



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Milica P. Matijević

**Ispitivanje interakcije fotoosetljivog
nanokompozitnog sistema baziranog na
nedopiranim i dopiranim česticama titanijum
(IV) oksida s biomolekulima i ćelijama**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2022.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCES AND MATHEMATICS
DEPARTMENT OF CHEMISTRY



Milica P. Matijević

**Investigations of the interaction of photo-
sensitive nanocomposite system based on
undoped and doped titanium oxide
nanoparticles with biomolecules and cells**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2022.

Подаци о докторској дисертацији

Ментор:	др Драган Ђорђевић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу
Наслов:	Испитивање интеракције фотоосетљивог наноконструктивног система базираног на недопираним и допираним честицама титанијум (IV) оксида с биомолекулима и ћелијама
Резиме:	<p>Наноструктурна неорганска једињења попут TiO_2 могу се користити као системи за доставу лекова и фотоосетљивих супстанци (ФС) у фотодинамичкој терапији (ФДТ) заснованој на светлосном стимулансу. Ова дисертација истражује примену ФДТ с немодификованим TiO_2 (колоидим наночестицама, TiO_2 НЧ; пролатним наносфероидима, TiO_2 ПНС) и модификованим (допираним наночестицама, N- и C-TiO_2 НЧ; коњугованим с моделом цитостатика у наноконструктивног система, НКС). Трансмисионом електронском микроскопијом потврђене су нано-димензије (5-104 nm), док су дифракциона рендгенска анализа и Раманска спектроскопија утврдиле да је код испитиваних TiO_2 доминантна светлосно-најактивнија кристална форма – анатас. Затим, формиран су НКС координацијом TiO_2 НЧ и ПНС с Ru(II) комплексом – цис-дихлоробис(2,2'-бипиридил-4,4'-дикарбоксилна киселина) рутенијум(II). За модификовани TiO_2, UV-Vis спектроскопијом потврђена је апсорпција у видљивој области и прорачунате су умањене вредности енергетских процепа. Електронском парамагнетном резонантом спектроскопијом установљено је присуство хидроксиал радикала у воденој суспензији TiO_2 ПНС и C-TiO_2 НЧ, док реактивне кисеоничне врсте нису детектоване код TiO_2 НЧ и N-TiO_2 НЧ. За НКС, <i>in vitro</i> су установљени профили продуженог константног отпуштања Ru(II) комплекса. Наиме, отпуштање комплекса на рН 7 је знатно спорије под утицајем видљиве светлости у односу на UV или одсуство светлости. Додатна инкапсулација НКС у мале униламеларне везикуле значајно је сузбила отпуштање комплекса. Конфокалном микроскопијом утврђен је добар ћелијски унос испитиваних TiO_2. Тестови вијабилности на нетрансформисаним ћелијама након инкубације с TiO_2 НЧ и ПНС, потврдили су њихову биокompatibilност. Фототоксична активност испитиваних TiO_2 је тестирана на ћелијским линијама канцера. Најзначајнији пад вијабилности остварен је комбинованим третманом с C-TiO_2 НЧ и плавим светлом код ћелијске линије HeLa. Штавише, показано је да C-TiO_2 НЧ подстичу механизме програмиране ћелијске смрти, што иде у прилог погодним особинама ФС за ФДТ.</p>
Научна област: Научна дисциплина:	Хемија Општа и неорганска хемија
Кључне речи:	Фотодинамичка терапија, TiO_2 , наноконструктивног систем, Ru(II) комплекс, енергетски процеп, реактивне кисеоничне врсте, фотосензитер, цитотоксичност, врсте ћелијске смрти, АНОВА
УДК:	(678 + 661.882) : 577.1 (678 + 661.882) : 576.3
CERIF класификација:	P 003 i P 360 Хемија и Неорганска хемија
Тип лиценце Креативне заједнице:	CC BY-NC-ND

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Dragan Đorđević, Ph.D., full professor, Faculty of Science and Mathematics, University of Niš
Title:	Investigations of the interaction of photo-sensitive nanocomposite system based on undoped and doped titanium oxide nanoparticles with biomolecules and cells
Abstract:	<p>Nanostructured inorganic compounds such as TiO₂ may be used as drug delivery carriers and photosensitizers (PSs) in light-based therapy – photodynamic therapy (PDT). This doctoral dissertation explores the implementation of PDT with unmodified TiO₂ (colloidal nanoparticles, TiO₂ NPs; prolate nanospheroids, TiO₂ PNSs) and modified (doped nanoparticles, N- and C-TiO₂ NPs; conjugated to a cytostatic model in the nanocomposite systems, NCSs).</p> <p>Transmission Electron Microscopy confirmed the nanosize (5-104 nm), whereas X-ray diffraction and Raman spectroscopy revealed predomination of the most photo-active form – anatase of the investigated TiO₂. Afterwards, NCSs were formed by coordination of TiO₂ NPs and PNS to the Ru(II) complex with cytostatic properties – <i>cis</i>-dichlorobis(2,2'-bipyridyl-4,4'-dicarboxylic acid) ruthenium(II). For the modified TiO₂, UV-Vis spectroscopy and bandgap calculations confirmed the visible light absorption. Electron paramagnetic resonance spectroscopy revealed the presence of hydroxyl radical in water suspensions of TiO₂ PNSs and C-TiO₂ NPs, whereas no reactive oxygen species were detected in suspensions of TiO₂ NPs and N-TiO₂ NPs.</p> <p>For NCS, the long-term constant release profiles of the Ru(II) complex were established <i>in vitro</i>. Namely, the complex release at pH 7 induced by visible light was slower compared to UV and light's absence. Furthermore, additional encapsulation of NCS in the small unilamellar vesicles significantly suppressed the complex release but with no light-induced effect.</p> <p>Confocal microscopy revealed good cells' internalization of the assessed TiO₂. Viability tests on non-transformed cells upon the incubation with unmodified TiO₂ indicated good biocompatibility. The photocytotoxic activity of the investigated TiO₂ was tested on several cancer cell lines. The most significant viability reduction has been achieved by the combined treatment with C-TiO₂ NPs and blue light on the HeLa cell line. Moreover, C-TiO₂ NPs promoted the programmed cells' death mechanisms, contributing to their exceptional PS features for PDT.</p>
Scientific Field:	Chemistry
Scientific Discipline:	General and Inorganic Chemistry
Key Words:	Photodynamic therapy, TiO ₂ , nanocomposite system, Ru(II) complex, band gap, ROS, photosensitizer, cytotoxicity, cell death modalities, ANOVA
UDC:	(678 + 661.882) : 577.1 (678 + 661.882) : 576.3
CERIF Classification:	P 003 and P 360 Chemistry and Inorganic Chemistry
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-ND



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	Монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Милица П. Матијевић
Ментор, МН:	Драган Ђорђевић
Наслов рада, НР:	Испитивање интеракције фотоосетљивог нанокompatитног система базираног на недопираним и допираним честицама титанијум (IV) оксида с биомолекулима и ћелијама
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2022.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	7 поглавља, 126 стране, 221 цитат, 7 табела, 53 слике, 2 прилога
Научна област, НО:	хемија
Научна дисциплина, НД:	општа и неорганска хемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	фотодинамичка терапија, TiO_2 , нанокompatитни систем, $Ru(II)$ комплекс, енергетски процеп, реактивне кисеоничне врсте, фотосензитер, цитотоксичност, врсте ћелијске смрти, АНОВА
УДК	(678 + 661.882) : 577.1 (678 + 661.882) : 576.3
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	Израду ове дисертације финансирао је Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (бр. пројекта ОИ 1702011 и бр. тема истраживања 0402107 и 0902107). Највећи део експерименталног рада реализован је у Институту за нуклеарне науке Винча. Део експеримената је урађен у ЕПР Лабораторији Факултета за физичку хемију Универзитета у Београду, Лабораторији за имунотерапију, Микробиолошког института Чешке Академије Наука у Прагу, у оквиру мултилатералног пројекта Даномика (ДС 2016-0052) и на Одсеку за оптичке науке и инжењерство Универзитета Фудан, Шангај, Кина у оквиру билатералног пројекта бр. 451-00-478/2018-09/16.



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Извод, ИЗ:	<p>Наноструктурна неорганска једињења попут TiO_2 могу се користити као системи за доставу лекова и фотоосетљивих супстанци (ФС) у фотодинамичкој терапији (ФДТ) заснованој на светлосном стимулансу. Ова дисертација истражује примену ФДТ с немодификованим TiO_2 (колоидим наночестицама, TiO_2 НЧ; пролатним наносфероидима, TiO_2 ПНС) и модификованим (допираним наночестицама, N- и C-TiO_2 НЧ; коњугованим с моделом цитостатика у нанокомполитне системе, НКС). Трансмисионом електронском микроскопијом потврђене су нано-димензије (5-104 nm), док су дифракциона рендгенска анализа и Раманска спектроскопија утврдиле да је код испитиваних TiO_2 доминантна светлосно-најактивнија кристална форма – анатас. Затим, формиран су НКС координацијом TiO_2 НЧ и ПНС с Ru(II) комплексом – цис-дихлоробис(2,2'-бипиридил-4,4'-дикарбоксилна киселина) рутенијум(II). За модификовани TiO_2, UV-Vis спектроскопијом потврђена је апсорпција у видљивој области и прорачунате су умањене вредности енергетских процепа. Електронском парамагнетном резонантом спектроскопијом установљено је присуство хидроксил радикала у воденој суспензији TiO_2 ПНС и C-TiO_2 НЧ, док реактивне кисеоничне врсте нису детектоване код TiO_2 НЧ и N-TiO_2 НЧ. За НКС, <i>in vitro</i> су установљени профили продуженог константног отпуштања Ru(II) комплекса. Наиме, отпуштање комплекса на pH 7 је знатно спорије под утицајем видљиве светлости у односу на UV или одсуство светлости. Додатна инкапсулација НКС у мале униламеларне везикуле значајно је сузбила отпуштање комплекса. Конфокалном микроскопијом утврђен је добар ћелијски унос испитиваних TiO_2. Тестови вијабилности на нетрансформисаним ћелијама након инкубације с TiO_2 НЧ и ПНС, потврдили су њихову биокомпатибилност. Фотоцитотоксична активност испитиваних TiO_2 је тестирана на ћелијским линијама канцера. Најзначајнији пад вијабилности остварен је комбинованим третманом с C-TiO_2 НЧ и плавим светлом код ћелијске линије HeLa. Штавише, показано је да C-TiO_2 НЧ подстичу механизме програмиране ћелијске смрти, што иде у прилог погодним особинама ФС за ФДТ.</p>
Датум прихватања теме, ДП:	24.09.2018.
Датум одбране, ДО:	
Чланови комисије, КО: Председник:	
Члан:	
Члан:	
Члан:	
Члан, ментор:	



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Milica P. Matijević
Mentor, MN :	Dragan Đorđević
Title, TI :	Investigations of the interaction of photo-sensitive nanocomposite system based on undoped and doped titanium oxide nanoparticles with biomolecules and cells
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2022.
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	7 chapters, 126 pages, 221 references, 7 tables, 53 figures, 2 appendixes
Scientific field, SF :	Chemistry
Scientific discipline, SD :	General and Inorganic Chemistry
Subject/Key words, S/KW :	Photodynamic therapy, TiO ₂ , nanocomposite system, Ru(II) complex, band gap, ROS, photosensitizer, cytotoxicity, cell death modalities, ANOVA
UDC	(678 + 661.882) : 577.1 (678 + 661.882) : 576.3
Holding data, HD :	library
Note, N :	The research of this PhD was funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic of Serbia (project's no. OI 1702011 and research topic's no. 0402107 and 0902107). Most of the experimental work was realized in Vinca Institute of Nuclear Sciences. Some experiments were conducted in the EPR Laboratory of the Faculty of Physical Chemistry, University of Belgrade, Laboratory for Immunotherapy, Microbiological Institute of the Czech Academy of Sciences, Prague, the Czech Republic, within the multilateral project Danomika (DS 2016-0052), and at the Department of Optical Sciences and Engineering, Fudan University, Shanghai, People Republic of China as part of the bilateral project no. 451-00-478/2018-09/16.



ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ

KEY WORDS DOCUMENTATION

<p>Abstract, AB:</p>	<p>Nanostructured inorganic compounds such as TiO₂ may be used as drug delivery carriers and photosensitizers (PSs) in light-based therapy – photodynamic therapy (PDT). This doctoral dissertation explores the implementation of PDT with unmodified TiO₂ (colloidal nanoparticles, TiO₂ NPs; prolate nanospheroids, TiO₂ PNSs) and modified (doped nanoparticles, N- and C-TiO₂ NPs; conjugated to a cytostatic model in the nanocomposite systems, NCSs).</p> <p>Transmission Electron Microscopy confirmed the nanosize (5-104 nm), whereas X-ray diffraction and Raman spectroscopy revealed predomination of the most photo-active form – anatase of the investigated TiO₂. Afterwards, NCSs were formed by coordination of TiO₂ NPs and PNS to the Ru(II) complex with cytostatic properties – <i>cis</i>-dichlorobis(2,2'-bipyridyl-4,4'-dicarboxylic acid) ruthenium(II). For the modified TiO₂, UV-Vis spectroscopy and bandgap calculations confirmed the visible light absorption. Electron paramagnetic resonance spectroscopy revealed the presence of hydroxyl radical in water suspensions of TiO₂ PNSs and C-TiO₂ NPs, whereas no reactive oxygen species were detected in suspensions of TiO₂ NPs and N-TiO₂ NPs.</p> <p>For NCS, the long-term constant release profiles of the Ru(II) complex were established <i>in vitro</i>. Namely, the complex release at pH 7 induced by visible light was slower compared to UV and light's absence. Furthermore, additional encapsulation of NCS in the small unilamellar vesicles significantly suppressed the complex release but with no light-induced effect.</p> <p>Confocal microscopy revealed good cells' internalization of the assessed TiO₂. Viability tests on non-transformed cells upon the incubation with unmodified TiO₂ indicated good biocompatibility. The photocytotoxic activity of the investigated TiO₂ was tested on several cancer cell lines. The most significant viability reduction has been achieved by the combined treatment with C-TiO₂ NPs and blue light on the HeLa cell line. Moreover, C-TiO₂ NPs promoted the programmed cells' death mechanisms, contributing to their exceptional PS features for PDT.</p>
<p>Accepted by the Scientific Board on, ASB:</p>	<p>24.09.2018.</p>
<p>Defended on, DE:</p>	
<p>Defended Board, DB:</p>	
<p>President:</p>	
<p>Member:</p>	
<p>Member:</p>	
<p>Member:</p>	
<p>Member, Mentor:</p>	

Mnoge stvari u životu su teško dostižne bez pomoći i podrške saradnika, prijatelja i porodice, kao što je za mene bila izrada ove disertacije. Mnogo je ljudi kojima sam zahvalna i potrudicu se da ih sve pomenem na ovoj stranici. S druge strane, iako sam zahvalna i na svim izazovima i preprekama prilikom izrade disertacije, njih neću pominjati. Pominjem ih samo ovde kao važan deo puta koji je učinio da mi srce bude puno iskrene zahvalnosti prema svima koji su mi pomogli da ih prevaziđem, a dostignuti cilj draži.

Najpre, jedinstvenu vrstu zahvalnosti imam prema **Dr Maji Nešić**, naučnom saradniku Instituta za Nuklearne nauke Vinča. Pored mentorstva, konstrukcionih predloga i angažovanja u eksperimentima, njoj sam zahvalna i na prijateljskoj ruci koju mi je pružila još pre početka naše saradnje, kao i na podršci i pomoći u svakom životnom aspektu. Majo, veliko je zadovoljstvo biti tvoj saradnik i radujem se svim budućim eksperimentima, diskusijama i druženju koje nam nesumnjivo predstoji.

Veliku zahvalnost dugujem profesorima s Prirodno Matematičkog Fakulteta u Nišu – **Dr Draganu Đorđeviću**, na stručnim savetima i ukazanom razumevanju i **Dr Maji Stanković** koja me je usmeravala i savetovala od samog početka doktorskih studija.

Izuzetnu zahvalnost dugujem saradnicima iz moje istraživačke grupe Instituta za Nuklearne nauke Vinča, **Dr Marijani Petković** i **Dr Milutinu Stepiću**, koji su svoje znanje i iskustvo uložili u stvaranje dobrih uslova za ovo istraživanje. Njima se zahvaljujem i na poverenju koje su mi poklonili, kao i na svakom stručnom i prijateljskom savetu. Marijani se posebno zahvaljujem što me je naučila da se svaki problem može prevazići, kao i da se posvećenost i vredan rad uvek na kraju isplate. Veoma sam zahvalna **Dr Mariji Nišavić** na velikodušnosti, brojim korisnim savetima i podršci. Duboku zahvalnost iskazala bih i **Dr Ivi Popović**. Prelepa je i vredna stvar imati tebe za saradnika i prijatelja.

Dr Mariji Radoičić sam zahvalna na dobroj višegodišnjoj saradnji i na nesebičnom deljenju svog znanja i iskustva iz oblasti nanomaterijala.

Dr Leli Korićanac i **Dr Jeleni Žakula** dugujem veliku zahvalnost na nesebičnom deljenju svog znanja i svesrdnoj pomoći u radu s ćelijskim linijama. Dr Leli Korićanac se dodatno zahvaljujem što je kao član komisije svojim komentarima značajno poboljšala kvalitet ove teze.

Prof. Dr Milošu Mojoviću s Fakulteta za fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu se zahvaljujem što je omogućio merenja na EPR-u. **Dr Đuri Nakarada** se zahvaljujem kako na pomoći oko merenja i sređivanja rezultata, tako i na uloženom vremenu, trudu i veoma korisnim sugestijama i komentarima koje mi je dao u svojstvu člana komisije.

Ne bih mogla da ne pomenem i podršku **Dr Ljupča Hadžievskog**, **Dr Sandre Maluckov**, **Dr Petre Beličev** i svih ostalih saradnika iz zgrade 51, Laboratorije za Atomsku Fiziku 040, Instituta za Nuklearne nauke Vinča. Svi oni, bez izuzetka, učinili su da naše radno okruženje ima toplinu doma.

Neopisiva je zahvalnost koju osećam prema svojoj majci **Živoslavi**. Osim podrške i pomoći tokom pisanja teze, ona mi je dala veliki motiv i unela lični karakter u ovo istraživanje, stoga njoj posvećujem ovu tezu. Svom suprugu **Milošu** dugujem ogromnu zahvalnost na bezgraničnoj ljubavi i nemejljivoj podršci. Hvala ti što si bio moj nepokolebljivi oslonac tokom svih ovih godina.

I na kraju, zahvaljujem se **Vidaku**, a njegovo postojanje je najveći i dovoljni razlog za to.

Milica Matijević

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	4
2.1. Terapija kancera, aspekti unapređenja i razvoja novih pristupa i citostatika	4
2.1.1. Sistemi za ciljanu i kontrolisanu dostavu citostatika	6
2.2. Nanoterapeutici i nosači za ciljanu i kontrolisanu dostavu citostatika	7
2.2.1. Načini akumulacije nanoterapeutika u tumorskom tkivu	8
2.2.2. Vrste nanoterapeutika i njihova dosadašnja primena.....	9
2.2.3. Stimulisana terapija – koncept i prednosti primene nanočestica osetljivih na stimulanse	13
2.3. Fotodinamička terapija	14
2.3.1. Osnovi fotodinamičke terapije	15
2.3.2. Mehanizam stvaranja i delovanja reaktivnih kiseoničnih vrsta	16
2.3.3. Mehanizmi ćelijske smrti indukovane fotodinamičkom terapijom	17
2.3.4. Prednosti primene fotodinamičke terapije u odnosu na tradicionalne terapije kancera	19
2.3.5. Ograničenja u primeni fotodinamičke terapije – optičke osobine kože i fotosenzibilacija	20
2.3.6. Osobine klinički primenjenih fotoosetljivih supstanci	22
2.4. Nanostrukturni TiO ₂	25
2.4.1. Kristalne forme nanostrukturnog TiO ₂	25
2.4.2. Fotohemijske osobine TiO ₂	27
2.4.3. Poboljšavanje karakteristika nanostrukturnog TiO ₂	30
2.4.4. Biološka primena nanostrukturnog TiO ₂	33
2.4.5. Nanostrukturni TiO ₂ kao fotoosetljiva supstanca i nosač za medikamente – pregled dosadašnjih istraživanja	34
2.5. Rutenijumovi kompleksi u fotodinamičkoj terapiji.....	36
2.5.1. Rutenijumovi kompleksi kao fotoosetljive supstance u konjugaciji s nanostrukturnim TiO ₂	37

3. ZADATAK RADA	39
4. EKSPERIMENTALNI DEO	40
4.1. Hemikalije i reagensi	40
4.2. Sinteza kompleksa [Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂].....	42
4.3. Sinteza nanostrukturnih TiO ₂ čestica	43
4.3.1. Sinteza koloidnih TiO ₂ nanočestica	43
4.3.2. Sinteza prolatnih nanosferoida TiO ₂	43
4.3.3. Sinteza N i C dopiranih TiO ₂ nanočestica	44
4.4. Formiranje nanokompozitnih sistema	44
4.4.1. Inkapsuliranje nanočestičnog nanokompozitnog sistema u male unilamelarne vezikule	45
4.5. Instrumentalne metode	46
4.5.1. Masena spektrometrija zasnovana na jonizaciji potpomognutoj laserskom desorpcijom iz matriksa koja koristi analizator masa na bazi vremena preleta.....	46
4.5.2. Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija	47
4.5.3. Infracrvena spektroskopija s Furijeovom transformacijom – FTIR	47
4.5.4. Ramanska spektroskopija.....	47
4.5.5. Rendgenska difrakciona analiza	48
4.5.6. Konfokalna Ramanska mikroskopija.....	48
4.5.7. Transmisiona elektronska mikroskopija – TEM.....	48
4.5.8. Epifluorescentna mikroskopija	49
4.5.9. Laserska skenirajuća konfokalna mikroskopija	49
4.5.10. Elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija – EPR.....	50
4.5.11. Analiza i praćenje nanočestica – NTA.....	50
4.5.12. Određivanje površinskog naelektrisanja suspenzije	51
4.5.13. Merenje intenziteta primenjene svetlosti	51
4.6. Sedimentacioni esej – određivanje efikasnosti vezivanja kompleksa [Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂] za površinu nanostrukturnih TiO ₂	51
4.7. <i>In vitro</i> praćenje kinetike otpuštanja [Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂] kompleksa s površine nosača (TiO ₂ nanočestica) pod uticajem vidljive i UV svetlosti	52

4.8.	Ćelijski unos i (foto)citotoksičnost [Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂] kompleksa, nanostrukturnih TiO ₂ i nanokompozitnih sistema.....	53
4.8.1.	Ćelijske kulture – gajenje i tretman	53
4.8.2.	Ispitivanje ćelijskog unosa i unutarćelijske distribucije nanostrukturnih TiO ₂ ...	54
4.8.3.	Određivanje stepena preživljavanja ćelija nakon tretmana – testovi vijabilnosti	55
4.9.	Statistička obrada podataka	57
5.	REZULTATI I DISKUSIJA REZULTATA	58
5.1.	Sinteza i karakterizacija.....	58
5.1.1.	Sinteza i karakterizacija kompleksa [Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂].....	58
5.1.2.	Karakterizacija nanostrukturnih TiO ₂	60
5.1.2.1.	Koloidne TiO ₂ nanočestice stabilizovane na pH 7	61
5.1.2.2.	Strukturalna karakterizacija prolatah nanosferoida TiO ₂	62
5.1.2.3.	Strukturalna karakterizacija C i N dopiranih TiO ₂ nanočestica.....	66
5.1.3.	Sinteza i karakterizacija nanokompozitnih sistema.....	68
5.1.3.1.	Strukturalna karakterizacija nanokompozitnog sistema s koloidnim TiO ₂ nanočesticama	70
5.1.3.2.	Strukturalna karakterizacija nanokompozitnog sistema s TiO ₂ prolatah nanosferoidima.....	72
5.1.3.3.	Strukturalna karakterizacija nanokompozitnog sistema s dopiranim TiO ₂ nanočesticama	73
5.2.	Optičke osobine nanokompozitnog sistema i TiO ₂ nanočestica	75
5.2.1.	Energetski procep nanokompozitnog sistema i njegovih komponenti	75
5.2.2.	Poboljšanje optičkih svojstava TiO ₂ nanočestica dopiranjem.....	77
5.2.2.1.	Energetski procep C dopiranih nanočestica TiO ₂	77
5.2.2.1.	Energetski procep N dopiranih nanočestica TiO ₂	79
5.3.	Kinetika otpuštanja kompleksa [Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂] s površine TiO ₂ nosača	79
5.3.1.	Uticaj inkapsulacije nanokompozitnog sistema u male unilamelarne vezikule na kinetiku otpuštanja	83
5.4.	Ćelijski unos.....	84
5.4.1.	Ćelijski unos i unutarćelijska distribucija koloidnih nanočestica TiO ₂ i nanokompozitnog sistema.....	84

5.4.2. Ćelijski unos i unutarćelijska distribucija prolatnih nanosferoida TiO ₂ i nanokompozitnog sistema.....	84
5.4.3. Ćelijski unos i unutarćelijska distribucija C i N dopiranih nanoćestica TiO ₂	87
5.5. Citotoksićna aktivnost kompleksa [Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂], nanostrukturnih TiO ₂ i nanokompozitnih sistema prema ćelijskim linijama.....	88
5.5.1. Citotoksićna aktivnost nemodifikovanog nanostrukturnog TiO ₂	89
5.5.1.1. Fotocitotoksićna aktivnost nemodifikovanog nanostrukturnog TiO ₂ ispitana na tumorskim ćelijskim linijama	91
5.5.2. Citotoksićna aktivnost C i N dopiranih nanoćestica TiO ₂	94
5.5.2.1. Fotocitotoksićna aktivnost dopiranih TiO ₂ nanoćestica	95
5.5.3. Citotoksićna aktivnost nanokompozitnih sistema i njihovih komponenti.....	99
5.5.3.1. Fotocitotoksićna aktivnost nanokompozitnog sistema i njegovih komponenti .	101
5.6. Oksidativna aktivnost modifikovanih nanostrukturnih TiO ₂	103
5.6.1. Oksidativna aktivnost nanoćestica i prolatnih nanosferoida TiO ₂	104
5.6.2. Oksidativna aktivnost dopiranih TiO ₂ nanoćestica	105
6. ZAKLJUĆAK	108
LITERATURA	111
<i>Prilog 1 Rezultati ispitivanja citotoksićnosti utvrćeni pomoću testova vijabilnosti.....</i>	<i>121</i>
<i>Prilog 2 Rezultati ispitivanja fotocitotoksićnosti utvrćeni pomoću SRB testa vijabilnosti</i>	<i>122</i>
Biografija	123
Bibliografija.....	124

Skraćenice i oznake

¹ O ₂	singletni kiseonik
3T3	ćelijska linija mišjih fetalnih fibroblasta
4T1	ćelijska linija mišjeg karcinoma mlečnih žlezda
A375	ćelijska linija humanog melanoma
A549	ćelijska linija humanog kancera bazalnih alveolarnih epitelijalnih ćelija
ANOVA	analiza varijansi (akronim od engl. <i>Analysis Of Variance</i>)
AO	akridin oranž
ATCC	engl. <i>American Type Culture Collection</i>
ATR	način rada uređaja FTIR – prigušena totalna refleksija (engl. <i>Attenuated Total Reflection</i>)
Balb/c	soj albino laboratorijskih miševa
B16-F10	3D ćelijska kultura mišjeg melanoma
BSA	Goveđi serumski albumin (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>)
C6	ćelijska linija glioma pacova
CCD	vrsta detektora (engl. <i>Charge-Coupled Device</i>)
CEM	linija limfoblastičnog kancera
cisplatina	<i>cis</i> -diamindihloridoplatina(II)
CRM	konfokalna Ramanska mikroskopija (engl. <i>Confocal Raman Microscopy</i>)
C-TiO ₂ NČ	nanočestice titan(IV)-oksida dopirane ugljenikom
CV	test vijabilnosti s agensom kristal violet (engl. <i>crystal violet</i>)
<i>dcbpy</i>	2,2'-bipiridil-4,4'-dikarboksilna kiselina
DCF	dihlorofluorescin
DCFH-DA	2,7-dihlorofluorescin diacetate
DEAE	dietilaminoetil
DEPMPO	5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirolin- <i>N</i> -oksid
DHB	2,5-dihidroksibenzojeva kiselina
DIC	diferencijalni interferentni kontrast
DLS	dinamičko rasejanje svetlosti (engl. <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMEM	ćelijski medijum (engl. <i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i>)
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilenediamintetrasirćetna kiselina
Eg	energetski procep – region bez energetskih nivoa kod poluprovodnika (engl. <i>band gap</i> ili <i>energy gap</i>)
EPR	elektronska paramagnetna rezonancija
EPRE	efekat povećane permeabilnosti i zadržavanja (engl. <i>Enhanced Permeability and Retention Effect</i>)
F98	ćelije glioma pacova vrste <i>Rattus norvegicus</i>
FBS	fetalni teleći serum (engl. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDT	fotodinamička terapija
FS	fotoosetljiva supstanca

FTIR	infracrvena spektroskopija s Furijeovom transformacijom (engl. <i>Fourier-transform InfraRed</i>)
GBM	oznaka za tip ćelijskih linija glioblastoma
H ₂ DCFDA	2',7'-dihlorodihidrofluorescin diacetat
H ₂ O ₂	vodonik-peroksid
HCl	hlorovodonična kiselina
HeLa	humane epitelijalne ćelije kancera grlića materice (ćelijka linija nazvana po pacijentkinji <i>Henrietta Lacks</i>)
HepG2	ćelijska linija humanog kancera jetre
HL60	ćelijska linija humane mijeloidne leukemije
HO ₂ [•]	hidroperoksidni radikal
HPMA	N-(2-hidroksipropil)-metaakrilamid
HRTM	način rada kod transmisionog elektronskog mikroskopa kojim je moguće posmatrati atomske strukture uzoraka (engl. <i>High Resolution Transmission Electron Microscopy</i>)
JCPDS	internacionalna baza difraktograma (engl. <i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>)
K562	ćelijska linija humane eritoleukemije
karboplatina	<i>cis</i> -diamin(1,1-ciklobutandikarboksilato)platina(II)
KB	ćelijska linija nazofaringealnog karcinoma
KP1019	<i>trans</i> -tetrahlorobis(1H-indazol)rutenat(III)
LoVo	ćelijska linija humanog kancera debelog creva
LSCM	laserska skenirajuća konfokalna mikroskopija (engl. <i>Laser Scanning Confocal Microscopy</i>)
M059K	ćelijska linija glioblastoma
MALDI TOF	masena spektrometrija zasnovana na jonizaciji potpomognutoj laserskom desorpcijom iz matriksa koja koristi analizator masa na bazi vremena preleta (engl. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight</i>)
MCF-7	ćelijska linija humanog adenokarcinoma dojke
MDA-MB-468	ćelijska linija humanog karcinoma dojke
MLCT	transfer naelektrisanja od metala ka ligandu (engl. <i>Metal to ligand charge transfer</i>)
MTT	test vijabilnosti zasnovan na aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza
MUV	male unilamelarne vezikule
NCT	prefiks za identifikacioni broj pod kojim je zavedena određena klinička studija (engl. <i>National Clinical Trial</i>)
NČ NKS	nanočestični nanokompozitni sistem
NIR	bliska infracrvena oblast (engl. <i>Near InfraRed</i>)
NKS	nanokompozitni sistem
NTA	metoda za praćenje i analizu nanočestice (engl. <i>Nanoparticles Tracking Analysis</i>)
N-TiO ₂ NČ	nanočestice titan(IV)-oksida dopirane azotom

O ₂ ^{•-}	superoksidni anjon radikal
•OH	hidroksilni radikal
oksalipatina	[SP-4-2(1 <i>R-trans</i>)]-(1,2-cikloheksandiamin- <i>N,N'</i>)[etandioat(2-)-O,O']platina
PANC-1	ćelijska linija humanog kancera pankreasa
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PEG	polietilenamin
PI	propidijum jodid
PNS NKS	prolatno nanosferoidni nanokompozitni sistem
PSD	fragmentacije do kojih dolazi nakon procesa ubrzavanja u masenom spektrometru
PZ	provodna zona poluprovodnika
<i>R,R</i> -dach	1,2-Diaminocikloheksan- <i>N,N'</i> -bis(2-difenilfosfinobenzoil)
RITC	rodamin-B-izotiocianat
RKV	reaktivne kiseonične vrste (engl. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
rpm	broj obrtaja u minuti (engl. <i>revolution per minute</i>)
RPMI-1640	oznaka za vrstu ćelijskog medijuma (engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
[Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂]	<i>cis</i> -dihlorobis(2,2'-bipiridil-4,4'-dikarboksilna kiselina) rutenijum(II)
S-91	ćelijska linija mišjeg (DBA/2) melanoma
SKBR3	ćelijska linija humanog kancera dojke
SRB	test vijabilnosti s agensom sulforhodamin B
T-24	ćelijska linija humanog karcinoma bešike
TBHB	tert-butil hidroperoksid
TEM	transmisiona elektronska mikroskopija (engl. <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TFA	trifluoro sirćenta kiselina
TiO ₂	titan(IV)-oksid
TiO ₂ NČ	TiO ₂ , koloidne nanočestice
TiO ₂ PNS	TiO ₂ , prolatni nanosferoidi
TiO ₂ Ws	TiO ₂ oblika <i>whiskers</i> -a (doslovno prevedeno s engleskog – brkovi)
TLC	tanskoslojna hromatografija (engl. <i>Thin Layer Chromatography</i>)
TLD1433	4-metil-2-(4-metilpiridin-2-il)piridin;rutenijum(2+);2-[5-(5-tiofen-2-iltiofen-2-il)tiofen-2-il]-1H-imidazo[4,5-f][1,10]penantrolin dihlorid
Tris	pufer tris-hidroksimetilaminometan
UV	ultraljubičasti deo spektra svetlosti
Vis	vidljivi deo spektra svetlost
VZ	valentna zona poluprovodnika
WST-8	2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazolijum, mononatrijumova so
XRD	rendgenska difrakciona analiza (engl. <i>X-ray Diffraction</i>)

1. UVOD

Dok maligne bolesti nastavljaju da ugrožavaju živote ljudi širom sveta, razvijaju se nove terapije i pristupi terapiji kancera koji imaju za cilj da uz visoku uspešnost lečenja smanje pojavu neželjenih efekata. Posebnu pažnju istraživača okupirala su različita jedinjenja nano-dimenzija koja pokazuju obećavajući potencijal kao sistemi za dostavu lekova i fotoosetljive supstance (FS) u terapiji zasnovanoj na svetlosnom stimulansu – fotodinamičkoj terapiji (FDT). Iako je do sada razvijen veliki broj nosača za dostavu lekova, klinički se primenjuje samo nekoliko tipova organskih nosača (lipozomski i albuminski) i nekoliko neorganskih, uglavnom baziranih na nanočesticama gvožđa.

Među neorganskim jedinjenjima, u svojstvu nanostrukturnog nosača ističe se potencijal za upotrebu titan(IV)-oksida (TiO_2) usled njegove dobre dostupnosti, stabilnosti, biokompatibilnosti i mogućnosti modifikacije površine. Ovaj neorganski oksid je zbog poluprovodničke prirode foto-aktivan u ultraljubičastoj oblasti elektromagnetnog spektra, te uz modifikacije koje bi omogućile apsorpciju u vidljivoj oblasti, ima potencijal za primenu kao FS. Nakon izlaganja nanostrukturnog TiO_2 svetlosnom stimulansu dolazi do pobuđivanja njegovih elektrona u valentnoj zoni. Ovi elektroni u prisustvu molekulskog kiseonika utiču na hiperprodukciju reaktivnih kiseoničnih vrsta koje dovode do oštećenja ćelija u okruženju, i na kraju do njihove smrti. Na taj način, FDT ima ciljano-lokalni karakter, dok se podešavanjem talasne dužine i intenziteta svetlosti omogućava doziranje koncentracije leka. Imajući u vidu izložene prednosti FDT, ne iznenađuje činjenica da se već nekoliko vrsta kancera uspešno klinički leči na ovaj način. Međutim, usled prevelike fotosenzibilacije kod pacijenata nakon terapije nekom od klinički odobrenih FS, postoji potreba za pronalaskom novih sistema s citostatikom ili FS koji bi umanjili neželjene efekte FDT i omogućili njenu rutinsku i masovnu kliničku primenu.

Uporedo s razvojem sistema za ciljanu i kontrolisanu dostavu citostatika za potrebe FDT, razvijaju se i citostatici nove generacije. Ovi potencijalni hemioterapeutici su najčešće bazirani na prelaznim metalima, od kojih iako prednjače istraživanja kompleksa platine, ne izostaju ni istraživanja kompleksa drugih prelaznih metala, pogotovo rutenijuma. Razlog velikog interesovanja za komplekse rutenijuma su njihove brojne prednosti u odnosu na komplekse platine, poput specifičnog načina delovanja, manje toksičnosti, veće selektivnosti i aktivnosti na linijama kancera i metastazama na kojima su platinski kompleksi neaktivni.

Sagledavajući navedeno, kao i činjenicu da do sada, ni nanostrukturni TiO_2 ni kompleksi rutenijuma nisu klinički primenjeni u FDT, u okviru prve faze istraživanja ove

disertacije ispitani su nanokompozitni sistemi (NKS), koji predstavljaju sisteme *antitumorski agens-nosač*, zasnovane na kompleksu rutenijuma s osobinama citostatika i nanostrukturnih TiO₂ s osobinama nosača. U narednoj fazi ispitane su i dopirane TiO₂ nanočestice s poboljšanim optičkim osobinama koje su ispoljile dobre osobine FS.

U **Opštem delu** su u kratkim crtama predstavljeni pristupi terapiji kancera koji se najčešće primenjuju u kliničkoj praksi, kao i mogućnosti njihovog unapređivanja. Istaknut je značaj kompleksa platine i rutenijuma, kao i njihovog kombinovanja s nanonosačima za ciljanu i kontrolisanu dostavu lekova. Dat je i pregled vrsta neorganskih nanoterapeutika s dosadašnjom primenom. S osvrtom na koncept stimulisane terapije, detaljnije su predstavljene karakteristike FDT (koncept, mehanizmi, prednosti i nedostaci). Preciznije su opisane i karakteristike nanostrukturnog TiO₂, s aspekta njegove multifunkcionalnosti, a istaknute su njegove fizičko-hemijske i biološke osobine, posebno fotohemijske, kao i mogućnosti njegovog poboljšavanja. Na kraju opšteg dela, sumiran je pregled dosadašnjih istraživanja u kojima su uspešno primenjeni nanostrukturni TiO₂ kao nosači i FS, i kompleksi rutenijuma kao FS/antitumorski agensi.

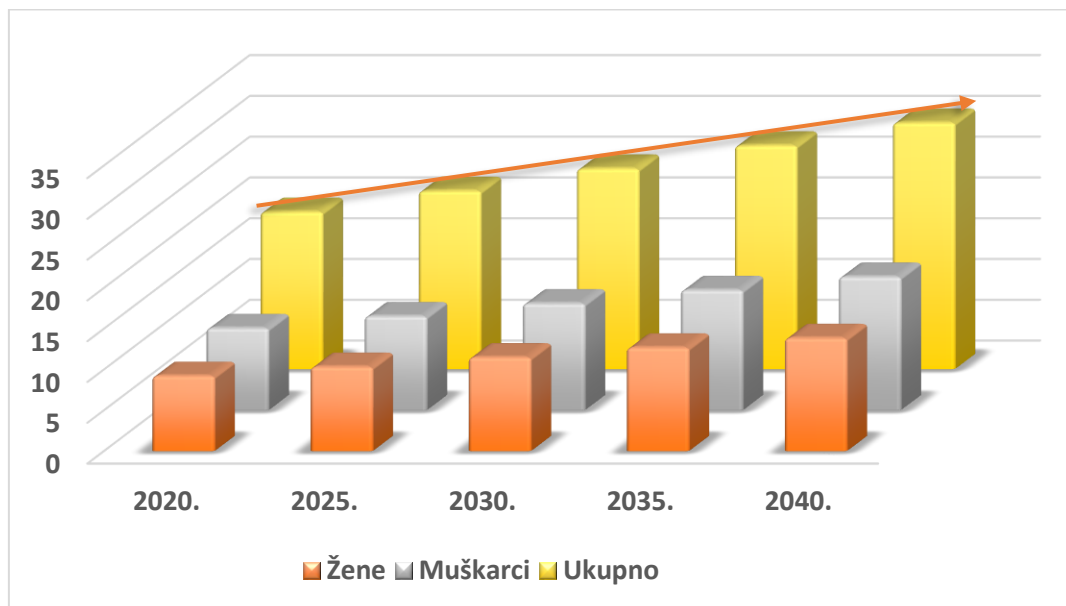
U **Eksperimentalnom delu** dat je pregled korišćenih hemikalija, opisana je sinteza i karakterizacija kompleksa *cis*-dihlorobis(2,2'-bipiridil-4,4'-dikarboksilna kiselina) rutenijum(II) ([Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂]), nanostrukturnih TiO₂ i NKS na bazi ispitivanih TiO₂/[Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂]. Detaljno su opisane instrumentalne metode kojima su okarakterisani NKS i njihove komponente: MALDI masena spektrometrija, UV-Vis spektrofotometrija uz primenu *Kubelka-Munk* i *Tauc* proračuna za određivanje vrednosti energetske procepa, infracrvena spektroskopija s Furijeovom transformacijom, Ramanska spektroskopija, rendgenska difrakciona analiza, konfokalna Ramanska mikroskopija, transmisiona elektronska mikroskopija, kao i metode za određivanje površinskog naelektrisanja. Prikazan je način na koji je određena stabilnost NKS, tj. efikasnost vezivanja komponenti (sedimentacioni esej) i metoda za praćenje kinetike otpuštanja kompleksa s nosača. Za modifikovane sisteme s TiO₂ (NKS i dopirane TiO₂ nanočestice) takođe su dati uslovi i metode za ispitivanja njihove biološke aktivnosti. U okviru toga detaljno su dati uslovi pri kojima su uzgajane i tretirane ćelijske linije, uslovi ozračivanja za praćenje fotoaktivnosti, kao i priprema i metode za praćenje njihovog ćelijskog unosa, uticaja na stepen preživljavanja ćelija i određivanje mehanizma ćelijske smrti (laserska skenirajuća konfokalna mikroskopija, konfokalna Ramanska mikroskopija, epifluorescentna mikroskopija, elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija).

Poglavlje **Rezultati i diskusija rezultata** prikazuje rezultate ostvarene u ovoj disertaciji dobijene ispitivanjem hemijsko-fizičkih osobina kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$, nanostrukturnih TiO_2 i NKS, kao i njihove optičke i biološke aktivnosti. Najpre su predstavljeni rezultati njihove strukturne karakterizacije s detaljnom analizom spektara dobijenih gorepomenutim spektroskopskim metodama, dok je optička karakterizacija data kroz izračunate vrednosti energetske rascepa za NKS i dopirane TiO_2 nanočestice. Uz strukturnu karakterizaciju NKS prikazane su i vrednosti efikasnosti vezivanja kompleksa, kao i profili brzine otpuštanja kompleksa s nosača pri različitim uslovima (pH vrednostima koje simuliraju uslove zdravog, pH~7 i tumorskog tkiva, pH~5, u mraku i u prisustvu UV i vidljive svetlosti). Biološka aktivnost NKS i nanostrukturnih TiO_2 je predstavljena kroz ćelijski unos i unutarćelijsku distribuciju, citotoksičnu aktivnost na netumorskim i tumorskim ćelijskim linijama. Pored navedenog, prikazana je fotocitotoksična aktivnost na tumorskim linijama i oksidativna aktivnost nanostrukturnih TiO_2 . Dodatno, za nanočestice TiO_2 dopirane ugljenikom ispitivani su i mehanizmi ćelijske smrti.

2. OPŠTI DEO

2.1. Terapija kancera, aspekti unapređenja i razvoja novih pristupa i citostatika

Decenijama unazad kancer je među vodećim uzrocima smrtnosti u svetu. Prema podacima Internacionalne Agencije za istraživanja o kanceru (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC) GLOBOCAN u toku 2020. godine na svetskom nivou zabeleženo je 19,3 miliona novih slučajeva karcinoma i skoro 10,0 miliona smrtnih slučajeva širom sveta.^[1] Na osnovu statističkih podataka koji ukazuju na progresivan trend rasta broja obolelih tokom godina, očekivan broj novoobolelih slučajeva u 2040. godini je značajno veći i iznosi 30,2 miliona (Slika 1).



Slika 1. Trend porasta broja slučajeva obolelih od kancera praćen u periodu od 2020. do 2040. godine (izvor Svetska Zdravstvena Organizacija). Predviđanje porasta broja obolelih do 2040. godine izvedeno je pomoću GLOBOCAN platforme (<https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>).

Iako je očigledan napredak imunološke, genske terapije i personalizovanog pristupa ciljane terapije, za klinički tretman malignih tumora i dalje se najčešće primenjuju hemioterapija, zračenje, hirurški zahvati, kao i njihove kombinacije. Nedostaci hemioterapije su sistemski neželjeni efekti, operativni zahvat je često praćen remisijom i neizvodljiv je u uznapredovalim fazama, kao i za teško pristupačne tumore, dok je zračenje dozno ograničeno zbog kumulativnog efekta. Stoga, postoji velika potreba za poboljšanjem klasičnih tretmana karcinoma i pronalaskom efikasnijih rešenja koja povećavaju stepen pozitivnih ishoda lečenja

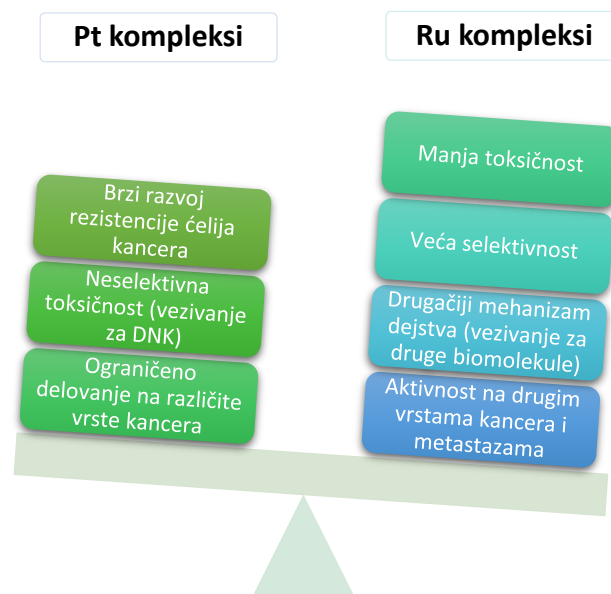
uz smanjen obim nuspojava. Iz ove potrebe proizilaze brojna istraživanja čiji je predmet razvoj kako novih citostatika, tako i alternativnih, manje invazivnih terapija kancera.

Za kliničko lečenje, trenutno se koriste hemioterapeutici različite hemijske strukture: citotoksični antibiotici (*Doxorubicin*, *Mitomycin*), antimetaboliti (*Fluoropyrimidine*, *Methotrexate*), antimikrotubularni agensi (*Vincristine*, *Paclitaxel*), inhibitori topoizomeraze (*Irinotecan*, *Kamptotecan*) i alkilirajući agensi (*Cisplatin*),^[2] koji izazivaju mnogobrojne neželjene efekte. Neželjeni efekti hemioterapije su najvećim delom posledica neselektivnog karaktera citostatika – podjednakog delovanja na ćelije kancera i zdrave ćelije koje se dele. Dodatno, njihovo brzo izbacivanje iz cirkulacije značajno smanjuje koncentraciju leka u ciljnom tumorskom tkivu, što takođe rezultuje u smanjenoj efikasnosti hemioterapeutika. Povrh svega, ćelije kancera mogu brzo da mutiraju ili aktiviraju sopstvene odbrambene mehanizme, razvijajući otpornost prema primenjenom medikamentu.^[3-6]

Citostatici u kojima je platina centralni jon – cisplatin, karboplatin i oksaliplatin čine 50-70% od ukupne terapije koja se primenjuje za lečenje pacijenata obolelih od kancera. Izražena ototoksičnost, neurotoksičnost i nefrotoksičnost koju ispoljavaju kompleksi Pt(II)^[7] su posledica neselektivnog vezivanja Pt(II) za molekule dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) kako ćelija kancera, tako i zdravih ćelija, čime je sprečena njihova dalja deoba i podstaknuta apoptoza – programirana ćelijska smrt.^[8] Uprkos nedostacima kompleksa platine i *in vitro* i *in vivo* potvrđenoj antitumorskoj aktivnosti koordinacionih kompleksa Au(III), Pd(II), Ru(II) i Ru(III), Os(II), Ti(IV), Sn(IV), Ga(III), Cu(II), Zn(II) i Bi(III) od neorganskih kompleksa u kliničkoj praksi trenutno se primenjuju isključivo kompleksi na bazi platine.^[9-14]

Jedan od pravaca istraživanja je usmeren na ispitivanje novih kompleksa platine drugog oksidacionog stanja, kao i kompleksa rutenijuma, od kojih mnogi ispoljavaju visoku efikasnost, čak i protiv metastaza.

Naime, kompleksi rutenijuma su pokazali antikancerogene efekte na tumorskim linijama protiv kojih su kompleksi Pt(II) bili neefikasni, ali i povećanu selektivnost prema ćelijama karcinoma i manju toksičnost prema normalnim ćelijama u poređenju sa postojećim citostaticima na bazi platine (Slika 2). Kompleksi rutenijuma i njihova primena u terapiji kancera predmet su posebnog poglavlja, 2.5.



Slika 2. Prikaz ključnih karakteristika kompleksa rutenijuma u odnosu komplekse platine.

2.1.1. Sistemi za ciljanu i kontrolisanu dostavu citostatika

Izražene probleme u primeni citostatika kao što su slaba rastvorljivost u vodenim rastvorima, brza ekskrecija iz organizma i neželjeni efekti moguće je prevazići formiranjem sistema nosač-citostatik. Dva su osnovna zadatka nosača za medikamente koja utiču na poboljšanje rezultata terapije:

- **Ciljano dostavljanje** medikamenta do tumorskog tkiva gde lek ispoljava svoje farmakološko delovanje, umanjuje mogućnost njegovog delovanja na zdravo tkivo i neželjene efekte terapije;
- **Kontrola brzine otpuštanja** medikamenta s nosača u tumorskom tkivu koja značajno doprinosi efikasnosti same terapije.

Ciljanu dostavu medikamenta omogućava modifikacija površine nosača, kao što je vezivanje liganada sposobnih da se specifično vežu za ciljanu grupu receptora na tumorskim ćelijama.^[15] Kontrola brzine otpuštanja medikamenta se postiže primenom nosača koji ima određeno svojstvo čija promena direktno utiče na kinetiku otpuštanja medikamenta. Postepenom promenom ovog svojstva nosača, kontroliše se količina medikamenta i vremenski interval otpuštanja. Ciljanom dostavom i kontrolisanim otpuštanjem moguće je prilagoditi terapiju specifičnim potrebama pacijenta.

Nosači treba da poseduju određene osobine:

- a) mala veličina
- b) biološka razgradivost
- c) laka eliminacija iz organizma nakon dostave.

Takođe, potrebno je da budu dobrog vezujućeg kapaciteta za citostatik, sposobni da održe njegovu visoku koncentraciju u cirkulaciji, da nisu imunogeni i da njihova primena dovodi do akumuliranja citostatika u tumorskom tkivu i ćelijama kancera.^[16] Ukratko, zahtevi koje bi nosač trebalo da ispunjava su “zadrži, izbegni, ciljaj i oslobodi”, (engl. *Retain, Evade, Target, Release*).^[17] Nosači za medikamente koji su razvijeni do sada mogu da se klasifikuju u tri grupe:

- 1) Sintetski (polimeri, neorganske nanočestice, kompozitni materijali, itd.)
- 2) Prirodni (nosači s aminokiselinama – peptidi, fosfolipidi, enzimi, različiti proteini, itd.)
- 3) Ćelijski (eritrociti, makrofagi, bakterije, virusi, itd.)

