

Utjecaj funkcionalizacije tinjca s niklovim kloridom i poli-L-lizinom na vezivanje i vizualizaciju izvanstaničnih vezikula iz cerebros spinalne tekućine ljudi mikroskopijom atomskih sila

Dević, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:623861>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-10**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij

Medicinska kemija

Marta Dević

Utjecaj funkcionalizacije tinjca s niklovim kloridom i poli-L-lizinom na
vezivanje i vizualizaciju izvanstaničnih vezikula iz cerebrospinalne tekućine
ljudi mikroskopijom atomskih sila

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Medicinska kemija

Marta Dević

Utjecaj funkcionalizacije tinjca s niklovim kloridom i poli-L-lizinom na
vezivanje i vizualizaciju izvanstaničnih vezikula iz cerebrospinalne tekućine
ljudi mikroskopijom atomskih sila

Diplomski rad

Rijeka, 2022.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica

Komentor: dr. sc. Marko Perčić

Zahvala

Željela bih izraziti iznimnu zahvalnost svojoj mentorici izv. prof. dr. Mladenki Malenici za organizaciju i jasne upute koje su me vodile tijekom izrade i pisanja ovog diplomskog rada. Također, želim se zahvaliti i svome komentoru dr. sc. Marku Perčiću na svim savjetima i razjašnjenim upitnicima koji su postojali.

Veliko Vam hvala na podršci i znanju kojeg ste mi prenijeli.

Na kraju, željela bih se zahvaliti obitelji i prijateljima koji su mi bili podrška kroz moje studiranje.

mentor: izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica

komentor: dr. sc. Marko Perčić

Diplomski rad obranjen je dana _____ pred povjerenstvom:

1. Doc. dr. sc. Ivan Gudelj (predsjednik), Odjel za biotehnologiju
2. Izv. prof. dr. sc. Marin Tota, Medicinski fakultet
3. Dr. sc. Marko Perčić, Tehnički fakultet (komentor)
4. Izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica, Medicinski fakultet (mentorica)

Rad ima 61 stranica, 20 slika, 1 tablicu i 50 literaturnih navoda

**Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci
OBRAZAC ZA IZVJEŠĆIVANJE O KORIŠTENJU ZNANSTVENE OPREME**

Projekt Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci“ financiran je iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR) u iznosu od 180.182.048,91 kn.

Vrsta rada:	Diplomski rad
Datum:	1.7.2022.
Institucija/e:	Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci Centar za mikro- i nanoznanosti i tehnologije (NANORI) – Sveučilište u Rijeci
Naziv rada (HRV):	Utjecaj funkcionalizacije tinjca s niklovim kloridom i poli-L-lizinom na vezivanje i vizualizaciju izvanstaničnih vezikula iz cerebrospinalne tekućine ljudi mikroskopijom atomskih sila
Naziv rada (ENG):	Influence of mica functionalization with nickel chloride and poly-L-lysine on binding and visualization of extracellular vesicles from human cerebrospinal fluid by atomic force microscopy
Sažetak:	Izvanstanične vezikule (IV) su membranske nanočestice koje sve stanice izlučuju i igraju važnu ulogu u komunikaciji između stanica, ali njihova nanometarska veličina zahtijeva napredne tehnike vizualizacije u cilju istraživanja njihove morfologije. Mikroskopija atomskih sila (engl. <i>Atomic Force Microscopy</i>) predložena je kao jedna od obećavajućih metoda za vizualizaciju, a upravo korištenjem načina tapkanja vršnom silom postignut je napredak u samoj tehnologiji snimanjem slika visoke razlučivosti. Tinjac se često koristi kao nosač uzorka zbog ravnine površine na razini atoma. Iako se uslijed elektrostatskih interakcija negativno nabijene IV vežu za tinjac, u cilju jačeg vezivanja potrebno je provesti funkcionalizaciju površine pozitivnim nabojem, primjerice niklovim(II) kloridom (NiCl ₂) ili poli-L-lizinom (PLL-om). Cilj ovog istraživanja bio je uspostaviti i optimizirati protokole vezivanja IV-a na tinjac prethodno funkcionaliziran s NiCl ₂ ili PLL-om te istražiti njihov učinak na vizualizaciju IV-a mikroskopom atomskih sila (AFM-om). Vizualizacija IV-a je izvedena AFM-om u načinu tapkanja, a tretman IV-a prije snimanja uključivao je; fiksaciju paraformaldehidom (PFA-om, 3%) i glutaraldehidom (GA-om, 1,5%), dehidraciju s etanolom ili 2,2-dimetoksiopropanom i sušenje s heksametil-disilazanom ili pri kritičnoj točki ugljikovog dioksida (CPD). Najbolji protokol za vizualizaciju IV-a i za primjenu u daljnjim istraživanjima uključuje funkcionalizaciju s NiCl ₂ , fiksaciju s PFA-om/GA-om, dehidraciju s etanolom i CPD. Ova metoda se pokazala optimalnom jer jedina pokazuje ujednačen broj detektiranih čestica prema promjeru i visini te veću srednju vrijednost promjera i visine s većom standardnom devijacijom. Svaka korištena metoda identificirala je određene oblike IV-a; konkavne, konveksne, multirežnjaste i nepravilne. Budući da se ove metode primjenjuju kako bi se omogućila identifikacija po sferičnosti, promjeru i visini, još nije moguće razdvojiti IV od čestica iste veličine. S tim razlogom, sljedeći korak istraživanja trebala bi biti imuno-interakcija IV-a s antitijelima,
Gljučne riječi (HRV):	izvanstanične vezikule, cerebrospinalna tekućina ljudi, mikroskopija atomskih sila, poli-L-lizin, niklov(II) klorid, 2,2-dimetoksiopropan, heksametil-disilazan, sušenje pri kritičnoj točki
Gljučne riječi (ENG):	extracellular vesicles, cerebrospinal fluid, atomic force microscopy, poly-L-lysine, nickel(II) chloride, 2,2-dimethoxypropane, hexamethyldisilazane, critical point drying
Autor rada:	Marta Dević
Mentor/i:	izv. prof. dr. sc. Mladenka Malenica
Komentor:	dr. sc. Marko Perčić

Ovaj diplomski rad financiran je projektima: **UNIRI potpora biomed-18-279-1451**: Uspostava protokola na Sveučilištu u Rijeci za primjenu nanotehnoloških metoda: mikroskopije atomskih sila i skenirajućeg elektronskog mikroskopa prilikom vizualizacije i karakterizacije egzosoma, voditeljice izv. prof. dr. sc. Mladenke Malenice, 2019-2023. **HRZZ IP-2019-04-1511**: Identifikacija cirkulirajućih biomarkera neurološkog oporavka u bolesnika s ozljedom mozga, voditeljice izv. prof. dr. sc. Kristine Grabušić, 2019-2023.



Sažetak

Izvanstanične vezikule (IV) su membranske nanočestice koje sve stanice izlučuju i igraju važnu ulogu u komunikaciji između stanica, ali njihova nanometarska veličina zahtijeva napredne tehnike vizualizacije u cilju istraživanja njihove morfologije. Mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*) predložena je kao jedna od obećavajućih metoda za vizualizaciju, a upravo korištenjem načina tapkanja vršnom silom postignut je napredak u samoj tehnologiji snimanjem slika visoke razlučivosti. Tinjac se često koristi kao nosač uzorka zbog ravnine površine na razini atoma. Iako se uslijed elektrostatskih interakcija negativno nabijene IV vežu za tinjac, u cilju jačeg vezivanja potrebno je provesti funkcionalizaciju površine pozitivnim nabojem, primjerice niklovim(II) kloridom (NiCl_2) ili poli-L-lizinom (PLL-om). Cilj ovog istraživanja bio je uspostaviti i optimizirati protokole vezivanja IV-a na tinjac prethodno funkcionaliziran s NiCl_2 ili PLL-om te istražiti njihov učinak na vizualizaciju IV-a mikroskopom atomskih sila (AFM-om). Vizualizacija IV-a je izvedena AFM-om u načinu tapkanja, a tretman IV-a prije snimanja uključivao je; fiksaciju paraformaldehidom (PFA-om, 3%) i glutaraldehidom (GA-om, 1,5%), dehidraciju s etanolom ili 2,2-dimetoksiopropanom i sušenje s heksametildisilazanom ili pri kritičnoj točki ugljikovog dioksida (CPD). Najbolji protokol za vizualizaciju IV-a i za primjenu u daljnjim istraživanjima uključuje funkcionalizaciju s NiCl_2 , fiksaciju s PFA-om/GA-om, dehidraciju s etanolom i CPD. Ova metoda se pokazala optimalnom jer jedina pokazuje ujednačen broj detektiranih čestica prema promjeru i visini te veću srednju vrijednost promjera i visine s većom standardnom devijacijom. Svaka korištena metoda identificirala je određene oblike IV-a; konkavne, konveksne, multirežnjaste i nepravilne. Budući da se ove metode primjenjuju kako bi se omogućila identifikacija po sferičnosti, promjeru i visini, još nije moguće razdvojiti IV od čestica iste veličine. S tim razlogom, sljedeći korak istraživanja trebala bi biti imuno-interakcija IV-a s antitijelima.

Ključne riječi: izvanstanične vezikule, cerebrospinalna tekućina ljudi, mikroskopija atomskih sila, poli-L-lizin, niklov(II) klorid, 2,2-dimetoksiopropan, heksametildisilazan, sušenje pri kritičnoj točki

Summary

Extracellular vesicles (EV) are membrane nanoparticles that all cells secrete and play an important role in communication between cells, but their nanometer size requires advanced visualization techniques in order to investigate their morphology. Atomic force microscopy has been proposed as one of the promising methods for EV visualization, and due to the use of peak force tapping methods, advances have been made in the technology itself by capturing high-resolution images. Mica is often used as a sample carrier due to the plane surface at the atomic level. Although due to electrostatic interactions negatively charged EV binds to mica, in order to strengthen binding it is necessary to carry out surface functionalization with positive charges such as nickel(II) chloride (NiCl_2) and poly-L-lysine (PLL). The aim of this study was to establish and optimize protocols of EV binding to mica previously functionalized with NiCl_2 or PLL and to investigate their effect on EV visualization by atomic force microscope (AFM). EV visualization was performed on AFM in tapping mode, and pre-recording EV treatment included; fixation with paraformaldehyde (PFA, 3%) and glutaraldehyde (GA, 1,5%), dehydration with ethanol or 2,2-dimethoxypropane and drying with hexamethyldisilazane or at the critical point of carbon dioxide (CPD). The best protocol for EV visualization and for use in further research includes functionalization with NiCl_2 , fixation with PFA/GA, dehydration with ethanol, and CPD. This method proved to be optimal because it is the only one that shows a uniform number of detected particles according to diameter and height and a higher mean value of diameter and height with a higher standard deviation. Each method used identified certain forms of EV; concave, convex, multi-lobed and irregular. Because these methods are applied to allow identification by sphericity, diameter, and height, it is not yet possible to separate EV from particles of the same size. For this reason, the next step in research should be immunointeraction of EV with antibodies.

Key words: extracellular vesicles, cerebrospinal fluid, atomic force microscopy, poly-L-lysine, nickel(II) chloride, 2,2-dimethoxypropane, hexamethyldisilazane, critical point drying

Sadržaj

1.	Uvod.....	1
1.1.	Dijelovi mikroskopa atomskih sila.....	1
1.2.	Načini snimanja u mikroskopiji atomskih sila i krivulje sile.....	3
1.3.	Akvizicija mikroskopa atomskih sila u tekućini i zraku.....	6
1.4.	Priprema uzorka.....	7
1.4.1.	Funkcionalizacija tinjca s poli-L-lizinom.....	8
1.4.2.	Funkcionalizacija s niklovim(II) kloridom.....	9
1.5.	Fiksacija uzorka.....	9
1.6.	Dehidracija uzorka.....	11
1.7.	Sušenje uzorka.....	12
1.8.	Izvanstanične vezikule.....	13
2.	Cilj diplomskog rada.....	14
3.	Metode i materijali.....	15
3.1.	Funkcionalizacija tinjca niklovim(II) kloridom.....	15
3.2.	Funkcionalizacija tinjca poli-L-lizinom.....	15
3.3.	Uzorak izvanstaničnih vezikula i njegova priprema.....	16
3.3.1.	Protokol fiksacije izvanstaničnih vezikula.....	16
3.3.2.	Protokol dehidracije izvanstaničnih vezikula u etanolu i sušenja pri kritičnoj točki ugljikovog dioksida.....	17
3.3.3.	Protokol dehidracije u 2,2-dimetoksipropanu i sušenja u heksametildisilazanu.....	18
3.4.	Snimanje mikroskopom atomskih sila.....	19
3.5.	Analizator slike Gwyddion.....	21
3.5.1.	Parametri hrapavosti profila i površine.....	22
3.6.	Analiza u ImageJ softveru.....	23
3.7.	Statistička analiza.....	23
4.	Rezultati.....	24
4.1.	Utjecaj sredstava za funkcionalizaciju i fiksaciju na hrapavost površine tinjca.....	24
4.2.	Utjecaj protokola koji uključuje dehidraciju s etanolom i sušenje pri kritičnoj točki ugljikovog dioksida na morfologiju i raspodjelu veličine izvanstaničnih vezikula.....	27
4.3.	Utjecaj protokola koji uključuje dehidraciju s 2,2-dimetoksipropanom i sušenje heksametildisilazanom na morfologiju i raspodjelu veličine izvanstaničnih vezikula.....	31

5.	Rasprava	37
6.	Zaključak.....	42
7.	Literatura	43
8.	Životopis.....	47

1. Uvod

Mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*) predstavlja jedinstvenu metodu kojom se dolazi do informacija o površini vodljivih i nevodljivih uzoraka na nanoskali, a svrstava se u obitelj mikroskopija sa skenirajućom sondom (engl. *Scanning probe microscopy*; SPM) (1,2). Djelovanje mikroskopije atomskih sila se očituje mjereći silu između sonde (oštrog vrha postavljenog na oprugu gredice) i površine uzorka koji se snima. Zapažena sila između površine uzorka i vrha sonde mikroskopa atomskih sila (AFM-a) nastaje nakon dodira vrha i površine uzorka uz razdvojenost do 10 nm. Hookeovim zakonom se opisuje nastala sila i prikazuje jednadžbom:

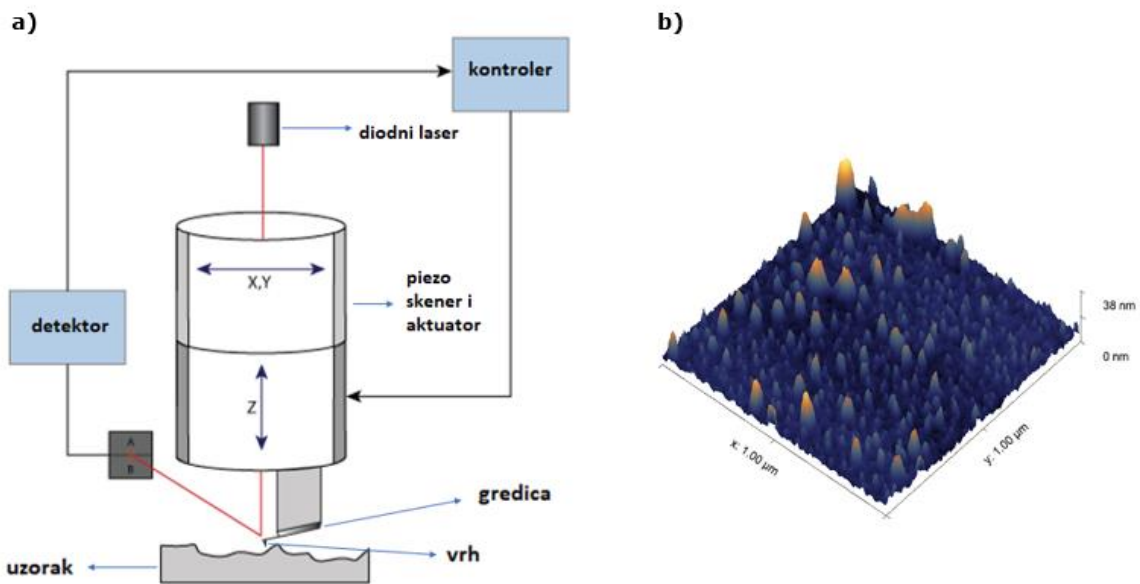
$$F = -k \cdot x \quad (1)$$

gdje je F sila, k označava konstantu opruge gredice, a x je otklon gredice. Dakle, sila se izračunava, a ne mjeri (1,3).

1.1. Dijelovi mikroskopa atomskih sila

Mjerenje mikroskopijom atomskih sila se provodi AFM-om u sklopu kojeg se učvršćuje sonda oštrog vrha od 10 nm do 20 nm, koja stupa u interakciju s uzorkom. Veličina interakcije sonda-uzorak ovisi o udaljenosti sonde i uzorka. Materijali od kojih su proizvedene gredice su silicij ili silicijev nitrid. Ovisno o korištenom materijalu i duljini gredice mijenja se konstanta opruge (4,5). Postoje dva modela dizajna SPM-a; jedan u kojem cijevni skener pomiče uzorak ispod stacionarnog vrha sonde te model u kojem uzorak miruje na postolju, dok skener pomiče vrh, kao kod Dimension Icon Bruker AFM-a na slici 1. Snimanje započinje pričvršćivanjem uzorka na XY postolje iznad kojeg se nalazi oštar vrh sonde na kraju cilindrične piezoelektrične

cijevi (Slika 1a, piezo skener i aktuator). Prelazak sonde po površini uzorka je pod kontrolom povratne sprege i piezoelektronskih skenera. Slika nastaje tako što se diodni laser odbija preko gredice na detektor fotodiode, čime detektor mjeri otklone gredice tijekom skeniranja vrha preko uzorka. Iz signala fotodiode dobivenih otklonom gredice dobiva se rasterska karta topografije površine (Slika 1b) (4).



