



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Невена Н. Миливојевић Димитријевић

**Употреба наночестица и „3D tumor-on-chip“
напредних технологија у биолошким
истраживањима – Модел систем колон
карцином**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2026



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

Nevena N. Milivojević Dimitrijević

**The use of nanoparticles and
"3D tumor-on-chip" advanced technologies in
biological research - Colon cancer model system**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2026

Идентификациона страница докторске дисертације

Аутор
Име и презиме: Невена Н. Миливојевић Димитријевић
Датум и место рођења: 11.02.1992. Крагујевац
Садашње запослење: Истраживач сарадник
Докторска дисертација
Наслов: Употреба наночестица и „3D tumor-on-chip“ напредних технологија у биолошким истраживањима – Модел систем колон карцином
Број страница: 154
Број слика: 115
Број библиографских података: 260
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Биолошке науке - Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија (577.21:616.345-006.6(469)(497.11)(043.3))
Ментор: Др Марко Живановић, научни саветник, Институт за информационе технологије Крагујевац, Универзитет у Крагујевцу
Број и датум одлуке Већа универзитета о прихватању теме докторске дисертације: Број: IV-01-754/9 Датум: 12.10.2022. год.

Захвалница

Највећу захвалност дугујем ментору др Марку Живановићу што ме је од почетка мог научно-истраживачког рада учио, подржавао и охрабривао. Хвала ти на посвећености, стрпљењу и разумевању, а пре свега пријатељству и животним саветима. Велика је част и задовољство радити са тобом, напредовати уз тебе свакога дана, а надам се и у будућности.

Захваљујем се члановима комисије. Велико хвала проф. др Ненаду Филиповићу на прилици да се усавршавам у иностранству, као и на подршци у експерименталном раду у Лабораторији за биоинжењеринг. Хвала на несебичној помоћи проф. др Биљани Љујић чије ми је знање и искуство много помогло у истраживачком раду. Хвала много проф. др Владимиру Петровићу на свим саветима, као и на идеји и усмерењу да упишем баш ове докторске студије. Велико хвала др Валентини Ђорђевић на професионалности и стручној помоћи у писању овог докторског рада. Посебну захвалност дугујем др Милени Милутиновић на знању које ми је пренела, пријатељској подршци од самог почетка докторских студија, као и на стручним саветима и сугестијама при изради ове докторске дисертације.

Захвалност дугујем колегама из Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију, Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу, што су ме лепо прихватили и помагали ми од почетка докторских студија. Такође, веома сам захвална др Снежани Марковић која ме је примила у њену групу на докторат, на подршци и знању које ми је пренела.

Много хвала и колегама из Лабораторије за биоинжењеринг, Института за информационе технологије Универзитета у Крагујевцу, на лепој радној атмосфери и помоћи у експерименталном раду, а посебно Ани Мирић, пријатељу и колегиници, за сваку помоћ и подршку.

Такође се захваљујем проф. др Владимиру Јуришићу, доц. др Ивици Петровићу, проф. Биљани Петровић, др Милицы Николић, др Тијани Ђукић, др Далибору Николићу и др Снежани Радисављевић, на дивној сарадњи, без чије помоћи не би било ове докторске дисертације.

Огромну захвалност дугујем др Мигуелу Оливеира (Miguel Oliveira) код кога сам боравила на ЗБс истраживачком институту у Португалу, на свему што сам тамо научила и видела. Хвала др Мариани Карваљо (Mariana Carvalho) и др Давиду Кабаљеро (David Caballero) који су ме учили и помагали ми у експерименталном делу рада.

Хвала мојим пријатељима и родбини што ме подржавају и охрабрују кроз живот.

Неизмерну захвалност дугујем својој породици, браћи Ивану и Владимиру, мајци Цици и оцу Небојши, за љубав, васпитање, разумевање и подршку кроз живот и школовање. Ви сте мој највећи ослонац.

Велико хвала мом супругу Ђорђу на љубави и подршци, и свему што тек долази.

Мојој Наталији, јер захваљујући њој сада све има смисла.

Иви, Влади, мами и тати

Сажетак

Предмет истраживања у оквиру ове докторске дисертације је испитивање потенцијално активних хемијских једињења у третману тумора, молекуларних механизма њиховог утицаја на ћелије, употреба микрофлуидних чип система у *in vitro* истраживањима за креирање 3Д тумора на чипу, и употреба наночестица као носача изабраних хемијских једињења. Преглед резултата претходно испитиваних једињења нам је показао да су комплекси злата (III) одлични кандидати за даља испитивања. Резултати експерименталног дела истраживања у *in vitro* условима, су поред високе антитуморске активности комплекса злата, указали да они доводе до смрти ћелија изазивајући апоптозу, где је тачно окарактерисан пут апоптозе за сваки од комплекса. Такође, ови комплекси нарушавају редокс равнотежу ћелија тумора, што је још један механизам којим делују. Синтезом дендримерских наночестица као носача за комплексе злата, добили смо бољу цитотоксичну активност. Фабрикација и употреба технологије микрофлуидних чип система, који омогућавају испитивања тумора у 3Д динамичном микроокружењу, допринела је бољем разумевању ефеката ових једињења. Поређење првих 2Д испитивања са 3Д моделом тумора, показало нам је све предности система који најприближније симулирају *in vivo* механизме. Резултати ове докторске дисертације представљају допринос у *in vitro* проучавању потенцијалних антитуморских супстанци, њихових молекуларних механизма, као и у значајности 3Д динамичких модел система. Значај овог истраживања огледа се у употреби нових метода у *in vitro* испитивањима у области молекуларне биологије, што је од великог интереса за људску популацију.

Кључне речи: микрофлуидни чип уређаји, наночестице, 3Д динамички систем, *in vitro* испитивања, комплекси злата, апоптоза, редокс статус

Abstract

The subject of research within this doctoral dissertation is the examination of potentially active chemical compounds in the treatment of tumors, the molecular mechanisms of their effect on cells, the use of microfluidic chip systems in *in vitro* research to create 3D tumor-on-a-chip model, and the use of nanoparticles as carriers of selected chemical compounds. An overview of the results of previously tested compounds showed us that gold (III) complexes are excellent candidates for further testing. The results of the experimental part of the research in *in vitro* conditions, in addition to the high antitumor activity of the gold complexes, indicated that they lead to the death of cells by causing apoptosis, where the apoptosis pathway was precisely characterized for each of the complexes. Also, these complexes disrupt the redox balance of tumor cells, which is another mechanism by which they act. By synthesizing dendrimer nanoparticles as carriers for gold complexes, we obtained better cytotoxic activity. The fabrication and use of microfluidic chip system technology, which enable tumor examinations in a 3D dynamic microenvironment, has contributed to a better understanding of the effects of these compounds. The comparison of the first 2D tests with the 3D tumor model showed us all the advantages of the system that most closely simulates *in vivo* mechanisms. The results of this doctoral dissertation represent a contribution to the *in vitro* study of potential antitumor substances, their molecular mechanisms, as the importance of 3D dynamic model systems. The importance of this research is reflected in the use of new methods in *in vitro* tests in the field of molecular biology, which is of great interest to the human population.

Key words: microfluidic chip devices, nanoparticles, 3D dynamic system, *in vitro* tests, gold complexes, apoptosis, redox status

Садржај

УВОД.....	1
1. Претклиничка испитивања	1
2. Ћелијске линије као модел системи	2
3. Хемиотерапија	2
4. Преглед испитивања потенцијалних антитуморских једињења	4
5. Молекуларно-биолошка истраживања	5
5.1 Апоптоза	5
5.2 Редокс статус	6
6. Микрофлуидни чип уређаји	8
6.1 Organ-on-a-chip	9
6.2 Lab-on-chip	9
7. Наночестице	12
ОСНОВНЕ ХИПОТЕЗЕ	16
СПЕЦИФИЧНИ ЦИЉЕВИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ	16
МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	17
1. Манипулација ћелијама у статичким 2Д условима	17
2. Манипулација ћелијама у динамичким 3Д условима	18
3. МТТ тест вијабилности ћелија и процена цитотоксичности третмана	18
4. Тестови квантификације ROS и RNS	19
5. Испитивања неензимских антиоксиданата	20
6. Тестови антиоксидативних ензима	20
7. Анализа ћелијске смрти	21
8. Одређивање експресије протеина - имунофлуоресценца	22
9. Проточна цитометрија	23
10. Квантитативна ланчана реакција полимеразе у реалном времену (qRT-PCR) ..	24
11. Математички модел редокс статуса	27
12. Математички модел апоптозе у 2Д и 3Д условима	28
13. Израда акрилног микрофлуидног чип система (ИИТ КГ)	29
14. Израда ПДМС микрофлуидног чип система (ЗБс институт Португал)	31
15. Модификована израда ПДМС микрофлуидног чип уређаја (ИИТ КГ)	36
16. Праћење миграције у микрофлуидном чип уређају	38
17. Синтеза CMChT/PAMAM дендримерних наночестица	38
18. Обележавање наночестица CMChT/PAMAM дендримера са флуоресцеин изотиоцијанатом (FITC)	40

19. Формулације наночестица CMChT/PAMAM дендримера са комплексом злата АК1	41
20. Физичко-хемијска карактеризација	41
21. Стабилност Au-комплекса + CMChT/PAMAM дендримерних наночестица.....	42
22. Ћелијска вијабилност у микрофлуидном чип уређају	42
23. Тест live/dead	43
24. Процена ефикасности интернализације наночестица у ћелије	43
25. Изолација моноклеарних ћелија периферне крви	43
26. Припрема библиотеке и секвенцирање транскриптома.....	44
27. Статистичка обрада података	48
РЕЗУЛТАТИ	49
1 Резултати испитивања цитотоксичности хемијских једињења	49
2 Резултати тестирања цитотоксичности комплекса злата	60
3 Резултати испитивања утицаја комплекса злата на редокс статус ћелија	63
3.1 Резултати <i>in vitro</i> испитивања редокс статуса ћелија.....	64
3.2 Резултати математичког модела редокс статуса у ћелијама.....	71
4 Резултати испитивања утицаја комплекса злата на механизам апоптозе у ћелијама	76
5 Резултати испитивања механизма апоптозе у статичким 2Д и динамичким 3Д системима	82
5.1 Резултати <i>in vitro</i> испитивања апоптозе у 2Д и 3Д условима.....	82
5.2 Резултати математичког модела апоптозе у 2Д и 3Д условима	89
6 Резултати испитивања карактеристика Au-комплекса и новосинтетизованих А и Б формулација наночестица.....	92
7 Процена ефикасности новосинтетисаних наночестица које носе комплекс злата у микрофлуидним чип уређајима.....	95
8 Примена микрофлуидних чип система за праћење миграције ћелија.....	99
9 Оптимизација дизајна микрофлуидних чип уређаја	99
10 Употреба микрофлуидних чип система у биолошким експериментима и припреми библиотеке за секвенцирање транскриптома.....	102
ДИСКУСИЈА	106
1. Цитотоксичност	106
2. Редокс статус	106
3. Апоптоза.....	109
4. Апоптоза у 2Д и у 3Д условима	110
5. Наночестице.....	113

6. Производња микрофлуидних чип уређаја	116
ЗАКЉУЧАК	117
Редокс статус ћелија	117
Апоптоза ћелија	117
Апоптоза у 2Д наспрам 3Д система	118
Наночестице	118
Микрофлуидни чип уређаји	118
Општи закључак	118
ЛИТЕРАТУРА	119
Биографија аутора	136
ПРИЛОГ 1	137

УВОД

1. Претклиничка испитивања

Тумори се могу сматрати најважнијим јавним здравственим проблемом широм света. Ова болест представља велики терет у нашем модерном друштву, са много нових случајева који се дијагностикују сваке године. (Siegel et al, 2026) Карцином дебелог црева представља један од главних узрока смртности у свету, и најчешћи узрок смрти од карцинома. (Yang et al, 2022) У 2026. години, предвиђа се да ће се у Сједињеним Државама догодити преко 2 милиона нових случајева тумора и преко 626.000 смртних случајева од тумора. Епидемиолошке процене Светске здравствене организације стављају карциноме као водећи узрок смрти до 2030. године. (Siegel et al, 2026) Терапија тумора се суочава са озбиљним изазовима, посебно у откривању лекова.

Претклиничка испитивања се обављају *in vitro* (у лабораторији) и *in vivo* (на животињама). (Zeng et al, 2015) Током ових испитивања се изводе фармакодинамске, фармакокинетичке и токсиколошке студије. За различита синтетисана хемијска једињења, годинама уназад се испитује антитуморска активност, као и молекуларни механизми којим они доводе до цитотоксичног ефекта. (Singh, 2018)

Развој и тестирање нових потенцијалних лекова кроз све претклиничке и клиничке фазе може трајати годинама, па чак и деценијама, са ниском стопом успеха. Процењује се да трошкови развоја једног успешног лека достижу милијарду долара, а од 10.000 различитих једињења, само једно добија одобрење за употребу код пацијената. (Carvalho et al, 2017a) Токсиколошким испитивањима потврђује се безбедност лека, и она најдуже трају јер се поред акутне токсичности (смртоносна доза лека) одређује и субакутна токсичност (6 месеци), хронична токсичност (1-2 године), као и тератогеност и утицај на репродуктивну способност, карциногени (2 године) и мутагени потенцијал супстанце, за које је потребно више године да се испоље. (Singh, 2018) Ова испитивања захтевају употребу великог броја животиња, па се тежи да се на *in vitro* моделима изводе бар нека од њих. (Akhtar, 2015)

In vitro истраживања у лечењу тумора су тренутно код нас углавном сведена на 2Д тестове који су превише једноставни да би репродуковали сложену структуру и динамику природног микроокружења тумора. При томе, ћелије тумора реагују на лекове значајно другачије у поређењу са стањем *in vivo*. (Horning et al, 2008)

У употреби су, такође, и *in vivo* тестирања на моделима животиња, али ту постоји значајна разлика у одговору на лек када се пореди са људима, јер животињски модели ипак имају слабу корелацију са физиологијом људи или патогенезом испитиваних болести. С друге стране, постоји и притисак јавности да се смањи употреба животиња у истраживању, да су ова истраживања етички контроверзна и веома скупа. (Jensen and Teng, 2020)

Све несавршености конвенционалних методологија у тестирању потенцијалних лекова за туморе довеле су до развоја нових уређаја комбиновањем неколико технологија у циљу имитације природног окружења и услова који окружују туморско ткиво. Микрофлуидни уређаји се све више користе за креирање *in vitro* модел система који могу рекапитулирати сложеност и динамику 3Д окружења тумора. Ова технологија се у литератури углавном назива „organ-on-chip“ технологија. (Carvalho et al, 2018; Carvalho et al, 2015; Sittampalam et al, 2015)

2. Ћелијске линије као модел системи

За претклиничка истраживања могу да се користе ћелијске линије или анимални модели. Изабрани типови ћелија веома могу утицати на исходе испитивања. Матичне ћелије, примарне ћелијске линије, имортализоване ћелијске линије или ћелије са модификованом генском експресијом за жељени фенотип, могу се разматрати за истраживања. Матичне ћелије представљају недиференциране ћелије са потенцијалом да се диференцирају у специјализоване ћелије. (Chen et al, 2014) Примарне ћелијске линије су већ диференциране ћелије добијене директно из одређеног органа или ткива, имају све карактеристике органа/ткива из којих су изоловане, ограниченог су животног века, и могу се користити за изолацију одређеног ћелијског типа. Добијене су изолацијом из ткива, центрифугирањем из крви, механичком изолацијом (пресовањем ткива кроз филтере) или ензимском деградацијом (употребом колагеназа и трипсина). (Pribyl et al, 2014) Трећи тип су имортализоване ћелијске линије, такође изоловане као примарне линије, а затим генетички измењене (инсертован или утишан ген од интереса) како би се ћелијама очувала неограничена способност пролиферације. Од изузетног су значаја за добијање информација о биологији ћелија и развој нових фармаколошких агенаса, али некада, за функције ћелија *in vivo*, те информације могу бити спорне. (Lodish et al, 2004)

Према начину раста, ћелијске линије могу бити суспензионе – ћелије које расту у суспензији као појединачне или у групама које плутају, или монослојне – ћелије које су адхериране за дно суда у коме се гаје. (Karalczyńska et al, 2018) Развој репрезентативних *in vitro* модела зависи од доступности специфичних ћелијских фенотипова, способних да рекапитулирају *in vitro* карактеристике нормалних или патолошких природних ћелија. (Benam et al, 2015) Већина ћелија је способна да диференцира и развије физиолошки значајан *in vitro* модел само ако је култивисана у 3Д окружењу. (Griffith et al, 2006; Khetani and Bhatia, 2006) Такође, физичка, хемијска и биолошка контрола ћелијског микроокружења су од пресудне важности за способност усмеравања и управљања понашањем ћелија у просторним и временским скалама модел система у *in vitro* истраживањима. (Barthes et al, 2014)

Постоје тзв. „банке ћелија“ које представљају колекције ћелијских линија и нуде велики избор добро окарактерисаних ћелија. Међу највећим и најпознатијим су ATCC (*The American Type Culture Collection*, Manassas, VA, USA) и ECACC (*European Collection of Authenticated Cell Cultures*, UK), као и CLS (*Cell Lines Service*, Eppelheim, Germany). (линк 1, линк 2, линк 3)

3. Хемиотерапија

Хемиотерапија представља системско лечење малигних обољења. Лекови који се користе могу деловати на малигне ћелије на три начина:

- спречавају раст карцинома спречавајући деобу ћелија (антипролиферативно дејство),
- заустављају раст ћелија (цитостатско дејство) и
- доводе до смрти ћелија (цитотоксично дејство).

Према месту деловања и хемијској грађи, хемиотерапеутици се могу поделити на више група:

- Алкилирајући агенси - делују директно на ДНК везујући се за азот на позицији 7 у пуринском нуклеусу (гуанину). Овим механизмом доводе до унакрсног везивања два ДНК ланца или погрешног упаривања база, где долази до прекида ланца ДНК и смрти ћелије. Делују у свим фазама ћелијског циклуса. Примери су: циклофосфамид, цисплатина, карбоплатина.
- Антиметаболити - ови лекови су структурни аналози молекула који учествују у синтези ДНК и РНК. Уграђују се у ДНК или РНК, што даље доводи до немогућности деобе ћелија. Најактивнији су током С фазе (синтезе ДНК), а практично не делују у фази мировања. Примери су: 5-флуороурацил (5-ФУ), метотрексат, гемцитабин.
- Антитуморски антибиотици – лекови који су откривени у природи као производи микроорганизама. Интеркалирају између две суседне ДНК базе, што онемогућава даље нормално функционисање ДНК. Примери су: доксорубицин, блеомицин.
- Цитостатици биљног порекла - делују тако што спречавају формирање микротубула и ометају функционисање митотског вретена, чиме спречавају деобу ћелија (митозу). Примери су: таксани (паклитаксел) и винка алкалоиди (винкристин).
- Инхибитори топоизомеразе - ови лекови ометају ензиме (топоизомеразе) који су одговорни за раздвајање ланаца ДНК током процеса репликације ДНК и транскрипције РНК. Примери су: етопозид, иринотекан.
- Хормони – ови лекови делују на туморе чији раст зависи од дејства хормона. Везују се за рецепторе хормона, некада их блокирају а некада претерано активирају. Примери су: тамоксифен, бусерелин. (Janković, 2011)

Цитотоксичност се дефинише као ефекат потенцијалних хемиотерапеутика на вијабилност ћелија тумора које се култивишу. У лабораторијским условима постоји велики број есеја којима се одређује потенцијални цитотоксични ефекат, где се углавном испитује проценат живих ћелија након употребе неког потенцијално цитотоксичног третмана. (Weyermann et al, 2005)

Најчешће индуковани типови ћелијске смрти су апоптоза и некроза. Индукција некрозе током цитотоксичне терапије је повезана са оштећњем околних ћелија и инфламацијом, док је апоптоза боље организована и ограничена на појединачну ћелију, па је тиме апоптоза пожељан процес уклањања оштећених, старих или карциномских ћелија. (Kanduc et al, 2002)

Нове стратегије у лечењу тумора су такође све заступљеније. Наночестице које носе различите супстанце имају многе предности у односу на саме супстанце. Повећање циљане ефикасности лека у оштећеном ткиву, смањење токсичности на здрава ткива, способност ношења већих количина супстанци, продужено време полуетиминације, смањење дозе која се користи, су важне карактеристике које чине наночестице обећавајућим алатима за циљану испоруку једињења. (Haley and Frenkel, 2008)

4. Преглед испитивања потенцијалних антитуморских једињења

Примена металних комплекса у медицини и фармацији је постала широко истражена током протеклих деценија за лечење многих болести. Метални јони се врло често користе у биолошким системима било за терапеутске примене или као дијагностичка помагала. (Li et al, 2018)

Током експерименталног рада тестирана је цитотоксичност једињења различитих комплекса метала, једињења без централног јона метала, као и комерцијалних цитостатика, чији је попис приказан у табелама 1, 2 и 3.

Табела 1. Тестирана једињења са централним јоном метала

Метал	Ознака	Референце
Гвожђе	Fe(II)	Фероцени – необјављени резултати
Родијум	Rh(III)	Petrovic et al, 2019 doi: 10.1021/acs.inorgchem.8b02390
		Petrović et al, 2020 doi: 10.1039/D0DT01343A
		Bogojeski et al, 2019 ISBN: 978-5-209-09395-4
		Čaković et al, 2024 doi: 10.1021/acs.jmedchem.4c01220
Злато	Au(III)	Radisavljević et al, 2019 doi: 10.1007/s00775-019-01716-8
		Radisavljevic et al, 2020 doi: 10.1039/D0NJ02037K
Рутенијум	Ru(II)	Medjedović et al, 2020 doi: 10.1016/j.poly.2019.114334
Цинк	Zn(II)	Soldatović et al, 2019 doi:10.1080/00958972.2019.1569229
Платина и Цинк	Pt(II)-Zn(II)	Soldatović et al, 2020 doi: 10.1002/aoc.5864
		Soldatović et al, 2020 doi: 10.3390/ECMC2020-07358
Паладијум и Селен	Se-Pd(II)	Raković et al, 2021 doi: 10.2174/1573406416666200930112442
Цинк и Бакар	Zn(II)-Cu(II)	Halilagić et al, 2020 doi: 10.3390/ECMC2020-07447
		Halilagić et al, 2022 doi: 10.1080/00958972.2022.2048376

Осмијум	Os(II)	Petrović et al, 2021 doi:10.1039/D0QI01540G
Платина и Паладијум	Pt(II) Pd(II)	Jovanovic-Stevic et al, 2021 doi: 10.1007/s00775-021-01879-3

Табела 2. Тестирана једињења без централног јона метала

Једињења	Референце
Хидразони	Branković et al, 2022 doi: 10.1098/rsos.211853
Шифове базе	Marjanović et al, 2025 doi: 10.1002/cbdv.202401699
Јонске течности	Čaković et al, 2024 doi: 10.1021/acs.jmedchem.4c01220

Табела 3. Тестирани комерцијални цитостатици

Комерцијални цитостатици	Референце
5-FU Irinotecan Leucovorin OxPt Docetaxel Doxorubicin Endoxan Paclitaxel	Demetriades et al, 2022 doi: 10.3390/pharmaceutics14040749
	Živanović et al, 2023 doi: 10.3390/pharmaceutics15061628
	Virijević et al, 2023 ISBN: 978-86-82679-14-1
	Ramović Hamzagić et al, 2024 doi: 10.3390/currenco131030091
	необјављени резултати протокола

5. Молекуларно-биолошка истраживања

5.1 Апоптоза

Програмирана ћелијска смрт или апоптоза је неопходна за развој и функционисање организма. Апоптоза је посредована скупом догађаја и користи биохемијске путеве који воде до структурних промена ћелије. Важност апоптозе лежи у потенцијалу контроле биолошких система. (Pfeffer and Singh, 2018) Може се активирати интра- и екстра-целуларним механизмима. (Milutinovic et al, 2015) Интрацелуларне компоненте се прате генетски дефинисаним редоследом, док екстрацелуларни аспекти укључују ендogene протеине, цитокине и хормоне, као и ксенобиотику, зрачења,

оксидативни стрес и хипоксију. (Kunac et al, 2022; Stoian et al, 2014) Унутрашњи пут углавном укључује ослобађање сигнала из митохондрија, који укључују пермеабилizацију митохондријалне мембране регулисане протеинима породице Б ћелијског лимфома-2 (BCL-2). (Azimian et al, 2015) Спољашњи пут укључује активацију рецептора смрти, последичну активацију прокапазе 8 која покреће низ даљих каскадних реакција одговорних за извођење апоптозе. (Elmore, 2007) Способност ћелије да уђе у апоптозу као одговор на сигнал „смрти“ зависи од њеног пролиферативног статуса, положаја у ћелијском циклусу, као и од контролисане експресије оних гена који регулишу промовисање или инхибицију ћелијске смрти. (Pfeffer and Singh, 2018)

Присуство апоптозе у туморима је одавно примећено. Већина антитуморских лекова као што су инхибитори топоизомеразе, агенси за алкиловање, антиметаболити и антагонистички хормони индукују апоптозу у ћелијама карцинома. (Wang, 2020) Карциногенеза је вишестепени процес са прогресивним променама на ћелијском, генетском и епигенетском нивоу. (Nguyen et al, 2020) Пожељно је идентификовати могуће мете одговорне за цитотоксичне ефекте. Активација апоптозе је кључни молекуларни механизам одговоран за антиканцерогене активности већине тренутно проучаваних потенцијалних агенаса против тумора. (Nikodijević et al, 2021; Wong, 2011)

Главни регулаторни протеини унутрашњих, митохондријалних путева су протеини породице BCL-2, који регулишу мембрански потенцијал. Повећану пермеабилност спољашње мембране митохондрија прати ослобађање цитохрома Ц (Cyt c) из митохондрија у цитоплазму, што представља „окидач“ апоптозе. (Kunac et al, 2022; Carneiro and El-Deiry, 2020) Унутар породице BCL-2 постоје проапоптотички (BAD, BAX, BAK, BCL-XS, BID, итд.) и антиапоптотички протеини (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, итд.). Проапоптотички протеини присутни су у цитосолу као сензори стреса или оштећења ћелије, док се у интермембранском простору митохондрија налазе антиапоптотички протеини. Однос проапоптотичких и антиапоптотичких фактора одређује осетљивост ћелија на апоптозу. (Warren et al, 2019) Њихов ефекат на ослобађање Cyt c је супротан: BAX утиче на формирање канале у спољној мембрани митохондрија, док их BCL-2 блокира и тиме инхибира ослобађање Cyt c. На спречавање реализације апоптотичког програма у наследном материјалу оштећених ћелија утиче и повећана експресија неких антиапоптотичких протеина из породице BCL-2, а истовремено промовише неконтролисану пролиферацију трансформисаних ћелија. (Banjara et al, 2020) Ова породица протеина је основа за развој нових генерација лекова који би се користили за малигне болести. (Nikodijević et al, 2021)

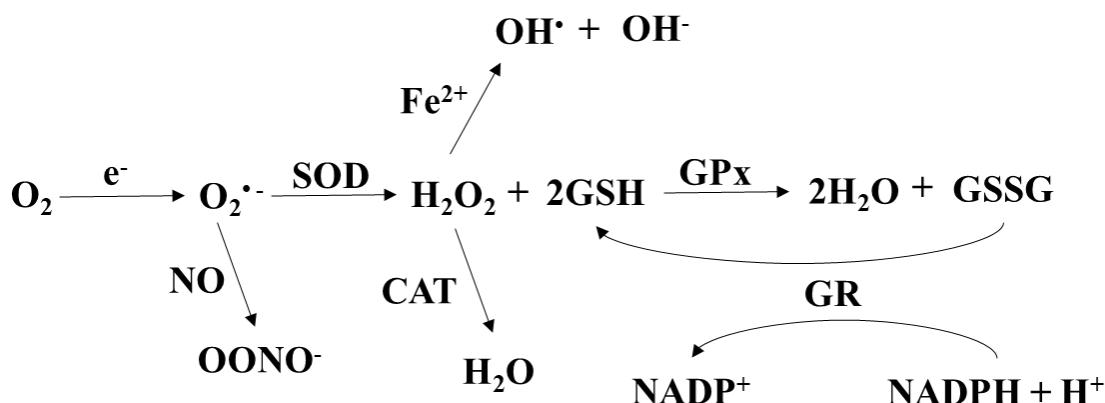
Каспаза 3 (CAS3) игра централну улогу у процесу апоптозе, која је после активације делимично или у потпуности одговорна за цепање многих ћелијских компоненти (протеини, актин, ламин), активацију CAD (Caspase Activated DNase) - ендонуклеазе одговорне за фрагментацију ДНК и кондензацију хроматина. (Carneiro and El-Deiry, 2020)

5.2 Редокс статус

Аеробни услови, од којих зависимо, могу довести до излагања организма опасним оксидационим процесима. Због тога су ћелије развиле заштитни механизам за одржавање редокс равнотеже – антиоксидативни одбрамбени систем (АОС). (Contreras – Zentella et al, 2022) Оксидативни стрес се јавља када реактивне врсте преплаве антиоксидативне системе, што се дешава у многим патолошким стањима, укључујући туморе. (Karoor et al, 2019) Три главне реактивне врсте кисеоника (ROS) које имају физиолошко значење су супероксид анјонски радикал, хидроксилни радикал и водоник пероксид. (Schmidlin et al,

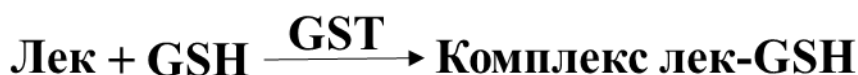
2019) Поред ових, значајне су и реактивне врсте азота (RNS) као што су азот моноксид, нитрити, пероксинитрити. (Kwon et al, 2021) Поремећај равнотеже прооксиданс-антиоксиданс, где се фаворизују прооксиданси, изазива оштећења у ћелијама, посебно оксидативно оштећење ДНК, што може покренути вишестепени процес канцерогенезе. (Karoor et al, 2019)

Антиоксидативни систем, поред глутатиона као неензимске компоненте, чине и антиоксидативни ензими као што су каталаза (CAT), супероксид дисмутаза (SOD), глутатион пероксидаза (GPx), глутатион редуктаза (GR). (Kivrak et al, 2017) Коначно одржавање GSH-GSSG односа је најважније за одбрану ћелије од оксидативног оштећења. (Gajewska et al, 2022) Молекуларни механизам реакција кисеоника, укључујући место деловања антиоксидативних ензима у овом ланцу, приказани су на шеми 1.



Шема 1. Молекуларни механизам редокс реакција кисеоника.

Глутатион (GSH), поред својих бројних улога у ћелији, такође игра улогу у детоксикацији од ксенобиотика, укључујући и потенцијалне цитостатике. (Kennedy et al, 2020) Глутатион-С-трансфераза (GST) катализује реакцију конјугације глутатиона и ксенобиотика, што омогућава њихов транспорт ван ћелије (шема 2). (Dong et al, 2018)



Шема 2. Неутрализација лека (хемијског комплекса) са GSH помоћу GST ензима.

Сваки ћелијски одговор на промене је регулисан факторима транскрипције који активирају или утишају различите циљне гене. (Tonelli et al, 2018) Најважнији фактори транскрипције у одржавању редокс равнотеже су фактор 2 повезан са еритроидом 2 (NRF2), (Rajab et al, 2022) фактор 1 алфа индукован хипоксијом (HIF1α) (Kim et al, 2022; Seo et al, 2021) и нуклеарни фактор капа-појачивач-лаког ланца активираних Б ћелија (NF-κB). (Yu et al, 2021) Повећање синтезе ензима који имају антиоксидативне функције, промовишући адаптивне одговоре на повећану концентрацију ROS или примењене ксенобиотике, као и фаворизовање преживљавања ћелија, неке су од суштинских улога ових транскрипционих фактора. (Dong et al, 2018)

Развој рачунарских модела, који се у биолошким системима називају *in silico* методе, побољшао је истраживање биолошких система и унапредио знање о ћелијским механизмима. *In silico* модели могу пружити увид и предвиђања у понашању биолошких система где је експериментални приступ изазован или немогућ због неодговарајуће или

недостатка најсавременије опреме. (Yusuf, 2023) Остале предности *in silico* модела су у обезбеђивању бржег одговора биолошких система и смањењу броја изведених експеримената и на тај начин доношењу бољих решења из етичке перспективе. *In silico* модели се могу развијати у различитим размерама. Додавање *in silico* модела са више скала је посебно корисно у решавању проблема скалирања и трансфера технологије са *in vitro* на *in vivo* приступ. *In silico* модели са више скала могу послужити и као платформа за тестирање постојећих и нових лекова, што доводи до смањеног нивоа ослобађања токсичности и изложености. (Chang et al, 2022)

6. Микрофлуидни чип уређаји

Обично су лекови против тумора истраживани коришћењем редукционистичких дводимензионалних (2Д) тестова или на животињским моделима. Међутим, као што је опште прихваћено, „равна“ биологија 2Д модела је превише поједностављена да би репродуковала сложене структуре и динамику природног туморског микроокружења. У овим условима, ћелије тумора реагују на лекове значајно другачије него *in vivo*. (Horning et al, 2008) Слично томе, слабу корелацију са људском физиологијом имају животињски модели, посебно са имунолошким системом. Поред тога, они су етички контроверзни и веома скупи. (Jensen and Teng 2020) Комбинација микрофлуидних алата и стратегија ткивног инжењеринга омогућила је развој напредних мултифункционалних платформи способних да поново креирају природно микроокружење тумора. (Carvalho et al, 2015; Sittampalam et al, 2015) Овакви типови биочипова су посебно погодни за истраживање многих динамичких догађаја који се могу јавити у метастатској каскади, као што је ефикасност лекова када се убризгавају у васкулатуру. (Carvalho et al, 2019a; Carvalho et al, 2018)

Модели 3Д култивације ћелија постају све популарнији у биомедицинској науци и скринингу лекова. (Gumuscu et al, 2017) Традиционални дводимензионални (2Д) системи су први коришћени у истраживању, као што су модели култивације ћелија *in vitro* у посудама за култивацију или микротитар плочама, Transwell култивација, модели формирања сфероида. (Ahn et al, 2017) Док 2Д једнослојно култивисане ћелије имају ограничене интеракције ћелија-ћелија које уводе велике промене у ћелијску физиологију, са друге стране постоји физиолошка разлика између животињских модела и људског тела, тако да *in vitro* системи ћелијске култивације и *in vivo* модели имају многе недостатке у тестирању потенцијалних лекова. (Trujillo-de Santiago et al, 2019; Nguyen et al, 2018; Ahn et al, 2017) Експериментални докази потврђују да се релевантне карактеристике и ефикасност фармацеутских једињења не могу правилно рекапитулирати у 2Д системима за ћелијску култивацију. *Ex vivo* тестови који предвиђају одговор на терапију могу попунити јаз између ових различитих модела. (Meijer et al, 2017) Lab-on-chip системи, који су се недавно појавили као моћни алати у истраживању, су микрофлуидни уређаји који имају за циљ да поново створе релевантне карактеристике физиологије. (Trujillo-de Santiago et al, 2019) Култивација „произведеног ткива“ на чипу је технологија у настајању са релативном једноставношћу узимања и доступности узорака. (Bower et al, 2017) Најчешћи микрофлуидни уређаји се производе од еластомера поли(диметилсилоксана) (ПДМС) и раде помоћу шприц-пумпи или перистолтичких пумпи са контролом динамике флуида. (Ahmed et al, 2016) Генерално, ови системи су уграђени у матрикс хидрогел, као што су колаген, Matrigel®, хидрогел на бази желатина, алгинат, итд, кроз које је могућа дифузија хранљивих материја и кисеоника из канала који имитирају капиларну мрежу у органоидна ткива. (Ko et al, 2022; Nahak et al, 2022)

Интеграција fine контроле флуида у платформу са 3Д одељцима напуњеним хидрогелом у унутрашњости, развила је нови приступ за мимикрију физиологије. (Gumuscu et al, 2017) Студије Organ-on-a-chip показале су важност производње физиолошки релевантних микроокружења у односу на системе плоча бунара са статичким протоком. (Cunha-Matos et al, 2016)

6.1 Organ-on-a-chip

Organ-on-a-chip (ООС) системи су изазвали огромно интересовање истраживача због њихове способности за праћење физичких параметара у реалном времену, опонашањем *in vivo* микроокружења, и добијањем прецизних одговора на ксенобиотику, тј. резултата ефикасности и токсичности лека, у односу на конвенционалне дводимензионалне (2Д) и тродимензионалне (3Д) култивације ћелија. (Nithin et al, 2023; Nolan et al, 2023)

Недавна запажања представљају доказ концепта да су минијатуризовани микрофлуидни 3Д модели људског ткива и органа моћне платформе за проучавање *ex vivo* функционалних јединица неких органа (нпр. јетра, црева), специфичних биолошких процеса (нпр. ангиогенеза), тумора са његовим микроокружењем и за претклиничка испитивања лекова. Интеграција fine контроле флуида у платформу са одељцима хидрогела напуњеним 3Д ћелијама, развила је нови приступ за мимикрију ткива. Студије орган-на-чипу су показале важност производње физиолошки релевантних микроокружења у односу на системе плоча-бунара са статичким протоком. (Lim et al, 2023; Mandrycky et al, 2021; Young et al, 2021)

Израда модела „више органа на чипу“ (‘multi-organ-on-chip’ - МОС) може да се оствари повезивањем одвојених комора органа заједно како би личили на идеалан фармакокинетички или фармакодинамички модел за праћење сложених интеракција између више органа и резултирајућих динамичких одговора на фармацеутска једињења. Физиолошки засновани фармакокинетички модели могли би да се користе за квантитативно описивање апсорпције, дистрибуције, метаболизма и излучивања (АДМЕ) лека који се користи. (Sung, 2021; Shinha et al, 2020)

У блиској будућности, системи орган-на-чипу обећавају да ће бити моћни покретачи персонализоване/прецизне медицине и скрининга лекова како би се усмеравало доношење одлука о лечењу. Нови 3Д системи се могу прилагодити тако да реконструишу скоро све важне биолошке и физиолошке параметре својих *in vivo* одговарајућих парњака. Даља размишљања о повезивању вишеструких модела органоида, на сличан начин на који су распоређени *in vivo*, могу пружити анализу мултиорганских интеракција чинећи систем тело-на-чипу (body-on-chip) упоредивим са целим људским телом. (Kimura et al, 2018; Mahler et al, 2016)

„Organ-on-chip“ технологија је на почетку развоја и сваки допринос овој теми у овом тренутку од велике је важности за каснију имплементацију у претклиничким и клиничким истраживањима.

6.2 Lab-on-chip

- *Lab-on-chip систем у single cell анализи*

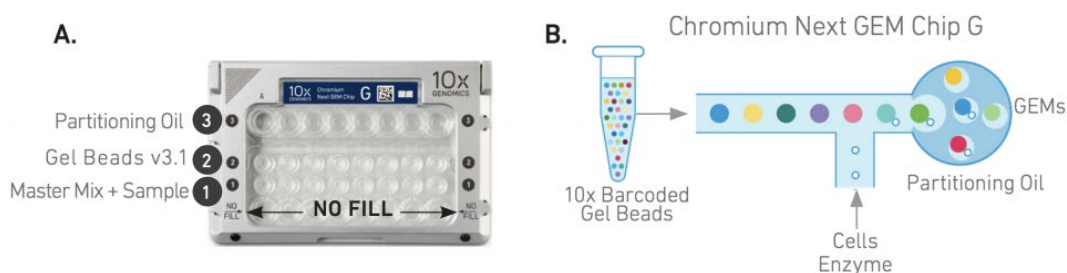
Микрофлуидика капљица је веома важна грана микрофлуидне технологије у којој се две течности које се не мешају стављају у унапред дизајниране микрофлуидне канале,

а брзина протока се контролише да пресече две фазе на месту њиховог састанка. Овим процесом може да се формира десетине хиљада хомогених капљица. (Li et al, 2023) Брзина стварања капљица и величина могу се контролисати двофазном брзином протока, а најмање капљице могу бити на микро- или чак нано-метарској скали. Свака капљица делује као посебан реактор изолован од спољашњег окружења. Због тога се микрофлуидика капљица, као платформа за скрининг високе пропусности са великим потенцијалом, широко користи у кинетици ензимске реакције, ћелијској култивацији, детекцији и анализи нуклеинских киселина, кристализацији протеина и многим другим пољима. (Jiang et al, 2023; Liu et al, 2022; Postek and Garstecki, 2022; Ou et al, 2021)

Капљице се могу генерисати коришћењем две течности које се не мешају, од којих је једна одвојена од друге силама смицања. (Vladislavjevic et al, 2013; Stone et al, 2004) Уљана фаза (континуирана фаза) и водена фаза (диспергована фаза) сусрећу се на улазу у заједнички каналић. Због немешања ове две течности и дизајна споја канала на микрофлуидном чипу, једна течност се обликује у капљицу унутар друге течности. Под комбинованим ефектом силе смицања уљане фазе и притиска водене фазе, део водене фазе се стисне и на крају пресече на мале капљице. (Zhao and Middelberg, 2011; Garstecki et al, 2006)

Код Lab-on-chip система у single cell анализи за добијање појединачних ћелија за даљу анализу, узорци од интереса се стављају у Chromium Chip G где системом комбинације микроканала долази до генерисања Gel Beads у емулзији (ГЕМ). ГЕМ-ови се генеришу комбиновањем појединачних ћелија са бар кодом за обележавање ћелија и капљицама гела. Да би се постигла резолуција сваке појединачне ћелије, ћелије се пипетирају у ограниченом разблажењу, тако да доста генерисаних ГЕМ-ова уопште не садржи ћелију, док остатак углавном садржи једну ћелију (синглет).

За генерисање Gel Beads у емулзији треба прво пипетирати назначене реагенсе у наведене редове: почевши од реда означеног са 1 где се пипетира Master Mix, након чега следи ред означен са 2 где иду Gel Beads и ред 3 где иде уље за раздвајање. Не треба пипетирати никакве реагенсе у доњи ред са ознаком NO FILL. Овако припремљен чип систем се убацује у Chromium машину где у микрофлуидним каналима долази до тачно одређеног мешања пипетираних састојака и настанка појединачних капљица уља које садрже по једну обележену ћелију.



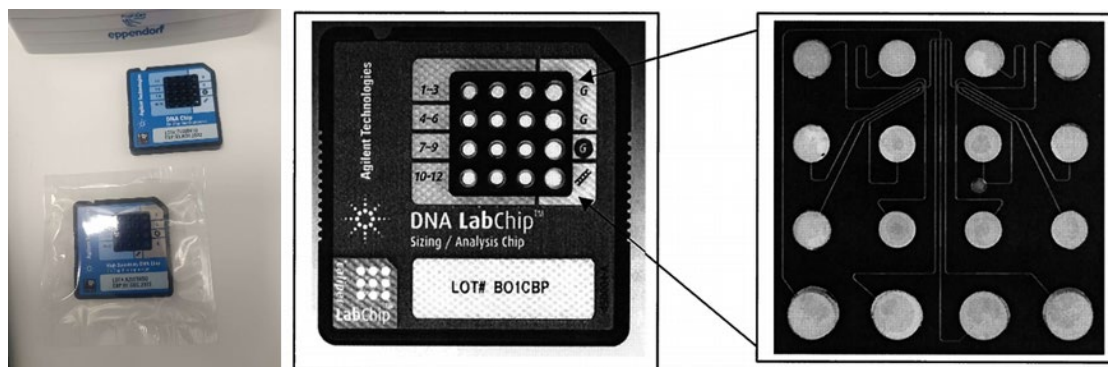
Слика 1. Lab-on-chip систем у single cell анализи. (линк 4)

- *Lab-on-chip систем за капиларну електрофору*

Високоосетљива ДНК електрофора на чипу омогућава побољшану анализу контроле квалитета размаза библиотеке за секвенцирање следеће генерације (NGS) добијених из само неколико циклуса амплификације. Било да су фрагментисане ДНК или библиотеке секвенцирања ДНК, Биоанализатор ДНК на чипу високе осетљивости поуздано одређује величину и квантификује ограничене узорке у ниском опсегу концентрација pg/ μ L. (Agilent Technologies User Mannual, 2013)

Поред контроле квалитета узорака за библиотеке секвенцирања следеће генерације, овакви високоосетљиви ДНК тестови се често користе и за PCR анализе ампликона, мултиплекс PCR ампликоне, анализу генске експресије помоћу RT-PCR, анализу рестрикционих фрагмената и детекцију циљаног цепања у студијама за едитовање гена. Тачност је обезбеђена широким линеарним динамичким опсегом и нормализацијом на унутрашње маркере и лествице.

Електрофореза ДНК на чипу изводи се на Agilent 2100 Bioanalyzer-у у комбинацији са Agilent високоосетљивим ДНК комплетом, према водичу за комплет ДНК високе осетљивости. Сваки ДНК чип садржи међусобно повезан скуп микроканала који се користи за одвајање фрагмената нуклеинске киселине на основу њихове величине, док се провлаче кроз њега преко електрофорезе. Сваки чип за електрофорезу ДНК има 11 места за пипетирање узорака, место за пипетирање ледера, као и места за пипетирање гела за електрофорезу. За тачно одређивање концентрације ДНК код NGS библиотека, укупна концентрација ДНК у узорцима мора бити између 100 pg/μl до 10 ng/μl. За тачно одређивање концентрације ДНК код PCR узорака, укупна ДНК у узорку мора бити између 5 – 500 pg/μl. Ако је концентрација узорка већа, онда их треба разблажити.



Слика 2. Lab-on-chip систем за капиларну електрофорезу

Главне карактеристике оваквих система на чипу су:

- ✓ Повећана осетљивост за анализу ДНК, до 5 pg/μl за анализу фрагмената или 100 pg/μl за сложене ДНК узорке, као што су NGS библиотеке;
- ✓ Широк линеарни динамички опсег који омогућава детекцију мање заступљених PCR производа;
- ✓ Тачна анализа размаза у оквиру одређеног опсега величина од интереса;
- ✓ Повећана прецизност величина, нормализована на унутрашње маркере и спољашње ледере;
- ✓ Тачност квантификације и поновљивост резултата према прецизним интерним стандардима;
- ✓ Потребна је минимална потрошња узорка јер је за анализу потребан само 1 μl узорка;
- ✓ Минимална изложеност опасним материјама, као што је етидијум бромид, обезбеђује сигурност;
- ✓ Остварује побољшану анализу контроле квалитета размаза библиотека за секвенцирања (NGS) добијених из само неколико циклуса амплификације;

- ✓ Побољшани квалитет ДНК ће побољшати исход низводне анализе секвенцирања, максимизирајући ефикасност протока уз минимизирање трошкова по узорку. (Zhu et al, 2022; Agilent Technologies User Mannual, 2013)

7. Наночестице

Нанотехнологије представљају нову врсту технологија које се заснивају на материјалима реда величине малих молекула, као и инструментација која је способна да такве материјале карактерише, да са њима манипулише по жељи независно од уобичајних спонтаних хемијских реакција међу атомима и молекулима, и да на принципима самоорганизације изграђује класичне, квантне и интелигентне наноматеријале и системе. (Koruga, 2006)

Основне предности нанотехнологије везане су за унапређење производње система за пречишћавање воде, енергетских система, унапређење наномедицине, производње хране, аутоиндустрије итд. Зато „нанооптимисти“ процењују да ће нанотехнологија омогућити производњу обиља чисте воде, атомски инжењеризовану храну, јефтинију и већу производњу енергије, чисту индустрију, боље формулације лекова, дијагностику и замену органа, много веће складиштење информација и веће комуникационе капацитете, интелигентну примену информација итд. Поред предности, примена нанотехнологија укључује у себи различите, до данас непознате, ризике везане за човекову околину, здравље, и различите друге негативне ефекте примене наночестица. (Stern and McNeil, 2008)

Са становишта утицаја на здравље разликујемо три типа наноструктуре: наноконпозите, наноструктурно дизајниране површине и наноконпоненте где су наночестице које су уграђене у материјал фиксирани или слободне. Слободне наночестице су опасне, могу бити проста или комплексна једињења где су наночестице појединачних елемената прекривене са другом супстанцом (прекривене наночестице или „core-shell“ наночестице). Њихова токсичност је још увек непозната и нема везе са токсичношћу макроматеријала. Прах или течност који садрже наночестице готово никада нису монодисперзни и садрже неку расподелу што још више компликује анализу ризика јер веће наночестице имају другачије особине у односу на мање. Наночестице показују и тенденцију агрегирања, а агрегати немају исте особине у поређењу са индивидуалним наночестицама. У развијеним земљама света бригу о здрављу и о околини, везано за испитивања утицаја наночестица, воде националне институције за здравље и сигурност околине и комисије за сигурност потрошача. (Utell and Frampton, 2000)

Наночестице су већ деценијама у употреби, међутим, у последњој декади значајни напори усмерени су ка развоју таквих наночестица које носе токсичан лек и специфично таргетирају туморско ткиво, као нпр. оне које имају повећани афинитет према киселој средини и ту испоручују супстанцу коју носе. С друге стране, слободни лекови су веома неспецифични у деловању, што утиче и на њихову ефикасност. С тим у вези, наномедицина у лечењу тумора је данас у великој експанзији, и наночестице добијају све већу пажњу у истраживању циљаног третмана ове болести.

Подела наноматеријала на основу величине

Да би један материјал био наноматеријал, потребно је да његов раст буде ограничен на нанометарском нивоу по једној, две и/или три димензије. Поделу наноматеријала на основу величине предложили су Pokropivny и Skorokhod, 2007:

- нултодимензионалне (0Д, све димензије мање од 100 nm),
- једнодимензионалне (1Д, бар једна димензија већа од 100 nm),
- дводимензионалне (2Д) и
- тродимензионалне (3Д).

Постоје различити морфолошки облици 1Д наноструктуре, од којих су у најчешће проучавани: нановлакна (нановлакна), наноножице (наножице), нанотраке (нанопојаси), нанопрстенови (нанопрстенови), наношипке (наношипке) и наноцеви (наноцеви). (Conde et al, 2014)

Подела наноматеријала на основу хемијског састава

На основу хемијског састава, наноматеријале делимо на органске и неорганске. Органске наночестице могу бити различитог хемијског састава попут липозома, дендримера, полимера, мицела, емулзија или њихових комбинација. У органске спадају и карбонски наноматеријали. Међу најзначајнијим су нанодијамант, фулерен C₆₀, угљеничне наноцеви и нановлакна. Угљенични наноматеријали могу бити у облику цеви или у облику шупље сфере или елипсоида, и тада се називају фулерени. Неоргански наноматеријали су честице базиране на металним оксидима: цинк-оксид, гвожђе-оксид, титанијум-диоксид, као и на металима попут злата, сребра, гвожђа или кобалта.

Физичка и хемијска својства материјала изузетно се мењају када се број атома који чине материјал знатно смањи, па тако и у нано величини, злато више није жуте боје и може да има зелену, црвену, плаву и друге боје. Наночестице Au имају примену као умањивачи флуоросценције. (Conde et al, 2014)



Слика 3. Приказ врста наночестица.

Нанопластика су материјали који се у задње време доста испитују. Све већа производња пластике утиче да се након њене деградације, током различитих механичких, фото-оксидативних или биолошких процеса, стварају микро- и нано-честице пластике. Процењено је да ће до 2050-те године производња пластике достићи чак 33 милијарде тона. Употреба пластичних производа у свакодневном животу довела је до тога да честице пластике можемо наћи у ваздуху, земљи, води, храни и пићу. Нажалост, пластика

нано величине може проћи биолошке баријере, и може изазвати многе нежељене ефекте по људе. Неколико грама наночестица недељно људи унесу кроз различите изворе контаминације. Полистирен, синтетички полимер стирена, је један од највише коришћених врста пластике у свету. (Stojković et al, 2023; Nikolić et al, 2022; Bojić et al, 2020)

С друге стране, употреба полимерних дендримерских наночестица као носача токсичних супстанци или лекова може омогућити у значајној мери побољшање лечења различитих обољења. (Saw et al, 2022; Oliveira et al, 2010)

Наноонкологија

Конвенционални лекови су веома неспецифични, што угрожава њихову ефикасност. (Kasendra et al, 2018; Bhatia and Ingber, 2014) С тим у вези, нове стратегије у наномедицини тумора су такође у порасту. Наночестице које носе лек могу повећати специфичност лека ка циљаној локацији, смањити токсичност на здрава ткива, продужити полуживот лека у циркулацији, смањити количину и дозу лека, чинећи наночестице обећавајућим алатом за циљану испоруку лекова против тумора. (Palmerston et al, 2017; Haley and Frenkel, 2008) Недавни напредак у нанотехнологији је у великој мери утицао на област медицине, што је довело до открића у областима као што су превенција, дијагноза и терапија. То је резултирало појавом нове генерације наномедицине. Коришћење модерних наноплатформи, које поседују јединствена физичко-хемијска својства, има потенцијал да револуционарно промени лечење тумора, као и да побољша дијагностичке технике и технике снимања ћелија. Ове наноплатформе представљају нову класу алата у биомедицини који су дизајнирани за терапистичке сврхе. (Kesharwani et al, 2019)

Портфолио наночестица је огроман, са широким спектром величина, модификација површине, састава и хемијских својстава. Међу свим типовима наночестица, глобуларни полимерни молекули са језгром етилендиамина и граном полиамидоамина (РАМАМ), такође познати као дендримери, привукли су пажњу у истраживању тумора. (Carvalho et al, 2020) Ови дендримери су биокомпатибилни и неимуногени, а њихова величина се може ефикасно контролисати подешавањем броја грана. На пример, Г5 дендримери, који су величине око 5-8 nm, имају велики терапеутски потенцијал (Kesharwani et al, 2019) пошто лекови од интереса могу бити инкапсулирани унутар шупљина дендримера или ковалентно коњуговани са њима коришћењем одцепљивог линкера који је осетљив на специфичне услове, као што је кисели рН. (Mignani et al, 2021) Системи за испоруку лекова изазвани киселином су погодни за циљано лечење тумора јер могу да реагују на његово благо кисело микроокружење. (Zhu et al, 2018) Модификовањем површине дендримера одређеним шећерима, пептидима, антителима и другим лигандима као што су хијалуронска киселина и карбоксиметилхитозан (CMCht), могуће је створити циљане агенсе који се везују за специфичне рецепторе на ћелијама тумора. (Kesharwani et al, 2019)

С друге стране, комбинација РАМАМ дендримера, који су привукли посебну пажњу због својих јединствених својстава, и злата (Au), који је најчешће коришћени неоргански материјал у биомедицинске сврхе, довела је до развоја нанохибрида који имају потенцијал да револуционарно промене терапију и дијагнозу тумора. (Kesharwani et al, 2019) Способност Au да апсорбује рендгенско зрачење чини га корисним у терапији зрачења тумора, а може се користити и као контрастно средство за снимање у дијагностици компјутерске томографије (СТ), поред његових цитотоксичних или фототермалних ефеката. (Mignani et al, 2021; Zhu et al, 2018) Коначно, CMCht/РАМАМ

дендримери могу послужити као идеални вектори за различита хемијска једињења, (Oliveira et al, 2010) нудећи велики потенцијал као интрацелуларни носачи лекова, (Oliveira et al, 2008) посебно када су комбиновани са златом, (Saw et al, 2022; Li and Kono, 2018) и могу се истовремено користити и за циљану хемиотерапију и за дијагностику снимањем. (Zhu et al, 2018)

Истраживања у области наноонкологије су тренутно фокусирана на развој система за испоруку лекова који су осетљиви на промену рН вредности, имају цитотоксична једињења и могу да преносе дијагностичке информације и прате терапијски процес *in situ*. (Mignani et al, 2021; Zhu et al, 2018)

ОСНОВНЕ ХИПОТЕЗЕ

- Тетра- и пента- координисани хемијски комплекси злата (III) показују изузетан потенцијал у третману карцинома колона.
- Одабрани комплекси злата значајно нарушавају редокс равнотежу, изазивају смањење вијабилности и стимулишу процесе апоптозе испитиваних ћелија колоректалног карцинома, HCT-116.
- Синтетисане дендримерске наночестице и инкорпорација одабраних хемијских комплекса злата у њихову структуру представља изузетан транспортни систем за третман карцинома колона.
- Ослобађање активне супстанце из наночестица у киселој средини циљано делује на микроокружење тумора.
- Употреба микрофлуидног система за креирање 3Д структуре тумора омогућава бољи увид у процесе истраживања тумора и представља адекватну замену за *in vivo* експерименте у значајној мери.

СПЕЦИФИЧНИ ЦИЉЕВИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Циљеви ове докторске дисертације су:

- да се испитају потенцијално активна хемијска једињења у третману тумора, као и њихови молекуларни механизми деловања,
- примена наночестица као носача изабране супстанце на циљано место деловања,
- употреба нових 3Д система за побољшане могућности *in vitro* истраживања (tumor-on-chip технологија),
 - с тим у вези и поређење 2Д и 3Д модел система у овим истраживањима.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

1. Манипулација ћелијама у статичким 2Д условима

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), пеницилин/стрептомицин, трипсин-ЕДТА, ФБС (fetal bovine serum - FBS) и ПБС (phosphate-buffered saline - PBS) су добијени од Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). ДМСО (dimethyl sulfoxide) и МТТ (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) су добијени од Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Експерименти у статичким 2Д условима спроведени су на микротитар плочама са 96 бунарчића. 10.000 ћелија по бунарићу култивисане су 24 h у комплетном медијуму за раст, како би се залепиле на дно плоче. (Langdon, 2004) Након тога, третмани су додати у различитим концентрацијама и инкубирани су 24 или 72 h.

За претклиничка истраживања која су у садржају ове докторске дисертације је коришћено више типова ћелијских линија:

- HCT-116 је имортализована, адхерентна ћелијска линија колоректалног карцинома. Поседују епителну морфологију, има експримиране гене за трансформишући фактор раста $\beta 1$ и $\beta 2$, као и мутацију у кодону 13 за *ras* протоонкоген;
- SW-480 је имортализована, адхерентна ћелијска линија колоректалног аденокарцинома. Експрипиран јој је ген за епидермални фактор раста, и мутацију у кодону 12 за *ras* протоонкоген;
- MDA-MB-231 је имортализована, адхерентна ћелијска линија млечне жлезде аденокарцинома дојке. Изолована је из плеуре плућа као дериват метастатских промена. Има експримиране гене за епидермални фактор раста и трансформишући фактора раста алфа. Припада групи "троструко негативних карцинома дојке" (ER-, PR-, HER2-: не поседују рецепторе за естроген, прогестерон и епидермални фактор раста);
- HeLa је имортализована ћелијска линија, најстарија људска ћелијска линија и једна од најчешће коришћених. HeLa ћелије су издржљиве и имају висок капацитет пролиферације, што омогућава широку примену у научним студијама. Линија је изведена из ћелија карцинома грлића материце узетих од 31-годишње афроамеричке мајке петоро деце, по којој је линија и добила име;
- MRC-5 је имортализована, адхерентна ћелијска линија, добијена из здравих феталних фибробласта плућа. По морфологији је вретенастог облика, и одликује је веома брза пролиферација;
- HaCaT је спонтано трансформисана анеуплоидна имортализована ћелијска линија кератиноцита са коже одрасле особе. HaCaT ћелије се користе због свог високог капацитета за диференцијацију и пролиферацију *in vitro*.
- PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells) су мононуклеарне ћелије људске периферне крви, изоловане из периферне крви и идентификоване као свака крвна ћелија са округлим једром (тј. лимфоцити, моноцити, НК ћелије природне убице или дендритске ћелије).

Ћелијске линије HCT-116, MDA-MB-231 и MRC-5 су добијене из ECACC и ATCC банке ћелија, ћелијске линије SW-480 и HeLa добијене из ATCC банке ћелија, док су HaCaT ћелије добијене из CLS банке ћелија. Ћелије су узгајане у комплетном медијуму

– ДМЕМ, 10% феталног говеђег серума, антибиотици - 100 IU/ml пеницилина и 100 µg/ml стрептомицина, у посудама за култивацију ћелија од 75 cm², у контролисаној атмосфери од 5% CO₂ на 37°C. Медијум је мењан свака 3 дана, а ресуспендовање ћелија за експерименте је обављено пре него што се постигло 80% конфлуентности у посудама за култивацију ћелија.

2. Манипулација ћелијама у динамичким 3Д условима

За експерименте у динамичким 3Д условима коришћен је Matrigel® (хидрогел сличан екстрацелуларном матриксу) који је инјектиран у централну комору микрофлуидног чип уређаја. Ћелије коришћене у овим експериментима су НСТ-116 ћелије карцинома колоне (добијене из ЕCACC банке ћелија), као и РВМСс периферни моноклеари (изоловане из периферне крви здравог волонтера). Ћелије су ресуспендоване у концентрацији од 10×10^6 ћелија/ml. Након инјектирања у чип, ћелије са Matrigel-ом су остављене 30 мин на 37°C да се Matrigel повеже у гел. Ћелије су третиране током 24 или 72 h. Као контрола коришћене су ћелије у које је додат само ДМЕМ медијум. Екстракција ћелија из микрофлуидног чипа је изведена коришћењем раствора за опоравак ћелија (Cell Recovery Solution - Corning) током 60 мин на 4°C који раствара Matrigel® и ослобађа нетакнуте ћелије.

3. МТТ тест вијабилности ћелија и процена цитотоксичности третмана

МТТ тест је колориметријска метода којом се испитује раст и преживљавање ћелија, а може се користити за процену нивоа цитотоксичности неке супстанце. (Mosmann, 1983) Раствор МТТ (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) је жуто обојена тетразолијумова со, која се редукује када уђе у ћелије и изложи се деловању митохондријалне дехидрогеназе, па мења жуту боју у љубичасту боју (добива се љубичасти формазан). Мерење интензитета љубичасте боје, раствореног формазана у DMSO-у, врши се уз помоћ спектрофотометра на одређеној таласној дужини (оптимално на 550 nm). Ћелије се засеју у велику посуду за култивацију ћелија (75 cm²) са 15 ml комплетног медијума – ДМЕМ (Dulbecco's Modified Eagle Medium) са додатком 10% феталног телећег серума (Fetal Bovine Serum), и гаје се у инкубатору под контролисаним условима (5% CO₂ и 37°C). Након неколико пасажирања, ћелије се засеју на микротитар плоче са 96 бунарића. У сваки бунарић се засеје по 10.000 ћелија са додатком медијума до 100 µl. Да би се ћелије залепиле за подлогу, инкубација траје 24 h до третирања.

По истеку времена инкубације, контролним ћелијама се замени медијум (100 µl), а осталим ћелијама се дода по 100 µl третмана, свака концентрација у 6 поновака (бунарића). Ћелије се даље инкубирају у присуству третмана 24, односно 72 h, у инкубатору под истим условима.

Након истека времена третмана, аспирира се садржај из бунарића, и свим ћелијама (и контролним и са третманима) додаје се 25 µl МТТ раствора у концентрацији 5 mg/ml, и по 100 µl медијума. Након додавања МТТ раствора, плоча се инкубира још 2-4 h (оптимално 3 h) на 37°C у CO₂ инкубатору. По истеку периода инкубације, аспирира се МТТ раствор и дода 150 µl DMSO (Dimethyl Sulfoxide) у коме се формазан раствара. Интензитет љубичасте боје, односно апсорбанце, мери се на ELISA читачу (RT/21000C) или на спектрофотометру (Multiskan SkyHigh UV/Vis спектрофотометар - Thermo Fisher

Scientific) на 550 nm. Вредности добијених апсорбанци, индиректно указују на број живих ћелија, односно на интензитет ћелијске респирације.

Однос апсорбанци ћелија у третманима и апсорбанци ћелија у контроли помножен са 100 представља проценат живих ћелија. Рачуна се средња вредност 6 бунарића/поновака, или за по 3 поновка/бунарића у 2 експеримента. Цитотоксичност третмана процењује се на основу добијених вредности за број вијабилних ћелија након третмана (изражено у процентима) у односу на нетретиране контролне ћелије. Инхибиторна доза која убија половину од укупног броја ћелија назива се IC_{50} вредност. Предстаља меру ефикасности једињења у инхибицији биолошке или биохемијске функције. Рачуна се из криве дозне зависности коришћењем софтвера CalcuSyn (BIOSOFT, Cambridge, UK). Ова квантитативна мера показује која концентрација одређеног лека или друге супстанце (инхибитора) је потребна да инхибира пролиферацију ћелија за 50%. (Petrović et al, 2021; Šeklić et al, 2018)

4. Тестови квантификације ROS и RNS

У овим тестовима, 30.000 НСТ-116 ћелија су засејане у плоче са 96 бунарића и после 24 h третиране са 100 μ l испитиваних супстанци у концентрацијама од 0.1 - 1 - 10 - 50 μ M, а након 24 и 72 h извршено је мерење.

• НБТ тест: одређивање супероксидног анјонског радикала

Спектрофотометријски тест за одређивање супероксидног анјонског радикала, $O_2^{\cdot-}$, заснива се на мерењу апсорбанције нитроплавог-формаза који је резултат редукције НБТ (Nitro Blue Tetrazolium Chloride) у присуству $O_2^{\cdot-}$ (Auclair and Voisin, 1985). $O_2^{\cdot-}$ је процењен додавањем 10 μ l НБТ (5 mg/ml ПБС) и 100 μ l комплетног медијума, инкубираних у контролисаним условима 3 h. Затим су ћелије испране ПБС-ом и измерене на ELISA читачу или UV-Vis спектрофотометру на 630 nm након додавања 100 μ l раствора КОН и 100 μ l DMSO. Нетретиране ћелије су служиле као негативна контрола.

