



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ**

**Маја Д. Нешић**

**ИСПИТИВАЊЕ МОГУЋНОСТИ КОРИШЋЕЊА  
НАНОЧЕСТИЦА  $\text{TiO}_2$  КАО НОСАЧА ЗА ЦИЉАНУ И  
КОНТРОЛИСАНУ ДОСТАВУ ЛЕКОВА НА БАЗИ  
КОМПЛЕКСА ПРЕЛАЗНИХ МЕТАЛА**

**Докторска дисертација**

**Крагујевац, 2018**

<b>I. Аутор</b>	
Име и презиме:	Маја Д. Нешић
Датум и место рођења:	22.05.1984. год., Сарајево, БиХ
Садашње запослење:	Истраживач сарадник у Институту за нуклеарне науке „Винча“, Београд
<b>II. Докторска дисертација</b>	
Наслов:	Испитивање могућности коришћења наночестица $TiO_2$ као носача за циљану и контролисану доставу лекова на бази комплекса прелазних метала
Број страница:	122
Број слика:	43
Број библиографских података:	326
Установа и место где је рад израђен:	Институт за нуклеарне науке „Винча“, Београд
Научна област(УКД):	Хемија(54)-Неорганска хемија(546)
Ментор:	др Маријана Петковић, научни саветник
<b>III. Оцена и одбрана</b>	
Датум пријаве теме:	14.10.2015. год.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације:	ННВ Природно-математичког факултета: 1040/VI-1, 28.10. 2015. год. Стручно Веће за природно-математичке науке: IV-01-631/6, 10.11.2015. год.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:	1. др Маријана Петковић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке „Винча“, Београд <i>Ужа научна област:</i> Неорганска хемија 2. др Живадин Д. Бугарчић, редовни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац, <i>Ужа научна област:</i> Неорганска хемија 3. др Биљана Петровић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац, <i>Ужа научна област:</i> Неорганска хемија
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:	1. проф. др Срећко Трифуновић, редовни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац <i>Ужа научна област:</i> Неорганска хемија 2. др Марија Радоичић, научни сарадник, Институт за нуклеарне науке „Винча“, Београд <i>Научна област:</i> Хемија <i>Ужа научна област:</i> Нанотехнологија 3. др Милутин Степић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке „Винча“, Београд <i>Научна област:</i> Физика <i>Ужа научна област:</i> Фотоника 4. др Зоран Шапоњић, научни саветник, Институт за нуклеарне науке „Винча“, Београд <i>Научна област:</i> Хемија <i>Ужа научна област:</i> Нанотехнологија 5. проф. др Биљана Петровић, ванредни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац, <i>Ужа научна област:</i> Неорганска хемија
Датум одбране докторске дисертације:	.2018. год.

*Мојим родитељима и породици*

Ова докторска дисертација је рађена у Институту за нуклеарне науке „Винча“, Универзитета у Београду, под менторским руководством др Маријане Петковић. Обухвата мултидисциплинарна истраживања која су укључивала помоћ, савете и тимски рад људи из различитих научних области чиме се посебно поносим, а сама тема дисертације за мене је била велики изазов.

Посебну захвалност дугујем својој менторки, др Маријани Петковић. Особи која је уз мене била од самих почетака, од дипломског, преко мастер рада и сада докторске дисертације. Која је имала вере у моје способности и пружила ми прилику да започнем своју научну каријеру. Неизмерно сам захвална и на дивном, пријатељском односу, на великом стрпљењу, подршци и пренешеном знању током целог пута научног сазревања.

Захваљујем се др Зорану Шапоњићу и др Марији Радоичић на свом пруженом знању, стручној помоћи, сугестијама и саветима који су ми помогли да решим бројне недоумице са којима сам се сусрела током истраживања и писања дисертације.

Веома сам захвална др Милутину Степићу на великој помоћи, уложеном труду и подршци током експерименталног рада, писања и прегледа докторске дисертације, као и на дивној сарадњи.

Др Лели Корићанац, др Јелени Жакули и др Андреји Лесковац захваљујем се на великој помоћи приликом извођења биолошког дела истраживања, интерпретацији, тумачењу резултата, корисним саветима, добронамерности и пријатељској атмосфери током целокупног заједничког рада.

Захвална сам и сарадницима мог истраживачког тима, посебно Њви Поповић, Марији Нишавић, као и нашој колегиници Шини Камчевој на пријатељству, искреној подршци и размени знања коју су ми пружиле у току израде дисертације. Захваљујем се и свим осталим колегама из Института за нуклеарне науке „Винча“.

Захваљујем се проф. др Живадину Бугарчићу, проф. др Срећку Трифуновићу и проф. др Биљани Петровић на учешћу у комисији за преглед, оцену и одбрану тезе. Такође им се захваљујем и на корисним и добронамерним саветима током израде и писања докторске тезе. Захваљујем се и сарадницама групе проф. др Бугарчић Јовани, Снежи, Ани и Мири на свој пруженој помоћи.

Највећу захвалност дугујем мојим родитељима који су, на себи својствен начин, проживљавали сваки мој корак у научној каријери, а својим ми поносом, вером, подршком и безграничном љубављу дали крила и помогли ми да истрајем. Сви моји успеси су и ваша велика заслуга. Мојој тетци Соњи на великој помоћи, неизмерној љубави и бризи велико хвала јер ми је омогућила завршну фазу писања тезе.

Мојој ћерки Теодори која је била уз мене цео пут писања и припреме одбране тезе. Хвала ти што си баш мене изабрала за своју маму и изабрала савршен тренутак да нас усређиш и ућеш у наше животе а тиме даш додатну мотивацију и елан да ова дисертација угледа завршну фазу.

Мом мужу Александру, мом животном ослоњу, највеће хвала на помоћи, стрпљењу, разумевању, неизмерној подршци и љубави пруженој у тренуцима када је то било најпотребније.

Маја Нешић



## Списак радова и саопштења Маје Нешић

### 1. Научни радови објављени у међународним часописима:

**1.1. Maja Radisavljević**, Tina Kamčeva, Iva Vukićević, Marija Radoičić, Zoran Šaponjić, Marijana Petković,

*Colloidal TiO<sub>2</sub> nanoparticles as substrates for M(S)ALDI mass spectrometry of transition metal complexes,*

*Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2012, **26**, 2041–2050.

ISSN/ISBN 0951-4198, DOI: 10.1002/rcm.6320

**IF 2.846**

**M21**

**1.2. Maja Nešić**, Iva Popović, Andreja Leskovic, Zoran Šaponjić, Marija Radoičić, Milutin Stepić, Marijana Petković,

*Testing the photo-sensitive nanocomposite system for potential controlled metallo-drug delivery,*

*Optical and Quantum Electronics*, 2016, **48**, 119

ISSN/ISBN 0306-8919, DOI: 10.1007/s11082-016-0421-5

**IF 1.290**

**M22**

**1.3. Maja Nešić**, Iva Popović, Andreja Leskovic, Marijana Petković,

*Biological activity and binding properties of [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] complex to bovine serum albumin, phospholipase A<sub>2</sub> and glutathione,*

*Biomaterials*, 2016, **29**, 921-933

ISSN/ISBN 0966-0844, DOI: 10.1007/s10534-016-9964-y

**IF 2.503**

**M22**

**1.4. Maja Nešić**, Jelena Žakula, Lela Korićanac, Milutin Stepić, Marija Radoičić, Iva Popović, Zoran Šaponjić, Marijana Petković

*Light controlled metallo-drug delivery system based on the TiO<sub>2</sub>-nanoparticles and Ru-complex,*

*Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2017, **347**, 55-66

ISSN/ISBN 1010-6030, DOI: 10.1016/j.jphotochem.2017.06.045

**IF 2.625**

**M22**

## 2. Радови саопштени на националним научним конференцијама

### 2.1. Maja Nešić, Jelena Žakula, Lela Korićanac, Milutin Stepić, Iva Popović, Boris Rajčić, Marijana Petković,

*System for photodynamic cancer therapy based on TiO<sub>2</sub> and Ru-complex*

53<sup>rd</sup> Meeting of the Serbian Chemical Society,

Kragujevac, Serbia, June 10-11, 2016, Book of abstracts, page 56.

M64

## 3. Радови саопштени на међународним научним конференцијама:

### 3.1. Maja Nešić, Andreja Leskovic, Marija Radoičić, Iva Popović, Zoran Šaponjić, Marijana Petković,

*Genotoxicity of TiO<sub>2</sub> based carrier for metallo-drugs and its influence on the antioxidative cell status,*

11<sup>th</sup> YSA PhD Symposium,

Viena, Austria, June 10-11, 2015, Book of abstracts, page 132.

M34

### 3.2. Maja Nešić, Dunja Drakulić, Ana Rilak, Marija Nišavić, Iva Popović, Marija Radoičić, Zoran Šaponjić, Marijana Petković,

*Preparation of nanosystem for fast screening of serum proteins which bind metallo-drugs,*

9th Central and Eastern European Proteomic Conference,

Poznan, Poland, June 15-18, 2015, Book of abstracts, page 68.

M34

### 3.3. Maja Nešić, Jelena Žakula, Lela Korićanac, Iva Popović, Marija Radoičić, Zoran Šaponjić, Marijana Petković, Milutin Stepić

*TiO<sub>2</sub>-Based Nanocomposite System As Light-Controlled Metallo-Drug Delivery System*

RIAO Optilas 2016

Pucón, Chile, November 21-25, 2016, Abstract book, page 114.

M34

## ИЗВОД

Синтеза и примена комплекса прелазних метала у лечењу канцера је предмет истраживања великог броја научника. Потреба за развојем нових цитостатика произилази из жеље да се превазиђу недостаци већ постојећих, као што су резистенција, токсичност и узак терапеутски опсег (активност против малог броја типова тумора). Тако се поред комплекса платине, и даље најчешће коришћених цитостатика у клиничкој пракси, развила читава серија нових комплекса редизајнирањем већ постојећих изменом лигананда и/или изменом централног металног јона. Посебно су се издвојили комплекси рутенијума због мање токсичности, активности на метастазама и туморима на којима су дотадашњи цитостатици били неактивни, а неки од њих су показали активност тек када се озраче светлошћу одговарајуће таласне дужине и потенцијал за примену у фотодинамичкој терапији.

Упркос развоју нових генерација цитостатика с побољшаним карактеристикама, као проблем остаје контрола постизања максималне концентрације лека у туморском ткиву. На путу до циљног, туморског ткива и циљних биомолекула, лек интерагује и с бројним другим биомолекулима што за последицу може имати токсичност, појаву резистенције, инактивацију лека и смањење његове ефективне концентрације на жељеном месту дејства. Потреба за превазилажењем овог проблема довела је до брзог развоја носача за лекове. Њихова улога је да вежу или инкапсулирају лек, носе га до туморског ткива спречавајући његову интеракцију с околним биомолекулима и затим га отпусте, активним или пасивним механизмом, у циљном туморском ткиву. Циљ употребе оваквих система је смањење штетног дејства лека на здраво ткиво, могућност контроле дозирања лека тј. постизање његове оптималне концентрације у туморском ткиву, а самим тим и постизање веће ефикасности терапије.

Носачи који се тестирају за могућност примене у контролисаној и циљаној достави медикамената су углавном на бази органских и неорганских наноматеријала, међутим мали број њих је у клиничкој употреби (липозоми и полимерни наноматеријали). У фази испитивања су многобројни носачи који реагују на стимулансе као што су рН средине, ултразвук, температура и светлост. У новијим истраживањима велику пажњу као носачи за лекове заузимају наночестице  $\text{TiO}_2$  због своје биокомпатибилности, фотоактивности, доступности и могућности модификације површине.  $\text{TiO}_2$

наночестице су такође показале и антитуморску активност приликом осветљавања с UV светлошћу. Ове особине чине наночестице TiO<sub>2</sub> све атрактивнијим кандидатом за носач за лекове.

Сходно горе наведеним потребама које намеће терапија, у овој дисертацији испитана је могућност коришћења наночестица TiO<sub>2</sub> као носача за лекове базиране на комплексу рутенијума с бипиридинским лигандима. Формиран је нанокмпозитни систем везивањем комплекса [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], *cis*-дихлоридо-*bis*-(2,2'-бипиридил-4,4'-дикарбоксилнакиселина)рутенијум(II), за наночестице TiO<sub>2</sub>. С обзиром на то да су обе компоненте фото-активне и у литератури се помињу као фотосензибилни материјали, испитана је могућност и за манипулацију системом дејством UV и видљивог зрачења у циљу утврђивања потенцијала за примену у фотодинамичкој терапији. Систем је најпре структурно дефинисан, испитана је његова фотоактивност као и фотоактивност појединачних компоненти. Биолошка активност је испитана интеракцијом с биолошки значајним лигандима (глутатионом, говеђим серум албумином и фосфолипазом А<sub>2</sub>), хуманим ћелијама лимфоцита и на туморској линији хуманог меланома. Кинетика отпуштања комплекса с површине наночестица под дејством UV и видљиве светлости је такође испитана заједно с утицајем исте на степен преживљавања хумане амијелотске меланомске ћелијске линије.

У оквиру добијених резултата потврђено је везивање потенцијалног терапеутика, односно комплекса за носач, као и пролонгиран, континуалан профил отпуштања комплекса с носача својствен системима за контролисану доставу лекова. Утврђено је да активна компонента нанокмпозитног система (комплекс) интерагује с биомолекулима укљученим у процесе транспорта, биодистрибуције и уклањања лекова из организма, као и молекулом PLA<sub>2</sub> укљученим у процесе карценогенезе. При томе одређена јачина поменутих интеракција сугерише добар терапеутски потенцијал комплекса који је касније потврђен тестирањем на туморској линији меланома. Показано је да примењено зрачење из UV и видљиве области утиче на брзину и профил отпуштања комплекса из нанокмпозитног система, и то тако што UV зрачење убрзава отпуштање комплекса с TiO<sub>2</sub> носача, док га црвена и зелена светлост успорава. У складу с овим резултатима, доказано је и да озрачивање система UV зрачењем резултује у ефикаснијем убијању туморских ћелија хуманог меланома у односу на неозрачену контролу, док систем не показује антитуморску активност када се озрачи црвеном светлошћу. На основу приказаних резултата може се

закључити да постоји могућност манипулације концентрацијом ослобођеног комплекса, односно његовом антитуморском активношћу, и то подешавањем таласне дужине зрачења у зависности од терапеутских потреба. Резултати добијени у оквиру ове докторске дисертације показују потенцијал примене датог нанокмпозитног система у фотодинамичкој терапији хуманог меланома што би могло да допринесе ефикаснијој и мање инвазивној терапији меланома.

## SUMMARY

A significantly rising interest in the design and use of metal complexes for cancer treatment is currently observed in the area of scientific inquiry. There has been a growing demand for development and improvement of metal-based compounds used in routine clinical practice in order to overcome disadvantages and limitations such as resistance, toxicity and narrow spectrum of activity (activity against a small number of tumor types). Beside platinum complexes, the leading agents in clinical use, many more metal-based compounds have been synthesized by redesigning the existing chemical structure through ligand substitution and/or central metal ion switching. Among them ruthenium complexes have been investigated as one of the most promising candidates because they shown less toxicity, significant activity against cancer metastases, and activity on tumors that were resistant to a variety of standard chemotherapeutic agents. Moreover, some of them are light sensitive drugs i.e. their functions is triggered once they are activated by light of a specific wavelength which make them promising candidates for photodynamic therapy.

Despite fast development of new generation of cytostatics with better characteristics, there are still areas where substantial improvements need to be made. One such area is achievement of a maximum concentration of the drug on tumor site. Once the drug enters the systemic circulation, it could face a number of challenges. Drug could react with non-target biomolecules on its way to target biomolecules in tumor tissue which could cause severe side effects such as toxicity, resistance, inactivation of the drug and reduction of its effective concentration at the target tumor site. One way to solve these problems is the development of drug delivery systems which consist of drug and drug carrier. Role of drug carriers is to bind or encapsulate the drug, prevent its interaction with non-target biomolecules, to carry the drug to the target tumor tissue and then release it with active or passive mechanism. The main advantages of using drug delivery systems are reduction of side effects of drug onto the healthy tissue, dosage control, optimal concentration of drug in the tumor tissue, and more effective treatment which could improve outcome of therapy.

Many organic and inorganic nanoparticles have been tested as drug carriers, but just few of them are in clinical use (liposomes and polymers). In recent years smart nanosystems for targeted drug delivery that respond to various stimuli including pH, ultrasound, temperature and light irradiation are in the center of many investigations. Recent studies suggest that TiO<sub>2</sub>

could be promising anticancer drug carrier due to its versatility and unique properties such as biocompatibility, photoactivity, availability and easy surface modification. Another interesting property is its antitumor activity when irradiated with UV light. According to this, TiO<sub>2</sub> holds to be one of the most promising drug carrier candidates.

Based on above mentioned therapeutic requirements, possibility to use TiO<sub>2</sub> nanoparticles as a carrier for potential antitumor drug (ruthenium complex with bipyridine ligands) has been investigated. Nanocomposite system has been formed by binding of [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], *cis*-dichloro-*bis*-(2,2'-bipyridyl-4,4'-dicarboxylic acid)ruthenium(II), to the TiO<sub>2</sub> nanoparticles. Both components of the system are photoactive and mentioned in many publications as a photosensitizers, too. Therefore, potential for system manipulation and use in photodynamic therapy has been investigated by irradiation with UV and visible light. Primarily, structural characterization of nanocomposite system is performed along with its photoactivity. Biological activity of the system with biologically relevant ligands (GSH, BSA and PLA<sub>2</sub>), human lymphocytes and melanoma cell line was also performed. Furthermore, influence of UV and visible light irradiation on drug release kinetics are also given. Additionally, the feasibility of using this system as a light-triggered drug delivery system was shown on amelanotic melanoma cancer line.

The experimental results revealed a clear preference for the coordination of [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] complex to the TiO<sub>2</sub> carrier which resulted in formation of the nanocomposite system. The nanocomposite system showed potential for long-term constant release of complex which is suitable for clinical practice. It has been demonstrated that complex (potentially active component of nanocomposite system) interact with biomolecules involved in the processes of transport and biodistribution (BSA), drug excretion (GSH), and also with biomolecule involved in process of proliferation and carcinogenesis (PLA<sub>2</sub>). The obtained order of complex binding affinity to those biomolecules suggested that complex might have a benefit in potential anticancer therapy. Anticancer activity of complex was confirmed on amelanotic melanoma cancer line as well. The further investigation of nanocomposite system indicated that it exhibited UV and red light susceptible drug release behavior which was confirmed by the complex release test. The system demonstrated slower complex release upon visible and increased release rate upon UV light illumination which was in good correlation with the light-dependent cytotoxicity of the system demonstrated on amelanotic melanoma cancer line. The cell death is enhanced by UV and reduced by red light

in the presence of investigated nanocomposite system. All obtained results suggested that nanocomposite system may have a potential use as a light sensitive drug delivery system in photodynamic therapy which could significantly contribute to development of more efficient and less invasive therapy of melanoma.



## Скраћенице и ознаке

цисплатина	<i>cis</i> -диаминдихлоридоплатина(II)
карбоплатина	<i>cis</i> -диамин(1,1-циклобутандикарбоксилато)платина(II)
NAME A	имидазолијум[ <i>trans</i> -тетрахлоро(диметилсулфоксид) (имидазол)рутенат(III)]
KP1019	индазолијум[ <i>trans</i> -тетрахлоридо <i>bis</i> (1H-индазол) рутенат(III)]
bipy	2,2'-бипиридин
dc bpy	2,2'-бипиридил-4,4'-дикарбоксилна киселина
[PtCl <sub>4</sub> (bipy)]	тетрахлоридо(бипиридин)платина(IV)
[RuCl <sub>2</sub> (bipy) <sub>2</sub> ]Cl	дихлоридо( <i>bis</i> -(бипиридин))рутенијум(III)-хлорид
[Ru(II)(dc bpy) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	<i>cis</i> -дихлоро- <i>bis</i> -(2,2'-бипиридил-4,4'-дикарбоксилна киселина)рутенијум(II)
9-AA	9-аминоакридин
CHCA	α-цијано-4-хидроксициметна киселина
DHB	2,5-дихидроксибензоева киселина
DNK	дезоксирибонуклеинска киселина
F20TPP	5,10,15,20- <i>meso</i> -тетраакспентафлуорофенил порфирин
FTIR	Фуријеова трансформација – јон циклотрон резонанција
IC	инфрацрвени
LD	ласерска десорпција
LDI	ласерска десорпција и јонизација
<i>m/z</i>	однос масе и наелектрисања
MALDI MS	масена спектрометрија заснована на јонизацији потпомогнутој ласерском десорпцијом из матрикса
MS	масена спектрометрија
PSD	фрагментације које се одвијају након процеса убрзавања у масеном спектрометру

S/N	однос сигнала и шума
SALDI	масена спектрометрија заснована на јонизацији потпомогнутој ласерском десорпцијом из супстрата
SA	синапинска киселина
НЧ	наночестице
HKC	нанокомпозитни систем
НЧ TiO <sub>2</sub>	наночестице титан(IV)-оксида
TOF	време прелета
UV	ултраљубичаста област спектра светлости
Vis	видљива област спектра светлости
Uv-Vis	ултраљубичасти и видљиви део спектра светлости
NIR	блиска инфрацрвена област спектра светлости
BSA	говеђи серум албумин
PLA <sub>2</sub>	ензим фосфолипаза A <sub>2</sub>
GSH	редуковани облик глутатиона
PBS	раствор фосфатног пуфера
XPS	рендгенска фотоелектронска спектроскопија
XRD	рендгенска дифракциона анализа
TEM	трансмисиона електронска микроскопија
ФДТ	фотодинамичка терапија
ФСМ	фотосензибилни материјал/и
ROS	реактивне кисеоничне врсте
MN	инциденца микронуклеуса
CBPI	индекс ћелијске пролиферације
MDA	малондиалдехид
K <sub>b</sub>	константа везивања
MLCT	трансфер наелектрисуња од метала ка лигандима

## САДРЖАЈ:

<b>Увод</b> .....	1
<b>1. Општи део</b>	
1.1. Канцер и ограничења традиционалне хемиотерапије.....	5
1.2. Развој нових цитостатика.....	7
1.2.1. Нове генерације цитостатика на бази платине.....	7
1.2.2. Нове генерације цитостатика на бази рутенијума.....	9
1.3. Нови приступи терапији.....	13
1.4. Развој наноматеријала за циљану и контролисану доставу лекова.....	14
1.4.1. Дефинисање појма наноматеријала и њихов развој.....	14
1.4.2. Подела наноматеријала за циљану и контролисану доставу лекова.....	15
1.4.3. Преглед наноматеријала за циљану и контролисану доставу лекова.....	17
1.4.4. Наночестице осетљиве на стимулансе-концепт и предности примене.....	22
1.4.5. Преглед врста стимуланса за отпуштања лека са носача.....	23
1.4.5.1. Примена температуре као спољашњег стимуланса за третман канцера и активацију система лек/носач.....	24
1.4.5.2. Примена ултразвука као спољашњег стимуланса за третман канцера и активацију система лек/носач.....	25
1.4.5.3. Примена магнетног поља као спољашњег стимуланса за третман канцера и активацију система лек/носач.....	25
1.5. Фотодинамичка терапија (ФДТ).....	26
1.5.1. Механизам стварања и дејства ROS као производа ФДТ.....	27
1.5.2. Механизми фото-индукованог отпуштања лека с носача у ФДТ.....	29
1.5.3. Предности примене ФДТ.....	32
1.5.4. Ограничења примене светлости у терапији и начини превазилажења истих.....	32
1.5.5. Фотосензитивни материјали које се користе у клиничкој пракси за ФДТ.....	33
1.6. Употреба НЧ $\text{TiO}_2$ у биомедицини; хемијски, физички и биолошки аспект..	34
1.6.1. Титан(IV)-оксид ( $\text{TiO}_2$ ); хемијски аспект.....	35
1.6.1.1. Кристална структура титан(IV)-оксида.....	35
1.6.1.2. Специфична површина НЧ $\text{TiO}_2$ и могућност модификације површине једињењима с различитим функционалним групама.....	32
1.6.2. Титан(IV)-оксид ( $\text{TiO}_2$ ); физички аспект –фотосензитивност.....	38
1.6.3. Титан(IV)-оксид ( $\text{TiO}_2$ ); биолошки аспект.....	41
1.6.4. НЧ $\text{TiO}_2$ као ФСМ и носачи за лекове; преглед досадашњих истраживања...	43
1.6.5. Рутенијумови комплекси као ФСМ; преглед досадашњих истраживања.....	45
<b>Задатак рада</b> .....	46

## 2. Експериментални део

2.1.	Хемикалије и реагенси.....	47
2.2.	Синтеза комплекса $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ .....	48
2.3.	Синтеза НЧ $\text{TiO}_2$ .....	49
2.4.	Формирање наноконтролног система (НКС).....	49
2.5.	Инструменталне методе.....	50
2.5.1.	Масена спектрометрија.....	50
2.5.1.1.	Припрема узорака за масеноспектрометријску анализу.....	50
2.5.2.	UV-Vis спектроскопија.....	51
2.5.3.	Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR спектроскопија).....	52
2.5.4.	Трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ).....	52
2.5.5.	Рендгенска дифракциона анализа (XRD).....	53
2.6.	Седиментациони есеј-одређивање ефикасности везивања комплекса за површину НЧ $\text{TiO}_2$ .....	53
2.7.	<i>In vitro</i> праћење кинетике отпуштања $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ с површине носача (НЧ $\text{TiO}_2$ ).....	53
2.7.1.	Праћење кинетике отпуштања $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ с површине носача (НЧ $\text{TiO}_2$ ) под утицајем видљиве светлости.....	54
2.7.1.1.	Праћење кинетике отпуштања $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ с површине носача (НЧ $\text{TiO}_2$ ) под утицајем зелене светлости.....	54
2.7.1.2.	Праћење кинетике отпуштања $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ с површине носача (НЧ $\text{TiO}_2$ ) под утицајем црвене светлости.....	55
2.7.2.	Праћење кинетике отпуштања $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ с површине носача (НЧ $\text{TiO}_2$ ) под утицајем UV светлости.....	55
2.7.3.	Утицај измене UV и црвене светлости на профил отпуштања $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ с површине носача (НЧ $\text{TiO}_2$ ).....	56
2.8.	Испитивање биолошке активности $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ , НЧ $\text{TiO}_2$ и НКС.....	56
2.8.1.	Испитивање биолошке активности на хуманим лимфоцитима.....	56
2.8.1.1.	Лимфоцити-изоловање, гајење у култури и третман с $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ , НЧ $\text{TiO}_2$ и НКС.....	56
2.8.1.2.	Одређивање инциденце микронуклеуса (MN).....	56
2.8.1.3.	Одређивање индекса ћелијске пролиферације (CBPI).....	57
2.8.1.4.	Одређивање количине малондиалдехида (MDA).....	57
2.8.2.	Испитивање цитотоксичности $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ комплекса, НЧ $\text{TiO}_2$ и НКС на туморским линијама.....	58
2.8.2.1.	Туморске ћелијске културе-гајење и третман.....	58
2.8.2.2.	Одређивање ћелијске вијабилности, SRB тест.....	58
2.8.3.	Фото-цитотоксична активност НКС и његових компоненти тестирана на линији хуманог меланома индукована применом UV и црвене светлости..	59
2.8.4.	Испитивање интеракције комплекса са биомолекулима: BSA, $\text{PLA}_2$ и GSH.....	60
2.8.4.1.	Анализа везивања $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy})_2]$ комплекса за BSA, $\text{PLA}_2$ и GSH	

	MALDI TOF масеном спектрометријом.....	60
2.8.4.2.	Одређивање константе везивања (Kb) комплекса са BSA, PLA <sub>2</sub> и GSH.....	60
2.9.	Статистичка анализа.....	61

### 3. Резултати и дискусија резултата

3.1	Синтеза и карактеризација [Ru(II)(dcbpy) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] комплекса.....	62
3.2.	Биолошка активност [Ru(II)(dcbpy) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] комплекса.....	65
3.2.1.	Генотоксичност, цитотоксичност и антиоксидативна активност [Ru(II)(dcbpy) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] комплекса у хуманим лимфоцитима.....	66
3.2.2.	Активност [Ru(II)(dcbpy) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] комплекса на туморским линијама.....	69
3.3.	Интеракција [Ru(II)(dcbpy) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] комплекса са BSA, PLA <sub>2</sub> и GSH.....	70
3.3.1.	Испитивање везивања [Ru(II)(dcbpy) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] комплекса за BSA, PLA <sub>2</sub> и GSH с MALDI TOF масеном спектрометријом.....	70
3.3.2.	Одређивање константе везивања (Kb) комплекса [Ru(II)(dcbpy) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] са BSA, PLA <sub>2</sub> и GSH.....	75
3.4.	Карактеризација НЧ TiO <sub>2</sub> .....	79
3.4.1.	Структурна карактеризација НЧ TiO <sub>2</sub> трансмисионом електронском микроскопијом (TEM), рендгенском дифракционом анализом (XRD) и дефинисање изоелектричне тачке.....	80
3.4.2.	Тестирање фотоактивности НЧ TiO <sub>2</sub> и бипиридинских комплекса рутенијума, и испитивање њихове међусобне интеракције у UV области употребом MALDI TOF масене спектрометрије.....	81
3.4.2.1.	Тестирање фотоактивности TiO <sub>2</sub> и бипиридинских комплекса рутенијума - LDI TOF масеноспектрометријска анализа.....	82
3.4.2.2.	Утицај површине НЧ TiO <sub>2</sub> на фотоактивност бипиридинских комплекса рутенијума и испитивање потенцијалне интеракције комплекса и НЧ TiO <sub>2</sub> дејством UV ласера-SALDI MS анализа.....	86
3.5.	Синтеза и карактеризација НКС.....	87
3.6.	Биолошка активност НКС и његових компоненти тестирана на хуманим лимфоцитима; Одређивање СВРП и концентрације MDA.....	92
3.7.	Кинетика отуштања комплекса с површине носача (НЧ TiO <sub>2</sub> ) стимулирана светлошћу.....	94
3.7.1.	Утицај видљиве светлости на кинетику отпуштања комплекса с површине носача (НЧ TiO <sub>2</sub> ) .....	95
3.7.1.1.	Утицај зелене светлости на кинетику отуштања комплекса с површине носача (НЧ TiO <sub>2</sub> ) .....	96
3.7.1.2.	Утицај црвене светлости на кинетику отуштања комплекса с површине носача (НЧ TiO <sub>2</sub> ) .....	97
3.7.2.	Утицај UV светлости на кинетику отуштања комплекса с површине носача (НЧ TiO <sub>2</sub> ) .....	100

3.7.3.	Комбиновани утицај UV и видљиве светлости на НКС.....	101
3.8.	Цитотоксична активност НКС и његових компоненти.....	102
3.8.1.	Фото-цитотоксична активност НКС и његових компоненти.....	103
3.8.1.1.	Фото-цитотоксична активност НКС и његових компоненти дејством UV зрачења.....	104
3.8.1.2.	Фото-цитотоксична активност НКС и његових компоненти дејством црвене светлости.....	105
<b>Закључак</b> .....		107
<b>Литература</b> .....		111

## УВОД

Лечење канцера, који је једна од најозбиљнијих болести данашњице, захтева веома комплексан процес употребе цитостатика и/или радиотерапије, често и у комбинацији с оперативним приступом. Нажалост, цитостатици (под овим термином се у овој дисертацији подразумевају превасходно комплекси прелазних метала) који су већ у клиничкој употреби показују озбиљне нежељене ефекте, као што су токсичност за здраве ћелије, резистенција, ограничена растворљивост и неактивност против великог броја учесталих типова канцера. Управо због тога се као циљ у побољшању терапије намеће развој нових цитостатика и нових приступа терапији, пре свега система за контролисану и циљану доставу лекова.

Нове генерације цитостатика на бази платине али и других прелазних метала (Ru, Ag, Au, Fe, Co, Cu, Ir, Os, Ga) се брзо развијају и тестирају, али мали проценат њих улази у неку од фаза клиничког тестирања. Комплекси рутенијума се издвајају по свом специфичном начину деловања, мањој токсичности, већој селективности и активности на туморским линијама и матастазама на којима су платински комплекси били неактивни, због чега су у центру интересовања, али и даље као проблем остаје контрола места дејства и просторна расподела цитостатика у организму, односно њихова биодистрибуција.

Важан део стратегије у терапији канцера је временска контрола отпуштања лека и контрола његове биодистрибуције, која омогућава да се лек усмери ка жељеном месту дејства (туморском ткиву) и самим тим повећа ефикасност терапије и смање нежељени ефекти на здраво ткиво. Један од приступа који би одговорио реалним клиничким захтевима је развој носача, који омогућују контролисану доставу лекова до туморског ткива. Током претходних неколико деценија развијен је велики број носача за циљану и контролисану испоруку лекова. Углавном се тестирају носачи на бази органских и неорганских наноматеријала, али за сада се на тржишту налазе само три, и то на бази липозома и албумина. Велики потенцијал као носач су показале наночестице титан(IV)-оксида (НЧ  $\text{TiO}_2$ ) због своје биокомпатибилности, стабилности, фотоактивности, доступности и могућности модификације површине. У фази испитивања су и многобројни носачи који реагују на стимулансе као што су рН

средине, ултразвук, температура, магнетно поље и светлост. Употреба светлости као спољашњег стимуланса и фотосензитивног материјала (ФСМ) представља основни концепт примене фотодинамичке терапије (ФДТ). Могућност прецизне локалне примене, временске контроле, подешавања таласне дужине светлости и њеног интензитета пружају могућност манипулацијом концентрације лека на много поузданији, контролисанији и софистициранији начин због чега се фотодинамичка терапија заслужено изборила за своје место у терапији канцера.

Имајући то у виду, значајно је усмерити испитивања ка синтези и карактеризацији фото-осетљивог система за контролисану доставу цитостатика. У оквиру ове докторске дисертације приказан је развој и карактеризација нанокомпаративног система за фотодинамичку терапију хуманог меланома који се састоји од комплекса рутенијума  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  и носача (наночестица  $\text{TiO}_2$ ).

- У Општем делу је дат осврт на развој цитостатика на бази комплекса прелазних метала, њихова ограничења у примени, као и могућа решења за превазилажење овог проблема. Дат је преглед цитостатика нове генерације на бази комплекса платине и рутенијума, као и преглед нових приступа терапији. Истакнут је значај развоја носача за цитостатике за циљану и контролисану доставу лекова на бази наноматеријала. Такође је дефинисан појам наноматеријала, њихов развој, као и подела и преглед наноматеријала који се користе за циљану и контролисану доставу лекова. Приказан је концепт и преглед врста стимуланса за отпуштање лека с носача с нагласком на светлост, односно на ФДТ чији су концепт, механизам примене, предности и ограничења детаљно описани. Могући механизми фото-индукованог отпуштања лека с носача и ФСМ који се користе у клиничкој пракси су такође приказани. Скренута је пажња и на особине НЧ  $\text{TiO}_2$  и њихову мултифункционалност, уз детаљан преглед њихових хемијских, физичких и биолошких особина с акцентом на фотоактивност и позитиван аспект коришћења у развоју носача за лекове осетљивих на светлост. На крају општег дела дат је преглед до сада публикованих резултата истраживања у домену коришћења НЧ  $\text{TiO}_2$  као ФСМ и носача, као и комплекса рутенијума као ФСМ.



- У **Експерименталном делу** су поред коришћених хемикалија, описани и синтеза и карактеризација  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплекса, НЧ  $\text{TiO}_2$  и нанокомпозитног система (НКС) на бази  $\text{TiO}_2 / [\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ . Детаљно су описане инструменталне методе коришћене за карактеризацију система и његових компоненти: MALDI масена спектрометрија, UV-Vis спектрофотометрија, инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом, трансмисиона електронска микроскопија, рендгенска дифракциона анализа као и статистичка обрада података. Описане су методе коришћене за праћење ефикасности везивања (седиментациони есеј), односно кинетике отпуштања комплекса с носача. Дате су методе за испитивање биолошке активности система и његових компоненти.
- У поглављу **Резултати и дискусија резултата** приказани су резултати карактеризације  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплекса, НЧ  $\text{TiO}_2$  и НКС. Прво су представљени резултати хемијске и биолошке карактеризације комплекса, која је потенцијално терапеутски активна компонента система. Хемијска карактеризација је дата уз детаљну анализу добијених масених, ATR-FTIR и UV-Vis спектра, док је биолошка активност представљена у виду генотоксичности, цитотоксичности, антиоксидативне активности комплекса у хуманим лимфоцитима, као и активности комплекса на туморским ћелијама грлића материце (HeLa) и хуманој амијелотској меланомској ћелијској линији (A375). Резултати интеракције комплекса с биолошки значајним протеинима (говеђим серумским албумином (BSA) и фосфолипазом  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>)) и пептидом глутатионом (GSH) су дати у виду константи везивања и процене броја везивних места комплекса за поменуте биомолекуле. Потом је дата структурна карактеризација носача (НЧ  $\text{TiO}_2$ ) уз приложу TEM микрографију, XRD дифрактограм и изоелектричну тачку, а приказани су и резултати испитивања фотоактивности обе компоненте система у UV области масеном спектрометријом, LDI и SALDI приступом. На крају су представљени резултати структурне карактеризације НКС с детаљном анализом добијених спектра и одређеном ефикасношћу везивања комплекса за носач. Дати су резултати испитивања биолошке активности НКС и његових компоненти на хуманим лимфоцитима у виду пролиферативног индекса ћелија и антиоксидативне

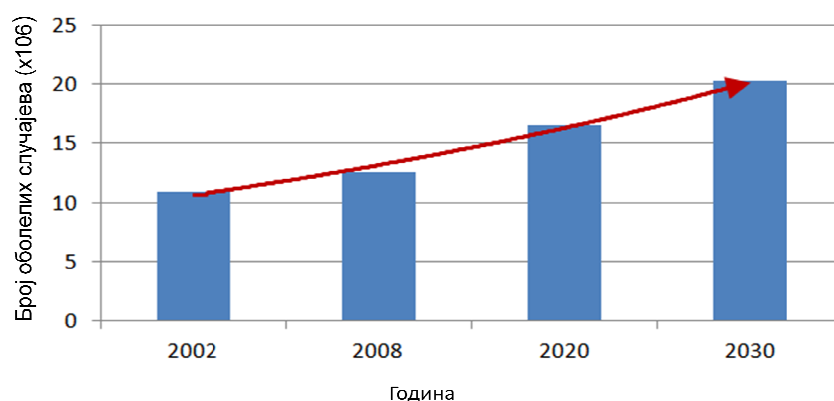
активности. Приказана је кинетика отпуштања комплекса с наночестичног носача у мраку, у присуству видљиве (црвене и зелене) и UV светлости, као и њихов комбиновани утицај. На крају су дати резултати тестирања система и компоненти на туморској линији меланома у виду цитотоксичности и фото-цитотоксичности у присуству црвене и UV светлости.

Резултати ове дисертације објављени су у оквиру 4 научна рада у водећим међународним часописима.

# 1. ОПШТИ ДЕО

## 1.1. Канцер и ограничења традиционалне хемиотерапије

Канцер је један од главних узрока смртности широм света. О озбиљности и распрострањености овог обољења говоре и извештаји Светске здравствене организације у којима се наводи да се број оболелих од канцера повећао са 12,7 милиона 2008. на 14,1 милион 2012. године. Уколико би број оболелих наставио да расте таквим трендом, број нових случајева би могао да достигне 22 милиона до 2030. године. Фактички би се удвостучио у односу на 2002. годину (Слика 1.1.).



*Слика 1.1. Тренд пораста броја случајева оболелих од канцера праћен у периоду од 2002. до 2012. године (извор Светска Здравствена Организација). Предвиђање пораста броја оболелих до 2030. године изведено је помоћу GLOBOCAN платформе која обезбеђује процене о учесталости, морталитету и преваленцији канцера на националном нивоу ([http://globocan.iarc.fr/Pages/burden\\_sel.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/burden_sel.aspx)).*

Хемиотерапеутски агенси раде на принципу уништавања ћелија које се брзо деле, што је и главна карактеристика туморских ћелија. Управо је ова чињеница и разлог што хемиотерапеутици нису селективни, односно уништавају и здраве ћелије које се брзо деле, као што су ћелије коштане сржи, макрофаги, ћелије дигестивног тракта и фоликула длаке. Све ово доводи до споредних, токсичних ефеката као што су миелосупресија, мукозитис, алопесија, дисфункција органа или чак анемија или тромбоцитопенија.<sup>1</sup> Традиционални хемотерапеутици се такође веома кратко

задржавају у циркулацији (врло брзо их уклањају макрофаги) што им не омогућава да интерагују с циљним молекулима у туморским ћелијама, те је терапија мање ефикасна.<sup>2</sup> Осим наведеног, уочени су и проблеми везани за резистенцију ћелија на терапију. Након дужег коришћења цитостатика, туморске ћелије активирају одбрамбени систем стварајући велике количине протеина и пептида богатих цистеином, као што су металотионин, глутатион и други за које цитостатици имају велики афинитет.<sup>3,4</sup> Туморске ћелије експримирају ове протеине на својој површини или их излучују у екстрацелуларни простор, дајући цитостатикама супстрат за везивање и спречавајући на тај начин акумулацију непромењеног, активног цитостатика у унутрашњости ћелије, као и њихову интеракцију с циљним молекулима. Сходно наведеном, цитостатик не испољава ефикасно жељено дејство, а туморске ћелије настављају да се неометано деле и туморско ткиво расте.

Због свега наведеног, настала је и потреба за развојем нових лекова и терапија које би превазишле нежељене ефекте и повећале ефикасност терапије. Развој нових анти-туморских медикамената може се поделити у два правца: развој нових цитостатика и развој нових начина терапија (Слика 1.2.). Наведени правци се ослањају један на други и развијају се паралелно. У оквиру наредних поглавља биће дат детаљнији осврт на оба правца с обзиром да се ова теза базира на испитивању оба аспекта терапије.



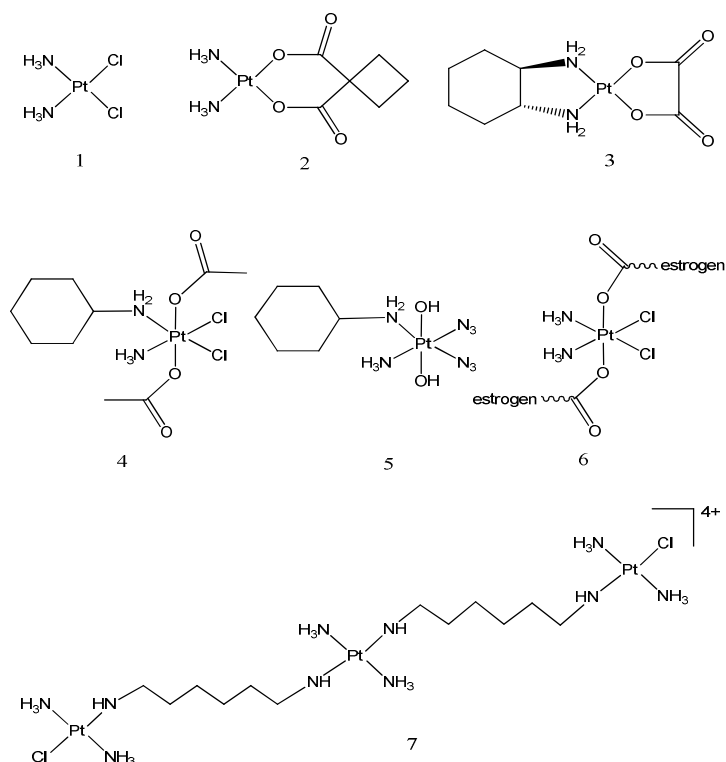
*Слика 1.2. Шематски приказ стратегије развоја и унапређења традиционалне хемиотерапије.*

## 1.2. Развој нових цитостатика

### 1.2.1. Нове генерације цитостатика на бази платине

Иако су комплекси на бази платине (цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина (Слика 1.3., редни бр. 1-3) и данас највише коришћени цитостатици у клиничкој пракси, они су далеко од „савршено“ ефикасног лека.<sup>5</sup> Неки од недостатака ове групе цитостатика су већ наглашени у претходном поглављу. Поред споменуте резистенције и токсичности, платински цитостатици су показали ефикасност само на неколико типова канцера, док је активност против великог броја учесталих типова канцера изостала. Тако су, нпр. канцер дојке и простате, који представљају најучесталије типове канцера у Европи, резистентни на цисплатину.<sup>6,7</sup> Такође, овај цитостатик није показао активност на колоректалном канцеру који је у порасту по броју оболелих.<sup>8</sup> Управо због наведеног, велики број комплекса на бази платине, али и других прелазних метала је синтетисан у току претходних деценија и тестиран на многобројним туморским ћелијским линијама.

Паралелно с развојем нових типова цитостатика и испитивањем њиховог механизма дејства дошло је до напуштања старих правила и усвајања нових концепата у синтези цитостатика. Тако је првенствено дошло до одступања у дотадашњим правилима у структурним карактеристикама које је комплекс морао да испуњава да би показао антитуморску активност (оксидационо стање платине(II), *cis*-геометрија, електронеутралност, лигандно правило које подразумева да комплекс у својој структури мора поседовати два монодентатна или један бидентатни анјонски лиганд и друге карактеристике). Један од примера нове генерације платинских цитостатика је сатраплатина (Слика 1.3., редни бр. 4) у којој је оксидационо стање платине(IV) и која постаје активна тек након уласка у ћелију и редукције интрацелуларним биомолекулима до активног облика платине(II).<sup>9</sup> Нестандардни комплекси платине вредни помена су комплекси платине(IV) који се примењују у фототерапији,<sup>10</sup> комплекси са специфичним лигандима за естрогенске рецепторе у туморском ткиву дојке,<sup>11</sup> као и полинуклеарни јонски комплекси платине(II)<sup>12</sup> (Слика 1.3., редни бр. 5-7).



**Слика 1.3.** Комплекси платине(II) који се најчешће користе у клиничкој пракси: 1 цисплатина, 2 карбоплатина и 3 оксалиплатина. Примери нестандардних комплекса платине(IV) у фази клиничких испитивања: 4 сатраплатина, 5 комплекс платине(IV) за фототерапију и 6 платина(IV) естрогенски карбоксилати. 7 Полинуклеарни јонски комплекси платине(II) који се води под шифром BBR3464 и који је прошао другу фазу клиничког испитивања за меланом, рак панкреаса, плућа и јајника.

Поред напуштања старих правила у структурним нормама комплекса, значајан помак у равоју нових цитостатика је начињен синтезом комплекса који за циљни молекул имају неке друге биомолекуле, а не молекуле ДНК. Наиме, дуго времена се антитуморска активност везивала искључиво за интеракцију комплекса с молекулима ДНК јер је управо овај механизам карактеристичан за комплексе платине(II).<sup>13</sup> Платина(II), као „мека“ *Lewis*-ова киселина, има изражен афинитет према донорским атомима азота из ДНК молекула, односно према пуринским и пиримидинским базама, за које се везује након активације комплекса хидролизом у физиолошким условима. Ово везивање представља основни механизам путем ког комплекси платине(II) остварују антитуморску активност. Међутим, временом је доказано да комплекси који за примарну мету имају ДНК молекуле, показују већу системску токсичност (што је једно од нежељених дејстава цитостатика о којима је било речи) него комплекси који за циљане молекуле имају оне који су карактеристични за туморска ткива.<sup>14</sup> Комплекси који су се истакли по специфичном механизму дејства, различитом од комплекса

платине, су комплекси на бази рутенијума. Стога ће у наредном поглављу бити дат преглед медикамената на бази рутенијума.

