające sygnał) możliwy jest nie tylko ilościowy pomiar antygeny (ADDLs), ale również analiza mechanizmów agregacji patologicznego białka, co może być pomocne w zrozumieniu mechanizmów choroby Alzheimera [60].

Reakcja antygen - przeciwciało może przebiegać nie tylko w roztworach wodnych (testy probówkowe), ale też na paskach testowych (tanie, proste, czułe testy do szybkiej diagnostyki). Zasada działania testów polega na tym, że roztwór odpowiednio funkcjonalizowanych nanocząstek jest naniesiony na pole testowe paska. W obecności analitu w badanym materiale dochodzi do reakcji receptor - analit i zmiany zabarwienia paska [8,61]. Opracowano szybkie testy paskowe z wykorzystaniem nanocząstek służące m.in. do: wykrywania obecności hCG w moczu (testy ciążowe); wykrywania werotoksyny produkowanej przez enterokrwotoczne *E. coli* (EHEC) i zanieczyszczającej żywność, identyfikacji immunoglobulin IgE związanych z kilkoma różnymi alergenami i pozwalające na szybką diagnostykę zagrażającej życiu nadwrażliwości alergicznej [8,62,63].

Testy paskowe z nanocząstkami złota wykorzystuje się też do pomiarów stężenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin w surowicy – jest to jedna z niewielu metod wykrywania tych ważnych białek [24].

Stworzone też zostały testy z użyciem nanocząstek srebra lub złota wykorzystujące odmienne założenie metodyczne wtedy gdy reakcja antygen - przeciwciało hamuje agregację nanostruktur wywołaną innym czynnikiem destabilizującym [64,65].

Interakcje substancja badana – receptor na powierzchni nanocząstki wpływają w różny sposób na sygnał związany z właściwościami nanocząstek. Efekty reakcji immunologicznych opisywane w pracach cytowanych powyżej mogą być różne: agregacja nanostruktur monitorowana spektrofotometrycznie lub widoczna jako sedymentacja, zahamowanie agregacji, przesunięcie maksimum LSPR (red-shift), zmiany zabarwienia roztworu widoczne makroskopowo. Zależy to od rodzaju materiału z jakiego wykonane są nanocząstki, ich rozmiarów, sposobu funkcjonalizacji czy też specyfiki reakcji receptor – badany związek.

Kolejnym ważnym aspektem związanym z wykorzystaniem nanocząstek do tworzenia modeli diagnostycznych jest tzw. potencjał elektrokinetyczny (potencjał zeta). Jest to potencjał

występujący przy powierzchni ciała stałego lub innych cząstek rozproszonych kontaktującej się z roztworem elektrolitu. Związany jest z istnieniem podwójnej warstwy elektrycznej wokół cząstek koloidu i utworzony na granicy faz – fazy adsorbcyjnej i dyfuzyjnej. Powłoka adsorbcyjna powstaje w wyniku gromadzenia się jonów na powierzchni fazy stałej nadając cząstkom koloidu ładunek elektryczny. Powłoka dyfuzyjna (rozmyta) tworzy się w wyniku przyciągania elektrostatycznego jonów naładowanych przeciwnie. W zależności od materiału z jakiego są utworzone nanocząstki, użytych substancji stabilizujących, ośrodka w którym są zawieszane, mają one różny potencjał zeta. Ma to wpływ na możliwości ich funkcjonalizacji a także oddziaływania z białkami [25]. Sam pomiar potencjału zeta nanocząstek może też być wykorzystywany jako narzędzie do detekcji określonych substancji [64].

### 1.3.2. Zastosowania terapeutyczne nanocząstek

Wykorzystanie nanocząstek metali w medycynie obejmuje nie tylko diagnostykę, ale również szerokie spektrum zastosowań terapeutycznych.

#### **Fototermalna terapia plazmonowa (PPT)**

Bardzo wysokie współczynniki absorpcji związane ze zjawiskiem wzbudzenia plazmonów powodują powstawanie oscylacji elektronów w obrębie nanocząstek. Wygasaniu tych oscylacji towarzyszy przekształcenie energii fotonu w energię termiczną i lokalny wzrost temperatury. Opłaszczony przeciwciałem rozpoznającym antygeny nowotworowe nanocząstki metali gromadzą się na powierzchni komórek nowotworu. Stosując światło o określonej długości fali oraz wykorzystując wrażliwość komórek nowotworowych na wysoką temperaturę można spowodować fototermiczną destrukcję tych komórek. Nanocząstki mogą być tak dobrane aby wzbudzało je światło z zakresu bliskiej podczerwieni (NIR - 650-900 nm), które łatwo przechodzi przez tkanki minimalnie oddziałując z wodą i hemoglobina. Umożliwia to niszczenie nowotworów zlokalizowanych głęboko wewnątrz narządów. Trwają prace nad wykorzystaniem fototermalnej ablacji laserowej w leczeniu guzów litych głowy i szyi, nowotworów piersi, jajnika [66].

#### **Celowany transport leków**

Nanocząstki metali poddają się łatwo funkcjonalizacji różnymi biomolekułami czy substancjami chemicznymi, w tym lekami. Biorąc pod uwagę ich nanometrowy rozmiar, zdolność do przechodzenia przez błony komórkowe i możliwość akumulacji w tkankach guza

mogą być one wykorzystane jako platformy do transportu leków [67]. Prowadzone są prace nad wykorzystaniem AuNPs funkcjonalizowanych czynnikiem martwicy nowotworów w leczeniu nowotworów jelita grubego [68], a AuNPs skoniugowanych z metotrexatem w nowotworach płuc [69]. Celem dla AuNPs połączonych z odpowiednim chemioterapeutyką są też receptory hormonów – receptory estrogenowe w nowotworach piersi [70] czy androgenowe w nowotworach prostaty [71]. Biomolekułami przyłączonymi do NPs mogą być również oligonukleotydy co pozwala na ich wykorzystanie w terapii genowej [72]. Uwalnianie leków w komórkach docelowych może odbywać dzięki działaniu czynników wewnętrznych, biologicznych, jak odpowiednie pH, wysokie stężenie glutationu lub też po zadziałaniu czynnika zewnętrznego np. światła o odpowiedniej długości fali (światło widzialne lub łatwo penetrującego tkanki promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni) [67].

Poza celowanym transportem leków istnieją też inne potencjalne możliwości użycia nanocząstek w terapii przeciwnowotworowej. Wykazano zdolność AgNPs do hamowania angiogenezy oraz uszkodzenie materiału genetycznego i organelli komórkowych komórek nowotworowych przez generowanie przez nanocząstki powstawania wolnych rodników tlenowych [73,74].

Bardzo obiecujące są doniesienia o możliwości skonstruowania nanokompozytów służących równocześnie diagnostyce obrazowej i terapii przeciwnowotworowej. Do wytwarzania nowej generacji nanokompozytowych fluoroforów wykorzystywane są nanocząstki metali ziem rzadkich (erb, iterb) [75]. Mają one zdolność równoczesnej absorpcji dwóch kwantów światła i konwersji promieniowania o niskiej energii (podczerwień) w fale o energii większej. Nanocząstki lantanowców modyfikowane odpowiednim przeciwciałem rozpoznającym komórki nowotworowe wzbudzone łatwo penetrującym tkanki światłem z zakresu bliskiej podczerwieni (980 nm) emitują promieniowanie widzialne (zielone i czerwone). Pozwala to na uwidocznienie patologicznych tkanek prezentujących antygeny rozpoznawane przez przeciwciała opłaszczone na nanocząstkach [52]. Poza luminescencją wzbudzone promieniowaniem podczerwonym nanocząstki mogą wytwarzać energię termiczną i powodować fototermalną destrukcję tych tkanek. Inny pierwiastek ziem rzadkich - gadolin wykazujący silne własności paramagnetyczne wykorzystywany jest jako środek kontrastujący w badaniach metodą rezonansu magnetycznego (MRI). Wykorzystanie unikalnych własności fizycznych nanocząstek metali ziem rzadkich oraz połączenie fotoluminescencji, rezonansu magnetycznego i fototermalnej terapii plazmonowej wydaje się mieć duży potencjał w diagnostyce i leczeniu nowotworów [75].

Prowadzone są też badania nad wykorzystaniem wielofunkcyjnych nanocząstek w innych jednostkach chorobowych np. w reumatoidalnym zapaleniu stawów [76]. Warto wspomnieć, że zastosowanie złota w celach terapeutycznych ma wieloletnią historię. Już w latach 30. XX w. wykorzystano związki złota do leczenia reumatoidalnego zapalenia stawów [77].

### 1.3.3. Przeciwbakteryjne działanie nanocząstek

Powszechne stosowanie antybiotyków powoduje, że obserwujemy wzrastającą oporność na tę grupę leków. Poszukuje się alternatywy dla antybiotyków a od stuleci znane są antibakteryjne właściwości srebra.

Prace badawcze wykazały, że nanosrebro jest skutecznym czynnikiem bakteriobójczym w stosunku do szerokiego spektrum bakterii zarówno Gram-ujemnych (*Acinetobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Vibrio*), jak i Gram-dodatnich (*Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* i *Streptococcus*) [4,5].

Mechanizm działania nanocząstek srebra na komórki bakteryjne jest złożony. Przyłączenie AgNPs do ściany komórkowej bakterii upośledza jej normalne funkcje. Ze względu na swój rozmiar nanocząstki mogą przechodzić przez ściany bakteryjne i oddziaływać z wieloma elementami komórkowymi. Uwalniane jony srebra oraz powstające wolne rodniki tlenowe powodują zmiany funkcjonalne i strukturalne białek oraz materiału genetycznego komórek bakteryjnych [78].

Istnieją liczne doniesienia, że nanosrebro jest też efektywnym, szybko działającym czynnikiem grzybobójczym (*Aspergillus*, *Candida* i *Saccharomyces*), hamuje replikację wirusa HIV-1, wirusa grypy i HBV [79].

Poza zahamowaniem wzrostu drobnoustrojów nanosrebro ma też działanie przeciwzapalne - zmniejsza lokalny i systemowy stan zapalny przez modulację produkcji cytokin: Il-6, TGF- $\beta$ 1, Il-10, VEGF, IFN- $\gamma$  [80]. Dodatkowo nanocząstki srebra wpływają na proliferację keratynocytów, różnicowanie fibroblastów w myofibroblasty oraz kontrolują ułożenie przestrzenne kolagenu. Poprawiają dzięki temu rozciągliwość regenerującej się skóry [81]. AgNPs hamują również tworzenie biofilmów - agregatów drobnoustrojów, które przyłączone do komórki utrudniają działanie leków czy rozpoznanie komórek przez układ odpornościowy gospodarza [4,82]. Właściwości te powodują, że nanocząstki srebra wykorzystane są do produkcji opatrunków i roztworów odkażających.

Z kolei nanocząstki złota stały się atrakcyjnym materiałem dla inżynierii materiałowej i medycyny regeneracyjnej dążącej do odtwarzania uszkodzonych struktur. Okazało się, że

inkorporacja nanostruktur złota do rusztowań regeneracyjnych tkanki kostnej, chrzęstnej czy nerwowej poprawia właściwości mechaniczne biomateriałów stanowiących te rusztowania, jak również przyspiesza proliferację i różnicowanie odbudowujących się komórek [83].

#### 1.4. Immunoglobuliny, wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin

Immunoglobuliny (przeciwciała) to grupa glikoprotein, które stanowią jeden z najważniejszych specyficznych mechanizmów obronnych naszego organizmu. Są one wytwarzane są przez pobudzone komórki plazmatyczne w odpowiedzi na kontakt z antygenem. W skład każdej cząsteczki immunoglobuliny wchodzi cztery łańcuchy polipeptydowe: dwa łańcuchy ciężkie (o masie 55-75 kD) i dwa łańcuchy lekkie (22-24 kD) połączone ze sobą mostkami disiarczkowymi. Zarówno łańcuchy lekkie jak i łańcuchy ciężkie zawierają tzw. część stałą (C) czyli fragmenty o bardzo podobnej budowie we wszystkich ludzkich immunoglobulinach oraz część zmienną (V). W zależności od sekwencji aminokwasowej części stałej łańcuchów ciężkich immunoglobuliny dzieli się na 5 klas: IgG, IgA, IgM, IgE oraz IgD. Budowa części stałej łańcuchów lekkich determinuje ich podział na dwa typy: kappa i lambda. Z kolei dzięki specyficznej sekwencji aminokwasowej części zmiennej możliwe jest oddziaływanie konkretnego antygeny z komplementarnym przeciwciałem. Strukturalnie możemy wyróżnić w budowie cząsteczki immunoglobuliny fragmenty Fab odpowiedzialne za wiązanie z antygenem i fragment efektorowy Fc [84].

Biorąc pod uwagę dużą różnorodność antygenów, z jakimi nasz organizm ma kontakt, układ immunologiczny ma możliwość wytworzenia olbrzymiej ilości wariantów przeciwciał. Pobudzone limfocyty B stają się komórkami plazmatycznymi i wydzielają przeciwciała, które posiadają różne funkcje efektorowe. Do ich najważniejszych funkcji należą:

- neutralizacja patogenów i toksyn,
- aktywacja układu dopełniacza,
- opsonizacja, w wyniku której patogen może być usunięty na drodze fagocytozy,
- cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał (ADCC),
- odpowiedź na pasożyty i udział w reakcjach alergicznych (IgE),
- ochrona błon śluzowych (IgA) [24].

Łańcuchy lekkie immunoglobulin wytwarzane są w nadmiarze w stosunku do łańcuchów ciężkich i wydzielane z plazmocytołów w postaci wolnych łańcuchów lekkich (*free light chain*, FLC). Dobowa synteza wolnych łańcuchów lekkich u zdrowego człowieka wynosi ok. 0,5-1,0 grama [85]. Wolne łańcuchy lekkie kappa występują najczęściej w postaci

monomeru a ich okres półtrwania we krwi wynosi około 2-4 godziny. Z kolei wolne łańcuchy lekkie lambda najczęściej występują w postaci kowalencyjnego dimeru i utrzymują się we krwi dłużej, około 3-6 godzin [86]. Masa cząsteczkowa monomeru wolnych łańcuchów lekkich wynosi około 22 kDa, natomiast dla dimeru jest to około 44 kDa. Są to białka drobnocząsteczkowe, które łatwo przechodzą przez błonę podstawną kłębuszków nerkowych, a następnie są absorbowane w komórkach nabłonkowych cewek nerkowych bliższych. Po przekroczeniu zdolności resorpcyjnej kanalików nerkowych, „nadmiarowe” łańcuchy zostają wydalone z moczem. Fizjologicznie stężenia lekkich łańcuchów kappa i lambda w surowicy powinny mieścić się w przedziale wartości referencyjnych i wynosić odpowiednio: 3,30–19,40 mg/l (FLC kappa) oraz 5,71-26,30 mg/l (FLC lambda) a prawidłowy stosunek  $\kappa/\lambda$  powinien wynosić 0,26-1,65 [87].

Łańcuchy lekkie immunoglobulin to istotny element strukturalny przeciwciał biorący udział w tworzeniu miejsc wiążących antygen kompletnej cząsteczki immunoglobuliny. Wykazano, że same łańcuchy lekkie także mogą łączyć się z antygenem choć ich powinowactwo do antygeny jest słabsze w porównaniu do powinowactwa kompletnego przeciwciała. Wśród innych funkcji wolnych łańcuchów lekkich wymienić można zdolność uczulania mastocytów, udział w patogenezie opóźnionej reakcji nadwrażliwości typu komórkowego oraz w rozwoju chorób autoimmunologicznych [85].

Wytwarzanie poliklonalnych wolnych łańcuchów lekkich może znacznie wzrosnąć podczas infekcji lub w stanach zapalnych, powodując wzrost wartości bezwzględnych obu łańcuchów kappa i lambda ze względnie niezmiennym stosunkiem  $\kappa/\lambda$ . Przeciwnie, nowotwory układu krwiotwórczego i dyskracje plazmocytowe wytwarzające monoklonalne łańcuchy kappa lub lambda z tłumieniem syntezy alternatywnego łańcucha lekkiego wyraźnie zmieniają stosunek  $\kappa/\lambda$ . Podsumowując, zwiększone stężenie jednego z FLC z nieprawidłowym stosunkiem  $\kappa/\lambda$  pośrednio odzwierciedla ekspansję klonalnych komórek plazmatycznych i wymaga dalszej szczegółowej diagnostyki. Ocenę stężenia i stosunku stężenia łańcuchów  $\kappa/\lambda$  wykorzystuje się w diagnostyce i monitorowaniu m.in. takich chorób jak: AL amyloidoza, szpiczak mnogi, choroba lekkich łańcuchów, chłoniak nieziarniczny, czy gammapatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu.

Immunoglobuliny będące produktem wielu klonów komórek plazmatycznych określane są jako poliklonalne. Na obrazie elektroforetycznym tworzą one szerokie pasmo w strefie  $\gamma$ -globulin. Nowotworowy rozrost pojedynczego klonu komórek plazmatycznych jest przyczyną grupy chorób określanych jako gammapatie monoklonalne. Charakteryzują się one obecnością w surowicy jednorodnej frakcji białkowej określanej jako białko monoklonalne.

Mogą to być kompletne immunoglobuliny lub fragmenty immunoglobulin. Przykładem gammapatii monoklonalnej jest szpiczak mnogi. Jest to drugi pod względem częstości nowotwór hematologiczny występujący głównie u osób starszych, choć zaobserwowano w ostatnich latach, że częstość występowania szpiczaka mnogiego zdecydowanie wzrasta i coraz częściej chorują osoby poniżej 55 rż. W przebiegu szpiczaka dochodzi do wytwarzania monoklonalnej immunoglobuliny IgG, ale mogą to być też immunoglobuliny innych klas lub też wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin. Klonalna proliferacja komórki plazmatycznej w szpiku powoduje tworzenie ognisk guzowatych, zwiększonej łamliwości kości i osteoporozy. Inne objawy szpiczaka to osłabienie, narastająca niedokrwistość, zmniejszona odporność na zakażenia, uszkodzenie nerek, zaburzenia krzepliwości krwi [88].

U około 15% chorych na szpiczaka wytwarzane są wyłącznie łańcuchy lekkie immunoglobulin. Jest to tzw. choroba łańcuchów lekkich - LCMM (*light chain multiple myeloma*). Wydzielane w nadmiarze wolne łańcuchy lekkie po przekroczeniu zdolności resorpcyjnej cewek nerkowych pojawiają się w moczu. Wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin wykazują toksyczne działanie na nerkę i są powodem uszkodzenia nerki (tzw. nerki szpiczakowej). Mogą wywoływać ostrą lub przewlekłą niewydolnością nerek. Mechanizm toksycznego działania FLC na nerki u różnych pacjentów może być odmienny. U części chorych odkładają się one w kłębuszkach nerkowych prowadząc do rozwoju choroby depozytów łańcuchów lekkich (LCDD – *light chain deposition disease*) [86].

Wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin to bardzo zróżnicowana grupa białek. Niektóre formy tego patologicznego białka (FLC) obecnego u chorych na szpiczaka są odpowiedzialne za inną chorobę depozytów białkowych – amyloidozę [89]. Amyloidozy to grupa chorób charakteryzująca się odkładaniem w organizmie nierozpuszczalnych, fibrylarnych form białek. Złogi amyloidu są deponowane głównie pozakomórkowo, chociaż po posiedzeniu członków *Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis* w 2006 roku definicję rozszerzono o wewnątrzkomórkowe depozyty charakterystyczne dla amyloidu [90].

Mechanizm powstawania amyloidu związany jest ze zaburzeniem fałdowania się białek. Pod wpływem pewnych czynników natywna, niestabilna termodynamicznie forma białka przyjmuje strukturę  $\beta$ -kartki, z której formowane są w dalszej kolejności włókna amyloidowe. Złogi te można uwidocznnić w badaniu mikroskopii elektronowej i mikroskopii spolaryzowanej po zabarwieniu czerwienią Kongo, co wykorzystuje się w diagnostyce [91].

Do tej pory zidentyfikowano około 30 białek mogących być prekursorami amyloidu. Obecnie najczęstszą formą amyloidozy jest amyloidoza AL (z łańcuchów lekkich immunoglobulin) [92]. Występuje ona w około 10-15% przypadków szpiczaka mnogiego.

Ponieważ jednak nie ma obecnie dobrych narzędzi do skringu amyloidozy, wydaje się, że liczba poprawnych rozpoznań jest niedoszacowana. Amyloidoza AL może też być wynikiem łagodnego pierwotnego rozrostu plazmocytozów spełniającego kryteria rozpoznania gammapatii monoklonalnej o nieokreślonym znaczeniu (MGUS, *monoclonal gammopathy of undetermined significance*). Objawy kliniczne amyloidozy zależą od lokalizacji narządowej depozytów. Odkładanie się patologicznych białek prowadzi w konsekwencji do upośledzenia funkcji zajętych narządów. W przypadku AL amyloidozy organami najczęściej zajętymi są serce, nerki, wątroba, język. Mechanizm molekularny tego uszkodzenia nie jest do końca poznany. Jego wyjaśnienie oparte wyłącznie o zastępowanie substancji międzykomórkowej przez złogi amyloidowe jest niewystarczające. Istnieją teorie, że właściwości cytotoksyczne wykazują nie same włókna, ale prekursorzy włókien amyloidowych. U niektórych pacjentów amyloidogenne monoklonalne wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin wiążą się z czynnikiem X układu krzepnięcia prowadząc do powstania wybroczyn [93].

Patologiczne złogi białkowe mogą przybierać też formę amorficznych struktur. Dzieje się tak w chorobie depozytów białkowych łańcuchów lekkich (LCDD). Amorficzne złogi białkowe odkładają się głównie w nerkach, w odróżnieniu od AL amyloidozy nie barwią się czerwienią Kongo i nie oddziałują z tioflawiną. Większość przypadków LCDD wiąże się z wytwarzaniem nadmiernej ilości wolnych łańcuchów lekkich typu kappa (w przeciwieństwie do AL amyloidozy gdzie dominują FLC typu lambda) [94].

Nadmierna synteza (u niektórych pacjentów kilkadziesiąt gramów na dobę) łańcuchów lekkich nie jest jednoznaczna z predyspozycją do tworzenia amyloidu. Nie wiadomo do końca co powoduje, że u konkretnego pacjenta dochodzi do odkładania patologicznych białek. Na pewno istotną rolę odgrywa sekwencja aminokwasowa części zmiennej łańcucha. Wyróżniono pewne sekwencje aminokwasowe wspólne dla wielu rodzajów prekursorów amyloidu łańcuchów lekkich [95,96]. Charakterystyczne dla prekursorów włókien amyloidowych są fragmenty o strukturze beta kartki [97]. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że odtworzenie procesu tworzenia złożeń białkowych *in vitro* bywa bardzo trudne, nasuwa się wniosek, że na proces amyloidogenezy składa się również wiele czynników środowiskowych. Dopiero wzajemne oddziaływanie między białkiem i środowiskiem skutkuje formowaniem fibryli lub amorficznych złożeń [98]. Zwraca się uwagę na znaczenie stężenia prekursorów patologicznych złożeń [99]. Istotną rolę w procesie tworzenia depozytów białkowych odgrywa pH środowiska [100]. Istnieje związek między punktem izoelektrycznym białek a typem złożeń. W przypadku AL amyloidozy punkt izoelektryczny łańcuchów mieści się w granicach



3.8 – 5.2 podczas gdy w LCDD białka mają bardziej zasadowy charakter, choć zdarzają się też odstępstwa od tej reguły [101].

Wyjaśnienie mechanizmów prowadzących do rozwoju chorób związanych z tworzeniem depozytów białkowych jest ważne w kontekście odpowiedniej diagnostyki i szybkiego podjęcia leczenia. Wcześnie wdrożona terapia może zahamować rozwój choroby i poprawić jakość życia pacjentów.

Współcześnie wykrywanie białka monoklonalnego związane z diagnostyką szpiczaka mnogiego wykorzystuje różne warianty metod elektroforetycznych. Są to m.in. elektroforeza białek surowicy na żelu agarozowym, elektroforeza o podwyższonej rozdzielczości (*HRE – high resolution electrophoresis*) lub immunofiksacja surowicy. W przypadku gammopatii monoklonalnych ze zwiększonym wytwarzaniem łańcuchów lekkich immunoglobulin ze względu na ich krótki okres półtrwania przydatna jest elektroforeza białek moczu. Metodą referencyjną jest tu elektroforeza na żelu poliakrylamidowym z dodatkiem SDS [88].

Ze względu na ograniczoną czułość metod elektroforetycznych konieczne stało się stworzenie nowych narzędzi diagnostycznych. W ostatnich latach na znaczeniu zyskują metody immunochemiczne oparte o turbidymetrię i nefelometrię. Wykorzystuje się w nich przeciwciała monoklonalne lub poliklonalne uzyskiwane od zwierząt immunizowanych ludzkimi FLC [102].

Nefelometryczne oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich w surowicy pozwala na obliczenie stosunku stężeń wolnych łańcuchów lekkich kappa do wolnych łańcuchów lekkich lambda. Stosunek ten jest podwyższony lub obniżony w odniesieniu do wartości referencyjnej w chorobach związanych z monoklonalnym rozrostem komórek plazmatycznych. Oznaczanie wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin jest obecnie „złotym” standardem w diagnostyce i monitorowaniu leczenia szpiczaka mnogiego [103].

W rutynowych laboratoriach diagnostycznych do ilościowego oznaczania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin używany jest lateksowy test nefelometryczny Freelite firmy Binding Site. Wykorzystujący owcze przeciwciała poliklonalne test stał się narzędziem referencyjnym i służy do diagnostyki szpiczaka mnogiego i innych gammopatii monoklonalnych [104]. Czułość analityczna tego komercyjnie dostępnego testu wynosi 5 mg/l. W ostatnich latach wprowadzono również dwa nowe testy – oparty o przeciwciała monoklonalne N Latex FLC (Siemens) i wykorzystujący przeciwciała poliklonalne Sebia FLC. Każdy z tych testów ma pewne ograniczenia. Porównując uzyskane w testach wyniki daje się zauważyć pewne niespójności analityczne. W przypadku niektórych pacjentów wyniki otrzymane za pomocą jednego testu różnią się kilkukrotnie od wyników uzyskanych inną

metodą. Prowadzone są badania mające na celu wyjaśnienie przyczyn tych niespójności [105,106].