• Гриесов тест: одређивање нитрита

Спектрофотометријска детекција нитрита, који се могу сматрати индикаторима азотног оксида, (Griess, 1879) заснива се на реакцији диазотације нитрита, сулфаниламида и NED (1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride). Поступак укључује коришћење 50 μ l супернатанта из плоча са 96 бунарића, додавање 50 μ l свеже припремљеног 1% сулфаниламида (раствореног у 5% фосфорној киселини) и 50 μ l свеже припремљеног 0.1% NED раствора. Овако припремљена реакциона смеша се мери на ELISA читачу или UV-Vis спектрофотометру, а нетретиране ћелије су сматране контролом. Пурпурни диазо производ је спектрофотометријски детектован на 492 nm.

• Одређивање концентрације водоник пероксида (H_2O_2)

Базира се на оксидацији фенол-црвеног у присуству пероксидазе рена (HRPO) као катализатора. Ћелије су избројане, лизирани и супернатант је, након центрифуге, одвојен. Додато је 100 μ l реакционе смеше која садржи фенол-црвено и HRPO ензим типа 2 и остављено да се инкубира 1 h на 37°C. Реакција је заустављена са 10 μ l раствора натријум хидроксида, а апсорбанца је измерена на 600 nm. (Pick and Keisari, 1980)

5. Испитивања неензимских антиоксиданата

У овим тестовима, 30.000 НСТ-116 ћелија су засејане у плоче са 96 бунарића и после 24 h третиране са 100 μl испитиваних супстанци у концентрацијама од 0.1 - 1 - 10 - 50 μM , а након 24 и 72 h извршено је мерење.

• Редуковани глутатион (GSH)

Одређује се методом описаном код Rahman et al, 2007, на основу оксидације GSH са 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) – DTNB. Ћелије су избројане, лизирани и супернатант је одвојен. 160 μl 0.3 M Na_2HPO_4 и 20 μl 0.04% DTNB додато је у 20 μl супернатанта. Жути производ, 5'-тио-2-нитробензојева киселина, мери се на 405 nm након 10 минута инкубационог периода помоћу ELISA читача или UV-Vis спектрофотометра. Нетретиране ћелије су сматране контролом.

• Оксидовани глутатион (GSSG)

Концентрације оксидованог глутатиона одређене су након ензимске реакције са глутатион редуктазом. (Rahman et al, 2007) Ћелије су избројане, лизирани и супернатант је одвојен. У 50 μl супернатанта прво је додат 1 μl 4-винилпидина, а затим је додато 100 μl главне мешавине која садржи ензим глутатион редуктазу, NADPH, DTNB и фосфатни пуфер, pH 7.4. После 10 минута инкубације, мерена је апсорпција на 405 nm на ELISA читачу или UV-Vis спектрофотометру. Нетретиране ћелије су сматране контролом.

6. Тестови антиоксидативних ензима

За ове тестове претходила је припрема НСТ-116 ћелија у Т25 флашковима. Након третмана у опсегу концентрација од 0.1 - 1 - 10 - 50 μM , а након 24 и 72 h, ћелије су пребачене у суспензију и избројане. Затим је уследило лизирање ћелија 30 минута у замрзивачу уз присуство пуфера за лизирање, и лизат је даље коришћен за рад. (Ognjanović 2012, Ognjanović 2010)

Активност ензима је приказана као промена апсорбанце у јединици времена по милилитру ћелијске суспензије. Апсорбанце су мерене UV-Vis спектрофотометром на одређеним таласним дужинама за сваки ензим посебно. За израчунавање активности ензима користила се апсорбанца узорка у поређењу са апсорбанцом узорка слепе пробе.

• Супероксид дисмутаза (SOD)

Активност супероксид дисмутазе је одређена методом као што су описали Marklund and Marklund (1974), на основу способности овог ензима да инхибира спонтану аутооксидацију пирогалола супероксидним анјонским радикалом ($\text{O}_2^{\cdot-}$) у алкалној средини. Активност је мерена UV-Vis спектрофотометром на 420 nm.

• Глутатион пероксидаза (GPx)

Активност глутатион пероксидазе је одређена методом као што су описали Maral et al (1977). Принцип методе заснива се на способности GSH-Px да катализује оксидацију

GSH у GSSG и редукцију великих количина хидропероксида. Апсорпција је мерена UV-Vis спектрофотометром на 340 nm, у поређењу са слепом пробом.



Шема 3. Молекуларни механизам оксидације глутатиона.

• Глутатион редуктаза (GR)

Активност глутатион редуктазе одређена је методом као што су описали Glatzle et al (1974). Метода се заснива на капацитету GR да катализује редукцију GSSG у GSH користећи никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADPH) као супстрат за истовремену оксидацију до NADP^+ . Апсорпција је мерена UV-Vis спектрофотометром на 340 nm, у поређењу са слепом пробом.



Шема 4. Молекуларни механизам редукције глутатиона.

• Глутатион-С-трансфераза (GST)

Активност глутатион-С-трансферазе да катализује реакцију између 1-хлоро-2,4-динитробензена (CDNB) и сулфхидрил групе (-SH) редукованог глутатиона мерена је према методи коју су описали Habig et al (1974). Промена апсорпције је мерена UV-Vis спектрофотометром на 340 nm, у поређењу са слепом пробом.



Шема 5. Молекуларни механизам реакције 1-хлоро-2,4-динитробензена и редукованог глутатиона.

7. Анализа ћелијске смрти

Смрт HCT-116 и MDA-MB-231 ћелија је испитана након двоструког бојења ћелија са акридин оранж / етидијум бромидом (АО/ЕБ), при чему је процењена ћелијска морфологија и специфични обојени флуоресцентни сигнал. (Baskić et al, 2006) Акридин оранж улази и у живе и мртве ћелије, и када се веже за двоструке ланце нуклеинских киселина (ДНК) емитује зелену флуоресценцу, или емитује црвену флуоресценцу ако се веже за једноланчану нуклеинску киселину (РНК). Етидијум бромид улази само у мртве ћелије и емитује црвену флуоресценцу везивањем за ДНК. Анализом се добија проценат живих ћелија, ћелија у раној и касној апоптози, као и проценат некротских ћелија.

Ћелије су засејане (10.000 ћелија по бунарићу) у плочу са 96 бунарића и након 24 h инкубације третиране са 100 μl комплекса злата (1, 10 и 50 μM), док је само медијум коришћен за контролне ћелије. Након истека времена третмана додаје се на медијум, без аспирирања, по 10 μl акридин оранжа и по 10 μl етидијум бромида. Ћелије (и контролне и са третманима) су одмах посматране под флуоресцентним микроскопом (Ti-Eclipse,

Nikon) при увећању од 400 х. У зависности од емитоване флуоресцентне боје и морфолошког аспекта (кондензације хроматина у обојеним нуклеусима), можемо разликовати четири типа ћелија:

- 1) Зелено једнолично су обојене живе ћелије (VC – Viable cells);
- 2) Зелене нуклеусе имају ћелије у раној апоптози (још увек имају неразграђену нуклеусну мембрану, али је започето цепање ДНК), али се на микроскопу уочавају зелени фрагменти јер долази до кондензације и фрагментације хроматина (EA – Early Apoptotic);
- 3) Наранџасто или црвено једро са кондензованим или фрагментисаним хроматином имају ћелије у касној апоптози (LA – Late Apoptotic);
- 4) Униформне црвене боје су некротске ћелије које су кондензоване (NC – Necrotic Cells).

Најмање 600 ћелија по узорку је разматрано за обраду резултата. Проценци сваког типа ћелије су израчунати у односу на укупан број ћелија које су праћене.

8. Одређивање експресије протеина - имунофлуоресценца

Имунофлуоресценца је техника која користи за маркирање појединих ћелијских делова флуоресцентним бојама. Заснива се на принципу антиген-антитело. Специфичност антиген-антитело реакције нам омогућава да прецизно и тачно пратимо присуство, локализацију, као и дистрибуцију испитиваних протеина у ћелији или ткиву. Овом техником можемо да посматрамо и појединачне протеине, али и комплетне ћелијске структуре. Антитело је обележено флуоресцентном бојом која има различите таласне дужине екситације и емисије. Детекција вршимо флуоресцентним микроскопом са могућношћу мерења интензитета флуоресценце.

Имунофлуоресценца је коришћена за одређивање локализације, количине и дистрибуције специфичних протеина, биомаркера апоптозе – FAS рецептор и каспаза 9:

- anti-FAS-specific primary antibody (RD Systems, Minneapolis, USA);
 - secondary antimouse antibody conjugated with Cy3 (Thermo Scientific);
 - anti-CAS9-specific primary antibody (RD Systems, Minneapolis, USA);
 - secondary antimouse antibody conjugated with Alexa 488 (Thermo Scientific).
- (Milutinović et al, 2022)

НСТ-116 и MDA-MB-231 ћелије су засејане у плоче са 6 бунарчића на претходно стерилисаним покровним стаклима (5×10^4 ћелија по бунарићу). После конфлуентности од 70%, ћелије су третиране са 2 ml комплекса злата (1 и 10 μ M). Контролним ћелијама је додат само ДМЕМ. У следећем кораку се фиксирају и пермеабилушу ћелије, како би се осигурао слободан приступ антитела антигенима. Савршена фиксација би омогућила непокретност антигена, задржавајући аутентичност мобилних делова и субцелулару архитектуру. При томе је потребно дозволити несметан приступ антителима на све ћелије и пролазак кроз субцелуларне структуре. Широко опсега фиксатива се користи, а избор метода зависи од природе антигена који се испитује као и од својства антитела. Затим се ради ћелијско бојење, што подразумева инкубацију ћелија са припремљеним антителима. Невезана антитела се уклањају испирањем. Везана примарна антитела за које је флуоресцентна боја директно конјугована могу се одмах визуелизовати. Визуелизација је могућа и индиректна преко секундарних антитела за које је везана флуоресцентна боја.

Експресија протеина FAS рецептора је визуелизована помоћу секундарног Су3-конјугованог антитела (црвена флуоресценција), док је каспаза 9 обележена секундарним антителом конјугованим са Alexa 488 (зелена флуоресценција). Ниво ћелијске флуоресценције у контролним и третираним ћелијама мерен је флуоресцентном микрографијом користећи софтвер ImageJ (Wayne Rasband, ImageJ). (линк 5) Резултати се представљају као релативна флуоресценција по ћелији, при чему је узето за анализу најмање 30 ћелија по узорку.

9. Проточна цитометрија

Проточна цитометрија је коришћена за одређивање броја живих, апоптотичких (раних и касних) или некротичних ћелија. (Živanović et al, 2023) НСТ-116 ћелије су ресуспендоване у пуферу тако да се добије ћелијска суспензија концентрације $0.25 - 1 \times 10^6$ ћелија/ml. Експеримент се изводи у епруветама од 5 ml, у које су додати FITC обележен анексин и пропидијум јодид (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI, Cat.No: 640914, lot: B337692, BioLegend). После инкубације, на собној температури, на тамном месту, анализа се врши на проточном цитометру BD FACSVersе Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) детекцијом FITC боје и пропидијум јодида.

За квантитативно одређивање протеина везаних за апоптозу (BCL-2 и BAX) и протеина везаних за редокс статус ћелије (HIF1 α , NF- κ B и NRF2) урађена је анализа проточне цитометрије. НСТ-116 ћелије су култивисане у комплетном медијуму третираном комплексима злата (AK1 и AK2 у концентрацијама од 1 и 10 μ M) као што је претходно описано. После 24 и 72 h, ћелије су одвојене помоћу трипсин-ЕДТА раствора, а узорци су пребачени у епрувете за проточну цитометрију. Након испирања са ПБС, епрувете су центрифугиране на 400 g током 5 минута, а ћелије су фиксиране са CitoFix раствором током 20 минута. Затим су ћелије испране раствором PermWash, инкубиране са специфичним примарним моноклонским антителима 30 мин. Моноклонска антитела која су се користила:

1. BCL-2 Rabbit Polyclonal IgG Antibody (Cat.No: E-AB-60788, lot: EC2021, Elabscience),
2. BAX Rabbit Polyclonal IgG Antibody (Cat.No: E-AB-10049, lot: EC5205, Elabscience),
3. HIF1 alpha Rabbit Polyclonal IgG Antibody (Cat.No: E-AB-13555, lot: EC8713, Elabscience),
4. NF κ B-p65 Rabbit Polyclonal IgG Antibody (Cat.No: E-AB-32232, lot: DK7552, Elabscience),
5. NRF2 Rabbit Polyclonal IgG Antibody (Cat.No: E-AB-63485, lot: EC0720, Elabscience).

Ћелије су поново испране, инкубиране са флуорохром-конјугованим секундарним моноклонским антителима током 30 минута (PE Donkey anti-rabbit Polyclonal IgG (minimal x-reactivity) Antibody; Cat.No: 406421, lot: B326433, BioLegend) и поново суспендоване у ПБС. Суспензије ћелија су анализирани на BD FACSVersе Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) проточном цитометру.

10. Квантитативна ланчана реакција полимеразе у реалном времену (qRT-PCR)

qPCR тестови релативне експресије гена вршени су према лабораторијским протоколима углавном заснованим на MIQE смерницама (Bustin et al, 2009) и у складу са GLP (Good Laboratory Practice) стандардима за PCR детекцију и пропозицијама лабораторијске манипулације усмерене на узорке.

Манипулација узорком – Коришћене су НСТ-116 ћелије. Третман Аи-комплексима (АК1 и АК2 у концентрацијама од 1 и 10 μM) трајао је 24 или 72 h. Све екстракције РНК и процене концентрације су извршене одмах након узорковања. За сваку групу изоловане РНК, реверзна транскрипција је обављена одмах. Комплементарна ДНК (кДНК) је чувана на -20°C док сви узорци нису припремљени и спремни за qPCR детекцију релативне експресије гена.

Екстракција РНК – Укупна РНК је екстрахована у 1 ml TRIzol реагенса (Thermo Fisher Scientific) и 0.2 ml хлороформа према протоколу. Након раздвајања три фазе, узимамо горњу фазу која садржи укупну РНК за даљи рад. РНК се исталожи коришћењем 0.5 ml изопропанола, а затим се испере два пута у 1 ml 70% етанола. Затим се добијена РНК осуши на Thermoblock (HB120-S, DLAB Scientific), и на крају елуира и одржава у води без РНазе/ДНазе. За екстракцију РНК коришћена је Gyrozen центрифуга велике брзине, 1248R модел (Daejeon, Korea).

Квантификација РНК - Концентрација РНК је процењена на Multiskan SkyHigh UV/Vis спектрофотометру са $\mu\text{Drop}^{\text{TM}}$ Duo Plate (Thermo Fisher Scientific) на 260 nm. Принос је био оптималан са односом A_{260}/A_{280} између 1.75 и 2.0.

Реверзна транскрипција је изведена коришћењем NG dART RT комплета реагенаса (кат. бр. E0801-02, EURx Molecular Biology Products). Према предлогу произвођача, изолована и квантификована РНК је одмах реверзно транскрибована. Комплет реагенаса садржи модификовану реверзну транскриптазу са побољшаном термостабилношћу (до 65°C) и процесивношћу за синтезу кДНК ланаца. Укључени реагенси доказују минимизацију активности и процесивности РНазе. Укупна РНК је додата у количини од 1.5 μg у 1 μl олиго dT прајмера, 1 μl NG dART RT мешавине, 4 μl 5 x NG кДНК пуфера и воде без РНазе до 20 μl . Реакциона смеша је инкубирана на 50°C током 60 минута у Mic qPCR Cycler (Biomolecular Systems, Yatala, Australia), након чега је уследила коначна инкубација на 85°C током 5 минута ради деактивације ензима.

Табела 4. qPCR циљне информације.

Име циљаног гена	Скраћеница	Приступни број / Локус	Дужина ампликона	Секундарне структуре
B-cell CLL/lymphoma 2	<i>BCL-2</i>	NM_000633.3	154 bp	Нема
BCL-2-associated X protein	<i>BAX</i>	NM_138761.4	164 bp	Нема
Caspase 3	<i>CAS3</i>	NM_004346.4	150 bp	Нема
Caspase 8	<i>CAS8</i>	NM_001131750.4	203 bp	Нема
Hypoxia-inducible factor	<i>HIF1α</i>	NM_001243084.2	169 bp	Нема

Nuclear factor kappa-B	<i>NF-κB</i>	XM_047415744.1	196 bp	Нема
Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	<i>NRF2</i>	NM_001313903.2	160 bp	Нема
Glutathione peroxidase 1	<i>GPx1</i>	NM_001329503.2	159 bp	Нема
Glutathione peroxidase 2	<i>GPx2</i>	NM_002083.4	217 bp	Нема
Glutathione peroxidase 3	<i>GPx3</i>	NM_001329790.2	246 bp	Нема
Glutathione peroxidase 4	<i>GPx4</i>	NM_001367832.1	168 bp	Нема
Glutathione-S-transferase	<i>GST</i>	NM_000852.4	243 bp	Нема
Thioredoxin reductase 1	<i>TXNRD1</i>	NM_182743.3	163 bp	Нема
Beta-actin (Housekeeping)	<i>β-actin</i>	NM_001101.5	187 bp	Веома мало

qPCR прајмери - Прајмери за qPCR реакцију су дизајнирани и купљени од Thermo Fisher Scientific. Прајмери су DSL пречишћени и C18 десалинизовани, без модификација на крајевима.

Табела 5. Прајмери за qPCR

<i>BCL-2</i>	F 5'- gataacggaggctgggatgc -3'
	R 5'- gacttcacttgtgcccagat -3'
<i>BAX</i>	F 5'- gcttcagggttccatccagga -3'
	R 5'- caatcatcctctgcagctcca -3'
<i>CAS3</i>	F 5'- gcacctggttattattcttggc -3'
	R 5'- ggactcaaattctgtgccacc -3'
<i>CAS8</i>	F 5'- agagtctgtgcccacaaatcaac -3'
	R 5'- gctgcttctcttctgtgaa -3'
<i>HIF1α</i>	F 5'- acccatttctactcaggacaca -3'
	R 5'- tgctggaataactgtaactgtgct -3'
<i>NF-κB</i>	F 5'- cacaaggcagcaaatagacgag -3'
	R 5'- tgggaaattgtcagcaggctaa -3'
<i>NRF2</i>	F 5'- tgacaatgagggttcttcggct -3'
	R 5'- aatgtcctgttgcataccgtct -3'
<i>GPX1</i>	F 5'- catcagctgcccttctctctg -3'
	R 5'- aggaaggcgaagagagggtg -3'

GPX2	F 5'- caatttgacatcaggagaact -3'
	R 5'- aatgatgagcttgggatcggt -3'
GPX3	F 5'- cctaaagaactcctgtcctccc -3'
	R 5'- gatgagacggccttcagtact -3'
GPX4	F 5'- accaagttcctcatcgacaaga -3'
	R 5'- gtcattgagtgccggtggaag -3'
GST	F 5'- gccctacaccgtggtctatttc -3'
	R 5'- tccttcccatagagcccaag -3'
TXNRD1	F 5'- tcgaggagacagttaagcatga -3'
	R 5'- ttgttgcttaatcctgtgag -3'
β -ACTIN	F 5'- ctcaccctgaagtaccccatc -3'
	R 5'- aggtctcaaacatgatctggg -3'

qPCR протокол - За потребе qPCR реакције за одређивање релативне експресије гена, коришћен је the FastGene IC Green 2 x qPCR Universal Mix (кат. бр. LS41, NIPPON Genetics EUROPE, Düren, Germany). Овај комплет реагенса се заснива на коришћењу FastGene® IC Green као интеркалирајуће боје, која детектује само дволанчану ДНК. Према информацијама које даје произвођач, 100 ng кДНК је помешано са 10 μ l 2X FastGene® IC Green, 0.8 μ l директног и 0.8 μ l реверзног прајмера (10 μ M) уз додатак воде за PCR до 20 μ l qPCR реакције. Mic qPCR Cycler (Biomolecular Systems, Yatala, Australia) је коришћен за циклусну реакцију са додатним анализама топљења високе резолуције. Почетна денатурација је изведена на 95°C током 2 минута. Додатних 40 циклуса је укључивало по два корака: денатурацију на 95°C у трајању од 5 секунди и продужење ланца на 62°C током 30 секунди. Анализа топљења је извршена на крају 40 циклуса као доказ поступка производа реакције. Сваки qPCR тест је такође анализирао NTC (Non Template Control) контролну реакцију. Mic qPCR Cycler користи специјално дизајниране ултра чисте епрувете претходно напуњене силиконским уљем високог вискозитета да би се спречило испаравање. За све есеје у лабораторији коришћени су пипете са дуплим филтерима (Jeremić et al, 2023; Živanović et al, 2023; Papic et al, 2022)

Анализа података - Mic qPCR Cycler контролише интуитивни софтверски пакет micPCR v2.10.3 за добијање Ct вредности и накнадне анализе топљења. Пошто је доказано да не постоји један ген који је конститутивно испољен у свим типовима ћелија, (Andersen et al, 2004) за истраживање ћелија тумора бирамо β -актин као референтни ген. (Yang et al, 2020) Након анализе података, релативна експресија гена се израчунава употребом формуле $\Delta\Delta C_t$ методе. (Livak and Schmittgen, 2001) Експресија гена је нормализована у односу на *b-actin* (ендогену контролу), а затим израчуната њихова релативна експресија у односу на вредности контролних нетретираних ћелија.

11. Математички модел редокс статуса

У објашњеној шеми модела (шема 1 редокс статуса) узели смо у обзир концентрације SOD ензима и $O_2^{\cdot-}$ анјона да бисмо предвидели концентрацију H_2O_2 . Касније смо упоредили добијене вредности са онима измереним у 24 h и 72 h за контролно стање, као и за излагање различитим концентрацијама комплекса АК1 и АК2 (0.1, 1, 10, 50).

Почетне концентрације SOD, $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 смо добили уклапањем вредности (линеарне функције) на временску тачку $t = 0$ s из контролних мерења (када нису примењивани комплекси). У следећем кораку користили смо добијене почетне вредности из контролних мерења које се користе као и почетне вредности у случају примене комплекса АК1 или АК2 (по четири концентрације за сваки комплекс). Експериментална мерења смо прилагодили полиномским функцијама другог реда да бисмо проценили вредности ових компоненти у временском опсегу од 0 s до 72 h.

За предвиђање концентрације H_2O_2 коришћен је математички модел и добијени резултати су упоређени са процењеном полиномском функцијом из експерименталних мерења.

$$\frac{dH_2O_2}{dt} = k \cdot SOD \cdot O_{2ox}$$

Почетне вредности GPx, GR, GSH, GSSG и GST (у време = 0 s) се постављају из контролних мерних тачака у 24 h и 72 h (линеарне функције). Добијене почетне вредности у контролним мерењима се користе као и почетне вредности за мерења када су примењивани комплекси АК1 и АК2. Коришћењем прилагођених почетних вредности и оних измерених у временским тачкама 24 h и 72 h за примењене АК1 и АК2 добијају се полиномске криве за GPx, GR, GSH, GSSG и GST. Помоћу прилагођених једначина можемо проценити вредности у свим временским тачкама од 0 s до 72 h.

Дакле, након контролних мерења (без изложености тестираним комплексима) и мерења под различитим вредностима изложености АК1 (АК1=0.1, 1, 10, 50), можемо проценити вредности у временском опсегу прилагођавањем експерименталних вредности полиномским функцијама другог реда. С друге стране, математички модел који се може користити за процену GSH и GSSG у времену заснива се на би-би механизму за ензиме.

$$\begin{aligned} \frac{dGSHred}{dt} = & -2 \cdot \frac{5.7 \cdot GPx \cdot GSHred \cdot H_2O_2}{(KmGSH + GSHred) \cdot (KmH_2O_2 + H_2O_2)} + 2 \cdot \frac{0.001 \cdot GR \cdot GSSGox \cdot NADPH}{(KmGSSG + GSSGox) \cdot (KmNADPH + NADPH)} \\ & - \frac{GST \cdot Drug \cdot GSHred}{(KmDrug + Drug) \cdot (KmGSHkom + GSHred)} + \frac{1}{Drug^{0.1}} e^{\frac{4t}{T}} \cdot \frac{Vmax \cdot Drug}{(Km + Drug)} \end{aligned}$$

$$\frac{dGSSGox}{dt} = \frac{5.7 \cdot GPx \cdot GSHred \cdot H_2O_2}{(KmGSH + GSHred) \cdot (KmH_2O_2 + H_2O_2)} - \frac{0.001 \cdot GR \cdot GSSGox \cdot NADPH}{(KmGSSG + GSSGox) \cdot (KmNADPH + NADPH)}$$

12. Математички модел апоптозе у 2Д и 3Д условима

In vitro евалуација НСТ-116 ћелијске линије под утицајем хранљивих материја и кисеоника, нумерички је моделирана коришћењем сложеног хибридног модела који комбинује agent-based modeling (ABM) (Bull et al, 2020; Greene et al, 2015) и lattice Boltzmann методу (LBM) (Zhang et al, 2022; Chopard et al, 2009). ABM приступ је коришћен за моделирање понашања појединачних ћелија карцинома и њиховог преласка из једног стања у друго.

Када се свака ћелија створи, дефинишу се специфична временска трајања за ту одређену ћелију. Наиме, трајање ћелијског циклуса t_i се насумично бира из униформне расподеле унутар опсега $(0.75\tau, 1.25\tau)$, где τ представља параметар нумеричког модела који дефинише просечну дужину ћелијског циклуса. На сличан начин, трајање хипоксичног (t_{Hi}), некротичног (t_{Ni}) и апоптотског (t_{Ai}) стања сваке појединачне ћелије се одређује при стварању ћелије.

Прелаз у разматраним стањима очигледно зависи од концентрације хранљивих материја. Претпоставља се да је концентрација континуирана и да се може описати коришћењем једначине advection-diffusion, где је потрошња хранљивих материја од стране живих ћелија карцинома представљена као тачке понора унутар разматраног домена:

$$\frac{\partial \omega}{\partial t} + \nabla(\mathbf{u}\omega) = D\nabla^2\omega - \kappa\omega\delta(\mathbf{x} - \mathbf{x}_{Ci})$$

где ω означава концентрацију хранљивих материја, $\mathbf{u}$ означава брзину флуида, D је коефицијент дифузије, κ је брзина потрошње хранљивих материја појединачних ћелија, а делта функција осигурава да се све ћелије (са координатама $\mathbf{x}_{Ci}$) сматрају поменути тачкама понора.

Треба напоменути да је за случај 3Д модела решена комплетна једначина advection-diffusion, пошто хранљиве материје теку кроз микрофлуидну комору, док је за 2Д случај решена само једначина дифузије, пошто нема протока кроз микро-бунаре. У оба случаја, једначина је решена коришћењем LBM-а. Комбиновањем ABM-а и LBM-а на овај начин, иста дискретизација је примењена и за домен који разматра ћелије карцинома и за домен који израчунава концентрацију хранљивих материја.

Поступак недимензионализације је извршен слично као у Bull et al, 2020, тако да су сви параметри модела у свом недимензионалном облику. У овој студији, ово је извршено на овај начин, јер нас је занимала анализа промене параметара услед разматраних третмана, а не самих вредности.

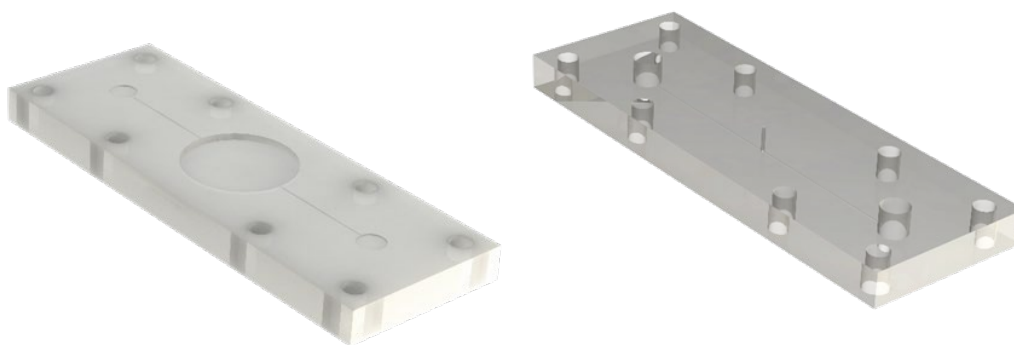
Генерално, хибридни нумерички модел представљен горе садржи 8 параметара: просечну дужину ћелијског циклуса τ , просечно трајање хипоксичног стања t_H , просечно трајање некротичног стања t_N , просечно трајање апоптотског стања t_A , вероватноћу да пролиферативна ћелија спонтано постане апоптотска α , праг концентрације хранљивих материја испод које пролиферативна ћелија постаје мирна ω_q , праг концентрације хранљивих материја испод које мирна ћелија постаје хипоксична ω_h , и брзину потрошње хранљивих материја појединачних ћелија κ . Ови параметри су процењени коришћењем експерименталних података за контролну ћелијску линију и за сваки разматрани третман, као и за 2Д и за 3Д модел. Поступак процене је спроведен у Matlab-у, комбиновањем генетског алгоритма (Holland, 1975) (који се користи за одређивање површине глобалног минимума) и Nelder-Mead simplex оптимизационог алгоритма како би се прецизније одредио минимум функције процене. (Nelder and Mead, 1965) Функција процене која је минимизирана је:

$$SE = (V_{24}^e - V_{24}^s)^2 + (V_{72}^e - V_{72}^s)^2$$

где горњи индекс е означава експериментално измерени проценат вијабилних ћелија, а горњи индекс s означава проценат вијабилних ћелија добијених у нумеричким симулацијама, а вредности су упоређене за два изабрана временска тренутка (24 и 72 h након третмана).

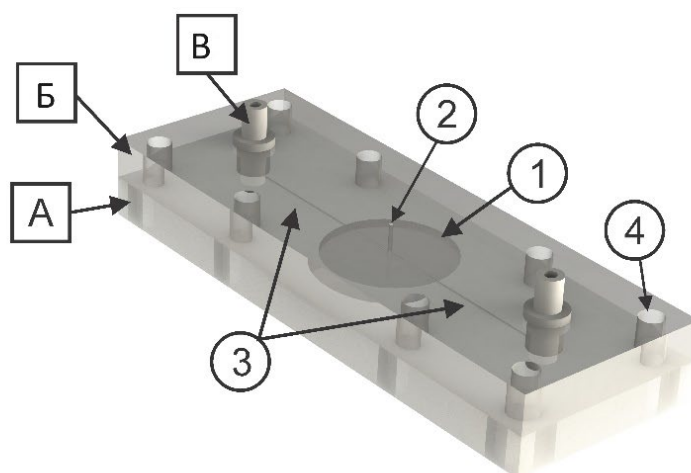
13. Израда акрилног микрофлуидног чип система (ИИТ КГ)

Развили смо микрофлуидни систем Lab-on-chip који је погодан за култивацију ћелија или примитивних ткива. (Milivojević Dimitrijević et al, 2026a; Milivojević et al, 2021a; Milivojević et al, 2021b) На слици 4 приказан је компјутерски дизајниран модел нашег чипа.



Слика 4. Компјутерски дизајниран модел.

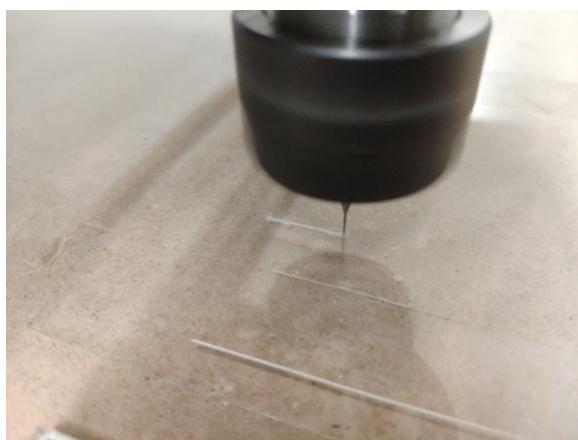
Чип је сендвич дизајна, састављен од две акрилне плоче дебљине 5 mm. Одабрани материјал је провидан за микроскопско праћење раста ћелија. Канали су пројектовани и глодани са унутрашње стране оба панела. За пројектовање и изградњу 3Д модела чипа коришћен је софтверски пакет SolidWorks 2020 CAD.



Слика 5. Чип: А - доњи део; Б - горњи део; В – прикључак з цевчице; 1 - главна комора; 2 - ваздушни стуб, за уклањање мехурића; 3 - канали за снабдевање.

Главне компоненте су: доња плоча (А - слика 5), димензија 30 mm x 70 mm и дебљине 5 mm. У овој плочи је изрезана цилиндрична главна комора за култивацију ћелија пречника 16 mm и дубине 0.8 mm, као и два доводна канала (3 – слика 5) са половином цилиндричног пресека пречника 0.25 mm. Друга половина канала је изрезана у горњој плочи (Б – слика 5) као и две рупе за наставке за цевчице. На крају сваког доводног канала причвршћени су цевни фитинзи (Ц – слика 5), а сврха је да се обезбеди лака веза између чипа и остатка експерименталне опреме (нпр. перисталтичке пумпе). Ови наставци су произведени поступком ФДМ 3Д штампања од ПЛА материјала. Коришћен је Creality 3D CR-10 MAX штампач, са висококвалитетном штампом (дебљина слоја 0.1 mm). Такође, на плочама су избушене рупе пречника 3 mm (4 – слика 5) ради лакшег причвршћивања.

Процеси глодања се изводе на домаће произведеном 3Д ЦНЦ рутеру – 3Д ЦНЦ глодалици. Ова машина је дизајнирана за веома прецизан рад са уграђеном глодалицом са воденим хлађењем од 2,2 KW. Ова глава обезбеђује макс. 24000 rpm. За аксијално прецизан (са грешком од 0.01 mm на 100 mm) и робустан рад машине коришћен је хибридни систем. Сваком корачном мотору је додат високопрецизан енкодер, а за њихову контролу коришћени су хибридни драјвери корака са повратном спрегом. На овај начин се обезбеђује стабилан рад и превазилази проблем прескакања корака који се јавља код машина са класичним корачним моторима. За глодање већих комора и отвора на плочама коришћена је глодалица са 2 сечива и пречника 2 mm, док је за мале доводне канале коришћена жлеб са кугличним крајем и пречником 0.25 mm. Са дубином сечења од 0.25 mm обезбеђен је профил полуцилиндричног попречног пресека доводних канала (слика 6).



Слика 6. Процес глодања, жлеб са кугличним крајем 0.25 mm.



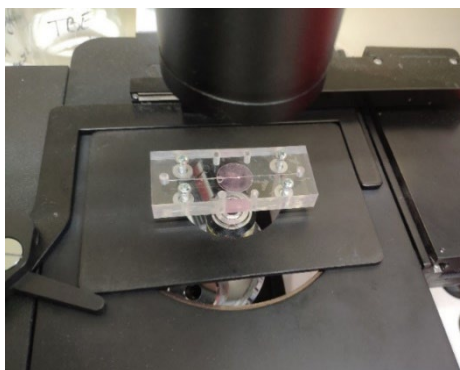
Слика 7. Прави модел након процеса глодања.

Када се чип повеже са перисталтичком пумпом, добијамо микрофлуидни систем са физиолошки релевантним микроокружењем за ћелије или ткива (слика 8). Перисталтичка пумпа обезбеђује фину контролу флуида која имитира услове у стварним *in vivo* системима, и на тај начин доводи до успешне пролиферације ћелија.



Слика 8. Чип повезан са перисталтичком пумпом са протоком.

Након засејавања ћелија у чип, и у присуству контролисаног протока медијума од 0.03 ml/min, ћелије су успешно култивисане. После 24 и 48 h експеримента са контролисаним протоком у инкубатору, ћелије у чипу су преживеле и неометано су пролиферисале.

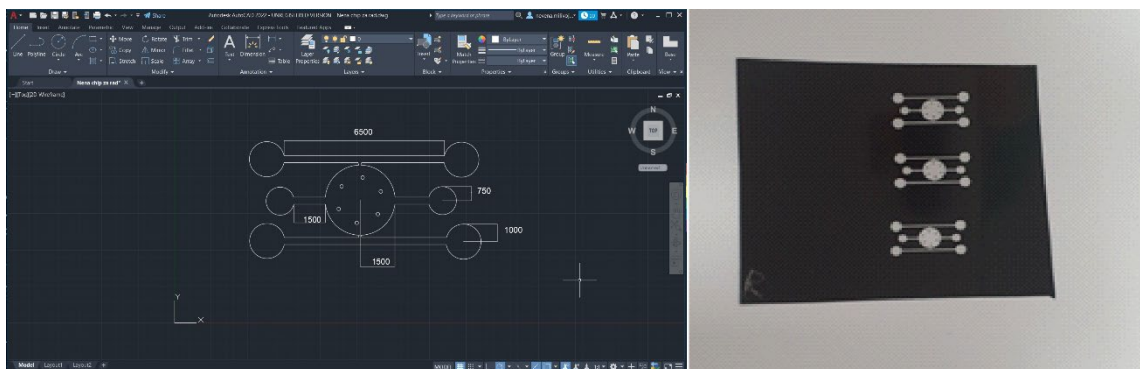


Слика 9. Снимање ћелија у чипу на микроскопу.

14. Израда ПДМС микрофлуидног чип система (ЗБс институт Португал)

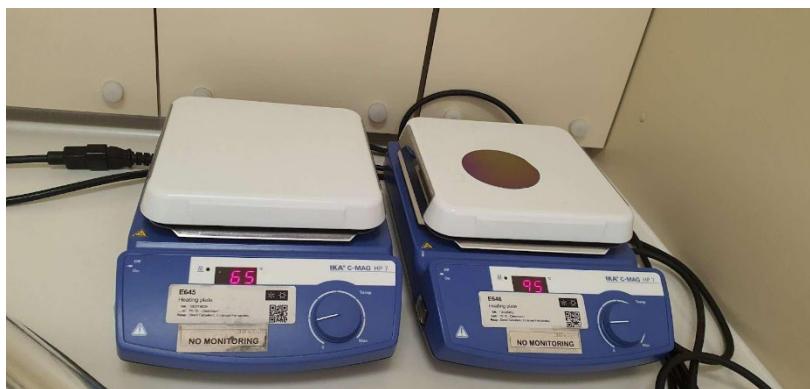
Карактеристике од интереса, као што су коморе и микрофлуидни канали, прво су дизајниране помоћу софтвера за пројектовање помоћу рачунара (Auto CAD). Они су прецизно оцртани да би репродуковали жељени биолошки догађај или микроокружење који се проучава.

Процес израде почиње репродукцијом дизајна (тј. штампањем) у фотомаски од ацетата или хрома.



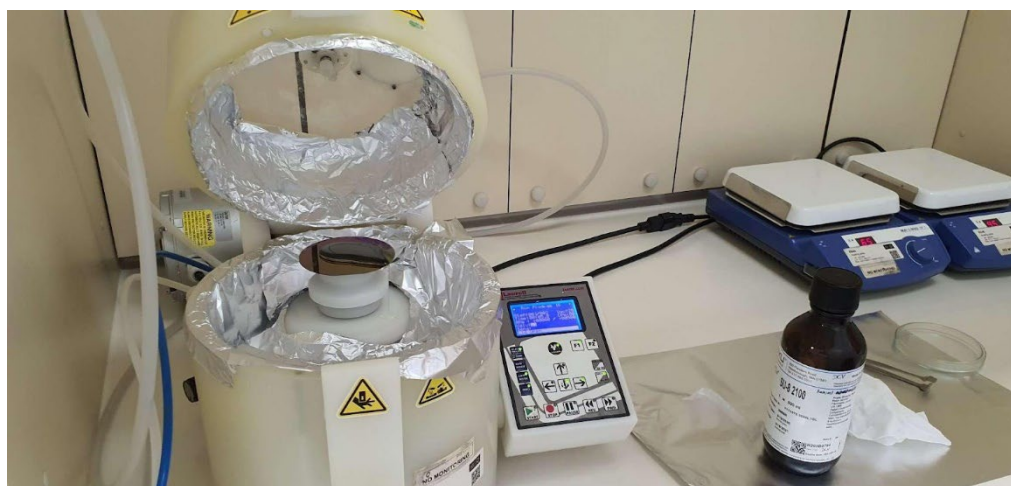
Слика 10. (Лево) Auto CAD дизајн. (Десно) Фотомаска.

Чиста вафла на бази силицијума се суши 15-30 min на 95°C, а површина вафла се активира у O₂ плазма реактору да би се побољшала адхезија фотосмоле.



Слика 11. Сушење вафле на 95°C.

Затим, СУ-8 фотоосетљива смола се центрифугира при одређеној угаоној брзини – произвођач фотосмоле даје детаљне информације о брзини центрифугирања у функцији жељене дебљине. Добија се потпуно раван слој смоле са добро контролисаном дебљином. СУ-8 се широко користи за микромашинску обраду због својих високих хемијских и термички стабилних карактеристика, између осталих смола које су такође доступне за UV-фотолитографију.



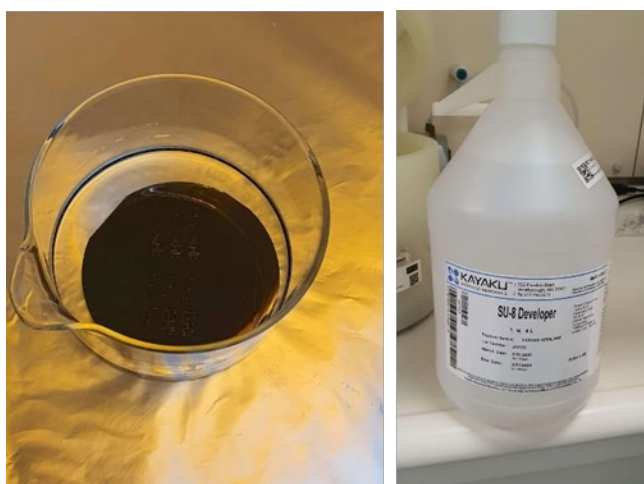
Слика 12. СУ-8 се центрифугира на вафли.

Силиконска плочица обложена СУ-8 је претходно печена да се стабилизује (време пре/после печења и температуре се такође могу наћи у упутствима произвођача). Затим се плочица и фотомаска, које садрже карактеристике микрофлуидног чип уређаја, стављају у поравнавач маске (Mask aligner) за излагање UV зрачењу. Фотомаска се поставља наопако у контакту са фотосмолем. Вафла обложена фотосмолем се озрачује одређеном дозом и временом да би се унакрсно повезали изложени региони (дозу зрачења обезбеђује произвођач фотосмолера из које се израчунава време излагања).



Слика 13. Излагање UV зрачењу у Mask aligner-а.

Након излагања UV зрачењу, вафла са фотосмолем се накнадно пече (на 65°C и 95°C), одређено време које је одређено упутствима произвођача. Користећи развијач на бази растварача (SU-8 Developer), неекспонирани региони се уклањају. Препоручена времена развоја су дата у упутствима. Затим, након развоја, супстрат се обично испере изопропил алкохолом да би се идентификовали неразвијени региони и осуши благим протоком азота на крају.



Слика 14. Уклањање неекспонираних региона на вафли.

Калуп реплике се користи за реплицирање мастера. Обично се користи биокомпатибилан и оптички провидан полимерни материјал, као што је полидиметилсилоксан (ПДМС). ПДМС се добија мешањем предполимера и унакрсног повезивача у односу 10:1 (v/v или w/w).



Слика 15. Калуп и ПДМС.

ПДМС еластомер се сипа преко калупа, дегасира 1 h у вакуум комори и суши у пећници на 70°C око 4 h.

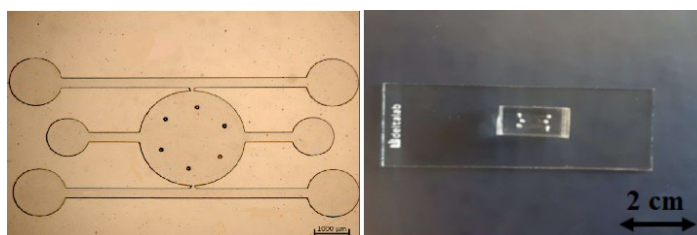


Слика 16. Дегасирање у вакуум комори.

Након очвршћавања, ПДМС реплика се лагано исече на одговарајуће величине и облике. Улази/излази су избушени за повезивање цеви. На крају, O₂ плазма реактор се користи за лепљење реплике ПДМС чипа на стандардно микроскопско стакло.



Слика 17. Плазма реактор.



Слика 18. (Лево) Слика микрофлуидног чипа и његових градивних делова под оптичким микроскопом. (Десно) Произведен микрофлуидни чип.

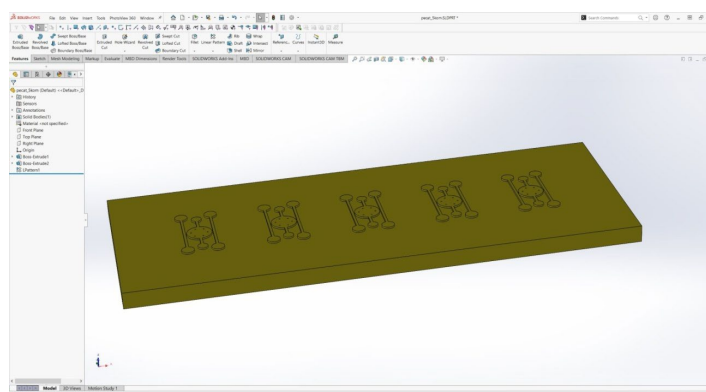
У овако произведене микрофлуидне чипове могу бити засејане ћелије и повезане микрофлуидним цевима са спољним изворима пумпања, као што су шприц или перисталтичка пумпа, за снабдевање ћелија медијумом за култивацију.

Описани поступак омогућава израду сложених структура до 200-300 μm . Овај пројектовани микрофлуидни чип систем омогућава одржавање вијабилности ћелија током дугих периода, чак и неколико недеља. (Gumuscu et al, 2017) Реплициране микроструктуре са засејаним ћелијама и перфузоване медијумом за ћелијску култивацију (или другим физиолошким течностима), рекапитулирају физиологију или патофизиологију природног органа. За бољу ћелијску адхезију, протеини екстрацелуларног матрикса, као што је фибронектин, могу се користити за облагање микроструктура и канала. Постоји растући тренд развоја нових микрофлуидних уређаја, који се обично називају „Organ-on-chip“, како би се боље реконституисало *in vivo* микроокружење на нивоу ткива или органа.

Коначно, једна од главних предности производње микрофлуидних уређаја коришћењем UV-фотолитографије и ПДМС реплике је његова једноставност, ниска цена инфраструктуре и брза процедура. Насупрот томе, аспекти масовне производње и аутоматизације су ограничени. (Milivojević et al, 2021c; Milivojević et al, 2021d)

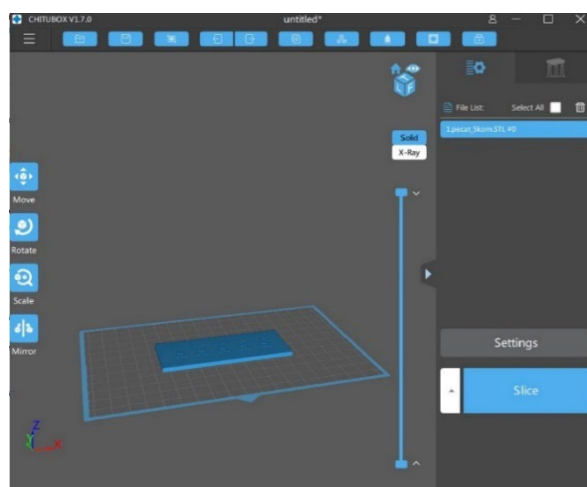
15. Модификована израда ПДМС микрофлуидног чип уређаја (ИИТ КГ)

Развили смо и модификовани начин изаде микрофлуидног чип уређаја. (Milivojević Dimitrijević et al, 2026b) Карактеристике од интереса, као што су коморе и микрофлуидни канали, прво су дизајниране од стране софтвера SolidWorks® Premium 2022 SP0.0 и експортиране у формат датотеке стереолитографије (STL). Они су прецизно оцртани да репродукују жељени биолошки догађај или микроокружење које се проучава.



Слика 19. SolidWorks® дизајн.

STL датотеке су затим увезене у софтвер (CHITUBOX 64) за 3Д штампање (слика 20). Овај софтвер је коришћен за сечење модела и креирање серије 2Д фотомаски.



Слика 20. CHITUBOX 64 приказ модела пред штампање.

Дизајнирани модел је пренет на 3Д штампач Creality LD 006. Интегрисани LCD монитор прави фотомаске на основу модела. Са технологијом маск-стереолитографије (mSLA), главни калуп се штампа слој по слој. Код овог штампача, прецизност дуж XY осе је 50 μm , док је висина слоја 10 μm . Creality LCD дентална смола (жута) се зрачи одоздо, одакле UV светлост (са дефинисаном дозом и временом експозиције) пролази до фотомаске и зрачи сваки слој карактеристика од интереса посебно. Слојеви се држе на горњој пријемној глави штампача.



Слика 21. (А) 3D принтер Creality LD 006. (Б) 3D штампање. (В) Мастер модла.

Након излагања UV зрачењу, супстрат се обично испере изопропил алкохолом да би се уклонили неразвијени делови, а на крају осуши благим протоком азота.

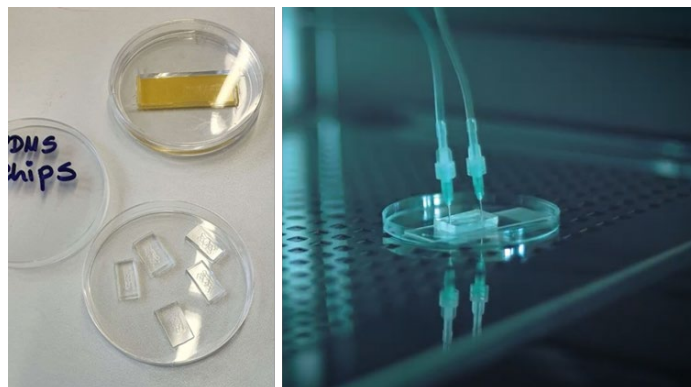
Калуп реплике се користи за реплицирање мастера. Користи се биокомпатибилан и оптички провидан полимерни материјал, полидиметилсилоксан (ПДМС). ПДМС се добија мешањем предполимера и унакрсног повезивача у односу 10:1 (w/w или v/v). ПДМС еластомер се сипа преко калупа, дегазира у вакуум комори да би се лепо прионуо на карактеристике и уклонио мехуриће, и осуши у сушници на 70°C најмање 4 h.



Слика 22. (Лево) Дегасирање у вакуум комори. (Десно) Печење у сушници.

Након очвршћавања, добијена ПДМС реплика се нежно одвоји од модле и исече на одговарајуће величине и облике. Улази/излази су избушени за повезивање цеви.

Коначно, контролисано UV и озонско зрачење се користи за везивање реплике ПДМС чипа на други део ПДМС-а или на стандардно микроскопско стакло. Проток је тестиран перисталтичком пумпом дефинисаног протока и није било проблема у функционисању овог микрофлуидног уређаја.



Слика 23. (Лево) Исечени ПДМС чипови. (Десно) Коначни микрофлуидни чип.

16. Праћење миграције у микрофлуидном чип уређају

Ћелије карцинома НСТ-116 са густином од 10×10^6 ћелија/ml су ресуспендоване у Matrigel® и убризгане у централну комору микрофлуидног уређаја. Хидрогел напуњен ћелијама је остављен да се инкубира 30 минута на 37°C ради унакрсног повезивања. Затим је ДМЕМ медијум (који садржи 10% ФБС) са VCAM-1 протеином (молекула адхезије васкуларних ћелија) додат у бочни канал да би се подстакла миграција и инвазија ћелија из централне коморе ка бочном каналу, док је за контролну групу бочни канал садржао само ДМЕМ медијум (са 10% ФБС). (Milivojević et al, 2021d)

17. Синтеза CMChT/PAMAM дендримерних наночестица

CMChT/PAMAM (carboxymethyl-chitosan / polyamidoamine) дендримерне наночестице су припремљене на начин корак по корак како су описали Oliveira et al, 2008. PAMAM дендримери завршени карбоксилном киселином (генерација 1.5, 20% (w/v) метанолни раствор) са језгром етилендиамина (Sigma, lot: MKBX0172V) су модификовани да би се повећала генерација дендримера. CMChT/PAMAM дендримери припремљени су на следећи начин: повећати стварање PAMAM-CT (Г 1.5), добити дендример са PAMAM метил-естером, изреаговати PAMAM и CMChT (реакција се дешава кондензацијом реакција између метил естарских и амин група) услед чега се метил естарске групе, које не реагују, преводе у карбоксилне групе у CMChT/PAMAM дендримеру, након чега следи таложење.

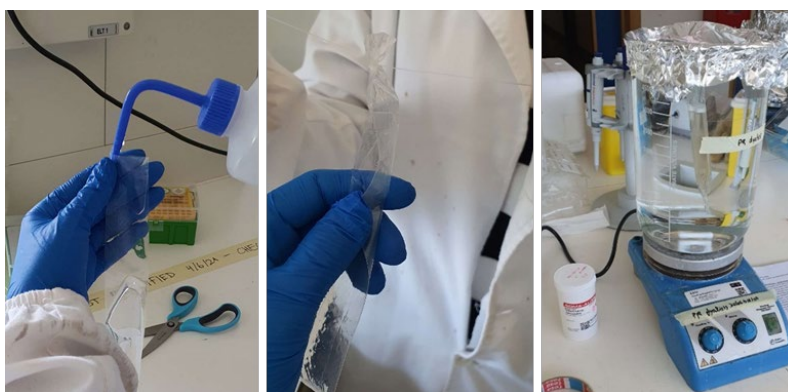
Да би се повећала генерација дендримера, прво је одговарајућа запремина PAMAM-а (Г 1.5) у метанолу пребачена у волуметријски балон ($1 \text{ g / ml} = 1 \text{ g PAMAM} + 1 \text{ ml метанола}$ – у 2 дела: $2 \times 0.5 \text{ ml}$) и растварач је упарен под гасом азота - N_2 (трагови се могу осушити и под вакуумом како би се у потпуности уклонио метанол - ми нисмо урадили овај корак). Почетно једињење је затим поново растворено у ултра чистој води да би се добила коначна концентрација од 10 mg/ml ($100 \text{ ml воде у 2 дела: } 2 \times 50 \text{ ml}$) и pH је подешен на 6.5 са разблаженим раствором хлороводоничне киселине (1 M). Држали смо на мешању 10 минута.



Слика 24. (Лево) Испаравање метанола. (Десно) Мешање раствора.

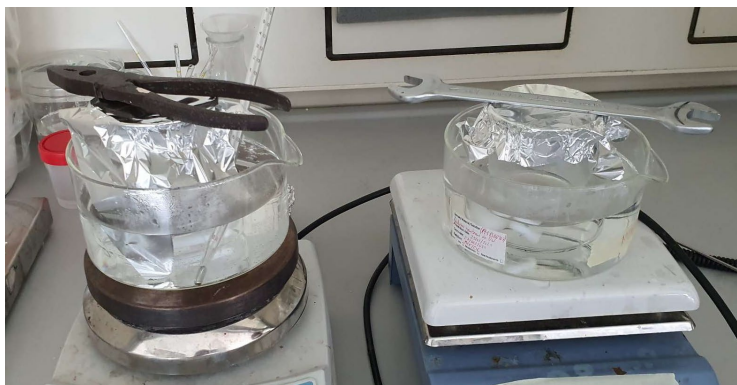
Затим је у раствор додат 1-етил-(3-диметиламинопропил) карбодиимид хидрохлорид (ЕДЦ) (Sigma) у моларном односу довољном да модификује карбоксилатни остатак дендримера ($0.05 \text{ g ЕДЦ} : 0.035 \text{ g ПАМАМ} = 0.7143 \text{ g ЕДЦ} : 0.5 \text{ g ПАМАМ} \text{ --- } \times 2$). Раствор је држан уз мешање 30 минута на собној температури да реагује. Етилендиамин (ЕДА, Sigma) је додат у раствор у моларном односу једнаком ЕДЦ ($2 \times 250 \text{ }\mu\text{l}$) - полако и под константним мешањем, и остављен да реагује 4 h на мешалици.

После овог периода, вишак ЕДЦ је уклоњен дијализом (целулозна цев, бензоилирана, за одвајање једињења са молекуларном масом ≤ 1200 , Sigma). Повремено је мењана вода због хемијске zasiћености.



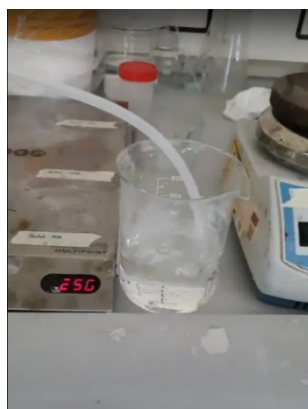
Слика 25. (А и Б) Припрема мембрана. (В) Мембране на дијализи.

Једињење са РАМАМ-амином је припремљено на следећи начин: СМCht са степеном деацетилације од 80% и степеном супституције од 47% је синтетизован путем хемијске модификације хитина (Sigma) као што су претходно описали Chen and Park, 2003. Затим је извршена алкилација примарних амина (Михаелова адиција). Одговарајућа запремина РАМАМ-амина је помешана са метанолом (Sigma) ($2 \times 100 \text{ ml}$) и метил метакрилатом ($2 \times 369 \text{ }\mu\text{l}$). Раствор је држан уз мешање у воденом купатилу 24 h на 50°C , да би се добио РАМАМ-метил естар.



Слика 26 . Михаелова адиција.

После реакције, метанол је упарен са гасом азота да би се оставила запремина раствора без метанола (у сваком по 50 ml).



Слика 27. Упаравање метанола са гасом азота.

Затим је CMChT у ултрачистој води помешан са дендримером PAMAM-метил естра, који је претходно растворен у 20/80 раствору вода/метанол (v/v). Коначни раствор је разблажен додавањем метанола и држан уз мешање 72 h.

CMChT/PAMAM дендримерне наночестице су затим исталожене након додавања одговарајуће запремине zasiћеног раствора Na_2CO_3 (Sigma) и хладног ацетона (Pronalab). Преципитати су сакупљени филтрацијом и дисперговани у ултрачистој води за дијализу током 48 h. Коначно, CMChT/PAMAM дендримерне наночестице су добијене замрзавањем раствора на -80°C и сушењем замрзавањем – лиофилизација (TelstarCryodos-80) током 7 дана да би се потпуно уклонио растварач. Припремљени на овај начин, CMChT/PAMAM дендримерне наночестице су растворљиве у води при физиолошкој pH вредности.

18. Обележавање наночестица CMChT/PAMAM дендримера са флуоресцеин изотиоцијанатом (FITC)

Конјугати CMChT/PAMAM-FITC су добијени ковалентним везивањем аминске групе CMChT и изотиоцијанатне групе FITC (10 mg/ml FITC (Sigma) у анхидрованом DMSO (Norconcessus)) да би се формирала тиоуреа веза (Carvalho et al, 2017a). Прво је припремљен раствор од 10 mg/ml CMChT/PAMAM дендримерних наночестица у карбонат-бикарбонатном пуферу са pH 9.2. Затим је додат раствор FITC/DMSO уз

мешање и држан у мраку на 4°C током 8 h. FITC-обележени раствор CMChT/PAMAM дендримерних наночестица је затим дијализован 24 h у ултрачистој води да би се уклонио неповезани FITC и филтриран (величина пора < 220 nm) у стерилним и тамним условима. Коначни производ је био добијен након сушења замрзавањем - лиофилизацијом.

19. Формулације наночестица CMChT/PAMAM дендримера са комплексом злата AK1

Комплекс злата AK1 је синтетизован како су описали Radisavljevic et al, 2020, и уграђени у CMChT/PAMAM дендримерне наночестице користећи две методе: А) Комплексација; и Б) Преципитација. Позитивно наелектрисање AK1 комплекса и негативно наелектрисање дендримера дају одличну основу за реакцију. Ове две методе доводе до две различите формулације наночестица:

- **Формулација А:** У методи комплексирања, Au-комплекс је помешан са CMChT/PAMAM дендримерним наночестицама (у једнаким моларним количинама) у воденом раствору током 24 h. Добијени производ је затим дијализован у ултрачистој води током 24 h, а коначни раствор је замрзнут на -80°C. Узорак је добијен сушењем замрзавањем (лиофилизацијом).

- **Формулација Б:** У методи преципитације, једнаке моларне количине Au-комплекса и CMChT/PAMAM дендримерних наночестица су растворене у H₂O и помешане са концентрованим раствором Na₂CO₃. Затим је додат хладни ацетон да би се омогућило да се наночестице таложе. Добијени производ је дијализован у ултрачистој води 24 h, а коначни раствор је замрзнут на -80°C. Узорак је добијен сушењем замрзавањем (лиофилизацијом).

20. Физичко-хемијска карактеризација

Физичко-хемијска карактеризација комплекса залата AK1 и обе формулације наночестица А и Б су описане у наставку.

Динамичко расипање светлости (Dynamic Light Scattering - DLS)

Величина честица и ζ (зета) потенцијал Au-комплекса AK1 и обе формулације CMChT/PAMAM дендримера са Au-комплексом мерени су помоћу анализатора величине честица (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments). Анализа величине честица обављена је у воденом раствору ниских концентрација, коришћењем кивета за једнократну употребу. Електрофоретска одређивања ζ потенцијала су испитивана у води коришћењем универзалне 'dip' ћелије на pH 7.4.

Трансмисиона електронска микроскопија (TEM)

Морфологија новосинтетизованих формулација наночестица је испитивана коришћењем Philips CM12 трансмисионог електронског микроскопа (Philips/FEI) опремљеног дигиталном камером SIS MegaView III (Olympus). Узорци су растворени у

води и стављени на бакарне решетке ради посматрања. Фотографије су добијене при увећању од 35.000 х.

Скенирајућа електронска микроскопија (СЕМ) и енергетска дисперзивна рендгенска спектроскопија (ЕДС)

СЕМ снимање формулација обе формулације наночестица и карактеризација мапирања комплекса злата су урађени коришћењем емисионог скенирајућег електронског микроскопа у пољу (FESEM) опремљеног енергетском дисперзивном рендгенском спектроскопијом (ЕДС) - FEI SCIOS2, DUAL BEAM SYSTEM.

Инфрацрвена Фуријеова трансформација (ФТИР)

Осушени Аи-комплекс АК1, CMChT/PAMAM дендримерне наночестице и CMChT/PAMAM дендримерне наночестице напуњене Аи-комплексом (формулације А и Б) помешани су са провидним калијум бромидом (KBr, Sigma) и стављени између два диска. Притисак од 4.5 метричких тона је примењен (помоћу Carver Inc. пресе) на диск да би се формирао пелет. Спектар формираног пелета је мерен ФТИР спектроскопијом (Exuinox 55, Bruker Optics Inc.) у опсегу 500-1800 cm^{-1} .

21. Стабилност Аи-комплекса + CMChT/PAMAM дендримерних наночестица

Стабилност формулација CMChT/PAMAM дендримерних наночестица + Аи-комплекс АК1 је анализирана коришћењем UV/VIS спектрофотометра. Стабилност је процењена у смислу јонске јачине и рН вредности. Ефекат јонске јачине је процењен 24 h након додавања раствора NaCl са коначним концентрацијама од 0, 0.001, 0.01, 0.1 и 0.5 М. Ефекат рН вредности је процењен 24 h након подешавања рН на 2, 4, 6, 8 и 10. Спектри апсорпције свеже припремљених, концентрованих раствора сваког типа наночестица су снимљени коришћењем Multiskan SkyHigh UV/VIS Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

22. Ћелијска вијабилност у микрофлуидном чип уређају

Метаболичка активност НСТ-116 ћелија култивисаних у микрофлуидним чиповима одређена је коришћењем Аламар блуе (Alamar blue - АБ) теста (BioRad). Овај тест је изведен и у присуству и у одсуству третмана. Када су ћелије потпуно ослобођене из Matrigel-a, сакупљене су у епипе од 1.5 ml и центрифугиране да би се формирао пелет на 300 g током 5 минута на собној температури. Затим је у ћелијски пелет додат медијум који садржи 20% (v/v) АБ и смеша је инкубирана у мраку на 37°C у CO₂ инкубатору. Након периода инкубације, 100 μl смеше је пребачено на плоче са 96 бунарића у три примерка, а флуоресценција је праћена на таласној дужини емисије од 590/20 nm (таласна дужина екситације 530/25 nm) коришћењем читача микроплоче (Synergy HT, Bio-Tek Instruments). Као бленк је коришћен медијум са 20% v/v АБ.

23. Тест live/dead

Вијабилност НСТ-116 ћелија култивисаних у микрофлуидним чиповима у одсуству или присуству било које формулације А или Б је процењена коришћењем теста live/dead. Бочни канали микрофлуидних чипова су прво испрани ПБС-ом, затим инкубирани у мраку на 37°C у раствору од 1 µg/ml калцеин-АМ и 5 µg/ml пропидијум јодида припремљеног у ДМЕМ-у током 30 мин. Након тога, узорци су поново испрани ПБС-ом и снимљени флуоресцентном микроскопијом (Axio Observer Zeiss). (Carvalho et al, 2019a)

24. Процена ефикасности интернализације наночестица у ћелије

Флуоресцентна микроскопија

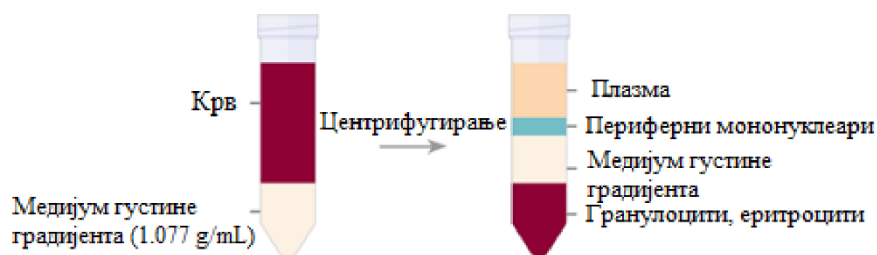
Да би се квалитативно проценила интернализација наночестица, НСТ-116 ћелије су засејане у микрофлуидни уређај и култивисане са 0.5 mg/ml FITC-обележеним Ау-комплексом + CMChT/PAMAM дендримерним наночестицама (обе формулације) под претходно описаним условима култивације током 24 и 72 h. Ћелије су затим фиксиране коришћењем 4% формалина током 20 минута на собној температури. Ћелијска језгра обојена су 4,6-диамидино-2-фенилиндолом, дилактатом (DAPI, Molecular Probes), док су Ф-актински филаменти обојени помоћу Texas Red-X phalloidin (Molecular Probes, Invitrogen) и снимљени помоћу флуоресцентне микроскопије.