### 1.2.2. Нове генерације цитостатика на бази рутенијума

Рутенијум (Ru) се може наћи у више оксидационих стања (II, III и IV) у физиолошким условима. Енергетска баријера за прелазак једног стања у друго је релативно ниска што омогућава лаке промене оксидационог стања овог металног јона у физиолошким условима. Поред овога, комплекси рутенијума показују релативно спору измену лигананда у воденим растворима, што значи да имају способност везивања за велики број биомолекула а не само за молекуле ДНК.<sup>15</sup> Последица поменутих хемијских особина комплекса су њихове добре карактеристике као потенцијалних цитостатика које су ови комплекси показали у односу на комплексе платине, а то су:

- (а) мања токсичност
- (б) већа селективност
- (ц) различит механизам дејства
- (д) активност на туморским линијама и метастазама на којима су платински комплекси били неактивни

(а) Разлог мање токсичности комплекса рутенијума у односу на комплексе платине лежи у чињеници да ови комплекси имају способност „активације редукцијом“.<sup>14</sup> Наиме, комплекси Ru(III) су инертнији у односу на комплексе Ru(II), што се може делимично приписати већом ефективном наелектрисувању. С друге стране, ћелије канцера представљају редукујуће окружење у односу на здраве ћелије због ниже концентрације молекулског кисеоника, бржег метаболизма и слабије прокрвљености туморског ткива.<sup>16</sup> Узимајући у обзир оба фактора, јасно је да, уколико се у организам унесе релативно инертни облик Ru(III) комплекса, оштећење здравих ћелија ће бити минимално, јер се овај облик рутенијума у њима не може редуковати. С друге стране, након доласка до туморског ткива Ru(III) бива редукован и испољава своје цитотоксично дејство на туморским ћелијама. Иако је ово прихваћено као објашњење

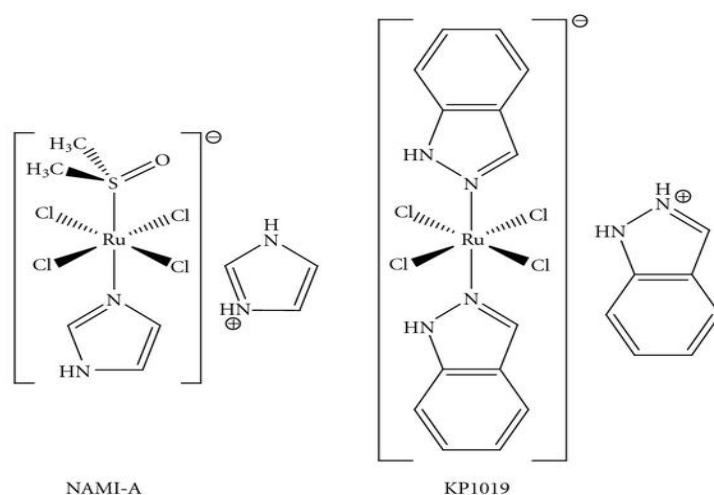
селективног дејства рутенијума у односу на платину, у последње време ова теорија је све чешће тема литературне дебате.<sup>17,18</sup>

(б) Већа селективност комплекса рутенијума у односу на платинске комплексе огледа се у томе да рутенијум, због својих особина сличних гвожђу, има способност да замени гвожђе у протеинима богатим овим металним јоном, првенствено трансферину.<sup>19</sup> С обзиром да туморске ћелије, због своје брзе деобе, имају повећане потребе за гвожђем, оне на мембрани имају и повећан број рецептора за трансферин. Управо због наведеног, могућ је повећан унос рутенијумовог комплекса у туморске ћелије у односу на здраве у чему се огледа и већа селективност комплекса рутенијума. Међутим, механизам доставе остаје и даље споран. Наиме, новија истраживања сугеришу да је примарни начин транспорта рутенијума, такозвани транспортни механизам албумином, пошто рутенијум с албумином формира термодинамички стабилније комплексе.<sup>20-23</sup>

(ц) Још једна карактеристика комплекса рутенијума, коју треба истаћи, је нешто другачији механизам дејства, који је заснован на другачијим циљним молекулима у односу на платинске комплексе. Управо због тога, у последње време биолошке мете ових комплекса су тема опсежних студија. За разлику од комплекса платине, који се доминантно везују за молекуле ДНК, биолошке мете комплекса рутенијума још нису јасно дефинисане. До сада постоји неколико радова чији резултати указују на чињеницу да су циљани молекули за рутенијумове комплексе пре протеини него ДНК молекули. Тако се, поред већ поменуте способности везивања за трансферин и албумин, у публикацијама помиње и афинитет везивања рутенијумових комплекса и за цитохром ц.<sup>24</sup> Затим, комплекси рутенијума се везују и за различите ензиме, који су укључени у сложене процесе карценогенезе и који представљају мете за цитостатике. Везивање рутенијумових комплекса за ове ензиме обично је праћено и мерењем ензимске активности. Тако је доказано да рутенијум(II)-аренски комплекси (RAPTA) имају способност инхибиције тиоредоксин редуктазе и катепсина Б.<sup>25</sup> Затим, да се органорутенијумов комплекс који носи ознаку L-FL172 везује за везивно место за аденозинтрифосфат (АТР) у протеин кинази и инхибира је,<sup>26</sup> а ту су такође и примери инхибиције ензима ацетилхолин естеразе<sup>27</sup> и фосфолипазе А<sub>2</sub><sup>28,29</sup> од стране бипиридинских комплекса рутенијума.



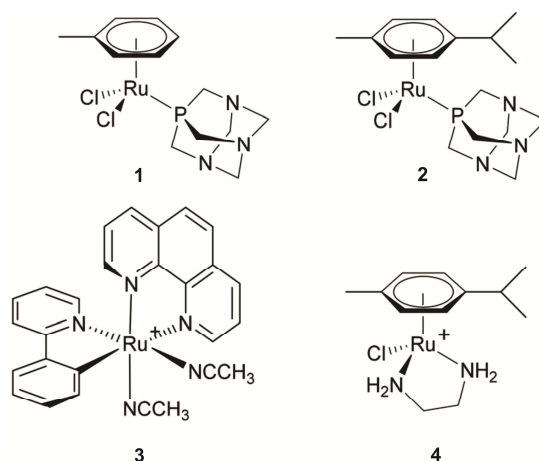
(д) Разлике у реактивности, селективности, као и механизму дејства комплекса рутенијума такође за последицу имају и активност према одређеним туморским врстама, као и метастазама на којима су комплекси платине до сада били неефикасни. Комплекси рутенијума(III) који су се до сада издвојили по повољним карактеристикама и увелико ушли у клиничка испитивања су дати на Слици 1.4. Комплекс *trans*-тетрахлоро(диметилсулфоксид)(имидазол)рутенат(III) или познатији под називом NAMI-A, синтетисан од стране групе професора Alessia, био је први рутенијумов комплекс који је ушао у клиничка тестирања на канцеру плућа.<sup>30</sup> Овај комплекс *in vitro* практично није показао цитотоксичност, док се *in vivo* показао као веома ефикасан против метастаза притом не утичући на примарни тумор.<sup>31–33</sup> Такође, *in vitro* и *in vivo* испитивања су искључила ДНК молекуле као примарну мету овог цитостатика с обзиром на његово много слабије везивање за ДНК молекуле у поређењу с комплексима платине.<sup>34</sup> Уместо за ДНК, уочен је јак афинитет за везивање за серумске протеине,<sup>35–37</sup> као и могућност транспорта посредованог рецептором за трансферин,<sup>38</sup> чиме је постигнута селективна достава до туморских ћелија. Такође, првом фазом клиничког тестирања је утврђена његова мања токсичност, а пацијенти су добро подносили терапију.<sup>30</sup> Након открића NAMI-A и његових добрих карактеристика, синтетисан је велики број комплекса сличне структуре али они нису показали тако добре карактеристике.



**Слика 1.4.** Комплекси рутенијума(III) са хетероцикличним базама који су у клиничким испитивањима: NAMI-A,  $[Him]trans-[RuCl_4(im)(dmsO-S)]$  (*im* = имидазол) и KP1019,  $[Hind]trans-[RuCl_4(ind)_2]$  (*ind* = индазол).

Још један комплекс рутенијума, који такође завређује пажњу је *trans*-тетрахлоро-*bis*-(1Н-индазол)рутенат(III) или познатији као КР1019. Овај комплекс је синтетисан од стране *Kepler*-ове групе и такође у фази клиничких испитивања.<sup>39</sup> За разлику од НАМИ-А, показао је значајну цитотоксичност *in vitro* против ћелија колоректалног канцера.<sup>40</sup> Такође је био ефикасан *in vivo* на колоректалном канцеру код пацова, смањујући раст тумора.<sup>41</sup> Овај потенцијални цитостатик је показао високи афинитет за везивање за трансферин и то на везивном месту за гвожђе.<sup>42</sup> Што се тиче механизма дејства, ДНК се помиње као циљани молекула, али је неколико истраживања показало да се ДНК лезије формиране с овим комплексом разликују од оних са цисплатином.<sup>41,43</sup> Прва фаза клиничких испитивања је показала добру толеранцију од стране пацијената као и стабилизацију стања код 5 од 6 пацијената.<sup>44</sup>

Обећавајуће карактеристике ових комплекса покренуле су праву лавину у синтези комплекса рутенијума. Тако је синтетисана група аренских комплекса рутенијума(II) за које је показано да су скоро нетоксични и да испољавају јединствене антитуморске особине.<sup>45</sup> То су рутенијум(II) аренски комплекси са 1, 3, 5-триаза-7-фосфаадамантанским лигандом (pta), тачније Ru( $\eta^6$ -toluene)(pta)Cl<sub>2</sub> или RАРТА-Т и Ru( $\eta^6$ -p-cymene)(pta)Cl<sub>2</sub> или RАРТА-С (Слика 1.5, 1 и 2). RАРТА-С комплекс такође за примарни циљани молекула нема ДНК молекуле. Уместо за ДНК, он се везује за хистонско протеинско језгро у хроматину.<sup>46</sup> Везивање је праћено инхибицијом раста примарних тумора *in vivo*.<sup>47</sup> Овај комплекс је такође показао антиангиогени ефекат на примарним туморима који су имали мање крвних судова узетим из мишева. Од посебног значаја је то да је ова активност комбинована с антиметастатском активношћу. Антиангиогени и антиметастатички ефекат се испољавају кроз интеракције са ћелијском мембраном. Такође је показано да је комбиновани ефекат лека јединствен, тако да уколико се RАРТА-С примени у комбинацији с другим лековима, долази до ефикасне инхибиције раста тумора и то с веома ниским дозама лека и без споредних токсичних ефеката.<sup>48</sup>



**Слика 1.5.** RAPTA-Т или  $Ru(\eta^6\text{-toluene})(pta)Cl_2$  ( $pta=1, 3, 5\text{-триаза-7-фосфаадамантан}$ )(1), RAPTA-Сили  $Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(pta)Cl_2$ (2), RDC11 или  $[Ru(phen)(2\text{-ppy})(NCMe)_2][PF_6]$  ( $phen$ =фенантролин) ( $2\text{-ppy}$ =2-фенилпиридин)(3) и RAED-Сили  $[Ru(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})(en)Cl][PF_6]$ (4). RDC11 и RAED-Су дају као  $PF_6^-$  соли.

Комплекси рутенијума(II) који су такође показали клинички интересантне особине су комплекси који носе ознаке RDC11 и RAED-С (Слика1.5., 3 и 4). RDC11 је тестиран на различитим туморским линијама, где је приликом третмана показана значајна инхибиција раста тумора, ефикаснија и од цисплатине само с много блажим ефектима по здраве ћелије.<sup>49</sup> Овај комплекс је такође показао слабу интеракцију с ДНК молекулама што сугерише постојање алтернативног механизма дејства. Такође је и RAED-С комплекс показао обећавајуће антитуморске карактеристике на различитим *in vivo* моделима.<sup>17</sup>

Због вишеструких повољних карактеристика, специфичних биомолекула за које се везују, комплекси рутенијума и данас се интензивно изучавају у циљу синтезе што бољих и ефикаснијих цитостатика.

### 1.3. Нови приступи терапији

Као што је већ поменуто, поред развоја нових врста цитостатика (унапређења хемиотерапије), научни развој је упоредо усмерен и на развој нових начина у самој терапији у циљу побољшања и унапређења лечења. Осим унапређења радиотерапије, имунолошке терапије и генске терапије развијају се системи за циљану и контролисану доставу цитостатика, односно развој носача за цитостатике. Основни циљ развоја

носача за цитостатике је циљана терапија тј. достављање цитостатика до оболелог ткива где је фармаколошко дејство цитостатика жељено, чиме се оштећење околног, здравог ткива, своди на минимум. Концепт, међутим није ограничен искључиво на контролисану доставу, већ и на контролу брзине отпуштања цитостатика с носача у циљном ткиву, чиме се утиче на концентрацију лека и на ефикасност саме терапије.

Током неколико претходних деценија, развијен је велики број носача за лекове већином у облику микросфера, филмова, таблета или имплантационих уређаја. Због комплексности, истраживања су добила мултидисциплинарни карактер тј. дошло је до повезивања хемије, физике, биологије и биоинжињерства. Као најефикаснији носачи углавном се у литератури помињу мицеле, липозоми, хидрогелови, течни кристали и наночестице за које лекови могу бити хемијски везани (ковалентно везани или адсорбовани) или само физички заробљени у унутрашњости носача (инкапсулирани).<sup>50</sup>

С обзиром на то да се ова теза базира на развоју НЧ  $\text{TiO}_2$  као фотосензитивних носача за циљану доставу потенцијалог цитостатика, у наредним поглављима акценат ће бити постављен само на употребу НЧ у поменуте сврхе.

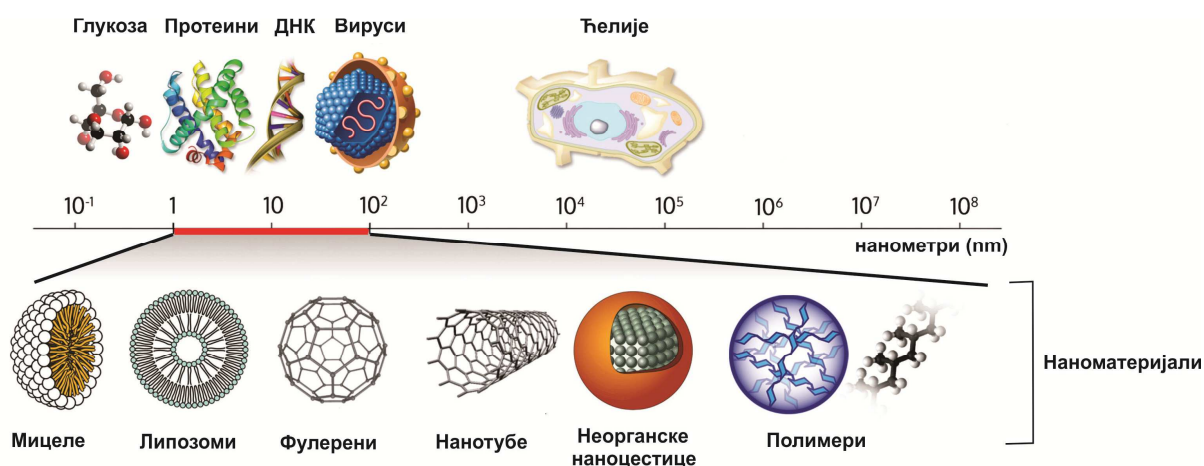
#### **1.4. Развој наноматеријала за циљану и контролисану доставу лекова**

##### **1.4.1. Дефинисање појма наноматеријала и њихов развој**

Пре свега неопходно је дефинисати сам појам „нано“ ради бољег разумевања концепта примене ових материјала. Наиме, постоји више различитих дефиниција, али од 2011. године када је Европска унија (EU) усвојила дефиницију за наноматеријале (2011/696/EU) она постаје општеприхваћена: *наноматеријали су случајно (природно) или наменски произведени материјали у којима 50% или више честица поседује једну или више димензија у опсегу од 1 nm - 100 nm* (преузето са сајта [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm) ). С обзиром да је у овој дисертацији рађено с НЧ и да ће се овај термин бити употребљаван у даљем тексту и дискусији, неопходно је нагласити да су НЧ наноматеријали чије све три димензије улазе у опсег 1 nm – 100 nm.<sup>51</sup> Интензивни развој наноматеријала је покренуо нову еру нанотехнологије која је отворила нови свет науке о материјалима и омогућила манипулацију материјалима на нивоу атома. Постојање материјала чије су димензије у опсегу нанометара води порекло још од постанка првог живота на земљи.

Биомолекули, структурне јединице живих бића, као што су протеини, ДНК и РНК молекули се налазе на наноскали и представљају прве структурне аналоге наноматеријала (Слика 1.6.).<sup>52</sup> Ензими, антигени и антитела са својим димензијама у опсегу 2-20 nm су такође нашли широку примену као бионаноматеријали у медицинској употреби.<sup>53,54</sup> Касније се интерес нанотехнологије проширује и на синтетичке органске и неорганске наноматеријале с обзиром да их њихове карактеристике, као што су висока реактивност и велика активна површина, такође чине добрим кандидатима за биомедицинску употребу.<sup>55-57</sup>

Могућност модификације наноматеријала, као што је нпр. промена облика, величине и/или функционализација површине, доводи до значајних промена у њиховим физичко-хемијским особинама што их чини погодним за манипулацију и прилагођавање жељеној намени. Данас се НЧ користе у свим аспектима модерне технологије као што су козметичка индустрија, медицина, енергетика и другим.<sup>58</sup> Међутим, након открића 1960-тих година да се липозоми могу користити као ефикасни носачи за лекове,<sup>59</sup> нанотехнологија је почела да има значајан утицај на развој система за контролисану доставу лекова.



Слика 1.6. Приказ димензија биомолекула и наноматеријала на наноскали.

#### 1.4.2. Подела наноматеријала за циљану и контролисану доставу лекова

На основу хемијског састава наноматеријали који се испитују у својству носача за лекове се деле на органске и неорганске. Органски наноматеријали обухватају широку

класу једињења на бази угљеника и угљоводоника, тако да овој класи припадају различити полимери, мицеле, липозоми и угљенични наноматеријали. С друге стране, неоргански наноматеријали представљају честице базиране на металима и металним оксидима.<sup>56</sup>

### **Органски наноматеријали**

**Полимери** представљају једињења настала међусобним повезивањем једноставних мономерних јединица у сложене полимерне ланце. Полимери, који се користе као носачи за лекове, могу се поделити на две главне групе: природне и синтетичке. Полимери типа албумина, хитозана и хепарина представљају природне полимере који могу служити као носачи за доставу олигонуклеотида, протеина али и различитих лекова.<sup>60</sup> С друге стране, значајни синтетички полимери су N-(2-хидроксипропил)-метаакриламид (HPMA), полиетилен гликол (PEG) и поли-L-глутаминска киселина (PGA). PGA представља биоразградиви носач, док преостала два наведена полимера припадају групи небиоразградивих синтетичких полимера.<sup>61</sup>

**Мицеле** стварају амфифилна једињења која се организују тако да формирају систем језгро/омотач у воденој средини, окрећући своје хидрофилне делове ка воденој средини, а хидрофобне један према другом у унутрашњости (Слика 1.6.). Тако формирано хидрофобно језгро служи као резервоар за хидрофобне лекове, док хидрофилни омотач стабилизује хидрофобно језгро и омогућава растворљивост система у води. Лек се може увести у мицеле на два начина: физичким заробљавањем лека у мицеле или хемијским-ковалентним везивањем лека.<sup>62</sup>

**Липозоми** су затворене колоидне структуре које се састоје од липидног двослоја сферног облика. Приликом формирања, липозоми заробљавају део околног растварача (обично воде) у својој унутрашњости док спољашњи липидни слој остаје окружен воденом/хидрофилном средином (Слика 1.6.). Они поседују јединствене карактеристике као што су биокомпатибилност и амфифилност захваљујући липидима који улазе у њихов састав. Састав липида који улази у структуру липозома може да варира у зависности од жељених карактеристика и примене која жели да се постигне. Могу се користити за транспорт хидрофилних и липофилних лекова.<sup>63</sup>

Најзначајнији **угљенични наноматеријали**, који се користе као носачи за лекове, су фулерени, угљеничне наноцеви и нановлакна. **Фулерени** представљају фамилију угљеничних кластера (C<sub>60</sub>, C<sub>70</sub>, C<sub>76</sub>, C<sub>78</sub>, C<sub>84</sub>, C<sub>90</sub>, C<sub>94</sub>, C<sub>96</sub> итд.) који се састоје од

петочланих и шесточланих прстенова угљеника. Фулерен C<sub>60</sub>, који има изглед фудбалске лопте, је први синтетисан и највише изучаван из фамилије фулерена (Слика 1.6.). Јединствена структура и својства фулерена чине да ова класа једињења има веома широку примену, као што су медицински антиоксиданси, фотосензитивни материјали, инхибитори вируса и бактерија.<sup>64-67</sup> Због своје величине (око 1nm), биолошке активности и лаког приступа циљаним молекулима, такође су значајне и транспортне карактеристике фулерена за антивиралне лекове, антибиотике и лекове против канцера, па имају обећавајућу примену у медицини и фармакологији.<sup>68</sup> Неки од конкретних литературних примера коришћења фулерена као носача за лекове су коњугати C<sub>60</sub>-*paclitaxel* за третман рака плућа, C<sub>60</sub>-*doxorubicin* тестиран на туморској линији рака дојке (MCF-7), фулерол-*doxorubicin* тестиран на меланомским ћелијама, као и коњугати с антибиотиком *vancomycin*-ом, нуклеозидима и фотосензибилним материјалима.<sup>68,69</sup> **Угљеничне наноцеве** су уређене, шупље наноструктуре које се састоје од угљеникових атома везаних један за други помоћу sp<sup>2</sup> веза. Могу се замислити као графенске плоче које су савијене у цилиндри (Слика 1.6.), тако да молекули и јони могу бити транспортовани кроз њих. Угљеничне наноцеве могу пробити и ћелијску мембрану без поремећаја њеног интегритета па стога имају потенцијал да се користе као „наноигле“ кроз које могу да се уносе лекови директно у ћелију.<sup>70</sup>

### Неоргански наноматеријали

**Наночестице на бази метала и металних оксида;** Хемијске особине ових материјала и способност њихове функционализације терапеутицима учинили су их примамљивим за изучавање у циљу формирања носача за лекове. Велики број НЧ метала и оксида метала су се показали као веома ефикасни носачи за лекове против канцера. Од метала најчешће се испитују НЧ злата и сребра, док се од оксида метала издвајају оксиди цинка, гвожђа, церијума, силицијума и титанијума.<sup>71-73</sup>

#### **1.4.3. Преглед наноматеријала за циљану и контролисану доставу лекова**

Поменуто откриће липозома као ефикасних носача за лекове покренуло је испитивање великог боја наноматеријала у циљу развоја најефикаснијег терапеутског модела за доставу лекова. У оквиру овог поглавља биће дат кратак преглед система лек-носач

који су већ у фази примене, клиничког тестирања или су дали веома добре резултате у истраживачким студијама, а базирају се на најефикаснијим хемотерапеутицима.

Од система који се базирају на природним полимерним носачима, од скоро је у клиничкој употреби лек *paclitaxel*\* везан за албумински носач. Комерцијални назив оваквог система је *Abraxane* и користи се за лечење канцера дојке.<sup>74</sup> *Abraxane* је такође и у клиничким тестирањима на још неколико врста канцера, као што су канцер плућа (друга фаза испитивања) и напредни нехематолошки малигнитети (прва фаза и фармакокинетичка испитивања).<sup>75,76</sup> Такође је и неколико хемиотерапеутика клинички тестирано у комбинацији с синтетичким полимерним носачем PGA *in vitro* и *in vivo*. При томе су добијени охрабрујући резултати који иду у прилог добробити коришћења оваквих система у односу на сам лек јер превазилазе недостатке самих лекова. Од њих коњугати *PGA-paclitaxel* (*Xyotax*)<sup>77</sup> и *PGA-camptothecin* (*CT-2106*)<sup>78</sup> су у фази клиничких тестирања. С друге стране, HPMA и PEG су највише коришћени небиоразградиви синтетички полимери.<sup>79</sup> Коњугат *Doxorubicin-HPMA* (*PK1*) је прошао прву фазу клиничких тестирања на пацијентима с различитим типовима канцера који су показали резистенцију на претходне хемиотерапије и/или зрачења.<sup>80</sup> Због обећавајућих резултата *PK1* је сада на следећем нивоу детаљних клиничких испитивања.

Од конкретних примера употребе мицела као носача може се издвојити лек *paclitaxel* који је у комбинацији с мицеларним носачем дао обећавајуће резултате у првој фази клиничких и фармакокинетичких истраживања на пацијентима с напредним облицима малигнитета.<sup>81</sup> Од тада се све више развијају и изучавају мултифункционалне мицеле које садрже циљане лиганде и терапеутске агенсе. Такође су се полимерне мицеле показале као веома ефикасни носачи за комплексе рутенијума. На пример, везивањем комплекса *NAMI-A* и *RAPTA-C* за полимерне мицеле примећене су вишеструке повољне карактеристике у виду побољшања антиметастатичког потенцијала, цитотоксичности или побољшаног узимања лека од стране туморских линија.<sup>82,83</sup> За детаље видети Табелу 1.1.

---

\* *Paclitaxel* (*Taxol*) је хемиотерапеутик који припада групи лекова познатих под називом таксани. Ова група лекова делује на цитоскелет ћелије, тачније на тубулин, реметећи његово нормално понашање у току ћелијске деобе и доводе до ћелијске смрти. Делује на рак дојке, јајника, плућа и панкреаса. Недостатак му је висока кардиотоксичност.



Липозомски носачи су употребљени у комбинацији с великим бројем лекова против канцера али су за сада само липозомски *doxorubicin*<sup>†</sup> (комерцијални назив *Doxil*, *Myocet*) и *daunorubicin*<sup>‡</sup> (комерцијални назив, *DaunoXome*) одобрени за клиничку употребу. Ови лекови се сад успешно користе за третман метастазе канцера дојке и Капошијевог саркома.<sup>84,85</sup> Поред наведених клинички одобрених агенаса, неколико липидних хемиотерапеутика на бази комплекса прелазних метала је у фази клиничког испитивања. Од њих најпознатија је *Lipoplatin-a*, која представља цисплатину у липозомском носачу, тренутно у трећој фази клиничког испитивања на карциному плућа. Поред карцинома плућа, *Lipoplatin-a* је дала обећавајуће резултате на још неколико типова канцера.<sup>86</sup> Добре резултате је дао и *Lipoxal*, оксалиплатина у липозомском носачу, који је тренутно у првој фази клиничког испитивања на пацијентима с гастроинтестиналним канцером.<sup>87</sup> За сад је овај лек показао добру толеранцију од стране пацијената, као и смањене нежељене ефекте у поређењу с оксалиплатином. Следећа генерација липозомалних лекова на којој се ради су имунолипозоми (антитела специфична за одређени туморски антиген закачена за липозомски носач), који би селективно достављали лекове на жељено место дејства.<sup>88</sup>

Што се тиче угљеничних наноматеријала као носача за хемиотерапеутике, показано је да цисплатина комбинована са фулеренским носачем показује повећану интрацелуларну акумулацију у туморским ћелијама резистентним на цисплатину (СР-г) као и смањену резистенцију у поређењу са самим леком.<sup>89</sup> Од комплекса прелазних метала, охрабрујуће резултате су дали системи који се састоје од комплекса платине(IV) (пролека оксалиплатине или цисплатине) инкорпориране у угљеничне наноцеви.<sup>91-93</sup> Овакви системи су показали бољу ефикасност него сами лекови. За више информација погледати Табелу 1.1.

Вишеструки примери примене носача на бази метала и оксида метала са лековима који су већ у клиничкој употреби говоре у прилог ефикаснијој терапији у односу на саме лекове. Тако је *Patra* са својим сарадницима показао да се НЧ злата могу ефикасно користити као носач за *Gemcitabine*, лек који се клинички користи за лечење различитих типова канцера.<sup>94</sup> Ефикасност овог система је доказана на ћелијама канцера

---

<sup>†</sup> *Doxorubicin* и *Daunorubicin* припадају групи антрациклинских антибиотика који имају широку примену у лечењу различитих врста канцера (леукемије, Хочкиновог и не-Хочкиновог лимфома, рака дојке, јајника, стомака, тироидне жлезде и саркома). Механизам дејства обухвата интеркалацију између парова база у ДНК молекулима. Недостатак им је изузетна кардиотоксичност.

панкреаса *in vitro* и *in vivo*. НЧ злата са тиолатним полиетилен гликолом (HS-PEG), цисплатином и фолном киселином показују цитотоксични ефекат на туморским ћелијама (OV-167, OVCAR 5) али не и на нормалним, здравим ћелијским линијама (HUVECs, OSE).<sup>95</sup> Такође се у литератури може наћи и неколико примера где су НЧ злата послужиле као ефикасни носачи за комплексе платине(IV) (пролека цисплатине, као што је дискутовано у делу 1.2.1.), цисплатине и оксалиплатине, при чему су ови системи показали многе повољне карактеристике у односу на саме лекове (Табела 1.1.).<sup>96,97</sup> Ту су и НЧ злата које побољшавају терапеутско дејство *doxorubicin*-а (Dox) када се користе као носачи за наведени лек.<sup>98,99</sup> Такође је показано да коришћење НЧ оксида гвожђа као носача за *doxorubicin* и цисплатину за последицу има повећање антитуморске ефикасности у односу на саме терапеутике.<sup>100,101</sup> Затим, коришћење НЧ оксида цинка као носача за *paclitaxel*, цисплатину или *daunorubicin* повећава ефикасност наведених лекова на туморским ћелијским линијама (HNSCC) сквамозног карцинома и ћелијама леукемије.<sup>102,103</sup> Силицијум оксид се такође показао као добар носач за *gemcitabine* и *paclitaxel* што је доказано на канцеру панкреаса мишева.<sup>104,105</sup> А што се тиче комплекса прелазних метала, показано је да везивање оксалиплатине и платина(IV) комплекса (пролека цисплатине) за силицијум оксид повећава ефикасност, као и унос лекова од стране туморских ћелија.<sup>106,107</sup> Поред поменутих оксида, као веома ефикасан носач се показао и титанијум(IV)-оксид. Његова употреба у својству носача биће дата детаљније у засебном поглављу (Поглавље 1.6.4.).

Сумарно, од свих поменутих наносистема за доставу лекова, за сада се на тржишту налазе само *DOXIL* (липозомални *doxorubicin*), *DaunoXome* (липозомални *daunorubicin*) и *Abraxane* (*paclitaxel* везан за албумин).<sup>108</sup> Они су одобрени од стране америчке агенције за храну и лекове (*Food and Drug Administration* (FDA)) и сматрају се првом генерацијом нанотерапеутика. За сада, ни један од одобрених нанотерапеутика не садржи хемиотерапеутике на бази комплекса прелазних метала али је зато велики број њих у фази клиничких испитивања, усавршавања и превазилажења недостатака као што је већ наведено у претходном делу. Преглед наносистема за доставу лекова који су у фази испитивања и усавршавања на бази комплекса прелазних метала је издвојен и дат у оквиру Табеле 1.1.

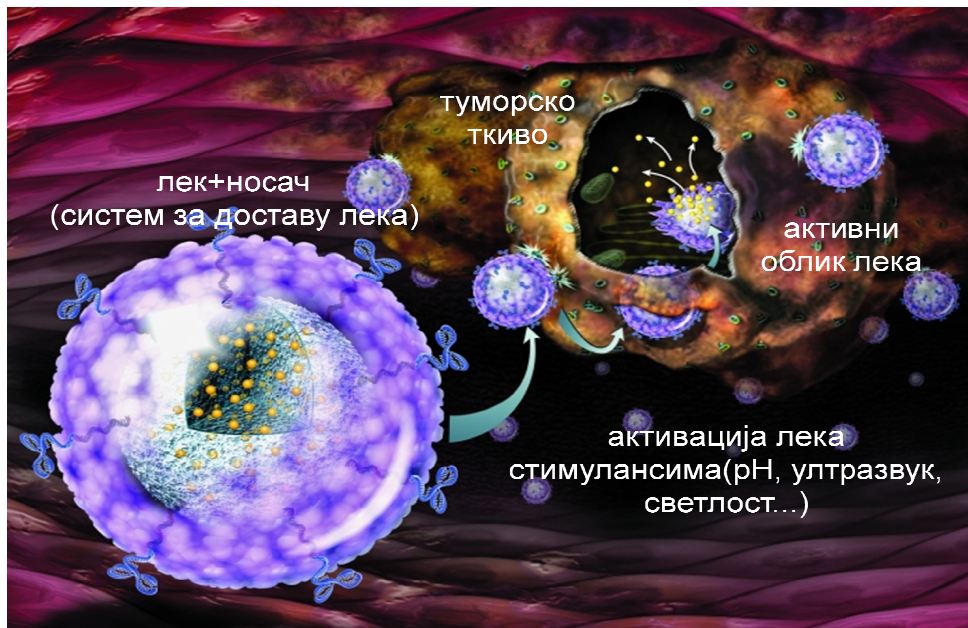
Табела 1.1. Системи носач-лек на бази комплекса прелазних метала платине и рутенијума с предностима коришћења.

Природа носача	Назив	Лек	Бенефит коришћења носача	Референце	
Полимери	AP5346	оксалиплатина	Клиничка испитивања фаза II	109,110	
	NC-4016	оксалиплатина	Клиничка испитивања фаза I	111-113	
	NC-6004	цисплатина	Клиничка испитивања фазе II и III	114-117	
	Полимер млечне киселине (PLA) НЧ	KP1019	20 пута повећана цитотоксичност	118	
	Полимерне мицеле	NAMI-A	1.5. пута већа цитотоксичност на туморским линијама A2780, Ovsar-3 и AsPC-1 него сам NAMI-A; Побољшање антиметастатичког потенцијала у поређењу са самим комплексом	82	
	Мицеле пресвучене фруктозом (гликополимер)	RAPTA-C	Побољшан унос лека од стране туморских ћелија дојке	83	
Липозоми	Liporlatin	цисплатина	Клиничка испитивања фаза III	113	
	Lipoxal	оксалиплатина	Клиничка испитивања фаза I	119	
Неорганске НЧ	Злато				
	Златом обложене НЧ гвожђе оксида	цисплатина	110-пута већа цитотоксичност него цисплатина	120	
		платина(IV)комплекс пролек цисплатине	3-10 пута већа ефикасност на туморским линијама HeLa, MCF-7, A549	96	
		платина(IV) комплекс пролек цисплатине	1,5-12 пута већа ефикасност на туморским ћелијама	97	
		оксалиплатина	6-пута већа цитотоксичност него сама оксалиплатина	121	
		Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	платина(IV) комплекс пролек цисплатине	MRI имидинг; Нижа вредност IC <sub>50</sub> када се користи магнетно поље	122
			цисплатна	Нижа вредност IC <sub>50</sub> него сама цисплатина на туморској линији SKBR-3	123
		Угљеничне НЧ			
		Угљеничне наноцеви	платина(IV) комплекс пролек оксалиплатине	Већа ефикасност <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	91
		Угљеничне наоцеви	платина(IV) комплекс пролек цисплатине	Нижа вредност IC <sub>50</sub> него сама цисплатина; 100-пута већа ефикасност	92,93
	Фулерен	цисплатина	Повећана интрацелуларна акумулација цисплатине у CP-г канцерогеним ћелијама; Смањена резистенција	89	
	НЧ на бази силицијума	оксалиплатина	Побољшан унос од стране туморских ћелија и већа ефикасност <i>in vitro</i> у поређењу с оксалиплатином	107	
		платина(IV)комплекс пролек цисплатине	5,7-62,7 пута већа ефикасност на туморским HeLa, A549 и MCF-7	106	

#### 1.4.4. Наночестице осетљиве на стимулансе- концепт и предности примене

У данашње време се све више ради на усавршавању особина наносистема, те се појављују нове генерације терапеутика. Циљ дизајнирања нових наночестица је побољшање проласка терапеутика кроз биолошке баријере, повећање терапеутске активности тиме што ће се продужити полу-живот лека, повећање растворљивост лека у физиолошким условима, омогућавање продуженог отпуштања лека или отпуштање лека стимулисано на различите начине.<sup>124,125</sup>

Наночестице осетљиве на промену услова средине у последње време све више привлаче пажњу. Разлог великог интересовања научника за ове наночестице, поред претходно наведених физичко-хемијских особина, лежи у чињеницама да се могу користити самостално као активни терапеутици или као носачи за доставу активних агенаса до оболелих ткива. Главни интерес је у чињеници да биолошки релативно инертан наноматеријал може служити као носач за лекове који након дејства стимуланса ослобађа активни лек или/и сам постаје активан и показује синергистички ефекат са леком.<sup>126</sup> Добробит коришћења оваквог система огледа се у чињеници да се лек може дистрибуирати до циљног, оболелог ткива и тек затим активирати, што је аналогно Тројанском коњу на биохемијском нивоу. Концепт је илустрован на Слици 1.7. Након апликације лека с носачем (интравенозно или интраперитонеално), систем доспева циркулацијом до туморског ткива где се акумулира на један од два могућа начина: пасивно (повећана пропустљивост туморског ткива и ефекат задржавања) или активним путем (путем интеракције с рецептором).<sup>127</sup> За детаље механизма акумулације система лек/носач у туморском ткиву видети поглавље 1.6.3. Тек након акумулације система лек/носач у туморском ткиву, лек се може отпустити с носача утицајем из спољашње средине или унутрашњим факторима. Излагање система стимулансу доводи до хемијских или физичких промена на систему што даље доводи до ослобађања или активације лека. Тако ослобођени лек с носача постаје активни терапеутски агенс који испуњава своје антитуморско дејство на жељеном месту у право време. Оваквим приступом се повећава ефикасност терапије и смањују споредни ефекти поменути у Поглављу 1.1.



**Слика 1.7.** Илустрација концепта активације ослобађања лека с површине носача у околини туморског ткива дејством различитих стимуланса.

#### 1.4.5. Преглед врста стимуланса за отпуштање лека са носача

Стимуланси за активацију отпуштања лека могу се поделити на унутрашње и спољашње (Слика 1.8.). Под унутрашњим стимулансима (*in vivo* стимулансима) подразумевају се фактори измењене средине оболелог ткива (pH вредност, температура, садржај реактивних кисеоничних врста (ROS)) у односу на здраво ткиво.<sup>128,129</sup> Туморско ткиво има нижу pH вредност у односу на здраво (киселија средина), микроокружење које је под благом хипертермијом (локална температура 1-2°C изнад вредности здравог ткива) и већу концентрацију реактивних кисеоничних врста (ROS) што је својствено месту инфламације.<sup>130,131</sup> Све то омогућава дизајн носача који ће претрпети физичко-хемијску промену при наведеним условима и отпустити лек након преласка из здравог у измењену средину оболелог ткива. Упркос могућностима, проблем са *in vivo*, унутрашњим стимулансима лежи у чињеници да се они не могу подешавати, нити контролисати. Због тога се све више прибегава развоју и употреби спољашњих стимуланса за активацију и/или манипулацију отпуштањем лека. Под спољашњим стимулансима подразумевају се температура, ултра-звук, магнетно поље и светлост. Применом наведених спољашњих стимуланаса на софистициранији начин се контролише концентрација терапеутика у оболелом ткиву.<sup>127</sup>

#### Подела стимуланаса за активацију отпуштања лека са носача



Слика 1.8. Преглед поделе и врста стимуланаса за активацију отпуштања лека с носача.

#### 1.4.5.1. Примена температуре као спољашњег стимуланса за третман канцера и активацију система лек/носач

Примена температуре у лечењу канцера има вишеструко добар ефекат. С једне стране, локализована хипертермија тј. излагање туморског ткива окружењу с повишеном температуром од 42.5–43.5 °С, потпомаже убијању туморских ћелија. Ова појава је последица промена у прокрвљености туморског ткива, што туморско ткиво чини осетљивијим на хипертермију него здраво ткиво. Тако у случају повећања температуре у односу на физиолошку, на 40 ~ 45 °С, туморске ћелије подлежу ћелијској смрти, док изложеност здравих ћелија поменути температурама у току једног сата не оставља никакве последице. С друге стране, температурни стимуланс проширује крвне судове, мења пропустљивост ћелијских мембрана што све заједно потпомаже достави лека до туморског ткива.<sup>126</sup> Системи за контролисану доставу лекова који су осетљиви на повишену температуру су такође у фази брзог развоја. Они функционишу на принципу физичких или хемијских промена које претрпи носач приликом повећања температуре околине, што резултује ослобађањем лека. Овакви системи удружују ефикасност саме термотерапије и хемиотерапије. Полимерни материјали, типа полиизопропилакриламида и полиакриламида, који су осетљиви на повећање температуре, се најчешће користе као носачи за температуром стимулирано отпуштање лека.<sup>132,133</sup> Примена повишене температуре на овакве системе доводи до раскидања водоничних веза између полимерних ланаца носача и молекула воде из окружења, смањења њихове растворљивости и на крају разградње температурно осетљивог полимерног носача што за последицу има отпуштање лека.<sup>126</sup> Поред полимера ту су

примери и с термо-осетљивим липозомским системом за доставу DOX-a.<sup>134</sup> Поред лека, у липозом је инкапсулиран и амонијум-хидрогенкарбонат који подлеже реакцији декомпозиције када температура достигне 42°C. Један од производа декомпозиције, гас CO<sub>2</sub>, испуњава унутрашњост липозома у виду мехурића, нарушава липозомски омотач и ослобађа молекуле DOX-a. Развијени су такође и системи који су у стању да на неки други вид стимулације (ултразвук или магнетно поље) реагују стварањем топлотне енергије која секундарно доводи до активације или ослобађања лека с носача. Овакви видови стимулације се изучавају посебно као ултразвучни, односно магнетни стимуланси.

#### **1.4.5.2. Примена ултразвука као спољашњег стимуланса за третман канцера и активацију система лек/носач**

Примена ултразвука се заснива углавном на два физичка механизма: загревању и кавитацији. Применом фокусираног ултразвука високог интензитета на одговарајуће место, локална температура се може благо подићи што доводи до апоптозе и некрозе туморских ћелија. Пример примене овог вида стимулације је систем који се састоји од носача тј. нанокавеза злата у који се може инкапсулирати лек и поре затворити фазно изменљивим материјалом који има способност да пређе из чврстог у течну стање када температура достигне 39°C.<sup>135</sup> Када се примени ултразвук на овакав систем, златни кавези ослобађају топлоту која топи фазно изменљиви материјал из пора кавеза што омогућава излазак лека из нанокавеза. Такође се нискофреквентни ултразвук показао веома корисним за стимулацију отпуштања DOX-a из липозома,<sup>136</sup> као и цисплатине из липозомских носача<sup>137</sup>. На експерименталним животињама, лабораторијским мишевима, је показано да након примене ултразвука преко стомака мишева проценат ослобођене цисплатине из липозомских носача износи 70%, док без примене ултразвука проценат ослобођеног лека износи само 3%.

#### **1.4.5.3. Примена магнетног поља као спољашњег стимуланса за третман канцера и активацију система лек/носач**

Развој система осетљивих на примену магнетног поља такође је у центру интересовања.<sup>138</sup> Овакви системи углавном функционишу на принципу ефекта магнетне хипертермије. Један од многобројних примера је дао *Tseng* са својом истраживачком групом.<sup>139</sup> Они су направили систем који се састојао од магнетних

наночестица ( $Zn_{0.4}Fe_{2.6}O_4$ ), лека DOX и комбинације полимера (полиетиленимин модификован  $\beta$ -циклодекстрином, полиетиленгликол и полиамидоамин модификовани адамантаном). Приликом примене магнетног поља, магнетне наночестице су стварале топлоту која је нарушавала полимерну опну носача што је довело до ослобађања молекула лека (DOX-a).

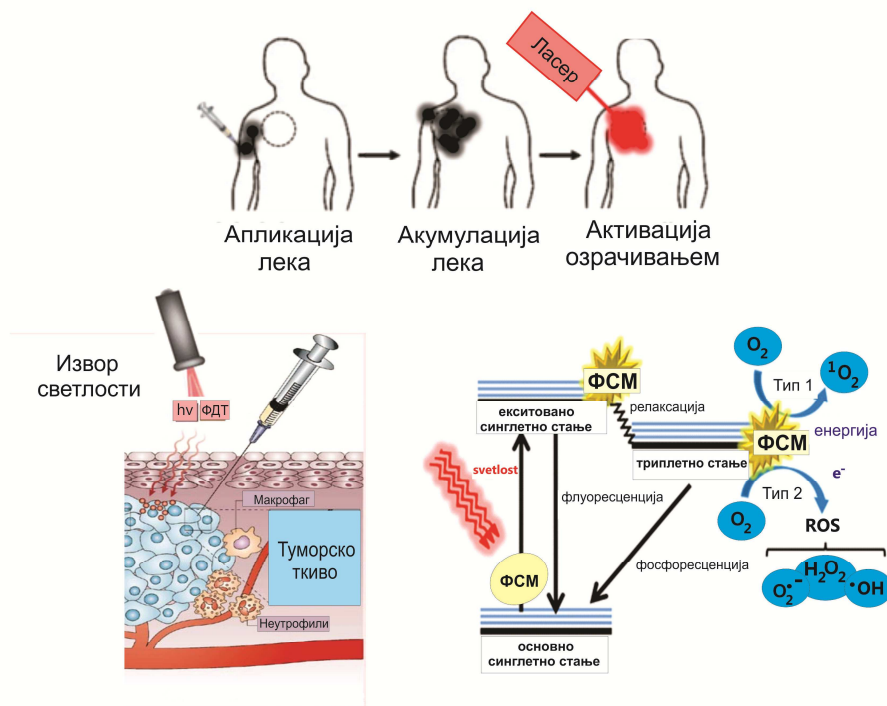
Насупрот великим наплетку које пружају наведени стимуланси у контролисаној достави лекова, остају многа ограничења и изазови које треба превазићи.<sup>127</sup> На пример, магнетно поље, иако спада у стару технику која је нашла широку примену, има недостатак који се огледа у високој цени третмана. Примена ултразвука, с друге стране, може довести до расипања туморског ткива и његовог ширења тј. појаве метастаза. Стога се и даље ради на оптимизацији спољашњих стимуланаса као и самих система носача и одговарајућег терапеутика. Осим наведених спољашњих видова стимулације, примењује се и светлост као засебан вид стимулације. С обзиром на фокус тезе, наредни део текста ће бити детаљније посвећен светлости као спољашњем стимулансу за отпуштање лека, односно особинама и могућностима примене фотодинамичке терапије.