Mimo ciekawych właściwości fizykochemicznych i optycznych nanocząstek niewiele jest skomercjalizowanych testów opartych o nanocząstki srebra. Wobec niskich kosztów syntezy, dużej stabilności, łatwości funkcjonalizacji i wysokiego współczynnika absorpcji molowej mogą one stanowić dobrą alternatywę dla np. kulek lateksowych wykorzystywanych w testach immunochemicznych. Należy podkreślić, że wolne monoklonalne łańcuchy lekkie immunoglobulin to bardzo heterogenna grupa białek. Można przyjąć w uproszczeniu, że każdy klon plazmacytów wytwarza niepowtarzalny rodzaj białka. Niektóre z klonów białkowych mają tendencję do tworzenia złogów amyloidowych. Obecnie wiemy, że większość przypadków AL amyloidozy diagnozowana jest zbyt późno. W przypadku gdy złogi amyloidowe powstają w tkance mięśnia sercowego większość pacjentów umiera w ciągu kilku miesięcy. AL amyloidozę można skutecznie leczyć. Warunkiem skutecznego leczenia jest wczesna diagnostyka. Obecnie nie istnieją testy laboratoryjne oceniające podatność wolnych łańcuchów lekkich na agregację i tworzenie fibryli amyloidu [97].

Wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin i przeciwciała anti-FLC są materiałem, który został wykorzystany w niniejszej pracy do stworzenia układu modelowego z wykorzystaniem nanocząstek. Po opracowaniu odpowiedniej metodologii oceny agregacji białek będzie można technologię wykorzystaną w pracy poszerzyć do śledzenia innych reakcji związanych z agregacją białek i tworzeniem depozytów białkowych.

## 2. Cel pracy i problemy badawcze

Celem pracy była próba zastosowania nanocząstek srebra do badania oddziaływań międzybiałkowych w oparciu o model antygen (FLC) – przeciwciało oraz do badania procesu spontanicznej agregacji wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin.

Do szczegółowych problemów badawczych należały:

- a) wybór optymalnej metody syntezy nanocząstek srebra,
- b) ocena własności fizycznych a w szczególności stabilności AgNPs,
- c) ustalenie warunków stechiometrycznych nanocząstki/przeciwciała koniecznych do optymalnej funkcjonalizacji nanocząstek białkami,
- d) ustalenie warunków przebiegu referencyjnej reakcji immunochemicznej antygen - przeciwciało związanej z agregacją białek,
- e) ocena użyteczności różnych technik badawczych do śledzenia procesu agregacji opłaszczonych białkami nanocząstek,
- f) próba zastosowania opracowanej metodologii do wykrywania procesu agregacji wolnych monoklonalnych łańcuchów lekkich immunoglobulin.

## 3. Materiał i metody badawcze

### 3.1. Synteza nanocząstek srebra

a) Syntezę wykorzystanych w pracy nanocząstek srebra przeprowadzono według metody opisanej przez Creightona [47]. Nanocząstki te dodatkowo stabilizowano cytrynianem sodu.

Do 19 ml schłodzonej wody destylowanej dodano 0,5 ml 0,01 M  $\text{AgNO}_3$  i 0,5 ml 0,01 M cytrynianu sodu. Do tak przygotowanego roztworu umieszczonego na mieszadle magnetycznym dodawano powoli kroplami 0,6 ml 0,001 M borowodorku sodu. Po zakończonej syntezie roztwór miał jasnożółtą barwę, świadczącą o uformowaniu się nanocząstek srebra o kształcie sferycznym i rozmiarze około 10 nm.

b) W pracy otrzymano także nanocząstki srebra z wykorzystaniem hydrazyny na drugim etapie redukcji oraz dwóch związków stabilizujących: PVA i cytrynianu [107].

Do 2 ml 0,001M roztworu azotanu (V) srebra dodano 2 ml PVA (1% w/v) i dobrze zmieszano. Do przygotowanej mieszaniny dodawano kroplami 2 ml 0,001M  $\text{NaBH}_4$  cały czas intensywnie mieszając – powstaje żółty roztwór (I) – jądra nukleacji. Do 1 ml PVA dodano 1 ml roztworu (I), 3 ml 0,1 M cytrynianu sodu (TSC) i 5 ml 0,1M hydrazyny ( $\text{N}_2\text{H}_4$ ). Kontynuując mieszanie dodawano stopniowo kroplami 0,001 M  $\text{AgNO}_3$  uzyskując roztwór o pomarańczowym zabarwieniu, a następnie – w miarę dodawania  $\text{AgNO}_3$  – roztwór o czerwonym, fioletowym i niebieskim zabarwieniu.

### 3.2. Ocena stabilności nanocząstek

W celu oceny stabilności nanocząstek do roztworów nanocząstek uzyskanych obiema metodami do 1 ml AgNPs dodawano po 1 ml roztworów NaCl o wzrastających stężeniach (0,125 M; 0,25 M; 0,5 M; 1 M).

### 3.3. Funkcjonalizacja nanocząstek srebra

W pierwszy etapie pracy funkcjonalizację AgNPs przeprowadzono wykorzystując komercyjnie dostępne przeciwciała anty-lambda (antysurowica Lambda Bound and Free firmy Interlab). Funkcjonalizacja ta polegała na dodaniu do 10 ml roztworu nanocząstek 1  $\mu\text{l}$  przeciwciał poliklonalnych anty-lambda, mieszaninę inkubowano 30 minut w temperaturze

37°C. Tak przygotowane (opłaszczone przeciwciałami) nanocząstki wykorzystano następnie do śledzenia przebiegu reakcji immunochemicznej antygen (FLC) – przeciwciało.

W drugim etapie badań do opłaszczania nanocząstek srebra wykorzystano mocze od pacjentów z białkomoczem Bence-Jonesa. Charakterystykę moczy przeprowadzono wykonując SDS elektroforezę z użyciem komercyjnie dostępnych żelów gradientowych 4-20% firmy Sigma. Immunofiksację białek moczu – w celu określenia rodzaju wolnych łańcuchów lekkich – przeprowadzono na komercyjnych żelach do immunofiksacji firmy InterLab z wykorzystaniem przeciwciał anty-FLC kappa i anty-FLC lambda (antysurowica Lambda/Kappa Bound and Free oraz antysurowica Lambda/Kappa Free firmy Interlab).

Do badań wykorzystano materiały od 19 pacjentów, z czego 9 moczy zawierało wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin typu lambda a 10 – wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin typu kappa. Zakresy stężeń FLC lambda w moczu pacjentów wynosiły 54,8 mg/l - 5370 mg/l, natomiast zakresy stężeń FLC kappa 100 mg/l – 3900 mg/l. Pomiarów stężeń FLC dokonywano komercyjnym testem Freelite firmy Binding Site.

Dla każdego pacjenta przygotowano 6 prób: do 1 ml nanocząstek srebra dodawano takie ilości moczu, aby uzyskać końcowe stężenia FLC w próbkach równe: 0 mg/l [0 nM], 0,2 mg/l [10 nM], 1 mg/l [50 nM], 3 mg/l [150 nM], 5 mg/l [250 nM] i 10 mg/l [500 nM]. Próbkę inkubowano w temperaturze 37°C przez dobę. Do próbek w których nie doszło do samoistnej agregacji a zmiany widmowe sugerowały wytworzenie stabilnej korony białkowej dodawano przeciwciała, odpowiednio: anty-lambda lub anty-kappa.

#### *3.4. Badanie oddziaływań opłaszczonych na nanocząstkach srebra przeciwciał anty-lambda z komplementarnym antygenem – FLC lambda*

W celu śledzenia reakcji immunochemicznej zachodzącej pomiędzy przeciwciałami anty-lambda opłaszczonymi na nanocząstkach srebra a wolnymi łańcuchami lekkimi immunoglobulin (FLC) przygotowano materiał wyjściowy - roztwór FLC o stężeniu 2,2 g/l [100 µM]. Wykorzystany do tego liofilizat wolnych łańcuchów lekkich otrzymany został z próbek moczu pacjentów, u których została zdiagnozowana gammapatia monoklonalna oraz białkomocz Bence-Jonesa. Do wyizolowania FLC została wykorzystana metoda wysalania roztworem siarczanu amonowego.

Do 1 ml opłaszczonych przeciwciałami nanocząstek srebra dodawano kolejno: po 1 µl odpowiednich rozcieńczeń (10x, 8x, 5x, 4x, 3x, 2x) roztworu wyjściowego FLC (2,2 g/l [100 µM]) oraz, aby uzyskać wyższe stężenia, 1, 2, 3, 4, 5, 7 i 10 µl roztworu wyjściowego.

Końcowe stężenia FLC w próbkach wynosiły 0,2–22 mg/L (10 - 1000 nM). Po wymieszaniu próbki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny.

### *3.5. Metody badania oddziaływań międzybiałkowych z wykorzystaniem nanocząstek srebra*

#### **3.5.1. Pomiar spektrofotometryczny**

Zmiany widma powierzchniowego rezonansu plazmonowego wynikające z opłaszczenia nanocząstek przeciwciałami, wolnymi łańcuchami lekkimi immunoglobulin a także zmiany będące efektem reakcji immunologicznej antygen - przeciwciało mierzono przez wykonanie pomiarów spektrofotometrycznych. Widma UV-Vis wykonano na analizatorze MultiscanSky (Thermoscientific).

#### **3.5.2. Transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM)**

Rozmiar i kształt nanocząstek stabilizowanych cytrynianem, nanocząstek opłaszczonych białkami oraz agregatów zobrazowano z wykorzystaniem wysokorozdzielczego transmisyjnego mikroskopu elektronowego Tecnai TF 20 X-TWIN (200 kV) wyposażonego w działo elektronowe z emisją polową (Field Emission Gun - FEG) (Akademickie Centrum Materiałów i Nanotechnologii AGH, Kraków). Materiał do badania umieszczony był na siatkach miedzianych z filmem węglowym. Analizę obrazów TEM wykonano wykorzystując oprogramowanie DeltaOptical DLT CamViewer (ver. x64, 3.7.12277.20180703). Wartości średnic uzyskano za pomocą narzędzia do pomiaru odległości uprzednio skalibrowanego względem paska skali umieszczonego na obrazach TEM.

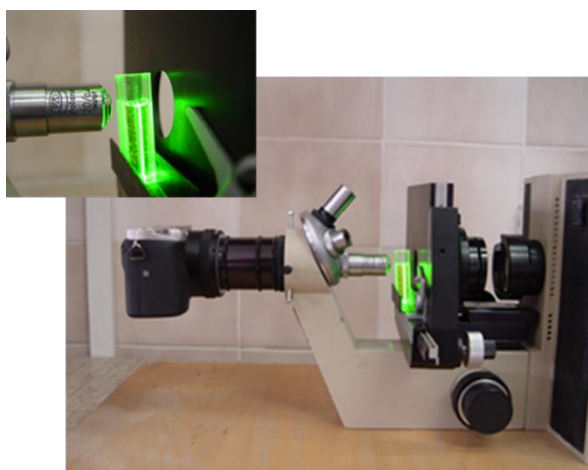
#### **3.5.3. Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)**

Średnicę nanocząstek srebra badano także wykorzystując technikę dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Pomiarów wykonano na analizatorze Malvern Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) (Akademickie Centrum Materiałów i Nanotechnologii AGH, Kraków). Określono średnicę hydrodynamiczną i potencjał zeta nanocząstek srebra w trzech różnych układach: wyjściowe AgNPs cytrynianowe, AgNPs opłaszczone antysurowicą oraz AgNPs opłaszczone surowicą, do których dodano optymalną, powodującą agregację nanocząstek ilość FLC (6 mg/l [300 nM]). Trzecia próbka była badana po 30 minutach,

1 godzinie i 2 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C (z ciągłym mieszaniem) w celu oceny zachodzących w próbce interakcji międzybiałkowych.

### 3.5.4. Rozpraszanie światła laserowego

W celu śledzenia procesu agregacji nanocząstek zastosowano metodę obrazowania zmian zachodzących w badanych roztworach przy wykorzystaniu rozpraszania światła laserowego. Rozproszenie rejestrowano za pomocą samodzielnie skonstruowanego urządzenia wykorzystującego zielony półprzewodnikowy laser (532 nm) oraz obiektyw o wydłużonym zakresie ostrości. Prototypowa konstrukcja składa się z mikroskopu optycznego, w którym w rewolwerze umieszczono obiektyw o wydłużonym zakresie ostrości i powiększeniu 40x. W mikroskopie zamiast okularu i tubusu umieszczono aparat fotograficzny marki SONY alpha 6000 (Minato, Tokio, Japan). Źródłem światła w układzie jest zielony laser półprzewodnikowy (Ryc. 10).



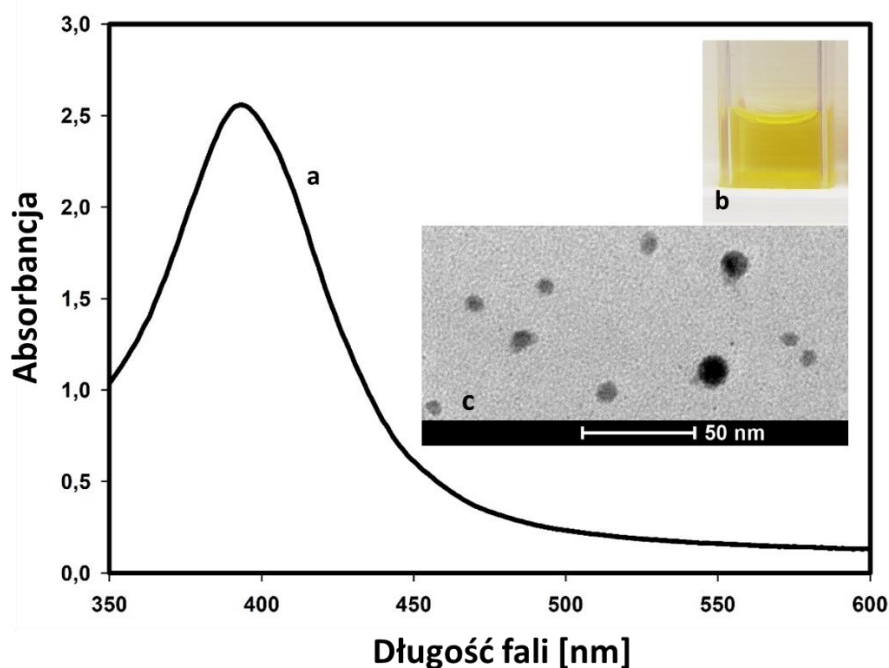
**Ryc. 10.** Układ do obserwacji rozpraszania światła laserowego.

## 4. Wyniki

### 4.1. Synteza i charakterystyka nanocząstek srebra

#### 4.1.1. Rozmiary nanocząstek

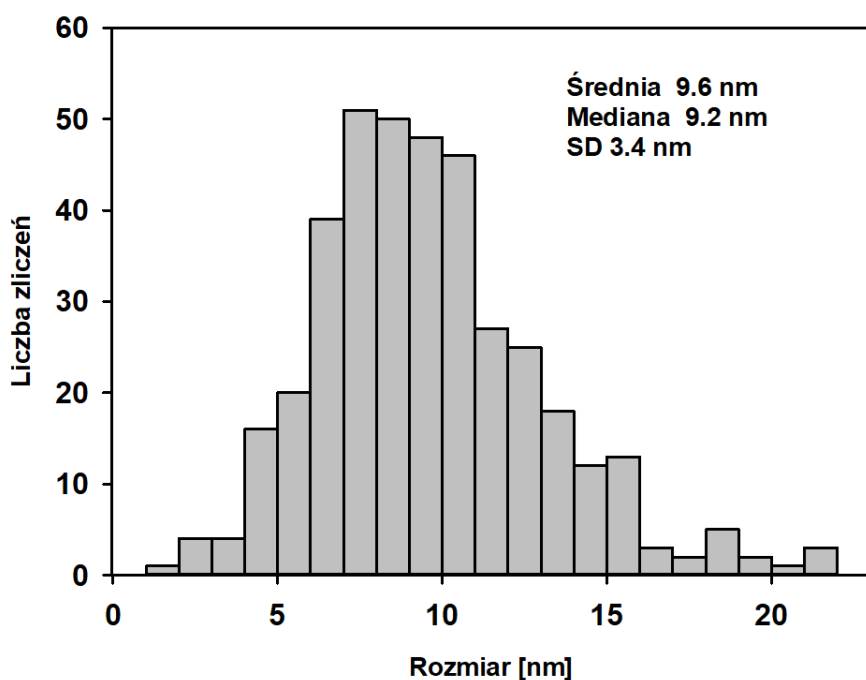
W wyniku redukcji chemicznej azotanu (V) srebra borowodorkiem sodu uzyskano roztwór o żółtej barwie i charakterystycznym widmie absorpcji z maksimum przy długości fali 395 nm (Ryc. 11). Na podstawie położenia maksimum widma powierzchniowego rezonansu plazmonowego oszacowano średnicę nanocząstek srebra na około 10 nm [108,109].



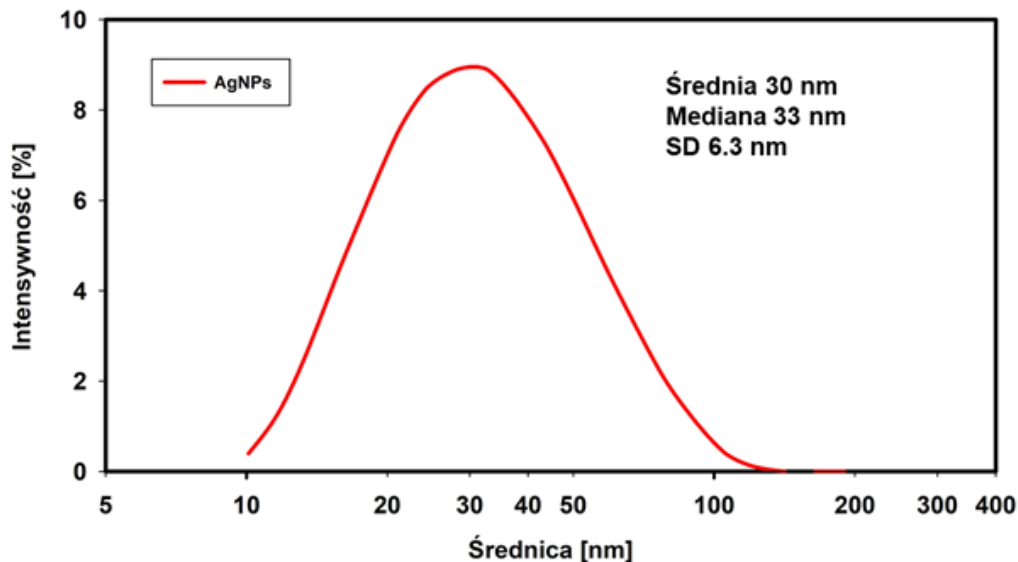
**Ryc. 11. Nanocząstki srebra uzyskane w wyniku redukcji chemicznej azotanu (V) srebra borowodorkiem sodu: a) charakterystyczne widmo z maksimum absorpcji przy 395 nm, b) barwa roztworu, c) obraz z transmisyjnego mikroskopu elektronowego.**

Rozmiary nanocząstek analizowano wykorzystując metodę dynamicznego rozpraszania światła (DLS) i obrazowanie za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) (Ryc. 11c). Średni rozmiar AgNPs obliczony na podstawie obrazów uzyskanych z TEM wynosił 9.62 nm (mediana 9.2 nm, SD 3.4 nm) (Ryc. 12).





Ryc. 12. Rozkład wielkości nanocząstek srebra uzyskany z wykorzystaniem TEM.



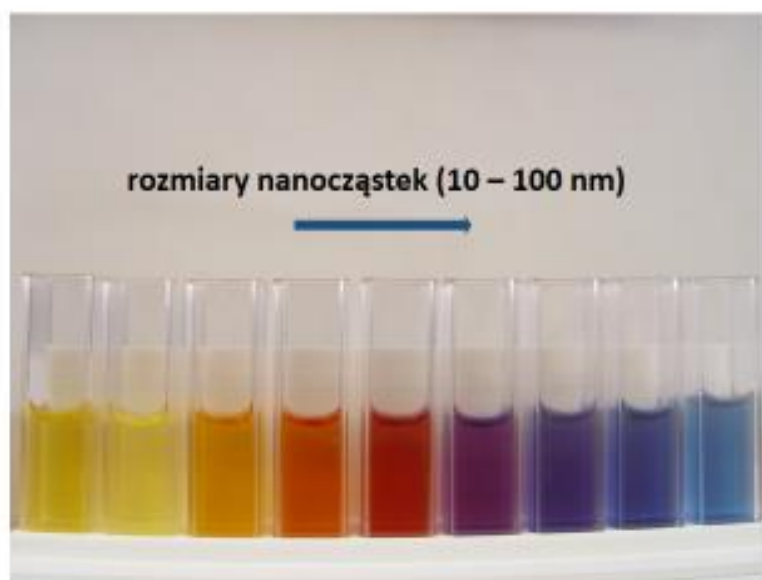
Ryc. 13. Rozkład wielkości cząstek w próbce w zależności od intensywności rozpraszania światła – metoda DLS.

Charakterystyka rozmiarów AgNPs metodą dynamicznego rozpraszania światła dała nieco odmienne wyniki. Średni rozmiar nanocząstek obliczony według intensywności rozpraszania (*size by intensity*) wyniósł  $30 \pm 6.3$  nm (Ryc. 13). Średnia i mediana rozmiarów AgNPs uzyskane z DLS były wyższe niż te otrzymane z TEM. Można to wytłumaczyć zupełnie

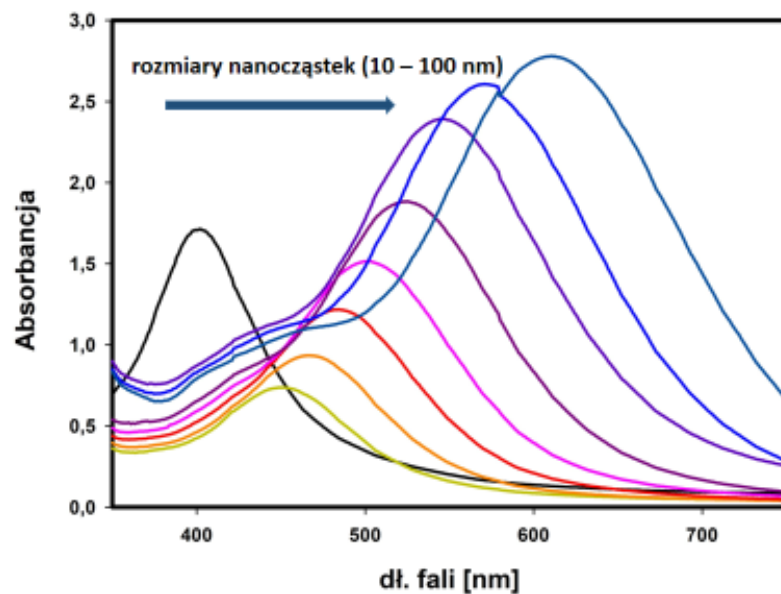
odmienną metodologią pomiaru. Metoda DLS mierzy średnicę hydrodynamiczną, obejmującą warstwę ośrodka dyspergującego. Dodatkowo wynik pomiaru otrzymany metodą DLS jest silnie przesuwany w kierunku największych struktur w roztworze, natomiast TEM pokazuje średnicę cząstek bez uwzględnienia ładunku wodnego i jonowego.

Uwzględniając maksimum LSPR (395 nm) i molowy współczynnik ekstynkcji przy tej długości fali ( $5,56 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [110] obliczone stężenie molowe przygotowanego roztworu nanocząstek wynosiło około 10 nM.

Wykorzystując metodę syntezy (z hydrazyną jako reduktorem na drugim etapie syntezy i PVA jako czynnikiem opłaszczającym) uzyskano szerokie spektrum nanocząstek o różnych rozmiarach oraz różnej intensywności i położeniu maksimum LSPR (Ryc. 14 i Ryc. 15).



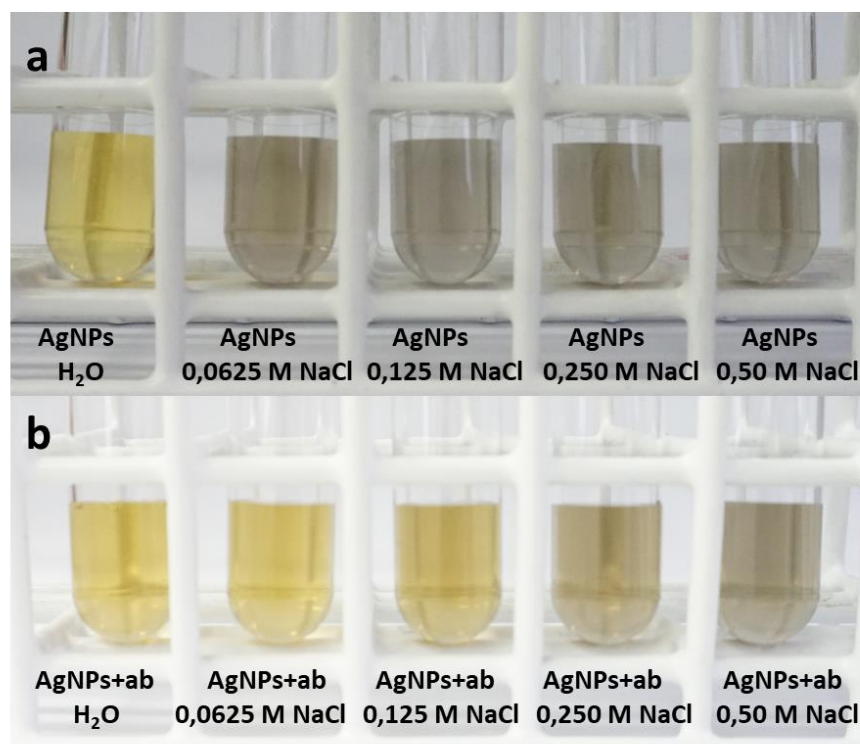
**Ryc. 14.** Zmiany barwy roztworów nanocząstek srebra wynikające ze zjawiska powierzchniowego rezonansu plazmonowego przy zwiększaniu rozmiarów nanocząstek. Do powstania zarodków krystalizacji użyto borowodorku sodu jako reduktora i cytrynianu jako czynnika stabilizującego, a następnie hydrazyny i PVA dla uzyskania wzrostu i stabilizacji nanocząstek.



**Ryc. 15.** Zmiany widma powierzchniowego rezonansu plazmonowego w zależności od rozmiarów nanocząstek srebra w zakresie 10-100 nm. W miarę wzrostu średnicy nanocząstek obserwuje się tzw. red-shift - przesunięcie maksimum widma LSPR w kierunku fal dłuższych.

#### 4.1.2. Ocena stabilności nanocząstek

Dodanie do stabilizowanych cytrynianem AgNPs roztworów NaCl o różnych stężeniach (0,125 M; 0,25 M; 0,5 M; 1 M) powodowało wytrącanie się nanocząstek z roztworu (Ryc. 16a). Opłaszczenie nanocząstek przeciwciałami anty-lambda zwiększyło ich stabilność (Ryc. 16b).