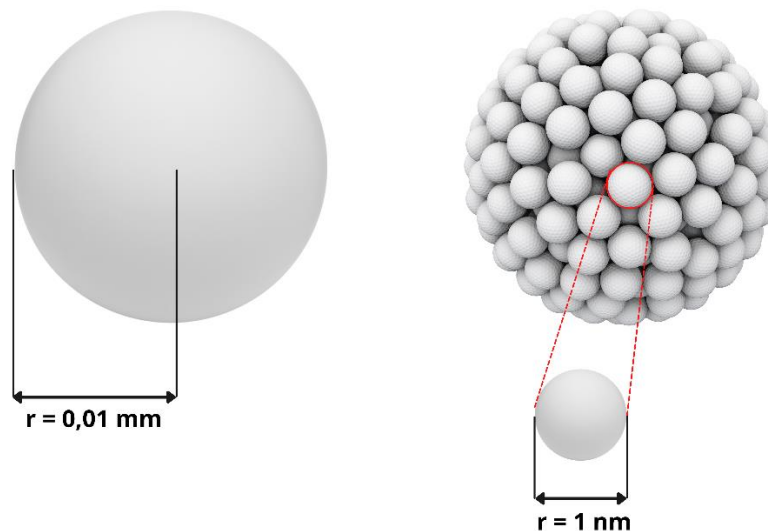
Razvijeni su i različiti pristupi u dizajniranju i primeni nosača, a u literaturi se kao najefikasniji ističu micelle, lipozomi, hidrogelovi, tečni kristali i nanočestice za koje medikamenti mogu biti hemijski vezani (kovalentno ili adsorbovani) ili fizički inkapsulirani u unutrašnjosti nosača.^[18]

2.2. Nanoterapeutici i nosači za ciljanu i kontrolisanu dostavu citostatika

Nanonosači predstavljaju grupu nosača za medikamente s jedinstvenim svojstvima. Svođenjem materijala na nano-dimenzije značajno se menjanju fizičko-hemijske osobine u odnosu na osobine polaznog materijala. Naime, kod nanomaterijala, prisutan je značajno veći broj atoma na površini (Slika 3) čime su promenjene njihove optičke, fotokatalitičke osobine, kao i parametri kristalne rešetke.

Sa stanovišta isporuke lekova, nanonosači bi trebalo da poseduju svojstva koja su pogodna kako sa fiziološkog, tako i s anatomskog aspekta. Za omogućavanje interakcija nanonosača na molekulskom nivou, najvažnije je da je njihova veličina uporediva s veličinom ćelije (10-100 μm), virusa (20-450 nm), proteina (5-50 nm) ili gena (širine 2 nm i dužine 10-100 nm).^[19] Podaci iz literature sugerišu da se izraz „nano“ u nanomedicini uglavnom odnosi na čestice $< 5 \mu\text{m}$ ^[20] budući da se veće čestice zadržavaju u kapilarima i predstavljaju opasnost

za ljudski život.^[21] Makrofagi uklanjaju čestice veće od 500 nm, dok je endocitoza^l karakteristična za manje čestice. Nanočestice koje su manje od 100 nm lako prolaze u tkivo kroz otvore endotelnog zida krvnih sudova.^[22] Mnoge studije su pokazale da je za isporuku lekova idealan opseg veličina od 5-250 nm.^[23]



Slika 3. Ilustracija povećanja specifične površine usled smanjenja veličine čestica na nano-dimenzije.

Pored veličine, na mogućnost i efikasnost unosa nanočestica u ćelije utiče njihov oblik kao i nadograđene površinske funkcije. Modifikacije na površini nanočestica mogu da obezbede specifičnu interakciju s ćelijskim receptorima, povoljnu kvašljivost, naelektrisanje, povećanu kontaktnu površinu ili utiču na stvaranje efikasne i dinamične kontaktne površine (nano-bio međupovršina).^[24]

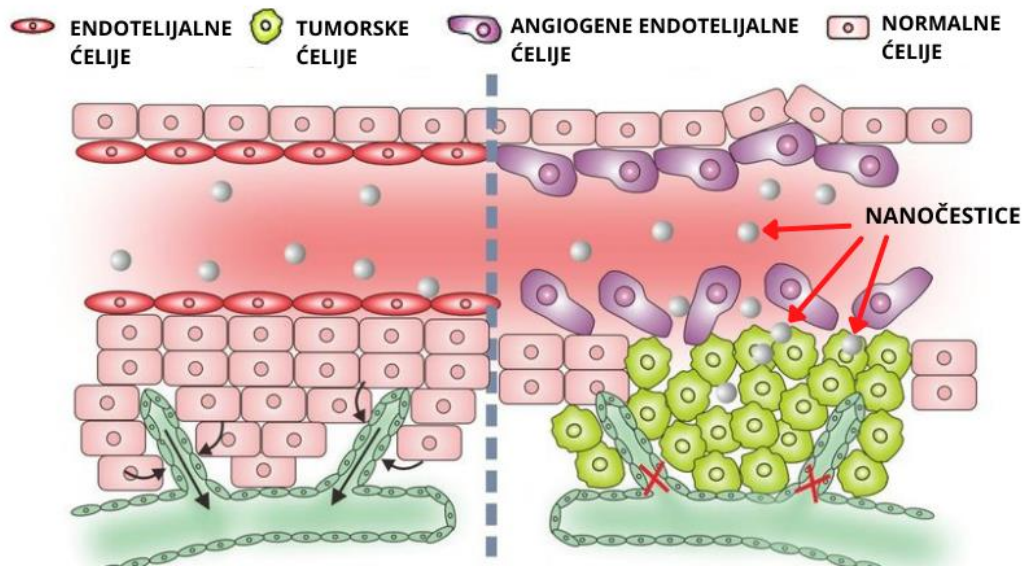
2.2.1. Načini akumulacije nanoterapeutika u tumorskom tkivu

U tumorskom tkivu se lakše akumuliraju i zadržavaju nosači za citostatike nano-dimenzija, te za njih postoje dva načina akumulacije – aktivni i pasivni način:

- **Aktivno akumuliranje** nanočestica postiže se vezivanjem liganda na površini nanočestica koji interaguje s membranskim receptorima koje ćelije kancera povećano ekspimiraju na svojoj površini. Kao ligandi, najčešće su ispitivani proteini (transferin),^[25] polimeri (heparin, ursolinska kiselina, kurkumin)^[26] i mali molekuli (folna kiselina).^[27]

^l Endocitoza je osnovni ćelijski proces putem koga ćelije unose različite makromolekule unutar ćelije iz svoj vanjskog okruženja. U osnovi se deli na fagocitozu, makropinocitozu i mikropinocitozu (endocitozu u užem smislu).

• **Pasivno akumuliranje** nanočestica oslanja se na efekat povećane permeabilnosti i zadržavanja (EPRE¹) nanočestica od strane tumorskog tkiva koji je posledica povećane vaskularne propustljivosti. Naime, u tumorskom tkivu intercelularni prostor je veći (400–800 nm) u poređenju sa zdravim tkivom. S obzirom da tumorsko tkivo nema razvijen limfno-drenažni sistem kao kod zdravih ćelija, ekskrecija nanočestica je sporija^[28], što doprinosi produženoj interakciji nanoterapeutika s ćelijama kancera (Slika 4).



Slika 4. Ilustracija pasivnog akumuliranja nanočestica usled EPRE-a. S leve strane isprekidane poprečne linije je prikazano zdravo tkivo, dok je s njene desne strane prikazano tumorsko tkivo. Prilagođeno iz literature ^[29].

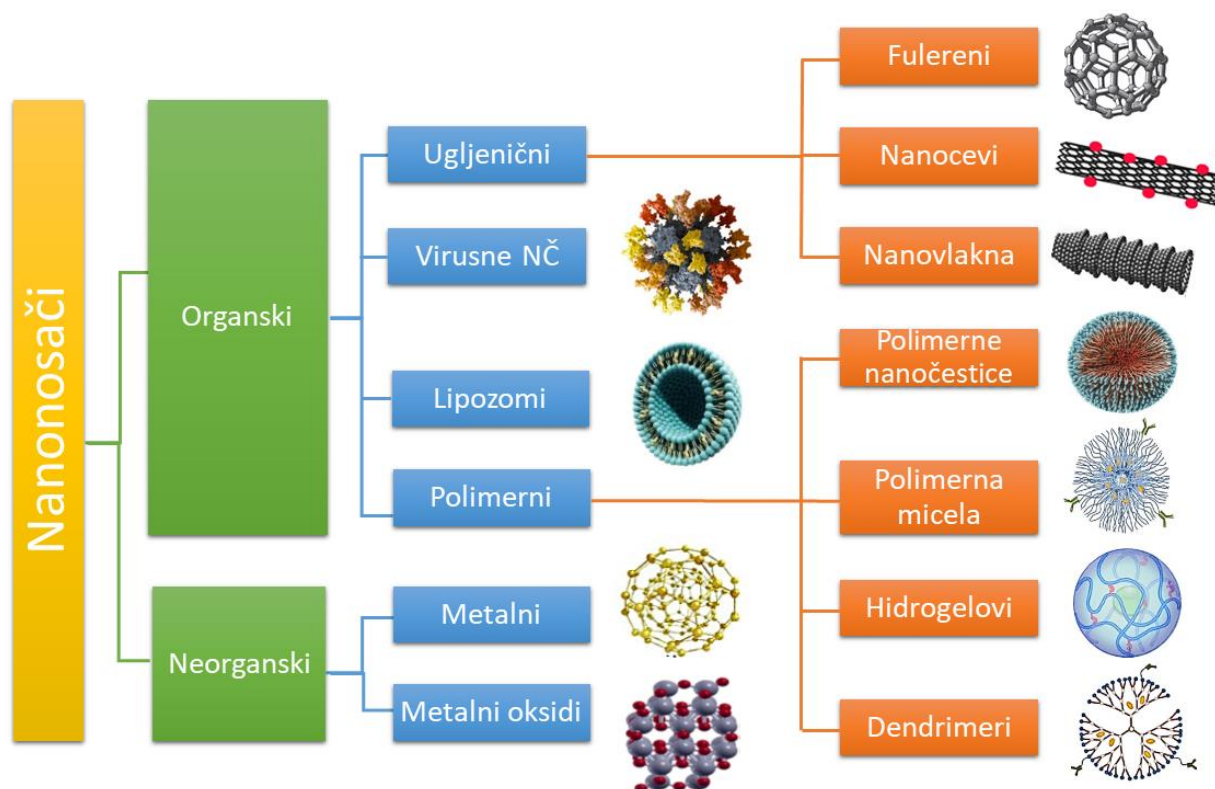
2.2.2. Vrste nanoterapeutika i njihova dosadašnja primena

Nanoterapeutici najvećim delom predstavljaju sisteme – konjugate nanonosaa i leka, a mogu biti i agensi za zračne terapije ili dijagnostički agensi kod magnetne rezonance, dok veoma mali broj nanočestica samostalno ispoljava terapijski efekat. Danas postoji veliki izbor nanonosaa koji imaju mogućnost terapijskog i/ili dijagnostičkog (engl. *theragnostic*) dostavljanja medikamenta, a koji se mogu klasifikovati u dve grupe na osnovu hemijskog sastava – organske i neorganske, kao što je sumirano na Slici 5.

Organski nanonosaači predstavljaju široku grupu jedinjenja na bazi ugljenika i ugljovodonika, kao što su različiti polimeri, micele, lipozomi i ugljenični nanomaterijali. Neorganski nanonosaači su uglavnom nešto jednostavnije strukture i predstavljaju čestice na

¹ U literaturi na engleskom jeziku ova skraćenica se uobičajeno upotrebljava u obliku EPR od engl. *Enhanced Permeability and Retention Effect*. U ovoj disertaciji je s dodatnim “E” na kraju skraćenice napravljena razlika u odnosu na drugu skraćenicu - EPR (engl. *Electron Paramagnetic Resonance*).

bazi metala, metalnih oksida i metalnih kompozita, a kako su oni predmet ove disertacije, u narednom poglavlju su detaljnije opisane njihove osobine.



Slika 5. Klasifikacija nanonosača i ilustracije njihovih struktura.

2.2.2.1. Neorganski nanoterapeutici

Neorganski nanoterapeutici su metalni kompoziti i oksidi metala čija je osnovna prednost veliki odnos površine prema zapremini usled visoke gustine i ograničene veličine ugla na ivicama površine. U sistemima za dostavu lekova, metalne nanočestice karakteriše mogućnost površinske funkcionalizacije i širi spektar metoda koje se mogu koristiti za praćenje biodistribucije u odnosu na organske sisteme. Modifikacija površine nanočestica omogućava kontrolisanu promenu svojstava, čime se utiče na brzinu rastvaranja i razgradnje, katalitičku aktivnost i stabilizaciju medikamenta.^[30] S druge strane, bez obzira na vrstu modifikacije površine, sve neorganske nanočestice su bionerazgrađive.

Sistem za dostavu medikamenata ne sme biti zasnovan na metalima koji imaju biološku ulogu u organizmu. Na primer, metal ne sme biti kofaktor za bilo koji enzim u ćelijama. Ukoliko je to neophodno, konačna koncentracija metala – kofaktora u cirkulaciji, mora da bude ispod nivoa neophodnog za aktiviranje enzima, kako se ne bi ugrozili procesi unutarćelijske signalizacije, ukoliko nisu vezani za terapiju.^[31,32]

Do sada, najviše su ispitivane metalne nanočestice zlata i srebra, metalni oksidi kadmijuma, gvožđa, itrijuma, silicijuma i titanijuma. Ovi metalni oksidi imaju specifičnu strukturnu geometriju, dok elektronska struktura utiče na provodna, poluprovodna ili izolatorska svojstva. Poluprovodnici imaju odvojeni najviši popunjeni elektronski nivo (valentnu zonu, VZ) od najnižeg nepopunjenog nivoa (provodne zone, PZ), između kojih se nalazi region bez energetske zone – energetske procepe (E_g). Kod poluprovodnih metalnih oksida, E_g iznosi 0,5-3,5 eV, što utiče na svojstva ovih nanonosaača po pitanju odziva na svetlosni stimulans. Najčešće ispitivani nanonosaači iz grupe poluprovodnika metalnih oksida su silicijum(IV)-oksid (SiO_2) i titan(IV)-oksid (TiO_2). Nadalje, poluprovodnička svojstva poseduje i grupa metalnih kompozita poznatijih pod nazivom kvantne tačke (Q-tačke). One imaju veliki prelazni dipolni moment i moguće je podešavati njihove apsorpcione i emisione karakteristike.

Pored navedenih neorganskih nanoterapeutika, izučavaju se i načini dopiranja metala i formiranja sistema s organskim nanočesticama, s krajnjim ciljem poboljšanja karakteristika samih nanočestica – efikasnosti dostave, stimulisane i kontrolisane dinamike otpuštanja leka. Dopiranje nanočestica TiO_2 , kao metoda za poboljšanje karakteristika nanonosaača, će biti tema posebnog potpoglavlja 2.4.3.2. Literaturni primeri za nanoterapeutike zasnovane na metalima, metalnim oksidima, metalnim kompozitima, kao i njihove konjugacije s organskim nanonosaačima prikazani su u Tabeli 1.

Od 1974. godine kada je odobren prvi lek – *CosmoFer*^I do leka *Hensify*^{II}, na tržište je izašlo najmanje 25 neorganskih nanoterapeutika, koji većim delom predstavljaju konjugate nanonosaača s medikamentom ili su dijagnostički agensi. Najveći broj komercijalnih nanoterapeutika je zasnovan na gvožđu, a koriste se za lečenje anemije i različitih vrsta kancera (*Ferrahem*, *DexFerrum*, *Venoferr*, *Monoferr* i *Diafer*) i za termalnu ablaciju glioblastoma (*NanoTherm* neradioaktivnog talijuma. Ostali nanoterapeutici zasnovani na gvožđu su dijagnostički agensi (*Sinerem*). Pored dijagnostike pomoću nanočestice s gvožđem, odobreni su i kontrastni agensi *Omniscan* i *Optimark* u čijoj osnovi je gadolinijum.^[33]

^I *CosmoFer* ($\text{Fe}(\text{OH})_3$ s oblogom od dekstrana male molekulske težine) je lek za anemiju.

^{II} *Hensify* (HfO_2) je agens za radiološku terapiju različitih karcinoma.

Tabela 1. Literaturni pregled različitih vrsta neorganskih nanočestica.

Nanočestice	Struktura	Karakteristike	Ref.
Au CdSe i CdTe Y ₂ O ₃ Fe ₂ O ₃ , Co	Koloidni rastvori	Fototermalni efekat Fotoluminescencija u obliku fluorescencije Fosforescencija Magnetni momenat	[34]
<i>Feridex</i>	Koloid s oblogom od dekstrana male molekulske težine, veličina čestica od 120-180 nm	Magnetni momenat Dijagnostički agens	[35]
CoFe ₂ O ₄	Nanočestice dispergovane u hidrogelu alginata	Magnetni momenat Vezivanje za proteine albumina	[36]
Fe ₃ O ₄ Fe ₃ O ₄ -PEG	Nanočestice veličine 80 ± 5 nm Funkcionalizacija PEG-om molekulima, 46 ± 0,6 nm	Magnetni momenat Povećana akumulacija u plućima usled aglomeracije u <i>in vivo</i> sistemima Magnetni moment Potencijal za hipertermalni tretman kancera	[37]
Pt-Au-PEG	Nanočestice Au funkcionalizovane PEG monoslojem s tiolnim grupama oivičenim karboksilnim grupama kompleksa [Pt(<i>R,R</i> -dach)]	Funkcionalizacija PEG-om sprečava formiranje agregata Povećan unos u odnosu na sam kompleks Pt(<i>R,R</i> -dach)] Nanočestice omogućavaju dostavu kompleksa [Pt(<i>R,R</i> -dach)] do ćelija kancera, a zatim i njegovo oslobađanje	[38]
Scg8-AuAg	AuAg nanorodovi označeni molekularnim aptamerom Scg8	Visoka hipertermalna efikasnost i selektivnost ka CEM ćelijskoj liniji u odnosu na sam aptamer	[10]
S1MPs, S2MPs	Mezoporozne SiO ₂ nanočestice, S1MPs s velikim porama su napunjene S2MPs	Visoka biokompatibilnost Veliki odnos površine prema zapremini pora Kontrolisana dinamika otpuštanja medikamenta	[39]
Ta-TiO ₂	Nanočestice dispergovane u dejonizovanoj vodi i ćelijskom medijumu (DMEM)	Značajna citotoksičnost indukcijom RKV Značajna genotoksičnost uzrokovana oštećenjima DNK molekula	[40]
N-TiO ₂	Nanočestice dispergovane u ćelijskom medijumu (DMEM-H)	Poboljšana apsorpcija u vidljivom delu spektra Izražena fotocitotoksičnost	[41]
Skraćenice: 1,2-Diaminocyclohexane- <i>N,N'</i> -bis(2-diphenylphosphinobenzoyl) (<i>R,R</i> -dach), <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM). DMEM bez fenol crvenog, piruvata i glutamina (DMEM-H).			

Pored gorenavedenih, postoji veliki broj metalnih nanoterapeutika za koje se trenutno sprovode klinička istraživanja. Nanočestice TiO₂ su trenutno u I fazi kliničkih ispitivanja za

lečenje infekcije kandidom (preliminarna studija NCT¹03666195) i upotrebu u stomatologiji (NCT02950584, I faza).

2.2.3. Stimulisana terapija – koncept i prednosti primene nanočestica osetljivih na stimulanse

Najveći izazov i cilj unapređivanja terapije kancera je obezbeđivanje selektivnog delovanja hemioterapeutika. Jedan od načina prevazilaženja ograničenja postojeće terapije kancera je razvoj novog koncepta tretmana koji bi se pojednostavljeno sastojao iz tri faze:

Faza 1. Intravenozna ili intraperitonealna primena leka (ili proleka) u obliku konjugata s nanočesticama ili primena neaktivnog oblika nanoterapeutika.

Faza 2. Akumulacija dovoljne koncentracije leka/nanoterapeutika u ciljnom tkivu koja se može odigrati pasivno ili aktivno.

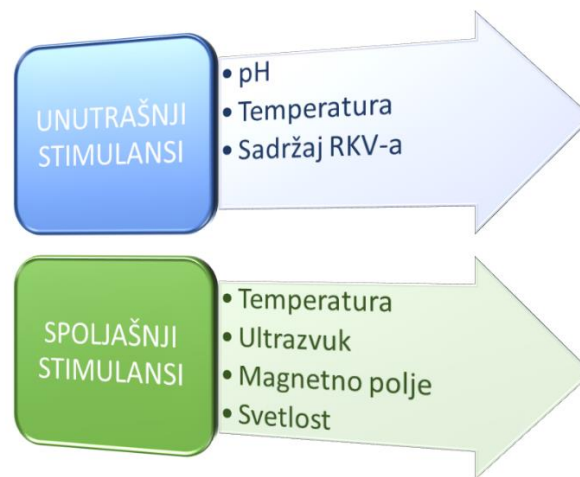
Faza 3. Prevođenje leka/nanoterapeutika u aktivni oblik uz pomoć spoljašnjih ili unutrašnjih stimulanasa.^[42] Stimulansi dovode do hemijskih ili fizičkih promena u osobinama nanoterapeutika i/ili do otpuštanja leka s nanonosaa te se antitumorsko dejstvo ispoljava na ciljanom mestu i u željenom trenutku.

Kada je reč o sistemu nanonosaa-lek, nakon aplikacije postoji puno poteškoća za uspešnu akumulaciju leka u ciljnom tumorskom tkivu. Pored toga što ostvaruje povoljan tip veze s medikamentom, nanonosaa bi trebalo da poveća njegovu rastvorljivost u fiziološkim uslovima, produži polu-život leka u cirkulaciji i olakša prolazak kroz biološke barijere. Uz sve navedeno, potrebno je i da poseduje osobinu koja može da se menja posredstvom određenog stimulanasa.

Stimulansi za aktivaciju otpuštanja leka se mogu podeliti na unutrašnje i spoljašnje (Slika 6). Unutrašnji stimulansi, tzv. *in vivo* stimulansi, predstavljaju promenu sredine koja je posledica karakteristika tumorskog tkiva po kojima se razlikuje od zdravog, kao što je niža pH vrednost, hipertermija (povišena lokalna temperatura za 1-2 °C) i povišena koncentracija reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV).^[43,44] Iako postoji znatan broj nanočestica koje su osetljive na ovakve promene sredine, nedostatak unutrašnjih stimulanasa je izostanak mogućnosti kontrole i podešavanja brzine otpuštanja leka. Stoga, bolju perspektivu u smislu kontrole pokazuju spoljašnji stimulansi. Primenom odgovarajuće temperature, ultrazvuka, magnetnog

¹ NCT je skraćenica od engl. *National Clinical Trial* i predstavlja jedinstveni identifikacioni broj pod kojim je zavedena određena klinička studija.

polja ili svetlosti postiže se delikatnija kontrola nad aktiviranjem leka i dinamikom otpuštanja što omogućava precizno doziranje leka u ciljnom tkivu.



Slika 6. Podela vrsta stimulansa za otpuštanje leka s nosača.

Kako je u ovoj disertaciji ispitivan sistem za dostavu s potencijalnom primenom u fotodinamičkoj terapiji, dalji tekst je usmeren isključivo na svetlost kao vrstu spoljašnjeg stimulansa za otpuštanje leka s nosača.

2.3. Fotodinamička terapija

U fototerapiji ili helioterapiji pacijent se izlaže svetlosti određene talasne dužine dobijenom pomoću svetlosnog izvora – lasera, dioda ili specijalnih lampi. Ova metoda lečenja je poznata od davnina, a danas se uglavnom koristi za lečenje ili ublažavanje simptoma bolesti kože, tumora, kao i pojedinih neuroloških i psiholoških poremećaja (Parkinsonove bolesti, demencije, depresije). Fototerapija je jedna od prvih terapija koju novorođenče dobija u slučaju povišenog nivoa bilirubina (fiziološke žutice). Svetlost se koristi i kao stimulans u kombinovanom tretmanu različitih bolesti i ovaj vid terapije se naziva fotodinamička terapija (FDT). U kliničkoj praksi, FDT je prvi put upotrebljena za tretman tumora bešike 1976. godine.^[45] Danas, fototerapija i FDT su klinički odobrene terapije za niz karcinoma i nemalignih bolesti. Primera radi, u oftalmologiji hirurško lečenje miopije je zamenila fototerapija, te se za promenu optičkih osobina očne jabučice koristi laser umesto noža. U lečenju degenerativne miopije, tj. koroidne neovaskularizacije primenjuje se tretman lekom – fotoosetljivom supstancom (FS) koji se aktivira pomoću lasera, i ovaj tretman predstavlja jednu od najčešćih, rutinski primenjenih, FDT.

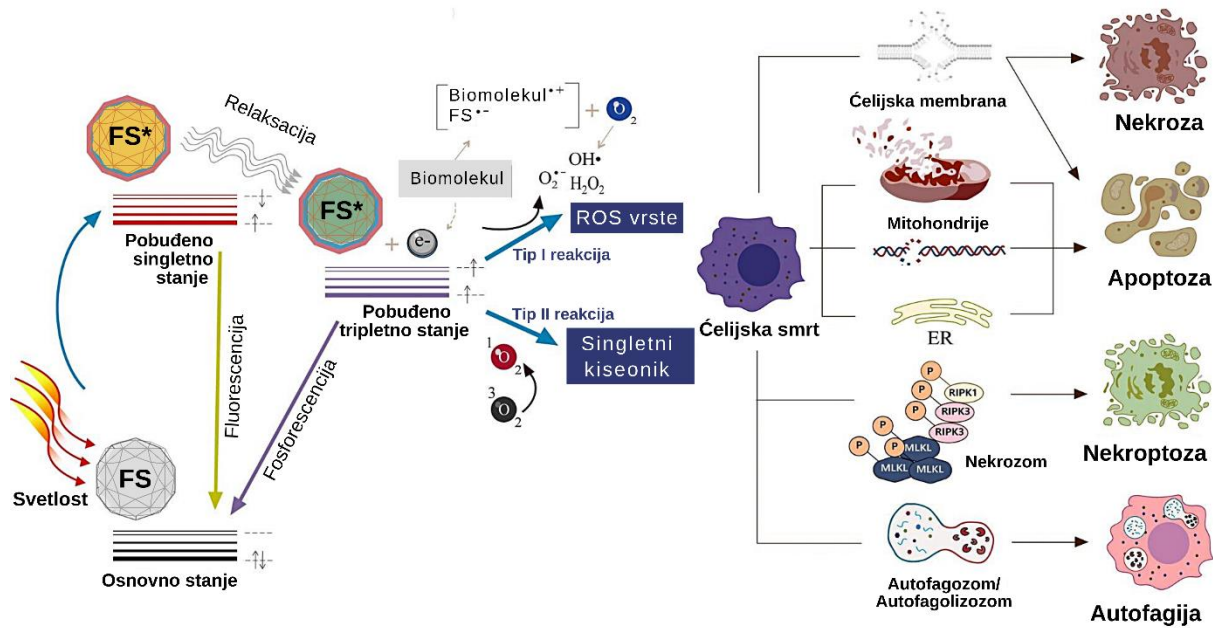
2.3.1. Osnovi fotodinamičke terapije

Prilikom primene FDT, koristi se FS koja se aktivira pomoću svetlosti određene talasne dužine, izazivajući terapijski učinak nepovratnim oštećenjem ciljnih ćelijskih molekula, što dovodi do ćelijske smrti. Pojednostavljeno, princip FDT se oslanja na tri bitne komponente: FS, kiseonik i svetlost. Naime, FS se aktivira tek nakon akumulacije u tumorskom tkivu, što dovodi do stvaranja RKV u prisustvu kiseonika (Slika 7). Povećane koncentracije stvorenih RKV posredstvom FS predstavljaju ključni mehanizam koji dovodi do ćelijskih oštećenja, te i njihove smrti u FDT.



Slika 7. Ilustracija koncepta FDT.

Ozračena FS apsorbuje svetlost čime se pobuđuju elektroni koji prelaze u viši energetski nivo (pobuđeno singletno stanje), označeno s FS* na Slici 8. Kako ovo stanje karakteriše izrazita nestabilnost i kratko vreme polu-života, dolazi do relaksacije u stanja niže energije. Jedan od načina relaksacije je vraćanje elektrona u osnovno stanje, pri čemu dolazi do emitovanja fluorescencije ili toplote u slučaju unutrašnje konverzije. Drugi način je prelazak u tripletno pobuđeno stanje koje karakteriše duže vreme polu-života i koje može da jonizuje molekul vode ili kiseonik (H_2O ili O_2). Rezultat toga je stvaranje povećane koncentracije RKV koje reakcijama s okolnim biomolekulima dovode do oštećenja tretiranog tumorskog tkiva i ćelijske smrti.



Slika 8. Mehanizam stvaranja RKV prilikom ozračivanja FS, kao i prikaz vrsta ćelijske smrti koje mogu da budu indukovane pomoću FDT. Prilagođeno iz literature ^[45].

2.3.2. Mehanizam stvaranja i delovanja reaktivnih kiseoničnih vrsta

Tripletno pobuđeno stanje FS dovodi do hiperprodukcije RKV putem dva tipa reakcije, (Slika 8). Prvi tip su redoks reakcije u kojima FS* u tripletnom pobuđenom stanju reaguje direktno s okolnim supstratima (nezasićenim lipidima, proteinima ili nukleinskim kiselinama) čime se stvaraju katjonske i anjonske radikalske vrste (reakcija tipa I). Ti radikali dalje stupaju u reakciju s kiseonikom, dovodeći do stvaranja niza RKV, kao što su superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikal ($\cdot OH$), ili vodonik peroksid (H_2O_2). U drugom tipu reakcija, FS* u tripletnom pobuđenom stanju prenosi energiju direktno na molekulski kiseonik te nastaje singletni kiseonik – nasetni kiseonik (1O_2 , Slika 8, tip II reakcija). Ovaj tip radikala je najznačajniji u efektu FDT, naročito kod niskog sadržaja kiseonika u obolelom tkivu. Dodatno, u okviru reakcije tipa I, moguć je i direktni prenos elektrona s FS* na okolne molekule vode pri čemu nastaju RKV koji reakcijom s ćelijskim biomolekulima dovode do njihovog oštećenja i ćelijske smrti. Iako odnos između tipa reakcija I i II zavisi od vrste i koncentracije FS, nivoa kiseonika i zračenja, stepen proizvodnje RKV i tačni detalji njihovog delovanja nisu u potpunosti razjašnjeni. Sve stvorene RKV reaguju s ćelijskim biomolekulima dovodeći do različitih vrsta ćelijske smrti. Zbog visoke reaktivnosti i kratkog vremena polu-života,

novonastale RKV oštećuju samo molekule u neposrednoj blizini FS, što obezbeđuje lokalizovan učinak FDT, tj. dolazi do ćelijske smrti isključivo u tretiranim lezijama tkiva.

2.3.3. Mehanizmi ćelijske smrti indukovane fotodinamičkom terapijom

Niz odgovora na oksidativni stres koje FDT pokreće dovode do trajnih oštećenja ćelija i na kraju do ćelijske smrti, kao što je ilustrativno prikazano na Slici 8. Međutim, sam tip smrti koji se indukuje zavisi od tipa ćelije, vrste FS, njene koncentracije i unutarćelijske lokalizacije, jačine i vremena zračenja i raspoložive koncentracije slobodnog kiseonika. Razlike kod glavnih tipova ćelijskih smrti indukovanih FDT (nekroze, nekroptoze, apoptoze i autofagije) prikazuje Tabela 2.

Nekroza je glavni tip ćelijske smrti koje izaziva FDT kada se FS akumulira na ćelijskoj membrani. Ova tzv. slučajna ili iznenadna smrt je posledica fizičkih ili hemijskih oštećenja ćelija, kao i delovanja patogena. Nekroza zahvata veći broj ćelija u populaciji, a karakteriše je uvećanje ćelija, bubrenje citoplazme, urušavanje organela i oštećenja ćelijske membrane. Kao posledica nekroze aktiviraju se signali upalnih procesa, te se ćelijski ostaci uklanjaju kako makrofagima, tako i heterofilnim granulocitima.

Ukoliko je FS pored ćelijske membrane akumulirana i u ćelijskim organelama (jedru, mitohondrijama, endoplazmatičnom retikulumu i lizozomima) verovatnije je da će dominantni tip ćelijske smrti biti apoptoza.^[45] **Apoptoza** je oblik programirane ćelijske smrti koji karakteriše aktiviranje kaspaza, enzima iz familije cistein proteaza, i deo je normalnog procesa u razvoju i starenju ćelija. Do apoptoze dolazi i u cilju zaštite tkiva pokretanjem imunološkog odgovora ili kao reakcija na delovanje toksina ili bolesti.^[46] Ovom vrstom ćelijske smrti bivaju zahvaćene pojedinačne ćelije ili manje grupe (klasteri) ćelija, koje su obično okružene ćelijama zdravog izgleda.

Ćelije kod kojih se indukuje apoptoza odlikuje smanjenje volumena (skupljanje ćelija) i piknoza jedra, dok organele i ćelijska membrana zadržavaju svoje integritet za prilično dug period. U terminalnoj fazi apoptoza dovodi do promena u strukturi citoskeleta i do tzv. baloniranja (engl. *blebbing*) membrane jedra što je praćeno cepanjem jedra i razdvajanjem fragmenata ćelija u apoptotska tela. Njihov sadržaj uklanjaju makrofagi fagocitozom i degradiraju ih u fagolizozomima. Na ovaj način ćelije ne oslobađaju svoj sadržaj u vanćelijski prostor i sprečena je sekundarna nekroza i stvaranje protiv-upalnih citokina. Apoptoza je glavni vid ćelijske smrti malignih ćelija i predstavlja ćelijski odbrambeni mehanizam protiv razvoja

maligniteta.^[47] Međutim, jedna od karakteristika ćelija kancera je sposobnost izbegavanja apoptoze, što predstavlja problem u primeni standardnih tipova terapije. Prednost primene FS koje se osim na ćelijskoj membrani akumuliraju i unutar ćelija, je upravo povećavanje stepena apoptotske smrti ćelija kancera u odnosu na druge mehanizme.

Dok je uloga apoptoze posredovane kaspazom detaljno proučavana još od sredine XX veka, u novije vreme utvrđeno je postojanje još jednog tipa programirane ćelijske smrti – nekroptoze koja predstavlja regulisanu nekrozu. **Nekroptoza** služi kao rezervni mehanizam kada apoptoza ne može da se pokrene. Dok mehanizam indukcije nekroptoze ima zajedničke tačke procesa s apoptozom, morfološke karakteristike odgovaraju nekrozi. Nadalje, nekroptoza karakteriše formiranje strukture zvane nekrozom (Slika 8) koji dalje inicira nekrotične morfološke promene.^[48] Takođe, nekroptoza izaziva inflamatorni odgovor u okolini ćelija koji može da podstakne tumorogenezu i metastaziranje, dok u isto vreme izaziva i imunološki odgovor koji, s druge strane, može da spreči progresiju tumora.

Pored navedenih načina smrti koji FDT može da inicira u ćelijama kancera, na Slici 8 prikazana je i **autofagija**. Ovaj proces u kome ćelija digestira sopstvenu citoplazmu i organele pokreće se u cilju dobijanja biomolekula koji su od suštinskog značaja za njeno preživljavanje. Do autofagije dolazi kao odgovor ćelije na različite stresove, poput smanjene količine hrane, faktora rasta i kiseonika, delovanje hemioterapeutika i zračenja.^[49] Autofagija je, poput apoptoze, regulisana energijom.^[50] Započinje stvaranjem preautofagozomskih membrana – fagofora. U njih se tokom procesa sazrevanja pakuje citoplazmatični sadržaj i formira autofagozom. Zatim, spajanjem autofagozoma sa lizozomom formira se autofagolizozom u kome dolazi do razgradnje sadržaja (Slika 8). Na ovaj način uklanja se rizična ćelijska struktura, čime se štite zdrave ćelijske komponente i održavaju normalne ćelijske funkcije. Iz izloženog se može zaključiti da osim što obezbeđuje hranjive materije i energiju, autofagija predstavlja važan mehanizam koji reguliše ćelijsku homeostazu. S obzirom da niski nivoi autofagije stimulišu opstanak i ćelijski rast i da autofagija ubija ćelije samo kada je zastupljena u višem obimu, kao i da autofagija ne pokreće inflamatorni odgovor i progresiju tumora, pravilno usmerena i dozirana, autofagija može da ima benefit prilikom tretmana tumora. Ipak, terapija kancera stimulacijom ove vrste ćelijske smrti bi imala puno izazova, posebno u kontroli odziva ćelija na stimulans.

Tabela 2. Uporedni pregled glavnih karakteristika mehanizama ćelijskih smrti (apoptoze, nekroze/nekroptoze i autofagije) uz ilustraciju promena na ćelijskom nivou u odnosu na normalnu ćeliju.

	Apoptoza	Nekroza/Nekroptoza	Autofagija
Stimulansi za pokretanje	Oksidativni stres, aktiviranje liganada receptora smrti, hemioterapeutici	Virusi, hemijska oštećenja, zračenje, endogeni ili patološki faktori	Ćelijska glad, hipoksija, hemioterapeutici, smanjena koncentracija faktora rasta
Morfološke promene	Piknoza jedra, sačuvana membrana i apoptozna tela	Oticanje ćelija i organela, membrana gubi svoj integritet	Stvaranje autofagozoma, masovna degradacija organela i proteina
Uklanjanje	Fagocitoza apoptoznih tela putem okolnih ćelija i makrofaga	Ingestija makrofagama i heterofilnim granulocitima	Sadržaj iz ćelije biva unet u okolne ćelije (recikliran)
Struktura normalne ćelije	Baloniranje membrane i fragmentacija jedra/DNK, a zatim formiranje apoptoznih tela	Narušavanje integriteta ćelijske membrane i prskanje ćelijskog materijala	Formiranje autofagozoma i autofagolizozoma

2.3.4. Prednosti primene fotodinamičke terapije u odnosu na tradicionalne terapije kancera

Prevazilaženje najvećeg nedostatka postojeće terapije kancera trebalo bi da se ogleda u selektivnom uništavanju malignih ćelija, uz očuvanje homeostaze zdravog tkiva. S obzirom na lokalni karakter primene, FDT ima veliki potencijal da zameni tradicionalnu terapiju. Naime, za razliku od termalnog ili hemijskog stimulansa, difuzioni efekat pri ozračivanju se može svesti na minimum manipulacijom širine svetlosnog snopa. Imajući u vidu da RKV indukovane pobuđenom FS imaju kratak polu-život, obezbeđeno je lokalno delovanje tretmana i time očuvanje okolnog zdravog tkiva u većoj meri. Delovanjem svetlosnog izvora u određenom vremenskom intervalu postiže se vremensko doziranje terapije, dok se izborom odgovarajućeg intenziteta primenjene svetlosti i talasne dužine koja odgovara opsegu apsorpcije FS postiže i kontrola nadindividualnim potrebama tretmana pacijenta. Ovo dopušta, primera radi, pulsno oslobađanje leka što značajno doprinosi ukupnom efektu terapije.

Osim lokalnog dejstva na obolelo tkivo, FDT ispoljava citotoksični efekat prema udaljenim malignim ćelijama aktiviranjem imunog odgovora organizma i stimulisanjem oslobađanja sekundarnih inflamatornih medijatora koji mogu da deluju na udaljene maligne ćelije.^[45] Na ovaj posredan način, uprkos lokalnom karakteru terapije, sprečavaju se i pojave metastaza i recidiva.

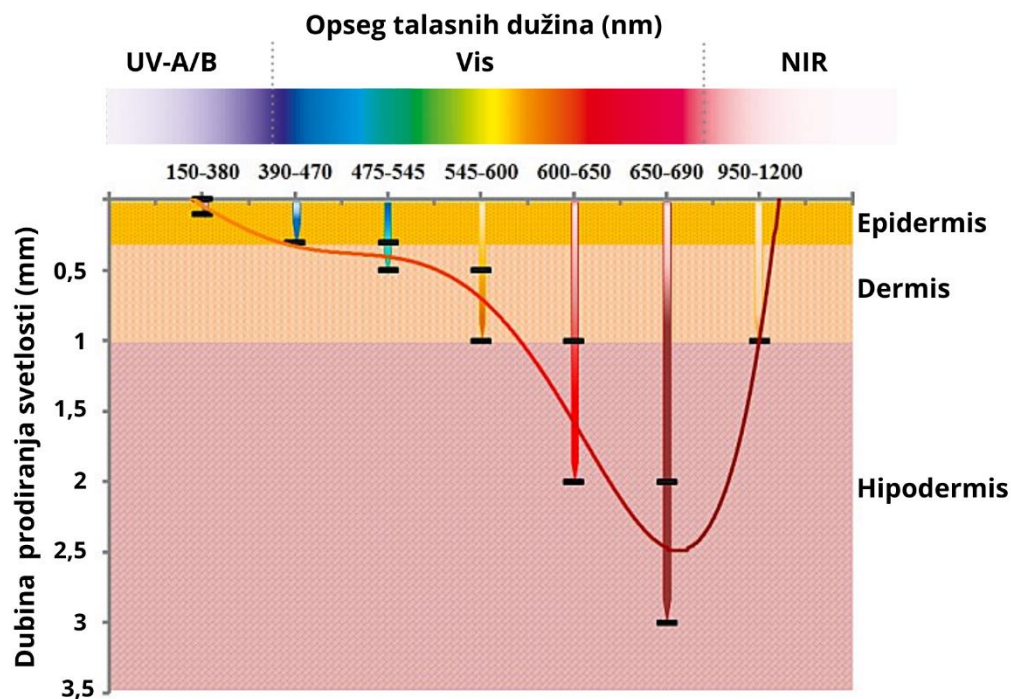
2.3.5. Ograničenja u primeni fotodinamičke terapije – optičke osobine kože i fotosenzibilacija

Najveća prepreka u primeni FDT potiče od samog svojstva ljudske kože. Koža predstavlja fizičku barijeru između ljudskog organizma i spoljašnosti, te je jedna od njenih osnovnih funkcija zaštita. Svetlost je jedan od mnogih faktora od čijeg je štetnog delovanja ljudski organizam zaštićen kožom. Pri izlaganju kože svetlosti, foton reaguje s biomolekulima u površinskom sloju kože (epidermisu). Svetlo se zatim reflektuje, rasejava, transmituje ili apsorbuje.^[51] Refleksijom ne dolazi do prelaza energije, te ona nema uticaja na delovanje svetlosti na kožu, a događa se u malom procentu, što je za ultraljubičastu svetlost (UV) oko 5 %. Takođe, u malom procentu se u epidermisu svetlost difuzno rasejava, pri čemu se deo energije fotona predaje keratinocitima – epidermalnim ćelijama kože, menjajući svoj pravac kretanja, dok predata energija dovodi do zagrevanja tkiva. Ovaj proces se završava kada foton izgubi energiju u potpunosti i apsorbuje se ili kada promenom pravca kretanja, tj. reemisijom napusti epidermis.

Do prodiranja svetlosti u dublje slojeve kože dolazi u procesu transmisije (propuštanja). Dubina propuštanja zavisi od talasne dužine samog zračenja. Može se reći da u oblasti UV i vidljive svetlosti važi pravilo da što je talasna dužina zračenja manja, manja je i dubina njegovog prodiranja (Slika 9). Melanin koji se nalazi u koži i štiti je od štetnog dejstva u opsegu 350-1200 nm, čime pokriva veći deo emitovanog sunčevog zračenja, takođe sprečava i dublje prodiranje svetlosti primenjene FDT.

Kao posledica fizičkih procesa koji se događaju u epidermisu (refleksija, rasejanje, transmisija i apsorpcija) i visoke energije, koža je za UV zrake slabo propusna (Slika 9). Najveći broj hromofora u koži apsorbuje u delu UV spektra kao što su tirozin, triptofan, DNK, keratin, melanin, urokanska kiselina i holesterol.^[52] Apsorpciju svetlosti u opsegu 300-600 nm otežava prisustvo hromofora hemoglobina (oksihemoglobin i deoksihemoglobin) čiji se apsorpcioni maksimumi nalaze na 540 i 576 nm.^[53] Dodatno, opseg 300-450 nm karakterišu rasejanja svetlosti, što takođe utiče na oslabljeno prodiranje svetlosti u ovoj oblasti.

Iz navedenih razloga, za tzv. biološki prozor u okviru koga se postiže zadovoljavajuća dubina prodiranja svetlosti u tkivo se smatra opseg talasnih dužina 600-1000 nm.^[54] Bliska infracrvena oblast nalazi se u opsegu 800-1000 nm (engl. *Near InfraRed*, NIR), a dubina prodiranja svetlosti iz ove oblasti je i do nekoliko milimetara. S druge strane, iznad 1000 nm dubina prodiranja ponovo opada, kako u ovoj oblasti veći deo zračenja apsorbuje voda. Pri ozračivanju svetlom koja ima veću talasnu dužinu od 1100 nm, usled niskih nivoa energije ne postiže se pobuđivanje FS i proizvodnja singletnog kiseonika koji je najvećim delom nosilac efekta FDT.



Slika 9. Dubina prodiranja svetlosti kroz poprečni presek kože data u mm u zavisnosti od talasne dužine upadnog zraka. Prilagođeno iz literature^[55].

Razvojem i napretkom tehnologije i optoelektronske opreme moguće je prevazišlaženje ograničenja koja predstavlja prisustvo hromofora u koži. Optička vlakna mogu da posluže za stimulans ciljnog tkiva koje nije površinski locirano, a dostupno je različitim medicinskim instrumentima, npr. sondama, kateterima i sl.

Najveći nedostatak FDT proizilazi iz delovanja FS nakon primenjene terapije. Naime, pacijenti često razvijaju osetljivost na zračenje – fotosenzibilaciju. FS se administrira uglavnom intravenozno, u nepobuđenom stanju. Međutim, kako terapija svetlom utiče na njegovo pobuđivanje, očekivano je i njegovo produženo delovanje u slučaju dostupnog stimulanisa, kao što je široki spektar sunčevog zračenja. Fotosenzibilizacija je posledica

fotohemijske reakcije u kojoj se energija prenosi s FS na okolne biomolekule, čime dolazi do njegove promene koja može da izazove oštećenje ili smrt ćelija. Kao manifestacija fotosenzibilacije na koži dolazi do pojave svraba, plikova, hiperpigmentisanih lezija i jakih opekotina.^[56,57] Ove neželjene reakcije zdravog tkiva mogu se preduprediti, na primer, dizajniranjem FS koje se specifično pobuđuju na određenoj talasnoj dužini i pri tome se brzo izlučuju iz organizma.

2.3.6. Osobine klinički primenjenih fotoosetljivih supstanci

Postoji niz svojstava koje idealna FS za FDT treba da ima kako bi se sprovela što uspešnija terapija uz minimalnu štetu na zdravo tkivo. Sumirano, za potencijalnu kliničku upotrebu, FS bi trebalo da ispuni sledeće zahteve:

- Da poseduje dobro poznate i utvrđene hemijske osobine. Dobro poznavanje hemijskih svojstava potencijalne FS omogućava predviđanje farmakokinetike i biodistribucije.
- Da ima što bolju stabilnost u uslovima fiziološke pH vrednosti. Ukoliko FS nije stabilna pri fiziološkom pH, administracijom se menja njena reaktivnost i sposobnost interakcije s biološkim molekulima, što može da dovede do neželjenih dejstava na zdrave ćelije.
- Da je amfifilna. Dok je hidrofilnost važna osobina za administraciju terapije, lipofilnost omogućava interakciju sa ciljanom ćelijom. Pri intravenoznoj administraciji hidrofobne FS dolazi do stvaranja agregata koji mogu da oštete krvne sudove. Agregati čine da je dostupna manja količina FS za terapiju, imajući u vidu da je za pobuđivanje neophodno da FS bude u fotoaktivnom monomernom obliku. S druge strane, lipofilnost je osobina koja doprinosi ćelijskom unosu kako lipofilni molekuli neometano prolaze kroz fosfolipidni dvosloj ćelijske membrane. Iz pomenutog sledi da je potrebno da FS poseduje hidrofilna i lipofilna svojstva (grupe) kako bi pokazala najbolju efikasnost u terapiji.
- Da se selektivno akumulira u ciljnom tkivu. Selektivna akumulacija FS u tumorskom tkivu smanjuje toksični učinak na zdrave ćelije.
- Da je niske toksičnosti u mraku. Za kontrolisani citotoksični efekat neophodno je da FS ispoljava svoje dejstvo tek nakon osvetljavanja pomoću svetlosti određene talasne dužine.
- Da je stabilna u toku tretmana svetlom. FS ne bi trebalo da se tokom ozračivanja prevede u neaktivni oblik ili raspadne u procesu koji je u literaturi poznat kao fotoizbeljivanje (engl. *photobleaching*) stvarajući toksične međuproizvode.^[58]

- Da apsorbuje u vidljivom i infracrvenom elektromagnetnom spektru. Jedna od ključnih osobina FS je deo spektra u kome apsorbuje fotone. Štaviše, opseg talasnih dužina neophodnih za pobuđivanje FS u tripletno stanje u korelaciji sa potrebnom energijom za pobuđivanje što direktno utiče na proizvodnju RKV. Idealno zračenje je u oblasti iz vidljivog i infracrvenog dela spektra koje dobro prolazi kroz kožu (Slika 9).
- Da ima visok koeficijent molarne apsorpcije. Visok molarni apsorptivitet omogućava primenu manjih doza FS za postizanje terapijskog efekta, što doprinosi i stepenu neželjenih efekata.^[59]
- Da indukuje visok stepen proizvodnje RKV. Da bi se ostvario visok stepen proizvodnje RKV neophodan je veliki kvantni prinos probuđenog tripletnog stanja FS i odgovarajućeg vremena polu-života koje omogućava interakciju s molekulskim kiseonikom ili drugim biomolekulima.
- Da se brzo eliminiše iz organizma. Najčešća nuspojava FDT je fotosenzibilizacija kože. Stoga, FS ne bi trebala da se zadržava u organizmu duže od vremena na koje je terapija ispitana.

Imajući u vidu veliki broj zahteva koje bi FS trebala da ispuni, trenutno je za kliničku upotrebu odobreno samo dvadesetak FS, dok su neke predmet kliničkih ispitivanja. U gotovo 50 godina istraživanja razvijene su tri generacije FS, od kojih su najznačajnije s aspekta primene prikazane na Slici 10.