### 1.5. Фотодинамичка терапија (ФДТ)

Фотодинамичка терапија, ФДТ, је развијена још пре више од 100 година са открићем von Tарреiner-a и Jesionek-a који су увидели да приликом примене еозина на тумор коже а затим озрачивањем белом светлошћу долази до смањења величине тумора током времена.<sup>140,141</sup> Концепт ФДТ, који је шематски приказан на Слици 1.9., заснива се на употреби светлости као спољашњег стимуланса и једињења осетљивог на светлост, односно фотосензибилног материјала (ФСМ). ФСМ се уноси у оболело ткиво, где се и акумулира, а ткиво се затим озрачи светлошћу одговарајуће таласне дужине која је одређена апсорпционим спектром активног једињења. Озрачени ФСМ апсорбује светлост након чега долази до ексцитације електрона у виши енергетски ниво (ексцитовано синглетно стање). Пошто синглетно стање има кратко полувреме живота, оно се једним од два релаксациона пута враћа у стање ниже енергије. Први пут подразумева флуоресцентну емисију при чему долази до повратка електрона у основно стање или може подлећи унутрашњој конверзији што за последицу има ослобађање топлоте. Такође, ексцитовани ФСМ може прећи у стање дужег полувремена живота тј. такозвано триплетно стање. Управо је ово триплетно стање неопходно за механизам



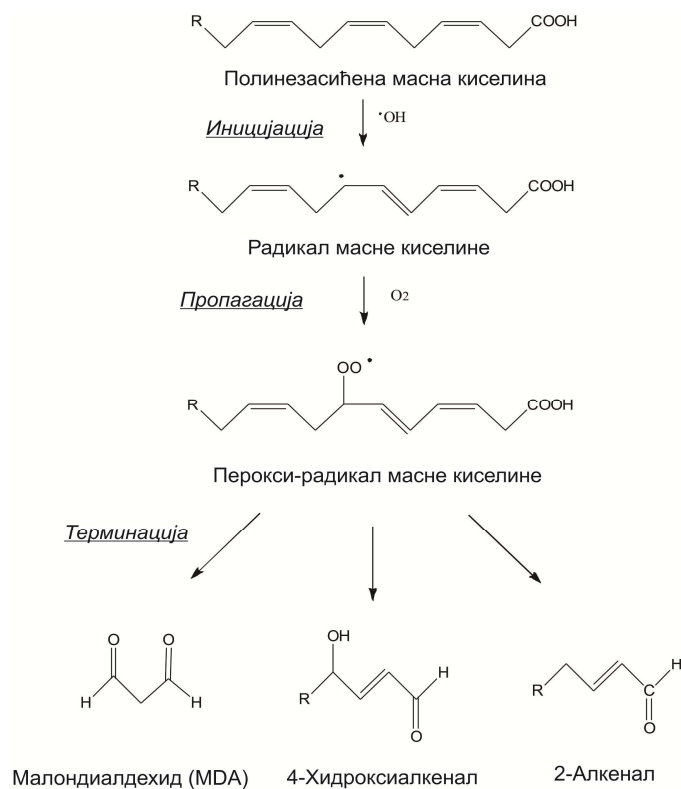
ФДТ који се заснива на преносу енергије на околне молекуле воде или кисеоника ( $\text{H}_2\text{O}$  или  $\text{O}_2$ ) и до њихове јонизације. Услед тога долази до стварања повишене концентрације високо реактивних кисеоничних врста (ROS) које могу да оштете биомолекуле и идукују апоптозу туморских ћелија.<sup>142</sup>



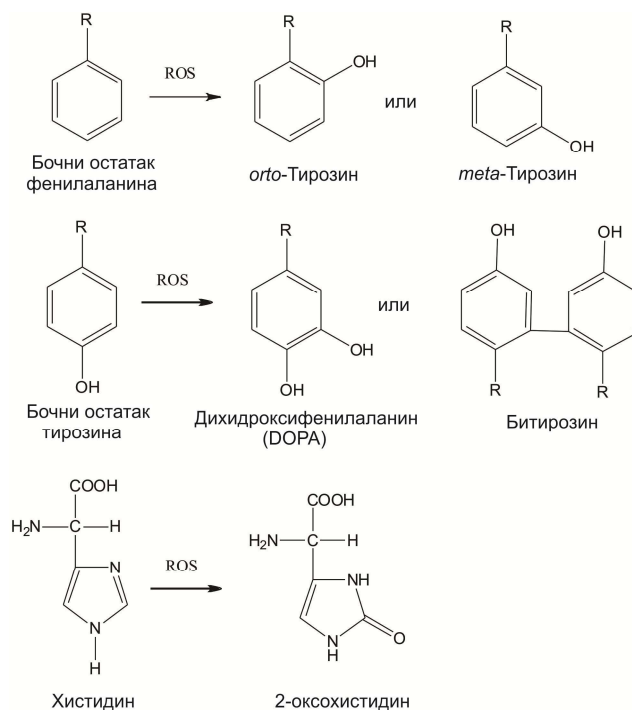
**Слика 1.9.** Илустрација концепта ФДТ и механизма стварања ROS приликом озрачивања фотосензибилног материјала (ФСМ).

### 1.5.1. Механизам стварања и дејства ROS као производа ФДТ

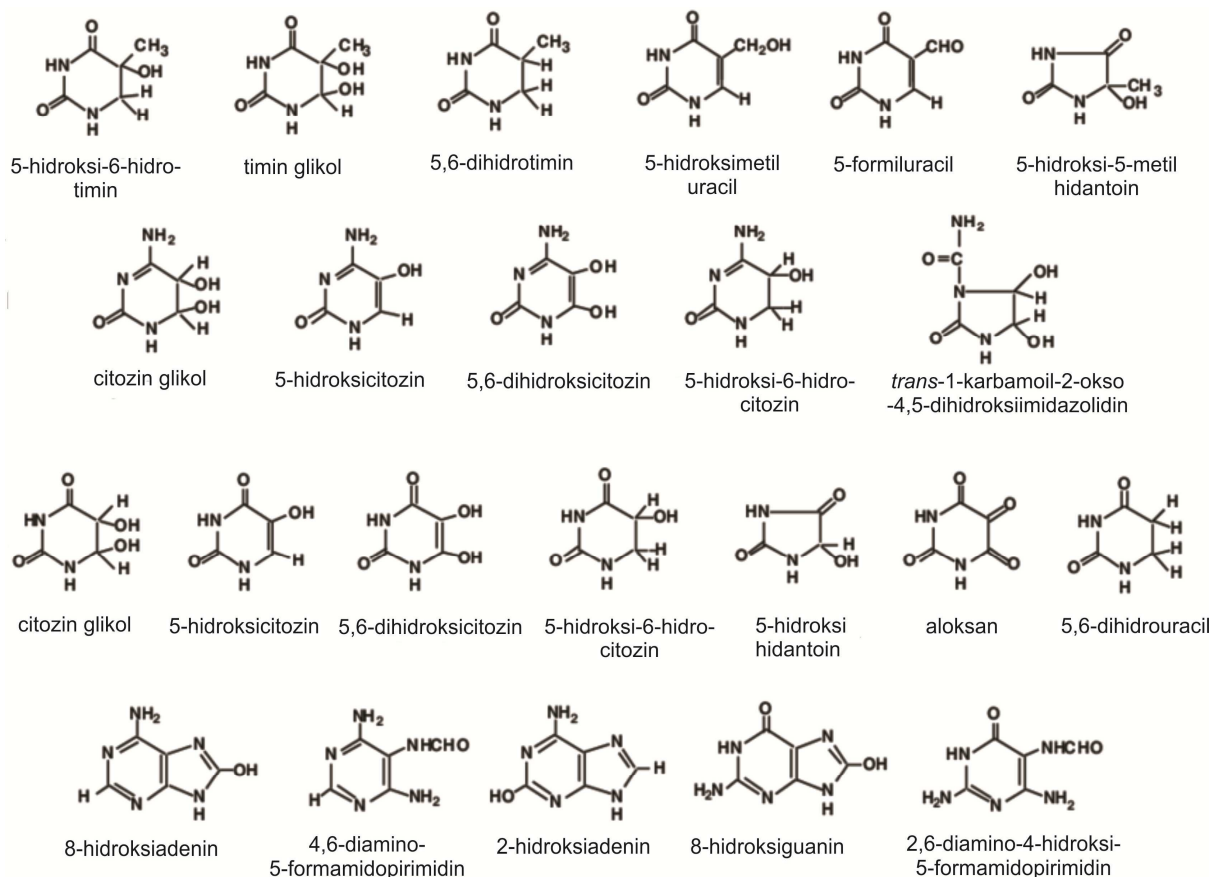
Реактивне кисеоничне врсте, ROS, се могу створити на два начина (Слика 1.9.). Први тип подразумева пренос енергије с триплетног стања ФСМ на молекул  $\text{O}_2$  при чему долази до настанка синглетног кисеоника ( $^1\text{O}_2$ ). Други тип реакције подразумева директан пренос електрона или протона с триплетног стања ФСМ на  $\text{H}_2\text{O}$  или  $\text{O}_2$  при чему настају хидрокси радикал ( $\cdot\text{OH}$ ), супероксид анјон радикал ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) или водоник пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).<sup>143</sup> Након стварања, наведене ROS се проширују у околно туморско ткиво и реагујући с градивним елементима ћелија (незасићеним масним киселинама из липида, бочним остацима аминокиселина из протеина и молекулима ДНК) доводе до уништавања околних туморских ћелија.<sup>144-146</sup> Реакција липидне пероксидације, реакција ROS врста с бочним остацима аминокиселина и ДНК молекулима дате су на Сликама 1.10., 1.11. и 1.12.



**Слика 1.10.** Приказ реакције липидне пероксидације која за последицу има уништавање ћелијске мембране туморских ћелија.



**Слика 1.11.** Приказ реакције ROS врста с различитим бочним аминокиселинским остацима протеина. Наведене реакције доводе до конформационих промена у самим протеинима, али и другим биомолекулима што за последицу има губитак функције протеина и ћелијске смрти.



**Слика 1.12.** Приказ оштећених нуклеотидних база изазваних реакцијом ДНК с ROS врстама. Оштећење ДНК молекула је најчешће изазвано реакцијама адиције хидрокси радикала ( $\cdot\text{OH}$ ) на двоструке везе база и абстракцијом водониковог атома из метил групе тимина и/или C-H веза 2'-дезоксирибозе. Постоји велики број потенцијалних механизма и производа реакције. На слици су дати само неки од њих. Слика је модификована из референце <sup>147</sup>

### 1.5.2. Механизми фото-индукованог отпуштања лека с носача у ФДТ

Фото-индуковано отпуштање активног терапеутика на жељено место дејства подразумева ослобађање лека с носача дејством светлости као спољашњег стимуланса. Лек може бити физички заробљен у носачу (инкапсулиран) или хемијски везан за носач. У случају када је лек физички заробљен, дејством светлости на систем долази до структурних промена на носачу (најчешће деградације) што за последицу има ослобађање инкапсулираног лека, док у случају где је лек хемијски везан за носач механизам ослобађања подразумева раскидање везе између носача и лека. Зависно од саме хемијске структуре лека и носача, као и природе њихове узajамне интеракције, дејством светлости долази до различитих фото-хемијских реакција којима подлежу лек и/или носач а које резултују различитим структурним, конформационим или физичким

променама.<sup>148</sup> Према типу фотохемијских реакција којима подлежу носач и/или лек механизам фото-индукованог отпуштања се може поделити на фотоизомеризацију, полимеризацију и фото-индуковану оксидацију.

**Фотоизомеризација** представља процес конформационе промене молекула дејством светлости. Углавном се односи на *cis-trans* изомеризацију органских молекула с двоструком везом, али овај процес није ограничен само на органске молекуле. И неорганска једињења, као што су комплекси прелазних метала, могу подлећи овом виду изомеризације. Што се тиче органских молекула с двоструким везама, азобензени, који поседују фенилни прстен с обе стране везе  $-N=N-$ , су најдетаљније испитани молекули што се тиче фотоизомеризације. Применом светлости долази до фотоизомеризације ових молекула из *trans* у *cis* облик што је праћено и променом у њиховим физичко-хемијским особинама. Планарни, *trans* облик је хидрофобнији од непланарног *cis* облика, тако да *cis* облик азобензена теже формира мицеле. *Trans* азобензен се због своје планарне структуре пакује чврсто с липозомалним двослојем стварајући компактну структуру за инкапсулацију лека. Приликом озрачивања овако добијеног система с UV зрачењем, азобензен мења своју конформацију из *trans* облика у *cis*, због чега се нарушава густо паковање липидног двослоја и азобензена што резултује цурењем инкапсулираног лека из липозома. Први је наведено доказао *Kano* са сарадницима.<sup>149</sup> Након овог открића, појавио се велики број публикација које су биле базиране на коришћењу липозома с азобензеном осетљивим на светлост.<sup>150–152</sup> Велика предност ових система с азобензеном је реверзибилност процеса изомеризације, што омогућава да се систем „укључи“ и „искључи“ по потреби, односно да се обезбеди дозирање отпуштање лека по потреби.

**Полимеризација** као процес ослобађања лека с носача може на први мах деловати нелогично, јер се фото-индукована полимеризација често користи у процесима формирања НЧ тј. носача. Међутим, овај процес се показао веома ефикасним и за фото-индуковано отпуштање лека с носача. Полимеризација се постиже озрачивањем полимеризабилних вишеструких (двоструких/троструких) веза директно или у присуству иницијатора тј. ФСМ. Полимеризација вишеструких веза инкорпорираних у хидрофобне домene липидног двослоја доводи до скупљања делова двослоја што нарушава једнолично паковање молекула и доводи до стварања пора у двослоју кроз које лек излази у спољашњу средину.<sup>148</sup> Један од примера су липозоми на бази

фосфатидил-холина који имају фото-полимеризабилне троструке везе. Аутори су показали да се ови липозоми могу користити као фото-осетљиви носачи за DOX.<sup>153</sup> DOX је у овом случају поред свог активног дејства као хемиотерапеутик служио и као ФСМ који је потпомагао полимеризацију липозомалног носача након озрачивања светлошћу таласне дужине од 514 nm. Ово је уједно био и први објављени пример фотоиндукованог отпуштања лека с липозомског носача. У новије време се уместо липозома користе и различити полимери као носачи осетљиви на фото-полимеризацију. Један од примера је полимер који у својим бочним деловима садржи инкорпориране деривате циметне киселине.<sup>154</sup> Идеја коришћења оваквог система је фото-индукована реакција циклоадиције циметне киселине која резултује скупљањем нано-носача и избацивањем инкапсулираног лека.

**Фото-индукована оксидација** је још један фотохемијски механизам који може довести до промене на носачу приликом излагању светлошћу. Она укључује стварање оксидујућег агенса, синглетног кисеоника, након озрачивања ФСМ са светлошћу одговарајуће таласне дужине. Створени синглетни кисеоник затим оксидује липиде и доводи до нарушавања структуре липидног двослоја.<sup>155</sup> Овај механизам је већ поменут приликом описа уништавања канцерогених ћелија ROS врстама кроз нарушавање ћелијске мембране приликом примене ФДТ. Исти хемијски концепт се може користити за фото-контролисано отпуштање терапеутског агенса из липидног носача. Тако би применом светлости липидна фото-оксидација (реакције дате на Слици 1.10.) доводила до нарушавања носача. Први пример фото-индуковане оксидације дао је *Anderson* са сарадницима 1992. год.<sup>156</sup> Он је демонстрирао контролисано отпуштање глукозе, као модел система, из липозомског носача дејством светлости из видљивог региона потпомогнуто ФСМ цинк фталацијанином који је био инкорпориран у хидрофобни регион мембране. Озрачивањем таквог система видљивом светлошћу отпуштала се двоструко већа количина глукозе него што је то био случај у одговарајућем еквивалентном контролном експерименту изведеном у мрачним условима.

Као што се из датих примера види, до сада се углавном развијају и усавршавају системи који раде на принципу фото-индуковане промене носача у циљу отпуштања инкапсулираног лека. Међутим, концепт који говори у прилог реверзибилној фото-индукованој промени лека која доводи до његовог ослобађања с носача још увек је недовољно испитан.

### 1.5.3. Предности примене ФДТ

Светло представља веома атрактиван спољашњи стимуланс јер пружа могућност:

**-прецизне локалне примене**, чиме се смањује дифузиони ефекат често присутан код термалног или хемијског стимулисања. Прецизна локална примена се постиже манипулацијом ширине светлосног снопа. Тако се светлосни снап може усмерити на једну тачку или проширити да заузме жељену површину. Овим се захватање здравог ткива своди на минимум.

**-временске контроле**, односно могућност подешавања трајања терапије лаким укључивањем и искључивањем светлосног снопа.

**-подешавања таласне дужине светлости и њеног интензитета**, у зависности од захтева терапије и врсте ФСМ

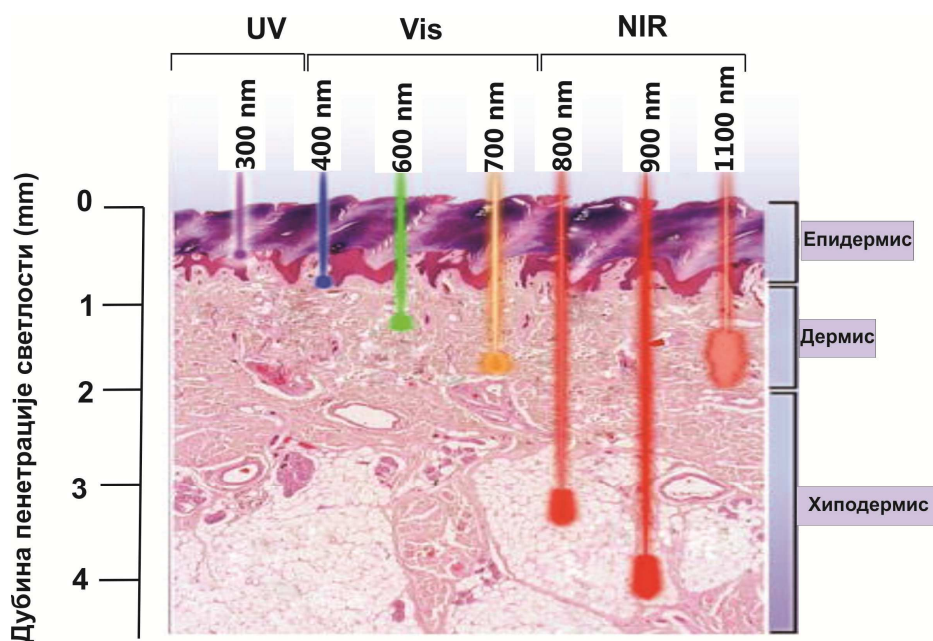
**-контролисање дозирања лека**. Терапија се може поделити у више доза наизменичним укључивањем и искључивањем светлости или подешавањем њене снаге. На овај начин се може обезбедити пулсно ослобађање лека тј. да се обезбеди више порција из само једне апликације чиме се повећава и ефикасност саме терапије.

### 1.5.4. Ограничења примене светлости у терапији и начини превазилажења истих

Коришћење светла као спољашњег стимуланса за ослобађање или активирање лека не представља нови концепт али је његово коришћење дуго било ограничено због ограничене пенетрације светлости у ткиво. Дубина пенетрације светлости је зависна од таласне дужине (Слика 1.13.). У региону таласних дужина од 300 до 600 nm дубина пенетрације светлости кроз кожу је веома мала због апсорпције од стране хемоглобина који има апсорпционе максимуме на 540 и 576 nm, а има и доста расејања у региону од 300 до 450 nm.<sup>157</sup> Уколико се користи светло таласне дужине од 800 до 1000 nm, које одговара блиској инфрацрвеној области (енг. *near infrared*, NIR), пенетрација светлости кроз кожу може достићи и неколико милиметара док се изнад 1000 nm дубина пенетрације опет смањује, с обзиром да у овој области вода апсорбује већину зрачења.<sup>158</sup> Ултрављубичасту (енг. *ultraviolet*, UV) област, којој одговара регион испод 380 nm, такође карактерише ограничена пенетрација, до 1 mm.<sup>159</sup>

С обзиром на ограничену пенетрацију светлости, могао би се извести закључак да било која техника која се заснива на употреби светла као спољашњег стимуланса не би била

довољно ефикасна. Међутим, брзи развој оптичких влакана који је омогућио увођење светлости у дубину ткива, као и употреба светлости за топикални третман тј. третман површинског ткива нпр. канцера коже (меланома) која не захтева дубоку пенетрацију светлости, учинили су да се фотодинамичка терапија заслужено избори за своје место у терапији канцера.



Слика 1.13. Дубина пенетрације светлости у зависности од таласне дужине. Слика модификована из референце<sup>160</sup>.

### 1.5.5. Фотосензибилни материјали које се користе у клиничкој пракси за фотодинамичку терапију

Различита органска и неорганска једињења су испитана као ФСМ за ФДТ. Порфирин, хлорин и фталоцијанин припадају групи органских ФСМ који су међу првима изучавани. Међутим, кратко полувреме живота ексцитованог стања и низак принос синглетног кисеоника допринели су томе да су ови ФСМ врло брзо превазиђени. До сада су само три врсте ФСМ одобрене за клиничку употребу у терапији канцера ФДТ широм света, док су још два одобрена само на Европском тржишту.<sup>142,161</sup> Преглед ФСМ који су у клиничкој употреби као и врсте канцера на којима су активни дат је у оквиру Табеле 1.2.

Табела 1.2. Преглед ФСМ који су одобрени за клиничку употребу третмана различитих врста канцера.

ФСМ	Структура	Таласна дужина (nm)	Клинички одобрен	У фази клиничког тестирања	Тип канцера против кој је активан
<i>Photofrin</i>	порфирин	630	Свуда у свету		плућа, једњака, жучних путева, бешике, мозга, јајника
<i>ALA</i>	порфирински прекурсор	635	Свуда у свету		коже, бешике, мозга, једњака
<i>ALA esters</i>	порфирински прекурсор	635	У Европи		коже, бешике
<i>Foscan</i>	Хлорин	652	У Европи	САД	главе и врата, плућа, мозга, коже, жучних путева
<i>Verteporfin</i>	Хлорин	690	Свуда у свету	Велика Британија	офталмолошки, панкреаса, коже

Као што се може приметити, ниједан од ФСМ који су у клиничкој употреби не припада наночестицама, ни комплексима прелазних метала али бројни литературни подаци говоре у прилог њиховом потенцијалу за ту сврху.<sup>162-166</sup> Међу њима наночестице (НЧ)  $TiO_2$  и комплекси рутенијума привлаче посебну пажњу. О њиховој употреби ће више речи бити у следећим поглављима.

### 1.6. Употреба НЧ $TiO_2$ у биомедицини; хемијски, физички и биолошки аспект

На тржишту је тренутно доступно пуно наноматеријала, међу којима се  $TiO_2$  налази на другом месту по заступљености и употреби у нашим свакодневним животима.<sup>167</sup> За широку примену овог материјала одговорне су његова лака доступност, ниска цена, фотоактивност, биокомпатибилност и једноставност модификације површине.  $TiO_2$  је нашао примену као фотокатализатор за пречишћавање воде од штетних органских



материја и у производњи енергије (соларне ћелије), сензора за гас, у козметологији најчешће у оквиру крема за сунчање, затим као бели пигмент у прехранбеној индустрији и индустрији боја.<sup>168-173</sup>

Упркос обимној употреби  $TiO_2$  у различитим комерцијалним продуктима, његова примена у области биомедицине је релативно новијег датума. Прву биомедицинску примену нано- $TiO_2$  објавио је јапански научник *Fujishima* деведесетих година двадесетог века, где је истакнута могућност употребе овог материјала у ФДТ против туморске линије HeLa.<sup>174</sup> У истом периоду, објављено је истраживање у ком се описује успешна примена  $TiO_2$  у својству медицинских имплантата у ортопедији.<sup>175</sup> Недуго затим, број радова и цитата о употреби  $TiO_2$  у области биомедицине је у експоненцијалном порасту, тако да је овај мултифункционални материјал до данашњег дана нашао примену у имицингу, дијагностици и терапији.<sup>176</sup> Што се тиче дијагностике и имицинга,  $TiO_2$  наноструктуре су се показале као добра нанолатформа за контрастна средства у магнетној резонанци. Посебно се издваја потенцијал коришћења наночестица  $TiO_2$  у својству носача за лекове и ФСМ у ФДТ. За ово су заслужне јединствене физичко-хемијске особине овог материјала чији ће преглед бити дат у следећим потпоглављима.

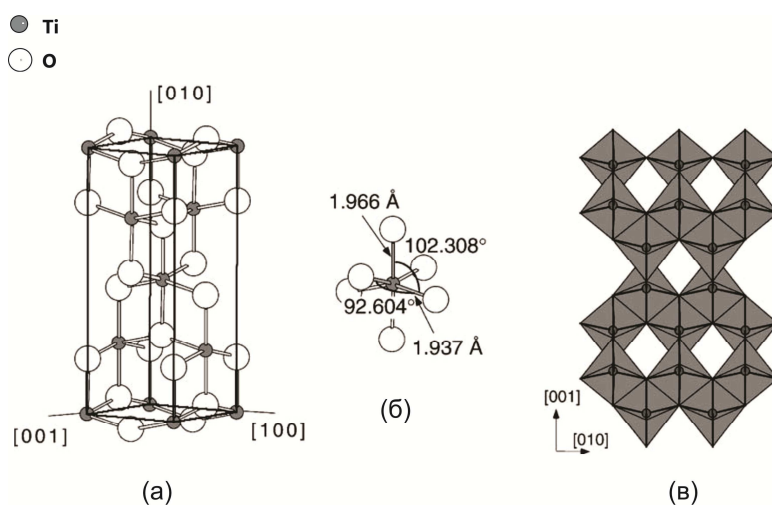
### **1.6.1. Титан(IV)-оксид $TiO_2$ , хемијски аспект**

#### **1.6.1.1. Кристална структура титан(IV)-оксида**

Титанијум је веома распрострањен и доступан елемент, који се у природи налази најчешће у облику  $TiCl_4$  и  $TiO_2$ .  $TiO_2$  постоји у три главне кристалне форме: рутил (тетрагонална), анатас (тетрагонална) и брукит (ромбоедарска).<sup>177</sup> Од наведених кристалних форми, доказано је да је анатас форма најфотоактивнија, те је стога нашао највише примене у пракси.<sup>178</sup> С обзиром да је управо ова кристална форма синтетисана и изучавана у својству носача и ФСМ, у овој докторској дисертацији акценат ће бити на поменутој форми.

Градивне јединице анатас кристалне форме су приказане на Слици 1.14. Основна градивна јединица се састоји од атома титанијума (Ti) који су окружени са шест атома кисеоника (O) и поседује октаедарску геометрију са дисторзијом која подразумева да

су дужине Ti-O везе на врховима октаедра (аксијалне везе) нешто дуже (износе 1,966 Å), од дужина екваторијалних Ti-O веза које износе 1,937 Å (Слика 1.14. (б)).<sup>179</sup>



**Слика 1.14.** Модел анатас кристалне структуре  $\text{TiO}_2$  (а) (атоми титана су дати сивом бојом, док су кисеоникови атоми дати белом). Једна  $\text{TiO}_6$  јединица с октаедарском геометријом и дисторзијом (б). Приказ грађења анатас кристалне структуре  $\text{TiO}_2$  везивањем октаедарских јединица (в). Слика је модификована из референце<sup>179</sup>.

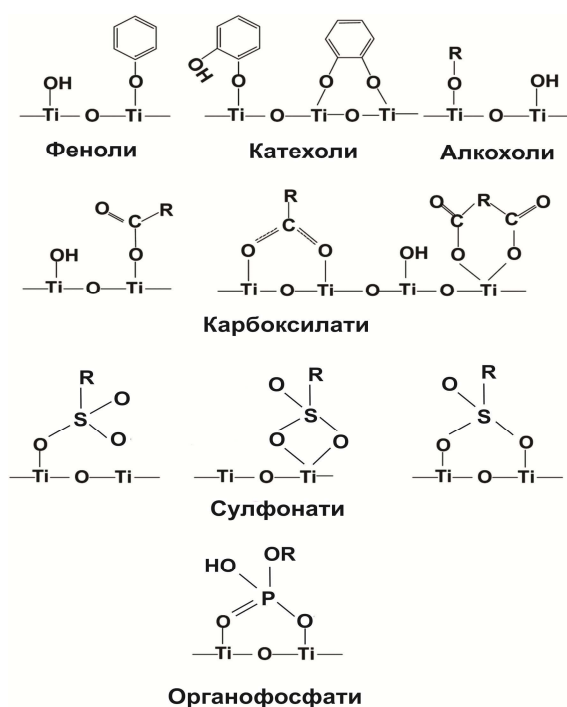
У нано-системима, велики удео атома који чине наночестице  $\text{TiO}_2$  је локализован на површини са значајно измењеним електро-хемијским особинама. Како величина наночестица  $\text{TiO}_2$  постаје мања од 20 nm, површински атоми титанијума прилагођавају своју координацију окружењу, мењајући геометрију из октаедарске (хексакоординатне) у квадратно-пирамидалну (пентакоординатну). Ова промена је такође праћена и скраћењем дужине веза између Ti и O у циљу прилагођавања закривљењу наночестице. Тако настали површински атоми титанијума, такозвани површински дефекти, с незасићеном координацијом извор су повећане реактивности наночестица што им пружа могућност да везују различите лиганде за своју површину.<sup>180–182</sup>

### 1.6.1.2. Специфична површина $\text{TiO}_2$ НЧ и могућност модификације површине једињењима са различитим функционалним групама

Величина која је битна код дефинисања свих наночестица је њихова специфична површина. Она представља површину активну за хемијске реакције и везивање специфичних група приликом функционализације честица за специфичне примене. Једноставна површинска модификација  $\text{TiO}_2$  представља велику предност овог

материјала јер је то ефикасан начин да се особине материјала промене или прилагоде жељеној намени. До сада је испитана читава класа електрон-донорских лиганата (ендиоли, бензенови деривати, карбоксилне киселине, фосфонати, сулфонати и други) који се у зависности од намене могу користити за површинску модификацију НЧ  $\text{TiO}_2$ .<sup>171,183–187</sup>

На Слици 1.15. је дат приказ координације различитих функционалних група за површину  $\text{TiO}_2$ . Карактеристичне групе се везују за координативно незасићене атоме  $\text{Ti}$  што за последицу има мењање координације атома  $\text{Ti}$  из квадратно-пирамидалне у октаедарску чиме се употпуњује координација свих атома  $\text{Ti}$  и  $\text{O}$  на површини нанокристала.



**Слика 1.15.** Функционализација површине  $\text{TiO}_2$ . Приказ координације различитих функционалних група на површини  $\text{TiO}_2$ .

Интензивно се испитује и координација великог броја комплекса прелазних метала, чији лиганди садрже неке од наведених функционалних група, за површину  $\text{TiO}_2$ .<sup>188–191</sup>

Међу највише изучаваним су комплекси рутенијума.<sup>192–196</sup> У свим поменутих студијама модификација површине поменутих једињењима је за циљ имала унапређење фотохемијских особина  $\text{TiO}_2$  и унапређење њихове примене као

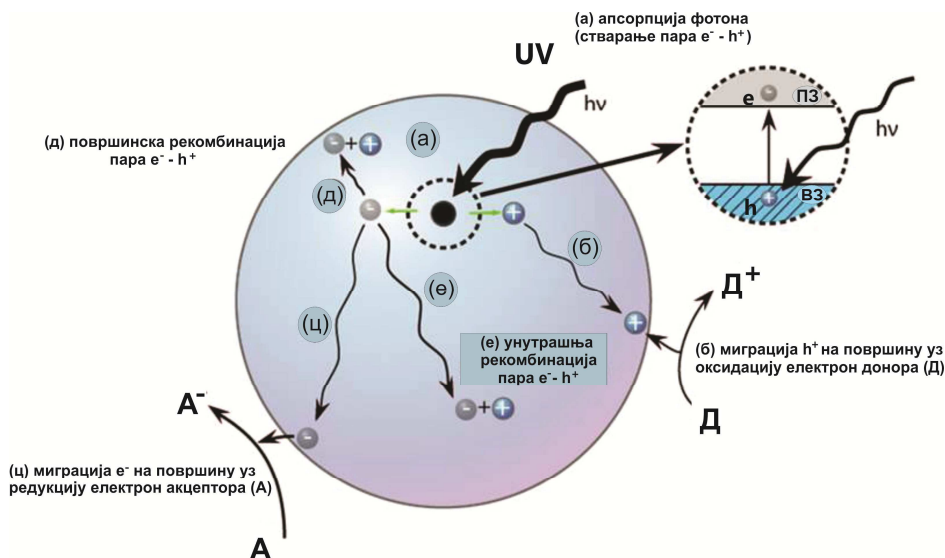
фотокатализатора у процесу стварања енергије. У новије време испитивања су усмерена на везивање лекова на површину  $\text{TiO}_2$ , где се  $\text{TiO}_2$  показао као ефикасан носач за различите групе лекова, што ће бити детаљно дискутовано у оквиру поглавља 1.5.

### 1.6.2. Титан(IV)-оксид ( $\text{TiO}_2$ ); фотосензитивност

Као што је већ истакнуто,  $\text{TiO}_2$  је изразито фотоактивно једињење. Побуђује се светлосном енергијом која је већа или једнака енергетском процепу. С обзиром да  $\text{TiO}_2$  наноструктуре имају енергетски процеп 3 – 3.8 eV, то јасно указује на то да су то материјали активни у UV области тј. да апсорбују ултраљубичасту светлост. Када фотон енергије веће или једнаке енергији енергетског процепа дође до површине  $\text{TiO}_2$  наноструктуре, побуђује се електрон из валентне (ВЗ) у проводну зону (ПЗ), остављајући за собом фотостворену шупљину у валентној зони (Слика 1.15.). Након интеракције с више фотона, долази до стварања побуђених врста тј. парова електрон-шупљина ( $e^- - h^+$ ) што се поједностављено може приказати следећом једначином:



Настали електрони и шупљине се слободно крећу дифузијом кроз материјал што за последицу има могућност одвијања више различитих процеса (Слика 1.16.). Заправо, оксидо-редукциони процеси који се одвијају на површини НЧ су у сталној конкуренцији са процесима рекомбинације, што представља један од основних проблема за ефикасну примену оваквих система у фотохемијским процесима. Најједноставнији начин за решавање овог проблема јесте присуство одговарајућих електрон-донорских, односно, електрон-акцепторских врста у околном медијуму, чиме се поступак раздвајања наелектрисања најефикасније постиже, а последично, процес рекомбинације готово у потпуности елиминише. Уз услов ефикасног раздвајања пара  $e^- - h^+$ , ови носиоци наелектрисања могу да дифундују на површину и на тај начин учествују у реакцијама оксидације и редукције. Тачније, електрони који дифундују на површину материјала могу редуковати акцепторе електрона из околине док, с друге стране, позитивно наелектрисане шупљине могу оксидовати доноре електрона.<sup>197,198</sup>



**Слика 1.16.** Шематски приказ главних фотокаталитичких процеса који се одигравају приликом озрачивања  $\text{TiO}_2$ . а) стварање пара електрон-шупљина ( $e^- - h^+$ ) б) миграција шупљине на површину наночестице што резултује оксидацијом електрон-донора (Д) ц) миграција електрона на површину наночестице што резултује редукцијом електрон-акцептора (А) д) рекомбинација пара  $e^- - h^+$  на површини наночестице е) рекомбинација пара  $e^- - h^+$  у унутрашњости наночестице.

Фотосензитивне честице са  $\text{TiO}_2$  се могу унети у живо ткиво, а након постизања одговарајуће концентрације на жељеном месту светлосни сноп се усмерава и пролази до циљног ткива. Честице  $\text{TiO}_2$  затим апсорбују светлост у облику фотона и потом га преносе на локалне молекуле који садрже кисеоник при чему настају различити реактивни облици кисеоника (ROS) и  $^1\text{O}_2$ , као што је већ сликовито дато у поглављу 1.3.5., (Слика 1.9). Детаљније сагледано, уколико се фотоактивирана наноструктура  $\text{TiO}_2$  нађе у воденој средини обogaћеној кисеоником, што је случај приликом тестирања у биолошким условима, пар електрон-шупљина ( $e^- - h^+$ ) формиран након озрачивања дифундује на површину наночестице где се догађају следећи процеси:

- 1) електрон редукује електрон акцептор; тако  $\text{O}_2$  бива редукован до  $\text{O}_2^-$
- 2) шупљина оксидује електрон донор што подразумева конверзију  $\text{H}_2\text{O}$  у  $\cdot\text{OH}$  или конверзију површинских титанола у радикал титанол.

Секундарне ROS, као што је  $\text{H}_2\text{O}_2$ , стварају се у даљим реакцијама енергетског трансфера примарних ROS. Приликом озрачивања  $\text{TiO}_2$  у воденим растворима утврђено је да такође долази до стварања  $^1\text{O}_2$  заједно са другим ROS али да је доминантна врста која настаје управо супероксид анјон ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ).<sup>198</sup> Након стварања, ROS врсте дифундују у околни раствор, односно ткиво. Времена живота и миграционе

раздаљине најчесталије створених ROS врста након озрачивања TiO<sub>2</sub> се могу наћи у литературним подацима<sup>199–201</sup> и преглед вредности је дат у Табели 1.3. Из датих вредности је уочљиво да O<sub>2</sub><sup>•-</sup> врста има најдуже време живота, што је уједно и разлог због чега је овај радикал најдоминантнија ROS врста која настаје након озрачивања TiO<sub>2</sub>, па се претпоставља и да има главну улогу у убијању туморских ћелија.

**Табела 1.3.** Полуживоти и дифузионе раздаљине три најчесталије створене ROS врсте настале након озрачивања TiO<sub>2</sub> UV светлости.

ROS	Полувреме живота	Дифузиона запремина
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	117 μs	118 nm
•OH	119 ns	119 Å
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	120 ms	120 μm

Оштећење туморских ћелија изазвано ROS врстама се одиграва у две фазе. Иницијално оксидативно оштећење се одиграва на ћелијској мембрани где фотокаталитичка површина TiO<sub>2</sub> остварује свој први контакт с ћелијом. Створене ROS врсте реагују с компонентама ћелијске мембране (незасићеним масним киселинама из липида и бочним остацима аминокиселина из протеина) што даље води нарушавању структуре мембране и њеној повећаној пропустљивости. Због повећане пропустљивости мембране, интрацелуларне компоненте ћелије почињу да цуре из ње, а с друге стране НЧ TiO<sub>2</sub> сада могу дифундовати у оштећену ћелију и директно „напасти“ преостале интрацелуларне компоненте што води ћелијској смрти.<sup>202</sup>

Из досадашњег текста јасно је да је управо површина честице одговорна за њену фотоактивност. Стога, није ни чудно што се манипулацијом величине честице може утицати на фотоефикасност и то тако да се са смањењем величине честице повећава фотоефикасност с обзиром на повећање односа површине и запремине. Када се ФСМ једном фотоактивира он ствара ROS наредних 18 h, што је сасвим довољно да се индукује апоптоза у циљним туморским ћелијама тј. да се испуни жељени ефекат у циљном ткиву.<sup>203</sup>

### 1.6.3. Титан(IV)-оксид (TiO<sub>2</sub>), биолошки аспект

Као што је већ претходно поменуто, неозрачени TiO<sub>2</sub> се сматра биокомпатибилним. Прва испитивања су рађена на експерименталним животињама где је показано да њихова примена нема изражен токсични ефекат. Сигурна доза НЧ TiO<sub>2</sub> одређена је на моделу пацова и износи 5 g/kg телесне масе пацова, без испољавања икаквих штетних ефеката.<sup>204</sup> Касније је показан и низак ниво токсичности приликом примене код људи, али се накнадно испоставило да токсичност ипак зависи од физичко-хемијских карактеристика НЧ TiO<sub>2</sub> као што су величина честица, кристална структура и фотоактивација.<sup>205</sup> Такође, показано је да неозрачена површина НЧ TiO<sub>2</sub> у форми танког филма подстиче раст здравих ћелија (фибробласти, остеобласти, хондробласти и мезенхимских матичних ћелија).<sup>206</sup> Претпоставља се да је разлог оваквог понашања у томе што је текстура TiO<sub>2</sub> филма веома слична текстури коју формира екстрацелуларни матрикс као природни супстрат на коме се остварује деоба и раст ћелија. Међутим, у биолошком окужењу, стабилност честица, као и њихова ванћелијска и ћелијска дистрибуција зависи од њихове хемијске структуре, морфологије и величине. Велики проблем с НЧ у биолошком окружењу је њихова брза елиминација из организма. Многе НЧ организм тренутно детектује и веома брзо их одстрањује, не остављајући им довољно времена да остваре свој терапеутски ефекат. Приликом инјектовања НЧ у крвоток, оне долазе у контакт са системом одбране који их препознаје као страна тела и тежи да их елиминише из организма фагоцитозом од стране Купферових ћелија јетре и макрофага слезине.<sup>207</sup> Елиминација НЧ се може десити и на други начин, у зависности од величине честице. Исцрпна истраживања су указала да НЧ за биомедицинску употребу не би требале да буду веће од 200 nm. Наиме, честице чије димензије прелазе 200 nm се лако акумулирају и агломеришу у слезини, ефикасније активирају систем за елиминацију од мањих честица, па се брже и уклањају из организма.<sup>208</sup>

С биолошког аспекта такође је неопходно споменути да НЧ TiO<sub>2</sub> показују селективност у убијању између здравих (неизмењених) и туморских (измењених) ћелија изазивајући првенствено смрт измењених, туморских ћелија. *Thevenot* је са својом групом изложио да је селективна цитотоксичност НЧ TiO<sub>2</sub> повезана с повећаном активношћу лизозома која се среће код туморских ћелија.<sup>209</sup> Он је, наиме, претпоставио да је цитотоксичност НЧ TiO<sub>2</sub> повезана с редукцијом самих НЧ TiO<sub>2</sub> а лизозоми су органеле богате киселим

хидролазама и редукујућим агенсима, као што је цистеин. Самим тим редуција НЧ  $TiO_2$  је могућа у киселом, редукујућем окружењу лизозома, што даље води повећаном стварању ROS врста и ћелијској смрти. Предложена су и два механизма којим се НЧ акумулирају у туморском ткиву:

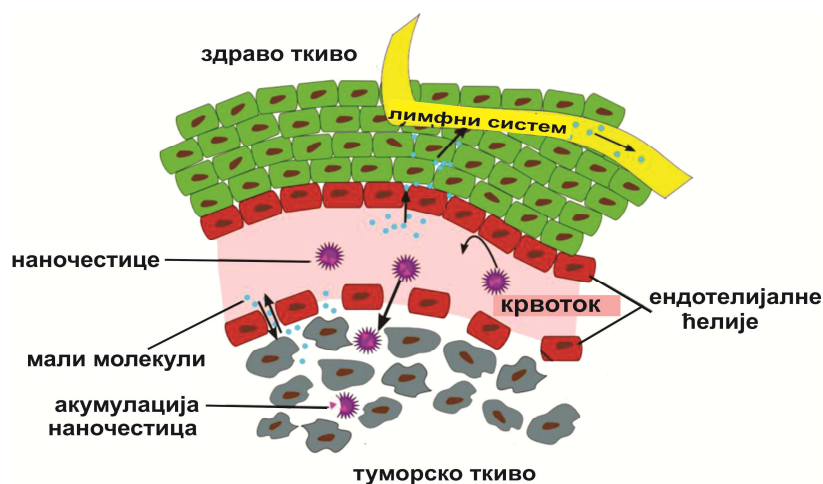
- 1) активним путем (путем интеракције с рецептором) и
- 2) пасивним (повећана пропустљивост туморског ткива и ефекат задржавања)

Наведеним начинима се постиже селективност у убијању туморских ћелија у односу на здраве.

1) Акумулација активним путем подразумева везивање одговарајућих лиганда на површину НЧ који се везују за мембранске протеине (рецепторе) повећано експримиране на површини туморских ћелија (на пример рецептор за трансферин и фолну киселину). Специфична интеракција између лиганда на површини НЧ и рецептора на туморским ћелијама убрзава улазак наночестица у ћелију покрећући сложене механизме ендоцитозе. Велики број лиганда је до сада коришћен за функционализацију површине НЧ у циљу постизања специфичног препознавања НЧ од стране рецептора на туморским ћелијама, укључујући протеине (трансферин), полимере и мале молекуле као што је фолна киселина.<sup>210-212</sup>

2) Акумулација пасивним путем подразумева повећану васкуларну пропустљивост туморског ткива и ефекат задржавања НЧ. Када НЧ и мали молекули уђу у крвоток, и једни и други могу прећи ендотелијалне ћелије крвних судова. Да ли ће проћи у ткиво зависи управо од тога да ли је у питању здраво или туморско ткиво. Туморско ткиво има већи интерцелуларни простор за разлику од здравог тако да у њега могу прећи и НЧ и мали молекули док у здраво ткиво могу прећи само мали молекули (Слика 1.17.) Такође, туморско ткиво има и редуковану лимфну дренажу тако да се доспели молекули из ткива уклањају много спорије и лекови акумулирају, што су свакако особине које се користе приликом терапије.<sup>213-215</sup> Још једна погодност је и већа цитотоксичност коју НЧ показују на туморским ћелијама у односу на здраве због повећане лизозомалне активности туморских ћелија.<sup>216,217</sup>





**Слика 1.17.** Илустрација пасивног механизма акумулације НЧ тј. повећане пропустљивости и ефекта задржавања наночестица за доставу лекова у туморском ткиву. Слика модификована из референце.<sup>218</sup>

Уколико се за НЧ вежу још и лиганди који препознају туморске ћелије по принципу лиганд/рецептор, селективност убијања туморских ћелија у односу на здраве се може још додатно повећати. Описани механизми акумулације наносистема за доставу лека у циљном туморском ткиву користе слабе тачке ћелија рака и представљају биолошки феномен који иде на руку примени наносистема за терапију канцера.

#### 1.6.4. НЧ $\text{TiO}_2$ као ФСМ и носачи; преглед досадашњих истраживања

Као што је већ поменуто НЧ  $\text{TiO}_2$  су биокompatibilне уколико нису активиране (минимална цитотоксичност у мрачним условима) док њихова фотоактивност и фототоксичност долази до изражаја приликом озрачивања UV светлошћу. Саме НЧ  $\text{TiO}_2$  ексцитоване UV зрачењем показале су потенцијал као ФСМ у ФДТ много различитих врста канцерогених ћелија. *In vitro* фото-индукована цитотоксичност је до сада показана на ћелијама цервикалног канцера (HeLa),<sup>219</sup> ћелијама глиома (C6, GMB),<sup>220</sup> ћелијама канцера бешике (T24),<sup>221</sup> ћелијама леукемије (HL60, THP-1),<sup>222</sup> ћелијама меланома (S-91),<sup>223</sup> ћелијама тумора дебелог црева (LoVo),<sup>224</sup> ћелијама рака дојке (MCF-7, MDA-MB-468)<sup>225</sup> и ћелијама рака јетре (HepG2),<sup>226</sup> док је *in vivo* доказана на ћелијама цервикалног канцера (HeLa)<sup>227</sup> и ћелијама канцера бешике (T24).<sup>221</sup> Такође, због могућности лаке модификације, на површину  $\text{TiO}_2$  се лако могу везати различите

групе једињења међу којима су и различите групе лекова. Када се томе дода и биокомпатибилност НЧ  $\text{TiO}_2$ , не изненађује пораст броја радова који описују НЧ  $\text{TiO}_2$  као потенцијалне носаче различитих група лекова. У литератури су већ многе  $\text{TiO}_2$  наноструктуре, укључујући НЧ  $\text{TiO}_2$ , нанотубе, капсуле и *whiskers*<sup>§</sup> описане као ефикасни носачи за лекове против канцера а брзином отпуштања лекова с носача се може манипулисати употребом светлости. У скорије време је *Yin* са сарадницима описао употребу НЧ  $\text{TiO}_2$  коњугованих с хијалуронском киселином и доксорубицином (изворно *doxorubicin*) у терапији канцера.<sup>228</sup> Ове НЧ  $\text{TiO}_2$  конвертују NIR у UV светлост притом вршећи контролисано отпуштање хемотерапеутског агенса доксорубицина у оболелом ткиву. Такође је *Wang* са својим сарадницима модификовао НЧ  $\text{TiO}_2$  с полиетиленамином у циљу доставе лека паклитаксела (*paclitaxel*) до оболелог туморског ткива.<sup>229</sup> НЧ  $\text{TiO}_2$  су потом активирани помоћу UV светлости. Након озрачивања ткива НЧ  $\text{TiO}_2$ , поред тога што је дошло до стварања ROS, такође је долазило и до ослобађања лека са површине НЧ  $\text{TiO}_2$  услед фотоактивације. *Liu* је такође објавио да функционализација НЧ  $\text{TiO}_2$  с хијалуронском киселином, а затим везивање цитостатика цисплатине за тако припремљен носач представља добар систем за циљану доставу лека и може знатно побољшати хемотерапију у случају канцера јајника.<sup>230</sup> *Xu* је са сарадницима развио систем који је подразумевао  $\text{TiO}_2$  *whiskers* које су пресвучене с гамбогиском киселином, која је показала потенцијал у терапији тумора јетре, плућа, простате, панкреаса и гастроинтестиналног тракта.<sup>231</sup> Добијени резултати су упућивали на то да је употребљени  $\text{TiO}_2$  ефикасан носач за доставу лека тј. гамбогијске киселине, као и ефикасан ФСМ. Штавише, на ћелијама леукемије (K562) су показали да  $\text{TiO}_2$  може да унапреди антитуморску активност гамбогиске киселине уз примену UV светлости. Поред наведених примера,  $\text{TiO}_2$  наноструктуре се помињу и као ефикасни носачи за даунорубин (*Daunorubicin* (DNR))<sup>232</sup>, темозоломид<sup>\*\*</sup> (*Temozolomide* (TMZ))<sup>233</sup>, и валпроинску киселину<sup>††</sup> (*valproic acid*)<sup>234</sup>.