**Ryc. 16. Porównanie stabilności nanocząstek srebra: a) nanocząstki stabilizowane cytrynianem, b) nanocząstki opłaszczane przeciwciałami anti-lambda. Funkcjonalizacja AgNPs przeciwciałami zwiększyła ich stabilność w roztworach NaCl.**

Dodawanie NaCl do nanocząstek uzyskanych wg drugiej metody syntezy (stabilizowanych dodatkowo PVA) nie powodowało ich wytrącania. Nanocząstki te są stabilniejsze, ale w efekcie wpływa to na późniejszy proces ich opłaszczania i badania oddziaływań białkowych. Nanocząstki stabilizowane PVA okazały się niepodatne na funkcjonalizację antysurowicą i łańcuchami lekkimi immunoglobulin, dlatego do dalszej części pracy wybrano nanocząstki cytrynianowe.

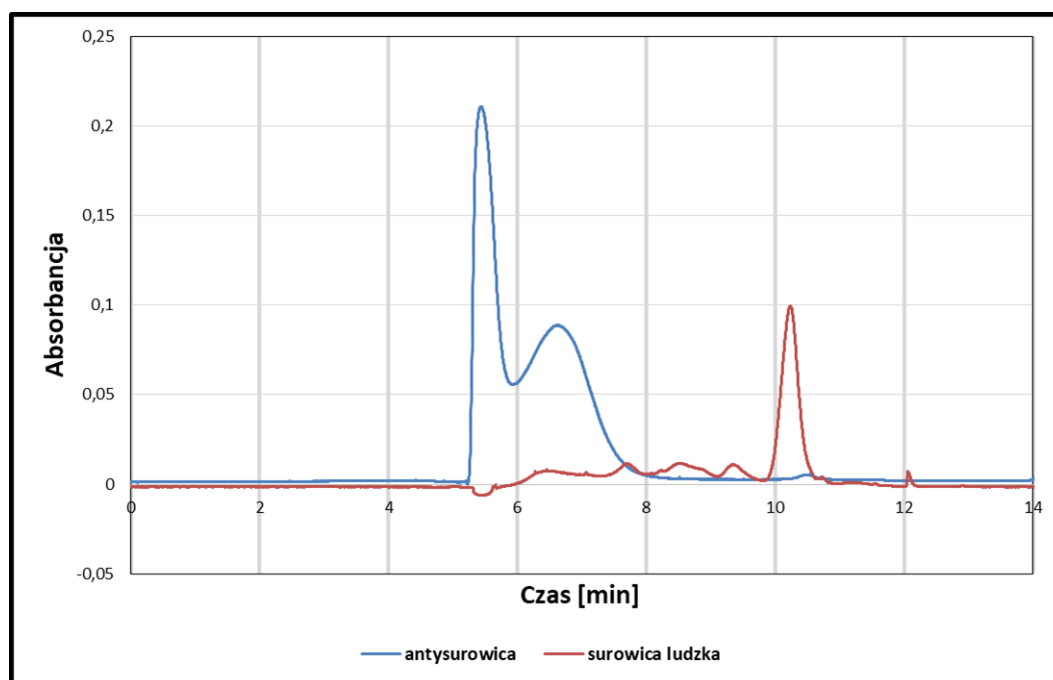
## *4.2. Wykorzystanie nanocząstek srebra do badania procesu sprzęgania białek w modelu antygen – przeciwciało*

### **4.2.1. Funkcjonalizacja nanocząstek srebra przeciwciałami**

W ramach badania oddziaływań międzybiałkowych z wykorzystaniem nanocząstek srebra doświadczenia rozpoczęto od najprostszego modelu jakim jest układ antygen – przeciwciało. Wykorzystano do tego nanocząstki srebra opłaszczane przeciwciałami anti-lambda, do których dodawano komplementarny antygen - łańcuchy lekkie immunoglobulin typu lambda. Potencjalnie model ten można wykorzystać w praktyce do konstrukcji testu diagnostycznego wykrywającego łańcuchy lekkie immunoglobulin.

Kluczowym elementem funkcjonalizacji AgNPs antysurowicą anty-lambda było ustalenie odpowiedniej ilości przeciwciał jaka powinna być użyta, aby skutecznie opłaszczyć nanocząstki. Należało w tym celu ustalić stężenie przeciwciał w wykorzystywanej, komercyjnie dostępnej antysurowicy.

Aby określić skład i stężenie przeciwciał użytych w pracy wykonano elektroforezę kapilarną antysurowicy. Przedstawiony obraz elektroforetyczny (Ryc. 17) dowodzi, że użyta surowica anty-FLC zawierała oczyszczoną frakcję immunoglobulin. Stężenie wyjściowe immunoglobuliny – obliczone przez porównanie pola powierzchni na elektroforegramie ze standardem białka o znanym stężeniu – wynosiło 168 g/l. Uwzględniając ciężar molekularny immunoglobuliny IgG wynoszący około 140 kDa, stężenie molowe antysurowicy wynosiło 1.2 mM.



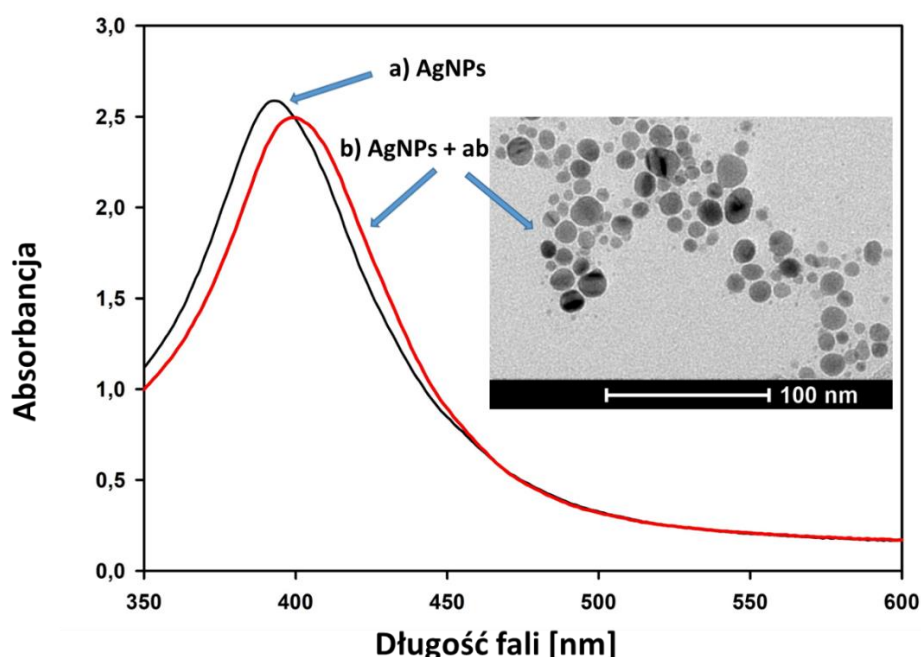
Ryc. 17. Elektroforeza kapilarna antysurowicy (niebieska linia) i (jako punkt odniesienia) surowicy ludzkiej (czerwona linia).

Jednym z najważniejszych kroków w zaprojektowaniu testu opartego o układ nanocząstka-przeciwciało-antygen jest określenie całkowitego stężenia wszystkich elementów układu oraz optymalnych stosunków molowych cząsteczek. Po pierwsze, stosunek molowy nanocząstka/przeciwciało powinien być dobrany tak, aby uzyskać skuteczną funkcjonalizację, ale uniknąć utworzenia nadmiernie rozbudowanej korony białkowej. Po drugie, bardzo ważne jest ustalenie optymalnego stosunku ilości cząsteczek antygeny przypadających na cząsteczkę przeciwciała. Jest to istotne w kontekście uniknięcia nadmiaru antygeny (efekt hooka).

W piśmiennictwie istnieją bardzo duże rozbieżności dotyczące ilości (stężenia) białek używanych do funkcjonalizacji nanocząstek. Wobec trudnych czasami do interpretacji danych i braku ich odniesienia do opracowywanego układu (rozmiaru nanocząstek, ich stężenia, potencjału zeta, punktu izoelektrycznego białka) ilość dodanego białka (zarówno przeciwciała, jak i antygeny) została dobrana doświadczalnie (1  $\mu$ l antysurowicy do 10 ml nanocząstek).

Aby ułatwić interpretację wyników w przeprowadzonym badaniu wszystkie stężenia podano w molach na litr. Ułatwia to analizowanie informacji dotyczących stosunków AgNPs/przeciwciała/antygen.

W przedstawionej pracy, jak już wcześniej podano, stężenie molowe roztworu AgNPs wynosiło około 10 nM. Biorąc pod uwagę, że nanocząstki srebra opłaszczano przeciwciałami dodając 1  $\mu$ l surowicy anti-FLC (roztwór wyjściowy o stężeniu 1.2 mM) do 10 ml roztworu AgNPs końcowe stężenie przeciwciał w roztworze wynosiło 120 nM. Oznacza to, że stosunek molowy ilości przeciwciał/AgNPs wynosił 12. Przy takiej liczbie przeciwciał nanocząstki są stabilne, nie agregują samoistnie a w porównaniu z AgNPs nieopłaszczonymi wykazują niewielkie przesunięcie maksimum widma absorpcji w prawo (red-shift) i nieznaczne obniżenie maksimum, bez poszerzenia widma (Ryc. 18).



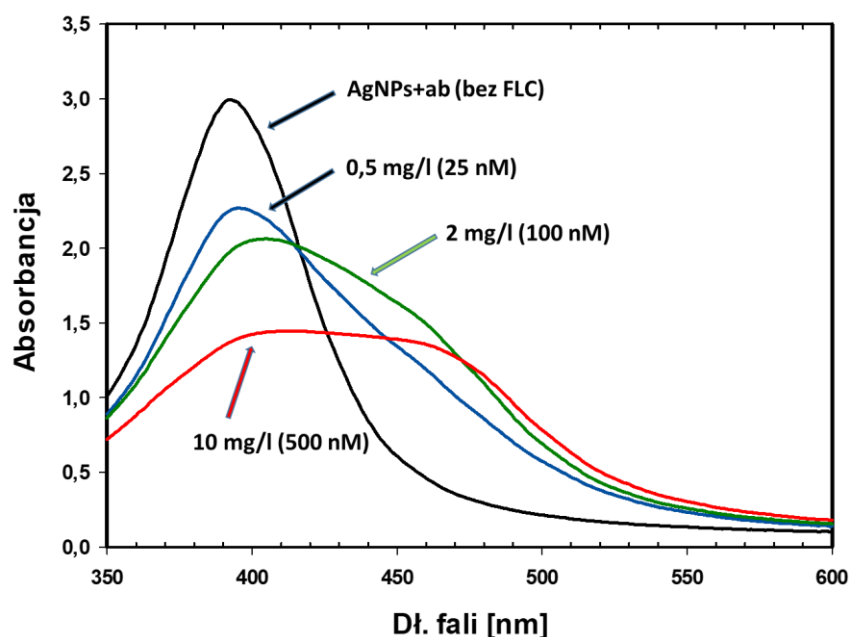
**Ryc. 18.** Zmiana widma absorpcji i obraz TEM: a) nanocząstki srebra (AgNPs) i b) nanocząstki srebra po opłaszczeniu przeciwciałami (AgNPs + ab). Na obrazie TEM zwracają uwagę przestrzenie pomiędzy pojedynczymi ziarnami nanocząstek.

Średni rozmiar nanocząstek srebra opłaszczonych przeciwciałami obliczony z wykorzystaniem DLS (*by intensity*) wyniósł  $46.1 \pm 4.1$  nm (vs.  $30 \pm 6$  nm – nanocząstki nieopłaszczone przeciwciałami). Przeciętne wymiary immunoglobulin podawane w piśmiennictwie to około  $14.5 \text{ nm} \times 8.5 \text{ nm} \times 4 \text{ nm}$  [28]. Dane otrzymane z DLS wskazują, że immunoglobuliny uformowały na powierzchni nanocząstek monowarstwę (widoczną na obrazie TEM – Ryc. 18).

Potencjał zeta modyfikowanych przeciwciałami AgNPs jest wyższy ( $-27.3$  mV vs.  $-36.6$  mV) niż wyjściowych nanocząstek (stabilizowanych cytrynianem). Wraz ze wzrostem potencjału zeta roztwór nanocząstek srebra opłaszczonych przeciwciałami staje się bardziej stabilny. Potwierdza to obserwacje innych badaczy, że pokrycie nanocząstek białkami zwiększa ich stabilność [36,111]. Ze względu na hydrofobowe i jonowe interakcje nanocząstka – białko nanocząstki opłaszczone białkami nie agregują [112].

#### 4.2.2. Oddziaływanie przeciwciał anty-lambda opłaszczonych na nanocząstkach srebra z komplementarnym antygenem – wolnymi łańcuchami lekkimi lambda

Badanie procesu agregacji białek oparte było na oddziaływaniu między przeciwciałami opłaszczonymi na nanocząstkach i komplementarnym dla zastosowanych przeciwciał antygenem (FLC). Wiązaniom wolnych łańcuchów lekkich z przeciwciałami towarzyszyły zmiany w widmie powierzchniowego rezonansu plazmonowego. Wzrastające stężenia FLC (do  $10 \text{ mg/l}$  [ $500 \text{ nM}$ ]) powodowały wyraźne obniżenie maksimum absorpcji przy długości fali  $395 \text{ nm}$ , poszerzenie i przesunięcie w prawo (red-shift) widma LSPR. Dodatkowo zaobserwowano powstanie drugiego piku przy długości fali  $470 \text{ nm}$ . Zmiany te korespondowały z procesem agregacji nanostruktur obserwowanym w TEM, metodzie DLS i bezpośrednim rozpraszaniu światła laserowego. Zmiany widmowe jakie zaobserwowano po dodaniu różnych ilości FLC do opłaszczonych przeciwciałami nanocząstek cytrynianowych przedstawiono na Ryc. 19. Dalsze zwiększanie stężenia FLC (powyżej  $10 \text{ mg/l}$  [ $500 \text{ nM}$ ]) powodowało ponowny wzrost maksimum absorpcji przy długości fali  $395 \text{ nm}$  i zwężenie się widma LSPR.

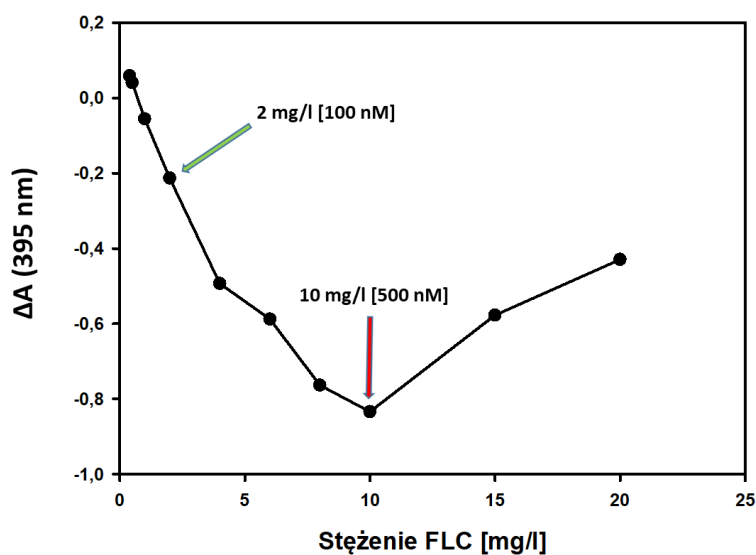


**Ryc. 19.** Zmiany widmowe zaobserwowane po 24 godzinach inkubacji opłaszczonych przeciwciałami AgNPs z różnymi stężeniami FLC. Stężenia końcowe FLC w roztworach wynosiły 0.5–10 mg/l (25–500 nM).

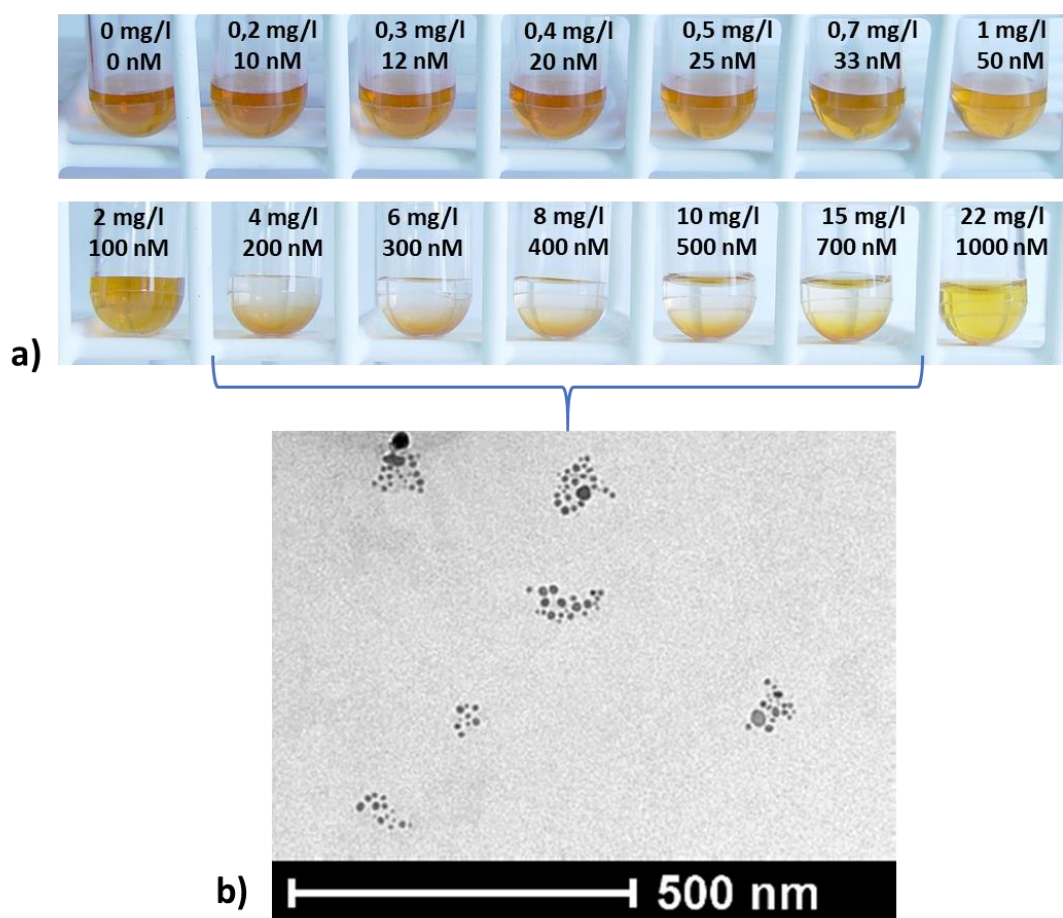
Ryc. 20 przedstawia zmiany absorbancji w maksimum widma powierzchniowego rezonansu plazmonowego (przy długości fali 395 nm) opłaszczonych przeciwciałami AgNPs (10 nM) przy wzrastających stężeniach FLC (od 0 do 20 mg/l [0-1000 nM]). Na wykresie widoczne są dwa etapy. W pierwszym etapie wzrastającym stężeniom wiązane przez przeciwciała antygeny towarzyszy wyraźny spadek absorbancji. Równocześnie, od określonego stężenia (4 mg/l [200 nM]), można było zaobserwować precypitację zaglutynowanych nanocząstek srebra. Agregaty nanocząstek widoczne były także w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (Ryc. 21).

W drugim etapie, przy stężeniach FLC powyżej 10 mg/l [500 nM] (50 cząsteczek antygeny/1 nanocząstkę srebra opłaszczoną przeciwciałami) zaczyna się wzrost absorbancji w maksimum widma SPR a proces aglutynacji (stężenia powyżej 15 mg/l [700 nM]) zostaje cofnięty. W roztworze pozostawały otoczone koroną białkowa stabilne nanocząstki srebra.



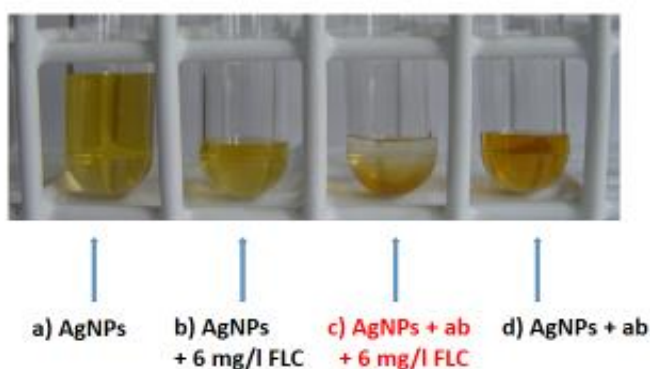


Ryc. 20. Zmiany absorbancji (przy długości fali 395 nm) w zależności od stężeń FLC. Największe zmiany zaobserwować można przy stężeniu wolnych łańcuchów lekkich wynoszącym 10 mg/l [500 nM].



Ryc. 21. Zmiany zachodzące w próbkach w wyniku dodania do AgNPs opłaszczonych przeciwciałami różnych ilości FLC: a) wzrastające stężenia FLC (od 0 do 22 mg/l [0-1000 nM]); b) obraz TEM agregatów (przy stężeniu FLC 6 mg/l [300 nM]).

Proces sedymentacji opłaszczonych przeciwciałami nanocząstek srebra w obecności antygeny następował stosunkowo wolno (72 godz.). Aby sprawdzić czy proces ten można przyspieszyć, roztwory opłaszczonych przeciwciałami nanocząstek srebra zawierające różne ilości FLC odwirowano po 3 godzinach inkubacji (5 min., 4000 obr./min.). Ryc. 22c ilustruje proces przyspieszonej w wyniku wirowania sedymentacji nanocząstek srebra (nanocząstki srebra opłaszczone przeciwciałami anty-lambda w obecności wolnych łańcuchów lekkimi immunoglobulin (6 mg/l [300 nM]). Dodatkowo na Ryc. 22 przedstawiono próby kontrolne: a) nieopłaszczone przeciwciałami stabilizowane cytrynianem nanocząstki srebra, b) nanocząstki srebra oraz wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin (6 mg/l [300 nM]), d) nanocząstki srebra opłaszczone przeciwciałami (bez FLC). Na rycinie widać, że proces sedymentacji nanocząstek srebra można znacząco przyspieszyć (Ryc. 22). W próbkach kontrolnych (Ryc. 22 a, b, d) nie dochodzi do sedymentacji nanocząstek.



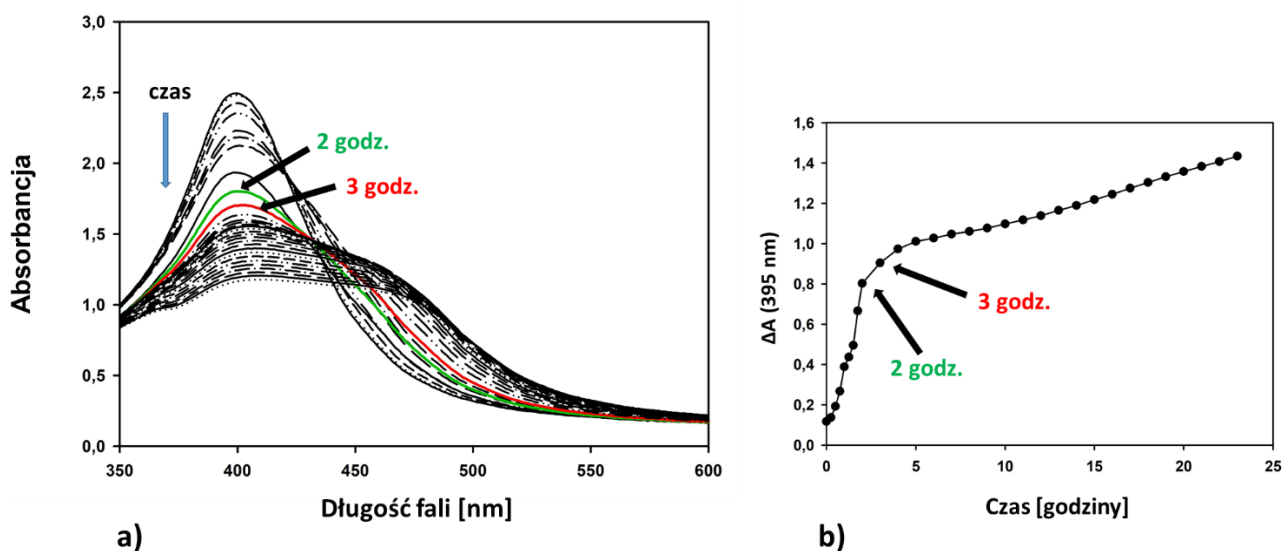
**Ryc. 22. Przyspieszona sedymentacja agregujących nanocząstek srebra. Próbkę odwirowano po 3 godzinach inkubacji. Widoczna sedymentacja agregatów: c) AgNPs opłaszczone przeciwciałami anty-lambda + FLC (6 mg/l [300 nM]. Próby kontrolne: a) AgNPs, b) AgNPs + FLC 6 mg/l [300 nM], d) AgNPs opłaszczone przeciwciałami bez obecności FLC.**

Analizując otrzymane wyniki można określić optymalne stężenia reagentów, przy jakich dochodzi do sprzęgania białek i agregacji nanocząstek w układzie: nanocząstki opłaszczone przeciwciałami + komplementarny antygen. Wiedząc, że stężenie molowe roztworu nanocząstek srebra wynosiło około 10 nM, a stężenie wolnych łańcuchów lekkich 100  $\mu$ M (2.2 g/l, masa molowa FLC 22000 g/mol) można wyliczyć stosunek liczby cząstek, które reagowały ze sobą. Z danych przedstawionych na Ryc. 20 i Ryc. 21 wynika, że reakcja aglutynacji przebiegała optymalnie (zachodziły największe zmiany widmowe oraz dochodziło do agregacji nanostruktur) do momentu, gdy na 1 nanocząstkę srebra opłaszczoną 12 cząsteczkami przeciwciał przypadało od 20 do 50 cząsteczek antygeny. Przy większej ilości

antygeny dochodziło do zablokowania reakcji. Model ten obarczony jest typową dla testów immunochemicznych cechą wynikającą z nadmiaru antygeny – tzw. efektem hooka. W praktyce, tak jak w innych tego typu testach, jedynym sposobem rozwiązania tego problemu jest rozcieńczenie próbki przy wysokich stężeniach FLC [104,113].

Opracowany model aglutynacji funkcjonalizowanych przeciwciałami nanocząstek srebra w obecności łańcuchów lekkich immunoglobulin może służyć potencjalnie jako test diagnostyczny. Biorąc pod uwagę zakresy wartości referencyjnych FLC w surowicy (5.71-26.30 mg/L dla FLC lambda oraz 3.30–19.40 mg/l dla FLC kappa) i w moczu (0.24 – 6.66 mg/l dla FLC lambda i 1.35 – 24.19 mg/l dla FLC kappa) zakres stężeń FLC przy których zachodzi proces agregacji (4-15 mg/l [200-700 nM]) wskazuje na klinicznie użyteczną czułość testu [87].