Проточна цитометрија за интернализацију наночестица

Да би се квантитативно одредила интернализација наночестица, извршена је анализа проточне цитометрије. НСТ-116 ћелије су култивисане у медијуму са додатком 0.5 mg/ml FITC-обележених Ау-комплекса + CMChT/PAMAM дендримерних наночестицама (обе формулације) као што је претходно описано. После 24 и 72 h, ћелије инкапсулиране у Matrigel-у су извучене коришћењем 500 µl Cell Recovery Solution (Corning) раствора за опоравак ћелија током 30 минута на 4°C. Узорци су затим пребачени у епрувете за проточну цитометрију, испрани са 2 ml 2% ФБС-а у ПБС-у, центрифугирани на 300 rpm током 5 минута и поново суспендовани у 1% формалина у ПБС-у. За одређивање вијабилности ћелија, примењивана је иста процедура, пошто су ћелије поново суспендоване у 800 µl 2% ФБС-а у ПБС-у. Након тога, сваком узорку је додато 5 µl 7-aminoactinomycin D (7-AAD; Taper group) за одређивање броја мртвих ћелија. Суспензије ћелија су анализирани у FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

25. Изолација моноклеарних ћелија периферне крви

Узорак крви се разблажи 1 : 1 са медијумом или са ПБС + 2% ФБС. Дода се у Lymphoprep према односу: 2 ml крви + 2 ml ПБС + 2% ФБС + 3 ml Lymphoprep-a. Разблажена крв се додаје полако, уз зид епрувете, тако да се не помеша са Lymphoprep раствором. Центрифугира се на 800 g 20-30 минута. Пажљиво се покупи слој моноклеарних ћелија кроз горњи слој плазме. Добијене ћелије се исперу 2 пута пуфером.



Слика 28. Изолација периферних мононуклеарних ћелија.

26. Припрема библиотеке и секвенцирање транскриптома

Припрема библиотеке за секвенцирање

Припремљени узорак за рад представља суспензију ћелија добијену из 2Д или 3Д култивисаних ћелија (криопрезервисаних или култивисаних) или из ткива (свежих, залеђених, фиксираних). Кључна разматрања за припрему висококвалитетних једноћелијских суспензија су минимални остаци ћелија у суспензији, низак ниво агрегата ћелија, као и висока вијабилност ћелија (најмање 70%). Невијабилне и умируће ћелије повећавају контаминацију околне РНК и агрегацију ћелија што доводи до повећаног зачепљења микрофлуидних чипова и даљег неуспеха.

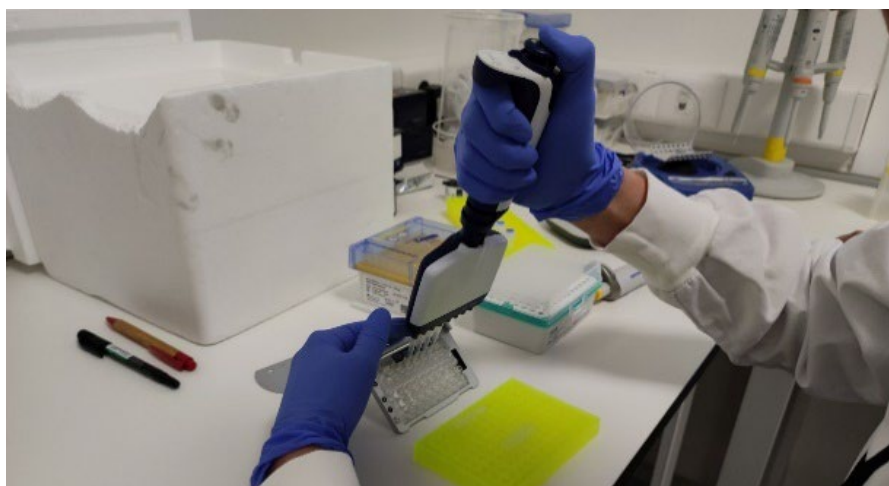
Испирање и ресуспендовање ћелија (периферних мононуклеара) треба прво да се изврши како би се минимизирало згрушавање ћелија, губитак ћелија и присуство остатака ћелија. Састав медијума и пуфера су веома битни за обезбеђивање квалитета узорка. Говеђи серумски албумин (БСА) се додаје ПБС-у да би се смањио губитак и агрегација ћелија и да би се очувала вијабилност ћелија. Ћелијску суспензију неколико пута пропустимо кроз стрејнере како би се ћелије одвојиле једне од других и формирале суспензију појединачних ћелија. Употреба микрофлуидних канала у даљем раду који су мањи од 100 μm захтева да филтрирање ћелијске суспензије буде са одговарајућим стрејнером – нпр стрејнер величине пора од 40 μm .

Након тога се изброје ћелије и одреди проценат вијабилних ћелија употребом аутоматског бројача ћелија. Ако се уоче ћелијски агрегати/групе, филтрира се узорак опет и поново преброји. Подеси се запремина узорка како би се добила циљна концентрација ћелија (700 – 1200 ћелија / μl), ако је потребно поново центрифугирати и ресуспендовати у мању запремину, па избројати. Након што се постигне циљна концентрација, ћелије се држе на леду.

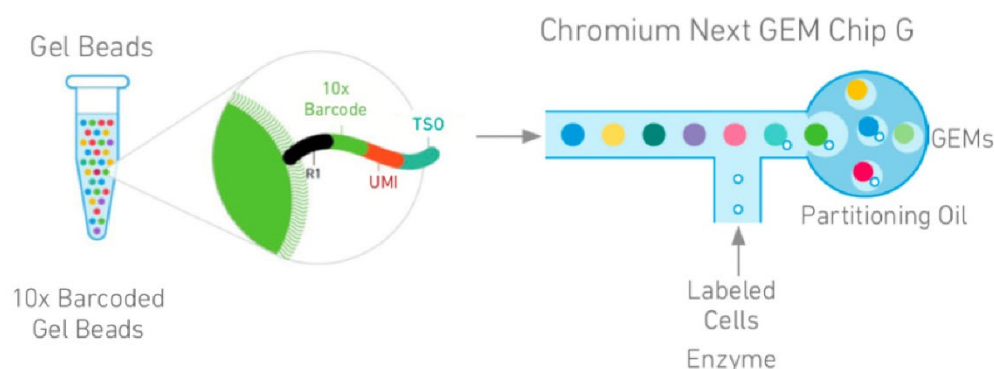


Слика 29. Бројање ћелија.

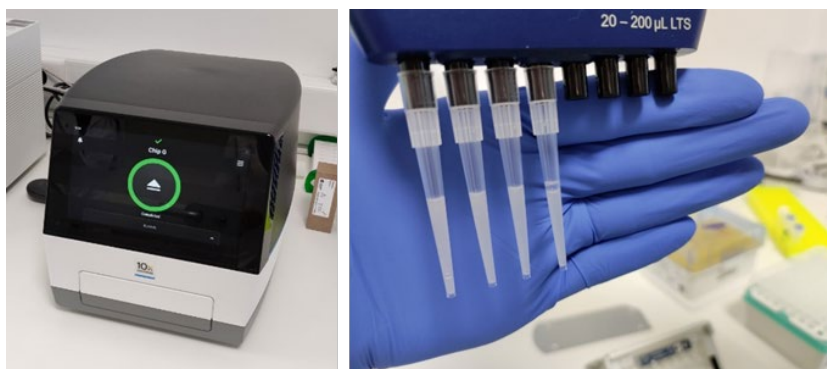
Пре него што пипетирамо у микрофлуидни чип, припремимо Master Mix на леду према упутству, припремимо 50% глицерол за празна места на чипу, као и Gel Beads који представљају баркодиране секвенце. Коначан број ћелија (10.000 ћелија) се прави у Master Mix-у према табели из упутства. На позицију 1 у чипу сипамо ћелије у Master Mix-у, на позицију 2 сипамо Gel Beads, а у позицију 3 уље у које машина на крају из позиција 1 и 2 направи коначну суспензију појединачних ћелија. Добијена суспензија представља Gel Beads-in-emulsion – GEMs. Да би се постигла резолуција једне ћелије, ћелије се испоручују у ограниченом разблажењу, тако да већина (~90-99%) генерисаних GEMs не садржи ћелију, док остатак углавном садржи једну ћелију. На једном Gel Bead имамо исте Illumina® TruSeq Read 1 (први прајмер за секвенцирање), све исте 10x BC секвенце (16 nt) које обележавају порекло РНК из исте ћелије, затим имамо UMI секвенце (12 nt) које су све различите и обележавају сваки транскрипт експримираног гена посебно (на овај начин можемо да пратимо колико је на почетку било копија транскрипта истог гена), и имамо секвенцу poly-dT (30 nt) као крај који представља прајмер за polyA реп за експримирану РНК.



Слика 30. Пипетирање у микрофлуидни чип.

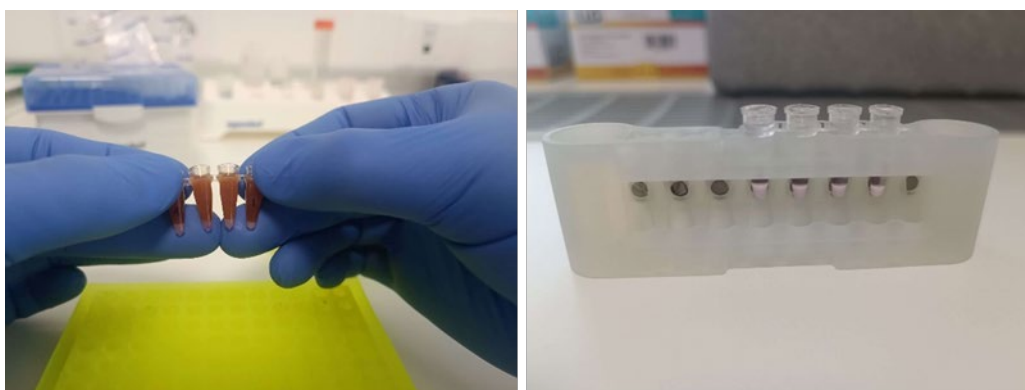


Слика 31. Генерисање GEMs у чипу. (линк 4)



Слика 32. (Лево) Chromium 10x Genomics, (Десно) Суспензија ћелија из чипа.

Добијену суспензију појединачних ћелија инкубирамо у thermocycler-у (PCR апарат) према датом протоколу. Реверзна транскрипција (RT) GEMs-а производи кДНК пуне дужине са бар кодом из полиадениловане информационе РНК (иРНК). Након инкубације, GEMs-ови се разбијају и скупљене фракције се враћају. Следи пречишћавање добијене суспензије кДНК из реакционе смеше након GEM-RT уз употребу магнетних перла силана (Dynabeads MyOne SILANE).



Слика 33. Пречишћавање узорка.

Након овога, баркодирана кДНК пуне дужине се амплифицира путем PCR-а да би се створила довољна количина за формирање библиотеке за секвенцирање. Амплификациони микс се прави на леду према упутству. Број циклуса одређујемо према упутству на основу броја ћелија у нашем узорку са почетка. У нашем случају, за 10.000 ћелија је потребно 11 циклуса. Још једном након амплификације следи пречишћавање узорка помоћу магнетних перлица.

Следећи корак је квантификација добијених фрагмената на биоанализатору. Сипамо 1 µl узорка (фактор разблажења 1:10) на Agilent Bioanalyzer чип високе осетљивости. Опсег који гледамо је од 200 до 9.000 базних парова. На апарату добијамо и концентрацију кДНК, а преко формула прерачунамо укупни принос кДНК:

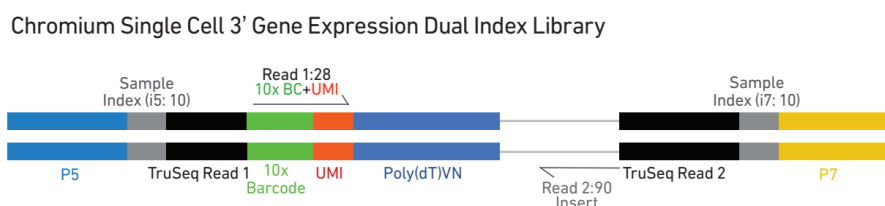
$$\text{Укупан принос кДНК} = \frac{\text{Концентрација (pg/}\mu\text{l)} \times \text{Запремина елуције (}\mu\text{l)} \times \text{Фактор разблажења}}{1000 \text{ (pg/ng)}}$$

Ензимска фрагментација и селекција величине се користе за оптимизацију величине кДНК ампликона. У овом кораку индекси узорака P5, P7, i7 и i5 и TruSeq Read 2 (други прајмер за секвенцирање) се додају преко End Repair, A-tailing, Adaptor Ligation и PCR реакције. Коначне библиотеке садрже прајмере P5 и P7 који се користе у Illumina® амплификацији. За даљу припрему библиотеке користимо 25% од укупно добијеног приноса кДНК. Пуфер за фрагментацију се припреми према упутству, дода у узорке, и инкубира према протоколу у thermocycler-у. Затим следи пречишћавање фрагмената на магнету уз додавање SPRIselect реагенса. Следећи корак је везивање адаптора – припремимо микс према упутству и инкубирамо у thermocycler-у према протоколу. Следи још једно пречишћавање уз SPRIselect реагенс. Последњи корак је додавање Dual Index секвенци помоћу којих приликом секвенцирања разликујемо узорке. Следи још једна инкубација према протоколу (за наше узорке је 13 циклуса према количини кДНК коју смо користили) и пречишћавање. На крају добијамо 35 µl узорка који може да се чува на 4°C до 72 h или на -20°C за дуготрајно складиштење.

На Agilent Bioanalyzer чипу високе осетљивости одредимо просечну величину припремљене библиотеке. Сипамо 1 µl узорка - фактор разблажења 1:10. Капа квантификацијом такође одредимо концентрацију припремљених библиотека. Капа квантификација представља методу qPCR квантификације next-generation sequencing (NGS) библиотека припремљених за секвенцирање на Illumina® платформама. (Milivojević et al, 2023)

Секвенцирање

Chromium Single Cell 3' библиотека са двоструким индексом за експресију гена садржи стандардне Illumina® упарене секвенце који почињу са P5 и завршавају са P7. 10x баркод од 16 базних парова и UMI од 12 базних парова су кодирани у Read 1, док се Read 2 користи за секвенцирање кДНК фрагмента. i7 и i5 индексне секвенце су инкорпориране као индекси узорка који се читају. TruSeq Read 1 и TruSeq Read 2 су стандардна места Illumina® прајмера за секвенцирање која се користе у секвенцирању упарених крајева.



Слика 34. Секвенце које садржи припремљена библиотека. (линк 4)

Секвенцирање је рађено на NovaSeq 6000 који је један од компатибилних Illumina® секвенцера који су препоручени од стране 10x Genomics. Како смо имали 10.000 ћелија у нашем узорку, а препоручено је 20.000 читања по ћелији, укупна дубина читања је онда била 200.000.000 пута. Број циклуса секвенцирања је био 138 јер Read 1 има дужину 28, i7 и i5 дужину од по 10, а Read 2 дужину од 90 базних парова.

10x Genomics начин припреме библиотеке је платформа за 3' експресију гена профилисањем 500 - 10.000 појединачних ћелија по узорку. Овакве 3' библиотеке транскриптома могу да се удружују за секвенцирање јер у припреми узорака добијају различите секвенце индекса.

PhiX spike-in анализа је додатно урађена. Она представља контролну библиотеку и препоручено је да се користи у скоро свим серијама секвенцирања. Има две функције: на основу читавања PhiX-а може се пратити квалитет (стопа грешке) секвенцирања, а PhiX такође помаже да се побољша разноликост секвенци у групи, што може бити корисно за перформансе секвенцирања. Количина PhiX-а која се користи у секвенцирању зависи од типа библиотеке – за 10x Genomics библиотеке препоручено је 7.5% PhiX-а.

Биоинформатичка обрада резултата

Добијени сирови подаци са секвенцирања се прво анализирају помоћу Cell Ranger софтвера, а затим се визуализују помоћу Loupe Browser[®] софтвера. Оба софтвера су обезбеђена од стране 10x Genomics[®]. Cell Ranger је скуп pipeline-ова за анализу који обрађује податке о Chromium експресији једног гена да би поравнао читања. Користећи филтриране баркодове, такође генерише матрице карактеристика бар кодова, одређује груписање у кластере и врши анализу диференцијалне експресије гена. Када се секвенцира више од једног узорка из истог експеримента, Cell Ranger се користи да се комбинују подаци из више узорака у матрицу и анализира баркодове за читав експеримент. Улазни фајл за први софтвер је BCL или FASTQ, а излазни фајл је .cloupe / .loupe који се даље користи за други софтвер. Loupe Browser је интерактивни алат за визуелизацију података који не захтева превише претходног знања о програмирању. Уз помоћ овог софтвера добијамо графиконе и бројеве који нам описују добијене кластере и експримиране гене. (Milivojević Dimitrijević et al, 2024)

27. Статистичка обрада података

Статистичка анализа је урађена у софтверу IBM SPSS Statistics software (v23.0; IBM Corp, Armonk, NY, USA). Подаци су анализирани коришћењем Shapiro-Wilk теста нормалности, једносмерног ANOVA или Kruskal-Wallis H теста, као и двостраног упареног т-студент теста. Сва МТТ и редокс мерења су извршена у шест примерака и подаци су приказани као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (SD). Резултати проточне цитометрије и qPCR-а су израчунати као средња вредност триplikата за сваки узорак и представљени су као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (SD) за сваки протеин/ген. Код qPCR резултата, третиране ћелије се пореде са здравом контролом за које је вредност постављена на 1. Вредност $p < 0.05$ указује на статистичку значајност за интервал поверења од 95%. (линк 6)

За визуелну презентацију хијерархијског кластерисања са топлотном мапом (Heatmap) имплементиран је веб алат под називом ClustVis који комбинује неколико R пакета. И редови и колоне су груписани коришћењем корелационе удаљености и просечне везе. (Jurišić et al, 2023)

РЕЗУЛТАТИ

1 Резултати испитивања цитотоксичности хемијских једињења

У циљу испитивања цитотоксичних ефеката различитих супстанци, тестиран је велики број комплекса који садрже централни метални јон, као и једињења без централног јона метала. Такође, тестирани су и комерцијални цитостатици ради поређења ефекта са новим хемијски синтетисаним супстанцама.

Тестирање комплекса гвожђа

Испитивани су фероцени - комплекси гвожђа у једној концентрацији од 50 μM на ћелијској линији карцинома колона НСТ-116. Тешко су се растварали и нису показали ефекат у поменутој дози, па даље нису испитивани.

*Тестирање родијум(III) комплекса**Тестирање Camphor-Derived Bis(pyrazolyl)pyridine родијум(III) комплекса*

Једињење родијума Rh1 показало је значајне ефекте са IC_{50} од 80.01 након 24 h и 7.26 μM након 72 h од третмана. Овај антипролиферативни ефекат Rh1 зависио је од концентрације и времена. Насупрот томе, резултати су показали да Rh2 и Rh3 нису били цитотоксични за ћелије карцинома колона НСТ-116. (Petrović et al, 2019)

Табела 6. Цитотоксичност једињења Rh 1-3

IC_{50} (μM)	НСТ-116	
	24 h	72 h
Rh 1	80.01	7.26
Rh 2	>500	>500
Rh 3	>500	>500

Rh 1 = $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{Me}_2\text{L}^)\text{Cl}_3]$; Rh2 = $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{H}_2\text{L}^*)\text{Cl}_3]$; Rh 3 = $[\text{Rh}^{\text{III}}(\text{terpy})\text{Cl}_3]$

Тестирање родијум (III) комплекса са 1,2,4-triazole лигандом

Rh-L комплекс је показао значајан ефекат на ћелијама карцинома НСТ-116 24 h након третмана (IC_{50} = 40.8 μM), док на здраве MRC-5 ћелије нема ефекат (IC_{50} > 500 μM). Овакав ефекат нам указује на селективност према ћелијама карцинома, иако се после 72 h та разлика скоро губи (IC_{50} вредност је 2.7 μM код НСТ-116 ћелија, док је 34.7 μM код MRC-5 ћелија). Лиганд, коришћен у синтези овог комплекса, није показао цитотоксични ефекат на обе испитиване ћелијске линије. (Petrović et al, 2020)

Табела 7. Цитотоксичност једињења Rh и Rh-L

IC ₅₀ (μM)	HCT-116		MRC-5	
	24 h	72 h	24 h	72 h
L	>500	>500	474.8	>500
Rh-L	40.8	2.7	>500	34.7

* Rh-L = [Rh(H₂L^{*})(1,2,4-triazole)₂Cl]Cl₂; L = 1,2,4-triazole

Тестирање N,N,N-хелатних Rh комплекса

Комплекс родијума Rh2 показао је посебно снажан ефекат на HeLa ћелије са IC₅₀ од 85.13 μM након 72 h од третмана, док је знатно мање изражен његов ефекат на MRC-5 ћелије. Ово наглашава способност комплекса да селективно циља канцерогене ћелије док штеди здраве ћелије. Да бисмо боље илустровали цитотоксичне ефекте, спровели смо студију временског тока која је открила да је дејство Rh2 зависно од времена и дозе, са вишим концентрацијама које су довеле до бржег пада вијабилности ћелија. Насупрот томе, Rh1 и Rh3 нису показали цитотоксичност са вредностима IC₅₀ већим од 500 μM за HeLa и MRC-5 ћелије. Rh4 је мање потентан, иако показује веома ниске вредности IC₅₀ за HeLa и MRC-5 (за 72 h) ћелије што указује на снажан цитотоксични ефекат, али не и селективност. (Сакловић et al, 2024; Bogojeski et al, 2019)

Табела 8. Цитотоксичност једињења Rh 1-4

IC ₅₀ (μM)	HeLa		MRC-5	
	24 h	72 h	24 h	72 h
Rh 1	>500	>500	>500	>500
Rh 2	>500	85.13	>500	>500
Rh 3	>500	>500	>500	>500
Rh 4	37.53	7.59	62.18	8.69

Rh 1-4 = [Rh^{III}(X)Cl₃] (X = dien, bpm, terpy, Me₂L^{})

Тестирање котретмана Rh комплекса са јонским течностима

Упоредна студија цитотоксичности родијумских комплекса Rh1 до Rh4 са заједничким третманом јонским течностима JT1 и JT10 открива нијансирану модулацију њихових ефеката на вијабилност ћелија. Сами родијумски комплекси су показали основни цитотоксични ефекат на HeLa ћелије који је промењен додатком јонских течности. На HeLa ћелијама са JT1 је генерално показана тенденција смањења вијабилности ћелија у поређењу са третманом самим Rh1 комплексом, посебно након 72 h. Котретман са Rh2 показао је тенденцију одржавања вијабилности ћелија, док је заједнички третман са Rh3 и Rh4 довео чак до повећања вијабилности ћелија након 24 h. Третман са JT10 је често резултирао одржаном вијабилношћу ћелија осим при заједничком третману са Rh2, где је примећена смањена вијабилност ћелија, што указује на повећан цитотоксични ефекат. У здравим MRC-5 ћелијама, присуство JT1 и JT10 понекад је довело до већег процента вијабилности ћелија у поређењу са третманом само

комплексима родијума, наговештавајући заштитни ефекат јонских течности. Вредности добијених процената вијабилности ћелија након котретмана јонских течности и комплекса родијума су приказане у табели 9. (Сакловић et al, 2024; Bogojeski et al, 2019)

Табела 9. Цитотоксичност Rh комплекса са јонским течностима, IC₅₀ (μM)

Hela			Rh 1	Rh 2	Rh 3	Rh 4
24 h	JT 1	10 μ M Rh	89.43	87.40	117.84	71.47
		100 μ M Rh	83.18	87.19	124.00	71.71
	JT 10	10 μ M Rh	94.16	83.59	107.60	32.30
		100 μ M Rh	80.05	82.64	54.85	44.57
72 h	JT 1	10 μ M Rh	46.63	51.86	74.79	53.66
		100 μ M Rh	49.72	49.09	77.26	50.44
	JT 10	10 μ M Rh	102.07	97.85	92.06	74.38
		100 μ M Rh	105.19	87.73	37.59	81.71
MRC-5			Rh 1	Rh 2	Rh 3	Rh 4
24 h	JT 1	10 μ M Rh	85.29	88.83	92.20	92.67
		100 μ M Rh	104.82	101.52	94.12	79.55
	JT 10	10 μ M Rh	104.20	109.60	107.29	83.36
		100 μ M Rh	102.43	91.87	97.00	83.52
72 h	JT 1	10 μ M Rh	112.32	104.54	101.01	77.85
		100 μ M Rh	112.22	72.82	106.57	67.52
	JT 10	10 μ M Rh	104.74	91.44	76.64	64.94
		100 μ M Rh	76.48	65.54	83.68	48.36

Rh 1-4 = [Rh^{III}(X)Cl₃] (X = dien, bpma, terpy, Me₂L)

*JT 1 = 1-ethyl-3-methylimid-azolium ethyl sulfate; JT 10 = agmatine salicylate

Интеракција између јонских течности и родијумских комплекса се разликовала у оквиру специфичног комплекса и ћелијске линије, са неким комбинацијама које сугеришу потенцијал за селективно циљање ћелија карцинома. Ова модулација помоћу JT1 и JT10 сугерише да би избор јонске течности у стратегијама заједничког лечења могао бити пресудан у оптимизацији терапеутске ефикасности и селективности третмана карцинома на бази родијума.

Тестирање комплекса злата

Тестирање динуклеарних и тринуклеарних комплекса злата

Комплекси злата (III) значајно су смањили вијабилност ћелија MDA-MB-231 у зависности од времена и дозе. Поред тога, тестирани комплекси злата (III) су значајно и дозно-зависно смањили вијабилност карциномске ћелијске линије HCT-116, као и

вијабилност здравих ћелија MRC-5 али без зависности од времена. Сви комплекси показују цитотоксичне ефекте на испитиване ћелије ($IC_{50} < 100 \mu M$). Међу њима, комплекси SR34 и SR33 су испољили највеће и значајне цитотоксичне ефекте на ћелијама карцинома дебелог црева HCT-116 ($IC_{50} < 25 \mu M$). Здраве ћелије фибробласта плућа (MRC-5) су такође осетљиве на цитотоксичне ефекте ових комплекса, што указује да синтетизовани комплекси злата (III) немају специфичну антитуморску активност. (Radisavljević et al, 2019)

Табела 10. Цитотоксичност једињења злата SR06,13,14,32,33,34

IC_{50} (μM)	HCT-116		MDA-MB-231		MRC-5	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
SR06	72.62	29.88	95.86	89.37	57.36	62.88
SR14	56.5	52.03	88.84	52.83	58.51	57.72
SR13	60.17	37.16	77.07	58.54	34.23	53.27
SR32	63.34	133.87	98.07	61.67	63.81	83.10
SR33	23.28	24.18	93.92	52.78	28.37	29.97
SR34	0.25	15.88	98.17	75.05	51.78	89.23

*SR06, SR13, SR14 = $[Au_2(NH_2(CH_2)_nNH_2)Cl_6]$, $n = 4,6,8$

*SR32-34 = $[Au_3(NH_2(CH_2)_nNH_2)Cl_8]Cl$, $n = 4,6,8$

Тестирање тетра- и пента- координираних комплекса злата (III)

Оба испитивана комплекса злата значајно су смањила вијабилност ћелијских линија, и карциномских ћелија дојке и колона, али и здравих HaCaT ћелија кератиноцита. Комплекси AK1 и AK2 су испољили цитотоксичне ефекте, зависне и од дозе и од времена, уз нешто бољи ефекат комплекса AK1. Међутим, наши резултати показују да проучавани комплекси нису показали значајну селективност према ћелијама карцинома. (Radisavljević et al, 2020)

Табела 11. Цитотоксичност једињења злата

IC_{50} (μM)	HCT-116		MDA-MB-231		HaCaT	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
AK1	3.13	0.14	28.16	0.98	10.26	1.61
AK2	14.57	0.01	75.02	11.75	70.58	2.40

*AK1 = $[Au(4,7\text{-diphenyl-}1,10\text{-phenanthroline})Cl_2]^+$

*AK2 = $[Au(2,9\text{-dimethyl-}1,10\text{-phenanthroline})Cl_3]$

Тестирање рутенијум комплекса

Оба динуклеарна рутенијум комплекса су показала умерену цитотоксичну активност према ћелијама карцинома дојке (MDA-MB-231), док нису показале никакав цитотоксични ефекат према HCT-116 ћелијама карцинома колона. Комплекс Ru2 био је активнији од комплекса Ru1 на ћелијској линији MDA-MB-231. (Medjerović et al, 2020)

Табела 12. Цитотоксичност једињења Ru 1 и 2

IC ₅₀ (μM)	HCT-116		MDA-MB-231	
	24 h	72 h	24 h	72 h
Ru1	> 200	> 200	> 200	71.7
Ru2	> 200	> 200	155.4	55.2

*Ru1 = [$\{RuCl(bpy)_2\}_2(\mu-pzn)[PF_6]_2 \cdot 2H_2O$; Ru2 = [$\{RuCl(phen)_2\}_2(\mu-pzn)[PF_6]_2 \cdot 2H_2O$
(bpy = 2,2'-bipyridine, phen = 1,10-phenanthroline, $\mu-pzn$ = pyrazine)

Тестирање цинк (II) комплекса

Комплекси цинка нису имали значајних цитотоксичних ефеката, осим Zn(terpy) комплекса који је цитотоксичан за линију карцинома колона HCT-116 након 24 h и за ћелијску линију карцинома дојке MDA-MB-231 након 72 h. Оба комплекса цинка (II) су смањила вијабилност свих тестираних ћелија. Временска зависност је присутна у третману ћелија MDA-MB-231 и HCT-116, али не и код ћелијске линије MRC-5. Као што се види у резултатима, на тестиране ћелије карцинома комплекси имају слаб цитотоксични ефекат, док на здраве MRC-5 ћелије имају више ефекта, што указује да нема специфичног антиканцерогеног ефекта.

Није било могуће дефинисати поједине вредности IC₅₀, јер су све вредности вијабилности биле изнад 50%, док вредност IC₅₀ за третман комплексом Zn(terpy) на ћелијској линији HCT-116 после 72 h није било могуће утврдити због значајног смањења вијабилности ћелија (13.3%), почевши од најниже концентрације. (Soldatović et al, 2019)

Табела 13. Цитотоксичност једињења Zn(en) и Zn(terpy)

IC ₅₀ (μM)	HCT-116		MDA-MB-231		MRC-5	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
Zn(en)	160.21	149.72	196.6	154.54	72.05	87.74
Zn(terpy)	10	/	/	23.04	/	93.97

* Zn(en) = [ZnCl₂(en)]; Zn(terpy) = [ZnCl₂(terpy)]
(en = 1,2-diaminoethane or ethylenediamine; terpy = 2,2':6',2''-terpyridine)

Тестирање комплекса Pt(II)-L-Zn(II)

Оба хетеронуклеарна комплекса Pt-L-Zn смањују вијабилност обе испитиване ћелијске линије карцинома, са бољим дејством на HCT-116 ћелије. Ефекат је код оба третмана временски завијан. Веома значајан ефекат примећен је на HCT-116 ћелијској линији карцинома колона са IC₅₀ вредностима нижим од 1 μM након 72 h од третмана. Тестирани комплекси су били мање цитотоксични на MDA-MB-231 ћелијској линији карцинома дојке. (Soldatović et al, 2020a; Soldatović et al, 2020b)

Табела 14. Цитотоксичност једињења Pt(II)-L-Zn(II)

IC ₅₀ (μM)	HCT-116		MDA-MB-231	
	24 h	72 h	24 h	72 h
Pt-L1-Zn	69.43	0.51	268.45	82.63
Pt-L2-Zn	276.56	0.42	201.60	36.82

*Pt-L1-Zn = [$\{cis-PtCl(NH_3)(\mu-pyrazine)ZnCl(terpy)\}\}(ClO_4)_2$

*Pt-L2-Zn = [$\{cis-PtCl(NH_3)(\mu-4,4'-bipyridyl)ZnCl(terpy)\}\}(ClO_4)_2$

(terpy = 2,2':6',2''-terpyridine, L1 = pyrazine, L2 = 4,4'-bipyridyl)

Тестирање паладијум (II) - селен комплекса

Испитана једињења оргоно-селенијум транс-паладијум (II) комплекса смањују вијабилност ћелија у дозном и временској зависности, али показују слабу цитотоксичну активност на ћелијама HCT-116. Сви тестирани комплекси су нетоксични и показују IC₅₀ више од 500 након 24 h, док поједини третмани показују цитотоксичну активност након 72 h. Умерену цитотоксичност на испитиваној ћелијској линији је показао комплекс Pd-Se2, са IC₅₀ нижим од 100 μM. (Raković et al, 2021)

Табела 15. Цитотоксичност комплекса Pd-Se

IC ₅₀ (μM)	HCT-116	
	24 h	72 h
L1	>500	>500
L2	>500	238.35
Pd-Se1	>500	218.78
Pd-Se2	>500	81.85

*L1 = 5-(phenylselanylmethyl)-dihydrofuran-2(3H)-one

*L2 = 2-methyl-5-(phenylselanylmethyl)-tetrahydrofuran

*Pd-Se1 = [Pd(L1)₂Cl₂]; Pd-Se2 = [Pd(L2)₂Cl₂]

Тестирање Zn(II) - Cu(II) комплекса

Цитотоксична активност хетеронуклеарних Zn и Cu комплекса значајно је смањила вијабилност ћелија на тестираном колоректалном карциному (HCT-116), као и на ћелијама здравих фибробласта плућа (MRC-5). Ипак, цитотоксична селективност тестираних комплекса је веома добра, и могу се сматрати селективним једињењима према ћелијској линији карцинома колона HCT-116. (Halilagić et al, 2022; Halilagić et al, 2020)

Табела 16. Цитотоксичност Zn(II) - Cu(II) комплекса

IC ₅₀ (μM)	HCT-116		MRC-5	
	24 h	72 h	24 h	72 h
Zn-L1-Cu	52.9	0.01	53.8	0.69
Zn-L2-Cu	168.64	0.01	62.25	0.8

*Zn-L1-Cu = [$\{ZnCl(terpy)(\mu\text{-pyrazine})CuCl(terpy)\}$](ClO₄)₂

*Zn-L2-Cu = [$\{ZnCl(terpy)(\mu\text{-4,4'-bipyridyl})CuCl(terpy)\}$](ClO₄)₂
(terpy = 2,2':6',2''-terpyridine, L1 = pyrazine, L2 = 4,4'-bipyridyl)

Тестирање комплекса осмијума

Резултати показују цитотоксични ефекат сва три комплекса осмијума на ћелијама карцинома дебелог црева HCT-116, а посебно на ћелијске линије карцинома дебелог црева SW-480. Ос3 је показао најслабији цитотоксични ефекат, највише токсичан према SW-480 ћелијама, а готово никакав ефекат на ћелије карцинома грлића материце HeLa и на здраве MRC-5 ћелије фибробласти плућа. Ос1 и Ос2 су показали цитотоксичност временски и дозно зависну према ћелијским линијама SW-480, HeLa и MRC-5. Показало се да су ћелије HCT-116 отпорне на сва три комплекса после 72 h од третмана, изражавајући само слаб акутни ефекат.

Селективност према ћелијама карцинома показао је комплекс Ос1 приликом третмана SW-480 и HeLa, у поређењу са здравим MRC-5 ћелијама. Ос2 није показао селективност према испитиваним ћелијама карцинома, док је Ос3 показао селективност према SW-480 ћелијама. (Petrović et al, 2021)

Табела 17. Цитотоксичност комплекса осмијума

IC ₅₀ (μM)	HCT-116		HeLa		SW-480		MRC-5	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
Ос1	121.56	216.42	76.13	17.4	143.55	33.75	349.59	131.08
Ос2	99.07	191.63	74.6	8.56	6.99	2.29	7.97	2.47
Ос3	175.82	283.88	>500	>500	256.55	47.17	>500	>500

*Ос1 = [Os^{II}(H₂L^{tBut})Cl₂H₂O]; Ос2 = [Os^{II}(Me₂L^{tBut})Cl₂H₂O]; Ос3 = [Os^{II}(terpy)Cl₂H₂O]

Тестирање комплекса Pt(II) и Pd(II)

Сви испитивани Pt(II) и Pd(II) комплекси нису смањивали вијабилност ћелија у дозама до 500 μM у току 24 h од третмана. Цитотоксични ефекат након 72 h од третмана примећен је код комплекса 1, 2 и 4 на ћелијама карцинома дебелог црева HCT-116, као и комплекса 1 и 2 на ћелијама карцинома дојке MDA-MB-231. Комплекс 3 није показао никакву цитотоксичност на испитиване ћелијске линије карцинома. Можемо приметити да је MDA-MB-231 линија била отпорнија на ове комплексе, са вишим вредностима IC₅₀. (Jovanović-Stević et al, 2021)

Табела 18. Цитотоксичност једињења Pt и Pd

IC ₅₀ (μM)	HCT-116		MDA-MB-231	
	24 h	72 h	24 h	72 h
комплекс 1	>500	27.95	>500	47.01
комплекс 2	>500	8.3	>500	176.2
комплекс 3	>500	>500	>500	>500
комплекс 4	>500	59.7	>500	>500

*комплекс 1-4 = [Pd(L1)Cl]Cl; [Pd(L2)Cl]Cl; [Pt(L1)Cl]Cl; [Pt(L2)Cl]Cl

L1=2,6-bis(5,6-diphenyl-1,2,4-triazin-3-yl)pyridine

L2=2,6-bis(5,6-dipropyl-1,2,4-triazin-3-yl)pyridine

Тестирање хидразона

У скоро свим групама phenolic N-acyl-хидразона једињења долази до смањења вијабилности ћелија, док код неких нема ефекта, посебно на здравој ћелијској линији MRC-5 (са вредностима IC₅₀ већим од 500 μM). Значајно је да присуство различитих функционалних група, и то у различитим позицијама, доводи до различитих ефеката на карциномске и здраве ћелијске линије. Једињења са одређеним модификацијама селективно утичу на ћелијску линију карцинома, показујући цитотоксични карактер. На основу добијених резултата издвајају се модификације б, д, г и х у оквиру тестиране серије. (Branković et al, 2022)

Табела 19. Цитотоксичност хидразона

IC ₅₀ (μM)		HCT-116		MRC-5	
		24 h	72 h	24 h	72 h
1	а	>500	>500	>500	>500
	б	249.4	139.1	>500	>500
	ц	>500	>500	>500	>500
	д	>500	66.6	>500	306.5
	е	>500	>500	>500	>500
	ф	>500	>500	>500	>500
	г	>500	315.9	>500	>500
	х	>500	>500	>500	>500
2	а	>500	>500	>500	>500
	б	26.9	70.5	>500	232.7
	ц	>500	>500	>500	>500
	д	80.5	26.2	37.9	87.3
	е	>500	>500	>500	>500
	ф	>500	>500	>500	>500
	г	>500	61.2	>500	>500
	х	>500	>500	>500	>500

	х	>500	208	>500	>500
3	а	>500	>500	>500	>500
	б	>500	101.3	>500	>500
	ц	>500	>500	>500	>500
	д	>500	94.1	>500	213.2
	е	>500	>500	>500	>500
	ф	>500	>500	>500	>500
	г	>500	129.8	>500	439.7
	х	>500	106.9	>500	>500
4	а	>500	>500	>500	>500
	б	249.7	91.4	>500	290
	ц	>500	>500	>500	>500
	д	>500	202.1	>500	127.6
	е	>500	>500	>500	>500
	ф	>500	>500	>500	>500
	г	193.5	>500	>500	306.6
	х	>500	>500	>500	>500
5	а	247.2	63.53	175.46	59.24
	б	62.6	32.35	104.44	52.15
	ц	71.75	38.45	91.99	31.88
	д	89.91	>500	179.64	457.52
	е	>500	65.23	>500	45.76
	ф	86.92	43.6	84.33	40.0
	г	99.9	77.34	76.35	78.6
	х	>500	58.76	>500	50.55

*модификације: **1** = R1=H, R2=H, R3=H, R4=H; **2** = R1=OH, R2=H, R3=H, R4=H; **3** = R1=H, R2=H, R3=OH, R4=H; **4** = R1=H, R2=OCH₃, R3=OH, R4=H; **5** = R1=H, R2=OH, R3=OH, R4=OH; **а** = R5=H, R6=H, R7=H, R8=H; **б** = R5=OH, R6=H, R7=H, R8=H; **ц** = R5=H, R6=H, R7=OH, R8=H; **д** = R5=OH, R6=OCH₃, R7=H, R8=H; **е** = R5=H, R6=OCH₃, R7=OH, R8=H; **ф** = R5=H, R6=OCH₃, R7=OH, R8=OCH₃; **г** = R5=OH, R6=H, R7=OH, R8=H; **х** = R5=H, R6=OH, R7=OH, R8=H

Тестирање шифових база изведених из триптамина

Прелиминарна студија цитотоксичности 8 супстанци у концентрацији од 50 μ M урађена је на ћелијама колон карцинома НСТ-116. Супстанце су показале слаб антипролиферативни ефекат, док једино супстанца ТСБ6 има значајан цитотоксични ефекат. (Marjanović et al, 2025)

Табела 20. Цитотоксичност шифових база

Вијабилност ћелија изражена у %		ТСБ1	ТСБ2	ТСБ3	ТСБ4	ТСБ5	ТСБ6	ТСБ7
HCT-116	24 h	90.71	80.46	86.48	89.89	74.11	44.59	60.59
	72 h	112.61	120.51	108.27	92.19	92.85	44.65	59.23

*ТСБ1-7 = C₁₈H₁₈N₂O₂; C₁₆H₁₅N₃; C₁₆H₁₅N₃; C₁₇H₁₅N₃O₂; C₁₅H₁₅N₃; C₂₀H₁₇N₃; C₁₅H₁₄N₂S

Тестирање јонских течности

Процена јонских течности (ЈТ) била је заснована на идентификацији било каквих цитотоксичних својстава која би могла да испоље када се користе независно од других комплекса метала. Користећи фиксну концентрацију од 100 μ M за сваку јонску течност, имали смо за циљ да уочимо све непосредне цитотоксичне ефекте који би могли бити критични за процес селекције у даљим тестовима третмана. Након анализе, примећено је да су се ЈТ1 и ЈТ10, из серије тестираних, истакли - не по својој цитотоксичности, већ пре по релативно нижем утицају на вијабилност ћелија, означавајући их као једињења од интереса за наредне експерименте (Табела 21). (Caković et al, 2024)

Табела 21. Цитотоксичност јонских течности

Вијабилност ћелија изражена у %	HeLa		MRC-5	
	24 h	72 h	24 h	72 h
JT1	68.4	48.5	124.1	117.7
JT2	65.3	40.9	115.7	110.2
JT3	65.9	54.9	118.9	110.6
JT4	72.2	90.2	122.4	125.8
JT5	42.2	17.2	119.1	105.4
JT6	77.5	112.8	116.9	113.2
JT7	80.4	81.8	139.1	117.9
JT8	74.5	95.6	140.2	88.4
JT9	71.3	77.5	141.6	107.8
JT10	69.8	66.9	118.7	133.5
JT11	70.5	81	127.2	146.9

* JT 1-11 = 1-ethyl-3-methylimid-azolium ethyl sulfate; choline nicotinate; choline biotinate; choline gamma-aminobutyrate; choline ascorbate; choline syringate; choline benzoate; agmatine nicotinate; agmatine ascorbate; agmatine salicylate; agmatine ibuprofenate

Тестирање комерцијалних цитостатика*Тестирање појединачних комерцијалних цитостатика*

Наши резултати показују најизраженији цитотоксични карактер 5-флуороурацила, оксалиплатине и иринотекана након 72 h на ћелијама карцинома дебелог црева HCT-116. Осим леуковорина, остала три лека показују смањење вијабилности ћелија зависно од времена и дозе. У третману ћелија карцинома дојке MDA-MB-231, доксорубицин је показао доминантну антиканцерогену активност у оба периода лечења. Значајан ефекат после 72 h такође су имали паклитаксел и доцетаксел, док Ендоксан није показао цитотоксичне ефекте. Доксорубицин и паклитаксел са $IC_{50} < 50 \mu M$ могу се сматрати веома агресивном опцијом лечења против горе поменуте ћелијске линије карцинома дојке. (Živanović et al, 2023; Demetriades et al, 2022)

Табела 22. Цитотоксичност комерцијалних цитостатика, IC_{50} (μM)

HCT-116	24 h	72 h
5-флуороурацил	>500	86.9
Иринотекан	>500	143.9
Леуковорин	>500	>500
Оксалиплатина	>500	89.3
MDA-MB-231	24 h	72 h
Доцетаксел	>500	166.5
Доксорубуцин	37.9	0.2
Ендоксан	>500	>500
Паклитаксел	412.9	0.02

Тестирање протокола комерцијалних цитостатика

Протоколи за колон карцином који се у данашње време користе у медицинској пракси (Folfox, Folfiri) показују добру цитотоксичност, али слабу селективност у односу на здраве ћелије. Folfiri протокол има нешто ниже IC_{50} вредности према туморској линији, али не довољно да бисмо могли рећи да је селективан (Табела 23).

С друге стране, протоколи за карцином дојке који се у данашње време користе у медицинској пракси (AC, Paclitaxel, Docetaxel) показују чак већу цитотоксичност према здравој линији фибробласта. Ово се посебно може видети код протокола Paclitaxel-a, као и 48 или 72 h после примене AC протокола (Табела 23).

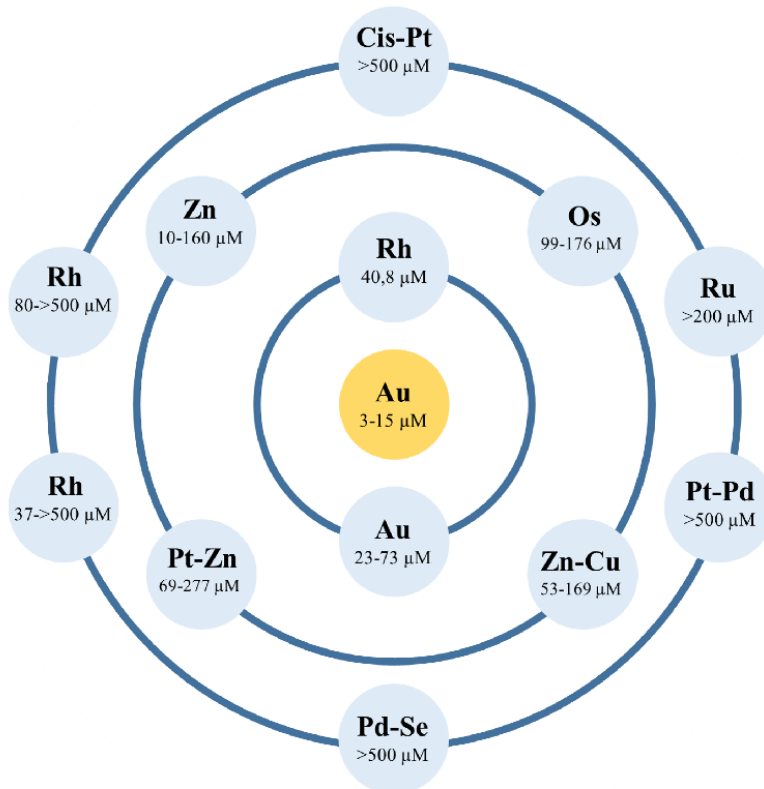
Табела 23. Цитотоксичност комерцијалних протокола, IC_{50} (μM)

HCT-116	Појединачан 24 h	Протокол 48 h	Појединачан 72 h	Протокол 72 h
Folfox	43.2	19.19	16.55	16.46
Folfiri	38.92	16.17	14.15	13.34

MDA-MB-231	Појединачан 24 h	Протокол 48 h	Појединачан 72 h	Протокол 72 h
AC	32.95	22.58	31.38	19.76
Paclitaxel	73.82	30.22	34.06	21.75
Docetaxel	70.09	27.76	32.93	18.78
MRC-5	Појединачан 24 h	Протокол 48 h	Појединачан 72 h	Протокол 72 h
Folfox	39.37	19.92	18.8	18.99
Folfiri	40.98	20.67	17.12	16.8
AC	44.91	18.85	15.63	14.82
Paclitaxel	46.87	20.48	18.86	16.35
Docetaxel	57.78	32.79	43.6	30.34

2 Резултати тестирања цитотоксичности комплекса злата

Према IC_{50} (μM) вредностима (слика 35), издвајају се тетра- и пента-координирани комплекси злата (III).



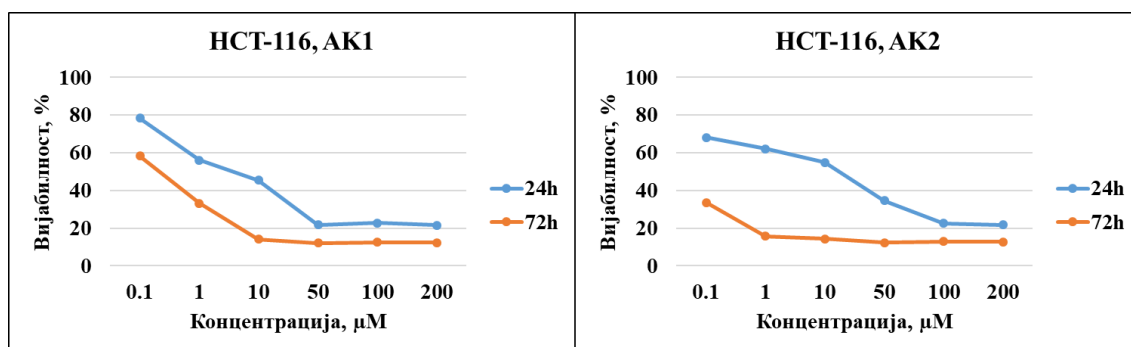
Слика 35. Вредности IC_{50} (μM) код испитиваних комплекса.

Комплекси који су се издвојили за даља истраживања према својој цитотоксичности, селективности и осталим карактеристикама су комплекси злата (III):

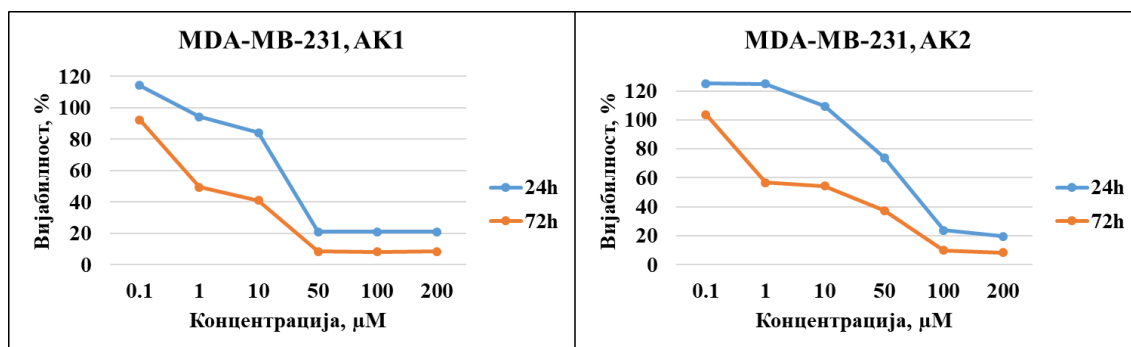
- АК1: квадратно-планарни $[\text{Au}(\text{DPP})\text{Cl}_2]^+$ (DPP = 4,7-дифенил-1,10-фенантролин), и
- АК2: искривљени квадратно-пирамидални $[\text{Au}(\text{DMP})\text{Cl}_3]$ (DMP = 2,9-диметил-1,10-фенантролин).

Оба комплекса су стабилна у води и у пуферском раствору (pH = 7.2). Потврђена је нешто већа реактивност комплекса АК1. Проучавање интеракција ових комплекса са ДНК показују да се на вишеструке начине везују, укључујући ковалентне и интеркалационе интеракције. Бољи афинитет за интеркалацију показао је комплекс АК2. Такође, релативно високе константе везивања према БСА показују добар афинитет везивања оба комплекса, али комплекс АК1 показује јачу интеракцију. (Radisavljevic et al, 2020)

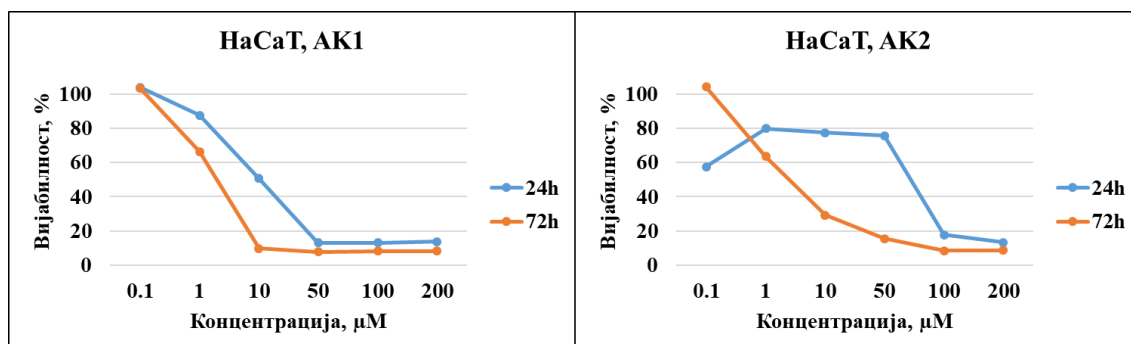
Ови комплекси злата значајно су смањили вијабилност ћелијских линија, и карцинома и здравих ћелија кератиноцита на временски и дозно зависан начин, уз нешто бољи ефекат комплекса АК1. Комплекси АК1 и АК2 су испољили највеће цитотоксичне ефекте на ћелије карцинома дебелог црева НСТ-116.



Слика 36. Ефекат АК1 и АК2 комплекса на вијабилност НСТ-116 ћелија после 24 и 72 h од излагања. Све вредности су средње; проценти живих ћелија.



Слика 37. Ефекат АК1 и АК2 комплекса на вијабилност МДА-МВ-231 ћелија после 24 и 72 h од излагања. Све вредности су средње; проценти живих ћелија.



Слика 38. Ефекат АК1 и АК2 комплекса на вијабилност HaCaT ћелија после 24 и 72 h од излагања. Све вредности су средње; проценти живих ћелија.

Испитивани комплекси су индуковали јачу цитотоксичну активност од цисплатине на ћелијама HCT-116 и MDA-MB-231. (Radisavljević et al, 2020)

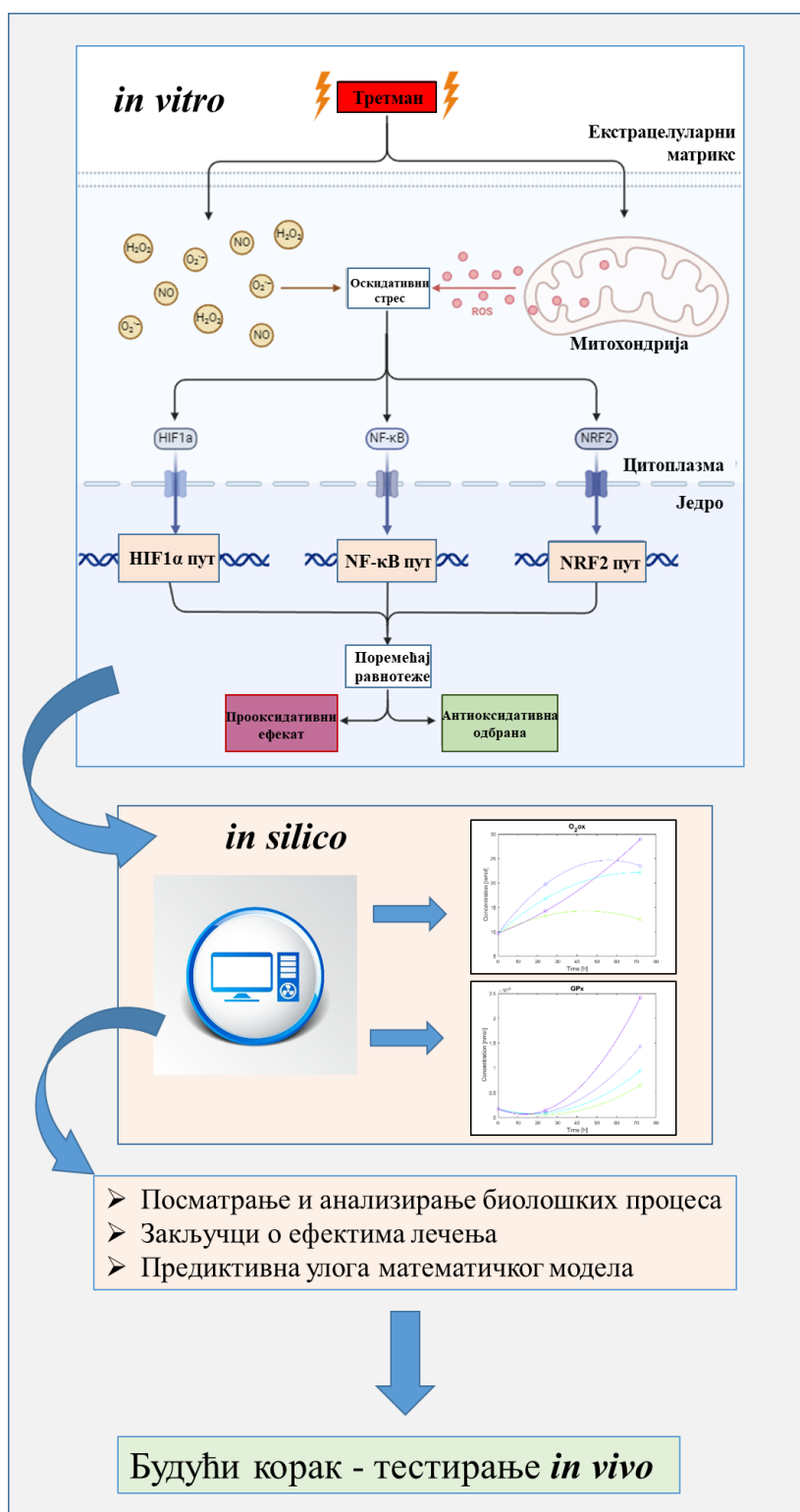
Табела 24. Цитотоксични ефекат - IC₅₀ (μM) вредности

Третман	IC ₅₀ (μM)					
	HCT-116		MDA-MB-231		HaCaT	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
AK1 ^a	3.13	0.14	28.16	0.98	10.26	1.61
AK2 ^a	14.57	0.01	75.02	11.75	70.58	2.40
K[AuCl ₄] ^б	>200	180.36	101.29	150.73	/	/
Цисплатина ^б	/	1.6	/	30.8	/	/

^aRadisavljević et al, 2020; ^бRadisavljević et al, 2019; ^бZaric et al, 2020.

Од молекуларно-биолошких тестова, на овим комплексима су рађени тестови процене апоптозе/некрозе и тестови испитивања редокс статуса. Такође, ови комплекси су даље убацивани у наночестице као носаче потенцијално токсичних једињења, и у овом облику су испитиване њихове особине, стабилност, ослобађање, као и токсичност. Ефекат комплекса злата на механизам апоптозе/некрозе испитиван је и у 2Д традиционалним статичким моделима и 3Д микрофлуидним динамичким чип уређајима.

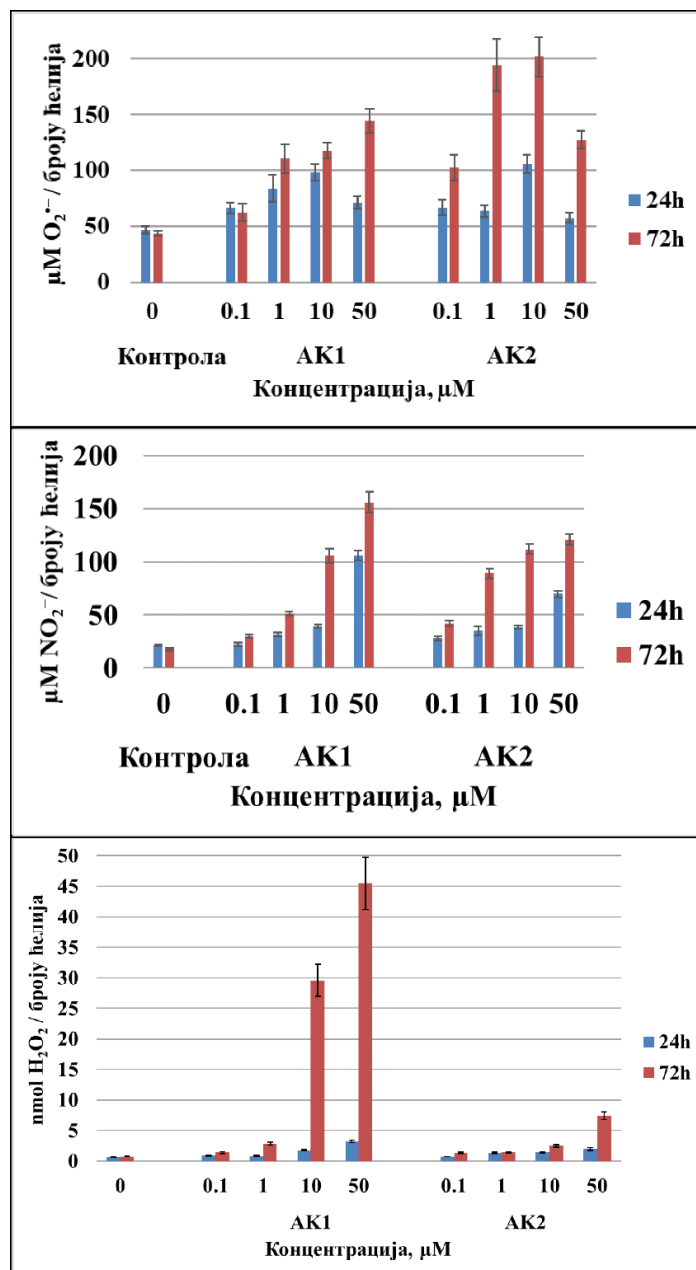
3 Резултати испитивања утицаја комплекса злата на редокс статус ћелија



Слика 39. Испитивање редокс статуса и математички модел.

3.1 Резултати *in vitro* испитивања редокс статуса ћелија

Преглед концентрација реактивних врста према броју живих ћелија приказан је на слици 40.

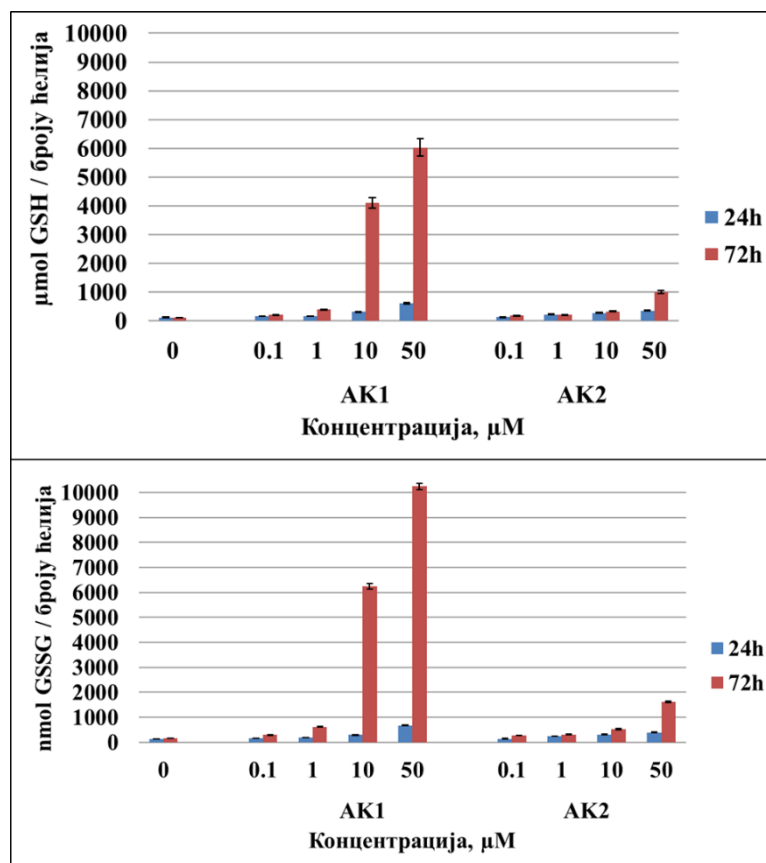


Слика 40. Ефекти Аи-комплекса (АК1 и АК2) на ћелије НСТ-116 изражени као: концентрације $\text{O}_2^{\bullet-}$, концентрације NO , концентрације H_2O_2 .