<sup>§</sup> У одсуству адекватног превода на српски језик назив за овај облик  $\text{TiO}_2$  честица је остављен на изворном енглеском језику. Описно, честице имају изглед влакана.

<sup>\*\*</sup> *Temozolomide* је орални хемотерапеутик који се користи у лечењу меланома и неколико типова канцера мозга. Механизам дејства обухвата алкиловање молекула ДНК на N-7 или O-6 позицији гуанина што даље води оштећењу туморских ћелија.

<sup>††</sup> Валпроинска киселина (2-пропилпентанска киселина) је масна киселина која се користи за лечење епилепсије, биполарних поремећаја, мигрена и шизофреније. Тренутно је у фази клиничких испитивања за примену лечења канцера као што су различити типови леукемије и тумора меких ткива.

### 1.6.5. Рутенијумови комплекси као ФСМ; преглед досадашњих истраживања

Комплекси метала су се показали као добри ФСМ, а самим тим и као добри кандидати за ФДТ, јер поседују релативно високу термодинамичку стабилност и дуго време живота триплетног ексцитованог стања. Поред већ описаних цитостатичких особина комплекса рутенијума, у последње време све је више радова који издвајају коришћење комплекса рутенијума у ФДТ при озрачивању светлом различитих таласних дужина. Стога се ови комплекси све више изучавају с оба аспекта; аспекта потенцијалних цитостатика и аспекта ФСМ у ФДТ.

Први комплекс рутенијума за потребе ФДТ изучаван је још 2009. год. од стране *Lemercifer*-а и сарадника.<sup>235</sup> Након тога је *Chao* са својим сарадницима објавио рад у ком се помиње рутенијум(II) полипиридил комплекс с обећавајућим потенцијалом за примену у ФДТ када се озрачи светлом таласне дужине 830 nm.<sup>236</sup> Овај комплекс је показао бољи ефекат на туморској линији HeLa него тетрафенилпорфирин, опште коришћени ФСМ у ФДТ. У скорије време је и *Cloonan*-ова група синтетисала нешто другачији рутенијум(II) полипиридил комплекс који је нетоксичан у мраку, али је зато након активације светлом из видљивог дела спектра ( $\geq 400$  nm) изазивао прекид у ДНК молекулима и показује цитотоксичност на HeLa и мезотелијомским ћелијама.<sup>237</sup> Такође је пријављен рутенијум(II) полипиридил комплекс од стране *Wachter*-а и сарадника који је показивао везивање за ДНК молекул након фотоактивације, као и цитотоксичност на туморским линијама након озрачивања светлом из области Vis и NIR региона.<sup>238</sup> Поред наведених примера, објављени су и резултати истраживања комплекса рутенијума(II) с порфиринским<sup>239</sup> и аренским лигандима<sup>240</sup> који су такође показали потенцијал у ФДТ. Ови комплекси су показали способност да стварају и/или да подлежу дисоцијацији лиганда након озрачивања што је праћено координацијом резултујућег рутенијумовог фрагмента за ДНК молекул.

## ЗАДАТАК РАДА

Задатак ове докторске дисертације је формирање и испитивање својстава наноконтролног система на бази НЧ  $\text{TiO}_2$  и  $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$  комплекса као основе за ФДТ меланома. У оквиру тога, појединачни задаци су:

- синтетисати и окарактерисати комплекс рутенијума, потенцијалног цитостатика хемијске формуле  $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ , који може да интерагује с  $\text{TiO}_2$  преко  $\text{dcbpy}$  лиганда, и с циљаним ћелијским молекулима с друге стране (преко лабилних хлоридних лиганда)
- синтетисати и окарактерисати НЧ  $\text{TiO}_2$  у својству фотосензитивног носача за потенцијални цитостатик
- од горе наведених компоненти формирати и испитати наноконтролни систем  $\text{TiO}_2/[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$  (у даљем тексту НКС)
- испитати биолошку активност појединачних компоненти и целог НКС
- испитати утицај видљиве (532 nm и 632,8 nm) и UV (254 nm) светлости на брзину и профил отпуштања комплекса с површине НКС
- тестирати систем на туморским ћелијама меланома

Добијени резултати би требали да допринесу и унапреде досадашња сазнања о НЧ  $\text{TiO}_2$  и њиховом потенцијалу за циљану и контролисану доставу потенцијалних лекова на бази комплекса прелазних метала, као и развоју фотосензитивних лекова и унапређењу терапије меланома.

## 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

### 2.1. Хемикалије и реагенси

За синтезу комплекса *cis*-дихлоро-*bis*-(2,2'-бипиридил-4,4'-дикарбоксилна киселина) рутенијум(II), [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], коришћени су следећи реагенси и раствори без претходног пречишћавања: рутенат(III)хлорид трихидрат RuCl<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany), 2,2'-бипиридил-4,4'-дикарбоксилна киселина (dcbpy) Suna Tech Inc. (Suzhou, China), диметилформаид DMF, хлороводонична киселина HCl, ацетон и диетилетар од произвођача Merck (Darmstadt, Germany). Титанијум-(IV)хлорид TiCl<sub>4</sub> и све остале хемикалије коришћене за синтезу НЧ TiO<sub>2</sub> су биле од произвођача Fluka и Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany).

Хемикалије за одржавање хуманих лимфоцита и рад са њима су следеће: РВ max медијум Invitrogen-Gibco (Paisley, UK), Giemsa боја и тиобарбитурна киселина (ТВА) произвођача MerckKGaA (Darmstadt, Germany), цитохалазин Б, натријум хлорид, калијум хлорид, глацијална сирћетна киселина и EDTA произвођача Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany), док је лимфопреп градијент (Lymphocyte separation medium) био од произвођача PAA Laboratories GmbH (Pasching, Austria).

За гајење хумане меланомске ћелијске линије А375 и HeLa ћелија (American Type Culture Collection ATCC, Manassas, VA, USA) коришћене су глукоза, L-глутамин, фетални телећи серум, Dulbecco's ModifiedEagle's Medium, RPMI1640 Medium, пеницилин и стрептомицин од произвођача Sigma-Aldrich (ChemieGmbH, Germany), као и трихлорсирћетна киселина произвођача Centrohem (Stara Pazova, Serbia).

За испитивање интеракције комплекса с биолошки значајним биомолекулима коришћени су говеђи серум албумин, BSA (лиофилизован прах, ≥98.0%), фосфолипаза А<sub>2</sub> из говеђег панкреаса, PLA<sub>2</sub> (лиофилизован прах, >20 IU/mg протеина) и редуковани облик глутатиона, GSH (лиофилизован прах, 98-100%) од добављача Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

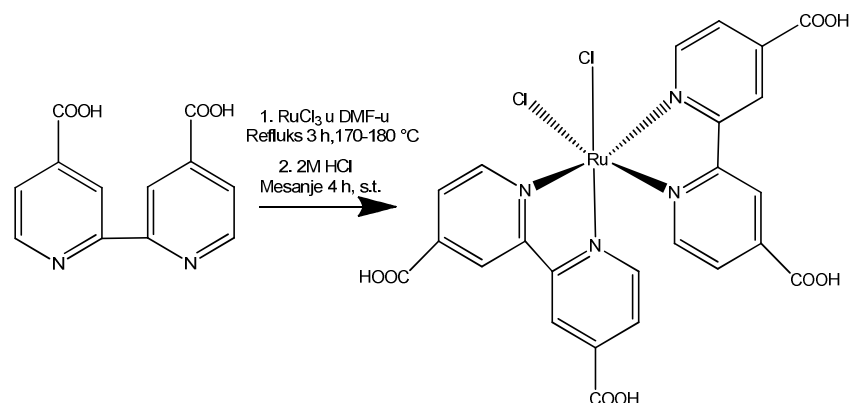
Матрице за MALDI TOF MS, 2,5-дихидроксибензојева киселина (DHB), синапинска киселина (SA) и 5,10,15,20-*mezo*-тетракиспентафлуорофенил порфирин (F20TPP), као и сви други растварачи (ацетонитрил, метанол, етанол) и трифлуорсирћетна киселина

(TFA) су хемикалије високог степена чистоће од произвођача Sigma Aldrich (Taufkirchen, Germany) и коришћене су без даљег пречишћавања.

Бипиридински комплекс рутенијума, дихлоридо(*bis*-(бипиридин))рутенијум(III)-хлорид  $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]\text{Cl}$ , је синтетисан и комплетно окарактерисан на Институту за хемију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, од стране истраживачке групе проф. Живадина Бугарчића.

## 2.2. Синтеза комплекса $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$

Комплекс, *cis*-дихлоридо-*bis*-(2,2'-бипиридил-4,4'-дикарбоксилнакиселина) рутенијум(II),  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ , је синтетисан по мало модификованој процедури описаној од стране Nazeeruddin-а и сарадника.<sup>241</sup> Реакција синтезе комплекса приказана је у оквиру Шеме 1. Рутенијум(III)хлорид трихидрат,  $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0,260g), је растворен у 50 mL диметилформамида (DMF) и након 15 мин. мешања додато је 0,476g лиганда (2,2'-бипиридил-4,4'-дикарбоксилне киселине, *dcbpy*). Реакциона смеша је рефлуктована у мраку, у азотној атмосфери 3h уз интензивно мешање у уљаном купатилу чија је температура одржавана између 170 и 180 °C. У току читавог процеса, било је битно да се реакција одвија у мраку јер се на тај начин спречава *cis-trans* изомеризација комплекса. Након тога, реакциона смеша је остављена да се охлади на собној температури а потом је профилирирана. Растварач, DMF, је упарен на вакуум упаривачу. Резултујући чврсти производ је испран прво смешом ацетона и диетилетра (1:4) а затим је стављен на мешање 4h с 2 M HCl у мраку. Смеша је, затим, опет профилирирана, а резултујући талог је стављен на сушење 5h на 40°C. Комплекс је чуван у затамњеној стакленој бочици у фрижидеру.



**Шема 1.** Реакција синтезе  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплекса с одговарајућим реакционим условима.

Комплекс је карактерисан MALDI TOF MS, UV-Vis и FTIR спектроскопијом као што је описано у поглављима 2.5.1., 2.5.2. и 2.5.3.

### 2.3. Синтеза НЧ TiO<sub>2</sub>

TiO<sub>2</sub> НЧ су синтетисане по процедури претходно објављеној од стране Т. Рајн и њених сарадника.<sup>185</sup> Раствор TiCl<sub>4</sub> претходно расхлађен на -20 °C је укапаван у расхлађену воду (4 °C) уз интензивно мешање на магнетној мешалици. Добијени раствор је одржаван на овој температури наредних 30 мин., при чему је рН вредност раствора била између 1 и 2, зависно од концентрације TiCl<sub>4</sub>. Спори раст честица је постигнут дијализом насупрот воде на 4 °C све док рН раствора није достигла вредност 3,5. Мембрана за дијализу коришћена за експеримент је Spectra/Por мембрана са пресеком молекулске масе 3500 (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA USA). Концентрација TiO<sub>2</sub> колоида је одређена као концентрација пероксидног комплекса добијеног након растварања честица у концентрованој H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> по процедури описаној од стране Eisenberg-a.<sup>242</sup> НЧ TiO<sub>2</sub> су окарактерисане употребом трансмисионе електронске микроскопије (TEM) и рендгенске дифракционе анализе (XRD) као што је описано у поглављима 2.5.4. и 2.5.5.

### 2.4. Формирање нанокондитног система (НКС)

Раствор комплекса [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] у етанолу (100 μL) концентрације 8x10<sup>-3</sup> M је додат у 900 μL водене суспензије НЧ TiO<sub>2</sub> концентрације 3x10<sup>-3</sup> M, рН 2,5, имајући у виду да број изложених атома Ti на површини НЧ TiO<sub>2</sub> износи 30%.<sup>243</sup> Поменути реакциона смеша је остављена на шејкеру, у замраченим условима, преко ноћи, у циљу формирања НКС. Добијени НКС је окарактерисан помоћу MALDI TOF масене спектрометрије, FTIR спектрографије и седиментационог есеја што је описано у оквиру поглавља 2.5.1., 2.5.3. и 2.6., док је део резултата у вези с карактеризацијом НКС помоћу рендгенске фотоелектронске спектрографије (XPS) дат у раду<sup>244</sup>.

## 2.5. Инструменталне методе

### 2.5.1. Масена спектрометрија заснована на јонизацији потпомогнутој ласерском десорпцијом из матрикса која користи анализатор маса на бази времена прелета, MALDI TOF MS (енгл. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization–Time OfFlight Mass Spectrometry*)

MALDI TOF масени спектри су снимани на два различита типа MALDI TOF масена спектрометра: Voyager Biospectrometry DE Pro Workstation (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA) и Autoflex масеном спектрометру (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) који су опремљени с пулсним 20 Hz, односно 50 Hz азотним ласером који емитују светлост на  $\lambda=337$  nm. Масеноспектрометријска анализа је коришћена за карактеризацију комплекса, НЧ TiO<sub>2</sub> и НКС, као и за испитивање фотоактивности и интеракције НЧ TiO<sub>2</sub> и бипиридинских комплекса. Ова метода је такође коришћена и за испитивање интеракције комплекса с биомолекулима: BSA, PLA<sub>2</sub> и GSH.

Спектри свих комплекса, НЧ TiO<sub>2</sub> и НКС су снимљени у рефлекторном, позитивном моду, с одложеним екстракционим временом 100 ns и напонам од 20 kV. Сваки снимљени спектар представљао је просек од 100-300 ласерских удара. Интензитет ласера је одржаван на ниској вредности у циљу спречавања деградације узорка и добијања доброг односа сигнал-шум (S/N) за молекуланалита. Такође је урађена и Post Source Decay (PSD) анализа [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплекса ради боље потврде анализе структуре комплекса.

За испитивање интеракције комплекса с BSA и PLA<sub>2</sub>, масени спектри биомолекула пре и након инкубирања с [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплексом су снимљени у линеарном моду и под условима одложене екстракције. Масени спектри GSH инкубираног с комплексом, као и контролни узорак GSH су снимљени у рефлекторном моду. Сваки снимљени спектар представљао је просек од 300 ласерских пулсева.

#### 2.5.1.1. Припрема узорака за масеноспектрометријску анализу

У циљу карактеризације [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] MALDI TOF MS, комплекс је растворен у етанолу до концентрације 0,6 mM. Матрица која је коришћена за анализу је F20TPP, концентрације 10 mg/mL у хлороформу. Мала запремина раствора комплекса (0,5  $\mu$ L) је нанета на златну MALDI TOF плочицу, а затим је нанета иста запремина раствора



матрице. Узорци су нанети у трипликату и остављени су на собној температури да кокрсталишу. Припрема НКС за масену анализу је извршена на исти начин као што је то описано за комплекс.

За испитивање фотоактивности у UV области и интеракције НЧ  $\text{TiO}_2$  и бипиридинских комплекса Ru, комплекси  $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]\text{Cl}$  и  $[\text{RuCl}_2(\text{dc bpy})_2]$  су растворени у метанолу или етанолу у концентрацији  $10^{-2}$  или  $10^{-3}$  mol/L, док су коришћене водене суспензије НЧ  $\text{TiO}_2$  биле 0,2 mol/L, pH~2,5. За LDI TOF анализу, 0,5  $\mu\text{L}$  раствора бипиридинских комплекса је нането на плочицу и остављено да кристалише на собној температури. Такође су у истој запремини нанети узорци водене суспензије НЧ  $\text{TiO}_2$ . За SALDI TOF анализу раствор/суспензија смеше комплекса и НЧ  $\text{TiO}_2$  је направљена тако да су финалне концентрације комплекса и НЧ  $\text{TiO}_2$  аналогне концентрацијама претходно нанешених самих компоненти. Након наношења по 0,5  $\mu\text{L}$ , смеша је остављена да се осуши на собној температури.

За анализу везивања биомолекула и  $[\text{RuCl}_2(\text{dc bpy})_2]$  комплекса, протеини/пептид су растворени у фосфатном пуферу pH 7,4 а потом инкубирани с комплексом (у моларном односу протеин:комплекс=1:10) 24h, на 37°C у мраку. Раствор протеина/пептида, исте финалне концентрације, без додатка комплекса инкубиран је под истим условима и служио је као контрола. Након инкубације, по 0,5  $\mu\text{L}$  узорка је нането на MALDI плочицу а потом је преко узорак нанешена и иста запремина матрице. Сви узорци протеина инкубираних с комплексом и контролни узорци протеина су снимани уз помоћ SA као матрице (10 mg/mL, у смеси ацетонитрил:вода, запреминског односа 1:1, и 0,1 % TFA), док је за снимање узорак GSH инкубираних са комплексом и контролни узорак GSH коришћена DHB матрица (0,5 M у метанолу и 0,1 % TFA). Плочица с узорцима је остављена на собној температури да се узорци осуше.

### 2.5.2. UV-Vis спектроскопија

UV-Vis спектрофотометар (Perkin Elmer Lambda 35) је коришћен за снимање спектра раствора комплекса, одређивање ефикасности везивања комплекса за површину НЧ  $\text{TiO}_2$  (седиментациони есеј), за праћење кинетике отуштања  $[\text{RuCl}_2(\text{dc bpy})_2]$  комплекса с површине носача (НЧ  $\text{TiO}_2$ ) и за одређивање константе везивања ( $K_b$ ) комплекса с BSA, PLA<sub>2</sub> и GSH. Сви UV-Vis спектри су снимани у опсегу од 200-700 nm на собној

температури. За снимање свих спектра и апсорбанција раствора коришћена је кварцна кивета (1mL).

У случају одређивања ефикасности везивања комплекса за носач, концентрација слободног, невезаног комплекса након центрифугирања у раствору одређена је мерењем апсорбанције комплекса на 520 nm а параметри везивања су рачунати као што је описано у оквиру седиментационог есеја, поглавље 2.6.

За праћење кинетике отуштања  $[\text{RuCl}_2(\text{dcbpy})_2]$  комплекса с површине носача (НЧ  $\text{TiO}_2$ ) количина ослобођеног комплекса одређивана је мерењем апсорбанције на 310 nm (за детаље видети поглавље 2.7.).

У случају одређивања константе везивања ( $K_b$ ) комплекса с BSA, PLA<sub>2</sub> и GSH прогрес реакције је праћен повећањем апсорбанције на 380 nm, где је и разлика у апсорбанцији између супстрата и производа била максимална. На основу ове методе, узимајући у обзир апсорпционе спектре комплекса без и у присуству протеина, било је могуће проценити вредност константе везивања ( $K_b$ ) што је детаљно описано у оквиру поглавља 2.8.4.б.

### **2.5.3. Инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом (FTIR спектроскопија)**

FTIR спектри су снимљени користећи Nicolet 380 FTIR спектрофотометар произвођача Thermo Electron Corporation у ATR (Attenuated Total Reflection) моду. Снимљени су спектри самог комплекса, као и комплекс- $\text{TiO}_2$  НКС. За снимање сваког спектра извршено је по 64 скенирања с резолуцијом  $2 \text{ cm}^{-1}$  у опсегу од  $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ .

### **2.5.4. Трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ)**

Величина НЧ  $\text{TiO}_2$  одређена је помоћу трансмисионе електронске микроскопије (ТЕМ). У ту сврху коришћен је електронски микроскоп JEOL-JEM 2100 LaB6 при радном напону 200 keV. Припрема узорка НЧ  $\text{TiO}_2$  за анализу је обухватала првенствено десетоминутни третман ултразвуком, након чега је  $6 \mu\text{L}$  узорка накапано на бакарну мрежицу прекривену слојем порозног угљеника. Узорак је затим остављен да се суши преко ноћи на ваздуху.

### 2.5.5. Рендгенска дифракциона анализа (XRD)

Рендгенска дифракциона анализа (X-ray Diffraction, XRD) праха НЧ TiO<sub>2</sub> изведена је на дифрактометру Philips PW 1050. Као упадно зрачење је коришћена линија бакра (CuK<sub>α</sub>), таласне дужине  $\lambda = 1,5418 \text{ nm}$  с Ni филтером. Интензитети дифракционих максимума прикупљани су с кораком од 0.05° и временом задржавања од 50 s по кораку.

### 2.6. Седиментациони есеј-одређивање ефикасности везивања комплекса за површину НЧ TiO<sub>2</sub>

Одређени су и параметри који се у фармацији често користе као показатељи ефикасности везивања одређеног лека за носач, у овом случају комплекса за НЧ TiO<sub>2</sub>. То су такозвана ефикасност заробљавања лека у носачу (енгл. *Entrapment efficiency*) и ефикасност „пуњења“ носача леком (енгл. *Loading efficiency*). Оба параметра су одређена употребом седиментационог есеја детаљно описаног у литератури.<sup>232</sup> НКС, синтетисан по већ описаној процедури, одвојен је од слободних тј. невезаних молекула комплекса центрифугирањем на 7000 rpm, 3 min. Концентрација слободног, невезаног комплекса у раствору одређена је применом UV-Vis спектрометрије, користећи калибрациону криву. Услови снимања су дати у оквиру поглавља 2.5.2. Параметри су затим израчунати користећи следеће једначине:

$$\text{Ефикасност заробљавања лека у носачу (\%)} = \frac{\text{Количина комплекса у НКС}}{\text{Иницијална количина комплекса}} \times 10$$

$$\text{Ефикасност „пуњења“ носача леком (\%)} = \frac{\text{Количина комплекса у НКС}}{\text{Количина НЧ TiO}_2} \times 100$$

### 2.7. *In vitro* праћење кинетике отпуштања [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплекса с површине носача (НЧ TiO<sub>2</sub>)

Прво су постављени експерименти за праћење кинетике отпуштања комплекса с носача без примене светлости (у мраку). У ту сврху коришћена је метода дијализе, на начин сличан описаном у раду.<sup>232</sup> Мембране дијализационих касета су изабране тако да могу

пропуштати само слободне (невезане) молекуле комплекса, али не и НКС и НЧ  $\text{TiO}_2$  (Thermo Scientific Dialysis cassette, са пресеком молекулске масе (MWCO) 7.000 и капацитетом од 0,1-0,5  $\mu\text{L}$ ). Праћена је дијализа самог комплекса ради контроле, а с друге стране НКС. По 500  $\mu\text{L}$  комплекса и НКС је шприцем убризгано у дијализационе касете. Дијализе су изведене паралелно наспрам 60 mL раствора фосфатног пуфера на собној температури уз континуално мешање на магнетној мешалици (100 rpm), у мрачним условима. У назначеним временским интервалима, узимано је по 500  $\mu\text{L}$  дијализата на анализу и сваки пут замењено истом запремином фосфатног пуфера. Узети аликвоти су анализирани спектрофотометријски мерењем апсорбанције на 310 nm. Свака дијализа је изведена у трипликату. Резултат је потом приказан графички као проценат ослобођеног комплекса у односу на раствор чистог комплекса у зависности од времена са стандардном девијацијом.

### **2.7.1. Праћење кинетике отпуштања $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ комплекса с површине носача (НЧ $\text{TiO}_2$ ) под утицајем видљиве светлости**

#### **2.7.1.1. Праћење кинетике отпуштања $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ комплекса с површине носача (НЧ $\text{TiO}_2$ ) под утицајем зелене светлости**

Праћење отпуштања комплекса с површине носача под утицајем зелене светлости извршено је дијализационом методом под истим експерименталним условима као што је већ горе описано, с једним изузетком. Раствори НКС у дијализационој касети су озрачени 28 h зеленом светлошћу коју је производио ласер diode-pumped solid state CW Verdi 5 laser (Coherent, 5W, 532nm). Ласерски сноп је био пажљиво фокусиран на узорке НКС у дијализационим касетама. Дијализе су изведене под четири различита интензитета ласера (1, 3, 50 и 100 mW). Интензитети ласера су мерени помоћу мерача интензитета ласера Nova II (Ophir) побољшаног с UV силиконским фотодиодним сензором PD300-UV с инсталираним филтером (CWpowerupto 300 mW). Интензитет светлости је мерен испред чаше на путу ласерског снопа ка узорку. Свака дијализа је изведена у трипликату. Профил отпуштања комплекса с носача је затим поређен с контролом.

### **2.7.1.2. Праћење кинетике отпуштања $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ комплекса с површине носача (НЧ $\text{TiO}_2$ ) под утицајем црвене светлости**

За 28 h озрачивање НКС коришћена је црвена светлост добијена од континуално-таласног (continuous wave CW) He-Ne ласера (Coherent, 2 mW, 632,8 nm). Профил отпуштања комплекса праћен је дијализационом методом већ описаном у претходним поглављима. Ласерски сноп, чији је интензитет био  $(1,90 \pm 0,10)\text{mW}$ , је прецизно фокусиран, помоћу оптичких компоненти, на узорак НКС у дијализационој касети. Интензитет светлости је мерен на исти начин као што је то описано у претходном поглављу. Свака дијализа је изведена у трипликату. Профил отпуштања комплекса с носача је затим поређен са контролом.

### **2.7.2. Праћење кинетике отпуштања $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ комплекса с површине носача (НЧ $\text{TiO}_2$ ) под утицајем UV светлости**

Праћење кинетике отпуштања комплекса с носача изведено је под истим експерименталним условима као што је то описано у претходном поглављу с једином разликом у врсти светла коришћеној за озрачивање раствора НКС у дијализационим касетама. У овом сету експеримената за 28 h озрачивање је коришћена UVC светлост добијена помоћу UVC-Hg лампе (Philips, 25W, 254 nm). UV лампа је постављена изнад лабораторијске чаше за дијализу. Интензитет светлости који је допирао до узорка износио је  $(1,50 \pm 0,10)\text{mW}$ . Интензитет примењене светлости је мерен истим инструментом који је описан у претходном поглављу, изнад саме површине чаше с дијализационим раствором. Свака дијализа је изведена у трипликату. Профил отпуштања комплекса с носача је затим поређен са контролом.

### **2.7.3. Утицај измене UV и црвене светлости на профил отпуштања $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ комплекса с површине носача (НЧ $\text{TiO}_2$ )**

Како би се испитало да ли осветљавање система UV светлошћу доводи до структурних промена у комплексу и/или на површини  $\text{TiO}_2$  које онемогућују даље везивање комплекса за површину НЧ, осмишљен је посебан експеримент. У одвојеном сету експеримената, 5 mL НКС, који је припремљен као што је описано у претходном делу, стављено је у чашицу која је потом стављена на магнетну мешалицу и затим озрачена, прво с UV светлошћу у току 8 h, а потом с црвеном светлошћу 22 h. По 500  $\mu\text{L}$  аликвота узимано је у означеним временским интервалима, центрифугирано на 7000

grm и затим анализирано на UV-Vis спектрофотометру. Светлосни извори (UV лампа и црвени ласер) постаљени су изнад чашице с узорком и фокусирани су у НКС. Раздаљине између светлосних извора и узорка биле су идентичне као у претходном експерименту.

## **2.8. Испитивање биолошке активности [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплекса, НЧ TiO<sub>2</sub> и НКС**

### **2.8.1. Испитивање биолошке активности на хуманим лимфоцитима**

Прелиминарно испитивање биолошке активности комплекса, НЧ TiO<sub>2</sub> и НКС је рађено на лако доступним хуманим лимфоцитима. У оквиру тога, одређена је инциденца микронуклеуса (MN), индекс ћелијске пролиферације (CBPI) и одређивање количине малондиалдехида (MDA) у хуманим лимфоцитима после третмана. Након тога, активност НКС и његових компоненти испитана је одређивањем цитотоксичности на туморској ћелијској линији меланома. Цитотоксичност је одређивана без и у присуству дејства црвене и UV светлости. Такође је испитана и интеракција комплекса с биомолекулима: BSA, PLA<sub>2</sub> и GSH.

#### **2.8.1.1. Лимфоцити-изоловање, гајење у култури и третман с [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплексом, НЧ TiO<sub>2</sub> и НКС**

Крв је узета из вене тридесетпетогодишњег здравог донора коришћењем вакутајнера с хепарином као антикоагулансом. Лимфоцитне културе су припремљене додатком 0,5 mL укупне крви у 4.5 mL Рb max медијума, а затим третиране с три различите концентрације комплекса, НЧ TiO<sub>2</sub> и НКС (финалне концентрације су биле 5, 15 и 25 µL). Третиране ћелије су потом инкубирани 72 h на 37 °C у мрачним условима. Све лимфоцитне културе су постављене у трипликату, док су нетретиране лимфоцитне културе служиле као контрола. Паралелно су постављене и ћелијске културе за одређивање количине малондиалдехида (MDA).

#### **2.8.1.2. Одређивање инциденце микронуклеуса (MN)**

Анализа микронуклеуса или инциденца микронуклеуса (MN) је урађена по већ познатој методи, познатој као Cytokinesis block micronucleus test, CB-MNT, у лимфоцитима хумане крви.<sup>245</sup> Културе лимфоцита су гајене 72 h на 37 °C, од чега последња 24 h у присуству citochalazina B финалне концентрације 4 µg/mL. Након тога,

ћелије су испране благим хипотоничним раствором (0.56 % KCl : 0.9 % NaCl, 1:1) и фиксиране у *McCarnoy* фиксативу (метанол: глацијална сирћетна киселина, 3:1), 3-4 пута. Између сваког корака ћелије су центрифугиране 10 min на 1600 rpm, а супернатант аспириран. Препарати су постављени накапавањем ћелијске суспензије на микроскопска предметна стакла. Анализирано је најмање 100 ћелија по узорку употребом микроскопа (Ortech microscope, Munich, Germany). Сва мерења су рађена у трипликату. Добијени резултати су обрађени статистички као што је то описано у поглављу 2.9.

### 2.8.1.3. Одређивање индекса ћелијске пролиферације (СВРП)

Цитокинезис блок пролиферативни индекс (СВРП) или индекс ћелијске пролиферације одређен је према већ устаљеној процедури,<sup>245</sup> користећи следећу једначину:

$$\text{СВРП} = [\text{MI} + 2\text{MII} + 3(\text{MIII} + \text{MIV})] / \text{N}$$

где MI-MIV представља број ћелија с једним до четири микронуклеуса, док N представља укупан број пребројаних ћелија.<sup>246</sup> За одређивање СВРП коришћени су исти препарати на којима је извршена анализа микронуклеуса такође употребом Ortech микроскопа на увећању 400x. Сва мерења су рађена у трипликату. Добијени резултати су обрађени статистички као што је то описано у поглављу 2.9.

### 2.8.1.4. Одређивање количине малондиалдехида (MDA)

Одређивање количине малондиалдехида (MDA) у хуманим лимфоцитима, познатији као *TBA* (тиобарбитурна киселина) тест урађен је по процедури предложеној од стране *Arioma* и сарадника.<sup>247</sup> Ова метода се заснива на употреби *TBA* с којом MDA у процесу нуклеофилне адиције (1 MDA:2 *TBA*) даје коњугат црвене боје. Количина MDA у узорцима одређена је спектрофотометријски мерењем максимума апсорбанције коњугата на 532 nm. Вредности су изражене као nmol *TBA*-реактивних супстанци (MDA еквиваленти) по mg протеина, употребом стандардне криве 1,1,3,3,-тетраметоксипропана. Сва мерења су рађена у трипликату. Концентрација протеина је одређена спектрофотометријски по *Lowry*-јевој методи.<sup>248</sup> Добијени резултати су обрађени статистички као што је то описано у поглављу 2.9.

## **2.8.2. Испитивање цитотоксичности [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплекса, НЧ TiO<sub>2</sub> и НКС на туморским линијама**

У циљу тестирања антитуморске активности комплекса, комплекс је тестиран на две туморске линије: хуманој меланомској ћелијској линији, која не производи меланин (тзв. амеланотична) која носи ознаку А375 и туморским ћелијама грлића материце, HeLa. Већу антитуморску активност комплекс је показао на линија А375 због чега је ова туморска линија изабрана за даљи рад и тестирање с НЧ TiO<sub>2</sub> и НКС.

### **2.8.2.1. Туморске ћелијске културе-гајење и третман**

Туморска линија А375 је гајена у медијуму (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) с 4500 mg/L глукозе и глутамин (L-glutamine), обогаћеним с инактивираним 10% феталним телећим серумом, с 10000 U/mL пеницилина и 10 mg/mL раствора стрептомицина. HeLa туморска линија је гајена у RPMI1640 медијуму такође с додатком 10% феталног телећег албумина и пеницилина/стрептомицина. Обе туморске линије су гајене под стандардним условима у инкубатору на 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> атмосфери (Heraeus, Hanau, Germany). Ћелије су засејане у микротитар плочицама (flat-bottomed 96 well microtiter plates) тако да им је густина била 2000 ћелија по бунару, а потом су инкубиране преко ноћи. У циљу тестирања антитуморске активности комплекса на поменуте туморске линије, ћелије су инкубиране с 5, 15, 35, 50, 75 и 100 μM-им комплексом 24, 48 и 72 h.

### **2.8.2.2. Одређивање ћелијске вијабилности, SRB тест**

Ћелијска вијабилност је одређена користећи сулфородамин Б (sulforhodamine B (SRB)) тест, који се заснива на одређивању садржаја ћелијских протеина. Тест је изведен на основу процедуре описане од стране *Skehan* и сарадника.<sup>249</sup> Укратко, ћелије су фиксиране у 10 % трихлорсирћетној киселини 1h на 4 °C и потом испране дестилованом водом. SRB раствор (0,4 % w/v, у 1 % сирћетној киселини) је додат у ћелије и плочице су остављене да се боје наредних 15 мин. на собној температури. Невезани SRB је отклоњен испирањем 1 % сирћетном киселином. Боја везана за протеин је екстрахована 10 mM Tris-ом. Апсорбанција боје је мерена на 550 nm с референтном таласном дужином од 690 nm у читачу (microplate reader, Wallac, VICTOR2 1420 Multilabel counter, PerkinElmer, Turku, Finland). Резултати су изражени као проценат ћелијске вијабилности одређене на основу следеће једначине:



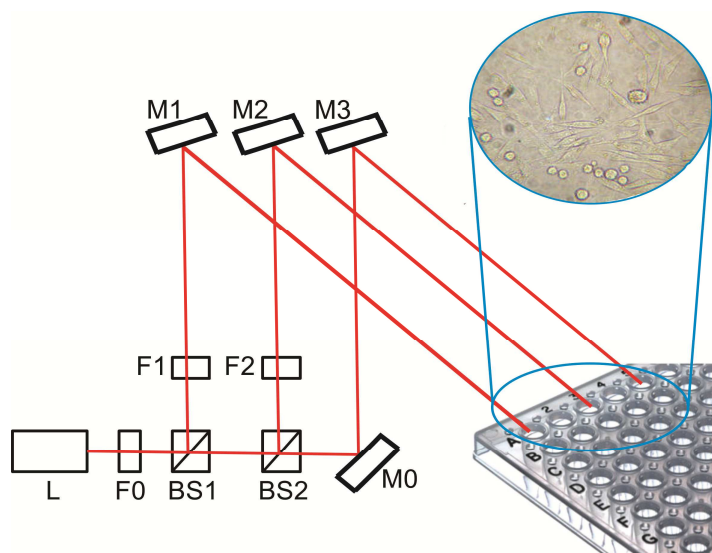
$$\text{Ћелијска вијабилност} = \frac{\text{Апсорбанција узорка}}{\text{Апсорбанција контроле}} \times 100$$

Сва мерења су урађена у квадрипликату, док је сваки експеримент поновљен три пута. Добијени резултати су обрађени статистички као што је то описано у поглављу 2.9.

### **2.8.3. Фото-цитотоксична активност НКС и његових компоненти тестирана на линији хуманог меланома индукована применом UV и црвене светлости**

Поступак гајења хумане туморске ћелијске линије меланома је већ детаљно описан у оквиру поглавља 2.8.2.а. У циљу анализе концентрационо-зависног ефекта комплекса на ћелије, ћелије су инкубиране с 5, 15, 35, 50, 75 и 100  $\mu\text{M}$  раствором комплекса 24,48 и 72 h. На основу добијених резултата издвојена је концентрација комплекса од 50  $\mu\text{M}$  као најефикаснија. Стога, у даљем раду, за третман је припремљен НКС који је садржао 50  $\mu\text{M}$  комплекса везаног за НЧ  $\text{TiO}_2$  водећи при томе рачуна да фракција изложених Ti атома на површини НЧ  $\text{TiO}_2$  износи 30%.<sup>243</sup>

У циљу испитивања цитотоксичне активности НКС и његових компоненти индуковане светлошћу, у првој фази су одређени услови зрачења, без третмана, који сами нису утицали на ћелијску вијабилност. У том циљу варирано је више јачина UV лампе, односно црвеног ласера. Шематски приказ поставке експеримента дат је на Слици 2.1. Након утврђених услова зрачења, рађени су третмани. НЧ  $\text{TiO}_2$ , комплекс и НКС су додати у засејане ћелијске културе и након 5 мин. инкубације, изложене су UV (60  $\mu\text{W}$ ) или црвеном (0,06  $\mu\text{W}$ ) зрачењу у интервалу од 10 мин. Третиране ћелије су затим остављене да се даље инкубирају 72 h, под стандардним условима. Ћелијске културе третиране на исти начин, само без зрачења, су служиле за поређење.



**Слика 2.1.** Шематски приказ поставке експеримента за одређивање фотоцитотоксичне активности НКС и његових компоненти на хуманој линији меланома индукованом црвеним ласером; L-ласер; F0, F1 и F2-оптички филтери; BS1 и BS2-50:50 разделник снопа; M0, M1, M2 и M3-оптичка огледала широког пропусног опсега. Хумане меланомске ћелије су засејане у бунариће микротитар плоче с равним дном.

Ћелијска вијабилност је одређена SRB тестом, детаљно описаним у поглављу 2.8.2.б. Сва мерења су урађена у квадруплику, док је сваки експеримент поновљен три пута.

## 2.8.4. Испитивање интеракције комплекса с биомолекулима: BSA, PLA<sub>2</sub> и GSH

### 2.8.4.1. Анализа везивања [RuCl<sub>2</sub>(dcbpy)<sub>2</sub>] комплекса за BSA, PLA<sub>2</sub> и GSH MALDI TOF масеном спектрометријом

Припрема узорака за MALDI TOF MS анализу, као и услови снимања спектра су дати у оквиру поглавља 2.5.1. и 2.5.1.а. Процена броја везивних места биомолекула за молекуле комплекса вршена је анализом разлике у  $m/z$  вредностима сигнала добијених пре и након инкубације комплекса с биомолекулима. Сви добијени масени спектри су анализирани у програму Data Explorer.

### 2.8.4.2. Одређивање константе везивања (K<sub>b</sub>) комплекса с BSA, PLA<sub>2</sub> и GSH

У циљу процене мере којом комплекс интерагује с BSA, PLA<sub>2</sub> и GSH, примењена је метода апсорпционе титрације, као што је описано раније од стране *Luzuriaga* и сарадника, за одређивање константе везивања BSA за фенантролински тип комплекса

рутенијума [Ru(phen)3]Cl2.<sup>250</sup> Снимани су сукцесивно спектри слободног комплекса и смеше комплекс/протеин у раствору фосфатног пуфера (0,15 М, рН 7,4) након 24 h инкубације, у мраку. Раствори комплекса и протеина су направљени да достигну моларни однос протеин/комплекс у опсегу од 1-25. Прогрес реакције је праћен повећањем апсорбанције на 380 nm, где је и разлика у апсорбанцији између супстрата и производа била максимална. На основу ове методе, узимајући у обзир апсорпционе спектре комплекса без и у присуству протеина, било је могуће проценити вредност константе везивања (*Kb*) на основу једначине:

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\epsilon_c}{\epsilon_{cp} - \epsilon_c} + \frac{\epsilon_c}{\epsilon_{cp} - \epsilon_c} \cdot \frac{1}{Kb \cdot [\text{протеин}]}$$

Ова једначина је коришћена и раније у литератури у циљу одређивања параметара везивања различитих лекова за биомолекуле.<sup>251</sup> Услови који се при томе морају узети у обзир су: а) количина протеина мора бити у великом вишку у односу на комплекс и б) постоји само једно везивно место за комплекс на протеину. *Kb* вредност (изражена у М<sup>-1</sup>) је добијена из графика зависности  $Y=A_0/(A-A_0)$  у функцији од  $X=1/[\text{протеин}]$ , одосно  $X=1/[\text{пептид}]$ . Gde  $A_0$  представља апсорбанцију слободног комплекса,  $A$  представља апсорбанцију након инкубације с назначеном количином протеина, а  $\epsilon_c$  и  $\epsilon_{cp}$  су њихови одговарајући апсорпциони коефицијенти.

## 2.9. Статистичка обрада података

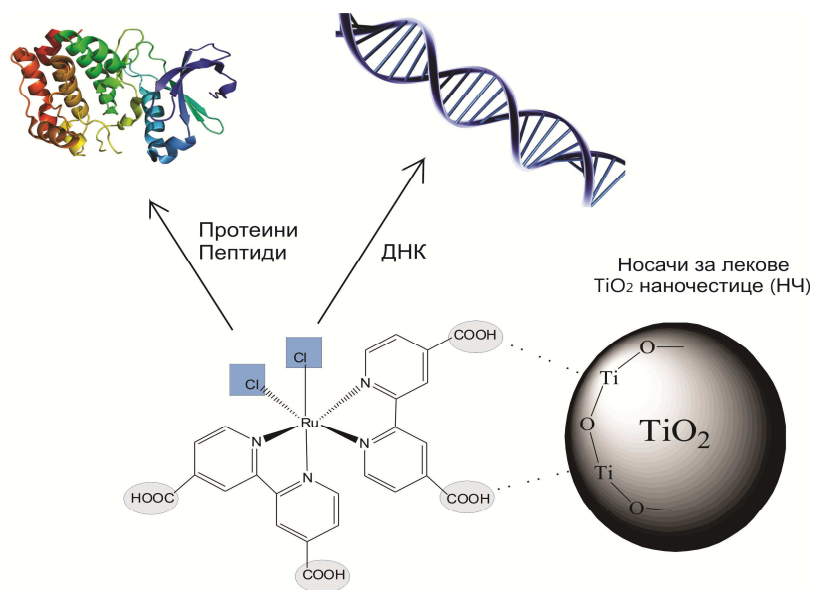
Студентов т тест (енгл. *Student's t test*) је коришћен за статистичку анализу резултата. Разлике за  $p < 0.05$  су узимане као статистички значајне. Резултати су презентовани као вредност±стандардна девијација (SD).

### 3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА РЕЗУЛТАТА

У првој фази израде овог доктората, синтетисан и окарактерисан је октаедарски комплекс рутенијума(II),  $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ , који се може везати за површину наночестица  $\text{TiO}_2$  путем лиганда и испитана његова биолошка активност. Затим, испитана је фотореактивност НЧ  $\text{TiO}_2$  и комплекса тетестирањем ових једињења као супстрата за MALDI TOF масену спектрометрију. Након тога, синтетисан је и окарактерисан нанокомпозитни систем који се састоји од НЧ  $\text{TiO}_2$  и комплекса рутенијума и испитан утицај светлости различитих таласних дужина на кинетику отпуштања комплекса. Систем је, на крају експеримената, тестиран на канцерској ћелијској линији меланома и испитано је да ли резултати корелишу с резултатима добијеним у *in vitro* условима.

#### 3.1. Синтеза и карактеризација $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ комплекса

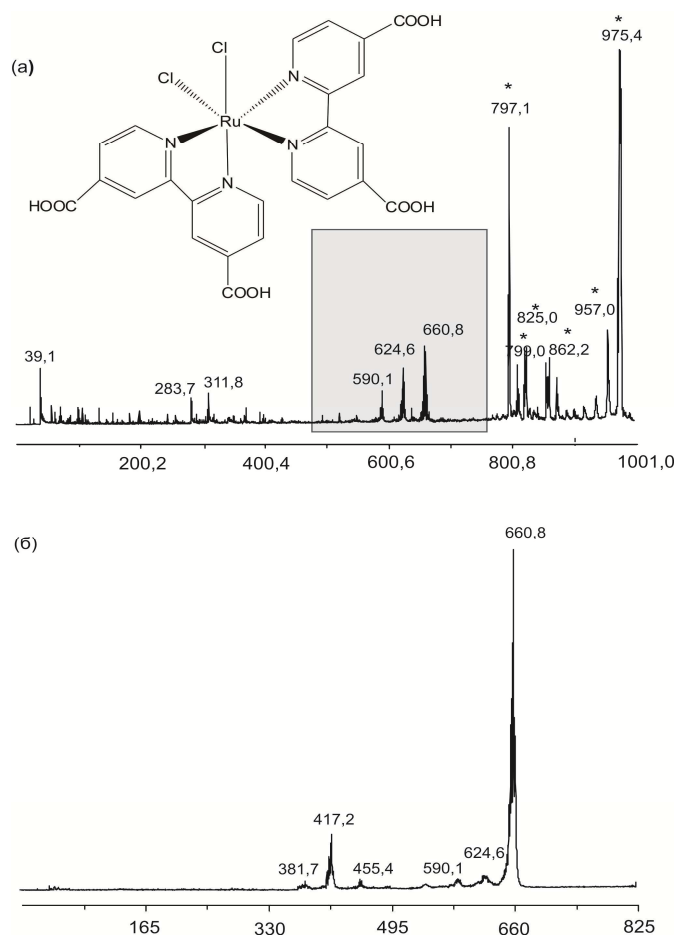
Хипотеза која је коришћена за дизајнирање и синтезу комплекса је била да комплекс садржи два бидентатна бипиридинска лиганда (bpy) с четири карбоксилне групе (COOH), док преостала два координациона места заузимају два монодентатна лабилна хлоридна лиганда (Cl). Синтеза једног оваквог комплекса с мултифункционалним групама би обезбедила мултифункционалност и самог комплекса. Наиме, лабилни лиганди хлора би могли учествовати у супституционим реакцијама с циљним доносним биомолекулима (ДНК молекулима, протеинима, пептидима или метаболитима) чиме би овај комплекс могао испољити своја антитуморско својство. С друге стране, уведене карбоксилне групе на bpy лигандима би требале да омогућавају везивање комплекса за потенцијални носач (НЧ  $\text{TiO}_2$ ) с обзиром на претходно потврђени високи афинитет површине  $\text{TiO}_2$  за карбоксилне групе.<sup>252</sup> Шематски приказ потенцијалне мултифункционалности и реактивности комплекса је дат на Слици 3.1. Након синтезе комплекса, карактеризација добијеног продукта извршена је помоћу MALDI TOF MS, UV-Vis и FTIR спектроскопијом.



**Слика 3.1.** Приказ стратегије при синтези  $[Ru(II)(dc bpy)_2Cl_2]$  комплекса; жељена структура комплекса с мултифункционалним групама способним за интеракцију с биомолекулима (антитуморско дејство комплекса) као и за везивање за носач, НЧ  $TiO_2$  (циљано и контролисано отпуштање потенцијалног цитостатика).