W celu zbadania dynamiki reakcji immunochemicznej zachodzącej między opłaszczonymi przeciwciałami nanocząstkami srebra i wolnymi łańcuchami lekkimi immunoglobulin przeprowadzono badanie przy optymalnym, tzn. wywołującym agregację nanocząstek stężeniu łańcuchów lekkich (6 mg/l [300 nM]) (Ryc. 23). W 10 nM roztworze nanocząstek srebra największe zmiany widmowe zachodziły w ciągu pierwszych 2-3 godzin od rozpoczęcia reakcji. Zaobserwowano ciekawy – dwufazowy przebieg reakcji. W pierwszym etapie (pierwsze 2 godziny) dochodzi obniżenia maksimum absorbancji widma SPR (przy długości fali 395 nm), a następnie do poszerzenia widma w kierunku fal dłuższych (red-shift) i powstania drugiego pik (470 nm).



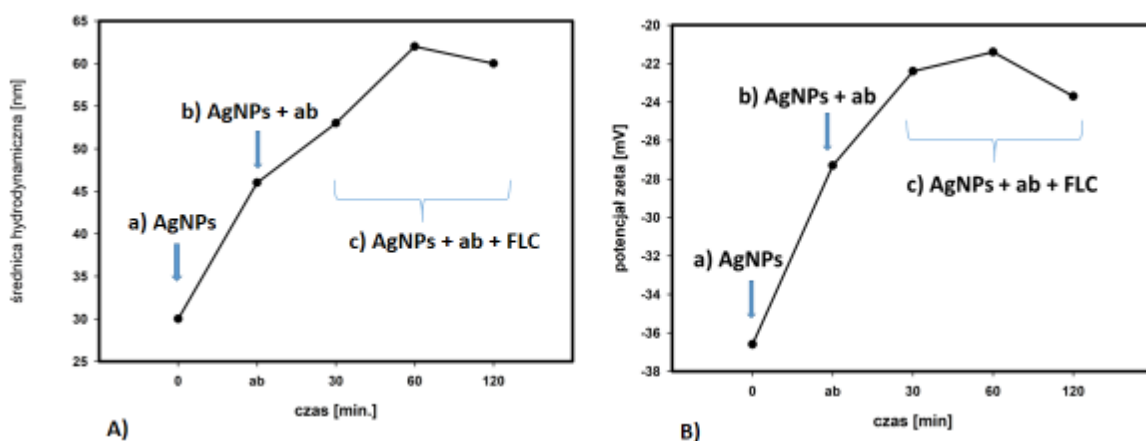
Ryc. 23. Dynamika reakcji immunochemicznej przy optymalnej (powodującej agregację nanocząstek 10 nM) ilości FLC (6 mg/l [300 nM]):

a) Charakterystyczna zmiana widma absorpcji: do 2-giej godziny spadek maksimum absorbcji przy długości fali 395 nm, a później poszerzenie widma w kierunku fal dłuższych (red-shift) i powstanie drugiego piku przy długości około 470 nm.

b) Zmiana absorbcji (przy długości fali 395 nm) w zależności od czasu reakcji. Największe zmiany obserwowane były przez pierwsze 2 godziny od rozpoczęcia reakcji.

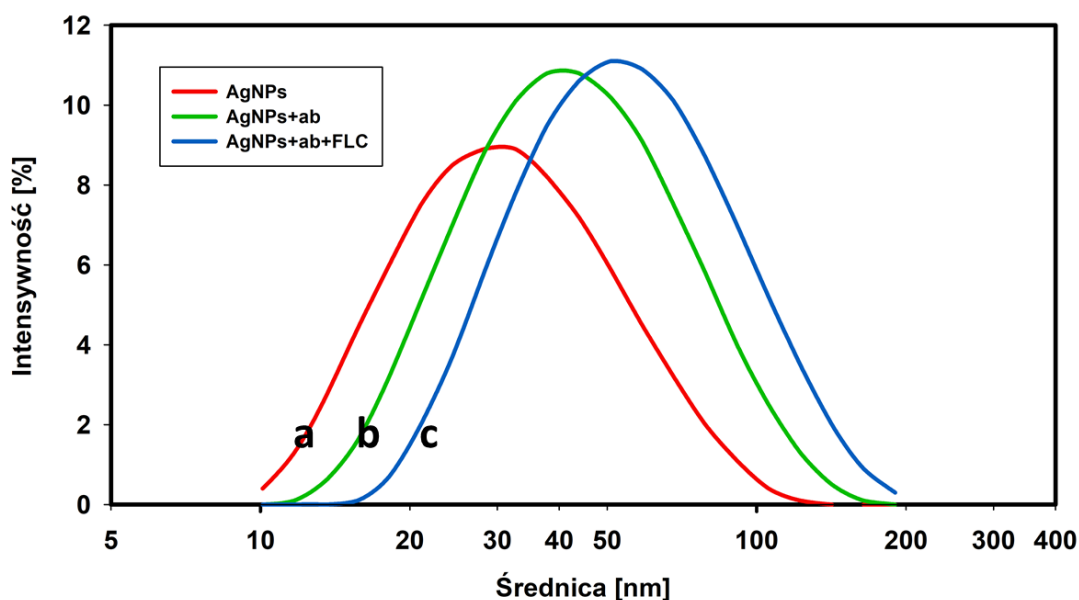
Proces funkcjonalizacji nanocząstek i sprzęgania antygeny badano także analizując zmiany średnicy hydrodynamicznej nanocząstek a także zmiany potencjału zeta metodą DLS ( Ryc. 24, Ryc. 25). Pomiaru wykonano na roztworach nanocząstek srebra nieopłaszczonych przeciwciałami, na AgNPs funkcjonalizowanych przeciwciałami anti- lambda oraz po dodaniu FLC (ilości wywołującej agregację nanocząstek 6 mg/l [300 nM]) do nanocząstek opłaszczonych przeciwciałami. W tym ostatnim przypadku pomiary przeprowadzone były po 30, 60 i 120 minutach od rozpoczęcia reakcji.

W miarę postępu reakcji opłaszczania nanocząstek białkami – najpierw przeciwciałami, a później łańcuchami lekkimi immunoglobulin zaobserwowano w pierwszym etapie – do 60 minut od momentu dodania FLC do opłaszczonych przeciwciałami AgNPs - wzrost średnicy hydrodynamicznej nanocząstek oraz wzrost potencjału zeta (pomiaru wykonano po 30, 60 i 120 minutach). W drugim etapie reakcji (po 60 minutach) dochodziło do obniżenia średnicy hydrodynamicznej i potencjału zeta.



Ryc. 24. Zmiany średnicy hydrodynamicznej (A) i potencjału zeta (B) nanocząstek srebra w procesie funkcjonalizacji przeciwciałami i wiązania antygenu:

- a) AgNPs - nanocząstki srebra nieopłaszczane przeciwciałami (0 na osi czasu),
- b) AgNPs + ab - nanocząstki srebra opłaszczane przeciwciałami (punkt ab na osi czasu),
- c) AgNPs + ab + FLC - nanocząstki srebra opłaszczane przeciwciałami po dodaniu FLC (30, 60 i 120 min. od dodania FLC). Po 60 min. przebiegu reakcji immunochemicznej antygen-przeciwciało wyraźnie widać drugi etap reakcji rejestrowany jako spadek średnicy hydrodynamicznej i obniżenie potencjału zeta powstających agregatów.

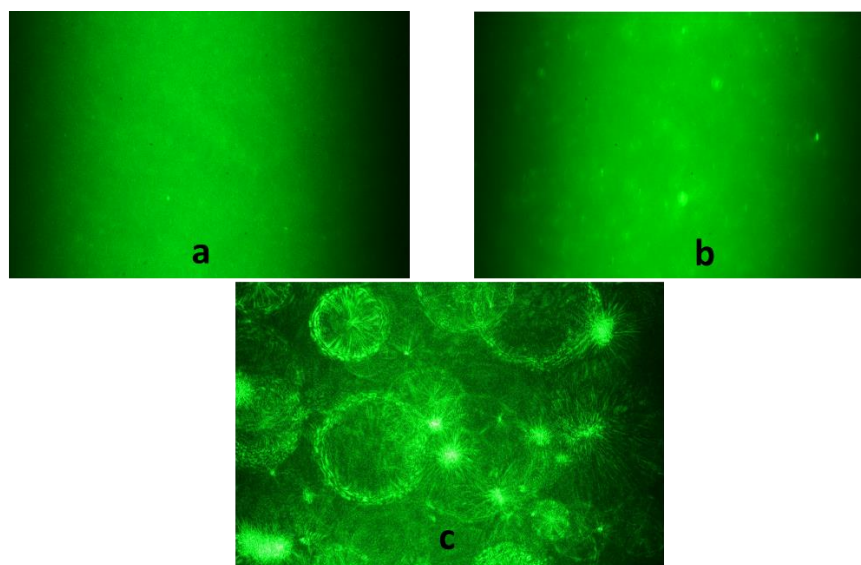


Ryc. 25. Zmiana rozkładu wielkości cząstek w próbce w zależności od intensywności rozpraszania światła – wyniki uzyskane metodą DLS:

- a) nanocząstki srebra nieopłaszczane przeciwciałami (AgNPs)
- b) nanocząstki srebra opłaszczane przeciwciałami anty-lambda (AgNPs+ab)
- c) nanocząstki srebra opłaszczane przeciwciałami 2 godz. po dodaniu wolnych łańcuchów lekkich (AgNPs+ab+FLC)

Średnica hydrodynamiczna nanocząstek po 1 godzinie mieszania roztworu wynosiła  $62.8 \text{ nm} \pm 4.4$ . Z powodu tworzenia dużych struktur aglutynacyjnych, pomiar po dłuższym czasie i śledzenie tworzenia dużych agregatów metodą DLS jest obarczony znacznym obciążeniem błędem pomiarowym wynikającym ze specyfiki metody.

Proces agregacji opłaszczonych przeciwciałami nanocząstek srebra badano też poprzez analizę rozpraszania zielonego światła laserowego (532 nm) wytwarzanego przez laser półprzewodnikowy. W skonstruowanym na potrzeby badań systemie pomiarowym wykazano różne wzorce rozpraszania światła w zależności od analizowanego materiału.



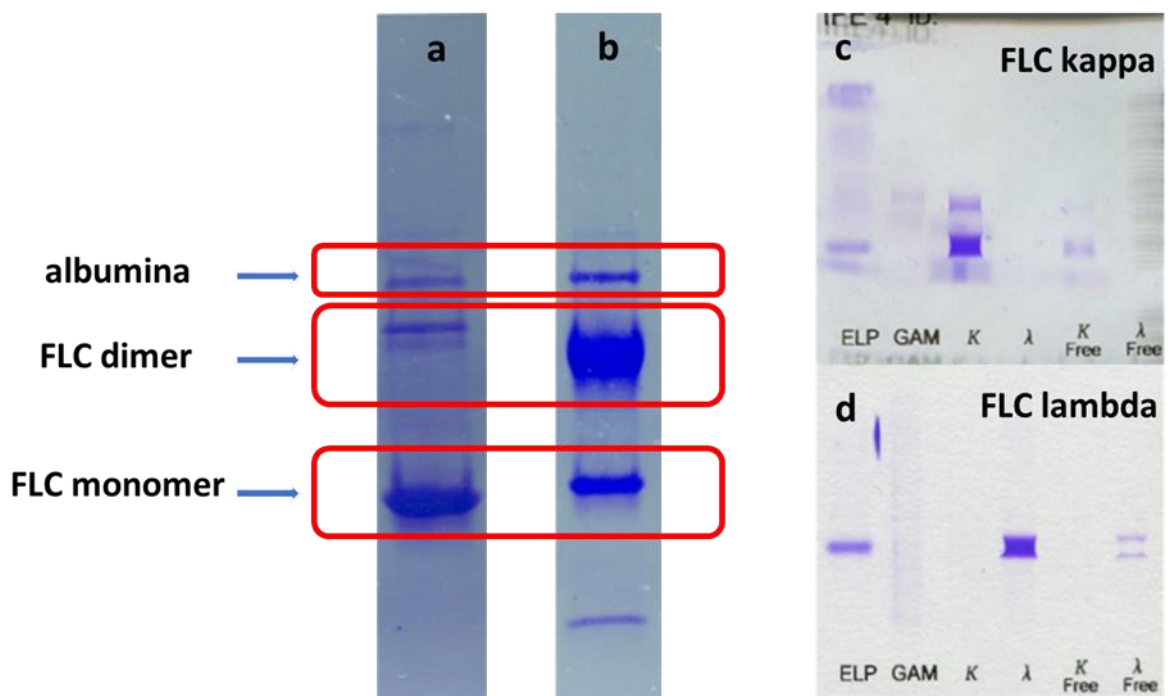
**Ryc. 26.** Wzorce rozpraszanie zielonego światła laserowego przez: a) nieopłaszczone białkami stabilizowane cytrynianem nanocząstki srebra, b) nanocząstki srebra opłaszczone przeciwciałami anty-lambda (AgNPs+ab), c) agregaty nanocząstek powstałe w wyniku oddziaływań antygen-przeciwciało (AgNPs+ab+FLC).

Wąska wiązka światła laserowego przechodząca przez roztwór niefunkcjonalizowanych nanocząstek srebra dała jednorodny wzór rozpraszania (Ryc. 26a). Funkcjonalizacja nanocząstek przeciwciałami spowodowała powstanie małych skupisk rozpraszających światło (Ryc. 26b). Dodanie antygenów białkowych (FLC) spowodowało utworzenie agregatów intensywnie rozpraszających światło (obraz przypominający rozbłyski sztucznych ogni) (Ryc. 26c). Uzyskane wzory rozproszenia były zgodne z wynikami uzyskanymi przez transmisyjną mikroskopię elektronową i obserwacje sedymentacyjne.

#### 4.3. Wykorzystanie nanocząstek srebra do badania procesu wzajemnego oddziaływania wolnych monoklonalnych łańcuchów lekkich immunoglobulin

Ponieważ monoklonalne łańcuchy lekkie są termodynamicznie niestabilne i w przypadku niektórych klonów mają tendencję do samoistnego tworzenia agregatów, w kolejnym etapie pracy stworzono model, w którym badano wzajemne oddziaływania wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin opłaszczonych na nanocząstkach srebra.

Zasadniczym elementem tej części pracy była funkcjonalizacja nanocząstek srebra wolnymi monoklonalnymi łańcuchami lekkimi immunoglobulin. Wykorzystano do tego wyselekcjonowane mocze od pacjentów z białkomoczem Bence-Jonesa. W wyselekcjonowanych próbkach moczu głównym składnikiem białkowym były monomery i dimery wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin (Ryc. 27).



Ryc. 27. Reprezentatywne przykłady rozdzielów elektroforetycznych białek moczy wykorzystanych w pracy (a, b). Jak widać głównym składnikiem moczu były monomery lub dimery wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. Metodą immunofiksacji wykazano, że były to FLC typu kappa (c) lub lambda (d).



W pracy wykorzystano 19 moczy, w tym 9 z FLC typu lambda i 10 z FLC typu kappa. Dla każdego klonu przygotowano 6 prób: do 1 ml nanocząstek srebra o stężeniu 10 nM dodawano takie ilości moczu, aby uzyskać końcowe stężenia FLC w próbkach równe: 0 mg/l [0 nM], 0,2 mg/l [10 nM], 1 mg/l [50 nM], 3 mg/l [150 nM], 5 mg/l [250 nM] i 10 mg/l [500 nM].

Proces agregacji łańcuchów lekkich badano metodą spektroskopii UV-Vis, TEM oraz analizowano bezpośrednio rozpraszanie światła laserowego.

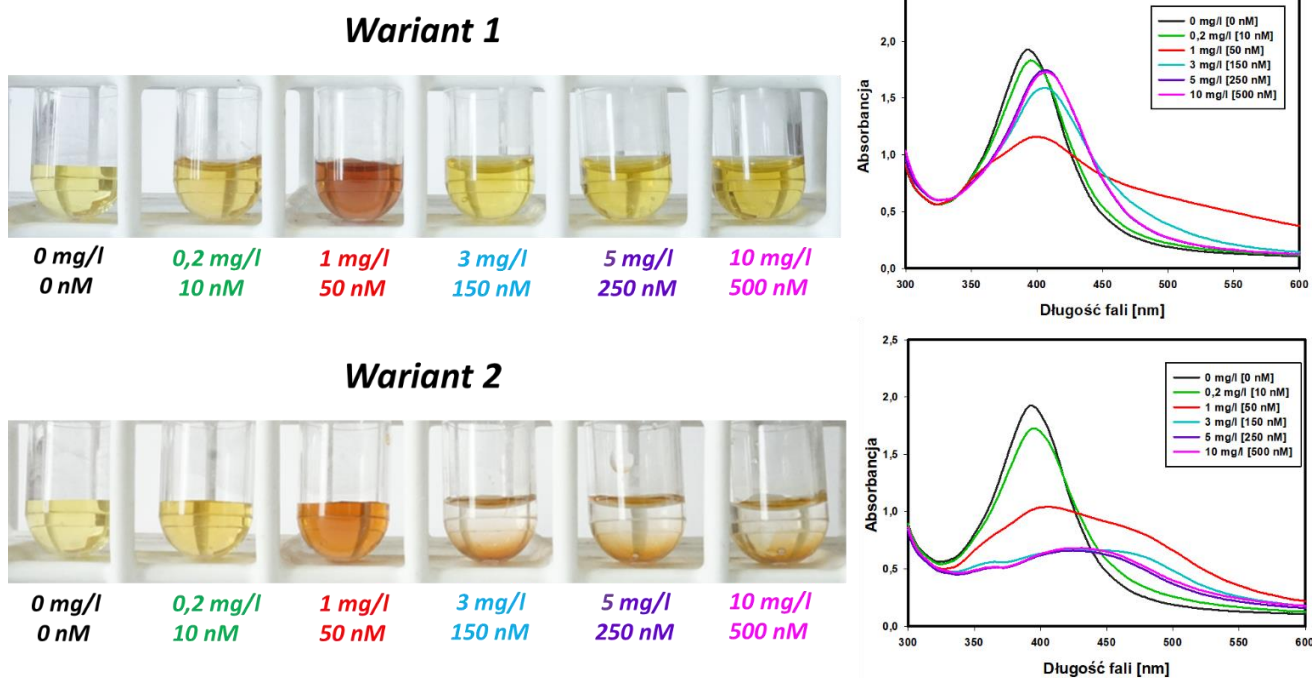
Analizując reakcje zachodzące w roztworach nanocząstek srebra funkcjonalizowanych monoklonalnymi wolnymi łańcuchami lekkimi zaobserwowano dwa charakterystyczne wzorce zmian. W obu wariantach przy stężeniu FLC równym 1 mg/l [50 nM] roztwór zmieniał barwę z żółtej na czerwoną. W widmie UV-Vis dochodziło do charakterystycznego obniżenia maksimum absorpcji, jego przesunięcia w prawo (red-shift) i poszerzenia widma (Ryc. 28). Przy większym stężeniu FLC (3 mg/l [150 nM], 5 mg/l [250 nM], 10 mg/l [500 nM]) dochodziło albo do stabilizacji roztworu nanocząstek (wariant 1), albo samoistnej agregacji nanostruktur (wariant 2).

W wariantie 1 przy wzrastających stężeniach FLC (od 3 mg/l [150 nM]) dochodziło do zmian widmowych sugerujących wytworzenie korony białkowej wokół nanocząstek (niewielkie obniżenie maksimum absorpcji i red-shift, bez poszerzenia widma). Roztwory miały barwę żółtą. Uwzględniając stężenia molowe reagentów ilość cząsteczek białka przypadających na 1 nanocząstkę w tych roztworach to 15:1, 25:1 i 50:1.

W wariantie 2 krzywe widm absorpcji przy wysokich stężeniach FLC spłaszczały się i dochodziło do widocznej makroskopowo agregacji nanostruktur.

Przedstawione wzorce zmian zachodziły bez związku z typem łańcuchów wolnych. Wariant 1 zaobserwowano u 7/9 pacjentów z FLC lambda i 8/10 u pacjentów z FLC kappa. Drugi, związany z agregacją nanocząstek, typ zmian zachodził u 2/9 pacjentów z FLC lambda i 2/10 u pacjentów z FLC kappa.





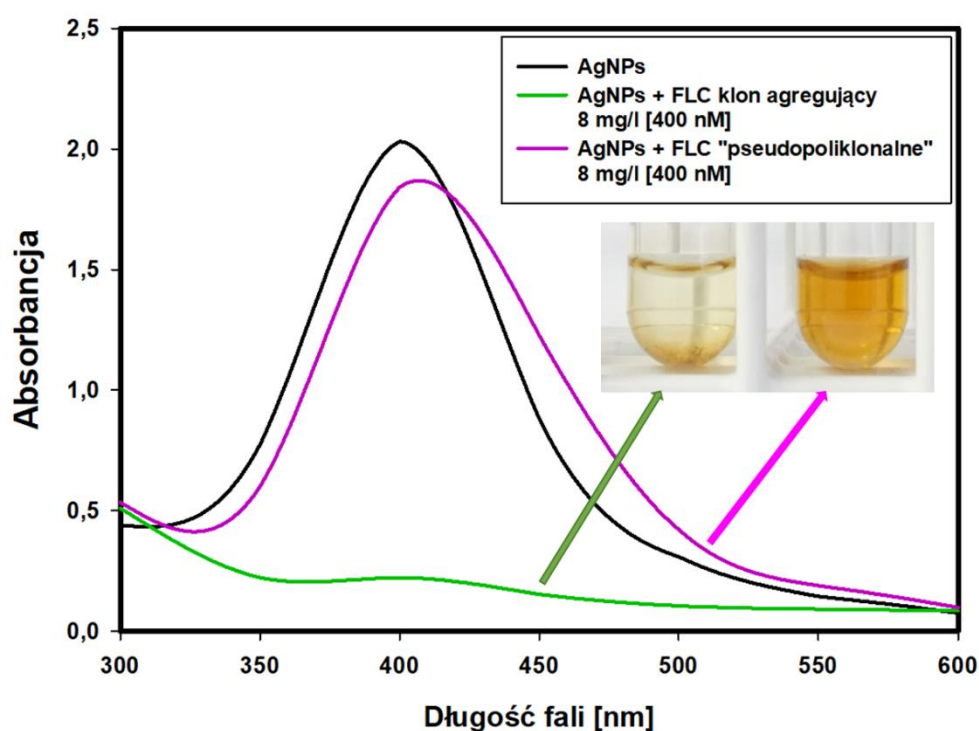
**Ryc. 28.** Wzorce zmian makroskopowych i widma LSPR w wyniku opłaszczenia nanocząstek srebra (10 nM) różnymi klonami wolnych monoklonalnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. W obu wariantach przy stężeniu FLC równym 1 mg/l [50 nM] obserwowano charakterystyczne czerwone zabarwienie roztworu a na wykresie widma UV-Vis obniżenie maksimum absorpcji, poszerzenie widma i red-shift. W wariacie 1 przy wyższych stężeniach FLC (od 3 mg/l [150 nM]) – obserwowano żółtą barwa roztworu, niewielkie obniżenie maksimum absorpcji (w stosunku do nanocząstek wyjściowych) i jego przesunięcie w prawo (red-shift), bez poszerzenia widma. W wariacie 2 przy wysokich stężeniach FLC – obserwowano agregację nanostruktur i spłaszczenie krzywych na wykresie widmowym.

Aby sprawdzić czy możliwe jest wywołanie agregacji stabilnych, opłaszczonych FLC nanocząstek srebra w układzie 1 do próbek dodano przeciwciała, które powinny zareagować z łańcuchami lekkimi immunoglobulin opłaszczonymi na nanocząstkach, odpowiednio: anti-FLC kappa lub anti-FLC lambda. Nie udało się jednak osiągnąć w ten sposób agregacji nanocząstek. Oddziaływanie antygen-przeciwciała nie spowodowało wytrącenia się nanocząstek. Układ jest bardzo stabilny, prawdopodobnie dzięki wytworzonej wokół nanocząstek dużej koronie białkowej.

Podsumowując, w wyniku opłaszczenia nanocząstek srebra wolnymi łańcuchami lekkimi w stosunku molowym 5:1 (FLC:AgNPs) dochodziło do zmiany LSPR i barwy roztworu (z żółtej na czerwoną). Przy wyższych stosunkach FLC do AgNPs (15:1, 25:1, 50:1) w przypadku części klonów dochodziło do wytworzenia stabilnej korony białkowej wokół nanocząstek, pozostałe natomiast oddziaływały ze sobą wywołując agregację nanostruktur.

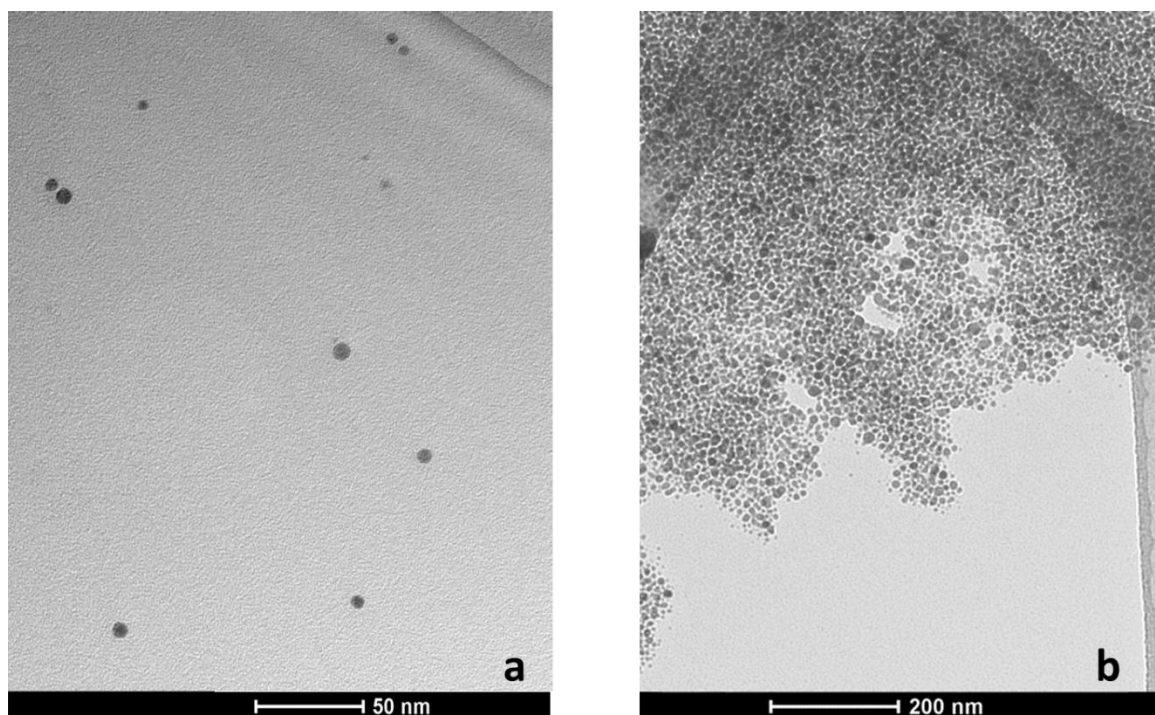
Ten prosty model (nanocząstki opłaszczone FLC) może potencjalnie służyć jako test do selekcji klonów wolnych łańcuchów lekkich mających tendencję do samoistnej agregacji.