Концентрација супероксидних анјонских радикала расте са повећањем концентрације примењених комплекса злата, осим за највеће концентрације ($50 \mu\text{M}$) где опада после оба комплекса након 24 h и после АК2 комплекса након 72 h. Што се тиче азотног оксида, његова концентрација се повећава у зависности од дозе у оба третмана. Концентрација водоник-пероксида благо расте са повећањем примењених концентрација

оба комплекса, с тим да у случају комплекса АК1 после 10 μM и 50 μM долази до значајног повећања H_2O_2 .

Промене у систему глутатиона такође зависе од дозе. Можемо уочити повећање и оксидованог и редукованог глутатиона, с тим што је то повећање значајно веће при примени већих концентрација (10 μM и 50 μM) комплекса АК1 након 72 h од примене третмана (слика 41).



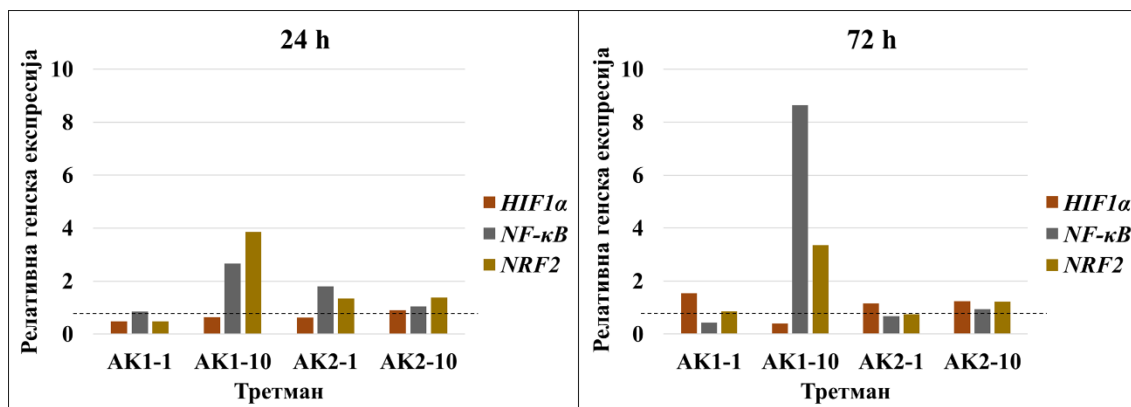
Слика 41. Ефекти Аи-комплекса (АК1 и АК2) на ћелије НСТ-116 изражени као концентрације GSH и GSSG.

Релативна генска експресија *HIF1α* показује смањену експресију овог гена 24 h након третмана, док након 72 h долази до благог повећања, осим при вишој концентрацији АК1 комплекса (10 μM) где се она још више смањује.

Што се тиче експресије *NF-κB* гена, комплекс АК1 у концентрацији од 1 μM после 24 h доводи до благог смањења експресије гена, која се још више смањује после 72 h, што није случај за већу концентрацију (10 μM) где се експресија повећава 2.7 пута након 24 h и наставља да расте још више (до 8.7 пута) након 72 h. Код АК2 комплекса имамо скоро 2 пута повећање експресије после 24 h примене ниже концентрације, а после 72 h смањује експресију *NF-κB* гена. Када примењујемо већу концентрацију, имамо вредности блиске нетретираним ћелијама у обе временске тачке теста.

Експресија гена *NRF2* значајно се разликује у зависности од примењене концентрације комплекса. Са АК1 комплексом у нижој концентрацији, долази до двоструког смањења експресије након 24 h третмана, која има тенденцију да се врати у нормалу након 72 h, док при вишој концентрацији (10 μM) долази до 4 пута повећања у експресији гена и ово повећање се приближно одржава и након 72 h. Након примене АК2

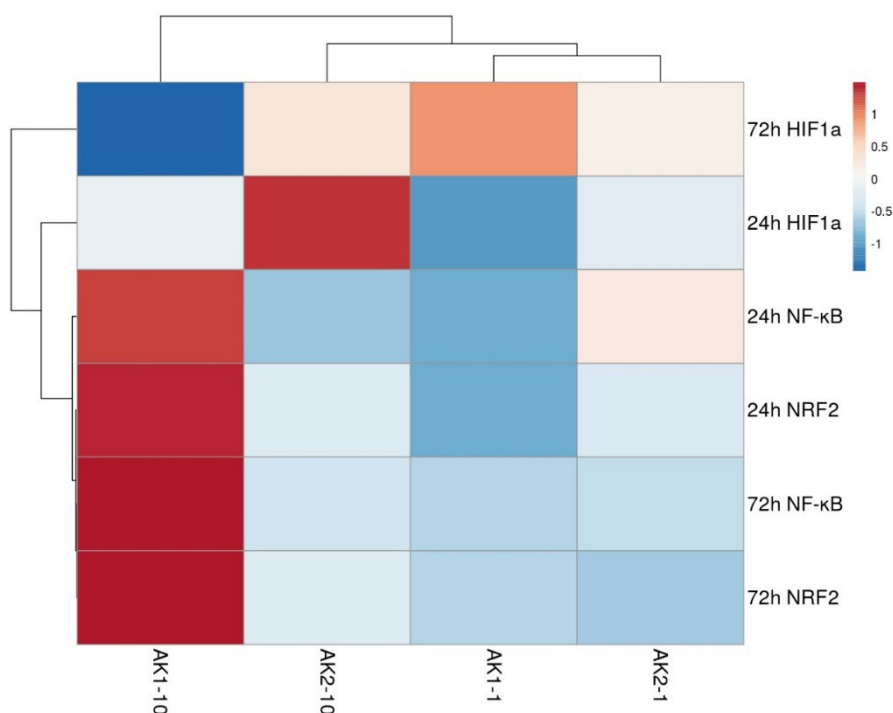
комплекса експресија *NRF2* гена је благо повишена након обе дозе после 24 h, и остаје тако након 72 h само при већој дози.



Слика 42. Релативна експресија иРНК за гене повезане са редокс равнотежом.

	AK1-1	AK1-10	AK2-1	AK2-10
24 h <i>HIF1α</i>	0.48	0.64	0.62	0.91
24 h <i>NF-κB</i>	0.85	2.66	1.80	1.03
24 h <i>NRF2</i>	0.48	3.85	1.34	1.37
72 h <i>HIF1α</i>	1.53	0.39	1.16	1.24
72 h <i>NF-κB</i>	0.44	8.63	0.67	0.94
72 h <i>NRF2</i>	0.85	3.36	0.75	1.22

Слика 43. Heatmap - Релативна експресија иРНК за гене повезане са редокс равнотежом – *HIF1α*, *NF-κB* и *NRF2*.

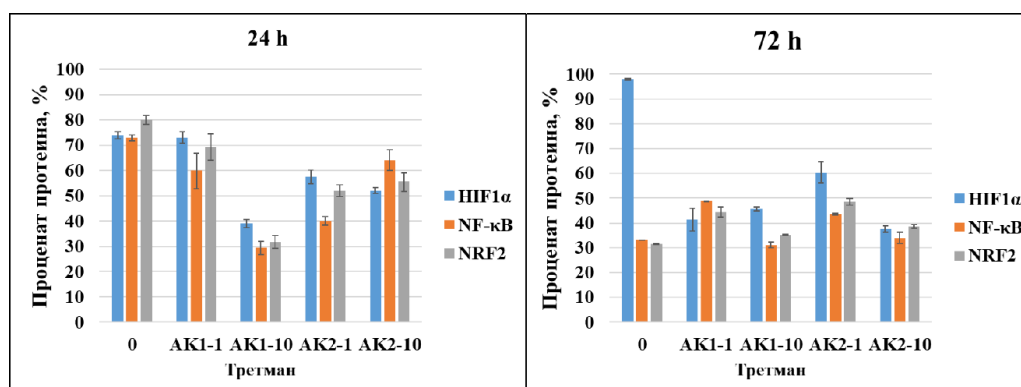


Слика 44. Heatmap - Релативна експресија иРНК за гене повезане са редокс равнотежом – *HIF1α*, *NF-κB* и *NRF2*.

Експресија протеина HIF1 α показује смањење процента протеина након примене АК2 комплекса, што је најизраженије када се примени већа концентрација третмана после 72 h (више него дупло). У случају третмана АК1, нема промене у проценту протеина после 24 h од примене ниже концентрације, док већа концентрација доводи до двоструког смањења. После 72 h, при обе концентрације, проценат протеина је више него двоструко смањен, уз повећање експресије овог протеина у контролним ћелијама.

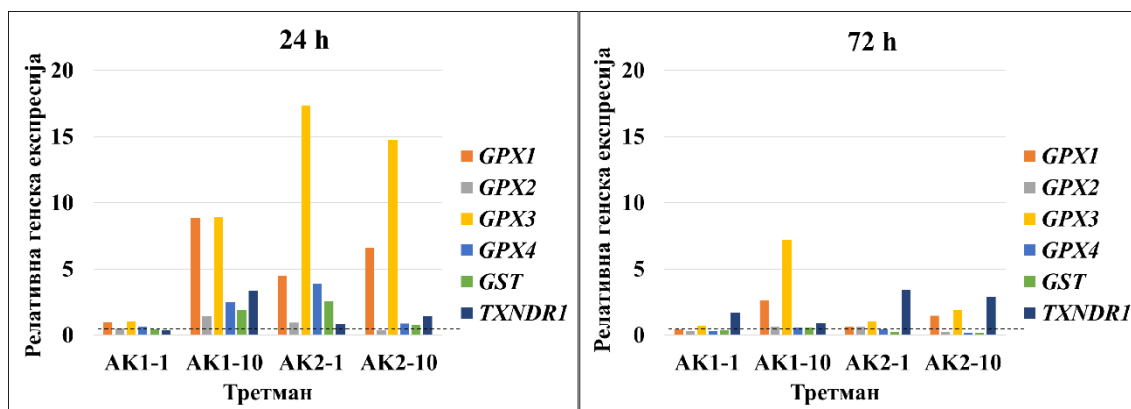
Експресија NF- κ B протеина показује дозно-зависно смањење након примене АК1 комплекса после 24 h, док се повећава после 72 h при нижој концентрацији у односу на контролу, и има приближно исти проценат протеина у вишој концентрацији као у нетретираним ћелијама (где имамо више него двоструко повећање након 72 h). Што се тиче комплекса АК2, његова примена после 24 h показује веће смањење експресије протеина при нижој дози (скоро дупло) него при вишој. После 72 h третмана, проценат NF- κ B протеина је једнак вредностима у контролним ћелијама при концентрацији од 10 μ M, док при нижој концентрацији проценат остаје благо повишен.

NRF2 протеинска експресија показује смањење процента протеина након примене оба комплекса после 24 h, с тим да је смањење највеће након примене 10 μ M АК1 комплекса. Насупрот томе, након 72 h од примене третмана долази до повећања експресије овог протеина у односу на нетретиране ћелије. Повећан проценат протеина је запаженији након примене нижих концентрација оба третмана (1 μ M).



Слика 45. Ниво експресије протеина HIF1 α , NF- κ B и NRF2 на HCT-116 контролним ћелијама и ћелијама третираним комплексима АК1 и АК2 (1 и 10 μ M).

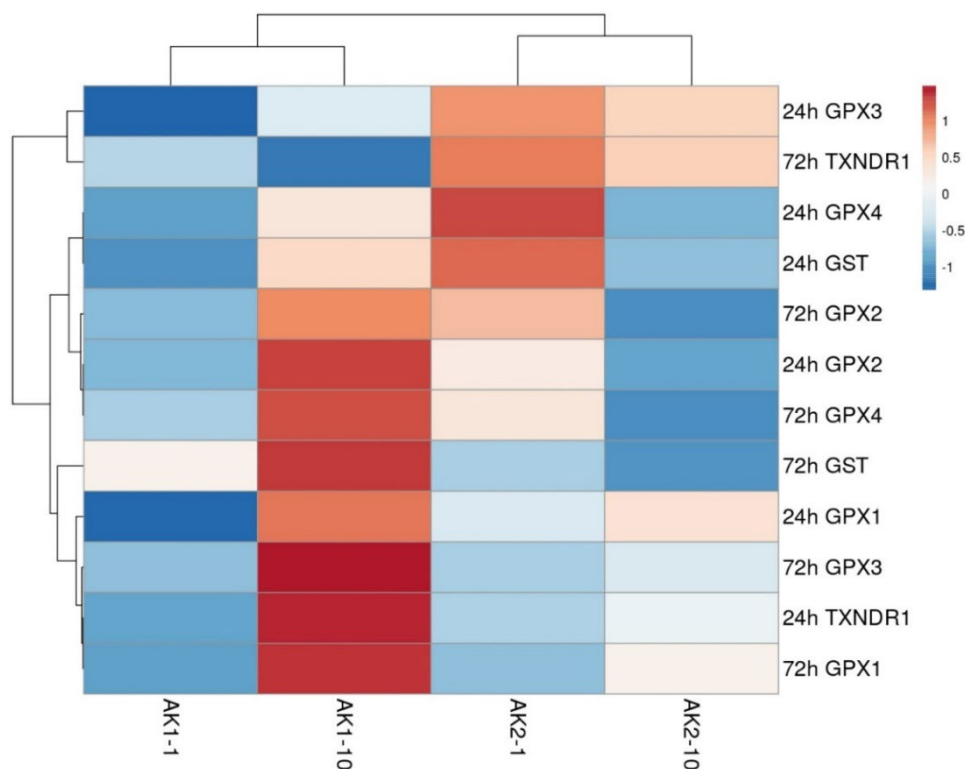
Експресија *GPx1* је значајно повишена после 24 h у третману са оба комплекса (9-, 4,5- и 6,5 пута), и остаје повишена после 72 h са вишим дозама ових комплекса (10 μ M). Експресија *GPx2* гена је благо повећана само код комплекса АК1 у вишој дози (10 μ M), у свим осталим случајевима је смањена. После 24 h, ген *GPx3* је веома изражен, посебно након примене комплекса АК2, до 17 и 15 пута. Са АК1 комплексом у вишој дози, повећава се до 9 пута после 24 h и остаје повишена експресија и после 72 h (7 пута), док се у другим случајевима враћа на контролне вредности. *GPx4* ген има благо повишену експресију после 24 h у третману АК1-10 и АК2-1, док је после 72 h експресија свих испитиваних параметара смањена. Експресија *GST* гена је после 24 h веома благо повишена у третманима АК1-10 и АК2-1, док је у свим осталим третманима експресија смањена и после 24 и после 72 h. Експресија *TXNDR1* гена је нешто већа после 24 h са већим дозама (10 μ M) обе супстанце, док се после 72 h смањује са АК1 третманом у вишој дози (10 μ M), а повећава се са остала 3 третмана (AK1-1, AK2-1 и AK2-10).



Слика 46. Релативна експресија иРНК за гене повезане са редокс равнотежом.

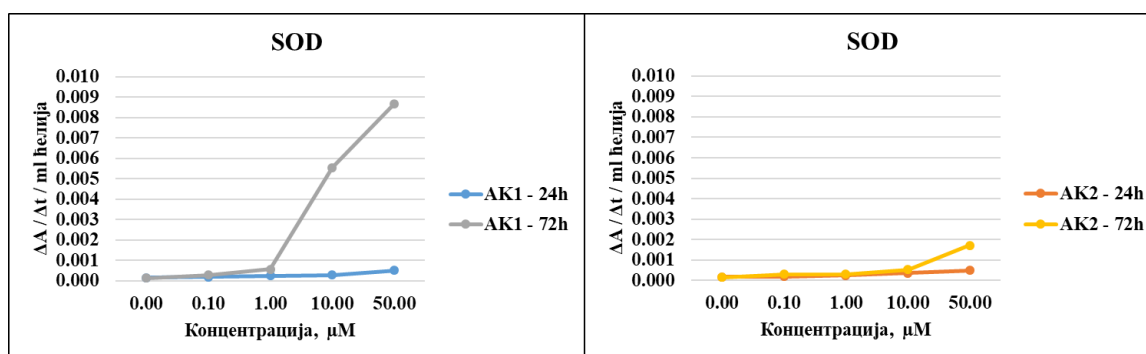
		AK1-1	AK1-10	AK2-1	AK2-10
24 h	<i>GPx1</i>	0.97	8.87	4.48	6.58
	<i>GPx2</i>	0.46	1.44	0.93	0.39
	<i>GPx3</i>	1.03	8.91	17.36	14.75
	<i>GPx4</i>	0.65	2.48	3.85	0.86
	<i>GST</i>	0.41	1.93	2.55	0.75
	<i>TXNDR1</i>	0.38	3.34	0.83	1.43
72 h	<i>GPx1</i>	0.42	2.58	0.64	1.44
	<i>GPx2</i>	0.30	0.67	0.61	0.23
	<i>GPx3</i>	0.72	7.22	1.04	1.93
	<i>GPx4</i>	0.28	0.54	0.41	0.21
	<i>GST</i>	0.37	0.59	0.23	0.15
	<i>TXNDR1</i>	1.66	0.91	3.43	2.92

Слика 47. Heatmap – Релативна експресија иРНК за гене повезане са редокс равнотежом.



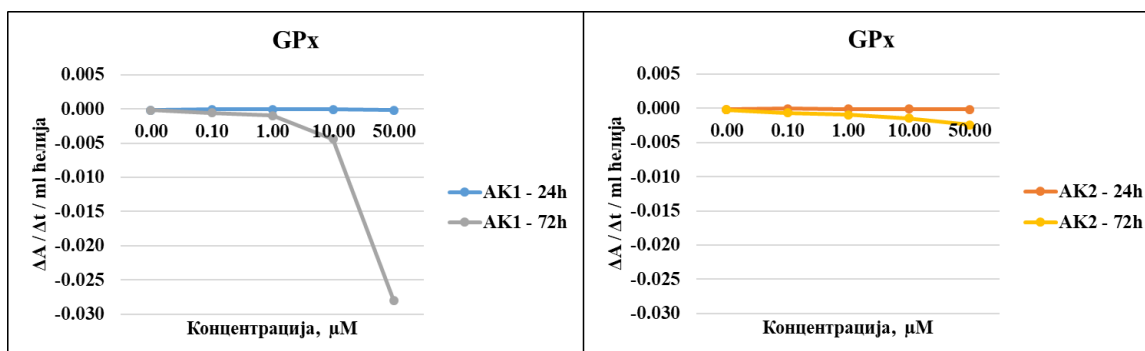
Слика 48. Heatmap – Релативна експресија иРНК за гене повезане са редокс равнотежом.

Након употребе комплекса АК1, активност SOD ензима се благо повећава након 24 h при примени највеће дозе, док после 72 h активност значајно расте након примене 10 и 50 μM . Код АК2 комплекса активност се благо повећава после 24 h само уз примену највеће дозе, а још више расте после 72 h, док остале дозе немају утицаја на SOD ензим.



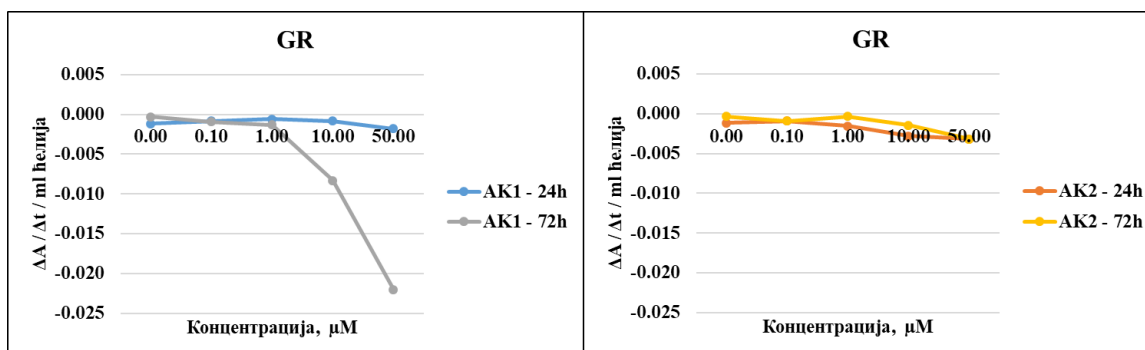
Слика 49. Активност супероксид дисмутазе (SOD) у ћелијама НСТ-116 третираним комплексима злата (III) (АК1 и АК2) после 24 и 72 h.

После 24 h комплекси злата немају ефекта на ензим GPx, док после 72 h активност нагло опада при примени 10 и 50 μM АК1 комплекса, а благо опада након 50 μM АК2 комплекса.



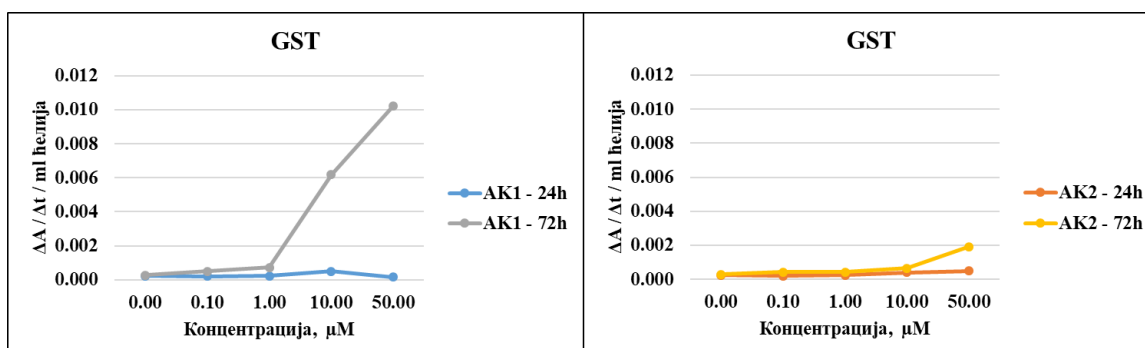
Слика 50. Активност глутатион пероксидазе (GPx) у ћелијама НСТ-116 третираним комплексима злата (III) (AK1 и AK2) после 24 и 72 h.

После 24 h, активност GR ензима се веома благо смањује при највишим дозама оба комплекса. После 72 h остаје иста активност са применом AK2 комплекса, док применом AK1 комплекса активност GR ензима знатно опада након доза од 10 и 50 µM.



Слика 51. Активност глутатион редуктазе (GR) у ћелијама НСТ-116 третираним комплексима злата (III) (AK1 и AK2) после 24 и 72 h.

После 24 h нема ефекта ових комплекса злата на GST ензим, док после 72 h долази до благог повећања активности при примени највеће дозе (50 µM) комплекса AK2, а значајног повећања после 10 и 50 µM AK1 комплекса.

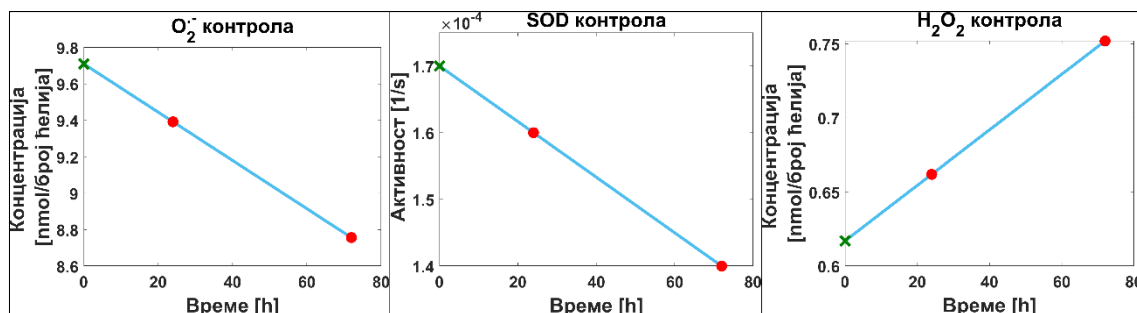


Слика 52. Активност глутатион-С-трансферазе (GST) у ћелијама НСТ-116 третираним комплексима злата (III) (AK1 и AK2) после 24 и 72 h.

3.2 Резултати математичког модела редокс статуса у ћелијама

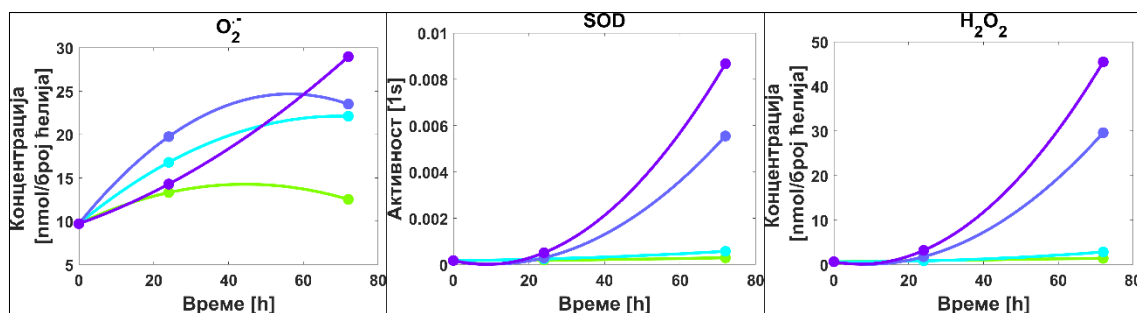
У објашњеној шеми модела узели смо у обзир концентрације $O_2^{\cdot-}$ анјона и SOD ензима да бисмо предвидели концентрацију H_2O_2 . Касније смо упоредили добијене вредности са онима измереним у 24 и 72 h за контролно стање, као и за излагање различитим концентрацијама комплекса AK1 и AK2 (0.1 – 1 – 10 – 50 μM).

Почетне концентрације $O_2^{\cdot-}$, SOD и H_2O_2 смо добили уклапањем вредности (линеарне функције) на временску тачку $t = 0$ s из контролних мерења (када нису примењивани комплекси).

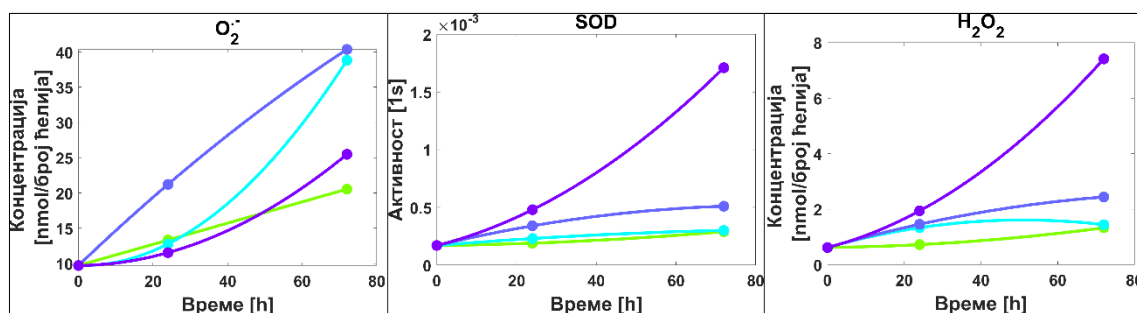


Слика 53. Прилагођене почетне вредности након контролних мерења за $O_2^{\cdot-}$ анјон, SOD ензим и H_2O_2 .

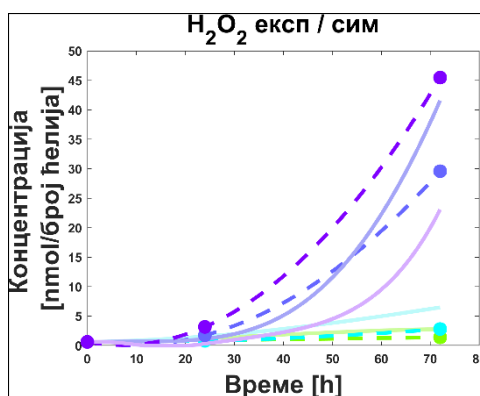
У следећем кораку користили смо добијене почетне вредности из контролних мерења да буду исте као у случају примене комплекса AK1 или AK2 (по четири концентрације за сваки комплекс). Експериментална мерења смо прилагодили полиномским функцијама другог реда да бисмо проценили вредности ових компоненти у временском опсегу од 0 s до 72 h.



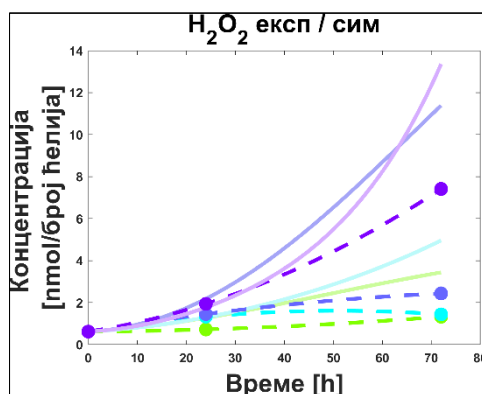
Слика 54. Прилагођене криве након добијених почетних вредности и мерења изложености AK1 комплексу за $O_2^{\cdot-}$, SOD, H_2O_2 . AK1=0.1 (светло зелена); 1 (светло плава); 10 (тамно плава) и 50 (љубичаста)



Слика 55. Прилагођене криве након добијених почетних вредности и мерења изложености АК2 комплексу за $O_2^{\bullet-}$, SOD, H_2O_2 . АК2=0.1 (светло зелена); АК2=1 (светло плава); АК2=10 (тамно плава) и АК2=50 (љубичаста)

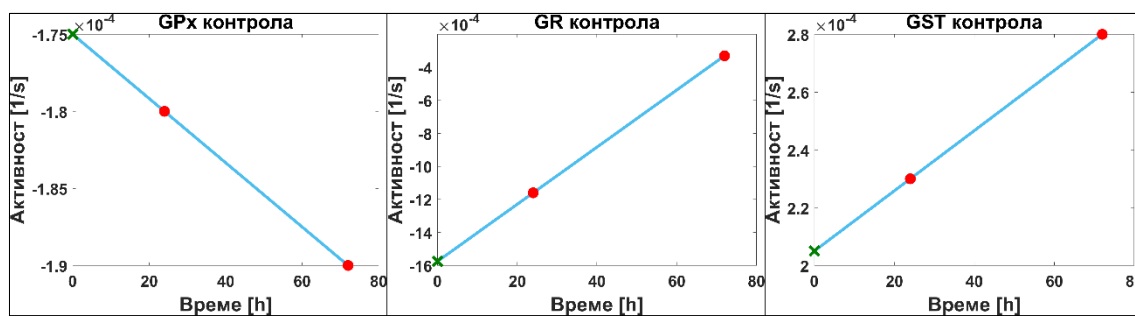


Слика 56. Предвиђене вредности симулације (пуне линије) у односу на експерименталне вредности (испрекидане линије) концентрације H_2O_2 током времена за АК1 комплекс.

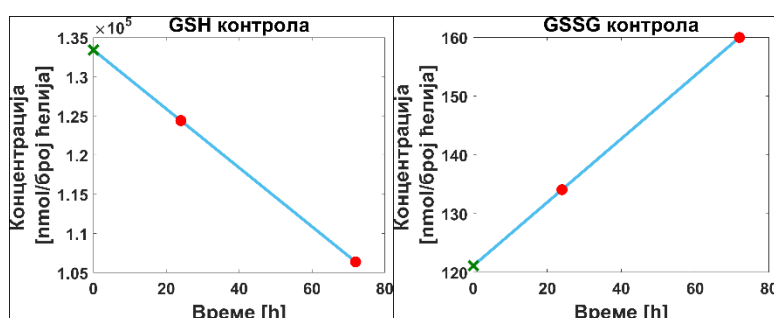


Слика 57. Предвиђене вредности симулације (пуне линије) у односу на експерименталне вредности (испрекидане линије) концентрације H_2O_2 током времена за АК1 комплекс.

Почетне вредности ензима GPx, GR и GST, као и неензимских компоненти GSH и GSSG (у време = 0 s) се постављају из контролних мерних тачака у 24 h и 72 h (линеарне функције). Добијене почетне вредности у контролним мерењима се користе као и почетне вредности за мерења када је примењен комплекс АК1 или АК2.

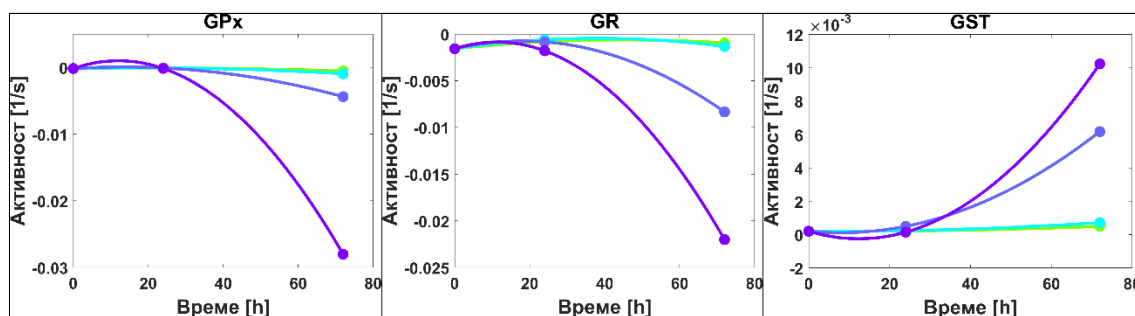


Слика 58. Предвиђене почетне вредности након контролних мерења за ензиме GPx, GR и GST.

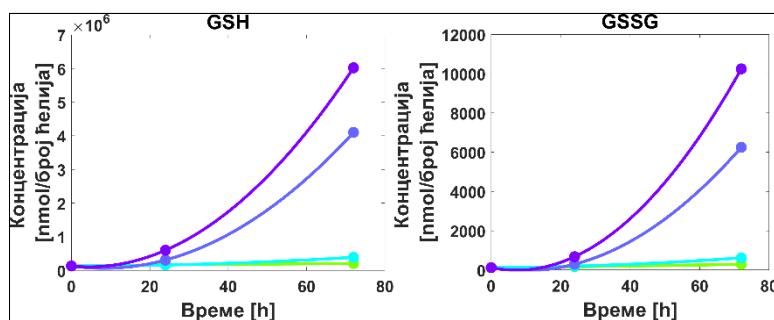


Слика 59. Предвиђене почетне вредности након контролних мерења за GSH, и GSSG.

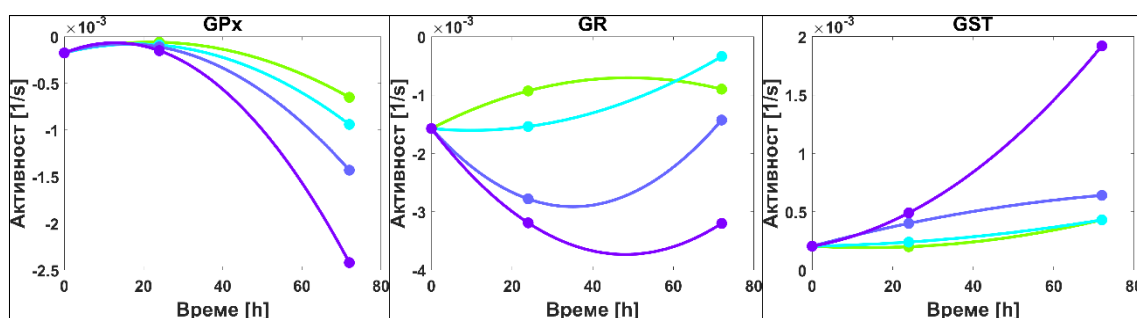
Коришћењем прилагођених почетних вредности и оних измерених у временским тачкама 24 и 72 h за примењене АК1 и АК2 добијају се полиномске криве за ензиме GPx, GR и GST, као и за GSH и GSSG. Помоћу прилагођених једначина можемо проценити вредности у свим временским тачкама од 0 s до 72 h.



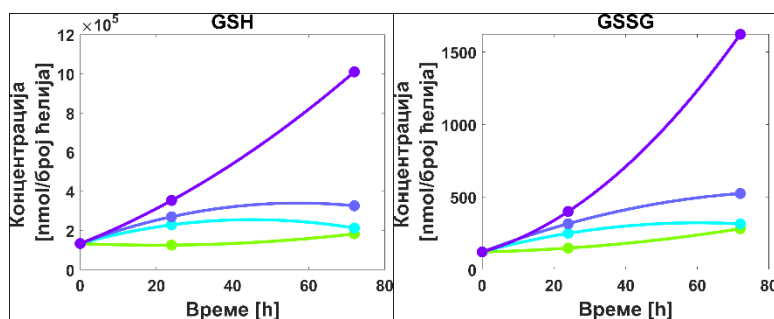
Слика 60. Прилагођене криве након добијених почетних вредности и мерења изложености АК1 за GPx, GR и GST. АК1=0.1 (светло зелена); АК1=1 (светло плава); АК1=10 (тамно плава) и АК1=50 (љубичаста)



Слика 61. Прилагођене криве након добијених почетних вредности и мерења изложености AK1 за GSH и GSSG. AK1=0.1 (светло зелена); AK1=1 (светло плава); AK1=10 (тамно плава) и AK1=50 (љубичаста)

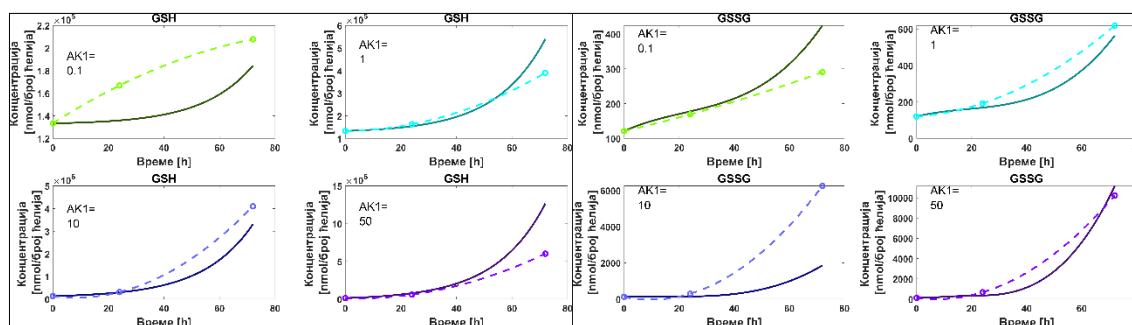


Слика 62. Прилагођене криве након добијених почетних вредности и мерења изложености AK2 за GPx, GR и GST. AK2=0.1 (светло зелена); AK2=1 (светло плава); AK2=10 (тамно плава) и AK2=50 (љубичаста)

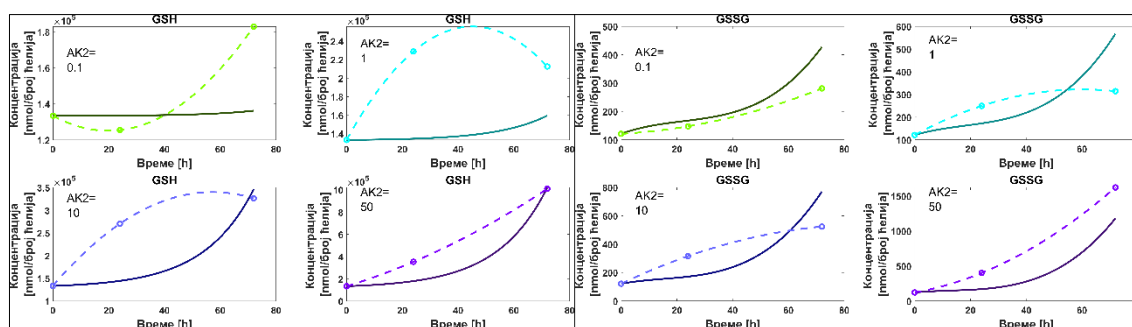


Слика 63. Прилагођене криве након добијених почетних вредности и мерења изложености AK2 за GSH и GSSG. AK2=0.1 (светло зелена); AK2=1 (светло плава); AK2=10 (тамно плава) и AK2=50 (љубичаста)

Поређење предвиђених вредности за GSH и GSSG са онима добијеним из експерименталних мерења у кораку валидације резултата приказано је на сликама 64 и 65.

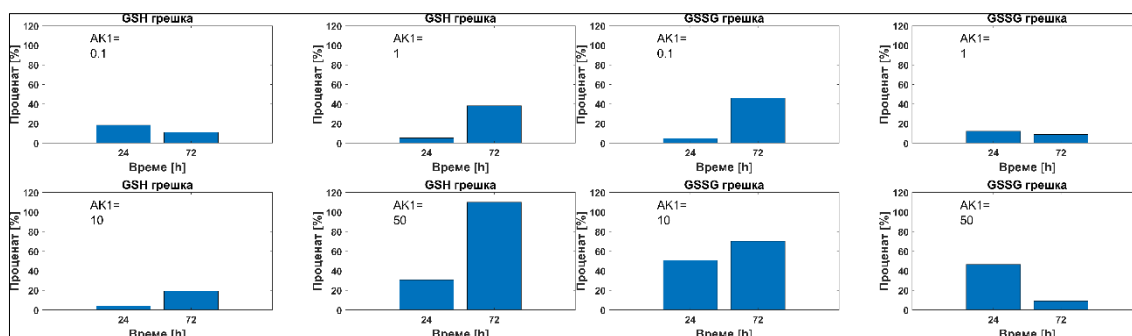


Слика 64. Предвиђене вредности симулације (пуне линије) у односу на експерименталне вредности (испрекидане линије) за GSH и GSSG након третмана AK1. Експериментална мерења су представљена кружићима.

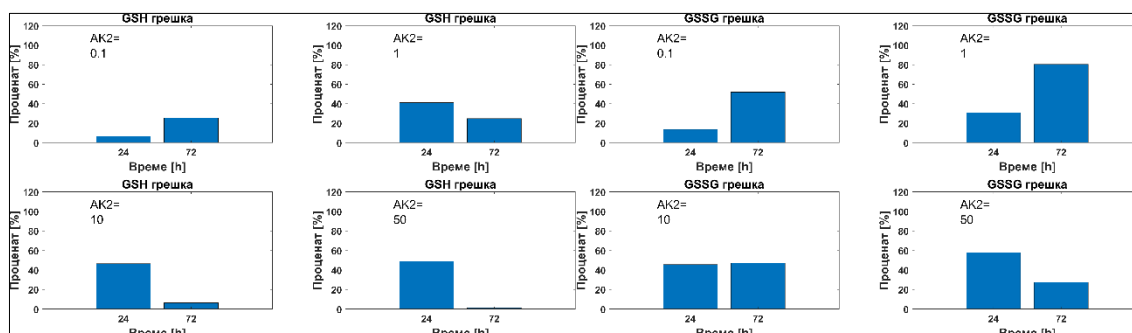


Слика 65. Предвиђене вредности симулације (пуне линије) у односу на експерименталне вредности (испрекидане линије) за GSH и GSSG након третмана AK2. Експериментална мерења су представљена кружићима.

Преклапање предвиђених и експериментално постављених кривих је различито за различите количине изложености AK1 или AK2 комплексу. Због тога смо израчунали добијену грешку за сваки случај да бисмо дискутовали о тачности и поузданости развијеног рачунарског алата (слике 66 и 67). Експериментална мерења у две временске тачке (24 и 72 h) узимају се као референтне тачке у прорачуну грешака.



Слика 66. Одступање симулираних вредности GSH и GSSG од експериментално измерених у две временске тачке (24 и 72 h) након примене AK1 комплекса.



Слика 67. Одступање симулираних вредности GSH и GSSG од експериментално измерених у две временске тачке (24 и 72 h) након примене AK2 комплекса.

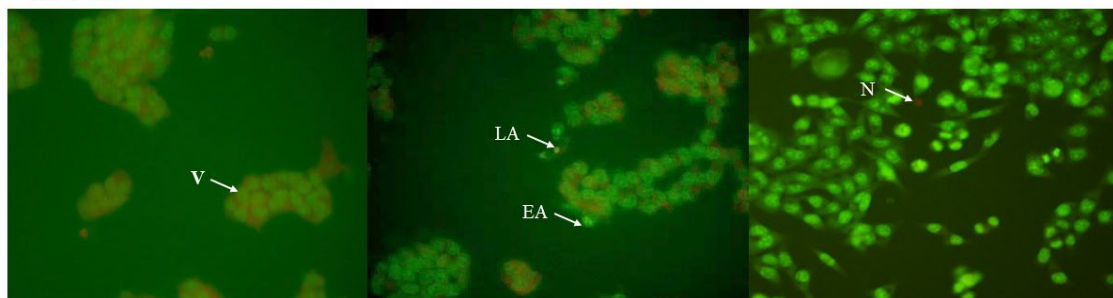
Са слике 64 се могу видети слични трендови у предвиђеним и прилагођеним кривама за добијене GSH и GSSG вредности. Ако погледамо слику 66, где су грешке уцртане, можемо приметити веће грешке у неким случајевима, на пример грешку у предвиђеној GSH вредности за експозицију AK1=50 после 72 h, али и мале грешке, као у предвиђеној вредности GSSG за излагање AK1=0.1 после 24 h. Иако предвиђени одговори имају одступања од експерименталних резултата у неким случајевима, можемо закључити да су предвиђене вредности унутар опсега и истог реда величине.

Са слике 65 се могу такође видети слични трендови у предвиђеним и прилагођеним кривама за добијене GSH и GSSG вредности. Ако погледамо слику 67, где су грешке уцртане, можемо приметити веће грешке у предвиђеној GSSG вредности за експозицију AK2=1 после 72 h или за AK2=50 после 24 h, али и мале грешке, као у предвиђеној вредности GSH за излагање AK2=50 после 72 h. Такође, можемо закључити да су предвиђене вредности унутар опсега и истог реда величине, иако предвиђени одговори имају одступања од експерименталних резултата у неким случајевима.

4 Резултати испитивања утицаја комплекса злата на механизам апоптозе у ћелијама

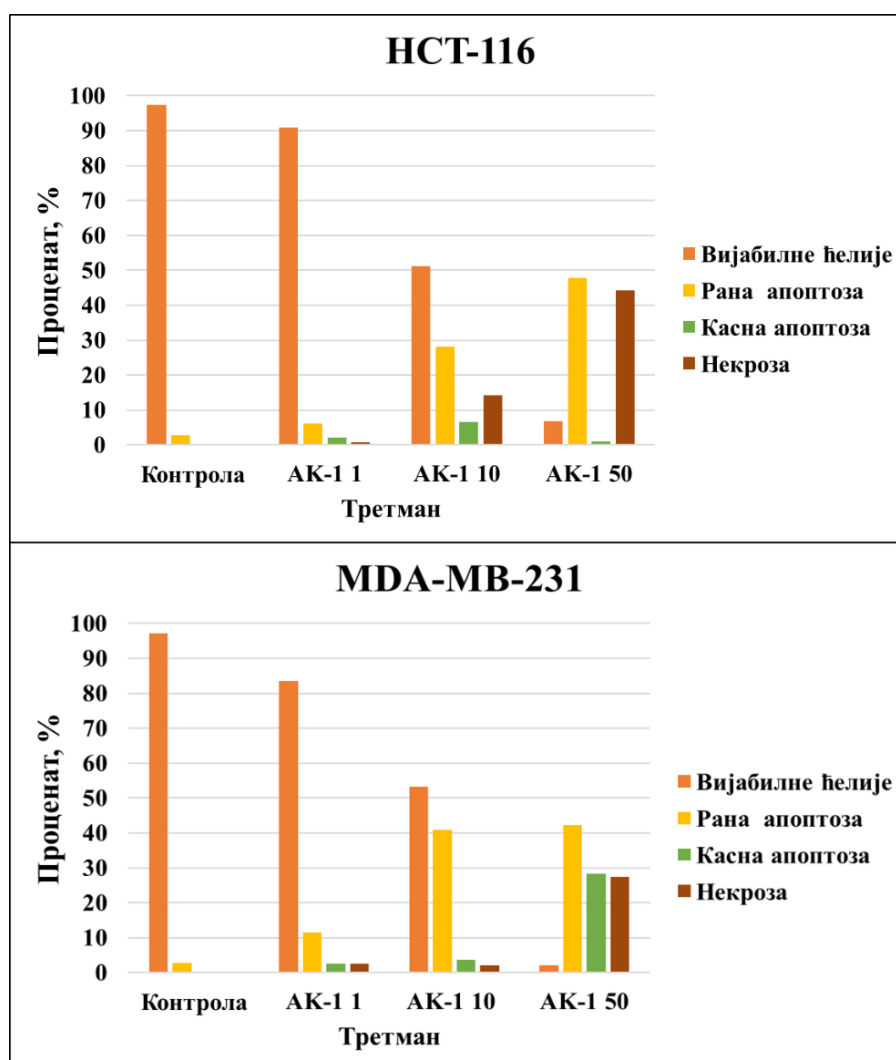
Промене у ћелијама карцинома колона третираним AK1 комплексом злата након 24 h процењене су двоструким бојењем са АО/ЕБ под микроскопом. Резултати су јасно показали морфолошке промене у једрима под третманом, као што су кондензација хроматина, која је јаче зелене флуоресценције, и смањене запремине ћелије, што је све карактеристично за рану апоптозу. Затим, добијена изражена кондензација и фрагментација хроматина са наранџастим сигналом указују на касну апоптозу, а црвено обојене ћелије указују на некрозу. Једра вијабилних ћелија су зелено обојена и јасно видљива.

HCT-116



Слика 68. Репрезентативне микографије - типична жива (V), апоптотичка (рана - EA, касна - LA) и некротична (N) морфологија ћелија HCT-116, обојених са АО/ЕБ (увећање 400 x).

На слици 69 и у табели 25 представљена је процентуална заступљеност вијабилних ћелија, ране и касне апоптозе, као и некрозе.



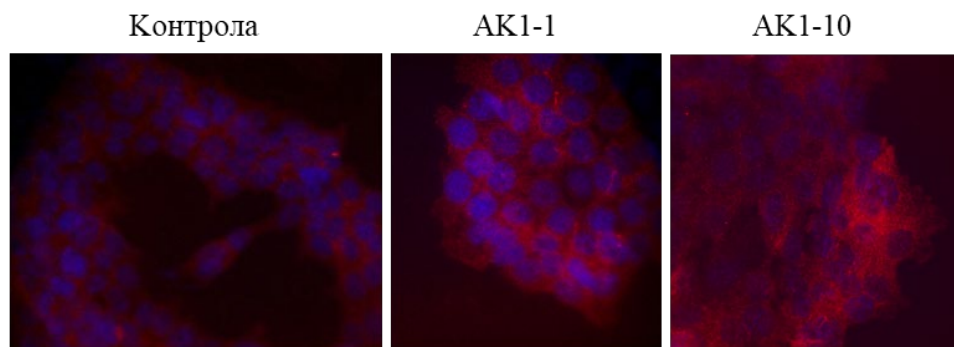
Слика 69. Проценти вијабилних, апоптотичних (раних и касних) и некротичних HCT-116 и MDA-MB-231 ћелија третираних АК1 комплексом злата.

АК1 комплекс злата(III) показао је дозно зависну проапоптотичку активност, што се види према значајно већем проценту апоптозе након примењених третмана у односу на нетретиране контролне ћелије. Показано је да је код обе испитиване ћелијске линије концентрација од 50 μM имала веома штетне ефекте и изазвала некрозу у високим процентима, код НСТ-116 ћелија скоро 50%. Из ових разлога, само ниже концентрације оба комплекса (1 и 10 μM) су узете за даље одређивање молекуларних механизма апоптозе.

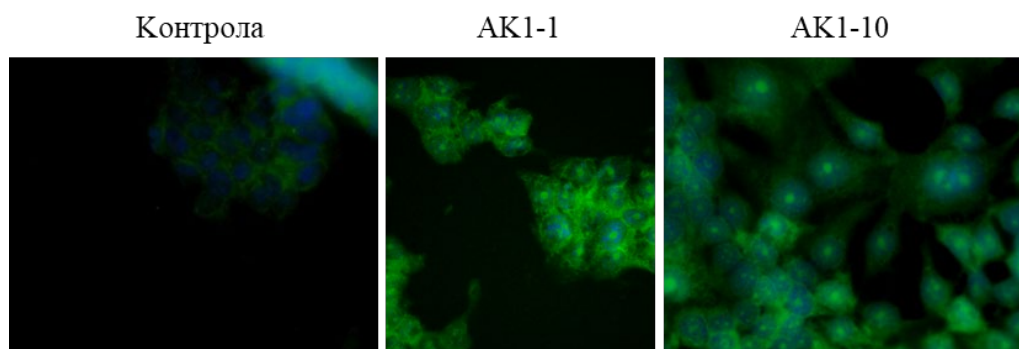
Табела 25. Проценти живих, ране и касне апоптозе, и некрозе, 24 h након третмана.

Третман	Живе ћелије	Рана апоптоза	Касна апоптоза	Некроза
НСТ-116				
Контрола	97.32 $\pm$ 0.54	2.69 $\pm$ 0.54	0	0
1 μM	90.81 $\pm$ 3.52	6.23 $\pm$ 2.47	2.09 $\pm$ 1.54	0.87 $\pm$ 0.44
АК-1 10 μM	51.21 $\pm$ 1.90	28.01 $\pm$ 1.64	6.66 $\pm$ 1.34	14.12 $\pm$ 0.91
50 μM	6.84 $\pm$ 1.01	47.93 $\pm$ 2.61	1.03 $\pm$ 0.22	44.19 $\pm$ 1.78
MDA-MB-231				
Контрола	97.17 $\pm$ 0.69	2.83 $\pm$ 0.69	0	0
1 μM	83.62 $\pm$ 5.39	11.47 $\pm$ 3.28	2.45 $\pm$ 1.12	2.46 $\pm$ 1.06
АК-1 10 μM	53.25 $\pm$ 6.11	40.89 $\pm$ 6.58	3.69 $\pm$ 1.41	2.17 $\pm$ 0.89
50 μM	2.12 $\pm$ 1.19	42.17 $\pm$ 1.11	28.34 $\pm$ 0.34	27.37 $\pm$ 0.05

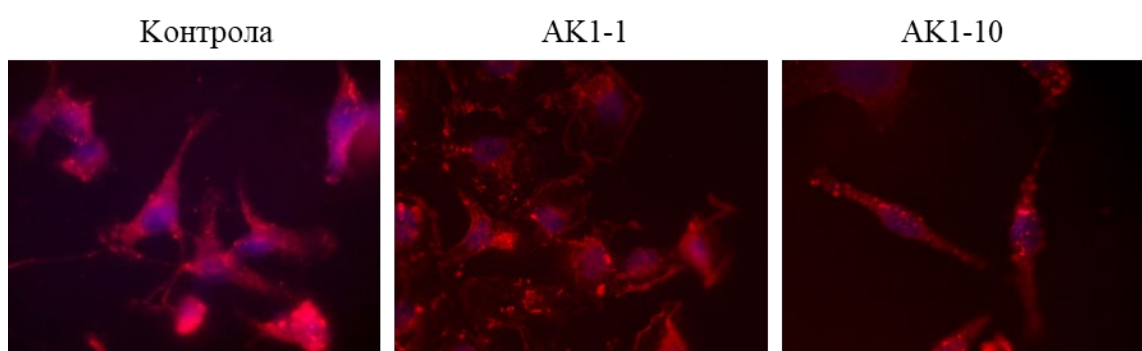
Експресија протеина FAS рецептора, као првог сигналног молекула у спољашњем апоптотичком путу, и експресија протеина каспазе 9, укључене у апоптотички пут зависан од митохондрија, приказана на сликама 70-73.



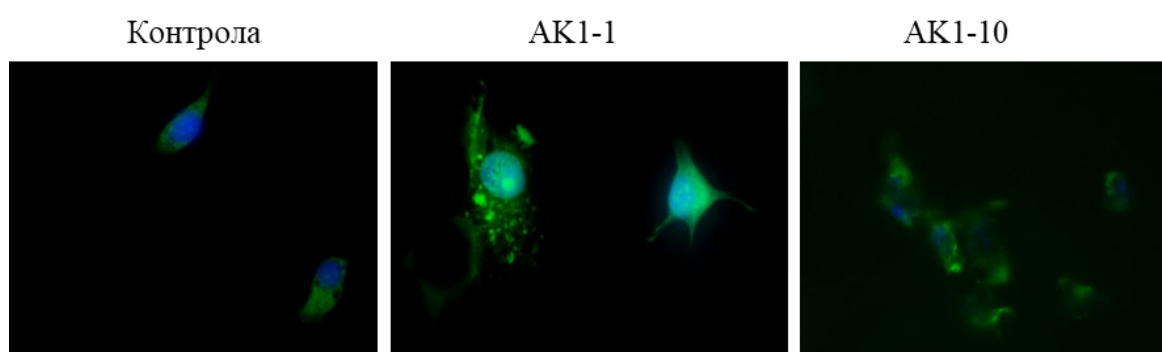
Слика 70. Ниво протеинске експресије FAS рецептора на НСТ-116 ћелијама. Снимљено флуоресцентним микроскопом при увећању од 600 x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), FAS је обојен црвено (Су3-коњуговано секундарно антители).



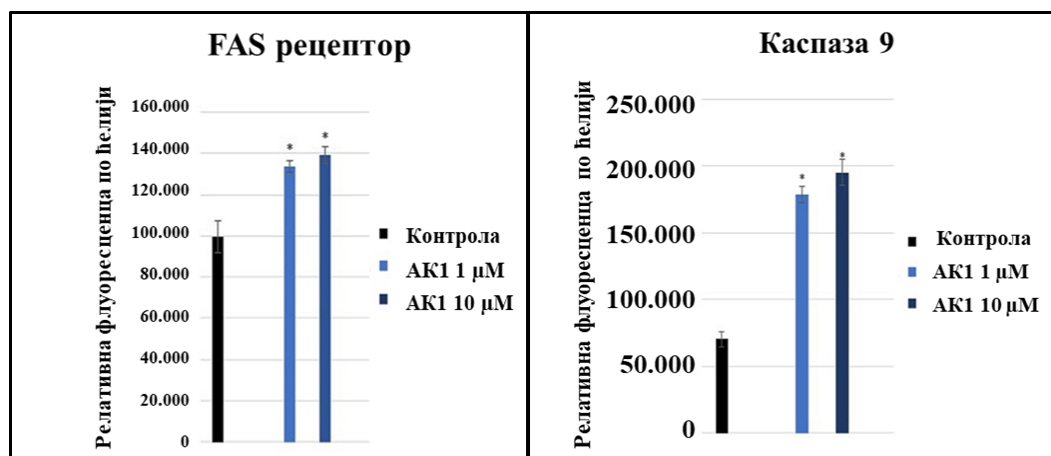
Слика 71. Ниво протеинске експресије каспазе 9 на HCT-116 ћелијама. Снимљено флуоресцентним микроскопом при увећању од 600 x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), каспаза 9 је обојена зелено (Аlexa 488-коњуговано секундарно антителио).



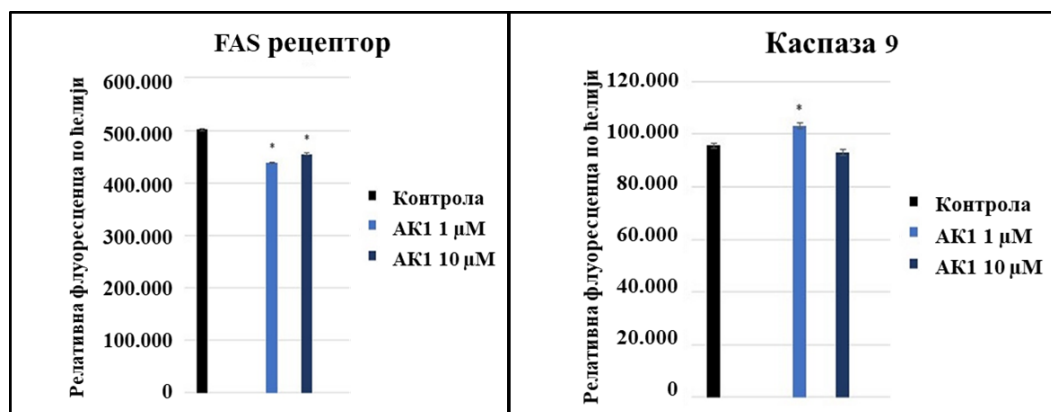
Слика 72. Ниво протеинске експресије FAS рецептора на MDA-MB-231 ћелијама. Снимљено флуоресцентним микроскопом при увећању од 600 x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), FAS је обојен црвено (Cy3-коњуговано секундарно антителио).



Слика 73. Ниво протеинске експресије каспазе 9 на MDA-MB-231 ћелијама. Снимљено флуоресцентним микроскопом при увећању од 600 x. Једра су обојена плаво (DAPI боја), каспаза 9 је обојена зелено (Аlexa 488-коњуговано секундарно антителио).



Слика 74. Експресија протеина FAS рецептора и каспазе 9 код HCT-116 ћелија; графички приказана квантификована флуоресценца са микрографија.



Слика 75. Експресија протеина FAS рецептора и каспазе 9 код MDA-MB-231 ћелија; графички приказана квантификована флуоресценца са микрографија.

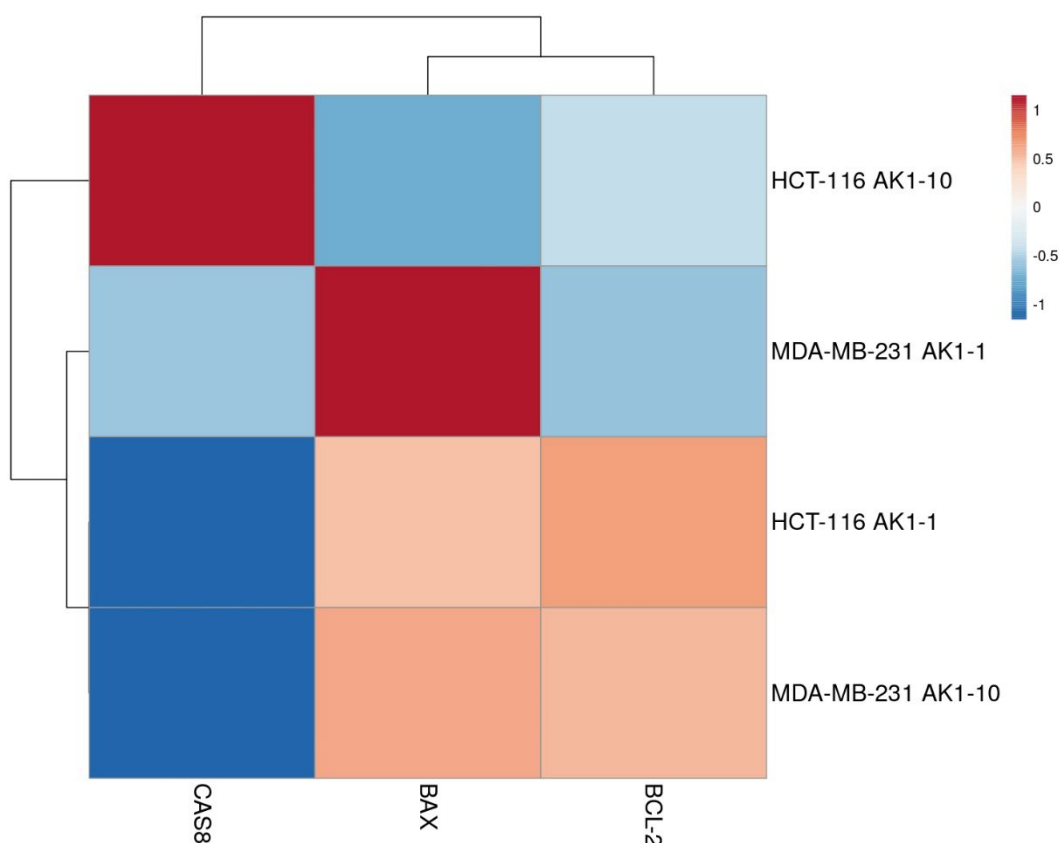
Репрезентативне микрографије (слике 70 и 71) и мерење релативне флуоресценце (слика 74) код HCT-116 ћелија показује да је комплекс AK1 значајно и дозно-зависно повећао експресију протеина FAS рецептора и каспазе 9 у ћелијама HCT-116 у поређењу са контролом.

Насупрот томе, мерење релативне флуоресценце (слика 75) и репрезентативне микрографије (слике 72 и 73) код метастатских MDA-MB-231 ћелија показују значајно смањену експресију протеина FAS рецептора у односу на контролне ћелије. Експресија каспазе 9 се код ћелија карцинома дојке повећава након примене ниже дозе комплекса AK1, и то значајно, али се након примене веће дозе овог комплекса смањује у односу на контролу која није третирана.

Механизам апоптозе процењен је и на нивоу генске експресије. Праћени су гени повезани за апоптозу попут проапоптотског *BAX* и антиапоптотског *BCL-2* гена за регулаторне протеине унутрашњег пута, као и ген за каспазу 8 која је иницијаторска каспаза спољашњег пута. Њихова експресија је нормализована у односу на *b-actin* (ендогену контролу), а затим израчуната њихова релативна експресија у односу на вредности контролних нетретираних ћелија (слика 76).

		<i>CAS8</i>	<i>BAX</i>	<i>BCL-2</i>
HCT-116	AK1-1	9.64	36.00	38.32
	AK1-10	32.67	1.93	6.82
MDA-MB-231	AK1-1	0.05	1.10	0.03
	AK1-10	0.13	6.02	5.81

Слика 76. Heatmap - Релативна експресија гена повезаних са апоптозом.