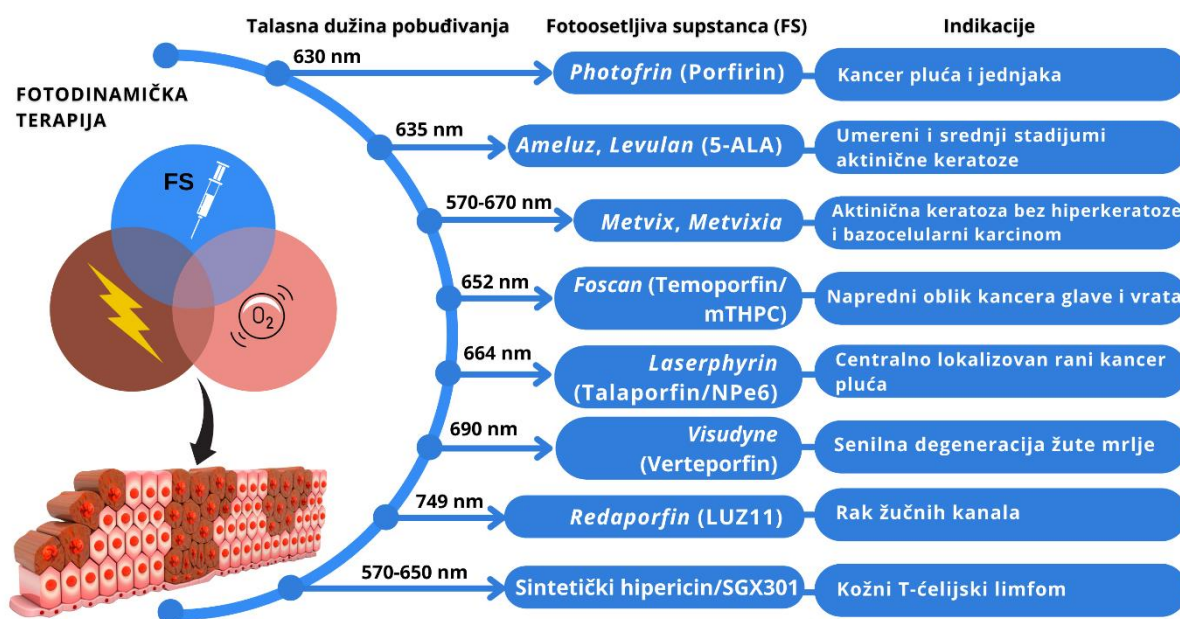
Prva generacija FS nastala je hemijskim modifikacijama porfirina kao što su hematoporfirin (HpD) (smeša porfirinskih monomera, dimera i oligomera) i porfimer natrijum (aktivna komponenta HpD).^[60] Poslednji je registrovan pod tržišnim imenom *Photofrin*, i dalje predstavlja jednu od najčešće korišćenih FS.^[61]

Od FS **druge generacije**, najznačajniji primeri iz kliničke upotrebe su: 5-aminolevulinska kiselina (5-ALA), metil-aminolevulinat (*Metvix*), derivati benzoporfirina, teksafirin, derivati tiopurina, hlorin (termoporfirin, talaporfin i verteporfirin), kao i analozi bakteriohlorina (*Redaporfin*) i ftalocijanin hlorina.

Drugu generaciju FS karakteriše bolja hemijska čistoća, visok prinos singletnog kiseonika i što je veoma važno, bolji prolazak u dublje locirana tkiva, s obzirom da je maksimalna apsorpcija u opsegu talasnih dužina 650-800 nm.^[61] Druga generacija FS pokazuje

i manje nuspojava, smanjenu pojavu fotosenzibilizacije, što je rezultat veće selektivnosti i bolje eliminacije, a glavni nedostatak je slaba rastvorljivost u vodi.

Razvoj FS **treće generacije** zasniva se na konjugaciji sa supstancama veće selektivnosti prema tumorskom tkivu. Ovakvi novi sistemi imaju za cilj da efikasno povećaju učinak FDT, što može da se izvede različitim modifikacijama postojeće FDT.



Slika 10. Pregled FS koje su odobrene za kliničku upotrebu tretmana različitih vrsta oboljenja. Prikazane su talasne dužine koje su potrebne za pobuđivanje, tržišni naziv leka, kao i u kojim se indikacijama koriste.

Jedan od načina unapređivanja FDT je korišćenje sistema nanonosač-lek u kome ili jedna ili obe komponente mogu da imaju osobine FS. Najčešće se izvodi tako što sam citostatik ima osobine FS, te je on inkapsuliran ili imobilisan u nanočestice kovalentnim ili nekovalentnim interakcijama.^[61] Konjugovanje leka (FS) s nanonosačem stabilizuje često slabo rastvorne FS koje su sklone agregiranju u fiziološkim uslovima, što doprinosi uspešnosti terapije. Isto tako, nanonosači čuvaju FS dok ne dospe u ciljno tkivo povećavajući njihovu lokalnu biodostupnost.

Imajući u vidu biokompatibilnost u odsustvu svetlosti koja se ispoljava kroz minimalnu citotoksičnost, nanostrukturni TiO₂ pokazuje potencijal za upotrebu kao FS u FDT kancera i predmet je velikog broja istraživanja. Ispituju se i sistemi za dostavu u kojima je nanostrukturni TiO₂ konjugovan s različitim citostaticima, naročito s kompleksima prelaznih metala. Stoga, imajući u vidu i predmet ove disertacije, u narednom poglavlju predstavljene su osobine

nanostrukturnog TiO₂ s akcentom na svetlosne interakcije i mogućnosti poboljšavanja fotohemijskih karakteristika.

2.4. Nanostrukturni TiO₂

Imajući u vidu izvanrednu hemijsku stabilnost, nisku toksičnost, visok indeks prelamanja i nisku cenu nanostrukturnog TiO₂, ne iznenađuje podatak da je to drugi po redu nanomaterijal po pitanju zastupljenosti u svakodnevnoj upotrebi.^[62] Pored široke primene u industriji, nanostrukturni TiO₂ je i sastojak kozmetičkih proizvoda poput pasta za zube, proizvoda za negu kože i zaštitu od sunca, a ulazi i u sastav tableta i kapsula.^[63]

S obzirom na to da je TiO₂ fotokatalizator, te da ima izuzetan oksidacioni potencijal, primena nanostrukturnog TiO₂ nije izostala ni u biomedicini. Njegove antibakterijske osobine primenjene su na oblaganju medicinskog alata i instrumenata. Važna oblast moguće primene nanostrukturnog TiO₂ je u dijagnostici, s obzirom da predstavlja dobru platformu za kontrastne agense u magnetnoj rezonanci, ali i u potencijalnom lečenju određenih vrsta kancera. Ispitivanja citotoksičnosti prema tumorskim linijama započeo je *Fujishima* sa saradnicima sredinom osamdesetih godina XX veka, u jednoj od prvih *in vitro* FDT koja uključuje TiO₂ nanočestice.^[64,65] U daljim istraživanjima, ova grupa autora je ispitala mogućnost da se ćelije uništavaju pojedinačno pomoću TiO₂ mikroelektrode.^[66]

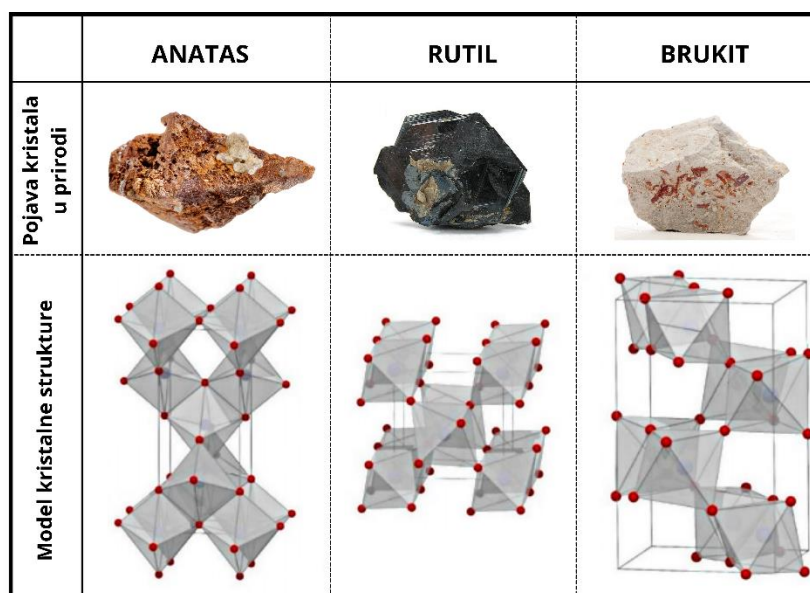
Veliki broj istraživanja u XXI veku usmeren je na upotrebu nanostrukturnog TiO₂ kao nosača i/ili FS u FDT. Ovo proizilazi iz povoljnih fizičko-hemijskih osobina koje nanostrukturni TiO₂ poseduje, te će ova svojstva biti istaknuta u narednim potpoglavljima.

2.4.1. Kristalne forme nanostrukturnog TiO₂

TiO₂ je pored TiCl₄ jedan od najzastupljenijih oblika titanijuma u prirodi, gde se nalazi u obliku tri glavne kristalne strukture: rutil (tetragonalna), anatas (tetragonalna) i brukit (ortorombična) (Slika 11). U prirodi najzastupljenija kristalna forma TiO₂ je rutil, koja je termodinamički najstabilnija.^[67] S druge strane, anatas i brukit su metastabilne faze, što znači da zadržavaju stabilnost na normalnom pritisku i temperaturi, dok na temperaturama > 600 °C prelaze u rutil. Ostala svojstva po kojima se međusobno razlikuju anatas, rutil i brukit su tvrdoća, gustina, indeks prelamanja, Eg, temperatura topljenja, toplotni kapacitet pri konstantnom pritisku, a razlikuje se i struktura energetske zone. Na Slici 11 prikazani su modeli kristalnih struktura TiO₂ koje su u osnovi izgrađene od TiO₆ oktaedara, u kome je svaki

katjon Ti^{4+} okružen sa šest anjona O^{2-} . Međusobno, kristalne strukture se razlikuju po načinu pakovanja TiO_6 oktaedara.

Međutim, na krajnje osobine koje poseduje određena kristalna forma utiče i veličina samih čestica. Svođenjem kristala TiO_2 na nano-dimenzije dolazi do promene ne samo specifične površine, već se menjaju karakteristike i same kristalne rešetke.

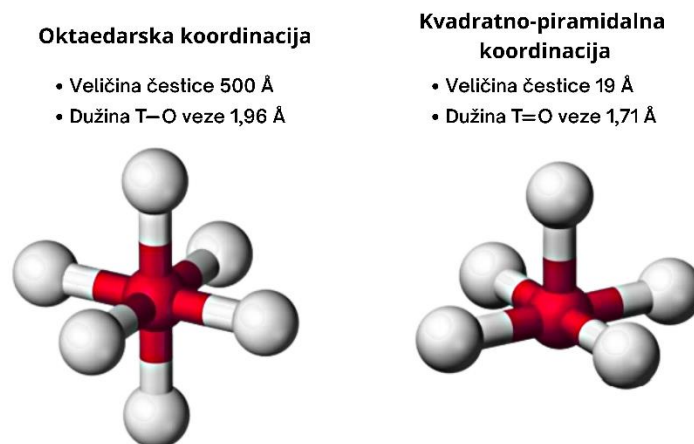


Slika 11. Prikaz kristalnih formi TiO_2 ; gornji red prikazuje oblik u kome se pojavljuje u prirodi, donji red prikazuje kristalne rešetke. Crvene tačke predstavljaju atome kiseonika, dok plave predstavljaju atome titana.

Jedna od važnih osobina na koju utiče smanjenje veličine čestica je stabilnost. Na osnovu literature može se reći da se kritična veličina čestica na kojoj je anatas najstabilnija struktura nalazi u opsegu 11-15 nm^[67,68], dok je kod čestica koje su > 35 nm, stabilnija rutilna kristalna forma. Imajući u vidu da anatasna struktura poseduje niz poželjnih karakteristika, kao što su izuzetna hemijska i mehanička stabilnost, niska toksičnost, veliki E_g (3,2 eV na 387 nm), visoke vrednosti tvrdoće, dielektrične konstante i indeksa prelamanja ($n = 2,488$)^[69,70], za istraživanje koje je predmet ove disertacije korišćen je nanostrukturni TiO_2 u kome je dominantna anatas kristalna forma.

Nanostrukturni TiO_2 anatas forme čiji je prečnik < 20 nm karakteriše pojava tzv. površinskih defekata koji predstavljaju atome Ti na površini čestica sa smanjenim koordinacionim brojem (5) i izmenjenom geometrijom (Slika 12), do čega dolazi usled velike zakrivljenosti površine. Kod površinskih defekata, umesto oktaedarske geometrije, Ti atomi zauzimaju kvadratno-piramidalnu. Na ovaj način se skraćuje Ti-O veza i produžava Ti-Ti veza (Slika 12), a površinski atomi Ti su okruženi s po pet atoma O. Nastali površinski defekti

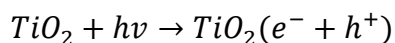
predstavljaju reaktivna mesta koja omogućavaju površinske modifikacije u cilju prilagođavanja nanostrukturnog TiO₂ odgovarajućoj nameni.^[71-73] S druge strane, površinski defekti predstavljaju mesta za nukleaciju, te povećanjem njihovog broja na povišenim temperaturama ubrzava se prelazak anatasa u rutil. Stoga, nanostrukturni TiO₂ čija je veličina čestica ispod 20 nm posebno je pogodan za specifične primene na umerenim temperaturama.



Slika 12. Prikaz promene koordinacionog broja i geometrije atoma Ti na površini nanočestice u zavisnosti od njene veličine. Sive sfere predstavljaju atome O, dok crvene sfere predstavljaju atome Ti.

2.4.2. Fotohemijske osobine TiO₂

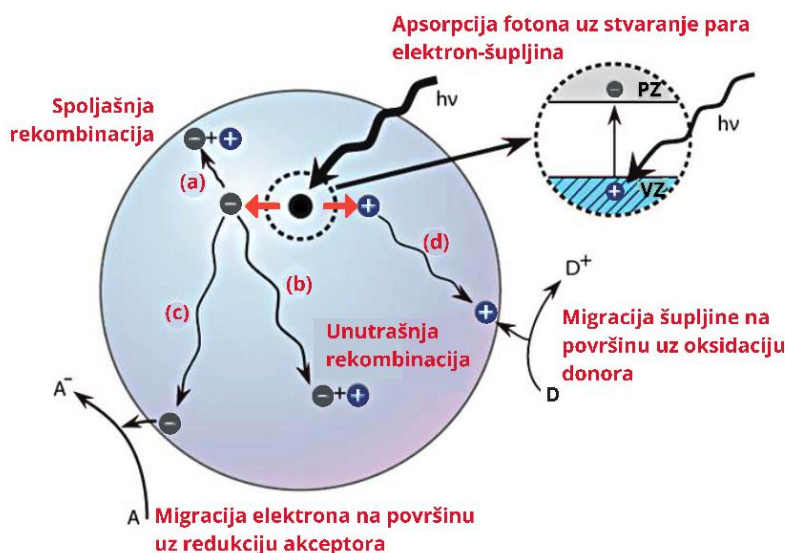
Pri ispitivanju mogućnosti primene nanostrukturnog TiO₂, neizostavno je istaći njegove fotohemijske osobine koje proizilaze iz njegove poluprovodne prirode. S tim u vezi je i fotoaktivnost nanostrukturnog TiO₂ koja se, s obzirom na E_g 3-3.8 eV, nalazi u UV oblasti. TiO₂ spada u grupu poluprovodnika n-tipa i njegovu elektronsku strukturu predstavljaju VZ u kojoj se nalaze 2p orbitale kiseonika i PZ u kojoj se nalaze 3d orbitale titana. Kada se apsorbuje foton odgovarajuće energije (> 3,2 eV za anatas kristalnu formu) i talasne dužine (< 388 nm), dolazi do prelaska elektrona iz VZ u PZ, uz stvaranje šupljine u VZ. Nakon apsorpcije svetlosti dolazi do interakcije s više fotona, što dovodi do stvaranja para elektron-šupljina (e⁻-h⁺), a ovaj proces može da se pojednostavljeno prikaže sledećom jednačinom:



Stvoreni par (e⁻-h⁺) nakon difuzije ka površini može da učestvuje u oksido-redukcionim reakcijama.^[74] Elektroni i šupljine mogu i da se zadrže u metastabilnim stanjima na površini i u unutrašnjosti čestice (Slika 13). Ovaj proces je poznat kao rekombinacija i prati ga oslobađanje toplote, a odvija se uporedo s oksido-redukcionim reakcijama. Međutim, rekombinacija para (e⁻-h⁺) je nepoželjna pojava jer neefikasno iskorišćenje energije fotona

dovodi do smanjivanja prinosa energije fotohemijskih procesa. S druge strane, u oksidoredukcionim reakcijama dolazi do razdvajanja elektrona i šupljina koji nadalje samostalno učestvuju u reakcijama, s tim da elektroni redukuju akceptore elektrona iz okoline, dok šupljine oksiduju donore elektrona.

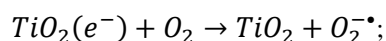
Fotohemijske osobine nanostrukturnog TiO_2 do sada su u najvećoj meri ispitane za potrebe fotokatalize zagađenih vodenih rastvora. Međutim, poslednjih godina sprovodi se značajan broj *in vitro* i *in vivo* ispitivanja nanostrukturnog TiO_2 kao FS u FDT. FDT koja uključuje TiO_2 moguće je izvesti prema uobičajenom protokolu: nakon unosa čestica TiO_2 i postizanja potrebne koncentracije u ciljnom tkivu, na njega se usmerava svetlosni snop. Zatim se primenjuje zračenje odgovarajućih karakteristika u pogledu talasne dužine ($> 388 \text{ nm}$) i intenziteta. Apsorbovani foton od strane TiO_2 stvara parove ($e^- - h^+$) koji prenose elektrone na okolne biomolekule, te se stvaraju različite RKV (O_2^- , $^1\text{O}_2$, $^{\bullet}\text{OH}$, HO_2^{\bullet}) i h^+ .



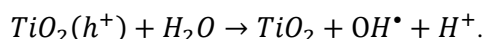
Slika 13. Šematski prikaz glavnih fotohemijskih procesa koji se odvijaju nakon apsorpcije fotona iz UV oblasti, tj. nakon stvaranja para ($e^- - h^+$). Rekombinacija ($e^- - h^+$) na površini nanočestice (a), rekombinacija ($e^- - h^+$) u unutrašnjosti nanočestice (b), migracija elektrona na površinu nanočestice što rezultuje redukcijom elektron-akceptora – A (c), migracija šupljine na površinu nanočestice što rezultuje oksidacijom elektron-donora – D (d). Prilagođeno iz literature [75].

Par ($e^- - h^+$) se razdvaja i na površini čestice, nakon čega elektroni i šupljine učestvuju u sledećim reakcijama:

- 1) elektron redukuje akceptore elektrona, poput molekuskog kiseonika što dovodi do stvaranja O_2^- –



- 2) šupljina oksiduje donore elektrona, poput površinskih titanol grupa (TiOH) ili adsorbovanog molekula vode što dovodi do stvaranja $\cdot\text{OH}$ –



Ovako stvoreni primarni radikali su okidači za stvaranje sekundarnih RKV. Na primer, O_2^\bullet u prisustvu slobodnog protona (H^+) stvara HO_2^\bullet koji se dalje pomoću elektrona iz PZ prevodi u H_2O_2 . Dobijeni H_2O_2 može da apsorbuje novi foton ili da reaguje s O_2^\bullet , pri čime se ponovo stvara $\cdot\text{OH}$. $\cdot\text{OH}$ se zbog visoke reaktivnosti smatra najznačajnijom RKV jer lako napada neutralne molekule iz okoline i površinski adsorbovane radikale i/ili radikalne jone.^[74] Međutim, smatra se da je O_2^\bullet dominantna RKV u fotohemijskim reakcijama TiO_2 , što je očekivano s obzirom na ovaj radikal ima najduže vreme polu-života (Tabela 3).

Tabela 3. Polu-životi najvažnijih RKV koje nastaju ozračivanjem TiO_2 UV svetlom.^[76,77]

RKV	Vreme polu-života
$^1\text{O}_2$	117 μs
$\cdot\text{OH}$	119 ns
O_2^\bullet	120 ms
HO_2^\bullet	7 s

Važna oblast istraživanja primene nanostrukturnog TiO_2 je za potrebe FDT kancera. Međutim, značajno je istaći da živi svet ima sopstvene mehanizme kojima se bori protiv štetnog delovanja RKV. Tako, svi aerobni oblici života proizvode superoksid dismutazu – enzim koji dismutira O_2^\bullet do H_2O_2 i O_2 ; i katalazu – enzim koji smanjuje unutarćelijsku koncentraciju H_2O_2 , pretvarajući je u H_2O i O_2 . Stoga, ostvarena efikasnost fotohemijske reakcije TiO_2 je veoma važan parametar koji utiče na učinak FDT.

Kada je proces dovoljno efikasan, oštećenje ćelija kancera izazvanih RKV se odvija u dve faze. U prvoj fazi, generisane RKV stupaju u interakcije s nezasićenim masnim kiselinama iz lipida i bočnim aminokiselinskim ostacima iz proteina. Narušavanjem integriteta ćelijske membrane povećava se njena propustljivost, što omogućava kako izlazak ćelijskih komponenti u vanćelijski prostor, tako i neometan ulazak nanočestica TiO_2 . U drugoj fazi koja se odvija unutar ćelije, novostvorene RKV su u bliskom kontaktu s organelama i s neukleotidnim bazama DNK molekula što doprinosi nepovratnom karakteru oštećenja i dovodi do ćelijske smrti.^[78]

2.4.3. Poboljšavanje karakteristika nanostrukturnog TiO₂

Postoji niz ograničenja koji otežavaju iskorišćavanje fotohemijskog potencijala nanostrukturnog TiO₂ u FDT. Jedno od njih je prevaziđeno izborom anatas kristalne forme TiO₂ koja ima značajno veću sposobnost da adsorbuje molekule O₂ u odnosu na rutil. Međutim, fotokonverziju smanjuje nizak prinos dugoživećih naelektrisanja koji je posledica rekombinacije parova (e⁻-h⁺). Dodatno, visoka vrednost E_g, uslovljava korišćenje izvora UV svetlosti koja, kako pokazuje Slika 9, u kožu prodire do dubine manje od 1 mm. Navedeni nedostaci ukazuju na potrebu za modifikovanjem postojeće fotohemijske kinetike na način kojim bi se poboljšala apsorpcija svetlosti u vidljivom delu spektra, smanjila brzina rekombinacije stvorenih parova (e⁻-h⁺) i povećao broj aktivnih mesta na površini nanočestice kristala. Uobičajeni načini za poboljšanje karakteristika nanostrukturnog TiO₂ su funkcionalizacija površine TiO₂ i ugradnja primesa u rešetku TiO₂ (dopiranje).

2.4.3.1. Modifikacija površine TiO₂

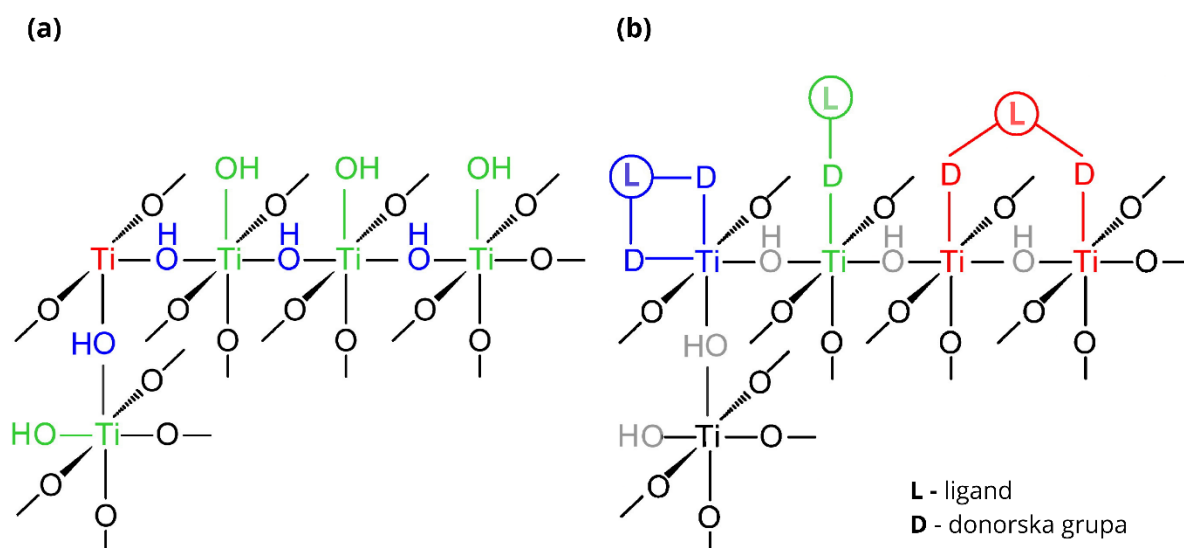
Jedna od povoljnih karakteristika nanostrukturnog TiO₂ je jednostavna površinska modifikacija koja je posledica velikog broja površinskih aktivnih mesta. Modifikacija površine ima dvostruko benefit za FDT: vezivanjem lekova i/ili jedinjenja za koje ćelije kancera imaju preekspimirane receptore na svojoj površini obezbeđuje terapijsku selektivnost, dok pomeranje apsorpcionog maksimuma iz UV ka vidljivoj oblasti smanjuje štetnost same terapije. Joni Ti⁴⁺ s površine se ponašaju kao Luisove kiseline, te lako prihvataju elektrone koji potiču od kiseonika ili azota s funkcionalne grupe liganda (Luisove baze). Elektron-donorske grupe liganda se mogu vezati za Ti atome iz površinskih defekata koji su koordinativno nezasićeni, što dovodi do promene geometrije iz kvadratno-piramidalne u oktaedarsku. Na površini hidratizane nanočestice TiO₂, prema modelu površinskog kompleksiranja možemo razlikovati tri aktivna centra za vezivanje liganda^[79] (Slika 14 (a)):

- 1) heksakoordinisane Ti⁴⁺ jone za koje je vezano pet O²⁻ jona i jedna OH grupa,
- 2) O²⁻ jone koji se nalaze između dva Ti centra za koje je vezan po jedan proton,
- 3) Ti⁴⁺ jone za koje je vezano četiri O²⁻ jona, od kojih su dve veze nezasićene.

Međutim, funkcionalne grupe liganada se uglavnom koordinišu s Ti⁴⁺ jonima. Postoje tri osnovne vrste vezivanja liganada za površinu nanočestice TiO₂: monodentatno; bidentatno

helirajuće (ligand se vezuje za jedno koordinaciono mesto Ti^{4+}) i bidentatno mostno (engl. *Bridging*, ligandi se vezuju na dva susedna Ti^{4+} centra) (Slika 14 (b)).

Modifikacija površine TiO_2 može da smanji energiju koja je potrebna za pobuđivanje i pomeri apsorpcioni prag iz UV ka vidljivoj oblasti spektra.^[80] Adsorpcijom liganada na površini TiO_2 stvara se kompleks TiO_2 -ligand u kome su promenjene elektronske strukture obe komponente. Tačnije, dolazi do sprezanja lokalizovanih orbitala liganada na površini s delokalizovanim elektronskim nivoima PZ TiO_2 što dovodi do stvaranja novih energetskih nivoa, te do smanjenja energije koja je potrebna za pobuđivanje, Eg. Stvoreni kompleks apsorbuje svetlost prenosom naelektrisanja čime se elektroni pobuđuju direktno s liganda u PZ- u TiO_2 .^[81] Pored toga, elektronsko sprezanje utiče na razdvajanje para (e^-h^+) lokalizujući šupljine na donoru funkcionalnih grupa liganada, dok su elektroni lokalizovani u PZ TiO_2 .^[82]



Slika 14. Tri vrste aktivnih centara na površini TiO_2 – heksakoordinisani Ti^{4+} jon (zeleno), protonovani O^{2-} joni (plavo) i Ti^{4+} joni s dve nezasićene veze (prikazani crvenom bojom) (a); tri vrste vezivanja liganda na površini TiO_2 – monodentatno (prikazano zelenom bojom), bidentatno helatno (prikazano plavom bojom) i bidentatno mostno (prikazano crvenom bojom) (b). Prilagođeno iz literature^[79].

Postoji niz elektron-donorskih liganada koji se vezuju za površinu TiO_2 nanočestica (kateholi, derivati ftalatne i salicilne kiseline, endioli, benzenovi derivati, mravlja kiselina, karboksilne kiseline, fosfonati, sulfonati i drugi).^[79,83–85] Značajan broj istraživanja ispituje mogućnosti koordinacije TiO_2 s kompleksima prelaznih metala, kao što je rutenijum,^[86–89] čiji ligandi sadrže neke od navedenih funkcionalnih grupa.^[86,90,91] Iako veći deo istraživanja ima za cilj poboljšanje prinosa fotokatalize za tretman otpadnih voda ili efekta konverzije solarne energije, značajan broj ispitivanja se bavi funkcionalizacijom površine TiO_2 kao

nanoterapeutika ili nanonosača za antikancerogene agense o čemu će više reći biti u potpoglavlju 2.4.5.

2.4.3.2. Poboljšavanje karakteristika TiO_2 pomoću dopiranja

Dopiranjem nanostrukturnog TiO_2 se modifikuje elektronska struktura tako da se omogući stvaranje para (e^-h^+) pomoću fotona čija je talasna dužina > 388 nm. Nanomaterijale generalno karakteriše značajno veća tolerancija na distorziju unutar rešetke u odnosu na polazni materijal većih dimenzija, što omogućava ovakve modifikacije nanostrukturnog TiO_2 uz očuvanje kristalne rešetke.

Dopiranje se postiže kontrolisanim umetanjem malih količina nečistoća tj. stranih atoma u kristalnu strukturu poluprovodnika, bez formiranja druge faze. Takve primese dovode do povećanja broja elektrona u PZ – tj. da budu donori, ili povećanja broja šupljina u VZ – tj. da budu akceptori. Osim pomeranja apsorpcionog praga, dopiranjem se poboljšavaju i karakteristike fotohemijskih reakcija. Naime, dopirani joni unošenjem dodatnih energetskih nivoa u strukture traka, zadržavaju elektrone ili šupljine, tj. razdvajaju parove (e^-h^+) čime sprečavaju njihovu rekombinaciju i omogućavaju da više nosilaca naelektrisanja uspešno difunduje na površinu.^[92]

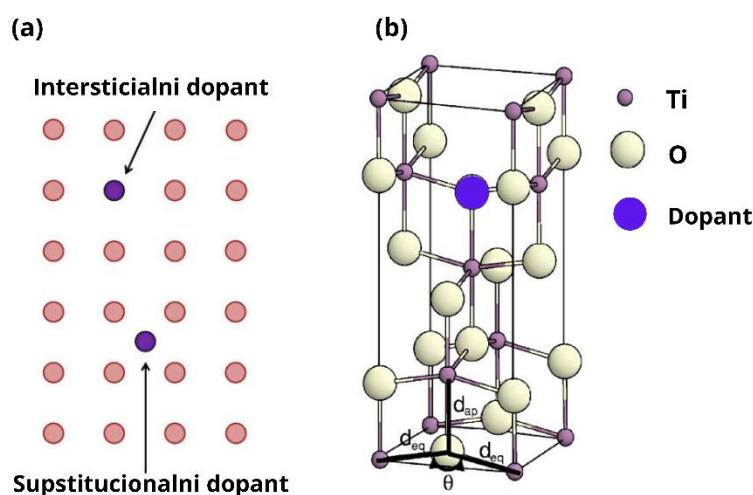
Postoji više vrsta dopiranja TiO_2 kao što su:

1. Samodopiranje pomoću Ti^{3+} jona^[93]
2. Dopiranje nemetalima^[94–98]
3. Dopiranje metalima^[99,100]
4. Kodopiranje^[101]

Azot i ugljenik su pogodni dopanti iz više razloga. Prvi razlog je što dopiranje ovim elementima ne utiče na ukupnu elektronegativnost TiO_2 . Naime, u kristalnoj rešetki TiO_2 i azot i ugljenik kao anjonski dopanti imaju mogućnost da zauzmu položaj kiseonika (substitucionalni položaj) (Slika 15 (a) i (b)); ili da se umetnu u kristalnu rešetku (intersticijalni položaj) (Slika 15 (a)), pri čemu ni jedan od položaja ne bi trebalo da utiče na promenu ukupnog odnosa naelektrisanja.^[96] S druge strane, katjonski dopanti iz grupe prelaznih metala ne ispoljavaju ovu osobinu. Dodatno, literatura sugerise da su katjonski dopanti termalno nestabilni, da doprinose rekombinacijama i često ispoljavaju toksičnost koja može da naruši biokompatibilnost dopiranog TiO_2 .^[41,92] Drugi razlog je činjenica da su azot i ugljenik biogeni makroelementi, i dopiranje ovim elementima ne narušava biokompatibilnost dopiranog TiO_2 ,

pošto se azot nalazi u sastavu mnogih bioloških molekula, a ugljenik je gradivni element koji ulazi u sastav svih ćelijskih biomolekula. Stoga, mala količina dopiranog azota i ugljenika ne bi trebalo da utiče na povećanje citotoksičnosti u odnosu na čist nanostrukturni TiO₂.

Kada je reč o azotom dopiranom TiO₂ literaturna ukazuje da do sužavanja Eg dolazi ili mešanjem N 2p stanja i O 2p stanja,^[102] ili umetanjem energetskih nivoa poreklom od azota unutar Eg TiO₂, neznatno iznad O 2p VZ.^[103,104] S tim u vezi, kod supstitucionalnog azota, pokazano je da do pomeranja praga apsorpcije dolazi usled umetanja izolovanih N 2p stanja iznad maksimuma VZ TiO₂. Sličan obrazac ima i ugljenikom dopirani TiO₂ kod koga se izolovana C 2p stanja nalaze nešto više iznad VZ čistog TiO₂ i koja doprinose foto-aktivaciji TiO₂ u vidljivom delu spektru.^[105]



Slika 15. Ilustracija načina umetanja dopanta u kristalnu rešetku poluprovodnika (a); jedinična ćelija kristala anatasa TiO₂ kod kojeg je dopant umetnut supstitucionalno (b).

2.4.4. Biološka primena nanostrukturnog TiO₂

Važna osobina koja omogućava biološku primenu nanostrukturnog TiO₂ je njegova biokompatibilnost, dok je za potencijalnu ulogu u FDT veoma važna njegova niska toksičnost u odsustvu svetlosnog stimulansa. Međutim, literaturni podaci su često različiti, pa čak i kontradiktorni kada su u pitanju ispitivanja toksičnosti TiO₂ u *in vitro* sistemima. Ipak, na osnovu literature se može zaključiti da je nanostrukturni TiO₂ niskog nivoa toksičnosti pri niskim koncentracijama tretmana i kratkom vremenu izloženosti. S druge strane, ispitivanja *in vivo* su saglasno potvrdila dobru biokompatibilnost nanostrukturnog TiO₂ što je i omogućilo klinička ispitivanja za njegovu ljudsku upotrebu. Jedno od prvih ispitivanja na eksperimentalnim životinjama je ustanovilo da doza od 5 g kg⁻¹ telesne mase pacova nema

izražen toksični efekat.^[106] Međutim, važno je istaći da toksičnost zavisi od veličine, kristalne forme i optičkih osobina nanostrukturnog TiO₂.^[107] S obzirom da se nanočestice TiO₂ koriste za apsorpciju UV zraka u proizvodima za negu i zaštitu kože, sproveden je veliki broj istraživanja koja su pokazala da uprkos maloj veličini (oko 50 nm) nanočestice TiO₂ ne prolaze kroz bazalnu membranu^l, te one ne dolaze u kontakt s ekstracelularnim matriksom kože u kome je smešten i krvotok, što ih čini bezbednim za upotrebu.^[108]

S druge strane, pokazano je da klusterski uređene nanočestice TiO₂ u formi tankog filma podstiču rast zdravih ćelija (fibroblasta, osteoblasta, hondroblasta i mezenhimskih matičnih ćelija),^[109] kao i određenih kancerogenih ćelija poput kancera pankreasa.^[110] Pretpostavlja se da do ove pojave dolazi usled sličnosti teksture površine TiO₂ filma i vanćelijskog matriksa koji je prirodni medijum bogat nutrijentima koji omogućavaju ćelijske deobe i rast ćelija.

Kod biološke primene nanostrukturnog TiO₂ najveći problem je vreme zadržavanja u cirkulaciji. S druge strane, jedna od povoljnih osobina nanostrukturnog TiO₂ je njegova selektivnost ka ćelijama kancera.^[111] Ovaj fenomen je posledica različitih svojstava zdravih i ćelija kancera, kao što je povećana aktivnost lizozoma kod izmenjenih malignih ćelija. Kisele hidrolaze i redukujući agensi kojima su ispunjeni lizozomi dovode do redukcije TiO₂ nanočestica unutar ćelije, te do hiperprodukcije RKV i ćelijske smrti.

2.4.5. Nanostrukturni TiO₂ kao fotoosetljiva supstanca i nosač za medikamente – pregled dosadašnjih istraživanja

Dostupni literaturni podaci se ne odnose isključivo na jedan oblik nanostrukturnog TiO₂, već su ispitivani različiti oblici u nano-dimenzijama. Pored sfernih nanočestica TiO₂, brojna istraživanja opisuju i nanotube, nanosfere, prolatne nanosferoide, nanovretena, nanokapsule i nanovlakna (engl. *whiskers*) koji mogu da budu nosači za citostatike, kao i FS za FDT kancera.^[112,113]

Svetlom aktivirani nanostrukturni TiO₂ je pokazao izražen citotoksični efekat prema različitim tumorskim ćelijskim linijama, kao što su HeLa ćelije raka grlića materice,^[114] C6 i GMB ćelije glioma,^[115] T-24 ćelijama kancera bešike T-24,^[116] HL60 ćelije leukemije,^[117,118] S-91 i B16-F10 ćelije melanoma,^[119,120] LoVo ćelije tumora debelog creva,^[121] MCF-7 i MDA-

^l Bazalna membrana je struktura koja odvaja eptielno tkivo od vezivnog tkiva kod sisara. U tekstu se odnosi na graničnu strukturu između epidermisa i dermisa ljudske kože.

MB-468 ćelijama raka dojke^[122] i HepG2 ćelijama raka jetre.^[123] Štaviše, potvrđena je i *in vivo* toksičnost na HeLa,^[124] T-24,^[116] i ćelijama raka dojke (4T1)^[125] kod humanizovanih miševa.

Tretman nanostrukturnim TiO₂, modifikovanim PEG-om, je pokazao na ćelijskoj liniji C6 izraženo suzbijanje rasta ćelijske kulture nakon zračenja UV svetlom.^[115] Značajna je i studija u kojoj je poređen fotocitotoksični efekat koji ima PEG-TiO₂ u odnosu na TiO₂ dopiran azotom i kobaltom. Utvrđeno je da zračenje pomoću svetlosti iz vidljive i NIR oblasti deluje citotoksično u značajnijoj meri kod tretmana PEG-TiO₂ u odnosu na tretman dopiranim TiO₂.^[126]

Određeni tipovi kancera imaju povećanu potrebu za folnom kiselinom kao nutrijentom, tj. ekspiriraju receptore za folnu kiselinu u većem obimu u odnosu na druge tipove kancera. Ovo svojstvo je upotrebljeno za stimulaciju aktivnog transporta N-TiO₂ konjugovanog s folnom kiselinom u studiji fotocitotoksičnosti na ćelijskoj liniji nazofaringealnog karcinoma (KB). Ćelije su najpre tretirane, a zatim su ozračene vidljivim svetlom. Uporedo je tretirana i ćelijska linija kancera pluća (A549) koja u smanjenom obimu ekspirira folnu kiselinu. Dobijeni rezultati jasno pokazuju povećan ćelijski unos tretmana u KB ćelijama u odnosu na A549, te je očekivan i potvrđen bolji fotocitotoksični efekat na ovoj ćelijskoj liniji.^[27] U sličnoj studiji ispitana je fotocitotoksičnost na ćelijskoj liniji glioblastoma (M059K) praznih nanosfera TiO₂ konjugovanih s folnom kiselinom – za aktivnu akumulaciju i cink(II)-tetranitroftalocijanom – za apsorpciju u vidljivom spektru. Rezultati koji potvrđuju dobar ćelijski unos sistema i značajno smanjenje vijabilnosti ukazuju na potencijal ovog sistema za primenu u FDT.^[127]

Ispitan je i fotocitotoksični efekat konjugata N-TiO₂ s aluminijum ftalocijaninom na ćelijskoj liniji HeLa. U ovoj studiji potvrđena je značajna proizvodnja RKV nakon ozračivanja vidljivim svetlom, a ispitivani sistem je okarakterisan kao veoma potentan za primenu u FDT.^[128] Još jedan primer je modifikacija površine TiO₂ pomoću hijaluronske kiseline koja takođe doprinosi akumulaciji nanočestica u tumorskom tkivu. *Yin* i saradnici su na ovaj način modifikovane TiO₂ nanočestice konjugovali s citostatikom *Doxorubicin*-om. Dodatno, sistem je obložen komponentom koja konvertuje zračenje iz bliske infracrvene oblasti u UV (NaGdF₄:Yb 25%, Tm 0.3%), pomoću čega su postigli svetlom kontrolisano otpuštanje citostatika u tumorskom tkivu.^[129] Dobru fotocitotoksičnost nakon UV zračenja je pokazao i sistem koji se sastoji od nanostrukturnog TiO₂ u obliku *whiskers*-a (TiO₂ Ws) presvučenog gamboginskom kiselinom. Povećana koncentracija gamboginske kiseline u ispitivanim ćelijama humane eritoleukemije (ćelijska linija K562) je potvrdila da TiO₂ Ws imaju potencijal za dostavu

terapeutika.^[130] Ispitivanja su takođe sprovedena i s drugim protiv-tumorskim agensima, te je nanostrukturni TiO₂ pokazao potencijal kao nosač i za valproinsku kiselinu.^[131]

Iako apsorbuje od UV do NIR oblasti (~ 1.150 nm), crni TiO_{2-x} u svojstvu FS je za sada veoma malo ispitan, kako je najveći broj istraživanja usmeren na ispitivanja njegovih fotokatalitičkih osobina. Ipak, njegova biokompatibilnost je potvrđena u studijama koje su ispitivale korišćenje crnog TiO_{2-x} za fototermalnu terapiju kancera.^[132-134] Dodatno, studija u kojoj je korišćen sistem koji se sastoji od defektnog crnog TiO_{2-x} čija je površina modifikovana (3-aminopropil)-trietokisilanom u konjugaciji s lekom koji se aktivira hipoksijom (6-aminoflavonom), je pokazala ne samo veoma dobru apsorpciju u NIR oblasti, već je postignuta i značajna inhibicija rasta ćelija HepG-2.^[135]

2.5. Rutenijumovi kompleksi u fotodinamičkoj terapiji

Osim kao citostatici, kompleksi rutenijuma se mogu koristiti kao FS u FDT kancera. Naime, Ru-kompleksi poseduju i jedinstvenu kombinaciju osobina kojima mogu značajno da unaprede terapiju kancera, a koje su istaknute na Slici 3. Jedna od njih je osobina mimikrije gvožđa koja doprinosi većoj selektivnosti Ru-kompleksa u odnosu na komplekse platine prema ćelijama kancera koje, s obzirom na brži metabolizam, imaju veću potrebu za gvožđem. Mimikrija gvožđa se ogleda u lakom vezivanju Ru(III) za serumske transportne proteine, albumin i transferin, na vezivnim mestima za gvožđe, što posledično utiče na nižu toksičnost kompleksa rutenijuma prema zdravim ćelijama u poređenju s kompleksima platine.^[136-138] Nadalje, biološke mete kompleksa rutenijuma mogu biti različiti biomolekuli kao što su transportni proteini (transferin, albumin); proteini iz mitohondrija (citohrom c^[139]); enzimi (acetilholin esteraza i fosfolipaza A₂^[140], tioredoksin reduktaza i katepsin B^[141]) i nukleotidi (adenozin trifosfat^[142]). Ru-kompleksi su takođe efikasniji prema određenim vrstama tumora za koje su se kompleksi platine pokazali kao neefikasni, kao i prema metastazama, što može biti posledica njihovog efekta na migraciju i adheziju na tumorske ćelije.^[143,144]

Imajući u vidu navedene prednosti koje ispoljavaju kompleksi rutenijuma, veliki je broj sintetisanih kompleksa čija se antikancerogena svojstva ispituju. Jedno od prvih ispitivanja rutenijumovih kompleksa za potrebe FDT se odnosi na porfirinski Ru(II) kompleks koji je pokazao veoma dobru fotocitotoksičnost nakon stimulacije laserom (652 nm) na ćelijskoj liniji humanog melanoma (A375) kao i ulazak u ćelije u granularnim strukturama koje su drugačije od lizozoma.^[145] Zatim je Ru(II) kompleks s etilen-glikolnim ligandima ispitan u svojstvu FS

za potrebe dvo-fotonske FDT na ćelijama glioma (F98). Nakon 15 min zračenja laserom (740 nm) usmerenog na pojedinačnu ćeliju tretiranu kompleksom zapažene su drastične morfološke promene u ćelijskoj strukturi, koje nisu bile uočljive kada su ćelije samo zračene pod istim uslovima.^[146] Ru(II) polipiridil kompleks je pokazao bolju fotocitotoksičnost prema HeLa ćelijskoj liniji u odnosu na tetrafenilporfirin, FS koja se uobičajeno koristi za FDT.^[91] Nešto drugačiji Ru(II) polipiridil kompleksi su se značajno akumulirali u jedru HeLa ćelija, što sugeriše interakcije s DNK molekulima. Nakon obasjavanja svetlom od 420 nm zapažen je izražen citotoksični efekat, dok su se u mraku ovi kompleksi pokazali kao netoksični.^[147] Na sličnim Ru(II) polipiridil kompleksima potvrđen je ćelijski unos kompleksa i njegova lokalizacija u lizozomima, što predstavlja idealnu lokaciju za FDT, kao i visok fotocitotoksični indeks nakon ozračivanja HeLa 3D sferoida.^[148]

Pored navedenih primera kao dobri kandidati za FDT pokazali su se i Ru(II) kompleksi s arenskim ligandima.^[141,149] Njihova efikasnost je posledica foto-indukovane disocijacije, nakon koje se slobodni rutenijumovi fragmenti vezuju za DNK molekul.

Posebnu pažnju zavređuje Ru(II) kompleks oznake TLD1433 koji je ušao u faze I i IIa kliničkih ispitivanja za FDT kancera bešike. Ovaj polipiridinski kompleks je prva Ru(II) FS koja se ispituje za kliničku primenu. Nakon dokazivanja fototoksičnog efekta *in vitro*, u brojnim studijama na različitim 2D i 3D ćelijskim kulturama i organoidima^L antitumorska aktivnost TLD1433 kompleksa je ispitana na pacijentima s invazivnim nemišićnim kancerom bešike koji nisu reagovali na standardnu terapiju (NCT03053635). Ova studija je dala zadovoljavajuće rezultate na 6 ispitanih pacijenata, a u toku je II faza ispitivanja na većoj populaciji ispitanika. Smatra se da je ovaj efekat posledica oštećenja DNK molekula pri ozračivanju vidljivim svetlom tumorskog tkiva tretiranog s TLD1433. Dodatno, u ćelijama kancera dolazi do luminiscencije, te osim kao terapija, TLD1433 može da posluži i kao dijagnostički agens.^[150]

2.5.1. Rutenijumovi kompleksi kao fotoosetljive supstance u konjugaciji s nanostrukturnim TiO₂

Postoji značajan broj radova koji su proučavali fizičko-hemijske karakteristike veze između rutenijumovih kompleksa i nanostrukturnog TiO₂, međutim ova istraživanja su imala za cilj da pokažu potencijal ovakvih nanokompozitnih sistema (NKS) kao efikasnih

^L Za razliku od 2D ćelijskih kultura koje predstavljaju monoslojeve ili suspenzije ćelija u medijumu, 3D ćelijske kulture i organoidi su složenije strukture. Mogu nastati uzgajanjem ćelijskih linija (3D sferoidi) ili izolovanjem, a zatim i uzgajanjem progenitornih ćelija koje su izdvojene od pacijenata u okviru personalizovane terapije.

katalizatora^[151] ili jedinica za konverziju solarne energije.^[152,153] Međutim, NKS koji je sintetisan vezivanjem potencijalnog citostatika – kompleksa *cis*-dihloridobis(2,2'-bipiridil-4,4'-dikarboksilnaiselina)rutenijum(II) za nosač – koloidne TiO₂ nanočestice pokazao je veoma dobar potencijal za kontrolisanu dostavu citostatika, uz mogućnost njegovog aktiviranja svetlom i postepenog otpuštanja. Nizak nivo citotoksičnosti u odsustvu svetlosnog stimulansa, kao i dobar fotocitotoksični efekat na ćelijama humanog melanoma A375 omogućavaju efikasnu FDT melanoma pomoću ovog NKS.^[87,154]

3. ZADATAK RADA

Zadatak ove disertacije je formiranje i ispitivanje svojstava NKS koji se sastoje od nanostrukturnih TiO₂ i kompleksa *cis*-dihlorobis(2,2'-bipiridil-4,4'-dikarboksilna kiselina) rutenijum(II), [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂], kao osnove za FDT različitih tipova kancera. U skladu s tim, pojedinačni zadaci rada su:

- sintetisati i okarakterisati potencijalni citostatik hemijske formule [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂];
- sintetisati i okarakterisati dopirane i nedopirane nanostrukturne TiO₂ raznih oblika i dimenzija za upotrebu u svojstvu FS i nosača za potencijalni citostatik;
- formirati i okarakterisati NKS od gore navedenih komponenti;
- ispitati promene optičkih osobina dopiranih nanostrukturnih TiO₂ i NKS;
- ispitati uticaj vidljive (632,8 nm) i UV (254 nm) svetlosti na brzinu i profil otpuštanja kompleksa s površine NKS, kada je slobodan i inkapsuliran u liposome;
- ispitati interakcije s ćelijama pojedinačnih komponenti i NKS (ćelijski unos i citotoksičnost prema ćelijskim linijama, bez i nakon primenjenog svetlosnog stimulansa);
- ispitati oksidativnu aktivnost dopiranih/modifikovanih nanostrukturnih TiO₂ i NKS.

Od rezultata dobijenih u okviru ove doktorske disertacije očekuje se dobijanje boljeg uvida u mehanizam dejstva fotoosetljivih NKS i pronalaženje sistema s nanostrukturnim TiO₂ koji će biti najefikasniji, odnosno čija će primena dovesti do najvećeg stepena inhibicije rasta ćelija kancera. Očekuje se uspostavljanje zavisnosti između citotoksičnosti, s jedne strane, i oblika nanočestica, vrste dopanta i vrste dodatnog površinskog modifikatora (fosfolipida).

Krajnji cilj je doprinos saznanjima o nanostrukturnim TiO₂ i mogućnostima njihove primene u svojstvu FS i nanonosača za ciljanu i kontrolisanu dostavu potencijalnih citostatika na bazi kompleksa prelaznih metala.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. Hemikalije i reagensi

Za sintezu kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] upotrebljene su sledeće komercijalno dostupne hemikalije bez prethodnog prečišćavanja: rutenijum-(III)hlorid trihidrat, RuCl₃·3H₂O, proizvođača *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka), 2,2'-bipiridil-4,4'-dikarboksilna kiselina (dcbpy) proizvođača *Suna Tech Inc.* (Suzhou, Kina), dimetilformamid (DMF), hlorovodonična kiselina (HCl), aceton i dietiletar (*Merck*, Darmstadt, Nemačka). Titanijum-(IV)hlorid (TiCl₄), komercijalni prah nanočestica TiO₂ i sve ostale hemikalije upotrebljene za sintezu nanostrukturnih TiO₂ su nabavljene od proizvođača *Fluka Chemical Corporation* (Buchs, Švajcarska) i *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka) i bile su najveće dostupne čistoće. Za sintezu i dijaliziranje koloidnih TiO₂ NČ korišćena je *Milli-Q* voda – destilovana pomoću sistema s četiri jonoizmenjivačke kolone.