Agregacja wolnych łańcuchów lekkich związana jest z ich klonalnością. Poprzeczna (do osi włókna amyloidowego) agregacja wolnych monoklonalnych łańcuchów lekkich możliwa jest wtedy gdy wyeksponowane fragmenty o strukturze beta kartki tworzą specyficzną dla klonu zazębiającą się komplementarnie strukturę. W piśmiennictwie brak jest doniesień o powstawaniu struktur amyloidowych u pacjentów z hipergammaglobulinemią poliklonalną. Cząsteczki białkowe różnych klonów mają odmienne, niepasujące do siebie fragmenty wiążące o strukturze beta kartki. W celu weryfikacji powyższej hipotezy zmieszano wybrane klony FLC wywołujące agregację tak, aby stężenie końcowe FLC w materiale wynosiło 8 mg/l. Okazało się, że „pseudopoliklonalna” mieszanina wolnych łańcuchów lekkich nie powoduje reakcji agregacji nanocząstek (Ryc. 29). Potwierdza to użyteczność systemu nanocząstkowego w identyfikacji klonów wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin mających tendencję do aglutynacji i – być może – tworzenia amyloidu.



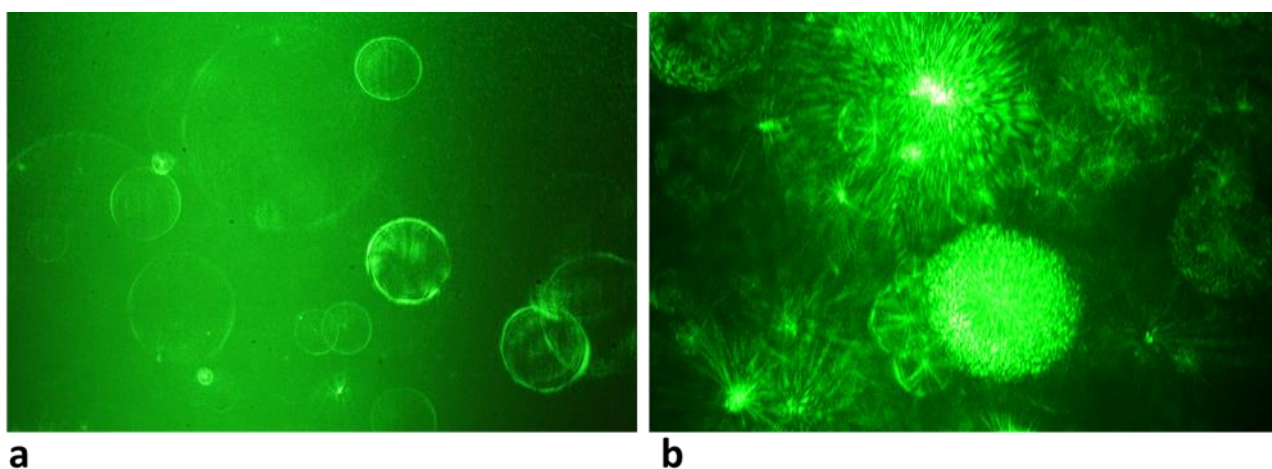
Ryc. 29. Porównanie zmian zachodzących po opłaszczeniu AgNPs wolnymi łańcuchami lekkimi (8 mg/l, [400nM]): klonem wywołującym samoistną agregację (kolor zielony) i pseudopoliklonalnymi FLC (kolor różowy). „Pseudopoliklonalna” mieszanina FLC nie powoduje reakcji agregacji nanocząstek.

Wzajemne oddziaływanie wolnych monoklonalnych łańcuchów lekkich opłaszczonych na nanocząstkach srebra badano też za pomocą obrazowania TEM (Ryc. 30). Ryc. 30a przedstawia pojedyncze nanocząstki srebra opłaszczone wolnymi łańcuchami lekkimi (10 mg/l [500 nM]), stabilne, z koroną białkową (odpowiada to wariantowi 1 opisanemu powyżej). Na Ryc. 30b widać agregaty nanocząstek powstające w wyniku oddziaływań między łańcuchami lekkimi (wariant 2).



**Ryc. 30. Agregacja monoklonalnych łańcuchów lekkich obrazowana przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego: a) nanocząstki srebra opłaszczone FLC (10 mg/l [500 nM]) stabilne, z koroną białkową (wariant 1); b) nanocząstki srebra opłaszczone FLC (10 mg/l [500 nM]) agregujące (wariant 2).**

Oceniając oddziaływania między wolnymi łańcuchami lekkimi analizowano również wzorce rozpraszania światła laserowego przez powstałe mieszaniny. Okazało się, że korona białkowa utworzona w obecności wysokich stężeń FLC (150 nM, 250 nM, 500 nM) daje obraz charakterystycznych koncentrycznych okręgów (Ryc. 31a). Agregaty powstałe w wariacie opisanym powyżej jako 2 dają obrazy („rozbłyśki sztucznych ogni”) (Ryc. 31b), podobne jak w części badania dotyczącej oddziaływań antygen – przeciwciała.



**Ryc. 31. Rozpraszanie zielonego światła laserowego przez: a) nanocząstki srebra pokryte dużą koroną białkową, b) agregaty nanocząstek.**

Analizę wzorów rozpraszania światła można wykorzystać do jakościowego badania procesu oddziaływań białek z nanocząstkami w czasie rzeczywistym. Ta metoda może zapewnić wysoką czułość, umożliwiając obserwację agregacji pojedynczych nanocząstek [114]. Metoda rozpraszania wzorca może być tanią, stosunkowo prostą metodą badawczą do badania oddziaływań białkowych z wykorzystaniem nanocząstek srebra.

## 5. Dyskusja

W pracy podjęto próbę zastosowania nanocząstek srebra do badania oddziaływań międzybiałkowych. W pierwszym etapie dokonano wyboru metody syntezy nanocząstek.

W piśmiennictwie istnieją setki metod syntezy nanocząstek srebra. Wybrana metoda syntezy powinna być:

1. Tania i prosta w wykonaniu.
2. Otrzymane nanocząstki powinny być stabilne w procesie przechowywania.
3. Nanocząstki powinny umożliwiać wiązanie białek na ich powierzchni.

Różne sposoby syntezy i stabilizacji nanocząstek wpływają na ich właściwości m.in. na rozmiar, kształt nanocząstek, ich ładunek powierzchniowy oraz późniejsze możliwości funkcjonalizacji.

Syntezę wykorzystanych w pracy nanocząstek srebra przeprowadzono według metody opisanej przez Creightona [47]. Otrzymane w wyniku redukcji jonów srebra nanocząstki stabilizowano jonami cytrynianowymi. Żółto zabarwiony roztwór posiadał związane z efektem powierzchniowego rezonansu plazmonowego, widmo absorpcji z maksimum przy długości fali 395 nm. Wykorzystując zależność między maksimum widma powierzchniowego rezonansu plazmonowego i rozmiarem nanocząstek oszacowano średnicę otrzymanych nanocząstek na około 10 nm [109]. Nanocząstki te okazały się podatne na opłaszczanie zarówno przeciwciałami zawartymi w antyosurowicy jak i wolnymi łańcuchami lekkimi immunoglobulin. Funkcjonalizowane białkami nanocząstki były stabilne w izotonicznym roztworze soli co umożliwiało badanie procesu agregacji białek w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Jest to szczególnie ważne ponieważ nanocząstki metali są niestabilne w środowisku zawierającym wysokie stężenia jonów jedno- i dwuwartościowych [115]. Otrzymane metodą Creightona roztwory nanocząstek srebra były stabilne przez wiele miesięcy. Uzyskane według innego protokołu syntezy AgNPs (borowodorek i hydrazyna jako związki redukujące oraz cytrynian i PVA jako stabilizatory) mimo potencjalnie atrakcyjnych cech – różnych rozmiarów i barw - okazały się bardzo stabilne a zwarta powierzchnia stabilizującego alkoholu poliwinylowego (PVA) zapobiegała wiązaniu się białek.

## *Model antygen-przeciwciała.*

Badania rozpoczęto od referencyjnego modelu oddziaływań białkowych, układu antygen – przeciwciała. Nanocząstki srebra opłaszczono przeciwciałami anty-lambda a elementem oddziałującym z otaczającą nanocząstki koroną białkową był komplementarny antygen – wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin typu lambda. Potencjalnie model ten można wykorzystać do konstrukcji testu diagnostycznego wykrywającego łańcuchy lekkie immunoglobulin.

Kluczowym elementem funkcjonalizacji AgNPs przeciwciałami anty-lambda było ustalenie odpowiedniej ilości antysurowicy jaka powinna być użyta, aby skutecznie opłaszczyć nanocząstki. Analizując dane z piśmiennictwa dotyczące optymalnej ilości przeciwciał, jaka powinna być użyta do funkcjonalizacji nanocząstek daje się zauważyć duże rozbieżności. Dane podawane przez różnych autorów się różnią się nawet o kilka rzędów wielkości. Dodatkowo, różni autorzy inaczej przedstawiają stężenia nanocząstek w roztworze i ilość dodawanych przeciwciał. Niektórzy badacze podają stężenie AgNPs w miligramach elementarnego srebra/litr [6,7,11,65,116-120].

Wobec trudnych do porównania danych z piśmiennictwa i braku odniesienia do opracowywanego układu (rozmiaru nanocząstek, ich stężenia, potencjału zeta, punktu izoelektrycznego białka) ilość dodanego białka (zarówno przeciwciała jak i antygeny) została dobrana na podstawie wcześniejszych doświadczeń.

Do wykrywania antygenów białkowych możemy wykorzystywać przeciwciała mono- lub poliklonalne. Przeciwciała monoklonalne mają swoje ograniczenia. W przypadku łańcuchów lekkich immunoglobulin, które cechują się dużą heterogennością, może dojść do sytuacji w której monoklonalny antygen będzie pozbawiony komplementarnego epitopu. W stosunku do heterogennych monoklonalnych łańcuchów lekkich metody badawcze oparte o przeciwciała poliklonalne są stabilniejsze [121]. Zastosowanie przeciwciał poliklonalnych ma jednak swoje wady. Trudno jest scharakteryzować komercyjnie dostępne przeciwciała poliklonalne. Z technicznego punktu widzenia może to być pełna surowica lub oczyszczona frakcja immunoglobulin. Aby określić skład i stężenie przeciwciał użytych w pracy wykonano elektroforezę kapilarną zastosowanej w pracy antysurowicy. Na podstawie uzyskanego profilu elektroforetycznego ustalono, że użyta surowica anty-FLC zawierała oczyszczoną frakcję immunoglobulin. Stężenie wyjściowe immunoglobuliny – obliczone przez porównanie pola powierzchni na elektroforegramie ze standardem białka o znanym stężeniu – wynosiło 168 g/l. Uwzględniając ciężar molekularny immunoglobuliny IgG wynoszący około 140 kDa, stężenie

molowe immunoglobulin w zastosowanej antysurowicy wynosiło 1.2 mM. Oczywiście otwartą i trudną do rozwiązania kwestią jest stężenie specyficznych przeciwciał rozpoznających epitopy wolnych łańcuchów lekkich, a także ich powinowactwo i awidność. Fakt ten należy uznać za wadę opracowywanego modelu [105].

W przedstawionej pracy na podstawie maksimum LSPR (395 nm) oraz współczynnika ekstynkcji molowej dla tej długości fali ( $5,56 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) stężenie molowe roztworu AgNPs oszacowano na 10 nM. Stężenie końcowe przeciwciał w roztworze (po funkcjonalizacji nanocząstek) wynosiło 120 nM. Oznacza to, że stosunek molowy ilości przeciwciał/AgNPs wynosił 12. Przy takiej ilości przeciwciał nanocząstki srebra były stabilne, nie agregowały samoistnie a w porównaniu z AgNPs nieopłaszczonymi wykazywały niewielkie przesunięcie maksimum widma absorpcji w prawo (red-shift). Charakterystyka nanocząstek funkcjonalizowanych przeciwciałami jest spójna z wynikami innych badaczy [25,122]. Np. Lu Zhang et al. opłaszczając 14-nanometrowe nanocząstki złota mysią immunoglobuliną IgG uzyskali podobne przesunięcie widma UV-Vis w porównaniu do wyjściowych AuNPs (nieznaczny red-shift) [122]. W cytowanej pracy ilość cząsteczek IgG przyłączonych do nanocząstek złota wg analiz dokonanych różnymi metodami wynosiła od 4 do 15.

Konstrukcja układu referencyjnego służącego do badania oddziaływań białkowych oparta była na oddziaływaniu między specyficznymi przeciwciałami opłaszczonymi na nanocząstkach i komplementarnym antygenie (FLC). Oddziaływaniom tym towarzyszyły zmiany w widmie powierzchniowego rezonansu plazmonowego. W określonym zakresie stężeń FLC (od 0 do 10 mg/l [500 nM]) dochodziło do obniżenia maksimum absorbancji przy długości fali 395 nm, poszerzenia i przesunięcia w prawo (red-shift) widma LSPR. Dodatkowo obserwowano powstanie drugiego piku przy długości fali 470 nm. Zmiany te korespondowały z procesem agregacji nanostruktur obserwowanym w TEM, metodzie DLS i bezpośrednim rozpraszaniu światła laserowego. Przy wyższych stężeniach FLC (powyżej 10 mg/l [500 nM]) dochodziło do ponownego wzrostu maksimum absorbancji przy długości fali 395 nm i zwężenia się widma LSPR. Zjawisko to związane było prawdopodobnie z tworzeniem drugiej warstwy białkowej składającej się z wolnych łańcuchów lekkich. Tworzona w obszarze nadmiaru antygeny korona białkowa stabilizowała cząsteczki a wysycające stężenie FLC zapobiegało agregacji.

Znając stężenie molowe roztworu nanocząstek srebra - 10 nM, i stężenia wolnych łańcuchów lekkich można wyliczyć stosunek liczby cząstek, które reagowały ze sobą. Reakcja aglutynacji przebiegała optymalnie (zachodziły największe zmiany widmowe) do momentu, gdy na 1 nanocząstkę srebra opłaszczoną 12 cząsteczkami przeciwciał przypadało od 20 do 50



cząstek antygeny. Przy większej ilości antygeny dochodziło wysycenia miejsc wiążących i zablokowania reakcji agregacji nanostruktur. Model oparty na reakcji antygen- przeciwciało obarczony jest typową dla testów immunochemicznych cechą wynikającą z nadmiaru antygeny – tzw. efektem hooka. W praktyce, tak jak w innych tego typu testach, jedynym sposobem rozwiązania tego problemu jest rozcieńczenie próbki przy wysokich stężeniach FLC [104,113,123].

W badaniu wzajemnych oddziaływań opłaszczonych na nanocząstkach białek należy uwzględnić wiele czynników. Własności fizyczne nanocząstek ściśle zależą od ich rozmiaru i kształtu. Ważne są również warunki środowiska – pH, siła jonowa, temperatura, czas reakcji. Pierwszym etapem konstrukcji układu badawczego opisanego powyżej było tworzenie opłaszczającej nanocząstki warstwy białkowej. Warstwę tę można uznać za jeden z elementów szeroko opisywanej w piśmiennictwie korony białkowej tworzącej się wokół nanocząstek. Własności korony białkowej, jej rozmiar, proces wiązania białek na powierzchni nanocząstek w istotny sposób wpływa na własności układu.

Aby scharakteryzować powstającą koronę białkową poza metodami spektrofotometrycznymi zastosowano dodatkowe metody badawcze. Dostępnych jest wiele technik badawczych a wybór metody analitycznej zależy od tego jaki parametr dotyczący korony białkowej chcemy ocenić [124]. Głównymi technikami wykorzystywanymi w celu określenia grubości korony białkowej są: metoda dynamicznego rozpraszania światła (DLS), wirowania różnicowego (*differential centrifugal sedimentation* - DCS), transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) [33,124-126].

Dane dotyczące grubości korony białkowej są powszechnie podawane w piśmiennictwie. Natomiast informacje dotyczące dokładnej ilości (stechiometrii) związanych białek oraz dynamiki ich wiązania/wymiany są trudne do oceny za pomocą standardowych metod badania. Do określenia powinowactwa wiązania wykorzystuje się m.in. metodę wygaszania fluorescencji (*fluorescence quenching titration* - FQT), spektroskopii korelacji fluorescencji (*fluorescence correlation spectroscopy* - FCS), chromatografii na sitach molekularnych (*size exclusion chromatography* - SEC), kalorymetrii różnicowej (*isothermal titration calorimetry* - ITC) [127-129].

W badaniach nad oceną dynamiki wiązania białek do nanocząstek wykorzystywano analizę powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR), wagi z oscylatorem kwarcowym (*quartz crystal microbalance* - QCM), potencjał zeta (*Zeta potential* - Z-pot) [126,127,130].

Aby określić skład korony białkowej stosuje się metody elektroforetyczne i spektrometrię mas [130,131].



W trakcie adsorpcji białek na powierzchni nanocząstek mogą one ulegać zmianom konformacyjnym. Jest to szczególnie istotne w przypadku niektórych białek, m.in. wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin gdzie zmiany konformacyjne i wyeksponowanie struktur  $\beta$ -kartki może być jednym z pierwszych etapów tworzenia amyloidu. Zmiany konformacyjne białek, do których może dojść w wyniku ich adsorpcji na nanocząstkach można śledzić wykorzystując do tego szereg metod, m.in.: dichroizm kołowy (*circular dichroism* - CD) czy różne warianty furierowskiej spektroskopii ramanowskiej (*fourier transform infrared spectroscopy* - FTIR) i magnetycznego rezonansu jądrowego (*nuclear magnetic resonance* - NMR) [130,132-134].

W pracy, poza spektrofotometrią UV-Vis, wykorzystano obrazowanie z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej, metodę dynamicznego rozpraszania światła a także autorską metodę rozpraszania światła laserowego.

Badanie zmian powierzchniowego rezonansu plazmonowego jest bardzo kuszącą metodą badawczą w przypadku nanocząstek metali. Zmiany w bezpośrednim otoczeniu nanostruktur mogą powodować spektakularne zmiany widmowe. Wykorzystanie tej metody nie zawsze jednak jest możliwe, ponieważ tworząca się wokół nanocząstek korona białkowa stabilizuje nanocząstki i nie obserwuje się wtedy bezpośrednich zmian LSPR. Łatwiej jest wówczas analizować zachodzące w roztworze zmiany wykorzystując metody obrazowe jak TEM czy bezpośrednio rozpraszanie światła (DLS).

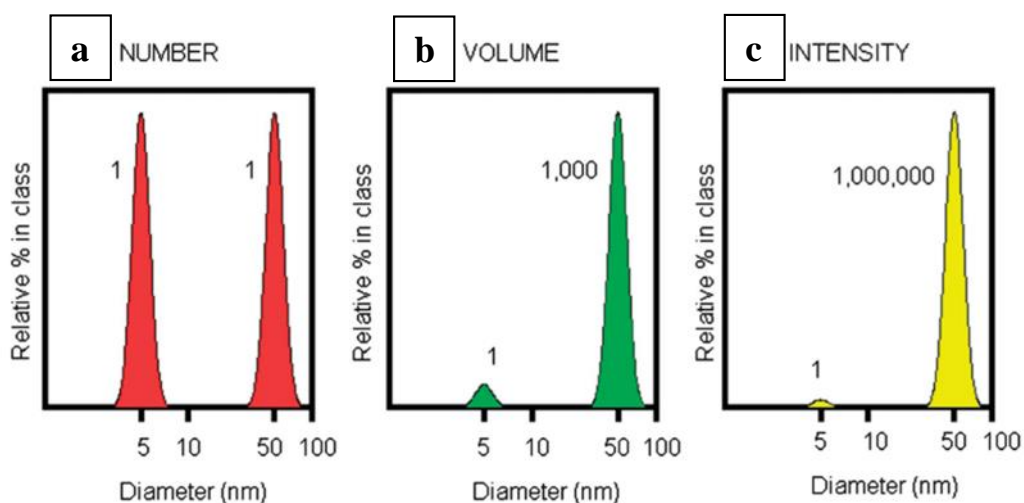
DLS to metoda analityczna, która polega na rozpraszaniu światła laserowego przez będące w ciągłym ruchu (ruchy Browna) nanocząstki zdyspergowane w cieczy. Szybkość zmian intensywności światła rozproszonego zależy od wielkości cząstek i dlatego może posłużyć do obliczenia ich rozmiaru [135].

DLS umożliwia pomiar wielkości nanocząstek z przedziału od 0.5 nm do 10 000 nm oraz badanie procesów zachodzących w czasie. Może być wykorzystywany do analizy kształtu oraz właściwości optycznych cząstek. DLS jest najczęściej stosowaną metodą do określenia grubości korony białkowej. Zaletą techniki DLS jest fakt, że nie wymaga ona specjalnego przygotowania próbki. Pomiar odbywa się w roztworze w którym znajdują się nanocząstki bez żadnych modyfikacji. Wadą tej techniki jest konieczność użycia wyspecjalizowanej aparatury [136].

Średni rozmiar nanocząstek wykorzystanych w pracy obliczony metodą DLS według intensywności rozpraszania (*size by intensity*) wyniósł  $30 \pm 6$  nm. Średnia i mediana rozmiarów AgNPs uzyskane z DLS były wyższe niż te otrzymane z TEM (średnia 9.62 nm, mediana 9.2 nm, SD 3.4 nm). Podobne rozbieżności zaobserwowano porównując rozmiary nanocząstek

złota uzyskane tymi dwoma metodami w badaniach Lu Zhang et al. (TEM  $14.8 \pm 1$  nm, DLS 20.9 nm) czy Bell et al. (TEM 20.1 nm, DLS  $25.7 \pm 0.2$  nm) [122,137]. Metoda DLS mierzy średnicę hydrodynamiczną nanocząstek i powyższe różnice wartości średnicy otrzymane różnymi metodami można wytłumaczyć zakłóceniem średnicy hydrodynamicznej NPs powodowanym przez środek dyspergujący. Poza warstwę hydratacyjną dodatkowym czynnikiem mogącym mieć wpływ na rozmiary nanocząstek uzyskane metodą DLS jest związek używany do stabilizacji nanocząstek (np. cytrynian). TEM tymczasem pokazuje średnicę cząstek bez uwzględnienia ładunku wodnego i jonowego [137].

Różnice w wynikach dodatkowo związane są z tym, że na prezentację wyników DLS w istotny sposób wpływa wybór sposobu obliczania. Podstawowy sposób pomiaru i przedstawiania wyników w metodzie DLS związany jest z intensywnością rozpraszania światła przez cząstki obecne w roztworze (*size by intensity*). Jeśli jednak w roztworze znajduje się duża ilość dużych cząstek ten sposób prezentacji wyników może być obciążony znacznym błędem i w wynikach małe cząstki będą pomijane. Konieczne może być wtedy określenie objętości fazy rozpraszającej i ilości cząstek rozpraszających. Pozwoli to na dodatkową prezentację wyników uwzględniającą objętość (*size by volume*) lub ilość danych cząstek (*size by numer*) [136]. Ryc. 32 pokazuje różnice w uzyskanych wynikach w zależności od przyjętej metody obliczania. Zakładając, że w roztworze znajduje się taka sama ilość cząstek o średnicy 5 nm i 50 nm na wykresie prezentującym rozkład wielkości według ilości cząstek rozpraszających (Ryc. 32a) otrzymamy dwa piki tej wielkości (stosunek 1:1). Licząc rozkład wielkości z uwzględnieniem objętości cząstek powierzchnia piku dla cząstek o średnicy 50 nm będzie 1000 razy większa (Ryc. 32b). Jeśli natomiast przedstawimy rozkład wielkości tych samych cząstek według intensywności rozpraszania światła (Ryc. 32c) to stosunek powierzchni pików będzie wynosił 1:1000000. Wynika to z faktu, że duże cząstki rozpraszają znacznie więcej światła niż cząstki małe (wg obliczeń Rayleigha intensywność rozpraszania zależy od szóstej potęgi średnicy) [138].



Ryc. 32. Wpływ wyboru metody obliczania na prezentację wyników rozmiarów cząstek mierzonych metodą DLS [136].

Wadą DLS jest więc niewątpliwie to, że interpretacja danych robi się skomplikowana w przypadku systemów polidispersyjnych [139]. Intensywność rozproszenia silnie zależy od wielkości cząstek i średnica hydrodynamiczna zmierzona tą metodą jest silnie przesuwana w kierunku największych struktur w roztworze. Cząstka 30 nm wykazuje  $10^6$ -krotnie większą intensywność rozpraszania niż cząstka 3 nm, co powoduje, że podając wyniki *by intensity* małe cząstki są zanedbywane. Dlatego nawet niewielka ilość większych cząstek może zaburzyć interpretację danych DLS i wpływać na ich poprawną interpretację. Ważne jest aby analizując NPs pod kątem ich wielkości hydrodynamicznej za pomocą DLS sprawdzić czy wskaźnik polidispersji (PDI) jest wystarczająco niski, aby uznać próbkę za monodispersyjną [135].

Ponieważ w przedstawionej pracy rozkład wielkości cząstek jest dość szeroki, obecność większych cząstek może przyczyniać się do wzrostu rozproszenia światła, co zwiększa rozmiar mierzonych cząstek. Dodatkowo, małe cząstki mogą ulegać aglomeracji i ich identyfikacja nie jest możliwa [139].