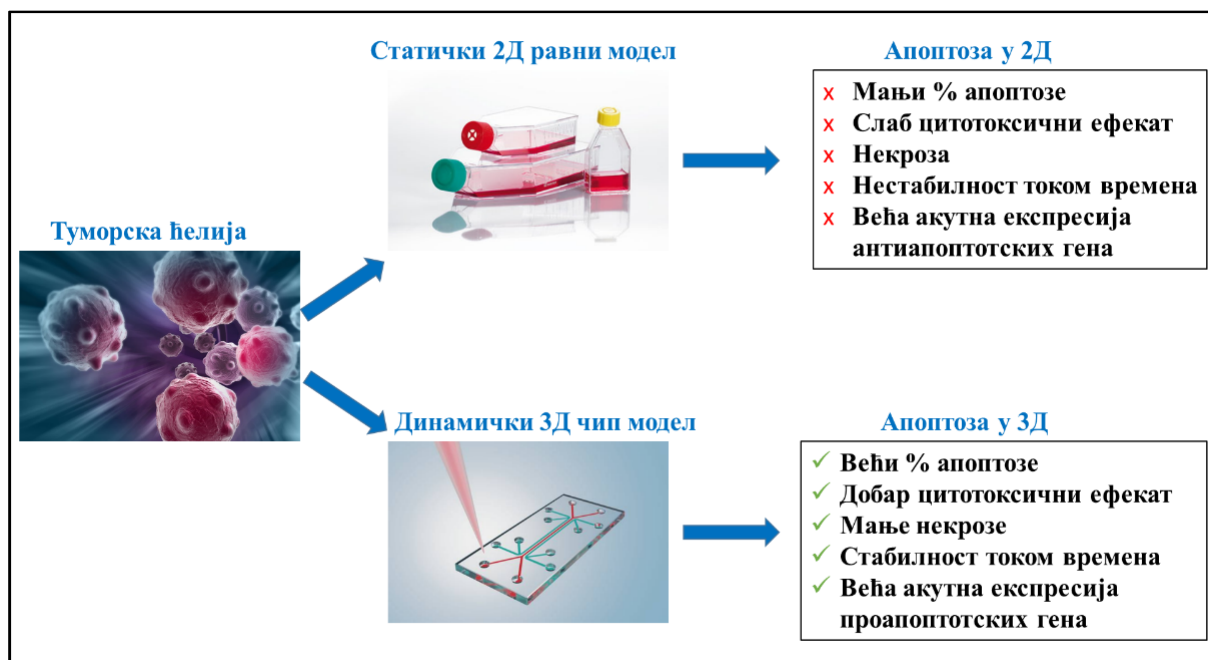


Слика 77. Heatmap - Релативна експресија гена повезаних са апоптозом.

Добијени резултати показују да комплекс АК1 повећава вредности експресије гена за каспазу 8 у ћелијама карцинома колона, нарочито након примене виших доза третмана. Комплекс АК1 такође повећава експресију оба *BAX* и *BCL-2* гена за регулаторне протеине, и то изразито након примене ниже дозе. Насупрот овоме, у ћелијама метастатског карцинома дојке комплекс АК1 смањује вредности експресије гена за каспазу 8, повећава експресију *BAX* и *BCL-2* гена тек након примене више дозе, док након примене ниже дозе не утиче на експресију *BAX* гена, а смањује експресију *BCL-2* гена.

5 Резултати испитивања механизма апоптозе у статичким 2Д и динамичким 3Д системима

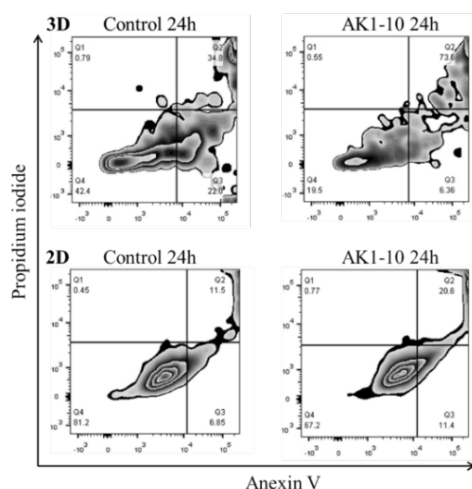
Резултати иницијалне претраге Pubmed платформе са кључним речима везаним за апоптозу, чип уређај или 3Д системе, показују да је ова област млада и у успону. У последњих 10 година апоптоза у 3Д системима, укључујући микрофлуидне чип уређаје, као тема у радовима представља мање од 1% од укупног броја радова који истражују апоптозу.



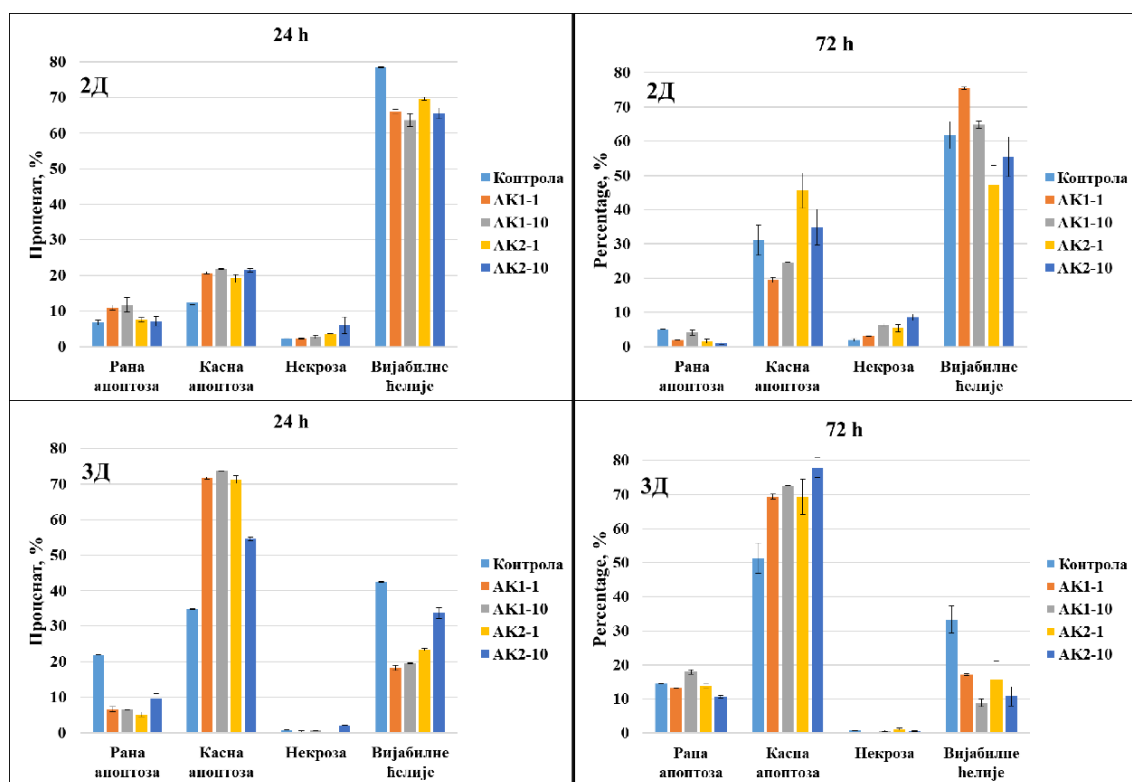
Слика 78. Разлике у апоптози код 2Д и 3Д *in vitro* модел система.

5.1 Резултати *in vitro* испитивања апоптозе у 2Д и 3Д условима

Упоређујући 2Д и 3Д системе, можемо видети да 3Д систем има мање вијабилних ћелија у обе временске тачке. Такође постоје разлике у појави апоптозе и некрозе. Рана апоптоза се јавља нешто више у 3Д систему након 72 h, док се касна апоптоза јавља много више и након 24 h и након 72 h такође у 3Д систему. Некроза се, с друге стране, ређе јавља у 3Д систему (слике 79 и 80).

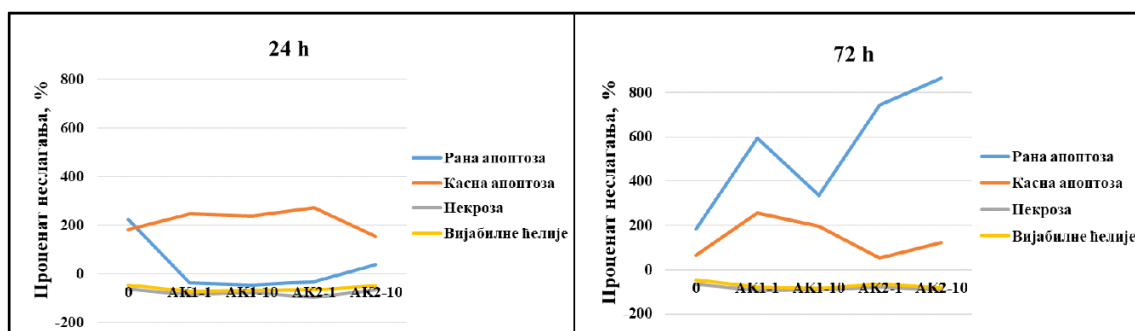


Слика 79. Репрезентативни плотови приказују проценат вијабилних, раних и касних апоптотичких, и некротичних ћелија тумора у 2Д и 3Д системима.



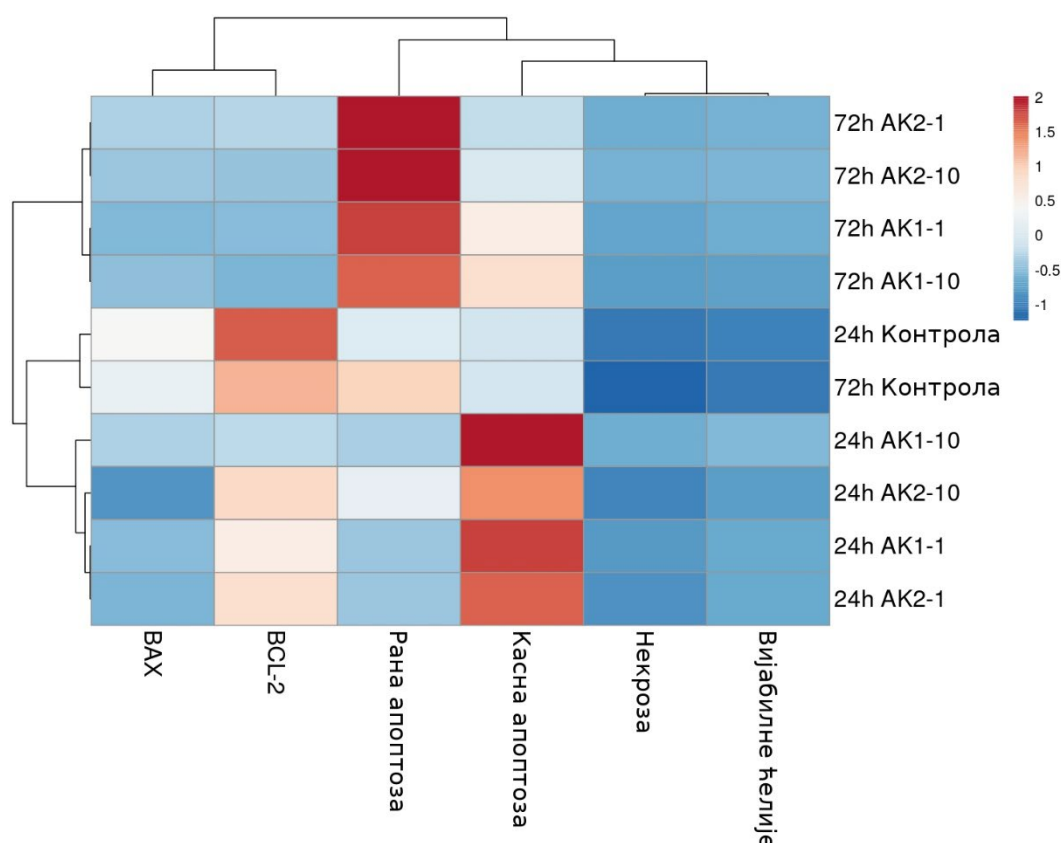
Слика 80. Ефекти АК1 и АК2 комплекса на проценат живих, раних апоптотичких, касно апоптотичких и некротичних ћелија НСТ-116 у статичким 2Д и динамичким 3Д условима.

Слика 81 показује проценат неслагања између 3Д и 2Д система. Позитивна разлика указује на већи проценат у 3Д систему, док негативна разлика указује на мањи проценат у 3Д системима. Можемо видети велики проценат повећања касне апоптозе након 24 h, и повећање и ране и касне апоптозе након 72 h у 3Д системима. Такође, благо смањење вијабилних ћелија и некроза се може видети у обе временске тачке са 3Д системом.



Слика 81. Разлике између 2Д и 3Д система.

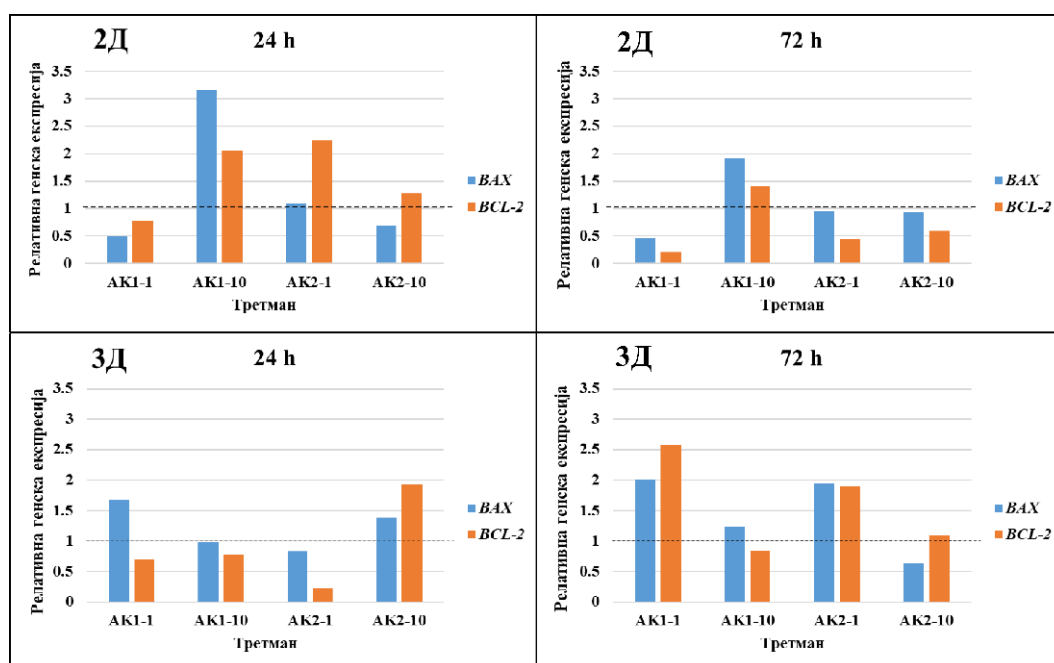
Са друге стране, на слици 82 приказана је топлотна мапа несллагања са корелацијом између 2Д и 3Д система – веће вредности (црвено) показују већи проценат за 3Д системе, и обрнуто, најниже вредности (плаве) показују мањи проценат за 3Д системе. Овде видимо јасну разлику између ране апоптозе после 72 h и касне апоптозе после 24 h, обе веће у 3Д системима. Такође се могу видети разлике у експресији гена *BCL-2* и *BAX*. Према повезивању на Heatmap-и, можемо видети да су односи несллагања у експресији *BAX* и *BCL-2* гена у ова два система у корелацији са одступањем у раној и касној апоптози.



Слика 82. Heatmap – разлике између 2Д и 3Д система.

У 2Д систему, АК1-10 изазива повећање експресије *BAX* и *BCL-2* гена у обе временске тачке, али више након 24 h и експресија *BAX* гена је већа. Код АК2 комплекса у 2Д систему долази до повећања експресије само *BCL-2* гена након 24 h, док је после 72 h експресија оба гена смањена, а више је смањена у случају *BCL-2* гена (слика 83).

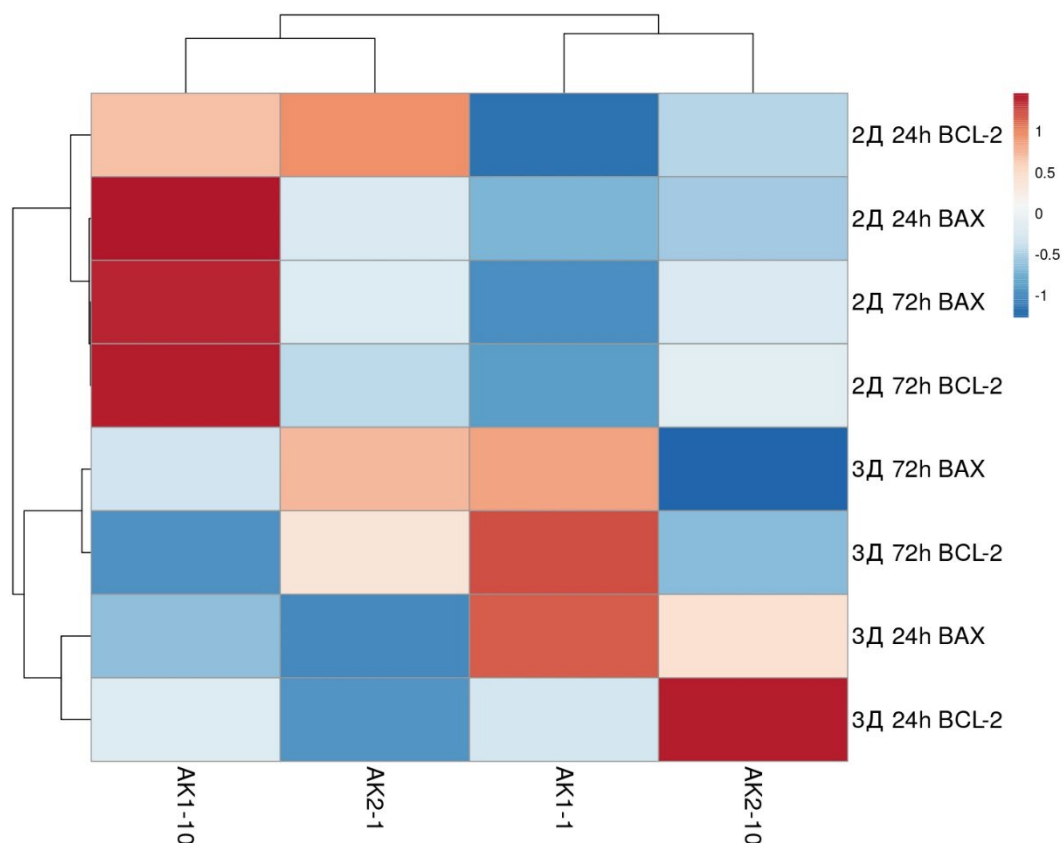
У 3Д систему, са комплексом АК1 у нижој дози (1 μ M), експресија *BAX* гена се повећала и *BCL-2* ген се смањио након 24 h, док након 72 h расте експресија оба гена 2 и више пута, са већим порастом *BCL-2* гена. Након примене веће дозе (10 μ M) првог комплекса, у 3Д систему, експресија *BAX* гена је као и у контроли након 24 h и благо расте након 72 h, док је експресија *BCL-2* гена смањена у обе временске тачке. Код комплекса АК2 у 3Д систему након 24 h, експресија гена везаних за апоптозу је смањена након примене ниже дозе (1 μ M), што је израженије у случају *BCL-2* гена, док су након 72 h обе експресије повећане до 2 пута. Након примене веће дозе АК2 комплекса (10 μ M), експресија ових гена је порасла после 24 h, уз веће повећање *BCL-2* гена, док после 72 h експресија опада тако да је експресија *BCL-2* гена као у контроли, а експресија *BAX* гена је смањена (слика 83).



Слика 83. Релативна експресија иРНК за гене повезане са апоптозом (*BCL-2* и *BAX*) у статичким 2Д и динамичким 3Д условима.

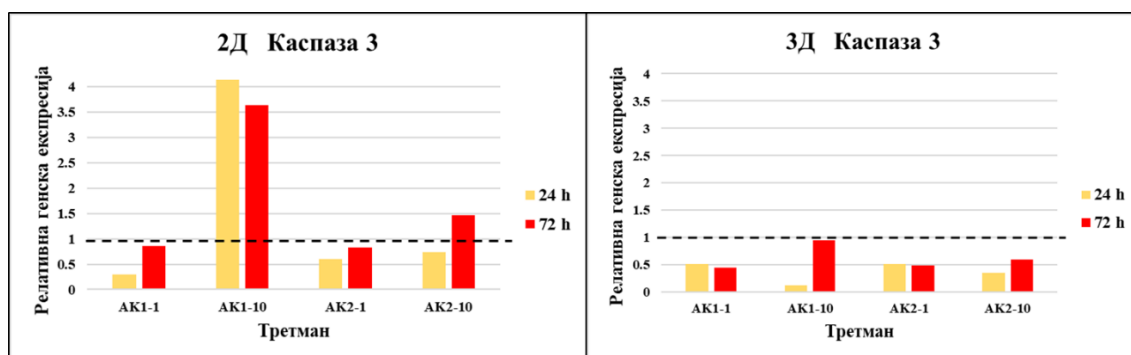
	време	ген	AK1-1	AK1-10	AK2-1	AK2-10
2D	24 h	<i>BAX</i>	0.49	3.15	1.10	0.69
		<i>BCL-2</i>	0.78	2.05	2.24	1.27
	72 h	<i>BAX</i>	0.47	1.92	0.95	0.93
		<i>BCL-2</i>	0.21	1.41	0.44	0.60
3D	24 h	<i>BAX</i>	1.66	0.98	0.83	1.38
		<i>BCL-2</i>	0.69	0.77	0.23	1.93
	72 h	<i>BAX</i>	2.01	1.24	1.95	0.64
		<i>BCL-2</i>	2.58	0.85	1.91	1.09

Слика 84. Heatmap – Релативна експресија иРНК за гене повезане са апоптозом (*BCL-2* и *BAX*) у статичким 2Д и динамичким 3Д условима.

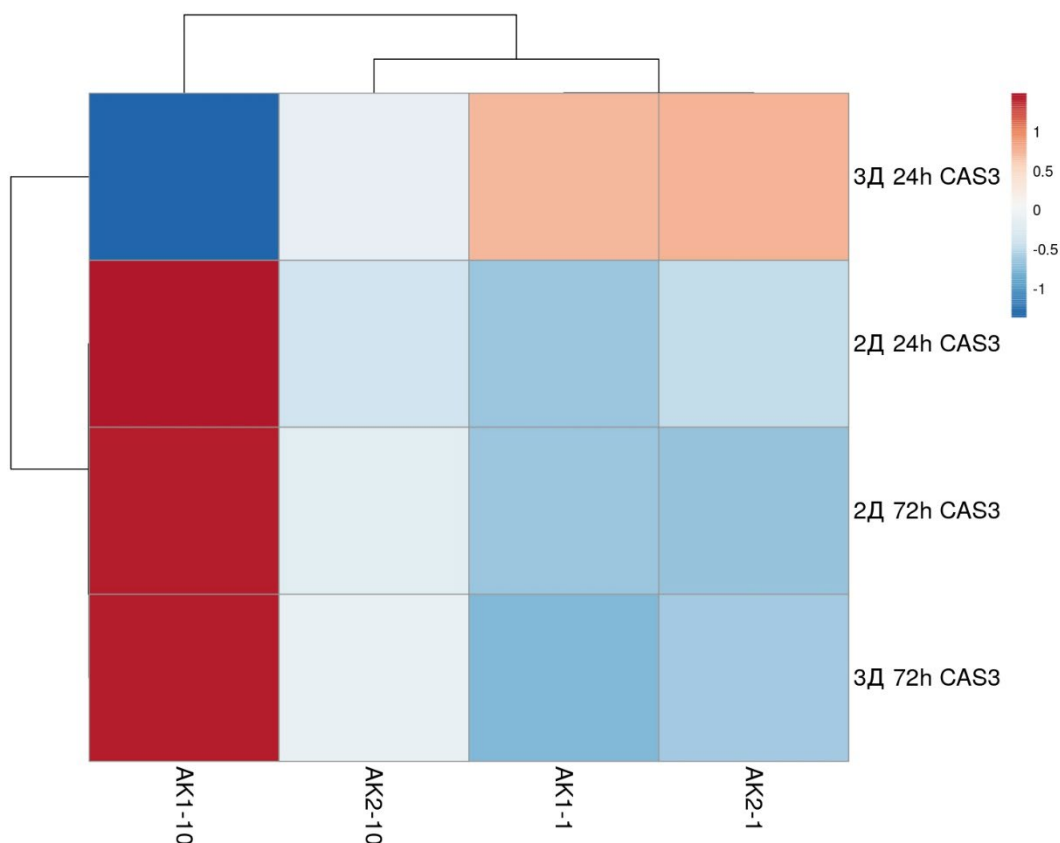


Слика 85. Heatmap – Релативна експресија иРНК за гене повезане са апоптозом (*BCL-2* и *BAX*) у статичким 2Д и динамичким 3Д условима.

Експресија гена каспазе 3 у 2Д систему показује изразито велико повећање након примене комплекса АК1 у вишој дози (10 μM) у обе временске тачке. Благо повећање експресије *CAS3* гена се такође може видети код комплекса АК2 у вишој дози (10 μM) након 72 h, док је у свим осталим случајевима у 2Д систему експресија *CAS3* гена смањена. Насупрот томе, у 3Д систему, експресија *CAS3* гена је смањена након примене оба комплекса, у обе дозе, и у оба мерена времена. Једино је након примене комплекса АК1 у вишој дози (10 μM) вредност експресије *CAS3* гена приближно иста као у контроли (слика 86).



Слика 86. Релативна експресија иРНК за ген каспазе 3 у статичким 2Д и динамичким 3Д условима.

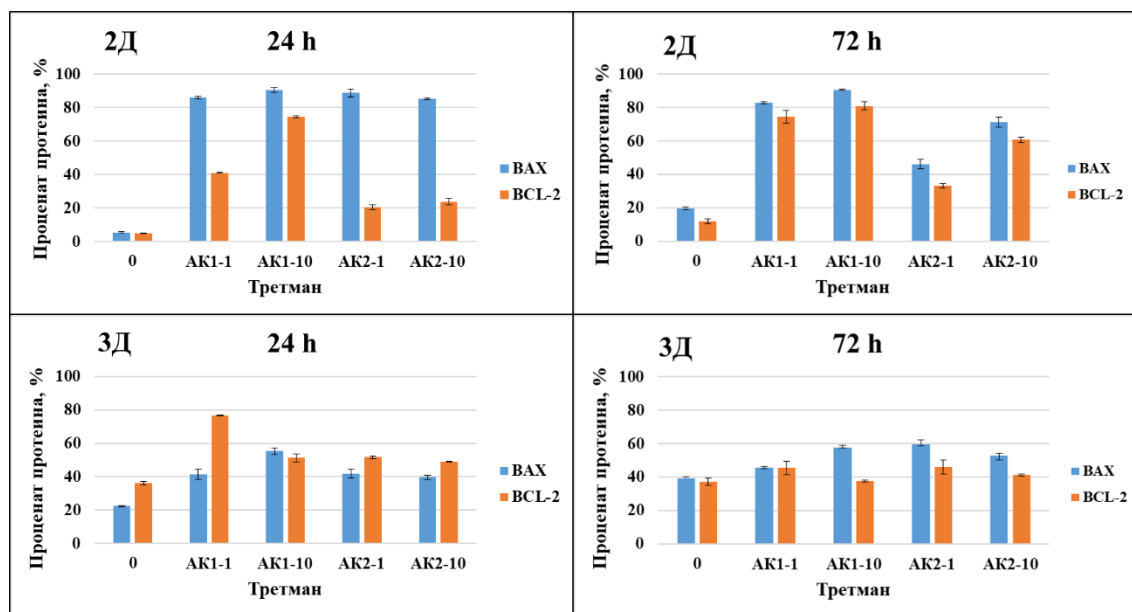


Слика 87. Heatmap – Релативна експресија иРНК за ген каспазе 3 у статичким 2Д и динамичким 3Д условима.

	AK1-1	AK1-10	AK2-1	AK2-10
2D 24 h CAS3	0.30	4.13	0.60	0.73
2D 72 h CAS3	0.86	3.63	0.82	1.47
3D 24 h CAS3	0.51	0.12	0.52	0.35
3D 72 h CAS3	0.45	0.95	0.48	0.60

Слика 88. Heatmap – Релативна експресија иРНК за ген каспазе 3 у статичким 2Д и динамичким 3Д условима.

Експресија протеина у 2Д систему показује да је BAX протеин присутнији од BCL-2 протеина, а ова разлика је већа када се AK2 комплекс примени после 24 h. У 3Д систему, након 24 h од примене оба третмана, преовладава BCL-2 протеин, осим код примене AK1 комплекса у већој дози (10 μ M), док после 72 h увек благо преовладава експресија BAX протеина (слика 89).



Слика 89. Ниво експресије протеина BAX и BCL-2 у статичким 2Д и динамичким 3Д условима.

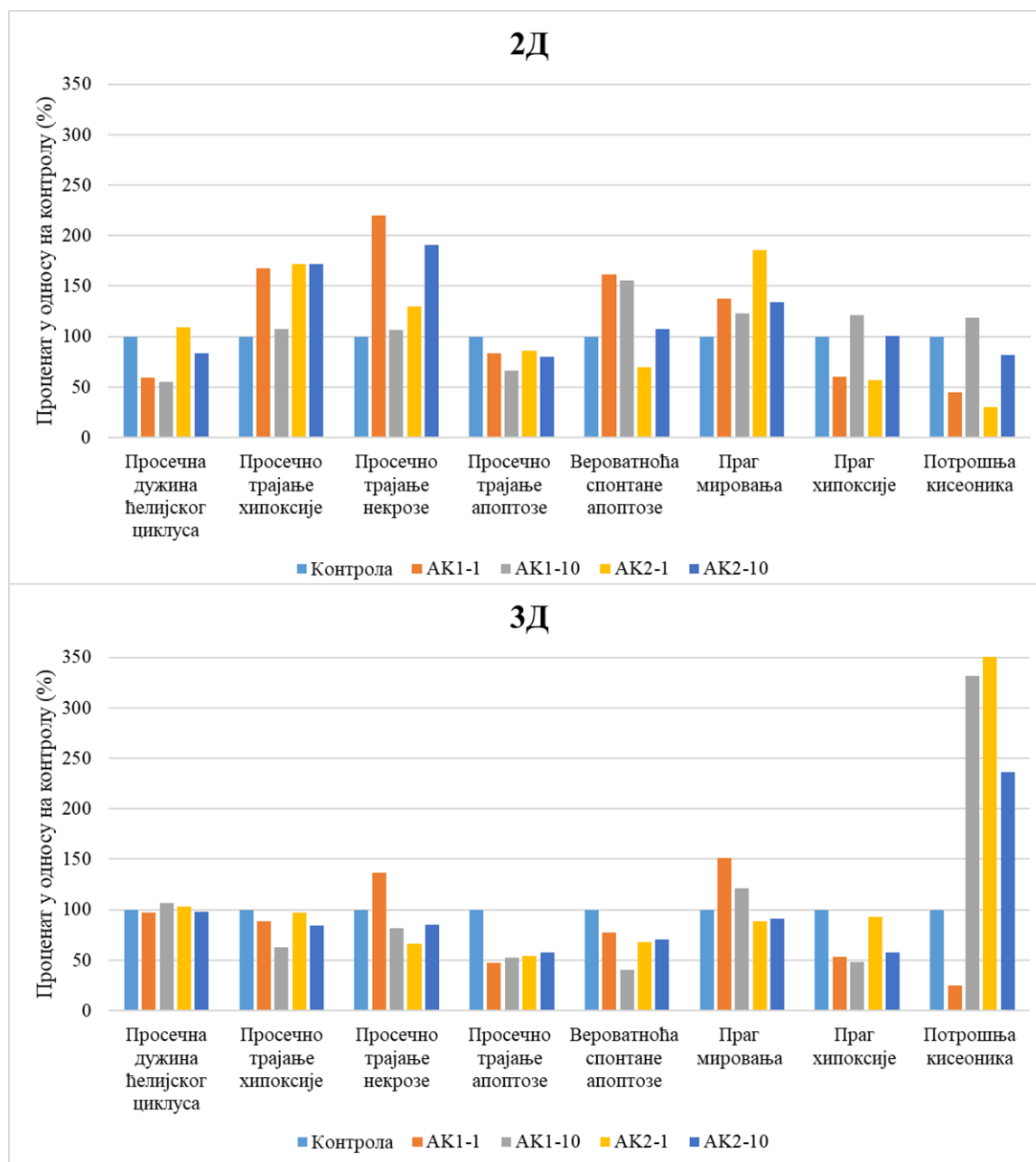
У табели 26 приказан је однос проапоптотичког BAX протеина према антиапоптотичком BCL-2 протеину, при чему вредности веће од 1 указују да преовлађује BAX протеин, што даље доводи до апоптозе. У 2Д систему видимо да постоји акутни ефекат покретања апоптозе након третмана, посебно приликом примене АК2 комплекса, док се после 72 h однос протеина приближава вредности 1, што указује на повећање антиапоптотичких сигнала. За разлику од тога, у 3Д динамичком окружењу, у првих 24 h, проапоптотички сигнали у поређењу са антиапоптотичким преовлађују само код најтоксичнијег третмана АК1-10, док се после 72 h апоптоза покреће још више, а покреће се и код АК2 третмана у обе дозе.

Табела 26. Однос проапоптотичких и антиапоптотичких протеина у статичким 2Д и динамичким 3Д условима.

BAX / BCL-2 однос		Контрола	AK1-1	AK1-10	AK2-1	AK2-10
2Д	24 h	1.10	2.10	1.21	4.33	3.59
	72 h	1.63	1.12	1.12	1.40	1.17
3Д	24 h	0.62	0.54	1.08	0.81	0.81
	72 h	1.06	1.01	1.54	1.30	1.28

5.2 Резултати математичког модела апоптозе у 2Д и 3Д условима

Поступак процене је спроведен за све разматране случајеве, како би се утврдио утицај разматраних третмана на њихове вредности. Слика 90 приказује резултате процене параметара, како за 2Д модел, тако и за 3Д модел.

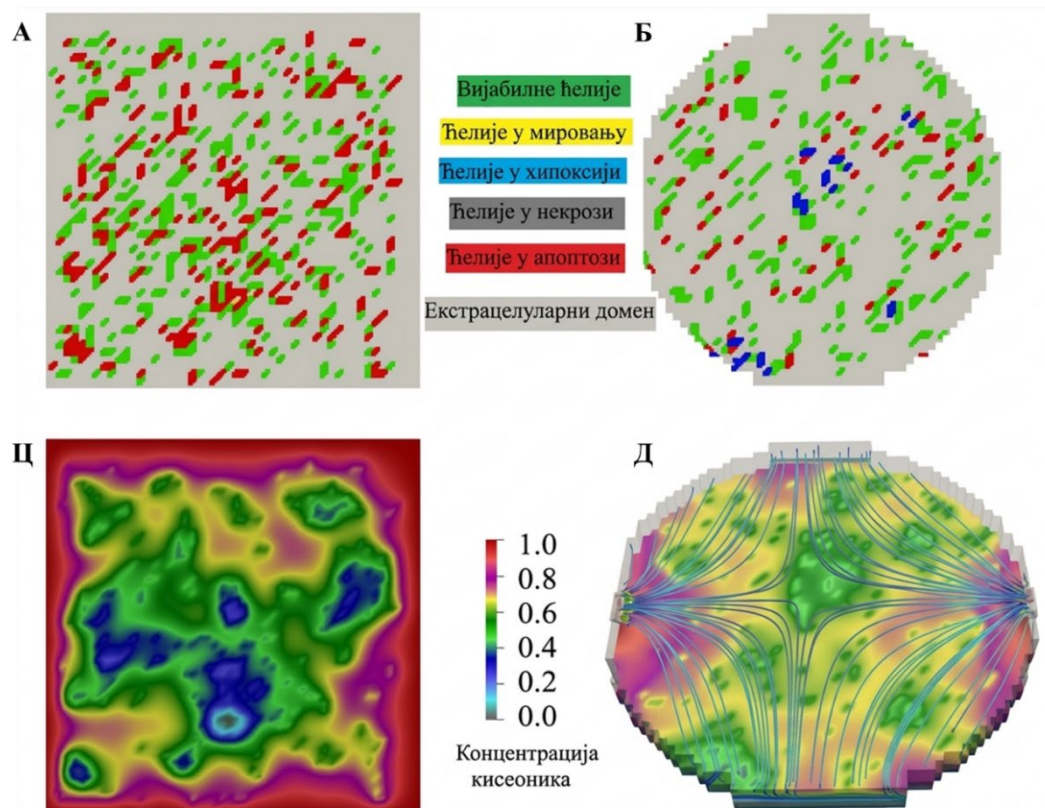


Слика 90. Математички модел приказује различите одговоре у статичким 2Д и динамичким 3Д условима. Стубичасти дијаграми приказују промене одабраних параметара предвиђене моделом након третмана са АК1 и АК2 комплексима у статичким 2Д и динамичким 3Д условима. Све вредности су представљене као проценат у односу на контролу (%), где је контрола нормализована на 100%.

Као што можемо видети из резултата, у 2Д моделу ћелијски циклус је скраћен након третмана, осим након примене АК2 комплекса у нижој дози, док је дужина ћелијског циклуса у 3Д динамичком систему непромењена. Трајање хипоксије и некрозе у ћелијама карцинома колона је дуже у 2Д моделу у поређењу са 3Д моделом. Насупрот томе, трајање апоптозе након третмана је скраћено у оба експериментална модела, али се јавља брже у 3Д динамичким условима. Вероватноћа спонтане апоптозе након третмана, а у поређењу са нетретираним ћелијама карцинома, повећава се у 2Д условима, осим након примене АК2 комплекса у мањој дози, док се у 3Д условима ова вероватноћа смањује. Праг за ћелије које улазе у стање мировања повећава се након третмана у 2Д условима, као и у 3Д условима након примене АК1 комплекса, док се у 3Д условима након АК2 комплекса овај праг не мења. Праг уласка ћелија у хипоксију у 2Д условима се смањује након примене нижих доза оба комплекса, док се након примене АК1 комплекса у већој дози овај праг благо повећава и не мења се са већом дозом АК2 комплекса. У 3Д условима, праг за улазак у хипоксију се смањује, осим код примене АК2 комплекса у нижој дози. Брзина потрошње кисеоника у 2Д условима се смањује након третмана тестираним комплексима, осим након примене АК1 комплекса у већој дози где се благо повећава. Насупрот томе, у 3Д динамичким условима, брзина потрошње кисеоника значајно расте након третмана, осим након ниже дозе АК1 комплекса где се ова потрошња значајно смањује.

Резултати нумеричких симулација за одређени случај приказани су на слици 91, где се 91А и 91Ц односе на 2Д модел, за третман АК1-1 (АК1 комплекс у дози од 1 μM), док се 91Б и 91Д односе на 3Д модел, за третман АК2-1 (АК2 комплекс у дози од 1 μM). Дистрибуција ћелија је приказана на сликама 91А и 91Б, док 91Ц и 91Д приказују дистрибуцију залиха хранљивих материја (на слици 91Д су такође приказане линије брзине, пошто и за 91Д модел постоји проток кроз микрофлуидни чип).

Када се упореде дистрибуције хранљивих материја за 2Д и 3Д модел, очигледно је како овај проток хранљивих материја у 3Д моделу обезбеђује боље снабдевање ћелија.



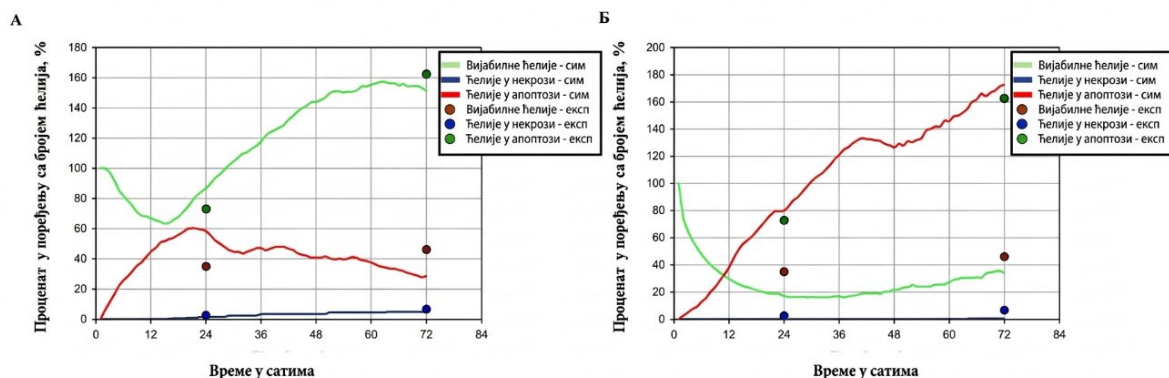
Слика 91. Резултати нумеричких симулација за појединачне случајеве.

А – Дистрибуција ћелија у 2Д моделу након 24 h након третмана АК1-1;

Б – Дистрибуција ћелија у 3Д моделу након 72 h након третмана АК2-1;

Ц – Дистрибуција снабдевања хранљивим материјама у 2Д моделу након 24 h након третмана АК1-1; Д – Дистрибуција снабдевања хранљивим материјама у 3Д моделу након 72 h након третмана АК2-1

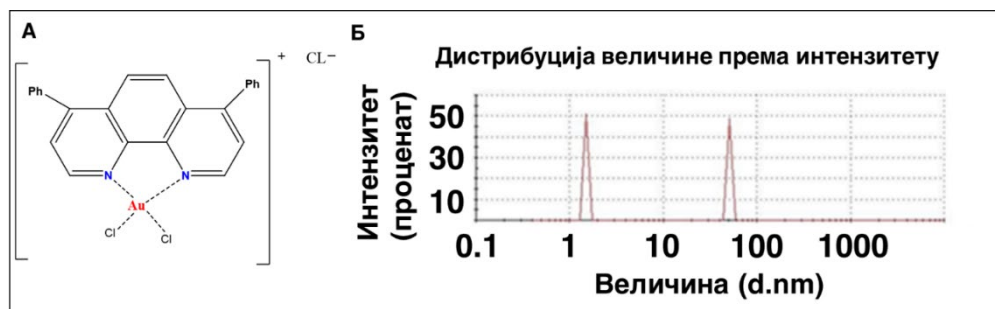
Слика 92 приказује варијацију броја ћелија током времена, добијену нумеричким симулацијама и експериментом. Линије приказују симулиране вредности, док тачке приказују експериментално измерене вредности. Сви бројеви су скалирани, у односу на почетни број (вијабилних) ћелија. Слагање симулираних и експерименталних вредности је боље за 3Д модел, али у оба случаја добија се исти тренд и задовољавајуће слагање, посебно имајући у виду да су за процену параметара коришћене само две временске тачке (24 и 72 h), што је био прилично тежак задатак.



Слика 92. Промена броја ћелија током времена. А – 2Д модел; Б – 3Д модел

6 Резултати испитивања карактеристика Аи-комплекса и новосинтетизованих А и Б формулација наночестица

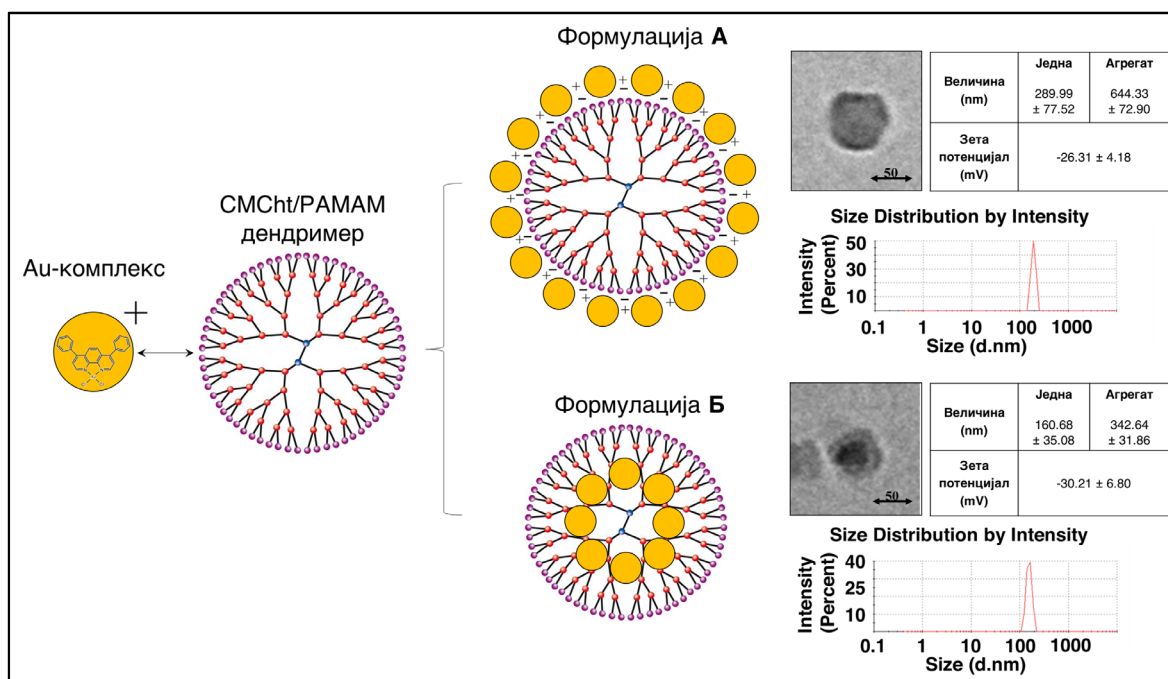
Слика 93А приказује молекуларну структуру Аи комплекса пречника 1.46 ± 0.49 nm (слика 93Б). Други пик примећен на ~ 50 nm одговара агрегираним комплексима. Што се тиче ζ (зета) потенцијала Аи-комплекса, добијен је позитиван набој од 32.30 ± 4.92 mV у води при неутралној рН вредности. Ово је вредно пажње јер су сами дендримери СМCht/РАМАМ негативно наелектрисани (-34.3 ± 3.0 mV у ддН₂О). (Carvalho et al, 2019b)



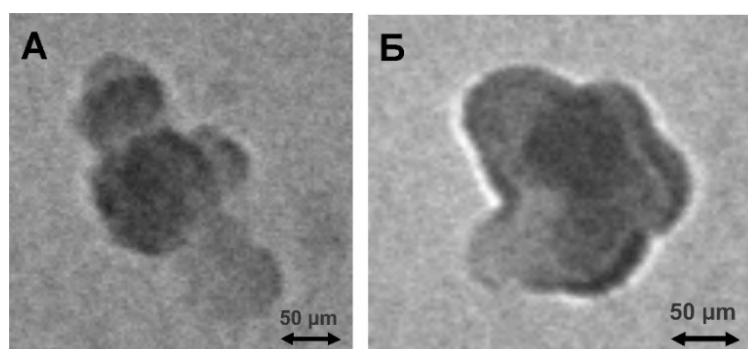
Слика 93. (А) Молекуларна структура Аи-комплекса; (Б) Величина Аи-комплекса (појединачно и агрегати).

Надовезујући се на ову карактеризацију Аи-комплекса, синтетизовали смо две различите формулације наночестица, А и Б. Шеме синтезе и ТЕМ фотографије обе формулације су приказане на слици 94. Може се видети да формулација А садржи Аи-комплекс на периферији док формулација Б садржи Аи-комплекс унутар шупљина честице. За Формулацију А, можемо претпоставити да се њихова интеракција дешава на површини, услед интеракција наелектрисања. Док у формулацији Б, реакција се дешава унутар честице која се обавија око Аи-комплекса попут језгра.

Затим смо измерили величину и ζ потенцијал обе формулације А и Б у води при неутралној рН вредности. Обе формулације А и Б су показале негативне вредности ζ потенцијала на -30.21 ± 6.80 mV и -26.31 ± 4.18 mV, што указује на померање почетног ζ потенцијала и смањење негативности добијених наночестица у поређењу са СМCht/РАМАМ дендримерима. Расподела величине честица обе формулације је приказана на слици 94.

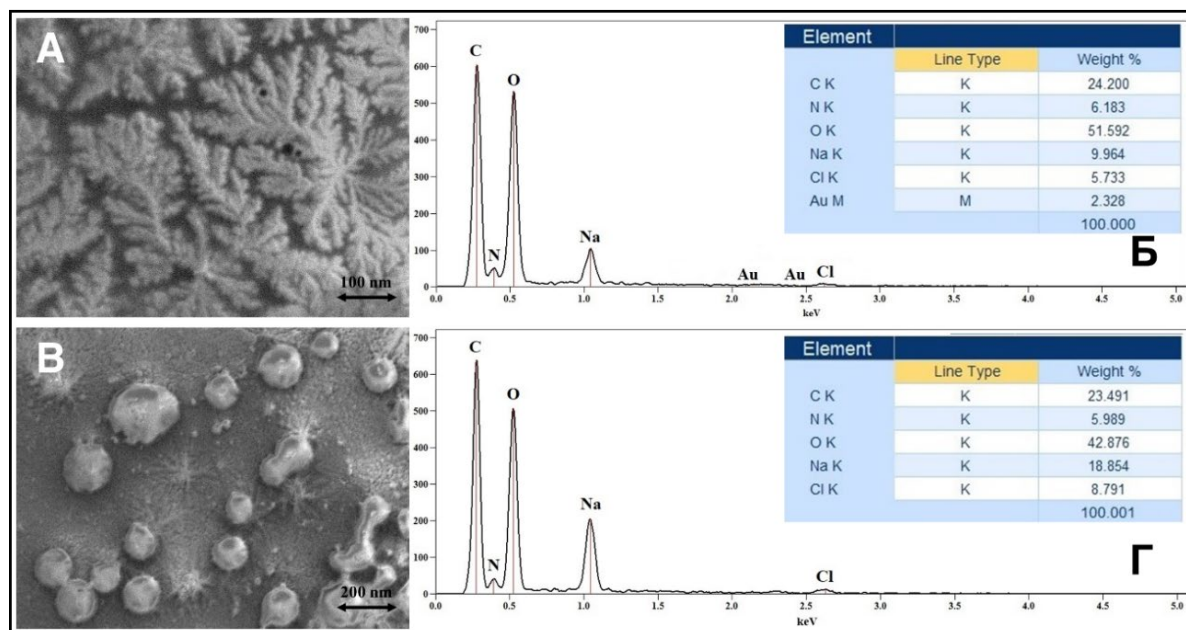


Слика 94. Шема синтезе, репрезентативне ТЕМ фотографије, величина и ζ потенцијал, и дистрибуција величине наночестица за Формулације А и Б.



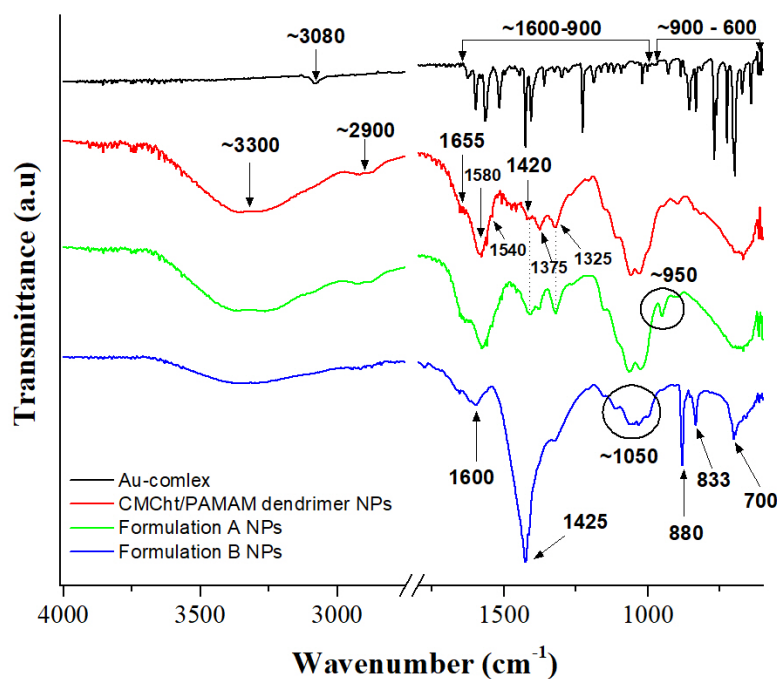
Слика 95. Репрезентативне ТЕМ фотографије агрегата Формулација А и Б.

На СЕМ фотографијама можемо видети Формулацију А, где су дендримерске структуре наночестице јасно видљиве, док се у Формулацији Б могу видети наночестице округлог, скупљеног облика јер је ова формулација синтетизована методом преципитације (слике 96А и 96В). Анализом спектра добијених ЕДС анализом можемо видети детекцију комплекса злата на површини Формулације А, док га у Формулацији Б нисмо детектовали због методе синтезе ових наночестица (слике 96Б и 96Г). Формулација Б је добијена преципитацијом, па се на овај начин комплекс злата инкапсулира и наночестица затвара, те се из тог разлога не детектује на површини, већ је комплекс злата само унутар наночестице. Додатно, проценат комплекса злата и ефикасност адсорпције обе формулације је урађен UV-Vis спектрофотометријом. Проценат комплекса злата у Формулацији А је 7.31%, док је у Формулацији Б 17.95%.



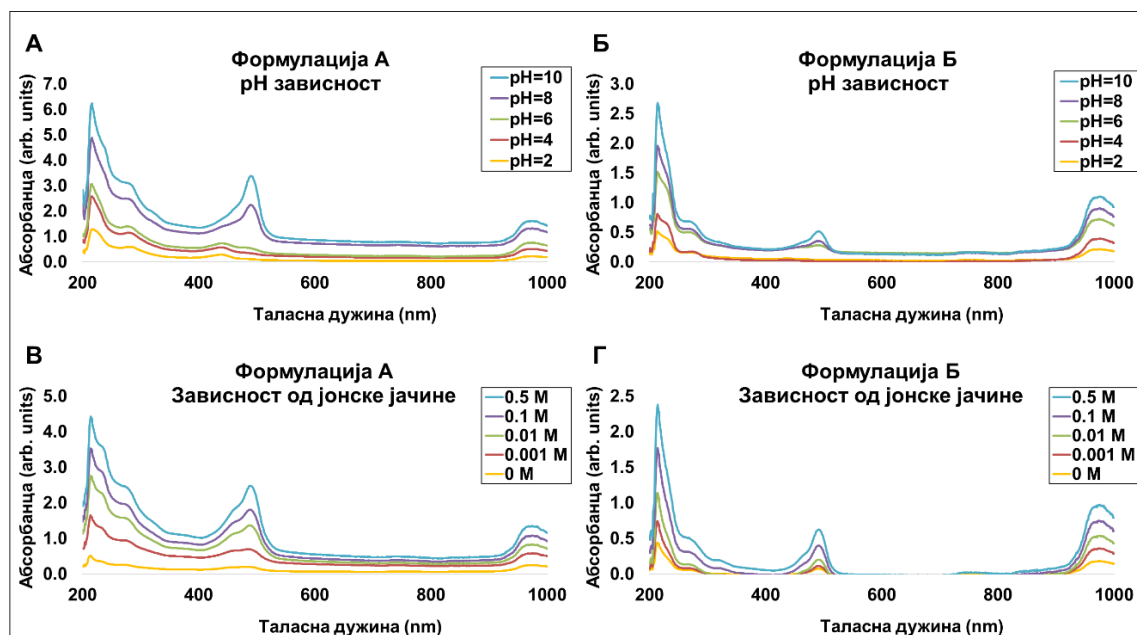
Слика 96. (А) СЕМ фотографија формулације А, (Б) ЕДС анализа формулације А, (В) СЕМ фотографија формулације Б, (Г) ЕДС анализа формулације Б.

Карактеризација на молекуларном нивоу конјугата добијеног реакцијама купловања CMChT/PAMAM дендримера са Au-комплексом је испитана FTIR анализом. Слика 97 приказује FTIR спектар Au-комплекса, CMChT/PAMAM дендримерних наночестица и ново модификоване формулације наночестица (А и Б).



Слика 97. ФТИР спектри: Au-комплекса, CMChT/PAMAM дендримерних наночестица и ново модификованих формулација наночестица (А и Б).

Стабилност две формулације А и Б у односу на рН вредност и јонску јачину приказана је на слици 98. Оба типа наночестица су прво растворена у води при одређеној јонској јачини или рН вредности, а после 24 h су снимљени спектри. Према UV-Vis спектрима, уочене су значајне разлике у спектрима код обе формулације наночестица у погледу утицаја различитих јонских јачина и рН вредности. Према резултатима, наше наночестице су стабилне при физиолошким рН вредностима и јакој јонској јачини, али су нестабилне у киселој средини, као што је у природном микроокружењу тумора, што фаворизује ослобађање супстанце из наночестице на овом месту.



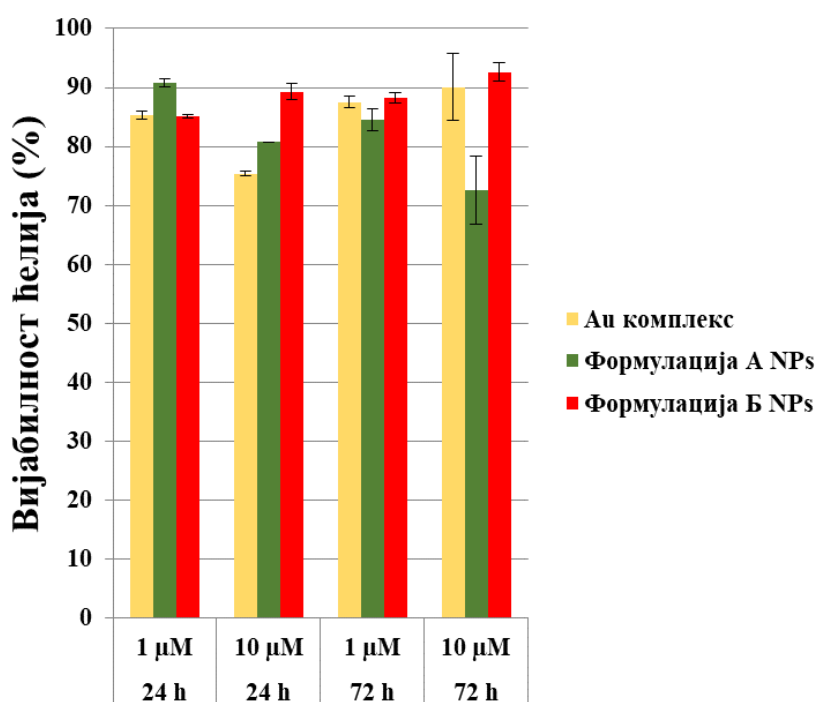
Слика 98. Стабилност новосинтетизованих формулација наночестица. (Горе) UV-Vis спектар стабилности у зависности од рН (А) Формулације А и (Б) Формулације Б наночестица. (Доле) UV-Vis спектар стабилности у зависности од јонске јачине (В) Формулације А и (Г) Формулације Б наночестица.

7 Процена ефикасности новосинтетисаних наночестица које носе комплекс злата у микрофлуидним чип уређајима

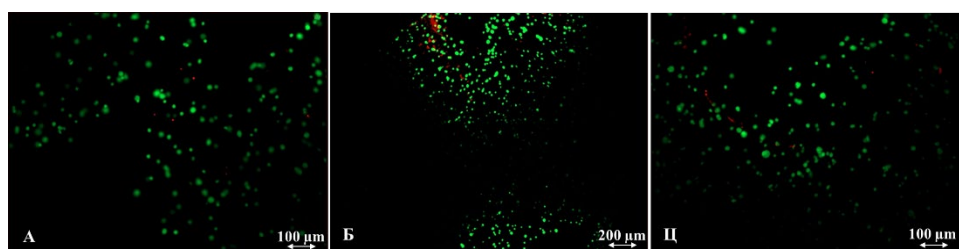
Да бисмо проценили ефикасност развијених наночестица, развили смо интерни микрофлуидни чип уређај да бисмо истражили њихову интеракцију са ћелијама хуманог колоректалног тумора засејаним у Matrigel®-у. Укратко, уређај је садржао три одељка: два бочна канала (сваки 300 μm ширине и 180 μm висине) који се користе за перфузију медијума и наночестица, и једну кружну централну комору (3 mm у пречнику и 180 μm у дубини) где је НСТ-116 ћелија инкапсулирана опонашајући микроокружење тумора. Канали и комора били су међусобно повезани кроз микро-прорезе који су омогућавали дифузију медија.

Могућа цитотоксичност Аи-комплекса и обе формулације новосинтетизованих наночестица процењена је у оквиру колоректалног карцинома на чипу мерењем ћелијске метаболичке активности (слика 99) и пролиферације (слика 100). Ћелије карцинома НСТ-116 су биле изложене Аи-комплексу и оба типа формулације Аи-комплекс + CMChT/PAMAM наночестице у две концентрације (1 μM и 10 μM) током периода од 24

и 72 h. Као што је приказано на слици 99, наночестице Формулације А су показале значајно најбољи цитотоксични ефекат при концентрацији од 10 μM после 72 h култивисања ($p=0.008$, $p=0.007$). Такође, наночестице Формулације А показују бољи ефекат при концентрацији од 1 μM након 72 h ($p>0.05$), а значајно бољи ефекат при концентрацији од 10 μM након 24 h ($p=0.021$). Што се тиче наночестица Формулације Б, показале су значајно бољи ефекат од наночестица Формулације А тек након 24 h при концентрацији од 1 μM ($p=0.003$). У већој концентрацији и током времена није било значајног утицаја на вијабилност ћелија карцинома. Аи-комплекс показује значајно бољи ефекат од модификованих наночестица само после 24 h ($p=0.003$, $p=0.042$, $p=0.009$ респективно), али касније се ћелије опорављају. Све у свему, наночестице Формулације А су показале најбољи ефекат на ћелије карцинома дебелог црева НСТ-116.



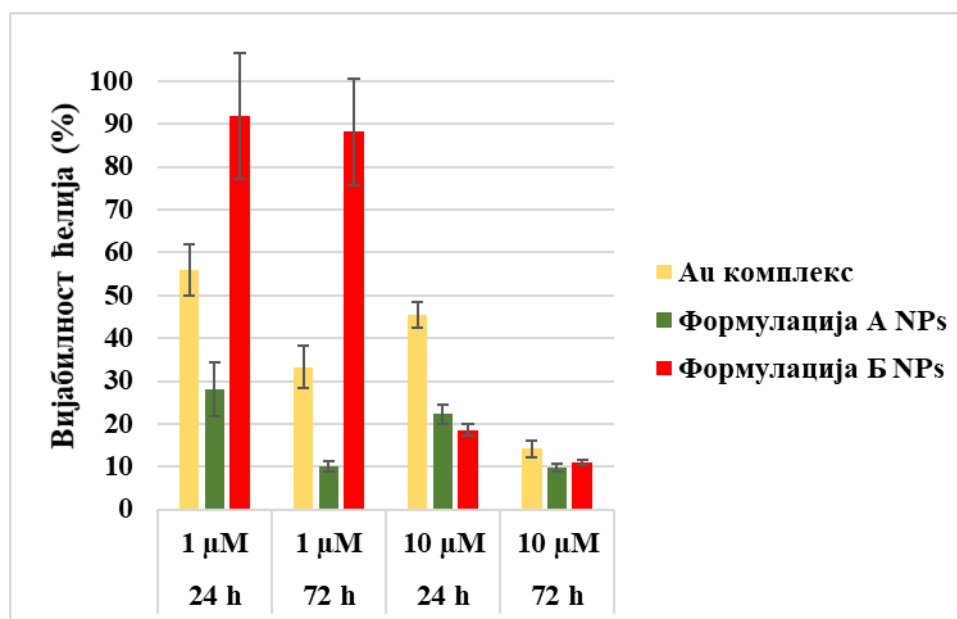
Слика 99. Вијабилност ћелија карцинома НСТ-116 у микрофлуидном уређају.



Слика 100. Репрезентативне фотографије флуоресцентне микроскопије живих/мртвих ћелија у микрофлуидном чип уређају након 24 и 72 h од сва три третмана и контроле (без третмана). **А)** Контролне ћелије после 24 h. **Б)** Ћелије третиране са Аи-комплексом 10 μM после 24 h. **Ц)** Ћелије третиране са дендримерним наночестицама + Аи-комплекс 10 μM после 24 h. Скала: 100-200 μm .