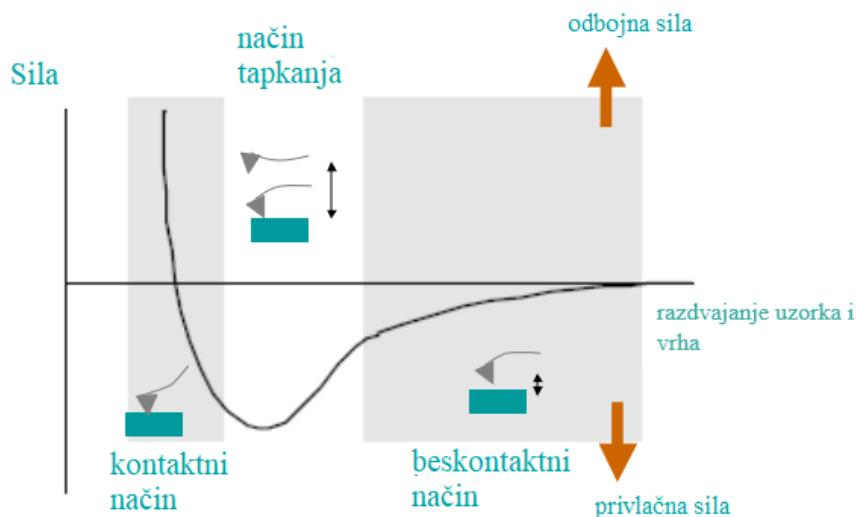
Slika 1. (a) Shematski prikaz instrumentacije mikroskopa atomskih sila. (b) Primjer topografske karte. Prilagođeno prema (4,6).

Piezoelektrični skener i aktuator upravlja kretanjem gredice, odnosno pomiče vrh sonde s ciljem skeniranja u smjeru lijevo-desno okomito na os skenera, ujedno pomičući vrh sonde gore-dolje. Metoda rada ovog skenera se temelji na piezoelektričnom efektu, gdje se piezoelektrični materijal širi ili skuplja razmjerno primijenjenom naponu. Sustav kontrole piezo skenera, koji primjenjuje napon na x i y elektrodu skenera, savija skener horizontalno (u smjeru x-osi i y-osi) i osigurava skeniranje rasterskih linija, dok napon primijenjen na z elektrodu pomiče skener vertikalno (u smjeru z-osi) i kontrolira vertikalni pomak gredice. Podaci o x, y i z poziciji

osiguravaju povratnu informaciju kojom se kontrolira položaj sonde u zatvorenoj petlji (4).

1.2. Načini snimanja u mikroskopiji atomskih sila i krivulje sile

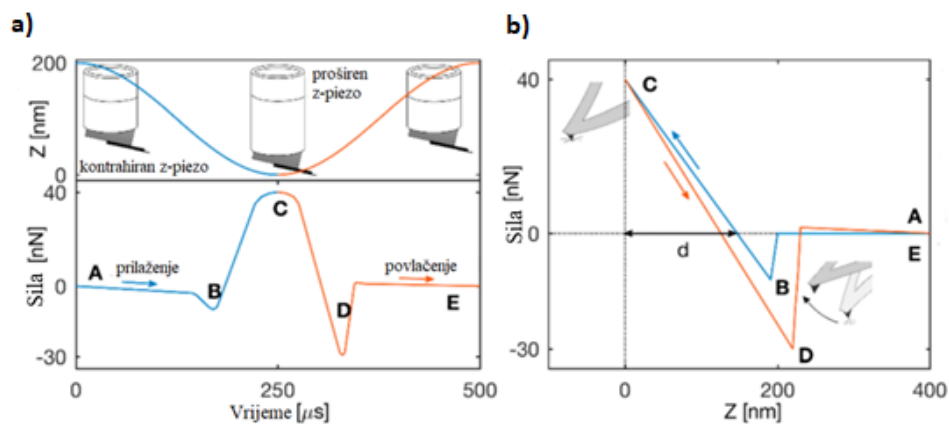
Prevladavaju tri dominantna načina snimanja u mikroskopiji atomskih sila: kontaktni način, način tapkanja (način s prekidajućim kontaktom) i beskontaktni način. Vrste sila koje se mjere AFM-om mogu biti različite, a ovisno o traženim podacima u obzir se uzimaju Van der Waalove sile, elektrostatske sile, magnetske sile, mehaničke sile i kapilarne sile. Korištenjem kontaktnog načina AFM-a, prisutna je odbojna Van der Waalova sila između vrha sonde i površine uzorka jer vrh sonde skenira po površini. Uz to, zastupljen je konstantni otklon gredice povratnom spregom te konstantna sila, što posljedično rezultira stvaranjem slike topografije površine uzorka (Slika 2, kontaktni način). Uz neke prednosti, kao što je brzo skeniranje, pojavljuju se i nedostaci u pogledu oštećenja uzorka zbog mehaničkog pritiska, odnosno, u konačnici deformiranost mekog uzorka. Korištenjem beskontaktnog načina rada AFM-a, aktivna je privlačna Van der Waalova sila između vrha sonde i površine, a razlog tome je da vrh sonde ne kontaktira površinu uzorka, nego točnije oscilira nad slojem adsorbirane tekućine koja se nalazi na površini (Slika 2, beskontaktni način). Površinska topografija nastaje kao posljedica privlačnih Van der Waalovih sila, zbog kojih dolazi do konstantne promjene amplitude upotrebom povratne sprege. Iako egzistira mala sila na sam uzorak što ga čuva od degradacije, snimanje ovim načinom kulminira slikama niže razlučivosti. Korištenjem trećeg načina snimanja, načina tapkanja, gre dica oscilira na svojoj rezonantnoj frekvenciji „tapkanjem“ po površini uzorka za vrijeme skeniranja, međutim, nema trajnog kontakta kao u kontaktnom načinu zbog čega je u konačnici smanjena i vjerojatnost oštećenja oblika uzorka (Slika 2, način tapkanja) (7).



Slika 2. Shematski dijagram interakcija na različitim udaljenostima sonde i površine uzorka u mikroskopiji atomskih sila. Na malim udaljenostima uzorka i sonde prisutne su Van der Waalsove (VdW) interakcije. U kontaktnom načinu snimanja zastupljene su odbojne VdW sile, a udaljavanjem vrha sonde od površine uzorka prevladavaju privlačne VdW sile (beskontaktni način). Preuzeto i prilagođeno prema (3).

Uz rezonantni način snimanja AFM-om, koji se javlja u načinu tapkanja, također je uveden nerezonantni modalitet u tehnologiji AFM-a. Način tapkanja vršnom silom (engl. *Peak force tapping*; PFT) u nerezonantnom modalitetu je označio značajan iskorak u znanosti. Snimanje ovim načinom obuhvaća široki raspon uzoraka te kao mogućnost nudi istodobno uz snimanje površine i detekciju krivulja sile za određivanje biomehaničkih svojstava uzorka (8). Vrh sonde se tijekom snimanja uzorka više puta dovodi do njegove površine, ostvaruje kontakt i izlazi van iz kontakta, pri čemu fotodioda preko pomaka gredice detektira silu što se manifestira krivuljom sila - pomak (Slika 3) (3). Korištenjem načina PFT uspostavljeno je dodirivanje površine uzorka vrlo malom silom u redu veličine pikonjutna (pN), zahvaljujući povratnoj sprezi, koja ograničava vršnu silu na vrijednost do 10 pN. Osim što se ističe neznatnom silom na uzorak, što održava uzorak stabilnim, prednost ovoga načina je i jednostavnost upotrebe bez podešavanja gredice, što posljedično pokazuje visokorazlučive slike i najmanjih uzoraka (9). Princip mjerenja nastao kao proširenje načinu PFT

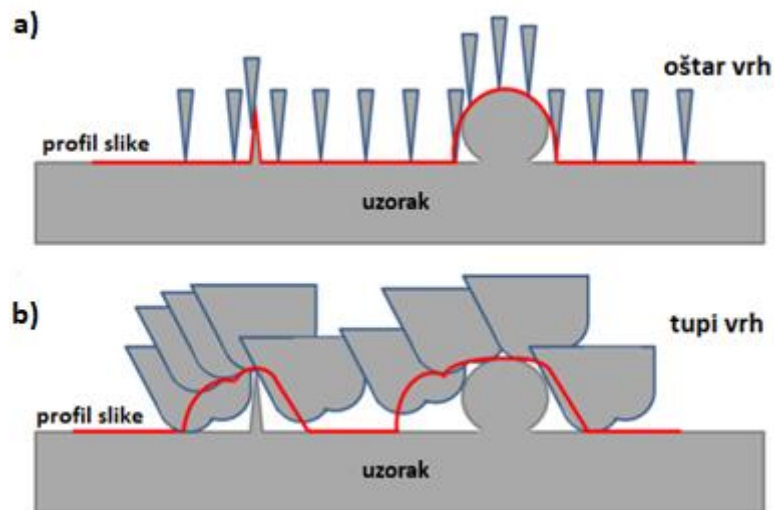
je kvantitativno nanomehaničko mapiranje (engl. *Peak Force QNM*; PF QNM), čime se uz istovremene slike topografije uzorka, koje su bazirane na signalu visine, dobivaju i kvantitativna nanomehanička svojstva uzorka izvedena iz krivulja sila - pomak dobivenih PFT-om. Korištenjem ovog principa svakim kontaktom vrha sonde s površinom uzorka izdvaja se i razlikuje informacija o mehaničkim karakteristikama: adheziji, modulu elastičnosti, deformaciji ili rasipanju adhezijske sile. Ova tehnika pomaže kod identificiranja nepoznatih karakteristika uzorka na temelju otkrivenih kvantitativnih podataka (10).



Slika 3. Krivulja sila - pomak dobivena mikroskopom atomskih sila u načinu tapkanja vršnom silom. Graf ovisnosti sile i otklona piezo skenera/aktuatora u smjeru z-osi (z-piezo) o vremenu tzv. „otkucaji srca” (a) prevode se u krivulje sila - pomak na temelju informacija o z-piezo položaju. Na slici (a) A predstavlja pristupanje sonde površini, B je skok u kontakt, C je vršna sila, D je adhezija te E povratak u početni položaj. Na slici (b) A označava pristupanje sonde površini, B je dodir sonde i površine uzorka, C je krajnji kontakt (vršna sila), D je odvajanje sonde od površine uzorka (sila adhezije) te E povratak sonde na početnu točku. Preuzeto i prilagođeno prema (11).

Kod svih tipova snimanja AFM-om veliku ulogu igra oštrina vrha sonde koja se koristi, ako vrh nije savršeno oštar nastale slike neće odraziti realnu topografiju površine uzorka (3). Ovisno o uzorku koji se želi vizualizirati, odabire se i prikladan vrh s određenim karakteristikama. Za uzorak s pretežito ravnom površinom s nekoliko stepenica oštrina vrha neće imati važnu značajku, međutim kod uzorka koji je oštar i ima šiljke ili rupe

kvaliteta slike je proporcionalna dobrom vrhu (12). Stoga, kako bi se osigurala točna ponovljivost oštih značajki površine uzorka preporuča se izabrati vrh oštrije od značajke uzorka (Slika 4a), a izbjegavati korištenje tupog vrha (Slika 4b). Tako je za vizualizaciju biološkog uzorka od 100 nm, potreban vrh koji je promjera manjeg od 10 nm (13).



Slika 4. Vizualizacija kretanja vrha sonde tijekom snimanja po površini uzorka koja posjeduje oštre i sferne karakteristike. (a) Snimanje površine uzorka oštrim vrhom daje bolju razlučivost od (b) snimanja tupim vrhom. Preuzeto i prilagođeno iz (13).

1.3. Akvizicija mikroskopa atomskih sila u tekućini i zraku

Vizualizacija AFM-om moguća je u tekućini i zraku. Opcija vizualizacije u zraku pruža stabilnije uvijete no uključuje sušenje uzorka, dok opcija vizualizacije u tekućini odražava stvarnije stanje vezikula, međutim uključuje više šumova (14). Sposobnost snimanja uzorka u tekućini uz stvaranje slike nanometarske razlučivosti izdvaja mikroskopiju atomskih sila od ostalih metoda. Dodatno se vizualizacijom u tekućini izbjegava kontaminacija površine solima iz pufera u kojem se nalazi izolirani uzorak, čime je snimanje točnije. Za opciju snimanja u tekućini potrebno je korištenje stanice s tekućinom, koja ima za ulogu držanje uzorka i sonde uronjene u tekućinu. Izvedbe stanica s tekućinom mogu biti izvedene u

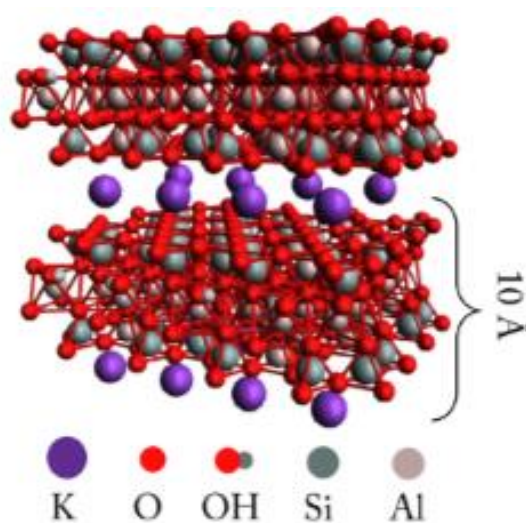
otvorenom i zatvorenom obliku (15). Brojne sile djeluju na području uzorak - sonda u tekućoj akviziciji, poput vodikovih veza, hidrodinamičkih sila, što dovodi do nižeg faktora kvalitete nego kod akvizicije na zraku. Primjena AFM-a u načinu tapkanja s akvizicijom u zraku izvodi se kada sonda može prevladati adhezijske i kapilarne sile uzorka u zraku. Ukoliko to nije moguće, kao sredstvo akvizicije se primjenjuje tekućina, koja za funkciju ima smanjenje tih sila. Na silu između uzorka i vrha sonde uvelike ima značaj krutost sonde. Način tapkanja s akvizicijom u zraku poznat je po korištenju silicijevih sondi krutosti od 30 do 50 N/m, iako je za mekše materijale moguće upotrijebiti sonde krutosti i do 0,3 N/m. Rezonantna frekvencija opruge gredice pri akviziciji u zraku iznosi i do 300 kHz, što označava veliku brzinu skeniranja i manju vjerojatnost oštećenja uzorka, dok je u tekućoj akviziciji ona između 50 i 70 kHz (16).

1.4. Priprema uzorka

Snimanje uzorka putem AFM-a nemoguće je bez koraka imobilizacije, stoga su razvijene brojne tehnike pripreme uzorka. Tinjac, kao pločasti silikatni mineral s kalijevim kationima između slojeva hidroksilnih skupina te s izrazito glatkom i atomski ujednačenom površinom, pokazao se optimalnom podlogom za vezivanje bioloških uzoraka (17,18). Najčešće korišten je muskovitni tinjac formule $KAl_2[AlSi_3O_{10}(OH)_2]$, sastavljen od negativno nabijenih alumino-silikatnih slojeva te pozitivno nabijenih kalijevih iona (Slika 5) (19). Uporaba tinjca je prilično jednostavna; cijepa se pomoću selotejpa, nakon čega su kalijevi kationi raspoređeni da daju ukupan negativan naboj na obje strane tinjca, odnosno u kontaktu tinjca s otopinom kalijevi ioni, K^+ , disociraju s površine i ostavljaju površinu negativno nabijenu. Kao takav, tinjac je idealan za adsorpciju pozitivno nabijenih molekula, dok je za adsorpciju molekula s negativnim nabojem potreban dodatan postupak pripreme površine tinjca (18). Površinu tinjca moguće je

funkcionalizirati tada s 3-aminopropiltrietoksisilanom (APTES-om) ili aminopropilsilatranom (APS), monovalentnim (Co^+) i dvovalentnim (Ni^{2+}) kationima, polimerima (poli-L-lizin (PLL)) i adsorbiranjem pozitivnog nabijenog lipidnog dvosloja (20).

Dvije tehnike funkcionalizacije površine tinjca kojim se ovaj rad bavi jesu dodavanje iona dvovalentnih metala (niklov(II) klorid (NiCl_2)) te modifikacija korištenjem otopine PLL-a.



Slika 5. Građa muskovitnog tinjca. Susjedne ploče od tetraedarskih slojeva (uključuju aluminij, kisik i silicij) i oktaedarskih slojeva (uključuju aluminij, kisik i vodik) spajaju kalijevi ioni. Atomi su obojeni prema identitetu. Kombinacijom negativno nabijenih alumino-silikatnih slojeva (uključujući tetraedarske i oktaedarske ploče) i pozitivnih međuslojeva kalijevih iona uspostavlja se neutralnost naboja tinjca. Atomi kisika se kovalentno vežu za atome aluminija i silicija. Preuzeto i prilagođeno iz (19,21).