У снимљеним MALDI TOF масеним спектрима  $[Ru(II)(dc bpy)_2Cl_2]$  комплекса, Слика 3.2. (а), уочљиви су сигнали на вредностима  $m/z$  (маса/наелектрисање) 660,8, 624,6 и 590,1 с изотопском расподелом карактеристичном за рутенијум. Идентитет детектованих сигнала у MALDI TOF масеним спектрима је дат у Табели 3.1. Сви сигнали који потичу од F20TPP матрице означени су звездicom, док преостали јони, који су детектовани у региону нижих маса у спектру, потичу од лиганда 2,2-бипиридин-4,4'-дикарбоксилна киселина (dc bpy).

Спектар  $[Ru(II)(dc bpy)_2Cl_2]$  комплекса снимљен у моду фрагментација које се одвијају након процеса убрзавања у масеном спектрометру (енгл. Post-source decay (PSD) дат је на Слици 3.2. (б). У PSD долази до фрагментације молекула комплекса у региону без магнетног поља (енгл. *field-free region*), након напуштања јонског извора.<sup>253</sup> Идентификација тако добијених фрагмената омогућава прецизнију карактеризацију узорка и идентификацију сигнала. У PSD масеном спектру је најзаступљенији сигнал на  $m/z$  660,8 који одговара молекулском јону комплекса, као и фрагменти на  $m/z$  455,4, 417,2 and 381,7. Добијени фрагменти настали су постепеним губитком једног или два лиганда као што је то приказано у Табели 3.1



**Слика 3.2.** MALDI TOF масени спектар комплекса  $[Ru(II)(dc bpy)_2Cl_2]$  снимљен уз помоћ F20TPP матрице (a) и PSD масени спектар комплекса (б) снимљени у позитивном моду. На слици је приказана и структура комплекса.

**Табела 3.1.** Позиција и идентитет сигнала детектованих у позитивном моду MALDI TOF масеног спектра  $[Ru(II)(dc bpy)_2Cl_2]$  комплекса снимљеног с F20TPP матрицом. Идентитети сигнала који потичу од матрице, у спектру означени звездицом, нису дати у табели.

m/z	Идентитет
283,7	$[dc bpy + K^+]^+$
311,8	$[dc bpy - 2H^+ + 3Na^+]^+$
381,7	$[Ru(I)(dc bpy)Cl + H^+]^+$
417,2	$[Ru(II)(dc bpy)Cl_2 + H^+]^+$
455,4	$[Ru(II)(dc bpy)Cl_2 + K^+]^+$
590,1	$[Ru(0)(dc bpy)_2 + H^+]^+$ ,
624,6	$[Ru(II)(dc bpy)_2Cl]^+$
660,8	$[Ru(II)(dc bpy)_2Cl_2 + H^+]^+$

Резултати UV-Vis карактеризације  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплекса, заједно с одговарајућим литературним вредностима су дати у Табели 3.2. У снимљеном UV-Vis спектру комплекса уочена су три карактеристична апсорпциона сигнала на таласним дужинама од 310, 380 и 540 nm. Добијени експериментални подаци су били у сагласности с литературним вредностима.<sup>254-256</sup> Сигнали на 540 и 380 nm одговарају трансферу наелектрисања од метала ка лигандима (енгл. *metal-to-ligand charge transfer*, MLCT), док сигнал на 310 nm потиче од органског бипиридинског лиганда ( $\pi$  to  $\pi^*$  систем).

**Табела 3.2.** UV-Vis апсорпциони максимуми  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплекса добијени снимањем етанолног раствора комплекса на собној температури и одговарајуће литературне вредности.

	Таласна дужина (nm)	Таласна дужина (nm)	Таласна дужина (nm)
Литературне вредности	520-560	380-414	304-316
Експерименталне вредности	520	380	310

Детаљна анализа спектра  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплекса добијена FTIR спектроскопијом, којом је потврђена структура, биће описана у Поглављу 3.4., у оквиру карактеризације наноконструктивног система.

### 3.2. Биолошка активност $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ комплекса

Како би се испитало да ли синтетисани  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплекс има биолошку активност за потенцијалну примену као антитуморски медикамент, испитана је његова генотоксичност, цитотоксичност, утицај на ћелијски оксидативни статус на ћелијама лимфоцита, интеракција с биолошки значајним молекулима, као и антитуморска активност на две туморске линије.

### 3.2.1. Генотоксичност, цитотоксичност и антиоксидативна активност

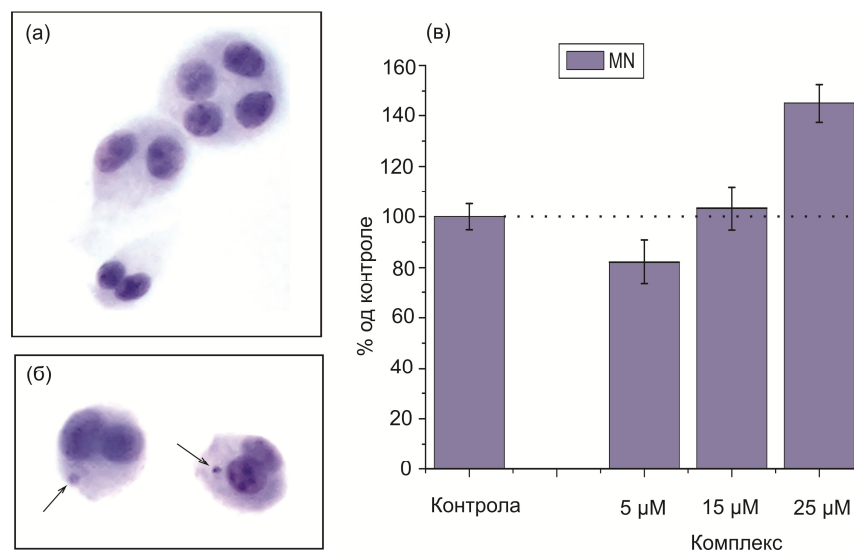
#### [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплекса у хуманим лимфоцитима

У ранијим литературним подацима је описано да различити рутенијумови комплекси могу утицати на ћелијски оксидативни статус<sup>257</sup> и да могу имати цитотоксични и генотоксични ефекат на ћелије.<sup>258,259</sup> Рутенијумови комплекси с пиридинским лигандима су привукли посебну пажњу као потенцијални антитуморски лекови<sup>14</sup>, али и као фото-сензитивни лекови<sup>235-240</sup>. Велики, ригидни, мултидентатни полипиридински лиганди доприносе облику и хиралности молекула комплекса чиме се постижу специфичне везивне карактеристике за биомолекуле, што је од значаја за испуњавање антитуморског дејства.<sup>263</sup> Такође треба поменути и погодности увођења карбоксилне групе у структуру полипиридинских комплекса која резултује побољшањем растворљивости, ћелијског транспорта и биолошке активности у виду побољшања антиоксидативне и антитуморске активности у односу на своје аналоге без карбоксилних група.<sup>264</sup> За тестирање биолошке активности комплекса коришћене су лако доступне ћелије, хумани лимфоцити из крви здравог донора. Као мера биолошке активности комплекса тестирани су следећи параметри:

- **Генотоксичност;** Генотоксичност различитих једињења и еколошких фактора процењује се помоћу микронуклеус (MN) теста који одражава степен оштећења генетичког материјала (хромозома). Микронуклеуси представљају фрагменте хромозома или целе хромозоме који нису инкорпорирани у једро. Ћелије с једним или више микронуклеуса су пребројаване за одређивање учесталости MN (број микронуклеуса/ 1000 ћелија) што одражава степен оштећења генетичког материјала ћелије и у позитивној је корелацији са генотоксичним потенцијалом тестираног агенса. Овај тест је управо због тога коришћен ради процене потенцијалног генотоксичног ефекта [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплекса. На Слици 3.3. (а) су приказане микрографије нетретираних хуманих лимфоцита периферне крви а на Слици 3.3. (б) репрезентативне микрографије лимфоцита након инкубације с [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплексом. Микронуклеуси, назначени стрелицом на Слици 3.3. (б), су јасно видљиви у узорцима третираним с комплексом и њихова учесталост се разликује у зависности од концентрације комплекса (Слика 3.3. (в)). Као што се види из резултата, микронуклеуси се појављују такође и у нетретираним ћелијама тј. контроли, али се њихова учесталост повећава са повећањем концентрације комплекса. Највиша



тестирана концентрација  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплекса ( $25 \mu\text{M}$ ) испољава генотоксични ефекат на ћелије, подстичући статистички значајно повећање у учесталости микронуклеуса у поређењу с контролом (Слика 3.3. (в)).

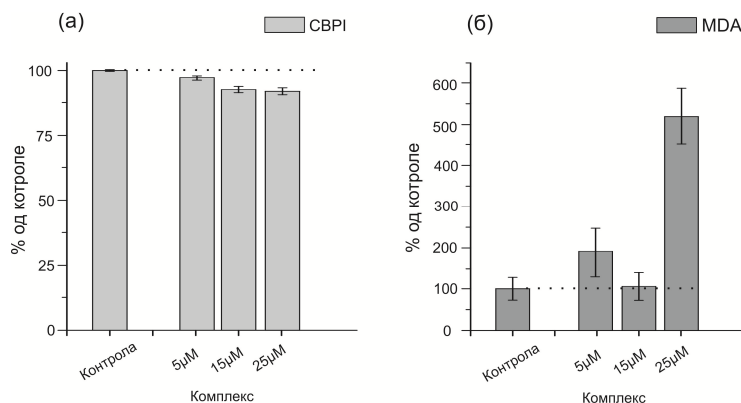


**Слика 3.3.** Репрезентативне микрографије нетретираних бинуклеарних и полинуклеарних ћелија (а) и ћелија третираних с  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплексом (б). Стрелице означавају микронуклеусе (фрагменте или целе хрозоми који нису инкорпорирани у једро). Учесталости MN у ћелијским културама третираним с назначеним концентрацијама комплекса приказане су у односу на контролу (учесталост микронуклеуса у нетретираним ћелијама) (в). Сви резултати су представљени у процентима (вредност  $\pm$  SD).

- **Пролиферативни индекс ћелија (СВPI)** представља мерило броја ћелија које се умножавају тј. деле (пролиферишу) у третираној ћелијској култури у односу на контролу. Ћелије канцера се неконтролисано деле, туморско ткиво се увећава, на тај начин угрожавајући здраво ткиво. Осим повећања ефикасности анти-туморског ефекта, лекови треба да имају и смањен ефекат на здраве ћелије. С обзиром на то да су касније у раду приказани резултати испитивања цитотоксичности на ћелије меланома, у овом делу су дати резултати испитивања цитотоксичности синтетисаног  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплекса на хуманим лимфоцитима (здраве ћелије).

Резултати, приказани на слици 3.4.(а) показују да третирање лимфоцита  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплексом доводи до смањене пролиферације ћелија у односу на нетретиране и до статистички значајног смањења ћелијске пролиферације, што се квантитативно изражава пролиферативним индексом. Уочено је и смањење

пролиферативног индекса с повећањем концентрације комплекса. Ови резултати, као и бројни литературни подаци, показују да је, у случају хемиотерапије лековима базираним на комплексима прелазних метала, неопходно наћи систем, односно начин њихове доставе до туморског ткива, који ће спречити нежељене штетне ефекте по здраве ћелије.



**Слика 3.4.** Пролиферативни индекс ћелија (CBPI) (а) и ниво малондиалдехида (MDA) у ћелијама лимфоцита третираним с назначеним концентрацијама  $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$  комплекса. Резултати су приказани у процентима (вредност  $\pm$  SD) у односу на контролу (вредности CBPI и MDA у нетретираним ћелијама).

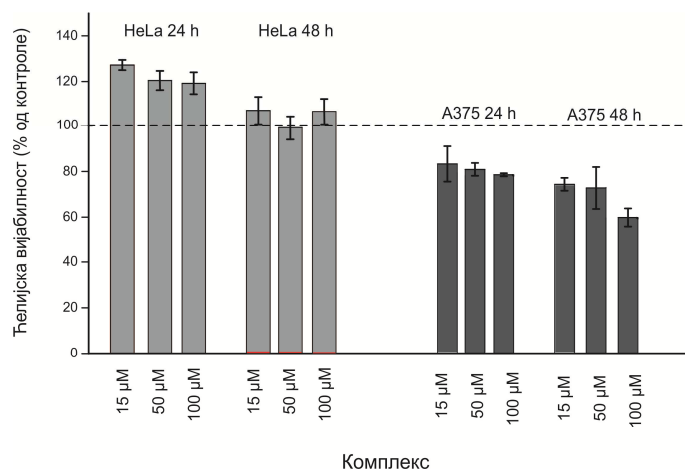
• **Антиоксидативна активност;** Већ је познато да неки комплекси рутенијума могу повећавати стварање ROS врста<sup>265,266</sup> и утицати на ћелијски оксидативни статус<sup>267</sup>. Претпоставља се чак да је то један од механизма помоћу кога комплекси прелазних метала испољавају свој цитостатички ефекат. Као биомаркер оксидативног стреса тј. оштећења ћелијске мембране изазване слободним радикалима користи се ниво малондиалдехида (MDA) у ћелијама, с обзиром да MDA представља главни производ липидне пероксидације. Одређени MDA ниво у ћелијама након третмана различитим концентрацијама  $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$  комплекса дат је на Слици 3.4. (б). Статистички значајно и изражено повећање нивоа MDA уочено је у ћелијама третираним највећом тестираном концентрацијом комплекса (25 μM) (Слика 3.4.(б)), што упућује на то да комплекс само при већим концентрацијама има способност да индукује стварање слободних радикала који оштећују ћелијску мембрану и да, највероватније, оксидативно оштећење ћелијске мембране није механизам којим би овај комплекс могао да испољи цитостатички, или цитотоксични ефекат.

Сумарно, дати резултати тестирања на хуманим лимфоцитима су упућивали на потенцијал примене  $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$  комплекса као генотоксичног и цитотоксичног

агенса при концентрацијама већим од 25  $\mu\text{M}$  и да механизам дејства у мањој мери укључује утицај комплекса на оксидативни статус ћелије. Такође, с обзиром на то да рутенијумов комплекс има цитостатски и генотоксични ефекат и на здраве ћелије, још једном је истакнута потреба да се комплекс активира тек када доспе у туморско ткиво.

### 3.2.2. Активност $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ комплекса на туморским линијама

Антитуморски ефекат  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплекса је испитан на две туморске линије: туморским ћелијама грлића материце (HeLa) и хуманој амијелотској (не производи меланин) меланомској ћелијској линији (A375). Резултати третирања поменутих туморских линија с  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплексом приказани су на Слици 3.5.



**Слика 3.5.** Степен преживљавања тј. ћелијска вијабилност туморских линија HeLa и A375 (истакнуто на графику) након третмана с назначеним концентрација  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплекса одређена у две временске тачке (након 24 и 48 h инкубације).

Из датих резултата се види да је комплекс показао антитуморску активност на линији A375, амијеланотичним ћелијама меланома (смањење броја живих ћелија). Цитотоксични ефекат комплекса је у корелацији с временом инкубирања (већи проценат убијених ћелија у односу на контролу) и с концентрацијом комплекса. У случају HeLa линије антитуморска активност комплекса је изостала. Сходно добијеним резултатима у даљем изучавању коришћена је хумана меланомска ћелијска линија (A375).

### 3.3. Интеракција $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ комплекса с BSA, PLA<sub>2</sub> и GSH

У оквиру општег дела тезе (Поглавље 1.2.2.) истакнуто је да су рутенијумови комплекси, који су дали обећавајуће резултате у оквиру клиничког тестирања, показали да за циљне молекуле имају биолошки значајне протеине, док су молекули ДНК секундарна мета.<sup>261</sup> Управо због тога, у последње време су протеини као циљани молекули тема опсежних студија приликом тестирања потенцијалних цитостатика на бази комплекса рутенијума. У складу с тим, тестирана су везивна својства  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплекса с биолошки значајним протеинима и пептидом. За тестирање су одабрани доле наведени протеини и пептид сходно следећем:

**Албумин** је главни протеин плазме који значајно утиче на фармакокинетику и биодистрибуцију лекова у организму.<sup>268</sup> Управо због тога је од великог значаја да се зна да ли и којом јачином се потенцијални лек везује за овај транспортни протеин. У оквиру тестирања коришћен је говеђи серум албумин (BSA) с обзиром на ниску цену, лаку доступност и структурну сличност с хуманим серумским албумином (HSA).

**Фосфолипаза А<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>)** је ензим који катализује хидролизу фосфолипида, што доводи до стварања метаболита укључених у процесе ћелијског раста, диференцијације, пролиферације и карценогенезе.<sup>269–272</sup> Такође је уочена и повећана активност и експресија неколико изоформи PLA<sub>2</sub> у хуманим канцерима, као и у случају запаљенских процеса, што чини овај ензим потенцијалним циљаним молекулом за антитуморске лекове, као и за антиинфламаторне агенсе.<sup>273–276</sup>

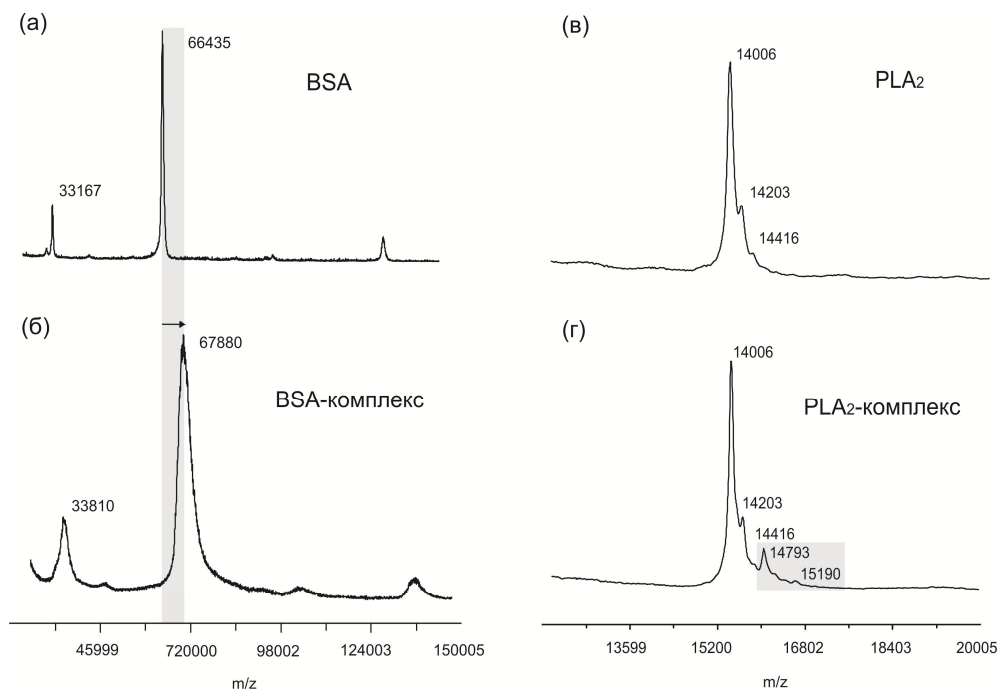
**Глутатион (GSH)** је врло значајан трипептид који игра главну улогу у процесима детоксикације организма. С друге стране, опсежне студије су утврдиле да повећан интрацелуларни ниво GSH представља део механизма резистенције тумора на одређени лек, с обзиром да је доказано да ћелије канцера имају повећан ниво GSH.<sup>277,278</sup>

#### 3.3.1. Испитивање везивања $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ за BSA, PLA<sub>2</sub> и GSH MALDI TOF масеном спектрометријом

Потенцијална интеракција  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплекса с наведеним молекулима испитивана је помоћу MALDI TOF масене спектрометрије. До скоро, употреба MALDI

TOF MS за детекцију везивања малих молекула за протеине представљала је изазов с обзиром на велику разлику у молекулској маси и смањење резолуције инструмента у случају анализе протеина високе масе. Међутим, у новије време, све је више радова који говоре у прилог томе да се MALDI TOF MS, поред употребе за детекцију интеракција, може користити и за процену броја малих молекула, као што су хомоцистеин-тиолактон<sup>279</sup>, сенозид А<sup>280</sup> и других<sup>281</sup>, везаних за молекул протеина. Из тих разлога је ова метода примењена за проверу везивне способности комплекса за протеине и GSH, као и за процену броја евентуалних везивних места на протеину/пептиду за испитивани комплекс. У том циљу, протеини/пептид су инкубирани с [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплексом 24 h, након чега су снимљени њихови масени спектри.

У масеном спектру BSA (Слика 3.6. (а)) могу се уочити два доминантна сигнала, [M+H]<sup>+</sup> на *m/z* 66435 и [M+2H]<sup>2+</sup> на *m/z* 33167, који одговарају једноструко и двоструко протонованом молекулу BSA. У масеном спектру BSA након 24 h инкубације с [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплексом (Слика 3.6. (б)) уочава се померање сигнала ка већој вредности *m/z* (дато сивом бојом у спектру) као и ширење самог сигнала. Ширење сигнала се јавља услед стварања коњугата протеина с комплексом. Овај широки сигнал се простире од *m/z* 66500 до 72837, с центром у 67880 (идентитети сигнала су дати у Табели 3.3.). На основу разлике у *m/z* вредностима сигнала самог молекула BSA и коњугата комплекс-BSA, узимајући такође у обзир молекулску масу комплекса ([Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>, Mr=590), број молекула комплекса који се може везати за молекул BSA је процењен на 2,45 тј. у просеку 2. У литератури се могу наћи подаци да кристална структура албумина поседује три домена од којих се сваки састоји од два субдомена, као и да албумин има два главна везивна места, такозвана места I и II која се налазе у субдоменима IIА и IIIА.<sup>282</sup> На основу тога би се могло претпоставити да су управо ова места везивна места и за испитивани [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплекс. Многа истраживања такође говоре у прилог да протеини плазме везују антитуморске рутенијумове комплексе преко хистидинских остатака што води стварању стабилних адуката.<sup>283–285</sup>



**Слика 3.6.** MALDI-TOF масени спектар BSA (а), BSA инкубираног с  $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$  комплексом (б), PLA<sub>2</sub> (в) и PLA<sub>2</sub> инкубиране с  $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$  комплексом (г). Сви спектри су снимљени у позитивном, линеарном моду. Осенчени део показује померање сигнала ка већим  $m/z$  вредностима након инкубације BSA са комплексом (а и б), односно појаву нових сигнала након инкубације са PLA<sub>2</sub> (г).

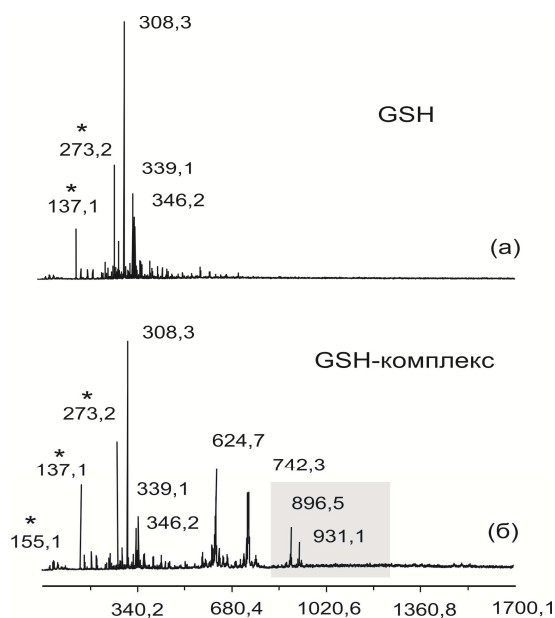
**Табела 3.3.** Преглед и идентитет сигнала детектованих у MALDI TOF масеним спектрима BSA, PLA<sub>2</sub> и GSH пре и након инкубације с  $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$  комплексом. Осенчени сигнали представљају детектоване адукте протеина/пептида и комплекса. Комерцијално доступна PLA<sub>2</sub> изолована из говеђег панкреаса садржи неколико изоформи већих маса (означено с\*), што је и претходно потврђено MALDI TOF MS.<sup>28</sup> Сигнали који потичу од DHB матрице у табели су означени са\*.

BSA		PLA <sub>2</sub>		GSH	
m/z	Идентитет сигнала	m/z	Идентитет сигнала	m/z	Идентитет сигнала
33167	[BSA+2H] <sup>2+</sup>	14006	Изоформа 1*	155,1*	[DHB+H] <sup>+</sup>
66435	[BSA+H] <sup>+</sup>	14203	Изоформа 2*	137,1*	[DHB-H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>
67880	[BSA+2[Ru(II)(dcbpy) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	14416	Изоформа 3*	273,2*	[2DHB-2H <sub>2</sub> O+H] <sup>+</sup>
		14793	[Изоформа 2+[Ru(II)(dcbpy) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	308,3	[GSH+H] <sup>+</sup>
		15190	[Изоформа 1+2[Ru(II)(dcbpy) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	339,1	[GSH-CO <sub>2</sub> H-H+2K] <sup>+</sup>
				346,2	[GSH+K] <sup>+</sup>
				624,7	[Ru(II)(dcbpy) <sub>2</sub> Cl] <sup>+</sup>
				742,3	[Ru(II)(dcbpy) <sub>2</sub> (DHB-H)] <sup>+</sup>
				896,5	[Ru(II)(dcbpy) <sub>2</sub> (GS)] <sup>+</sup>
				931,1	[Ru(II)(dcbpy) <sub>2</sub> Cl(GSH)] <sup>+</sup>

[Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплекс се такође везује за ензим PLA<sub>2</sub>, што је потврђено значајном променом у снимљеним масеним спектрима између саме PLA<sub>2</sub> (Слика 3.6. (в)) и PLA<sub>2</sub> инкубиране с комплексом (Слика 3.6. (г)). Прецизније, у масеном спектру ензима који је инкубиран с комплексом појављују се два нова сигнала на већим  $m/z$  вредностима (један већег интензитета на  $m/z$  14793, и други слабијег интензитета на  $m/z$  15190). Настали адукти ензима и комплекса су осенчени сивом бојом у спектру (Слика 3.6.(г)) и у Табели 3.3. За разлику од ширења сигнала BSA при формирању коњугата с комплексом, у случају снимљеног спектра коњугата између комплекса и PLA<sub>2</sub> резолуција инструмента је много већа што се огледа у јасном раздвајању сигнала у спектру. Ово је карактеристично за MALDI TOF MS анализу протеина различитих молекулских маса. Наиме, резолуција инструмента се повећава са смањењем молекулске масе протеина. У сваком случају, на основу разлике у  $m/z$  вредностима и молекулске масе комплекса, израчунато је да максималан број молекула комплекса који се везује за PLA<sub>2</sub> износи 2. Везивање структурно сличног комплекса рутенијума(III), [RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>]Cl, за PLA<sub>2</sub> је публиковано раније.<sup>28</sup> Ти резултати, објављени од стране Камчеве и сарадника, су упућивали да се два молекула [RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>]Cl комплекса везују за један молекул PLA<sub>2</sub>, што је у сагласности с резултатима приказаним у овој дисертацији: узевши све у обзир, резултати сугеришу постојање два везивна места на молекулу PLA<sub>2</sub> за везивање структурно сличних рутенијум бипиридинских комплекса.

Главни сигнали у спектру GSH (Слика 3.7. (а)) налазе се на  $m/z$  308,3, 339,1 и 346,2 што одговара његовом протонском и калијумовим адуктима. Идентификовани сигнали су назначени на основу њихове  $m/z$  вредности а одговарајући идентитети су дати у Табели 3.3. Јони детектовани у региону нижих маса у спектру потичу од DHB матрице и означени су са \*. Након инкубирања GSH с комплексом (Слика 3.7. (б)), у масеном спектру су детектовани сигнали који потичу од адукта с матрицом ([Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>(DHB-H)]<sup>+</sup> на  $m/z$  742,3), и с GSH ([Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>(GS)]<sup>+</sup> на  $m/z$  896,5 и [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl(GSH)]<sup>+</sup> на  $m/z$  931,5). Сигнали који потичу од адукта комплекса и GSH су осенчени сивом бојом у спектру (Слика 3.7.(б)) и у Табели 3.3. Детектовани адукти комплекса са GSH упућивали су на то да се GSH у овом случају може понашати

као монодентатни и бидентатни лиганд. Међутим, израчунато је да се само један молекул комплекса може координовати за молекул GSH.



**Слика 3.7.** MALDI TOF масени спектар GSH (а) и GSH након инкубације с комплексом (б). Спектри су снимљени у позитивном, рефлекторном моду. Сигнали који потичу од адуката  $[Ru(II)(dc bpy)_2Cl_2]$  комплекса и GSH су осенчени сивом бојом.

Редуковани облик глутатиона (GSH) формира комплексе и с „меким“ и „тврдим“ *Lewis*-овим киселинама (јонима метала). Поседује осам донорских атома тако да се могу очекивати и различити типови координације. С друге стране, Ru(II) је „мека“ киселина па је вероватније да ће координација ићи најпре преко тиолног сумпора. Стога се може претпоставити да се тиолна група прво координује метални центар што резултује супституцијом једног лабилног хлоридног лиганда (Cl) и формирањем  $[Ru(II)(dc bpy)_2Cl(GSH)]^+$ . Реакција је потом праћена супституцијом другог Cl лиганда и хелатизовањем преко карбоксилног -O или пептидног -N што резултује бидентатном координацијом и стварањем  $([Ru(II)(dc bpy)_2(GS)]^+)$ . Овакав модел координације је претходно објављен и за друге Ru(II) бипиридил комплексе.<sup>286</sup> Такође, сличан тип везивања (преко -S и -N) је предложен и за везивање GSH за цисплатину, који је и даље један од најчешће примењиваних цитостатика.<sup>287</sup>



### 3.3.2. Одређивање константе везивања (K<sub>b</sub>) комплекса [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] с говеђим серумским албумином, фосфолипазом А<sub>2</sub> и глутатионом

У наредном кораку је одређена јачина интеракције између [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплекса и молекула. Јачина ових интеракција одређује да ли ће лек бити инактивиран или испољавати висок ниво токсичности кроз јако везивање за протеине плазме/ћелијске пептиде (BSA и GSH) или ће бити отпуштен из адукта под одређеним условима што подразумева слабије везивање и бољу транспортну функцију.<sup>250</sup> Ова величина такође открива колики везивни потенцијал [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплекс има за ензим PLA<sub>2</sub>, који је уједно и циљни молекул у терапији канцера.

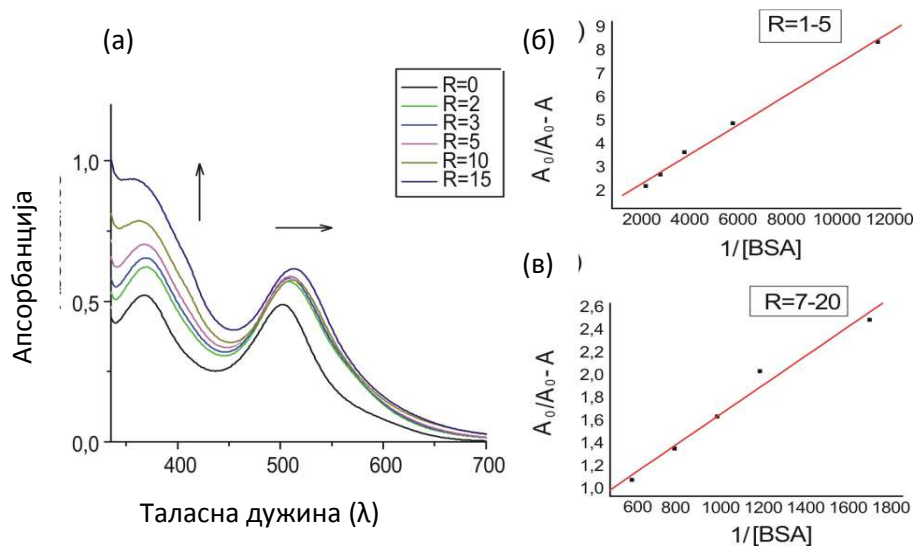
Константе везивања (K<sub>b</sub>) су одређене спектрофотометријски праћењем промене апсорбанције комплекса на одабраној таласној дужини тј. прецизније, праћењем максималне промене апсорбанције комплекса у функцији од концентрације додатог протеина, односно пептида. Најпре је снимљен UV-Vis спектар самог комплекса ради процене апсорпционе траке комплекса која ће бити разматрана за квантификацију интеракције. У спектру су детектоване три апсорпционе траке на таласним дужинама 310, 380 и 520 nm. Траке локализоване на већим таласним дужинама 380 и 520 nm су одабране за праћење интеракције с протеинима/GSH због тога што је на овим таласним дужинама интерференција с апсорпционим тракама самих протеина минимална. Спектар самог [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплекса, исте концентрације као у смеси протеина и рутенијумовог комплекса, снимљен након истог инкубационог времена (24 h) је служио за поређење у циљу елиминације потенцијалних промена у спектру комплекса које би могле бити изазване стајањем (24 h инкубационим временом).

Након инкубирања [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплекса с различитим количинама BSA, примећене су следеће промене у спектру комплекса:

- хиперхромни померај траке на 380 nm и
- батохромни померај траке на 520 nm с повећањем концентрације BSA (Слика 3.8. (а)).

Сличан батохромни померај примећен је и раније у литератури, само с другим типом комплекса рутенијума.<sup>250</sup> Ту је описано да је управо овај тип померања индикатор везивања комплекса и BSA, тачније, да је последица преласка комплекса у мање поларно окружење након интеракције с BSA. Због наведеног, повећање апсорбанције на 380 nm је узето за одређивање константе везивања између комплекса и BSA.

Графичким приказом  $A_0/(A-A_0)$  у функцији од  $1/[BSA]$ , константа везивања је одређена из једначине праве помоћу нагиба и одсечка. Такође, примећена је линеарност у два домена у зависности од односа BSA/комплекс (Слика 3.8. (б) и (в)).

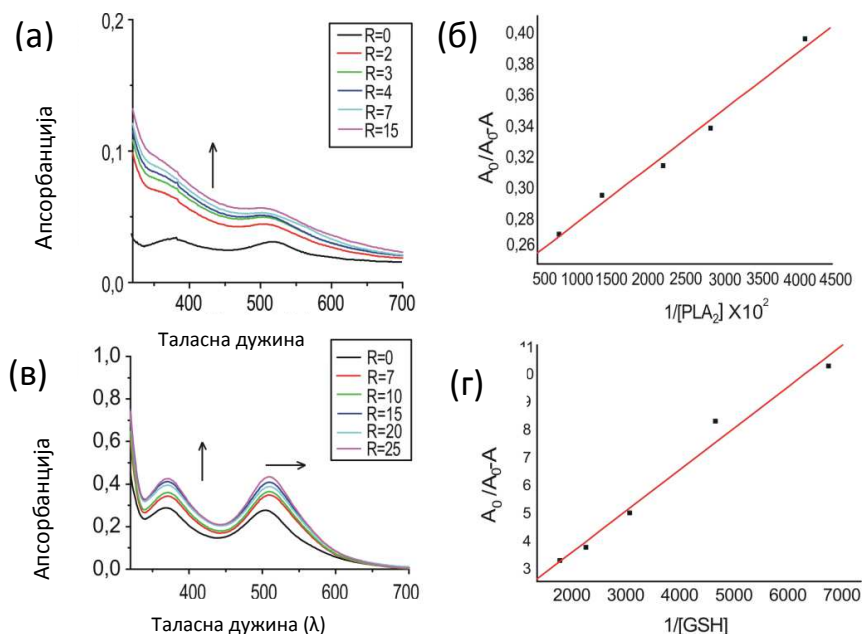


**Слика 3.8.** Спектрофотометријска титрација BSA са  $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$  комплексом (а). Концентрација комплекса је одржавана константном а количина BSA је варирана тако да је однос  $[протеин]/[комплекс]$  био у опсегу од 1 до 20. R представља однос између моларних концентрација BSA и комплекса ( $R=[BSA]/[комплекс]$ ). Графици зависности  $A_0/(A-A_0)$  од  $1/[BSA]$  су дати на (б) и (в). Линеарност је уочена у два домена (б) и (в), у зависности од R вредности.

Линеарност у два домена упућује на постојање два везивна места на молекулу BSA за комплекс, што је у сагласности с резултатима добијеним помоћу MALDI TOF MS (Поглавље 3.3.1). Сходно наведеном, израчунате су две  $K_b$  вредности,  $1.84 \times 10^3$  и  $2.42 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$  из којих се види разлика у афинитету везивања између комплекса и BSA у зависности од концентрације комплекса. Са становишта теорије, при нижим концентрацијама комплекса прво долази до везивања комплекса за везивно место с већим афинитетом за везивање, док се при већим концентрацијама комплекса попуњавају везивна места с мањим афинитетом пошто је претходно место већег афинитета већ засићено комплексом. Број везивних места за комплекс на молекулу BSA, као и њихов одговарајући везивни афинитет утиче на концентрацију слободног тј. активног облика лека у крвотоку. Стога, јако везивање између лека и албумина може смањити ефикасност, утицати на његову биодистрибуцију и процес уклањања лека из организма.<sup>288</sup> На основу добијених вредности за константе везивања у овом

случају, може се рећи да је везивање потенцијалног лека (комплекса) за BSA релативно слабо у поређењу с другим лековима ( $10^4$ – $10^6$  M<sup>-1</sup>).<sup>286,289</sup>

Након инкубирања [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] комплекса с различитим концентрацијама PLA<sub>2</sub>, хиперхромни померај зависно од концентрације је уочен за обе траке и на 380 и 520 nm (Слика 3.9. (а)). Реакција је праћена мерењем повећања у апсорбацији на 380 nm, јер је у том случају разлика у апсорбацијама између комплекса и производа везивања с комплексом максимална. Линеарност је примећена само у једном домену што упућује на постојање једног везивног места (Слика 3.9. (б)), с релативно високом вредношћу за *K<sub>b</sub>* ( $7.67 \times 10^5$  M<sup>-1</sup>). Поређењем ових резултата с резултатима добијеним помоћу MALDI TOF MS уочава се одступање. Наиме, резултати добијени помоћу MALDI TOF MS упућивали су на постојање два везивна места и ако је координација првог молекула комплекса за PLA<sub>2</sub> одговарала сигналу већег интензитета, док је координација другог молекула комплекса резултовала сигналом знатно нижег интензитета (Слика 3.6. (д)). Споменуто одступање се може објаснити могућношћу да је релативно јака координација првог молекула комплекса резултовала у конформационим променама у молекулу PLA<sub>2</sub> што је за последицу имало стварање другог везивног места с веома ниским везивним потенцијалом што није било могуће детектовати UV-Vis спектроскопијом. Добијена висока вредност *K<sub>b</sub>* је показатељ високог афинитета комплекса за PLA<sub>2</sub>, с обзиром да се према литературним подацима сматра да везивна константа треба да буде  $\geq 10^5$  M<sup>-1</sup> да би новоформирани адукт протеин-комплекс остао непромењен у физиолошким условима.<sup>290</sup> Везивање комплекса за PLA<sub>2</sub> такође за последицу може имати инхибицију ензимске активности, што је и раније демонстрирано у случају примене неколико комплекса платине и рутенијума.<sup>28,29,291</sup> Висок везивни потенцијал комплекса за PLA<sub>2</sub>, као и инхибиција овог ензима је значајна са становишта проналажења нових циљаних молекула за терапију канцера, јер је повећана активност и експресија неколико изоформи PLA<sub>2</sub> пронађена у ћелијама хуманог канцера.



**Слика 3.9.** Спектрофотометријска титрација  $PLA_2$  (а) и  $GSH$  (в) са  $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$  комплексом. Концентрација комплекса је одржавана константном, док су вариране концентрације  $PLA_2$ , односно  $GSH$  у циљу постизања различитих  $R$  вредности.  $R$  представља однос између моларних концентрација ензима/пептида и комплекса ( $R=[PLA_2]/[комплекс]$  тј.  $R=[GSH]/[комплекс]$ ). Приказ графичке зависности  $A_0/(A-A_0)$  од  $1/[PLA_2]$ , односно  $1/[GSH]$  су дати на (б) и (г).

Инкубирањем  $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$  комплекса с различитим концентрацијама  $GSH$ , у UV-Vis спектру комплекса уочен је сличан ефекат као са BSA тј. батохромни померај траке на 520 nm и хиперхромни померај траке на 380 nm (Слика 3.9. (в)). За разлику од BSA, линеарност је овде уочена у само једном домену што је индикатор постојања само једног везивног места (Слика 3.9. (г)), као што је већ утврђено и помоћу MALDI TOF MS. Одређена вредност  $Kb$  је била ниска, тачније  $2.53 \times 10^2 M^{-1}$ . Ако се за поређење размотри цисплатина, веома јако и иреверзибилно везивање овог лека за интрацелуларне тиолатне лиганде, међу којима је и  $GSH$ , представља главни корак у инактивацији овог лека што за последицу има негативан ефекат на терапијску ефикасност.<sup>292,293</sup> Стога, добијени ниски афинитет  $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$  комплекса за  $GSH$  би могао имати предност у потенцијалној терапији.

Ретроспектива свих везивних константи и броја везивних места добијених из експеримената су дате у Табели 3.4. Из тога је било могуће извести следећи тренд у афинитету везивања комплекса:  $PLA_2 > BSA > GSH$ . Резултати упућују да се комплекс везује јаче за  $PLA_2$  (потенцијалну мету за цитостатике) него за BSA, и ако имају исти

број везивних места за молекула комплекса и упркос чињеници да је албумин познат као свестрани носач за различите групе лекова за које има и висок везивни афинитет. Најнижи везивни афинитет комплекс је показао према GSH, који се уједно сматра и главним потенцијалним инактиватором лека и узрочником стварања резистенције на лек. Стога, добијени поредак у реактивности комплекса према датим биомолекулима би могао имати погодности у потенцијалној терапији.

**Табела 3.4.** Ретроспектива константи везивања и броја везивних места комплекса за дате биомолекуле.

молекул	$Kb_1$ (M <sup>-1</sup> )	$Kb_2$ (M <sup>-1</sup> )	Број везивних места ( $n$ )
<b>BSA</b>	$(1,84 \pm 0,09) \times 10^3$	$(2,42 \pm 0,12) \times 10^2$	2
<b>PLA<sub>2</sub></b>	$(7,67 \pm 0,38) \times 10^5$		2
<b>GSH</b>	$(2,53 \pm 0,13) \times 10^2$		1

### 3.4. Карактеризација НЧ TiO<sub>2</sub>

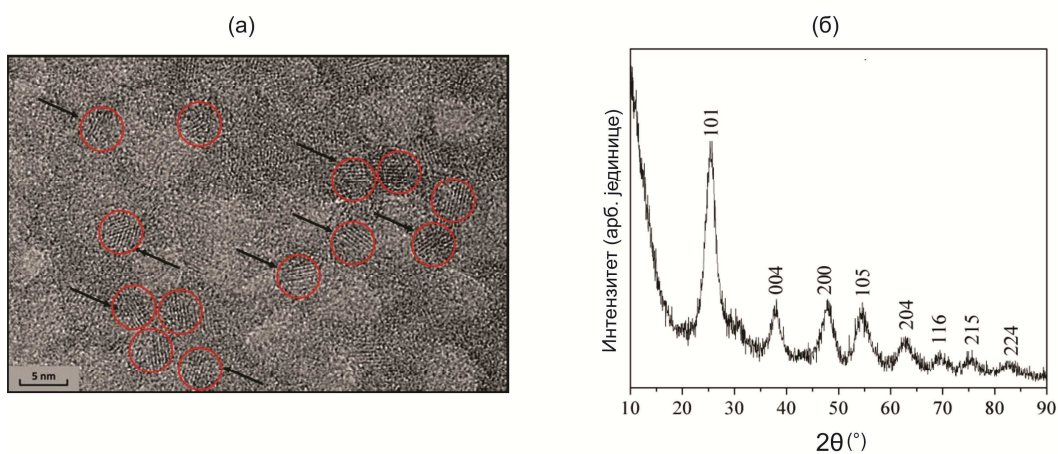
Као носач за потенцијални медикамент изабране су НЧ TiO<sub>2</sub> због вишеструких позитивних карактеристика, описаних детаљније у оквиру општег дела (Поглавље 1.6.), од којих се посебно издвајају једноставна функционализација површине, биокомпатибилност и фотоактивност. У оквиру ове дисертације коришћене су синтетисане колоидне НЧ TiO<sub>2</sub> чија је рН вредност износила 2,5. Ради детаљне карактеризације НЧ извршена је структурна карактеризација и тестирање фотоактивности што је описано у наредна два потпоглавља.

#### 3.4.1. Структурна карактеризација НЧ TiO<sub>2</sub> трансмисионом електронском микроскопијом (TEM), рендгенском дифракционом анализом (XRD) и дефинисање изоелектричне тачке

Величина и облик НЧ TiO<sub>2</sub> су окарактерисани трансмисионом електронском микроскопијом (TEM). Репрезентативна микрографија синтетисаних НЧ TiO<sub>2</sub> дата је на Слици 3.10. (а) На основу мерења утврђено је да су у питању сферне НЧ просечне

величине 5 nm. Приликом одабира начина синтезе НЧ  $\text{TiO}_2$  посебна пажња посвећена је потреби да величина НЧ не прелази 200 nm да би се избегла њихова брза филтрација из крвотока и дала шанса потенцијалном цитостатику, који је касније за њих везан, да оствари свој терапеутски ефекат. У супротном би се НЧ лако акумулирале и агломерисале у слезини, ефикасније активирале систем за елиминацију а самим тим и брже уклањале из организма.<sup>208</sup> Такође, јако важан критеријум у одабиру синтезе била је и потреба униформности и хомогености система, што је свакако постигнуто колоидном синтезом НЧ  $\text{TiO}_2$ .

Снимљени дифрактограм праха НЧ  $\text{TiO}_2$  је дат на Слици 3.10.(б) Сигнали који се јављају на вредности  $2\theta$  25,4°, 38,1°, 48,1°, 54,5°, 63,0°, 69,6°, 75,7° и 82,9° одговарају кристалним равнинама за анатас облик  $\text{TiO}_2$  (101), (004), (200), (105), (204), (116), (215) и (204).(tetragonal JCPDS No.21-1272). Како добијени резултати нису показали присуство било каквог дифракционог максимума који одговара другој кристалној форми, може се са сигурношћу тврдити да на овај начин синтетисане НЧ одговарају анатас кристалној форми  $\text{TiO}_2$ .



**Слика 3.10.** Трансмисиона електронска микрографија НЧ  $\text{TiO}_2$  (НЧ су означене црвеним круговима и стрелицама) (а) и дифрактограм праха синтетисаних НЧ  $\text{TiO}_2$  (б).

Изоелектрична тачка (pI) дисперзије НЧ  $\text{TiO}_2$  у дејонизованој води, по литературним подацима, варира од 2 до 9 у зависности од особина растварача и самих НЧ.<sup>294</sup> У случају дисперзије НЧ  $\text{TiO}_2$  која по величини и кристалној структури одговара синтетисаним НЧ, вредност pI варира у опсегу између 5 и 6.<sup>295</sup> рН вредност

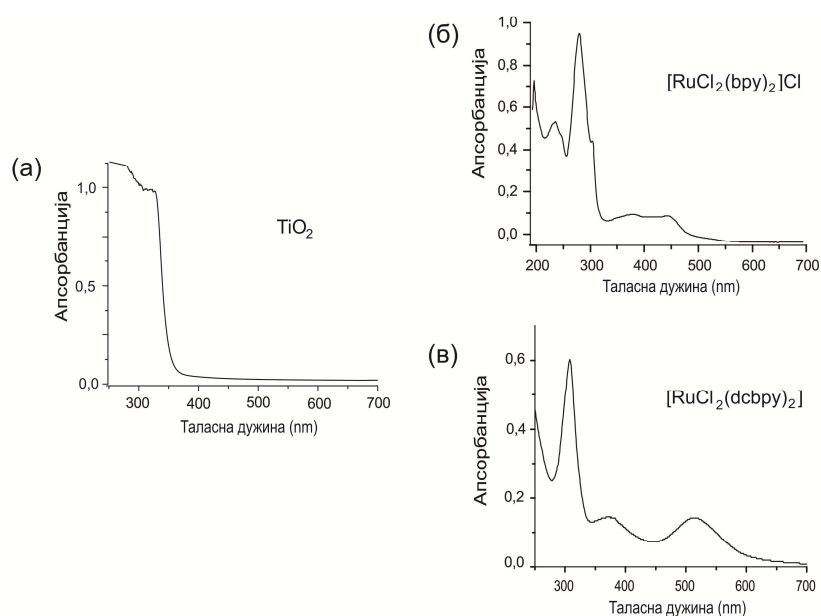
синтетисаних НЧ  $\text{TiO}_2$  износила је око 2. На овај начин постигнута је потпуна протонваност површине НЧ и добијен је стабилан колоидни систем у ком је проблем потенцијалне агломерације у потпуности избегнут.