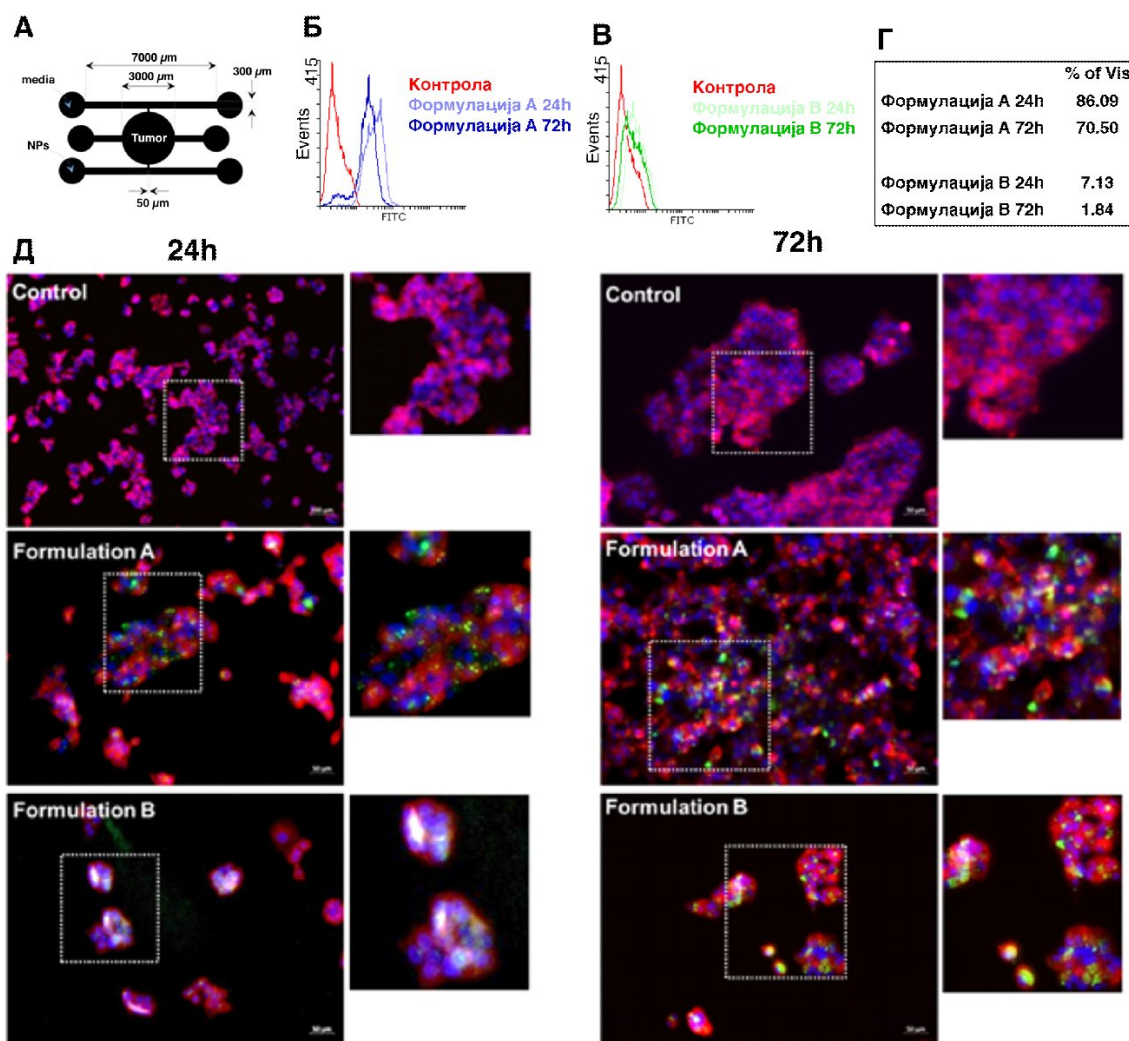
За разлику од 3Д динамичног модела, проценат вијабилности ћелија при различитим третманима се доста разликује у 2Д статичним традиционалним посудама за

култивацију ћелија. На слици 101 се могу видети веома дифузно распоређени ефекти примењених наночестица које носе токсични комплекс, као и самог комплекса злата. Ови резултати су такође приказани и кроз две различите дозе и у две различите временске тачке.



Слика 101. Вијабилност ћелија карцинома НСТ-116 у 2Д статичним условима.

Репрезентативне фотографије флуоресцентне микроскопије добијене након култивације ћелија тумора у чипу током 24 и 72 h са обе врсте FITC-обележених формулација Au-комплекса + CMChT/РАМАМ наночестица, приказане су на слици 102Д. Ове фотографије показују да су наночестице или захваћене ћелијама или лоциране на њиховим површинама. Квантитативна процена ефикасности интернализације наночестица је спроведена помоћу анализе проточне цитометрије. Ћелијски унос обе формулације FITC-обележених наночестица је приказан на слици 102Б-102В. Проценат интернализације Формулације А је значајно већи од Формулације Б (слика 102Г), о чему сведочи већи флуоресцентни сигнал на слици 102Б. Временом је проценат интернализације за обе формулације наночестица показао благи пад, што је вероватно резултат механизма ћелијског ефлукса.

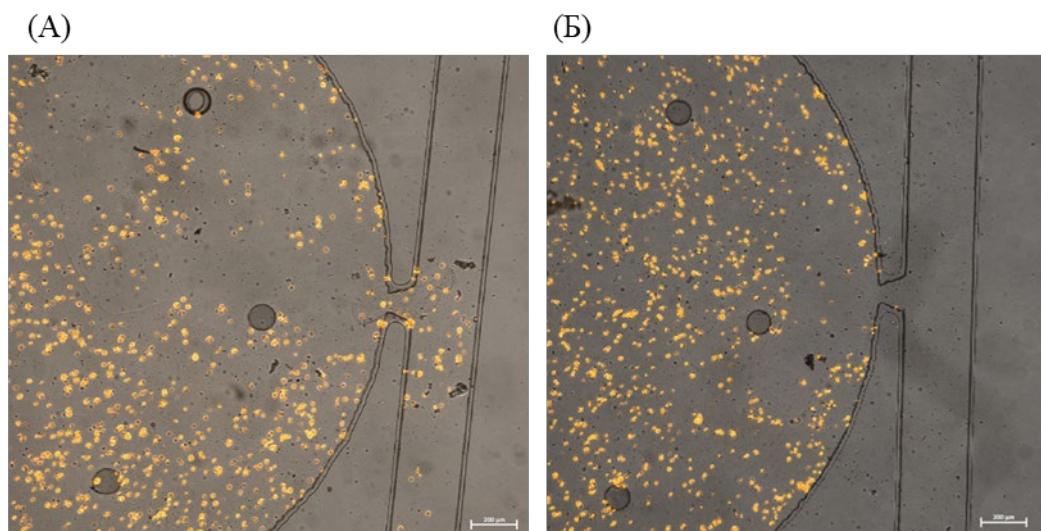


Слика 102. (А) Шема микрофлуидног чипа и његових градивних елемената; (Б) Анализа проточне цитометрије интернализације наночестица Формулације А; (В) Анализа проточне цитометрије интернализације наночестица формулације Б; (Г) Табела процента интернализације обе формулације наночестица; (Д) Флуоресцентне микроскопске фотографије ћелија карцинома НСТ-116 обојених на Ф-актин (фалоидин, црвено) и језгра (DAPI, плаво) након 24 и 72 h третмана са Формулацијом А и Б наночестица (зелено). Горњи ред слика одговара нетретираним ћелијама (контрола). Скала: 50 μm .

8 Примена микрофлуидних чип система за праћење миграције ћелија

Овај микрофлуидни чип је дизајниран тако да ћелије карцинома које се налазе у централној комори имају пролаз ка микроканалима где могу да мигрирају. Када се у канале дода неки атрактан који привлачи ћелије, попут високог процента феталног говеђег серума или молекула адхезије васкуларних ћелија (VCAM-1 протеин), ћелије које имају миграторни потенцијал ће се кретати ка њима, изаћи ће из централне коморе и прећи у микроканале. Овај пример микрофлуидних уређаја за студије миграције ћелија фокусира се на појединачне типове ћелија и услове екстрацелуларног матрикса. На овај начин смо добили модел за тестирање потенцијала миграције карцинома у микрофлуидном чипу. (Milivojević et al, 2021d)

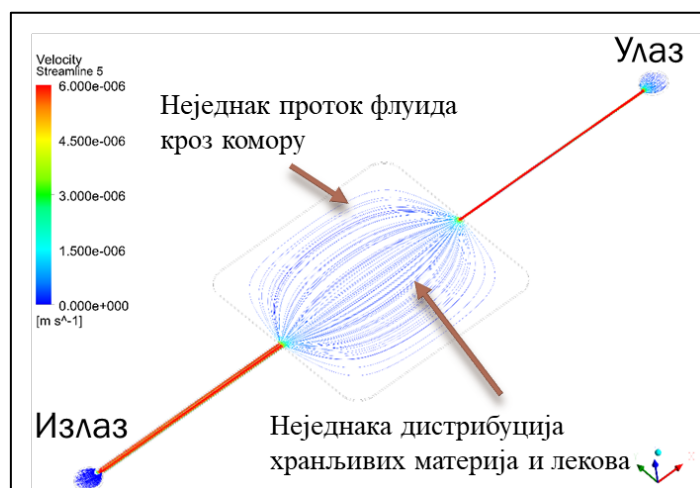
У нашем експерименту показало се да је експериментална група ћелија мигрирала из централне коморе у каналиће након одређеног временског интервала (слика 103А), док код контролне групе није дошло до кретања ћелија (слика 103Б).



Слика 103. (А) Тест миграције ћелија у микрофлуидном чипу. (Б) Контролна група (без миграције) у микрофлуидном чипу.

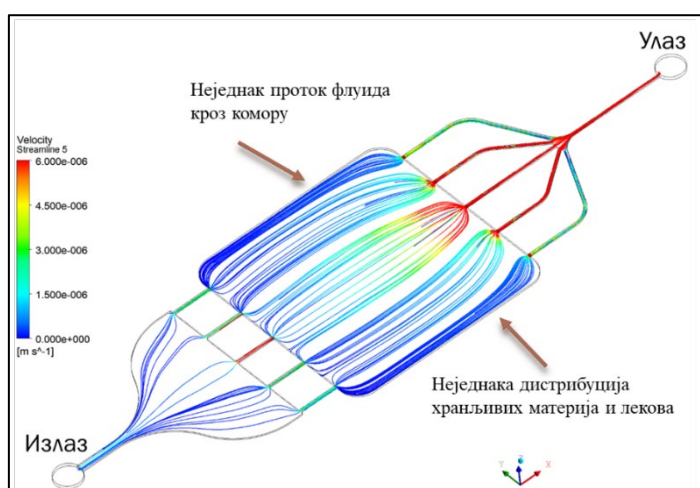
9 Оптимизација дизајна микрофлуидних чип уређаја

Први модел микрофлуидног уређаја је креиран као једнокоморни чип са једним улазним и једним излазним каналом, што представља најједноставнији дизајн уређаја lab-on-chip. Коришћењем модела рачунарске динамике флуида (computational fluid dynamics - CFD) симулиран је проток овог уређаја и приказани су резултати поља линија протока (слика 104). (Milivojević et al, 2022) Анализом резултата из симулације закључујемо да је проток кроз комору неједнако распоређен и да је дизајн уређаја потребно побољшати. Линије протока веома добро представљају стање протока флуида у микрофлуидном уређају као што је приказано на слици 104.



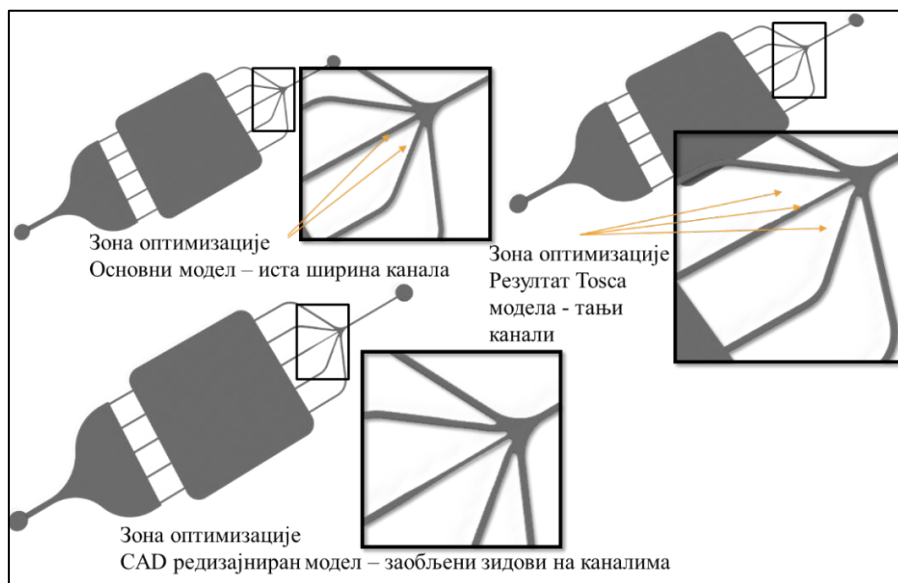
Слика 104. Линије струјања почетног модела.

Да бисмо побољшали струјање флуида у уређају, додали смо још неколико улазних канала како би се створио уједначенији проток (слика 105). Проток је био бољи него код једноканалних уређаја, али ипак постоје мале неправилности у дистрибуцији услед различите дужине улазних канала које проузрокују неједнак проток и дистрибуцију хранљивих материја у попречном пресеку коморе.



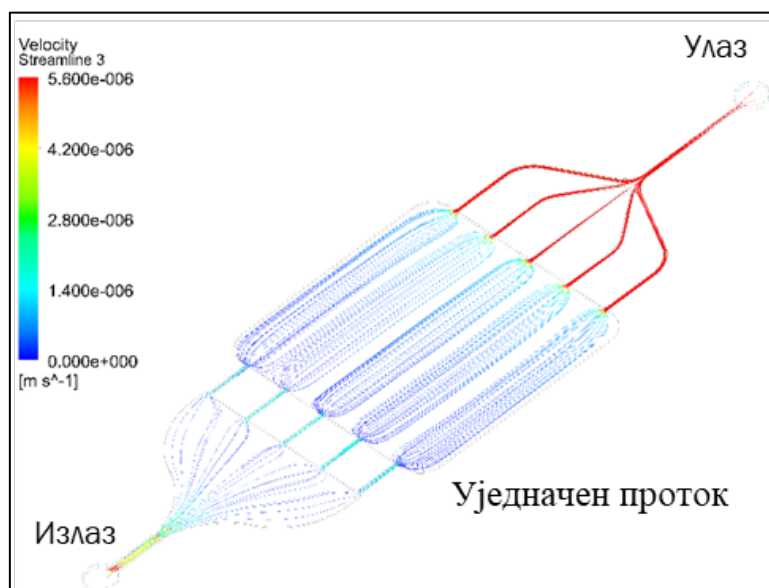
Слика 105. Линије струјања модела након мануелне оптимизације.

Да би се уређај још више унапредио и постигао уједначен проток флуида кроз њега, примењена је напредна техника тополошке оптимизације. Tosca Fluid – CFD софтвер за оптимизацију топологије (слика 106). Процес оптимизације топологије почео је од константне ширине свих канала. Кроз серију симулација протока користећи алгоритам за балансирање масеног протока, Tosca Fluid софтвер је променио геометрију канала како би постигао равномерну дистрибуцију протока флуида.



Слика 106. Оптимизација модела у Tosca Fluid софтверу.

Резултати дистрибуције линија струјања флуида у финалном моделу након оптимизације топологије показују да је овим дизајном постигнут равномеран проток флуида кроз централну комору (слика 107).



Слика 107. Крајњи модел након оптимизације у Tosca Fluid софтверу.

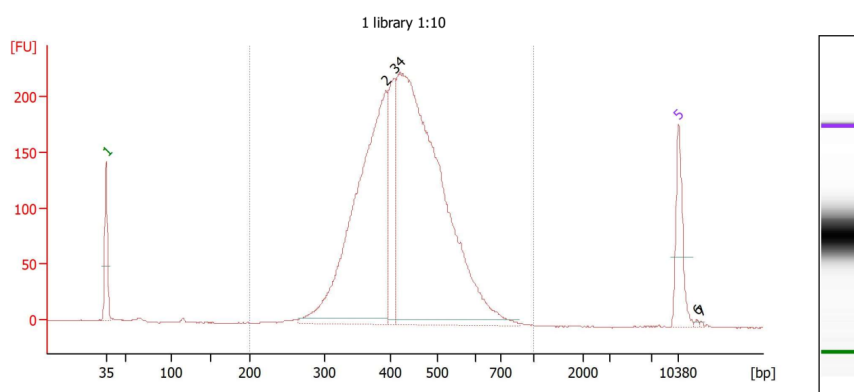
10 Употреба микрофлуидних чип система у биолошким експериментима и припреми библиотеке за секвенцирање транскриптома

Резултати квантификације припремљених библиотека помоћу биоанализатора и помоћу капа квантификације су приказани у Табели 27.

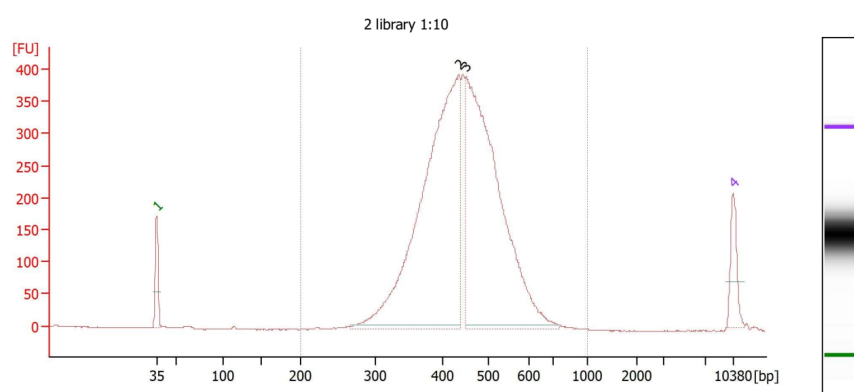
Табела 27. Квантификација библиотека за секвенцирање.

	Биоанализатор	Капа квантификација
Узорак 1	22.58 ng/μl	14.7 ng/μl
Узорак 2	32.49 ng/μl	18.0 ng/μl
Узорак 3	22.08 ng/μl	12.8 ng/μl
Узорак 4	19.43 ng/μl	10.0 ng/μl

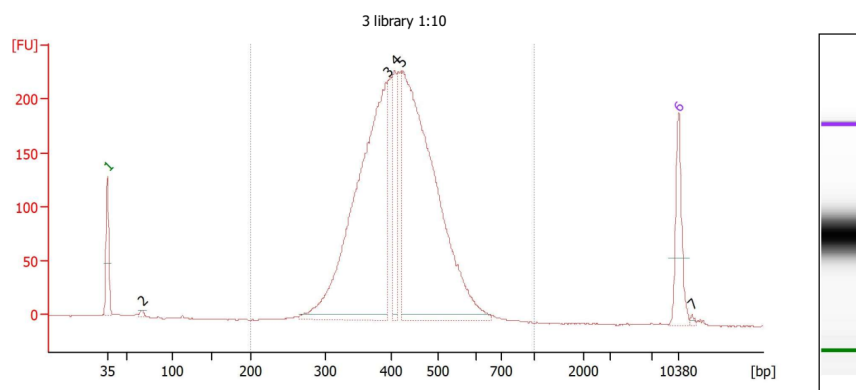
На фугурама 108, 109, 110 и 111 су приказане расподеле величине фрагмената припремљених библиотека за секвенцирање за сва 4 узорка, добијене на биоанализатору.



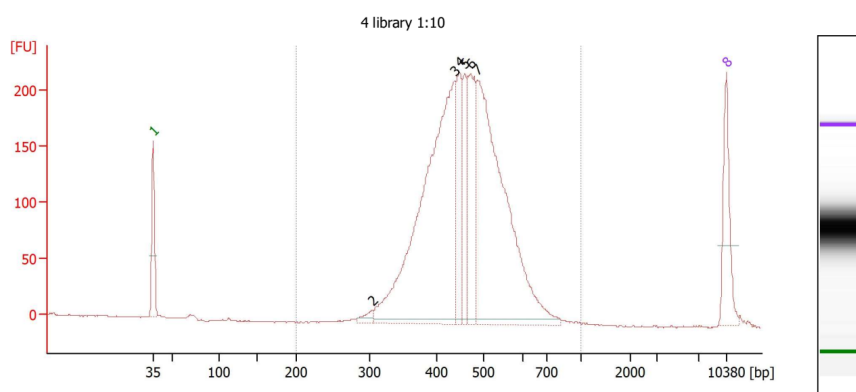
Слика 108. Библиотека узорка 1 на биоанализатору.



Слика 109. Библиотека узорка 2 на биоанализатору.



Слика 110. Библиотека узорка 3 на биоанализатору.



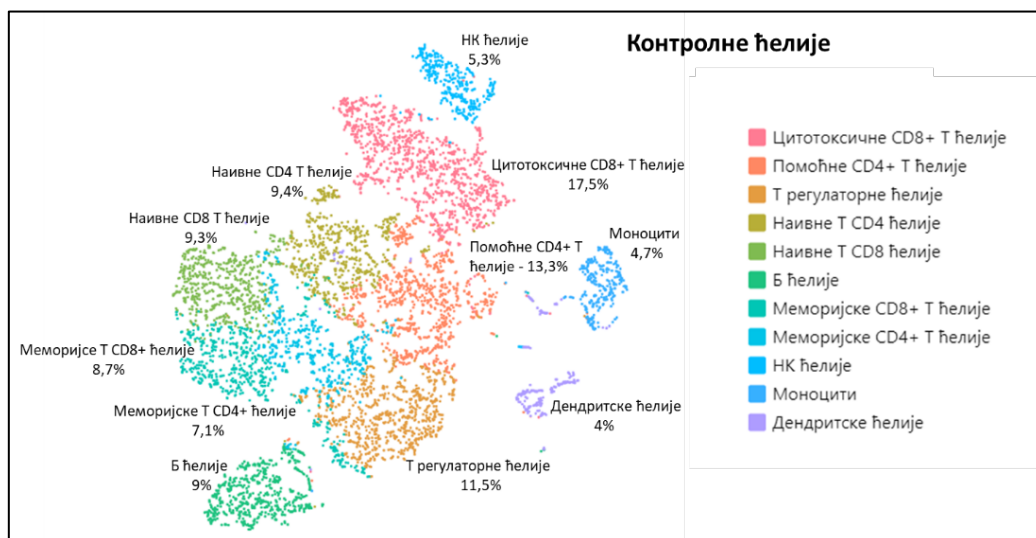
Слика 111. Библиотека узорка 4 на биоанализатору.

Преглед добијених резултата секвенцирања у резолуцији појединачне ћелије приказан је у Табели 28.

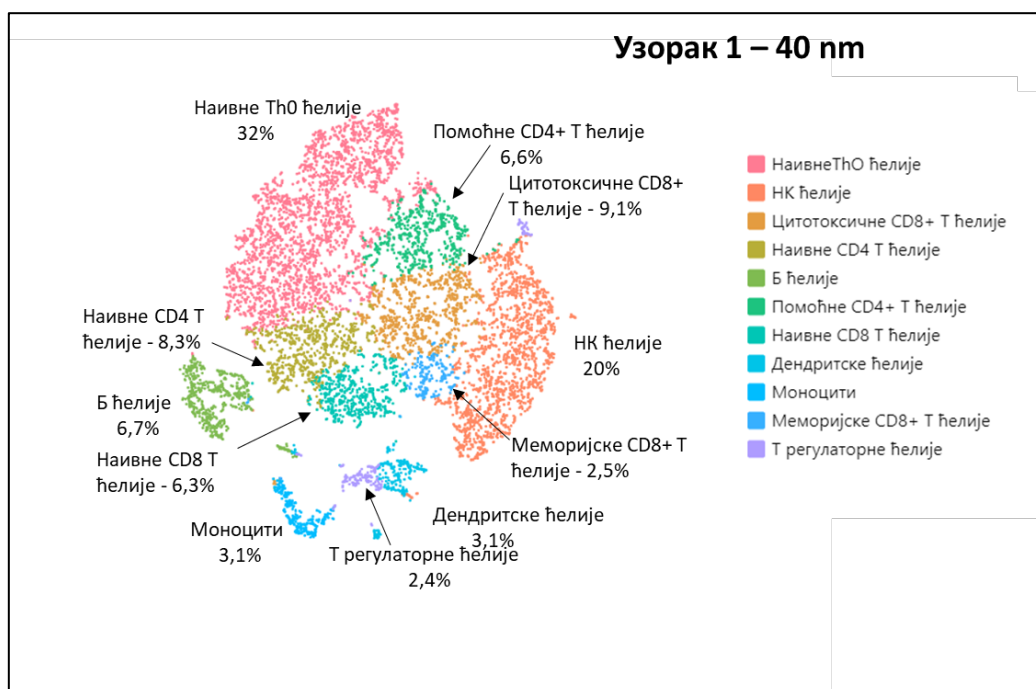
Табела 28. Резултати секвенцирања.

	Процењен број ћелија	Просек по ћелији читања	Број читања	Кластери	Гени
Узорак 1 (40 nm)	8.743	29.239	255.635.833	11	25.791
Узорак 2 (200 nm)	12.703	18.138	230.408.531	12	26.216
Узорак 3 (40 + 200 nm)	6.176	27.724	171.226.231	11	25.006
Узорак 4 (контрола)	6.546	36.083	236.197.487	11	25.162

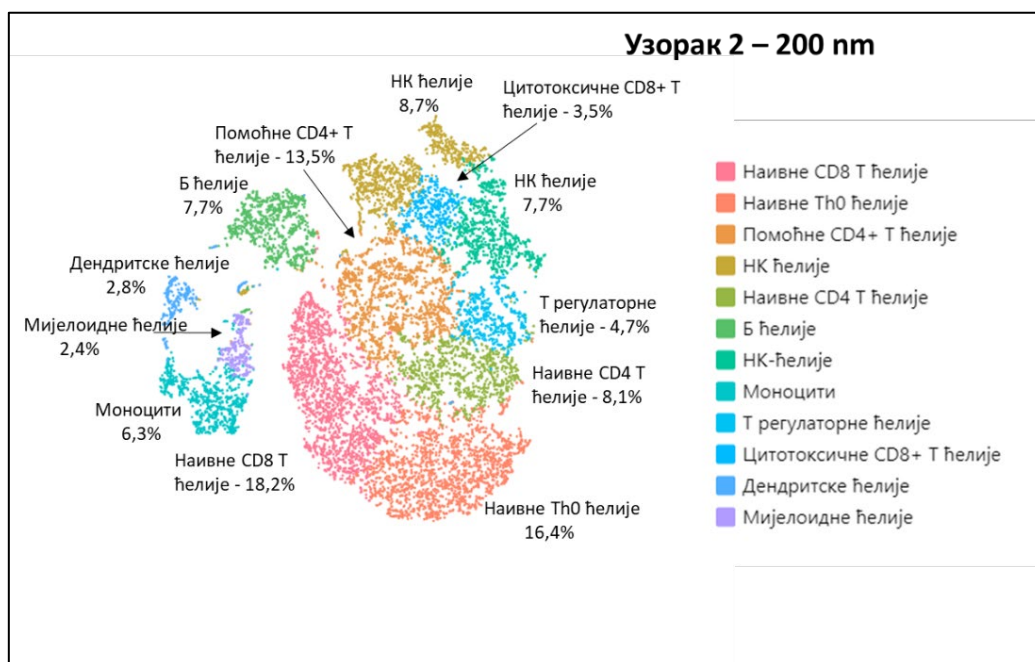
Након биоинформатичке обраде добијених података, добили смо резултате приказане на сликама 112-115. Можемо видети да наночестице различите величине изазивају другачији одговор имунских ћелија на хуманом узорку периферних моноклеарних ћелија.



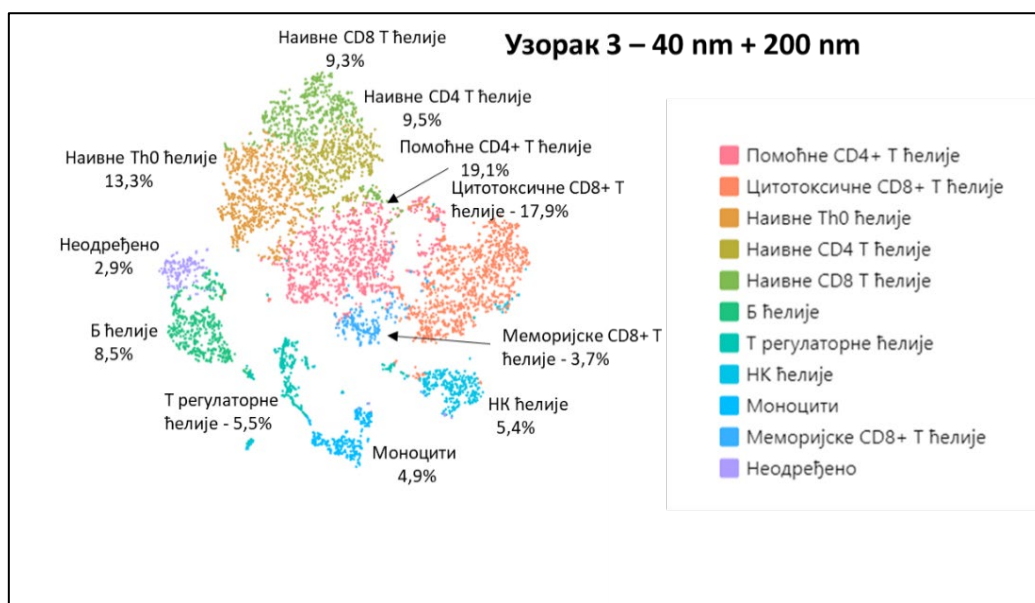
Слика 112. Приказ добијених ћелија у контролном узорку.



Слика 113. Приказ добијених ћелија у узорку третираном наночестицама од 40 nm.



Слика 114. Приказ добијених ћелија у узорку третираном наночестицама од 200 nm.



Слика 115. Приказ добијених ћелија у узорку третираном са обе врсте наночестица (40 nm + 200 nm).

ДИСКУСИЈА

1. Цитотоксичност

Последњих година, комплекси злата (III) су опсежно истражени међу комплексима на бази метала због њихових повољних својстава и предности у поређењу са уобичајено коришћеним лековима против тумора на бази метала. (Zarić et al, 2020; Kim et al, 2019; Wang et al, 2007) Неколико студија је описало да комплекси злата(III) показују стабилност у физиолошким условима и индукују *in vitro* цитотоксичност против различитих ћелијских линија карцинома. (Alhoshani et al, 2021; Ronconi et al, 2005) Након серије испитивања различитих једињења, значајна цитотоксична активност комплекса злата (III) примећена је код Radisavljević et al (2020), са изузетним вредностима IC₅₀ у опсегу од 0.01-14.57 μM за колоректални карцином HCT-116 и 0.98-75.02 μM за ћелије карцинома дојке MDA-MB-231. На основу ових резултата спроведено је детаљно испитивање механизма њихове цитотоксичности. Раније описане цитотоксичне активности различитих комплекса злата(III) су последица различитих механизма, попут директне интеракције са ДНК или интеракције са другим ћелијским компонентама, као што је регулација BCL-2 породице протеина и индукција апоптозе, ремећење ћелијског циклуса, инхибиција раста ћелије, повезанот са инхибицијом активности протеазома, итд. (Aldinucci et al, 2007; Saggioro et al, 2007)

2. Редокс статус

Концентрација реактивних кисеоничних и азотних врста након примене комплекса злата се знатно мења, што нам указује да долази до поремећаја редокс равнотеже и генерално мењања статуса ћелија. (Petrović et al, 2020; Živanović et al, 2017) До сада је већ описано у литератури да једињења са јоном метала као централним јоном ремете редокс равнотеже и проузрокују многе промене. (Petrović et al, 2021) У нашој студији, концентрација супероксидних анјонских радикала расте са повећањем концентрације примењених комплекса злата, са изузетком највеће концентрације (50 μM). Различити механизми могу довести до овог пораста, попут самих структура испитиваних комплекса који могу покренути ланац слободно-радикалских реакција, до Фентонове реакције која је показана код многих транзиторних метала. (Živanović et al, 2017) Како се и очекује, (Petrović et al, 2012) комплекси имају временски завиштан одговор, тј концентрација $\text{O}_2^{\cdot-}$ је већа након 72 h у односу на 24 h, што указује да им ефекат није само акутни већ траје дуже. Такође, код оба третмана долази до одговора зависног и од дозе и од времена када посматрамо концентрације азот монооксида. Повишени нивои NO, праћени производњом других кисеоничних врста, су директни докази оксидативног стреса у ћелији. (Prokić et al, 2015) Пораст ове две врсте слободних радикала је повезан са падом вијабилности ћелија, (Radisavljević et al, 2020) а то се такође доводи у везу и код других аутора. (Čanović et al, 2017) Заједно са супероксид анјон радикалом, азот монооксид може врло брзо довести до настанка још токсичнијих пероксинитрита. (Djordjević et al, 2010) Још једна реактивна кисеонична врста, водоник пероксид, благо расте са повећањем примењених концентрација оба комплекса, а након примене виших доза (10 μM и 50 μM) комплекса АК1 долази до значајног повећања количине H_2O_2 . На овај начин, свеукупна продукција хемијски индукованих слободних радикала води до поремећаја редокс равнотеже и смрти ћелије. (Petrović et al, 2021; Petrović et al, 2020)

Повећан оксидативни стрес се огледа и у порасту нивоа глутатиона, (Canović et al, 2017) како оксидованог тако и редукованог. (Prokić et al, 2015) Генерисане реактивне врсте се прво сусрећу са ендогеним тиолима као што је глутатион. (Trbojević et al, 2010) У нашем случају, промене у систему глутатиона такође зависе од дозе и од времена. Уочавамо повећање и оксидованог и редукованог глутатиона, са значајним повећањем након 72 h од примене АК1 комплекса у највишим концентрацијама (10 μ M и 50 μ M). Ово је очекивана реакција јер редуковани глутатион сакупља и ксенобиотику у ћелијама. (Petrović et al, 2021) Сваку већу продукцију слободних радикала прати већа продукција глутатиона, (Živanović et al, 2017) који је способан да штити биомолекуле од оксидативног оштећења. (Novaković et al, 2018) С тим у вези, сваку активацију ензима који синтетишу глутатион можемо сматрати начином антиоксидативног деловања ћелије у борби са примењеним третманом или поремећеним редокс балансом ћелије. (Canović et al, 2017; Trbojević et al, 2010)

Смањена релативна експресија *HIF1 α* гена 24 h након третмана указује да акутно доводи до престанка развоја карцинома. (Chai et al, 2022) Такође, у случају третмана АК1 и АК2 комплекса долази до промене и у проценту *HIF1 α* протеина после 24 h од примене. Обе концентрације АК2 комплекса смањују проценат овог протеина, док већа концентрација АК1 комплекса доводи до двоструког смањења његовог нивоа. Низак ниво *HIF1 α* је добар показатељ успешности третмана јер тада долази до повећане апоптозе, смањене ангиогенезе, (Wang et al, 2022; Semenza, 2003) нема активације гена који утичу на покретање адаптивних одговора ћелије, (Duarte et al, 2021) алтернативних метаболичких путева, (Semenza, 2003) смањује се процес канцерогенезе. (Chai et al, 2022) Након 72 h од третмана долази до покушаја преживљавања канцерских ћелија тако што благо повећају *HIF1 α* генску експресију, осим при вишој концентрацији АК1 комплекса (10 μ M). Ипак, овај благ пораст генске експресије не прати протеинска експресија која и даље остаје смањена или се чак још више смањује, што је најизраженије када се примени већа концентрација третмана (двоструко смањење). Док након третмана генерално долази до пада нивоа *HIF1 α* , код контролних ћелија ниво овог протеина расте што је и одлика хипоксичних карцинома. (Chai et al, 2022)

NF- κ B припада породици транскрипционих фактора који су кључни регулатори у карциномима. (Mitchell et al, 2016) Експресија *NF- κ B* гена у нашем случају се благо повећава након примене АК2 комплекса у концентрацији од 1 μ M после 24 h, док се код АК1 комплекса експресија повећава и до 3 пута уз примену веће концентрације (10 μ M). Након 72 h ова експресија наставља да расте још више (и до 9 пута више), док се код АК2 комплекса после 72 h смањује експресија *NF- κ B* гена. Како се често дешава да је регулација NF- κ B у карциномима неправилна, (Rajab et al, 2022) и овде се срећемо са тим. Експресија NF- κ B протеина, насупрот генској експресији, показује дозно-зависно смањење након примене АК1 комплекса после 24 h, док је благо повишена после 72 h при нижој концентрацији комплекса. Након примене АК2 после 24 h долази до већег смањења експресије протеина при нижој дози (скоро дупло) него при вишој. После 72 h третмана, проценат NF- κ B протеина је приближно једнак вредностима у контролним ћелијама. Почетно повећање експресије *NF- κ B* гена може да буде последица претходно описаног акутног повећања реактивних кисеоничних врста, (Rajab et al, 2022) али ипак на протеинском нивоу немамо овај ефекат што нам указује да NF- κ B неће довести до помоћи преживљавању карциномских ћелија. (Dolcet et al, 2005) Смањен ниво након 24 h, и приближно исти ниво овог протеина након 72 h неће спречавати карциномске ћелије да уђу у апоптозу и на овај начин доведу до резистенције на примењени третман. (Dolcet et al, 2005)

Трећи испитивани ген и протеин је NRF2 који има доста значајних улога у одржавању редокс равнотеже код примене третмана на ћелије. (Duarte et al, 2021; Suzuki

et al, 2021; Schmidlin et al, 2019) Експресија *NRF2* гена и протеина значајно се разликује у зависности од примењених концентрација комплекса. Са АК1 комплексом у нижој концентрацији, долази до двоструког смањења експресије након 24 h третмана, која тежи да се врати у нормалу након 72 h, док при вишој концентрацији (10 μM) долази до 4 пута повећања у експресији гена и ово повећање се приближно одржава и после 72 h. Слично томе, благо повећање се задржава и после 72 h од примене АК2 комплекса. Према нашим резултатима, цитопротекторна улога (Tonelli et al, 2018) и антистрес механизам који је одговоран за преживљавање ћелија (Bellezza et al, 2018) се укључују само после примене већих доза АК1 комплекса, и благо након примене АК2 комплекса. Насупрот томе, ниво *NRF2* протеина показује смањење након 24 h од примене третмана, са највећим смањењем након примене 10 μM АК1 комплекса. С друге стране, након 72 h од третмана, долази до благог повећања експресије овог протеина у поређењу са нетретираним ћелијама. Занимљиво да је повећани проценат протеина уочљивији након примене нижих концентрација оба третмана (1 μM). Ово може бити последица већег нивоа реактивних врста након 72 h од примене третмана, јер се при овим условима *NRF2* активира у цитоплазми и транслоцира у једро. (Duarte et al, 2021) На нивое *NRF2* и NF- κB доста може да утиче и њихова истовремена експресија, тј долази до конкуренције у транскрипцији, активација *NRF2* успорава NF- κB , (Bellezza et al, 2018) али ипак на крају ефекторски и регулаторно делују у истом смеру. (Johansson et al, 2018; Kipp et al, 2017) У нашем случају, ова два протеина се углавном прате и у смеру генске и у смеру протеинске експресија.

Експресија *TXNDR1* гена је нешто већа после 24 h са већом дозом АК1 комплекса, док се после 72 h повећава са остала 3 третмана (АК1-1, АК2-1 и АК2-10). Овај пораст експресије после 72 h може се довести у везу са повећаном *NRF2* активношћу. (Tonelli et al, 2018)

Генска експресија све 4 варијанте глутатион пероксидазе (*GPx*) је значајно повишена после 24 h од примене АК1 комплекса у вишој дози, док је код осталих комплекса доминантан само пораст варијанта *GPx1* и *GPx3*. На пораст експресије ових ензима делује и *NRF2* као последица реакције на спољашње стимулусе. (Yu et al, 2021) Након 72 h пораст генске експресије ових варијанти остаје само код виших доза комплекса, посебно код АК1. Ово опадање генске експресије након 72 h, посебно код *GPx4*, огледа се и у активност *GPx* ензима која се тада исто смањује.

Ензимска активност глутатион редуктазе (GR) прати активност глутатион пероксидазе, само што учествују у реакцијама супротног смера. На оба ензима може да утиче *NRF2*, (Tonelli et al, 2018) што се делом и види по добијеним резултатима где смањење експресије *NRF2* протеина смањује и активност ових ензима.

Активност SOD ензима се тек повећава након 72 h, и то значајно расте након примене 10 и 50 μM . Код АК2 комплекса активност се благо повећава после 72 часа само уз примену највеће дозе, док остале дозе третмана немају утицаја на SOD ензим. Повећане количине $\text{O}_2^{\cdot-}$ повећавају активност овог ензима, који даље каталише транслацију $\text{O}_2^{\cdot-}$ у H_2O_2 . (Novakovic et al, 2019; Novakovic et al, 2018) Ово видимо и у нашим резултатима где високе концентрације $\text{O}_2^{\cdot-}$ и висока активност SOD ензима после 72 h прати и пораст H_2O_2 . На овај пораст активности SOD ензима такође може да утиче *NRF2* експресија, (Duarte et al, 2021) која на генском нивоу показује јасну повезаност, док на протеинском нивоу прати повећање али уз високе вредности *NRF2* и за ниже дозе третмана.

Експресија *GST* гена је после 24 h веома благо повишена у третманима АК1-10 и АК2-1, док је у свим осталим третманима експресија смањена и после 24 и после 72 h. *GST* игра важну улогу у антиоксидативној одбрани од ксенобиотика, па с тим у вези NF- κB и *NRF2* утичу на експресију овог гена. (Yu et al, 2021; Tonelli et al, 2018) У нашим

результатима можемо и видети њихову повезаност како при истим третманима делују у истом смеру. Насупрот томе, GST ензимска активност се повећава тек при вишим дозама АК1 комплекса након 72 h, што није случај са осталим третманима и након краћег временског периода. Ова каснија активност GST ензима је можда део познате фазе 2 детоксикације где конјугује метаболите формиране током оксидативних реакција. (Djordjević et al, 2010)

Нумеричке симулације и математички модели биолошких процеса су од велике помоћи за боље разумевање дешавања у ћелији под различитим условима, тј. третманима. (Bhowmick et al, 2020) У нашем случају, добијени резултати математичког модела интерпретирају реакције оксидо-редукције на молекуларном нивоу. На овај начин можемо да посматрамо и анализирамо било коју временску тачку биолошког процеса од интереса, и изводимо закључке о ефектима третмана. Наш модел редокс статуса има добру моћ предвиђања ако погледамо одступања симулираних вредности у односу на вредности добијене експериментално. У неким случајевима се дешава да се криве не поклапају потпуно, али и за њих можемо закључити да су обе вредности унутар опсега и истог реда величине.

3. Апоптоза

Након анализе поремећаја редокс равнотеже у ћелијама које доводе до њихове смрти, додатно се испитује тип смрти ових ћелија (апоптоза или некроза). (Petrovic et al, 2021) Комплекс злата АК1 је показао проапоптотску активност у обе тестиране ћелијске линије. Ове резултате потврђују и претходна испитивања цитотоксичне активности овог комплекса, где проапоптотска активност одговара добијеним вредностима IC_{50} у испитиваним ћелијским линијама. (Radisavljević et al, 2020) У концентрацији од 50 μM третмана овај комплекса доводи до високог процента некрозе у испитиваним ћелијама карцинома колона и дојке.

Процена биомаркера за покретање апоптозе показала је разлике у ефектима испитиваног комплекса злата на различите ћелијске линије, што нам указује на молекуларне механизме проапоптотичке активности овог комплекса. Екстерни апоптотички пут је према резултатима доминантан у карциномским колоректалним ћелијама НСТ-116, што је показано повећањем експресије протеина у ћелијској мембрани - FAS рецептора, као и експресије гена каспазе 8. Испитивани комплекс је имао утицај и на унутрашњу апоптотску сигнализацију јер је показан његов утицај на BCL-2 чланове регулаторних протеина - повећана промена нивоа експресије гена BCL-2 и BAX, а такође и на повећану експресију протеина каспазе 9.

Како је већ познато, примарно и метастатско место ћелија тумора може бити разлог за различите механизме ефекта третмана и осетљивости на хемиотерапију. (Boot et al, 2016) Резултати на ћелијама карцинома дојке MDA-MB-231 показују да АК1 комплекс није утицао на биомаркере спољашњег апоптотичког пута, већ су апоптозу првенствено иницирале митохондрије. Повећана експресија про-апоптотског гена BCL-2 и смањена експресија анти-апоптотског маркера BAX, показују да је њихов међусобни однос поремећен, што доводи до покретања апоптозе. Затим следи ослобађање цитохрома c, као сигнала за апоптозу, па низводна сигнализација апоптозе и активација каспазе 9, (Adams et al, 2007) што је и показано у нашим резултатима где је повећана експресија гена каспазе 9.

Цитотоксична и проапоптотска активност фенантролинског лиганда који је у саставу испитиваног комплекса злата већ је описана у претходним истраживањима. Реактивност овог лиганда приписује се интеракцији са РНК и ДНК молекулима и

ензимом топоизомеразом II. (Marverti et al, 2019; Chen et al, 2013; Hande, 2006) Тако да можемо рећи да је добра активност комплекса делимично индукована и лигандом уз синергистичко дејство са централним металним јоном.

У литератури су већ описани неки подаци који се односе на комплексе злата (III) који су индуковали апоптозу унутрашњим путем у ћелијама карцинома колона НСТ-116, (Dandash et al, 2017) као и јака цитотоксична активност комплекса злата (III) активацијом апоптозе у више ћелијских линија тумора дебелог црева: SW1116, Colo 205, CRL-238, CC2-134 и НСТ-15. (Tu et al, 2009) Механизми цитотоксичности других комплекса злата према метастатским ћелијама карцинома дојке MDA-MB-231 показују проапоптотичку активност ових комплекса са различитим лигандима. (Racham et al, 2007; Milacic et al, 2006) Такође описан је и комплекс злата(III) који је индуковао апоптозу у ћелијама тумора простате (PC-3 и DU145) утицајем на унутрашњи пут апоптозе, (Celegato et al, 2014) као и комплекс злата(III) који индукује апоптозу путем митохондрија посредованог пута. (Wang and Chiu, 2008; Wang et al, 2005) Свим испитиваним комплексима злата је заједничка особина да утичу на апоптозу преко чланова породице протеина BCL-2, па је предвиђање могућих интеракција комплекса злата и ових протеина веома важно за развој лекова на бази овог метала. (Casini et al, 2008; Wang and Chiu, 2008) Битно је и напоменути да комплекси злата имају јак афинитет према сумпору, кога садрже многи ензими, па могу бити потенцијална мета за ове хемијске комплексе. (Tong et al, 2020; Zou et al, 2015; Gunatilleke and Barrios, 2006)

Такође, потенцијални механизам деловања овог комплекса злата(III) могу бити и оксидативна оштећења протеина због њиховог оксидационог карактера и редукције злата(III) у злато(I). (Giorgio and Merlino, 2020; Massai et al, 2020; Zoppi et al, 2020) Редокс механизми комплекса злата су већ показани у нашим резултатима, и веома су важни у биолошкој активности ових једињења. Описано је у литератури и неколико примера одабраних циљева за цитотоксичну активност злата као што је ензим тиоредоксин редуктаза, (Scalcon et al, 2018) или неки транскрипциони фактори. (Abbehausen, 2019)

4. Апоптоза у 2Д и у 3Д условима

3Д *in vitro* култивације ћелија дају велику наду за откривање и развој лекова премошћивањем јаза између конвенционалне 2Д култивације и животињских модела. (Dhiman et al, 2005; Ulukaya et al, 2001) 2Д имају "равну" и калдрмасту морфологију, (Keeratichamroen et al, 2023) док 3Д обезбеђује интеракцију ћелија-ћелија, механичку стабилност преко ЕЦМ подршке и интеракције са матриксом, а такође 3Д култивисане ћелије садрже више фенотипова ћелија заједно (пролиферирајуће, непролиферирајуће или некротичне ћелије). (Dhiman et al, 2005; Kim et al, 2004; Nakamura et al, 2002) 2Д модели представљају равну биологију, а свака методологија која се користи за истраживање ових модела је заснована на испирању (анализирају се само адхерентне ћелије), док се у 3Д систему анализирају све ћелије које су присутне од почетка. Многе студије о разликама између 2Д и 3Д показују недостатак добрих претклиничких студија. (Huselstein et al, 2006; Smalley et al, 2006) Системи 3Д култивације ћелија, који више личе на *in vivo* биологију тумора, могу бити ефикаснији модели у потрази за новим хемотерапијским агенсима и терапијским циљевима за лечење тумора. (Hsieh et al, 2023; Dhiman et al, 2005; Kim et al, 2004)

У нашим резултатима можемо видети да 2Д систем има више вијабилних ћелија у обе временске тачке. Ово се може објаснити чињеницом да ћелије у суспензији нису ограничене доступношћу простора или хранљивих материја, (Luo and Yang, 2004) док 3Д култивације ћелија праве градијент хранљивих материја, кисеоника, метаболита и

отпада. (Keeratichamroen et al, 2023) Такође, у резултатима се могу уочити разлике у појави апоптозе и некрозе. У литератури је већ описано да 2Д култивисане ћелије не могу бити стабилне за дуготрајну култивацију ћелија. Насупрот томе, у 3Д култивацији ћелије су мање, имају мање захтева, спајају се, апоптоза се постепено смањује и постају стабилне на дужи период. (Luo and Yang, 2004) Мање вијабилних ћелија у 3Д систему такође се може објаснити посматраним временским тачкама у нашој студији, које могу бити недовољно дугачке. Литература описује 3Д култивације ћелија у којима ћелије смањују брзину апоптозе и повећавају преживљавање тек након 4 дана, (Zhao et al, 2023; Chen et al, 2003) што може бити тема за даља истраживања. Један од разлога за повећан степен апоптозе у 3Д системима је апоптоза ћелија у централним деловима 3Д структура. (Karalczynska et al, 2018) Рана апоптоза се јавља више у 3Д систему него у 2Д систему тек након 72 h, што показује и експресија протеина након 72 h где BAX доминира као проапоптотички маркер. Сличне резултате су показали Лан и сарадници где постоји значајан проценат ране апоптозе која је индукована путем BCL-2/BAX/CAS3. (Lan et al, 2023) Касна апоптоза се више јавља у 3Д него у 2Д систему после оба испитивана времена (24 и 72 h), што је забележено и при примени неких конвенционалних цитостатика. (Kloskowski et al, 2021) С друге стране, према нашим резултатима, некроза се мање јавља у 3Д систему, што је описано и у другим студијама. (Luo and Yang, 2004)

3Д окружење омогућава међућелијску интеракцију, интеракцију ћелија са ЕЦМ, а све то утиче на експресију гена и протеина. (Keeratichamroen et al, 2023; Luo and Yang, 2004) Тако, у нашој студији, можемо видети разлике у експресији гена и протеина истих маркера које смо пратили. Метаболизам и синтеза протеина се значајно мењају када имате систем са додатном димензијом и где се уводи динамички ток. (Hsieh et al, 2023; Luo and Yang, 2004; Chen et al, 2003) Овде, у нашим резултатима са трећом димензијом, ниво експресије гена у ћелијама је на почетку смањен, а након 72 h од третмана се повећава експресија, што је супротно дешавањима у 2Д систему.

Унутрашњи пут активације апоптозе или митохондријски пут регулисан је BCL-2 фамилијом протеина. (Golbaz et al, 2020; Li et al, 2019; Chen et al, 2018; Han et al, 2018) Дуготрајно статичко оптерећење током 12 h изазива апоптозу појединачних ћелија повећавајући експресију гена BAX и CAS3 и смањујући ген BCL-2, (Zhang et al, 2014) што се такође може видети у нашим резултатима где имамо све мање и мање одрживих ћелија у 2Д статичком систему како време наставља. У нашим резултатима, у 3Д систему, примећена је смањена експресија гена CAS3 код оба комплекса, у обе дозе и током оба мерена времена. Слични резултати су пронађени у другим студијама где 3Д има мање ћелија позитивних на CAS3 него 2Д систем. (Sun et al, 2023) Добијени нижи ниво експресије CAS3 у 3Д систему може се објаснити много већим бројем касне апоптозе него у 2Д култивисаним ћелијама, а пошто CAS3 више није активан у касној апоптози, његова укупна експресија је нижа у 3Д. (Kloskowski et al, 2021) Посматрајући однос проапоптотичког BAX гена у односу на антиапоптотички BCL-2 ген, у 2Д систему тек након 72 h преовладава тас који доводи до апоптозе, а насупрот томе, у 3Д култивацији је већином више BAX експресије у овом односу након 24 h и опстаје код примене АК1-10 третмана, што се показује укупним вишим степеном индукције апоптозе након третмана.

Гледајући протеински стадијум, можемо видети да се експресија протеина значајно повећава у 2Д систему након третмана испитиваним супстанцама, док у 3Д систему не долази до тако значајне промене. У нашем случају, где имамо посла са породицом протеина који утичу на апоптозу, треба обратити пажњу на њихову равнотежу. Однос промена у BCL-2 и BAX, више од њихове одвојене експресије, игра кључну улогу у активацији апоптозе. (Campira et al, 2019) У 2Д равном систему у почетку BAX доминира над BCL-2, што доводи до апоптозе, док касније, након 72 h, вредности

ових протеина су у равнотежи и не дају даљи сигнал за улазак у апоптозу. Посматрајући 3Д систем, после 24 h преовладава BCL-2 протеин, што је знак борбе ћелије за опстанак и развој резистенције. (Birtekosak et al, 2021) Међутим, како време пролази, после 72 h, BAX се повећава и преовладава у односу на BCL-2, и то зависи од дозе, што се најбоље види код комплекса АК1 у вишој дози (10 μ M) (Табела 26).

Просторна организација ћелија и архитектура ткива у 3Д је одговорна за опстанак ћелија јер утиче на то како ћелије реагују на спољашње утицаје, посебно у апоптози и различитим путевима апоптозе. (Zahir and Weaver, 2004) Осврћући се на ово, наши резултати показују да комплекси злата које смо користили делимично индукују сигнале из митохондрија који доводе до апоптозе, али делимично кроз спољашњи пут као што је приказано у претходном раду. (Milutinovic et al, 2022)

Једноћелијске 3Д структуре су погодне за раније фазе развоја лека, али ни то још увек није сасвим задовољавајуће јер *in vivo* туморско ткиво садржи и друге ћелије. (Geiger et al, 2016) Напредак у развоју 3Д култивације ћелија је већи него икад, али је потребно више истраживања. (Kim et al, 2004) Такође, потребно је боље разумевање регулације сигналне мреже у 3Д култивисаним ћелијама. (Smalley et al, 2006)

Очигледно је да ефекат третмана није исти у оба експериментална модела, и да различити начини култивације ћелија и снабдевања хранљивим материјама играју главну улогу у понашању ћелија. У зависности од доступности кисеоника и хранљивих материја, туморско ткиво (примитивно) има неколико зона: некротичне, хипоксичне, мирне и пролиферишуће зоне. (Barisam et al, 2018)

Представљени математички модел разматра неколико биолошких аспеката: дужину ћелијског циклуса, трајање хипоксије, некрозу и апоптозу, вероватноћу спонтане апоптозе, праг мировања и хипоксије, као и потрошњу кисеоника. 3Д ћелијске културе имају другачију дужину ћелијског циклуса у поређењу са 2Д ћелијама, што је важно приликом тестирања потенцијалних лекова. (Buczacki et al, 2018) Наши резултати су показали смањење трајања ћелијског циклуса у 2Д моделу након третмана, док није било промене у динамичком 3Д моделу, што објашњава да хетерогеност у дужини ћелијског циклуса значајно утиче на исход терапије. (Buczacki et al, 2018) У почетку, пролиферативну фазу прати застој ћелијског циклуса, а терапија приморава те ћелије које мирују на прогресију ћелијског циклуса, (Buczacki et al, 2018) тако да је такав скраћени ћелијски циклус повезан са повећаном стопом раста ћелија и пролиферације. (Holstein and David, 1990) Због ове брзе пролиферације, тумор брзо исцрпљује своје залихе хранљивих материја и кисеоника и постаје хипоксичан. (Eales et al, 2016) Ово је такође показано у нашим резултатима где је праг за улазак у хипоксију у оба модела и у већини третмана смањен. Карактеристична особина туморских ћелија је њихова способност да промене метаболизам хранљивих материја и кисеоника. (Burne et al, 2020) Смањење брзине потрошње кисеоника од стране ових ћелија је добра метода за ублажавање хипоксије. Неколико студија је описало концепт контроле раста тумора кроз регулацију потрошње кисеоника. (Rickard et al, 2020) Наш математички модел је описао смањену брзину потрошње кисеоника у 2Д условима, као и последично повећање трајања хипоксије. Насупрот томе, у динамичком 3Д моделу, потрошња кисеоника је значајно већа, тако да различити фенотипови ова два модела нуде могућност развоја нових терапија. У хипоксичним условима, расту најмалигније ћелије отпорне на терапију. (Eales et al, 2016) Према нашем математичком прорачуну, трајање хипоксије је значајно дуже у 2Д моделу у поређењу са 3Д моделом. Стога, морамо разумети како хипоксија мења ове ћелије како бисмо адекватно циљали одговорне ћелијске путеве и убили ове ћелије. Такви прорачуни и циљање ћелијских путева отварају терапијски прозор у коме можемо да делујемо, што је од великог клиничког значаја. (Eales et al, 2016) Један од разлога за смањену осетљивост на терапију је индукција мировања ћелија услед

хипоксије. (Menegakis et al, 2021) Према нашим резултатима, праг ћелија које улазе у стање мировања је значајно виши у 2Д условима након терапије него у 3Д, што указује на већу отпорност 3Д модела како су описали други аутори. (Menegakis et al, 2021) Као одговор на хипоксију, поред других патолошких механизма, индукује се и апоптоза. У зависности од трајања хипоксије, индукција и трајање апоптозе се разликују, (Wang et al, 2018) што је такође показано у нашем математичком моделу. Способност туморских ћелија да модификују горе поменуте механизме када је то потребно даје им селективну предност да преживе и опстану због изложености антитуморској терапији и промењеном окружењу. Стога је веома важно циљати различите биолошке путеве терапијом како би се избегла ова флексибилност туморских ћелија. (Byrne et al, 2020)

5. Наночестице

Развој нових терапеутских наночестица је кључна област истраживања у области наномедицине тумора. Ове формулације имају потенцијал да побољшају испоруку лекова и селективност, повећавајући ефикасност хемиотерапије. У овом докторату, фокусирали смо се на развој нових формулација заснованих на наночестицама и проценили њихов потенцијал коришћењем интерног микрофлуидног чип уређаја који репродукује физичко-хемијско стање природног окружења колоректалног тумора. Модел је дизајниран да олакша ефикасну испоруку наночестица које носе токсични комплекс злата и омогућио је екстракцију ћелија након третмана, што је омогућило анализу ефеката.

Развили смо нове формулације наночестица комбиновањем претходно синтетисаног комплекса злата (Radisavljevic et al, 2020) са CMChT/PAMAM дендримерним наночестицама у два различита приступа. Да би се добиле детаљније информације о физичко-хемијским карактеристикама добијених формулација, спроведено је неколико испитивања. Расподела величине честица указује на веће величине од самих дендримера (око 50 nm), (Oliveira et al, 2008; Chen and Park, 2003) што указује на успешну инкорпорацију комплекса злата. Формирање агрегата наночестица може се приписати чињеници да је током синтезе CMChT/PAMAM дендримерних наночестица било доступно више места везивања за реакције унакрсног повезивања. (Oliveira et al, 2008)

Вредност зета потенцијала новосинтетизованих формулација наночестица, у води при неутралној рН вредности, показала је благи негативни набој (-30.21 ± 6.80 и -26.31 ± 4.18 mV), док је сам комплекс злата имао позитивно наелектрисање (32.30 ± 4.92 mV). CMChT/PAMAM дендримери имају негативно наелектрисане карбоксиметил групе распоређене по површини њихових честица, што резултира негативним наелектрисањем од -34.3 ± 3 mV. (Maschmeyer et al, 2015) Разлике у наелектрисању између самих наночестица дендримера и дендримера са комплексом злата (мање негативним) указују на смањење броја група карбоксилне киселине на површини добијених наночестица, што је праћено интеракцијом са комплексом злата. Ово потврђују и резултати ФТИР анализе, где је идентификована структурна карактеризација појединачних компоненти као и добијене композитне структуре, што показује да је синтеза модификованих наночестица била успешна у оба приступа.

У ФТИР спектру широки опсег вибрација на ~ 3080 cm^{-1} приписује се C-H растезним вибрацијама пиридинских прстенова узорка Au-комплекса. (Radisavljevic et al, 2020; Socrates, 2001) Траке добијене на 900–1600 cm^{-1} приписују се вибрацијама истезања прстена C–N, C=C, као и вибрацијама истезања прстена. (Song et al, 2017) Поред тога, опсег вибрација између 600 и 900 cm^{-1} одговара C–H у равним вибрацијама

савијања. (Socrates, 2001) У FTIR спектрима CMChT/PAMAM дендримерних наночестица примећено је неколико трака: широка трака на $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ одговара --O--H групи, широка трака на $\sim 2900\text{ cm}^{-1}$ одговара вибрацији истезања N--H , трака на 1655 cm^{-1} одговара C--O вибрацији истезања Амид I везе, трака на 1580 cm^{-1} одговара C--N истезању и N--H вибрација савијања Амид II везе, трака на 1540 cm^{-1} приписује се C--N истезању вибрација Амид II везе позициониране унутар језгра дендримера, трака на 1420 cm^{-1} одговара симетричном режиму истезања COO-- групе, трака на 1375 cm^{-1} одговара моду асиметричног истезања COO-- групе, трака на 1325 cm^{-1} одговара C--N вибрација истезања амидне III везе. (Oliveira et al, 2008, Socrates, 2001)

Након процеса комплексирања између Au -комплекса и дендримера, формиране су наночестице Формулације А. У поређењу са молекуларном структуром прекурсора, добијене су благе промене у ФТИР спектрима Формулације А. Конкретно, већина присутних трака је одговарала CMChT/PAMAM дендримерским наночестицама. Међутим, могло се открити неколико варијација у вибрационим спектрима. Уочен је плави помак траке од 1580 до 1573 cm^{-1} , уз повећање интензитета трака на 1420 cm^{-1} и на 1325 cm^{-1} . Поред тога, примећено је формирање нове траке на $\sim 950\text{ cm}^{-1}$. Ове промене у вибрационим спектрима могу указивати на потенцијалну модификацију површине CMChT/PAMAM дендримерних наночестица од стране Au -комплекса. Конкретно, промене у интензитету трака које одговарају симетричном режиму истезања COO-- групе и C--N вибрације истезања Амид II и Амид III везе, као и формирање нове траке, потврђују одређени тип интеракције између појединачних компоненти дендримера и Au -комплекса. С друге стране, након процеса преципитације дошло је до значајних промена у хемијској структури. Присуство нових трака у ФТИР спектрима преципитираних наночестица (Формулација Б) на ~ 1600 , 1425 , 880 , 833 и 700 cm^{-1} указује на формирање нових хемијских веза између појединачних компоненти током вишестепеног синтетичког пута. Конкретно, траке на ~ 1600 и 1425 cm^{-1} потврђују формирање унидентатног карбоксилатног комплекса који је настао током фазе преципитације. (Vieira et al, 2015) Трака која се појавила на приближно 1600 cm^{-1} одговара симетричној C--O вибрацији истезања, док трака на 1425 cm^{-1} одговара C=O истезној вибрацији претходно поменутог комплекса. Поред тога, траке које се појављују на нижим таласним бројевима као што су 880 , 833 и 700 cm^{-1} су повезане са C--H вибрацијама савијања у равни које потичу од прекурсора Au -комплекса. (Radisavljevic et al, 2020; Socrates, 2001)

ТЕМ фотографије откривају облике попут наносфера, појединачне честице и агрегате са више детаља. Сами дендримери су такође сферног облика, (Salgado et al, 2010; Oliveira et al, 2008) а примери напуњених наночестица су задржали исти облик након синтезе. (Carvalho et al, 2019b) Au -комплекс је уграђен у дендримере на два начина: у наночестицама Формулације А, Au -комплекси се могу видети дуж периферије честице, док се у Формулацији Б Au -комплекс може видети унутар шупљина сфере.

Према UV-Vis спектрима, при физиолошким рН вредностима, синтетизоване формулације наночестица показују стабилност, и пикови који одговарају Au -комплексу ($250\text{--}350\text{ nm}$) (Radisavljevic et al, 2020) као и FITC боји (488 nm) (Carvalho et al, 2019b) могу се јасно уочити. У базним условима, пикови се одржавају али је њихова апсорпција повећана, док се у киселим условима пикови распршују. Ово је израженије код наночестица формулације А и указује на нестабилност овог типа наночестица и ослобађање Au -комплекса. Ово својство наночестица је кључно јер је микроокружење тумора типично кисело. (Boedtkjer and Pedersen, 2020) Због тога ће се цитотоксични Au -комплекс ослободити из дендримерних наночестица на одговарајућој локацији. С друге стране, биолошка средина у здравом ткиву има рН од око 7 и јаку јонску јачину. (Vieira et al, 2015) У погледу утицаја јонске јачине, при вишим вредностима концентрације соли добијају се јача апсорпција и јасни пикови. При највећим испитиваним јонским јачинама

долазило је и до таложења. У растворима ниже јонске снаге (0.001 М и 0 М) наночестице Формулације А, пикови су спљоштени, док код наночестица Формулације Б пикови остају, али су мање јачине. Према овим резултатима, наше добијене наночестице поседују обећавајућа својства јер показују стабилност у условима неопходним за дистрибуцију у целом организму до окружења тумора.

Претходне студије су показале да CMChT/PAMAM дендримери имају ниску цитотоксичност, а када су обележени FITC бојом, они су стабилни током дужег временског периода без изазивања токсичности за ћелије. (Maschmeyer et al, 2015) Наши резултати указују да Au-комплекс има слабији ефекат на 3Д ћелијске формације у поређењу са 2Д условима, што се очекује за већину лекова. (Radisavljevic et al, 2020; Imamura et al, 2015) У поређењу са новодобијеним наночестицама, Au-комплекс има слабији ефекат од Формулације А након 72 h, што је знатно мање након примене веће концентрације ових наночестица. Формулација Б наночестица је имала најмањи цитотоксични ефекат у скоро свим условима и временским тачкама, осим након 24 h у концентрацији од 1 μM где је значајно смањила вијабилност ћелија у односу на Формулацију А. Формулација А показује цитотоксични ефекат који је и дозно и временски зависан. Такође, Формулација А у дози од 10 μM после 72 h има статистички значајно најбољи ефекат од сва три типа третмана.