Helijum i ostali gasovi su bili visoke čistoće (99,5 %, *Messer Tehnogas AD*, Beograd Srbija). Spinski hvatač 5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirolin-*N*-oksid (DEPMPO) za elektronsku paramagnetnu rezonantnu (EPR) spektroskopiju kupljen je od proizvođača *Focus Biomolecules* (Plymouth Meeting, SAD). Hemikalije potrebne za prečišćavanje DEPMPO, kalijum–heksacijanoferat(III), jonski izmenjivači dietilaminoetil (DEAE), Sephadex A-25 i aktivni ugalj kupljeni su od proizvođača *Merck KGaA* (Nemačka). Goveđi serum albumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA), puferi – fosfatni (engl. *Phosphate Buffered Saline*, PBS), Tris-hidroksimetilaminometan (Tris), rastvarači – dimetil sulfoksid (DMSO), metanol i hloroform, agensi za fiksiranje i bojenje ćelija – formalin i formaldehid, akridin oranž (AO) i propidijum jodid (PI) su kupljeni od *Sigma-Aldrich* (Darmstadt, Nemačka). Natrijum hlorid (NaCl), trihlorsirćetna kiselina, etanol i sirćetna kiselina nabavljeni su od *Centrohema* (Stara Pazova, Srbija). Rastvor tripsin-EDTA je nabavljen od proizvođača *Gibco Thermo Fisher* (Waltham, SAD)

Ćelijske linije: mišjih fetalnih fibroblasta 3T3, humanog melanoma A375, humanog kancera dojke SKBR3, humanog kancera pankreasa PANC-1 i humanog kancera bazalnih alveolarnih epitelijalnih ćelija A549, nabavljene su od organizacije *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, SAD). Za potrebe ispitivanja ćelijskog unosa korišćena je HeLa ćelijska linija nabavljena iz šangajske banke ćelija (Ćelijska Banka Kineske Akademije Nauka, Šangaj, Kina). Ćelije iz mišje slezine, splenociti su izdvojene iz laboratorijskih miševa soja

Balb/c gajenih u *Institutu za mikrobiologiju Češke Akademije Nauka* (Prag, Češka). Sve eksperimentalne procedure su sprovedene u skladu s etičkim načelima rada s laboratorijskim životinjama propisanim od strane Evropske konvencije za brigu i upotrebu laboratorijskih životinja (engl. *European Convention for the Care and Use of Laboratory Animals*). Izvođenje ogleada je odobrio *Komitet za negu i upotrebu životinja, Instituta za mikrobiologiju Češke Akademije Nauka* (broj odobrenja 64/2015).

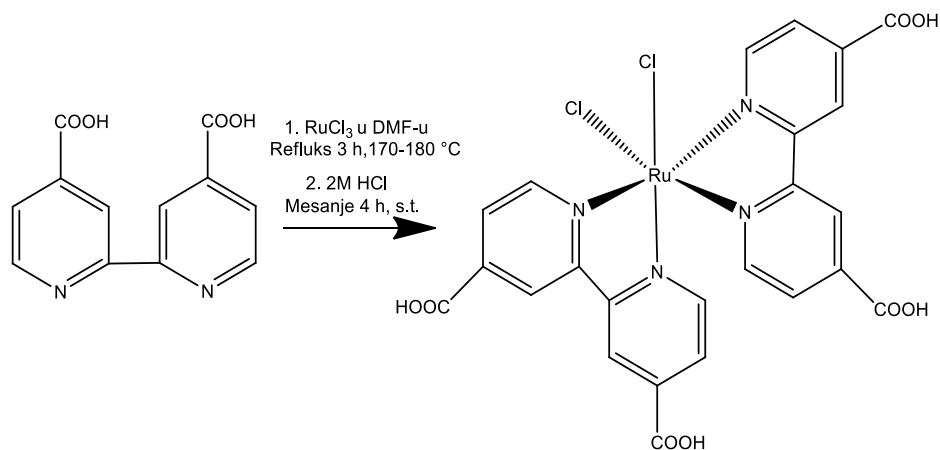
Za gajenje ćelijskih linija 3T3, A375, SKBR3, PANC-1, A549 i HeLa korišćeni su *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) i *RPMI-1640 Medium* sa dodatkom glukoze, L-glutamina, fetalnog telećeg seruma (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS, *Gibco*, Grand Island, SAD), natrijum piruvata, 2-merkaptetanola, penicilina, streptomcina (*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Taufkirchen, Nemačka). Za gajenje splenocita korišćen je Hankov minimalni esencijalni medijum (HMEM-d) koji je napravljen u *Institutu za molekularnu genetiku* (Prag, Češka). Za potrebe određivanja unutarćelijske proizvodnje RKV ćelije su gajene u DMEM medijumu bez fenol crvenog, proizvođača *Biological Industries Ltd.* (Beit-Haemek, Izrael).

Za karakterizaciju $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ kompleksa masenom spektrometrijom zasnovanom na jonizaciji potpomognutoj laserskom desorpcijom iz matriksa koja koristi analizator masa na bazi vremena preleta, MALDI TOF MS (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry*) korišćena je matrica 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina (DHB) i trifluorsirćetna kiselina (TFA). Matrica i hemikalije za MALDI TOF MS korišćene su bez daljeg prečišćavanja i nabavljene su od proizvođača *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka).

HeLa ćelije za ispitivanje ćelijskog unosa obojene su fluorescentnim indikatorom – bisbenzimidom, *Hoechst 33342I*, nabavljenim od proizvođača *Beyotime* (Jiangsu, Kina). Za bojenje nanostrukturnog tretmana za A549 ćelije korišćen je rodamin-B-izotiocianat (skraćeno RITC) nabavljen od *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Taufkirchen, Nemačka). Za test aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza (MTT test) korišćena je so 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid nabavljena od *Serva Electrophoresis GmbH* (Heidelberg, Nemačka), dok je za modifikovani MTT test korišćena so WST-8 (2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazolijum, mononatrijumova so) nabavljen od *Beyotime* (Jiangsu, Kina). Boje za ostale testove vijabilnosti, triarilmetan (za kristal violet test, engl. *Crystal Violet*, CV) i sulforodamin B (SRB) nabavljene su od *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (Steinheim, Nemačka). Za određivanje unutarćelijskog nivoa RKV korišćen je komplet za fluorometrijski test nabavljen od kompanije *Elabsciences* (Houston, SAD).

4.2. Sinteza kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$

Kompleks $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ je sintetisan modifikacijom procedure opisane od strane Nazeeruddin-a i saradnika.^[153] Šema 1 prikazuje reakciju sinteze kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$, koja počinje rastvaranjem 0,260 g $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ u 50 mL DMF-a. U rastvor rutenijumovih soli dobijenih nakon 15 min mešanja, dodato je 0,476 g liganda dcbpy. Zatim je reakciona smeša refluktovana na temperaturi u rasponu 170-180 °C pomoću uljanog kupatila tokom 3 h uz intenzivno mešanje u atmosferi helijuma i odsustvo svetlosti. Za dobijanje produkta željenih osobina, veoma je važno bilo održavati uslove bez prisustva svetlosti, kako je na taj način sprečena izomerizacija kompleksa u neželjeni *trans* oblik. Nakon zagrevanja, reakciona smeša je ostavljena da se hladi na sobnoj temperaturi, a zatim je filtrirana. DMF je zatim uparen na vakuum uparivaču, a rezultujući čvrst produkt je ispran smešom acetona i dietiletra (1:4) i rastvoren 2 M vodenim rastvorom HCl i mešan tokom 4 h u odsustvu svetlosti. Nakon naredne filtracije reakcione smeše, dobijen je talog koji je sušen tokom 5 h na 40 °C. Sintetisani $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ kompleks je čuvan u zatamnjenoj staklenoj bočici u frižideru.



Šema 1. Reakcija sinteze $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ kompleksa s odgovarajućim reakcionim uslovima. Preuzeto uz dozvolu od ^[155].

Nakon sinteze kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$, karakterizacija dobijenog produkta izvršena je maseno-spektrometrijskom analizom pomoću MALDI TOF uređaja, ultraljubičaste i vidljive spektroskopije (engl. *Ultra Violet-Visible*, UV-Vis) i infracrvene spektroskopije s Furijeovom transformacijom (engl. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR).

4.3. Sinteza nanostrukturnih TiO₂ čestica

4.3.1. Sinteza koloidnih TiO₂ nanočestica

Koloidni rastvor TiO₂ nanočestica je sintetisan prema proceduri prethodno opisanoj od strane *Rajh* i saradnika.^[156] Vodeni rastvor TiCl₄ temperature -20 °C je dodat u rashlađenu vodu (4 °C) ukapavanjem pri konstantnom mešanju. Dobijeni koloidni rastvor je ostavljen 30 min u ledenom kupatilu, a zatim je dijaliziran pomoću membrane za dijalizu (molekulske mase 3500, *Spectrum Laboratories*, Rancho Dominguez, SAD) u odnosu na tri puta veću zapreminu *Milli-Q* vode. Nakon dijalize, koloidni TiO₂ je razblažen do koncentracije 0,015 M i pomešan s 100 µL glicidil-izopropil etra (koji oblaže nanočestice TiO₂ i sprečava neželjene reakcije hidroksilnih grupa na površini TiO₂). Zatim, u koloidni rastvor TiO₂ je ubrizgan litijum-hidroksid (0,2 M) uz intenzivno mešanje do postizanja pH vrednosti od 9,5. Na ovaj način dobijene su koloidne TiO₂ nanočestice (TiO₂ NČ) veličine 4,5 nm (oko 1500 molekula TiO₂ po čestici) koje su još jednom dijalizovane uz 10 mM NaH₂PO₄ sve dok nije postignuta pH vrednost od 7.

TiO₂ NČ su okarakterisane pomoću infracrvene spektroskopije s Furijeovom transformacijom, rendgenske difrakcione analize (engl. *X-ray Diffraction*, XRD) i transmisione elektronske mikroskopije (TEM) kao što je opisano u potpoglavljima 4.5.3., 4.5.5. i 4.5.7. navedenim redom.

4.3.2. Sinteza prolatnih nanosferoida TiO₂

Sinteza TiO₂ prolatnih nanosferoida (TiO₂ PNS) je izvedena preko međuproizvoda TiO₂ nanotuba. Nanotube TiO₂ su sintetisane hidrotermalnom metodom u baznoj sredini. Ukratko, postupak je bio sledeći: 250 mg komercijalnog praha nanočestica TiO₂ je pomešano s 10 mL rastvora natrijum-hidroksida (koncentracije 10 M), a zatim je smeša autoklavirana na 150 °C tokom 20 h. Dobijena disperzija je zatim ispirana vodenim rastvorom HCl (0,1 M) do postizanja pH vrednosti od 7. Rastvor je zatim centrifugiran (2000×g, 30 min) i istaložene TiO₂ nanotube su sušene na 70 °C do postizanja konstantne mase. TiO₂ PNS su sintetisani iz dobijenih nanotuba dodatnim hidrotermalnim tretmanom, a oba postupka su detaljno opisana od strane *Radoičić* i saradnika.^[157] Ukratko, osušene nanotube (50 mg) su dispergovane u 10 mL destilovane vode (pH 7), a zatim autoklavirane na 250 °C tokom 90 min. Na taj način dobijeni TiO₂ PNS su sušeni na 70 °C do konstantne mase.

TiO₂ PNS su okarakterisani pomoću Ramanske spektroskopije, tehnika XRD i TEM, kao što je opisano u potpoglavljima 4.5.4., 4.5.5. i 4.5.7.

4.3.3. Sinteza N i C dopiranih TiO₂ nanočestica

Koloidne TiO₂ nanočestice dopirane azotom i ugljenikom (N-TiO₂ NČ i C-TiO₂ NČ) su pripravljene prema sličnom postupku koji je opisan od strane *Ren-a* i saradnika.^[158] Sinteza je izvedena preko među-proizvoda – amorfni TiO₂ nanočestica dobijenih postupkom kontrolisane hidrolize etanolnog rastvora izopropoksid titana (97 %). Ukratko, 100 mL etanola je pomešano s 0,4 mL vodenog rastvora kalijum-hlorida (0,1 M), nakon čega je dodato 2,2 mL rastvora titanijum izopropoksida uz intenzivno mešanje tokom 10 min. Suspenzija s belim talogom je ostavljena tokom 24 sata radi zrenja. Nakon toga, gornji sloj suspenzije je sakupljen, filtriran i osušen na 60 °C.

N i C-TiO₂ NČ su zatim pripravljene dodatnom termičkom obradom smeše amorfno TiO₂. Preciznije, za sintezu N-TiO₂ NČ, amorfne TiO₂ nanočestice su zajedno s ureom (maseni odnos 22: 1) rastvorene u *Milli-Q* vodi, dok je za sintezu C-TiO₂ NČ umesto uree korišćena glukoza. Zatim su smeše s N/C-TiO₂ NČ autoklavirane na 160 °C tokom 12 sati. Nakon hlađenja, dobijeni produkti sinteze su sakupljeni, isprani vodom i etanolom i osušeni na 60 °C.

N i C-TiO₂ NČ su okarakterisane Ramanskom spektroskopijom, XRD i TEM, kao što je opisano u potpoglavljima 4.5.4., 4.5.5. i 4.5.7.

4.4. Formiranje nanokompozitnih sistema

Kompleks [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] je rastvoren u etanolu (99,5 %), te je dobijen tamno crveni rastvor koncentracije 8x10⁻³ M. Za formiranje NKS 100 µL pomenutog rastvora [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] kompleksa je dodato u 900 µL vodene suspenzije TiO₂ NČ ili TiO₂ PNS koncentracije 3x10⁻³ M, pH 7. Ovaj odnos je izabran s obzirom da broj izloženih atoma Ti na površini TiO₂ iznosi 30 %.^[159] Reakcione smeše su blago mešane (u šejkeru) tokom 24 h, u odsustvu svetlosti. Dobijeni nanočestični NKS (NČ NKS) je okarakterisan pomoću FTIR tehnike, dok je prolatno-nanosferoidni NKS (PNS NKS) okarakterisan pomoću Ramanske mikroskopije i sedimentacionog eseja (PNS NKS) što je detaljnije opisano u okviru potpoglavlja 4.5.3., 4.5.4. i poglavlja 4.6.

4.4.1. Inkapsuliranje nanočestičnog nanokompozitnog sistema u male unilamelarne vezikule

NČ NKS je za potrebe potencijalno bolje distribucije i stabilnosti sistema inkapsuliran u male unilamelarne vezikule (MUV). Za njihovu pripremu najpre smo izolovali fosfolipide iz žumanceta kokošijeg jajeta. Za ekstrakciju je korišćena procedura za potpunu ekstrakciju lipida iz žumanceta koju su opisali *Furusawa* i saradnici.^[160] Ukratko, primenjena je metoda po *Folch*-u prema kojoj je žumance najpre rastvoreno u smeši nepolarnog i polarnog rastvarača – hloroforma i metanola zbog sposobnosti hloroforma da dobro rastvara lipide, a metanola da dobro ekstrahuje polarne komponente žumanceta. Smeša je korišćena u zapreminskom odnosu (v/v) 2:1, dok je maseno/zapreminski odnos žumanceta prema rastvaraču bio 1:20 (na 10 g žumanceta korišćeno je 20 mL smeše rastvarača). Nakon homogenizacije i centrifugiranja, usledilo je ispiranje 1 % rastvorom NaCl. Zatim je odvojen hloroformski sloj (donji sloj) koji je ispran smešom hloroforma, metanola i vode (3:48:47, v/v). Nakon homogenizacije i centrifugiranja konačno je odvojen hloroformski sloj koji je uparen do suva, najpre na vakuum uparivaču, a zatim u struji azota.

Fosfolipidni sastav dobijen ekstrakcijom iz žumanceta je određen pomoću tankoslojne hromatografije (engl. *Thin Layer Chromatography*, TLC). U tu svrhu je deo ekstrakta neposredno, pre dobijanja suvog ostatka, nanet na pločicu za TLC (Sillica gel 60, *Merck*, Nemačka) u nekoliko različitih razblaženja. U istoj količini naneti su i standardni fosfolipidni rastvori – fosfatidilholin, dipalmitoil-fosfatidilholin, lizofosfatidilholin i sfingomijelin. Nakon sušenja nanetih uzoraka i standarda pločica je postavljena uspravno u kadicu s mobilnom fazom (hloroform:etanol:voda:tetraetilamin; v/v – 30:35:7:36). Kada je mobilna faza dostigla visinu od otprilike 1 cm od gornjeg kraja pločice, pločica je izvađena i ostavljena da se osuši. Sasvim suva pločica za TLC je smeštena u zatvorenu staklenu posudu s nekoliko kristala joda koji su omogućili vizuelizaciju dobijene raspodele uzoraka i standarda između mobilnog rastvarača i silika gela.

Na osnovu dobijene raspodele ovim postupkom,^[161] poređenjem sa standardom, potvrđeno je prisustvo fosfatidilholina u ekstrahovanoj smeši iz žumanceta što doprinosi stabilnosti NČ NKS-MUV. Takođe, potvrđeno je odsustvo dipalmitoil-fosfatidilholina. Moguće je prisustvo sfingomijelina i fosfatidilinozitola u tragovima.

Nakon potvrde željenog fosfolipidnog sastava, MUV su pripremljene prema postupku koji su koristili *Alonso* i saradnici,^[162] uz korišćenje ultrazvučne sonde UP100H (*Hielscher-Ultrasound Technology*, Nemačka). Prethodno ekstrahovani fosfolipidi su nakon uparavanja

do suva resuspendovani u 5 mL rastvora 0,15 M NaCl i 0,0067 M PBS pH vrednosti 7,4. Zatim je dobijeni rastvor podvrgnut ultrazvučnom tretmanu pomoću uronjene sonde, čija je amplituda bila 10-12 μm , tokom 20 min s ciklusima naizmeničnog paljenja i gašenja ultrazvuka u trajanju od 10 s. Formirane MUV su za potrebe daljih analiza čuvane u uslovima dubokog zamrzavanja na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prema navedenoj literaturi,^[162] dobijeni MUV na ovaj način imaju očekivani prosečni prečnik od 30 nm.

Najzad, dobijene MUV u koncentraciji od $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, su pomešane s NČ NKS u masenom odnosu 1:1. Smeša NČ NKS i MUV je zatim inkubirana tokom 24 h na sobnoj temperaturi uz blago mešanje, čime je dobijen novi sistem NČ NKS-MUV koji je korišćen u daljim eksperimentima pod istim uslovima kao i slobodni NKS.

4.5. Instrumentalne metode

4.5.1. Masena spektrometrija zasnovana na jonizaciji potpomognutoj laserskom desorpcijom iz matriksa koja koristi analizator masa na bazi vremena preleta

Kompleks $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ je okarakterisan maseno-spektrometrijskom analizom. MALDI TOF maseni spektri su dobijeni pomoću Autoflex masenog spektrometra (*Bruker Daltonics*, Bremen, Nemačka) koji je opremljen s pulsniim 50 Hz azotnim laserom koji emituje svetlost na $\lambda=337\text{ nm}$.

Spektar $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ kompleksa je snimljen u reflektornom, pozitivnom modu, s odloženim ekstrakcionim vremenom 100 ns i naponom od 20 kV, a dobijen je pomoću 100-300 laserskih udara u proseku. U cilju sprečavanja degradacije $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ kompleksa i ostvarivanja pogodnog odnosa signal-šum (S/N), intenzitet lasera je održavan na niskoj vrednosti. Dodatno, radi potvrde strukture $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ kompleksa, urađena je *Post Source Decay* analiza.

4.5.1.1. Priprema uzoraka za maseno-spektrometrijsku analizu

Za karakterizaciju pomoću MALDI TOF MS analize, napravljen je etanolni rastvor kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ koncentracije 0,6 mM. Korišćena je matrica DHB rastvorena u metanolu (0,5 M) s 0,1 % TFA. Na MALDI TOF pločicu je naneta mala zapremina (0,5 μL) pripremljenog rastvora $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ kompleksa, nakon čega je naneta ista zapremina rastvora matrice. Isti postupak je ponovljen tri puta za dobijanje triplikata, a pre analize je sačekano da dođe do kokristalizacije kompleksa i matrice na sobnoj temperaturi.

4.5.2. Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija

Za snimanje spektara pomoću UV-Vis spektroskopije rastvora kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂], TiO₂ NČ, TiO₂ PNS, C-TiO₂ NČ; određivanje apsorbancije rastvora za sedimentacioni esej (određivanje efikasnosti vezivanja kompleksa za površinu TiO₂ NČ i TiO₂ PNS) i za praćenje kinetike otpuštanja kompleksa s površine nosača (TiO₂ NČ) korišćen je spektrofotometar Lambda 35 (*Perkin Elmer*, Waltham, SAD). Opseg snimanja spektara bio je od 200-700 nm, snimanja su izvedena na sobnoj temperaturi, a uzorci (700 µL) su bili smešteni u kvarcnoj mikrokiveti čiji je optički put 1 cm. UV-Vis difuziono-refleksioni spektri su snimljeni na uređaju Evolution 600 UV/Vis spectrometer, (*Thermo Scientific*, Waltham, SAD).

Za određivanje stepena preživljavanja ćelija i određivanje unutarćelijskih RKV korišćeni su sledeći spektrofotometrijski čitači mikrotitar pločica:

- Za SRB i određivanje RKV korišćen je uređaj VICTOR2 1420 Multilabel Counter (*Perkin Elmer*, Waltham, SAD).
- Za MTT i CV testove korišćen je uređaj Infinite 200Pro (*Tecan*, Männedorf, Švajcarska).
- Za modifikovani MTT test korišćen je uređaj Bio-Tek Synergy HT (*Bio-Tek Instruments*, Vermont, SAD).

4.5.3. Infracrvena spektroskopija s Furijeovom transformacijom – FTIR

Dobijeni FTIR spektri kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂], TiO₂ NČ i NČ NKS su snimljeni pomoću FTIR spektrofotometra Nicolet 380 proizvođača *Thermo Electron Corporation* (Waltham, SAD) u načinu rada prigušene totalne refleksije (engl. *Attenuated Total Reflection*, ATR). Opseg snimanja je bio 400-4000 cm⁻¹, a izvršeno je po 64 skeniranja rezolucije 2 cm⁻¹.

4.5.4. Ramanska spektroskopija

Kristalna struktura N i C-TiO₂ NČ je proučavana Ramanskom spektroskopijom. Ramanski spektri su snimljeni na uređaju DXR Raman microscope (*Thermo Scientific*, Waltham, SAD) opremljenim s optičkim mikroskopom i CCD (engl. *Charge-Coupled Device*) detektorom. Laserski snop je fokusiran na uzorak pomoću objektiva uvećanja ×50. Pobudna talasna dužina diodnog lasera je iznosila 532 nm. Rasejana svetlost analizirana je spektrografom s difrakcionom rešetkom koja sadrži 900 zarezova po mm.

4.5.5. Rendgenska difrakciona analiza

Kristalna struktura ispitivanih nanostrukturnih TiO₂ određena je pomoću XRD tehnike na uređaju Philips PW 1050 (Amsterdam, Holandija). Kao upadno zračenje je korišćena linija bakra (CuK_α), talasne dužine $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ s Ni filterom. Intenziteti difrakcionih maksimuma prikupljeni su skenirajućom tehnikom u rangu $2\theta = 10-70^\circ$ s korakom od $0,05^\circ$ i vremenom zadržavanja od 50 s po koraku.

4.5.6. Konfokalna Ramanska mikroskopija

Konfokalna Ramanska mikroskopija (engl. *Confocal Raman Microscopy*, CRM) kombinuje spontanu Ramansku emisiju s detekcijom pomoću konfokalnog mikroskopa. CRM tehnikom moguće je pored karakterizacije nanomaterijala, utvrditi i njegovu preciznu lokalizaciju u ćelijama. Naime, snimanjem čitavog Ramanovog spektra na bilo kom mestu ćelija inkubiranih s nanomaterijalom, dobijaju se trake u spektrima koje potiču kako od nanomaterijala tako i od odgovarajućih biomolekula iz ćelija (proteina, DNK, lipida) čime se jasno dobija informacija u kom delu ćelije se nalaze ispitivane nanostrukture.^[163] Stoga, ova metoda je korišćena pre svega za karakterizaciju TiO₂ PNS i PNS NKS, a zatim je ispitan i ulazak ovog sistema u ćeliju.

CRM analiza je izvedena pomoću *Renishaw inVia Raman* mikroskopa. Pobudna talasna dužina lasera iznosila je 532 nm s rešetkom koja sadrži 1800 zarezova po mm. Korišćen je vodeni objektiv uvećanja $\times 40$ s fokusnim mestom prečnika približno 1 μm . Spektri su zabeleženi u regionu $300-3600 \text{ cm}^{-1}$ s rezolucijom od približno 7 cm^{-1} . Akumulirano je najmanje 8-15 skeniranja na različitim mestima u organelama, lipidnim telima, citoplazmi i jedru pomoću kojih je smanjen spektralni šum. Spektri su snimani nakon inkubacije s PNS NKS na mestima u ćelijama gde su bili uočljivi nanočestični agregati. Kontrolni spektri različitih ćelijskih organela uzeti su u ćelijama koje nisu izložene nanomaterijalu. Svi spektri su korigovani baznom linijom poreklom od PBS rastvora i pokrovnog stakla.

4.5.7. Transmisiona elektronska mikroskopija – TEM

Veličina i oblik ispitivanih nanostrukturnih TiO₂ je određena pomoću TEM. Korišćeni su mikroskopi proizvođača *JEOL* (Japan), pri radnom naponu 200 keV. Za određivanje TiO₂ NČ korišćen je model JEM 2100 LaB₆, dok je za snimanje TiO₂ PNS, N i C-TiO₂ NČ korišćen model JEM2100F. Nanostrukturne disperzije su za TEM pripremljene prvo desetominutnim

ultrazvučnim tretmanom, nakon čega je po 6 μL uzorka nakapano na bakarnu mrežicu prekrivenu slojem poroznog ugljenika, a zatim su uzroci sušeni na vazduhu.

4.5.8. Epifluorescentna mikroskopija

Za ispitivanje vrste ćelijske smrti uzrokovane kombinovanim tretmanom C-TiO₂ NČ i plavog svetla korišćen je epifluorescentni mikroskop Axio Imager A1 (*Carl Zeiss*, Nemačka) opremljen ISIS softverskim paketom za slike (*MetaSystems*, Nemačka). Najpre su HeLa ćelije obojene koristeći AO/PI metodu. Zatim su ćelije tretirane s C-TiO₂ NČ i/ili zračene u trajanju od 15 min plavim svetlom dobijenim postavljanjem propusnog filtera u opsegu 400-450 nm (*ThorLabs*, Bergkirchen, Nemačka) na optički put sijalice od 100 W. Ovako dobijeno plavo svetlo na 450 nm je bilo rezultujuće snage od 120 μW , a za merenje snage je korišćen uređaj opisan u potpoglavlju 4.5.13. Nakon inkubacije od 48 h pri standardnim uslovima za kultivaciju ćelija, ćelije su odvojene od površine flaska pomoću rastvora tripsin-EDTA, blokirane dodavanjem podloge s 10 % FBS-om, prebačene u epruvete i centrifugirane 5 minuta na 600 \times RCF, a zatim isprane PBS-om. Nakon dodavanja istih zapremina fluorescentnih boja (10 mL, 10 mg mL⁻¹), ćelijska suspenzija naneta je na mikroskopske pločice, prekrivena pokrovnim staklom i analizirana pod mikroskopom u roku od 15 minuta. Prebrojano je i analizirano najmanje 100 ćelija po tretmanu.

4.5.9. Laserska skenirajuća konfokalna mikroskopija

Za ispitivanje unosa nanostrukturnih TiO₂ u ćeliju, korišćen je laserski skenirajući konfokalni mikroskop (engl. *Laser Scanning Confocal Microscopy*, LSCM) čija je osnovna prednost što je moguće dobiti detaljni prikaz unutrašnjosti ćelija pomoću različitih pobudnih talasnih dužina lasera i primenjenih filtera emisije.

Ćelije su posmatrane pomoću LSCM uređaja (FV300/IX, *Olympus*, Japan) s kontinualnim laserom pobudne talasne dužine od 405 nm i vodenim objektivnom uvećanja $\times 60$, numeričke aperture 1,2 i skenirajuće oblasti veličine 115 x 115 μm . Dobijene su mikrografije rezolucije 512 x 512 piksela (1 piksel – 225 nm). Važno je napomenuti da iako TiO₂ nije fluorescentan i ne može se detektovati fluorescentnim kanalom bez bojenja, pogodan je za slikanja u refleksiji. Stoga su za ispitivane nanostrukturne TiO₂ dobijene refleksione mikrografije pomoću refleksionog kanala bez filtera, i mikrografije diferencijalnog interferentnog kontrasta (engl. *Differential Interference Contrast*, DIC) koji predstavlja

ćelijsku morfologiju pomoću transmisionog kanala. *ImageJ* softver (*Fidži*) je primenjen za preklapanje ova dva kanala i za crveno obojenu prezentaciju nanostrukture TiO₂.

Za dodatno ispitivanje unutarćelijske raspodele TiO₂ PNS, preciznije dobijanje trodimenzionalne (3D) raspodele, korišćen je isti LSCM uređaj s opcijom skeniranja duž z ose (engl. *z-scan mode*). Rezultujuće konfokalne 3D mikrografije koje prikazuju distribuciju TiO₂ PNS u ćelijama dobijene su preklapanjem refleksionog kanala (bez filtera) u kome su TiO₂ PNS predstavljeni zelenom bojom s fluorescentnim kanalom (propusni filter opsega 420-460 nm) s plavo obojenim jedrima.

4.5.10. Elektronska paramagnetna rezonantna spektroskopija – EPR

Radi procene proizvodnje RKV pod uticajem svetlosnog stimulansa korišćena je EPR spektroskopija. U 28 µL vodenih suspenzija nanostrukturnih TiO₂ (1 mg mL⁻¹) dodato je 2 µL DEPMPO (105 mM). Nakon toga, dobijene smeše su prebačene u gas-propustljive teflonske cevi (*Zeus Industries Inc.*, Orangeburg, SAD) koje su umetnute u posebnu kvarcnu cev EPR spektrometra (*Bruker ELEXSYS-II E540*, Nemačka) koji radi u X oblasti. Eksperimentalna podešavanja EPR-a su bila sledeća: centar polja 3500 G, snaga mikrotalasa 10 mW, frekvencija mikrotalasa 9,85 GHz, modulaciona frekvencija 100 kHz, modulaciona amplituda 2 G. Da bi se pratio uticaj svetlosti na ispitivane nanostrukturne TiO₂, za isti uzorak napravljene su tri probe koje su snimane s istim brojem akumulacija. Jedna proba je kontinualno zračena tokom akumulacije EPR spektara izvorom vidljive svetlosti HeNe lasera (632,8 nm, 120 mW). Druga proba je zračena UVA lampom (365 nm, 600 µW) 2 min neposredno pre snimanja. Treća, kontrolna proba, je snimana u odsustvu svetlosti.

4.5.11. Analiza i praćenje nanočestica – NTA

U nanočestičnim disperzijama može doći do stvaranja čestičnih agregata, što znači da stvarna veličina dispergovanih čestica može da se razlikuje od veličine dobijene merenjem nanočestičnog praha. Za procenu veličine čestica u disperzijama TiO₂ PNS i C-TiO₂ NČ primenjena je metoda Analize i praćenja nanočestica (engl. *Nanoparticles Tracking Analysis*, NTA) pomoću NanoSight LM10 uređaja (*NanoSight*, Amesburi, Velika Britanija), opremljenog s laserom od 532 nm. Pre merenja, sprašeni uzorci TiO₂ PNS i C-TiO₂ NČ su resuspendovani i razblaženi vodom do konačne koncentracije od približno 10⁸-10⁹ čestica po

mL⁻¹. Sva merenja vršena su na sobnoj temperaturi, a uzorci su mereni 60 s na pet različitih pozicija u tri nezavisna merenja. Za snimanje i analizu podataka korišćen je softver NTA 3.0.

4.5.12. Određivanje površinskog naelektrisanja suspenzije

Površinsko naelektrisanje suspenzije TiO₂ PNS i C-TiO₂ NČ u dejonizovanoj vodi (1 µg mL⁻¹) na 25 °C i pH vrednosti od 7 određeno je merenjima zeta potencijala na Zetasizer Nano ZS90 (*Malvern Instruments*, Malvern, Velika Britanija).

4.5.13. Merenje intenziteta primenjene svetlosti

Intenziteti svetlosti su mereni pomoću mernog uređaja Nova II (*Ophir, Jerusalem, Izrael*) poboljšanog UV silikonskim fotodiodnim senzorom PD300-UV s instaliranim filterom (CW power up to 300 mW).

4.6. Sedimentacioni esej – određivanje efikasnosti vezivanja kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] za površinu nanostrukturnih TiO₂

Pomoću sedimentacionog esej, za potencijalne nosače, TiO₂ NČ i TiO₂ PNS, ispitivana je efikasnost zarobljavanja potencijalnog leka, kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂], u nosaču (engl. *Entrapment efficiency*) i efikasnost „punjenja“ nosača kompleksom [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] (engl. *Loading efficiency*), parametri koji se u farmaciji često koriste kao pokazatelji efikasnosti vezivanja određenog leka za nosač. NČ NKS i PNS NKS su sintetisani za ovaj test po već opisanoj proceduri u poglavlju 4.4., a zatim su centrifugirani brzinom od 7000 rpm, tokom 3 min, u cilju odvajanja nevezanog kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂]. Nakon toga je pomoću UV-Vis spektroskopije i kalibracione krive određena koncentracija slobodnog, nevezanog kompleksa. Uslovi snimanja su dati u okviru poglavlja 4.5.2., a pomenuti parametri su određeni korišćenjem sledećih jednačina:

$$\text{Efikasnost zarobljavanja leka u nosaču, \%} = \frac{\text{Količina [Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2\text{] u NKS}}{\text{Inicijalna količina [Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2\text{]}} \times 100$$

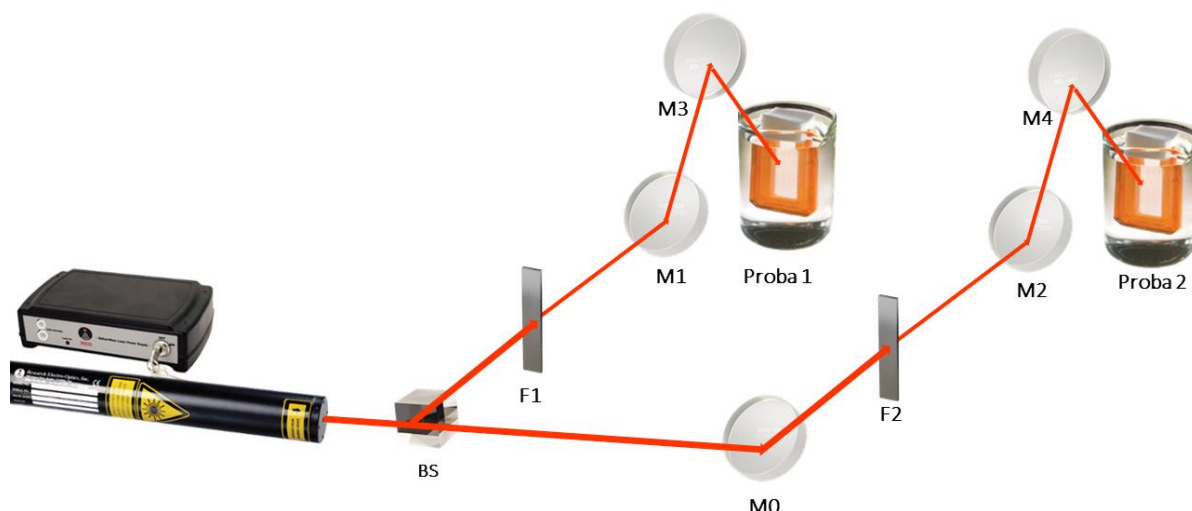
$$\text{Efikasnost "punjenja" leka nosačem, \%} = \frac{\text{Količina [Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2\text{] u NKS}}{\text{Količina TiO}_2\text{ NČ}} \times 100$$

4.7. *In vitro* praćenje kinetike otpuštanja [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] kompleksa s površine nosača (TiO₂ nanočestica) pod uticajem vidljive i UV svetlosti

Sprovedena su dva odvojena testa praćenja kinetike otpuštanja kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] s nosača pomoću dijalize na način sličan onom opisanom u radu.^[164] Za potrebe eksperimenta su korišćene kasete za dijalizu kapaciteta 0,1-0,5 mL s veličinom membrane koja dozvoljava propuštanje kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] u spoljni medijum, dok NČ NKS i TiO₂ NČ ostaju unutar membrane (*Thermo Scientific* Dialysis cassette, 7.000 MWCO). U prvom testu, istovremeno je ispitana kinetika otpuštanja kompleksa s NČ NKS-om u rastvorima PBS-a, na različitim pH vrednostima (5 i 7) i pri različitim uslovima ozračivanja (vidljivim crvenim – 632,8 nm i UV svetlom – 254 nm), kao i pri odsustvu svetlosti. U drugom testu ispitana je kinetika otpuštanja kompleksa sa NČ NKS-MUV sistemom u PBS-u pH 7, imajući u vidu da bi inkapsulacija u liposome trebalo da spreči “curenje” kompleksa u serum. Priprema proba je bila identična za oba testa: u kasete za dijalizu pomoću igle je uneto 500 µL rastvora NČ NKS, ili NČ NKS-MUV, koje su zatim potopljene u 60 mL PBS-a. U prvom testu, dve kasete s NČ NKS su uronjene u dva različita medijuma (PBS pH 5 i pH 7) za svaki uslov ozračivanja. U drugom testu, po jedna kasete sa sistemom NČ NKS-MUV je uronjena u PBS pH vrednosti 7 za svaki uslov ozračivanja. Oba testa su sprovedena u triplikatu. Smeša je mešana pomoću magnetne mešalice brzinom od 100 rpm, a testovi su vršeni na kontrolisanoj sobnoj temperaturi. Tokom 32 h, kontrolna proba je držana u uslovima bez svetlosti, druga grupa proba je ozračivana kontinualnim crvenim snopom HeNe lasera (632,8 nm, *Thorlabs*, Bergkirchen, Nemačka), a treća grupa proba je ozračivana UVC-Hg lampom (25 W, 254 nm, *Philips*). Snopovi HeNe lasera su pomoću optičkih delova bili usmereni upravno u odnosu na laboratorijske čaše u kojima se nalazio dijalizat i kasete i pažljivo fokusirani na uzorke u kasetama (Slika 16). Intenziteti svetlosti su mereni ispred čaša na putu laserskog snopa ka uzorku i iznosili su (1,9 ± 0,1) mW. UV lampa je postavljena iznad čaše s probom, s obzirom da staklo ne propušta UV zrake. Intenzitet primenjene svetlosti izmeren iznad same površine čaše s rastvorom za dijalizu iznosio je (1,5 ± 0,1) mW.

U naznačenim vremenskim intervalima iz proba je odvajano po 500 µL dijalizata za analizu, a svaki put odvojena količina u probama je bila zamenjena s ekvivalentnom količinom odgovarajućeg PBS-a. Dobijeni alikvoti su zatim analizirani merenjem apsorpcije na 310 nm. Rezultat je potom prikazan grafički kao procenat oslobođenog kompleksa u odnosu na rastvor čistog kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] u zavisnosti od vremena sa standardnom

devijacijom. Dobijeni profili otpuštanja kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ s TiO_2 NČ, su zatim poređeni s kontrolom (profilom otpuštanja u odsustvu svetlosti).



Slika 16. Šematski prikaz postavke eksperimenta za praćenje kinetike otpuštanja kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ s nosača iz NKS pri ozračivanju HeNe laserom; F1 i F2 – varijabilni optički filteri; BS – 50:50 razdelnik snopa; M0, M1, M2, M3 i M4 – optička ogledala širokog propusnog opsega. U Probi 1 spoljni medijum je bio PBS pH 5, u Probi 2 spoljni medijum je bio PBS pH 7.

4.8. Ćelijski unos i (foto)citotoksičnost $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ kompleksa, nanostrukturnih TiO_2 i nanokompozitnih sistema

4.8.1. Ćelijske kulture – gajenje i tretman

Za ispitivanje citotoksičnosti korišćene su različite netransformisane i tumorske ćelije. Kao netransformisane ćelije korišćeni su mišji embrionalni fibroblasti 3T3 i splenociti. Ćelijska linija 3T3 je gajena u DMEM medijumu s 2 mM L-glutaminom, 0,05 mg gentamicina, 1 mM rastvorom natrijum piruvata, 0,05 mM rastvorom 2-merkptoetanolu i 10 % termalno-inaktiviranim FBS. Splenociti su izolovani iz mišijih slezina koje su u sterilnim uslovima sakupljene od 6 mužjaka laboratorijskih životinja i odložene u HMEM-d medijum. Nakon usitnjavanja kroz najlonsku mrežu, suspenzije splenocita su prebačene u RPMI-1640 medijum.

Tumorske linije A375, SKBR3 i PANC-1 su gajene u DMEM medijumu s 4500 mg L^{-1} glukoze i dodatkom glutamina (L-glutamine), 10 % FBS, 10 000 U mL^{-1} penicilina i 10 mg mL^{-1} rastvora streptomicina. HeLa i A549 tumorske linije su gajene u RPMI-1640 medijumu takođe s dodatkom 10 % FBS-a i penicilina/streptomicina. Ćelijske linije i splenociti su gajeni pod standardnim uslovima u inkubatoru na 37 °C i 5 % CO_2 atmosferi (Heraeus, Hanau, Nemačka).

4.8.2. Ispitivanje ćelijskog unosa i unutarćelijske distribucije nanostrukturnih TiO₂

Pomoću LSCM tehnike ispitani su ćelijski unos i unutarćelijska distribucija primenjenih tretmana. Unos nanostrukturnih TiO₂ i NČ NKS je ispitan na HeLa ćelijskoj liniji, dok je CRM tehnika korišćena za ispitivanje unosa PNS NKS na ćelijskoj liniji A549.

HeLa ćelije su zasejane kako je opisano u potpoglavlju 4.8.1. i inkubirane 24 h kako bi se zalepile za stakleno dno Petrijeve posude. Ćelije su zatim tretirane koncentracijama nanostrukturnih TiO₂ naznačenim u Tabeli 4 i inkubirane 1 h pre konfokalne mikroskopije. Pre snimanja, ćelije su isprane PBS-om kako bi se uklonili nanokristali koji nisu ušli u ćelije, a zatim su snimljene mikrografije pomoću refleksionog i transmisionog kanala. Dodatno, za TiO₂ PNS, HeLa ćelije su inkubirane s 25 µg mL⁻¹ TiO₂ PNS tokom 12 h, a zatim fiksirane 4 % rastvorom formalina tokom 10 min. Nakon toga, 0,5 µg mL⁻¹ boje Hoechst 33342 je dodato u ćelijski medijum, a zatim je usledila dodatna inkubacija u trajanju od 5 min. Nakon toga ćelije su isprane tri puta PBS-om, a zatim analizirane. Za dobijanje mikrografija s unutarćelijskom raspodelom simultano su snimljeni fluorescentni i refleksioni kanali. Za analizu ćelijskog unosa tretmana pomoću LSCM uređaja, uporedo s tretiranim ćelijama isti postupak pripreme je primenjen i na netretirane ćelije koje su služile kao kontrola. Dobijene mikrografije s pojedinačnih kanala su radi bolje prezentacije rezultata preklopljene na način kako je opisano u potpoglavlju 4.5.9.

Za analizu unosa agenasa A549 ćelije su zasejane u Petrijeve posude sa staklenim dnom. Nakon inkubacije od 24 h, ćelije su tretirane s 150 µg mL⁻¹ PNS NKS, i dodatno inkubirane tokom 12 h. Nakon toga, Petrijeve posude su isprane PBS rastvorom nekoliko puta i ćelije su fiksirane 3,7 % formaldehidom u PBS-u tokom 30 minuta, a zatim ponovo isprane i analizirane.

Tabela 4. Prikaz primenjenih koncentracija tretmana HeLa ćelija za ispitivanje ćelijskog unosa

Vrsta tretmana	Koncentracija (µg mL ⁻¹)
[Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂]	33
TiO ₂ NČ	13
NČ NKS	33/13*
TiO ₂ PNS	4
N-TiO ₂ NČ	4
C-TiO ₂ NČ	7
*prva koncentracija se odnosi na [Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂] kompleks, dok se druga koncentracija odnosi na TiO ₂ NČ	

4.8.3. Određivanje stepena preživljavanja ćelija nakon tretmana – testovi vijabilnosti

Za ispitivanje cito- i fotocitotoksičnosti, 2000 ćelija po bunariću je zasejano u mikrotitar pločice s 96 bunarića sa ravnim dnom (*flat-bottomed 96 well microtiter plates*) i potom inkubirano 24 h. Ćelije su zatim tretirane željenim koncentracijama [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂], nanostrukturnih TiO₂ i NKS, i nakon određenog vremena inkubacije podvrgnute različitim testovima vijabilnosti. Merenjem apsorbancije na karakterističnoj talasnoj dužini uz oduzimanje apsorbancije slepe probe (ćelije s medijumom) određen je stepen preživljavanja ćelija. Rezultati su izraženi kao procenat ćelijske vijabilnosti u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije) čija je vijabilnost arbitrarno postavljena na 100 %, kao što je prikazano jednačinom:

$$\text{Ćelijska vijabilnost} = \frac{\text{Apsorbancija uzorka}}{\text{Apsorbancija kontrole}} \times 100\%$$

Za sve testove vijabilnosti, merenja su urađena u kvadriplikatu, a svaki eksperiment je ponovljen tri puta. Dobijeni rezultati su obrađeni statistički kao što je to opisano u poglavlju 2.9. Uslovi primenjeni za ispitivanje citotoksičnosti (koncentracije tretmana, vremena inkubacije, vrste primenjenih testova) su tabelarno predstavljani u Prilogu 1 zajedno s ostvarenim rezultatima dobijenih nakon primenjene statističke obrade podataka.

4.8.3.1. *SRB test*

Vijabilnost ćelijskih linija HeLa, A375, SKBR3 i PANC-1 nakon tretmana je određena pomoću SRB testa. Vijabilnost se ovim testom određuje posredno preko određivanja sadržaja ćelijskih proteina, a primenjena je procedura koju su opisali *Skehan* i saradnici.^[165] Ukratko, ćelije su fiksirane 10 % trihlorsirćetnom kiselinom 1 h na 4 °C, a zatim su isprane vodom. U bunariće je dodat SRB rastvor (0,4 % w/v, u 1 % sirćetnoj kiselini), a ploče su ostavljene na sobnoj temperaturi tokom 15 min kako bi se vezala boja za ćelijske proteine. Nevezani SRB je ispran 1 % sirćetnom kiselinom, dok je vezani SRB ekstrahovan Tris rastvorom (10 mM). Apsorbancija je merena na 550 nm s referentnom talasnom dužinom od 690 nm.

4.8.3.2. *MTT test*

Vijabilnost 3T3 i splenocita je određena pomoću kolorimetrijskog MTT testa. Ovaj test se zasniva na redukciji tetrazolijumove soli, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromida, u ljubičasto obojene kristale formazana, posredstvom aktivnosti mitohondrijalnih enzima, sukcinat dehidrogenaze. Količina dobijenog formazana je direktno proporcionalna

broju vijabilnih ćelija. Procedura za MTT je bila sledeća: nakon dodavanja boje u medijum s ćelijama (krajnje koncentracije $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$), ćelije su inkubirane 1 h u odsustvu svetlosti. Medijum i boja su zatim uklonjeni, a formirani kristali formazana su rastvoreni u DMSO-u. Apsorbancija je merena na 550 nm.

Vijabilnost HeLa ćelija je određena pomoću izmenjenog MTT testa, na osnovu procedure opisane od strane Li i saradnika^[41] u kojoj se umesto standardnih bromidnih koriste natrijumove tetrazonijum soli, WST-8. Sadržaj TiO_2 u DMEM medijumu značajno utiče na apsorbciju koja se meri na 450 nm, te je pre tretmana izmerena apsorbcija slepe probe. U bunariće koji sadrže po $100 \mu\text{L}$ medijuma je dodato po $10 \mu\text{L}$ rastvora iz kompleta za test koji sadrži WST-8. Nakon dodavanja boje, HeLa ćelije su inkubirane tokom 2 h, a zatim je merena apsorbcija na 450 nm kontrolnih i tretiranih ćelija.

4.8.3.3. Kristal violet test

Za procenu vijabilnosti 3T3 ćelija korišćen je CV test koji omogućava određivanje broja adherentnih ćelija, za čije se DNK molekule i proteine vezuje boja iz ovog testa. Nakon tretmana s TiO_2 PNS, medijum je pažljivo otklonjen, a ćelije su isprane tri puta PBS-om. Ćelije su zatim obojene etanolnim (30 %) rastvorom kristal violeta (0,5 %) i ploče su ostavljene 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, bunarići su intenzivno ispirani vodom da bi se odstranila boja koja se nije vezala za ćelije. Relativni broj adherentnih ćelija je određen merenjem apsorbcije na 590 nm.

4.8.3.4. Određivanje fotocitotoksične aktivnosti $[\text{Ru(II)}(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ kompleksa, nanostrukturnih TiO_2 i nanokompozitnih sistema na tumorskim linijama

Pre ispitivanja fotocitotoksičnosti, utvrđene su bezbedne koncentracije tretmana na osnovu testova vijabilnosti sprovedenih u odsustvu svetlosnog stimulansa koji su opisani u prethodnim potpoglavljima. Pored pogodnih koncentracija, inicijalno su ispitani i uslovi zračenja koji bez tretmana ne dovode do značajnog pada vijabilnosti. Nakon utvrđenih uslova zračenja, ćelije su tretirane i inkubirane s analiziranim agensima, a zatim izložene zračenju UVC ili plave svetlosti tokom određenog vremena. U oba slučaja, svetlosni izvor je bio postavljen iznad mikrotitar pločica s ćelijama, a podešavanjem njegove razdaljine od ćelija ostvareni su željeni intenziteti svetlosti. Za UV zračenja korišćena je UVC lampa prethodno opisana u poglavlju 4.7. Plavo svetlo je dobijeno na način koji je opisan u potpoglavljju 4.5.8. Tretirane i/ili ozračene ćelije su zatim ostavljene da se inkubiraju pod standardnim uslovima.

Nezrađene tretirane ćelije, kao i netretirane zrađene ćelije su služile za poređenje, dok je kontrola bila bez tretmana i zrađjenja. Uslovi primenjeni za ispitivanje fotocitotoksičnosti (koncentracije agenasa, vremena inkubacije, vrste primenjenih testova, vreme i snaga primenjenog zrađjenja) su tabelarno predstavljeni u Prilogu 2 zajedno s ostvarenim rezultatima nakon primene statističke obrade podataka.

4.9. Statistička obrada podataka

Ostvareni rezultati testova vijabilnosti su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (SD). Za statističku obradu rezultata korišćena je jednofaktorska analiza varijansi (engl. *One-way Analysis of variance*, akronim *one-way ANOVA*) koja služi za poređenje proseka populacija koje su podvrgnute različitim tretmanima. Primenjen je i naknadni test višestrukih poređjenja – *Tukey test* koji se naziva i testom “zaista značajne različitosti” (engl. *Honestly Significant Different*), a koji omogućava poređjenje populacionih proseka s jedinstvenim nivoom značajnosti. Zasnovan je na Studentovoj raspodeli, q , sa r i $n-r$ stepenom slobode. Kriterijum *Tukey* testa se izražava prema jednačini:

$$T = q_{\alpha} \frac{\sqrt{V_r}}{\sqrt{n_i}}$$

Gde je V_r , rezidualna varijansa, a n_i , najmanja veličina od r uzoraka. U ovom radu, za statističku obradu rezultata korišćen je program *GraphPad Prism 8.0.1*. U svim slučajevim, vrednosti $p < 0,05$ je smatrana značajnom.

5. REZULTATI I DISKUSIJA REZULTATA

U prvoj fazi ove disertacije je sintetisan i okarakterisan kompleks $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$, za koji literaturni podaci ukazuju da se vezuje za koloidne TiO_2 nanočestice stabilne na pH 2. Tako formirani sistem je pokazao značajni potencijal u FDT humane melanomske tumorske linije A375.^[154] Ovo svojstvo je iskorišćeno za formiranje NKS koji predstavljaju konjugaciju modela antitumorskog agensa (kompleks $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$) i nosača baziranih na različitim nanostrukturnim TiO_2 . Cilj ovih modifikacija je bio da se formira sistem s poboljšanim ćelijskim unosom i omogući fotoaktivacija u vidljivom delu spektra. Upravo zbog toga su u drugoj fazi sintetisane i okarakterisane koloidne TiO_2 NČ koje su stabilizovane na pH 7, kao i nanostrukturni TiO_2 drugačijih oblika – TiO_2 PNS, kao i N i C- TiO_2 NČ. U trećoj fazi je pokušana sinteza NKS formiranih od kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ i pomenutih nanostrukturnih TiO_2 . S obzirom da su uspešno formirana dva NKS – NČ NKS i PNS NKS u daljim fazama ispitivanja sistemi su okarakterisani. Ispitana je efikasnost vezivanja kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$, njihov potencijal za kontrolisano otpuštanje terapeutika, a zatim i uticaj svetlosti različitih talasnih dužina na kinetiku otpuštanja kompleksa.