### **3.4.2. Тестирање фотоактивности НЧ $\text{TiO}_2$ , бипиридинских комплекса рутенијума и испитивање њихове међусобне интеракције у UV области употребом MALDI TOF масене спектрометрије**

Једна од главних карактеристика НЧ  $\text{TiO}_2$  је и њихова изражена фотоактивност у UV области детаљно описана у оквиру општег дела у Поглављу 1.6.2. Стога је, пре испитивања могућности коришћења НЧ  $\text{TiO}_2$  као носача за контролисану доставу лекова, испитана њихова фотосензитивност MALDI TOF масеном спектрометријом. MALDI TOF MS представља масену спектрометрију у којој су ласерска десорпција и јонизација узорка потпомогнуте матрицом. Иако комплетан механизам десорпције и јонизације није сасвим разјашњен, претпоставља се да је јонизација и десорпција узорка омогућена интеракцијом ласерске светлости и узорка који је помешан с матрицом. Улога матрице је да апсорбује енергију ласера, која се затим предаје узорку, чиме долази до његове десорпције, односно преласка у гасну фазу, а потом и јонизације. С обзиром да матрица апсорбује већи део енергије ласера, фрагментација молекула узорка је знатно редукована.<sup>296</sup> Управо због овога, ова јонизациона техника се назива „меком“. У пракси, MALDI TOF MS се користи за детекцију и анализу биомолекула и других нестабилних једињења јер не захтева претходну модификацију узорка, поседује високу осетљивост, брза је (траје неколико секунди) и уз њену помоћ се добија велики број информација.<sup>296</sup> С обзиром да се заснива на интеракцији ласерске светлости и узорка, за потребе ове дисертације, метода је послужила као систем за испитивање фотоактивности.

Поред фотоактивности носача (НЧ  $\text{TiO}_2$ ), било је неопходно испитивање и друге компоненте фотосензитивног система за контролисану доставу лекова тј. комплекса рутенијума. Од значаја је било утврдити да ли обе компоненте система могу апсорбовати светлост ласера MALDI TOF масеног спектрометра, као и могућност преноса апсорбоване енергије с једне на другу компоненту НКС и њихове међусобне интеракције. Као узорци, испитиване су НЧ  $\text{TiO}_2$  и бипиридински комплекси рутенијума(II) и рутенијума(III) (структурни аналози, без и с карбоксилним групама

везаним за бипиридинске лиганде, чије су структурне формуле дате на Слици 3.12.) који су и сами разматрани као ФСМ и антитуморски агенси. Изводљивост самог експеримента је била могућа с обзиром да НЧ  $\text{TiO}_2$  и наведени комплекси апсорбују зрачење у UV области (видети дате UV-Vis спектре на Слици 3.11.) а ласер коришћеног уређаја MALDI TOF масеног спектрометра емитује на 337 nm. За наведена испитивања коришћен је LDI и SALDI приступ детаљно објашњен у оквиру следећих поглавља.



Слика 3.11. UV-Vis спектри а) НЧ  $\text{TiO}_2$ , б)  $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]\text{Cl}$  и в)  $[\text{RuCl}_2(\text{dc bpy})_2]$ .

### 3.4.2.1. Тестирање фотоактивности $\text{TiO}_2$ и бипиридинских комплекса рутенијума - LDI TOF масеноспектрометријска анализа

LDI MS анализа представља приступ снимања масених спектра узорка без матрице при чему долази до директног контакта ласерског зрачења с узорком а као резултат, уочава се повећан степен фрагментације узорка. На основу добијених спектра добија се информација о фотоактивности узорка.

Порекло јединствене фотоактивности  $\text{TiO}_2$  потиче од постојања места на површини НЧ са слободним координационим местима. С обзиром на велико закривљење површине,  $\text{TiO}_2$  НЧ реконструишу своју површину на такав начин да се нарушава кристално окружење површинских атома Ti. При томе површински атоми Ti постају



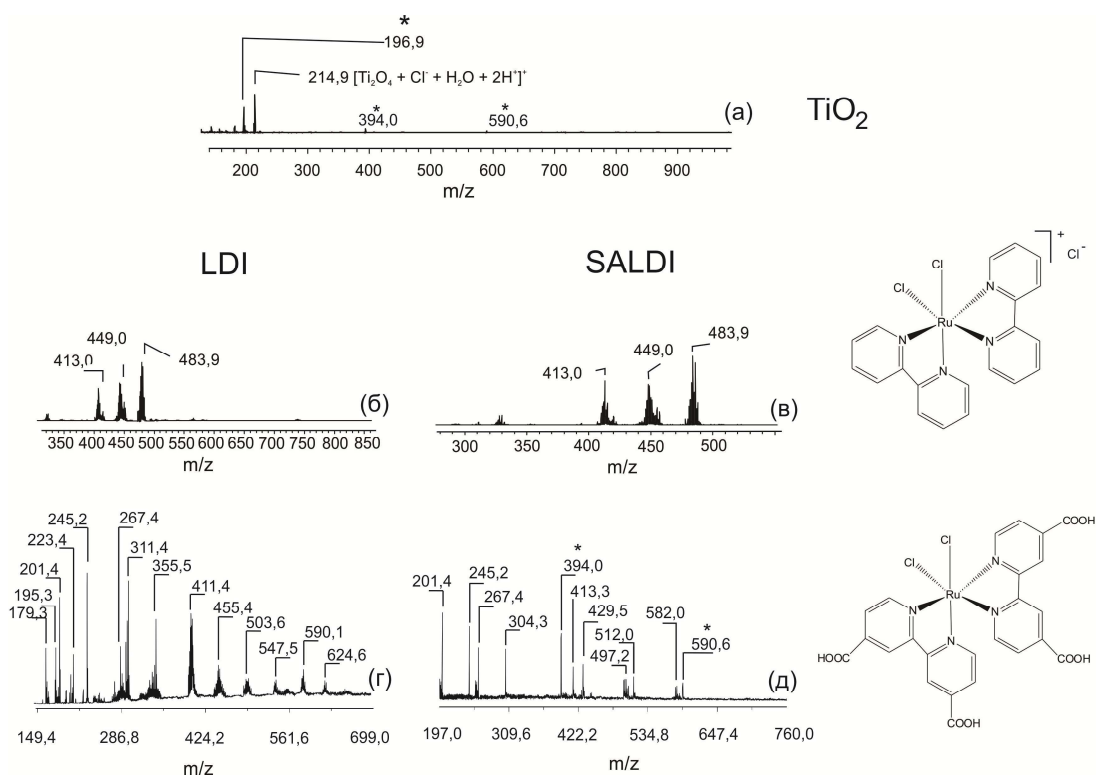
пентакоординисани тј. координационо незасићени, што се још назива и „површинским дефектима“ (за детаљније објашњење погледати Поглавље 1.6.1.1.). На тај начин, координационо незасићени атоми Ti се понашају као „клопке“ за фотогенерисано наелектрисање.<sup>180-182</sup>

LDI TOF масени спектар TiO<sub>2</sub> НЧ, снимљен у позитивном јонском моду, дат је на Слици 3.12.(а). Сигнали који потичу од златне плочице су означени звездицом и припадају самом јону злата, као и његовим кластерима (димеру и тримеру) који се могу створити у систему дејством ласера (Au<sub>n</sub><sup>+</sup>, n=1-3). Ови сигнали нису узимани у обзир приликом даље интерпретације спектра и провере фотоактивности система. Из датог спектра се такође уочава сигнал који потиче од TiO<sub>2</sub> НЧ на *m/z* вредности 214,9. Сигнал представља димер TiO<sub>2</sub> настао уз додаток молекула воде, протона и хлоридног јона.

Због апсорпционих могућности оба бипиридинска комплекса рутенијума у UV области, (Слика 3.11) очекивано је да ће сами комплекси апсорбовати зрачење ласера, што резултује одговарајућим масеним спектром комплекса. Директна интеракција UV зрачења и комплекса је такође корисна за разумевање фотоактивности самог комплекса као и процеса које индукује UV зрачење. Већ је познато из више литературних извора, да дејством ласера на комплексе прелазних метала, као и на соли метала, долази до фото-индуковане оксидације или редукције металног јона што за последицу има појаву смеше јона у којима се метални јон појављује како у свом оригиналном оксидационом стању, тако и у оксидованој и/или редукованој форми.<sup>297-300</sup> Такође, честа појава је и губитак једног или више лиганата и/или њихова фрагментација. Наведене фотохемијске промене на комплексима рутенијума такође могу резултовати и у побољшању њихове антитуморске способности. Такви комплекси се понашају као ФСМ, а њихов преглед, врста светлости која их активира, као и механизам саме активације је описан у Поглављу 1.6.5.

Добијени LDI масени спектри тестираних комплекса су дати на Слици 3.12. (б) и (г), док су идентитети сигнала дати у Табели 3.5. Спектар [RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>]Cl (Слика 3.12.(б)) даје три карактеристична сигнала. Прва два (*m/z* 413,0 и 449,0), потичу од јонских врста насталих након редукције Ru<sup>III</sup> у Ru<sup>II</sup> и губитка лабилних Cl лиганата, док трећи сигнал на вредности *m/z* 483,9 одговара изворном облику комплекса који је само из спољашње координационе сфере изгубио један Cl јон (Табела 3.5.). LDI спектар комплекса [RuCl<sub>2</sub>(dc bpy)<sub>2</sub>] дат је на Слици 3.12.(г). У области нижих *m/z* вредности детектовани су сигнали који потичу од протонског или натријумовог адукта dc bpy

лиганда као и од фрагментационих продуката лиганда праћених губитком једног или два  $\text{CO}_2$  молекула (Табела 3.5.). На већим  $m/z$  вредностима детектовани су сигнали са сложенијом изотопском расподелом који потичу од јонских врста комплекса. За детаљнији идентитет сигнала видети Табелу 3.5. У детектованим јонским врстама комплекса, рутенијум се појављује како у свом оригиналном оксидационом стању ( $\text{Ru}^{\text{II}}$ ), тако и у редукованој форми ( $\text{Ru}^0$ ). Већина детектованих јонских врста настаје губитком једног или оба лабилна лиганда хлора, одласком једног или два  $\text{CO}_2$  молекула из  $\text{dcbru}$  лиганда или чак одласком целог  $\text{dcbru}$  лиганда (Табела 3.5.) Поређењем LDI спектра  $[\text{RuCl}_2(\text{dcbru})_2]$  (Слика 3.12.(г)) са спектром  $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]\text{Cl}$  (Слика 3.12.(б)), уочава се већа лабилност  $[\text{RuCl}_2(\text{dcbru})_2]$  комплекса узрокована увођењем карбоксилних група у бипиридинске лиганде. Дејством ласера на овај комплекс добија се већи проценат сигнала који потичу од самог лиганда и фрагментационих производа лиганда.



**Слика 3.12.** LDI TOF масени спектри  $\text{TiO}_2$  (а),  $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]\text{Cl}$  (б) и  $[\text{RuCl}_2(\text{dcbru})_2]$  (в). SALDI TOF масени спектри комплекса  $[\text{RuCl}_2(\text{bpy})_2]\text{Cl}$  (з) и  $[\text{RuCl}_2(\text{dcbru})_2]$  (д) снимљени помоћу НЧ  $\text{TiO}_2$ . Сви спектри су снимљени у позитивном моду. Сигнали означени звездицама потичу од саме златне плочице и одговарају кластерима јона злата ( $\text{Au}_n^+$ ,  $n=1-3$ ).

Табела 3.5. Идентитети сигнала детектованих у (SA)LDI TOF масеним спектрима  $[RuCl_2(bpy)_2]Cl$  и  $[RuCl_2(dcbpy)_2]$ .

	$[RuCl_2(bpy)_2]Cl$	$[RuCl_2(dcbpy)_2]$
	Позиција сигнала / идентитет сигнала	Позиција сигнала / идентитет сигнала
LDI	$m/z$ 413,0 / $[Ru^{II}(bpy)_2-H]^+$ $m/z$ 449,0 / $[Ru^{II}Cl(bpy)_2]^+$ $m/z$ 483,9 / $[Ru^{III}(bpy)_2Cl_2]^+$	$m/z$ 179,3 / $[dcbpy-2CO_2+Na]^+$ $m/z$ 195,3 / $[dcbpy-2CO_2+K]^+$ $m/z$ 201,4 / $[dcbpy-CO_2+H]^+$ $m/z$ 223,4 / $[dcbpy-CO_2+Na]^+$ $m/z$ 245,2 / $[dcbpy+H]^+$ $m/z$ 267,4 / $[dcbpy+Na]^+$ $m/z$ 311,4 / $[Ru^{II}(dcbpy)Cl-2CO_2+H_2O]^+$ $m/z$ 355,5 / $[Ru^{II}(dcbpy)Cl-CO_2+H_2O]^+$ $m/z$ 411,4 / $[Ru^{II}(dcbpy)Cl_2-CO_2+K]^+$ $m/z$ 455,4 / $[Ru^{II}(dcbpy)Cl_2+K]^+$ $m/z$ 503,6 / $[Ru^0(dcbpy)_2-2CO_2]^+$ $m/z$ 547,5 / $[Ru^0(dcbpy)_2-CO_2]^+$ $m/z$ 590,1 / $[Ru^0(dcbpy)_2+H]^+$ $m/z$ 624,6 / $[Ru^{II}(dcbpy)_2Cl]^+$
SALDI		
НЧ $TiO_2$	$m/z$ 413,0 / $[Ru^{II}(bpy)_2-H]^+$ $m/z$ 449,0 / $[Ru^{II}Cl(bpy)_2]^+$ $m/z$ 483,9 / $[Ru^{III}(bpy)_2Cl_2]^+$	$m/z$ 201,4 / $[dcbpy-CO_2+H]^+$ $m/z$ 245,2 / $[dcbpy+H]^+$ $m/z$ 267,4 / $[dcbpy+Na]^+$ $m/z$ 304,3 / $[dcbpy-2H+Na+K]^+$ $m/z$ 394,0 * / $Au_2^+$ $m/z$ 413,3 / $[(dcbpy)_2-3CO_2+H_2O+K]^+$ $m/z$ 429,5 / неидентификовани сигнал $m/z$ 497,2 / $[Ru^{II}(dcbpy)Cl_2+TiO_2+H]^+$ $m/z$ 512,0 / $[(dcbpy)_2+Na]^+$ $m/z$ 582,0 / $[Ru^{II}(dcbpy)Cl_2+Ti_2O_3+Na]^+$ $m/z$ 590,6 * / $Au_3^+$

Као што се могло претпоставити, у случају оба тестирана комплекса долази до делимичне фотохемијске редукције комплекса изазване UV ласером инструмента, тако да се као крајњи производи детектују изворни и редуковани облици комплекса.

#### **3.4.2.2. Утицај површине НЧ TiO<sub>2</sub> на фотоактивност бипиридинских комплекса рутенијума и испитивање потенцијалне интеракције комплекса и НЧ TiO<sub>2</sub> дејством UV ласера-SALDI MS анализа**

Због своје изразите фотоактивности у UV области НЧ TiO<sub>2</sub> имају тенденцију да се понашају као матрице приликом MS анализе. Осим у облику НЧ, TiO<sub>2</sub> се користи у облику танких филмова и нанотуба у масеноспектрометријској анализи различитих узорака.<sup>299-302</sup> Пошто се сви процеси везани за ласерску десорпцију и јонизацију одигравају на површини НЧ TiO<sub>2</sub> тј. на „површинским дефектима“ НЧ, овај приступ анализе се зове и SALDI MS (енгл. *Surface-assisted laser desorption and ionization mass spectrometry*) или масена спектрометрија у којој су ласерска десорпција и јонизација потпомогнуте површином. Управо овај приступ је коришћен за детекцију могућности јонизовања комплекса прелазних метала уз помоћ НЧ TiO<sub>2</sub>. Координационо незасићена места тј. „површински дефекти“ НЧ TiO<sub>2</sub> поред тога што су одговорна за фотоактивност НЧ TiO<sub>2</sub> такође су одговорна и за реактивност површине НЧ према различитим лигандима.<sup>180-182</sup> Управо због тога НЧ TiO<sub>2</sub> имају способност да координирају на својој површини велики број хемијских једињења и биомолекула. У оквиру Поглавља 1.6.1.2. је дат литературни преглед лиганада чија је координација за TiO<sub>2</sub> детаљније испитана.

Потенцијална интеракција рутенијумових бипиридинских комплекса, који су структурни аналози са и без карбоксилних група, с НЧ TiO<sub>2</sub> као и утицај те интеракције на фотоактивност дејством UV ласера је испитана а резултати су дати на Слици 3.12. (в) и (д). Спектри су након снимања поређени међусобно, као и са спектрима добијеним применом LDI приступа. У случају комплекса [RuCl<sub>2</sub>(bpy)<sub>2</sub>]Cl, у SALDI TOF масеном спектру с НЧ TiO<sub>2</sub> (Слика 3.12.(в)) детектовани су исти сигнали као и у LDI спектру самог комплекса (Слика 3.12.(б)). Нису детектовани сигнали који би упућивали на интеракцију између овог комплекса и НЧ TiO<sub>2</sub>, осим сорпције на површини НЧ. SALDI TOF масени спектар комплекса [RuCl<sub>2</sub>(dcbpy)<sub>2</sub>] дат је на Слици

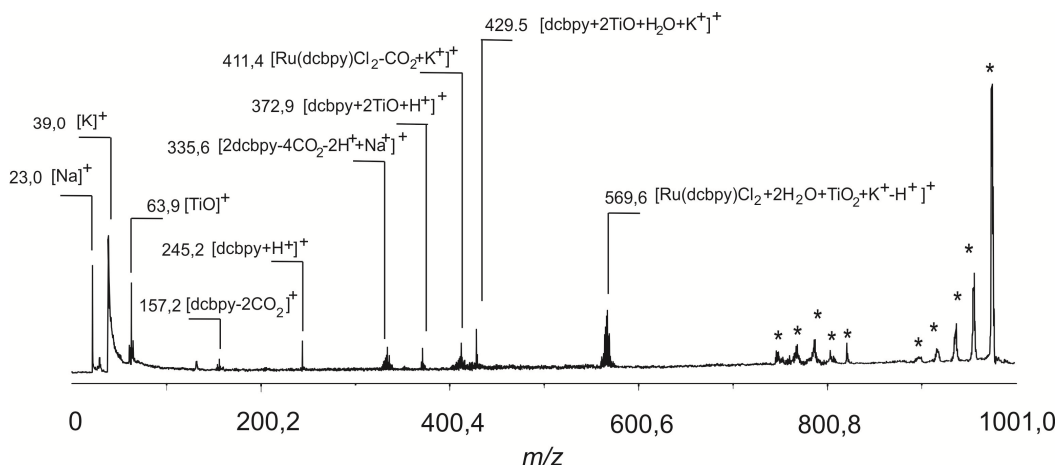
3.12.(д). На први поглед се уочава ишчезавање великог броја сигнала који су претходно детектовани у LDI спектру (Слика 3.12.(г)), као и појава неколико нових сигнала. Од њих се издвајају два, сложеније изотопске расподеле и слабијег интензитета, на  $m/z$  вредностима 582,0 и 497,2 који потичу од адуката насталих везивањем комплекса с  $TiO_2$  (Табела 3.5.). Преостали сигнали у спектру, знатно једноставније изотопске расподеле и јачег интензитета, углавном потичу од протонских, натријумових и калијумових адуката  $dcbru$  лиганда. Добијени спектар потврђује интеракцију између комплекса и НЧ  $TiO_2$ . Оно што је такође карактеристично за SALDI масени спектар је знатно мањи број сигнала који потичу од фрагментације самог  $dcbru$  лиганда (губитак једног или оба  $CO_2$  из  $dcbru$ ), што је карактеристично за LDI спектар комплекса (Табела 3.5.). Мањи проценат фрагментисаног слободног  $dcbru$  лиганда у SALDI масеном спектру говори у прилог томе да је лиганд  $dcbru$  заштићен од директног удара ласера уз помоћ НЧ  $TiO_2$  које остварују везу с комплексом управо преко овог лиганда. Дејством примењене јачине UV ласера на створени адукт између комплекса  $[RuCl_2(dcbru)_2]$  и НЧ  $TiO_2$ , НЧ  $TiO_2$  апсорбују већи део UV зрачења спречавајући већи проценат фрагментације комплекса што резултује у мањим бројем сигнала у SALDI у односу LDI спектар.

Овим делом је потврђено да је за интеракцију између комплекса и наночестица неопходно присуство карбоксилне групе на бипиридинском лиганду и да се присуство НЧ  $TiO_2$  у систему који користи светлост ласера може искористити за активирање, односно, у овом случају десорпцију и јонизацију узорка.

### 3.5. Синтеза и карактеризација НКС

Након што је потврђен потенцијал комплекса као цитостатика, следећа фаза била је везивање комплекса за одговарајући носач у циљу обезбеђивања његове циљане и контролисане доставе до туморског ткива. Као носач за лек изабране су НЧ  $TiO_2$  које су претходно структурно окарактерисане и чија је фотоактивност детаљно испитана у присуству комплекса у оквиру претходног поглавља. НЧ су изабране због својих повољних карактеристика описаних детаљније у општем делу (Поглавље 1.6.), као и због свог високог афинитета за интеракцију с карбоксилним групама.<sup>252</sup> Рутенијумов комплекс који је синтетисан у оквиру ове докторске дисертације, садржи бидентатна ( $dcbru$ ) лиганда са по две карбоксилне групе, самим тим четири потенцијална везивна



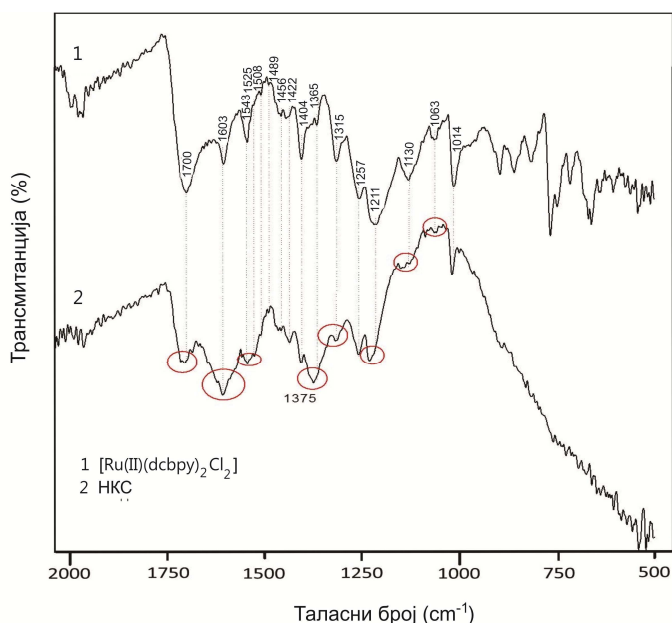


**Слика 3.14.** MALDI TOF масени спектар комплекса снимљен након инкубације са НЧ  $\text{TiO}_2$  уз помоћ F20TPP матрице у позитивном моду.

Добијени масени спектар поређен је с масеним спектром самог комплекса (Слика 3.2.), снимљеног под истим условима и у истој матрици. На основу поређења спектра види се да након инкубације комплекса с НЧ  $\text{TiO}_2$  из спектра ишезавају сигнали који су карактеристични за сам комплекс ( $m/z$  660,8, 624,6 и 590,1), а да се јавља сигнал карактеристичан за везивање  $\text{TiO}_2$  и комплекса на вредности  $m/z$  569,6, као и сигнали који одговарају везивању  $\text{TiO}_2$  за  $\text{dc bpy}$  лиганд (372,9 и 429,5) (Слика 3.14). Поменути сигнали на  $m/z$  372,9 и 429,5 највероватније настају као последица фрагментације адукта комплекса с  $\text{TiO}_2$  (приметити да адукту на  $m/z$  569,6 недостаје један  $\text{dc bpy}$  лиганд) услед стерног фактора и/или као последица фотохемијских процеса. Поред наведених сигнала ту су још и сигнали који потичу од самог лиганда, фрагмент на  $m/z$  157,2, затим протонски адукт на 245,2 и полимеризациони адукт на 335,6, као и сигнал који потиче од НЧ на 63,9. Коришћена метода је дала потврду о интеракцији између комплекса и НЧ  $\text{TiO}_2$  али не и о детаљима те интеракције као што је начин везивања.

У циљу одређивања начина везивања комплекса за НЧ  $\text{TiO}_2$ , снимљени су и FTIR спектри. ATR-FTIR спектри спрашених узорка комплекса, као и комплекса након адсорпције/везивања с НЧ  $\text{TiO}_2$  (формирања НКС)) су приказани на Слици 3.15. Најзначајније промене у FTIR спектру комплекса и НКС су уочене у опсегу од 1800 до 800  $\text{cm}^{-1}$ . У спектру комплекса уочени су сигнали карактеристични за истежуће вибрације (енгл. *stretching vibrations*) карбоксилне групе  $\nu_s(-\text{COOH})$  на 1700 и 1543  $\text{cm}^{-1}$ . Интензивни сигнал на 1603  $\text{cm}^{-1}$  одговара асиметричним истежућим вибрацијама

карбоксилне групе  $\nu_{as}(-COO^-)$ , док сигнали на  $1365$  и  $1063\text{ cm}^{-1}$  одговарају симетричним истежућим вибрацијама  $-COO^-$  групе.<sup>304</sup> Сигнали на  $1315$ ,  $1211$  и  $1130\text{ cm}^{-1}$  одговарају истежућим вибрацијама  $C-O$  групе ( $\nu(C-O)$ ),<sup>303</sup> док сигнал на  $1014\text{ cm}^{-1}$  одговара деформационој вибрацији карбоксилне групе ( $\delta(O-CO-H)$ ).  $C=C$  истежућим вибрацијама ароматичног прстена,  $\nu(C=C)$ , одговарају сигнали на  $1508$  и  $1456\text{ cm}^{-1}$ . Јака трака на  $1404\text{ cm}^{-1}$  одговара апсорпцији бипиридина<sup>305</sup> и вибрацији  $C-H$  ( $\nu_s$ ) 4-моносултитуисаног пиридина<sup>306</sup>.



Слика 3.15. FTIR спектар комплекса (1) и НКС (2).

Неколико значајних промена у вибрационом спектру комплекса је примећено након његовог везивања за површину НЧ  $TiO_2$ . Смањење интензитета сигнала на  $1700$  и  $1543\text{ cm}^{-1}$  представљало је јасан показатељ интеракције карбоксилне групе са НЧ  $TiO_2$ . Прецизније, то што нису све  $C=O$  групе искоришћене за интеракцију са НЧ  $TiO_2$  представља потврду о монодентатном типу везивања комплекса за површину НЧ  $TiO_2$ . Такође је смањење интензитета сигнала на  $1315$  и  $1211\text{ cm}^{-1}$ , као и потпуни нестанак сигнала  $\nu(C-O)$  на  $1130\text{ cm}^{-1}$  у FTIR спектру комплекса након везивања за површину НЧ, указује на комплетно искоришћење  $C-O$  група за монодентатну координацију комплекса за површину НЧ  $TiO_2$ . Формирање НКС је такође подржано појавом новог сигнала на  $1375\text{ cm}^{-1}$ <sup>306</sup> Током везивања је такође примећено и ширење сигнала на  $1603\text{ cm}^{-1}$ , који одговара асиметричној истежућој вибрацији карбоксилне групе  $\nu_{as}(-COO^-)$ .



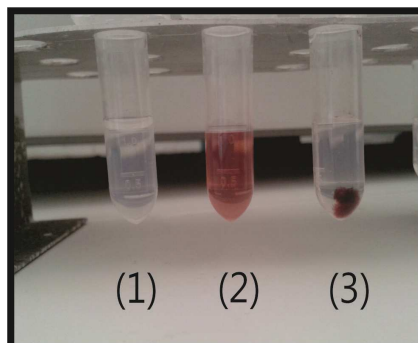
Ако се у обзир узму и литературни подаци, где је „bridging“ везивање (Слика 3.13.) карбоксилне групе за површину НЧ  $\text{TiO}_2$  обично праћено комплетним нестанком сигнала на  $1603 \text{ cm}^{-1}$  у вибрационом спектру, што није био случај у нашем узорку, додатно се може искључити овај тип везивања.<sup>184</sup>

Као критеријум за одређивање типа везивања, може се користити и разлика у таласним бројевима између асиметричних и симетричних вибрација сигнала у слободном (невезаном) стању и након везивања за површину НЧ. Уколико је разлика између асиметричних и симетричних вибрација карбоксилне групе у везаном стању мања него у слободном (невезаном) стању, онда је тип везивања бидентатна хелација или „bridging“ везивање. С друге стране, уколико је разлика већа или једнака од оне у слободном стању, онда је тип везивања монодентатни.<sup>303,307</sup> Вођени овим правилом, узимајући у обзир незнатну разлику између таласних бројева асиметричних и симетричних вибрација слободног комплекса и комплекса након везивања за површину НЧ  $\text{TiO}_2$  (формирање НКС) закључено је да се највероватније ради о монодентатном типу везивања, као што је илустровано на слици 3.13.

Рендгенска фотоелектронска спектроскопија (XPS) је такође примењена у циљу додатне потврде везивања комплекса и НЧ, односно формирања НКС. Добијени спектри и њихова детаљна анализа описани су у оквиру научног рада који улази у састав ове докторске дисертације.<sup>244</sup> Добијени резултати су додатно потврдили везивање између комплекса и НЧ тј. промену окружења карбоксилних група из лиганда комплекса, као и да је половина кисеоникових атома из карбоксилних група везана за површину НЧ  $\text{TiO}_2$ .

У наредном експерименту, одређена је ефикасност везивања комплекса за носач седиментационим есејем, као што је већ раније описано у литератури.<sup>232</sup> На Слици 3.16. приказана је фотографија епендорфица с узорцима НЧ (1), комплекса (2) и НКС (3) након центрифугирања. НЧ  $\text{TiO}_2$  формирају беличаст талог на дну (Слика 3.16., (1)), док се слободни комплекс не таложи при истим условима (Слика 3.16., (2)). У епендорфици са НКС, након центрифугирања видљив је црвени талог (Слика 3.1.6., (3)). Применом седиментационог есеја добијене су вредности за ефикасност заробљавања потенцијалног лека у носачу и ефикасност „пуњења“ носача потенцијалним леком,  $(87.3 \pm 1.5)\%$  и  $(29.1 \pm 2.3)\%$ . Добијене вредности су у складу с

теоретски предвиђеним максималним могућим zasiћењем слободних места на површини  $\text{TiO}_2$ .<sup>243</sup>



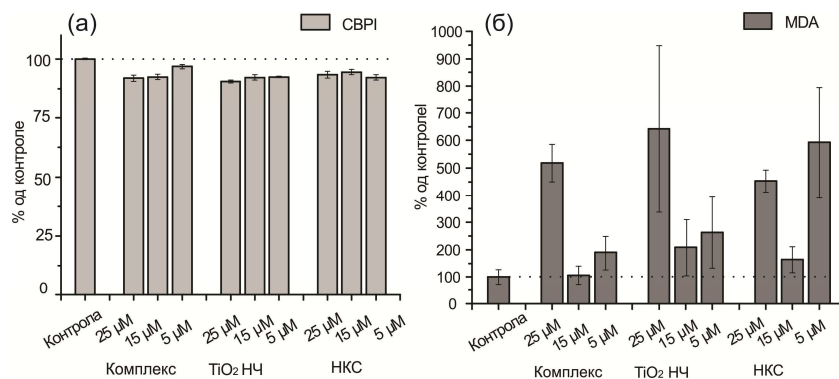
*Слика 3.16. Фотографија епендорфица с узорцима НЧ  $\text{TiO}_2$  (1), комплекса (2) и НКС (3) након центрифугирања, приликом одређивања ефикасности везивања комплекса за носач (НЧ  $\text{TiO}_2$ ) седиментационим есејем.*

### **3.6. Биолошка активност НКС и његових компоненти тестирана на хуманим лимфоцитима; Одређивање СВРП и концентрације MDA**

Као и у случају испитивања биолошке активности комплекса, испитана је и биолошка активност НКС и његових компоненти. За тестирање биолошке активности НКС коришћене су лако доступне ћелије, хумани лимфоцити из крви здравог донора. Као мера активности система и његових компоненти одређени су следећи параметри:

- **Пролиферативни индекс ћелија (СВРП)** чије је значење описано код тестирања активности самог комплекса (Поглавље 3.2.1.). Добијене СВРП експерименталне вредности за различите концентрације НКС и његових компоненти дате су на Слици 3.17.(а). При свим тестираним концентрацијама уочено је статистички значајно смањење у ћелијској пролиферацији што је јасан показатељ да НКС и његове компоненте смањују ћелијску деобу. Значајно је истаћи да поред комплекса, за који је претходно утврђено да је потенцијални цитостатик (Поглавље 3.2.1), и сам носач (НЧ  $\text{TiO}_2$ ) показује цитотоксични ефекат на ћелијама лимфоцита (Слика 3.17.(а)). Цитотоксични ефекат НЧ  $\text{TiO}_2$  тестиран на неколико различитих типова ћелија је доступан и у литературним подацима.<sup>308,309</sup> Дакле, дати резултати потврђују потенцијал

примене НКС система и његових компоненти као анти-пролиферативних агенаса, али и упућују на могућност утицаја читавог система на здраво ткиво и ћелије.



**Слика 3.17.** CBPI и MDA ниво у културама третираним с различитим концентрацијама комплекса, НЧ TiO<sub>2</sub> и НКС у односу на контролу. Сви резултати су приказани као вредност ± SD.

• **Антиоксидативна активност;** Као што је већ поменуто у оквиру Поглавља 1.6.2., главни механизам токсичности НЧ TiO<sub>2</sub> се испољава кроз стварање ROS врста, које оштећују ћелијску мембрану, молекуле протеина и ДНК, и такође утичу на електричну проводљивост ћелије.<sup>310</sup> Са друге стране, већ је експериментално утврђено да испитивани комплекс рутенијума само при већим концентрацијама (25 μM) има способност да индукује стварање слободних радикала који оштећују ћелијску мембрану (Поглавље 3.2.1., резултат је дат и на Слици 3.17. (б) ради поређења). С обзиром да поменуте компоненте НКС имају тенденцију стварања ROS врста под одређеним условима, и сам НКС би требао да има утицај на оксидативни статус ћелије. Као биомаркер оксидативног стреса одређен је ниво MDA у ћелијама након третмана различитим концентрацијама НКС и аналогним концентрацијама његових компоненти, ради поређења. Резултат је дат на Слици 3.17. (б) с које се уочава повећан ниво MDA у ћелијама третираним с највећом концентрацијом комплекса, највећом концентрацијом НЧ TiO<sub>2</sub> и НКС, али такође и с најнижом концентрацијом НКС. Добијени резултати упућују да се потенцијал НКС у убијању ћелија највероватније одвија преко механизма који укључује стварање ROS које оштећују ћелијску мембрану. Међутим, НКС и НЧ TiO<sub>2</sub> највероватније покрећу различите механизме ћелијске одбране за разлику од комплекса због разлике у самој величини честица. Наиме, претпоставља се да постоје

разлике у месту стварања ROS а самим тим и у месту испољавања токсичног дејства. *Heinlaan* и сарадници су показали да НЧ не морају да уђу у ћелију да би испољиле токсични ефекат, већ да се ROS врсте стварају екстрацелуларно на додирној површини НЧ-ћелија, услед адхезије НЧ на мембрани ћелије.<sup>311</sup> Адхезија агломерисаних НЧ  $\text{TiO}_2$  на мембранама еритроцита је већ детектована скенирајућом електронском микроскопијом (SEM) и описана у литератури.<sup>312</sup> Стога се може претпоставити да на исти начин НКС испољава свој токсични ефекат на ћелијској мембрани, док би сам комплекс, с обзиром на своје много мање димензије, требао да уђе у ћелију и оствари своје токсично дејство унутар ћелије било кроз интеракцију с циљним биомолекулима или интрацелуларно кроз стварање ROS. Но, с обзиром на методолошка ограничења, ова претпоставка није могла бити и доказана, тако да локализација наночестица и НКС у ћелијама остаје отворено питање.

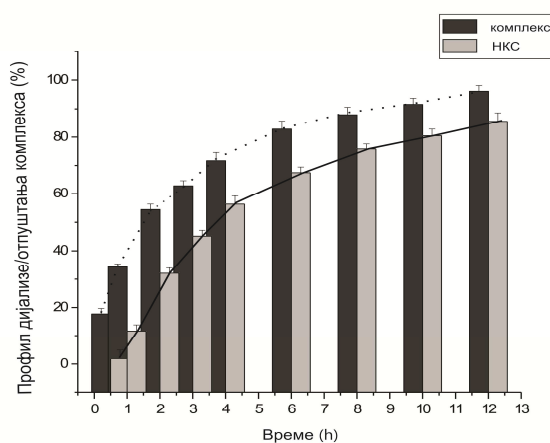
### **3.7. Кинетика отпуштања комплекса с површине носача (НЧ $\text{TiO}_2$ ) стимулирана светлошћу**

Носачи за лекове осетљиви на дејство светлости се све више изучавају с обзиром на бројне предности у односу на конвенционалну терапију и примену система носач/лек који се активирају на другачији начин. Системи који се активирају светлошћу пружају могућност манипулације отпуштањем лека с носача подешавањем таласне дужине и јачине светлости, и омогућавају бољу контролу дозирања лека, самим тим и већу ефикасност терапије.<sup>140</sup>

Обе компоненте НКС су фотоактивна једињења, као што је дискутовано у Поглављу 3.4.2. Наночестице  $\text{TiO}_2$  апсорбују у UV, док комплекс апсорбује у UV и Vis области. Самим тим, било је потребно проверити да ли се светлост различитих таласних дужина може користити за манипулацију брзином отпуштања комплекса с површине носача. За испитивања су коришћени извори светлости на три таласне дужине: зелена (532 nm), црвена (632,8 nm) и UVC (254 nm).

Експерименти отпуштања комплекса с површине су рађени као што је већ описано у литератури.<sup>232</sup> Најпре је одређен профил отпуштања комплекса с носача без озрачивања у односу на профил дифузије слободног комплекса кроз дијализациону мембрану, Слика 3.18. С графика се може уочити да се у првих 4 h с носача ослободи

нешто више од 50% комплекса, док више од 70% слободног комплекса прође кроз дијализациону мембрану у истом временском интервалу. Поређењем профила отпуштања уочава се да НКС испољава благи ефекат задржавања комплекса као и контролисаније отпуштање све до 12 h у поређењу с дифузијом слободног комплекса кроз мембрану. Овај ефекат је индикатор потенцијала НКС за константно отпуштање лека током времена што представља и предност у дозирању лека у клиничкој пракси.<sup>313</sup> Комплекс садржи карбоксилне групе које се везују за површину НЧ  $\text{TiO}_2$  комплексацијом за  $\text{Ti}^{4+}$ , као што је доказано помоћу FTIR спектроскопије (Слика 3.15.). За овакве системе је карактеристично да под базним и јако киселим условима десорбују комплекс с површине НЧ  $\text{TiO}_2$ , па се отпуштање комплекса с површине НЧ  $\text{TiO}_2$  у PBS (pH 7.5) без озрачивања светлошћу може објаснити повећањем броја депротонисаних карбоксилних група комплекса чије присуство доводи до одбијања од негативно наелектрисане површине НЧ  $\text{TiO}_2$ .<sup>314</sup>



*Слика 3.18. Поређење профила дијализе слободног комплекса и профила отпуштања комплекса из НКС.*

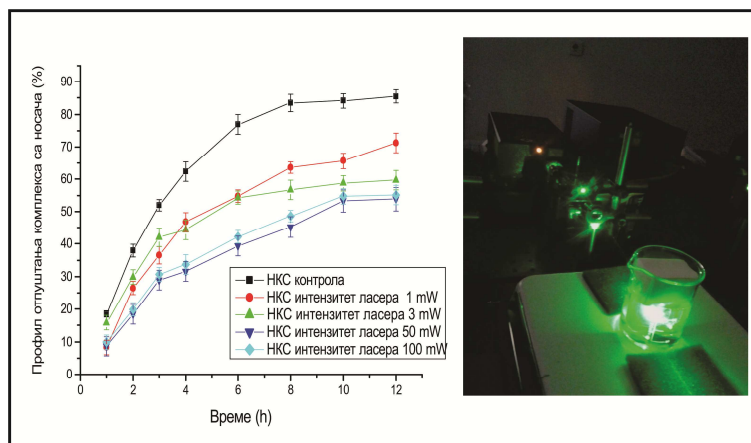
### 3.7.1. Утицај видљиве светлости на кинетику отпуштања комплекса с површине носача (НЧ $\text{TiO}_2$ )

Коришћени рутенијумов комплекс апсорбује зрачење у видљивом делу спектра што отвара потенцијалну могућност да се утиче на његове везивне карактеристике за површину НЧ  $\text{TiO}_2$  користећи ласер који емитује светлост управо у овој области. Ради провере хипотезе, НКС је озрачиван употребом ласера који емитују зелену (532 nm) и

црвену (632,8 nm) светлост а резултати су поређени с неозраченим системом ради контроле.

### 3.7.1.1. Утицај зелене светлости на кинетику отпуштања комплекса с површине носача (НЧ TiO<sub>2</sub>)

Профили отпуштања комплекса под утицајем зелене светлости, различитог интензитета, дати су на Слици 3.19. С датог графика се уочава да озрачивање НКС резултује у споријем отпуштању комплекса у поређењу с неозраченим системом при свим примењеним интензитетима ласера, али да је отпуштање истовремено зависно од примењеног интензитета ласера. НКС озрачен зеленим ласерским снопом достиже максимално отпуштање комплекса, од око 50%, након 12 h. За исти временски интервал, 85% слободног комплекса прође кроз дијализациону мембрану у случају неозраченог НКС. Такође је уочено да повећање интензитета ласера с 3 на 50 mW, доводи до значајног повећања у задржавању комплекса на површини НЧ TiO<sub>2</sub>, док повећања с 1 на 3 mW, и с 50 на 100 mW не доводи до значајних разлика у профили задржавања комплекса (Слика 3.19.).

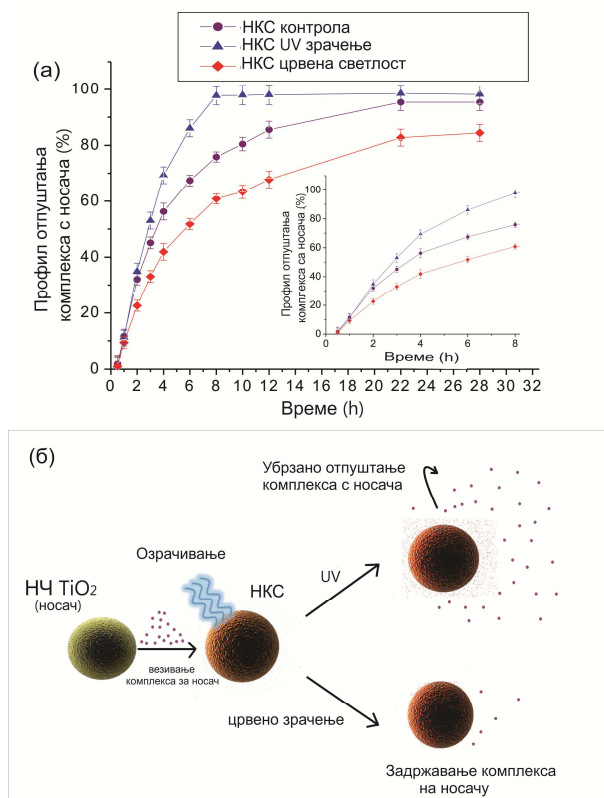


**Слика 3.19.** Поређење профила отпуштања комплекса у случају неозраченог НКС (контрола) и НКС озраченог снопом светлости зеленог ласера. Примењени интензитети ласера су назначени на графику. Експериментални услови за контролу и озрачене узорке су били исти и извођени су на собној температури. Фотографија експерименталне поставке дата је с десне стране слике.

Описани ефекат се преписује карактеристикама рутенијумовог комплекса, с обзиром да  $\text{TiO}_2$  не може да апсорбује светлост из видљивог спектра. С тога се могло претпоставити да комплекс подлеже одговарајућим структурним променама након озрачивања, што даље резултује повећаним афинитетом за везивање за површину НЧ  $\text{TiO}_2$ . Да би се наведено потврдило, снимљен је UV спектар остатка након озрачивања у дијализационој касети. Снимљени спектри су потврдили постојање процеса *cis-trans* изомеризације озраченог комплекса. Процес изомеризације комплекса, детаљна анализа добијених спектра, као и утицај изомеризације комплекса на везивање за површину НЧ  $\text{TiO}_2$  биће дискутовани у наредном поглављу.

### **3.7.1.2. Утицај црвене светлости на кинетику отпуштања комплекса с површине носача (НЧ $\text{TiO}_2$ )**

Након описаног ефекта зелене светлости на профил отпуштања комплекса, изазваног апсорпцијом светлости од стране комплекса и његове структурне промене, испитан је утицај светлости такође из видљиве области коју апсорбује комплекс. Прецизније, црвене светлости таласне дужине 632,8 nm. Резултат је приказан на слици 3.20.(а). У прва два сата се уочава приближно исти иницијални профил отпуштања комплекса у озраченом и неозраченом узорку пре него што брзина отпуштања достигне неки стабилни профил. Овај феномен је познат под називом „напрасно отпуштање“ или „експозивно отпуштање“ (изворно енг. „burst release“),<sup>315</sup> и највероватније је последица дијализе молекула комплекса који су остали неvezани или слабо vezани за површину носача. Након успостављања стабилног профила, НКС озрачен црвеном светлошћу је показао значајно спорије отпуштање комплекса са површине носача, у односу на неозрачену контролу, с максимумом од 80 % који систем достиже након 28 h. Овај резултат је врло сличан резултату претходно добијеном са зеленом светлошћу (претходно поглавље).



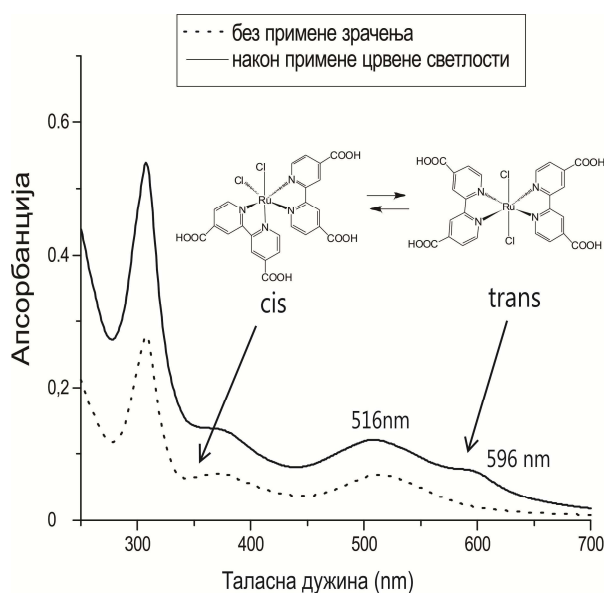
**Слика 3.20.** Поређење профила отпуштања комплекса с носача без, и у присуству UV и црвене светлости (а). Остали експериментални услови за сва три теста су били исти и извођени су на собној температури. Додатак на слици 3.20. (а) представља увеличани регион профила отпуштања комплекса у току првих 8 h ради бољег уочавања разлике. На слици 3.20. (б) дат је сумирано графички приказ могућности манипулације отпуштања комплекса с носача применом UV и црвене светлости.