Да бисмо стекли увид у интернализацију наших нових наночестица у ћелије, спровели смо флуоресцентну микроскопију и експерименте проточне цитометрије. Као што је претходно описано, величина честица одређује механизам њихове интернализације у ћелију. (Wu et al, 2019; Bannunah et al, 2014) Ћелијска интернализација честица које су око 50 nm се дешава ендоцитозом, док се веће честице уносе у цитосол првенствено фагоцитозом. Молекули мањи од 10 nm се убацују из цитоплазме у језгро кроз комплекс нуклеарних пора путем пасивне дифузије. (Petithory et al, 2021; Oliveira et al, 2008) Након што се наночестице интернализују, оне се разграђују под утицајем ензима или рН вредности унутар ендозома, чиме се повећава доступност лекова или других супстанци унутар ћелије. (Oliveira et al, 2008) На овај начин, CMChT/PAMAM дендримерне наночестице повећавају концентрацију цитотоксичног Au-комплекса унутар ћелија карцинома дебелог црева.

Фотографије флуоресцентне микроскопије показују да су ћелије карцинома НСТ-116 биле у стању да интернализују оба типа наночестица у динамичким условима у уређају са микрофлуидним чипом, или да ступе у интеракцију са честицама на површини. Фотографије приказују наночестице распоређене по цитоплазми, па чак и у језгру. Квантитативна анализа је открила много већу интернализацију Формулације А него Формулације Б наночестица. Поред тога, према нашим резултатима, интернализација се временом смањивала; за обе формулације вредности су биле ниже након 72 h. Слични подаци су раније добијени на ћелијама карцинома дебелог црева НСТ-116, где је интернализација њихових наночестица достигла врхунац у року од 24 h, а затим се благо смањила. (Carvalho et al, 2017b) Дакле, можемо рећи да наночестице Формулације А показују повећану цитотоксичност у поређењу са Формулацијом Б, посебно статистички значајно при концентрацији од 10 μM , у складу са њиховим стопама интернализације. Насупрот томе, наночестице формулације Б показују ефекат засићења и опоравка ћелија тумора након 72 h, што се види по њиховој пролиферацији при коначној концентрацији од 1 и 10 μM .

6. Производња микрофлуидних чип уређаја

Манипулација малим количинама течности унутар затворених микроканала са пречником у опсегу од 1 μm до 1 mm повезана је са новим и јединственим карактеристикама механике флуида на микроскали. Ово одговара запремини течности у опсегу од 10^{-6} до 10^{-9} L (у неким случајевима се може постићи манипулација запреминама од 10^{-12} до 10^{-15} L). Ово је од највеће важности када се ради о ћелијама, које су на микрометријској скали.

СЛА 3Д штампач садржи дисплеј заснован на течним кристалима (ЛЦД) користи дигитални светлосни пројектор за очвршћавање смоле. Он осветљава слике целих слојева на дно посуде са смолом. Слојеви генерисани коришћењем ЛЦД штампача састоје се од такозваних воксела, 3Д еквивалента пиксела. У процесу ЛЦД 3Д штампања, он осветљава комплетне слојеве на резервоару смоле са UV светлом која долази из низа ЛЕД диода које сијају кроз ЛЦД екран. Екран делује као маска, откривајући само пикселе неопходне за тренутни слој и затамњујући остатак. Ова посебна техника се често назива „маскирани СЛА“ или МСЛА.

У поређењу са конвенционалним техникама израде уређаја са микрофлуидним чипом, наш приступ има неколико предности. На пример, моделирање фузионог таложења представља нека ограничења у вези са добијеном храпавом површином и брзина штампања је спора, док ЛЦД штампање нема ове недостатке. Такође, друга техника као што је инкјет моделирање има нека ограничења која укључују уклањање потпорног материјала и количину отпада који настаје током процеса штампања, док код ЛЦД методе нема таквих губитака. Што се тиче стереолитографије, постоје две главне варијабле током процеса, фотополимеризујући промотер и карактеристике смоле. Добијена резолуција зависи од ове две варијабле, и резолуција код ЛЦД технологије је веома висока. (Macdonald et al, 2017; Waheed et al, 2016)

Процес 3Д штампања који смо користили за израду микрофлуидних чипова је брз и омогућава већу слободу у креирању модела. Смањили смо број корака у целом процесу израде. Такође, значајна предност овог приступа штампању је што се више модела може штампати одједном.

Користећи савремене компјутерски потпомогнуте инжењерске методе за анализу протока флуида, у комбинацији са методом тополошке оптимизације, могуће је креирати микрофлуидни чип уређај који ће имати једнаку дистрибуцију протока флуида у свим деловима, а самим тим и на испитивана ткива. Tosca Fluid софтвер као алат за тополошку оптимизацију генерише моделе које је тешко произвести коришћењем конвенционалних техника израде. Стога је 3Д штампа идеалан алат за производњу оптимизованих модела који могу бити веома сложени и, у неким случајевима, немогуће произвести на други начин.

Описани поступци производње омогућавају израду сложених микрофлуидних чип система који омогућавају одрживост ћелија током дугих временских периода, чак и неколико недеља. (Gumuscu et al, 2017) Реплициране микроструктуре са засејаним ћелијама које су перфундоване медијумом за ћелијску култивацију (или другим физиолошким течностима), могу да рекапитулирају физиологију или патофизиологију природног ткива или органа. За бољу ћелијску адхезију, протеини екстрацелуларног матрикса, као што је фибронектин или VCAM-1 протеин (молекула адхезије васкуларних ћелија), могу се користити за облагање микроструктура и канала. Постоји растући тренд развоја нових микрофлуидних уређаја, „organ-on-chip“, како би се боље реконституисало *in vivo* микроокружење на нивоу ткива или органа. (Zheng et al, 2016; Bhatia and Ingber, 2014)

ЗАКЉУЧАК

Цитотоксичност	На основу великог броја тестирања у 2Д културама, комплекси злата (III) су се издвојили за даља истраживања према својој цитотоксичности и селективности на ћелије карцинома колоне.
Редокс статус	Испитивани комплекс злата (III) утиче на редокс равнотежу у ћелијама карцинома колоне.
Апоптоза	Испитивани комплекс злата (III) индукује апоптозу доминантно спољашњим путем, али делом и унутрашњим путем.
2Д наспрам 3Д	Резултати испитивања механизма апоптозе и некрозе указују да су 3Д динамичке култивације ћелија у микрофлуидном чип уређају релевантнији системи за <i>in vitro</i> истраживања.
Наночестице	Наночестице дендримера које носе комплекс злата (формулација А) имају изузетну способност циљања ћелија у киселој средини тумора, и испоруку потенцијалног лека.
Микрофлуидни чип уређаји	Производња микрофлуидних биочипова и њихова употреба у истраживањима омогућава реалнији приказ сложених биолошких система.

Редокс статус ћелија

Део биолошке евалуације молекуларних механизма дејства потенцијано цитотоксичних новосинтетисаних једињења су и студије испитивања редокс равнотеже, у овом случају код ћелија карцинома колоне (HCT-116). Према нашим резултатима, промене у концентрацијама биомаркера оксидо-редукционог система сугеришу на прооксидативни карактер оба испитивана комплекса злата (III). С друге стране, индукован оксидативни стрес покреће и ензимске и неензимске компоненте антиоксидативне одбране. Такође, механизми генске и протеинске експресије указују на ремећење овог баланса у ћелијама карцинома. Ако упоредимо и са резултатима цитотоксичности ових једињења, можемо да истакнемо утицај комплекса АК1, посебно при концентрацијама 10 μM и већим. Докази да ова једињења изазивају већу продукцију слободних радикала, и последично доводе до цитотоксичног ефекта на ћелијску линију карцинома, изгледају обећавајуће и отварају даља разматрања за испитивање *in vitro*, па касније и *in vivo*.

Апоптоза ћелија

Испитивана проапоптотичка активност АК1 комплекса злата (III), као и експресије генских и протеинских биомаркера апоптозе, повећавају знање о механизму изузетне цитотоксичности овог комплекса. Добијени резултати показују да овај комплекс индукује апоптозу у нижим и средњим дозама, што је жељени пут ћелијске смрти у терапији карцинома. У ћелијама карцинома колоне апоптоза је била доминантно активирана спољашњим апоптотичким путем, али је био покренут и митохондријски пут. Насупрот томе, апоптоза је у ћелијама метастатског карцинома дојке покренута из митохондрија, тј унутрашњим путем. Наши резултати указују да испитивани комплекс злата има основу за даља испитивања и потенцијални развој у лек против испитиваних карцинома дојке и колоне.

Апоптоза у 2Д наспрам 3Д система

Можемо закључити да је промена смрти ћелија тумора увођењем треће димензије и динамичког модела у *in vitro* истраживања веома важна област истраживања која је у повоју. Разлике на које је наша студија указала су већи проценат апоптозе, посебно касне, и мање некрозе у 3Д динамичкој ћелијској култивацији. Такође, показан је мањи проценат вијабилних ћелија тумора у 3Д условима након третмана. Судећи по есејима који су урађени, апоптоза се индукује делом унутрашњим путем, али и екстерним путем у 3Д систему. Са молекуларно биолошке тачке гледишта, значајно различит степен експресије гена и протеина је у 2Д и 3Д системима. Такође је показано да су 3Д динамичке култивације у микрофлуидном чипу стабилније током времена од 2Д равних система, те стога погодније за истраживања у биологији, фармацији и медицини. Пошто су ово неистражене теме, потребна су даља истраживања и побољшања ових 3Д система.

Наночестице

У области наномедицине постоји хитна потреба да се дизајнирају и развију нови и ефикаснији нано-фармацеутици за терапију тумора. Наша студија се бавила овом потребом истражујући комбинацију нових наночестица као система за испоруку лекова, и користећи модел колоректалног карцинома на чипу. Резултати су показали да наночестице базирани на комплексу дендримера и злата добијене комплексирањем (формулација А) имају изузетну способност циљања ћелија тумора и испоруке лекова. Са фармацеутске перспективе, уградња токсичних једињења у наночестице дендримера као носаче има значајан потенцијал за примене у клиници. Све у свему, комбинација ПАММ дендримера и злата има потенцијал да револуционарно промени терапију и дијагнозу тумора тако што ће превазићи изазове традиционалних третмана тумора, и отворити пут персонализованим и ефикаснијим терапијама у будућности.

Микрофлуидни чип уређаји

Микрофлуидни чип уређаји показују огроман потенцијал у поређењу са традиционалним системима који се користе у лабораторијама за истраживања у многим областима као што су биомедицина, ткивно инжењерство, фармакологија и откривање лекова, биотехнологија и персонализована медицина. Описане методологије производње чипова овде су се показале веома успешним. Овако добијени резултати биће коришћени у будућим истраживањима за убрзање процеса развоја микрофлуидних чип уређаја и других биомедицинских уређаја.

Општи закључак

Значај резултата ове докторске дисертације се огледа у употреби нових метода у *in vitro* испитивањима у области молекуларне биологије, као и употреби технологија које ће побољшати активност супстанци против тумора, што је од великог интереса за људску популацију. С друге стране, интерес за употребу 3Д динамичних система у *in vitro* испитивањима све више расте, као и за употребу наночестица као носача за циљано деловања активних агенаса, на шта указују многе нове научно-истраживачке студије које истичу њихову ефикасност.

ЛИТЕРАТУРА

- Abbehausen C. Zinc finger domains as therapeutic targets for metal-based compounds-an update. *Metallomics*. 2019 Jan; 11(1):15-28. doi: 10.1039/c8mt00262b.
- Adams JM, Cory S. The Bcl-2-regulated apoptosis switch: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol*. 2007 Oct; 19(5):488-96. doi: 10.1016/j.coi.2007.05.004.
- Agilent High Sensitivity DNA Kit, Agilent Technologies User Manual, publication number G2938-90321, 2013.
- Ahmed N, Sukovich D, Abate AR. Operation of droplet-microfluidic devices with a lab centrifuge. *Micromachines (Basel)*. 2016 Sep; 7(9):161. doi: 10.3390/mi7090161.
- Ahn J, Sei YJ, Jeon NL, Kim Y. Tumor microenvironment on a chip: the progress and future perspective. *Bioengineering (Basel)*. 2017 Jul; 4(3):64. doi: 10.3390/bioengineering4030064.
- Akhtar A. The flaws and human harms of animal experimentation. *Camb Q Healthc Ethics*. 2015 Oct; 24(4):407-19. doi: 10.1017/S0963180115000079.
- Aldinucci D, Lorenzon D, Stefani L, Giovagnini L, Colombatti A, Fregona D. Antiproliferative and apoptotic effects of two new gold(III) methylsarcosinedithiocarbamate derivatives on human acute myeloid leukemia cells in vitro. *Anti-cancer Drugs*. 2007 Mar; 18(3):323-32. doi: 10.1097/CAD.0b013e328011ae98.
- Alhoshani A, Sulaiman AAA, Sobeai HMA, Qamar W, Alotaibi M, Alhazzani K, Monim-Ul-Mehboob M, Ahmad S, Isab AA. Anticancer activity and apoptosis induction of Gold(III) complexes containing 2,2'-bipyridine-3,3'-dicarboxylic acid and dithiocarbamates. *Molecules*. 2021 Jun; 26(13):3973. doi: 10.3390/molecules26133973.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*. 2004 Aug; 64(15): 5245-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. *Handbook of methods for oxygen radical research*. RA Greenwald (ed), CRC Press. 1985. eBook ISBN: 9781351072922.
- Azimian H, Bahreyni-Toossi MT, Rezaei AR, Rafatpanah H, Hamzehloei T, Fardid R. Up-regulation of Bcl-2 expression in cultured human lymphocytes after exposure to low doses of gamma radiation. *J Med Phys*. 2015 Jan-Mar; 40(1):38-44. doi: 10.4103/0971-6203.152249.
- Bannunah AM, Vllasaliu D, Lord J, Stolnik S. Mechanisms of nanoparticle internalization and transport across an intestinal epithelial cell model: effect of size and surface charge. *Mol Pharm*. 2014 Dec; 11(12):4363-73. doi: 10.1021/mp500439c.
- Banjara S, Suraweera CD, Hinds MG, Kvensakul M. The Bcl-2 Family: Ancient origins, conserved structures, and divergent mechanisms. *Biomolecules*. 2020 Jan; 10(1):128. doi: 10.3390/biom10010128.
- Barisam M, Saidi MS, Kashaninejad N, Nguyen NT. Prediction of necrotic core and hypoxic zone of multicellular spheroids in a microbioreactor with a U-shaped barrier. *Micromachines (Basel)*. 2018 Feb; 9(3):94. doi: 10.3390/mi9030094.
- Barthes J, Özçelik H, Hindié M, Ndreu-Halili A, Hasan A, Vrana NE. Cell microenvironment engineering and monitoring for tissue engineering and regenerative medicine: the recent advances. *Biomed Res Int*. 2014;2014:921905. doi: 10.1155/2014/921905.
- Baskić D, Popović S, Ristić P, Arsenijević NN. Analysis of cyclohexamide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium

- iodide versus acridine orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int*. 2006 Nov; 30(11):924-32. doi: 10.1016/j.cellbi.2006.06.016.
- Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2018 May; 1865(5):721-733. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.02.010.
 - Benam KH, Dauth S, Hassell B, Herland A, Jain A, Jang KJ, Karalis K, Kim HJ, MacQueen L, Mahmoodian R, Musah S, Torisawa YS, van der Meer AD, Villenave R, Yadid M, Parker KK, Ingber DE. Engineered in vitro disease models. *Annu Rev Pathol*. 2015; 10: 195-262. doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040418.
 - Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol*. 2014 Aug; 32(8):760-72. doi: 10.1038/nbt.2989.
 - Bhowmick R, Sarkar RR. Differential suitability of reactive oxygen species and the role of glutathione in regulating paradoxical behavior in gliomas: A mathematical perspective. *PLoS One*. 2020 Jun; 15(6):e0235204. doi: 10.1371/journal.pone.0235204.
 - Birtekocak F, Demirbolat GM, Cevik O. TRAIL Conjugated silver nanoparticle synthesis, characterization and therapeutic effects on HT-29 colon cancer cells. *Iran J Pharm Res*. 2021 Spring;20(2):45-56. doi: 10.22037/ijpr.2020.112069.13514.
 - Boedtker E, Pedersen SF. The acidic tumor microenvironment as a driver of cancer. *Annu Rev Physiol*. 2020 Feb; 82:103-126. doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034627.
 - Bogojeski J, Petrović A, Milutinović MM, Živanović M, Milivojević N, Puchta R, Scheurer A, Korzekwa J, Klisurić OR. Structure-reactivity relationship, biological activity of the bis-pyrazolylpyridine RhIII complexes. The Fifth International Scientific Conference: Advances in synthesis and complexing. 22-26 April 2019. Moscow, Russia. pp 27-27. ISBN: 978-5-209-09395-4.
 - Bojic S, Falco MM, Stojkovic P, Ljubic B, Gazdic Jankovic M, Armstrong L, Markovic N, Dopazo J, Lako M, Bauer R, Stojkovic M. Platform to study intracellular polystyrene nanoplastic pollution and clinical outcomes. *Stem Cells*. 2020 Oct; 38(10): 1321-1325. doi: 10.1002/stem.3244.
 - Boot A, van Eendenburg J, Crobach S, Ruano D, Speetjens F, Calame J, Oosting J, Morreau H, van Wezel T. Characterization of novel low passage primary and metastatic colorectal cancer cell lines. *Oncotarget*. 2016 Mar; 7(12):14499-509. doi: 10.18632/oncotarget.7391.
 - Bower R, Green VL, Kuvshinova E, Kuvshinov D, Karsai L, Crank ST, Stafford ND, Greenman J. Maintenance of head and neck tumor on-chip: gateway to personalized treatment? *Future Sci OA*. 2017 Mar; 3(2): FSO174. doi: 10.4155/fsoa-2016-0089.
 - Branković J, Milivojević N, Milovanović V, Simijonović D, Petrović ZD, Marković Z, Šeklić DS, Živanović MN, Vukić MD, Petrović VP. Evaluation of antioxidant and cytotoxic properties of phenolic N-acylhydrazones: Structure-activity relationship. *R Soc Open Sci*. 2022 Jun; 9(6): 211853. doi: 10.1098/rsos.211853.
 - Buczaccki SJA, Popova S, Biggs E, Koukorava C, Buzzelli J, Vermeulen L, Hazelwood L, Francies H, Garnett MJ, Winton DJ. Itraconazole targets cell cycle heterogeneity in colorectal cancer. *J Exp Med*. 2018 Jul; 215(7):1891-1912. doi: 10.1084/jem.20171385.
 - Bull JA, Mech F, Quaiser T, Waters SL, Byrne HM. Mathematical modelling reveals cellular dynamics within tumour spheroids. *PLoS Comput Biol*. 2020 Aug; 16(8):e1007961. doi: 10.1371/journal.pcbi.1007961.
 - Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr; 55(4): 611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
 - Byrne FL, Olzomer EM, Marriott GR, Quek LE, Katen A, Su J, Nelson ME, Hart-Smith G, Larance M, Sebesfi VF, Cuff J, Martyn GE, Childress E, Alexopoulos SJ, Poon IK, Faux

- MC, Burgess AW, Reid G, McCarroll JA, Santos WL, Quinlan KG, Turner N, Fazakerley DJ, Kumar N, Hoehn KL. Phenotypic screen for oxygen consumption rate identifies an anti-cancer naphthoquinone that induces mitochondrial oxidative stress. *Redox Biol.* 2020 Jan; 28:101374. doi: 10.1016/j.redox.2019.101374.
- Campa P, Aznar-Garcia MJ, Ramos-Bueno RP, Gonzalez-Fernandez MJ, Khaldi H, Garrido-Cardenas JA. A whole-food approach to the in vitro assessment of the antitumor activity of gazpacho. *Food Res Int.* 2019 Jul; 121:441-452. doi: 10.1016/j.foodres.2018.11.058.
 - Canovic P, Bogojeski J, Kosaric J, Markovic S, Zivanovic M. Pt(IV), Pd(II), and Rh(III) complexes induced oxidative stress and cytotoxicity in the HCT-116 colon cancer cell line. *Turk J Biol.* 2017 Jan; 41(1):141-147, doi: 10.3906/biy-1605-77.
 - Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020 Jul; 17(7):395-417. doi: 10.1038/s41571-020-0341-y.
 - Carvalho MR, Barata D, Teixeira LM, Giselsbrecht S, Reis RL, Oliveira JM, Truckenmüller R, Habibovic P. Colorectal tumor-on-a-chip system: A 3D tool for precision onco-nanomedicine. *Sci Adv.* 2019a May; 5(5):eaaw1317. doi: 10.1126/sciadv.aaw1317.
 - Carvalho MR, Carvalho CR, Maia FR, Caballero D, Kundu SC, Reis RL, Oliveira JM. Peptide-modified dendrimer nanoparticles for targeted therapy of colorectal cancer. *Adv Ther.* 2019b Sep; 2(11): 1900132. doi: 10.1002/adtp.201900132.
 - Carvalho MR, Lima D, Reis RL, Correlo VM, Oliveira JM. Evaluating biomaterial- and microfluidic-based 3D tumor models. *Trends Biotechnol.* 2015 Nov; 33(11):667-678. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.09.009.
 - Carvalho MR, Lima D, Reis RL, Oliveira JM, Correlo VM. Anti-cancer drug validation: the contribution of tissue engineered models. *Stem Cell Rev Rep.* 2017a Jun; 13(3): 347-363. doi: 10.1007/s12015-017-9720-x.
 - Carvalho MR, Maia FR, Silva-Correia J, Costa BM, Reis RL, Oliveira JM. A semiautomated microfluidic platform for real-time investigation of nanoparticles' cellular uptake and cancer cells' tracking. *Nanomedicine (Lond).* 2017b Mar; 12(6):581-596. doi: 10.2217/nnm-2016-0344.
 - Carvalho MR, Maia FR, Vieira S, Reis RL, Oliveira JM. Tuning enzymatically crosslinked silk fibroin hydrogel properties for the development of a colorectal cancer extravasation 3D model on a chip. *Glob Chall.* 2018 May; 2(5-6):1700100. doi: 10.1002/gch2.201700100.
 - Carvalho MR, Reis RL, Oliveira JM. Dendrimer nanoparticles for colorectal cancer applications. *J Mater Chem B.* 2020 Feb; 8(6):1128-1138. doi: 10.1039/c9tb02289a.
 - Casini A, Hartinger C, Gabbiani C, Mini E, Dyson PJ, Keppler BK, Messori L. Gold(III) compounds as anticancer agents: relevance of gold-protein interactions for their mechanism of action. *J Inorg Biochem.* 2008 Mar; 102(3):564-75. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2007.11.003.
 - Celegato M, Fregona D, Mongiat M, Ronconi L, Borghese C, Canzonieri V, Casagrande N, Nardon C, Colombatti A, Aldinucci D. Preclinical activity of multiple-target gold(III)-dithiocarbamate peptidomimetics in prostate cancer cells and xenografts. *Future Med Chem.* 2014 Jul; 6(11):1249-63. doi: 10.4155/fmc.14.81.
 - Chai X, Wu X, Ren J, Du K, Wu X, Feng F, Zheng J. Expression of HIF-1 α , ANXA3, CD133 and their associations with clinicopathological parameters in human colon carcinoma. *Transl Cancer Res.* 2022 Jun; 11(6):1644-1651. doi: 10.21037/tcr-22-1277.
 - Chang Y, Hawkins BA, Du JJ, Groundwater PW, Hibbs DE, Lai F. A guide to in silico drug design. *pharmaceutics.* 2022 Dec; 15(1):49. doi: 10.3390/pharmaceutics15010049.
 - Chen C, Chen K, Yang ST. Effects of three-dimensional culturing on osteosarcoma cells grown in a fibrous matrix: analyses of cell morphology, cell cycle, and apoptosis. *Biotechnol Prog.* 2003 Sep-Oct; 19(5):1574-82. doi: 10.1021/bp034024w..

- Chen J, Zhong J, Liu Y, Huang Y, Luo F, Zhou Y, Pan X, Cao S, Zhang L, Zhang Y, Wang J. Purified vitexin compound 1, a new neolignan isolated compound, promotes PUMA-dependent apoptosis in colorectal cancer. *Cancer Med.* 2018 Dec; 7(12):6158-6169. doi: 10.1002/cam4.1769.
- Chen JH, Zhou LB, Pan SY. A brief review of recent advances in stem cell biology. *Neural Regen Res.* 2014 Apr; 9(7):684-7. doi: 10.4103/1673-5374.131565.
- Chen X, Gao F, Yang WY, Zhou Z, Lin JQ, Ji LN. Structure-activity relationship of polypyridyl ruthenium(II) complexes as DNA intercalators, DNA photocleavage reagents, and DNA topoisomerase and RNA polymerase inhibitors. *Chem Biodivers.* 2013 Mar; 10(3):367-84. doi: 10.1002/cbdv.201100414.
- Chen XG, Park HJ. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. *Carbohydr Polym.* 2003 Sep; 53(4):355-359. doi: 10.1016/s0144-8617(03)00051-1.
- Chopard B, Falcone J, Latt J. The lattice Boltzmann advection-diffusion model revisited. *Eur. Phys. J. Spec. Top.* 2009; 171:245-249. doi: 10.1140/epjst/e2009-01035-5.
- Conde J, Dias JT, Grazú V, Moros M, Baptista PV, de la Fuente JM. Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Front Chem.* 2014 Jul; 2:48. doi: 10.3389/fchem.2014.00048.
- Contreras-Zentella ML, Villalobos-García D, Hernández-Muñoz R. Ethanol metabolism in the liver, the induction of oxidant stress, and the antioxidant defense system. *Antioxidants (Basel).* 2022 Jun; 11(7):1258. doi: 10.3390/antiox11071258.
- Cunha-Matos CA, Millington OR, Wark AW, Zagnoni M. Real-time assessment of nanoparticle-mediated antigen delivery and cell response. *Lab Chip.* 2016 Aug; 16(17):3374-81. doi: 10.1039/c6lc00599c.
- Dandash F, Yannick Léger D, Fidanzì-Dugas C, Nasri S, Brégier F, Granet R, Karam W, Diab-Assaf M, Sol V, Liagre B. In vitro anticancer activity of new gold(III) porphyrin complexes in colon cancer cells. *J Inorg Biochem.* 2017 Dec; 177:27-38. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2017.08.024.
- Demetriades M, Zivanovic M, Hadjicharalambous M, Ioannou E, Ljubic B, Vucicevic K, Ivosevic Z, Dagovic A, Milivojevic N, Kokkinos O, Bauer R, Vavourakis V. Interrogating and quantifying in vitro cancer drug pharmacodynamics via Agent-Based and Bayesian Monte Carlo modelling. *Pharmaceutics.* 2022 Mar; 14(4):749. doi: 10.3390/pharmaceutics14040749.
- Dhiman HK, Ray AR, Panda AK. Three-dimensional chitosan scaffold-based MCF-7 cell culture for the determination of the cytotoxicity of tamoxifen. *Biomaterials.* 2005 Mar; 26(9):979-86. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.04.012.
- Djordjević NZ, Babić GM, Marković SD, Ognjanović BI, Stajn AS, Saicić ZS. The antioxidative effect of estradiol therapy on erythrocytes in women with preeclampsia. *Reprod Toxicol.* 2010 Apr; 29(2):231-6. doi: 10.1016/j.reprotox.2009.11.004.
- Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF-κB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005 May; 446(5):475-82. doi: 10.1007/s00428-005-1264-9.
- Dong SC, Sha HH, Xu XY, Hu TM, Lou R, Li H, Wu JZ, Dan C, Feng J. Glutathione S-transferase π: a potential role in antitumor therapy. *Drug Des Devel Ther.* 2018 Oct; 12: 3535-3547. doi: 10.2147/DDDT.S169833.
- Duarte TL, Talbot NP, Drakesmith H. NRF2 and Hypoxia-inducible factors: Key players in the redox control of systemic iron homeostasis. *Antioxid Redox Signal.* 2021 Aug; 35(6):433-452. doi: 10.1089/ars.2020.8148.
- Eales KL, Hollinshead KE, Tennant DA. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis.* 2016 Jan; 5(1):e190. doi: 10.1038/oncsis.2015.50.

- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun; 35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337.
- Gajewska J, Chełchowska M, Rychłowska-Pruszyńska M, Klepacka T, Ambroszkiewicz J. Oxidative and antioxidative status expressed as OSI index and GSH/GSSG ratio in children with bone tumors after anticancer therapy completion. *J Clin Med.* 2022 Mar; 11(6):1663. doi: 10.3390/jcm11061663.
- Garstecki P, Fuerstman MJ, Stone HA, Whitesides GM. Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction—Scaling and mechanism of breakup. *Lab a Chip.* 2006 Mar; 6(3):437-46. doi: 10.1039/b510841a.
- Geiger P, Mayer B, Wiest I, Schulze S, Jeschke U, Weissenbacher T. Binding of galectin-1 to breast cancer cells MCF7 induces apoptosis and inhibition of proliferation in vitro in a 2D- and 3D- cell culture model. *BMC Cancer.* 2016 Nov; 16(1):870. doi: 10.1186/s12885-016-2915-8.
- Giorgio A, Merlino A. Gold metalation of proteins: structural studies. *Coord Chem Rev.* 2020 Mar; 407:213175. doi: 10.1016/j.ccr.2019.213175.
- Glatzle D, Vuilleumier JP, Weber F, Decker K. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia.* 1974 Jun; 30(6): 665-7. doi: 10.1007/BF01921531.
- Golbaz R, Khoei S, Khoei S, Shirvalilou S, Safa M, Mahdavi SR, Karimi MR. Apoptosis pathway in the combined treatment of x-ray and 5-FU-loaded triblock copolymer-coated magnetic nanoparticles. *Nanomedicine (Lond).* 2020 Aug; 15(23):2255-2270. doi: 10.2217/nnm-2020-0119.
- Greene JM, Levy D, Fung KL, Souza PS, Gottesman MM, Lavi O. Modeling intrinsic heterogeneity and growth of cancer cells. *J Theor Biol.* 2015 Feb; 367:262-277. doi: 10.1016/j.jtbi.2014.11.017.
- Griess P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1879; 12(1): 426-428. doi: 10.1002/cber.187901201117.
- Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Mar; 7(3):211-24. doi: 10.1038/nrm1858.
- Gumuscu B, Albers HJ, van den Berg A, Eijkel JCT, van der Meer AD. Compartmentalized 3D tissue culture arrays under controlled microfluidic delivery. *Sci Rep.* 2017 Jun; 7(1):3381. doi: 10.1038/s41598-017-01944-5.
- Gunatilleke SS, Barrios A. Inhibition of lysosomal cysteine proteases by a series of Au(I) complexes: a detailed mechanistic investigation. *J Med Chem.* 2006 Jun; 49(13):3933-7. doi: 10.1021/jm060158f.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974 Nov; 249(22): 7130-9. PMID: 4436300.
- Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol.* 2008 Jan-Feb; 26(1):57-64. doi: 10.1016/j.urolonc.2007.03.015.
- Halilagić A, Selimović E, Katanić Stanković J, Srećković N, Virijeвиć K, Živanović M, Šmit B, Soldatović T. Novel heterometallic Zn(II)-L-Cu(II) complexes: studies of the nucleophilic substitution reactions, antimicrobial, redox and cytotoxic activity. *J Coord Chem.* 2022 Feb; 75(3-4):472-492. doi: 10.1080/00958972.2022.2048376.
- Halilagić A, Soldatović T, Selimović E, Miliwojević N, Virijeвиć K, Živanović M, Šmit B. Viability and oxidative response of human colorectal HCT-116 cancer and human lung healthy pleura MRC-5 cell lines treated with novel bridged heteronuclear Zn(II)-L-Cu(II). 6th International Electronic Conference on Medical Chemistry, 1-30. novembar 2020.
- Han B, Jiang P, Li Z, Yu Y, Huang T, Ye X, Li X. Coptisine-induced apoptosis in human colon cancer cells (HCT-116) is mediated by PI3K/Akt and mitochondrial-associated

- apoptotic pathway. *Phytomedicine*. 2018 Sep; 48:152-160. doi: 10.1016/j.phymed.2017.12.027.
- Hande KR. Topoisomerase II inhibitors. *Updat Cancer Ther*. 2006 Mar; 1(1):3–15. doi: 10.1016/j.uct.2006.04.001.
 - Holland JH. *Adaptation in natural and artificial systems*. University of Michigan Press, Ann Arbor, 1975.
 - Holstein TW, David CN. Cell cycle length, cell size, and proliferation rate in hydra stem cells. *Dev Biol*. 1990 Dec; 142(2):392-400. doi: 10.1016/0012-1606(90)90360-u.
 - Horning JL, Sahoo SK, Vijayaraghavalu S, Dimitrijevic S, Vasir JK, Jain TK, Panda AK, Labhasetwar V. 3-D tumor model for in vitro evaluation of anticancer drugs. *Mol Pharm*. 2008 Sep-Oct; 5(5): 849-62. doi: 10.1021/mp800047v.
 - Hsieh PH, Phal Y, Prasanth KV, Bhargava R. Cell phase identification in a three-dimensional engineered tumor model by infrared spectroscopic imaging. *Anal Chem*. 2023 Feb; 95(6):3349-3357. doi: 10.1021/acs.analchem.2c04554.
 - Huselstein C, de Isla N, Kolopp-Sarda MN, Kerdjoudj H, Muller S, Stoltz JF. Influence of mechanical stress on cell viability. *Biorheology*. 2006;43(3,4):371-5. PMID: 16912409.
 - Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, Kiyota N, Takao S, Kono S, Nakatsura T, Minami H. Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncol Rep*. 2015 Apr; 33(4):1837-43. doi: 10.3892/or.2015.3767.
 - Janković S. *Farmakologija i toksikologija*. 3 edn. Medicinski fakultet u Kragujevcu. 2011. ISBN: 978-86-7760-066-2. p. 582-602.
 - Jensen C, Teng Y. Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture? *Front Mol Biosci*. 2020 Mar; 7: 33. doi: 10.3389/fmolb.2020.00033.
 - Jeremic J, Govoruskina N, Bradic J, Milosavljevic I, Srejovic I, Zivkovic V, Jeremic N, Nikolic Turnic T, Tanaskovic I, Bolevich S, Jakovljevic V, Bolevich S, Zivanovic MN, Okwose N, Seklic D, Milivojevic N, Grujic J, Velicki L, MacGowan G, Jakovljevic DG, Filipovic N. Sacubitril/Valsartan reverses cardiac structure and function in experimental model of hypertension-induced hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem*. 2023 Dec; 478(12): 2645-2656. doi: 10.1007/s11010-023-04690-7.
 - Jiang L, Yang H, Cheng W, Ni Z, Xiang N. Droplet microfluidics for CTC-based liquid biopsy: a review. *Analyst*. 2023 Jan; 148(2):203-221. doi: 10.1039/d2an01747d.
 - Johansson K, Cebula M, Rengby O, Dreij K, Carlström KE, Sigmundsson K, Piehl F, Arnér ES. Cross talk in HEK293 cells between Nrf2, HIF, and NF-κB activities upon challenges with redox therapeutics characterized with single-cell resolution. *Antioxid Redox Signal*. 2017 Feb; 26(6):229-246. doi: 10.1089/ars.2015.6419.
 - Jovanovic-Stevic Snezana, Radisavljevic Snezana R, Scheurer Andreas, Cocic Dusan C, Smit Biljana M, Petkovic Marijana Z, Zivanovic Marko N, Virjevic Katarina V, Petrovic Biljana V. Bis(triazinyl)pyridine complexes of Pt(II) and Pd(II): studies of the nucleophilic substitution reactions, DNA/HSA interactions, molecular docking and biological activity. *J Biol Inorg Chem*. 2021 Aug; 26(5):625-637. doi: 10.1007/s00775-021-01879-3.
 - Jurisic V, Obradovic J, Nikolic N, Javorac J, Perin B, Milasin J. Analyses of P16INK4a gene promoter methylation relative to molecular, demographic and clinical parameters characteristics in non-small cell lung cancer patients: A pilot study. *Mol Biol Rep*. 2023 Feb; 50(2):971-979. doi: 10.1007/s11033-022-07982-1.
 - Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol*. 2002 Jul; 21(1):165-70. doi: 10.3892/ijo.21.1.165.

- Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Łuczewski Ł, Lamperska K. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci.* 2018 Jun; 14(4):910-919. doi: 10.5114/aoms.2016.63743.
- Kapoor D, Singh S, Kumar V, Romero R, Prasad R, Singh J. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant Gene.* 2019 Sep; 19: 100182. doi: 10.1016/j.plgene.2019.100182.
- Kasendra M, Tovaglieri A, Sontheimer-Phelps A, Jalili-Firoozinezhad S, Bein A, Chalkiadaki A, Scholl W, Zhang C, Rickner H, Richmond CA, Li H, Breault DT, Ingber DE. Development of a primary human Small Intestine-on-a-Chip using biopsy-derived organoids. *Sci Rep.* 2018 Feb; 8(1):2871. doi: 10.1038/s41598-018-21201-7.
- Keeratichamroen S, Sornprachum T, Ngiwsara L, Ornnork N, Svasti J. p-STAT3 influences doxorubicin and etoposide resistance of A549 cells grown in an in vitro 3D culture model. *Oncol Rep.* 2023 Apr; 49(4):71. doi: 10.3892/or.2023.8508.
- Kennedy L, Sandhu JK, Harper ME, Cuperlovic-Culf M. Role of glutathione in cancer: from mechanisms to therapies. *Biomolecules.* 2020 Oct; 10(10):1429. doi: 10.3390/biom10101429.
- Kesharwani P, Choudhury H, Meher JG, Pandey M, Gorain B. Dendrimer-entrapped gold nanoparticles as promising nanocarriers for anticancer therapeutics and imaging. *Prog Mater Sci.* 2019 Jun; 103: 484-508. doi: 10.1016/j.pmatsci.2019.03.003.
- Khetani SR, Bhatia SN. Engineering tissues for in vitro applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2006 Oct; 17(5):524-31. doi: 10.1016/j.copbio.2006.08.009.
- Kim JB, Stein R, O'Hare MJ. Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer-- a review. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Jun; 85(3):281-91. doi: 10.1023/B:BREA.0000025418.88785.2b.
- Kim JH, Reeder E, Parkin S, Awuah SG. Gold(I/III)-Phosphine complexes as potent antiproliferative agents. *Sci Rep.* 2019 Aug; 9(1):12335. doi: 10.1038/s41598-019-48584-5.
- Kim MJ, Ku JM, Choi YJ, Lee SY, Hong SH, Kim HI, Shin YC, Ko SG. Reduced HIF-1 α stability induced by 6-gingerol inhibits lung cancer growth through the induction of cell death. *Molecules.* 2022 Mar; 27(7):2106. doi: 10.3390/molecules27072106.
- Kimura H, Sakai Y, Fujii T. Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2018 Feb; 33(1):43-48. doi: 10.1016/j.dmpk.2017.11.003.
- Kipp AP, Deubel S, Arnér ESJ, Johansson K. Time- and cell-resolved dynamics of redox-sensitive Nrf2, HIF and NF- κ B activities in 3D spheroids enriched for cancer stem cells. *Redox Biol.* 2017 Aug; 12:403-409. doi: 10.1016/j.redox.2017.03.013.
- Kivrak E, Yurt K, Kaplan A, Alkan I, Altun G. Effects of electromagnetic fields exposure on the antioxidant defense system. *J Microsc Ultrastruct.* 2017 Oct-Dec; 5(4):167-176. doi: 10.1016/j.jmau.2017.07.003.
- Kloskowski T, Szeliski K, Fekner Z, Rasmus M, Dąbrowski P, Wolska A, Siedlecka N, Adamowicz J, Drewa T, Pokrywczyńska M. Ciprofloxacin and Levofloxacin as potential drugs in genitourinary cancer treatment-the effect of dose-response on 2D and 3D cell cultures. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov; 22(21):11970. doi: 10.3390/ijms222111970.
- Ko J, Park D, Lee S, Gumuscu B, Jeon NL. Engineering organ-on-a-chip to accelerate translational research. *Micromachines (Basel).* 2022 Jul; 13(8): 1200. doi: 10.3390/mi13081200.
- Koruga Đ. Nanotehnologije u medicini i kozmetici. *Arhiv za farmaciju.* 2006; 56(2):164-177.

- Kunac N, Filipović N, Kostić S, Vukojević K. The expression pattern of Bcl-2 and Bax in the tumor and stromal cells in colorectal carcinoma. *Medicina (Kaunas)*. 2022 Aug; 58(8):1135. doi: 10.3390/medicina58081135.
- Kwon N, Kim D, Swamy KMK, Yoon J. Metal-coordinated fluorescent and luminescent probes for reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Coord Chem Rev*. 2021 Jan; 427:213581. doi: 10.1016/j.ccr.2020.213581.
- Lan Y, Yang Y, Das A, Bhattacharya B, Roy S. Raptinal ameliorates 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer through p53/Bcl2/Bax/caspase-3-mediated apoptotic events *in vitro* and *in vivo*. *Indian J Pharmacol*. 2023 Mar-Apr; 55(2):97-107. doi: 10.4103/ijp.ijp_168_22.
- Langdon SP. Basic principles of cancer cell culture. *Methods Mol Med*. 2004; 88: 3-15. doi: 10.1385/1-59259-406-9:3.
- Li B, Ma X, Cheng J, Tian T, Guo J, Wang Y, Pang L. Droplets microfluidics platform-A tool for single cell research. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023 Apr; 11:1121870. doi: 10.3389/fbioe.2023.1121870.
- Li S, Liu S, Wang L, Lin M, Ge R, Li X, Zhang X, Liu Y, Zhang L, Sun H, Zhang H, Yang B. Tumor theranostics of transition metal ions loaded polyaminopyrrole nanoparticles. *Nanotheranostics*. 2018 May; 2(3):211-221. doi: 10.7150/ntno.25119.
- Li SZ, Ren JW, Fei J, Zhang XD, Du RL. Cordycepin induces Bax-dependent apoptosis in colorectal cancer cells. *Mol Med Rep*. 2019 Feb; 19(2):901-908. doi: 10.3892/mmr.2018.9717.
- Li X, Kono K. Functional dendrimer-gold nanoparticle hybrids for biomedical applications. *Polym Int*. 2018 Jul; 67(7): 840-852. doi: 10.1002/pi.5583.
- Lim S, Kim SW, Kim IK, Song BW, Lee S. Organ-on-a-chip: Its use in cardiovascular research. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2023; 83(4): 315-339. doi: 10.3233/CH-221428.
- Liu D, Sun M, Zhang J, Hu R, Fu W, Xuanyuan T, Liu W. Single-cell droplet microfluidics for biomedical applications. *Analyst*. 2022 May; 147(11):2294-2316. doi: 10.1039/d1an02321g.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec; 25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scot, MP, Darnell J. *Molecular cell biology*. 5 edn. W.H. Freeman and Company. 2004. p. 236-240.
- Luo J, Yang ST. Effects of three-dimensional culturing in a fibrous matrix on cell cycle, apoptosis, and MAb production by hybridoma cells. *Biotechnol Prog*. 2004 Jan-Feb; 20(1):306-15. doi: 10.1021/bp034181v.
- Macdonald NP, Cabot JM, Smejkal P, Guijt RM, Paull B, Breadmore MC. Comparing microfluidic performance of three-dimensional (3D) printing platforms. *Anal Chem*. 2017 Apr; 89(7):3858-3866. doi: 10.1021/acs.analchem.7b00136.
- Mahler GJ, Esch MB, Stokol T, Hickman JJ, Shuler ML. Body-on-a-chip systems for animal-free toxicity testing. *Altern Lab Anim*. 2016 Oct; 44(5):469-478. doi: 10.1177/026119291604400508.
- Mandrycky CJ, Howard CC, Rayner SG, Shin YJ, Zheng Y. Organ-on-a-chip systems for vascular biology. *J Mol Cell Cardiol*. 2021 Oct; 159:1-13. doi: 10.1016/j.yjmcc.2021.06.002.
- Maral J, Puget K, Michelson AM. Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977 Aug; 77(4): 1525-35. doi: 10.1016/s0006-291x(77)80151-4.
- Marjanović JS, Petrović N, Kosanić M, Košarić J, Mirić A, Milivojević N, Kostić MD, Divac VM. Tryptamine-derived Schiff bases: Potent antimicrobial agents and evaluation of

- cytotoxicity, ADME and DNA binding properties. *Chem Biodivers.* 2025 Mar; 22(3): e202401699. doi: 10.1002/cbdv.202401699.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 1974 Sep; 47(3): 469-74. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x.
 - Marverti G, Gozzi G, Lauriola A, Ponterini G, Belluti S, Imbriano C, Costi MP, D'Arca D. The 1,10-phenanthroline ligand enhances the antiproliferative activity of DNA-intercalating thiourea-Pd(II) and -Pt(II) complexes against Cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian cancer cell lines. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec; 20(24):6122. doi: 10.3390/ijms20246122.
 - Maschmeyer I, Lorenz AK, Schimek K, Hasenberg T, Ramme AP, Hübner J, Lindner M, Drewell C, Bauer S, Thomas A, Sambo NS, Sonntag F, Lauster R, Marx U. A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents. *Lab Chip.* 2015 Jun; 15(12):2688-99. doi: 10.1039/c5lc00392j.
 - Massai L, Zoppi C, Cirri D, Pratesi A, Messori L. Reactions of medicinal Gold(III) compounds with proteins and peptides explored by electrospray Ionization Mass spectrometry and complementary biophysical methods. *Front Chem.* 2020 Oct; 8:581648. doi: 10.3389/fchem.2020.581648.
 - Medjedović M, A.R. Simović, D. Ćočić, M. Milutinović, L. Senft, S. Blagojević, N. Milivojević, B. Petrović. Dinuclear ruthenium(II) polypyridyl complexes: mechanistic study with biomolecules, DNA/BSA interactions and cytotoxic activity. *Polyhedron.* 2020 Mar. 178:114334. doi: 10.1016/j.poly.2019.114334.
 - Meijer TG, Naipal KA, Jager A, van Gent DC. Ex vivo tumor culture systems for functional drug testing and therapy response prediction. *Future Sci OA.* 2017 Mar; 3(2): FSO190. doi: 10.4155/fsoa-2017-0003.
 - Menegakis A, Klompmaker R, Vennin C, Arbusà A, Damen M, van den Broek B, Zips D, van Rheenen J, Krenning L, Medema RH. Resistance of hypoxic cells to ionizing radiation is mediated in part via hypoxia-induced quiescence. *Cells.* 2021 Mar; 10(3):610. doi: 10.3390/cells10030610.
 - Mignani S, Shi X, Ceña V, Rodrigues J, Tomas H, Majoral JP. Engineered non-invasive functionalized dendrimer/dendron-entrapped/complexed gold nanoparticles as a novel class of theranostic (radio)pharmaceuticals in cancer therapy. *J Control Release.* 2021 Apr; 332:346-366. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.03.003.
 - Milacic V, Chen D, Ronconi L, Landis-Piwowar KR, Fregona D, Ping Dou Q. A novel anticancer gold(III) dithiocarbamate compound inhibits the activity of a purified 20S proteasome and 26S proteasome in human breast cancer cell cultures and xenografts. *Canc Res.* 2006 Nov; 66(21):10478-86. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3017.
 - Milivojević Dimitrijević N, Ljujić B, Gazdić Janković M, Mirić A, Živanović M, Filipović N. Processing of big data after transcriptome sequencing at single cell resolution. 3rd Serbian International Conference on Applied Artificial Intelligence (SICAAI). Kragujevac, Serbia, May 23-24, 2024. pp 80. ISBN: 978-86-81037-79-9.
 - Milivojević Dimitrijević N, Mirić A, Nikolić D, Živanović M, Filipović N. 2026b. Fabrication of PDMS microfluidic chip device. *protocols.io.* doi: 10.17504/protocols.io.j8nlkzjwdl5r/v1.
 - Milivojević Dimitrijević N, Nikolić D, Jovanović Pešić Ž, Živanović M, Filipović N. 2026a. Fabrication of an acrylic microfluidic chip system. *protocols.ioh.* doi: 10.17504/protocols.io.n2bvjkw85gk5/v1.
 - Milivojević N, Caballero D, Carvalho MR, Kokanović M, Živanović M, Filipović N, Reis RL, Oliveira JM. A Microfluidic Platform as an in vitro for Biomedical Experimentation – a Cell Migration Study. The 21th IEEE International Conference on BioInformatics and

- BioEngineering (BIBE). 25-27 October 2021d. Kragujevac, Serbia. pp 1-6. ISBN: 978-1-6654-4261-9. ISSN: 2471-7819. doi: 10.1109/BIBE52308.2021.9635498.
- Milivojević N, Caballero D, Carvalho MR, Živanović M, Filipović N, Reis RL, Oliveira JM. Engineering a microfluidic platform as a pre-clinical model for biomedical applications. 1st International Conference on Chemo and Bioinformatics. 26-27 October 2021c. Kragujevac, Serbia. pp 259-262. ISBN: 978-86-82172-01-7. doi: 10.46793/ICCBi21.259M.
 - Milivojević N, Carvalho MR, Caballero D, Radisavljević S, Radoičić M, Živanović M, Kundu SC, Reis RL, Filipović N, Oliveira JM. Evaluation of novel dendrimer-gold complex nanoparticles for theranostic application in oncology. *Nanomedicine (Lond)*. 2024 Jan. doi: 10.2217/nmm-2023-0355.
 - Milivojević N, Nikolić D, Šeklić D, Jovanović Ž, Živanović M, Filipović N. Development of microfluidic lab-on-chip system for cultivation of cells and tissues. 4th International Conference on Medical and Biological Engineering in Bosnia and Herzegovina (CMBEBIH). 21–24 April 2021b. Mostar, Bosnia and Herzegovina. Springer, Cham. pp 718-725. ISBN: 978-3-030-73908-9. doi: 10.1007/978-3-030-73909-6_81.
 - Milivojević N, Nikolić D, Živanović M, Filipović N. Novel approach in designing microfluidic devices based on finite element and topological optimization methods. IX International Conference on Computational Bioengineering ICCB2022. 11-13 April 2022. Lisbon, Portugal. ISBN: 978-989-99424-9-3.
 - Milivojević N, Prosenc Zmrzljak U, Ljujić B, Đorđević V, Gazdić Janković M, Živanović M, Puač F, Ivanović M, Filipović N. Single cell 3' transcriptome profiling. 4th Belgrade Bioinformatics Conference, BelBi2023. 19-23 June 2023. Belgrade, Serbia. pp 45. ISBN: 978-86-82679-14-1.
 - Milivojević N, Živanović M, Nikolić D, Jovanović Ž, Šeklić D, Nikolić M, Filipović N. Microfluidic lab-on-chip system development for cell culture cultivation. 8th International Congress of Serbian Society of Mechanics. 28-30 June 2021a. Kragujevac, Serbia. pp 390-399. ISBN: 978-86-909973-8-1. doi: 10.5281/zenodo.6323631.
 - Milutinović MG, Milivojević NN, Đorđević NM, Nikodijević DD, Radisavljević SR, Đeković Kesić AS, Marković SD. Gold(III) complexes with phenanthroline-derivatives ligands induce apoptosis in human colorectal and breast cancer cell lines. *J Pharm Sci*. 2022 Dec; 111(12):3215-3223. doi: 10.1016/j.xphs.2022.09.021.
 - Milutinović M, Stanković M, Cvetković D, Maksimović V, Šmit B, Pavlović R, Marković S. The molecular mechanisms of apoptosis induced by *Allium flavum* L. and synergistic effects with new-synthesized Pd(II) complex on colon cancer cells. *J Food Biochem*. 2015 Feb; 39(3): 238–250. doi: 10.1111/jfbc.12123.
 - Mitchell S, Vargas J, Hoffmann A. Signaling via the NFκB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2016 May; 8(3):227-41. doi: 10.1002/wsbm.1331.
 - Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec; 65(1-2):55-63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
 - Nahak BK, Mishra A, Preetam S, Tiwari A. Advances in organ-on-a-chip materials and devices. *ACS Appl Bio Mater*. 2022 Aug; 5(8): 3576-3607. doi: 10.1021/acsabm.2c00041.
 - Nakamura K, Kuga H, Morisaki T, Baba E, Sato N, Mizumoto K, Sueishi K, Tanaka M, Katano M. Simulated microgravity culture system for a 3-D carcinoma tissue model. *Biotechniques*. 2002 Nov; 33(5):1068-70, 1072, 1074-6. doi: 10.2144/02335rr02.
 - Nelder JA, Mead R. A simplex method for function minimization. *Comput. J*. 1965; 7:308–313. doi: 10.1093/COMJNL/7.4.308.
 - Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2020 Jan; 158(2):291-302. doi: 10.1053/j.gastro.2019.08.059.

- Nguyen M, De Ninno A, Mencattini A, Mermet-Meillon F, Fornabaio G, Evans SS, Cossutta M, Khira Y, Han W, Sirven P, Pelon F, Di Giuseppe D, Bertani FR, Gerardino A, Yamada A, Descroix S, Soumelis V, Mechta-Grigoriou F, Zalcmann G, Camonis J, Martinelli E, Businaro L, Parrini MC. Dissecting effects of anti-cancer drugs and cancer-associated fibroblasts by on-chip reconstitution of immunocompetent tumor microenvironments. *Cell Rep.* 2018 Dec; 25(13):3884-3893.e3. doi: 10.1016/j.celrep.2018.12.015.
- Nikodijević DD, Jovankić JV, Cvetković DM, Anđelković MZ, Nikezić AG, Milutinović MG. L-amino acid oxidase from snake venom: Biotransformation and induction of apoptosis in human colon cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 2021 Nov; 910:174466. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174466.
- Nikolic S, Gazdic-Jankovic M, Rosic G, Miletic-Kovacevic M, Jovicic N, Nestorovic N, Stojkovic P, Filipovic N, Milosevic-Djordjevic O, Selakovic D, Zivanovic M, Seklic D, Milivojević N, Markovic A, Seist R, Vasilijic S, Stankovic KM, Stojkovic M, Lujic B. Orally administered fluorescent nanosized polystyrene particles affect cell viability, hormonal and inflammatory profile, and behavior in treated mice. *Environ Pollut.* 2022 Jul; 305: 119206. doi: 10.1016/j.envpol.2022.119206.
- Nithin R, Aggarwal A, Sravani AB, Mallya P, Lewis S. Organ-on-a-chip: An emerging research platform. *Organogenesis.* 2023 Dec; 19(1):2278236. doi: 10.1080/15476278.2023.2278236.
- Nolan J, Pearce OMT, Screen HRC, Knight MM, Verbruggen SW. Organ-on-a-chip and microfluidic platforms for oncology in the UK. *Cancers (Basel).* 2023 Jan; 15(3):635. doi: 10.3390/cancers15030635.
- Novakovic TR, Dolicanin ZC, Djordjevic NZ. Effects of maternal subclinical hypothyroidism on amniotic fluid cells oxidative status. *Reprod Toxicol.* 2018 Jun; 78:97-101. doi: 10.1016/j.reprotox.2018.04.002.
- Novakovic TR, Dolicanin ZC, Djordjevic NZ. Oxidative stress biomarkers in amniotic fluid of pregnant women with hypothyroidism. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2019 Apr; 32(7):1105-1110. doi: 10.1080/14767058.2017.1400005.
- Ognjanović BI, Djordjević NZ, Matić MM, Obradović JM, Mladenović JM, Štajn AŠ, Saičić ZS. Lipid peroxidative damage on Cisplatin exposure and alterations in antioxidant defense system in rat kidneys: a possible protective effect of selenium. *Int J Mol Sci.* 2012;13(2):1790-1803. doi: 10.3390/ijms13021790.
- Ognjanović BI, Marković SD, Ethordević NZ, Trbojević IS, Stajn AS, Sačić ZS. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: protective role of coenzyme Q(10) and vitamin E. *Reprod Toxicol.* 2010 Apr; 29(2):191-7. doi: 10.1016/j.reprotox.2009.11.009.
- Oliveira JM, Kotobuki N, Marques AP, Pirraco RP, Benesch J, Hirose M, Costa SA, Mano JF, Ohgushi H, Reis RL. Surface engineered carboxymethylchitosan/poly(amidoamine) dendrimer nanoparticles for intracellular targeting. *Adv Funct Mater.* 2008 Jun; 18(12):1840-1853. doi: 10.1002/adfm.200800165.
- Oliveira JM, Salgado AJ, Sousa N, Mano JF, Reis RL. Dendrimers and derivatives as a potential therapeutic tool in regenerative medicine strategies – a review. *Prog. Polym. Sci.* 2010 Sep; 35(9):1163–1194. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.006.
- Ou Y, Cao S, Zhang J, Dong W, Yang Z, Yu Z. Droplet microfluidics on analysis of pathogenic microbes for wastewater-based epidemiology. *Trends Analyt Chem.* 2021 Oct; 143:116333. doi: 10.1016/j.trac.2021.116333.
- Palmerston Mendes L, Pan J, Torchilin V. Dendrimers as nanocarriers for nucleic acid and drug delivery in cancer therapy. *Molecules.* 2017 Aug; 22(9):1401. doi: 10.3390/molecules22091401.

- Papic M, Zivanovic S, Vucicevic T, Papic MV, Zdravkovic D, Milivojevic N, Virijevic K, Zivanovic M, Mircic A, Ljubic B, Lukic ML, Popovic M. Pulpal expression of erythropoietin and erythropoietin receptor after direct pulp capping in rat. *Eur J Oral Sci.* 2022 Oct; 130(5): e12888. doi: 10.1111/eos.12888.
- Petithory T, Pieuchot L, Josien L, Ponche A, Anselme K, Vonna L. Size-dependent internalization efficiency of macrophages from adsorbed nanoparticle-based monolayers. *Nanomaterials.* 2021 Jul; 11(8):1963. doi: 10.3390/nano11081963.
- Petrovic A, Milutinović M, Petri E, Zivanovic M, Milivojevic N, Puchta R, Scheurer A, Korzekwa J, Klisuric O, Bogojeski J. Synthesis of camphor-derived bis-pyrazolylpyridine rhodium(III) complexes: structure, Reactivity relationships and biological activity. *Inorg Chem.* 2019 Jan; 58(1):307-319. doi: 10.1021/acs.inorgchem.8b02390.
- Petrović A, Živanović M, Puchta R, Čočić D, Scheurer A, Milivojevic N, Bogojeski J. Experimental and quantum chemical study on the DNA/protein binding and the biological activity of a rhodium(iii) complex with 1,2,4-triazole as an inert ligand. *Dalton Trans.* 2020 Jul; 49(26):9070-9085. doi: 10.1039/d0dt01343a.
- Petrović A, Cocic D, Bockfeld D, Živanović M, Milivojević N, Virijevic K, Jankovic N, Scheurer A, Vraneš M, Bogojeski J. Biological activity of bis(pyrazolylpyridine) and terpyridine Os(II) complexes in presence of biocompatible ionic liquids. *Inorg Chem Front.* 2021 Apr; 8(11): 2749–2770. doi: 10.1039/D0QI01540G.
- Petrović V, M Živanović, D Simijonović, J Đorović, Z Petrović, S Marković. Chelate N,O-palladium(ii) complexes: synthesis, characterization and biological activity. *RSC Adv.* 2015 Oct; 5(105):86274-86281. doi: 10.1039/C5RA10204A.
- Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb; 19(2):448. doi: 10.3390/ijms19020448.
- Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods.* 1980; 38(1-2): 161-70. doi: 10.1016/0022-1759(80)90340-3.
- Pokropivny VV, Skorokhod VV. Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science. *Mat Sci Eng C.* 2007 Sep; 27(5-8): 990-993. doi: 10.1016/j.msec.2006.09.023.
- Postek W, Garstecki P. Droplet microfluidics for high-throughput analysis of antibiotic susceptibility in bacterial cells and populations. *Acc Chem Res.* 2022 Mar; 55(5):605-615. doi: 10.1021/acs.accounts.1c00729.
- Pribyl LJ, Coughlin KA, Sueblinvong T, Shields K, Iizuka Y, Downs LS, Ghebre RG, Bazzaro M. Method for obtaining primary ovarian cancer cells from solid specimens. *J Vis Exp.* 2014 Feb; (84): e51581. doi: 10.3791/51581.
- Prokić M, Paunović M, Matić M, Đorđević N, Ognjanović B, Štajn AŠ, Saičić Z. Effect of aspartame on biochemical and oxidative stress parameters in rat blood. *Arch Biol Sci.* 2015 Nov; 67(2):535-545. doi: 10.2298/ABS141009016P.
- Racham O, Nichols SJ, Leedman PJ, Barners-Price SJ, Filipovska A. A gold(I) phosphine complex selectively induces apoptosis in breast cancer cells: implications for anticancer therapeutics targeted to mitochondria. *Biochem Pharmacol.* 2007 Oct; 74(7):992-1002. doi: 10.1016/j.bcp.2007.07.022.
- Radisavljevic S, Dekovic Kesic A, Cocic D, Puchta R, Senft L, Milutinovic M, Milivojevic N, Petrovic B. Studies of the stability, nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interactions, cytotoxic activity, DFT and molecular docking of some tetra- and penta-coordinated gold(III) complexes. *New J Chem.* 2020 Jun; 44(26):11172-11187. doi: 10.1039/d0nj02037k.
- Radisavljević S, Čočić D, Jovanović S, Šmit B, Petković M, Milivojević N, Planojević N, Marković S, Petrović B. Synthesis, characterization, DFT study, DNA/BSA-binding

- affinity, and cytotoxicity of some dinuclear and trinuclear gold(III) complexes. *J Biol Inorg Chem*. 2019 Oct; 24(7):1057-1076. doi:10.1007/s00775-019-01716-8.
- Rahman I, Kode A, Biswas S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*. 2007; 1(6):3159–3165. doi: 10.1038/nprot.2006.378.
 - Rajab BS, Albukhari TA, Khan AA, Refaat B, Almehmadi SJ, Nasreldin N, Elshopakey GE, El-Boshy M. Antioxidative and anti-inflammatory protective effects of β -caryophyllene against Amikacin-induced nephrotoxicity in rat by regulating the Nrf2/AMPK/AKT and NF- κ B/TGF- β /KIM-1 molecular pathways. *Oxid Med Cell Longev*. 2022 Aug; 2022:4212331. doi: 10.1155/2022/4212331.
 - Raković I, Bogojeski J, Mladenović K, Petrović A, Divac V, Mihailović K, Popovska Jovicić B, Kostić M, Canović P, Milivojević N, Zivanović M, Radojević I. Synthesis, characterization and biological studies of a organoselenium trans-Palladium(II) complexes. *Med Chem*. 2021; 17(9):1007-1022. doi: 10.2174/1573406416666200930112442.
 - Ramović Hamzagić A, Cvetković D, Gazdić-Janković M, Milivojević N, Nikolić D, Zivanović M, Kastratović N, Petrović I, Nikolić S, Jovanović M, Šeklić D, Filipović N, Ljujić B. Modeling 5-FU-induced chemotherapy selection of drug-resistant cancer stem cell subpopulation. *Curr Oncol*. 2024 Feb; 31(3):1221-1234. doi: 10.3390/curroncol31030091.
 - Rickard AG, Zhuang M, DeRosa CA, Zhang X, Dewhirst MW, Fraser CL, Palmer GM. Dual-emissive, oxygen-sensing boron nanoparticles quantify oxygen consumption rate in breast cancer cells. *J Biomed Opt*. 2020 Nov; 25(11):116504. doi: 10.1117/1.JBO.25.11.116504.
 - Ronconi L, Giovagnini L, Marzano C, Bettio F, Graziani R, Pilloni G, Fregona D. Gold dithiocarbamate derivatives as potential antineoplastic agents: design, spectroscopic properties, and in vitro antitumor activity. *Inorg Chem*. 2005 Mar; 44(6):1867-81. doi: 10.1021/ic048260v.
 - Saggioro D, Rigobello MP, Paloschi L, Folda A, Moggach SA, Parsons S, Ronconi L, Fregona D, Bindoli A. Gold(III)-dithiocarbamate complexes induce cancer cell death triggered by thioredoxin redox system inhibition and activation of ERK pathway. *Chem Biol*. 2007 Oct; 14(10):1128-39. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.08.016.
 - Salgado AJ, Oliveira JM, Pirraco RP, Pereira VH, Fraga JS, Marques AP, Neves NM, Mano JF, Reis RL, Sousa N. Carboxymethylchitosan/poly(amidoamine) dendrimer nanoparticles in central nervous systems-regenerative medicine: effects on neuron/glia cell viability and internalization efficiency. *Macromol Biosci*. 2010 Oct; 10(10):1130-40. doi: 10.1002/mabi.201000005.
 - Saw WS, Anasamy T, Do TTA, Lee HB, Chee CF, Isci U, Misran M, Dumoulin F, Chong WY, Kiew LV, Imae T, Chung LY. Nanoscaled PAMAM dendrimer spacer improved the photothermal-photodynamic treatment efficiency of photosensitizer-decorated confetto-like gold nanoparticles for cancer therapy. *Macromol Biosci*. 2022 Aug; 22(8): e2200130. doi: 10.1002/mabi.202200130.
 - Scalcon V, Bindoli A, Rigobello MP. Significance of the mitochondrial thioredoxin reductase in cancer cells: an update on role, targets and inhibitors. *Free Radic Biol Med*. 2018 Nov; 127:62-79. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.043.
 - Schmidlin CJ, Dodson MB, Madhavan L, Zhang DD. Redox regulation by NRF2 in aging and disease. *Free Radic Biol Med*. 2019 Apr; 134:702-707. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.016.
 - Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003 Oct; 3(10): 721-32. doi: 10.1038/nrc1187.