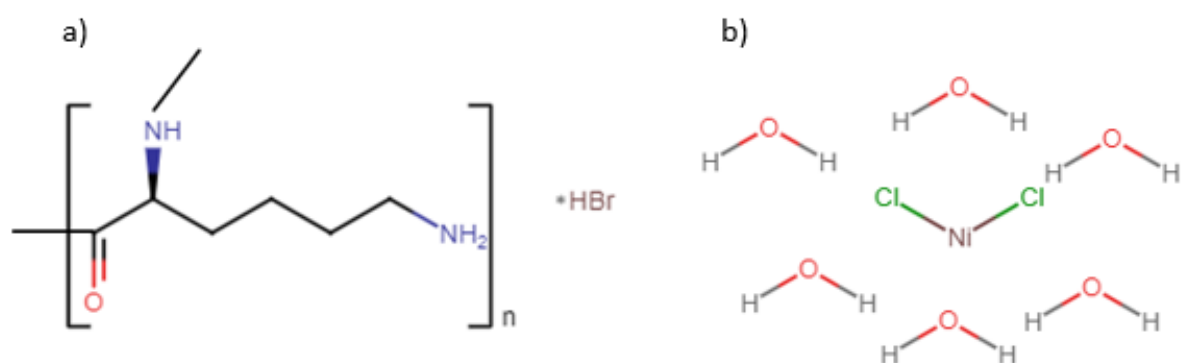
1.4.1. Funkcionalizacija tinjca s poli-L-lizinom

Funkcionalizacija označava pričvršćivanje molekula proteina PLL-a (Slika 6a) djelovanjem elektrostatičkih interakcija za tinjac. PLL unaprjeđuje elektrostatičku interakciju između negativno nabijenih iona uzorka te površine tinjca, jer nakon što se apsorbira na površinu supstrata raste broj pozitivno nabijenih mjesta za vezanje negativno nabijenog uzorka (22). Funkcionalizacija površine tinjca s otopinom PLL-a ima prednost

nekorištenja soli u otopini, ali zbog svoje iznimne ljepljivosti i velikog pozitivnog naboja ima minuse u pogledu unošenja drugih zagađivača iz otopine (20).

1.4.2. Funkcionalizacija s niklovim(II) kloridom

Nadogradnja molekula NiCl_2 (Slika 6b) na površinu od tinjca postiže se također uspostavom elektrostatičkih interakcija. NiCl_2 pozitivno djeluje na vezanje negativno nabijenog uzorka na površinu tinjca jer porastom koncentracije niklovih iona (Ni^{2+}) raste i snaga adsorpcije uzorka na supstrat. Primjena soli za funkcionalizaciju tinjca predstavlja rizik od kontaminacije površine supstrata agregatima soli, čime se može ometati razlučivost i interpretacija slike nastale AFM-om (23).



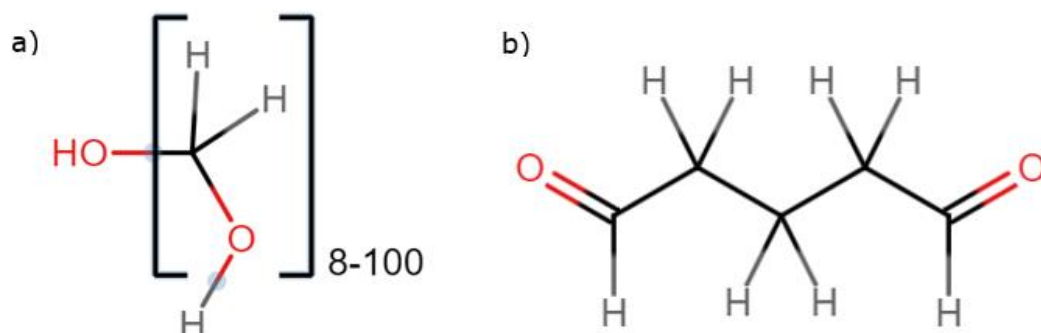
Slika 6. Struktura poli-L-lizina hidrobromida (a) i niklovog klorida heksahidrata (b), nacrtana programom Chemaxon Marvin JS (Chemaxon, Budimpešta, Mađarska). Aminokiselinski polimer poli-L-lizin sadrži jedan hidrobromid po ostatku lizina, čime je poli-L-lizin topiv u vodi u kristalnom obliku zbog ometanja hidrobromida u stvaranju vodikove veze između amino i karboksilnih skupina. Prilagođeno iz (24).

1.5. Fiksacija uzorka

S ciljem očuvanja autentičnog oblika uzorka, različite metode fiksacije uzorka su često korištene. Dvije su temeljne skupine metoda fiksacije, aditivne ili umrežavajuće fiksacije, koje uključuju formaldehid, paraformaldehid (PFA) te glutaraldehid (GA), i denaturirajuće ili taložne fiksacije, koje uključuje metanol i etanol (25). Umrežavajući fiksatori

reagiraju s proteinima, odnosno primarnim aminima na N-kraju proteina, sekundarnim aminima u peptidnoj vezi i bočnim lancima pozitivno nabijenih aminokiselina te stvaraju metilenski most uz otpuštanje molekula vode (26). Otapanjem molekula formaldehida u vodi nastaje metilen hidrat, koji međusobno reagira i tvori polimere formaldehida. PFA pripada u netopljive polimere formaldehida, sadržavajući 8-100 jedinica monomera (Slika 7a) (27). Bez obzira na prednost PFA što brzo umrežava proteine na kratkoj udaljenosti, nedostaci poput nepotpunog fiksiranja proteina i oštećenja stanične membrane predstavljaju problem prilikom njegovog korištenja (28). Za razliku od PFA, GA je dialdehid s pet ugljikovih atoma (Slika 7b) (29). Prednost GA leži u umrežavanju proteina na velikoj udaljenosti te u većem potencijalu umrežavanja. Za povećani potencijal su zaslužne po dvije alhidne skupine svake molekule, koje stvaraju vezu s dušikom na proteinu u dodiru (30). Etanol, koji pripada skupini denaturirajućih fiksatora, deformira oblik stanice, prerađuje tercijarnu strukturu proteina, zgrušava proteine te uništava hidrofobne veze između proteina (28).

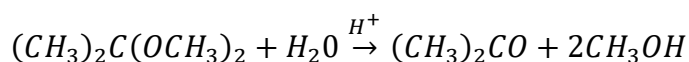
Stoga, važno je učvrstiti uzorak ispravnim fiksatorom koji će stabilizirati interakciju između proteina i nukleinskih kiselina, a kombinacija dva fiksatora, PFA i GA, pokazala se korisnom uzimavši u obzir prednosti oba fiksativa (30).



Slika 7. Struktura paraformaldehida (a) i glutaraldehida (b) nacrtana programom Chemaxon Marvin JS (Chemaxon, Budimpešta, Mađarska).

1.6. Dehidracija uzorka

Proces uklanjanja vode iz uzorka ili dehidracija, izvodi se prije snimanja na AFM-u kako bi se osigurala veća vjerojatnost da uzorak nema oštećenje morfologije. Zbog visoke površinske napetosti vode (70 mN/m) uništava se struktura uzorka pa bi se način sušenja uzorka na zraku trebao izbjegavati. Umjesto toga načina trebali bi se primjenjivati načini koji uključuju tvari s malom površinskom napetošću ili bez nje (6). Dva takva načina dehidracije su dehidracija kroz serijska razrjeđenja etanola (23,2 mN/m) ili pomoću 2,2-dimetoksipropana (2,2-DMP). Cilj je vodu iz uzorka zamijeniti otapalom niže površinske napetosti. Kod dehidracije s etanolom, cilj je vodu izvući iz uzorka bez da se dogode oštećenja morfologije unutarstaničnih struktura. Takav postupak uključuje propuštanje alkohola u serijama kao 30%-tni, 50%-tni, 70%-tni, 80%-tni, 90%-tni i 100%-tni, čime se održava polagan protok vode iz uzorka u medij za dehidraciju (31). Poželjna alternativa klasičnoj dehidraciji s etanolom je dehidracija u 2,2-DMP-u. Ova tekućina endotermnom reakcijom reagira s vodom u prisutnosti vodikovih iona i daje produkte reakcije metanol i aceton, koji se svrstavaju u ustaljene kemijske tvari za dehidraciju uzorka (slika 8) (32). Uspoređujući karakteristike dehidracije s 2,2-DMP-om i etanolom, dehidracija s 2,2-DMP-om se provodi puno brže (33).



Slika 8. Endotermna reakcija 2,2-dimetoksipropana s ekvimolarnom količinom vode u prisutnosti kiselog katalizatora (koncentrirana klorovodična kiselina) daje produkte metanol i aceton u molarnom omjeru 1:2. Preuzeto i prilagođeno iz (32).

1.7. Sušenje uzorka

Prisustvo otapala ili sredstva za dehidraciju otežava vizualizaciju uzorka primjenjujući AFM i izaziva morfološke promjene, stoga se sušenjem eliminira iz uzorka (34). Kako bi se izbjegao štetan učinak površinske napetosti etanola (23,2 mN/m) ili acetona (23,5 mN/m) pri prijelazu otapala iz tekućeg u plinovito stanje, primjenjuje se sušenje pri kritičnoj točki ugljikovog dioksida (CO₂) (CPD) i kemijsko sušenje s heksametildisilazanom (HMDS-om) prije snimanja na mikroskopu. Karakteristično svojstvo CPD-a je dolazak u kritičnu točku gdje su fizikalna svojstva tekućine i plina jednaka. Tada tekućina može preći u plin bez štetnog efekta površinske napetosti na uzorak. Kod CPD-a etanol ili aceton se zamijene tekućim CO₂ (6,5 – 0,59 mN/m) koji onda ispari. U primjeni je kritična točka CO₂, koja se nalazi na 31° C i 74 bara te koja ne bi trebala narušiti strukturu uzorka. Svojstvo CO₂ da se ne miješa s vodom zahtjeva prije CPD-a zamjenu vode s tekućinom koja se miješa s CO₂ i vodom, kao što su etanol ili aceton. Etanol i aceton se miješaju s vodom, ali ne predstavljaju dobre kandidate za uporabu u CPD-u zbog visoke temperature kritične točke. Po završetku zamjene vode s izmjenjivačkom tekućinom i zamjene iste s tekućim CO₂, tekući CO₂ se povećanjem tlaka i stalnom temperaturom kritične točke prevodi u plin (35). Iako primjena CPD-a ima više prednosti od sušenja na zraku, njegova visoka cijena i dulja priprava uzorka će možda odbiti neke potencijalne korisnike (34).

Druga spomenuta metoda sušenja je sušenje s otapalom HMDS-om, koji ne uklanja potpuno površinsku napetost, ali ju znatno smanjuje. Osobitost HMDS-a je dodatno umrežavanje proteina bioloških uzoraka, čime uzorak postaje čvršći i otporniji tijekom sušenja na zraku. Ovo se osim potencijalu umrežavanja može pripisati i niskoj površinskoj napetosti HMDS-a, koja iznosi 18 mN/m (36). Premda način djelovanja ovoga otapala nije

razjašnjen, sušenje bioloških uzoraka s HMDS-om dovodi do sličnih rezultata kao i sa CPD-om. Međutim, sušenje s HMDS-om se više koristi za veće strukture, dok se za manje uzorke primjenjuje CPD. Ova metoda se ističe nad CPD-om u pogledu izvođenja pod atmosferskim tlakom, malih troškova bez dodatne opreme, manjeg napora i vremena pripreme uzorka (37).

1.8. Izvanstanične vezikule

Izvanstanične vezikule (IV) su negativno nabijene strukture s fosfolipidnom membranom koja sadrži proteine i nukleinske kiseline, a distribucija njihove veličine se proteže od 50 nm do 200 nm (6). Primjena IV-a kao biomarkera za mnoge bolesti proizašla je isticanjem IV-a u brojnim fiziološkim i patološkim procesima (38). IV iz cerebrospinalne tekućine uključene su u procese u mozgu, poput angiogeneze, upale, neurogeneze, međustanične komunikacije, regeneracije živaca pa samim time služe kao biomarkeri za bolesti poput multiple skleroze, Alzheimerove bolesti, shizofrenije, bipolarnog poremećaja i mnogih drugih. Ipak, osim u cerebrospinalnoj tekućini, IV su prisutne u biološkim tekućinama poput krvi, sline, urina i amnionske tekućine te ih izlučuju otprilike sve stanice. Morfologija IV-a je uglavnom sferična, no može varirati i između konkavne, konveksne ili ravne, ovisno o sili vrha sonde primijenjenoj na vezikule. Primjena AFM-a za karakterizaciju IV-a je rijetko prisutna u literaturi, ali u zadnje vrijeme primjetan je napredak kroz određivanje morfologije, raspodjele veličine, strukturne raspodjele, mehaničkih i biofizičkih svojstava IV-a (6).

2. Cilj diplomskog rada

Cilj ovog istraživanja bio je uspostaviti optimalan protokol funkcionalizacije tinjca za vezivanje IV-a iz cerebrospinalne tekućine ljudi i njihovu vizualizaciju AFM-om u zračnom načinu.

Specifični ciljevi ovoga diplomskog rada su:

- 1) optimizirati protokol funkcionalizacije površine tinjca s NiCl_2 i PLL-om kako bi dobili zadovoljavajuće vezivanje IV-a na površini tinjca
- 2) usporediti utjecaj pojedine funkcionalizacije na grubost tinjca i posredno prisustvo nečistoća
- 3) istražiti utjecaj protokola koji uključuju dehidraciju IV-a s etanolom i CPD na očuvanje njihove morfologije i strukture
- 4) istražiti utjecaj protokola koji uključuju dehidraciju IV-a 2,2-DMP-om i sušenje s HMDS-om na očuvanje njihove morfologije i strukture

3. Metode i materijali

3.1. Funkcionalizacija tinjca niklovim(II) kloridom

Supstrat od tinjca (čistoća V-1, promjer 12 mm, debljina 0,15 mm; Structure Probe Inc., West Chester, PA, SAD) je aktiviran s 10 mM otopinom NiCl_2 (niklov klorid heksahidrat; prikladan za stanične kulture, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) pripremljenom u superčistoj vodi (HiPerSolv CHROMANORM, voda za HPLC, filtrirana na 0,2 μm , BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo) (39). Otopina NiCl_2 uvijek je pripremljena svježe prije pokusa kako bi se izbjegao element polimerizacije. Prije uporabe razrijeđena otopina NiCl_2 je filtrirana korištenjem filtera za špricu (Chromafil RC-20/15, 0,2 μm , 15mm, Macherey-Nagel GmbH, Njemačka) (40).

Kako bi se otkrila djevičanska površina tinjca potrebno je ukloniti tanki sloj tinjca koji je neposredno bio izložen okolišu. To se postiže korištenjem selotejp trake, prilikom čega se naglim pokretom otkida površinski sloj tinjca, kako bi se otkrio dio djevičanske i nezagađene površine (21). Ujedno se površina na koju se nanosio uzorak označavala zarezivanjem. Na djevičansku površinu tinjca se dodaje 50 μL 10 mM otopine NiCl_2 te se ostavi 5 minuta u petrijevoj zdjelici pri sobnoj temperaturi. Otopina NiCl_2 se ukloni dodirivanjem ruba tinjca optički čistom maramicom (Kimberly-Clark Inc., Mississauga, ON, Kanada) te se površina ispere tri puta s 200 μL superčiste vode. Na poslijetku funkcionalizacije s NiCl_2 površina tinjca se osuši s mlazom komprimiranog dušika (41,42).

3.2. Funkcionalizacija tinjca poli-L-lizinom

Otopina PLL-a je pripremljena razrjeđivanjem 0,01%-tne otopine (0,01% sterilan i filtriran bioreagens, prigodan za stanične kulture, Sigma Aldrich, Ujedinjeno Kraljevstvo) sa superčistom vodom u omjeru 1:9. Prije uporabe

razrijeđena otopina PLL-a je filtrirana korištenjem filtera za špricu (Chromafil RC-20/15, 0,2 μm , 15mm, Macherey-Nagel GmbH, Njemačka) (43).

Na pripremljen, svježe cijepan tinjac kao pod 3.1. se ispusti 50 μL razrijeđene i filtrirane otopine PLL-a i inkubira u poklopljenoj petrijevoj zdjelici na sobnoj temperaturi 30 minuta. Nakon isteklog vremena otopina PLL-a se uklanja te se površina tinjca ispiri kao pod 3.1 (19,43).

3.3. Uzorak izvanstaničnih vezikula i njegova priprema

Korišteni uzorak u ovoj studiji su kromatografski izolirane IV iz cerebrospinalne tekućine pacijenta s traumatskom ozljedom glave. Uzorak je prikupljen ventrikulostomijom u općoj bolnici Pula (Pula, Hrvatska) uz pristanak Etičkog odbora Opće bolnice Pula, Pula, Hrvatska (broj: URBr 4943/10-1, 17. srpnja 2019.) i člana obitelji. Prikupljanje nije bilo dio diplomskog rada kao ni izolacija vezikula kromatografijom isključivanja po veličini već se provodi u sklopu postojećih projekata na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci. IV u fosfatnom puferu (PBS) kao mobilnoj fazi prilikom kromatografske izolacije su čuvane na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i otapane na ledu do primjene protokola koji uključuje fiksaciju, dehidraciju i sušenje.

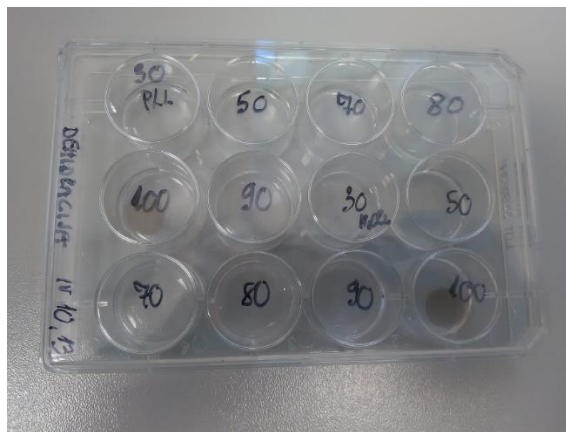
3.3.1. Protokol fiksacije izvanstaničnih vezikula

Fiksacija se izvodi kombinacijom 6%-tnog paraformaldehida (PFA, paraformaldehidna 32%-tna vodena otopina, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, SAD) i 3%-tnog glutaraldehida (GA, glutaraldehidna 25%-tna vodena otopina, Spi Chem, West Chester, PA, SAD) razrijeđenih s PBS-om (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, SAD). Uzorak IV-a u PBS-u se miješa s fiksativom u omjeru 1:1 u mikroepruveti i inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta, a zatim se 50 μL fiksiranog uzorka nanosi na funkcionalizirani tinjac i inkubira još 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Nakon isteklih 30 minuta slijede tri ispiranja s PBS-om i tri ispiranja sa superčistom vodom (28).