Iako nisu pokazale tendenciju da se vezuju za kompleks $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$, nezavisno su ispitivane N i C- TiO_2 NČ zbog već pomenutih (potpoglavlje 2.4.3.2.) poboljšanih optičkih karakteristika u vidljivom regionu. Za nanostrukturne TiO_2 koji su predmet ove disertacije, kao i za NKS ispitani su ćelijski unos, oksidativna aktivnost, biokompatibilnost i citotoksičnost pri delovanju svetlosti različitih talasnih dužina i snage u skladu s optičkim osobinama ispitivane vrste čestica.

5.1. Sinteza i karakterizacija

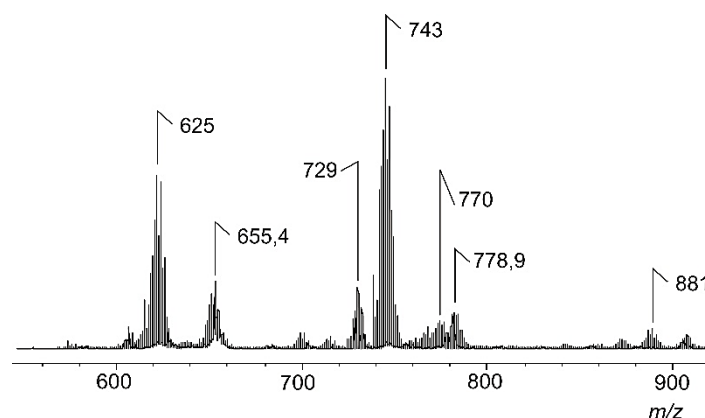
5.1.1. Sinteza i karakterizacija kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$

U ovoj disertaciji ispitana je mogućnost korišćenja TiO_2 NČ kao nosača za agense bazirane na kompleksu rutenijuma s biperidinskim ligandima – kompleks $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$. Ovaj kompleks je izabran kao model potencijalnog citostatika imajući u vidu da je u prethodnim istraživanjima pokazao brojne povoljne osobine, od kojih su najvažnije da sadrži multifunkcionalne grupe koje omogućavaju vezivanje za nosač i interakciju s biomolekulima, kao i da ima potencijal za primenu u svojstvu genotoksičnog i citotoksičnog agensa.^[87,166] Još

jedna veoma važna osobina je da kompleks pokazuje fotoaktivnost u UV i vidljivoj oblasti spektra, što će biti preciznije prikazano u potpoglavlju 5.2.1.

Nakon sinteze kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$, karakterizacija dobijenog produkta izvršena je pomoću MALDI TOF MS, UV-Vis i FTIR spektroskopije.

U snimljenom MALDI TOF masenom spektru kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ (Slika 17), uočljivi su signali na vrednostima m/z (masa/naelektrisanje) čije identitete prikazuje Tabela 5. Identiteti signala koji potiču od matrice nisu prikazani u navedenoj tabeli.



Slika 17. MALDI TOF maseni spektar kompleks $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ snimljen uz pomoć DHB matrice u pozitivnom reflektornom modu.

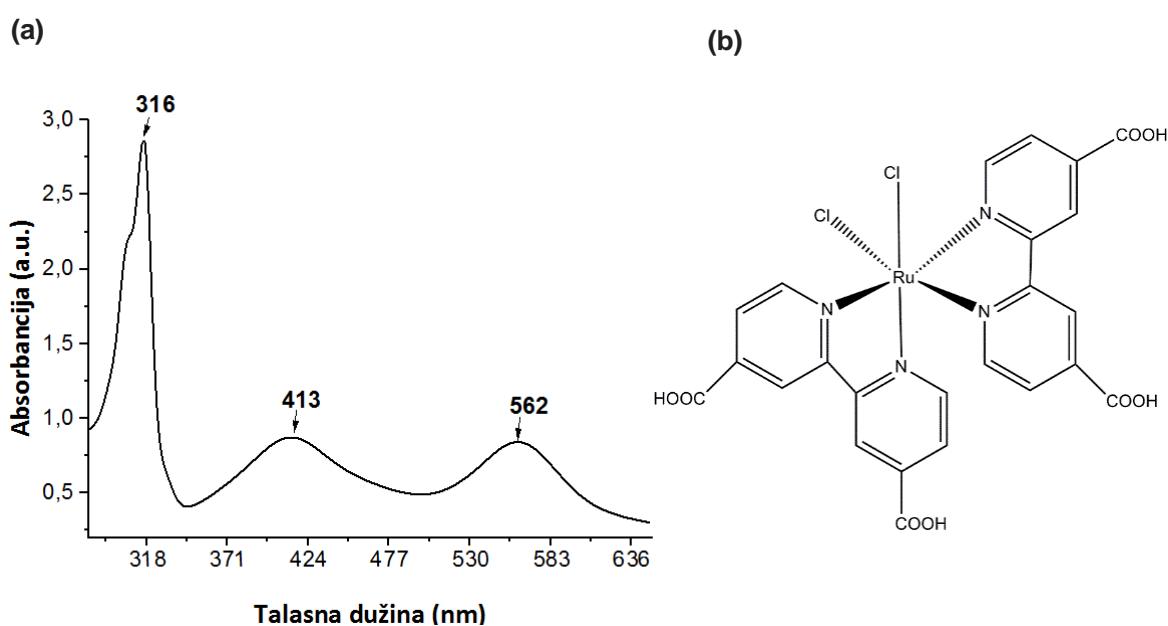
Tabela 5. Pozicija i identitet signala detektovanih u pozitivnom modu MALDI TOF masenog spektra kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ snimljenog s DHB matricom. Oznaka K u tabeli odnosi se na masu celog kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ (molekulska masa 660 g mol^{-1}), oznaka M se odnosi na DHB matricu (molekulska masa $154,12 \text{ g mol}^{-1}$).

m/z	Identitet signala
625	$[\text{K-Cl}]^+$
655,4	$[\text{K-dcbpy-Cl}+2\text{M-2OH}+\text{H}^+]^+$
729	Neidentifikovani jon
743	$[\text{K-2Cl}+\text{M-H}^+]^+$
770	$[\text{K-dcbpy-2Cl}+3\text{M-2H}_2\text{O-H}^+]^+$
778,9	$[\text{K-Cl}+\text{M}]^+$
881	$[\text{K-Cl}+2\text{M-2H}_2\text{O-OH}+\text{H}^+]^+$

Kvalitet sintetisanog kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ je potvrđen i UV-Vis spektrom. Uočena su tri karakteristična apsorpciona signala u UV-Vis spektru na talasnim dužinama 316, 413 i 562 nm, (Slika 18 (a)). Tabela 6 prikazuje dobijene eksperimentalne podatke naspram literaturnih vrednosti.^[153,166] Signali na 562 i 413 nm odgovaraju prelazu naelektrisanja od metala ka ligandima, $d\pi \rightarrow \pi^*$ prelaz, (engl. *Metal-to-Ligand Charge Transfer*, MLCT), dok signal na 316 nm potiče od organskih bipyridinskih liganada ($\pi \rightarrow \pi^*$).

Tabela 6. UV-Vis apsorpcioni maksimumi kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ dobijeni snimanjem etanolnog rastvora kompleksa na sobnoj temperaturi. U zagradama su prikazani odnosi apsorpcionih maksimuma. Poređenja radi, pod I su predstavljene izmerene vrednosti na kraju sinteze, dok su pod II predstavljene literaturne vrednosti.^[153,166]

Talasna dužina, λ_{max} (nm) (odnos apsorpcionih maksimuma)			
I	562 (1.00)	413 (1.04)	316 (3.40)
II	565 (1.00)	414 (1.05)	316 (3.33)



Slika 18. UV-Vis spektar (a) i prikaz molekulske strukture kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ (b).

Molekulska struktura kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ ispitivana je i FTIR spektroskopijom, a dobijeni spektar je detaljnije opisan u potpoglavlju 5.1.3. u okviru karakterizacije NKS.

5.1.2. Karakterizacija nanostrukturnih TiO_2

Nanočestice mogu da ispoljavaju antitumorske osobine ili mogu da budu nosači za antitumorske agense. U oba slučaja, od presudnog značaja za pomenuta svojstva su veličina i oblik. Optimalna veličina nanočestica za primenu u antitumorskoj terapiji je između 10 i 200 nm, kako bi se s jedne strane izbeglo izlučivanje preko bubrega i hvatanje od strane makrofaga kada su čestice sitnije od 10 nm,^[32] a s druge strane omogućio nesmetan unos čestica u ćelije.^[167]

U ovom radu korišćeno je više tipova nanostrukturnih TiO₂, različitog oblika i dimenzija zbog mnogobrojnih povoljnih osobina koje su opisane u poglavlju 2.4.:

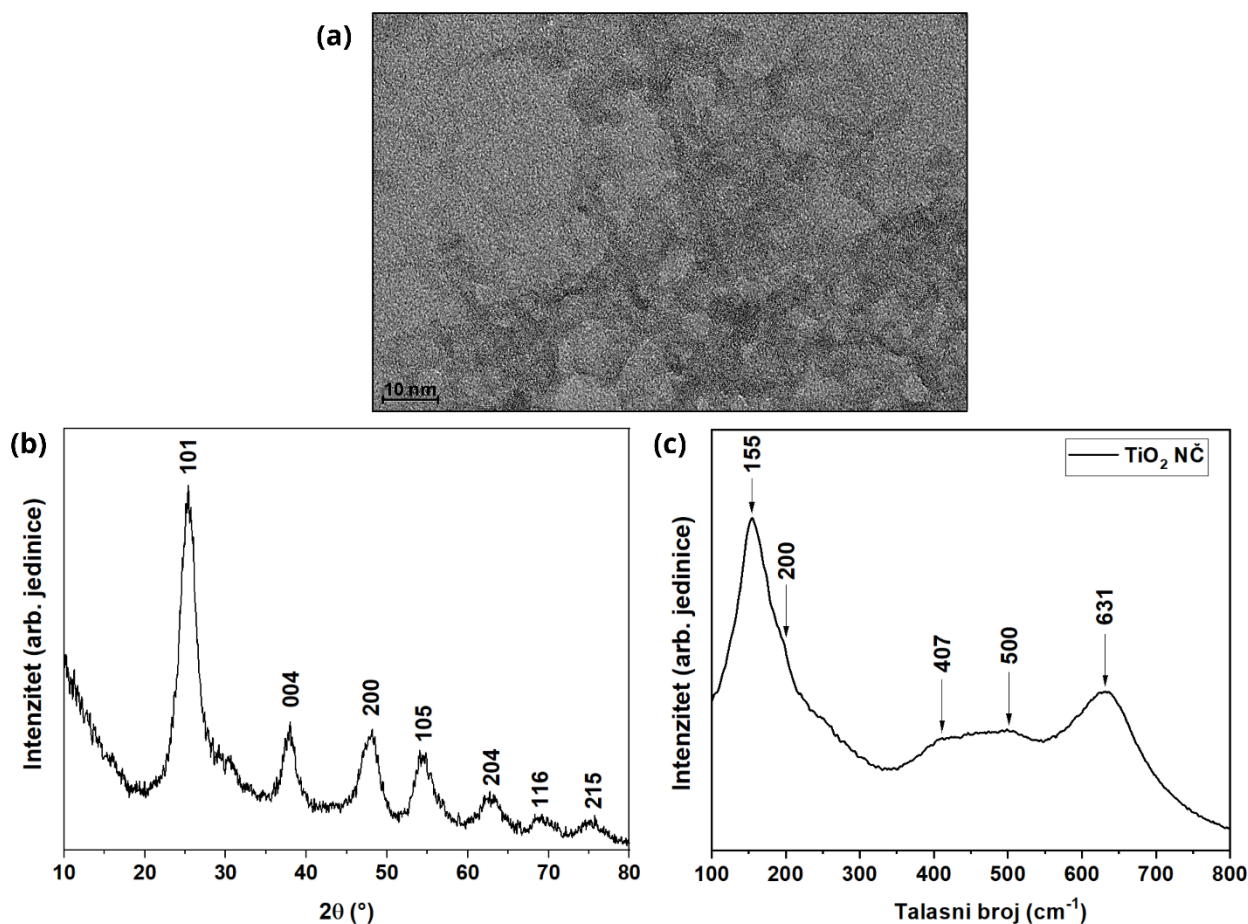
- TiO₂ NČ – sferne koloidne nanočestice;
- TiO₂ PNS – čestice elipsoidnog oblika;
- N-TiO₂ NČ – sferne koloidne nanočestice dopirane azotom;
- C-TiO₂ NČ – sferne koloidne nanočestice dopirane ugljenikom

Navedene nanostrukture TiO₂ su sintetisane u cilju bolje prilagođenosti nameni i fiziološkim uslovima, te su primenjene specifične modifikacije koje su se značajno odrazile na njihove osobine, na veličinu i oblik ili na optičke osobine. Modifikovani nanostrukturni TiO₂ su zatim strukturno okarakterisani.

5.1.2.1. Koloidne TiO₂ nanočestice stabilizovane na pH 7

TiO₂ NČ koje su ispitane u okviru ove disertacije nastale su stabilizacijom na pH 7 prethodno ispitivanih i okarakterisanih koloidnih TiO₂ NČ za čiju stabilnost je bila neophodna kisela sredina (pH~2). Kako stabilizacija na višim pH vrednostima omogućava njihovu upotrebu u fiziološkim uslovima a ne bi trebala da utiče na oblik, veličinu i strukturu kristalne rešetke, prema podacima iz prethodnih istraživanja za koloidne TiO₂ očekivana je ista prosečna veličina od 5 nm i anatas kristalna forma.^[87,154]

Slika 19 (a) prikazuje reprezentativnu mikrografiju sintetisanih TiO₂ NČ okarakterisanih pomoću TEM-e. Merenja su potvrdila da su dobijene sferne nanočestice, prosečne veličine 5 nm. Na difraktogramu praha TiO₂ NČ (Slika 19 (b)) dobijeni su signali na vrednostima 2θ: 25,4°, 38,0°, 48,0°, 54,4°, 62,7°, 69,2° i 75,0° koji odgovaraju kristalnim ravnima anatas kristalne forme TiO₂ (101), (004), (200), (105), (204), (116) i (215), navedenim redom, prema standardu *Tetragonal* JCPDS No. 21-1272. S obzirom da se pored navedenih ne javljaju dodatni difrakcioni maksimumi koji odgovaraju drugim kristalnim formama, nedvosmisleno se može zaključiti da su sintetisane TiO₂ NČ u anatas kristalnoj formi. Ramanskom spektroskopijom je potvrđeno da kod ispitivanih TiO₂ NČ preovladava anatas kristalna struktura, kako se u Ramanskom spektru javljaju karakteristične trake anatas forme – 155, 200, 407, 500 i 631 cm⁻¹ (Slika 19 (c)). Traka velikog intenziteta na 155 cm⁻¹ pripada E_g fononu kristalne strukture, dok trake na 402, 498 i 631 cm⁻¹ u Ramanskom spektru TiO₂ NČ odgovaraju E_g, B_{1g}, A_{1g} i E_g modovima anatas faze, redom.



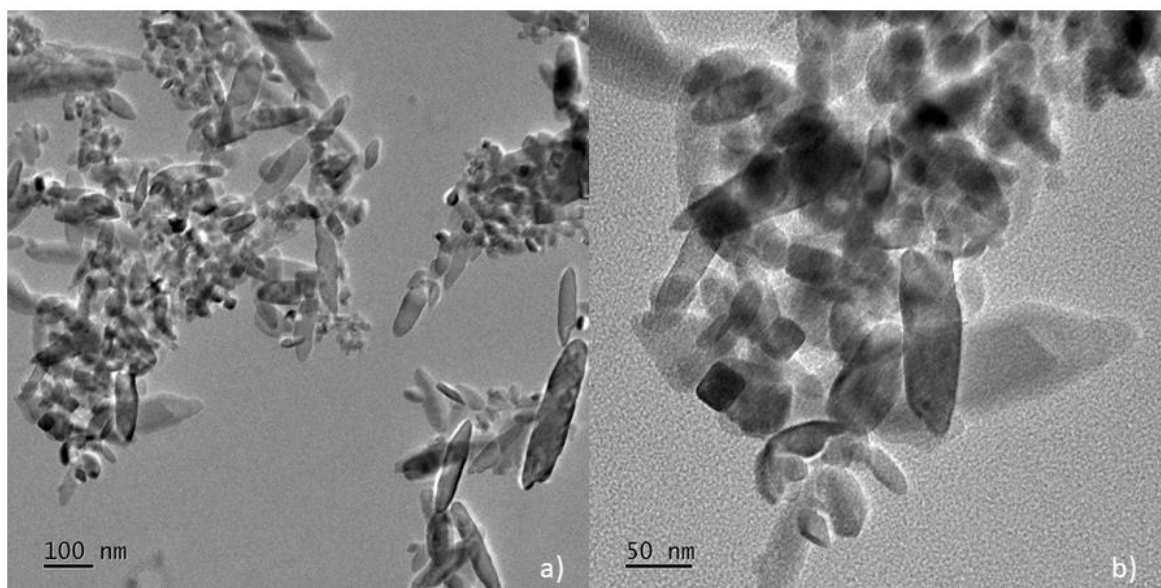
Slika 19. TEM mikrografija (a); difraktogram (b) i Ramanski spektar TiO_2 NČ (c).

Dodatna stabilnost koloidnih TiO_2 NČ u fiziološkim uslovima ispitana je sedimentacionim esejom, što će biti detaljnije opisano u potpoglavlju 5.1.3.4. u okviru procene efikasnosti vezivanja kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ za TiO_2 NČ kod formiranog NČ NKS. Ukratko, stabilnost TiO_2 NČ se ogledala u činjenici da se čestice nisu taložile primenom centrifugiranja pri fiziološkim pH vrednostima.

5.1.2.2. Strukturna karakterizacija prolatnih nanosferoida TiO_2

Najpre su ispitani veličina i oblik TiO_2 PNS, uz evši u obzir da ove dve osobine značajno utiču na ćelijski unos nanostrukture. U prilog korišćenju nanostrukture elipsastog oblika idu i literaturni podaci koji sugerišu da je efikasniji ćelijski unos zapažen kod čestica koje imaju veću dužinu u odnosu na nanočestice sfernog oblika.^[32,168] Kod TiO_2 PNS se očekuje optimalan odnos dužine i širine nanokristala koji bi omogućio značajan EPRE u tumorskom tkivu, a samim tim i dobru efikasnost FDT u kojoj se TiO_2 PNS koriste kao FS.

Veličina i oblik TiO₂ PNS su okarakterisani TEM-om. Slika 20 prikazuje reprezentativnu mikrografiju TiO₂ PNS. Na osnovu merenja potvrđen je elipsasti oblik prosečne dužine u rasponu od 100 nm do 300 nm, i prosečne širine od 50 nm, što je u skladu s veličinama koje su imale prethodno sintetisane čestice.^[169] Zapažena je i pojava agregata, koji su najverovatnije posledica sušenja nanokristalne disperzije na vazduhu tokom pripreme uzoraka za TEM analizu. Ova pojava je bila očekivana, kako su je prethodno uočili i drugi autori.^[170]



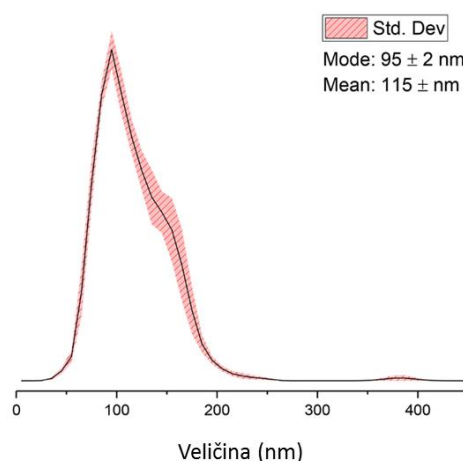
Slika 20. TEM mikrografije TiO₂ PNS pri manjem a) i većem b) uvećanju.

Kako bi se dobili precizniji detalji o veličini i raspodeli veličine TiO₂ PNS, primenjene su metode koje se uobičajeno koriste za karakterizaciju raspodele veličina čestica u nanokristalnim vodenim disperzijama – NTA i metoda dinamičkog rasejavanja svetlosti (engl. *Dynamic Light Scattering*, DLS).

DLS je standardna metoda za merenje raspodele veličina čestica u nano-disperzijama. DLS merenjima dobija se vrednost hidrodinamičkog prečnika (d_H) tj. prečnika čestice s hidratacionim omotačem koji predstavlja srednju vrednost prečnika svih izmerenih čestica. Za sferne čestice vrednost d_H odgovara stvarnoj veličini čestice koja se može izmeriti TEM-om. Međutim, u slučaju TiO₂ PNS, tj. za nanokristale elipsastog oblika bilo je potrebno odrediti d_H DLS metodom. Ova metoda se zasniva na merenju brzine koju čestice ostvaruju Braunovim kretanjem u suspendovanom rastvoru. To se postiže laserskim osvetljavanjem dispergovanih čestica i analiziranjem intenziteta fluktuacija rasute svetlosti. Intenzitet svetlosti je proporcionalan je korenu zapremine čestica u suspenziji. S tim je u vezi je i najveći nedostatak

ove metode, koji se ispoljava kod disperzija koje sadrže čestice različitih veličina. Naime, pri delovanju svetlosti lasera, manje čestice često budu zasenčene velikim, te prisustvo manjeg broja velikih agregata može da utiče da izmerena vrednost d_H značajno odstupa od stvarne.^[171] DLS metodom često dobijamo informacije koje se odnose na veličinu agregata pre nego na prečnik individualne nanočestice i u ovakvim sistemima dobijeni rezultat uzimamo s rezervom.

Ovaj problem kod disperzija koje sadrže čestice različitih veličina može da se prevaziđe primenom druge metode za određivanje raspodele veličine, kao što je NTA. Poput DLS metode, i NTA metoda se zasniva na merenju brzine Braunovog kretanja čestica. Međutim, dok DLS metoda za merenje difuzionog koeficijenta čestica očitava intenzitet rasejavanja svetlosti, NTA metoda računa difuzioni koeficijent na osnovu kretanja pojedinačnih čestica. Kako je rezultat dobijen pomoću DLS metode zasnovan na veličini prema izmerenom intenzitetu, a kod NTA metode je zasnovan na broju čestica, pomoću ovih metoda mogu da se dobiju različiti rezultati za istu disperziju. Na Slici 21 prikazana je raspodela dispergovanih čestica u rasponu 95-150 nm dobijenu pomoću NTA metode pod pretpostavkom da su čestice sfernog oblika. Primenom proračuna koji uzima u obzir elipsasti oblik TiO_2 PNS koji su potvrdila TEM merenja, dobijena je realna raspodela veličina 72-104 nm. Samo mali broj agregata veličine od 380 nm je zapažen. Rezultati dobijeni pomoću DLS metode su odstupali značajno od ove vrednosti i nisu prikazani kao relevantni u ovoj disertaciji, s obzirom da NTA metoda više odgovara ispitivanoj disperziji TiO_2 PNS.



Slika 21. NTA veličina distribucije TiO_2 PNS.

Za ćelijski unos, pored veličine i oblika nanostrukture, od izuzetne važnosti je stabilnost u fiziološkim uslovima, kao i ukupno površinsko naelektrisanje. Xi i saradnici su potvrdili da se mehanizam ćelijskog unosa nanostrukturnih TiO_2 razlikuje u zavisnosti da li je

naelektrisanje površine TiO₂ pozitivno ili negativno, te da je kod pozitivno naelektrisanih TiO₂ NČ dominantan mehanizam ćelijskog unosa endocitoza posredovana klatrinom, dok kod negativno naelektrisanih TiO₂ NČ preovladava kaolin-posredovana endocitoza.^[172]

Pogodna metoda za merenje površinskog naelektrisanja i predviđanje mogućih interakcija na površini nanostruktura je merenje elektrokinetičkog potencijala (zeta potencijala). Za nanočestice je karakterističan dvostruki električni dvosloj koji ima uobičajene vrednosti u rasponu od +100 mV do -100 mV, a koji se sastoji od tri dela. Prvi sloj se sastoji od negativnih jona snažno adsorbovanih na površini dok drugi sloj, *Sternov* sloj, čine pozitivni joni slabije vezani. Treći sloj je difuzijski deo dvostrukog električnog sloja, *Gouy Chapman-ov* sloj, u kome se joni i čestice kreću kako bi formirali stabilnu celinu. Vrednost koja se dobija merenjem zeta potencijala predstavlja stepen odbijanja između čestica u disperziji, te je direktna mera stabilnosti nanostrukturne disperzije. Visoku stabilnost pokazuju disperzije koje imaju vrednost zeta potencijala veću od 25 mV ili manju od -25 mV.^[173] Disperzije kod kojih je vrednost zeta potencijala između ovih vrednosti sklone su agregaciji tokom vremena usled delovanja privlačnih *Van Der Waals-ovih* sila. Merenjem zeta potencijala za TiO₂ PNS dobijena je vrednost od -22,4 mV koja ukazuje solidnu koloidnu stabilnost. Ipak, treba imati u vidu da na formiranje agregata u živim sistemima ne utiče isključivo zeta potencijal, već i pojava interakcija čestica disperzija s biomolekulima. Preciznije, nano-bio interakcije mogu da spreče nepoželjno stvaranje agregata. Stoga, razvijeni su brojni protokoli proteinske stabilizacije nanočestica u biološkim sistemima za različite nanomedicinske primene. Teorijska osnova ovih protokola oslanja se na pojavu da neposredno nakon kontakta nanočestica s biološkim sistemom, dolazi do različitih procesa transformacija od kojih preovladava stvaranje prostora između površine nanočestice i bioloških komponenti poput proteina, nukleinskih kiselina, lipida i bioloških metabolita. U tom se međuprostoru stvara kruna ili tzv. korona (engl. *corona*) građena od dve zone. U ovakvom obliku, sekundarno vezani biomolekuli maskiraju primarno vezane i tako onemogućuju primarno vezanim biomolekulima interakciju s ćelijskim medijumom. Važne interakcije s proteinima, ostvaruju se fizičko-hemijskim pojavama kao što su *Van der Waals-ove* sile, hidrofobne, hidrofilne, strukturne i sterne interakcije.^[173]

Za nano-bio interakcije posebno je važna vrednost ukupnog naelektrisanja površine, koja kod nekih makromolekula direktno utiče na strukturu. Naime, određeni makromolekuli menjaju svoju strukturu u zavisnosti od naelektrisanja čestice za koju se adsorbuju. Primer za to je serumski albumin, najčešće korišćen protein za stabilizaciju nanostrukture koronom, koji ima osobinu da pri adsorpciji s negativno naelektrisanim nanočesticama zadržava svoju nativnu

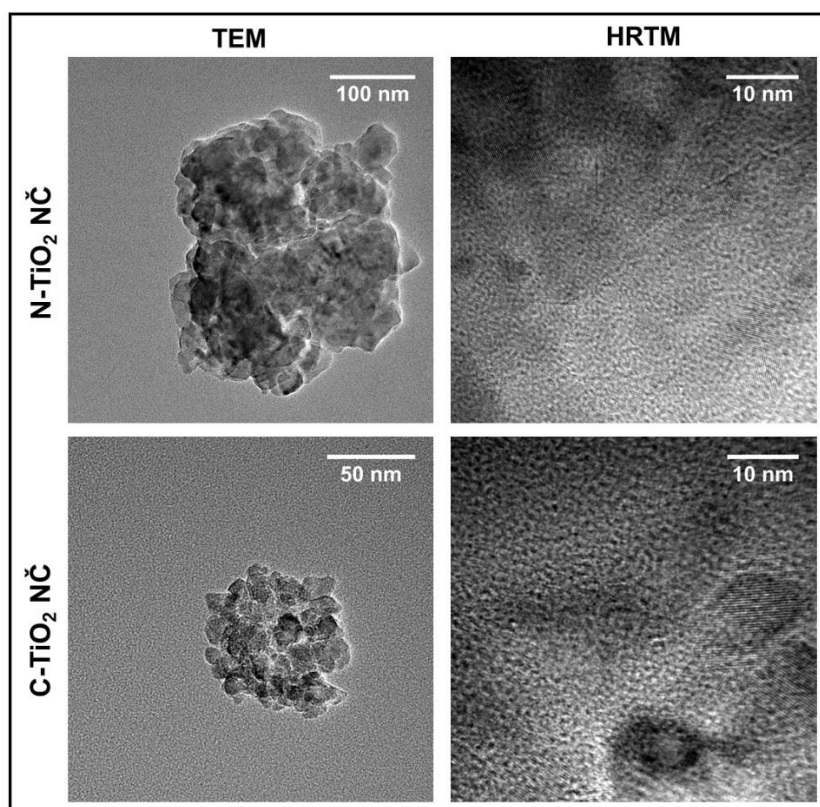
strukturu. S druge strane, pri adsorpciji pozitivno naelektrisanih nanočestica dolazi do konformacijskih promena čime se dobijeni konjugat protein – nanočestica preusmerava prema receptorima za izlučivanje iz organizma.^[174] Za TiO₂ PNS, izmerena je ukupna negativna vrednost zeta potencijala, što je povoljna osobina koja utiče da se nakon inkubacije sa serumskim albuminom formira stabilan konjugat. Stvaranjem ovakvog konjugata moguće je ne samo sprečiti pojavu nanostrukturnih agregata, već i olakšati ćelijski unos.

5.1.2.3. Strukturna karakterizacija C i N dopiranih TiO₂ nanočestica

Imajući u vidu biokompatibilnost TiO₂ NČ i postojanje elektrona u VZ koji se mogu aktivirati pomoću svetlosti, kao još jednu moguću vrstu FS ispitane su N i C-TiO₂ NČ.

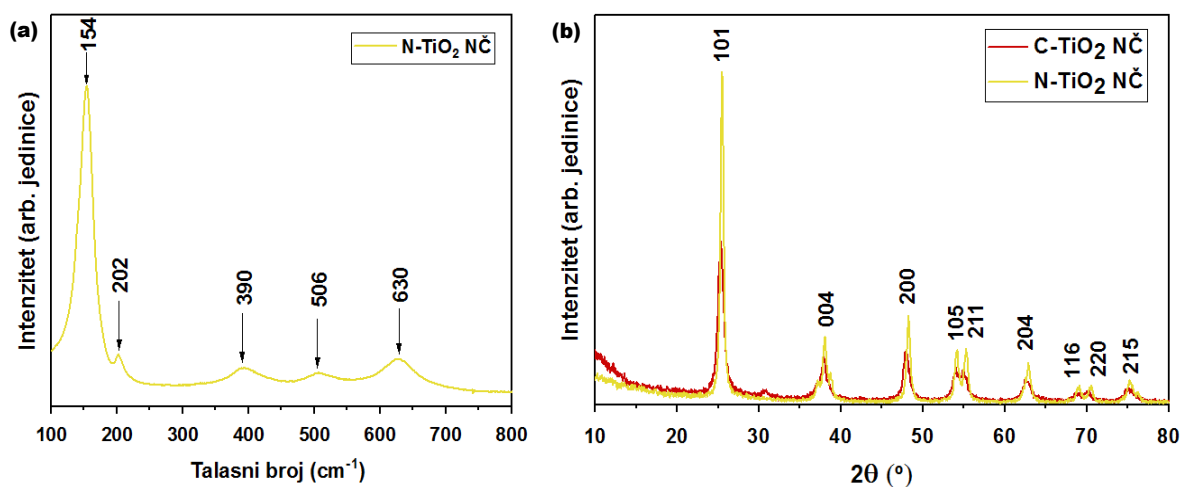
Na Slici 22 prikazane su TEM mikrografije visoke rezolucije (engl. *High Resolution Transmission Electron Microscopy*, HRTM) N i C-TiO₂ NČ na osnovu kojih je moguće proceniti veličinu čestica i kristalne ravnima. Na predstavljenim HRTM mikrografijama se može uočiti da su primenjenim tehnikama dopiranja polazne sferne nanočestice TiO₂ uglavnom zadržale svoj oblik. Veličina čestica je u rasponu od 5-10 nm za N-TiO₂ NČ, dok je za C-TiO₂ NČ veličina u rasponu od 5-15 nm. Takođe, izmeren je i razmak između kristalnih ravni od 0,35 nm kod obe vrste dopiranih čestica, što odgovara ravni (101) anatas kristalne forme.

Cilj dopiranja TiO₂ NČ s elementima *p*-bloka je pomeranje energetskog procepa TiO₂ ka vidljivoj oblasti, uz očuvanje njihove biokompatibilnosti. S druge strane, izbor tehnike dopiranja TiO₂ azotom i ugljenikom je od izuzetne važnosti, kako se kristalna rešetka može promeniti u zavisnosti od primenjene temperature. Literaturni podaci takođe ukazuju da je kod dopiranja ugljenikom u odnosu na ostale nemetale mogućnost transformacije iz anatas u rutil kristalnu formu više verovatna, pa čak i ubrzana.^[175] S obzirom da je sa stanovišta fotoaktivnosti povoljnija anatas forma, važno je bilo jednoznačno potvrditi anatas kristalnu formu za N i C- dopirane TiO₂ NČ. XRD analiza je pokazala da prilikom dopiranja nije došlo do promene u kristalnoj rešetki, što je potvrđeno Ramanskom spektroskopijom.



Slika 22. TEM mikrografija agregata N i C-TiO₂ NČ (leva kolona), i HRTEM mikrografije N i C-TiO₂ NČ (desna kolona). Odgovarajući raspon merenja je prikazan u gornjem desnom uglu mikrografija.

Analizom Ramanskog spektra N-TiO₂ NČ (Slika 23 (a)), potvrđeno je da je anatas kristalna forma očuvana nakon primenjene tehnike dopiranja. Traka velikog intenziteta na 154 cm⁻¹ pripada E_g fononu kristalne strukture anatas. Takođe, trake na 390, 506 i 630 cm⁻¹ u Ramanskom spektru N-TiO₂ NČ odgovaraju E_g, B_{1g}, A_{1g} i E_g modovima anatas faze. S druge strane, nije dobijen reprezentativni Ramanski spektar za C-TiO₂ NČ, te ovi rezultati nisu prikazani, ali je anatas kristalna forma u ovim nanočesticama potvrđena XRD analizom.



Slika 23. Ramanski spektar N-TiO₂ NČ (a) i difraktogrami za C i N-TiO₂ NČ (b).

Za uporedno potvrđivanje anatas kristalne strukture N-TiO₂ i C-TiO₂ NČ korišćena je XRD metoda (Slika 23 (b)). Kod obe vrste dopanta XRD analizom uočeni su karakteristični signali na identičnim vrednostima 2θ , s uočljivom razlikom da su kod C-TiO₂ NČ signali slabijeg intenziteta. Signali koji se javljaju na vrednostima 2θ : 25°, 38°, 48°, 54°, 63°, 69° i 75° odgovaraju kristalnim ravnima za anatas oblik TiO₂ (101), (004), (200), (105), (204), (116) i (215), prema standardnom spektru *tetragonal* JCPDS 21-1272. Uočen je i signal na vrednosti 70° koji odgovara kristalnoj ravni za anatas oblik TiO₂ (220) prema standardnom spektru JCPDS 84-1286. Pored signala karakterističnih za anatas, uočen je i signal slabijeg intenziteta na 55° koji odgovara kristalnoj ravni za rutil oblik TiO₂ (211) prema standardnom spektru JCPDS 88-1175. Ovo ukazuje na mogućnost da, iako preovladava anatas kristalna forma, postoji i nizak udeo rutilne faze u N i C-TiO₂ NČ. Postoji mogućnost da je veći deo kristalnih ravni koja se javlja u ovoj fazi ispod limita detekcije primenjene metode. Kako je XRD metoda niskog limita detekcije, udeo rutila u kristalnoj strukturi N i C-TiO₂ NČ je stoga zanemarljiv za ispitivanja koja su predmet ove disertacije.

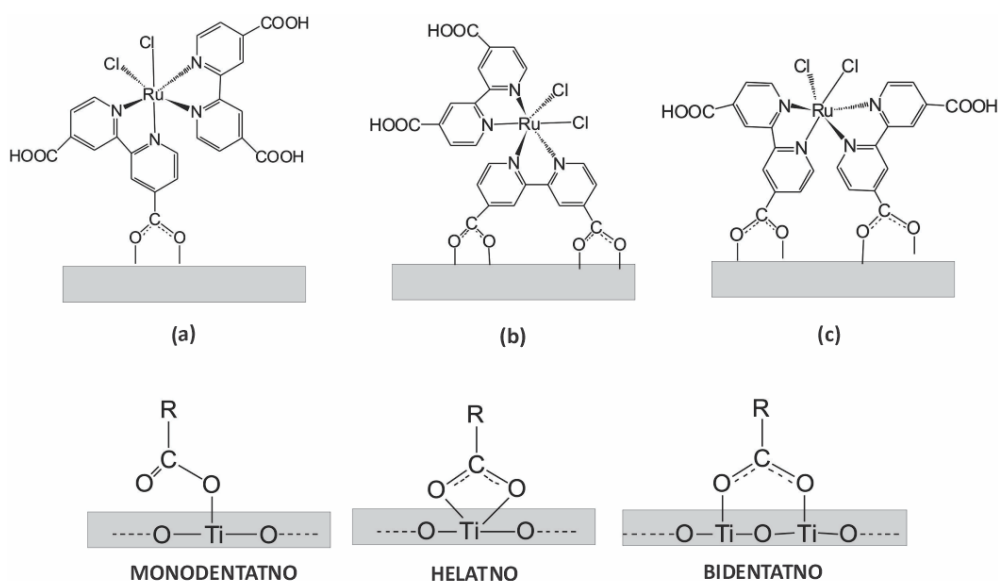
Dodatno, za C-TiO₂ NČ je izmeren zeta potencijal koji je iznosio $-11,0 \pm 0,6$ mV. U tački nultog naelektrisanja nedopiranog TiO₂ zeta potencijal je u rasponu 3-6 mV, i površina čestica je pozitivna.^[176] S druge strane, negativna vrednost zeta potencijala za C-TiO₂ NČ ukazuje na postojanje difuzionog dvosloja,^[177] međutim, niska vrednost naelektrisanja upućuje da debljina dvosloja nije dovoljna za zadovoljavajuću koloidnu stabilnost.^[173] Za N-TiO₂ NČ nije bilo mogućnosti da se odredi zeta potencijal, a ni pretraživanjem literature za primenjeni postupak sinteze N-TiO₂ NČ nije pronađen podatak u vezi s vrednošću zeta potencijala. Međutim, na osnovu podataka iz literature može se izvesti generalni zaključak da dopiranje TiO₂ azotom stvara negativno naelektrisanje čija negativna vrednost raste s porastom količine dopanta, te se vrednosti zeta potencijala u literaturi kreću u rasponu od -5 mV do -90 mV.^[176,178,179]

5.1.3. Sinteza i karakterizacija nanokompozitnih sistema

NKS su sintetisani po ugledu na sistem koji je takođe sadržao kompleks [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂], a koji je bio vezan za nosač – koloidne TiO₂ NČ (pH 2). Za ovaj NKS potvrđen je potencijal za fotoosetljivo kontrolisano otpuštanje medikamenata.^[154] Međutim, ovakav NKS je bio stabilan u kiseljoj sredini (pH ~ 2), što je nepovoljno za primenu u fiziološkim uslovima. U cilju proizvodnje NKS boljih karakteristika testirane su mogućnosti

sinteze NKS od dve fotoosetljive komponente – kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ i različitih nanostrukturnih TiO_2 (TiO_2 NČ (pH 7), TiO_2 PNS, C i N- TiO_2 NČ),

Kao što je prethodno pomenuto u poglavlju 5.1.1., kompleks $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ je izabran kao model antikancerogenog agensa zbog genotoksičnog i citotoksičnog efekta, a pre svega zbog svoje multifunkcionalnosti.^[166] Poslednja osobina potiče od dva monodentatna labilna hloridna liganda (Cl) koji mogu da učestvuju u supstitucionim reakcijama s ciljnim donorskim biomolekulima (DNK, proteinima, peptidima ili metabolitima) i dva bidentatna (dcbpy) liganda s po dve karboksilne grupe (Slika 18 (b)) za koje TiO_2 ima visok afinitet za vezivanje.^[180] Ovakva molekulska struktura omogućava antitumorsko delovanje koordinisanjem s biomolekulima supstitucijom Cl liganda, i vezivanje za nanonosaoč koordinisanjem s površinom TiO_2 nanokristala preko dcbpy liganda. Na kompleksu $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ postoje ukupno četiri potencijalna vezivna mesta za površinu TiO_2 nanokristala, te nekoliko načina za vezivanje kompleksa za nosaoč: preko jedne karboksilne grupe (Slika 24 (a)), preko dve karboksilne grupe locirane na istom bipiridinskom ligandu (Slika 24 (b)) i preko dve karboksilne grupe locirane na susednim bipiridinskim ligandima (Slika 24 (c)). Dodatno, pojedinačne karboksilne grupe mogu da se koordinišu s atomima Ti na površini TiO_2 na tri različita načina koja su prethodno predstavljena u potpoglavlju 2.4.3. (Slika 24, donji red). Vezivanje preko dve karboksilne grupe istog ili susednih liganada osigurava jače vezivanje kompleksa za TiO_2 NČ, dok se vezivanje kompleksa preko jedne karboksilne grupe ostvaruje slabijim, fleksibilnim vezivanjem kompleksa.^[87]



Slika 24. Mogući načini koordinacije kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ za površinu TiO_2 NČ. Preuzeto uz dozvolu iz literature od ^[155].

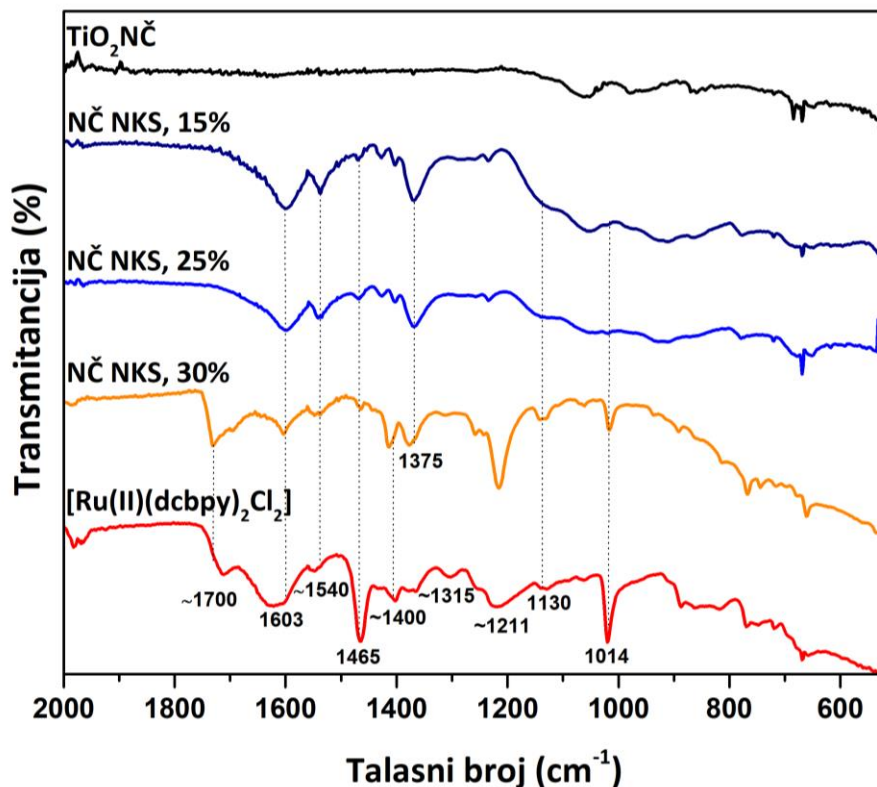
5.1.3.1. Strukturna karakterizacija nanokompozitnog sistema s koloidnim TiO₂ nanočesticama

Kao model sistem za ispitivanje mogućnosti upotrebe TiO₂ NČ u svojstvu nosača koji omogućava ciljanu i kontrolisanu dostavu antitumorskog agensa do tumorskog tkiva, prvo je formiran i okarakterisan NČ NKS. Radi dobijanja boljeg uvida u način vezivanja kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] za TiO₂ NČ, snimljeni su FTIR spektri. Slika 25 prikazuje ATR-FTIR spektre prašenih uzoraka – pojedinačno TiO₂ NČ, kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] i NČ NKS s različitim odnosima komponenti, dok su reprezentativne trake zajedno s njihovim identitetima prikazane u Tabeli 7.

FTIR spektar TiO₂ NČ je pokazao samo očekivanu traku na 1060 cm⁻¹ koja odgovara Ti–O vezi, bez tragova umetnutih molekula vode (spektar dat crnom bojom),^[181] dok je spektar kompleksa značajno složeniji (spektar predstavljen crvenom bojom, Slika 25). U FTIR spektru kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] trake koje potiču od simetričnih istežućih vibracija karboksilnih grupa $\nu_s(-COOH)$ uočljive su na ~1700 i ~1540 cm⁻¹, za deprotonovani oblik $\nu_s(-COO^-)$ na 1400 cm⁻¹, dok su asimetrične vibracije $\nu_{as}(-COO^-)$ uočljive na 1603 cm⁻¹.^[87] Intenzivna traka na 1465 cm⁻¹ odgovara istežućim vibracijama aromatičnog bipiridinskog prstena, $\nu(C=C)$.^[182] Trake karakteristične za istežuće vibracije $\nu(C-O)$ detektovane su na 1315, 1211 i 1130 cm⁻¹.^[87] Dodatno, intenzivna traka na 1014 cm⁻¹ odgovara deformacionim vibracijama karboksilnih grupa $\delta(O-CO-H)$.^[87]

U FTIR spektru NČ NKS s 30 % udela kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] (spektar predstavljen narandžastom bojom, Slika 25) interakciju TiO₂ NČ i kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] potvrđuje, pre svega, pojava nove trake u FTIR spektru na 1375 cm⁻¹ koja odgovara simetričnim vibracijama $\nu_s(-COO^-)$ koje nisu prisutne u spektru samog kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂].^[183] Ovo dodatno potvrđuje smanjenje intenziteta traka koje odgovaraju $\nu_{as}(-COO^-)$ i $\nu(C-O)$ (1603, 1315 i 1014 cm⁻¹), kao i pomeranje traka $\nu_s(-COOH)$ (1700 cm⁻¹) i $\nu_s(-COO^-)$ (1400 cm⁻¹) ka većim talasnim brojevima. Za određivanje mogućeg načina vezivanja posmatrana je razlika u talasnim brojevima između asimetričnih i simetričnih vibracija karboksilne grupe ($\Delta\nu(COO^-) = \nu_{as}(COO^-) - \nu_s(COO^-)$) kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] pre i nakon vezivanja za površinu nanočestica. Kada je razlika između posmatranih vibracija manja, onda dolazi do bidentatnog vezivanja. S druge strane, ukoliko je razlika veća ili jednaka onoj u nevezanom stanju, onda je tip vezivanja monodentatni.^[152,184] U FTIR spektru za NČ NKS s 30 % udela kompleksa, razlika između posmatranih vibracija je bila manja što ukazuje

da je dominantan bidentatni tip vezivanja. Bez obzira što u ovom slučaju preovladava bidentatni tip vezivanja, nisu sve karboksilne grupe iskorišćene za vezivanje za TiO_2 NČ, te su u spektru i dalje primetne vibracije nevezanih i vezanih C=O i C-O grupa.



Slika 25. FTIR spektri (odozdo na gore) – kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ (crvena kriva), NČ NKS s 30% (narandžasta kriva), 25 % (svetlo plava kriva) i 15 % (tamno plava kriva) udela kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$, kao i koloidnih TiO_2 NČ (crna kriva).

U drugoj fazi ispitan je efekat vezivanja različitih masenih udela kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ u odnosu na TiO_2 NČ (spektri predstavljeni plavom bojom, Slika 25). Preciznije, napravljene su dve probe NČ NKS s istim komponentama, ali različitih masenih udela kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ (15 i 25 %) u odnosu na TiO_2 NČ. Ovako sintetisani NČ NKS su poređeni međusobno, u odnosu na komponente i na prethodno sintetisani sistem s 30 % udela kompleksa (Slika 25). I u ovim spektrima uočena je nova traka na 1375 cm^{-1} – indikator stvaranja veze između kompleksa i TiO_2 NČ. Međutim, poređenjem karakterističnih traka uočenih u prethodno formiranom sistemu s 30 % udela kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ može da se zaključi da pri nižim koncentracijama kompleksa dolazi do drugačijeg tipa vezivanja. Preciznije, nestanak traka kod NČ NKS s 15 i 25 % udela kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ na 1315 i 1014 cm^{-1} ukazuje da je došlo do potpunog iskorišćenja svih

C-O grupa za koordinaciju s TiO_2 NČ. Iščezavanje trake $\sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ $\nu_s(-\text{COOH})$ ukazuje na odsustvo protonovanog oblika karboksilne grupe, dok prisustvo signala na 1600 i 1540 cm^{-1} , iako smanjenog intenziteta u odnosu na sam kompleks, dodatno pokazuje da nisu sve C=O grupe iskorišćene za vezivanje s nanočesticama. Ovo ukazuje na monodentatni tip vezivanja što je potvrđeno i neznatnom razlikom između talasnih brojeva asimetričnih i simetričnih vibracija slobodnog kompleksa i kompleksa nakon vezivanja za TiO_2 NČ.

Tabela 7. Pozicija i identitet signala dobijenih u IR spektru kompleksa $[\text{Ru(II)}(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ i NČ NKS s različitim udelima kompleksa.

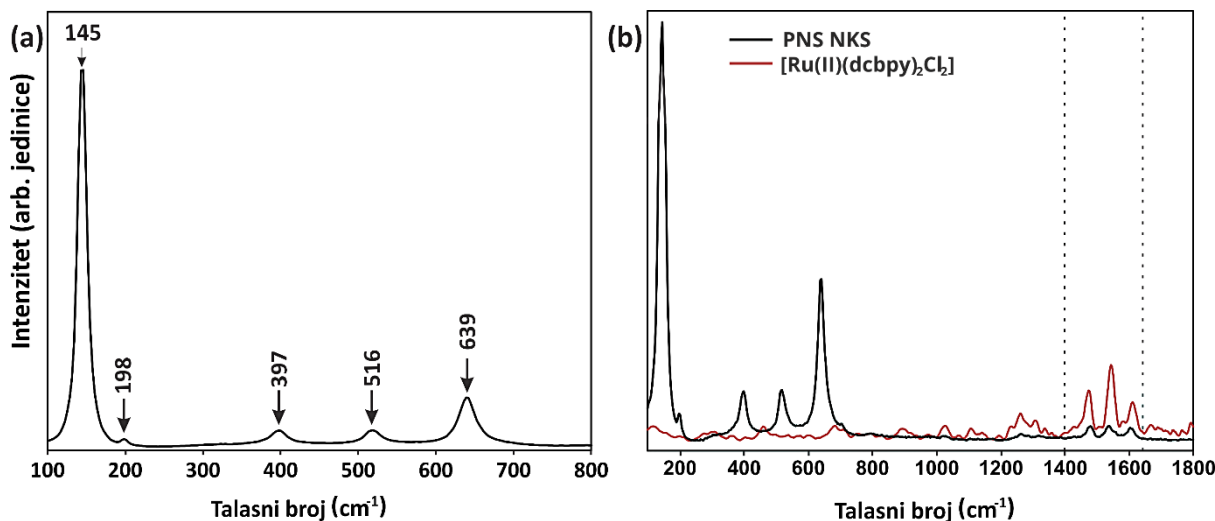
Pozicija signala (cm^{-1})	Identitet signala
1700	$\nu_s(-\text{COOH})$
1603	$\nu_{as}(-\text{COO}^-)$
1540	$\nu_s(-\text{COOH})$
1465	$\nu(\text{C}=\text{C})$
1400	$\nu_s(-\text{COO}^-)$
1375	$\nu_s(-\text{COO}^-)^*$
1315	$\nu(\text{C}-\text{O})$
1211	$\nu(\text{C}-\text{O})$
1130	$\nu(\text{C}-\text{O})$
1014	$\delta(\text{O}-\text{CO}-\text{H})$
*Indikator stvaranje veze između kompleksa $[\text{Ru(II)}(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ i TiO_2 NČ	

5.1.3.2. Strukturna karakterizacija nanokompozitnog sistema s TiO_2 prolattim nanosferoidima

U daljem toku istraživanja sintetisan je i okarakterisan NKS u kome su ulogu nosača umesto TiO_2 NČ, imali TiO_2 PNS (PNS NKS) čija je površina modifikovana kompleksom $[\text{Ru(II)}(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$. Strukturna karakterizacija NKS je ispitana pomoću CRM tehnike, a dobijeni spektri su poređeni sa spektrima poreklom od individualnih komponenti.