- Seo J, Yun J, Fukuda J, Chun YS. Tumor-intrinsic FABP5 is a novel driver for colon cancer cell growth via the HIF-1 signaling pathway. *Cancer Genet.* 2021 Nov; 258-259:151-156. doi: 10.1016/j.cancergen.2021.11.001.
- Shinha K, Nihei W, Ono T, Nakazato R, Kimura H. A pharmacokinetic-pharmacodynamic model based on multi-organ-on-a-chip for drug-drug interaction studies. *Biomicrofluidics.* 2020 Jul; 14(4):044108. doi: 10.1063/5.0011545.
- Siegel RL, Kratzer TB, Wagle NS, Sung H, Jemal A. Cancer statistics, 2026. *CA Cancer J Clin.* 2026 Jan-Feb; 76(1): e70043. doi: 10.3322/caac.70043.
- Singh Gursharan. Preclinical drug development. Book Chapter - Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research. 2018. Pages 47-63. Doi: 10.1016/B978-0-12-802103-3.00004-3.
- Sittampalam S, Eglen R, Ferguson S, Maynes JT, Olden K, Schrader L, Shelper T, Ferrer M. Three-dimensional cell culture assays: Are they more predictive of in vivo efficacy than 2D monolayer cell-based assays? *Assay Drug Dev Technol.* 2015 Jun; 13(5):254-61. doi: 10.1089/adt.2015.29001.rtd.
- Smalley KS, Lioni M, Herlyn M. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2006 Sep-Oct; 42(8-9):242-7. doi: 10.1290/0604027.1.
- Socrates G. (George) Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts / George Socrates. 3rd ed. England: John Wiley & Sons Ltd; 2001.
- Soldatović T, Selimović E, Milivojević N, Jovanović M, Šmit B, Virijević K. Novel bridged heteronuclear Pt(II)-L-Zn(II) complexes with promising antitumor activity. 6th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry. 1-30 November 2020a. MDPI: Basel, Switzerland. doi: 10.3390/ECMC2020-07358.
- Soldatović T, Selimović E, Milivojević N, Jovanović M, Šmit B. Novel heteronuclear Pt(II)-L-Zn(II) complexes: synthesis, interactions with biomolecules, cytotoxic properties. Two metals give promising antitumor activity? *Appl Organomet Chem.* 2020b Jun; 34(10):e5864. doi: 10.1002/aoc.5864.
- Soldatović TV, Selimović E, Šmit B, Ašanin D, Planojević NS, Marković SD, Puchta R, Alzoubi BM. Interactions of zinc(II) complexes with 5'-GMP and their cytotoxic activity. *J Coord Chem.* 2019 Feb; 72(4):690-706. doi:10.1080/00958972.2019.1569229.
- Song W, Duan W, Liu Y, Ye Z, Chen Y, Chen H, Qi S, Wu J, Liu D, Xiao L, Ren C, Chen X. Ratiometric detection of intracellular lysine and pH with one-pot synthesized dual emissive carbon dots. *Anal Chem.* 2017 Dec; 89(24):13626-13633. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04211.
- Stern ST, McNeil SE. Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicol Sci.* 2008 Jan; 101(1):4-21. doi: 10.1093/toxsci/kfm169.
- Stoian M, State N, Stoica V, Radulian G. Apoptosis in colorectal cancer. *J Med Life.* 2014 Jun; 7(2):160-4. PMID: 25408720.
- Stojkovic M, Ortuño Guzmán FM, Han D, Stojkovic P, Dopazo J, Stankovic KM. Polystyrene nanoplastics affect transcriptomic and epigenomic signatures of human fibroblasts and derived induced pluripotent stem cells: Implications for human health. *Environ Pollut.* 2023 Mar; 320: 120849. doi: 10.1016/j.envpol.2022.120849.
- Stone HA, Stroock AD, Ajdari A. Engineering flows in small devices: Microfluidics toward a lab-on-a-chip. *Annu Rev Fluid Mech.* 2004; 36:381-411. doi:10.1146/annurev.fluid.36.050802.122124.
- Sun L, Ji Y, Chi B, Xiao T, Li C, Yan X, Xiong X, Mao L, Cai D, Zou A, Wang Y, Zhang L, Tang L, Wang Q. A 3D culture system improves the yield of MSCs-derived extracellular vesicles and enhances their therapeutic efficacy for heart repair. *Biomed Pharmacother.* 2023 May; 161:114557. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114557.

- Sung JH. Multi-organ-on-a-chip for pharmacokinetics and toxicokinetic study of drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2021 Aug; 17(8):969-986. doi: 10.1080/17425255.2021.1908996.
- Suzuki S, Yamamoto M, Sanomachi T, Togashi K, Sugai A, Seino S, Yoshioka T, Okada M, Kitanaka C. Dexamethasone sensitizes cancer stem cells to Gemcitabine and 5-Fluorouracil by increasing reactive oxygen species production through NRF2 reduction. *Life (Basel)*. 2021 Aug; 11(9):885. doi: 10.3390/life11090885.
- Šeklić DS, Obradović AD, Stanković MS, Živanović MN, Mitrović TL, Stamenković SM, Marković SD. Proapoptotic and antimigratory effects of *Pseudevernia furfuracea* and *Platismatia glauca* on colon cancer cell lines. *Food Technol Biotechnol*. 2018 Sep; 56(3):421-430. doi: 10.17113/ftb.56.03.18.5727.
- Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*. 2018 Dec; 29(17):1727-1745. doi: 10.1089/ars.2017.7342.
- Tong KC, Lok CN, Wan PK, Hu D, Fung YME, Chang XY, Huang S, Jiang H, Che CM. An anticancer gold(III)-activated porphyrin scaffold that covalently modifies protein cysteine thiols. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Jan; 117(3):1321-1329. doi: 10.1073/pnas.1915202117.
- Trbojević I, Ognjanović B, Đorđević N, Marković S, Štajn A.Š., Gavrić J, Saičić Z. Effects of cisplatin on lipid peroxidation and the glutathione redox status in the liver of male rats: The protective role of selenium. *Arch Biol Sci*. 2010; 62(1):75-82. doi: 10.2298/ABS1001075T.
- Trujillo-de Santiago G, Flores-Garza BG, Tavares-Negrete JA, Lara-Mayorga IM, González-Gamboa I, Zhang YS, Rojas-Martínez A, Ortiz-López R, Álvarez MM. The tumor-on-chip: Recent advances in the development of microfluidic systems to recapitulate the physiology of solid tumors. *Materials (Basel)*. 2019 Sep; 12(18):2945. doi: 10.3390/ma12182945.
- Tu S, Wai-Yin Sun R, Lin MC, Tao Cui J, Zou B, Gu Q, Kung HF, Che CM, Wong BC. Gold (III) porphyrin complexes induce apoptosis and cell cycle arrest and inhibit tumor growth in colon cancer. *Cancer*. 2009 Oct; 115(19):4459-69. doi: 10.1002/cncr.24514.
- Ulukaya E, Kurt A, Wood EJ. 4-(N-hydroxyphenyl)retinamide can selectively induce apoptosis in human epidermoid carcinoma cells but not in normal dermal fibroblasts. *Cancer Invest*. 2001;19(2):145-54. doi: 10.1081/cnv-100000149.
- Utell MJ, Frampton MW. Acute health effects of ambient air pollution: The ultrafine particle hypothesis. *J Aerosol Med*. 2000 Winter;13(4):355-59. doi: 10.1089/jam.2000.13.355.
- Vieira S, Vial S, Maia FR, Carvalho M, Reis RL, Granja PL, Oliveira JM. Gellan gum-coated gold nanorods: an intracellular nanosystem for bone tissue engineering. *RSC Adv*. 2015 Sep; 5(95):77996-78005. doi: 10.1039/c5ra13556g.
- Virijević K, Živanović M, Gazdić Janković M, Ramović Hamzagić A, Milivojević N, Pecić K, Šeklić D, Jovanović M, Kastratović N, Mirić A, Đukić T, Petrović I, Jurišić V, Ljujić B, Filipović N. Numerical and biological modeling approach in the analysis of the cancer viability and apoptosis. 4th Belgrade Bioinformatics Conference, BelBi2023. 19-23 June 2023. Belgrade, Serbia. pp 70. ISBN: 978-86-82679-14-1.
- Vladislavljević GT, Khalid N, Neves MA, Kuroiwa T, Nakajima M, Uemura K, Ichikawa S, Kobayashi I. Industrial lab-on-a-chip: design, applications and scale-up for drug discovery and delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 Nov; 65(11-12):1626-63. doi: 10.1016/j.addr.2013.07.017.
- Waheed S, Cabot JM, Macdonald NP, Lewis T, Guijt RM, Paull B, Breadmore MC. 3D printed microfluidic devices: enablers and barriers. *Lab Chip*. 2016 May; 16(11):1993-2013. doi: 10.1039/c6lc00284f.

- Wang H. MicroRNAs and apoptosis in colorectal cancer. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul; 21(15):5353. doi: 10.3390/ijms21155353.
- Wang K, Chen YS, Chien HW, Chiou HL, Yang SF, Hsieh YH. Melatonin inhibits NaIO₃-induced ARPE-19 cell apoptosis via suppression of HIF-1 α /BNIP3-LC3B/mitophagy signaling. *Cell Biosci.* 2022 Aug; 12(1):133. doi: 10.1186/s13578-022-00879-3.
- Wang M, Tan J, Miao Y, Li M, Zhang Q. Role of Ca²⁺ and ion channels in the regulation of apoptosis under hypoxia. *Histol Histopathol.* 2018 Mar; 33(3):237-246. doi: 10.14670/HH-11-918.
- Wang Y, Chiu J. Proteomic approaches in understanding action mechanisms of metal-based anticancer drugs. *Met Based Drugs.* 2008; 2008:716329. doi: 10.1155/2008/716329.
- Wang Y, He QY, Sun RW, Che CM, Chiu JF. Cellular pharmacological properties of gold(III) porphyrin 1a, a potential anticancer drug lead. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jan; 554(2-3):113-22. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.10.034.
- Wang Y, He Q-Y, Sun RW-Y, Che C-M, Chiu J-F. Gold(III) porphyrin 1a induced apoptosis by mitochondrial death pathways related to reactive oxygen species. *Cancer Res.* 2005 Dec; 65(24):11553-64. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2867.
- Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis.* 2019 Feb; 10(3):177. doi: 10.1038/s41419-019-1407-6.
- Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm.* 2005 Jan; 288(2):369-76. doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.09.018.
- Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011 Sep; 30(1):87. doi: 10.1186/1756-9966-30-87.
- Wu M, Guo H, Liu L, Liu Y, Xie L. Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2019 Jun; 14:4247-4259. doi: 10.2147/IJN.S201107.
- Yang H, Zhang L, Liu S. Determination of reference genes for ovine pulmonary adenocarcinoma infected lung tissues using RNA-seq transcriptome profiling. *J Virol Methods.* 2020 Oct; 284:113923. doi: 10.1016/j.jviromet.2020.113923.
- Yang YJ, Luo S, Xu ZL. Effects of miR-490-5p targeting CDK1 on proliferation and apoptosis of colon cancer cells via ERK signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2022 Mar; 26(6):2049-2056. doi: 10.26355/eurev_202203_28353.
- Young RE, Huh DD. Organ-on-a-chip technology for the study of the female reproductive system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021 Jun; 173:461-478. doi: 10.1016/j.addr.2021.03.010.
- Yu C, Dong H, Wang Q, Bai J, Li YN, Zhao JJ, Li JZ. Danshensu attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity through activation of Nrf2 pathway and inhibition of NF- κ B. *Biomed Pharmacother.* 2021 Oct; 142:111995. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111995.
- Yusuf, M. Insights into the in-silico research: Current scenario, advantages, limits, and future perspectives. *Life in Silico.* 2023 Jul; 1(1):13–25.
- Zahir N, Weaver, VM. Death in the third dimension: apoptosis regulation and tissue architecture. *Curr Opin Genet Dev.* 2004 Feb; 14(1):71-80. doi: 10.1016/j.gde.2003.12.005.
- Zarić M, Čanović P, Stanojević Pirković M, Knežević S, Živković Zarić R, Popovska Jovičić B, Hamzagić N, Simović Marković B, Marković N, Rilak Simović A. New gold pincer-type complexes induce caspase-dependent apoptosis in human cancer cells in vitro. *Vojnosanit Pregl.* 2021; 78(8):865-873. doi: 10.2298/VSP190507002Z.
- Zeng X, Zhang Y, Kwong JS, Zhang C, Li S, Sun F, Niu Y, Du L. The methodological quality assessment tools for preclinical and clinical studies, systematic review and meta-analysis, and clinical practice guideline: a systematic review. *J Evid Based Med.* 2015 Feb; 8(1):2-10. doi: 10.1111/jebm.12141.

- Zhang M, Zheng T, Zong M, Kong D, Li X, Xue C, Fu P, Fang J. Sustained static stress-induced chondrocyte apoptosis in the rat cervical vertebral growth plate and its signal transduction mechanisms. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. 2014 Jul; 24(Suppl 1):299-304. doi: 10.1007/s00590-013-1297-8.
- Zhang Z, Li Z, Wu Y. Advection–Diffusion Lattice Boltzmann method with and without dynamical filter. *Front. Phys.* 2022 May; 10:875628. doi: 10.3389/fphy.2022.875628.
- Zhao CX, Middelberg APJ. Two-phase microfluidic flows. *Chem Eng Sci*. 2011 Apr; 66(7):1394–1411. doi:10.1016/j.ces.2010.08.038.
- Zhao X, Zhang S, Gao S, Chang HM, Leung PCK, Tan J. A novel three-dimensional follicle culture system decreases oxidative stress and promotes the prolonged culture of human granulosa cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2023 Mar; 15(12):15084-15095. doi: 10.1021/acsami.2c18734.
- Zheng F, Fu F, Cheng Y, Wang C, Zhao Y, Gu Z. Organ-on-a-chip systems: Microengineering to mimetic living systems. *Small*. 2016 May; 12(17):2253-82. doi: 10.1002/sml.201503208.
- Zhu H, Mellors JS, Chan WC, Thompson JW, Ficarro SB, Tavares I, Bratt AS, Decker J, Krause M, Kruppa G, Buhrlage SJ, Marto JA. On-chip preconcentration microchip capillary electrophoresis based CE-PRM-LIVE for high-throughput selectivity profiling of deubiquitinase inhibitors. *Anal Chem*. 2022 Jul; 94(27):9508-9513. doi: 10.1021/acs.analchem.2c01337.
- Zhu J, Wang G, S. Alves C, Tomás H, Xiong Z, Shen M, Rodrigues J, Shi X. Multifunctional dendrimer-entrapped gold nanoparticles conjugated with Doxorubicin for pH-responsive drug delivery and targeted CT imaging. *Langmuir*. 2018 Oct; 34(41):12428-12435. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b02901.
- Zoppi C, Messori L, Pratesi A. ESI MS studies highlight the selective interaction of auranofin with protein free thiols. *Dalton Trans*. 2020 May; 49(18):5906-5913. doi: 10.1039/d0dt00283f.
- Zou T, Tung Lum C, Lok CN, Zhang JJ, Che CM. Chemical biology of anticancer gold(III) and gold(I) complexes. *Chem Soc Rev*. 2015 Dec; 44(24):8786-801. doi: 10.1039/c5cs00132c.
- Živanović M, Gazdić Janković M, Ramović Hamzagić A, Virijeвић K, Milivojević N, Pecić K, Šeklić D, Jovanović M, Kastratović N, Mirić A, Đukić T, Petrović I, Jurišić V, Ljujić B, Filipović N. Combined biological and numerical modeling approach for better understanding of the cancer viability and apoptosis. *Pharmaceutics*. 2023 May; 15(6):1628. doi: 10.3390/pharmaceutics15061628.
- Živanović MN, Košarić JV, Šmit B, Šeklić DS, Pavlović RZ, Marković SD. Novel selenohydantoin palladium(II) complex - antimigratory, cytotoxic and prooxidative potential on human colon HCT-116 and breast MDA-MB-231 cancer cells. *Gen Physiol Biophys*. 2017 Apr; 36(2):187-196. doi: 10.4149/gpb_2016036.

Link 1: <https://www.atcc.org>

Link 2: <https://www.culturecollections.org.uk/about-us/ecacc/>

Link 3: <http://www.clsgmbh.de/>

Link 4: <https://www.10xgenomics.com>

Link 5: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

Link 6: <https://www.ibm.com/analytics/spss-statistics-software>

Биографија аутора



Невена Миливојевић Димитријевић рођена је 11.02.1992. године у Крагујевцу. Завршила је основну школу „21. октобар“ и средњу школу Прву крагујевачку гимназију, природно-математички смер. Интегрисане академске студије фармације на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу је завршила 2016. године са просечном оценом 9,33. Специјалистичке академске студије „Биолошки лекови“ на Фармацеутском факултету Универзитета у Београду је завршила 2020. године са просечном оценом 9,71. Мастер академске студије „Биоинжењеринг“ на Факултету инжењерских наука Универзитета у Крагујевцу је завршила 2022. године, са просечном оценом 10. Докторске академске студије на Природно-математичком факултету у Крагујевцу уписала је школске 2016/2017. године.

Добитник је награде за једног од најбољих студената коју додељује Факултет медицинских наука у Крагујевцу. Била је добитник више стипендија које је додељивала Општина Крагујевац и Министарство просвете Републике Србије.

Као студент, била је укључена у рад Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију на Природно-математичком факултету у Крагујевцу. Тренутно је запослена као Истраживач сарадник у Лабораторији за биоинжењеринг, Института за информационе технологије, Крагујевац. Ангажована је и као сарадник у настави на предмету Инжењеринг ткива, на смеру мастер Биоинжењеринг на Факултету инжењерских наука у Крагујевцу.

Током 2020. и 2021. године боравила је као истраживач у Португалу на Minho Универзитету - 3B's Research Group, код проф. Joaquim Miguel Oliveira и проф. Rui L. Reis. Учествовала је на више семинара и усавршавања у земљи и иностранству.

Члан је Српског друштва за молекуларну биологију, Српског друштва за истраживање рака, Европске асоцијације за истраживање карцинома, Биохемијског друштва Србије, Друштва генетичара Србије.

ПРИЛОГ 1

Библиографија

Невена Миливојевић Димитријевић је у току досадашњег научно-истраживачког рада публиковала 1 поглавље у књизи категорије M13, 31 рад у научним часописима категорије M20 (3 рада из категорије M21a+, 3 рада из категорије M21a, 12 радова из категорије M21, 10 радова из категорије M22, 2 рада из категорије M23, 1 рад из категорије M24) и 28 радова саопштених на међународним научним скуповима (13 радова штампаних у целини - M33, и 15 радова штампаних у изводу - M34).

Поглавље у књизи – M13

1. Mirić A., **Milivojević N.** (2023). Intelligent Drug Delivery Systems. In: Filipovic, N. (eds) Applied Artificial Intelligence: Medicine, Biology, Chemistry, Financial, Games, Engineering. AAI 2022. Lecture Notes in Networks and Systems, vol 659. Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-031-29717-5_21.

Научни радови публиковани у водећим међународним часописима - M21a+

1. Matic S, Milovanovic D, Mijailovic Z, Djurdjevic P, Sazdanovic P, Stefanovic S, Todorovic D, Popovic S, Vukicevic V, Vukic M, Vukovic N, **Milivojevic N**, Zivanovic M, Jakovljevic V, Filipovic N, Baskic D, Djordjevic N. IFNL3/4 polymorphisms as a two-edged sword: an association with COVID-19 outcome. Journal of Medical Virology, 2023 Jan 19; 95(2): e28506.
DOI: 10.1002/jmv.28506,
ISSN: 0146-6615,
(IF = 12.7 за 2022 годину; 2/41; M21a+; област: Virology).
2. Matic S, Milovanovic D, Mijailovic Z, Djurdjevic P, Sazdanovic P, Stefanovic S, Todorovic D, Popovic S, Vukicevic V, Vukic M, Vukovic N, **Milivojevic N**, Zivanovic M, Jakovljevic V, Filipovic N, Djordjevic N, Baskic D. Its all about IFN-λ4: Protective role of IFNL4 polymorphism against COVID-19-related pneumonia in females. Journal of Medical Virology, 2023 Oct 09; 95(10): e29152.
DOI: 10.1002/jmv.29152,
ISSN: 0146-6615,
(IF = 12.7 за 2022 годину; 2/41; M21a+; област: Virology).
3. Saković A, Čočić D, Živanović M, Janković N, **Milivojević N**, Delibašić M, Kostić M, Radojević I, Grujović M, Marković KG, Klisurić OR, Vraneš M, Bogojeski J. Enhancing Bioactivity of N,N,N-Chelating Rhodium(III) Complexes with Ionic Liquids: Toward Targeted Cancer Therapy. Journal of Medicinal Chemistry, 2024 Aug 8; 67(15): 13349-13362.
DOI: 10.1021/acs.jmedchem.4c01220,
ISSN: 0022-2623,
(IF = 6.9 за 2023 годину; 3/72; M21a+; област: Chemistry, Medicinal)

Научни радови публиковани у водећим међународним часописима - M21a

1. Petrovic A, Milutinović M, Petri E, Zivanovic M, **Milivojevic N**, Puchta R, Scheurer A, Korzekwa J, Klisuric O, Bogojeski J. Synthesis of camphor-derived bis-pyrazolylpyridine rhodium(III) complexes: structure, Reactivity relationships and biological activity. *Inorganic Chemistry*, 2019 Jan 7; 58(1): 307-319.
DOI: 10.1021/acs.inorgchem.8b02390,
ISSN: 0020-1669,
(IF = 4.825 за 2019 годину; 4/45; M21a; област: Chemistry, Inorganic & Nuclear).
2. Petrović A, Cocic D, Bockfeld D, Živanović M, **Milivojević N**, Virijevec K, Jankovic N, Scheurer A, Vraneš M, Bogojeski J. Biological activity of bis(pyrazolylpyridine) and terpyridine Os(II) complexes in presence of biocompatible ionic liquids. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 2021; 8(11): 2749–2770.
DOI: 10.1039/D0QI01540G,
ISSN: 2052-1553,
(IF = 7.779 за 2021 годину; 3/46; M21a; област: Chemistry, Inorganic & Nuclear).
3. Nikolic S, Gazdic-Jankovic M, Rosic G, Miletic-Kovacevic M, Jovicic N, Nestorovic N, Stojkovic P, Filipovic N, Milosevic-Djordjevic O, Selakovic D, Zivanovic M, Seklic D, **Milivojević N**, Markovic A, Seist R, Vasilijic S, Stankovic K, Stojkovic M, Ljubic B. Orally administered fluorescent nanosized polystyrene particles affect cell viability, hormonal and inflammatory profile, and behavior in treated mice. *Environmental Pollution*, 2022 Apr 8; 305: 119206.
DOI: 10.1016/j.envpol.2022.119206,
ISSN: 0269-7491,
(IF = 9.988 за 2021 годину; 23/274; M21a; област: Environmental Sciences).

Научни радови публиковани у водећим међународним часописима - M21

1. Radisavljević S, Cocic D, Jovanovic S, Smit B, Petkovic M, **Milivojevic N**, Planojevic N, Markovic S, Petrovic B. Synthesis, characterization, DFT study, DNA/BSA binding affinity and cytotoxicity of some dinuclear and trinuclear gold(III) complexes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2019 Oct; 24(7): 1057-1076.
DOI: 10.1007/s00775-019-01716-8,
ISSN: 0949-8257,
(IF = 3.246 за 2019 годину; 9/45; M21; област: Chemistry, Inorganic & Nuclear).
2. Petrović A, Živanović M, Puchta R, Čočić D, Scheurer A, **Milivojevic N**, Bogojeski J. Experimental and quantum chemical study on the DNA/protein binding, and the biological activity of rhodium(III) complex with 1,2,4-triazole as inert ligand. *Dalton Transactions*, 2020 Jul 7; 49(26): 9070-9085.
DOI: 10.1039/D0DT01343A,
ISSN: 1477-9226,
(IF = 4.390 за 2020 годину; 8/45; M21; област: Chemistry, Inorganic & Nuclear).
3. Soldatović T, Selimović E, **Milivojević N**, Jovanović M, Šmit B. Novel heteronuclear Pt(II)-L-Zn(II) complexes: synthesis, interactions with biomolecules, cytotoxic properties. Two metals give promising antitumor activity? *Applied Organometallic Chemistry*. 2020 Oct; 34(10): e5864.
DOI: 10.1002/aoc.5864,
ISSN: 0268-2605,
(IF = 4.105 за 2020 годину; 10/45; M21; област: Chemistry, Inorganic & Nuclear).

4. Miloradovic D, Pavlovic D, Jankovic MG, Nikolic S, Papic M, **Milivojevic N**, Stojkovic M, Ljubic B. Human Embryos, Induced Pluripotent Stem Cells, and Organoids: Models to Assess the Effects of Environmental Plastic Pollution. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021 Sep 3; 9: 709183.
DOI: 10.3389/fcell.2021.709183,
ISSN: 2296-634X,
(IF = 6.081 за 2021 годину; 6/40; M21; област: Developmental Biology).
5. Demetriades M, Zivanovic M, Hadjicharalambous M, Ioannou E, Ljubic B, Vucicevic K, Ivosevic Z, Dagovic A, **Milivojevic N**, Kokkinos O, Bauer R, Vavourakis V. Interrogating and Quantifying In Vitro Cancer Drug Pharmacodynamics via Agent-Based and Bayesian Monte Carlo Modelling. *Pharmaceutics*, 2022 Mar 30; 14(4): 749.
DOI: 10.3390/pharmaceutics14040749,
ISSN: 1999-4923,
(IF = 6.525 за 2021 годину; 39/279; M21; област: Pharmacology & Pharmacy).
6. Juskovic A, Nikolic M, Ljubic B, Matic A, Zivkovic V, Vucicevic K, Milosavljevic Z, Vojinovic R, Jovicic N, Zivanovic S, **Milivojevic N**, Jakovljevic V, Bolevich S, Miletic Kovacevic M. Effects of Combined Allogenic Adipose Stem Cells and Hyperbaric Oxygenation Treatment on Pathogenesis of Osteoarthritis in Knee Joint Induced by Monoiodoacetate. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Jul 12; 23(14): 7695.
DOI: 10.3390/ijms23147695,
ISSN: 1422-0067,
(IF = 6.208 за 2021 годину; 69/296; M21; област: Biochemistry & Molecular Biology).
7. Živanović M, Gazdić Janković M, Ramović Hamzagić A, Virijeвић K, **Milivojević N**, Pecić K, Šeklić D, Jovanović M, Kastratović N, Mirić A, Đukić T, Petrović I, Jurišić V, Ljubić B, Filipović N. Combined Biological and Numerical Modeling Approach for Better Understanding of the Cancer Viability and Apoptosis. *Pharmaceutics*. 2023; 15(6): 1628.
DOI: 10.3390/pharmaceutics15061628,
ISSN: 1999-4923,
(IF = 6.525 за 2021 годину; 39/279; M21; област: Pharmacology & Pharmacy).
8. **Milivojević N**, Carvalho MR, Caballero D, Radisavljević S, Radoičić M, Živanović M, Kundu SC, Reis RL, Filipović N, Oliveira JM. Evaluation of novel dendrimer-gold complex nanoparticles for theranostic application in oncology. *Nanomedicine (Lond)*. 2024 Jan 26.
DOI: 10.2217/nnm-2023-0355,
ISSN: 1743-5889,
(IF = 6.096 за 2021 годину; 31/161; M21; област: Biotechnology & Applied Microbiology).
9. Virijeвић K, Živanović MN, Nikolić D, **Milivojević N**, Pavić J, Morić I, Šenerović L, Dragačević L, Thurner PJ, Rufin M, Andriotis OG, Ljubić B, Miletic Kovačević M, Papić M, Filipović N. AI-Driven Optimization of PCLPEG Electrospun Scaffolds for Enhanced In Vivo Wound Healing. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2024 April 25.
DOI: 10.1021/acsami.4c03266,
ISSN: 1944-8244,
(IF = 9.5 за 2022 годину; 55/344; **M21**; област: Materials Science, Multidisciplinary)
10. Ramović Hamzagić A, Gazdić Janković M, Cvetković D, Nikolić D, Nikolić S, **Milivojević Dimitrijević N**, Kastratović N, Živanović M, Miletic Kovačević M, Ljubić B. Machine Learning Model for Prediction of Development of Cancer Stem Cell

- Subpopulation in Tumors Subjected to Polystyrene Nanoparticles. *Toxics*. 2024; 12(5):354.
DOI: 10.3390/toxics12050354,
ISSN: 2305-6304,
(IF = 4.6 за 2022 годину; 15/94; M21; област: Toxicology)
11. Matic S, Milovanovic D, Mijailovic Z, Djurdjevic P, Stefanovic S, Todorovic D, Vitosevic K, Canovic V, Popovic S, Milivojevic Dimitrijevic N, Zivanovic M, Seklic D, Aleksic S, Djordjevic N, Vukic M, Vukovic N, Filipovic N, Baskic D, Djordjevic N. *ACE2 and TMPRSS2 genetic polymorphisms as potential predictors of COVID-19 severity and outcome in females*. *Front Med (Lausanne)*. 2024 Dec 18; 11:1493815.
DOI: 10.3389/fmed.2024.1493815,
ISSN: 2296-858X,
(IF = 3.0 за 2024 годину; 61/332; M21; област: Medicine, General & Internal)
12. Matovic V, Lujic B, Radojevic I, Delic G, Kovacevic MM, Zivanovic S, Papic M, Milivojevic N, Petrovic I, Gazdic Jankovic M. *Trapa natans L. Extract Attenuates Inflammation and Oxidative Damage in Cisplatin-Induced Cardiotoxicity in Rats by Promoting M2 Macrophage Polarization*. *Mediators Inflamm*. 2025 Jan 22;2025: 6587305.
DOI: 10.1155/mi/6587305,
ISSN: 0962-9351,
(IF = 4.2 за 2024 годину; 62/183; M21; област: Immunology)

Научни радови публиковани у међународним часописима – M22

1. Medjedović M, Simović A R, Ćočić D, Milutinović M, Senft L, Blagojević S, Milivojević N, Petrović B M. Dinuclear ruthenium(II) polypyridyl complexes: mechanistic study with biomolecules, DNA/BSA interactions and cytotoxic activity. *Polyhedron*. 2020 Mar 1; 178: 114334.
DOI: 10.1016/j.poly.2019.114334,
ISSN: 0277-5387,
(IF = 3.052 за 2020 годину; 17/45; M22; област: Chemistry, Inorganic & Nuclear).
2. Radisavljevic S, Dekovic Kesic A, Cocic D, Puchta R, Senft L, Milutinovic M, Milivojević N, Petrovic, B. Studies of the stability, nucleophilic substitution reactions, DNA/BSA interactions, cytotoxic activity, DFT and molecular docking of some tetra- and penta-coordinated gold (III) complexes. *New Journal of Chemistry*, 2020 Jun 8; 44(26): 11172-11187.
DOI: 10.1039/D0NJ02037K,
ISSN: 1144-0546,
(IF = 3.591 за 2020 годину; 75/178; M22; област: Chemistry, Multidisciplinary).
3. Stevanovic M, Selakovic D, Vasovic M, Lujic B, Zivanovic S, Papic M, Zivanovic M, Milivojevic N, Mijovic M, Tabakovic SZ, Jokanovic V, Arnaut A, Milanovic P, Jovicic N, Rosic G. Comparison of Hydroxyapatite/Poly(lactide-co-glycolide) and Hydroxyapatite/Polyethyleneimine Composite Scaffolds in Bone Regeneration of Swine Mandibular Critical Size Defects: In Vivo Study. *Molecules*. 2022 Mar 4; 27(5): 1694.
DOI: 10.3390/molecules27051694,
ISSN: 1420-3049,
(IF = 4.927 за 2021 годину; 114/296; M22; област: Biochemistry & Molecular Biology).

4. Brankovic J, **Milivojević N**, Milovanović V, Simijonović D, Petrović Z D., Marković Z, Šeklić D S., Živanović M N., Vukić M D. and Petrović V P. Evaluation of antioxidant and cytotoxic properties of phenolic N-acylhydrazones: structure–activity relationship. Royal Society Open Science, 2022 Jun 8; 9(6): 211853.
DOI: 10.1098/rsos.211853,
ISSN: 2054-5703,
(IF = 3.653 за 2021 годину; 30/73; M22; област: Multidisciplinary Sciences).
5. Milutinović MG, **Milivojević NN**, Đorđević NM, Nikodijević DD, Radisavljević SR, Đeković Kesić AS, Marković SD. Gold(III) complexes with phenanthroline-derivatives ligands induce apoptosis in human colorectal and breast cancer cell lines. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2022 Sep 23: S0022-3549(22)00423-3.
DOI: 10.1016/j.xphs.2022.09.021,
ISSN: 0022-3549,
(IF = 3.784 за 2021 годину; 125/279; M22; област: Pharmacology & Pharmacy).
6. Papic M, Zivanovic S, Vucicevic T, Papic MV, Zdravkovic D, **Milivojevic N**, Virijevic K, Zivanovic M, Mircic A, Ljubic B, Lukic ML, Popovic M. Pulpal expression of erythropoietin and erythropoietin receptor after direct pulp capping in rat. European Journal of Oral Sciences. 2022 Aug 2: e12888.
DOI: 10.1111/eos.12888,
ISSN: 0909-8836,
(IF = 2.160 за 2021 годину; 43/92; M22; област: Dentistry, Oral Surgery & Medicine).
7. Papic M, Zivanovic S, Vucicevic T, Vuletic M, Papic MV, **Milivojević N**, Mirić A, Miletic Kovacevic M, Zivanovic M, Stamenkovic M, Zivkovic V, Mitrovic S, Jakovljevic V, Ljubic B, Popovic M. Effects of direct pulp capping with recombinant human erythropoietin and/or mineral trioxide aggregate on inflamed rat dental pulp. Molecular and cellular biochemistry. 2023 Oct 25: Epub ahead of print.
DOI: 10.1007/s11010-023-04868-z,
ISSN: 0300-8177,
(IF = 4.3 за 2022 годину; 93/191; M22; област: Cell Biology).
8. Jeremic J, Govoruskina N, Bradic J, Milosavljevic I, Srejovic I, Zivkovic V, Jeremic N, Nikolic Turnic T, Tanaskovic I, Bolevich S, Jakovljevic V, Bolevich S, Zivanovic MN, Okwose N, Seklic D, **Milivojevic N**, Grujic J, Velicki L, MacGowan G, Jakovljevic DG, Filipovic N. Sacubitril/valsartan reverses cardiac structure and function in experimental model of hypertension-induced hypertrophic cardiomyopathy. Molecular and cellular biochemistry. 2023 Mar 30.
DOI: 10.1007/s11010-023-04690-7,
ISSN: 0300-8177,
(IF = 4.3 за 2022 годину; 93/191; M22; област: Cell Biology).
9. Marjanović JS, Petrović N, Kosanić M, Košarić J, Mirić A, **Milivojević N**, Kostić MD, Divac VM. Tryptamine-Derived Schiff Bases: Potent Antimicrobial Agents and Evaluation of Cytotoxicity, ADME and DNA Binding Properties. Chem Biodivers. 2025 Mar; 22(3): e202401699.
DOI: 10.1002/cbdv.202401699,
ISSN: 1612-1872,
(IF = 2.5 за 2024 годину; 123/239; M22; област: Chemistry, Multidisciplinary)
10. Matovic V, Ljubic B, Miletic Kovacevic M, Milosevic-Djordjevic O, **Milivojevic N**, Nikolic S, Jankovic MG. NO-mediated DNA damage induced by polystyrene nanoparticles triggers program cell death in mesenchymal stem cells. Drug Chem Toxicol. 2025 Jul; 48(4):720-728.
DOI: 10.1080/01480545.2025.2453580,

ISSN: 0148-0545,
(IF = 2.1 за 2023 годину; 78/106; M22; област: Toxicology)

Научни радови публиковани у међународним часописима – M23

1. Raković I, Bogojeski J, Mladenović K, Petrović A, Divac V, Mihailović K, Popovska Jović B, Kostić M, Canović P, **Milivojević N**, Zivanović M, Radojević I. Synthesis, Characterization and Biological Studies of a Organoselenium trans-Palladium(II) Complexes. Medicinal Chemistry, 2021; 17(9): 1007-1022.
DOI: 10.2174/1573406416666200930112442,
ISSN: 1573-4064,
(IF = 2.329 за 2021 годину; 50/63; M23; област: Chemistry, Medicinal).
2. Ramović Hamzagić A, Cvetković D*, Gazdić-Janković M, **Milivojević N**, Nikolić D, Zivanović M, Kastratović N, Petrović I, Nikolić S, Jovanović M, Šeklić D, Filipović N, Ljujić B. Modeling 5-FU-Induced Chemotherapy Selection of Drug-Resistant Cancer Stem Cell Subpopulation. Current Oncology, 2024; 31(3), 1221-1234.
DOI: 10.3390/curroncol31030091,
ISSN: 1198-0052,
(IF = 2.6 за 2021 годину; 176/242; M23; област: Oncology)

Рад у водећем националном часопису – M24

1. Perić A, Mirić A, Košarić J, **Milivojević N**, Živanović M, Ćićarić N, Arsenijević P. Expression of proapoptotic-antiapoptotic genes in malignant, borderline and benign ovarian tumors. Kragujevac Journal of Science. 2023, 45, 121-128, doi: 10.5937/KgJSci2345121P.

Научна саопштења са међународних конференција штампана у целини - M33

1. Halilagić A, Soldatović T, Selimović E, **Milivojević N**, Virijeвић K, Živanović M, Šmit B. Viability and oxidative response of human colorectal HCT-116 cancer and human lung healthy pleura MRC-5 cell lines treated with novel bridged heteronuclear Zn(II)-L-Cu(II). 6th International Electronic Conference on Medical Chemistry. 1-30 November 2020. MDPI: Basel, Switzerland. doi: 10.3390/ECMC2020-07447.
2. Soldatović T, Selimović E, **Milivojević N**, Jovanović M, Šmit B, Virijeвић K. Novel bridged heteronuclear Pt(II)-L-Zn(II) complexes with promising antitumor activity. 6th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry. 1-30 November 2020. MDPI: Basel, Switzerland. doi: 10.3390/ECMC2020-07358.
3. **Milivojević N**, Nikolić D, Šeklić D, Jovanović Ž, Živanović M, Filipović N. Development of Microfluidic Lab-on-Chip System for Cultivation of Cells and Tissues. 4th International Conference on Medical and Biological Engineering in Bosnia and Herzegovina (CMBEBIH). 21–24 April 2021. Mostar, Bosnia and Herzegovina. Springer, Cham. pp 718-725. ISBN: 978-3-030-73908-9. doi: 10.1007/978-3-030-73909-6_81.
4. **Milivojević N**, Živanović M, Nikolić D, Jovanović Ž, Šeklić D, Nikolić M, Filipović N. Microfluidic Lab-on-Chip System Development for Cell Culture Cultivation. 8th

- International Congress of Serbian Society of Mechanics. 28-30 June 2021. Kragujevac, Serbia. pp 390-399. ISBN: 978-86-909973-8-1. doi: 10.5281/zenodo.6323631.
5. **Milivojević N**, Caballero D, Carvalho MR, Živanović M, Filipović N, Reis RL, Oliveira JM. Engineering a Microfluidic Platform as a Pre-clinical Model for Biomedical Applications. 1st International Conference on Chemo and Bioinformatics. 26-27 October 2021. Kragujevac, Serbia. pp 259-262. ISBN: 978-86-82172-01-7. doi: 10.46793/ICCBi21.259M.
6. **Milivojević N**, Caballero D, Carvalho MR, Kokanović M, Živanović M, Filipović N, Reis RL, Oliveira JM. A Microfluidic Platform as an in vitro for Biomedical Experimentation – a Cell Migration Study. The 21th IEEE International Conference on BioInformatics and BioEngineering (BIBE). 25-27 October 2021. Kragujevac, Serbia. pp 1-6. ISBN: 978-1-6654-4261-9. ISSN: 2471-7819. doi: 10.1109/BIBE52308.2021.9635498.
7. Šeklić DS, Jovanović MM, **Milivojević NN**, Živanović MN. Platinum (IV) complex and its corresponding ligand suppress cell motility and promote expression of Frizzled-7 receptor in colorectal cancer cells. 1st International Conference on Chemo and Bioinformatics, 26-27 October 2021. Kragujevac, Serbia, pp 288-291. ISBN: 978-86-82172-01-7. doi: 10.46793/ICCBi21.288S.
8. Šeklić D, Jovanović M, **Milivojević N**, Marković S, Živanović M. Cordyceps sinensis Edible Mushroom Reduces Migration of Colorectal Adenocarcinoma Cells. ISPEC 7th International Conference on Agriculture, Animal Sciences and Rural Development. 18-19 September 2021, Mus, Turkey, pp 924-929. ISBN: 978-625-7720-61-8.
9. Jovanović M, Grujović M, Mladenović K, Nikolić J, Mitić M, **Milivojević N**, Šeklić D. Phenolic Profile and Effects of Edible Mushroom Laetiporus sulphureus Extract on Cervical Cancer Cell Line. ISPEC 7th International Conference on Agriculture, Animal Sciences and Rural Development. 18-19 September 2021, Mus, Turkey, pp 917-923. ISBN: 978-625-7720-61-8.
10. Nikolić D, **Milivojević N**, Mirić A, Živanović M, Filipović N. Designing, Optimising and Fabricating of Microfluidic Devices, Based on Topology Optimisation and 3D Printing. 9th International Congress of the Serbian Society of Mechanics. 5-7 July 2023, Vrnjačka Banja, Serbia, pp 337-344.
11. Nikolić D, Ljujić B, Ramović Hamzagić A, Gazdić Janković M, Mirić A, Virijević K, Šeklić D, Jovanović M, Kastratović N, Petrović I, Jurišić V, **Milivojević N**, Živanović M, Filipović N. Predicting the Evolution of Cancer Stem Cell Subtypes Using a Machine Learning Framework. In: Filipović, N. (eds) Applied Artificial Intelligence 2: Medicine, Biology, Chemistry, Financial, Games, Engineering. AAI 2023. Lecture Notes in Networks and Systems, vol 999. 2024. Springer, Cham. doi: 10.1007/978-3-031-60840-7_22.
12. Djukic T, **Milivojevic Dimitrijevic N**, Zivanovic M, Filipovic N. Combining Lattice Boltzmann and Agent-Based Modeling to Model the Behavior of Cancer Cells In-Vitro, 2024 IEEE 24th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE), Kragujevac, Serbia, 2024, pp. 1-4, doi: 10.1109/BIBE63649.2024.10820492.
13. **Milivojevic Dimitrijević N**, Mirić A, Vulović R, Živanović M, Filipović N. Use of Bioinformatics to Extract Pharmacogenomic Information, 2024 IEEE 24th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE), Kragujevac, Serbia, 2024, pp. 1-5, doi: 10.1109/BIBE63649.2024.10820461.

Научна саопштења са међународних конференција штампана у изводима - М34

1. Blagojević S, Milutinović M, **Milivojević N**, Živanović M, Marković S. Cytotoxic and proapoptotic effects of extracts from *Vitis vinifera* L. petiole on colon cancer cell lines. 8th Conference of Serbian Biochemical Society “Coordination in Biochemistry and Life”, Novi Sad, 16 November 2018. pp 117-118. ISBN: 978-86-7220-096-6.
2. Bogojeski J, Petrović A, Milutinović MM, Živanović M, **Milivojević N**, Puchta R, Scheurer A, Korzekwa J, Klisurić OR. Structure-reactivity relationship, biological activity of the bis-pyrazolylpyridine RhIII complexes. The Fifth International Scientific Conference: Advances in synthesis and complexing. 22-26 April 2019. Moscow, Russia. pp 27-27. ISBN: 978-5-209-09395-4.
3. Virijeвић K, Grujić J, Kokanović M, **Milivojević N**, Živanović MN, Filipović N. Optimization of parameters for preparing gelatin electrospun microfibers. 3th Belgrade Bioinformatics Conference, BelBI. 21-25 June 2021. Belgrade, Serbia. pp 101-101. ISSN: 2334-6590.
4. **Milivojević N**, Nikolić D, Živanović M, Filipović N. Novel approach in designing microfluidic devices based on finite element and topological optimization methods. IX International Conference on Computational Bioengineering ICCB2022. 11-13 April 2022. Lisbon, Portugal. ISBN: 978-989-99424-9-3.
5. Mirić A, Pavić J, Benolić L, Nikolić D, **Milivojević N**, Živanović M, Tanasković I, Filipović N. Controlled drug release from a 3D printed tablet. 1st Serbian International Conference on Applied Artificial Intelligence. 19-20 May 2022. Kragujevac, Serbia. pp 86-86. ISBN: 978-86-81037-71-3.
6. Nikolić D, Ljujić B, Ramović Hamzagić A, Gazdić Janković M, Mirić A, Virijeвић K, Šeklić D, Jovanović M, Kastratović N, Petrović I, Jurišić V, **Milivojević N**, Živanović M, Filipović N. Prediction of Development of Cancer Stem Cell Subpopulation by Machine Learning Model. 2nd Serbian International Conference on Applied Artificial Intelligence (SICAAI). 19-20 May 2023. Kragujevac, Serbia.
7. **Milivojević N**, Prosenc Zmrzljak U, Ljujić B, Đorđević V, Gazdić Janković M, Živanović M, Puač F, Ivanović M, Filipović N. Single cell 3' transcriptome profiling. 4th Belgrade Bioinformatics Conference, BelBi2023. 19-23 June 2023. Belgrade, Serbia. pp 45. ISBN: 978-86-82679-14-1.
8. Virijeвић K, Živanović M, Gazdić Janković M, Ramović Hamzagić A, **Milivojević N**, Pecić K, Šeklić D, Jovanović M, Kastratović N, Mirić A, Đukić T, Petrović I, Jurišić V, Ljujić B, Filipović N. Numerical and Biological Modeling Approach in the Analysis of the Cancer Viability and Apoptosis. 4th Belgrade Bioinformatics Conference, BelBi2023. 19-23 June 2023. Belgrade, Serbia. pp 70. ISBN: 978-86-82679-14-1.
9. **Milivojević Dimitrijević N**, Ljujić B, Gazdić Janković M, Mirić A, Živanović M, Filipović N. Processing of big data after transcriptome sequencing at single cell resolution. 3rd Serbian International Conference on Applied Artificial Intelligence (SICAAI). Kragujevac, Serbia, May 23-24, 2024. pp 80. ISBN: 978-86-81037-79-9.
10. Mirić A, **Milivojević Dimitrijević N**, Milenković S, Nikolić D, Slavković V, Grujović N, Živanović M, Filipović N. Advancements in Intraocular Lenses Design and Manufacturing: Evaluating Optical Clarity and Performance Standards. Twenty-Second Young Researchers Conference – Materials Science and Engineering December 4 – 6, 2024, Belgrade, Serbia.
11. **Milivojević Dimitrijević N**, Ivanović M, Živić A, Ljujić B, Gazdić Janković M, Prosenc Zmrzljak U, Mirić A, Đorđević V, Puač F, Živanović M, Filipović N. Deciphering the effects of nanosized polystyrene particles using lab-on-chip technology and

- transcriptome profile. Belgrade Bioinformatics Conference, BelBi2024 conference. June 17-20, 2024, Belgrade, Serbia.
12. Nikolic M, **Milivojević Dimitrijević N**, Miric A, Zivanovic M, Filipovic N. Analysis of redox processes from in silico perspective in colorectal cancer cell line. 9th European Medical and Biological Engineering Conference (EMBEC), Portoroz, Slovenia. August 17, 2025. doi: 10.5281/zenodo.16891268.
 13. Kovačević V, Živić A, Ivanović M, **Milivojević Dimitrijević N**, Živanović M. A Reproducible Pipeline for Preprocessing and Annotation of scRNA-seq Data Using Seurat and Scanpy. 3rd International Conference on Chemo and BioInformatics, Kragujevac, September 25-26, 2025. pp. 371-374. doi: 10.46793/ICCBIG25.371K.
 14. Djukic T, **Milivojević Dimitrijević N**, Zivanovic M, Filipovic N. Simulating the behaviour of cancer cells in the microfluidic chip. 3rd International Conference on Chemo and BioInformatics, Kragujevac, September 25-26, 2025. pp. 436-439. doi: 10.46793/ICCBIG25.436DJ.
 15. Mirić A, Perić A, Košarić J, **Milivojević Dimitrijević N**, Arsenijević P, Živanović M, Filipović N. Time-dependent apoptotic responses to vitamin E in precancerous lesions-on-chip models. 3rd International Conference on Chemo and BioInformatics, Kragujevac, September 25-26, 2025. pp. 382-385. doi: 10.46793/ICCBIG25.382M.

Радови у процесу рецензије

1. **Nevena Milivojević Dimitrijević**, Ana Mirić, Tijana Đukić, Ivica Petrović, Ana Kesić, Vladimir Jurišić, Luka Dragačević, Marko Živanović, Nenad Filipović. Apoptosis Execution is Spatially Regulated.
2. **Nevena Milivojević Dimitrijević**, Ana Mirić, Milica Nikolić, Ivica Petrović, Biljana Petrović, Vladimir Jurišić, Marko Živanović, Nenad Filipović. From Parameters to States: The Redox Disturbance Index.
3. **Nevena Milivojević Dimitrijević**, Vukašin Slavković, Dalibor Nikolić, Strahinja Milenković, Ana Mirić, Marko Živanović, Nenad Grujović, Nenad Filipović. Comparison of fluid flow experiment and simulation in a newly fabricated microfluidic chip device for biomedical application.
4. Vladimir Kovacevic, **Nevena Milivojević Dimitrijević**, Marija Mihailovic, Marko Zivanovic, Milos Ivanovic, Andreja Zivic, Marina Gazdic Jankovic, Aleksandra Kovacevic, Uršula Prosenc Zmrzljak, Feđa Puac, Nenad Filipović, Biljana Ljubic. Nanoscale Material Size Shapes Distinct Immune Transcriptional States Under Physiological Flow.

Публиковани радови у часописима и на конференцијама у којима су презентовани резултати докторске дисертације:

1. **Milivojević N**, Carvalho MR, Caballero D, Radisavljević S, Radoićić M, Živanović M, Kundu SC, Reis RL, Filipović N, Oliveira JM. Evaluation of novel dendrimer-gold complex nanoparticles for theranostic application in oncology. *Nanomedicine (Lond)*. 2024 Jan 26. ISSN: 1743-5889, DOI: 10.2217/nmm-2023-0355.
2. Milutinović MG, **Milivojević NN**, Đorđević NM, Nikodijević DD, Radisavljević SR, Đeković Kesić AS, Marković SD. Gold(III) complexes with phenanthroline-derivatives ligands induce apoptosis in human colorectal and breast cancer cell lines. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022 Sep 23: S0022-3549(22)00423-3. ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1016/j.xphs.2022.09.021.
3. **Milivojević N**, Nikolić D, Šeklić D, Jovanović Ž, Živanović M, Filipović N. Development of Microfluidic Lab-on-Chip System for Cultivation of Cells and Tissues. 4th International Conference on Medical and Biological Engineering in Bosnia and Herzegovina (CMBEBIH). 21–24 April 2021. Mostar, Bosnia and Herzegovina. Springer, Cham. pp 718-725. ISBN: 978-3-030-73908-9. doi: 10.1007/978-3-030-73909-6_81.
4. **Milivojević N**, Živanović M, Nikolić D, Jovanović Ž, Šeklić D, Nikolić M, Filipović N. Microfluidic Lab-on-Chip System Development for Cell Culture Cultivation. 8th International Congress of Serbian Society of Mechanics. 28-30 June 2021. Kragujevac, Serbia. pp 390-399. ISBN: 978-86-909973-8-1. doi: 10.5281/zenodo.6323631.
5. **Milivojević N**, Caballero D, Carvalho MR, Živanović M, Filipović N, Reis RL, Oliveira JM. Engineering a Microfluidic Platform as a Pre-clinical Model for Biomedical Applications. 1st International Conference on Chemo and Bioinformatics. 26-27 October 2021. Kragujevac, Serbia. pp 259-262. ISBN: 978-86-82172-01-7. doi: 10.46793/ICCB121.259M.
6. **Milivojević N**, Caballero D, Carvalho MR, Kokanović M, Živanović M, Filipović N, Reis RL, Oliveira JM. A Microfluidic Platform as an in vitro for Biomedical Experimentation – a Cell Migration Study. The 21th IEEE International Conference on Bioinformatics and BioEngineering (BIBE). 25-27 October 2021. Kragujevac, Serbia. pp 1-6. ISBN: 978-1-6654-4261-9. ISSN: 2471-7819. doi: 10.1109/BIBE52308.2021.9635498.
7. **Milivojević N**, Nikolić D, Živanović M, Filipović N. Novel approach in designing microfluidic devices based on finite element and topological optimization methods. IX International Conference on Computational Bioengineering ICCB2022. 11-13 April 2022. Lisbon, Portugal. ISBN: 978-989-99424-9-3.
8. **Milivojević N**, Prosenc Zmrzljak U, Ljujić B, Đorđević V, Gazdić Janković M, Živanović M, Puač F, Ivanović M, Filipović N. Single cell 3' transcriptome profiling. 4th Belgrade Bioinformatics Conference, BelBi2023. 19-23 June 2023. Belgrade, Serbia. pp 45. ISBN: 978-86-82679-14-1.
9. **Milivojević Dimitrijević N**, Ljujić B, Gazdić Janković M, Mirić A, Živanović M, Filipović N. Processing of big data after transcriptome sequencing at single cell resolution. 3rd Serbian International Conference on Applied Artificial Intelligence (SICAAI). Kragujevac, Serbia, May 23-24, 2024. pp 80. ISBN: 978-86-81037-79-9.
10. Djukic T, **Milivojevic Dimitrijevic N**, Zivanovic M, Filipovic N. Combining Lattice Boltzmann and Agent-Based Modeling to Model the Behavior of Cancer Cells In-Vitro, 2024 IEEE 24th International Conference on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE), Kragujevac, Serbia, 2024, pp. 1-4, doi: 10.1109/BIBE63649.2024.10820492.

11. Nikolić D, **Milivojević N**, Mirić A, Živanović M, Filipović N. Designing, Optimising and Fabricating of Microfluidic Devices, Based on Topology Optimisation and 3D Printing. 9th International Congress of the Serbian Society of Mechanics. 5-7 July 2023, Vrnjačka Banja, Serbia, pp 337-344.
12. **Milivojević Dimitrijević N**, Ivanović M, Živić A, Ljujić B, Gazdić Janković M, Prosenc Zmrzljak U, Mirić A, Đorđević V, Puač F, Živanović M, Filipović N. Deciphering the effects of nanosized polystyrene particles using lab-on-chip technology and transcriptome profile. Belgrade Bioinformatics Conference, BelBi2024 conference. June 17-20, 2024, Belgrade, Serbia.
13. Nikolic M, **Milivojevic Dimitrijevic N**, Miric A, Zivanovic M, Filipovic N. Analysis of redox processes from in silico perspective in colorectal cancer cell line. 9th European Medical and Biological Engineering Conference (EMBEC), Portoroz, Slovenia. August 17, 2025. doi: 10.5281/zenodo.16891268.
14. Djukic T, **Milivojevic Dimitrijevic N**, Zivanovic M, Filipovic N. Simulating the behaviour of cancer cells in the microfluidic chip. 3rd International Conference on Chemo and BioInformatics, Kragujevac, September 25-26, 2025. pp. 436-439. doi: 10.46793/ICCBIG25.436DJ.

Research Article

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Nanomedicine



Evaluation of novel dendrimer–gold complex nanoparticles for theranostic application in oncology

Nevena Milivojević^{1,2,3}, Mariana R Carvalho^{4,5}, David Caballero^{4,5}, Snežana Radisavljević⁶, Marija Radoičić⁷, Marko Živanović^{1,2,3}, Subhas C Kundu^{4,5}, Rui L Reis^{4,5}, Nenad Filipović^{*,1,3,8} & Joaquim M Oliveira^{*,4,5}

¹University of Kragujevac, Učea Kneževine Srbije 1A, 34000, Kragujevac, Serbia

²Institute for Information Technologies, University of Kragujevac, Jovana Cvijica bb, 34000, Kragujevac, Serbia

³BiolIRC – Bioengineering Research & Development Center, University of Kragujevac, Prvoslava Stojanovića 6, 34000, Kragujevac, Serbia

⁴3B's Research Group, I3Bs – Research Institute on Biomaterials, Biodegradables & Biomimetics, University of Minho, Headquarters of the European Institute of Excellence on Tissue Engineering & Regenerative Medicine, AvePark, Parque de Ciência e Tecnologia, Zona Industrial da Gandra, 4805-017, Barco, Guimarães, Portugal

⁵ICVS/3B's – PT Government Associated Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal

⁶Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000, Kragujevac, Serbia

⁷"Vinča" Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, PO Box 522, 11000, Belgrade, Serbia

⁸Faculty of Engineering, University of Kragujevac, Sestre Janjić 6, 34000, Kragujevac, Serbia

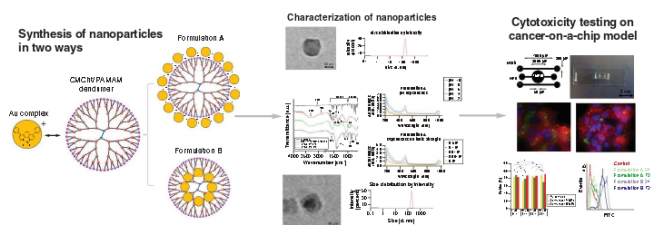
*Author for correspondence: miguel.oliveira@i3bs.uminho.pt

**Author for correspondence: fica@kg.ac.rs

Aim: Despite some successful examples of therapeutic nanoparticles reaching clinical stages, there is still a significant need for novel formulations in order to improve the selectivity and efficacy of cancer treatment.

Methods: The authors developed two novel dendrimer–gold (Au) complex-based nanoparticles using two different synthesis routes: complexation method (formulation A) and precipitation method (formulation B). Using a biomimetic cancer-on-a-chip model, the authors evaluated the possible cytotoxicity and internalization by colorectal cancer cells of dendrimer–Au complex-based nanoparticles. **Results:** The results showed promising capabilities of these nanoparticles for selectively targeting cancer cells and delivering drugs, particularly for the formulation A nanoparticles. **Conclusion:** This work highlights the potential of dendrimer–Au complex-based nanoparticles as a new strategy to improve the targeting of anticancer drugs.

Graphical abstract:



First draft submitted: 8 September 2023; Accepted for publication: 14 December 2023; Published online: 26 January 2024

Keywords: Au-complex • colorectal cancer • dendrimer nanoparticles • microfluidics • nano-oncology • nanomedicine



ARTICLE IN PRESS

Journal of Pharmaceutical Sciences 000 (2022) 1–9



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical Sciences

journal homepage: www.jpharmsci.org


Drug Discovery–Development Interface

Gold(III) Complexes with Phenanthroline-derivatives Ligands Induce Apoptosis in Human Colorectal and Breast Cancer Cell Lines

Milena G. Milutinović^{a,*}, Nevena N. Miliwojević^{bc}, Nevena M. Đorđević^a,
Danijela D. Nikodijević^a, Snežana R. Radisavljević^b, Ana S. Đeković Kesić^c,
Snežana D. Marković^a
^a University of Kragujevac, Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^b University of Kragujevac, Department of Chemistry, Faculty of Science, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

^c University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Natural Sciences, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia

ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 July 2022
Revised 20 September 2022
Accepted 20 September 2022
Available online xxx

Keywords:
Anticancer activity
Bax
Bcl-2
Caspases
Cell death
Metal-based complexes

ABSTRACT

Due to their promising effects, gold(III) complexes recently drew increasing attention in the design of new metal-based anticancer therapeutics. Two gold(III) complexes, square-planar $[\text{Au}(\text{DPP})\text{Cl}_2]^+$ - Complex **1** and distorted square-pyramidal $[\text{Au}(\text{DMP})\text{Cl}_3]$ - Complex **2** (where DPP=4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline and DMP=2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline) were previously synthesized, described and approved as complexes with pronounced cytotoxic effects on colorectal HCT-116 and breast MDA-MB-231 cancer cells. This study investigated the type of cell death by AO/EB double staining, and identification of possible targets responsible for their cytotoxicity, monitored by immunofluorescence and qPCR methods. Both complexes induced apoptosis in all applied concentrations. In the HCT-116 cells apoptosis was activated by external apoptotic pathway, via increase of Fas receptor protein expression and Caspase 8 gene expression. Also, the mitochondrial pathway was triggered by affecting the Bcl-2 members of regulatory proteins and increased caspase 9 protein expression. In MDA-MB-231 cells, apoptosis was initiated from the mitochondria, due to disbalance between expressions of pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family members and caspase 9 activation. Complex **1** shows better activity compared to Complex **2**, which is in accordance with its structural characteristics. The results deal weighty data about proapoptotic activity of gold(III) complexes and highlighted potential targets for cancer therapy.

© 2022 American Pharmacists Association. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The global statistics about cancer, as a cause of millions of deaths worldwide, suggest the need for additional research of potential affected targets to improve anticancer therapy.¹ With discovery of cisplatin and its anticancer properties, the research in other metal-based complexes and their development began. These investigations were aimed at synthesizing metallodrugs with various modifications or additional ligands, identification of new inorganic agents to be used in chemotherapy, and development of anticancer agents with more applicable properties in terms of solubility, more potent cytotoxicity, cell selectivity, avoidance of tumor resistances, etc.² A lot of structurally diverse gold(I) and gold(III) complexes were examined for this purpose.^{3–5} Many studies confirmed gold complexes as a

powerful cytotoxic substance against several cell lines, where they showed strong cell growth inhibition, and suggested their application as anticancer agents.^{5–7}

The synthesized gold(III) complexes, $[\text{Au}(\text{DPP})\text{Cl}_2]^+$ and $[\text{Au}(\text{DMP})\text{Cl}_3]$ (their structures were presented in Fig. S1) were previously described following the published procedures and characterized as effective in terms of their interactions with some molecules in the cells such as DNA, GSH, BSA, together with their pronounced cytotoxic activity against HCT-116 colorectal cancer and MDA-MB-231 breast cancer cells.⁷ These complexes are especially interesting due to pseudo-five-coordinate gold(III) complex ($[\text{Au}(\text{DMP})\text{Cl}_3]$), and N-containing aromatic ligands that have a great impact on the stability of Au(III) complexes, as well as on their biological activity. Furthermore, promising IC_{50} results⁷ encouraged further examinations.

The mechanism of cytotoxicity for gold(III) complexes **1** and **2** has not been studied yet. The process of induced cytotoxicity in cancer cells and activated signaling in induced cell death are particularly important for consideration of these substances as potential

* Corresponding author at: University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia.
E-mail address: milena.milutinovic@pmf.kg.ac.rs (M.G. Milutinović).

<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.09.021>

0022-3549/© 2022 American Pharmacists Association. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.



Development of Microfluidic Lab-on-Chip System for Cultivation of Cells and Tissues

Nevena Miliivojević¹✉, Dalibor Nikolić^{1,2}, Dragana Šeklić¹, Živana Jovanović³, Marko Živanović^{1,2}, and Nenad Filipović^{2,3}

¹ Institute of Information Technologies, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

² BioIRC - Bioengineering Research and Development Center, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³ Faculty of Engineering, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Abstract. Lab-on-chip systems are microfluidic devices that can be used as powerful tools for research in fields of molecular biology and bioengineering. Novel chip systems such as miniaturized microfluidic human tissue and organ models are powerful platforms to *ex vivo* study functional units of any important biological and physiological parameters of their *in vivo* counterparts. Also, development of microfluidic system with mathematical modeling described fluid dynamics in a chip can be used in real-time monitoring of the transport, efficacy, and cytotoxicity of potential drugs on the same platform.

We have developed a Chip system that is suitable for cultivation of cells or primitive tissues. The sandwich chip design is composed of acrylic plates - material that is transparent for easy optical following of cells growing. It is manufactured by milling processes performed on in-house developed 3D CNC router – 3D CNC milling machine and by the FDM 3D printing process on Creality 3D CR-10max printer. The main components are: i) bottom plate with cylindrical main chamber for cells growing and two supplying channels; ii) top plate with other half of the channel as well as two holes for tubing fittings.

Connection of Chip to a peristaltic pump gives a microfluidic system physiologically relevant microenvironment for cell growth. Fluidic control mimics conditions in real *in vivo* systems and leads to successful cell proliferation.

In near future, organ-on-chip systems promise to be powerful platforms for *ex vivo* studies of functional units of some organs, for specific biological processes, for examination of tumor with its microenvironment. Also, these small devices can be used for personalized/precision medicine and drug screening for direct treatment decision-making. The chip model that we developed can be used for successful growth of cells or smaller tissues in conditions as suitable as in a living system.

Keywords: Lab-on-chip · Microfluidics · Tissue engineering

1 Introduction

Lab-on-chip systems, which have recently emerged as powerful tools in research, are microfluidic devices that aim to recreate relevant physiological features [1]. 'Engineered

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

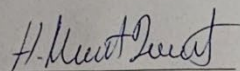
„Употреба наночестица и „3D tumor-on-chip“ напредних технологија у биолошким истраживањима – Модел систем колон карцином“

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 извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 20.04.2026. године,



потпис аутора

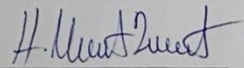
Образац 2

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ
ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

**Употреба наночестица и „3D tumor-on-chip“ напредних технологија у
биолошким истраживањима – Модел систем колон карцином**
истоветне.

У Крагујевцу, 20.04.2026. године,



потпис аутора

Образац 3

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Невена Миливојевић Димитријевић,

☒ дозвољавам

☐ не дозвољавам

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

Употреба наночестица и „3D tumor-on-chip“ напредних технологија у биолошким истраживањима – Модел систем колон карцином

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

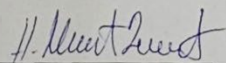
☐ не дозвољавам¹

¹ 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 прерада²

У Крагујевцу, 20.04.2026. године,



потпис аутора

² 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/>