Wykorzystując DLS do pomiaru średnicy hydrodynamicznej nanocząstek srebra opłaszczonych przeciwciałami anti-lambda otrzymano wynik  $46.1 \pm 4.1$  nm (vs  $30 \pm 6$  nm – nanocząstki nieopłaszczone przeciwciałami). Uwzględniając przeciętne wymiary immunoglobulin podawane w piśmiennictwie ( $14.5 \text{ nm} \times 8.5 \text{ nm} \times 4 \text{ nm}$ ) [28] otrzymane z DLS dane wskazują, że immunoglobuliny uformowały na powierzchni nanocząstek monowarstwę. Warstwa ta widoczna była na obrazie TEM jako przestrzeń oddzielająca pojedyncze nanocząstki (Ryc. 11). Podobnie, wzrost średnicy hydrodynamicznej nanocząstek po opłaszczeniu białkami osocza wykazali w swojej pracy Dobrovolskaia et al. ( $33.3$  nm przed vs.  $76.1$  nm po inkubacji nanocząstek złota z osoczem) [111]. W cytowanej pracy pomiar metodą TEM nie pozwolił na uchwycenie zmiany rozmiarów nanocząstek po opłaszczeniu

(27.2 nm przed vs. 28.4 nm po opłaszczeniu). TEM uznano jednak za przydatną do wykazania, że inkubacja nanocząstek z osoczem nie spowodowała agregacji nanocząstek, a w konsekwencji zjawisko agregacji nanocząstek nie wpłynęło na analizę DLS. Obrazowanie metodą TEM, powszechnie wykorzystywane w obrazowaniu nanostruktur, może zatem stanowić uzupełnienie informacji otrzymanych dzięki DLS [111].

Agregacja nanostruktur może też być skutkiem wirowania przeprowadzonego w celu wyizolowania kompleksów NPs-białka lub też efektem działania specyficznych warunków środowiskowych. Obecność agregatów może znacząco wpłynąć na wyniki uzyskane metodą DLS, a końcowej obliczonej grubości nie należy uważać za reprezentatywną dla całej próbki. Na przykład Wang i współpracownicy w swoim badaniu zaobserwowali zmianę zarówno wielkości, jak i dystrybucji rozkładu nanocząsteczek złota po inkubacji z surowicą: średni rozmiar nanocząstek wzrósł z 25 do 83 nm, a rozkład wielkości stał się bardziej niejednorodny. Postawili hipotezę, że wzrost średnicy NPs był spowodowany nie tylko tworzeniem się korony białkowej, ale także obecnością aglomeratów białko-NPs, których powstanie było efektem obecności w roztworze jonów  $\text{Ca}^{++}$  i  $\text{Mg}^{++}$  [140].

Transmisyjna mikroskopia elektronowa jest jedną z bardziej popularnych technik mikroskopii wykorzystywanych do charakterystyki nanocząstek [135]. Pozwala ona na określenie rozmiaru i kształtu nanocząstek, a także ich charakterystykę chemiczną. Metoda ta cechuje się wysoką rozdzielczością, nawet do 0.07 nm. [135] Podstawowym ograniczeniem elektronowej mikroskopii transmisyjnej jest konieczność przygotowania próbki. Sam pomiar odbywa się na podłożu po całkowitym usunięciu wody. Usunięcie wody może znacznie zmienić labilne struktury białkowe otaczające nanocząstki. Kolejnym problemem, który się pojawia przy obrazowaniu metodą TEM jest konieczność przygotowania cienkich próbek (limit grubości wynosi 200 nm) aby uniknąć efektów chromatycznych. Zbyt „gruba” próbka może zmniejszyć osiągalną rozdzielczość do 1.5–2 nm. Technika ta jest kosztowna i skomplikowana operacyjnie, wymaga czasochłonnego przygotowania próbki [136]. Dodatkowo pole widzenia jest stosunkowo niewielkie, co stwarza możliwość, że analizowany region może nie być charakterystyczny dla całej próbki. Istnieje prawdopodobieństwo, że próbka może zostać uszkodzona przez wiązkę elektronów, szczególnie w przypadku materiałów biologicznych [136].

Mimo swoich ograniczeń TEM jest jedną z najczęściej stosowanych technik do badania i charakterystyki nanocząstek. Metodą TEM w pracy udało się określić rozmiary nanocząstek, wykazać tworzenie wokół nanocząstek korony białkowej zapobiegającej ich agregacji oraz zobrazować powstające agregaty.

Oczywistym jest, że każda metoda analityczna ma swoje wady i zalety. W przypadku badania nanomateriałów wyzwaniem staje się odpowiednie przygotowanie próbek do badania, tak aby uniknąć agregacji czy też rozpuszczenia nanostruktur. Istotne jest stężenie nanocząstek, aby osiągnąć limit detekcji danej metody. Aby właściwie scharakteryzować NPs, dobrze jest zastosować więcej niż dwie różne metody analityczne [135].

W ramach pracy nad badaniem oddziaływań międzybiałkowych z wykorzystaniem nanocząstek dodatkowo opracowano autorską metodę oceny rozpraszania zielonego światła laserowego (532 nm) na nanocząstkach i porównano jej wyniki z pozostałymi metodami.

W skonstruowanym na potrzeby badań systemie pomiarowym wykazano różne wzorce rozpraszania światła na nanocząstkach nieopłaszczonych, opłaszczonych przeciwciałami, opłaszczonych łańcuchami lekkimi w nadmiarze (korona białkowa) oraz na agregatach nanocząstek srebra.

Wąska wiązka światła laserowego przechodząca przez roztwór niefunkcjonalizowanych nanocząstek srebra dała jednorodny wzór rozpraszania (Ryc. 26a). Funkcjonalizacja nanocząstek przeciwciałami spowodowała powstanie małych skupisk rozpraszających światło (Ryc. 26b). Dodanie 6 mg/l [300 nM] antygenów białkowych (FLC) do opłaszczonych przeciwciałami anti-FLC nanocząstek spowodowało utworzenie agregatów intensywnie rozpraszających światło (obraz przypominający rozbłyski sztucznych ogni) (Ryc. 26c). Efektem rozpraszania światła laserowego na modelu będącym wynikiem drugiego etapu pracy – nanocząstkach otoczonych dużą koroną białkową były charakterystyczne koncentryczne okręgi (Ryc. 31). Agregaty nanocząstek otrzymane w tej części pracy (model 2) dawały wzory rozproszenia podobne jak w pierwszym etapie pracy (model antygen-przeciwciało).

Różne wzory rozpraszania widoczne w obserwacjach mikroskopowych pokrywały się z wynikami uzyskanymi innymi metodami. Analizę wzorów rozpraszania światła można uznać za przydatną do jakościowego badania procesu oddziaływań białek z nanocząstkami w czasie rzeczywistym [141]. Metoda ta może zapewnić wysoką czułość, umożliwiając obserwację agregacji pojedynczych nanocząstek [142]. Analiza rozpraszania światła laserowego (metoda rozpraszania wzorca) może być tanią, stosunkowo prostą metodą badawczą do badania interakcji białek z wykorzystaniem nanocząstek srebra.

Wykorzystane w pracy metody śledzenia agregacji nanocząstek związanej z oddziaływaniami antygen-przeciwciało - spektrofotometria UV/Vis, obrazowanie TEM, dynamiczne rozpraszanie światła – dają generalnie spójne wyniki. Każda z tych metod ma jednak pewne ograniczenia wynikające między innymi ze sposobu do przygotowania próbki do badania lub samej metodologii badawczej. Podczas tworzenia korony białkowej, systemów

badan agregacji należy wziąć pod uwagę wiele elementów związanych z właściwościami fizycznymi i chemicznymi nanocząstek i ligandów białkowych.

Podsumowując przy odpowiednio dobranym zakresie stężeń białka funkcjonalizującego (przeciwciała) i antygeny (wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin) oraz wykorzystując odpowiednio dobrane metody badawcze nanocząstki srebra mogą służyć do badania oddziaływań białkowych w modelu antygen – przeciwciało.

Opracowany model agregacji opłaszczonych przeciwciałami nanocząstek srebra w obecności wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin może służyć potencjalnie jako test diagnostyczny. Zakres stężeń FLC przy których zachodzi proces agregacji (4-15 mg/l) wskazuje na wystarczającą klinicznie, użyteczną czułość testu.

### *Oddziaływania międzybiałkowe – między wolnymi łańcuchami lekkimi immunoglobulin*

Po weryfikacji modelu i zastosowanych metod badawczych w kolejnej części pracy oceniano oddziaływania międzybiałkowe różnych klonów wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin opłaszczonych na nanocząstkach srebra. Ten model może być pomocny w identyfikacji białek mających tendencję do agregacji (tworzenia złożeń).

Wykorzystane w pracy wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin to białka o ciekawych właściwościach. Cechują się olbrzymią (powiązaną z funkcją wiązania antygeny) zmiennością aminokwasową i szerokim zakresem pI. W badaniu M. Diemert et al. analizowano wartości pI wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin pochodzących od 92 pacjentów z białkomoczem Bence-Jonesa [143]. Uzyskano wyniki w zakresie od 3 do 9, z czego u 55% pacjentów wartości pI były poniżej 6, a u 45% powyżej 6. Już z tak szerokiego rozkładu pI wynika, że różne klony FLC mogą zachowywać się odmiennie. Łańcuchy lekkie to niekompletne białka, które w fizjologicznych warunkach, ze względu na szybką filtrację kłębuszkową, występują we krwi w stężeniach rzędu 10 mg/l. Obecne we krwi (wytwarzane w pewnym nadmiarze do łańcuchów ciężkich) wolne łańcuchy lekkie to białka poliklonalne, które „nie pasują do siebie” i nie wykazują tendencji do tworzenia agregatów. U niektórych chorych, w przebiegu gammadatii monoklonalnych homogenna frakcja monoklonalnego białka wykazuje tendencję do agregacji i odkładania się w tkankach. Monoklonalne wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin niekiedy zmienione konformacyjnie w wyniku proteolizy lub innych czynników są termodynamicznie

niestabilne i mają tendencję do samoistnego tworzenia zewnątrzkomórkowych agregatów [144-146].

Wolne łańcuchy lekkie mogą tworzyć uporządkowane struktury fibrylarne – w przebiegu amyloidozy lub amorficzne depozyty białkowe w przebiegu choroby depozytów wolnych łańcuchów lekkich. Nie znamy przyczyn dla których niektóre klonety FLC tworzą depozyty białkowe lecz jest to na pewno związane z ich budową. Łańcuchy lekkie typu lambda tworzą włókna amyloidowe czterokrotnie częściej niż łańcuchy lekkie typu kappa. Te ostatnie z kolei częściej tworzą amorficzne depozyty w chorobie depozytów wolnych łańcuchów lekkich [147,148]. Opracowanie testu, który u pacjentów z gammopatią monoklonalną mógłby oceniać zdolność konkretnych klonów wolnych łańcuchów lekkich do agregacji miałby duże znaczenie diagnostyczne w leczeniu tej choroby.

W niniejszej pracy postanowiono zbadać czy nanocząstki srebra mogą być przydatnym narzędziem do badania procesu agregacji wolnych łańcuchów lekkich i ich podatności do tworzenia depozytów białkowych. Do opłaszczenia nanocząstek stabilizowanych cytrynianem wykorzystano wyselekcjonowane mocze od pacjentów z białkomoczem Bence-Jonesa.

Należy jeszcze raz podkreślić, że pierwszym etapem badania oddziaływań między białkami jest oddziaływanie samych białek z nanocząstkami. Umieszczone w płynach ustrojowych nanocząstki oddziałują z zawartymi w płynach tych związkami, głównie białkami. Białka, w zależności od składu, stężenia, struktury, mogą wytworzyć monowarstwę lub tzw. koronę białkową wokół nanocząstek. Tworzenie tej korony to skomplikowany, dynamiczny proces wynikający głównie z oddziaływań elektrostatycznych i hydrofobowych między białkami a powierzchnią nanocząstek [36]. Proces ten zależy od pH, temperatury środowiska, czasu przebiegu reakcji. Istotną rolę odgrywają właściwości nanocząstek: ich skład, kształt, rozmiar, ładunek powierzchniowy. Równie ważnym elementem jest budowa i właściwości fizykochemiczne białka. W zależności od budowy białka, jego punktu izoelektrycznego, hydrofobowości proces opłaszczania nanocząstek i formowania korony białkowej może być diametralnie różny [29].

W piśmiennictwie podkreślany jest fakt, że z około 9000 białek osocza na nanocząstkach adsorbuje się tylko 300-500. Skłania to do poszukiwania czynników i mechanizmów odpowiedzialnych za tak selektywne tworzenie korony białkowej [149]. Pomimo wielu badań wciąż brakuje pełnego wyjaśnienia mechanizmu wiązania białek z NPs.

Obecny konsensus jest taki, że korona białkowa powstaje gwałtownie w ciągu kilku sekund do kilku minut i jest konsekwencją współzawodnictwa między białkami mającymi różne powinowactwo wiązania do NPs (efekt Vroman) [149]. Łatwiej wiążą się do

nanocząstek białka o dużej ilości regionów hydrofobowych, z dużą ilością struktur beta ( $\beta$ -harmonijek) i małą ilością alfa-helis [149].

W pracy W. Lai et al. badano skład korony białkowej utworzonej z ludzkiego osocza na nanocząstkach srebra i złota o średnicy 20 nm z trzema różnymi modyfikacjami powierzchni (BPEI, PVP and CIT), w tym dodatnimi (nanocząstki stabilizowane BPEI) i ujemnymi (stabilizowane cytrynianem i PVP) ładunkami powierzchniowymi [25]. Wykazano, że wszystkie nanocząstki, nawet te z dodatnimi modyfikacjami powierzchni, uzyskują ładunek ujemny po interakcji z osoczem. Z 300 białek zidentyfikowanych w składzie koron, 99 znajdowało się na każdym nanomateriale. 20 z nich stanowiło ponad 80% całkowitej liczby białek. Wykazano, że ładunek powierzchniowy i rdzeń nanocząstek, a także punkt izoelektryczny białek osocza odgrywają znaczącą rolę w określaniu składu koron nanocząstek. 65% białek koronowych na BPEI-NPs miało  $pI < 6$ , podczas gdy mniej niż 35% białek na CIT/PVP-NP miało  $pI < 6$ . Wynik sugeruje tendencję do odkładania się kwaśnych białek na dodatnio naładowanych BPEI-NPs i mniej kwaśnych białek na ujemnie naładowanych CIT/PVP-NP. Ponadto, wśród tych 20 najliczniej występujących białek, korony CIT/PVP-NPs zawierały 30% białek o  $pI > 8$ . Wyniki te wskazują również, że ładunek powierzchniowy odgrywa ważną rolę w określaniu składu białka koronowego. Należy jednak zauważyć, że chociaż ujemnie naładowane nanocząstki wiążą mniej kwaśnych białek osocza niż dodatnio naładowane nanocząstki o dodatnim ładunku powierzchniowym, nadal 60% białek koronowych miało  $pI < 7$ . Białkami występującymi najliczniej w koronach były: składnik C4 dopełniacza, łańcuch alfa fibrynogenu, czynnik V krzepnięcia, witronektyna, składnik C3 dopełniacza. Albumina i globuliny były obecne na poziomie poniżej 2% w koronach nanocząstkowych [25]. Przedstawione obserwacje pokazały specyficzny wzór wiązania nanocząstek srebra i złota w osoczu, a także znaczenie ładunku powierzchniowego i rdzenia w określaniu składu koronowego białka.

Oprócz ładunku powierzchniowego hydrofilowość/hydrofobowość nanocząstek wpływa na formację koronową białka zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym [150]. Głównymi białkami adsorbowanymi na silnie hydrofobowych nanocząstkach są albumina, fibrynogen i apolipoproteiny (AI, AII, AIV i E) [150].

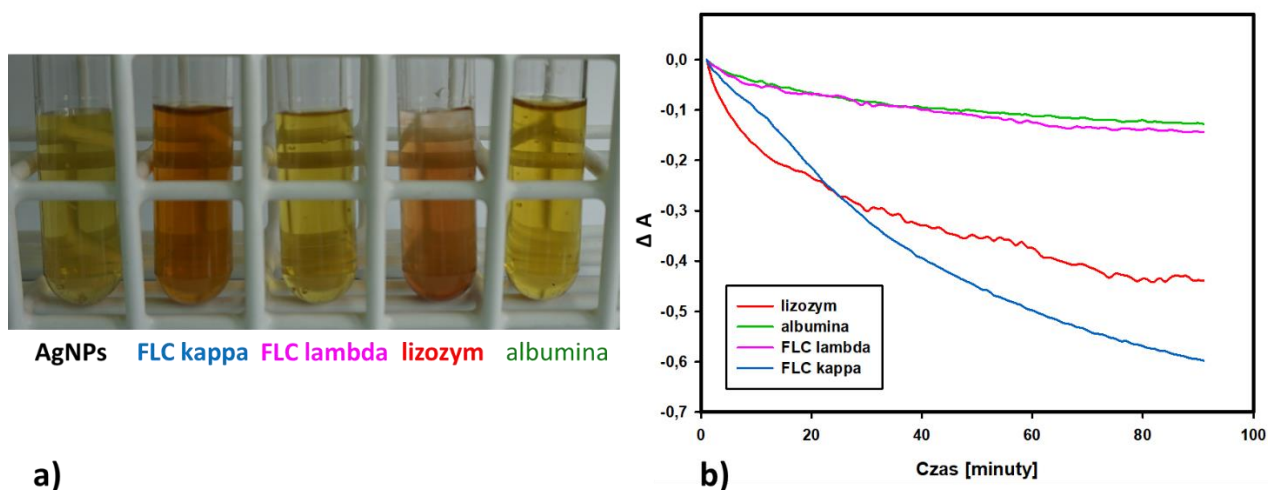
Fibrynogen składa się z łańcuchów  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$  i ma wydłużoną konfigurację w porównaniu z albuminą, jednołańcuchowym białkiem globularnym. Fibrynogen i albumina różnią się ładunkiem w pH odpowiadającym wartościom fizjologicznym. Punkt izoelektryczny ( $pI$ ) albuminy (4.7) jest niższy niż fibrynogenu ( $pI = 5,8$ ). Dane te sugerują, że różnice w ładunku białka mogą przyczynić się do różnicy w wiązaniu białka z powierzchnią koloidalnego metalu



w tym sensie, że bardziej anionowa albumina mniej skutecznie wiąże funkcjonalizowaną, anionową powierzchnię nanocząstek niż fibrynogen [111].

Powyższe dane potwierdzają jak ważny jest przy badaniu oddziaływań NPs-białko wybór odpowiedniego sposobu syntezy nanocząstek i ich stabilizacji.

Aby pokazać różnicę w opłaszczaniu nanocząstek stabilizowanych cytrynianem białkami przygotowano prosty model uwzględniający 4 białka: albuminę, lizozym, FLC kappa i FLC lambda (Ryc. 33). Białka te różnią się znacznie budową i punktem izoelektrycznym. Albumina ma masę cząsteczkową 66.5 kD i pI około 4.7, lizozym 14.4 kD, i pI około 11.35, monomery FLC m.cz. 22 kD, pI w zakresie 3-9. Do AgNPs dodano takie ilości roztworów białek, aby uzyskać stosunek molowy cząsteczek białka do ilości nanocząstek równy 25:1. Próbkę inkubowano w temperaturze 37°C i przez 90 minut badano dynamikę zmian absorbancji przy długości fali 395 nm.



Ryc. 33. Zmiana barwy (a) i dynamika zmian widmowych (b) zachodzących po opłaszczaniu AgNPs różnymi białkami.

Analizując otrzymane wyniki widać, że najszybciej zmiany widmowe zachodzą w przypadku opłaszczenia nanocząstek srebra lizozymem. Lizozym jest białkiem o wysokim punkcie izoelektrycznym (około 11). Biorąc pod uwagę, że wykorzystywane w badaniu AgNPs były stabilizowane cytrynianem, który nadaje im ładunek ujemny, doszło do silnych oddziaływań elektrostatycznych, co może odpowiadać za tak szybki przebieg reakcji.

Kolejna szybka reakcja zaszła w przypadku opłaszczenia nanocząstek srebra FLC kappa. Dodatkowo, w porównaniu do pozostałych białek zmiany widmowe po 90 minutach były tu największe. W przypadku pozostałych badanych białek - albuminy oraz FLC lambda zmiany widna powierzchniowego rezonansu plazmonowego były słabsze. Wiąże się to ze stosunkowo

niskim punktem izoelektrycznym albuminy. W przypadku FLC ich pI zależy od klonu i może się zmieniać w szerokim zakresie (3-9).

Analizując wyniki pracy okazało się, że efekty opłaszczenia wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin na stabilizowanych cytrynianem nanocząsteczkach srebra były różne.

Zależały one od klonu wolnych łańcuchów lekkich i ilości użytych FLC. Niektóre klony wywoływały agregację nanocząstek, a w przypadku innych układ robił się hiperstabilny. W wyniku opłaszczenia nanocząstek srebra wolnymi łańcuchami lekkimi w stosunku molowym 5:1 (FLC:AgNPs) dochodziło do zmiany LSPR i barwy roztworu (z żółtej na czerwoną). Przy wyższych stosunkach FLC do AgNPs (15:1, 25:1, 50:1) w przypadku części klonów dochodziło do wytworzenia stabilnej korony białkowej wokół nanocząstek, pozostałe natomiast oddziaływały ze sobą wywołując agregację nanostruktur. Niezmiernie ważny okazał się element właściwych proporcji białko – nanocząstki.

Podobnie jak w modelu referencyjnym (antygen-przeciwciało) agregacji opłaszczonych na nanocząstkach srebra monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich towarzyszyły zmiany widma LSPR. Proces agregacji potwierdzono również metodą TEM oraz poprzez analizę wzorców rozpraszania światła laserowego.

Aby dodatkowo potwierdzić przydatność przedstawionego systemu nanocząstkowego do selekcji klonów wolnych łańcuchów lekkich mających tendencję do agregacji sprawdzono efekt oddziaływania nanocząstek srebra z „pseudopoliklonalną” mieszaniną FLC utworzoną z klonów FLC wywołujących agregację. Okazało się, że w wyniku oddziaływań międzybiałkowych w takiej mieszaninie nie dochodziło do agregacji AgNPs.

Podsumowując – okazało się, że technologia nanocząstkowa jest pomocna w identyfikacji klonów wolnych łańcuchów lekkich mających tendencję do agregacji i – być może – tworzenia amyloidu.

Wyniki pracy pokazują, że wolne łańcuchy lekkie immunoglobulin to bardzo heterogenna grupa białek. Różne klony różnych łańcuchów lekkich zachowują się w inny sposób. Zależy to prawdopodobnie od struktury samych łańcuchów i być może koreluje z tendencją do tworzenia depozytów. Nie jest wykluczone, że adsorpcja FLC na nanocząstkach srebra towarzyszą zmiany konformacyjne stymulujące powstawanie lub odsłaniające strukturę  $\beta$ -kartki. Działają więc jako katalizator w pierwszym najwolniejszym etapie tworzenia amyloidu [151].

Zmiany struktury i funkcji białek zachodzące w wyniku ich opłaszczenia na nanocząstkach wielokrotnie opisano w piśmiennictwie.

W pracy D. Ban, S. Paul wykazano, że w wyniku interakcji AgNPs stabilizowanych skrobią z alfa-laktoalbuminą bydłą (BLA, 14.2 kD) doszło do zmiany struktury

drugorzędowej białka i utraty jego aktywności biologicznej [152]. BLA w takim koniugacie (AgNPs-BLA) zawierało mniejszą ilość odsłoniętych niepolarnych reszt na powierzchni, a zatem hydrofobowość powierzchni białka została zmniejszona. Cząsteczki BLA stały się odporne na działanie proteiny K. Obserwacja ta dowodzi, że wprowadzenie NPs do układu biologicznego może spowodować, że białko stanie się wysoce odporne na proteinę K, co może uniemożliwić jego normalny proces degradacji a przez to doprowadzić do akumulacji niefunkcyjnych białek w komórkach.

Dodatkowo opłaszczenie AgNPs BLA spowodowało utratę właściwości bakteriobójczych nanocząstek srebra. Aby zminimalizować zaobserwowane zmiany zmieniono sposób stabilizacji nanocząstek (ze skrobi na PEG). Wykorzystanie AgNPs opłaszczonych PEG zmniejszyło adsorbcję albuminy na powierzchni nanocząstek a także pozwoliło na utrzymanie potencjału bakteriobójczego AgNPs. Doświadczenie przeprowadzono również z wykorzystaniem większego białka - albuminy bydlęcej (BSA, 66.4 kD) oraz z osoczem ludzkim. Wyniki jednoznacznie pokazały, że stabilizacja AgNPs za pomocą PEG skutecznie zmniejsza oddziaływanie nanocząstek z białkami (w porównaniu ze skrobią) [152].

Z kolei Vertegel et al. badali zmiany struktury i aktywności lizozymu po opłaszczeniu nim nanocząstek krzemu [39]. W zależności od rozmiarów nanocząstek efektem oddziaływań lizozym-SiNPs było zmniejszenie liczby alfa-helis w strukturze białka. Aktywność enzymu opłaszczonego na nanocząstkach była niższa niż wolnego białka – proporcjonalnie do utraconych alfa helis.

Podobne zmiany w strukturze białka – zmniejszenie ilości alfa helis i zwiększenie ilości beta kartek zaobserwowali Li Shang et al. badając oddziaływanie albuminy z nanocząstkami złota [38]. Intensywność zmian zależała od pH środowiska, w wyższym pH zmiany były bardziej nasilone.

Powyższe przykłady obrazują złożoność interakcji nanocząstka – białko uwzględniając różnorodność struktury białek. W zależności od budowy białka, rozmiaru, stężenia, sposobu stabilizacji nanocząstek efekty oddziaływań NPs-białka są inne.

Niektóre nieprawidłowo pofałdowane białka mają tendencję do tworzenia fibryli lub amorficznych agregatów. Wykazano, że to właśnie nanocząstki mogą być induktorem zmian konformacyjnych prowadzących do powstania fibryli [151,153]. Nie można więc wykluczyć, że zmiany konformacyjne związane z adsorpcją FLC na powierzchni nanocząstek srebra przyspieszają proces agregacji i tworzenie amyloidu.

Hipotezę te potwierdzają prace Zhang et al. którzy wykazali, że nanocząstki złota mogą indukować zmiany konformacyjne i agregację lizozymu w fizjologicznym pH [40]. Zmiany

struktury wiązały się m.in z rozrywaniem wiązań disiarczkowych, zmniejszeniem ilości alfa helis i zwiększenie ilości beta kartek w obrębie cząsteczki lizozymu. Okazało się też, że opłaszczenie nanoczątek złota tiolowanym glikolem polietylenowym (PEG) w odpowiednim stężeniu powodowało zahamowanie procesu agregacji białka. Potwierdza to jak istotny dla procesu funkcjonalizacji i oddziaływań z białkami jest sposób stabilizacji nanocząstek [152].

Innym peptydem wykorzystywanym w badaniach nad tworzeniem amyloidu jest insulina. Tworzenie amyloidopodobnych struktur stwierdza się u części pacjentów z cukrzycą II. W swojej pracy Sukhanova et al. pokazali, że kropki kwantowe CdSe/ZnS o określonym rozmiarze (12 nm) stabilizowane PEG-OH (o ładunku ujemnym, potencjał zeta  $-6$  mV) indukowały zmiany struktury drugorzędowej insuliny i, w konsekwencji, tworzenie włókien amyloidowych [144].