3.3.2. Protokol dehidracije izvanstaničnih vezikula u etanolu i sušenja pri kritičnoj točki ugljikovog dioksida

Nakon ispiranja fiksiranih uzoraka slijedi dehidracija IV-a u seriji etanola (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%) (Slika 9). Serijska razrjeđenja etanola rađena su iz 99,98%-tne otopine etanola (Etanol apsolutni, Gram-Mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska) sa superčistom vodom. U svakoj seriji etanola (od 1 mL) uzorci se ostave 10 minuta, no u posljednjoj 100%-tnoj otopini etanola uzorci se ostavljaju do CPD-a (30).



Slika 9. Ploča s 12 jažica u kojoj se odvijala dehidracija uzorka nakon njegove fiksacije. Svaka jažica ispunjena je s jednim od serijskih razrjeđenja etanola (30%-tni, 50%-tni, 70%-tni, 80%-tni, 90%-tni i 100%-tni etanol). U svakoj seriji etanola tinjac s uzorkom je ostavljen 10 minuta, osim u 100%-tnom etanolu u kojem je držan do sušenja pri kritičnoj točki.

Dehidrirani uzorci iz etanola su stavljeni u nosač uzorka (Slika 10a) za sušionik pri kritičnoj točki K850 (Quorum Technologies Ltd, Laughton, Lewes, Istočni Sussex, Ujedinjeno Kraljevstvo, Slika 10b). Nakon što je provjereno da su svi ventili zatvoreni, pokrenuto je hlađenje komore na +5 °C tijekom 4 minute korištenjem ventila za hlađenje. Potom je držač uzorka stavljen u sušionik te se pokrenulo ispiranje tekućim CO₂ prema uputi proizvođača. Postupak namakanja i ispiranja ponovljen je tri puta

kako bi se etanol u uzorku potpuno zamijenio s tekućim CO₂. S ciljem da se tekući CO₂ potpuno otpari, komora se napuni do vrha gornje crvene linije s CO₂, uključi se grijač i komora se stlači pri čemu se stabilni uvjeti (+35 °C, 1250 psi = 8618446 Pa) održavaju 35 minuta. Nakon provedenog sušenja sustav se odzrač i tlak se izjednači s atmosferskim u trajanju od 20 minuta, a potom se osušeni uzorci uklone i ostave u eksikatoru do snimanja na AFM-u.

a)



b)



Slika 10. Nosač uzoraka (a) i sušionik pri kritičnoj točki (b) (Quorum Technologies Ltd, Laughton, Lewes, Istočni Sussex, Ujedinjeno Kraljevstvo). Korišteni uređaj se nalazi u Centru za -mikro i -nano znanosti i tehnologije, NANORI, na Sveučilištu u Rijeci.

3.3.3. Protokol dehidracije u 2,2-dimetoksiopropanu i sušenja u heksametildisilazanu

Uzorak se nakon fiksacije i ispiranja na tinjcu dehidrira u 1 mL zakiseljenog 2,2-DMP-a 10 minuta pri sobnoj temperaturi (45). Priprema zakiseljenog 2,2-DMP-a se odvija neposredno prije upotrebe dodavanjem 5 µL koncentrirane klorovodične kiseline u 5 mL 98%-tnog 2,2-DMP-a (98%-tni 2,2-DMP, Alfa Aesar, GmbH&Co, Njemačka) (32). Nakon provedene dehidracije u kojoj se razvije aceton i metanol, slijede dva ispiranja u 100%-tnom acetonu (Kemika, Zagreb, Hrvatska) od 10 minuta, nakon čega je

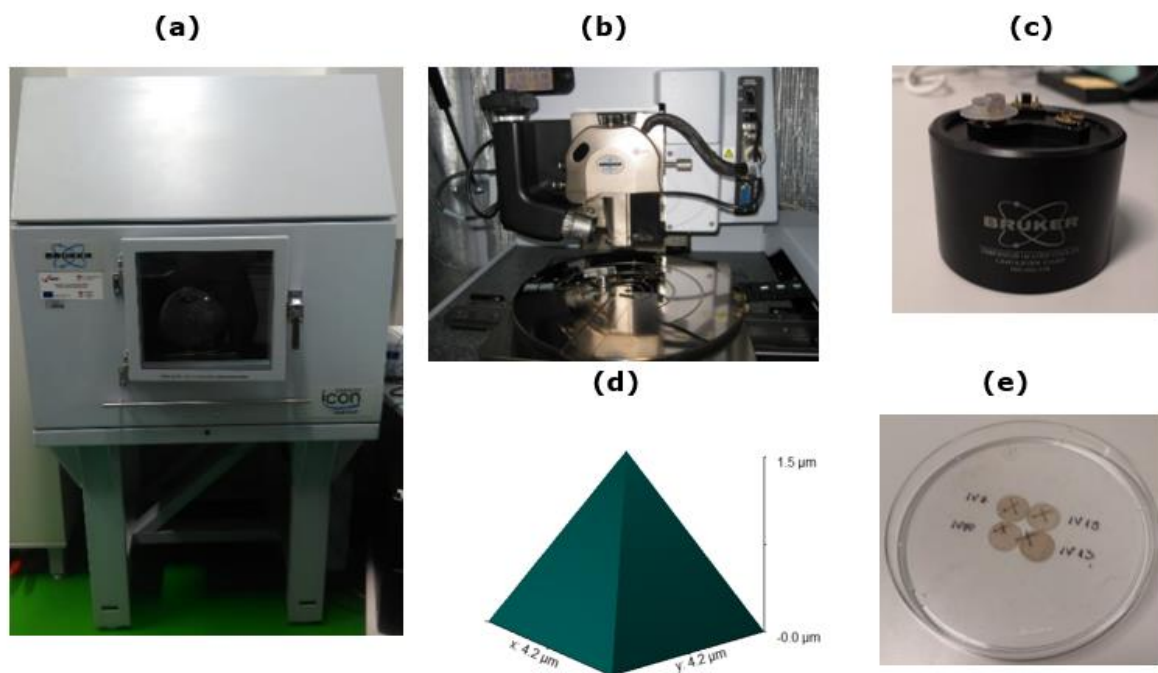
uzorak na tinjcu osušen HMDS-om (HMDS; GPR RECTAPUR, VWR International Ltd, Leuven, Belgija) (45).

Otopine HMDS-a su bile pomiješane s acetonom u omjeru 1:2 HMDS:aceton, 2:1 HMDS:aceton i konačno uzorak je ostavljen 20 minuta u 100%-tnom HMDS-u. Nakon provedenog sušenja u staklenim petrijevim zdjelicama, uzorci su ostavljeni u eksikatoru preko noći do snimanja (46).

3.4. Snimanje mikroskopom atomskih sila

Snimanje uzoraka IV-a izvedeno je AFM-om (Bruker Dimension Icon AFM, Bruker Corporation, Billerica, MA, SAD) (Slika 11a, 11b) načinom tapkanja u zraku. Prvi korak prije pokretanja snimanja je postavljanje sonde (Scanasyst-air, polumjer 2-12 nm, Bruker Corporation, Billerica, MA, SAD) na držača sonde (Slika 11c). Rekonstrukcija površine vrha sonde rađena je na temelju AFM slike površine titana primjenjujući opciju model vrha (engl. *model tip*) u softveru Gwyddion (Slika 11d) i očitavanjem promjera pomoću programa ImageJ. Navedena vrijednost promjera od 6,5 nm primijenjena je za opciju karakterizacije vrha. Potom slijedi ugradnja uzorka postavljenog na podlogu (Slika 11e), definiranje postavki, lasersko poravnanje, usklađivanje fotodetektora te fokusiranje sonde i uzorka prema korisničkom priručniku (4). U konačnici se još postave parametri skeniranja koji su prethodno kalibrirani; parametar vrste podataka, integralno i proporcionalno pojačanje te brzina skeniranja. Korištena je brzina skeniranja od 0,97 Hz te veličina skeniranja od 0,5 μm i 5 μm u jednom smjeru. S obzirom na obrnuto proporcionalan odnos između zadane vrijednosti amplitude i sile koju vrh primjenjuje na uzorak, korištena je zadana vrijednost amplitude od 150 nm. Odabirom ove amplitude zadana vrijednost vršne sile koja je postignuta iznosila je 214,4 pN, što predstavlja blagu silu kojom bi se trebao izbjeći efekt oštećenja uzorka ili trošenja vrha. Pristupanje sonde uzorku ponavljano je frekvencijom od 2 kHz (4).

Za ovu studiju veličina skeniranja je postavljena na $0,5 \mu\text{m} \times 0,5 \mu\text{m}$ za određivanje parametara hrapavosti i za kontrolu fiksativa te $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ za vizualizaciju IV-a. Svaki je uzorak snimljen na nekoliko mjesta te su dobivene dvodimenzionalne topografske slike. Iz četiri mikrofotografije tinjca tretiranog sa sredstvom za funkcionalizaciju, veličine $0,5 \mu\text{m} \times 0,5 \mu\text{m}$ i četiri mikrofotografije tinjca sa sredstvom za funkcionalizaciju i fiksativom, veličine $0,5 \mu\text{m} \times 0,5 \mu\text{m}$, procijenjeni su parametri površinske hrapavosti. Distribucija IV-a po promjeru i visini procijenjena je iz osam mikrofotografija tretiranog tinjca s IV-ama veličine $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$.

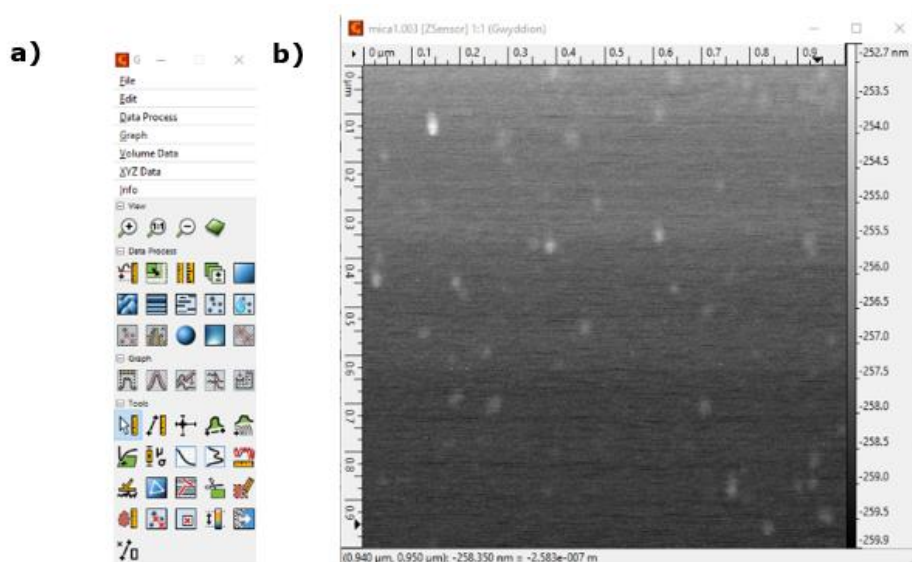


Slika 11. (a) Sustav zvučne/vibracijske izolacije, AVH1000 (Dimension Icon Bruker, Billerica, MA, USA), koji se sastoji od zračnog stola na koji se postavlja Dimension Icon mikroskop atomskih sila (AFM), i zvučne haube, koja se otvara za pristupanje uzorku. **(b) Dimension Icon AFM** (Dimension Icon Bruker, Billerica, MA, USA) koji se nalazi u Centru za -mikro i -nano znanosti i tehnologije, NANORI, na Sveučilištu u Rijeci. **(c) Držak sonde.** **(d) Rekonstruiran vrh sonde piramidalnog oblika promjera $6,5 \text{ nm}$.** Slika snimljena AFM-om Dimension Icon i obrađena softverom Gwyddion. **(e) Podloga s pripremljenim uzorcima** koja se postavlja na prijestolje AFM-a.

3.5. Analizator slike Gwyddion

Gwyddion 2.56 (Czech Metrology Institute, Češka Republika) je softver korišten za analizu topografskih slika IV-a. Softver pruža informacije putem niza operacija za validaciju podataka dobivenih AFM-om, a postupci obrade slika su provedeni prema protokolu korištenom u radu Skliara i Chernysheva. Primijenjeno je poravnanje ravnine snimanja kako bi se uklonio nagib podloge iz podataka skeniranja, dok je poravnanje redova rađeno prema medianu, algoritmu koji pronalazi i uzima prosječnu visinu svake linije skeniranja od podataka. Za uklanjanje ožiljaka, odnosno ustaljenih propusta, opcija „engl. *remove scars*” se aplicirala. Nadalje, kako bi se poravnala površina tinjca na nultoj visini, korištena je „engl. *flattening*” opcija ili opcija izravnjanja. Označavanje čestica prema pragu se implementiralo za lociranje IV-a na skeniranoj površini supstrata, pri čemu se vezikule prikazuju kao čestice koje strše iz podloge iznad odabranog praga. Odabiranjem manjeg praga, 1-3 nm, uklonio se najveći broj pozadinskih smetnji (41).

Za raspodjelu čestica po promjeru korišten je algoritam „engl. *maximum Martin diameter*”, odnosno podaci o najvećoj duljini srednje linije kroz česticu, koji su izvedeni iz Gwyddiona. Za raspodjelu čestica po visini izvedeni su iz Gwyddiona podaci o visini korištenjem opcije „engl. *row/column statistics*”, nakon čega je uslijedila analiza u Microsoft Excelu (Microsoft Corporation, Washington, DC, SAD). Također, spremljeni su i eksperimentalni podaci o površinskoj hrapavosti površine tinjca prije i nakon funkcionalizacije i fiksacije sa sredstvima, korištenjem opcije „engl. *statistical quantities*”. Grafičko korisničko sučelje korištenog softvera Gwyddiona, prikazano na slici 9, sastoji se od glavnog prozora, prozora podataka, prozora grafikona i niza alata za specifične primjene.



Slika 12. (a) Grafičko korisničko sučelje softvera Gwyddion. **(b)** Slika dobivena Gwyddionom, koja sadrži podatke dobivene mjerenjem na mikroskopu atomskih sila.

3.5.1. Parametri hrapavosti profila i površine

Budući da je svrha AFM-a mapiranje topografije površine pri nanometarskoj rezoluciji, primijenjeni parametri za karakterizaciju površinske hrapavosti su 2D parametri hrapavosti (R_a i R_q) i 3D parametri hrapavosti (S_a i S_q). Tim parametrima su opisana srednja aritmetička i srednja kvadratna odstupanja na profilu (R_a , R_q) i na površini (S_a , S_q), a računa ih softver Gwyddion (47). Tekstura površine koja se promatra služi za definiranje parametara, a korištenjem matematičkih izraza svaki parametar se prenosi na oblik površine ili linije (48). Standardni parametri hrapavosti koji su određeni u ovom istraživanju pomoću Gwyddion programa su:

R_q ili R_{RMS} - Drugi korijen srednjeg kvadrata hrapavosti (engl. *root mean square roughness*) izračunat je na temelju korijena srednjeg odstupanja profila formulom:

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{l_r} \int_0^{l_r} z(x)^2 dx} \quad (2)$$

R_a - Srednja hrapavost površine (engl. *average roughness*) izračunata je na temelju aritmetičkog odstupanja profila:

$$R_a = \frac{1}{l_r} \int_0^{l_r} |z(x)| dx \quad (3)$$

Sq- Korijen srednjeg kvadratnog odstupanja površine (engl. *root mean square height*) dobiva se proširivanjem jednadžbe za liniju (2D) na ravninu (3D). Ovaj se parametar izračunava iz drugog središnjeg momenta vrijednosti podataka:

$$s_q = \sqrt{\frac{1}{A} \int \int_A z^2(x,y) dx dy} \quad (4)$$

Sa- Aritmetička sredina apsolutnih odstupanja profila hrapavosti na određenoj površini (engl. *arithmetical mean height*), razlikuje se od Sq vrijednosti po tome što se izračunava iz zbroja apsolutnih vrijednosti razlika podataka od srednje vrijednosti, a ne kvadrata (49):

$$s_a = \frac{1}{A} \int \int_A |z(x,y)| dx dy \quad (5)$$

U navedenim jednadžbama (2-5), $z(x)$ predstavlja visinu površine u 2D dimenziji, $z(x, y)$ je visina površine u 3D dimenziji, l je duljina uzorkovanja, A je područje uzorkovanja, a x i y označavaju osi površine.

3.6. Analiza u ImageJ softveru

Promjer korištenog vrha je određen softverom ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD).

3.7. Statistička analiza

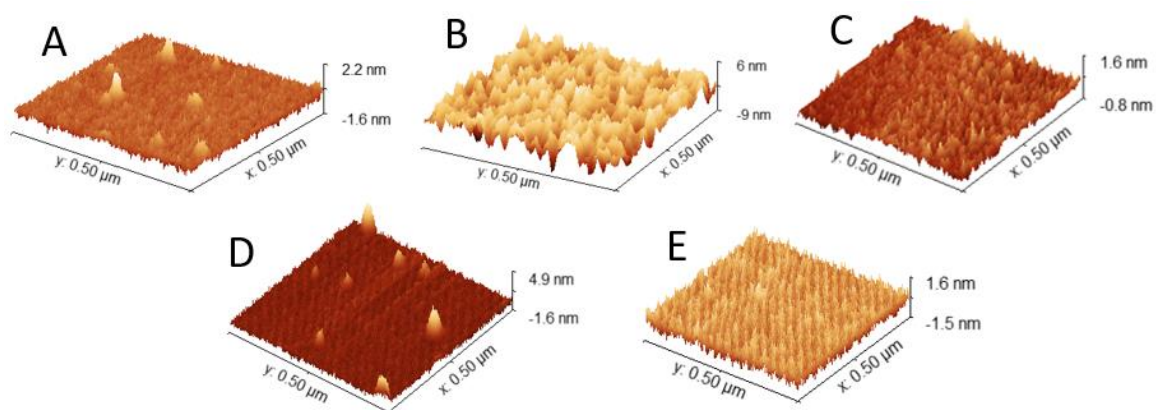
Statistička analiza provedena je softverom Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) uz korištenje neparametrijske inačice t-testa: MannWhitney U-test. Kriterij statističke značajnosti za ovaj test iznosio je $\alpha=0,05$ (5%), pri čemu je razlika između promatranih skupina smatrana značajnom ako je razina statističke značajnosti (p) bila manja od 0,05.