Najpre, karakterizacijom PNS NKS je utvrđena kristalna struktura TiO_2 PNS. U Ramanskom spektru TiO_2 PNS uočene su karakteristične trake anatasa koje odgovaraju aktivnim modovima uobičajenih za anatas fazu (3 E_g , 2 B_{1g} i A_{1g} i E_g). U pitanju su sledeće trake i odgovarajući modovi: 145 i 198 cm^{-1} (E_g), 397 cm^{-1} (B_{1g}), 516 cm^{-1} (B_{1g} i A_{1g}) i 639 cm^{-1} (E_g) (Slika 26 (a)).

Nakon inkubacije kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ s TiO_2 PNS, dobijen je Ramanski spektar PNS NKS koji je prikazan zajedno sa spektrom kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ (Slika 26 (b)).

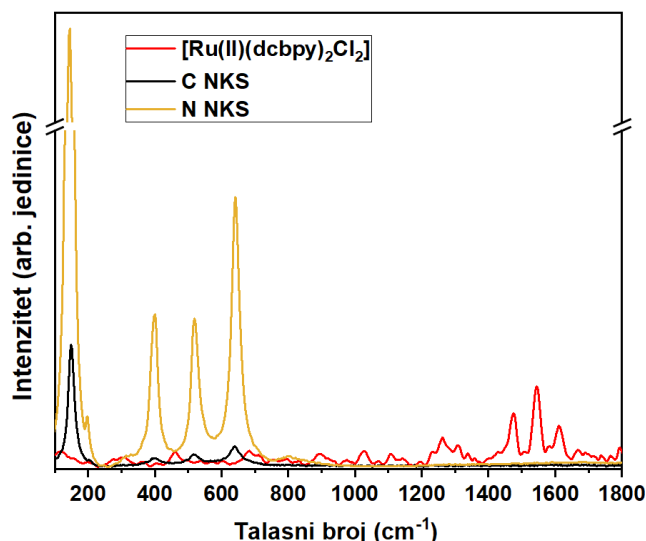


Slika 26. Ramanski spektri – TiO_2 PNS (a); PNS NKS i kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ (b).

S leva na desno, u spektru PNS NKS je uočljivo pet karakterističnih traka za anatas TiO_2 koje su prethodno navedene kod karakterizacije TiO_2 PNS. U drugom delu spektra opažaju se tri trake u oblasti $1400\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ koje su s većim intenzitetom prisutne u spektru kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$. Ove trake potiču od vibracija bipiridinskih prstenova i nedvosmisleno ukazuju na vezivanje kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ za površinu TiO_2 PNS.^[181]

5.1.3.3. Strukturna karakterizacija nanokompozitnog sistema s dopiranim TiO_2 nanočesticama

Pokušana je, takođe, sinteza NKS s C i N- TiO_2 NČ (C NKS i N NKS). Za njihovu karakterizaciju korišćena je CRM tehnika i dobijeni spektri su prikazani na Slici 27. Poređenjem Ramanskih spektara C NKS i N NKS, primetno je odsustvo karakterističnih traka u oblasti $1400\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ koje potiču od vibracija bipiridinskih prstenova kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$, što ukazuje da se obe ispitivane vrste dopiranih TiO_2 nanočestica ne vezuju za ispitivani kompleks. Ovim rezultatom je završeno ispitivanje C i N- TiO_2 NČ u svojstvu nosača za kompleks $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$, ali je nastavljeno njihovo ispitivanje u svojstvu FS.



Slika 27. Ramanski spektri kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ (crvena linija), N NKS (žuta linija) i C NKS (crna linija).

5.1.3.4. Efikasnost vezivanja kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ za TiO_2 nanočestice

U cilju određivanja efikasnosti vezivanja kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ za TiO_2 NČ i TiO_2 PNS ispitivana je efikasnost zarobljavanja antitumorskog agensa u nosaču (engl. *Entrapment efficiency*) i efikasnost „punjenja“ nosača agensom (engl. *Loading efficiency*).

Za razliku od sličnog NKS korišćenog u literaturi, a koji je bio stabilan na pH 2 i lako se taložio pri centrifugiranju na 7000 rpm tokom 3 minuta,^[87] NČ NKS koji sadrži koloidne TiO_2 NČ stabilizovane na pH 7 nije bilo moguće istaložiti ni primenom većih brzina mikrocentrifuge (12000 rpm) što ukazuje na visoku stabilnost sistema u fiziološkim uslovima. Stabilnost NČ NKS je testirana dodatno inkubacijom s BSA za koji se kompleks $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ dobro vezuje.^[166] Nakon inkubiranja u fiziološkim uslovima (PBS, pH 7), usledilo je taloženje pomoću ultra-centrifuge ($40000 \times g$), tokom jednog časa. Na taj način dobijen je talog u veoma maloj količini koja nije bila dovoljna za određivanje parametara sedimentacionog eseja.

Primenom sedimentacionog eseja na PNS NKS efikasnost zarobljavanja potencijalnog leka – kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ u nosaču i efikasnost „punjenja“ nosača potencijalnim lekom iznose $60,2 \pm 2 \%$ i $18,0 \pm 0,5 \%$, redom navedeno. Dobijene vrednosti su u skladu s literaturnim podacima i teorijski mogućim zasićenjem slobodnih mesta na površini TiO_2 .^[87]

5.2. Optičke osobine nanokompozitnog sistema i TiO₂ nanočestica

U prethodnom poglavlju je napomenuto da E_g TiO₂ leži u UV oblasti (3,2 eV za anatas), a da se modifikacijom TiO₂ može poboljšati optička aktivnost i pomeriti E_g ka vidljivoj oblasti. Iz tog razloga, pomoću *Tauc*-ovog numeričkog modela su utvrđene vrednosti E_g za C-TiO₂ NČ, kao i za NČ NKS i njegove komponente koje su poređene s polaznim TiO₂ NČ. Kod ovog modela, zavisnost direktnog energetskeg procepa od energije fotona data je izrazom:

$$(ahv)^n = A(hv - E_g)$$

gde je: hv – energija fotona (*Planck*-ova konstanta h umnožena s frekvencijom ν), E_g – energetski procep, A – apsorpciona konstanta (nagib linearne oblasti) i α – koeficijent apsorpcije dok je n u vezi s prirodom elektronskih prelaza i označava indirektno ($n = 1/2$) ili direktne ($n = 2$) dozvoljene prelaze. Imajući u vidu da su kod TiO₂ dominantni indirektni dozvoljeni prelazi, u proračunu je uzeto da je $n = 1/2$. Vrednost E_g je određena pomoću koeficijenta apsorpcije α iz eksperimentalno dobijenih apsorpcionih spektara.

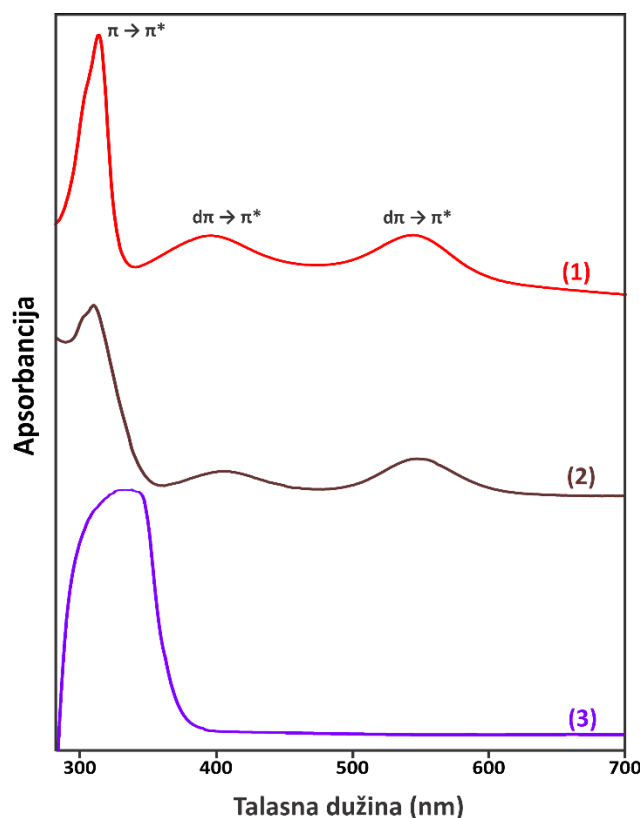
Za određivanje izmenjene vrednosti E_g kod N-TiO₂ NČ primenjena je *Kubelka-Munk* funkcija prema jednačini:

$$F(r) = \frac{(1 - R)}{2R}$$

gde R predstavlja apsolutnu refleksiju disperzije N-TiO₂ NČ, dok $F(R)$ predstavlja *Kubelka-Munk*-ovu funkciju apsorpcije. Veličina E_g je procenjena tako što je funkcija $[F(R)hv]^n$ izražena u zavisnosti od energije fotona (hv). Takođe, uzeto je da je $n = 1/2$. Vrednost E_g je određena presekom energetske ose s linearnim delovima dobijenih funkcija.

5.2.1. Energetski procep nanokompozitnog sistema i njegovih komponenti

U cilju potvrđivanja optičke aktivnosti u vidljivom delu spektra, najpre su snimljeni UV-Vis spektri NČ NKS i njegovih komponenti – kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] i TiO₂ NČ (Slika 28), a zatim su određene vrednosti E_g pomoću *Tauc*-ovog numeričkog modela. Na Slici 29 (a) prikazana je kriva zavisnosti ahv od energije fotona hv za NČ NKS i njegove komponente. Ekstrapolacijom linearnog dela krive do preseka s apcisom dobija se vrednost direktnog E_g .

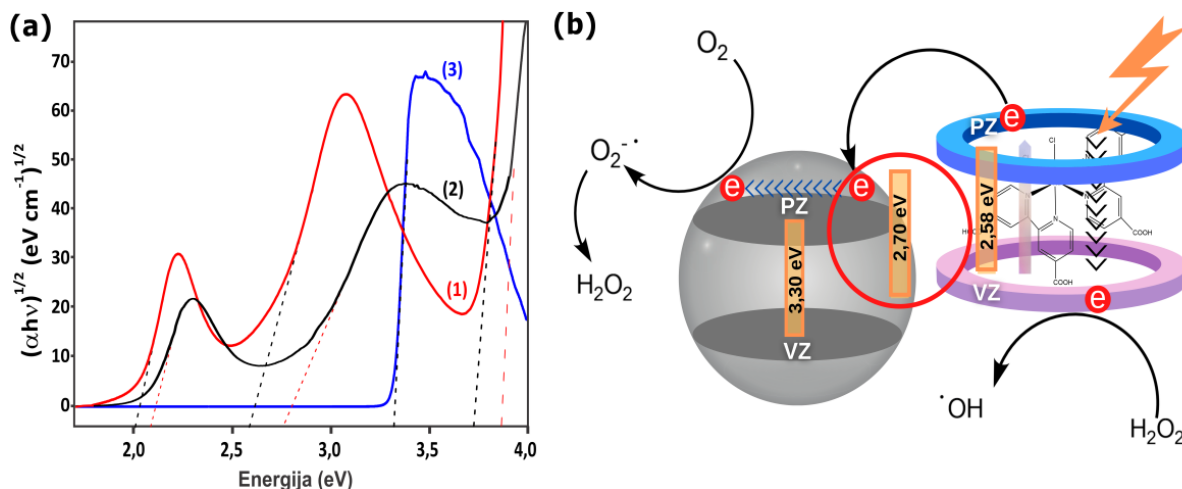


Slika 28. UV-Vis apsorpcijski spektri kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ (oznaka 1, kriva crvene boje); NČ NKS (oznaka 2, kriva braon boje); TiO_2 NČ (oznaka 3, kriva ljubičaste boje). Na krivoj broj (1) su označeni karakteristični prelazi.

Na Slici 28 primetan je karakteristični oštar signal TiO_2 na 350 nm koji odgovara prelazu elektrona iz VZ do PZ (kriva ljubičaste boje), dok je kod NČ NKS (kriva braon boje) ublažen karakterističan oštar signal koji potiče od TiO_2 , uz pojavu dodatnih širokih signala, na 413 i 562 nm, koji su posledica adsorpcije kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ na površini TiO_2 NČ. Ovi signali jasno ukazuju da je NČ NKS aktivan u vidljivoj oblasti. Signali na 413 i 562 nm su umanjenog intenziteta kod NČ NKS u odnosu na čist kompleks $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ (kriva crvene boje) što je verovatno posledica manjeg sadržaja kompleksa u NČ NKS, tj. interakcije između kompleksa i TiO_2 NČ.

Primenom *Tauc*-ovog modela za TiO_2 NČ dobijena je vrednost E_g od 3,30 eV (Slika 29 (a), linija (3)), koja odgovara vrednostima iz literature.^[185,186] Kompleks $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$, s druge strane, ima tri vrednosti E_g (Slika 29 (a), linija (1)). Prva vrednost je 3,7 eV koji potiče od prelaza između bipiridinskih liganda ($\pi \rightarrow \pi^*$). Druge dve vrednosti E_g , 2,6 i 2,0 eV, odgovaraju prelazima naelektrisanja od metala ka ligandima ($d\pi \rightarrow \pi^*$). Ovi prelazi su odgovorni za aktivnost kompleksa u vidljivoj oblasti, i u odnosu na njih su posmatrani odgovarajući E_g za NČ NKS. Slično kompleksu $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$, NČ NKS ima tri vrednosti E_g : 3,9; 2,7 i 2,1 eV (Slika 29 (a), linija (2)). Poslednje dve odgovaraju prelazima

naelektrisanja s metala ka ligandima, te one potvrđuju fotoaktivnost NČ NKS u vidljivoj oblasti.



Slika 29. Tauc-ova kriva koja određuje vrednost E_g za kompleks $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ (oznaka 1, kriva crvene boje); NČ NKS (oznaka 2, kriva crne boje) i TiO_2 NČ (oznaka 3, kriva plave boje) za dozvoljene indirektno prelaze (a); ilustrativni prikaz jednog od dva moguća kombinovana E_g NČ NKS (2,7 eV, naglašen crvenom linijom), kao i mogućih reakcija nastajanja RKV nakon aktivacije NČ NKS svetlom vidljivog dela spektra.

S obzirom da TiO_2 NČ i TiO_2 PNS imaju identični UV-Vis spektar, tj. da promena oblika nanostrukturnog TiO_2 nije uticala na optičke osobine, za PNS NKS očekivana je slična vrednost izmenjenog E_g . Stoga, Tauc-ov metod nije primenjen na ovaj sistem.

5.2.2. Pобољшanje optičkih svojstava TiO_2 nanočestica dopiranjem

Kod nedopiranih TiO_2 NČ, VZ odgovaraju O 2p stanja, a PZ odgovaraju Ti 3d stanja. S druge strane, za C i N- TiO_2 NČ očekivano je smanjenje vrednosti za E_g , kako dopiranjem TiO_2 elementima p -bloka dolazi do izmene VZ mešanjem p -stanja dopanta s p -stanjima kiseonika,^[187] i podizanja položaja VZ.^[93,94]

5.2.2.1. Energetski procep C dopiranih nanočestica TiO_2

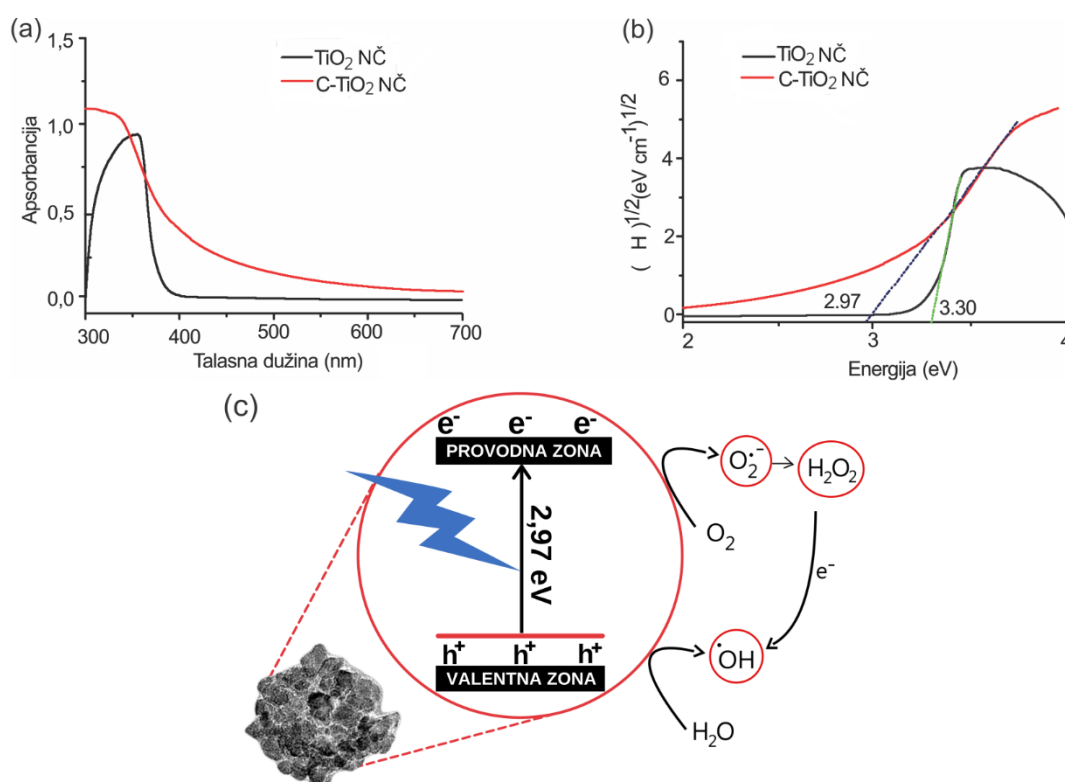
Na Slici 30 (a) prikazani su apsorpcioni spektri nedopiranih i C- TiO_2 NČ. Čist TiO_2 ima apsorpcioni prag na oko 400 nm, dok je za C- TiO_2 ovaj prag raširen i opada sa znatno manjim nagibom ka vidljivoj oblasti. Iz dobijenog UV-Vis spektra je očigledno da je u oblasti plave svetlosti, između 380 nm i 500 nm, poboljšana apsorpcija za C- TiO_2 NČ. Ova pojava je posledica smanjenja E_g , koja dovodi do smanjenih rekombinacija elektronskih šupljina i stvaranja Ti-C veze.

Primenom proračuna *Tauc*-ovog modela, za C-TiO₂ NČ dobijena je vrednost E_g od 2,97 eV, koja potvrđuje da je došlo do smanjivanja E_g kao posledice direktne interakcije između atoma C i Ti na površini nanočestica (Slika 30 (b)). Na Slici 30 (c) prikazana je VZ C-TiO₂ s hibridzovanim C 2p i O 2p stanjima, koja se nalazi iznad VZ TiO₂ NČ. Pomeranje VZ omogućava fotoaktiviranje C-TiO₂ NČ u plavoj oblasti vidljivog spektra, te je potrebno manje energije za prelazak elektrona između VZ i PZ. Dobijeni rezultat je u skladu s podacima predstavljenim u literaturi.^[101,188] Dodatno, u ovoj disertaciji je i eksperimentalno potvrđen fotocitotoksični uticaj kombinovanog tretmana s C-TiO₂ NČ i plavim svetlom na ćelije kancera, što će detaljnije biti predstavljeno u potpoglavlju 5.5.2.1.

Za $E = 2,97$ eV, primenom jednačine za energiju fotona:

$$E = h \frac{c}{\lambda}$$

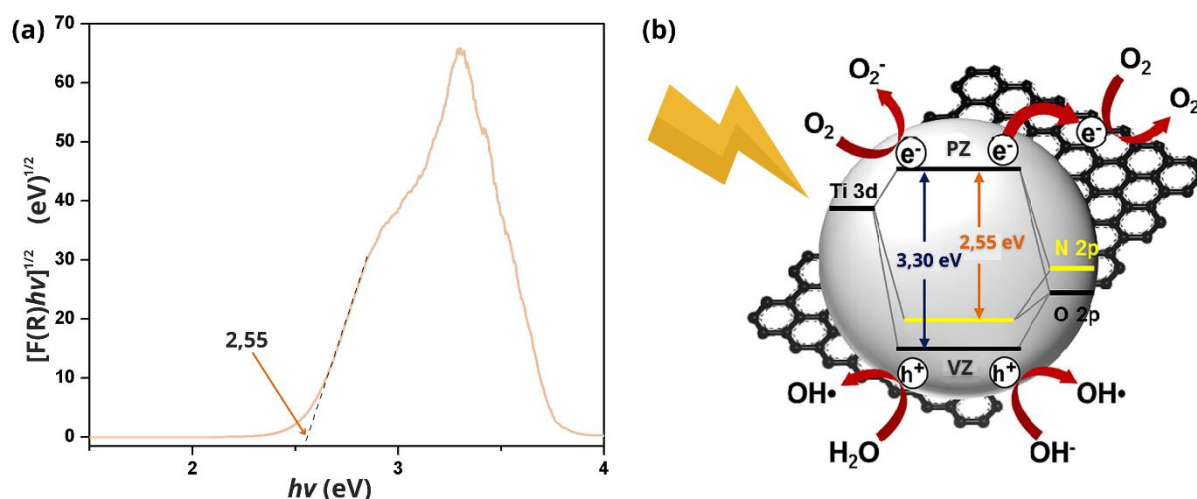
u kojoj E predstavlja energiju fotona, h predstavlja *Planck*-ovu konstantu, c brzinu svetlosti i λ talasnu dužinu. Nakon konverzije iz jedinice J u eV (1 eV predstavlja $1,602176634 \times 10^{-19}$ J), dobijena je vrednost talasne dužine od 417,5 nm. Na ovoj talasnoj dužini se nalazi apsorpcioni maksimum tj. na toj talasnoj dužini C-TiO₂ NČ imaju najveću fotoaktivnost, a ona se nalazi u svetlo ljubičastom delu vidljivog spektra.



Slika 30. UV-Vis spektar TiO₂ i C-TiO₂ NČ (a) *Tauc* kriva koja određuje vrednost E_g za TiO₂ i C-TiO₂ NČ (b); prikaz VZ, PZ i mogućih reakcija nastajanja RKV nakon aktivacije C-TiO₂ NČ s plavim svetlom.

5.2.2.1. Energetski proces N dopiranih nanočestica TiO₂

Primenom proračuna *Kubelka-Munk*-ovog modela za N-TiO₂ NČ, dobijena je vrednost E_g od 2,55 eV (Slika 31 (a)), koja ukazuje na značajno smanjivanje E_g u odnosu na čist TiO₂ i direktne interakcije između atoma N i Ti na površini nanočestica. Zabeleženo smanjenje E_g kod N-TiO₂ NČ je u saglasnosti s pomeranjem izmerenih vrednosti refleksivnosti ka vidljivom delu spektra, a dobijena vrednost odgovara literaturnim podacima za anatas formu nanostrukturnog TiO₂ dopiranog azotom u različitim postupcima sinteze.^[189–192] Kako ilustracija na Slici 31 (b) prikazuje, uzrok smanjene vrednosti E_g je najverovatnije formiranje novih energetskih nivoa od azota u rešetki TiO₂ neposredno iznad VZ, tj. iznad položaja O 2p stanja.



Slika 31. E_g N-TiO₂ NČ izračunat iz reflektivnog spektra uz pomoć Kubelka-Munk funkcije (a), prikaz VZ, PZ i mogućih reakcija nastajanja RKV nakon aktivacije N-TiO₂ NČ sa svetlom vidljivog dela spektra (b). Ilustracija je prilagođena iz literature^[193].

Primenom jednačine za energiju fotona i poznatu vrednost E_g (2,55 eV) je pokazano da se apsorpcioni maksimum za N-TiO₂ NČ nalazi na talasnoj dužini od 486 nm, što potvrđuje apsorpciju u cijan-plavoj oblasti vidljivog spektra.

5.3. Kinetika otpuštanja kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] s površine TiO₂ nosača

Mogućnost održavanja koncentracije antitumorskog agensa dok ne stigne u tumorsko tkivo i kontrole njegovog otpuštanja s nosača ispitana je praćenjem kinetike otpuštanja kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] metodom dijalize koja simulira fiziološke uslove. Metoda je zasnovana na obezbeđivanju pH vrednosti i hemijskog sastava na nivou bliskom krvnoj plazmi

sisara (pH 7) i u tumorskom tkivu (pH 5), održavanju konstante temperature i obezbeđivanju dinamičkih uslova koji simuliraju cirkulaciju (mešanjem vodenog rastvora konstantom brzinom). Sprovedena su dva odvojena testa dijalize na način opisan u poglavlju 4.7.

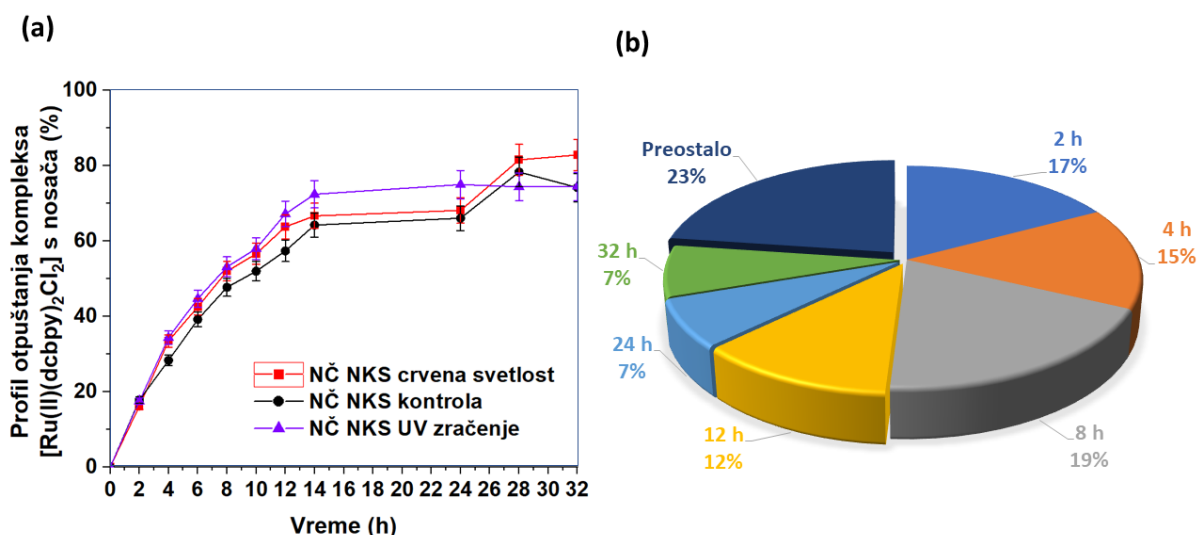
Literaturni podaci za NKS koji je sadržao koloidne TiO_2 NČ stabilne na pH 2 poređenjem profila dijalize slobodnog kompleksa i profila otpuštanja kompleksa s NKS ukazuju da konjugacija s TiO_2 NČ utiče na postepeno otpuštanje kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ s nosača.^[154] Postepeno otpuštanje je bilo dalje potpomognuto ozračivanjem vidljivim svetlom, koje uzrokovalo strukturne promene u kompleksu $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ – *cis* i *trans* izomerizacije, favorizovanjem vezivanja novonastalog *trans* izomera naspram otpuštanja manje efikasno vezanog izvornog *cis* izomera.^[87] Ova osobina je poželjna s obzirom da ukazuje na konstantno otpuštanje niže koncentracije leka u dužem vremenskom intervalu. Mana sistema, s druge strane, bila je agregacija, odnosno nestabilnost u fiziološkim uslovima. Imajući u vidu da kompleks apsorbuje u vidljivom delu spektra i UV oblasti, a da TiO_2 NČ apsorbuju isključivo u UV oblasti, za NČ NKS sa stabilizovanim TiO_2 NČ na pH 7 bilo je potrebno ispitati kinetiku otpuštanja u istim uslovima, kao i na koji način dodatna inkapsulacija u MUV utiče na profile otpuštanja kompleksa s nosača i mogućnost kontrolisane dostave.

Otpuštanje kompleksa s NČ NKS u različitim medijumima (PBS pH 7 i pH 5) i različitim uslovima ozračivanja odlikuje se sličnim dvofaznim profilom s inicijalnim bržim oslobađanjem, fenomenom koji se u literaturi opisuje kao “naprasno otpuštanje” ili “eksplozivno otpuštanje” (engl. *burst release*) (Slika 32 i Slika 33). Do njega najverovatnije dolazi kao posledica dijalize molekula kompleksa koji su ostali nevezani ili slabije vezani za površinu nanonosaa. Kod profila otpuštanja u PBS-u pH 5 “naprasno otpuštanje” događa se tokom prvih 2 sata kada se naglo oslobodi oko 20 % kompleksa s NČ NKS nakon čega se profil otpuštanja polako tokom vremena stabilizuje (Slika 32 (a)). S grafika je lako uočljivo da primena vidljive i crvene svetlosti statistički neznačajno utiče na profil otpuštanja kompleksa u poređenju s nezračenom kontrolom. U slučaju profila otpuštanja bez uticaja svetlosti kod medijuma PBS pH 7 “naprasno otpuštanje” događa se tokom prvih 4 sata kada se naglo oslobodi oko 40 % kompleksa nakon čega se profil otpuštanja stabilizuje (Slika 33 (a i c)). Primenom UV svetlosti efekat zračenja na promenu kinetike otpuštanja kompleksa bio je slabo izražen u odnosu na nezračenu kontrolu i to tek nakon zračenja u trajanju od 24 h, kad je primećeno zadržavanje kompleksa u malom procentu (Slika 33 (c i d)). Za razliku od UV svetlosti, primena crvene svetlosti je dala značajno odstupanje od kontrolnog profila otpuštanja

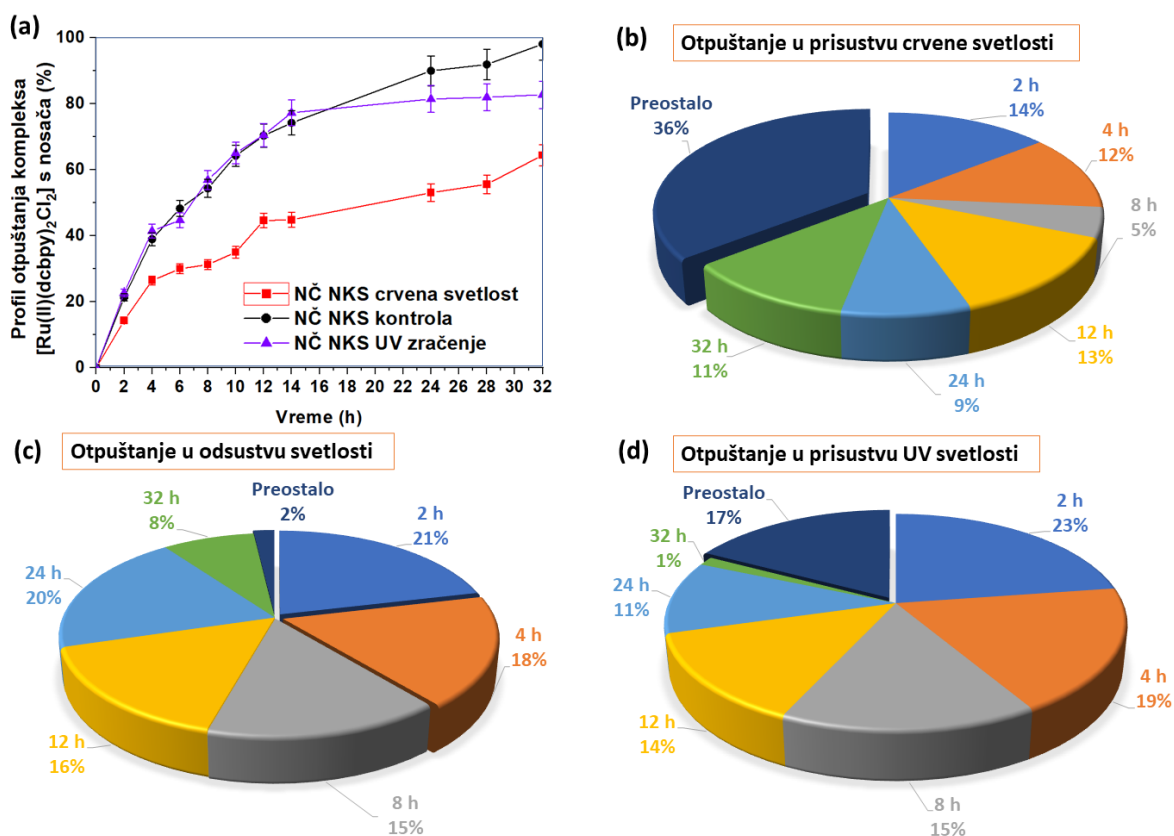
kompleksa bez zračenja (Slika 33 (a)). Tačnije, primećeno je produženo otpuštanje kompleksa s nosača pri ozračivanju s vidljivim crvenim svetlom u medijumu PBS pH 7. Grafički prikaz relativne koncentracije ukupnog kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ (Slika 33 (b)) jasno predstavlja da se nakon 32 sata otpusti ukupno 64 % kompleksa uz primenu crvene svetlosti, dok se u istom vremenskom intervalu s nezračenog kontrolnog sistema oslobodi približno 100 % kompleksa (Slika 33 (c)). Imajući u vidu podatke iz literature, pojava blagog zadržavanja pri ozračivanju vidljivim svetlom je najverovatnije posledica *cis-trans* izomerizacije.^[87] Ova osobina ukazuje na potencijal NČ NKS za konstantno otpuštanje antitumorskog agensa tokom vremena, čime se poboljšava i terapijski efekat leka. Izostanak istog trenda zadržavanja tj. sporijeg otpuštanja kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ pri osvetljenju svetlom iz vidljivog dela spektra u medijumu PBS pH 5, može biti usled većeg broja protonovanih karboksilnih grupa i hidratacionog sloja na površini TiO_2 NČ, koji sprečavaju ponovno vezivanje kompleksa za površinu nanonosača nakon što se oslobode. S druge strane, razlog izostanka efekta UV svetlosti na kinetiku otpuštanja kompleksa može da bude to što je kod NČ NKS stabilizovanog na pH 7 površina nosača dodatno modifikovana u poređenju s prethodnim sistemom, pa je samim tim i mehanizam otpuštanja drugačiji. Takođe, moguće je i da je potrebno primeniti UV zračenje veće jačine, što u kliničkoj praksi nije poželjno te predstavlja nedostatak ispitivanog sistema.

Potrebno je takođe istaći razlike u otpuštanju kompleksa između sistema na pH 5 i 7 bez efekta svetlosti. Naime, kod sistema na pH 5 koji simulira kisele uslove tumorskog mikrookruženja uočeno je produženo otpuštanje kompleksa u poređenju s profilom otpuštanja na pH 7 koji simulira uslove zdravog tkiva. Dok se za 32 h oslobodi 98 % kompleksa iz NKS na pH 7 (Slika 33 (c)), za isto vreme se s NKS na pH 5 oslobodi 77 % (Slika 32 (b)). Ovo upućuje na to da sistem u tumorskom kiselom okruženju postepeno otpušta kompleks što može da poboljša terapijski efekat potencijalnog citostatika u tumorskom tkivu u odnosu na zdravo. Pored efikasnosti, konstantno otpuštanje niže koncentracije leka u dužem vremenskom intervalu, kao pogodnost može imati smanjenje neželjenih efekata kroz upotrebu manjeg broja neophodnih terapijskih doza.

Kako su praćenjem kinetike otpuštanja kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ s površine koloidnih TiO_2 NČ dobijeni očekivani rezultati za ozračivanje svetlom iz vidljivog dela spektra, a imajući u vidu da PNS NKS ima sličnu optičku aktivnost na osnovu preklopljenih UV-Vis spektara, za njega se može pretpostaviti slična dinamika kinetike otpuštanja kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$.



Slika 32. Poređenje profila otpuštanja kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ s nosača bez, i delovanjem UV i crvene svetlosti u medijumu, PBS (pH 5), (a); relativna količina otpuštenog kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ u zavisnosti od vremena – predstavljene su prosečne vrednosti za sve uslove ozračivanja (standardna devijacija je u opsegu od 1-5 %) (b).

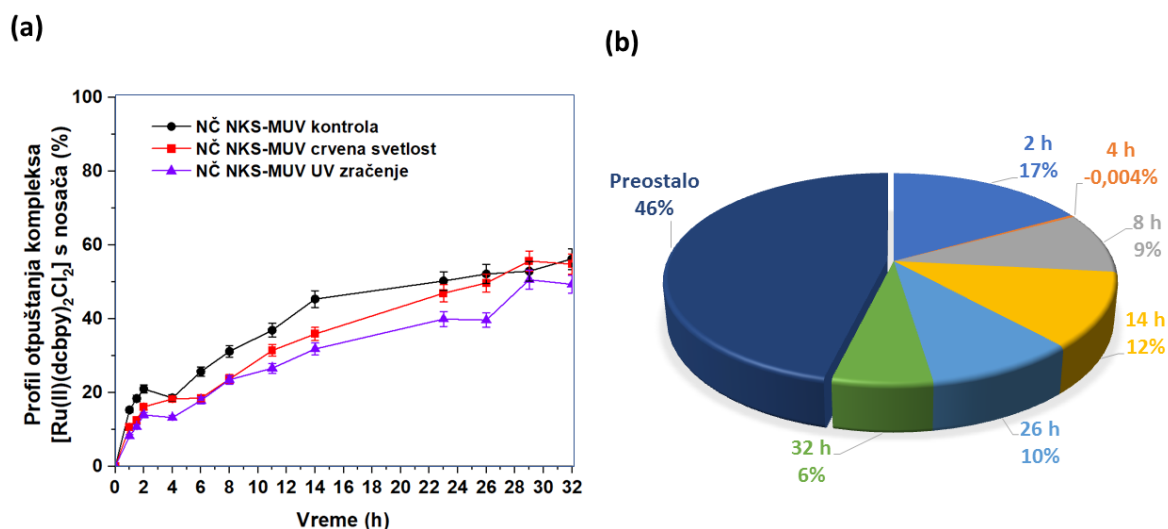


Slika 33. Poređenje profila otpuštanja kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ s nosača u medijumu, PBS (pH 7), (a); relativna količina otpuštenog kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ u zavisnosti od vremena – delovanjem crvene svetlosti (b); – u odsustvu svetlosti (c); – u prisustvu UV svetlosti (d).

5.3.1. Uticaj inkapsulacije nanokompozitnog sistema u male unilamelarne vezikule na kinetiku otpuštanja

Kako bi se povećao ulazak u ćelije, NČ NKS je inkapsuliran u lipozome tj. u MUV sintetisane i okarakterisane prema proceduri opisanoj u potpoglavlju 4.4.1. Cilj inkapsulacije u lipozome je pored povećanja permeabilnosti i stabilnosti sistema u cirkulaciji/krvnoj plazmi, bilo i smanjenje procenta "curenja" antitumorskog agensa, što u najvećoj meri zavisi od fosfolipidnog sastava. Stoga na osnovu karakterizacije izolovanih fosfolipida (potpoglavlje 4.4.1.) i na osnovu literature,^[194] može se zaključiti da su formirani MUV imali pogodan fosfolipidni sastav.

Profil otpuštanja kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ s nosača za NČ NKS-MUV bez i u prisustvu primenjene svetlosti prikazani su na Slici 34. Poređenjem profila otpuštanja inkapsuliranog NKS-MUV sistema s NČ NKS bez svetlosne stimulacije (Slika 33) uočljivo je gotovo dvostruko brže otpuštanje kompleksa u slučaju NČ NKS. Dok se za 32 h otpusti skoro 100 % kompleksa u slučaju NČ NKS, za isto vreme se u slučaju NKS-MUV sistema otpusti 54 %. Inkapsulacija NČ NKS u MUV pokazala je da zračenje, bilo vidljivim ili UV svetlom, ima sličan uticaj na kinetike otpuštanja i da se ne razlikuje značajno od nezračene kontrole, s obzirom da se u svim eksperimentalnim uslovima iz konjugovanog NKS-MUV sistema oslobodilo oko 50 % ukupno vezanog kompleksa za 32 h (Slika 34). Fosfolipidi osim što čuvaju NČ NKS, imaju i nepoželjnu osobinu da apsorbuju veći deo primenjene svetlosti, UV i vidljive, što objašnjava sličnost dobijenih profila s profilom kontrole. Ovim je potvrđen dobar potencijal NČ NKS-MUV za postepeno otpuštanje leka, ali ne i za primenu u FDT.



Slika 34. Poređenje profila otpuštanja kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ s NČ NKS-MUV bez, i delovanjem UV i crvene svetlosti (a); relativna količina otpuštenog kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ u zavisnosti od vremena – predstavljene su prosečne vrednosti za sve uslove ozračivanja (standardna devijacija je u opsegu od 2,5-6,6 %) (b).

5.4. Ćelijski unos

Nakon katalize nanostrukturnih TiO₂ pomoću svetlosti stvaraju se parovi (e⁻-h⁺). Nastali elektroni i šupljine se slobodno kreću difuzijom kroz materijal što dovodi do aktiviranja različitih oksidaciono – redukcionih procesa na površini nanočestica. Imajući u vidu i da su vremena polu-života nastalih RKV kratka, te da oni deluju lokalno, za izazivanje foto-indukovanog antitumorskog efekta informacije o tačnoj unutarćelijskoj distribuciji nanostrukturnih TiO₂ su od presudnog značaja.

5.4.1. Ćelijski unos i unutarćelijska distribucija koloidnih nanočestica TiO₂ i nanokompozitnog sistema

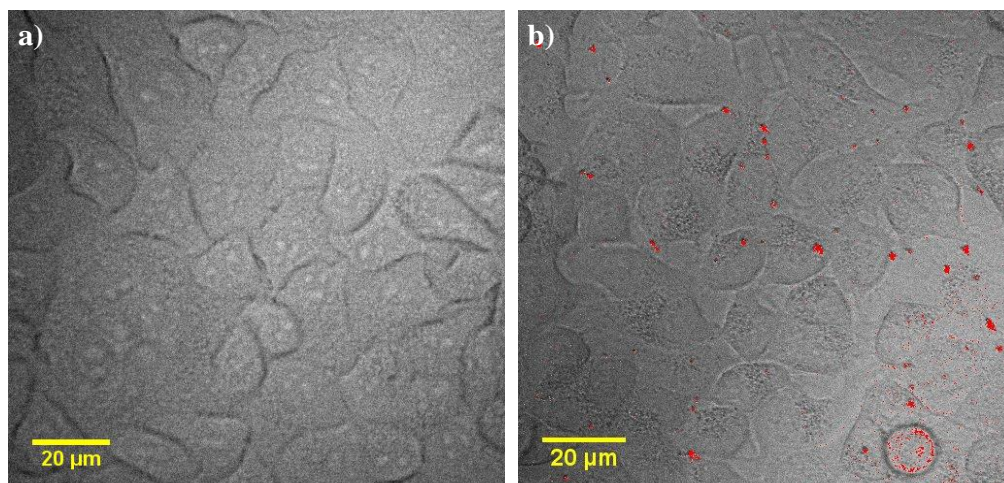
U potpoglavlju 4.5.9. definisane su karakteristike metode LSCM. Uzevši u obzir da su koloidne TiO₂ NČ veličine oko 5 nm i da ih karakteriše izrazita homogenost, ovom metodom nije bilo moguće utvrditi tačnu unutarćelijsku lokaciju koloidnih TiO₂ NČ, kao ni za NČ NKS. Njihov signal bio je nadjačan šumom, te rezultati nisu prikazani.

5.4.2. Ćelijski unos i unutarćelijska distribucija prolatnih nanosferoida TiO₂ i nanokompozitnog sistema

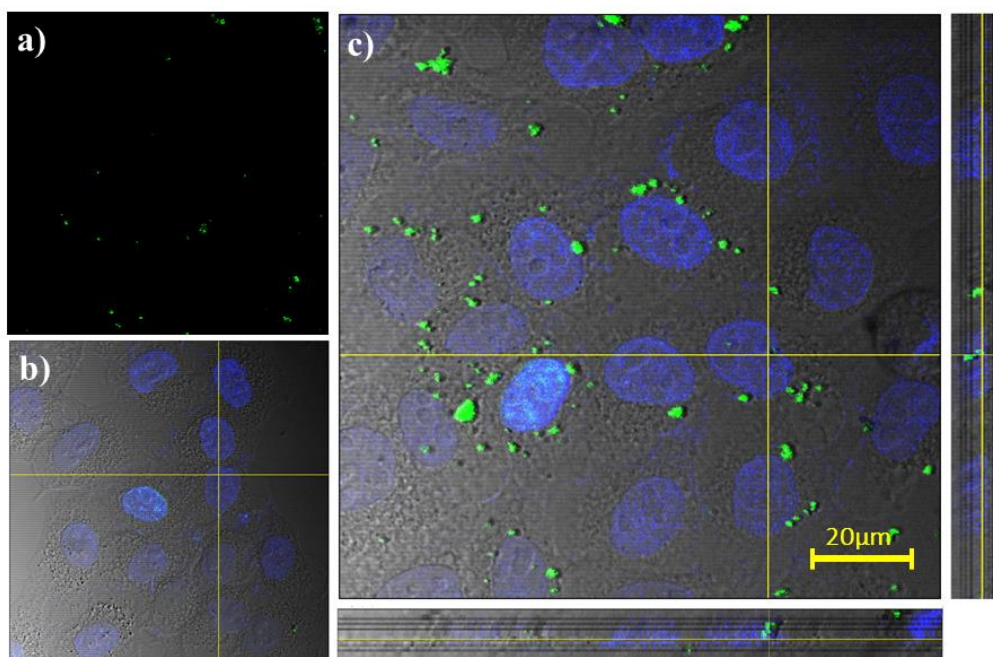
Radi boljeg uvida u unutarćelijsku lokalizaciju čestica, ćelijski unos TiO₂ PNS je ispitan najpre pomoću metode LSCM na ćelijskoj liniji HeLa. HeLa ćelije su tretirane TiO₂ PNS u cilju ispitivanja ćelijskog unosa i unutarćelijske distribucije TiO₂ PNS. Dobijena DIC mikrografija je preklapljena s refleksionom na način opisan u potpoglavlju 4.5.9. Na Slici 35 prikazane su netretirane – kontrolne HeLa ćelije (a) u odnosu na HeLa ćelije tretirane s 5 μg mL⁻¹ TiO₂ PNS (b), odakle se lako uočava da je većina ćelija zadržala populaciju tokom trajanja inkubacije s tretmanom, kao i da su prisutni agregati TiO₂ PNS (predstavljeni crvenom bojom) unutar i oko ćelija.

Kao što Slika 35 sugerije, TiO₂ PNS se u ćelijama nalaze u okolini jedra. Kako prisustvo nanostrukture u blizini jedra omogućava potencijalnu interakciju s DNK molekulima, bilo je potrebno utvrditi njihovu tačnu lokaciju. Stoga, u cilju daljeg ispitivanja unutarćelijske raspodele TiO₂ PNS, HeLa ćelije su nakon tretmana obojene bojom Hoechst 33342 koja bojeći DNK molekul u plavo, vizuelno izdvaja jedro od ostatka ćelije (Slika 36 (b)). Preklapanjem mikrografije snimljene pomoću refleksionog kanala (Slika 36 (a)) s fluorescentnim kanalom dobijena je kompozitna slika (Slika 36 (c)) koja potvrđuje da se većina TiO₂ PNS

(predstavljenih zelenom bojom) nalazi unutar ispitivanih HeLa ćelija, kao i da su pojedine čestice prisutne i u jedru (X-Z i Y-Z profili na Slici 36 (c)).



Slika 35. Kompozit preklapljenih DIC i refleksijskih mikrografija HeLa ćelija koje su služile kao kontrola (bez tretmana) (a) i HeLa ćelija tretiranih s TiO_2 PNS (predstavljene crvenom bojom) (b).



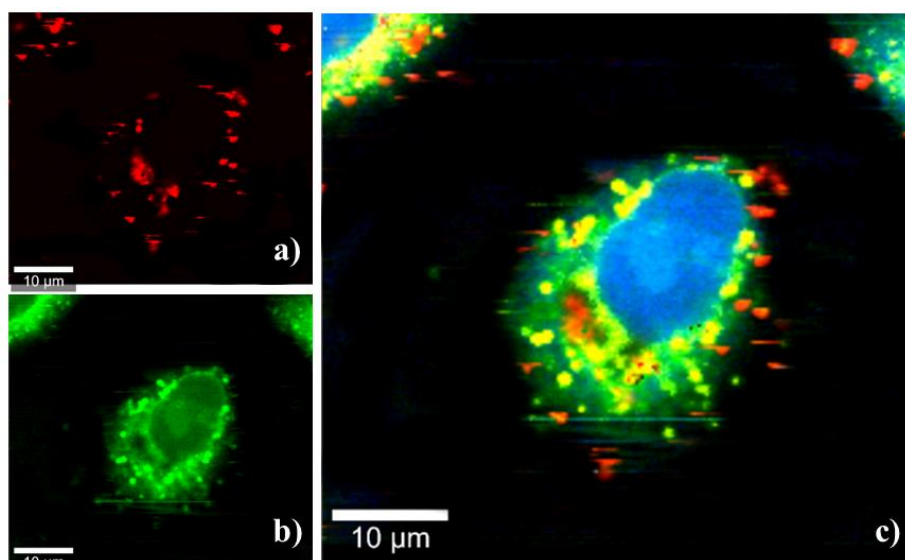
Slika 36. Mikrografije distribucije TiO_2 PNS u HeLa ćelijama. Mikrografija dobijena pomoću refleksijskog kanala koji prikazuje TiO_2 PNS (predstavljene zelenom bojom) (a); Mikrografija dobijena pomoću fluorescentnog kanala u kome su jezra netretiranih ćelija (plavo obojena) (b); Mikrografija koja predstavlja 3D distribuciju TiO_2 PNS. Žute linije označavaju tačnu lokaciju čestice TiO_2 PNS unutar jezra. Dodaci mikrografija na dnu i s desne strane su X-Z i Y-Z profili mereni duž oznaka i pokazuju 3D distribuciju TiO_2 PNS (c).