Z kolei Linse i in. wykazali, że istnieją nanozwiązki (kopolimery, nanorurki węglowe, kropki kwantowe) zdolne do indukowania tworzenia włókien fibrylarnych z  $\beta 2$ -mikroglobuliny adsorbowanej w dużych ilościach na powierzchni nanocząstek [154].

Wśród czynników, które mogą indukować proces agregacji białek wymienić należy rozmiar nanocząstek, ich ładunek powierzchniowy, sposób stabilizacji. Nanocząsteczki dzięki swej dużej powierzchni reaktywnej i odpowiedniemu ładunkowi powierzchniowemu sprzyjają adhezji białek zapewniając lokalne wysokie stężenie białek, co jest konieczne do procesu agregacji [151].

Tworzenie patologicznych włókien fibrylarnych z białek jest związane z wieloma chorobami, m.in. amyloidozą AL, chorobą Parkinsona i chorobą Alzheimera. Fakt, że nanocząstki mogą działać jako platformy inicjujące takie zmiany strukturalne, wymaga dalszych badań tego zjawiska.

Większość prac dotyczących oddziaływań nanocząstka - białko przeprowadzana jest na białkach komercyjnie dostępnych, tanich – lizozym, albumina, fibrynogen.

Wykorzystanie AgNPs do śledzenia oddziaływań międzybiałkowych mimo, że teoretycznie model jest prosty, okazuje się być bardzo złożonym procesem. Aby osiągnąć zamierzony cel należy uwzględnić cały szereg różnych czynników. Różne białka w zależności od cech całego układu różnie się wiążą do nanocząstek, a modele opracowane np. na albuminie nie mają bezpośredniego odniesienia modeli wykorzystujących inne białka. Badania oddziaływań łańcuchów lekkich immunoglobulin są szczególnie skomplikowane ze względu na klonalny charakter tych cząstek. W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach wykorzystano unikalne, niedostępne komercyjnie klony FLC. Nie wiemy czy pacjenci od których pozyskano użyte w niniejszej pracy wolne łańcuchy lekkie mieli objawy amyloidozy.

Trzeba jednak pamiętać, że amyloidoza to rzadka choroba. Wiadomo także, że wykrywana jest bardzo późno i tylko u niektórych pacjentów u których objawy kliniczne są bardzo wyraźne.

Wykazano, że u pacjentów u których klinicznie rozpoznaje się amyloidozę wykrywa się gammopatie monoklonalną i obecność wolnych łańcuchów lekkich na wiele lat przed tym, gdy złogi amyloidowe doprowadzą do uszkodzenia serca lub nerek [97]. W początkowym etapie pacjenci z MGUS nie są leczeni. Pomimo prób, nieznana jest obecnie technika pozwalająca na identyfikację amyloidogennych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. Opracowanie takiej metody pozwoliłoby na wczesne wyselekcjonowanie pacjentów podwyższonego ryzyka i wdrożenie skutecznego leczenia. W miarę wprowadzania nowych leków przeżywalność pacjentów z amyloidozą znacznie wzrosła. Poprawa nie dotyczy jednak pierwszych miesięcy od rozpoznania choroby, gdyż zbyt późna diagnoza jest przyczyną śmierci dużej grupy pacjentów ze zmianami kardiologicznymi.

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki badań dotyczące zastosowania nanocząstek srebra do badania procesu agregacji wolnych monoklonalnych łańcuchów lekkich należy uznać za obiecujące. Nanocząstki srebra mogą być narzędziem służącym do badania oddziaływań białkowych z wykorzystaniem wielu technik pomiarowych.

Wykazano, że różne klony łańcuchów lekkich immunoglobulin zachowują się odmiennie. Agregację opłaszczonych na nanocząstkach srebra monoklonalnych łańcuchów lekkich udało się wykazać w 2/9 przypadków dla łańcuchów typu lambda i 2/10 przypadków typu kappa. Z podobną częstością wykrywana jest amyloidoza u pacjentów z chorobą łańcuchów lekkich.

Proces agregacji dotyczy tylko monoklonalnych łańcuchów lekkich i zostaje zahamowany gdy nie zostaje spełniony warunek homogenności. Jest to spójne z naszą wiedzą dotyczącą mechanizmu wzrostu włókien amyloidu, który wymaga obecności homogennych komplementarnych struktur białkowych. Jest możliwe, że po związaniu z nanocząstkami srebra wolne łańcuchy lekkie ulegają zmianom konformacyjnym faworyzującym strukturę beta kartki (zjawisko takie opisano dla innych białek). Nanocząstki srebra są więc potencjalnie katalizatorem pierwszego najwolniejszego etapu tworzenia amyloidu.

Otrzymane wyniki mogą być podstawą dalszych badań obejmujących materiał biologiczny pochodzący od chorych ze zdiagnozowaną AL amyloidozą lub inną chorobą depozytów łańcuchów lekkich. Należy także wyjaśnić czy nanocząstki srebra przyspieszają powolny proces tworzenia amyloidu *in vitro*.

## 6. Wnioski

1. Metody syntezy nanocząstek i materiał, z którego są wytworzone wpływają na ich właściwości fizykochemiczne i sposób oddziaływania z białkami. Podczas tworzenia układów badania agregacji białek należy uwzględnić wiele elementów związanych z własnościami fizycznymi i chemicznymi nanocząstek i ligandów białkowych.
2. Agregacja nanocząstek srebra i towarzyszące jej zmiany optyczne następuje w wąskim skorelowanym ze stężeniem nanocząstek zakresie stężeń. Nadmiar ligandów białkowych prowadzi do powstania korony stabilizującej i zapobiega agregacji nanocząstek.
3. Efektem modelowej reakcji immunologicznej między nanocząstkami srebra opłaszczonymi przeciwciałami anty-lambda a komplementarnym antygenem – wolnymi łańcuchami lekkimi immunoglobulin były zmiany absorbancji w obszarze maksimum powierzchniowego rezonansu plazmonowego zależne od stężenia FLC. W pewnym zakresie stężeń FLC (4-15 mg/l) zmianom absorbancji towarzyszyła agregacja nanostruktur.
4. Zastosowane standardowe metody śledzenia reakcji agregacji funkcjonalizowanych przeciwciałami nanocząstek: spektrofotometria UV/Vis, obrazowanie TEM, dynamiczne rozpraszanie światła, dają całościowo spójne wyniki. Jednak każda z tych metod ma pewne ograniczenia wynikające m.in ze sposobu przygotowania próbki do badania czy też samej metodologii badania. Opracowana w niniejszej pracy autorska metoda z bezpośrednim rozpraszaniem światła laserowego przyniosła zadowalające wyniki. Różne wzorce rozpraszania pokrywają się z wynikami uzyskanymi innymi metodami.
5. Technologia badania agregacji opłaszczonych białkami nanocząstek wykazała różnicowanie we własnościach agregacyjnych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. Być może jest to związane z podatnością niektórych klonów FLC na tworzenie złogów amyloidowych.

6. Technologia z wykorzystaniem nanocząstek srebra, przy wyborze odpowiednich technik obrazowania, może być przydatną, oferującą nowe możliwości metodą śledzenia reakcji związanych z agregacją białek np. w badaniu amyloidozy i innych chorób związanych z tworzeniem depozytów białkowych.

## 7. Streszczenie

Nanocząstki metali szlachetnych ze względu na swoje wyjątkowe właściwości optyczne, chemiczne i fototermiczne są coraz powszechniej wykorzystywane w medycynie. W oparciu o nanotechnologię rozwija się diagnostyka laboratoryjna, diagnostyka obrazowa, doskonałe są metody terapeutyczne.

Nanocząstki w specyficzny, zależny od ich budowy i cech fizykochemicznych sposób oddziałują z biomolekułami, a szczególnie białkami. Stwarza to możliwość wykorzystania nanocząstek do badania oddziaływań między białkami. Oddziaływania te są niezwykle istotne m.in. w przypadku rozwoju ciężkich chorób związanych z tworzeniem i odkładaniem się w tkankach depozytów białkowych (amyloidozy). Niektóre nieprawidłowo pofałdowane białka (np. wolne monoklonalne łańcuchy lekkie immunoglobulin - FLC) mają tendencję do tworzenia fibryli lub amorficznych agregatów. Obecnie nie jest znana technika pozwalająca na identyfikację amyloidogennych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. Opracowanie takiej metody pozwoliłoby na wczesne wyselekcjonowanie pacjentów podwyższonego ryzyka i wdrożenie skutecznego leczenia.

Celem pracy była próba zastosowania nanocząstek srebra (AgNPs) do badania oddziaływań międzybiałkowych. W pierwszym etapie opracowano parametry układu w oparciu o model antygen (FLC) – przeciwciała. W drugim etapie, zweryfikowaną metodykę próbowano wykorzystać do badania procesu spontanicznej agregacji wolnych monoklonalnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. Oceniono też użyteczność różnych technik badawczych do śledzenia procesu agregacji opłaszczonych białkami nanocząstek.

Materiałem wykorzystanym w pracy były komercyjnie dostępne przeciwciała, oczyszczone monoklonalne łańcuchy lekkie immunoglobulin pochodzące od pacjentów ze zdiagnozowaną gammapatią monoklonalną lub białkomoczem Bence-Jonesa oraz mocze od pacjentów z białkomoczem Bence-Jonesa. Do oceny procesu agregacji opłaszczonych białkami nanocząstek użyto: spektrofotometrię UV/Vis, obrazowanie metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) oraz autorską metodę rozpraszania światła laserowego.

W wyniku syntezy zmodyfikowaną metodą Creightona otrzymano nanocząstki srebra stabilizowane cytrynianem podatne na funkcjonalizację zarówno przeciwciałami jak i wolnymi łańcuchami lekkimi immunoglobulin. W określonym zakresie stężeń opłaszczone przeciwciałami nanocząstki srebra w obecności komplementarnego antygeny ulegały agregacji. Procesowi temu towarzyszyły zmiany widma powierzchniowego rezonansu plazmonowego



LSPR. Proces agregacji nanostruktur potwierdzono metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej, dynamicznego rozpraszania światła laserowego oraz autorską metodą bezpośredniej obserwacji światła laserowego.

Zastosowane w pracy metody śledzenia reakcji agregacji funkcjonalizowanych przeciwciałami nanocząstek: spektrofotometria UV/Vis, obrazowanie TEM, DLS oraz autorska metoda analizy wzorców rozpraszanie światła laserowego dały całościowo spójne wyniki. Jednak każda z tych metod ma pewne ograniczenia wynikające m.in. ze sposobu przygotowania próbki do badania czy też samej metodologii badania. Opracowana w niniejszej pracy autorska metoda z bezpośrednią analizą rozpraszaniem światła laserowego przyniosła dobre wyniki. Różne wzorce rozpraszania pokrywały się z wynikami uzyskanymi innymi metodami.

W drugim etapie pracy badano oddziaływanie różnych klonów monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin opłaszczonych na nanocząstkach srebra. Wykazano, że różne klony łańcuchów lekkich immunoglobulin zachowują się odmiennie. Niektóre klony samoistnie wywoływały agregację nanocząstek, a w przypadku innych układ robił się hiperstabilny. Wynika to prawdopodobnie ze struktury samych łańcuchów i być może koreluje z tendencją do tworzenia depozytów. Nie jest wykluczone, że adsorpcji FLC na nanocząstkach srebra towarzyszyły zmiany konformacyjne stymulujące powstawanie lub odsłaniające strukturę  $\beta$ -kartyki, a tym samym inicjujące agregację białek.

Podsumowując, nanocząstki srebra są użytecznym narzędziem do badania oddziaływań międzybiałkowych. Otrzymane w pracy wyniki mogą być podstawą dalszych badań obejmujących materiał biologiczny pochodzący od chorych ze zdiagnozowaną AL amyloidozą lub innymi chorobami, w których dochodzi do tworzenia depozytów białkowych.

## 8. Abstract

Noble metal nanoparticles, due to their unique optical, chemical and photothermal properties, are increasingly used in medicine. Based on nanotechnology diagnostics, biomedical imaging, therapeutic and drug delivery methods are improved.

Nanoparticles interact with different biomolecules, especially proteins, in a specific way, depending on the structure and physicochemical characteristics both nanoparticles and proteins. This provides the ability to use nanoparticles to study the interactions between proteins. These interactions are extremely important, among others in the case of the development of severe diseases associated with the formation and deposition of protein deposits in the tissues (amyloidosis). Some misfolded proteins, e.g. free immunoglobulin monoclonal light chains (FLC) tend to form fibrils or amorphous aggregates. There is currently no technique allowing for the identification of amyloidogenic immunoglobulin light chains. The development of such a method would allow for early selection of patients at high risk of developing amyloidosis. Early and accurate diagnosis is essential for effective treatment and prognosis for patients.

The aim of the study was to evaluate usefulness of silver nanoparticles (AgNPs) to study interactions between proteins. In the first phase of this work basic parameters of the system and investigating methods were validated based on the antigen (FLC) - antibody model. In the second stage the verified methodology was used to study the process of spontaneous aggregation of the free immunoglobulin monoclonal light chains. The utility of various research techniques for monitoring the aggregation process of protein-coated nanoparticles was also assessed.

The material used in the study were commercially available antibodies, purified immunoglobulin monoclonal light chains from patients diagnosed with monoclonal gammopathy or Bence-Jones proteinuria, and urines from patients with Bence-Jones proteinuria.

To evaluate the aggregation process of nanoparticles coated with proteins UV/Vis spectroscopy, transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS) and the original laser light scattering method developed for the purpose of this research were used.

AgNPs stabilized with citrate were prepared according to the method reported by Creighton (with a slight modification). These nanoparticles were susceptible to functionalization with both antibodies and immunoglobulin free light chains. Within the specified concentration range, the antibody-coated silver nanoparticles aggregated in the presence of the complementary antigen. This process was accompanied by changes in the

localised surface plasmon resonance (LSPR) spectrum. The process of aggregation of nanostructures was confirmed by transmission electron microscopy, dynamic light scattering and the proprietary method of direct observation of laser light scattering.

The methods of the investigation the aggregation process of nanoparticles functionalized with antibodies used in the work: UV/Vis spectroscopy, TEM, DLS and the method of analysing patterns of laser light scattering gave overall consistent results. However, each of these methods has some limitations resulting from the sample preparation or the research methodology itself. The author's method with direct analysis of laser light scattering gave good results. Different scattering patterns correlated with results obtained by other methods. The analysis of laser light scattering can be a cheap, relatively simple research method for a real time studying of protein interactions.

In the second stage of the work, the interactions of various monoclonal clones of immunoglobulin free light chains coated on silver nanoparticles were investigated. It has been shown that different immunoglobulin light chain clones behaved differently. Some clones spontaneously triggered the aggregation of the nanoparticles, while in the presence of others the nanoparticle solution became hyperstable. This is probably due to the structure of the chains themselves, unique protein - AgNPs interactions and perhaps correlates with the tendency of some FLC clones to form deposits. It is also possible that nanoparticles induced changes in the structure of the adsorbed proteins (FLC). These conformational changes may lead to the formation or revealing the structure of the  $\beta$ -sheet and thus initiate protein aggregation.

In conclusion, silver nanoparticles turned out to be the efficient tool for studying of protein interactions. The results obtained in this work can be the basis for further research on biological material from patients diagnosed with AL amyloidosis or other diseases associated with the formation of protein deposits.

## 9. Piśmiennictwo

- [1] Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej, ZALECENIE KOMISJI z Dnia 18 Października 2011 r. Dotyczące Definicji Nanomateriału (2011/696/UE).
- [2] Bensebaa, F. Nanoparticle Fundamentals in Nanoparticle Technologies: From Lab to Market (Interface Science and Technology), Elsevier **2013**, *19*, 1-84.
- [3] Austin, L. A.; MacKey, M. A.; Dreaden, E. C.; El-Sayed, M. A. The Optical, Photothermal, and Facile Surface Chemical Properties of Gold and Silver Nanoparticles in Biodiagnostics, Therapy, and Drug Delivery. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88* (7), 1391–1417.
- [4] Varner, K. E.; El-Badawy, A.; Feldhake, D.; Venkatapathy, R. State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver an More. U. S. EPA, Washington, DC **2010**, 1-221.
- [5] Mazur, P.; Skiba-Kurek, I.; Mrowiec, P.; Karczewska, E.; Drożdż, R. Synergistic Ros-Associated Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles and Gentamicin against Staphylococcus Epidermidis. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 3551–3562.
- [6] Xu, X.; Ying, Y.; Li, Y. One-Step and Label-Free Detection of Alpha-Fetoprotein Based on Aggregation of Gold Nanorods. *Sensors Actuators, B Chem.* **2012**, *175*, 194–200.
- [7] Chen, Z.; Lei, Y.; Chen, X. Immunoassay for Serum Alpha-Fetoprotein Using Silver Nanoparticles and Detection via Resonance Light Scattering. *Microchim. Acta* **2012**, *179* (3–4), 241–248.
- [8] Mark, D.; Haeberle, S.; Roth, G.; Von Stetten, F.; Zengerle, R. Microfluidic Lab-on-a-Chip Platforms: Requirements, Characteristics and Applications. *NATO Sci. Peace Secur. Ser. A Chem. Biol.* **2010**, *3*, 305–376.
- [9] Le, T. T.; Adamiak, B.; Benton, D. J.; Johnson, C. J.; Sharma, S.; Fenton, R.; McCauley, J. W.; Iqbal, M.; Cass, A. E. G. Aptamer-Based Biosensors for the Rapid Visual Detection of Flu Viruses. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (98), 15533–15536.
- [10] Huang, C.; Wen, T.; Shi, F. J.; Zeng, X. Y.; Jiao, Y. J. Rapid Detection of IgM Antibodies against the SARS-CoV-2 Virus via Colloidal Gold Nanoparticle-Based Lateral-Flow Assay. *ACS Omega* **2020**, *5* (21), 12550–12556.
- [11] Wang, X.; Li, Y.; Wang, H.; Fu, Q.; Peng, J.; Wang, Y.; Du, J.; Zhou, Y.; Zhan, L. Gold Nanorod-Based Localized Surface Plasmon Resonance Biosensor for Sensitive Detection of Hepatitis B Virus in Buffer, Blood Serum and Plasma. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26* (2), 404–410.

- [12] Martins, J. P.; das Neves, J.; de la Fuente, M.; Celia, C.; Florindo, H.; Günday-Türeli, N.; Popat, A.; Santos, J. L.; Sousa, F.; Schmid, R.; Wolfram, J.; Sarmiento, B.; Santos, H. A. The Solid Progress of Nanomedicine. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2020**, *10* (3), 726–729.
- [13] Farahavar, G.; Abolmaali, S. S.; Gholijani, N.; Nejatollahi, F. Antibody-Guided Nanomedicines as Novel Breakthrough Therapeutic, Diagnostic and Theranostic Tools. *Biomaterials Science*. Royal Society of Chemistry 2019, *7* (10), 4000–4016.
- [14] Kopp, M.; Kollenda, S.; Epple, M. Nanoparticle-Protein Interactions: Therapeutic Approaches and Supramolecular Chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50* (6), 1383–1390.
- [15] Petryayeva, E.; Krull, U. J. Localized Surface Plasmon Resonance: Nanostructures, Bioassays and Biosensing-A Review. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *706* (1), 8–24.
- [16] Tauran, Y.; Brioude, A.; Coleman, A. W.; Rhimi, M.; Kim, B. Molecular Recognition by Gold, Silver and Copper Nanoparticles. *World J. Biol. Chem.* **2013**, *4* (3), 35.
- [17] Sepúlveda, B.; Angelomé, P. C.; Lechuga, L. M.; Liz-Marzán, L. M. LSPR-Based Nanobiosensors. *Nano Today* **2009**, *4* (3), 244–251.
- [18] Zhang, X. F.; Liu, Z. G.; Shen, W.; Gurunathan, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences* **2016**, *17* (9), 1534-1568.
- [19] Ashaduzzaman, M.; Deshpande, S. R.; Murugan, N. A.; Mishra, Y. K.; Turner, A. P. F.; Tiwari, A. On/off-Switchable LSPR Nano-Immunoassay for Troponin-T. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–10.
- [20] Mauriz, E. Recent Progress in Plasmonic Biosensing Schemes for Virus Detection. *Sensors (Switzerland)* **2020**, *20* (17), 1–27.
- [21] Lizoń, A.; Drożdż, R. Nanocząsteczki Metali w Zastosowaniach Diagnostycznych i Terapeutycznych. *Przegl. Lek.* **2018**, *75* (9), 457–463.
- [22] Kim E. Sapsford, W. Russ Algar, L. B. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries That Facilitate Nanotechnology. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (3), 1904–2074.
- [23] Page Faulk, W.; Malcolm Taylor, G. Communication to the Editors. An Immunocolloid Method for the Electron Microscope. *Immunochemistry* **1971**, *8* (11), 1081–1083.
- [24] Arruebo, M.; Valladares, M.; González-Fernández, Á. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications. *J. Nanomater.* **2009**, Article ID 439389.

- [25] Lai, W.; Wang, Q.; Li, L.; Hu, Z.; Chen, J.; Fang, Q. Interaction of Gold and Silver Nanoparticles with Human Plasma: Analysis of Protein Corona Reveals Specific Binding Patterns. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2017**, *152*, 317–325.
- [26] Miclăuş, T.; Bochenkov, V. E.; Ogaki, R.; Howard, K. A.; Sutherland, D. S. Spatial Mapping and Quantification of Soft and Hard Protein Coronas at Silver Nanocubes. *Nano Lett.* **2014**, *14* (4), 2086–2093.
- [27] Erickson, H. P. Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biological Procedures Online.* **2009**, *11* (1), 32–51.
- [28] Matea, C. T.; Mocan, T.; Zaharie, F.; Iancu, C.; Mocan, L. A Novel Immunoglobulin G Monolayer Silver Bio-Nanocomposite. *Chem. Cent. J.* **2015**, *9* (1), 1–7.
- [29] Ahsan, S. M.; Rao, C. M.; Ahmad, M. F. Nanoparticle-Protein Interaction: The Significance and Role of Protein Corona. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2018**, *1048*, 175–198.
- [30] Gessner, A.; Lieske, A.; Paulke, B. R.; Müller, R. H. Functional Groups on Polystyrene Model Nanoparticles: Influence on Protein Adsorption. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2003**, *65* (3), 319–326.
- [31] Maffre, P.; Nienhaus, K.; Amin, F.; Parak, W. J.; Nienhaus, G. U. Characterization of Protein Adsorption onto Fept Nanoparticles Using Dual-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2011**, *2* (1), 374–383.
- [32] Gessner, A.; Lieske, A.; Paulke, B. R.; Müller, R. H. Influence of Surface Charge Density on Protein Adsorption on Polymeric Nanoparticles: Analysis by Two-Dimensional Electrophoresis. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2002**, *54* (2), 165–170.
- [33] Monopoli, M. P.; Walczyk, D.; Campbell, A.; Elia, G.; Lynch, I.; Baldelli Bombelli, F.; Dawson, K. A. Physical-Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to in Vitro and in Vivo Biological Impacts of Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (8), 2525–2534.
- [34] Lesniak, A.; Campbell, A.; Monopoli, M. P.; Lynch, I.; Salvati, A.; Dawson, K. A. Serum Heat Inactivation Affects Protein Corona Composition and Nanoparticle Uptake. *Biomaterials* **2010**, *31* (36), 9511–9518.
- [35] Ghavami, M.; Saffar, S.; Abd Emamy, B.; Peirovi, A.; Shokrgozar, M. A.; Serpooshan, V.; Mahmoudi, M. Plasma Concentration Gradient Influences the Protein Corona Decoration on Nanoparticles. *RSC Adv.* **2013**, *3* (4), 1119–1126.

- [36] Barbero, F.; Russo, L.; Vitali, M.; Piella, J.; Salvo, I.; Borrajo, M. L.; Busquets-Fité, M.; Grandori, R.; Bastús, N. G.; Casals, E.; Puntès, V. Formation of the Protein Corona: The Interface between Nanoparticles and the Immune System. *Semin. Immunol.* **2017**, *34* (7), 52–60.
- [37] Park, S. J. Protein–Nanoparticle Interaction: Corona Formation and Conformational Changes in Proteins on Nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 5783–5802.
- [38] Shang, L.; Wang, Y.; Jiang, J.; Dong, S. PH-Dependent Protein Conformational Changes in Albumin:Gold Nanoparticle Bioconjugates: A Spectroscopic Study. *Langmuir* **2007**, *23* (5), 2714–2721.
- [39] Vertegel, A. A.; Siegel, R. W.; Dordick, J. S. Silica Nanoparticle Size Influences the Structure and Enzymatic Activity of Adsorbed Lysozyme. *Langmuir* **2004**, *20* (16), 6800–6807.
- [40] Zhang, D.; Neumann, O.; Wang, H.; Yuwono, V. M.; Barhoumi, A.; Perham, M.; Hartgerink, J. D.; Wittung-Stafshede, P.; Halas, N. J. Gold Nanoparticles Can Induce the Formation of Protein-Based Aggregates at Physiological PH. *Nano Lett.* **2009**, *9* (2), 666–671.
- [41] Zaman, M.; Ahmad, E.; Qadeer, A.; Rabbani, G.; Khan, R. H. Nanoparticles in Relation to Peptide and Protein Aggregation. *Int. J. Nanomedicine* **2014**, *9* (1), 899–912.
- [42] Jamkhande, P. G.; Ghule, N. W.; Bamer, A. H.; Kalaskar, M. G. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *53*, Article 101174.
- [43] Lee, S. H.; Jun, B. H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (4).
- [44] Evanoff, D. D.; Chumanov, G. Synthesis and Optical Properties of Silver Nanoparticles and Arrays. *ChemPhysChem* **2005**, *6* (7), 1221–1231.
- [45] Turkevich, J.; Stevenson, P.; Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55-75.
- [46] Lee, P.; Meisel, D. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols. *The Journal of Physical Chemistry* **1982**, *86* (17), 3391-3395.
- [47] Creighton, J. A.; Blatchford, C. G.; Albrecht, M. G. Plasma Resonance Enhancement of Raman Scattering by Pyridine Adsorbed on Silver or Gold Sol Particles of Size Comparable to the Excitation Wavelength. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.* **1979**, *75*, 790–798.