4. Rezultati

4.1. Utjecaj sredstava za funkcionalizaciju i fiksaciju na hrapavost površine tinjca

S obzirom na to da je prvi korak optimizacije vezivanja IV-a na površini tinjca bio funkcionalizirati tinjac s NiCl_2 ili PLL-om, potvrdilo se imaju li korištena sredstva utjecaj na hrapavost površine tinjca i pridonose li prisutnosti nečistoća na površini. Dodatno je istražen utjecaj sredstava za fiksaciju IV-a, PFA/GA, na hrapavost površine i prisutnost nečistoća.

Slika 14. prikazuje reprezentativne 3D topografske AFM slike tinjca prije i nakon ekspozicije sredstvima za funkcionalizaciju i fiksaciju. U odnosu na nativni tinjac (Slika 14A) koji ima prosječnu visinu 4 nm, tinjac s NiCl_2 (Slika 14B) ima prosječnu visinu 8-16 nm, dok tinjac s PLL-om (Slika 14C) ima prosječnu visinu 2 nm.



Slika 14. Reprezentativne 3D topografske slike tinjca prije i nakon ekspozicije sredstvima za funkcionalizaciju i fiksaciju. Nefunkcionaliziran tinjac (A), tinjac funkcionaliziran s 10 mM otopinom niklova(II) klorida (NiCl_2) (B), tinjac funkcionaliziran s 0,001%-tnom otopinom poli-L-lizina (PLL) (C), tinjac funkcionaliziran s NiCl_2 te fiksiran 3%-tnim paraformaldehidom (PFA) : 1,5%-tnim glutaraldehidom (GA) (D), tinjac funkcionaliziran s PLL i fiksiran 3%-tnim PFA-om : 1,5%-tnim GA-om (E).

Primijećene su moguće nečistoće uzrokovane kombinacijom funkcionalizacije s NiCl_2 i fiksacije s PFA-om/GA-om. Za tinjac s NiCl_2 i fiksativom PFA-om/GA-om dobiven je prosječan promjer uočenih čestica

koje nisu IV (nečistoće od fiksativa i PBS-a) od 0,75 nm i prosječna visina 3-6 nm (Slika 14D). Za tinjac s PLL-om i fiksativom ostvaren je prosječan promjer uočenih čestica od 0,86 nm i prosječna visina od 3 nm (Slika 14E).

Nadalje, na istima uzorcima tinjca sa sredstvima za funkcionalizaciju i fiksaciju provedena su mjerenja 2D i 3D parametara hrapavosti, na četiri površine veličine 0,5 μm x 0,5 μm .

Tablica 1. Eksperimentalne vrijednosti 2D i 3D parametara površinske hrapavosti površine tinjca prije i nakon funkcionalizacije poli-L-lizinom i niklovim(II) kloridom te nakon dodatka paraformaldehida i glutaraldehida. Vrijednosti dobivene iz četiri slike dimenzije 0,5 μm x 0,5 μm .

	Eksperiment			
	2D parametar mjerenja		3D parametar mjerenja	
	Rq, nm	Ra, nm	Sq, nm	Sa, nm
tinjac	0,25 \pm 0,04	0,26	0,19 \pm 0,02	0,19
tinjac + 10mM niklov(II) klorid	2,11 \pm 0,22	2,12	1,68 \pm 0,19	1,68
tinjac + 0,001%-tni poli-L-lizin	1,90 \pm 2,14	0,24	0,88 \pm 1,22	0,19
tinjac + 10 mM niklov(II) klorid + paraformaldehid : glutaraldehid 3% : 1,5%	0,45 \pm 0,11	0,55	0,35 \pm 0,05	0,35
tinjac + 0,001%-tni poli-L-lizin + paraformaldehid : glutaraldehid 3% : 1,5%	0,48 \pm 0,26	0,46	0,28 \pm 0,10	0,35

Tablica 1. prikazuje eksperimentalno izmjerene vrijednosti 2D parametara (R_q i R_a) i 3D parametara hrapavosti (S_q i S_a). R_q i S_q vrijednosti za hrapavost nativnog tinjca (0,26 nm; 0,19 nm) se nešto više povećaju ukoliko se tinjac funkcionalizira sa $NiCl_2$ (2,11 nm; 1,68 nm) u odnosu na PLL (1,90 nm; 0,88 nm). Međutim, ukoliko se na funkcionaliziranu površinu dodaje fiksativ (PFA/GA) vrijednosti za hrapavost se ujednačavaju ($R_q \sim 0,45$ nm; $S_q \sim 0,3$ nm).

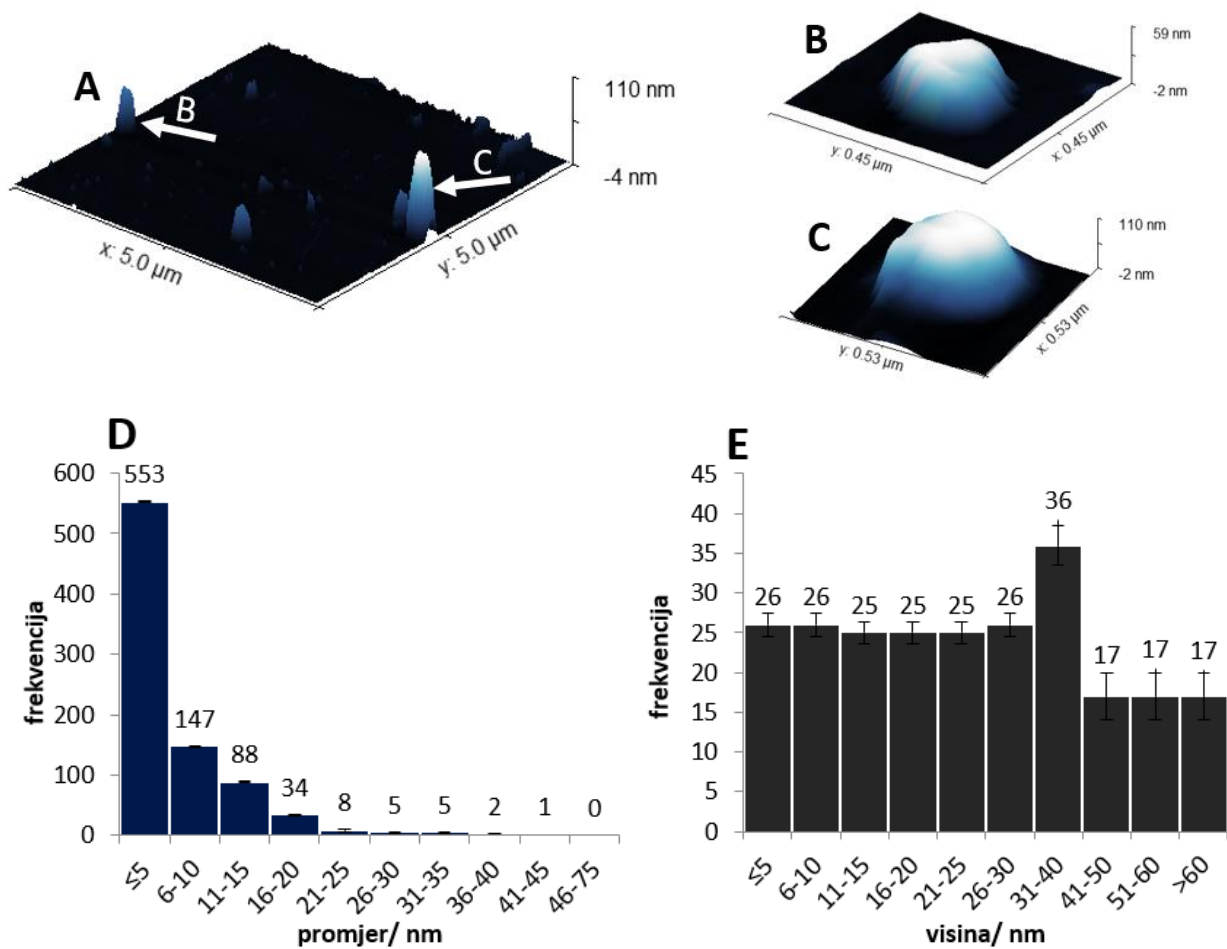
Parametri hrapavosti R_q ; R_a te S_q ; S_a kod nativnog tinjca iznose 0,26 nm; 0,26 nm te 0,19 nm; 0,19 nm. Pri funkcionalizaciji tinjca s $NiCl_2$ parametri hrapavosti R_q ; R_a te S_q ; S_a iznose 2,11 nm; 2,11 nm te 1,68 nm; 1,68 nm. Nakon funkcionalizacije tinjca s $NiCl_2$ i fiksacije s PFA-om/GA-om parametri hrapavosti R_q ; R_a te S_q ; S_a daju vrijednosti 0,45 nm; 0,55 nm te 0,34 nm; 0,34 nm. 2D parametri hrapavosti (R_q ; R_a) pri funkcionalizaciji s PLL-om iznose 1,93 nm; 0,24 nm, dok nakon dodatka fiksativa na PLL funkcionaliziran tinjac 2D parametri daju vrijednosti 0,48 nm; 0,46 nm, a 3D parametri hrapavosti (S_q ; S_a) iznose 0,28 nm; 0,35 nm.

4.2. Utjecaj protokola koji uključuje dehidraciju s etanolom i sušenje pri kritičnoj točki ugljikovog dioksida na morfologiju i raspodjelu veličine izvanstaničnih vezikula

Sljedeći cilj bio je otkriti kako se mijenja morfologija i veličina IV-a nakon tretiranja IV-a različitim metodama. Stoga, nakon određenih parametara hrapavosti, uslijedila je primjena protokola koja je uključivala; funkcionalizaciju tinjca s PLL-om ili NiCl₂, fiksaciju IV-a na tinjcu s PFA-om/GA-om, dehidraciju u gradijentu etanola i CPD.

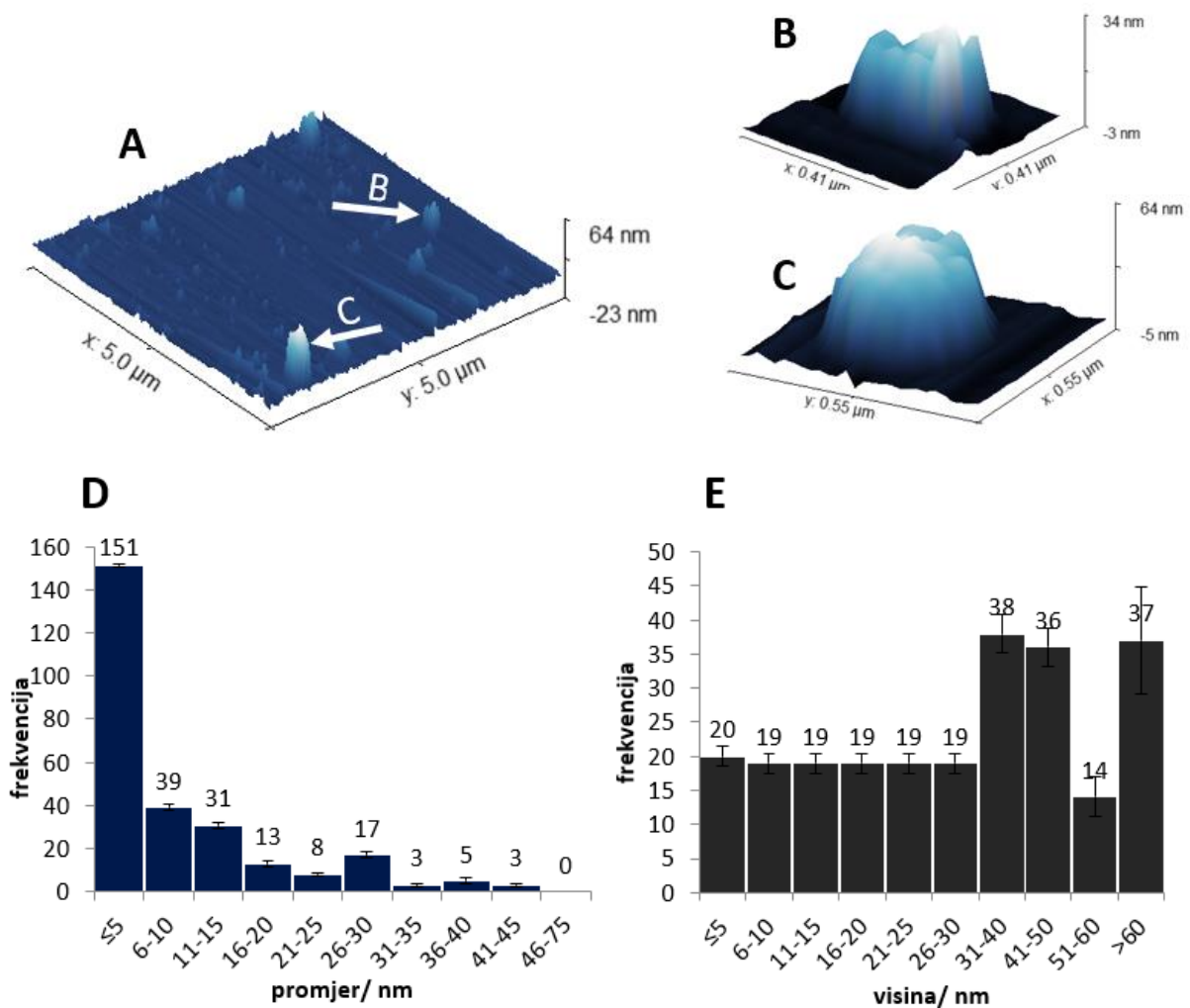
Pragovi za procjenu artefakata na slikama s vezikulama su promjer manji od 0,75 nm i visina manja od 6 nm za tinjac s NiCl₂ i fiksativom te promjer manji od 0,86 nm i visina manja od 3 nm za tinjac s PLL-om i fiksativom.

Prvo je provedena funkcionalizacija tinjca s PLL-om (Metoda 1). Slika 15A prikazuje primjer reprezentativne 5 μm x 5 μm slike od ukupno osam snimljenih mikrofotografija tinjca s IV-ama. Pretraživanjem površine uočene su različiti oblici IV-a; konkavne (engl. *cup-shape*) i okrugle. Reprezentativni oblici označeni strelicom na slici 15A su uvećani i prikazani su na slikama 15B i 15C. Na slici 15B je konkavna struktura vezikule, dok je na slici 15C prikazana okrugla vezikula. Kako bi se odredila veličina čestica vizualiziranih na AFM-u, napravljena je raspodjela čestica po promjeru i visini (Slika 15D i Slika 15E). Ovom metodom pripreme uzorka ukupno je detektirano 843 čestica po promjeru, od čega je jedna čestica kategorizirana kao artefakt. Nadalje, ovom metodom pripreme uzorka detektirano je 240 čestica po visini, od kojih se 17 čestica smatra artefaktom jer se nalazi pri visini manjoj od 3 nm. Najveća frekvencija čestica je dobivena u području promjera manjem od 5 nm i visine 31-40 nm. Nisu prisutne velike devijacije po pitanju promjera, dok devijacije za visinu dosežu do 3 nm za kategorije veće od 40 nm. Najmanji broj čestica dobiven je u području većem od 46 nm za promjer i u području većem od 41 nm za visinu.



Slika 15. (A) 3D prikaz površine tinjca funkcionalizirane s poli-L-lizinom na kojoj su fiksirane izvanstanične vezikule (IV), dehidrirane u etanolu i sušene pri kritičnoj točki ugljikovog dioksida, dimenzija slike je 5 μm x 5 μm. 3D prikaz konkavne IV (engl. *cup-shape*) (B) i IV okruglog oblika (C). Distribucija veličine fiksniranih IV-a s obzirom na promjer (D) i visinu (E) uz prikaz standardne devijacije. Podaci su dobiveni analizom osam 5 μm x 5 μm slika snimljenih mikroskopom atomskih sila.

Nadalje, metodom koja je kombinirala NiCl_2 funkcionalizaciju IV-a, dehidraciju u etanolu i CPD (Metoda 2) dobiveni su rezultati prikazani na slici 16. Slika 16A prikazuje $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ AFM sliku izoliranih čestica na zraku, na kojoj su uočeni su različiti oblici IV-a; konkavne i multirežnjaste (engl. *multilobed*). Reprezentativni oblici označeni strelicom na slici 16A su uvećani i prikazani su na slikama 16B i 16C. AFM slika konkavne vezikule prikazana je na slici 16B, dok je na slici 16C opažena multirežnjasta vezikula. Veličina čestica vizualiziranih na AFM-u određena je raspodjelom čestica po promjeru i visini (Slika 16D i Slika 16E). Ovom metodom pripreme uzorka ukupno je detektirano 270 čestica po promjeru, pri čemu je jedna čestica kategorizirana kao artefakt. Uz to, ovom metodom pripreme uzorka detektirano je 240 čestica po visini, od kojih se 24 čestice smatraju artefaktom jer se nalaze pri visini manjoj od 6 nm. Najveća frekvencija čestica je dobivena u području promjera manjem od 5 nm i visine 31-40 nm. Nisu prisutne velike devijacije po pitanju promjera, dok su prisutne velike devijacije za visinu do čak 7,76 nm za kategoriju čestica većih od 60 nm. Najmanji broj čestica dobiven je u području 31-35 nm za promjer i u području 51-60 nm za visinu.