Ćelijski unos PNS NKS je posmatran pomoću CRM tehnike primenom drugačijeg protokola za fluorescentno bojenje u kome su umesto ćelija fluorescentno označeni nanokristali

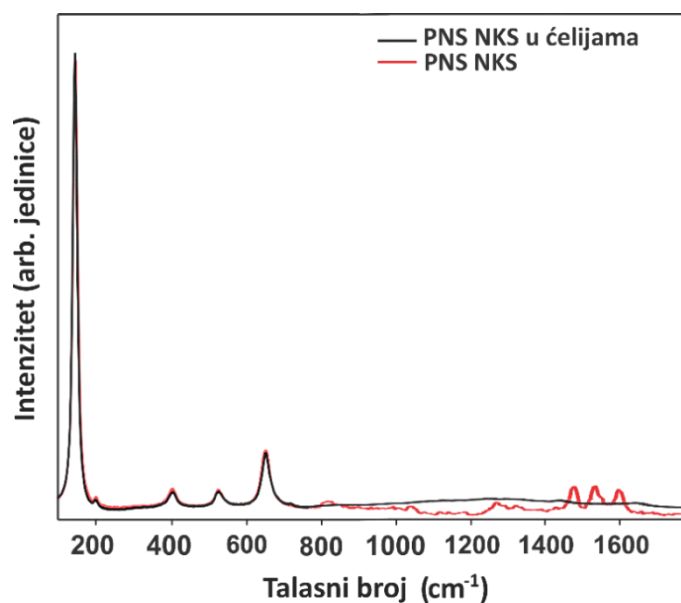
TiO₂. Nakon bojenja PNS NKS bojom RITC, tretirana je ćelijska linija A549, a zatim inkubirana tokom 24 h. Dobijene su fluorescentne mikrografije izdvojene ćelije koje pokazuju intenzitete individualnih RGB kanala (crvenog, zelenog i plavog), a koji preklapanjem daju kompletnu sliku ćelijske strukture. Zahvaljujući bojenju, prikazana je tačna unutarćelijska raspodela nanostruktura, koje su uočljive usled crvenog fluoresciranja u citoplazmi (zeleno boja) i u okolini jedra (plava boja) (Slika 37). Štaviše, crveno obojene nanostrukture su uočljive i u lipidnim telima, što može ukazati i na aktivaciju njihovog lizozomskog izlučivanja.

Pomoću sonde za Ramansku spektroskopiju snimljeni su Ramanski spektri na različitim lokacijama gde su crvene nanostrukture uočene unutar posmatrane ćelije. Ovi spektri su pokazali da crvene nanostrukture ne predstavljaju PNS NKS, već TiO₂ PNS i da prisustvo kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] u ćeliji nije potvrđeno. Naime, na Slici 38 uočljivo je da nakon ćelijskog unosa u Ramanskom spektru izostaju karakteristične trake u predelu 1400-1600 cm⁻¹ koje potiču od rezonancije biperidinskih prstenova iz kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂]. Iako je u poglavlju 5.1.3. pomoću CRM tehnike pokazano da dolazi do značajnog vezivanja kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] za TiO₂ PNS pre ćelijske inkubacije, rezultati ukazuju da se kompleks u fiziološkim uslovima otpustio s nosača, najverovatnije iz metodoloških razloga. Naime, do otpuštanja kompleksa je najverovatnije došlo prilikom bojenja, i da molekuli RICT imaju veći afinitet vezivanja za površinu TiO₂ te supstituišu molekule kompleksa. Ipak, veoma je značajno sa stanovišta FDT što je i CRM tehnikom potvrđeno ne samo prisustvo TiO₂ PNS unutar ćelije, nego i njihova distribucija u blizini jedra.

Ovim je za dve tumorske ćelijske linije, HeLa i A459, primenom dve različite tehnike fluorescentnog obeležavanja, potvrđeno da se TiO₂ PNS lokalizuju u ćelijama u kojima formiraju aglomerate veličine do 3 μm. Veličina i distribucija ovih aglomerata je slična distribuciji unutar endozoma i lizozoma, što upućuje da je mehanizam ćelijskog unosa endocitoza.^[195] Lokalizacija u okolini jedra i na jedarnoj membrani je potpuno nov podatak za ovu vrstu nanostrukturnih TiO₂ koji do sada nije potvrđen u literaturi, a kako je u ovom istraživanju potvrđen za obe vrste indikatora, mogućnost da je označavanje fluorescentnim indikatorom uticalo na lokalizaciju oko jedra je veoma mala. Pomenuta osobina TiO₂ PNS je veoma korisna za primenu ovih čestica u FDT, kako bi ozračivanje moglo da indukuje oštećenja DNK,^[196] koje naknadno dovode do smrti ćelije apoptozom, ćelijskim starenjem ili nekrozom.^[197]



Slika 37. Mikrografija distribucije TiO_2 PNS u A549 ćeliji. TiO_2 PNS (crveno obojeni) su prikazani pod (a); Citoplazma (zeleno obojena) je prikazana pod (b); Distribucija TiO_2 PNS u ćeliji je prikazana pod (c). Narandžasto obojene strukture predstavljaju lipidna tela, plava boja predstavlja jedro.

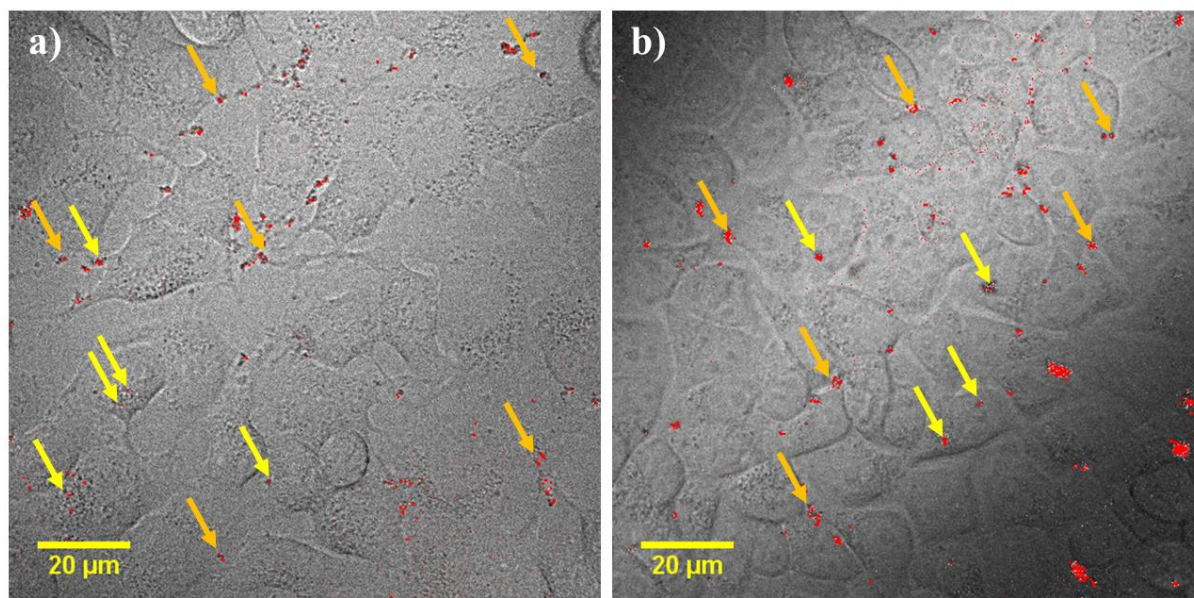


Slika 38. Ramanski spektar PNS NKS pre i posle inkubacije s ćelijama

5.4.3. Ćelijski unos i unutarćelijska distribucija C i N dopiranih nanočestica TiO_2

Metoda LSCM je korišćena i za proveru ćelijskog unosa C i N- TiO_2 NČ u HeLa ćelije nakon 1 h inkubacije. Koncentracija tretmana je iznosila $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ za oba tipa dopiranih TiO_2 NČ. Na mikrografijama prikazanim na Slici 39, crvenom bojom su prikazane nanočestice i njihova distribucija u odnosu na HeLa ćelije. Dobijena DIC mikrografija je preklapljena s refleksionom na način opisan u potpoglavlju 4.5.9. Stepem preživljavanja kod oba tretmana je

bio visok u odnosu na kontrolu (Slika 35 (a)), a primetno je i da su N-TiO₂ NČ sklonije formiranju agregata od C-TiO₂ NČ (Slika 39). Uočljivo je da se oba tipa dopiranih nanočestica nalaze s unutrašnje strane ćelijske membrane, kao i da su u međućelijskom prostoru većim delom zastupljeni nanočestični agregati.



Slika 39. Kompozit preklopljenih DIC i refleksionih mikrografa C-TiO₂ NČ (a) i N-TiO₂ NČ (b). Žutim strelicama su označene čestice koje se nalaze u unutrašnjosti ćelije, dok su narandžastim strelicama označene čestice i čestični agregati prisutni u vanćelijskom prostoru.

5.5. Citotoksična aktivnost kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂], nanostrukturnih TiO₂ i nanokompozitnih sistema prema ćelijskim linijama

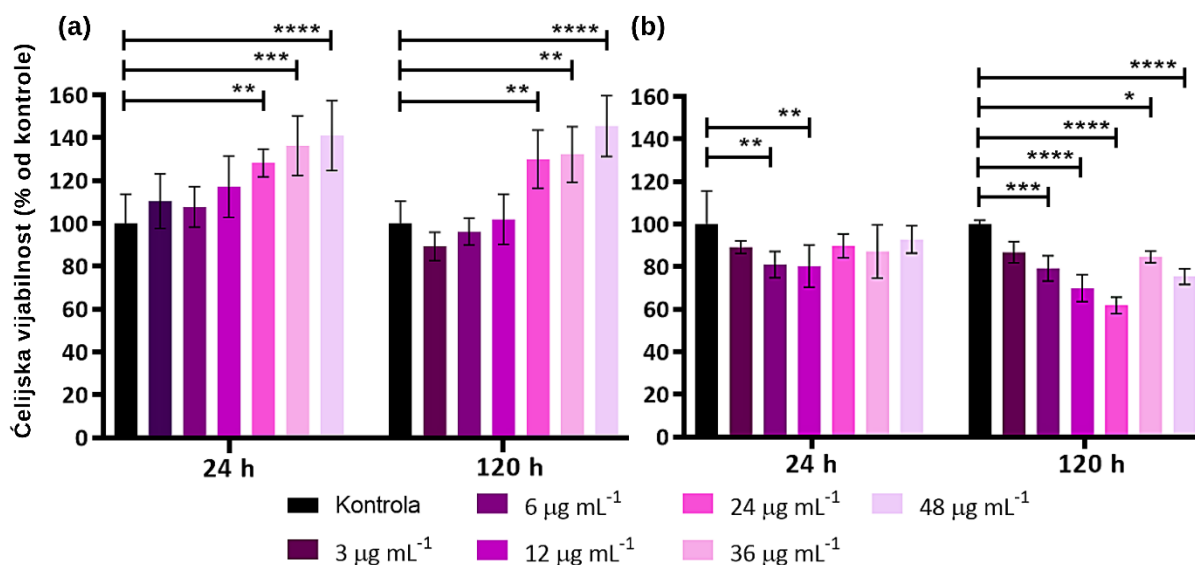
Radi pronalazjenja sistema koji će biti najefikasniji, odnosno čija će primena dovesti do najvećeg stepena fotocitotoksičnosti, ćelijske linije su tretirane različitim koncentracijama kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂], nanostrukturnih TiO₂ i NKS koje prethodno nisu značajno uticale na vijabilnost u mraku. U cilju ispitivanja fotocitotoksičnosti, ćelije su najpre inkubirane s izabranim koncentracijama tretmana, a zatim izložene svetlosnom stimulansu. Krajnji cilj je bio uspostavljanje zavisnosti između fotocitotoksičnosti, s jedne strane, i oblika nanostrukturnih TiO₂ i vrste njegovih modifikacije ili dopanta. Uredni prikaz ostvarenih rezultata citotoksične i fotocitotoksične aktivnosti za sve ispitivane tretmane i ćelijske linije prikazani su u Prilozima 1 i 2.

5.5.1. Citotoksična aktivnost nemodifikovanog nanostrukturnog TiO₂

Biokompatibilnost se definiše kao sposobnost materijala da nakon aplikacije obavlja određenu funkciju u organizmu ne izazivajući neželjeni odgovor tkiva domaćina.^[198] *In vitro* ispitivanja predstavljaju prvi korak ka ispitivanju biokompatibilnosti materijala koje se završava kliničkim studijama na ljudima. Stoga, sagledavanje biokompatibilnosti uglavnom započinje testovima citotoksičnosti kojima se utvrđuje stepen preživljavanja ćelija nakon tretmana materijalom koji se ispituje.

Biokompatibilnost TiO₂ NČ i TiO₂ PNS je najpre ispitana praćenjem vijabilnosti netransformisanih ćelija u mraku. Naime, kako bi se neželjeni efekti moguće terapije redukovali u najvećoj mogućoj meri, bilo je potrebno utvrditi citotoksičnu aktivnost u pogledu zavisnosti od koncentracije i vremena inkubacije tretmana s ćelijama. Na taj način utvrđuju se koncentracije kod kojih se citotoksični efekat TiO₂ NČ i TiO₂ PNS ispoljava tek nakon ćelijskog unosa i dodatnog tretmana svetlom. Za tretman različitim koncentracijama TiO₂ NČ i TiO₂ PNS u mraku, izabrana su dva različita tipa netransformisanih ćelija miša. Kao kontinuirana ćelijska linija izabrani su 3T3 vezivni fibroblasti embriona miša koje karakteriše brza proliferacija. Drugi tip netransformisanih ćelija su primarne, imunokompetentne ćelije (splenociti) izolovane za potrebe eksperimenata iz mišje slezine.

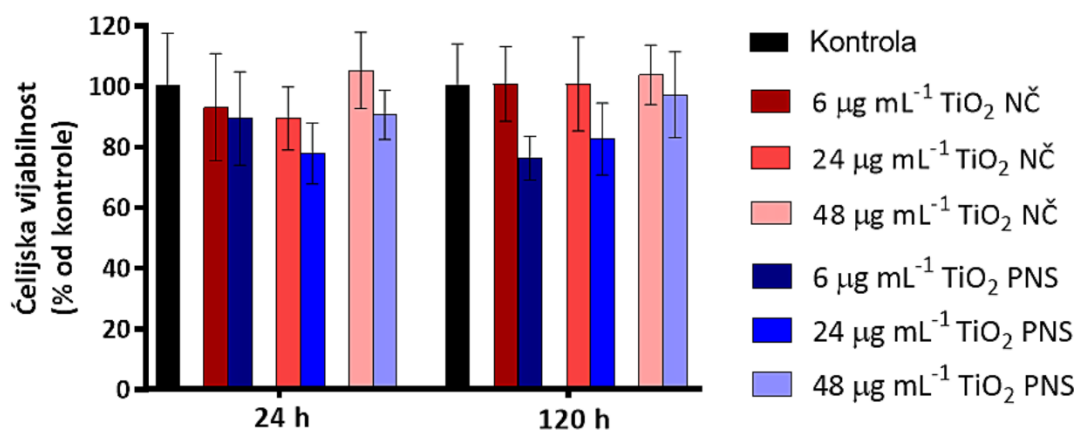
Vijabilnost 3T3 fibroblasta ispitana je *in vitro* pomoću kristal violet testa nakon inkubacije od 24 i 120 h s naznačenim koncentracijama TiO₂ NČ i TiO₂ PNS, a dobijeni rezultati su prikazani na Slici 40. Kod tretmana TiO₂ NČ primetan je veoma sličan koncentracijski-zavisani stimulatívni efekat u obe ispitivane vremenske tačke (Slika 40 (a)). Statistički značajan porast vijabilnosti uočljiv je za tretmane koncentracijama od 24 µg mL⁻¹ i većim. Preciznije, koncentracije od 24 i 36 µg mL⁻¹ su dovele do povećanja vijabilnosti na oko 130 %, dok su koncentracije od 48 µg mL⁻¹ uticale na povećanje vijabilnosti od oko 140 % za obe vremenske tačke. U potpoglavlju 2.4.4. je bilo reči o tome da nanostrukturni TiO₂ može da podstakne ćelijsku proliferaciju određenih ćelijskih linija, između ostalih i fibroblasta, tako da su dobijeni rezultati očekivani i u skladu sa saznanjima o biološkoj ulozi nanostrukturnog TiO₂. Stoga, za ispitivane TiO₂ NČ može se pretpostaviti da osim što ih ćelije fibroblasta dobro podnose, verovatno je da koloidnu strukturu ovih čestica ćelije fibroblasta prepoznaju kao matriks za rast koji uz nutrijente iz medijuma omogućava njihovu brzu deobu.^[109]



Slika 40. Dozno-zavisni efekat TiO_2 NČ (a) i TiO_2 PNS (b) (predstavljene su konačne koncentracije u medijumu) na ćelijsku vijabilnost nakon 24 i 120 h inkubacije utvrđen pomoću kristal violet testa na fibroblastima miša 3T3. Podaci su analizirani pomoću jednofaktorskog ANOVA i Tukey testa. “*” označava statistički značajne razlike u poređenju s netretiranim ćelijama (kontrolom) – $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) i $p < 0,0001$ (****). Vrednost kontrole je uzeta kao arbitrarna vrednost od 100 %.

S druge strane, tretmani rastućim koncentracijama TiO_2 PNS su pokazali drugačiji trend (Slika 40 (b)). Nakon 24 h inkubacije s TiO_2 PNS koncentracije od 6 i 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$ došlo je do blagog pada vijabilnosti (81 i 80 %, redom navedeno). Smanjenje vijabilnosti i progresivni, statistički značajni, citotoksični efekat zapažen je nakon 120 h za sve koncentracije. Ipak, značajno je istaći da je za sve ispitane koncentracije tretmana nakon 120 h, stepen preživljavanja bio veći od 60 %. Različiti profili citotoksičnosti kod TiO_2 PNS u i TiO_2 NČ su najverovatnije posledica drugačijeg oblika i veličine čestica, koji posledično dovodi do poboljšanog ćelijskog unosa ovog tipa čestica. Stoga, uzimajući u obzir mikroskopska ispitivanja TiO_2 PNS (potpoglavlje 5.4.2.), moguće je da značajan broj ovih čestica interaguje s DNK, što dovodi do smanjenja proliferacije ćelija nakon produženog vremena inkubacije.^[199]

Imajući u vidu da su splenociti primarne neadherentne ćelije, test kristal violet nije bio pogodan za određivanje citotoksičnosti, stoga je citotoksična aktivnost TiO_2 NČ i PNS na splenocitima određena pomoću MTT testa pod istim eksperimentalnim uslovima. Efekat tretmana TiO_2 NČ i TiO_2 PNS je pokazao drugačiji obrazac kod splenocita u odnosu na fibroblaste, što je prikazano na Slici 41.



Slika 41. Dozno-zavisni efekat TiO_2 NČ (crveni stubići) i PNS (plavi stubići) na ćelijsku vijabilnost nakon 24 i 120 h inkubacije utvrđen pomoću MTT testa na splenocitima. Predstavljene su konačne koncentracije u medijumu. Podaci su analizirani korišćenjem jednofaktorskog ANOVA i Tukey testa. Prikazane vrednosti nisu bile od statističkog značaja ($p \geq 0,05$) poređenjem s kontrolom. Vrednost kontrole (crni stubići) je uzeta kao arbitrarna vrednost od 100 %.

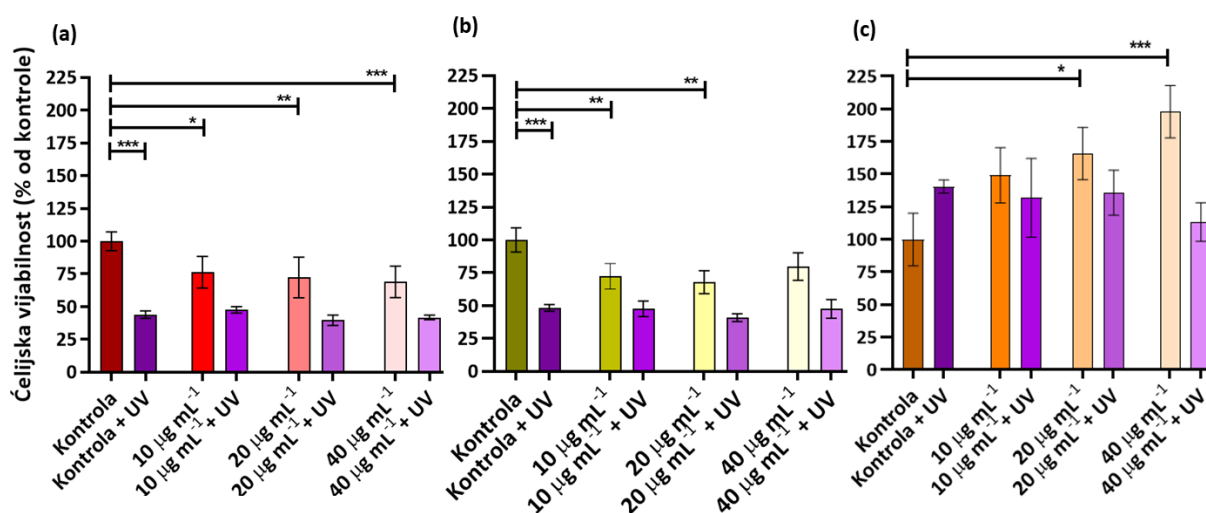
Različiti tretmani na splenocitima su doveli do sličnog obrasca citotoksičnosti. Iako je primetno da tretman i inkubacija od 24 i 120 h kod TiO_2 PNS izaziva veći pad vijabilnosti u poređenju s TiO_2 NČ, značajno je istaći da prilikom tretmana svim naznačenim koncentracijama TiO_2 NČ i TiO_2 PNS u obe vremenske tačke, promena vijabilnosti nije bila od statističkog značajna. Pogotovo je uočljivo da je za TiO_2 NČ vijabilnost nakon 120 h veoma bliska kontroli (oko 100 % nakon 120 h za sve ispitivane koncentracije). Ovim je pokazana veoma dobra biokompatibilnost nemođifikovanih nanostrukturnih TiO_2 koji su predmet istraživanja ove disertacije s imunokompetenim ćelijama. S druge strane, u slučaju tretmana *in vivo* očekivano je da bi nanočestice brzo prošle kroz cirkulaciju usled delovanja bubrega, pre nego što bi se postiglo aktiviranje imunog odgovora.

5.5.1.1. Fotocitotoksična aktivnost nemođifikovanog nanostrukturnog TiO_2 ispitana na tumorskim ćelijskim linijama

S obzirom da je nemođifikovani nanostrukturni TiO_2 fotoaktivan u UV oblasti, fotocitotoksičnost TiO_2 NČ i TiO_2 PNS je testirana na tri ćelijske linije karcinoma (A375, SKBR3 i PANC-1) nakon zračenja UV svetlom. Iako je UV svetlo škodljivo i ne prodire dublje u kožu, ono se ipak primenjuje u različitim sferama ljudske aktivnosti, od fototerapije odojčadi, različitih lokalnih primena u stomatologiji, do kozmetičkih tretmana. Stoga postoje doze i jačine UV svetlosti koje se smatraju bezbednim za primenu kod ljudi. Sagledavajući incidenciju maligniteta i visoku stopu smrtnosti usled malignih oboljenja, korišćenje UV zračenja primenjenog u bezbednim dozama na pacijentima obolelim od kancera može se

opravdati time što uzrokuje manje štetnih i neželjenih efekata nego postojeće invazivne terapije kancera.

Ispitivane ćelije su najpre tretirane bliskim koncentracijskim nivoima TiO_2 NČ i TiO_2 PNS za koje je prethodno utvrđeno da na netransformisanim ćelijama ne dovode do značajnog pada vijabilnosti. Takođe, imajući u vidu prethodno izložene rezultate citotoksičnosti u dve vremenske tačke, ćelije su nakon tretmana inkubirane tokom 24 h, a zatim su zračene UV svetlom u trajanju od 5 min (254 nm, 600 μW) i dodatno inkubirane 24 h. Dobijena zavisnost vijabilnosti od koncentracije tretmana i/ili zračenja za TiO_2 PNS predstavljena je na Slici 42. Ova zavisnost nije prikazana za ispitivanja fotocitotoksičnosti TiO_2 NČ, kako ni jedna koncentracija tretmana, kao ni dodatno zračenje nije dovelo do statistički značajnih promena u stepenu preživljavanja za sve ispitivane ćelijske linije.



Slika 42. Koncentraciono-zavisni efekat TiO_2 PNS (predstavljene su konačne koncentracije u medijumu) nakon 24 h inkubacije i dodatnog ozračivanja UV svetlom na vijabilnost ćelijskih linija A375 (a); SKBR3 (b); PANC-1 (c). Vijabilnost je određena pomoću SRB testa. Podaci su analizirani pomoću jednofaktorskog ANOVA i Tukey testa. “*” označava statistički značajne razlike u poređenju s netretiranim ćelijama (kontrolom) – $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) i za $p < 0,001$ (***). Vrednost kontrole je uzeta kao arbitrarna vrednost od 100 %.

Ćelijska linija A375 se pokazala osetljivijom na tretman TiO_2 PNS, a stepen preživljavanja se smanjivao s porastom koncentracija ($p < 0,05$ za 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $p < 0,01$ za 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i $p < 0,001$ za 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TiO_2 PNS), (Slika 42 (a)). Merenja nakon UV zračenja su pokazala značajan fotocitotoksični efekat koji je poticao isključivo od uticaja svetlosti, a ne od kombinovanog uticaja tretmana i svetlosti ($p < 0,001$ za sve uzorke ozračene UV svetlom u odnosu na kontrolu; $p > 0,05$ za sve uzorke tretirane s TiO_2 + UV svetlom u odnosu na kontrolu + UV). Sličan trend je primećen na ćelijskoj liniji SKRB3 (Slika 42 (b)) – citotoksični efekat tretmana bez zračenja je bio najizraženiji nakon primene 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ TiO_2 PNS, dok efekat

kombinovanog tretmana i zračenja nije dao značajne rezultate i bio je ekvivalentan efektu same svetlosti, kao i kod A375 linije. Štaviše, kod ćelijskih linija A375 i SKRB3 izgledalo je da UV svetlost uzrokuje nizak stepen preživljavanja u kontroli (manje od 50 %; $p < 0,001$ za *kontrola* naspram *kontrola + UV*), što čini primenjene uslove neprikladnim za FDT.

S druge strane, rezultati ispitivanja citotoksičnosti na ćelijskim linijama A375 i SKBR3 ukazuju da su ćelije kancera osetljivije na tretman TiO_2 PNS u mraku u odnosu na netransformisane ćelije, te da je tretmanom TiO_2 PNS moguće postići značajno smanjenje vijabilnosti.

Za razliku od ćelijskih linija A375 i SKRB3, ćelijska linija PANC-1 pokazala je sasvim drugačiji trend nakon tretmana TiO_2 PNS (Slika 42 (c)). Sve koncentracije tretmana TiO_2 PNS podstakle su progresivan rast ćelija, a stepen preživljavanja se više nego udvostručio primenom najveće koncentracije od $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($p > 0,05$ za $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $p < 0,05$ za $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ i $p < 0,001$ za $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ TiO_2 PNS). S druge strane, primenjeno UV zračenje u slučaju PANC-1 tumorske linije nije dovelo do statistički značajne promene vijabilnosti u odnosu na nezračenu kontrolu, kao ni u slučaju kombinovanog tretmana i zračenja u odnosu na zračenu kontrolu ($p > 0,05$ za *kontrolu* i sve ćelije tretirane s $\text{TiO}_2 + \text{UV}$ u odnosu na *kontrolu + UV*). Karcinom pankreasa je jedan od najsmrtonosnijih karcinoma s malim brojem dokazano-efikasnih tretmana, a u literaturi su potvrđeni terapijski efekti u pre-kliničkim studijama hipertermalnog tretmana s radiofrekventnim zračenjem i nanočesticama zlata.^[35] Poznato je da je uticaj istih nanočestica na različite ćelije drugačiji i zavisi od ćelijskog odgovora na brojne strategije detoksikacije koje ćelija može da iskoristi kao odgovor na nanočestični tretman.^[200] Do neočekivane stimulacije rasta PANC-1 ćelija kao ćelijski odgovor na tretman TiO_2 PNS je najverovatnije došlo usled inherentne rezistencije. Međutim, ove pretpostavke se moraju detaljnije istražiti i potvrditi.

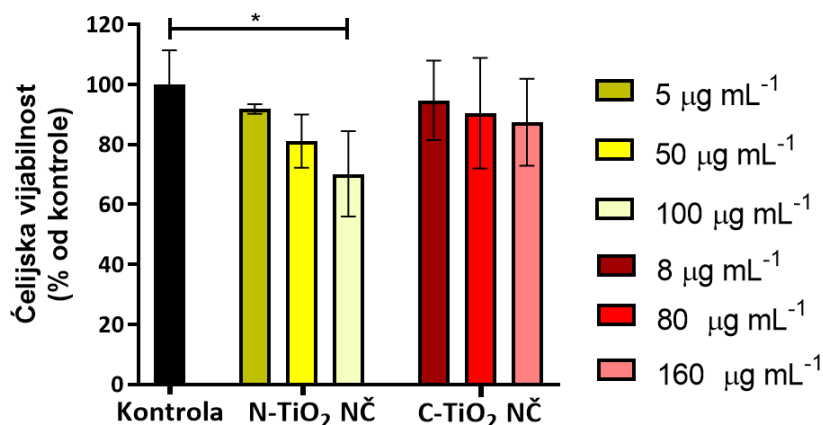
Pošto su TiO_2 PNS pokazali oksidativnu aktivnost u rastvoru, utvrđen je sadržaj MDA/HNE u ćelijama, koji su produkti oksidativnog oštećenja lipida i proteina, ali nisu zapažene značajnije promene u njihovom sadržaju u svim ćelijama koje su tretirane TiO_2 PNS u mraku i posle ozračivanja (podaci nisu prikazani). Prema tome, mehanizam njihovog delovanja može biti drugačiji u tretiranim ćelijskim linijama što predstavlja zadatak daljih istraživanja.

5.5.2. Citotoksična aktivnost C i N dopiranih nanočestica TiO₂

S obzirom na dobru fotoaktivnost u vidljivom delu spektra koju su pokazale C i N-TiO₂ NČ (potpoglavlje 5.2.2.1.), ove nanočestice su ispitane kao FS za FDT karcinoma grlića materice koji predstavlja treći najčešći uzrok smrtnosti od raka kod žena širom sveta.^[201] Iako se FDT u najvećoj meri primenjuje u lečenju površinskih tumora kao što je melanom, primena FDT nije ograničena samo na površinski dostupne tumore. Naime, pomoću optičkog vlakna mogu da se selektivno ozrače tumorske lezije koje su dostupne na ovaj način (npr. sondom za rak pluća i kateterom za rak žučnih kanala). Kako je za pristup tumoru grlića materice potreban samo kolposkop za optički put lasera, FDT se uspešno primenjuje za karcinom grlića materice.^[202] Ovakav vid lečenja ima brojne prednosti, a pokazano je da može da očuva plodnost, dok je terapija manje bolna i često uspešnija. Međutim, klinički primenjena FDT ima značajan nedostatak – FS se neselektivno aplicira (intravenozno), te dolazi do neželjene citotoksičnosti zdravog tkiva, kao i do pojave produžene fotosenzibilacije kod pacijenata. I ovaj nedostatak bi mogao biti prevaziđen aplikacijom citostatika na optičko vlakno i njegovom aktivacijom u samom grliću materice. Stoga je izabrana HeLa ćelijska linija, najpre za ispitivanje citotoksičnog efekta tretmana C i N-TiO₂ NČ čime su utvrđene koncentracije koje ćelije dobro podnose, a zatim i za ispitivanje fotocitotoksičnosti, tj. udruženog efekta na vijabilnost HeLa ćelija nakon tretmana C i N-TiO₂ NČ i delovanja vidljivim svetlom.

Za procenu vijabilnosti pomoću modifikovanog MTT testa, HeLa ćelije su tretirane s po tri različite koncentracije suspenzija C i N-TiO₂ NČ, a ostvarene vrednosti vijabilnosti su prikazane na Slici 43. Posle 48 sati inkubacije u mraku, zapažena je značajna citotoksičnost tretmana N-TiO₂ NČ koncentracije od 100 µg mL⁻¹, dok tretmani nižim koncentracijama (5 i 50 µg mL⁻¹) nisu doveli do statistički značajne promene u ćelijskoj vijabilnosti. Iako je koncentracija od 100 µg mL⁻¹ N-TiO₂ NČ ispoljila dobru osobinu da značajno smanjuje stepen preživljavanja HeLa ćelija, za procenu fotocitotoksičnosti izabrana je koncentraciju od 50 µg mL⁻¹ N-TiO₂ NČ kako bi se jasnije utvrdio kombinovani efekat sa zračenjem.

S druge strane, imajući u vidu da sve ispitivane koncentracije tretmana s C-TiO₂ NČ nisu pokazale značajnu citotoksičnost, maksimalna ispitivana koncentracija (160 µg mL⁻¹) je izabrana za dalja ispitivanja primene C-TiO₂ NČ kao FS.



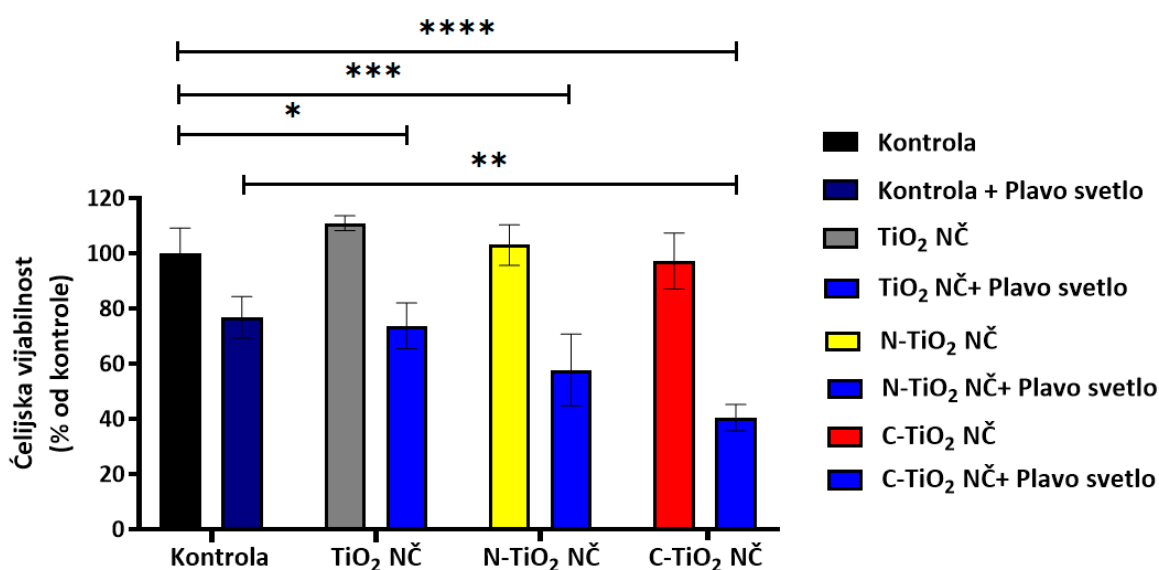
Slika 43. Koncentraciono-zavisni efekat N-TiO₂ NČ (žuti stubići) i C-TiO₂ NČ (crveni stubići) na ćelijsku vijabilnost (predstavljene su konačne koncentracije u medijumu) nakon 48 h inkubacije utvrđen pomoću modifikovanog MTT testa na HeLa ćelijskoj liniji. Podaci su analizirani pomoću jednofaktorskog ANOVA i Tukey testa. “*” označava statistički značajne razlike u poređenju s netretiranim ćelijama (kontrolom) – $p < 0,05$ (*). Vrednost kontrole (crni stubići) je uzeta kao arbitrarna vrednost od 100 %.

5.5.2.1. Fotocitotoksična aktivnost dopiranih TiO₂ nanočestica

Uzimajući u obzir da se apsorpcioni maksimumi za C i N-TiO₂ NČ nalaze na 417,5 i 486 nm, redom navedeno, izabrano je plavo svetlo kao svetlosni stimulans za ispitivanje kombinovanog efekta tretmana ovim česticama i zračenjem na HeLa ćelijskoj liniji. Na Slici 44 prikazan je stepen preživljavanja HeLa ćelija nakon kombinovanog tretmana C-/N-TiO₂ NČ i zračenjem s plavim svetlom (400-450 nm, 120 µW) u trajanju od 15 min. Poređenja radi, istovremeno je ispitan uticaj na vijabilnost HeLa ćelija kombinovanog tretmana s plavim svetlom i nedopiranim, koloidnim TiO₂ NČ. Dobijene vrednosti ćelijske vijabilnosti nakon 48 h inkubacije HeLa ćelija s C i N-TiO₂ NČ (160 i 50 µg mL⁻¹ redom navedeno), kao i nedopiranim TiO₂ NČ (160 µg mL⁻¹), bez zračenja potvrđuju odsustvo značajnog citotoksičnog efekta u odsustvu svetlosnog stimulansa. Nakon primenjenog zračenja na ćelije tretirane na isti način uočeno je da efekat samog primenjenog zračenja nema statistički značajan uticaj na vijabilnost ćelija u poređenju s nezračenom kontrolom, kao ni da kombinovani tretman TiO₂ NČ, N-TiO₂ NČ i zračenja ne utiče na vijabilnost ćelija u poređenju sa zračenom kontrolom. S druge strane, ćelije na koje je delovao kombinovani tretman C-TiO₂ NČ i plavim svetlom, ispoljile su znatno nižu vijabilnost gde je stepen preživelih ćelija nakon pomenutog tretmana iznosio oko 40 % i pokazao statistički značaj u poređenju sa zračenom kontrolom $p < 0,01$ (**). Poređenjem rezultata dobijenih ispitivanjem fotocitotoksičnosti može se zaključiti da iako C i N-TiO₂ NČ apsorbuju plavu svetlost, samo C-TiO₂ NČ ispoljavaju fotocitotoksičnu aktivnost

na HeLa liniji. Ovo se može pripisati oksidativnoj aktivnosti koju su C-TiO₂ NČ ispoljile pri interakciji sa svetlom vidljivog dela spektra, a koja je detaljnije opisana u poglavlju 5.5.

Literaturni podaci upućuju da zračenje plavim svetlom niskog intenziteta može biti efikasan tretman za različite vrste ćelija karcinoma, poput limfoma,^[203] melanoma,^[204] raka debelog creva,^[205] humanog fibrosarkoma i leukemije.^[206] Ovaj tretman ima nekoliko potencijalnih prednosti u odnosu na konvencionalno zračenje. Plava LED svetlost inhibira rast i proliferaciju i indukuje apoptozu različitih ćelija kancera. Štaviše, kombinacija plave LED svetlosti s hemijskim agensima i/ili FS ima veliki potencijal za upotrebu u kliničkoj praksi u lečenju različitih karcinoma.^[207,208]



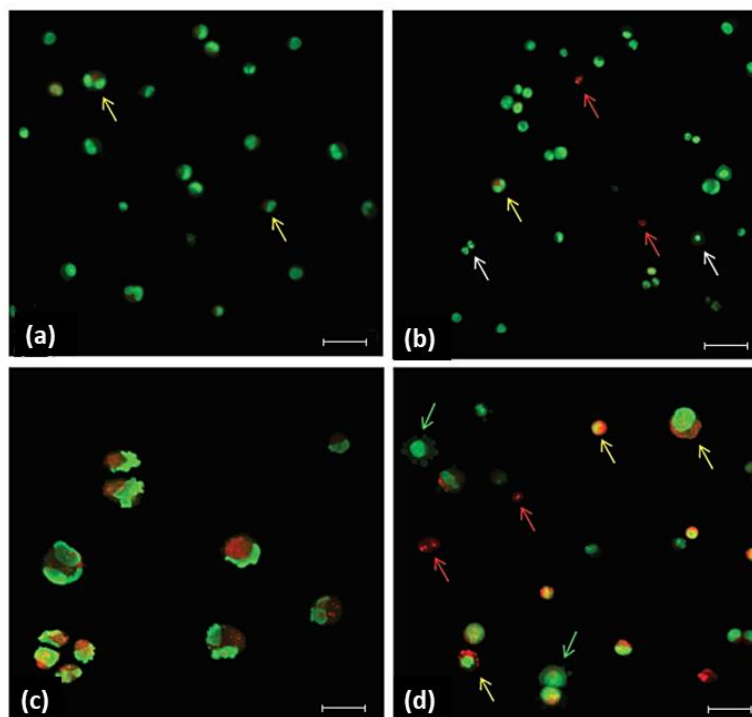
Slika 44. Vijabilnost HeLa ćelija nakon 1 h inkubacije s TiO₂ NČ, N-TiO₂ i C-TiO₂ NČ (predstavljene su konačne koncentracije u medijumu). Nakon inkubacije, ćelije su zračene plavim svetlom (400-450 nm, 120 μW) u trajanju od 15 min. Vijabilnost je određena pomoću SRB testa. Podaci su analizirani korišćenjem jednofaktorskog ANOVA i Tukey testa. “**“ označava statistički značajne razlike u poređenju s netretiranim ćelijama (kontrolom) – $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) i $p < 0,0001$ (****). Vrednost kontrole je uzeta kao arbitrarna vrednost od 100 %.

Kako je kombinovani tretman HeLa ćelija C-TiO₂ NČ i plavim svetlom pokazao značajnu fotocitotoksičnost, ispitali smo detaljnije mehanizme ćelijske smrti koje ovakav tretman indukuje. S tim ciljem, HeLa ćelije su posmatrane pomoću fluorescentnog mikroskopa nakon primene odgovarajućeg fluorohroma (PI i AO). Na ovaj način omogućena je detekcija ćelijskih promena koje su karakteristične za programirane ćelijske smrti apoptozu i autofagiju, što je omogućilo vizuelno razlikovanje netretiranih (Slika 45 (a)) i tretiranih ćelija (C-TiO₂ NČ, plavo svetlo i kombinacija C-TiO₂ NČ + plavo svetlo, Slika 45 (b), (c) i (d), redom navedeno). Kontrolne, netretirane ćelije pokazuju zdravu ćelijsku morfologiju i veličinu ćelije ($9,4 \pm 0,4$

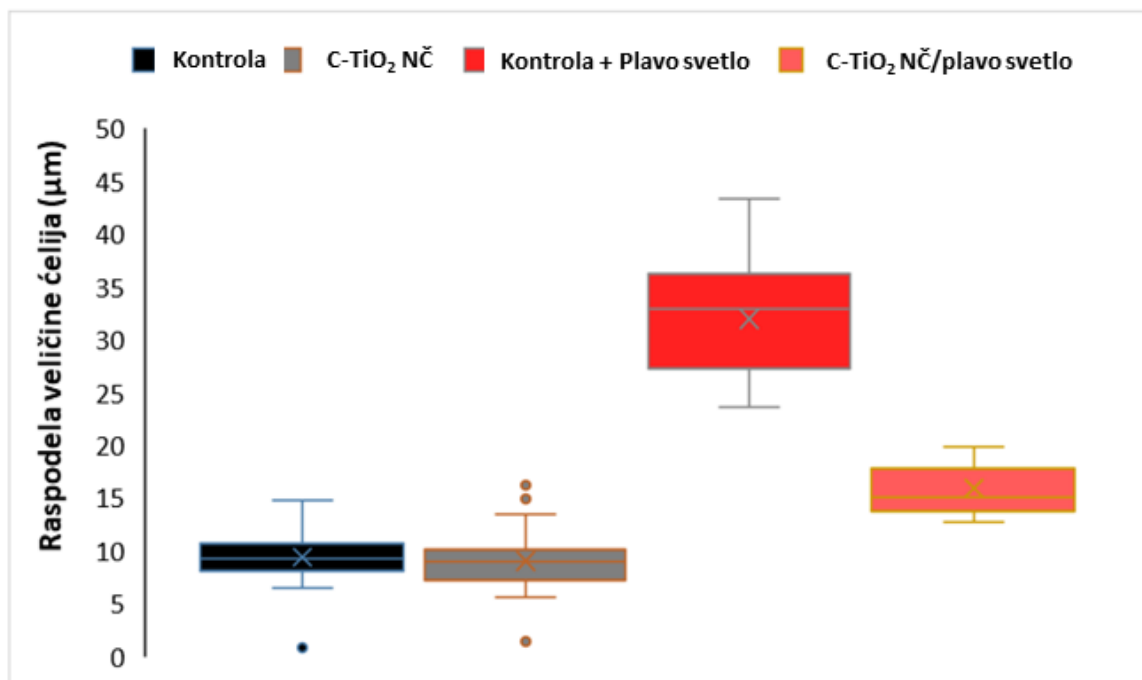
mm) (Slika 46) a formirane citoplazmatske vezikule – autofagozomi i autofagolizozomi su zapažene u malom procentu (oko 5 %, Slika 47) i verovatno su posledica autofagije na bazalnom nivou opisane u HeLa ćelijama.^[209] Nakon tretmana C-TiO₂ NČ, detektovano je 2,9 % ranih (zeleno obojene ćelije s kondenzovanim jezgrima) i 6,7 % kasnih apoptičnih ćelija (crvenih smanjenih ćelija s kondenzovanim jezgrima i poremećenom morfologijom) prosečne veličine $9,0 \pm 0,5 \mu\text{m}$ (Slika 45 (b), Slika 46, Slika 47) što nije predstavljalo značajne razlike u odnosu na kontrolne ćelije. Ćelije tretirane plavim svetlom su velike s deformisanim jezgrima ($32 \pm 1 \mu\text{m}$, Slika 46), nabubrenom citoplazmom i ćelijskom membranom (Slika 45 (c)). Ovo ukazuje na nekrozu s velikim brojem citoplazmatskih vezikula (32,6 %, Slika 47), što sugerise aktivaciju citoprotektivne autofagije i povećane proizvodnje RKV.^[50,210] Prethodna istraživanja su pokazala da povećana proizvodnja RKV oštećuje organele, te ćelija kao odgovor na preživljavanje pokreće proces autofagije. Kao što smo napomenuli u potpoglavlju 2.3.3., autofagijom se recikliraju oštećene organele i unutarćelijski biomolekuli nastali kao odgovor na stres kako bi se izbegla apoptoza. Međutim, kada oštećenja ćelija postanu značajna, indukuje se apoptoza u apoptotski-kompetentnim ćelijama, dok se kod ostalih ćelija indukuje nekroza.^[211] *Oh* i sar.^[203] su pokazali da zračenje plavim LED svetlom dovodi do ćelijske smrti posredstvom metaboličkih puteva u mitohondrijama koji su povezani s autofagijom i povećanim nivoima unutarćelijskog Ca²⁺.

Kombinovani tretman C-TiO₂ NČ i plavim svetlom (Slika 45 (d)) izazvao je porast broja ćelija s autofagozomima i autofagolizozomima na 36,4 % (žute strelice), što ukazuje na aktiviranje autofagije. Zapaženi su i značajni udeli drugih tipova ćelijske smrti, što je za ranu i kasnu apoptozu iznosilo 9,9 % i 19,0 % (Slika 47), redom navedeno.

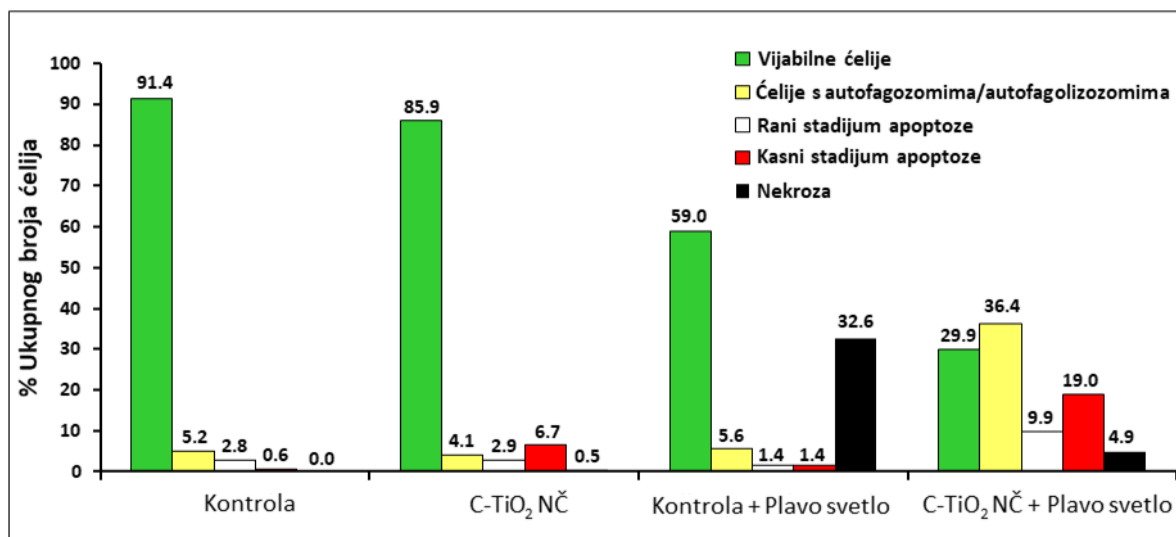
Značajno je istaći da je udeo nekrotičnih ćelija kod tretmana C-TiO₂ NČ i plavim svetlom od 4,9 % značajno niži u odnosu na tretman samo zračenjem (32,6 %), što sugerise prelazak na programiranu ćelijsku smrt. Prečnik ćelija tretiranih C-TiO₂ NČ i plavim svetlom takođe je bio manji ($15,9 \pm 0,4 \mu\text{m}$, Slika 46) u poređenju s ćelijama koje su samo zračene. Uzimajući u obzir da nekroza malignih ćelija uzrokuje neželjene efekte, kao što su inflamacija tkiva, progresija tumora i pojava metastaza, kombinacija C-TiO₂ NČ i plavog svetla osim što daje efikasniji rezultat u ubijanju tumorskih ćelija nego samo zračenje, takođe može da pruži bolji ishod terapije kancera.



Slika 45. Reprezentativne mikrografije HeLa ćelija obojenih s AO/PI: netretirane ćelije – zeleno obojene, uobičajena morfologija, žute strelice – ćelije s apoptotskim telima (a), ćelije tretirane C-TiO₂ NČ – bele i crvene strelice predstavljaju rane i kasne apoptozne ćelije (b); ćelije ozračene plavim svetlom (c) i ćelije tretirane C-TiO₂ NČ i plavim svetlom (d). Prikazani promer je 30 μm.



Slika 46. Raspodela veličine ćelija nakon primenjenih različitih tretmana C-TiO₂ NČ i/ili plavim svetlom.



Slika 47. Kvantifikacija obojenih HeLa ćelija s AO/PI prikazana kao procenat ćelija bez promena (netretirane ćelije), u ranom ili kasnom stadijumu apoptoze i nekrotičnih ćelija nakon tretmana C-TiO₂ NČ, plavim svetlom i nakon kombinovanog tretmana plavim svetlom i C-TiO₂ NČ.