С обзиром на то да комплекс апсорбује у видљивом региону (апсорпциони максимуми дати у Табели 3.2.), да би се отклонила сумња да задржавање комплекса није последица његове полимеризације изазване озрачивањем видљивом светлошћу изведен је контролни експеримент и то на следећи начин: поређена је брзина дифузије неозраченог и комплекса озраченог видљивом светлошћу (црвеном и зеленом) кроз мембрану за дијализу и при томе добијено да нема разлике између брзине дифузије неозраченог и озраченог комплекса. На основу овог једноставног експеримента, показано је да евентуална полимеризација комплекса није одговорна за задржавање комплекса у мембрани приликом озрачивања узорка, већ су вероватнији други механизми (везивање за површину HЧ TiO<sub>2</sub>).

Могући разлог дужег задржавања комплекса на површини носача приликом озрачивања видљивом светлошћу (црвеном и зеленом) може бити изазван, као што је



већ поменуто у претходном поглављу, променом у структури самог комплекса дејством примењене светлости. Да би се то и показало, снимљени су UV-Vis спектри свих дијализационих раствора (озрачених и контролног неозраченог) као и спектри заосталих раствора у дијализационим касетама након 28 h озрачивања и дијализе. У снимљеним спектрима свих дијализационих раствора није постојала значајна разлика која би указивала на промену структуре комплекса већ само концентрациона разлика, док је у спектрима заосталих раствора у дијализационим касетама након озрачивања уочена значајна разлика. UV-Vis спектри заосталих раствора у дијализационим касетама снимљених након интензивног мешања и центрифугирања су дати на Слици 3.21. На слици се јасно уочава померање MLCT максимума с 516 на 596 nm. Фотоиндуковани процес изомеризације праћен батохромним померањем MLCT траке најниже енергије је описан и раније у литератури и веома је честа појава код многих Ru(II) bis-(bpy) комплекса.<sup>316,317</sup> Поређењем батохромног померања добијеног у спектрима нашег комплекса са литературним подацима других Ru(II) (bpy) комплекса потврђено је да највероватније долази до фотоиндуковане *cis-trans* изомеризације комплекса.



**Слика 3.21.** UV-Vis спектри раствора заосталих у дијализационим касетама након озрачивања NCS с црвеном и зеленом светлошћу снимљени након 28 h дијализе. Спектар заосталог раствора у дијализационој касети након озрачивања UV светлошћу није приказан на графику јер након 28 h дијализе сав комплекс изађе из дијализационе касете, те његова детекција није била могућа. Спектар одговарајућег неозраченог дијализационог раствора је дат за поређење.

С обзиром на то да је контролним експериментом претходно потврђено непостојање разлике у брзини дифузије између раствора озраченог и неозраченог комплекса кроз дијализациону мембрану, јасно је да *cis-trans* изомеризациони процес комплекса не доводи до задржавања самог комплекса у дијализацијоној касети. Међутим, с друге стране, фотоиндукована *cis-trans* изомеризација комплекса видљивом светлошћу може утицати на његову везивну ефикасност за површину носача (НЧ  $\text{TiO}_2$ ) фаворизујући притом везивање новонасталог *trans* изомера наспрам отпуштања мање ефикасно везаног изворног *cis* изомера. Ово објашњава резултате експеримената који показују задржавање комплекса на носачу након озрачивања црвеном и зеленом светлошћу.

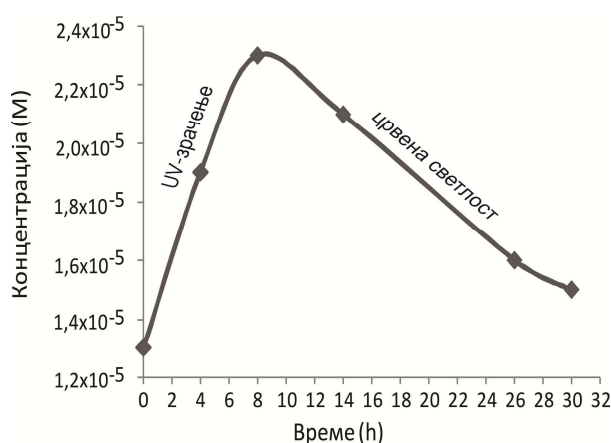
### **3.7.2. Утицај UV светлости на кинетику отпуштања комплекса са површине носача (НЧ $\text{TiO}_2$ )**

С обзиром на то да НЧ  $\text{TiO}_2$  апсорбују у UV области, у наредном делу експеримената, испитиван је утицај ове светлости на кинетику отпуштања комплекса с површине  $\text{TiO}_2$ . За ова испитивања, коришћена је лампа која емитује светлост таласне дужине 254 nm, и испитан је на профил отпуштања комплекса, изазван апсорпцијом светлости од стране носача (НЧ  $\text{TiO}_2$ ).

Приликом примене UV зрачења, у току првих 8 h, скоро 100 % комплекса се отпусти с НКС (Слика 3.20.(a)) па се може рећи да UV зрачење доводи до повећавања брзине отпуштања комплекса тј. да има стимулативно дејство у поређењу с профилем отпуштања неозраченог НКС. *Zuleta* и сарадници су недавно уочили премештања хемисорбоване боје (N719) на  $\text{TiO}_2$  анатас површини (101) коју индукује бела светлост.<sup>318</sup> Овакво молекулско премештање хемисорбоване боје, која поседује двоструке везе, на површини  $\text{TiO}_2$  резултује у торзионалном премештању и нерадијативној емисији. Узимајући то у обзир, разлог ефикасније десорпције комплекса с површине НЧ  $\text{TiO}_2$  након озрачивања UV светлошћу може бити последица симултаног ефекта благо базних услова (одбијање претежно негативно наелектрисаних карбоксилних група комплекса и негативно наелектрисана површина НЧ  $\text{TiO}_2$ , као што је већ претходно дискутовано) и преуређења комплекса на површини НЧ  $\text{TiO}_2$  праћено десорпцијом.

### 3.7.3. Комбиновани утицај UV и видљиве светлости на НКС

Сумирани резултати добијене кинетике отпуштања комплекса с површине НКС без озрачивања и уз озрачивање видљивом и UV светлошћу су приказани на Слици 3.20. (а), док је читав процес и утицај светлости на њега приказан на Слици 3.20.(б). Утицај светлости на профил отпуштања се може описати као стимулативни ефекат UV светлости и ефекат задржавања комплекса изазван применом видљиве светлости, што се из профила отпуштања јасно уочава. Ова теза је дата и у поједностављеној, графичкој форми на Слици 3.20.(б). Следеће питање које се наметало било је да ли светлост изазива иреверзибилне промене у структури комплекса које би даље утицале на везивну моћ комплекса за површину носача. У циљу разјашњавања, постављен је једноставан експеримент у коме је раствор НКС третиран тако што је наизменично озрачен UV и црвеним зрачењем. Концентрација ослобођеног комплекса је одређена UV-Vis спектроскопијом а резултат је дат на Слици 3.22. На основу добијених резултата јасно је да се количина слободног комплекса смањује с временом када се зрачење промени с UV на црвено, тј. да комплекс задржава своју везивну способност за површину носача након стимулисаног отпуштања дејством UV зрачења. Овим експериментом је још једном потврђено да је могуће манипулисати отпуштањем комплекса дејством светлости, те појачати или смањити отпуштање комплекса зависно од терапијских захтева.

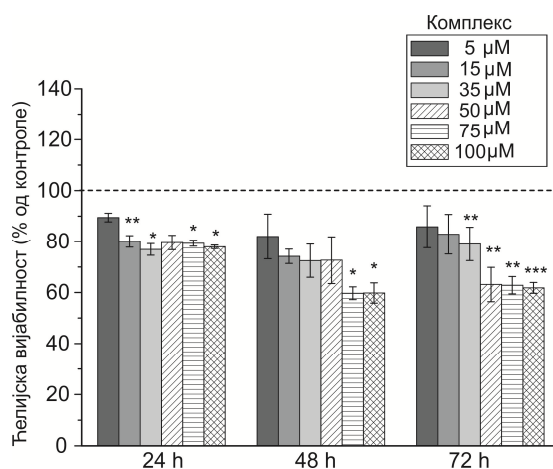


**Слика 3.22.** Концентрација комплекса праћена током циклуса наизменичног озрачивања UV и Vis (црвеним) зрачењем у функцији времена.

### 3.8. Цитотоксична активност НКС и његових компоненти

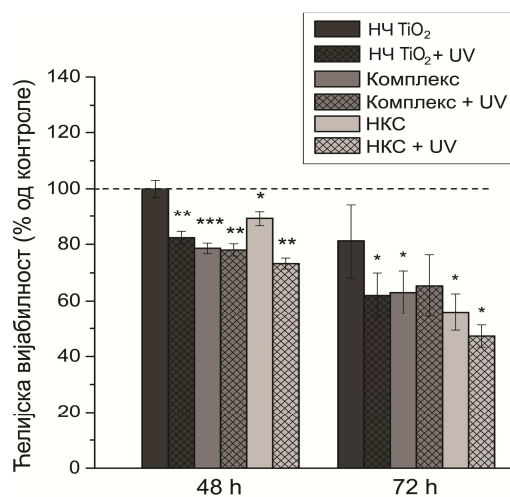
С обзиром да је претходно доказано да НКС и комплекс имају потенцијал као антипролиферативни и генотоксични агенси, да сам комплекс показује активност на меланомској туморској линији и да постоји могућност манипулације НКС дејством светлости, у следећој фази експеримената тестиран је потенцијал НКС и његових компоненти у убијању туморске линије меланома без и у присуству UV, као и црвене светлости. Хумана линија меланома је одабрана за тестирање јер је потенцијално терапеутски активна компонента НКС тј. комплекс, претходно показао потенцијал у уништавању ове туморске линије.

Тестирана је антитуморска активност НКС и његових компоненти без озрачивања, и то на амеланотичкој ћелијској линији. Првенствено је одређена концентрација комплекса као и тачно време инкубације неопходно за најефикасније убијање меланомских ћелија. Стопа преживелих меланомских ћелија (вијабилност) након третмана различитим концентрацијама комплекса и различитим инкубационим временима дата је на Слици 3.23. На основу приказаног графика јасно је да је најефикаснија концентрација комплекса у убијању меланомске линије 50  $\mu\text{M}$  и да комплекс показује наизраженији цитотоксични ефекат након 48 и 72 h сата инкубације. Даље повећање концентрације комплекса (75  $\mu\text{M}$  и 100  $\mu\text{M}$ ) није доводило до даљег статистички значајног смањења у вијабилности ћелија, у односу на 50  $\mu\text{M}$ . Управо због тога у свим наредним експериментима коришћен је 50  $\mu\text{M}$  комплекс и НКС у ком је 50  $\mu\text{M}$  комплекс везан за површину носача (НЧ  $\text{TiO}_2$ ).



**Слика 3.23.** Концентрационо зависни ефекат комплекса на вијабилност хумане меланомске линије одређиван у три временске тачке (24, 48 и 72 h).

Анитуморска активност НКС и његових компоненти без озрачивања у функцији инкубационог времена (48 и 72 h) је дата на Слици 3.24. НЧ  $\text{TiO}_2$  не показују цитотоксични ефекат након 48 h инкубације, а након 72 h цитотоксични ефекат је благо изражен (у просеку 90% преживелих ћелија), што потврђује његову биокомпатибилност у одсуству зрачења. Овај резултат је очекиван јер, као што је већ поменуто у литератури,  $\text{TiO}_2$  представља биомиметички материјал за различите ћелијске типове.<sup>319–321</sup> НКС је показао мању цитотоксичност него комплекс након 48 h, док након 72 h цитотоксичност оба, НКС и комплекса, достиже исту вредност (око 60%). Цитотоксичност НКС се оволико повећава с временом инкубирања највероватније због спонтаног ослобађања комплекса с површине носача током времена, а достиже исту вредност као комплекс када се сав комплекс ослободи с површине носача (након 72 h).



**Слика 3.24.** Вијабилност ћелија меланома након третмана с НКС и његовим компонентама без и у присуству десетоминутног UV озрачивања одређена у две временске тачке (48 и 72h)

### 3.8.1. Фото-цитотоксична активност НКС и његових компоненти

Фото-цитотоксична активност НКС и његових компоненти изазвана UV и црвеним зрачењем је испитана и поређена с цитотоксичним ефектом добијеним без зрачења. Пре ових експеримента, изведен је контролни експеримент у циљу утврђивања услова озрачивања (време и интензитет зрачења) који не утичу на ћелијску вијабилност. Успостављање ових услова је врло битно због елиминације могућности утицаја саме

светлости на промену вијабилности ћелија и због јасног диференцирања ефекта НКС или његових компоненти. У ту сврху варирани су интензитети светлости, као и време излагања ћелија зрачењу. Утврђено је да десетоминутно излагање ћелија меланома UV или црвеном зрачењу јачине 0,06 mW не доводи до никакве промене у ћелијској вијабилности тј. да примењени услови не делују ни стимулативно нити цитотоксично на туморску линију, те су ти услови коришћени у даљим експериментима.

### **3.8.1.1. Фото-цитотоксична активност НКС и његових компоненти дејством UV зрачења**

Резултати испитивања фото-цитотоксичне активности НКС и његових компоненти изазваних десетоминутним UV зрачењем су дати такође на Слици 3.24. Након примењеног UV зрачења уочено је значајно смањење степена преживљавања тј. ћелијске вијабилности у културама третираним с НЧ TiO<sub>2</sub> у поређењу са његовом непостојећом, односно веома ниском цитотоксичношћу добијеном третманом без зрачења након 48 и 72 h. Овај резултат се лако може објаснити чињеницом да TiO<sub>2</sub> показује изразиту фотоактивност када се озрачи UV зрачењем. Као што је претходно детаљно описано у Поглављу 1.6.2., након фотоексцитације TiO<sub>2</sub> долази до стварања ROS у ћелијама што за последицу има њихово оштећење и смрт.<sup>163</sup> Стога се може рећи да су добијени резултати у сагласности с претходно добијеним литературним подацима који декларишу TiO<sub>2</sub> за ефикасан ФСМ у убијању туморских ћелија.<sup>220,227,322–325</sup>

Цитотоксичност самог комплекса се није разликовала много без, и с примењеним UV зрачењем након 48 и 72 h. Овај резултат указује да комплекс не подлеже процесу фотостимулације под примењеним експерименталним условима на начин на који је то описано за неке друге рутенијумове комплексе с полипиридил<sup>236–238</sup>, порфиринским<sup>239</sup> и аренским лигандима<sup>240</sup>, већ поменути у оквиру Поглавља 1.6.5. Неки од њих су показали бољу ефикасност у уништавању туморских ћелија након озрачивања што је у случају тестираног комплекса озраченог UV зрачењем изостало. Међутим, добијени резултат с друге стране још једном потвђује да не долази до процеса фотодеградације комплекса под примењеним условима зрачења. Деградација би директно утицала на цитотоксичну способност комплекса смањујући је, што би се огледало повећањем

вијабилности туморских ћелија у узорку третираном комплексом и UV зрачењем у односу на добијену вијабилност с неозраченим комплексом.

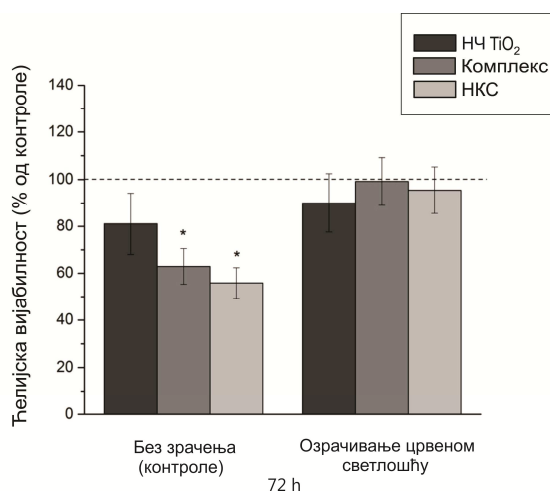
Након примене UV зрачења, значајно смањење у вијабилности туморских ћелија је примећено у ћелијским културама третираним са НКС у поређењу с неозраченим аналогом, након 48 и 72 h. Међутим, ефекат је израженији након 48 h највероватније јер је још увек у том тренутку одређена количина комплекса заостала везана за носач, па долази до подстицања његовог отпуштања с носача дејством UV зрачења. Да након 72 h нема више везаног комплекса за носач, говори у прилог иста цитотоксичност НКС и комплекса у неозраченим културама. Стога се смањење вијабилности меланомских ћелија након 72 h третмана НКС и озрачивања UV светлошћу у односу на неозрачени аналог може једино објаснити цитотоксичним доприносом носача (TiO<sub>2</sub> НЧ) индукованим UV зрачењем.

Сумарно, фото-цитотоксична активност НКС стимулирана UV зрачењем се може објаснити удруженим тј. синергистичким ефектом следећа два ефекта: стимулираним отпуштањем комплекса с површине носача и индукованом цитотоксичношћу носача UV зрачењем. Једноставније, UV озрачивање НКС повећава цитотоксични ефекат НКС јер убрзава отпуштање лека (комплекса) с носача с једне стране, а с друге активира носач да се понаша као ФСМ тј. активира процесе стварање ROS.

### **3.8.1.2. Фото-цитотоксична активност НКС и његових компоненти дејством црвене светлости**

Као што је већ показано у претходном *in vitro* експерименту, Слика 3.20., озрачивање НКС црвеном светлошћу утиче на профил отпуштања комплекса тако што доводи до продуженог задржавања комплекса на површини носача. Због оваквог понашања система очекивала би се повећана вијабилност ћелија при третману и озрачивању црвеном светлошћу ћелијске културе НКС у поређењу са неозраченим аналогом. На Слици 3.25. дати су експериментални резултати фото-цитотоксичне активности НКС и његових компоненти индуковане озрачивањем црвеном светлошћу у поређењу с контролним неозраченим аналозима. С графика се уочава да комплекс не показује цитотоксичност на меланомским ћелијама када се озрачи црвеном светлошћу за разлику од његовог неозраченог аналога с израженим цитотоксичним дејством. Овакво

понашање комплекса приликом озрачивања црвеном светлошћу може бити објашњено изомеризационим процесом којем комплекс подлеже. У претходном поглављу је показано да комплекс подлеже процесу изомеризације притом прелазећи из свог изворног *cis*-облика у *trans*-облик (видети Сliku 3.21.) који, судећи према добијеним резултатима није активан против испитиване линије хуманог меланома. Овакво понашање није неуобичајено. Узмимо за пример комплекс диаминдихлоридоплатина(II). *cis*-изомер овог комплекса, познатији као циспатина, и данас је најчешће коришћени цитостатик у клиничкој пракси, док његов *trans*-изомер не показује антитуморску активност.<sup>326</sup> Смањена туморска активност комплекса, при примењеном зрачењу црвеном светлошћу, такође искључује његов потенцијал као ФСМ јер ФСМ зрачење активира што није био случај при примењеним експерименталним условима на комплекс.



**Слика 3.25.** Вијабилност ћелија меланома након 72 h инкубације с HCS и његовим компонентама. Третман је праћен десетоминутним озрачивањем с црвеним ласером. Вијабилност третираних ћелија без озрачивања је дата на истом графику ради поређења.

Такође, HCS не показује цитотоксичност када се примени озрачивање црвеном светлошћу. Овакво понашање HCS је и очекивано, с обзиром да је у претходном поглављу показано да *cis-trans* изомеризација проузрокована озрачивањем црвеном светлошћу утиче на ефикасност везивања комплекса за носач фаворизујући притом везивање на супрот отпуштања комплекса с носача. Стога се може претпоставити да задржавање комплекса, и то у антитуморски неактивном *trans*-облику, на површини носача узроковано црвеном светлошћу спречава HCS да у потпуности испољи своју антитуморску активност.



## Закључак

На основу добијених резултата у оквиру ове дисертације може се закључити да је успешно формиран и тестиран нанокмпозитни систем базиран на честицама  $\text{TiO}_2$  и комплексу  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  који има потенцијал за фото-сензитивно контролисано отпуштање медикамената базираним на комплексима прелазних метала. Брзину отпуштања медикамента, као и цитотоксичност ћелија меланома било је могуће контролисати осветљавањем система светлошћу различитих таласних дужина-видљива светлост је смањивала, док је UV светлост подстицала ослобађање комплекса с површине НКС. На основу добијених резултата може се претпоставити да се механизам цитостатичног дејства овог система, који се испољава под дејством UV светлости, не испољава само путем стварања ROS од стране  $\text{TiO}_2$  носача, већ је највероватније у питању комбиновани ефекат с повишеном концентрацијом ослобођеног лека с носача у ћелијама.

Осим овога, појединачни закључци су:

- Резултати масене спектрометрије, FTIR и Uv -Vis спектрометрије су потврдили успешну синтезу  $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$  комплекса с мултифункционалним групама способним за везивање за носач и интеракцију с биомолекулима чија је активност потврђена кроз интеракцију с биолошки значајним биомолекулима (PLA<sub>2</sub>, BSA и GSH), на хуманим лимфоцитима и на амеланотичној хуманој линији меланома.
- Тестирање комплекса на хуманим лимфоцитима је потврдило потенцијал примене комплекса као генотоксичног и цитотоксичног агенса при концентрацијама већим од 25  $\mu\text{M}$ , као и да механизам у мањој мери укључује утицај комплекса на оксидативни статус ћелије. Међутим, с обзиром на то да је тест рађен на здравим ћелијама тј. лимфоцитима здравог донора, истиче се потреба да се комплекс активира тек када доспе у туморско ткиво.
- Комплекс показује антитуморску активност на линији A375, амеланотичној линији хуманог меланома, која је у позитивној корелацији с временом инкубирања и концентрацијом комплекса (број преживелих туморских ћелија се смањује с повећањем времена инкубирања и концентрацијом комплекса). У

случају туморских ћелија грлића материце, HeLa линије, антитуморска активност комплекса је изостала.

- Комплекс се везује за све тестиране биомолекуле и то следећим афинитетом:  $PLA_2 > BSA > GSH$ . Наведени поредак би могао имати погодности у потенцијалној терапији с обзиром да је афинитет највећи према молекулу  $PLA_2$  који је потенцијална мета за цитостатике, а најмањи према молекулу  $GSH$  који се сматра инактиватором лека и узрочником резистенције.
- Честице  $TiO_2$ , синтетисане у својству носача за потенцијални лек тј. комплекс, су приближно сферног облика, просечне величине 5 nm, одговарају анатас кристалној форми и фотоактивне су у UV области.
- Комплекс  $[RuCl_2(bpy)_2]Cl$ , као и његов аналог с карбоксилним групама  $[RuCl_2(dcbpy)_2]$ , су такође фотоактивна једињења у UV области што је потврђено LDI TOF масеном спектрометријом. SALDI приступом, уз употребу НЧ  $TiO_2$ , потврђено је да је за интеракцију између комплекса и наночестица неопходно присуство карбоксилне групе на бипиридинском лиганду и да се НЧ  $TiO_2$  могу искористити за активирање, односно, десорпцију и јонизацију узорка комплекса.
- MALDI TOF масеном спектрометријом, FTIR и XPS спектроскопијом је потврђено везивање  $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$  комплекса за носач (НЧ  $TiO_2$ ), односно формирање НКС, и то са ефикасношћу везивања  $(87.3 \pm 1.5)\%$ , односно  $(29.1 \pm 2.3)\%$  што одговара приближно теоријски предвиђеним максималним вредностима.
- Тестирање НКС на хуманим лимфоцитима потврдило је значајно смањење у ћелијској пролиферацији тј. да НКС делује тако што смањује ћелијску деобу и да се потенцијал НКС у убијању ћелија највероватније одвија преко механизма који укључује стварање ROS које оштећују ћелијску мембрану. Због методолошких ограничења локализација наночестица и НКС у ћелијама остаје отворено питање.
- Кинетичким испитивањима профила отпуштања комплекса с носача је утврђено да се комплекс дуже задржава на носачу, као његово контролисаније отпуштање с носача у поређењу с дифузијом слободног комплекса кроз мембрану. Константан профил отпуштања лека с носача током времена представља предност приликом дозирања лека у клиничкој пракси.

- Озрачивање НКС зрачењем из видљивог дела спектра, црвеним и зеленим, доводи до пролонгираног отпуштања комплекса с носача у односу на неозрачени аналог. Дуже задржавање комплекса на носачу је последица изомеризационог процеса коме комплекс подлеже, прелазећи притом из свог изворног *cis* облика у *trans* облик који се боље везује за носач. Сам процес је завистан од интензитета примењеног зрачења.
- Примењено UV зрачење на НКС доводи до стимулације отпуштања комплекса с носача у поређењу с неозраченим аналогом.
- Комбиновани утицај UV и видљиве светлости на НКС се може описати као стимулативни ефекат UV светлости и ефекат задржавања комплекса изазван применом видљиве светлости. Утврђено је да комплекс задржава своју везивну способност за површину носача након стимулисаног отпуштања дејством UV зрачења.
- UV зрачење не утиче на активност комплекса против меланомске ћелијске линије, чиме се искључује деградација комплекса, али и понашање комплекса као ФСМ које би подразумевало његову активацију и повећање антитуморске активности након примењених услова зрачења.
- Црвено зрачење утиче на активност комплекса против меланомске ћелијске линије смањујући је, што је највероватније последица изомеризационог процеса којем комплекс подлеже прелазећи из свог антитуморски активног, изворног *cis* изомера, у неактивни *trans* изомер.
- Ни црвено ни UV зрачење не доводе до активације комплекса, која подразумева побољшање његове антитуморске способности против тестиране линије меланома, чиме се искључују његова ФСМ својства. Односно комплекс се при примењеним условима понаша као класични цитостатик а не као ФСМ.
- Црвено зрачење не утиче на антитуморску активност НЧ TiO<sub>2</sub>, док UV утиче тако што смањује број преживелих туморских ћелија након третмана НЧ TiO<sub>2</sub> и озрачивања. Побољшање или активација антитуморских карактеристика система након озрачивања је карактеристика ФСМ што НЧ TiO<sub>2</sub> дефинитивно јесу у UV области.
- НКС не показује цитотоксичност када се примени озрачивање црвеном светлошћу, с једне стране због пролонгираног отпуштања комплекса с носача, а с друге због изомеризације комплекса у *trans* облик који је неактиван на

тестираној меланомској линији. Тако би сврха озрачивања система зрачењем из видљивог спектра било смањење брзине отпуштања комплекса све док систем не дође до циљног туморског ткива. Оваквим приступом би се смањили негативни споредни ефекти на здраво ткиво.

- UV озрачивање НКС повећава цитотоксични ефекат НКС. Ефекат се објашњава двојаким процесима које активира UV зрачење. Убрзавањем отпуштања комплекса с носача с једне стране, а с друге активацијом носача (НЧ  $\text{TiO}_2$ ) да се понаша као ФСМ тј. активира процесе стварање ROS. Иронично, показано је да се зрачење које се иначе сматра примарним узроком настанка меланома, може користити за активацију система који се користи у терапеутске сврхе за редуkcију раста меланомског ткива.
- Показано је, како кинетичким тако и *in vitro* испитивањима на амеланотичној меланомској линији, да је примењеним зрачењем могућа манипулација НКС у смислу успоравања, односно стимулације ослобађања потенцијалног лека у зависности од терапеутских потреба. Сама могућност контроле концентрације лека пружа могућност контролисанијег дозирања, ефикасније терапије и смањења негативних ефеката на здраво ткиво.

## Литература

1. A. Coates, S. Abraham, S. B. Kaye, T. Sowerbutts, C. Frewin, R. M. Fox and M. H. Tattersall, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 1983, **19**, 203–208.
2. K. B. Sutradhar and M. L. Amin, Nanotechnology in Cancer Drug Delivery and Selective Targeting, *ISRN Nanotechnol.*, 2014, **2014**, 1-12.
3. M. Links and R. Brown, *Expert Rev. Mol. Med.*, 1999, **1999**, 1–21.
4. C. A. Rabik and M. E. Dolan, *Cancer Treat. Rev.*, 2007, **33**, 9–23.
5. M. Galanski, *Recent Patents Anticancer Drug Discov.*, 2006, **1**, 285–295.
6. V. Brabec and J. Kasparkova, *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.*, 2005, **8**, 131–146.
7. T. Torigoe, H. Izumi, H. Ishiguchi, Y. Yoshida, M. Tanabe, T. Yoshida, T. Igarashi, I. Niina, T. Wakasugi, T. Imaizumi, Y. Momii, M. Kuwano and K. Kohno, *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, 2005, **5**, 15–27.
8. D. Matei, F. Fang, C. Shen, J. Schilder, A. Arnold, Y. Zeng, W. A. Berry, T. Huang and K. P. Nephew, *Cancer Res.*, 2012, **72**, 2197–2205.
9. S. Vouillamoz-Lorenz, T. Buclin, F. Lejeune, J. Bauer, S. Leyvraz and L. A. Decosterd, *Anticancer Res.*, 2003, **23**, 2757–2765.
10. P. Müller, B. Schröder, J. A. Parkinson, N. A. Kratochwil, R. A. Coxall, A. Parkin, S. Parsons and P. J. Sadler, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 2003, **42**, 335–339.
11. K. R. Barnes, A. Kutikov and S. J. Lippard, *Chem. Biol.*, 2004, **11**, 557–564.
12. P. Di Blasi, A. Bernareggi, G. Beggiolin, L. Piazzoni, E. Menta and M. L. Formento, *Anticancer Res.*, 1998, **18**, 3113–3117.
13. T. C. Johnstone, K. Suntharalingam and S. J. Lippard, *Philos. Transact. A Math. Phys. Eng. Sci.*, 2015, **373**, 1-12.
14. E. S. Antonarakis and A. Emadi, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2010, **66**, 1–9.
15. M. J. Clarke, F. Zhu and D. R. Frasca, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2511–2534.
16. P. Schluga, C. G. Hartinger, A. Egger, E. Reisner, M. Galanski, M. A. Jakupec and B. K. Keppler, *Dalton Trans.*, 2006, **14**, 1796–1802.
17. C. S. Allardyce and P. J. Dyson, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 3201–3209.
18. A. Levina, J. B. Aitken, Y. Y. Gwee, Z. J. Lim, M. Liu, A. M. Singharay, P. F. Wong and P. A. Lay, *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, 2013, **19**, 3609–3619.
19. F. Kratz and L. Messori, *J. Inorg. Biochem.*, 1993, **49**, 79–82.
20. A. K. Bytzek, K. Boeck, G. Hermann, S. Hann, B. K. Keppler, C. G. Hartinger and G. Koellensperger, *Metallomics*, 2011, **3**, 1049–1055.
21. M. Sulyok, S. Hann, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, G. Stingeder and G. Koellensperger, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, **20**, 856–863.
22. N. Cacita and S. Nikolaou, *J. Lumin.*, 2016, **169**, 115–120.
23. J. Sun, Y. Huang, C. Zheng, Y. Zhou, Y. Liu and J. Liu, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2015, **163**, 266–274.
24. L. Trynda-Lemiesz, *Acta Biochim. Pol.*, 2004, **51**, 199–205.
25. A. Casini, C. Gabbiani, F. Sorrentino, M. P. Rigobello, A. Bindoli, T. J. Geldbach, A. Marrone, N. Re, C. G. Hartinger, P. J. Dyson and L. Messori, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 6773–6781.
26. J. Maksimoska, L. Feng, K. Harms, C. Yi, J. Kissil, R. Marmorstein and E. Meggers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 15764–15765.
27. N. A. Vyas, S. S. Bhat, A. S. Kumbhar, U. B. Sonawane, V. Jani, R. R. Joshi, S. N. Ramteke, P. P. Kulkarni and B. Joshi, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **75**, 375–381.
28. T. Kamčeva, J. Flemmig, B. Damnjanović, J. Arnhold, A. Mijatović and M. Petković, *Met. Integr. Biometal Sci.*, 2011, **3**, 1056–1063.

29. T. Kamčeva, M. Radisavljević, I. Vukićević, J. Arnhold and M. Petković, *Chem. Biodivers.*, 2013, **10**, 1972–1986.
30. J. M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J. H. Beijnen and J. H. M. Schellens, *Clin. Cancer Res.*, 2004, **10**, 3717–3727.
31. G. Sava, S. Pacor, G. Mestroni and E. Alessio, *Clin. Exp. Metastasis*, 1992, **10**, 273–280.
32. G. Sava, I. Capozzi, K. Clerici, G. Gagliardi, E. Alessio and G. Mestroni, *Clin. Exp. Metastasis*, 1998, **16**, 371–379.
33. G. Sava, R. Gagliardi, A. Bergamo, E. Alessio and G. Mestroni, *Anticancer Res.*, 1999, **19**, 969–972.
34. M. Ravera, S. Baracco, C. Cassino, D. Colangelo, G. Bagni, G. Sava and D. Osella, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 984–990.
35. I. Khalaila, A. Bergamo, F. Bussy, G. Sava and P. J. Dyson, *Int. J. Oncol.*, 2006, **29**, 261–268.
36. L. Messori, P. Orioli, D. Vullo, E. Alessio and E. Iengo, *Eur. J. Biochem.*, 2000, **267**, 1206–1213.
37. F. Frausin, M. Cocchietto, A. Bergamo, V. Scarcia, A. Furlani and G. Sava, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2002, **50**, 405–411.
38. F. Kratz, M. Hartmann, B. Keppler and L. Messori, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 2581–2588.
39. B. K. Keppler, M. Henn, U. M. Juhl, M. R. Berger, R. Niebl and F. E. Wagner, in *Ruthenium and Other Non-Platinum Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1989, pp. 41–69.
40. S. Kapitza, M. Pongratz, M. A. Jakupec, P. Heffeter, W. Berger, L. Lackinger, B. K. Keppler and B. Marian, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2005, **131**, 101–110.
41. C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas and B. K. Keppler, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, **100**, 891–904.
42. C. G. Hartinger, S. Hann, G. Koellensperger, M. Sulyok, M. Groessl, A. R. Timerbaev, A. V. Rudnev, G. Stinger and B. K. Keppler, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 2005, **43**, 583–585.
43. J. Malina, O. Novakova, B. K. Keppler, E. Alessio and V. Brabec, *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.*, 2001, **6**, 435–445.
44. M. A. Jakupec, V. B. Arion, S. Kapitza, E. Reisner, A. Eichinger, M. Pongratz, B. Marian, N. Graf von Keyserlingk and B. K. Keppler, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, 2005, **43**, 595–596.
45. C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurency, T. J. Geldbach, G. Sava and P. J. Dyson, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 4161–4171.
46. M. V. Babak, S. M. Meier, K. V. M. Huber, J. Reynisson, A. A. Legin, M. A. Jakupec, A. Roller, A. Stukalov, M. Gridling, K. L. Bennett, J. Colinge, W. Berger, P. J. Dyson, G. Superti-Furga, B. K. Keppler and C. G. Hartinger, *Chem. Sci.*, 2015, **6**, 2449–2456.
47. A. Weiss, X. Ding, J. R. van Beijnum, I. Wong, T. J. Wong, R. H. Berndsen, O. Dormond, M. Dallinga, L. Shen, R. O. Schlingemann, R. Pili, C.-M. Ho, P. J. Dyson, H. van den Bergh, A. W. Griffioen and P. Nowak-Sliwinska, *Angiogenesis*, 2015, **18**, 233–244.
48. U. Ndagi, N. Mhlongo and M. E. Soliman, *Drug Des. Devel. Ther.*, 2017, **11**, 599–616.
49. X. Meng, M. L. Leyva, M. Jenny, I. Gross, S. Benosman, B. Fricker, S. Harlepp, P. Hébraud, A. Boos, P. Wlosik, P. Bischoff, C. Sirlin, M. Pfeffer, J.-P. Loeffler and C. Gaiddon, *Cancer Res.*, 2009, **69**, 5458–5466.
50. G. Tiwari, R. Tiwari, B. Sriwastawa, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey and S. K. Bannerjee, *Int. J. Pharm. Investig.*, 2012, **2**, 2–11.
51. B. L. Cushing, V. L. Kolesnichenko and C. J. O'Connor, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 3893–3946.
52. T. A. Taton, *Trends Biotechnol.*, 2002, **20**, 277–279.
53. E. Katz and I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 2004, **43**, 6042–6108.
54. A. N. Shipway, E. Katz and I. Willner, *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.*, 2000, **1**, 18–52.
55. P. Bhattacharya, D. Du and Y. Lin, *J. R. Soc. Interface*, 2014, **11**, 1–14.
56. M. E. Grigore, *J. Med. Res. Health Educ.*, 2017, **1**, 1–8.
57. J. J. Giner-Casares, M. Henriksen-Lacey, M. Coronado-Puchau and L. M. Liz-Marzán, *Mater. Today*, 2016, **19**, 19–28.

58. G. M. Whitesides, *Small Weinh. Bergstr. Ger.*, 2005, **1**, 172–179.
59. G. Bozzuto and A. Molinari, *Int. J. Nanomedicine*, 2015, **10**, 975–999.
60. P. Panta, D. Y. Kim, J. S. Kwon, A. R. Son, K. W. Lee and M. S. Kim, *J. Biomed. Sci. Eng.*, 2014, **7**, 825–832.
61. N. Larson and H. Ghandehari, *Chem. Mater. Publ. Am. Chem. Soc.*, 2012, **24**, 840–853.
62. K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. G. Chen and D. M. Shin, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, 2008, **14**, 1310–1316.
63. L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S. Y. Wu, A. K. Sood and S. Hua, *Front. Pharmacol.*, 2015, **6**, 286–292.
64. P. Mroz, G. P. Tegos, H. Gali, T. Wharton, T. Sarna and M. R. Hamblin, in *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, Springer, Dordrecht, 2008, pp. 79–106.
65. F. Beuerle, R. Lebovitz and A. Hirsch, in *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, Springer, Dordrecht, 2008, pp. 51–78.
66. J. Zhu, Z. Ji, J. Wang, R. Sun, X. Zhang, Y. Gao, H. Sun, Y. Liu, Z. Wang, A. Li, J. Ma, T. Wang, G. Jia and Y. Gu, *Small Weinh. Bergstr. Ger.*, 2008, **4**, 1168–1175.
67. S. H. Friedman, D. L. DeCamp, R. P. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl and G. L. Kenyon, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 6506–6509.
68. R. D. Bolskar, in *Encyclopedia of Nanotechnology*, Springer, Dordrecht, 2016, pp. 1267–1281.
69. T. Y. Zakharian, A. Seryshev, B. Sitharaman, B. E. Gilbert, V. Knight and L. J. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 12508–12509.
70. T. Yamashita, K. Yamashita, H. Nabeshi, T. Yoshikawa, Y. Yoshioka, S. Tsunoda and Y. Tsutsumi, *Materials*, 2012, **5**, 350–363.
71. J. W. Rasmussen, E. Martinez, P. Louka and D. G. Wingett, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2010, **7**, 1063–1077.
72. M. P. Vinardell and M. Mitjans, *Nanomater. Basel Switz.*, 2015, **5**, 1004–1021.
73. M. Liong, J. Lu, M. Kovochich, T. Xia, S. G. Ruehm, A. E. Nel, F. Tamanoi and J. I. Zink, *ACS Nano*, 2008, **2**, 889–896.
74. W. J. Gradishar, S. Tjulandin, N. Davidson, H. Shaw, N. Desai, P. Bhar, M. Hawkins and J. O’Shaughnessy, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2005, **23**, 7794–7803.
75. M. R. Green, G. M. Manikhas, S. Orlov, B. Afanasyev, A. M. Makhson, P. Bhar and M. J. Hawkins, *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, 2006, **17**, 1263–1268.
76. D. W. Nyman, K. J. Campbell, E. Hersh, K. Long, K. Richardson, V. Trieu, N. Desai, M. J. Hawkins and D. D. Von Hoff, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2005, **23**, 7785–7793.
77. P. Sabbatini, C. Aghajanian, D. Dizon, S. Anderson, J. Dupont, J. V. Brown, W. A. Peters, A. Jacobs, A. Mehdi, S. Rivkin, A. J. Eisenfeld and D. Spriggs, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2004, **22**, 4523–4531.
78. R. Bhatt, P. de Vries, J. Tulinsky, G. Bellamy, B. Baker, J. W. Singer and P. Klein, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 190–193.
79. R. Duncan, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2003, **2**, 347–360.
80. P. A. Vasey, S. B. Kaye, R. Morrison, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, A. H. Thomson, L. S. Murray, T. E. Hilditch, T. Murray, S. Burtles, D. Fraier, E. Frigerio and J. Cassidy, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, 1999, **5**, 83–94.
81. T.-Y. Kim, D.-W. Kim, J.-Y. Chung, S. G. Shin, S.-C. Kim, D. S. Heo, N. K. Kim and Y.-J. Bang, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, 2004, **10**, 3708–3716.
82. B. M. Blunden, A. Rawal, H. Lu and M. H. Stenzel, *Macromolecules*, 2014, **47**, 1646–1655.
83. M. Lu, F. Chen, J.-M. Noy, H. Lu and M. H. Stenzel, *Macromol. Biosci.*, 2017, **17**, DOI: 10.1002/mabi.201600513 DOI:10.1002/mabi.201600513.
84. M. Markman, *Expert Opin. Pharmacother.*, 2006, **7**, 1469–1474.
85. E. Rosenthal, I. Poizot-Martin, T. Saint-Marc, J.-P. Spano, P. Cacoub and DNX Study Group, *Am. J. Clin. Oncol.*, 2002, **25**, 57–59.

86. T. Boulikas, *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2009, **18**, 1197–1218.
87. G. P. Stathopoulos, T. Boulikas, A. Kourvetaris and J. Stathopoulos, *Anticancer Res.*, 2006, **26**, 1489–1493.
88. J. Wu, Q. Liu and R. J. Lee, *Int. J. Pharm.*, 2006, **316**, 148–153.
89. X.-J. Liang, H. Meng, Y. Wang, H. He, J. Meng, J. Lu, P. C. Wang, Y. Zhao, X. Gao, B. Sun, C. Chen, G. Xing, D. Shen, M. M. Gottesman, Y. Wu, J. Yin and L. Jia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, **107**, 7449–7454.
90. M. Prato, K. Kostarelos and A. Bianco, *Acc. Chem. Res.*, 2008, **41**, 60–68.
91. J. Li, S. Q. Yap, C. F. Chin, Q. Tian, S. L. Yoong, G. Pastorin and W. H. Ang, *Chem. Sci.*, 2012, **3**, 2083–2087.
92. S. Dhar, Z. Liu, J. Thomale, H. Dai and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 11467–11476.
93. R. P. Feazell, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 8438–8439.
94. C. R. Patra, R. Bhattacharya, E. Wang, A. Katarya, J. S. Lau, S. Dutta, M. Muders, S. Wang, S. A. Buhrow, S. L. Safgren, M. J. Yaszemski, J. M. Reid, M. M. Ames, P. Mukherjee and D. Mukhopadhyay, *Cancer Res.*, 2008, **68**, 1970–1978.
95. R. Arvizo, R. Bhattacharya and P. Mukherjee, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2010, **7**, 753–763.
96. Y. Min, C.-Q. Mao, S. Chen, G. Ma, J. Wang and Y. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 2012, **51**, 6742–6747.
97. S. Dhar, W. L. Daniel, D. A. Giljohann, C. A. Mirkin and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 14652–14653.
98. F. Wang, Y.-C. Wang, S. Dou, M.-H. Xiong, T.-M. Sun and J. Wang, *ACS Nano*, 2011, **5**, 3679–3692.
99. K. Zabielska-Koczywaś, I. Dolka, M. Król, A. Żbikowski, W. Lewandowski, J. Mieczkowski, M. Wójcik and R. Lechowski, *Mol. Basel Switz.*, 2017, **22**, DOI:10.3390/molecules22020253.
100. F. M. Kievit, F. Y. Wang, C. Fang, H. Mok, K. Wang, J. R. Silber, R. G. Ellenbogen and M. Zhang, *J. Controlled Release*, 2011, **152**, 76–83.
101. K. Cheng, S. Peng, C. Xu and S. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 10637–10644.
102. D. Guo, C. Wu, H. Jiang, Q. Li, X. Wang and B. Chen, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2008, **93**, 119–126.
103. S. Hackenberg, A. Scherzed, W. Harnisch, K. Froelich, C. Ginzkey, C. Koehler, R. Hagen and N. Kleinsasser, *J. Photochem. Photobiol. B*, 2012, **114**, 87–93.
104. Q. Fu, D. Hargrove and X. Lu, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, 2016, **12**, 1951–1959.
105. P. Nigam P, D. Sarkar, *J Chem Applied Biochem.*, 2015, **2**, 110-117.
106. B. Ahn, J. Park, K. Singha, H. Park and W. J. Kim, *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 2829–2836.
107. H. He, H. Xiao, H. Kuang, Z. Xie, X. Chen, X. Jing and Y. Huang, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2014, **117**, 75–81.
108. G. Pillai and M. L. Ceballos-Coronel, *SAGE Open Med.*, 2013, **1**, 1-17.
109. P. Sood, K. B. Thurmond, J. E. Jacob, L. K. Waller, G. O. Silva, D. R. Stewart and D. P. Nowotnik, *Bioconjug. Chem.*, 2006, **17**, 1270–1279.
110. J. R. Rice, J. L. Gerberich, D. P. Nowotnik and S. B. Howell, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, 2006, **12**, 2248–2254.
111. H. Cabral, N. Nishiyama and K. Kataoka, *J. Controlled Release*, 2007, **121**, 146–155.
112. H. Cabral, N. Nishiyama, S. Okazaki, H. Koyama and K. Kataoka, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, 2005, **101**, 223–232.
113. M. Murakami, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Wu, M. R. Kano, T. Yamori, N. Nishiyama and K. Kataoka, *Sci. Transl. Med.*, 2011, **3**, 64ra2.
114. T. Kapp, A. Dullin and R. Gust, *Bioconjug. Chem.*, 2010, **21**, 328–337.
115. B. A. Howell and D. Fan, *Proc. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.*, 2010, **466**, 1515–1526.
116. V. K. Yellepeddi, A. Kumar, D. M. Maher, S. C. Chauhan, K. K. Vangara and S. Palakurthi, *Anticancer Res.*, 2011, **31**, 897–906.