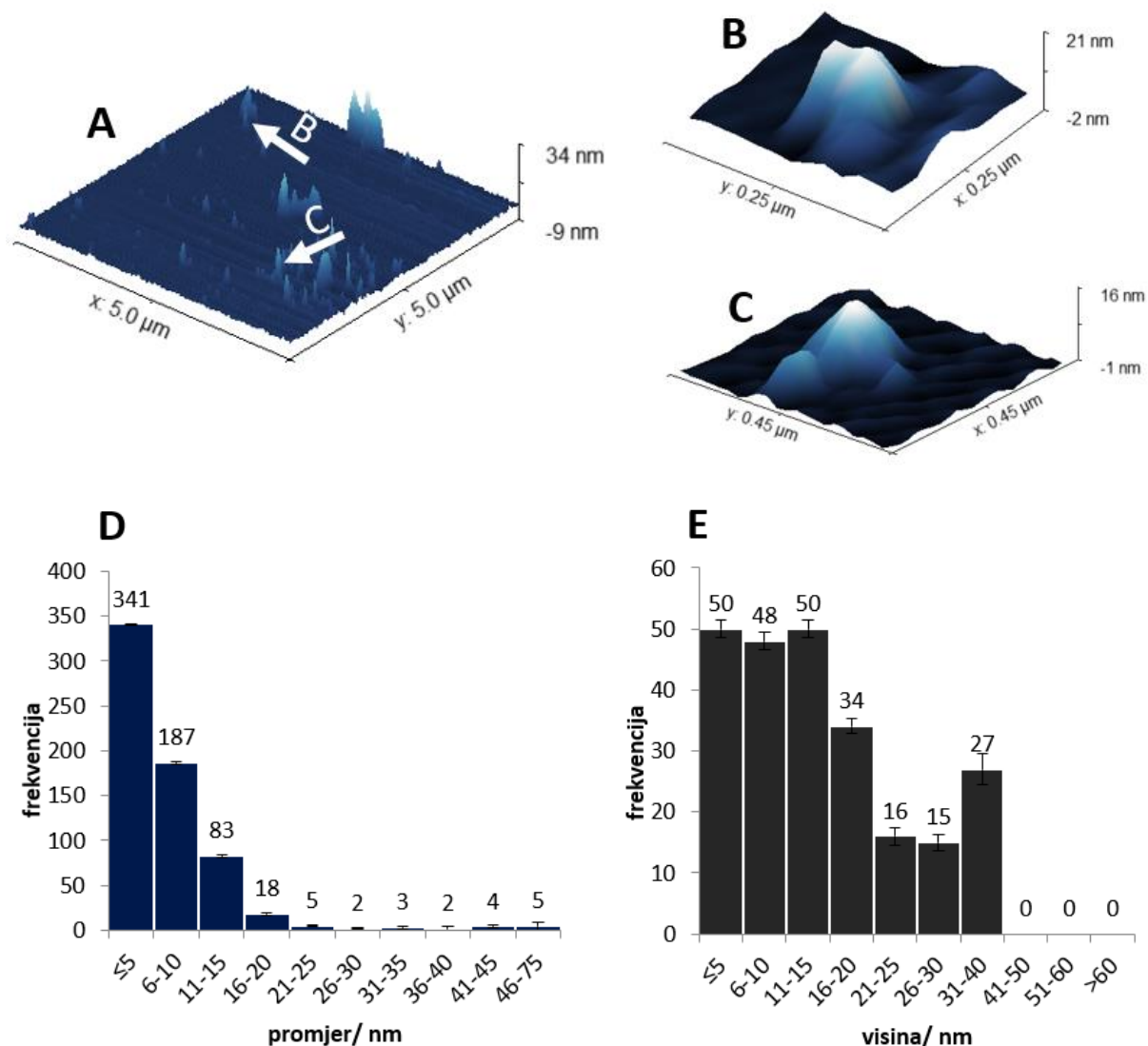


Slika 16. (A) 3D prikaz površine tinjca funkcionalizirane s niklovim(II) kloridom na kojoj su fiksirane izvanstanične vezikule (IV) dehidrirane u etanolu i sušene pri kritičnoj točki ugljikovog dioksida, dimenzija slike je 5 μm x 5 μm . 3D prikaz IV konkavnog oblika (B) i multireznjaste strukture (C). Distribucija veličine fiksiranih IV-a s obzirom na promjer (D) i visinu (E) uz prikaz standardne devijacije. Podaci su dobiveni analizom osam 5 μm x 5 μm slika snimljenih mikroskopom atomskih sila.

4.3. Utjecaj protokola koji uključuje dehidraciju s 2,2-dimetoksiopropanom i sušenje heksametildisilazanom na morfologiju i raspodjelu veličine izvanstaničnih vezikula

Sljedeći provedeni eksperiment sastojao se od utvrđivanja kako se mijenja morfologija i veličina IV-a nakon tretiranja sljedećim metodama: PLL ili NiCl₂ funkcionalizacija tinjca, fiksacija IV-a s PFA-om/GA-om, dehidracija u 2,2-DMP-u i sušenje u HMDS-u.

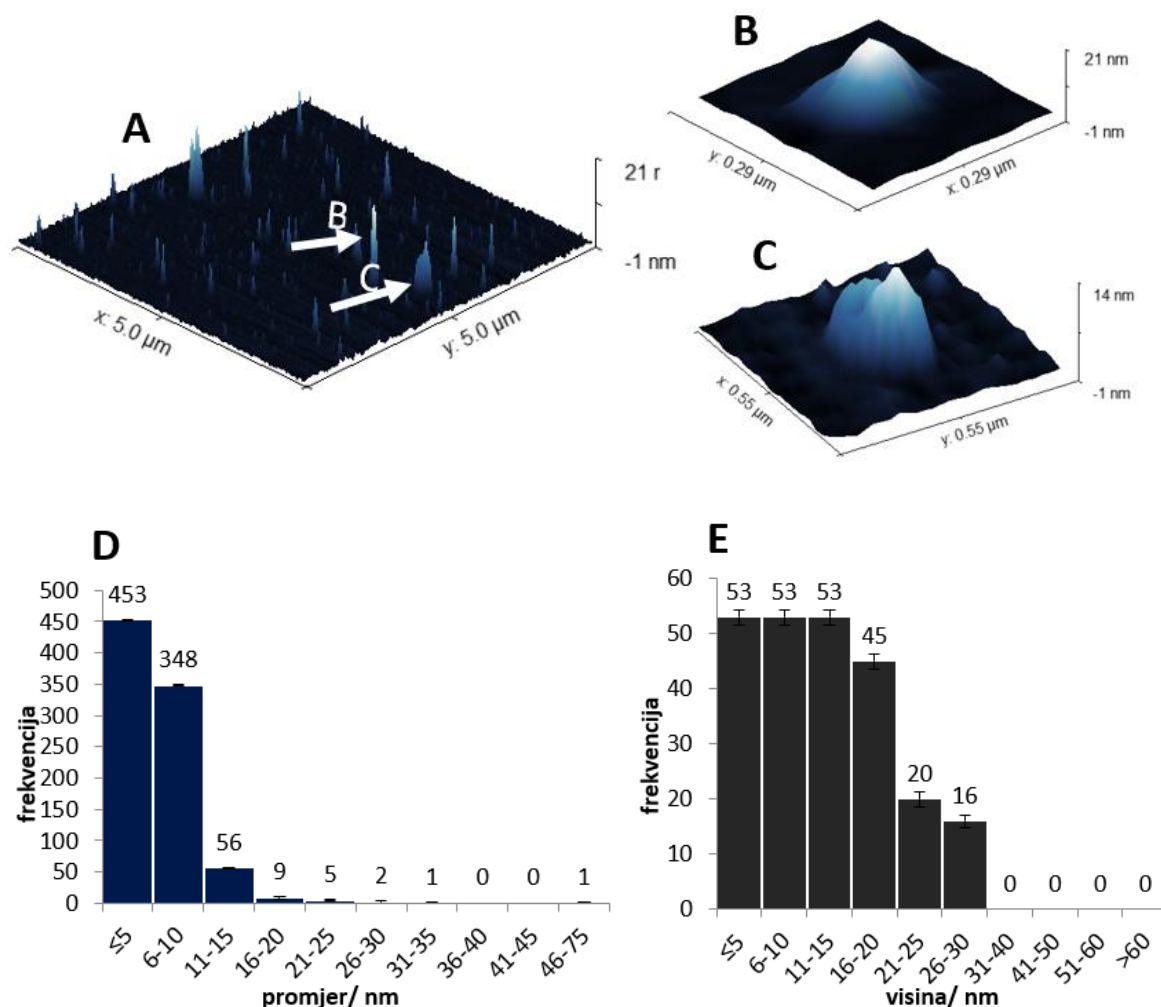
Prvo se provela funkcionalizacija tinjca s PLL-om (Metoda 3) i dobiveni su sljedeći rezultati prikazani na slici 17. Slika 17A prikazuje 5 μm x 5 μm AFM sliku izoliranih vezikula. Pregledavanjem površine detektirani su različiti oblici IV-a, ali najveći broj je nepravilnih struktura s jednim ili više vrhova. Reprezentativni oblici označeni strelicom na slici 17A su uvećani i prikazani su na slikama 17B i 17C. Na slikama 17B i 17C su vezikule nepravilne strukture. Ovom metodom pripreme uzorka detektirano je 650 čestica po promjeru, od čega je jedna čestica kategorizirana kao artefakt. Nadalje, ovom metodom pripreme uzorka otkriveno je 240 čestica po visini, od kojih se 31 čestica smatra artefaktom jer se nalazi pri visini manjoj od 3 nm. Najveća frekvencija čestica u kojoj nisu artefakti je dobivena u području promjera 11-15 nm i visine 16-20 nm. Nisu prisutne velike devijacije po pitanju promjera, dok devijacije za visinu dosežu do 2,5 nm za kategoriju 31-40 nm. Najmanji broj čestica dobiven je u području 26-30 nm i 36-40 nm za promjer i u području većem od 41 nm za visinu.



Slika 17. (A) 3D prikaz površine tinjca funkcionalizirane s poli-L-lizinom na kojoj su fiksirane izvanstanične vezikule (IV), dehidrirane u 2,2-dimetoksipropanu i sušene heksametildisilazanom, dimenzija slike je 5 μm x 5 μm. 3D prikaz IV-a nepravilnog obika s jednim ili više vrhova (B) (C). Distribucija veličine fiksniranih IV-a s obzirom na promjer (D) i visinu (E) uz prikaz standardne devijacije. Podaci su dobiveni analizom osam 5 μm x 5 μm slika snimljenih mikroskopom atomskih sila.

Četvrta metoda primijenjena za vizualizaciju vezikula uključivala je NiCl₂ funkcionalizaciju IV-a, dehidraciju s 2,2-DMP-om i sušenje u HMDS-u (Metoda 4). Slika 18A prikazuje 5 μm x 5 μm AFM sliku izoliranih vezikula i njihovu raspodjelu veličine na slikama 18D i 18E. Proučavanjem snimljene površine nije ustanovljena niti jedna okrugla struktura, već samo jedna konkavna i nepravilne strukture. Reprezentativni oblici označeni strelicom

na slici 18A su uvećani i prikazani su na slikama 18B i 18C. Čestica nepravilnog oblika nalazi se na slici 18B, dok je na slici 18C konkavna vezikula.



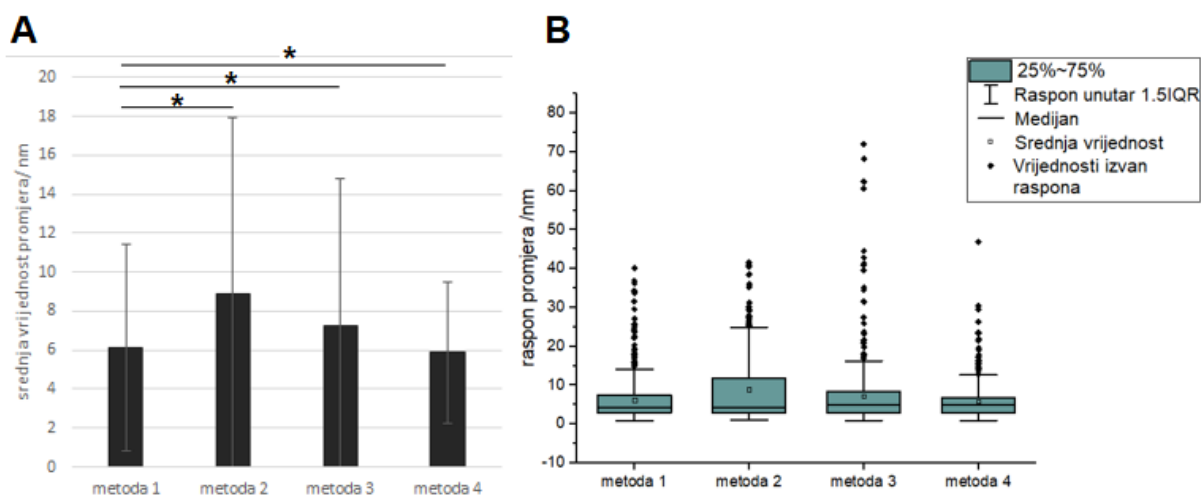
Slika 18. (A) 3D prikaz površine tinjca funkcionalizirane s niklovim(II) kloridom na kojoj su fiksirane izvanstanične vezikule (IV) dehidrirane u 2,2-dimetoksiopropanu i sušene heksametildisilazanom, dimenzija slike je 5 μm x 5 μm. 3D prikaz IV-a nepravilnog (B) i engl. *cup-shape* oblika (C). Distribucija veličine fiksiranih IV-a s obzirom na promjer (D) i visinu (E) uz prikaz standardne devijacije. Podaci su dobiveni analizom osam 5 μm x 5 μm slika snimljenih mikroskopom atomskih sila.

Ovom metodom pripreme uzorka ukupno je primijećeno 875 čestica po promjeru te ni jedna čestica nije kategorizirana kao artefakt. Također, ovom metodom pripreme uzorka otkriveno je 240 čestica po visini, od kojih se 64 čestica smatra artefaktom jer se nalazi pri visini manjoj od 6 nm. Najveća

frekvencija čestica u kojoj nisu artefakti je dobivena u području promjera 11-15 nm i visine 6-15 nm. Nisu prisutne velike devijacije ni za vrijednosti promjera ni visine. Najmanji broj čestica dobiven je u području promjera 36-45 nm i visine veće od 31 nm.

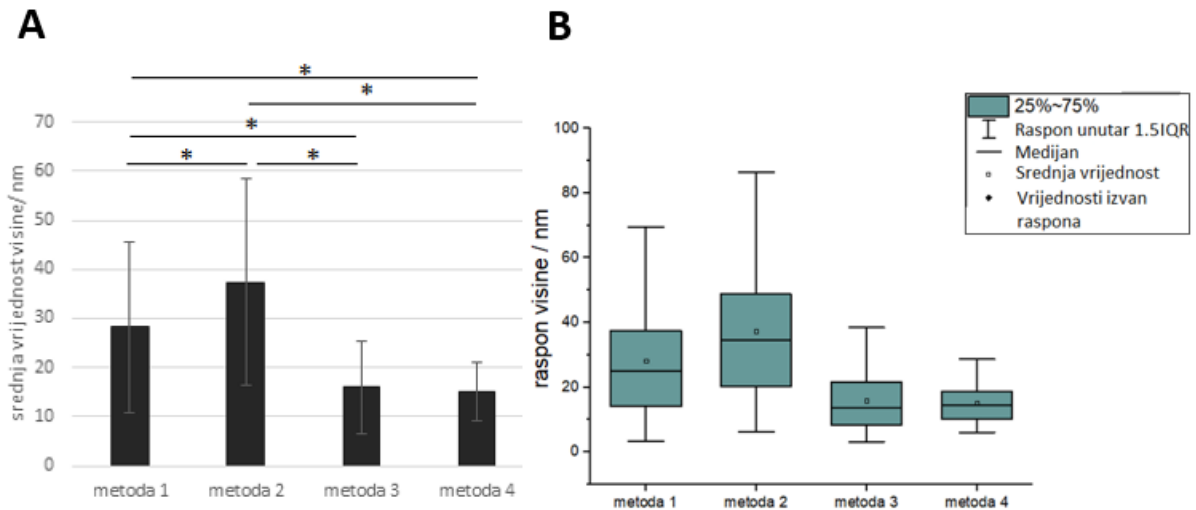
Najveći broj čestica, kada se oduzmu artefakti, po promjeru je detektiran Metodom 4 (875), nakon toga Metodom 1 (842) i Metodom 3 (649), a najmanji broj čestica je detektiran Metodom 2 (269) (Slika 15-18). Uz to, najveći broj čestica po visini, izuzevši artefakte, uočen je Metodom 1 (223), potom Metodom 2 (216) i Metodom 3 (209) te u konačnici najmanje je detektirano čestica Metodom 4 (176).

Nakon provedene sve četiri metode, kako bi se usporedile i odredila ona optimalna za vizualizaciju IV, rađena je statistička analiza u softveru Origin. Srednja vrijednost promjera najviša je pri Metodi 2 (8,90 nm), potom pri Metodi 3 (7,26 nm) i Metodi 1 (6,12 nm), a najmanja je kod Metode 4 (5,87 nm). Najveća standardna devijacija od srednje vrijednosti promjera dobivena je za Metodu 2 (9,03), zatim za Metodu 3 (7,52) i Metodu 1 (5,30), a najmanja standardna devijacija uočena je kod Metode 4 (3,64) (Slika 19A). Najveći raspon promjera dobiven je za Metodu 2 (1,06-25 nm), dok je najuži raspon dobiven za Metodu 4 (0,90-12 nm) (Slika 19B). Najviše vrijednosti koje jako odstupaju od osnovnog skupa podataka (engl. *outliers*) primijećeno je Metodom 1 (21) i Metodom 3 (21), dok ih je najmanje zastupljeno Metodom 2 (15).