- [48] Abou El-Nour, K. M. M.; Eftaiha, A.; Al-Warthan, A.; Ammar, R. A. A. Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arab. J. Chem.* **2010**, *3* (3) 135-140.
- [49] Malina, D.; Sobczyk-Kupiec, A.; Kowalski, Z. Nanocząstki Srebra - Przegląd Chemicznych Metod Syntezy. *Czas. Tech. Chem.* **2010**, *107* (10), 183–192.
- [50] Schütz, C. A.; Juillerat-Jeanneret, L.; Mueller, H.; Lynch, I.; Riediker, M. Therapeutic Nanoparticles in Clinics and under Clinical Evaluation. *Nanomedicine* **2013**, *8* (3), 449–467.
- [51] Howes, P. D.; Chandrawati, R.; Stevens, M. M. Bionanotechnology. Colloidal Nanoparticles as Advanced Biological Sensors. *Science* **2014**, *346* (6205), 53-63.
- [52] Wang, M.; Abbineni, G.; Clevenger, A.; Mao, C.; Xu, S. Upconversion Nanoparticles: Synthesis, Surface Modification and Biological Applications. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2011**, *7* (6), 710–729.
- [53] Paramelle, D.; Sadovoy, A.; Gorelik, S.; Free, P.; Hobley, J.; Fernig, D. G. A Rapid Method to Estimate the Concentration of Citrate Capped Silver Nanoparticles from UV-Visible Light Spectra. *Analyst* **2014**, *139* (19), 4855–4861.
- [54] Liao, H.; Hafner, J. H. Gold Nanorod Bioconjugates Supplementary Information. *Chem. Mater.* **2005**, *17* (18), 4636-4641.
- [55] [www.bachem.com/Technical\\_Notes](http://www.bachem.com/Technical_Notes), Chromophores/Fluorophores: Spectral Properties and Characteristics.
- [56] Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G.; Gray, T. How To Measure and Predict the Molar Absorption-Coefficient of a Protein. *Protein Sci.* **1995**, *4* (11), 2411–2423.
- [57] Gold, L.; Janjic, N.; Jarvis, T.; Schneider, D.; Walker, J. J.; Wilcox, S. K.; Zichi, D. Aptamers and the RNA World, Past and Present. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2012**, *4* (3), 1–11.
- [58] Lefferts, J. A.; Jannetto, P.; Tsongalis, G. J. Evaluation of the Nanosphere Verigene® System and the Verigene® F5/F2/MTHFR Nucleic Acid Tests. *Exp. Mol. Pathol.* **2009**, *87* (2), 105–108.
- [59] Richmond, T. D. The Current Status and Future Potential of Personalized Diagnostics: Streamlining a Customized Process. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2008**, *14* (416), 411–422.
- [60] Haes, Amanda, J.; Chang, L.; Klein, William, L.; Duyne, Richard, P. Detection of a Biomarker for Alzheimer ' s Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2005**, *11*, 2264–2271.
- [61] Shyu, R. H.; Shyu, H. F.; Liu, H. W.; Tang, S. S. Colloidal Gold-Based Immunochromatographic Assay for Detection of Ricin. *Toxicon* **2002**, *40* (3), 255–258.



- [62] Park, C. H.; Kim, H. J.; Hixon, D. L.; Bubert, A. Evaluation of the Duopath Verotoxin Test for Detection of Shiga Toxins in Cultures of Human Stools. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41* (6), 2650–2653.
- [63] Diaz-Vazquez, C.; Torregrosa-Bertet, M. J.; Carvajal-Urueña, I.; Cano-Garcinuño, A.; Fos-Escrivà, E.; García-Gallego, A.; López-Cacho, F.; Monzón-Fueyo, M. C.; Pérez-Porcuna, X. M.; Ridaio-Redondo, M. L. Accuracy of ImmunoCAP® Rapid in the Diagnosis of Allergic Sensitization in Children between 1 and 14 Years with Recurrent Wheezing: The IReNE Study. *Pediatr. Allergy Immunol.* **2009**, *20* (6), 601–609.
- [64] Wangoo, N.; Kaushal, J.; Bhasin, K. K.; Mehta, S. K.; Suri, C. R. Zeta Potential Based Colorimetric Immunoassay for the Direct Detection of Diabetic Marker HbA1c Using Gold Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (31), 5755.
- [65] Batistela, D. M.; Stevani, C. V.; Freire, R. S. Immunoassay for Human IgG Using Antibody-Functionalized Silver Nanoparticles. *Anal. Sci.* **2017**, *33* (10), 1111–1114.
- [66] Huang, X.; Jain, P. K.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. Determination of the Minimum Temperature Required for Selective Photothermal Destruction of Cancer Cells with the Use of Immunotargeted Gold Nanoparticles. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82* (2), 412–422.
- [67] Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C. K.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticles in Delivery Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (11), 1307–1315.
- [68] Paciotti, G. F.; Myer, L.; Weinreich, D.; Goia, D.; Pavel, N.; McLaughlin, R. E.; Tamarkin, L. Colloidal Gold: A Novel Nanoparticle Vector for Tumor Directed Drug Delivery. *Drug Deliv. J. Deliv. Target. Ther. Agents* **2004**, *11* (3), 169–183.
- [69] Chen, Y.-H.; Tsai, C.-Y.; Huang, P.-Y.; Chang, M.-Y.; Cheng, P.-C.; Chou, C.-H. Methotrexate Conjugated to Gold Nanoparticles Inhibits Tumor Growth in a Syngeneic Lungtumor Model. *Mol. Pharm.* **2007**, *4* (5), 713–722.
- [70] Dreaden, E. C.; Mwakwari, S. C.; Sodji, Q. H.; Oyelere, A. K.; El-Sayed, M. A. Tamoxifen-Poly(Ethylene Glycol)-Thiol Gold Nanoparticle Conjugates: Enhanced Potency and Selective Delivery for Breast Cancer Treatment. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (12), 2247–2253.
- [71] Dreaden, E. C.; Gryder, B. E.; Austin, L. A.; Tene Defo, B. A.; Hayden, S. C.; Pi, M.; Quarles, L. D.; Oyelere, A. K.; El-Sayed, M. A. Antiandrogen Gold Nanoparticles Dual-Target and Overcome Treatment Resistance in Hormone-Insensitive Prostate Cancer Cells. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (8), 1507–1512.

- [72] Sun, N.; Liu, Z.; Huang, W.; Tian, A.; Hu, S. The Research of Nanoparticles as Gene Vector for Tumor Gene Therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2014**, *89* (3), 352–357.
- [73] Gurunathan, S.; Lee, K. J.; Kalishwaralal, K.; Sheikpranbabu, S.; Vaidyanathan, R.; Eom, S. H. Antiangiogenic Properties of Silver Nanoparticles. *Biomaterials* **2009**, *30* (31), 6341–6350.
- [74] Soenen, S. J.; Rivera-Gil, P.; Montenegro, J. M.; Parak, W. J.; De Smedt, S. C.; Braeckmans, K. Cellular Toxicity of Inorganic Nanoparticles: Common Aspects and Guidelines for Improved Nanotoxicity Evaluation. *Nano Today* **2011**, *6* (5), 446–465.
- [75] Wang, C.; Xu, L.; Xu, J.; Yang, D.; Liu, B.; Gai, S.; He, F.; Yang, P. Multimodal Imaging and Photothermal Therapy Were Simultaneously Achieved in the Core–Shell UCNR Structure by Using Single near-Infrared Light. *Dalt. Trans.* **2017**, *46* (36), 12147–12157.
- [76] Kim, H. J.; Lee, S. M.; Park, K. H.; Mun, C. H.; Park, Y. B.; Yoo, K. H. Drug-Loaded Gold/Iron/Gold Plasmonic Nanoparticles for Magnetic Targeted Chemo-Photothermal Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Biomaterials* **2015**, *61*, 95–102.
- [77] Faa, G.; Gerosa, C.; Fanni, D.; Lachowicz, J. I.; Nurchi, V. M. Gold - Old Drug with New Potentials. *Curr. Med. Chem.* **2018**, *25* (1), 75–84.
- [78] SonDI, I.; Salopek-SonDI, B. Silver Nanoparticles as Antimicrobial Agent: A Case Study on E. Coli as a Model for Gram-Negative Bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *275* (1), 177–182.
- [79] Galdiero, S.; Falanga, A.; Vitiello, M.; Cantisani, M.; Marra, V.; Galdiero, M. Silver Nanoparticles as Potential Antiviral Agents. *Molecules* **2011**, *16* (10), 8894–8918.
- [80] Tian, J.; Wong, K. K. Y.; Ho, C. M.; Lok, C. N.; Yu, W. Y.; Che, C. M.; Chiu, J. F.; Tam, P. K. H. Topical Delivery of Silver Nanoparticles Promotes Wound Healing. *ChemMedChem* **2007**, *2* (1), 129–136.
- [81] Kwan, K. H. L.; Liu, X.; To, M. K. T.; Yeung, K. W. K.; Ho, C.; Wong, K. K. Y. Modulation of Collagen Alignment by Silver Nanoparticles Results in Better Mechanical Properties in Wound Healing. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2011**, *7* (4), 497–504.
- [82] Singh, R.; Shedbalkar, U. U.; Wadhvani, S. A.; Chopade, B. A. Bacteriogenic Silver Nanoparticles: Synthesis, Mechanism, and Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99* (11), 4579–4593.
- [83] Vial, S.; Reis, R. L.; Oliveira, J. M. Recent Advances Using Gold Nanoparticles as a Promising Multimodal Tool for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **2017**, *21* (2), 92–112.

- [84] Jakóbiśiak M.: Immunologia. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa **1998**, 70-83.
- [85] Basile, U.; Gulli, F.; Gragnani, L.; Napodano, C.; Pocino, K.; Rapaccini, G. L.; Mussap, M.; Zignego, A. L. Free Light Chains: Eclectic Multipurpose Biomarker. *J. Immunol. Methods* **2017**, *451* (April), 11–19.
- [86] Bradwell AR.: Serum free light chain analysis. Fifth edition. **2008**.
- [87] Katzmann, J. A.; Clark, R. J.; Abraham, R. S.; Bryant, S.; Lymp, J. F.; Bradwell, A. R.; Kyle, R. A. Serum Reference Intervals and Diagnostic Ranges for Free  $\kappa$  and Free  $\lambda$  Immunoglobulin Light Chains: Relative Sensitivity for Detection of Monoclonal Light Chains. *Clin. Chem.* **2002**, *48* (9), 1437–1444.
- [88] Rollig, C.; Knop, S.; Bornhauser, M. Multiple Myeloma. *Lancet* **2015**, *385* (9983), 2197-2208.
- [89] Merlini, G.; Stone, M. Dangerous Small B-Cell Clones. *Blood* **2006**, *108* (8), 2520-2530.
- [90] Sipe, J. D.; Benson, M. D.; Buxbaum, J. N.; Ikeda, S. I.; Merlini, G.; Saraiva, M. J. M.; Westermark, P. Amyloid Fibril Proteins and Amyloidosis: Chemical Identification and Clinical Classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid* **2016**, *23* (4), 209–213.
- [91] Yakupova, E. I.; Bobyleva, L. G.; Vikhlyantsev, I. M.; Bobylev, A. G. Congo Red and Amyloids: History and Relationship. *Biosci. Rep.* **2019**, *39* (1), BSR20181415.
- [92] Palladini G, Merlini G. What Is New in Diagnosis and Management of Light Chain Amyloidosis? *Blood* **2016**, *128* (2), 159-168.
- [93] Merlini G. AL Amyloidosis: From Molecular Mechanisms to Targeted Therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* **2017**, *1*, 1-12.
- [94] Picken, M. M.; Frangione, B.; Barlogie, B.; Luna, M.; Gallo, G.: Light Chain Deposition Disease Derived from the Kappa (I) Light Chain Subgroup. Biochemical Characterization. *Am. J. Pathol.* **1989**, *134* (4), 749-754.
- [95] Blancas-Mejía, L. M.; Hammernik, J.; Marin-Argany, M.; Ramirez-Alvarado, M. Differential Effects on Light Chain Amyloid Formation Depend on Mutations and Type of Glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (8), 4953–4965.
- [96] Martin, D. J.; Ramirez-Alvarado, M. Comparison of Amyloid Fibril Formation by Two Closely Related Immunoglobulin Light Chain Variable Domains. *Amyloid* **2010**, *17* (3-4), 129-136.
- [97] Muchtar, E.; Buadi, F. K.; Dispenzieri, A.; Gertz, M. A. Immunoglobulin Light-Chain Amyloidosis: From Basics to New Developments in Diagnosis, Prognosis and Therapy. *Acta Haematologica* **2016**, *135*, 172–190.

- [98] Dobson, C.M. Protein Folding and Misfolding. *Nature* **2003**, *426*, 884–890.
- [99] Chiti, F.; Dobson, C. M. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 333–366.
- [100] Misra, P.; Blancas-Mejia, L. M.; Ramirez-Alvarado, M. Mechanistic Insights into the Early Events in the Aggregation of Immunoglobulin Light Chains. *Biochemistry* **2019**, *58* (29), 3155–3168.
- [101] Rostagno, A.; Vidal, R.; Kaplan, B.; Chuba, J.; Kumar, A.; Elliott, J.; Frangione, B.; Gallo, G.; Ghiso, J. pH-Dependent Fibrillogenesis of a V Kappa III Bence Jones Protein. *British Journal of Haematology* **1999**, *107* (4) 835-843.
- [102] Bhole, M. V; Sadler, R.; Ramasamy, K. Serum-Free Light-Chain Assay: Clinical Utility and Limitations. *Annals of Clinical Biochemistry* **2014**, *51* (5), 528–542.
- [103] Hillengass, J.; Usmani, S.; Rajkumar, S. V. et al. International Myeloma Working Group Consensus Recommendations on Imaging in Monoclonal Plasma Cell Disorders. *Lancet Oncol.* **2019**, *20* (6), 302–312.
- [104] Tate, J.; Mollee, P. Towards Improved Measurement of Serum Free Light Chains: Clinical and Laboratory Issues. *Biochim. Clin.* **2013**, *37* (5), 395–404.
- [105] Schieferdecker, A.; Hörber, S.; Ums, M.; Besemer, B.; Bokemeyer, C.; Peter, A.; Weisel, K. Comparison of Three Different Serum-Free Light-Chain Assays—Implications on Diagnostic and Therapeutic Monitoring of Multiple Myeloma. *Blood Cancer J.* **2020**, *10*, 1-9.
- [106] Kubicki, T.; Dytfeld, D.; Baszczuk, A.; Wysocka, E.; Komarnicki, M.; Lewandowski, K. Clinical Usefulness of Serum Free Light Chains Measurement in Patients with Multiple Myeloma: Comparative Analysis of Two Different Tests. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2017**, *71*, 40–46.
- [107] Walshe, J.; Amarandei, G.; Ahmed, H.; McCormack, S.; Doran, J. Development of Poly-Vinyl Alcohol Stabilized Silver Nanofluids for Solar Thermal Applications. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2019**, *201*, Article 110085.
- [108] Krajczewski, J.; Kudelski, A. Photochemical synthesis of silver and gold nanoparticles. *Wiadomości chemiczne* **2015**, *69* (3–4), 171-195 .
- [109] Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S. Size-Controlled Silver Nanoparticles Synthesized over the Range 5-100 nm Using the Same Protocol and Their Antibacterial Efficacy. *RSC Adv.* **2014**, *4* (8), 3974–3983.

- [110] Paramelle, D.; Sadovoy, A.; Gorelik, S.; Free, P.; Hobley, J.; Fernig, D. G. A Rapid Method to Estimate the Concentration of Citrate Capped Silver Nanoparticles from UV-Visible Light Spectra. *Analyst* **2014**, *139* (19), 4855–4861.
- [111] Dobrovolskaya, M.; Patri, A.; Zheng, J.; et al. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine* **2009**, *5* (2) 106-117.
- [112] Durán, N.; Silveira, C. P.; Durán, M.; Martinez, D. S. T. Silver Nanoparticle Protein Corona and Toxicity: A Mini-Review. *J. Nanobiotechnology* **2015**, *13* (1), 1–17.
- [113] Bosmann, M.; Kößler, J.; Stolz, H.; Walter, U.; Knop, S.; Steigerwald, U. Detection of Serum Free Light Chains: The Problem with Antigen Excess. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2010**, *48* (10), 1419–1422.
- [114] Wang, F.; Chen, B.; Yan, B.; Yin, Y.; Hu, L.; Liang, Y.; Song, M.; Jiang, G. Scattered Light Imaging Enables Real-Time Monitoring of Label-Free Nanoparticles and Fluorescent Biomolecules in Live Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (36), 14043–14047.
- [115] Baalousha, M.; Nur, Y.; Römer, I.; Tejamaya, M.; Lead, J. R. Effect of Monovalent and Divalent Cations, Anions and Fulvic Acid on Aggregation of Citrate-Coated Silver Nanoparticles. *Sci. Total Environ.* **2013**, *454–455*, 119–131.
- [116] Nietzold, C.; Lisdat, F. Fast Protein Detection Using Absorption Properties of Gold Nanoparticles. *Analyst* **2012**, *137* (12), 2821-2826.
- [117] Hirsch, L. R.; Jackson, J. B.; Lee, A.; Halas, N. J.; West, J. L. A Whole Blood Immunoassay Using Gold Nanoshells. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (10), 2377–2381.
- [118] Mendoza González, J. D.; Miranda Lluck, E.; Velazco Castrejón, O.; Tinoco Reyna, O.; Maciel Pérez, M. J. Fast Protein Detection Using Absorption Properties of Gold Nanoparticles. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* **1995**, *65* (6), 546–550.
- [119] Gong, Y.; Hu, J.; Choi, J. R.; You, M.; Zheng, Y.; Xu, B.; Wen, T.; Xu, F. Improved LFIA for Highly Sensitive Detection of BNP at Point-of-Care. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 4455–4466.
- [120] Yuan, Y.; Zhang, J.; Zhang, H.; Yang, X. Label-Free Colorimetric Immunoassay for the Simple and Sensitive Detection of Neurogenin3 Using Gold Nanoparticles. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26* (10), 4245–4248.

- [121] Messiaen, A. S.; De Sloovere, M. M. W.; Claus, P. E.; Vercammen, M.; Van Hoovels, L.; Heylen, O.; Debrabandere, J.; Vanpoucke, H.; De Smet, D. Performance Evaluation of Serum Free Light Chain Analysis: Nephelometry vs Turbidimetry, Monoclonal vs Polyclonal Reagents. *Am. J. Clin. Pathol.* **2017**, *147* (6), 611–622.
- [122] Zhang, L.; Hu, D.; Salmain, M.; Liedberg, B.; Boujday, S. Direct Quantification of Surface Coverage of Antibody in IgG-Gold Nanoparticles Conjugates. *Talanta* **2019**, *204*, 875–881.
- [123] Jacobs, J. F. M.; De Kat Angelino, C. M.; Brouwers, H. M. L. M.; Croockewit, S. A.; Joosten, I.; Van Der Molen, R. G. Evaluation of a New Free Light Chain ELISA Assay: Bringing Coherence with Electrophoretic Methods. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2018**, *56* (2), 312–322.
- [124] Pederzoli, F.; Tosi, G.; Vandelli, M. A.; Belletti, D.; Forni, F.; Ruozi, B. Protein Corona and Nanoparticles: How Can We Investigate On? *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, *9* (6), 1467-1491.
- [125] Walczyk, D.; Bombelli, F. B.; Monopoli, M. P.; Lynch, I.; Dawson, K. A. What the Cell “Sees” in Bionanoscience. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (16), 5761–5768.
- [126] Casals, E.; Pfaller, T.; Duschl, A.; Oostingh, G. J.; Puntès, V. Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona. *ACS Nano* **2010**, *4* (7), 3623–3632.
- [127] Cedervall, T.; Lynch, I.; Lindman, S.; Berggård, T.; Thulin, E.; Nilsson, H.; Dawson, K. A.; Linse, S. Understanding the Nanoparticle-Protein Corona Using Methods to Quantify Exchange Rates and Affinities of Proteins for Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (7), 2050–2055.
- [128] Nienhaus, G. U.; Maffre, P.; Nienhaus, K. Studying the Protein Corona on Nanoparticles by FCS. *Methods Enzymol.* **2013**, *519*, 115–137.
- [129] Hong, P.; Koza, S.; Bouvier, E. S. P. Size Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and Their Aggregates. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2012**, *35* (20), 2923-2950.
- [130] Mahmoudi, M.; Lynch, I.; Ejtehadi, M. R.; Monopoli, M. P.; Bombelli, F. B.; Laurent, S. Protein-Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (9), 5610–5637.
- [131] Docter, D.; Distler, U.; Storck, W.; Kuharev, J.; Wünsch, D.; Hahlbrock, A.; Knauer, S. K.; Tenzer, S.; Stauber, R. H. Quantitative Profiling of the Protein Coronas That Form around Nanoparticles. *Nat. Protoc.* **2014**, *9* (9), 2030–2044.

- [132] Lundqvist, M.; Sethson, I.; Jonsson, B. H. Protein Adsorption onto Silica Nanoparticles: Conformational Changes Depend on the Particles' Curvature and the Protein Stability. *Langmuir* **2004**, *20* (24), 10639–10647.
- [133] Brandes, N.; Welzel, P. B.; Werner, C.; Kroh, L. W. Adsorption-Induced Conformational Changes of Proteins onto Ceramic Particles: Differential Scanning Calorimetry and FTIR Analysis. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *299* (1), 56–69.
- [134] De Paoli Lacerda, S. H.; Park, J. J.; Meuse, C.; Pristinski, D.; Becker, M. L.; Karim, A.; Douglas, J. F. Interaction of Gold Nanoparticles with Common Human Blood Proteins. *ACS Nano* **2010**, *4* (1), 365–379.
- [135] Kim, H.-A.; Seo, J.-K.; Kim, T.; Lee, B.-T. Nanometrology and Its Perspectives in Environmental Research. *Environ. Health Toxicol.* **2014**, *29*, 2014016-2014025.
- [136] Linkov, P.; Artemyev, M.; Efimov, A. E.; Nabiev, I. Comparative Advantages and Limitations of the Basic Metrology Methods Applied to the Characterization of Nanomaterials. *Nanoscale* **2013**, *5* (19), 8781-8798.
- [137] Bell, N. C.; Minelli, C.; Shard, A. G. Quantitation of IgG Protein Adsorption to Gold Nanoparticles Using Particle Size Measurement. *Anal. Methods* **2013**, *5* (18), 4591–4601.
- [138] Technical Note, Malvern Instruments Ltd., <http://Chemikalie.Upol.Cz/Skripta/Msk/MRK656.Pdf>.
- [139] Souza, T. G. F.; Ciminelli, V. S. T.; Mohallem, N. D. S. A Comparison of TEM and DLS Methods to Characterize Size Distribution of Ceramic Nanoparticles. *J. Phys. Conf. Ser.* **2016**, *733* (1), 12039-12044.
- [140] Wang, G.; Papasani, M. R.; Cheguru, P.; Hrdlicka, P. J.; Hill, R. A. Gold-Peptide Nanoconjugate Cellular Uptake Is Modulated by Serum Proteins. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2012**, *8* (6), 822–832.
- [141] Wang, F.; Chen, B.; Yan, B.; Yin, Y.; Hu, L.; Liang, Y.; Song, M.; Jiang, G. Scattered Light Imaging Enables Real-Time Monitoring of Label-Free Nanoparticles and Fluorescent Biomolecules in Live Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (36), 14043–14047.
- [142] Kinoshita, T.; Kiso, K.; Le, D.; Shiigi, H.; Nagaoka, T. Light-Scattering Characteristics of Metal Nanoparticles on a Single Bacterial Cell. *Anal. Sci.* **2016**, *32* (3), 301–305.

- [143] Diemert, M. C.; Musset, L.; Gaillard, O.; Escolano, S.; Baumelou, A.; Rousselet, F.; Galli, J. Electrophoretic Study of the Physico-Chemical Characteristics of Bence-Jones Proteinuria and Its Association with Kidney Damage. *J. Clin. Pathol.* **1994**, *47* (12), 1090–1097.
- [144] Mukhopadhyay, A.; Basu, S.; Singha, S.; Patra, H. K. Inner-View of Nanomaterial Incited Protein Conformational Changes: Insights into Designable Interaction. *Research* **2018**, *1*, 1-15.
- [145] Qin, Z.; Hu, D.; Zhu, M.; Fink, A. L. Structural Characterization of the Partially Folded Intermediates of an Immunoglobulin Light Chain Leading to Amyloid Fibrillation and Amorphous Aggregation. *Biochemistry* **2007**, *46* (11), 3521–3531.
- [146] Wall, J.; Schell, M.; Murphy, C.; Hrcic, R.; Stevens, F. J.; Solomon, A. Thermodynamic Instability of Human  $\Lambda$ 6 Light Chains: Correlation with Fibrillogenicity. *Biochemistry* **1999**, *38* (42), 14101–14108.
- [147] Sikkink, L. A.; Ramirez-Alvarado, M. Biochemical and Aggregation Analysis of Bence Jones Proteins from Different Light Chain Diseases. *Amyloid* **2008**, *15* (1), 29–39.
- [148] Sayed, R. H.; Wechalekar, A. D.; Gilbertson, J. A.; Bass, P.; Mahmood, S.; Sachchithanatham, S.; Fontana, M.; Patel, K.; Whelan, C. J.; Lachmann, H. J.; Hawkins, P. N.; Gillmore, J. D. Natural History and Outcome of Light Chain Deposition Disease. *Blood* **2015**, *126* (26), 2805–2810.
- [149] Gorshkov, V.; Bubis, J. A.; Solovyeva, E. M.; Gorshkov, M. V.; Kjeldsen, F. Environmental Science Nano Blood Plasma Is Highly Selective and Resistant to Physicochemical Changes of the Solution. *Environ. Sci.: Nano* **2019**, *6*, 1089–1098.
- [150] Cedervall, T.; Lynch, I.; Foy, M.; Berggård, T.; Donnelly, S. C.; Cagney, G.; Linse, S.; Dawson, K. A. Detailed Identification of Plasma Proteins Adsorbed on Copolymer. *Angew. Chem. Int. Engl.* **2007**, *46* (30), 5754–5756.
- [151] Colvin, V. L.; Kulinowski, K. M. Nanoparticles as Catalysts for Protein Fibrillation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (21), 8679–8680.
- [152] Ban, D. K.; Paul, S. Protein Corona over Silver Nanoparticles Triggers Conformational Change of Proteins and Drop in Bactericidal Potential of Nanoparticles: Polyethylene Glycol Capping as Preventive Strategy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *146*, 577–584.
- [153] Wagner, S. C.; Roskamp, M.; Pallerla, M.; Araghi, R. R.; Schlecht, S.; Kokschi, B. Nanoparticle-Induced Folding and Fibril Formation of Coiled-Coil-Based Model Peptides. *Small* **2010**, *6* (12), 1321–1328.



- [154] Linse, S.; Cabaleiro-Lago, C.; Xue, W. F.; Lynch, I.; Lindman, S.; Thulin, E.; Radford, S. E.; Dawson, K. A. Nucleation of Protein Fibrillation by Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104* (21), 8691–8696.