117. I. Haririan, M. S. Alavidjeh, M. R. Khorramizadeh, M. S. Ardestani, Z. Z. Ghane and H. Namazi, *Int. J. Nanomedicine*, 2010, **5**, 63–75.
118. B. Fischer, P. Heffeter, K. Kryeziu, L. Gille, S. M. Meier, W. Berger, C. R. Kowol and B. K. Keppler, *Dalton Trans. Camb. Engl.* 2003, 2014, **43**, 1096–1104.
119. Z. Hang, M. A. Cooper and Z. M. Ziora, *Biochem. Compd.*, 2016, **4**, 1-10.
120. A. J. Wagstaff, S. D. Brown, M. R. Holden, G. E. Craig, J. A. Plumb, R. E. Brown, N. Schreiter, W. Chrzanowski and N. J. Wheate, *Inorganica Chim. Acta*, 2012, **393**, 328–333.
121. S. D. Brown, P. Nativo, J.-A. Smith, D. Stirling, P. R. Edwards, B. Venugopal, D. J. Flint, J. A. Plumb, D. Graham and N. J. Wheate, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 4678–4684.
122. Z. Cheng, Y. Dai, X. Kang, C. Li, S. Huang, H. Lian, Z. Hou, P. Ma and J. Lin, *Biomaterials*, 2014, **35**, 6359–6368.
123. C. Xu, B. Wang and S. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 4216–4217.
124. P. Khadka, J. Ro, H. Kim, I. Kim, J. T. Kim, H. Kim, J. M. Cho, G. Yun and J. Lee, *Asian J. Pharm. Sci.*, 2014, **9**, 304–316.
125. R. Singh and J. W. Lillard, *Exp. Mol. Pathol.*, 2009, **86**, 215–223.
126. C. Ding, L. Tong, J. Feng and J. Fu, *Mol. Basel Switz.*, , DOI:10.3390/molecules21121715.
127. J. Yao, J. Feng and J. Chen, *Asian J. Pharm. Sci.*, 2016, **11**, 585–595.
128. V. Torchilin, *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV*, 2009, **71**, 431–444.
129. M. G. Vander Heiden, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2011, **10**, 671–684.
130. J. W. Wojtkowiak, D. Verduzco, K. J. Schramm and R. J. Gillies, *Mol. Pharm.*, 2011, **8**, 2032–2038.
131. L. Zhu and V. P. Torchilin, *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro*, 2013, **5**, 96-107.
132. B. Shen, Y. Ma, S. Yu and C. Ji, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2016, **8**, 24502–24508.
133. L. Deng, J. Ren, J. Li, J. Leng, Y. Qu, C. Lin and D. Shi, *Nanoscale*, 2015, **7**, 9655–9663.
134. K.-J. Chen, H.-F. Liang, H.-L. Chen, Y. Wang, P.-Y. Cheng, H.-L. Liu, Y. Xia and H.-W. Sung, *ACS Nano*, 2013, **7**, 438–446.
135. W. Li, X. Cai, C. Kim, G. Sun, Y. Zhang, R. Deng, M. Yang, J. Chen, S. Achilefu, L. V. Wang and Y. Xia, *Nanoscale*, 2011, **3**, 1724–1730.
136. W. G. Pitt, G. A. Hussein and B. J. Staples, *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2004, **1**, 37–56.
137. A. Schroeder, R. Honen, K. Turjeman, A. Gabizon, J. Kost and Y. Barenholz, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, 2009, **137**, 63–68.
138. D. Yoo, J.-H. Lee, T.-H. Shin and J. Cheon, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 863–874.
139. J.-H. Lee, K.-J. Chen, S.-H. Noh, M. A. Garcia, H. Wang, W.-Y. Lin, H. Jeong, B. J. Kong, D. B. Stout, J. Cheon and H.-R. Tseng, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 2013, **52**, 4384–4388.
140. R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X.-H. Hu, C. J. Childs and C. H. Sibata, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2004, **1**, 27–42.
141. S. K. Sharma, P. Mroz, T. Dai, Y.-Y. Huang, T. G. St. Denis and M. R. Hamblin, *Isr. J. Chem.*, 2012, **52**, 691–705.
142. P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson and J. Golab, *CA. Cancer J. Clin.*, 2011, **61**, 250–281.
143. C. S. Foote, *Photochem. Photobiol.*, 1991, **54**, 659.
144. M. Ochsner, *J. Photochem. Photobiol. B*, 1997, **39**, 1–18.
145. E. R. Stadtman and R. L. Levine, *Amino Acids*, 2003, **25**, 207–218.
146. C. A. Rice-Evans, in *New Comprehensive Biochemistry*, eds. C. A. Rice-Evans and R. H. Burdon, Elsevier, 1994, vol. 28, pp. 131–153.
147. M. Dizdaroglu, *Methods Enzymol.*, 1994, **234**, 3–16.
148. N. Fomina, J. Sankaranarayanan and A. Almutairi, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, **64**, 1005–1020.
149. K. Kano, Y. Tanaka, T. Ogawa, M. Shimomura, Y. Okahata and T. Kunitake, *Chem. Lett.*, 1980, 421–424.
150. R. H. Bisby, C. Mead and C. G. Morgan, *FEBS Lett.*, 1999, **463**, 165–168.

151. R. H. Bisby, C. Mead and C. G. Morgan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, **276**, 169–173.
152. R. H. Bisby, C. Mead and C. G. Morgan, *Photochem. Photobiol.*, 2000, **72**, 57–61.
153. A. Yavlovich, A. Singh, R. Blumenthal and A. Puri, *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, **1808**, 117–126.
154. D. Shi, M. Matsusaki and M. Akashi, *Macromol. Biosci.*, 2009, **9**, 248–255.
155. A. W. Girotti, *Photochem. Photobiol.*, 1990, **51**, 497–509.
156. V. C. Anderson and D. H. Thompson, *Biochim. Biophys. Acta*, 1992, **1109**, 33–42.
157. B. L. Horecker, *J. Biol. Chem.*, 1943, **148**, 173–183.
158. J. V. Frangioni, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, **7**, 626–634.
159. C. Ash, M. Dubec, K. Donne and T. Bashford, *Lasers Med. Sci.*, 2017, **32**, 1909–1918.
160. B. W. Pogue, L. Lilge, M. S. Patterson, B. C. Wilson and T. Hasan, *Appl. Opt.*, 1997, **36**, 7257–7269.
161. Z. Huang, *Technol. Cancer Res. Treat.*, 2005, **4**, 283–293.
162. S. Bhattacharyya, R. A. Kudgus, R. Bhattacharya and P. Mukherjee, *Pharm. Res.*, 2011, **28**, 237–259.
163. H. Zhang, Y. Shan and L. Dong, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2014, **10**, 1450–1457.
164. X. Jiang, N. Zhu, D. Zhao and Y. Ma, *Sci. China Chem.*, 2016, **59**, 40–52.
165. S. I. Klink, H. Keizer, H. W. Hofstraat and F. C. J. M. van Veggel, *Synth. Met.*, 2002, **127**, 213–216.
166. H. Abrahamse and M. R. Hamblin, *Biochem. J.*, 2016, **473**, 347–364.
167. E. Brun, F. Barreau, G. Veronesi, B. Fayard, S. Sorieul, C. Chanéac, C. Carapito, T. Rabilloud, A. Mabondzo, N. Herlin-Boime and M. Carrière, *Part. Fibre Toxicol.*, 2014, **11**, 13.
168. S. Middlemas, Z. Z. Fang and P. Fan, *Hydrometallurgy*, 2013, **131–132**, 107–113.
169. C. Garzella, E. Comini, E. Tempesti, C. Frigeri and G. Sberveglieri, *Sens. Actuators B Chem.*, 2000, **68**, 189–196.
170. A. Mills, R. H. Davies and D. Worsley, *Chem. Soc. Rev.*, 1993, **22**, 417–425.
171. B. O'Regan and M. Grätzel, *Nature*, 1991, **353**, 737–740.
172. N. Serpone, D. Dondi and A. Albini, *Inorganica Chim. Acta*, 2007, **360**, 794–802.
173. Y. Paz, Z. Luo, L. Rabenberg and A. Heller, *J. Mater. Res.*, 1995, **10**, 2842–2848.
174. R. Cai, K. Hashimoto, K. Itoh, Y. Kubota and A. Fujishima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1991, **64**, 1268–1273.
175. J. E. Ellingsen, *Biomaterials*, 1991, **12**, 593–596.
176. F. U. Rehman, C. Zhao, H. Jiang and X. Wang, *Biomater. Sci.*, 2015, **4**, 40–54.
177. K. A. Davis, *J. Chem. Educ.*, 1982, **59**, 158.
178. A. Sclafani and J. M. Herrmann, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 13655–13661.
179. U. Diebold, *Surf. Sci. Rep.*, 2003, **48**, 53–229.
180. I. A. Janković, Z. V. Šaponjić, M. I. Čomor and J. M. Nedeljković, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 12645–12652.
181. N. M. Dimitrijević, Z. V. Šaponjić, D. M. Bartels, M. C. Thurnauer, D. M. Tiede and T. Rajh, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 7368–7375.
182. L. X. Chen, T. Rajh, W. Jäger, J. Nedeljković and M. C. Thurnauer, *J. Synchrotron Rad.*, 1999, **6**, 445–447.
183. Z. V. Šaponjić, N. M. Dimitrijević, D. M. Tiede, A. J. Goshe, X. Zuo, L. X. Chen, A. S. Barnard, P. Zapol, L. Curtiss and T. Rajh, *Adv. Mater.*, 2005, **17**, 965–971.
184. T. Rajh, J. Nedeljković, L. X. Chen, D. M. Tiede and M. C. Thurnauer, *J. Adv. Oxid. Technol.*, 2017, **3**, 292–298.
185. T. Rajh, A. E. Ostafin, O. I. Mičić, D. M. Tiede and M. C. Thurnauer, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 4538–4545.
186. J. Moser, S. Punehewa, P. P. Infelta and M. Grätzel, *Langmuir*, 1991, **7**, 3012–3018.
187. P. Z. Araujo, P. J. Morando and M. A. Blesa, *Langmuir*, 2005, **21**, 3470–3474.
188. K. Wada, C. S. K. Ranasinghe, R. Kuriki, A. Yamakata, O. Ishitani and K. Maeda, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, **9**, 23869–23877.
189. J. Feng, P. Yang, S. Wang and J. Wang, *J. Electroanal. Chem.*, 2012, **674**, 97–102.

190. K. Kalyanasundaram and M. Grätzel, *Coord. Chem. Rev.*, 1998, **177**, 347–414.
191. A. A. Grechnikov, V. Georgieva, A. S. Borodkov, S. M. Nikiforov, Z. Raicheva, J. Lazarov and N. Donkov, *J. Phys. Conf. Ser.*, 2014, **558**, 012035.
192. M. Abrahamsson, J. H. J. Hedberg, H.-C. Becker, A. Staniszewski, W. H. Pearson, W. B. Heuer and G. J. Meyer, *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.*, 2014, **15**, 1154–1163.
193. J. He, B. Wang, S. Chang and T. Chen, in *Organometallics and Related Molecules for Energy Conversion*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2015, pp. 91–114.
194. M. Grätzel, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, 2003, **4**, 145–153.
195. M. K. Nazeeruddin, A. Kay, I. Rodicio, R. Humphry-Baker, E. Mueller, P. Liska, N. Vlachopoulos and M. Graetzel, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 6382–6390.
196. M. Grätzel, *Nature*, 2001, **414**, 338–344.
197. A. Mills and S. Le Hunte, *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 1997, **108**, 1–35.
198. O. Carp, C. L. Huisman and A. Reller, *Prog. Solid State Chem.*, 2004, **32**, 33–177.
199. M. K. Kuimova, G. Yahiloglu and P. R. Ogilby, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 332–340.
200. E. Skovsen, J. W. Snyder, J. D. C. Lambert and P. R. Ogilby, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 8570–8573.
201. R. Roots and S. Okada, *Radiat. Res.*, 1975, **64**, 306–320.
202. A.-P. Zhang and Y.-P. Sun, *World J. Gastroenterol. WJG*, 2004, **10**, 3191–3193.
203. D. Daicovicu, A. Filip, R. M. Ion, S. Clichici, N. Decea and A. Muresan, *Folia Biol. (Praha)*, 2011, **57**, 12–19.
204. J. Wang, G. Zhou, C. Chen, H. Yu, T. Wang, Y. Ma, G. Jia, Y. Gao, B. Li, J. Sun, Y. Li, F. Jiao, Y. Zhao and Z. Chai, *Toxicol. Lett.*, 2007, **168**, 176–185.
205. F. Grande and P. Tucci, *Mini Rev. Med. Chem.*, 2016, **16**, 762–769.
206. S. Ronald and D. K. Mills, *J. Funct. Biomater.*, 2016, **7**, 1–15.
207. A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier and J.-P. Benoit, *Biomaterials*, 2006, **27**, 4356–4373.
208. T. J. Brunner, P. Wick, P. Manser, P. Spohn, R. N. Grass, L. K. Limbach, A. Bruinink and W. J. Stark, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, **40**, 4374–4381.
209. P. Thevenot, J. Cho, D. Wavhal, R. B. Timmons and L. Tang, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, 2008, **4**, 226–236.
210. F. Danhier, A. Le Breton and V. Préat, *Mol. Pharm.*, 2012, **9**, 2961–2973.
211. S. Tortorella and T. C. Karagiannis, *J. Membr. Biol.*, 2014, **247**, 291–307.
212. S. Swain, P. K. Sahu, S. Beg and S. M. Babu, *Curr. Drug Deliv.*, 2016, **13**, 1290–1302.
213. R. Jahanban-Esfahlan, K. Seidi, B. Banimohamad-Shotorbani, A. Jahanban-Esfahlan and B. Yousefi, *J. Cell. Physiol.*, 2018, **233**, 2982–2992.
214. N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly and O. C. Farokhzad, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2014, **66**, 2–25.
215. S. S. Linton, S. G. Sherwood, K. C. Drews and M. Kester, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2016, **8**, 208–222.
216. V. P. Torchilin, *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2010, **197**, 3–53.
217. Y. Matsumura and H. Maeda, *Cancer Res.*, 1986, **46**, 6387–6392.
218. K. Stockhofe, J. M. Postema, H. Schieferstein and T. L. Ross, *Pharmaceuticals*, 2014, **7**, 392–418.
219. Z. Li, X. Pan, T. Wang, P.-N. Wang, J.-Y. Chen and L. Mi, *Nanoscale Res. Lett.*, 2013, **8**, 96.
220. S. Yamaguchi, H. Kobayashi, T. Narita, K. Kanehira, S. Sonezaki, Y. Kubota, S. Terasaka and Y. Iwasaki, *Photochem. Photobiol.*, 2010, **86**, 964–971.
221. Y. Kubota, T. Shuin, C. Kawasaki, M. Hosaka, H. Kitamura, R. Cai, H. Sakai, K. Hashimoto and A. Fujishima, *Br. J. Cancer*, 1994, **70**, 1107–1111.
222. K. Huang, L. Chen, J. Xiong and M. Liao, *International Journal of Photoenergy*, 2012, **2012**, 1–9.
223. A. Jańczyk, A. Wolnicka-Głubisz, K. Urbanska, H. Kisch, G. Stochel and W. Macyk, *Free Radic. Biol. Med.*, 2008, **44**, 1120–1130.
224. J. Xu, Y. Sun, J. Huang, C. Chen, G. Liu, Y. Jiang, Y. Zhao and Z. Jiang, *Bioelectrochemistry*, 2007, **71**, 217–222.

225. N. Lagopati, P. V. Kitsiou, A. I. Kontos, P. Venieratos, E. Kotsopoulou, A. G. Kontos, D. D. Dionysiou, S. Pispas, E. C. Tsilibary and P. Falaras, *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 2010, **214**, 215–223.
226. T. Lopez, E. Ortiz, M. Alvarez, J. Navarrete, J. A. Odriozola, F. Martinez-Ortega, E. A. Páez-Mozo, P. Escobar, K. A. Espinoza and I. A. Rivero, *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, 2010, **6**, 777–785.
227. R. Cai, Y. Kubota, T. Shuin, H. Sakai, K. Hashimoto and A. Fujishima, *Cancer Res.*, 1992, **52**, 2346–2348.
228. M. Yin, E. Ju, Z. Chen, Z. Li, J. Ren and X. Qu, *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, 2014, **20**, 14012–14017.
229. T. Wang, H. Jiang, L. Wan, Q. Zhao, T. Jiang, B. Wang and S. Wang, *Acta Biomater.*, 2015, **13**, 354–363.
230. E. Liu, Y. Zhou, Z. Liu, J. Li, D. Zhang, J. Chen and Z. Cai, *J Nanomater.*, 2015, **2015**, 1-8.
231. P. Xu, R. Wang, J. Ouyang and B. Chen, *Nanoscale Res. Lett.*, 2015, **10**, 94.
232. H. Zhang, C. Wang, B. Chen and X. Wang, *Int. J. Nanomedicine*, 2012, **7**, 235–242.
233. T. López, J. Sotelo, J. Navarrete and J. A. Ascencio, *Opt. Mater.*, 2006, **29**, 88–94.
234. M. J. Uddin, D. Mondal, C. A. Morris, T. Lopez, U. Diebold and R. D. Gonzalez, *Appl. Surf. Sci.*, 2011, **257**, 7920–7927.
235. S. C. Boca, M. Four, A. Bonne, B. van der Sanden, S. Astilean, P. L. Baldeck and G. Lemerrier, *Chem. Commun.*, 2009, **30**, 4590–4592.
236. J. Liu, Y. Chen, G. Li, P. Zhang, C. Jin, L. Zeng, L. Ji and H. Chao, *Biomaterials*, 2015, **56**, 140–153.
237. S. M. Cloonan, R. B. P. Elmes, M. Erby, S. A. Bright, F. E. Poynton, D. E. Nolan, S. J. Quinn, T. Gunnlaugsson and D. C. Williams, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 4494–4505.
238. E. Wachter, D. K. Heidary, B. S. Howerton, S. Parkin and E. C. Glazer, *Chem. Commun. Camb. Engl.*, 2012, **48**, 9649–9651.
239. F. Schmitt, P. Govindaswamy, G. Süss-Fink, W. H. Ang, P. J. Dyson, L. Juillerat-Jeanneret and B. Therrien, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 1811–1816.
240. Y. Chen, W. Lei, G. Jiang, Y. Hou, C. Li, B. Zhang, Q. Zhou and X. Wang, *Dalton Trans.*, 2014, **43**, 15375–15384.
241. M. K. Nazeeruddin, S. M. Zakeeruddin, R. Humphry-Baker, M. Jirousek, P. Liska, N. Vlachopoulos, V. Shklover, C.-H. Fischer and M. Grätzel, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 6298–6305.
242. G. Eisenberg, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 1943, **15**, 327–328.
243. L. X. Chen, T. Rajh, Z. Wang and M. C. Thurnauer, *J. Phys. Chem. B*, 1997, **101**, 10688–10697.
244. M. Nešić, J. Žakula, L. Korićanac, M. Stepić, M. Radoičić, I. Popović, Z. Šaponjić and M. Petković, *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 2017, **347**, 55–66.
245. M. Fenech, *Mutat. Res.*, 1993, **285**, 35–44.
246. J. Surrallés, N. Xamena, A. Creus and R. Marcos, *Mutat. Res.*, 1995, **342**, 43–59.
247. O. I. Aruoma, B. Halliwell, M. J. Laughton, G. J. Quinlan and J. M. Gutteridge, *Biochem. J.*, 1989, **258**, 617–620.
248. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265–275.
249. P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney and M. R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990, **82**, 1107–1112.
250. L. Laura and C. María Fernanda, *Adv. Biol. Chem.*, 2012, **2**, 262-267.
251. A. Shah, A. M. Khan, M. Usman, R. Qureshi, M. Siddiq and S. S. Shah, *J. Chil. Chem. Soc.*, 2009, **54**, 134–137.
252. T. D. Savić, Z. V. Šaponjić, M. I. Čomor, J. M. Nedeljković, M. D. Dramićanin, M. G. Nikolić, D. Ž. Veljković, S. D. Zarić and I. A. Janković, *Nanoscale*, 2013, **5**, 7601–7612.
253. B. Spengler, *J. Mass Spectrom.*, 1997, **32**, 1019–1036.
254. O. Schwarz, D. van Loyen, S. Jockusch, N. J. Turro and H. Dürr, *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 2000, **132**, 91–98.

255. D. M. Mogale, *Synthesis of Ruthenium Dye (N3 Dye) from Recycled Ruthenium Trichloride for Application in Dye Sensitized Solar Cells*, Tshwane University of Technology, 2009.
256. S. M. Zakeeruddin, M. K. Nazeeruddin, R. Humphry-Baker and M. Grätzel, *Inorganica Chim. Acta*, 1999, **296**, 250–253.
257. M. M. da S. Paula, C. T. Pich, F. Petronilho, L. B. Drei, M. Rudnicki, M. R. de Oliveira, J. C. F. Moreira, J. A. P. Henriques, C. V. Franco and F. Dal Pizzol, *Redox Rep. Commun. Free Radic. Res.*, 2005, **10**, 139–143.
258. Y.-J. Liu, Z.-H. Liang, Z.-Z. Li, J.-H. Yao and H.-L. Huang, *DNA Cell Biol.*, 2011, **30**, 829–838.
259. Y.-J. Liu, C.-H. Zeng, J.-H. Yao, F.-H. Wu, L.-X. He and H.-L. Huang, *Chem. Biodivers.*, 2010, **7**, 1770–1783.
260. I. Bratsos, S. Jedner, T. Gianferrara and E. Alessio, *Chim. Int. J. Chem.*, 2007, **61**, 692–697.
261. E. S. Antonarakis and A. Emadi, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2010, **66**, 1–9.
262. I. Kostova, *Curr. Med. Chem.*, 2006, **13**, 1085–1107.
263. C.-W. Jiang, H. Chao, X.-L. Hong, H. Li, W.-J. Mei and L.-N. Ji, *Inorg. Chem. Commun.*, 2003, **6**, 773–775.
264. T. Sathiya Kamatchi, N. Chitrapriya, S. K. Kim, F. R. Fronczek and K. Natarajan, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **59**, 253–264.
265. J. Yellol, S. A. Pérez, A. Buceta, G. Yellol, A. Donaire, P. Szumlas, P. J. Bednarski, G. Makhloufi, C. Janiak, A. Espinosa and J. Ruiz, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 7310–7327.
266. Z. Luo, L. Yu, F. Yang, Z. Zhao, B. Yu, H. Lai, K.-H. Wong, S.-M. Ngai, W. Zheng and T. Chen, *Metallomics*, 2014, **6**, 1480–1490.
267. S. Sunder Anchuri, S. Thota, R. Yerra and S. Dhulipala, *Lett. Drug Des. Discov.*, 2012, **9**, 421–425.
268. F. Kratz, P. Senter and H. Steinhagen, *Drug Delivery in Oncology: From Basic Research to Cancer Therapy, 3 Volume Set*, John Wiley & Sons, 2013.
269. B. S. Cummings, J. McHowat and R. G. Schnellmann, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2000, **294**, 793–799.
270. M. Nakanishi and D. W. Rosenberg, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1761**, 1335–1343.
271. M. Cuendet and J. M. Pezzuto, *Drug Metabol. Drug Interact.*, 2000, **17**, 109–157.
272. J. Aoki, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2004, **15**, 477–489.
273. J. P. Laye and J. H. Gill, *Drug Discov. Today*, 2003, **8**, 710–716.
274. V. Magriotti and G. Kokotos, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2010, **20**, 1–18.
275. S. Yamashita, M. Ogawa, K. Sakamoto, T. Abe, H. Arakawa and J. Yamashita, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*, 1994, **228**, 91–99.
276. M. C. Meyer, P. Rastogi, C. S. Beckett and J. McHowat, *Curr. Pharm. Des.*, 2005, **11**, 1301–1312.
277. N. Traverso, R. Ricciarelli, M. Nitti, B. Marengo, A. L. Furfaro, M. A. Pronzato, U. M. Marinari, C. Domenicotti, N. Traverso, R. Ricciarelli, M. Nitti, B. Marengo, A. L. Furfaro, M. A. Pronzato, U. M. Marinari and C. Domenicotti, *Oxidative Med. Cell. Longev.*, 2013, **2013**, 1–10.
278. P. Calvert, K.-S. Yao, T. C. Hamilton and P. J. O'Dwyer, *Chem. Biol. Interact.*, 1998, **111–112**, 213–224.
279. E. Callegher, R. Seraglia, M. Vettore, L. Puricelli, R. Millionsi and P. Tessari, *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*, 2009, **23**, 3837–3842.
280. O. Morinaga and Y. Shoyama, in *Latest research into quality control*, Intech Open, 2012, pp 1–27.
281. X.-Y. Li, T.-H. Li, J.-S. Guo, Y. Wei, X.-B. Jing, X.-S. Chen and Y.-B. Huang, *Biotechnol. Prog.*, 2012, **28**, 856–861.
282. J. Ghuman, P. A. Zunszain, I. Petitpas, A. A. Bhattacharya, M. Otagiri and S. Curry, *J. Mol. Biol.*, 2005, **353**, 38–52.
283. L. Messori, F. G. Vilchez, R. Vilaplana, F. Piccioli, E. Alessio and B. Keppler, *Met.-Based Drugs*, 2000, **7**, 335–342.
284. M. Nišavić, M. Stoiljković, I. Crnolatac, M. Milošević, A. Rilak and R. Masnikosa, *Arab. J. Chem.*, 2018, **11**, 291–304.

285. S. L. Soebbing, *Incorporation of Histidine-Rich Metal-Binding Sites Onto Small Protein Scaffolds: Implications for Imaging, Therapeutics, and Catalysis*, BiblioBazaar, 2012.
286. J. Bertolini, N. Goss and J. Curling, *Production of Plasma Proteins for Therapeutic Use*, John Wiley & Sons, 2012.
287. B. Odenheimer and W. Wolf, *Inorganica Chim. Acta*, 1982, **66**, L41–L43.
288. A. M. Krause-Heuer, W. S. Price and J. R. Aldrich-Wright, *J. Chem. Biol.*, 2012, **5**, 105–113.
289. U. Kragh-Hansen, *Pharmacol. Rev.*, 1981, **33**, 17–53.
290. C. S. H. Domínguez and P. Hernández, *Am. J. Anal. Chem.*, 2013, **04**, 314.
291. M. Radisavljević, T. Kamčeva, Ž. D. Bugarčić and M. Petković, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2013, **28**, 651–660.
292. S. L. Kelley, A. Basu, B. A. Teicher, M. P. Hacker, D. H. Hamer and J. S. Lazo, *Science*, 1988, **241**, 1813–1815.
293. A. K. Godwin, A. Meister, P. J. O’Dwyer, C. S. Huang, T. C. Hamilton and M. E. Anderson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1992, **89**, 3070–3074.
294. M. Kosmulski, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2002, **99**, 255–264.
295. K. Suttiponparnit, J. Jiang, M. Sahu, S. Suvachittanont, T. Charinpanitkul and P. Biswas, *Nanoscale Res Lett*, 2010, **6**, 27.
296. F. Hillenkamp and J. Peter-Katalinić, *Maldi MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*, John Wiley & Sons, 2007.
297. J. Zhang, V. Frankevich, R. Knochenmuss, S. D. Friess and R. Zenobi, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, **14**, 42–50.
298. M. Radisavljević, T. Kamčeva, I. Vukićević, M. Nišavić, M. Milovanović and M. Petković, *Eur. J. Mass Spectrom. Chichester Engl.*, 2013, **19**, 77–89.
299. M. Radisavljević, T. Kamčeva, I. Vukićević, M. Radoičić, Z. Šaponjić and M. Petković, *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*, 2012, **26**, 2041–2050.
300. I. Popović, M. Nešić, M. Nišavić, M. Vranješ, T. Radetić, Z. Šaponjić, R. Masnikosa and M. Petković, *Mater. Lett.*, 2015, **150**, 84–88.
301. I. A. Popović, M. Nešić, M. Vranješ, Z. V. Šaponjić and M. Petkovic, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, **408**, 7481–7490.
302. I. Popović, D. Milovanović, J. Miletić, M. Nešić, M. Vranješ, Z. Šaponjić and M. Petković, *Opt. Quantum Electron.*, 2016, **2**, 1–6.
303. M. K. Nazeeruddin, R. Humphry-Baker, P. Liska and M. Grätzel, *J. Phys. Chem. B*, 2003, **107**, 8981–8987.
304. M. Milošević, M. Radoičić, Z. Šaponjić, T. Nunney, C. Deeks, V. Lazić, M. Mitrić, T. Radetić and M. Radetić, *Cellulose*, 2014, **21**, 3781–3795.
305. E. Bae, W. Choi, J. Park, H. S. Shin, S. B. Kim and J. S. Lee, *J. Phys. Chem. B*, 2004, **108**, 14093–14101.
306. G. Socrates, *Infrared and Raman characteristic group frequencies : tables and charts /*, Wiley, Chichester, 3rd ed., 2001.
307. G. B. Deacon and R. J. Phillips, *Coord. Chem. Rev.*, 1980, **33**, 227–250.
308. M. S. Acar, Z. B. Bulut, A. Ateş, B. Nami, N. Koçak and B. Yıldız, *Hum. Exp. Toxicol.*, 2015, **34**, 74–82.
309. E.-J. Park, J. Yi, K.-H. Chung, D.-Y. Ryu, J. Choi and K. Park, *Toxicol. Lett.*, 2008, **180**, 222–229.
310. K. Hirakawa, M. Mori, M. Yoshida, S. Oikawa and S. Kawanishi, *Free Radic. Res.*, 2004, **38**, 439–447.
311. M. Heinlaan, A. Ivask, I. Blinova, H.-C. Dubourguier and A. Kahru, *Chemosphere*, 2008, **71**, 1308–1316.
312. M. Šimundić, B. Drašler, V. Šuštar, J. Zupanc, R. Štukelj, D. Makovec, D. Erdogmus, H. Hägerstrand, D. Drobne and V. Kralj-Iglič, *BMC Vet. Res.*, 2013, **9**, 1-13.
313. K. Park, *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, 2014, **190**, 3–8.

314. H. K. Wayment-Steele, L. E. Johnson, F. Tian, M. C. Dixon, L. Benz and M. S. Johal, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2014, **6**, 9093–9099.
315. X. Huang and C. S. Brazel, *J. Controlled Release*, 2001, **73**, 121–136.
316. J. L. Walsh and B. Durham, *Inorg. Chem.*, 1982, **21**, 329–332.
317. S. M. Zakeeruddin, M. K. Nazeeruddin, R. Humphry-Baker and M. Grätzel, *Inorganica Chim. Acta*, 1999, **1**, 250–253.
318. M. Zuleta, T. Edvinsson, S. Yu, S. Ahmadi, G. Boschloo, M. Göthelid and A. Hagfeldt, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 10780–10788.
319. R. Carbone, I. Marangi, A. Zanardi, L. Giorgetti, E. Chierici, G. Berlanda, A. Podestà, F. Fiorentini, G. Bongiorno, P. Piseri, P. G. Pelicci and P. Milani, *Biomaterials*, 2006, **27**, 3221–3229.
320. J. Park, S. Bauer, P. Schmuki and K. von der Mark, *Nano Lett.*, 2009, **9**, 3157–3164.
321. E. Gongadze, D. Kabaso, S. Bauer, T. Slivnik, P. Schmuki, U. van Rienen and A. Iglič, *Int. J. Nanomedicine*, 2011, **6**, 1801–1816.
322. N. Lagopati, E.-P. Tsilibary, P. Falaras, P. Papazafiri, E. A. Pavlatou, E. Kotsopoulou and P. Kitsiou, *Int. J. Nanomedicine*, 2014, **9**, 3219–3230.
323. N. Huang, X. Min-hua, C. Yuan and Y. Rui-rong, *J. Photochem. Photobiol. Chem.*, 1997, **108**, 229–233.
324. D. Flak, E. Coy, G. Nowaczyk, L. Yate and S. Jurga, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 85139–85152.
325. M. Xu, N. Huang, Z. Xiao and Z. Lu, *Supramol. Sci.*, 1998, **5**, 449–451.
326. M. Coluccia and G. Natile, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2007, **7**, 111–123.

## БИОГРАФИЈА



Маја Нешић (девојачко Радисављевић) рођена је 22. маја 1984. године у Сарајеву, Република Босна и Херцеговина. Основну школу и средњу медицинску школу завршила је у Београду. Школске 2003/2004 уписала је Хемијски факултет, Универзитета у Београду. Студије је завршила са укупном просечном оценом 8,20 и оценом 10 на дипломском испиту. Мастер студије на Хемијском факултету, Универзитета у Београду, уписала је школске 2010/2011 и стекла звање дипломирани хемичар-мастер 29.12.2011. године одбраном мастер рада под називом „Анализа соли прелазних метала (гвожђе(III)-хлорида и кадмијум(II)-ацетата) употребом *MALDI TOF* масене спектрометрије“ под руководством др Маријане Петковић и др Илије Брческог. Мастер студије је завршила с укупном просечном оценом 10,00 и оценом 10 на мастер испиту.

Докторске студије на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу, смер неорганска хемија, уписала је школске 2011/2012. године. Од јануара 2011. године запослена је у Институту за нуклеарне науке „Винча“, где ради у групи др Маријане Петковић, научног саветника Лабораторије за физичку хемију, Института за нуклеарне науке „Винча“ на пројекту 172011, чији је руководилац проф. др Зорица Бугарчић (Природно-математички факултет Универзитета у Крагујевцу). Од марта 2018. ради у Лабораторији за атомску физику, такође у оквиру Института за нуклеарне науке „Винча“.

Маја Нешић је свој научно-истраживачки рад започела 1. јануара 2011. године ангажовањем у оквиру пројекта „Испитивање механизма реакција комплекса јона прелазних метала с биолошки значајним молекулима“ (бр. 172011). Учесник је у COST акцији (BM 1104) под називом „Mass Spectrometry Imaging: New Tools for Healthcare Reserch“ која је покренута 2010 године под руководством др. Liam McDonnell, Leiden University Medical Center, 2333ZA Leiden Netherlands, и у акцији BM1403 (Native Mass Spectrometry and Related Methods for Structural Biology), под руководством професора Frank Sobott-a, University of Antwerp, BAMS Antwerpen, Belgium. У оквиру билатералног пројекта „Структурни и функционални ефекти анти-туморских лекова на бази металних комплекса на полиморфонуклеарне леукоците“ боравила је месец дана у Немачкој (Institute for Medical Physics and Biophysics, Leipzig).

Поред редовних истраживачких активности, Маја Нешић је активни учесник у популаризацији науке. Од 2011. активно учествује у манифестацији „Отворена врата Института Винча“. Била је координатор радионице у оквиру пројекта „Винчине научионице“ 2012. године. Такође је у оквиру процеса успостављања система квалитета у оквиру Лабораторије за физичку хемију према ИСО 9001 стандарду именована за представника групе за квалитет 2014. године.



# *Πριλογ*

## Colloidal TiO<sub>2</sub> nanoparticles as substrates for M(S)ALDI mass spectrometry of transition metal complexes

Maja Radisavljević<sup>1</sup>, Tina Kamčeva<sup>1</sup>, Iva Vukićević<sup>1</sup>, Marija Radoičić<sup>2</sup>, Zoran Šaponjić<sup>2</sup> and Marijana Petković<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Physical Chemistry, Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Belgrade, Republic of Serbia

<sup>2</sup>Department of Radiation Chemistry and Physics, Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Belgrade, Republic of Serbia

**RATIONALE:** Nanoparticles as substrates for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) have advantages over organic matrices, since they enable acquisition of spectra in the low-mass range. It has been previously shown that TiO<sub>2</sub> nanoparticles can be used as substrate for MALDI-TOF MS analysis of phospholipids and for other types of molecules, but none of them was applied to the analysis of transition metal complexes.

**METHODS:** The MALDI-TOF mass spectra of potential anti-tumor drugs [AuCl<sub>2</sub>(bipy)]Cl, [PtCl<sub>4</sub>(bipy)], and [RuCl<sub>2</sub>(bipy)<sub>2</sub>]Cl acquired with organic matrices have been compared with spectra acquired with colloidal titanium dioxide nanoparticles. Colloidal TiO<sub>2</sub> nanoparticles (NPs) with average diameter of 5 nm were synthesized and characterized by microscopy. For some experiments, the TiO<sub>2</sub> NPs were treated at 60 °C. Suspensions of matrix and the analyte were premixed, applied to the MALDI target and left at room temperature. Mass spectra were acquired with a 50-Hz pulsed nitrogen laser emitting at a wavelength of 337 nm.

**RESULTS:** The MALDI spectra of transition metal complexes acquired with TiO<sub>2</sub> NPs exhibited somewhat lower sensitivity than those with organic matrices; on the other hand, they are characterized by significantly lower number of signals arising from the tested complexes than the organic matrices. Whereas adducts between organic matrices and the analytes were detectable in the spectra, this was not the case for the TiO<sub>2</sub>-assisted mass spectra.

**CONCLUSIONS:** We have shown that colloidal TiO<sub>2</sub> NPs can be used as substrates for MALDI-TOF MS of transition metal complexes. Although the sensitivity of this approach in comparison with the use of organic matrices might still be a problem, the potential of the applications of NPs for the mass spectrometric characterization of transition metal complexes is clearly demonstrated. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a soft ionization mass spectrometric method which enables detection and analyses of molecules with a reduced fragmentation.<sup>[1]</sup> From the standpoint of transition metal complexes, which are used in the therapy of various diseases, including cancer,<sup>[2,3]</sup> MALDI-TOF MS seems to be a promising tool due to the possibility of being able to analyze transition metal complexes (metallo-drugs) alone and the products of their interaction with biomolecules, i.e. cellular targets. MALDI can also be used as a tool for mass spectrometry imaging and the analysis of drug metabolites directly from the (diseased) tissue.<sup>[4,5]</sup>

In spite of numerous advantages, there is still one major drawback of the MALDI MS methodology, related to the analyses of small molecules (<500 Da). This mass region is usually crowded with signals arising from the organic matrices<sup>[1,6]</sup> traditionally used in MALDI-TOF MS and these

can suppress analyte signals. As we have previously reported, in addition to this problem, the analysis of transition metal complexes by MALDI with the assistance of organic molecules seems to be complicated by the generation of adducts between metallo-drugs and matrices, making peak identification difficult and in some cases unreliable.<sup>[7,8]</sup> This is an important issue if new generations of transition metal complexes are to be characterized by MS. These new generations of metallo-drugs are being synthesized to overcome drawbacks of the routinely used therapeutic agents.<sup>[9,10]</sup> MALDI-TOF MS is being used for the structural characterization of these new metallo-drugs and to monitor their interaction with cellular targets.

The advantages of using nano-particles to assist LDI MS for the detection of low-mass molecules are (i) the absence of signals in the low-mass range, (ii) the absence of the formation of adducts with analyte molecules, (iii) high tolerance toward increased concentrations of inorganic salts, and (iv) according to some reports, that analysis with the assistance of nanoparticles is more sensitive than that utilizing 'classical' matrices.<sup>[11,12]</sup> Numerous particles and functionalized surfaces have already been tested for the LDI analyses not only of small molecules, but also for biomolecules.<sup>[12]</sup> These include

\* Correspondence to: M. Petković, Department of Physical Chemistry, Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Mike Alasa 12–14, Belgrade, Republic of Serbia. E-mail: marijanapetkovic@vinca.rs

## Testing the photo-sensitive nanocomposite system for potential controlled metallo-drug delivery

Maja Nešić<sup>1</sup> · Iva Popović<sup>1</sup> · Andreja Leskovic<sup>1</sup> ·  
Zoran Šaponjić<sup>1</sup> · Marija Radoičić<sup>1</sup> · Milutin Stepić<sup>1</sup> ·  
Marijana Petković<sup>1</sup>

Received: 29 October 2015 / Accepted: 16 January 2016 / Published online: 21 January 2016  
© Springer Science+Business Media New York 2016

**Abstract** Photo-responsive drug release systems are promising for drug delivery applications due to many benefits compared to conventional chemotherapy such as targeted, controlled release of a drug and reduced toxicity to healthy tissues. In this work, we report synthesis of the nanocomposite system based on carrier TiO<sub>2</sub> nanoparticles and potential anticancer ruthenium complex, with light controllable release properties. Nanocomposite system showed biological activity and induced the generation of free radicals, which are implied in the efficient cell killing. The drug release tests demonstrated sustained release of the transition metal complex from the surface implying the potency for the controlled drug delivery system. Taking into account photoactivity of the Ru-complex, in the next step we have investigated the influence of green light on the rate of the complex release, and the results showed dependence of the Ru-complex release from the surface of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the applied laser energy. Therefore, these characteristics make this nanocomposite system promising for the photo-responsive chemotherapy.

**Keywords** Photo-responsive release · Nanocomposite system · Anticancer drug

---

This article is part of the Topical Collection on Advances in the science of light.

Guest Edited by Jelena Radovanovic, Milutin Stepić, Mikhail Sumetsky, Mauro Pereira and Dragan Indjin  
Provided Funding information has to be tagged.

---

✉ Maja Nešić  
maki@vinca.rs; maki@vinca.com

<sup>1</sup> Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Mike Petrovića Alasa 12-14, Belgrade 11 000, Serbia

## Biological activity and binding properties of [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] complex to bovine serum albumin, phospholipase A<sub>2</sub> and glutathione

Maja Nešić · Iva Popović · Andreja Leskovic · Marijana Petković

Received: 18 March 2016 / Accepted: 31 July 2016 / Published online: 11 August 2016  
© Springer Science+Business Media New York 2016

**Abstract** Ruthenium compounds are highly regarded as metallo-drug candidates. Many studies have focused their attention on the interaction between ruthenium complexes with their possible biological targets. The interaction of ruthenium complexes with transport proteins, enzymes and peptides is of great importance for understanding their biodistribution and mechanism of action, therefore, the development of an anti-cancer therapy involving ruthenium complexes has recently shifted from DNA targeting towards protein targeting. With the aim of gaining insight into possible interactions between ruthenium complexes with biologically relevant proteins, we have studied the interaction of *cis*-dichlorobis(2,2'-bipyridyl-4,4'-dicarboxylic acid)ruthenium(II) complex [Ru(II)(dcbpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>], which previously showed good potency in photo-dynamic chemotherapy, with bovine serum albumin (BSA), phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) and glutathione (GSH). Binding constants and possible number of binding sites to mentioned proteins and peptide are investigated by ultraviolet–visible spectroscopy and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI TOF MS). The complex binding affinities were in the following order: PLA<sub>2</sub> > BSA > GSH. Moreover, genotoxic profile of the complex, tested on

peripheral blood lymphocytes as a model system, was also promising.

**Keywords** Ruthenium (II) complex · Potential metallo-drug · Biological targets · Proteins · Glutathione

### Introduction

Over the last decade, ruthenium complexes have found many different applications. They can be used as antitumor, antibacterial, antiviral therapy, and some of them are also very attractive for utilization as photosensitizers (Nazeeruddin et al. 1993; Kostova 2006; Anthonysamy et al. 2011; Li et al. 2015; Karki et al. 2014). The anticancer properties exhibited by many ruthenium(III) and a number of ruthenium(II) complexes synthesized over the past two decades are also significant (Velders et al. 1998; Cini et al. 2003; Xu et al. 2014; Lima et al. 2014; Motswainyana et al. 2015). Chemical properties that make ruthenium complexes suitable for medical use are slow ligand exchange kinetics, multiple oxidation states and ability to mimic iron (Antonarakis and Emadi 2010). Currently, the most promising candidates for cancer treatment, that are undergoing clinical phase II trials, are KP 1019 and NAMI-A (Sava et al. 1995, 1999; Hartinger et al. 2006, 2008). These ruthenium complexes and other promising candidates usually contain aromatic rings,

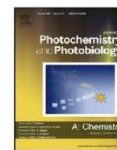
M. Nešić (✉) · I. Popović · A. Leskovic · M. Petković  
Department of Physical Chemistry, Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Mike Petrovića Alasa 12-14, Belgrade 11 000, Serbia  
e-mail: maki@vin.bg.ac.rs





Contents lists available at ScienceDirect

# Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jphotochem](http://www.elsevier.com/locate/jphotochem)

## Light controlled metallo-drug delivery system based on the TiO<sub>2</sub>-nanoparticles and Ru-complex



Maja Nešić\*, Jelena Žakula, Lela Korićanac, Milutin Stepić, Marija Radoičić, Iva Popović, Zoran Šaponjić, Marijana Petković

Vinča Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, P.O. Box 522, 11 001 Belgrade, Serbia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 November 2016  
Received in revised form 30 May 2017  
Accepted 29 June 2017  
Available online 8 July 2017

#### Keywords:

Photodynamic therapy  
Metallo-drug delivery  
Light controlled drug release  
TiO<sub>2</sub> nanoparticles  
Melanoma

### ABSTRACT

We studied the colloidal TiO<sub>2</sub> nanoparticles as a carrier for controlled delivery of the ruthenium complex to the melanoma cell line. The system demonstrated slower complex release upon visible and increased release rate upon UV light illumination. Accordingly, the light-dependent cytotoxicity of the system was demonstrated on amelanotic melanoma cancer line. The cell death is enhanced by UV and reduced by red light in the presence of investigated nanocomposite system. Both components of the system may act as photosensitizers, by generating reactive oxygen species, which promote cell death. Thus, the system might act dually, as photodynamic therapeutic agent and as the light tunable system for metallo-drug delivery and it might be of interest for development of new more efficient drug delivery approaches by using a light as external stimulus.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

New therapies in cancer treatment use the light as activator of photosensitizers (PSs) in photodynamic therapy (PDT) or/and as external stimulus for detachment of the drug from the delivery systems. This approach is nowadays increasingly applied in clinical praxis alongside radiotherapy and chemotherapy. Light is particularly attractive external stimulus for drug delivery and activation of PS because it provides a precise, temporal and spatial control over the activation and/or release of therapeutic agents. More precisely, it can be applied locally without suffering from diffusion effects as would a thermal or chemical stimulus, it can be switched 'on' and 'off' easily; and the desired response can be tuned according to the wavelength and intensity of light [1].

A variety of organic [2–5] and inorganic [5–8] materials have been explored as PS or PDT. Recently, it was reported that photo-activated ruthenium (Ru) complexes were used in PDT [9–11]. Moreover, many Ru-complexes are also highly regarded as metallo-drug candidates without photo-activation and some of them are already in clinical trials as anticancer agents [12–15]. Ru-complexes showed ability to generate <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and/or undergo ligand dissociation upon irradiation followed by the coordination of the resultant Ru fragment to DNA and therefore potential for PDT

[10,16,17]. Simple Ru(II) polypyridyl complexes reported by Wachter and co-workers demonstrated both photo-activated DNA binding and potent cytotoxicity in cancer cells after irradiation with visible and near-IR light [18].

Titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanostructures are continuously attracting great attention both as PS as well as photoactive drug carriers [19–25]. Besides photoactivity, TiO<sub>2</sub> has a wide range of useful properties, such as stability, availability, large surface area, and possibility for surface modification thus allowing the attachment of different drugs [26]. Recently, Yin et al. [27] and Wang et al. [28] conjugated mesoporous TiO<sub>2</sub> NPs with anticancer agents doxorubicin and paclitaxel, respectively. The porous TiO<sub>2</sub> NPs not only produced the ROS but also released the chemotherapeutic agent upon photo-activation. Still, use of the TiO<sub>2</sub> as a potential PS and photo-activated drug carrier, is challenged by the limited tissue penetration of UV light (several mm). However, this is not limiting factor for topical treatments i.e. treatment of melanoma (skin cancer) where there is no need for deep penetration of light.

In this work, we have focused on the photoresponsivity of the system made of colloidal TiO<sub>2</sub> NPs as carriers for the transition metal complex, which might be applied in the therapy of melanoma. In our previous work, we have shown that such a system could be manipulated by the green light, therefore further investigations were encouraged [29]. Since both components of NCS are photoactive (NPs absorb the UV light, whereas the complex absorbs both the UV and visible light) complex release

\* Corresponding author.

E-mail address: [maki@vin.bg.ac.rs](mailto:maki@vin.bg.ac.rs) (M. Nešić).

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, **Маја Нешић**, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

**„Испитивање могућности коришћења наночестица  $TiO_2$  као носача за циљану и контролисану доставу лекова на бази комплекса прелазних метала“**


која је одбрањена на **Природно-математичком факултету**

Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршила повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу,            06.06.2018. године,

  
\_\_\_\_\_  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, **Маја Нешић,**

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

**„Испитивање могућности коришћења наночестица  $TiO_2$  као носача за циљану и контролисану доставу лекова на бази комплекса прелазних метала“**

која је одбрањена на **Природно-математичком факултету**

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>††</sup>

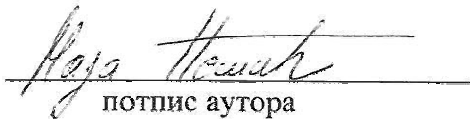
---

<sup>††</sup>Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>ss</sup>

У Крагујевцу,            06.06.2018. године,

  
потпис аутора

---

<sup>ss</sup>Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на [:http://creativecommons.org.rs/](http://creativecommons.org.rs/)