Slika 19. Srednja vrijednost promjera izvanstaničnih vezikula (IV) ovisno o metodi tretiranja nakon oduzetih artefakata sa snimljene slike mikroskopom atomskih sila. (A) Promjer IV-a prikazan kao srednja vrijednost (stupci) sa standardnom devijacijom (linijska oznaka). Mann-Whitney test korišten je da se pokaže značajna razlika između skupina (* <math><0,05</math> razina značajnosti). (B) Grafički prikaz numeričkih podataka o promjeru uz vertikalno orijentirane box plot-ove. Prikazani su podaci medijana sa interkvartilnim rasponom (IQR). Visina pravokutnika odgovara IQR-u, linije koje se protežu iz pravokutnika označavaju varijabilnost izvan IQR-a (raspon unutar 1,5 IQR-a), medijan je označen kao crta, srednja vrijednost točkom, a vrijednosti izvan raspona (engl. *outliers*) malim kvadratićima. Metoda 1: funkcionalizacija s poli-L-lizinom (PLL), dehidracija s etanolom i sušenje pri kritičnoj točki ugljikovog dioksida (CPD). Metoda 2: funkcionalizacija s niklovim(II) kloridom (NiCl_2), dehidracija s etanolom i CPD. Metoda 3: funkcionalizacija s PLL-om, dehidracija s 2,2-dimetoksiopropanom (2,2-DMP), sušenje heksametilidisilazanom (HMDS). Metoda 4: funkcionalizacija s NiCl_2 , dehidracija s 2,2-DMP-om i sušenje HMDS-om.

Srednja vrijednost visine najviša je za Metodu 2 (37,37 nm), nešto manja je pri Metodi 1 (28,18 nm) i Metodi 3 (15,94 nm), a najmanja je pri Metodi 4 (15,09 nm). Najveća standardna devijacija od srednje vrijednosti visine dobivena je za Metodu 2 (21,06), potom za Metodu 1 (17,48) i Metodu 3 (9,54), a najmanja standardna devijacija primijećena je kod Metode 4 (5,98) (Slika 20A). Najveći raspon visine dobiven je za Metodu 2 (80,297 nm), dok je najuži raspon dobiven za Metodu 4 (22,644 nm) (Slika 20B). Također, niti jedna vrijednost visine unutar ove četiri metode se nije pokazala kao engl. *outlier*.



Slika 20. Srednja vrijednost visine izvanstaničnih vezikula (IV) ovisno o metodi tretiranja nakon oduzetih artefakata s početne snimljene slike. (A) Visina IV-a prikazana kao srednja vrijednost (stupci) sa standardnom devijacijom (linijska oznaka). Mann-Whitney test korišten je da se pokaže značajna razlika između skupina (* <math><0,05</math> razina značajnosti). (B) Grafički prikaz numeričkih podataka o visini uz vertikalno orijentirane box plot-ove. Prikazani su podaci medijana s interkvartilnim rasponom (IQR). Visina pravokutnika odgovara IQR-u, linije koje se protežu iz pravokutnika označavaju varijabilnost izvan IQR-a (raspon unutar 1,5 IQR-a), medijan je označen kao crta, srednja vrijednost točkom, a vrijednosti izvan raspona (engl. *outliers*) malim kvadratićima. Metoda 1: funkcionalizacija s poli-L-lizinom (PLL), dehidracija s etanolom i sušenje pri kritičnoj točki ugljikovog dioksida (CPD). Metoda 2: funkcionalizacija s niklovim(II) kloridom (NiCl_2), dehidracija s etanolom i CPD. Metoda 3: funkcionalizacija s PLL-om, dehidracija s 2,2-dimetoksiopropanom (2,2-DMP), sušenje heksametilidisilazanom (HMDS). Metoda 4: funkcionalizacija s NiCl_2 , dehidracija s 2,2-DMP-om i sušenje HMDS-om.

5. Rasprava

IV su potencijalni neinvazivni dijagnostički biomarkeri, koji bi se u budućnosti mogli koristiti za probir kandidata za određenu strategiju liječenja i uspostavljanje dijagnoze. To svojstvo proizlazi iz toga jer sudjeluju u komunikaciji između stanica te prenose molekule tereta poput proteina, genetskog materijala i informacija o bolesti (6). Međutim, zbog njihove male veličine kvalifikacija i kvantifikacija ovih čestica ostaje izazovna. Pristupačna i dostupna alternativa zlatnom standardu karakterizacije IV-a, kriogenoj transmisijskoj elektronskoj mikroskopiji, koja je skupa i zahtjevna, je mikroskopija atomskih sila (41). Ovim radom AFM-om je ispitan utjecaj funkcionalizacije tinjca na vezivanje i vizualizaciju IV-a izoliranih iz humanog likvora pacijenta s traumatskom ozljedom glave. Metoda ovoga rada odnosi se na pripremu uzorka IV-a na podlozi od tinjca, uz modifikaciju negativno nabijene površine tinjca u površinu s pozitivnim nabojem, koja u konačnici elektrostatički privlači IV. Stoga, u ovom istraživanju površina tinjca je modificirana s otopinom PLL-a i NiCl_2 te je promatrana AFM-om u načinu tapkanja na zraku za definiranje površinske hrapavosti kako bi se stekla visoka rezolucija snimanja topografije. Nadalje, s obzirom da su u literaturi dostupni različiti protokoli pripreme IV-a za vizualizaciju AFM-om, ovim radom pokušano je ujediniti i optimizirati četiri protokola pripreme IV-a na tinjcu korištenjem kombinacije metoda dehidracije i sušenja IV-a. S ciljem da se odredi ona optimalna, proučio se njihov utjecaj na morfologiju i raspodjelu veličine IV-a.

Postupak funkcionalizacije i imobilizacije je izuzetno bitan kod AFM-a u načinu tapkanja na zraku jer se njime treba osigurati ravnoteža između dobrog vezanja nanočestica, koje se neće izgubiti korištenjem prilično grubih metoda dehidracije i prejakog vezanja, kojim će se čestice spljoštiti (6). Iz topografija površina tinjca prije i nakon primjene određenog sredstva

funkcionalizacije (NiCl₂ ili PLL), uočen je veći utjecaj NiCl₂ (Slika 14B) na hrapavost površine tinjca od PLL-a (Slika 14C). Međutim, primjenom fiksativa PFA/GA u kombinaciji sa sredstvima za funkcionalizaciju uočeno je ujednačavanje hrapavosti površine tinjca. Budući da su Sabihah i sur. odredili da je niža hrapavost (Rq) bitna za učinkovito vezanje nanočestica na tinjac, uspoređene su Rq vrijednosti hrapavosti tinjca s PLL-om/NiCl₂ i PFA-om/GA-om (17). Podaci iz Tablice 1 pokazuju niže vrijednosti hrapavosti za tinjac funkcionaliziran s PLL-om od tinjca funkcionaliziranog s NiCl₂, no primjena fiksativa ujednačava Rq vrijednosti hrapavosti tinjca kod obje funkcionalizacije. Stoga, oba sredstva funkcionalizacije jednako utječu na efektivno vezanje IV-a.

Podaci o 2D i 3D parametrima hrapavosti (Tablica 1) potvrđuju dobro slaganje između rezultata dobivenih za 2D parametre hrapavosti (Rq; Ra) kao i dobro slaganje između rezultata za 3D parametre hrapavosti (Sq; Sa) kod nativnog tinjca i pri funkcionalizaciji tinjca s NiCl₂ te fiksacijom s PFA-om/GA-om. Time je označena ujednačenost izmjerenih površina te je vidljiv neznatan utjecaj nečistoća na hrapavost. S druge strane, nije utvrđeno dobro slaganje između 2D parametara hrapavosti pri funkcionalizaciji s PLL-om što predlaže da površina tinjca nakon provedene funkcionalizacije nije posve ujednačena. Međutim, nakon dodatka fiksativa na PLL funkcionaliziran tinjac dolazi do slaganja između rezultata 2D parametara i 3D parametara hrapavosti, odnosno, hrapavost se ujednačava. Izmjerene vrijednosti Rq; Ra hrapavosti nativnog tinjca (0,26 nm; 0,19 nm) su u popriličnom skladu s literaturnim vrijednostima koje su dobili Sabihah i sur. (0,38 nm; 0,24 nm), dok su eksperimentalne vrijednosti Rq hrapavosti tinjca s NiCl₂ (2,12 nm) više od onih koje navodi Hsueh i sur. (0,3 nm) (17,50). Uz to, izmjerene vrijednosti Rq; Ra hrapavosti tinjca s PLL-om (0,24 nm; 0,19 nm) su niže od literaturnih vrijednosti koje navodi Sabihah i sur (0,91 nm; 0,72 nm) (17). To može biti razlog različite korištene

molekularne mase PLL-a, kao i različitog održavanja i pripreme otopina NiCl_2 , jer u radu Hsueha i sur. otopina NiCl_2 nije pripremana sviježe prije pokusa. Također, uzorci u radu Hsueha i sur. su čuvani u spremnicima ispunjenim suhim dušikom do mjerenja na AFM-u, dok su uzorci korišteni za ovaj rad bili čuvani u eksikatoru do snimanja (50).

U nastavku istraživanja proučavala se morfologija i distribucija veličine promjera i visine IV-a snimljenih AFM-om, nakon njihove fiksacije, dehidracije i sušenja na funkcionaliziranom supstratu od tinjca s četiri različite metode. IV su tretirane sljedećim metodama: funkcionalizacija s PLL-om, fiksacija s PFA-om/GA-om, dehidracija s etanolom i CPD (Metoda 1), funkcionalizacija s NiCl_2 , fiksacija, dehidracija s etanolom i CPD (Metoda 2), funkcionalizacija s PLL-om, fiksacija, dehidracija s 2,2-DMP-om, sušenje HMDS-om (Metoda 3), funkcionalizacija s NiCl_2 , fiksacija, dehidracija s 2,2-DMP-om i sušenje HMDS-om (Metoda 4). Na snimljenoj površini su tražene različite strukture IV-a: okrugle, konkavne, nepravilne i s različitim izbočenjima. Nepravilni oblici su također istraživani budući da intrinzična svojstva IV-a, kao što je krutost, mogu dovesti do njih (6). Iz dobivenih rezultata (Slika 15-18) vidljivo je da sve primijenjene metode tretiranja IV-a dobro vežu IV na funkcionaliziran tinjac te je utjecaj artefakata beznačajan (čestice procijenjene ispod 0,75 nm i 0,86 nm promjera i ispod 3-6 nm visine, dobiveno izračunom promjera i visine tinjca s PLL-om/ NiCl_2 i fiksativom PFA-om/GA-om). Utjecaj funkcionalizacije s PLL-om doveo je do glatkije površine na kojoj su uočene poneke nepravilne čestice (Slika 15 i 17), dok je funkcionalizacija s NiCl_2 dovela do hrapavije površine na kojoj su osim vezikula primijećeni i nepravilni oblici koji bi mogli odgovarati istaloženim solima iz fosfatnog pufera, korištenom kao mobilna faza kod izolacije IV-a kromatografijom isključenja po veličini (Slika 18). Više je IV-a nepravilnog oblika dobiveno prilikom dehidracije s 2,2-DMP-om i sušenja s HMDS-om (Slika 17 i 18).

Osim djelovanja primijenjenih metoda na oblik IV-a, primjetan je učinak i na raspodjelu veličine promjera i visine IV-a. Metoda 2 i Metoda 3 pokazuju veći promjer, ali manju ujednačenost veličine promjera od Metode 1 i Metode 4 (Slika 19.). Uz to, Mann-Whitney test pokazao je statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) vrijednosti promjera između Metode 1 s Metodama 2, 3 i 4. Međutim, nema statistički značajne razlike srednje vrijednosti promjera između Metode 2 i Metode 3 ($p = 0,58$), Metode 2 i Metode 4 ($P = 0,70$) te između Metode 3 i Metode 4 ($p = 0,10$). Također, Metoda 3 i Metoda 4 pokazuju manju srednju vrijednost visine, ali veću ujednačenost veličine visine od Metode 1 i Metode 2 (Slika 20). Prema Mann-Whitney testu pokazala se statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između vrijednosti visina uzoraka, osim između Metode 3 i Metode 4, među kojima ne postoji statistički značajna razlika vrijednosti visine ($p = 0,57$).

Budući da Metoda 2 jedina pokazuje ujednačen broj detektiranih čestica prema promjeru (269 uz 0,37% artefakata) i visini (216 uz 10% artefakata), veću srednju vrijednost promjera ($8,90 \pm 9,03$) i visine ($37,37 \pm 21,06$) s većom standardnom devijacijom od ostalih metoda, smatra se optimalnom metodom za pripremu IV-a za vizualizaciju AFM-om. Ostale metode ne prikazuju ujednačen broj detektiranih čestica prema promjeru i visini, no sljedećom najboljom metodom može se imenovati Metoda 3, prilikom koje je otkriveno 649 IV-a prema promjeru (uz 0,15% artefakata) i 209 IV-a prema visini (uz 13% artefakata). Uz to, ova metoda također ima veću srednju vrijednost promjera od Metode 1 i Metode 4 uz veće odstupanje ($7,26 \text{ nm} \pm 7,52$), ali manju srednju vrijednost visine uz manje odstupanje ($15,94 \text{ nm} \pm 9,54$). Treća najbolja metoda prema dobivenim vrijednostima je Metoda 1 s ukupno detektirane 842 IV prema promjeru (uz 0,12% artefakata) i 223 IV prema visini (uz 7,1% artefakata), koja pak ima manju srednju vrijednost promjera uz manje odstupanje ($6,12 \pm 5,30$), ali veću srednju vrijednost visine uz veće odstupanje ($28,18 \text{ nm} \pm 17,48$).

Najmanje slaganje između broja detektiranih čestica ostvareno je Metodom 4 uz 875 IV prema promjeru (uz 0% artefakata) i 176 IV-a prema visini (uz 27% artefakata). Prema tome PLL i NiCl₂ su se pokazali jednako dobrim sredstvima za funkcionalizaciju tinjca. Prilikom detekcije IV-a mali broj čestica je kategoriziran kao artefakt prema promjeru (0% - 0,37%) i visini (7,1% - 27 %), stoga se korišteni pragovi mogu smatrati objektivnima.

Ovo istraživanje temelji se na kriteriju selekcije IV-a po sferičnosti, promjeru i visini, međutim potrebne su buduće studije koje će identificirati određene vrste IV-a iz cerebrospinalne tekućine ljudi metodama koje se baziraju na imuno-interakcijama. Imuno-interakcijama s antitijelima mogli bi detektirati IV između ostalih čestica na temelju proteinskih markera poput CD9, CD63, CD81, od globularnih proteina i liposoma (6).

6. Zaključak

Najprikladnija metoda za pripremu fiksiranih IV-a PFA-om/GA-om za vizualizaciju na AFM-u u načinu tapkanja na zraku uključuje funkcionalizaciju tinjca s NiCl_2 , dehidraciju s etanolom i CPD.

Funkcionalizirana površina tinjca s PLL-om ili NiCl_2 jednako efektivno veže IV. Dodatno, funkcionalizacija s NiCl_2 je rezultirala hrapavijom površinom tinjca na kojoj su osim vezikula primijećeni i nepravilni oblici, koji bi mogli odgovarati istaloženim solima fosfatnog pufera, koji je korišten kao mobilna faza prilikom izolacije IV-a kromatografijom isključenja po veličini.

Mali postotak AFM-om identificiranih čestica prema promjeru i visini pripadao je artefaktima, što potvrđuje da su korišteni pragovi promjera te pragovi visine bili prikladni za ovaj tip analize. Svakom korištenom metodom uočili su se prepoznatljivi oblici IV-a; sferični, konkavni, multirezni i nepravilne strukture s više vrhova.

Ograničavajući čimbenik ovog istraživanja je nemogućnost odjeljivanja IV-a od ostalih čestica iste veličine kromatografijom isključenja po veličini. U cilju razlikovanja određenih populacija IV-a, u daljnjim istraživanjima trebale bi se primijeniti metode koje se baziraju na imuno-interakcijama antigena na IV-ama i specifičnog antitijela za njihovo razlikovanje od ostalih čestica jednake veličine, primjerice globularnih proteina i liposoma.

7. Literatura

1. JPK Instruments AG. The NanoWizard® AFM Handbook. 2005.;1-4.
2. Chanbai S, Weber M. Accuracy of Surface Topography Characterization Tools. Encyclopedia of Tribology. Springer US; 2013. 9–16 str.
3. Introduction to Scanning Probe Microscopy (SPM) Basic Theory Atomic Force Microscopy (AFM) [Internet]. [citirano 19. ožujak 2022.]. Dostupno na: https://asdlab.org/onlineArticles/ecourseware/Bullen/SPMModule_BasicTheoryAFM.pdf
4. Dimension Icon User Guide [Internet]. [citirano 19. ožujak 2022.]. Dostupno na: http://nanophys.kth.se/nanophys/facilities/nfl/afm/icon/bruker-help/Content/Cover_page.htm
5. Sinha Ray S. Techniques for characterizing the structure and properties of polymer nanocomposites. Environmentally Friendly Polymer Nanocomposites. Woodhead Publishing; 2013. 74–88 str.
6. Malenica M, Vukomanović M, Kurtjak M, Masciotti V, Dal Zilio S, Greco S, i ostali. Perspectives of microscopy methods for morphology characterisation of extracellular vesicles from human biofluids. Biomedicines. 2021.;9(6):1-22.
7. Wang H, Chu PK. Surface Characterization of Biomaterials [Internet]. Characterization of Biomaterials. Elsevier; 2013. 105–174 str. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-415800-9.00004-8>
8. Xu K, Sun W, Shao Y, Wei F, Zhang X, Wang W, i ostali. Recent development of PeakForce Tapping mode atomic force microscopy and its applications on nanoscience. Nanotechnol Rev. 2018.;7(6):605–21.
9. PeakForce Tapping | Bruker [Internet]. [citirano 01. lipanj 2022.]. Dostupno na: <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microscopes/materials-afm/afm-modes/peakforce-tapping.html>
10. Bruker Corporation. PeakForce QNM - User Guide. 2010.;1-53.
11. Hosseinali F, Thomasson JA. Probing of Nanoscale Friction and Mechanical Characteristics of Cotton Fiber's Surface. Fibers. 2019.;7(7):64.
12. Shen J, Zhang D, Zhang FH, Gan Y. AFM tip-sample convolution effects for cylinder protrusions. Appl Surf Sci [Internet]. 2017.;422:482–91. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.06.053>
13. Flater EE, Zacharakis-Jutz GE, Dumba BG, White IA, Clifford CA. Towards easy and reliable AFM tip shape determination using blind tip reconstruction. Ultramicroscopy [Internet]. 2014.;146:130–43. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultramic.2013.06.022>
14. Hardij J, Cecchet F, Berquand A, Gheldof D, Chatelain C, Mullier F, i ostali. Characterisation of tissue factor-bearing extracellular vesicles with AFM: Comparison of air-tapping-mode AFM and liquid peak force AFM. J Extracell Vesicles. 2013.;2(1):2.
15. Liquid Scanning with Atomic Force Microscopy [Internet]. [citirano 26. kolovoz 2021.]. Dostupno na: <https://www.afmworkshop.com/newsletter/liquid-scanning-with-an-atomic-force-microscope>
16. Tapping Mode - MikroMasch [Internet]. [citirano 26. kolovoz 2021.]. Dostupno na: <https://www.spmtips.com/how-to-choose-by-AFM-technique-tapping-mode.html>

17. Sabihah ZN, Aziz AA, Zakaria ND. Functionalization Of Mica Surface Using Poly-L-Lysine (PLL). 2020.;677–82.
18. Lyubchenko YL, Shlyakhtenko LS, Ando T. Imaging of nucleic acids with atomic force microscopy. *Methods* [Internet]. 2011.;54(2):274–83. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.02.001>
19. Gruber E, Bergen L, Salou P, Lattouf E, Grygiel C, Wang Y, i ostali. High resolution AFM studies of irradiated mica - Following the traces of swift heavy ions under grazing incidence. *J Phys Condens Matter*. 2018.;30(28):2.
20. Haynes PJ, Main HS, Pyne AL, Pyne A, Hadfield R. Atomic Force Microscopy of DNA and DNA-Protein Interactions. 2020. [citirano 01. lipanj 2022.]; Dostupno na: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bncemate>
21. Yang L, Czajkowsky DM, Sun J, Hu J, Shao Z. Anomalous Surface Fatigue in a Nano-Layered Material. *Adv Mater*. 2014.;26(37):6478–82.
22. Poly-L-Lysine Cell Attachment Protocol [Internet]. [citirano 05. rujan 2021.]. Dostupno na: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/3d-cell-culture/poly-lysine-product>
23. Thomson NH. Atomic Force Microscopy of DNA Structure and Interactions. *Biosyst - Investig by Scanning Probe Microsc*. 2010.;389–426.
24. Poly- L -lysine 0.01 , sterile-filtered, BioReagent, cell culture mammalian 25988-63-0 [Internet]. [citirano 12. svibanj 2022.]. Dostupno na: <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigma/p4707>
25. Chao Y, Zhang T. Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011.;92(2):381–92.
26. Darvell BW. *Materials Science for Dentistry. More Chemistry*. Woodhead Publishing; 2018. 771–789 str.
27. Kiernan JA. Formaldehyde, Formalin, Paraformaldehyde And Glutaraldehyde: What They Are And What They Do. *Micros Today* [Internet]. siječanj 2000. [citirano 01. lipanj 2022.];8(1):8–13. Dostupno na: <https://www.cambridge.org/core/journals/microscopy-today/article/formaldehyde-formalin-paraformaldehyde-and-glutaraldehyde-what-they-are-and-what-they-do/911F1870567E2487D56A51140EB8EA17>
28. Qin Y, Jiang W, Li A, Gao M, Liu H, Gao Y, i ostali. The combination of paraformaldehyde and glutaraldehyde is a potential fixative for mitochondria. *Biomolecules*. 2021.;11(5):1–14.
29. Zhou W, Apkarian R, Wang ZL, Joy D. Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). *Scanning Microsc Nanotechnol Tech Appl*. 2007.;1–40.
30. Baričević V. Protocol optimisation for the visualisation of extracellular vesicles from cerebrospinal fluid of patients with traumatic brain injury on scanning electron microscope. *Diplomski rad*. Rijeka: Sveučilište u Rijeci. 2021.,10-20.
31. DEHYDRATION OF TISSUES | HISTOLOGICAL TECHNIQUES [Internet]. [citirano 09. rujan 2021.]. Dostupno na: <https://paramedicsworld.com/histological-techniques/dehydration-of-tissues/medical-paramedical-studynotes>

32. Conway K, Kiernan JA. Chemical dehydration of specimens with 2,2-dimethoxypropane (DMP) for paraffin processing of animal tissues: Practical and economic advantages over dehydration in ethanol. *Biotech Histochem.* 1999.;74(1):20–6.
33. Maser MD, Trimble JJ. Rapid chemical dehydration of biologic samples for scanning electron microscopy using 2,2-dimethoxypropane. *J Histochem Cytochem [Internet].* 1977. [citirano 01. lipanj 2022.];25(4):247–51. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/67137/>
34. Bhattacharya R, Saha S, Kostina O, Muravnik L, Mitra A. Replacing critical point drying with a low-cost chemical drying provides comparable surface image quality of glandular trichomes from leaves of *Millingtonia hortensis* L. f. in scanning electron micrograph. *Appl Microsc.* 2020.;50(1):2-5.
35. Brief Introduction to Critical Point Drying | Science Lab | Leica Microsystems [Internet]. [citirano 10. rujanj 2021.]. Dostupno na: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/brief-introduction-to-critical-point-drying/>
36. Muri HI, Hoang L, Hjelme DR. Mapping nanoparticles in hydrogels: A comparison of preparation methods for electron microscopy. *Appl Sci.* 2018.;8(12):1–14.
37. Schu M, Terriac E, Koch M, Paschke S, Lautenschläger F, Flormann DAD. Scanning electron microscopy preparation of the cellular actin cortex: A quantitative comparison between critical point drying and hexamethyldisilazane drying. *PLoS One.* 2021.;16(7 July):1–27.
38. Sharma S, LeClaire M, Wohlschlegel J, Gimzewski J. Impact of isolation methods on the biophysical heterogeneity of single extracellular vesicles. *Sci Rep [Internet].* 2020.;10(1):1–11. Dostupno na: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70245-1>
39. Guo F, Wang F, Wang Y, Zhang W, Wang X, Zhao L, i ostali. Imaging of DNA molecules by atomic force microscope. *Conf Progr Dig - 7th Int Conf Manip Manuf Meas Nanoscale, IEEE 3M-NANO 2017.* 2018-January:315–8
40. Zhang N, Brugger J, Etschmann B, Ngothai Y, Zeng D. Thermodynamic modeling of poorly complexing metals in concentrated electrolyte solutions: An X-ray absorption and UV-Vis spectroscopic study of Ni(II) in the NiCl₂-MgCl₂-H₂O system. *PLoS One.* 2015.;10(4):1–23.
41. Skliar M, Chernyshev VS. Imaging of extracellular vesicles by atomic force microscopy. *J Vis Exp.* 2019.;2019(151):1–13.
42. Zhang X, Tang Q, Wu L, Huang J, Chen Y. AFM visualization of cortical filaments/network under cell-bound membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2015.;1848(10):2225–32.
43. Grobelny J, DelRio FW, Pradeep N, Kim DI, Hackley VA, Cook RF. Size measurement of nanoparticles using atomic force microscopy. *Methods Mol Biol [Internet].* 2011. [citirano 01. lipanj 2022.];697:71–82. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21116955/>
44. Piétremont O, Pastré D, Fusil S, Jeusset J, David MO, Landousy F, i ostali. Reversible Binding of DNA on NiCl₂-Treated Mica by Varying the Ionic Strength. *Langmuir [Internet].* 01. travanj 2003. [citirano 01. lipanj 2022.];19(7):2536–9. Dostupno na: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la026942u>
45. Hussain MA, Ahmed D, Anwar A, Perveen S, Ahmed S, Anis I, i ostali. Combination Therapy of Clinically Approved Antifungal Drugs Is Enhanced by Conjugation with Silver Nanoparticles. *Int Microbiol.* 2019.;22(2):239–46.

46. Pardo YA, Florez C, Baker KM, Schertzer JW, Mahler GJ. Detection of outer membrane vesicles in *Synechocystis* PCC 6803. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 21. rujana 2015. [citirano 01. lipanj 2022.];362(20):2. Dostupno na: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26363014/>
47. Barišić G. Razvoj etalona hrapavosti za nanomjeriteljstvo. Doktorska disertacija. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu. 2011.,88-94.
48. Turkalj L. Mjerenje 3D parametara hrapavosti mikroskopom atomskih sila. Završni rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu. 2020.,2-4.
49. Statistical Analysis [Internet]. [citirano 17. ožujak 2022.]. Dostupno na: <http://gwyddion.net/documentation/user-guide-en/statistical-analysis.html>
50. Hsueh C, Chen H, Gimzewski JK, Reed J, Abdel-Fattah TM. Localized nanoscopic surface measurements of nickel-modified Mica for single-molecule DNA sequence sampling. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2010.;2(11):3249–56.

8. Životopis

Marta Dević

Datum rođenja: 25/11/1998

Državljanstvo: hrvatsko

Spol: Žensko

(+385) 0998575262

martadevic.2511@hotmail.com

Ul. Josipa Jelačića 12, 35425, Davor, Hrvatska

RADNO ISKUSTVO

01/09/2021 – TRENUTAČNO – rijeka, Hrvatska

CENTAR ZA -MIKRO I -NANO ZNANOSTI I TEHNOLOGIJE, NANORI – IZV. PROF. DR. SC. MLADENKA MALENICA; ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU, SVEUČILIŠTE U RIJECI

Rad na znanstvenom projektu Sveučilišta u Rijeci „Uspostava protokola na Sveučilištu u Rijeci za primijenu nanotehnoloških metoda: mikroskopije atomskih sila i skenirajućeg elektronskog mikroskopa prilikom vizualizacije i karakterizacije egzosoma“ .

- priprema uzoraka za analizu
- statistička analiza (obrada rezultata u Gwyddionu i Microsoft Excelu)

<https://nanori.uniri.hr/lperhnt/hr/>

Radmile Matejčić, 2, 51000, Rijeka

09/12/2021 – 09/01/2022 – Rijeka, Hrvatska

ASISTENT U UČENJU STUDENATA NA KOLEGIJU "OPĆA I ANORGANSKA KEMIJA" – STUDIJFARMACIJE, MEDICINSKI FAKULTET, SVEUČILIŠTE U RIJECI

Pomoć pri izvođenju laboratorijskih vježbi iz kolegija Opća i anorganska kemija uz

03/2022 – Rijeka, Hrvatska

ASISTENT U UČENJU STUDENATA NA KOLEGIJU "OPĆA KEMIJA" – ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU, SVEUČILIŠTE U RIJECI

Pomoć pri izvođenju laboratorijskih vježbi iz kolegija Opća kemija.

01/07/2020 – 15/07/2020 – Slavonski Brod, Hrvatska

OBVEZNA PRAKSA – LJEKARNE "FURIĆ"

Rad u ljekarnoj sastojao se od:

- izrada magistralnih pripravaka
- skladištenje i preuzimanje lijekova
- priprema razrijeđenog alkohola

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

20/09/2020 – TRENUTAČNO – Radmile Matejčić2, Rijeka, Hrvatska

MAGISTAR MEDICINSKE KEMIJE, MAG. MED. CHEM. – Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

Kolegiji:

- Razvoj i registracija lijekova, Prirodni spojevi i njihova upotreba u farmakologiji, Razvoj i registracija lijekova, Koloidi, Instrumentalne metode kemijske analize, Primjena svjetla u medicinskoj kemiji, Fizikalno organska računarska kemija, Kemometrija, Odabrane teme organske sinteze
- Statistika i analiza znanstvenih rezultata, Dizajn biološki aktivnih molekula računalnim metodama

Naučene metode analize:

- masena spektrometrija, ATR analiza, MALDI

Područja obrazovanja:

- Medicinska kemija

Diplomski rad: Utjecaj funkcionalizacije tinjca s niklovim kloridom i poli-L-lizinom na vezivanje i vizualizaciju izvanstaničnih vezikula iz cerebroskopske tekućine ljudi mikroskopijom atomskih sila

<http://biotech.uniri.hr/hr/>

01/09/2017 – 16/09/2020 – Radmile Matejčić2, Rijeka, Hrvatska

SVEUČILIŠNA PRVOSTUPNICA BIOTEHNOLOGIJE I ISTRAŽIVANJA LIJEKOVA, UNIV. BACC. BIOTECHN. ET. PHARM. INV. – Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci

Položeni kolegiji:

- Opća kemija, Analitička kemija, Organska kemija, Uvod u anorgansku kemiju, Biokemija, Fizikalna kemija
- Stanična i molekularna biologija, Mikrobiologija, Imunologija, Opća toksikologija, Osnove molekularne medicine, Farmakognozija i prirodni proizvodi, Farmakologija, Opća fiziologija i patofiziologija
- Kemoinformatika

Korištene metode analize:

- kromatografija (TLC, GC, LC), spektroskopija (UV/Vis, FTIR/ATR), izolacija DNA i gel elektroforeza, RTPCR, ELISA

Korišteni programi u računalnom dizajnu lijekova: Avogadro, ChemAxonMarvin, VMD, GAMESSMacMolPlot, PyMol, Chimera

Područja obrazovanja:

- Biotehnologija i istraživanje lijekova
4,537 (na skali 1,00 - 5,00); magna cum laude

<http://biotech.uniri.hr/hr/>

01/09/2013 – 02/06/2017 – Trg kralja Tomislava 9, Nova Gradiška, Hrvatska

SREDNJOŠKOLSKO OBRAZOVANJE – Gimnazija "Nova Gradiška"

Područja obrazovanja

- Opća gimnazija

<http://gimnazija-nova-gradiska.skole.hr/>

POČASTI I NAGRADE

22/03/2019

Stipendija Brodsko-posavske županije za izvrsnost – Brodsko posavska županija

2019.-trenutno

DODATNO OBRAZOVANJE

08/06/2020 – 24/06/2020

Online ljetna škola "Patofiziologije aktualnih javnozdravstvenih problema i bolesti"

Saint Cloud State University (SAD) & Odjel za biotehnologiju (Sveučilište u Rijeci)

03/2018 – 03/2018

Zimska škola znanstvenog pisanja

Sveučilište u Rijeci

<https://drive.google.com/file/d/16YCQU8zfkOSmS0la0cOXBeLnsH0lhCpv/view?usp=sharing>

01/02/2022 – 04/06/2022

Online tečaj prodajnog predstavnika „Groundwork for Success in Sales Development“

SV academy, Salesforce i Coursera

https://drive.google.com/file/d/16NYRuCghLvsA4bQ8addCTQ_DyFLf2hAl/view?usp=sharing

LABORATORIJSKE I RAČUNALNE VJEŠTINE

Laboratorijske vještine

Analiza različitih uzoraka:

-kemijskim tehnikama: kromatografija (TLC, GC, LC), ATR analiza, mikroskopija, MALDI masa spektrometrija, spektroskopija (UV/vis, IR), neutralimetrija, kompleksometrijske titracije, taložne titracije, oksido-redukcijske titracije, potenciometrijska titracija

-odjeljivanje sastojaka smjese ekstrakcijom, filtracija pri sniženom tlaku, vruća filtracija i vakumska filtracija

-biološkim tehnikama: izolacija DNA, gel elektroforeza, PCR u stvarnom vremenu, FISH, uzgoj bakterija, ELISA

-određivanje koncentracije proteina po Lowry-ju, fluorimetrijsko određivanje koncentracije proteina

Računalne vještine na molekularnim programima

Analiza podataka na molekularnim programima:

- Avogadro, ChemAxonMarvin, VMD, WinGAMES, MacMolPlot, PyMol, Chimera, R program, LigPlus, Spark, MedCalc, Statistica, Microsoft Excel, KinTek

JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: **HRVATSKI**

Drugi jezici:

	RAZUMIJEVANJE	GOVOR		PISANJE
	Slušanje Čitanje	Govorna produkcija	Govorna	
ENGLESKI C2	C1	B2	B2	C1
NJEMAČKI A1	A2	A1	A2	A2

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

DIGITALNE VJEŠTINE

Microsoft Office

Social media

Instagram

Facebook

WhatsApp

Internet user

LinkedIn

Zoom

Outlook

Skype

Google Docs

Google Drive

Gmail

VOZAČKA DOZVOLA

Vozačka dozvola: B

STUDENSKI POSLOVI

Svoje komunikacijske vještine unaprijedila sam zahvaljujući studentskim poslovima (rad u trgovinama i restoranima) gdje sam imala priliku raditi s mnogo različitih ljudi. Sezonski poslovi pomogli su mi da postanem prilagodljiva i odgovorna. Za mene je od velike važnosti što mi je ovo iskustvo omogućilo brzu prilagodbu različitim timovima te sam stoga sposobna za timski rad, ali volim raditi i samostalno. Otvorena sam za nova iskustva.