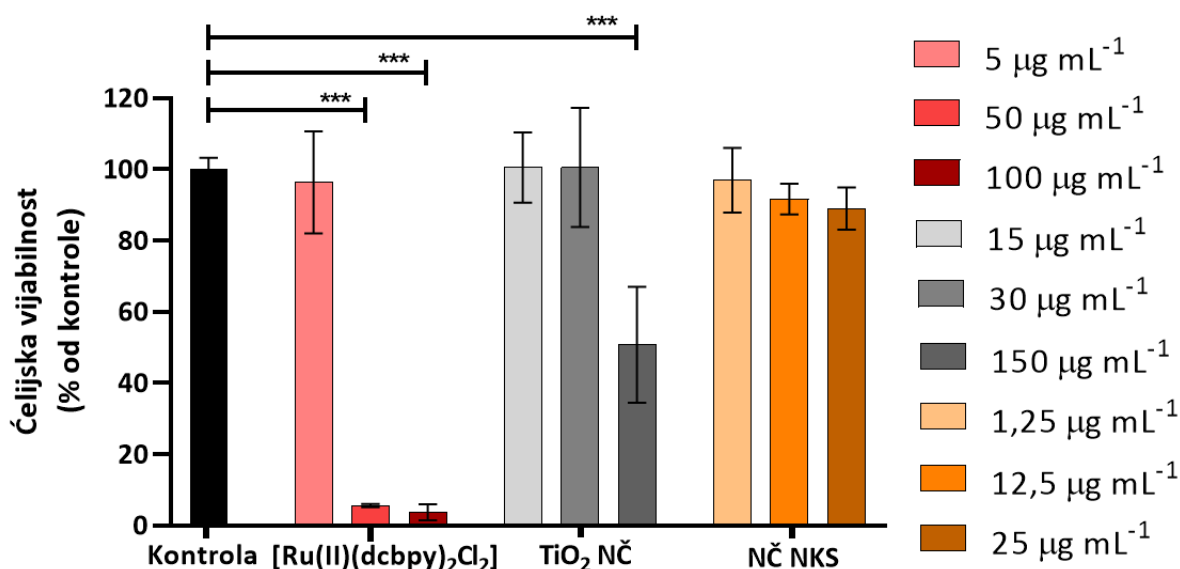
5.5.3. Citotoksična aktivnost nanokompozitnih sistema i njihovih komponenti

Citotoksični efekat kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] je pokazan u prethodnim istraživanjima,^[87] dok je za TiO₂ NČ stabilizovane na pH 7 i NČ NKS bilo potrebno utvrditi pri kojim koncentracijama tretmana u odsustvu svetlosti dolazi do značajne citotoksičnosti na ćelijskoj liniji HeLa. Na Slici 48 prikazana je vijabilnost ćelija utvrđena pomoću modifikovanog MTT testa nakon naznačenih tretmana.

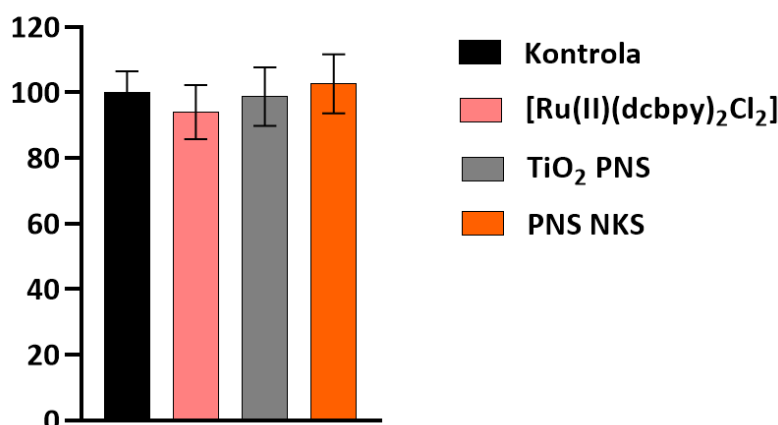
Kada je reč o efektu tretmana kompleksom [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] nakon inkubacije ćelija u trajanju od 48 h dobijeni rezultati su bili u skladu sa prethodnim istraživanjima, odnosno, kompleks je pokazao izraženu citotoksičnost na HeLa ćelijama za ispitane koncentracije veće od 50 μg mL⁻¹. Tretman koloidnom suspenzijom TiO₂ NČ od 150 μg mL⁻¹ je doveo do značajno nižeg stepena preživljavanja (52 %) nakon inkubacije od 48 h, dok tretmani nižim koncentracijama (30 i 15 μg mL⁻¹) nisu pokazali statistički značajnu promenu ćelijske vijabilnosti u odnosu na kontrolu. S druge strane, sve primenjene koncentracije tretmana ćelija NČ NKS, nisu dovele do statistički značajne citotoksičnosti, čime je pokazano da je ovaj sistem netoksičan u mraku pri navedenim koncentracijama na HeLa ćelijskoj liniji.

Daljim ispitivanjem citotoksičnog efekta drugačijeg NKS (PNS NKS, kao i kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂]) na HeLa ćelijskoj liniji, utvrđeno je da bez svetlosnog stimulansa ćelije dobro podnose izabrane koncentracije tretmana, tj. ni tretman PNS NKS, ni njegove komponente nisu dovele do statistički značajnog pada vijabilnosti (Slika 49). Ovi rezultati su

bili osnova za ispitivanje fotocitotoksičnosti PNS NKS koja su predstavljena u narednom potpoglavlju.



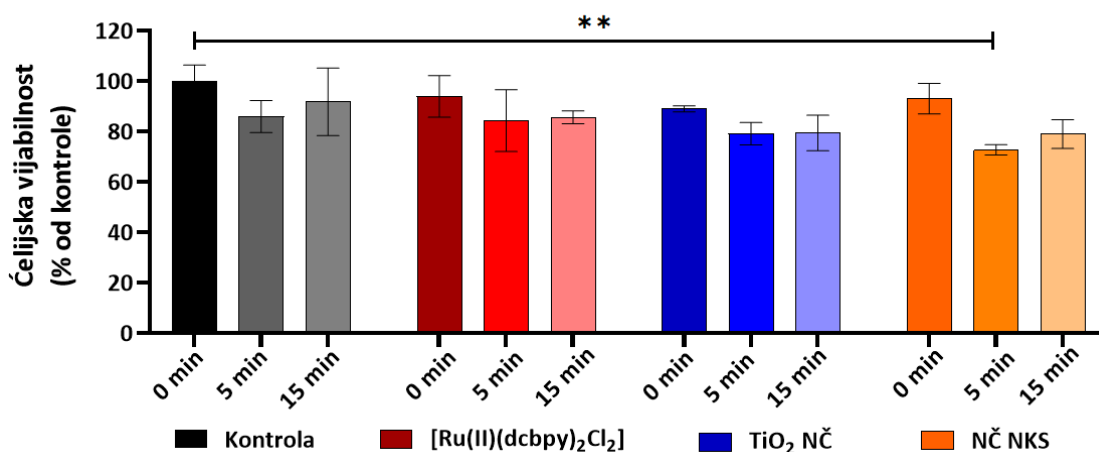
Slika 48. Efekat kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ (crvene kolone), TiO_2 NČ (sive kolone) i NČ NKS (narandžaste kolone) (predstavljene su konačne koncentracije u medijumu) na čelijsku vijabilnost nakon 48 h inkubacije utvrđen pomoću modifikovanog MTT testa na HeLa čelijskoj liniji. Podaci su analizirani korišćenjem jednofaktorskog ANOVA i Tukey testa. “***” označava statistički značajne razlike u poređenju s netretiranim čelijama (kontrolom) – $p < 0,001$ (***). Vrednost kontrole je uzeta kao arbitrarna vrednost od 100 %.



Slika 49. Efekat $5 \mu g mL^{-1}$ kompleksa $[Ru(II)(dcbpy)_2Cl_2]$ (crveni stubić), $70 \mu g mL^{-1}$ TiO_2 PNS (sivi stubić) i $5 \mu g mL^{-1}$ (u odnosu na kompleks) PNS NKS (narandžasti stubić) na čelijsku vijabilnost nakon 48 h inkubacije utvrđen pomoću SRB testa na HeLa čelijskoj liniji. Navedene se konačne koncentracije u medijumu. Podaci su analizirani korišćenjem jednofaktorskog ANOVA i Tukey testa. Vrednost kontrole je uzeta kao arbitrarna vrednost od 100 %.

5.5.3.1. Fotocitotoksična aktivnost nanokompozitnog sistema i njegovih komponenti

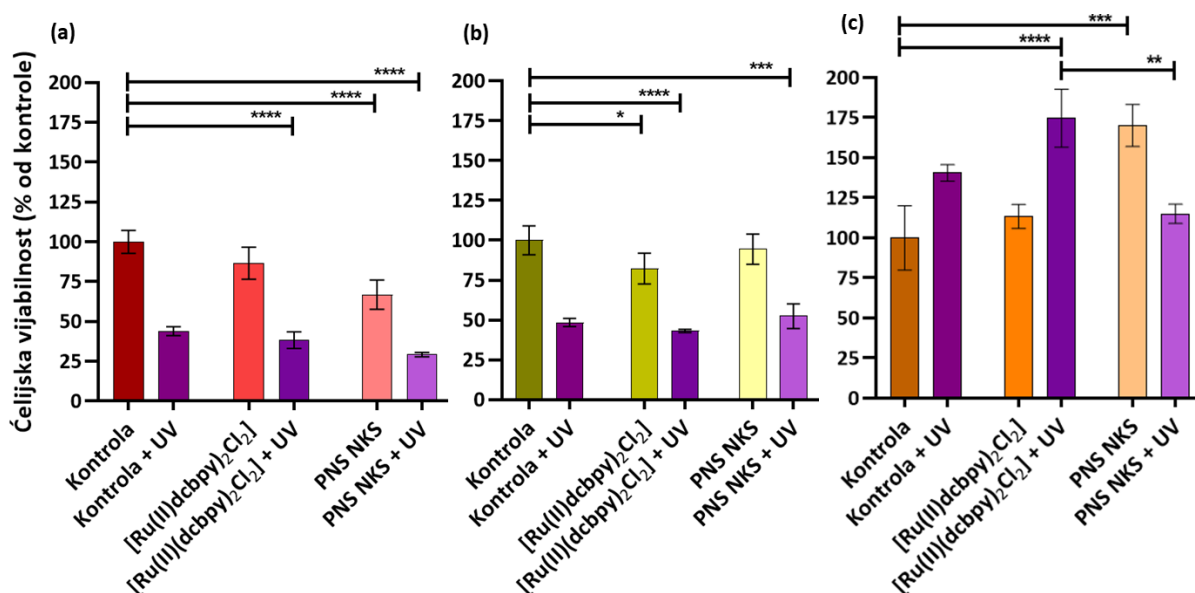
Fotocitotoksična aktivnost NKS i njihovih komponenti je ispitana i poređena s citotoksičnim efektom dobijenim bez zračenja i zračenom kontrolom. Najpre, uticaj kombinovanog tretmana zračenjem pomoću LED lampe na vijabilnost HeLa ćelijske linije ispitan je nakon inkubacije s prethodno utvrđenim koncentracijama NČ NKS i njegovim komponentama – kompleksom $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ i TiO_2 NČ, koje nisu dovodile do statistički značajne citotoksičnosti. Hladno-belo LED svetlo je izabrano uzimajući u obzir da njegov spektar u odnosu na sijalicu s užarenim vlaknom ima više intenzitete zračenja u početnom delu vidljivog spektra (400-500 nm), gde NČ NKS apsorbuje svetlost prema rezultatima predstavljenim u potpoglavlju 5.2.1. Vijabilnost tretiranih i netretiranih ćelija, nakon zračenja u trajanju od 5 i 15 min (50 mW) prikazana je na Slici 50.



Slika 50. Vijabilnost HeLa ćelija nakon 2 h inkubacije s $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ kompleksa $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$ (crveni stubići), $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ TiO_2 NČ (plavi stubići) i $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ NČ NKS u odnosu na kompleks (narandžasti stubići). Prikazane su konačne koncentracije u medijumu. Nakon inkubacije, ćelije su zračene LED svetlom (350 nm, 50 mW) u trajanju od 5 i 15 min (0 min je za tretmane bez zračenja). Vijabilnost je određena pomoću SRB testa. Podaci su analizirani korišćenjem jednofaktorskog ANOVA i Tukey testa. “**“ označava statistički značajne razlike u poređenju s netretiranim ćelijama (kontrolom) – $p < 0,01$ (**). Vrednost kontrole je uzeta kao arbitrarna vrednost od 100 %.

Uprkos očekivanom efektu da korišćeno LED svetlo može da pobudi elektrone iz PZ TiO_2 , i samim tim da izazove citotoksični efekat na ćelije, tretman TiO_2 NČ i svetlom nije doveo do statistički značajnog pada vijabilnosti u odnosu na zračene kontrole (zračene, netretirane ćelije). Odsustvo efekta zračenja je izostalo i u slučaju tretmana kompleksom $[\text{Ru}(\text{II})(\text{dcbpy})_2\text{Cl}_2]$. Zabeležen je jedino statistički značajan udruženi efekat na vijabilnost nakon tretmana NČ NKS i LED zračenjem u trajanju od 5 min u odnosu na kontrolu (nezračene, netretirane ćelije).

Ispitivanjem oksidativne aktivnosti koja je detaljno opisana u narednom poglavlju utvrđena je izražena fotoaktivnost TiO₂ PNS nakon ozračivanja UV svetlom, te je ispitan i kombinovani efekat ozračivanja UV svetlom i tretmana PNS NKS na ćelijske kulture transformisanih ćelija. Ćelijske linije karcinoma (A375, SKBR3 i PANC-1) na kojima je prethodno testirana fotocitotoksičnost TiO₂ PNS pomoću SRB testa, su u ovom eksperimentu tretirane PNS NKS i kompleksom [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂], a zatim su inkubirane tokom 24 h. Nakon inkubacije, ćelije su zračene UV svetlom u trajanju od 5 min (254 nm, 600μW). Na Slici 51 prikazane su rezultujuće vijabilnosti nakon tretmana i tretmana sa zračenjem u odnosu na kontrolu (netretirane i nezračene ćelije).



Slika 51. Efekat nakon 24 h inkubacije s $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ i $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ PNS NKS u odnosu na kompleks (navedene su konačne koncentracije u medijumu) i zračenja UV svetlom na vijabilnost ćelijskih linija (a) A375; (b) SKBR3; (c) PANC-1. Vijabilnost je određena pomoću SRB testa. Podaci su analizirani korišćenjem jednofaktorskog ANOVA i Tukey testa. “*” označava statistički značajne razlike u poređenju s netretiranim ćelijama (kontrolom) – $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), za $p < 0,001$ (***) i za $p < 0,0001$ (****). Vrednost kontrole je uzeta kao arbitrarna vrednost od 100 %.

Nakon tretmana ćelijske linije A375 kompleksom $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ nije došlo do značajnog smanjenja stepena preživljavanja. S druge strane, tretman PNS NKS je uzrokovao značajan pad vijabilnosti ćelijske linije A375 (Slika 51 (a)). Sama UV svetlost je proizvela značajni fotocitotoksični efekat, a vijabilnost ćelija je pala na oko 29 % nakon kombinovanog tretmana PNS NKS i UV svetlom ($p < 0,0001$ za sve uzorke ozračene UV svetlom u odnosu na kontrolu). Međutim, posmatrajući kontrolu + UV, kombinovani tretman s UV svetlom nije pokazao statistički značajan citotoksični efekat (manje od 50 %; $p < 0,001$) pa se rezultat kombinovanog tretmana može pripisati samom efektu UV zračenja.

Značajan citotoksični efekat na ćelijskoj liniji SKRB3 pokazao je samo tretman kompleksom $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ (Slika 51 (b)), dok je nakon ozračivanja UV svetlom uočen sličan efekat kao i kod linije A375 – samo UV zračenje je značajno uticalo na smanjenje stepena preživljavanja, a kombinovani tretmani nisu imali dodatno povećan citotoksični efekat, što upućuje da su primenjeni uslovi neprikladni za FDT.

Poput ispitivanja fotocitotoksičnosti TiO_2 PNS i PNS NKS je na ćelijskoj liniji PANC-1 pokazao sasvim drugačiji trend (Slika 51 (c)). Naime, tretman PNS NKS je podstakao progresivni rast ćelija ($p < 0,001$), a sličan trend je nastavljen i nakon zračenja UV svetlom. Preciznije, samo UV zračenje je značajno podstaklo rast ćelija ($p < 0,05$ za kontrola + UV u odnosu na kontrolu), dok je kombinovani tretman UV svetlom i kompleksom $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ podstakao najveći rast, od preko 174 %. Pored zapažene stimulacije rasta, nije zapažen značajni efekat kombinovanog tretmana u odnosu na kontrola + UV.

5.6. Oksidativna aktivnost modifikovanih nanostrukturnih TiO_2

Imajući u vidu da različite modifikacije nanostrukturnih TiO_2 mogu da utiču na optičke osobine i time posredno na oksidativnu aktivnost, za nanostrukturne TiO_2 korišćena je EPR tehnika za detekciju proizvodnje RKV. EPR tehniku u odnosu na ostale spektroskopske metode izdvaja specifičnost koja omogućava otkrivanje paramagnetnih vrsta čak i pri veoma niskim koncentracijama. S obzirom da RKV sadrže nesparene elektrone, te su samim tim paramagnetici, EPR predstavlja jedinstvenu metodu kojom je moguće detektovati i kvantifikovati njihov pojedinačni sadržaj. S druge strane, uzimajući u obzir da su RKV kratkog vremena polu-života (Tabela 3), te da ih je nemoguće detektovati u izvornom obliku, za detekciju RKV indukovanih zračenjem nanostrukturnog TiO_2 primenjena je njihova stabilizacija odgovarajućim *spinskim hvatačem*^l.

Stvaranje određene radikalske vrste zavisi od mnogih faktora, a da bi bili korisni kao FS, nanostrukturni TiO_2 bi trebalo da katalizuje proizvodnju RKV nakon ozračivanja svetlom. Poznato je da UV zračenje TiO_2 stvara $\text{O}_2^{\cdot-}$ koji igra važnu ulogu u biološkim procesima i složenim hemijskim reakcijama.^[212] Brojne studije su potvrdile pored ili umesto $\text{O}_2^{\cdot-}$, prisustvo i drugih radikalskih vrsta.^[212–214] Stoga, za očekivane RKV, kao spinski hvatač upotrebljen je DEPMPO uzimajući u obzir njegovu selektivnost ka $\text{O}_2^{\cdot-}$ i $\cdot\text{OH}$, kao i dobru stabilnost i dugo

^l Spinski hvatač (engl. *spin trap*) je dijamagnetna supstanca koja reaguje s radikalskim vrstama formirajući radikal (adukt) koji je stabilniji u odnosu na polaznu radikalsku vrstu.

vreme polu-života stvorenih spin adukata (17 i 132 minuta za adukte s $O_2^{\cdot-}$ i $\cdot OH$, redom navedeno).^[215,216] Dodatno, pri snimanju EPR spektara vodenih suspenzija TiO_2 NČ, TiO_2 PNS, C i N- TiO_2 NČ sa spinskim hvatačem DEPMPO, primenjeni su neki od sledećih uslova:

- Izlaganje suspenzije UV svetlosti u trajanju od 2 minuta neposredno pre snimanja spektara;
- Kontinualno izlaganje suspenzije vidljivoj svetlosti (400-450 nm; 120 μW) istovremeno s akumulacijom spektara;
- Snimanjem suspenzija u odsustvu svetlosti (u mraku) – kontrolni spektar.

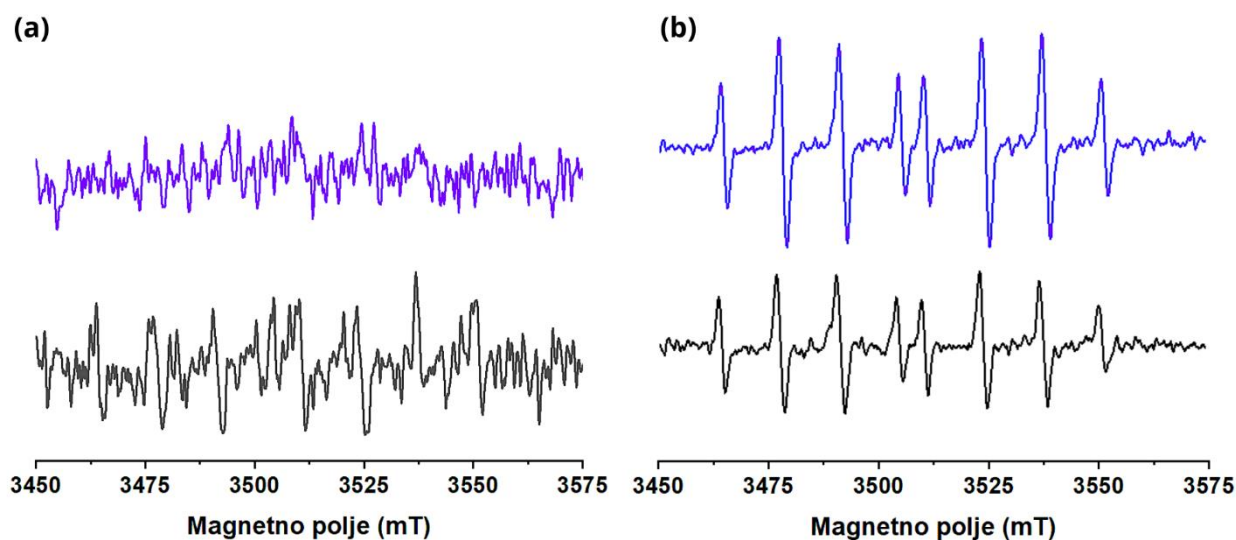
5.6.1. Oksidativna aktivnost nanočestica i prolatnih nanosferoida TiO_2

U poglavlju 2.4. je istaknuto da anatas kristalna forma ima najveću foto-aktivnost u poređenju s drugim kristalnim formama koja se ispoljava u UV oblasti. Kako se sintezom TiO_2 NČ i TiO_2 PNS zadržava anatas kristalna forma polaznog TiO_2 ,^[169] bilo je potrebno potvrditi njihovu oksidativnu aktivnost.

Suspenzije koje sadrže TiO_2 NČ ili TiO_2 PNS sa spinskim hvatačem DEPMPO su izložene UV svetlu u trajanju od 2 minuta neposredno pre snimanja. Iste suspenzije su snimane bez prethodnog zračenja, u odsustvu svetlosti. Na ovaj način dobijeni su EPR signali prikazani na Slici 52. Dok u slučaju suspenzije TiO_2 NČ nisu detektovane RKV (Slika 52 (a)), EPR spektri TiO_2 PNS nedvosmisleno pokazuju prisustvo radikalskog adukta DEPMPO/OH kako u ozračenim i tako i u neozračenim probama (Slika 52 (b)). Prisustvo $\cdot OH$ u ozračenom uzorku je očekivano, s obzirom da TiO_2 apsorbuje u UV oblasti. Važno je napomenuti da ovom prilikom nisu detektovane druge RKV (na prvom mestu $O_2^{\cdot-}$), čije odsustvo je verovatno posledica lančanih reakcija oksidacije i redukcije u kojima prelazni radikalski oblici na kraju opet daju $\cdot OH$. Naime, u reakcijama TiO_2 učestvuju i elektroni i pozitivne šupljine, tako da pozitivne šupljine oksiduju molekul vode do $\cdot OH$, dok elektroni redukuju molekulski kiseonik $O_2^{\cdot-}$. Nastali $O_2^{\cdot-}$ učestvuje u daljim reakcijama i preko formiranog hidroperoksidnog radikala (HO_2^{\cdot}) i vodonik-peroksida daje opet $\cdot OH$ (Slika 30). S druge strane, prisustvo $\cdot OH$ u mraku otkriva mogućnost spontanog aktiviranja TiO_2 PNS.

Ova pojava je retko proučavana u literaturi, kako su glavna istraživanja u ovoj oblasti fokusirana na fotokatalitička svojstva TiO_2 , te je proizvodnja RKV u mraku opisana u samo nekoliko bioloških studija.^[217-219] Obimniju studiju su uradili *Jaiaram* i sar.^[220] u kojoj su pokazali da nanočestice TiO_2 , bilo u obliku poluprovodnika ili aditiva za prehrambenu industriju, proizvode niske koncentracije RKV u mraku što su doveli u vezu s kiseoničnim i

drugim šupljinama na površini nanostrukturnih TiO₂. Iako su TiO₂ PNS pokazali da takođe katalizuju proizvodnju [•]OH u mraku, nakon osvetljenja UV svetlom koncentracija dobijenog [•]OH je bila veća dva puta, (Slika 52 (b)). Dodatno, uzimajući u obzir da su merenja vršena u atmosferi vazduha i nisu postignuti potpuno mračni uslovi, moguće je da na pojavu određene količine [•]OH u neozračenim probama uticalo prisustvo molekularnog O₂ i slabog pozadinskog dnevnog svetla koje sadrži UV komponentu.



Slika 52. EPR spektri [•]OH-spin adukta DEPMPO u prisustvu TiO₂ NČ (a) i TiO₂ PNS (b) dobijeni u mraku (crna linija) i nakon 2 min ozračivanja UV svetlom (ljubičasta linija).

Dobijeni rezultati sugerišu da ukoliko se TiO₂ PNS primene u dovoljnim količinama, mogu da deluju kao FS i da uz svetlosnu stimulaciju oštete biomolekule u dovoljnom obimu da dovedu do ćelijske smrti. Mogući biološki put citotoksičnog delovanja TiO₂ PNS je stoga u vezi s povećanom proizvodnjom [•]OH koja dovodi do peroksidacije lipidnih membrana i direktnog oštećenja proteina.

S druge strane, TiO₂ NČ nisu dale signale koji odgovaraju ni jednoj radikalskoj vrsti, ni u mraku a ni prilikom ozračivanja UV svetlom što je u skladu s rezultatima fotocitotoksičnosti o kojima je bilo reči u potpoglavlju 5.5.1.1.

5.6.2. Oksidativna aktivnost dopiranih TiO₂ nanočestica

U okviru istraživanja ove disertacije, proverena je oksidativna aktivnost C i N-TiO₂ NČ pomoću EPR tehnike. U potpoglavlju 5.2.2. prikazano je da se dopiranjem TiO₂ uspešno pomeraju apsorpcioni maksimum dopiranih TiO₂ vrsta iz UV ka vidljivoj oblasti. Stoga je moguća pojava hiperprodukcije RKV za C i N-TiO₂ NČ ispitana delovanjem vidljive svetlosti.

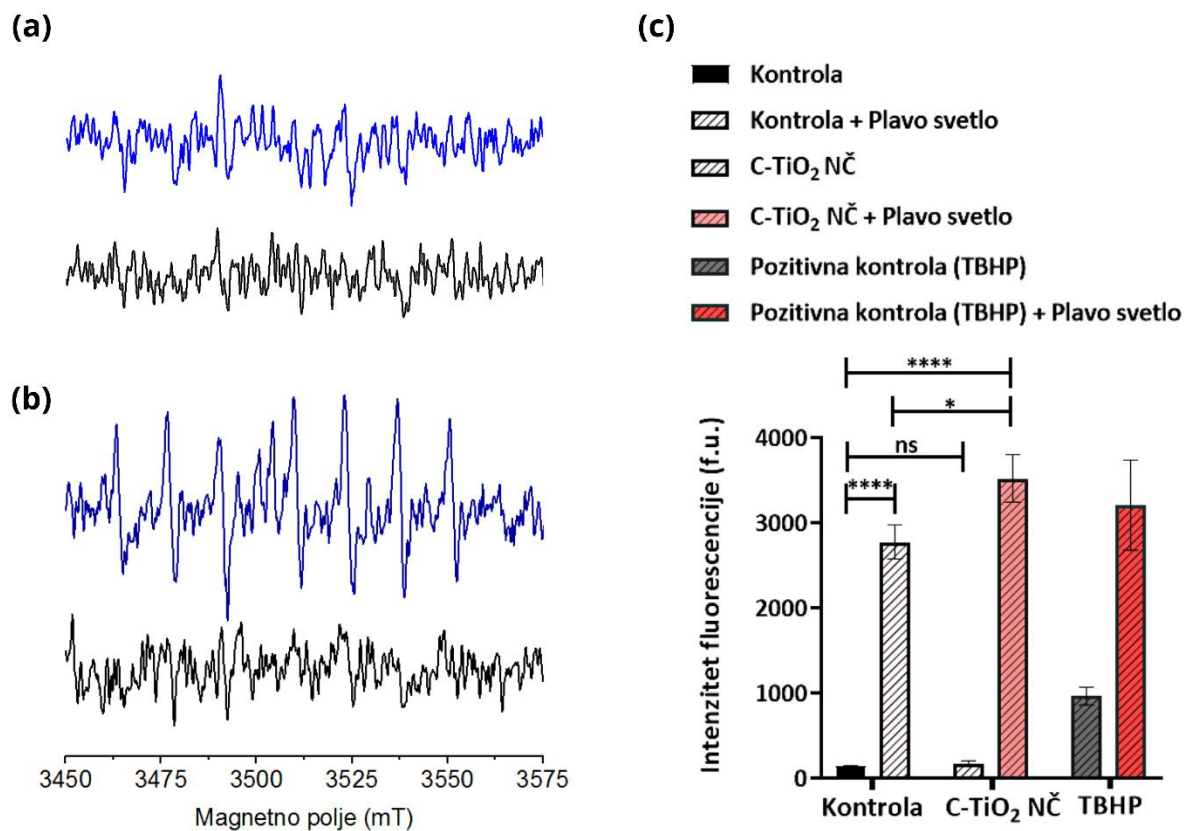
Ispitivane N-TiO₂ NČ nisu dale signale koji odgovaraju bilo kojoj vrsti slobodnih radikala, ni u mraku a ni prilikom ozračivanja vidljivim svetlom (Slika 53 (a)). Ovi rezultati su saglasni s rezultatima datim u potpoglavlju 5.5.2.1 koji ukazuju da kombinovani tretman ćelija s N-TiO₂ NČ i vidljivim svetlom ne uzrokuje značajnu citotoksičnost.

U slučaju ispitivanih C-TiO₂ NČ dobijen je karakteristični signal s osam linija DEPMPO/OH adukta (Slika 53 (b)), koji je potvrdio stvaranje [•]OH radikala. Iako je jasno uočljiv karakteristični EPR signal DEPMPO/OH adukta, važno je napomenuti da je on bio značajno manje izražen nego kod TiO₂ PNS (Slika 52 (b)). S druge strane, ovaj signal nije dobijen snimanjem kontrolne suspenzije C-TiO₂ NČ i DEPMPO spinskih adukata, tj. snimanjem u odsustvu svetlosti. Nastanak RKV se smatra glavnim uzrokom ćelijske smrti pri njihovoj interakciji s različitim nanočesticama.^[187] Kako je već napomenuto u potpoglavlju 2.4.2., [•]OH radikal je u najvećoj meri odgovoran za citotoksični efekat kod aerobnih organizama usled visoke reaktivnosti i najvećeg jedno-elektronskog potencijala redukcije.^[221] Dobijeni rezultat je potvrda da je upravo foto-stimulisana oksidativna aktivnost C-TiO₂ NČ uzrok fotocitotoksičnog efekta kombinovanog tretmana C-TiO₂ NČ i vidljivim svetlom.

Foto-stimulisana oksidativna aktivnost C-TiO₂ NČ je dodatno potvrđena u ćelijskoj kulturi spektrofotometrijski pomoću fluorescentne probe DCFH-DA. Ova metoda ima nizak prag detekcije ukupnih RKV, te iako ne detektuje specifične RKV, pruža značajne informacije o oksidativnoj aktivnosti materijala.

Za procenu stvaranja RKV unutar ćelija, nefluorescentni DCFH-DA je inkubiran s HeLa ćelijama uz kombinovani tretman C-TiO₂ NČ i plavim svetlom (450 nm, 120 μW). DCFH-DA lako difunduje kroz ćelijsku membranu, nakon čega se hidrolizuje unutarćelijskim esterazama do takođe nefluorescentnog 2',7'- dihlorodihidrofluoresceina (DCFH₂). Peroksidaze, citohrom c i Fe²⁺ mogu da oksiduju H₂DCFDA do veoma fluorescentnog 2',7'- dihlorofluoresceina (DCF) u prisustvu vodonik peroksidaza. Akumulacija DCF unutar ćelija se može meriti povećanjem fluorescencije na 530 nm, kada se uzorak pobudi na 485 nm. Intenzitet fluorescencije DCF je proporcionalan količini RKV formiranih unutar ćelije. Na Slici 53 pokazano je da kombinovani tretman plavim svetlom i C-TiO₂ NČ dovodi do značajne unutarćelijske proizvodnje RKV koja je bliska osvetljenoj pozitivnoj kontroli (TBHP + Plavo svetlo). Kod tretmana samim C-TiO₂ NČ, izmereni nivoi RKV su bliski nivoima kontrole bez ozračivanja (Slika 53 (c)), što dokazuje da C-TiO₂ NČ ne stimulišu unutarćelijsku proizvodnju RKV u mraku. S druge strane, primenjeno vidljivo svetlo takođe prouzrokuje unutarćelijsku proizvodnju RKV čiji je efekat manje izražen. Na ovaj način su dodatno potvrđeni rezultati

dobijeni pomoću EPR spektroskopije. Potvrda oksidativne aktivnosti C-TiO₂ NČ je u saglasnosti i s rezultatima citotoksičnosti i fotocitotoksičnosti.



Slika 53. EPR spektar ^{*}OH-spin adukta DEPMPO u prisustvu N-TiO₂ NČ (a) i C-TiO₂ NČ (b) dobijen u mraku (crna linija), tokom kontinualnog ozračivanja vidljivim svetlom (plava linija); Unutarćelijska proizvodnja RKV vrsta procenjena pomoću fluorometrijskog testa (c). Vrednost fluorescencije u ćelijama HeLa tretiranih C-TiO₂ NČ i plavim svetlom upoređena je s vrednostima u kontroli, osvetljenoj kontroli i ćelijama tretiranim C-TiO₂ NČ. TBHP je pozitivna kontrola. Podaci su analizirani pomoću jednofaktorskog ANOVA i Tukey testa i smatrani su statistički bez značaja (engl non significant, ns) za $p \geq 0,05$, a statistički značajnim za $p < 0,05$ (*) i $p < 0,0001$ (****).

6. ZAKLJUČAK

Dobijeni rezultati u okviru disertacije ukazuju na uspešno formiranje nanokompozitnih sistema od $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ kompleksa s koloidnim TiO_2 nanočesticama i TiO_2 prolatnim nanosferoidima, dok je utvrđeno da se za nanočestice TiO_2 dopirane azotom i ugljenikom ovaj kompleks ne vezuje. Međutim, pored uspešne sinteze i karakterizacije formirani nanokompozitni sistemi nisu dali zadovoljavajuću fotocitotoksičnost na testiranim tumorskim linijama uz primenu UV i vidljive svetlosti kao stimulansa za fotodinamičku terapiju. Kao uspešne fotoaktivne supstance izdvojile su se TiO_2 nanočestice dopirane ugljenikom koje su pokazale izrazitu fotocitotoksičnu aktivnost primenom plavog zračenja i time visok potencijal za primenu u fotodinamičkoj terapiji raka grlića materice.

Detaljnije, pojedinačni zaključci su sledeći:

- ❖ Za sve vrste ispitivanih nanostrukturnih TiO_2 utvrđena je anatas kristalna forma, koja je ujedno i najviše fotoaktivna, kao i sledeći oblici i veličine čestica:
 - Koloidne nanočestice TiO_2 su sfernog oblika, prosečne veličine oko 5 nm
 - Prolatni nanosferoidi TiO_2 su elipsastog oblika, raspona veličine 72-104 nm, s malim brojem agregata veličine od 380 nm
 - Koloidne nanočestice TiO_2 dopirane azotom su sfernog oblika, raspona veličine 5-10 nm
 - Koloidne nanočestice TiO_2 dopirane ugljenikom su sfernog oblika, raspona veličine 5-15 nm.
- ❖ Formiranje nanokompozitnog sistema se ostvaruje uspostavljanjem bidentatnog tipa vezivanja kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ za koloidne TiO_2 nanočestice kada se primeni 30 % kompleksa, odnosno monodentatnim tipom vezivanja kada je procenat kompleksa 15 i 20 %.
- ❖ Ispitivanjem optičkih svojstava nanokompozitnog sistema je pokazano da vezivanjem kompleksa $[\text{Ru(II)(dcbpy)}_2\text{Cl}_2]$ s nanostrukturnim TiO_2 dolazi do njegovog suženja njegovog energetskog procepa i da formirani nanokompozitni sistem postaje aktivan i u vidljivoj oblasti elektromagnetnog spektra. Takođe, za dopirane TiO_2 nanočestice pokazano je da dopiranje značajno utiče na promenu energetske strukture kristalne rešetke i da dolazi do pomeranja apsorpcionog maksimuma iz UV u vidljivu oblast. Ova osobina omogućava da se dopirane TiO_2 nanočestice dalje posmatraju kao fotoosetljive supstance koje

predstavljaju jednu od tri elementa fotodinamičke terapije (uz slobodni kiseonik i svetlosni stimulans).

- ❖ Dobijeni profili otpuštanja nanokompozitnog sistema s koloidnim TiO₂ nanočesticama ukazuju da u slučaju slabo kiselog medijuma koje simulira uslove u tumorskom tkivu dolazi do produženog tj. usporenog otpuštanja potencijalnog leka – kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] s nosača u poređenju s difuzijom slobodnog kompleksa kroz membranu na pH 7 koji simulira uslove zdravog tkiva. Primena UV i vidljivog zračenja nije izazvala promene u profilu otpuštanja kompleksa s nanokompozitnog sistema na pH 5. Iako je postepeno oslobađanje medikamenta s nosača poželjna osobina, nemogućnost kontrole brzine otpuštanja nije dobra karakteristika za primenu u fotodinamičkoj terapiji. S druge strane, profili otpuštanja u pH neutralnom medijumu koji simulira fiziološke uslove u zdravom tkivu pokazuju slične profile za otpuštanja u odsustvu svetlosti i pri dejstvu UV svetlosti, dok u slučaju vidljive svetlosti dolazi do dodatnog usporenja u brzini otpuštanja (za 28 h otpusti se oko 50 % kompleksa). Ova osobina ostavlja mogućnost kontrole otpuštanja potencijalnog citostatika pre akumulacije u obolelom tkivu, čime se sprečavaju njegova neželjena dejstva na zdravo tkivo. Na ovaj način dobijeni rezultati ukazuju na izuzetnu stabilnost formiranog sistema, a u skladu su i s rezultatima sedimentacionog eseja.
- ❖ Dodatna inkapsulacija nanokompozitnog sistema u male unilamelarne vezikule doprinela je stabilnosti sistema i produženom otpuštanju kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] što predstavlja prednost u kliničkoj praksi jer obezbeđuje veću efikasnost terapije. Međutim, fosfolipidni dvosloj koji oblaže nanokompozitni sistem osim što dodatno usporava otpuštanje kompleksa, apsorbuje primenjenu svetlost. Stoga, inkapsulirani sistem iako sprečava „curenje“ kompleksa u cirkulaciji nije pogodan za primenu u fotodinamičkoj terapiji bez dodatne modifikacije koja bi omogućila foto-indukovanu aktivaciju.
- ❖ Mikroskopska ispitivanja ćelijskog unosa pokazala su da se ispitivani nanostrukturni TiO₂ nalaze u većem delu u ćelijama, dok se u vanćelijskom prostoru zadržavaju njihovi agregati. U slučaju TiO₂ prolatnih nanosferoida čiji je oblik posebno pogodan za ulazak u ćelije, utvrđeno je njihovo prisustvo u jedru. Ova osobina je posebno pogodna, imajući u vidu da učinak fotodinamičke terapije ima izrazito lokalni karakter usled kratkog polu-života indukovanih radikalskih vrsta koji su osnova citotoksičnog delovanja fotoosetljive supstance. Oksidativna aktivnost utvrđena je za ovu vrstu čestica pomoću EPR spektroskopije, kojom je potvrđeno prisustvo [•]OH, najznačajnijeg radikala u fotodinamičkoj terapiji. Prisustvo ovog radikala je potvrđeno i kod TiO₂ nanočestica dopiranih ugljenikom, za koje je određena i ukupna količina reaktivnih kiseoničnih vrsta.

- ❖ Ispitivanja citotoksičnosti na različite ćelijske linije u odsustvu svetlosti potvrdila su za najveći deo ispitivanih koncentracija dobru biokompatibilnost nanokompozitnih sistema, njihovih komponenti i TiO₂ nanočestica dopiranih azotom i ugljenikom. Međutim, uprkos povoljnim optičkim i strukturnim osobinama, kao i citotoksičnoj aktivnosti pojedinačnih komponenti, fotocitotoksičnost nanokompozitnih sistema je bila ispod značajnih vrednosti, tj. nije postignut dobar učinak u smanjivanju vijabilnosti primenom kombinovanog tretmana s nanokompozitnim sistemima i vidljivim/UV svetlom. Stoga, može se izvesti zaključak da ispitivani nanokompozitni sistemi zahtevaju dodatnu modifikaciju da bi bili korišćeni kao sistemi citostatik-nosač u fotodinamičkoj terapiji.
- ❖ TiO₂ nanočestice dopirane ugljenikom su pokazale dobru fotocitotoksičnu aktivnost pri delovanju vidljivog svetla iz plave oblasti elektromagnetnog spektra na ćelijskoj liniji raka grlića materice, smanjujući stepen preživljavanja HeLa ćelija nakon kombinovanog tretmana ispod 40 %, što ih čini dobrim kandidatima za fotoosetljive supstance u fotodinamičkoj terapiji. Primenom kombinovanog tretmana nanočesticama TiO₂ dopiranim ugljenikom i plavim svetlom indukuju se mehanizmi programiranih oblika ćelijskih smrti, kao poželjnih vidova smrti koji dovode do suzbijanja tumora. Ovakav vid terapije bi bio moguć u praksi s obzirom na pristupačnost grlića materice i dostupnost optičkih vlakana za aktivaciju sistema u šupljini grlića. Dodatno, mogućnost daljih modifikacija kodopiranjem TiO₂ dopiranog ugljenikom otvara perspektivu za fino podešavanje uslova ozračivanja svetlom većih talasnih dužina za koje je potrebna manja energija za fotoaktivaciju s jedne strane, dok se s druge strane ostvaruje bolji učinak terapije usled dubljeg prodiranja svetlosti u tkivo.

LITERATURA

- [1] J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, D. M. Parkin, M. Piñeros, A. Znaor, F. Bray, *International Journal of Cancer* **2021**, *149*, 778.
- [2] L. Bai, C. Gao, Q. Liu, C. Yu, Z. Zhang, L. Cai, B. Yang, Y. Qian, J. Yang, X. Liao, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, *140*, 349.
- [3] C. Carvalho, R. Santos, S. Cardoso, S. Correia, P. Oliveira, M. Santos, P. Moreira, *Current Medicinal Chemistry* **2009**, *16*, 3267.
- [4] C. Dikken, J. Sitzia, *Journal of Clinical Nursing* **1998**, *7*, 371.
- [5] K. M. Islam, T. Anggondowati, P. E. Deviany, J. E. Ryan, A. Fetrick, D. Bagenda, M. S. Copur, A. Tolentino, I. Vaziri, H. A. McKean, S. Dunder, J. E. Gray, C. Huang, A. K. Ganti, *BMC Cancer* **2019**, *19*, 1.
- [6] C. L. Shapiro, A. Recht, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* **2009**, *344*, 1997.
- [7] S. M. Cohen, S. J. Lippard, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **2001**, *67*, 93.
- [8] T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, S. J. Lippard, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2015**, 373.
- [9] P. J. Dyson, G. Sava, *Dalton Transactions* **2006**, 1929.
- [10] J. Conde, G. Doria, P. Baptista, *Journal of Drug Delivery* **2012**, *2012*, 1.
- [11] C. Mari, G. Gasser, *CHIMIA International Journal for Chemistry* **2015**, *69*, 176.
- [12] M. Frezza, S. Hindo, D. Chen, A. Davenport, S. Schmitt, D. Tomco, Q. Ping Dou, *Current Pharmaceutical Design* **2010**, *16*, 1813.
- [13] A. Garoufis, S. K. Hadjidakou, N. Hadjiliadis, *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253*, 1384.
- [14] C. Mari, V. Pierroz, S. Ferrari, G. Gasser, *Chemical Science* **2015**, *6*, 2660.
- [15] E. Briones, C. Isabel Colino, J. M. Lanao, *Journal of Controlled Release* **2008**, *125*, 210.
- [16] W. J. Syu, H. P. Yu, C. Y. Hsu, Y. C. Rajan, Y. H. Hsu, Y. C. Chang, W. Y. Hsieh, C. H. Wang, P. S. Lai, *Small* **2012**, *8*, 2060.
- [17] D. Needham, G. Anyarambhatla, G. Kong, M. W. Dewhirst, *Cancer Research* **2000**, *60*, 1997.
- [18] G. Tiwari, R. Tiwari, S. Bannerjee, L. Bhati, S. Pandey, P. Pandey, B. Sriwastawa, *International Journal of Pharmaceutical Investigation* **2012**, *2*, 2.
- [19] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *Journal of Physics D: Applied Physics* **2003**, *36*, R167.
- [20] R. Singh, J. W. Lillard, *Experimental and Molecular Pathology* **2009**, *86*, 215.
- [21] J. A. Champion, Y. K. Katare, S. Mitragotri, *Journal of Controlled Release* **2007**, *121*, 3.
- [22] F. T. G. Bezerra, A. M. P. Dau, R. van den Hurk, J. R. V. Silva, *Domestic Animal Endocrinology* **2021**, *74*, 106485.
- [23] M. C. Garnett, P. Kallinteri, *Occupational Medicine* **2006**, *56*, 307.
- [24] W. H. Suh, Y. H. Suh, G. D. Stucky, *Nano Today* **2009**, *4*, 27.
- [25] S. Tortorella, T. C. Karagiannis, *The Journal of Membrane Biology* **2014**, *247*, 291.

- [26] R. Jahanban-Esfahlan, K. Seidi, B. Banimohamad-Shotorbani, A. Jahanban-Esfahlan, B. Yousefi, *Journal of Cellular Physiology* **2018**, 233, 2982.
- [27] J. Xie, X. Pan, M. Wang, L. Yao, X. Liang, J. Ma, Y. Fei, P.-N. Wang, L. Mi, *Nanomaterials* **2016**, 6, 113.
- [28] B. Taghizadeh, S. Taranejoo, S. A. Monemian, Z. S. Moghaddam, K. Daliri, H. Derakhshankhah, Z. Derakhshani, *Drug Delivery* **2015**, 22, 145.
- [29] X. Xie, Y. Zhang, F. Li, T. Lv, Z. Li, H. Chen, L. Jia, Y. Gao, *Current Cancer Drug Targets* **2018**, 19, 257.
- [30] V. M. Couto, M. J. Prieto, D. E. Igartúa, D. A. Feas, L. N. M. Ribeiro, C. M. G. Silva, S. R. Castro, V. A. Guilherme, D. D. Dantzger, D. Machado, S. del v. Alonso, E. de Paula, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2018**, 107, 2411.
- [31] H. Zhang, C. Wang, B. Chen, X. Wang, *International Journal of Nanomedicine* **2012**, 7, 235.
- [32] J. H. Lee, Y. Yeo, *Chemical Engineering Science* **2015**, 125, 75.
- [33] H. Huang, W. Feng, Y. Chen, J. Shi, *Nano Today* **2020**, 35, 100972.
- [34] R. A. Sperling, W. J. Parak, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2010**, 368, 1333.
- [35] P. Cherukuri, E. S. Glazer, S. A. Curley, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, 339.
- [36] M. Amiri, A. Akbari, M. Ahmadi, A. Pardakhti, M. Salavati-Niasari, *Journal of Molecular Liquids* **2017**, 249, 1151.
- [37] M. Radović, M. P. Calatayud, G. F. Goya, M. R. Ibarra, B. Antić, V. Spasojević, N. Nikolić, D. Janković, M. Mirković, S. Vranješ-Đurić, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2015**, 103, 126.
- [38] S. D. Brown, P. Nativo, J.-A. Smith, D. Stirling, P. R. Edwards, B. Venugopal, D. J. Flint, J. A. Plumb, D. Graham, N. J. Wheate, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132, 4678.
- [39] E. Tasciotti, X. Liu, R. Bhavane, K. Plant, A. D. Leonard, B. K. Price, M. M. C. Cheng, P. Decuzzi, J. M. Tour, F. Robertson, M. Ferrari, *Nature Nanotechnology* **2008**, 3, 151.
- [40] B. Almutairi, D. Ali, N. Alyami, N. S. Alothman, S. Alakhtani, S. Alarifi, *Journal of King Saud University - Science* **2021**, 33, 101546.
- [41] Z. Li, L. Mi, P. N. Wang, J. Y. Chen, *Nanoscale Research Letters* **2011**, 6, 1.
- [42] P. Khadka, J. Ro, H. Kim, I. Kim, J. T. Kim, H. Kim, J. M. Cho, G. Yun, J. Lee, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2014**, 9, 304.
- [43] L. E. Gerweck, K. SeethaRaman, *Cancer Research* **1996**, 56.
- [44] L. Miao, L. Huang, Springer, Cham, in *Exploring the Tumor Microenvironment with Nanoparticles* **2015**, pp. 193–226.
- [45] D. L. Sai, J. Lee, D. L. Nguyen, Y.-P. Kim, *Experimental & Molecular Medicine* **2021**, 53, 495.
- [46] A.-A. A Ali Azzwali, A. Elsayed Azab, *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering* **2019**, 6, 156.
- [47] R. Suomalainen, B. H. Robinson, *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics* **2001**, 106, 62.

- [48] Y. Gong, Z. Fan, G. Luo, C. Yang, Q. Huang, K. Fan, H. Cheng, K. Jin, Q. Ni, X. Yu, C. Liu, *Molecular Cancer* **2019**, *18*, 1.
- [49] K. Schlie, J. E. Spowart, L. R. K. Hughson, K. N. Townsend, J. J. Lum, *International Journal of Cell Biology* **2011**.
- [50] C. Fang, L. Gu, D. Smerin, S. Mao, X. Xiong, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, 2017.
- [51] B. H. Mahmoud, C. L. Hexsel, I. H. Hamzavi, H. W. Lim, *Photochemistry and Photobiology* **2008**, *84*, 450.
- [52] A. R. Young, *Physics in Medicine & Biology* **1997**, *42*, 789.
- [53] G. Zonios, J. Bykowski, N. Kollias, *Journal of Investigative Dermatology* **2001**, *117*, 1452.
- [54] Y. H. Chang, K. C. Huang, C. C. Yang, H. Y. Tsai, *ICNSC 2015 - 2015 IEEE 12th International Conference on Networking, Sensing and Control* **2015**, 394.
- [55] B. L. Diffey, I. E. Kochevar, *Photodermatology* **2007**, 15.
- [56] A. Kim, B. F. Chong, *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine* **2013**, *29*, 4.
- [57] S.-I. Moriwaki, J. Misawa, Y. Yoshinari, I. Yamada, M. Takigawa, Y. Tokura, *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* **2001**, *17*, 241.
- [58] D. J. Robinson, H. S. de Bruijn, N. van der Veen, M. R. Stringer, S. B. Brown, W. M. Star, *Photochemistry and Photobiology* **1998**, *67*, 140.
- [59] N. Siraj, P. E. Kolic, B. P. Regmi, I. M. Warner, *Chemistry - A European Journal* **2015**, *21*, 14440.
- [60] J. Kou, D. Dou, L. Yang, J. Kou, D. Dou, L. Yang, *Oncotarget* **2017**, *8*, 81591.
- [61] S. Kwiatkowski, B. Knap, D. Przystupski, J. Saczko, E. Kędzierska, K. Knap-Czop, J. Kotlińska, O. Michel, K. Kotowski, J. Kulbacka, *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2018**, *106*, 1098.
- [62] E. Brun, F. Barreau, G. Veronesi, B. Fayard, S. Sorieul, C. Chanéac, C. Carapito, T. Rabilloud, A. Mabondzo, N. Herlin-Boime, M. Carrière, *Particle and Fibre Toxicology* **2014**, *11*, 1.
- [63] R. A. McIntyre, *Science Progress* **2012**, *95*, 1.
- [64] A. Fujishima, R. X. Cai, J. Otsuki, K. Hashimoto, K. Itoh, T. Yamashita, Y. Kubota, *Electrochimica Acta* **1993**, *38*, 153.
- [65] A. Fujishima, *Photomed. Photobiol.* **1986**, *8*, 45.
- [66] Sakai H, Baba R, Hashimoto K, Kubota Y, Fujishima A, *Chemistry Letters* **2006**, *24*, 185.
- [67] O. Carp, C. L. Huisman, A. Reller, *Progress in Solid State Chemistry* **2004**, *32*, 33.
- [68] M. Fernández-García, A. Martínez-Arias, J. C. Hanson, J. A. Rodriguez, *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 4063.
- [69] U. Diebold, *Surface Science Reports* **2003**, *48*, 53.
- [70] T. R. Esch, I. Gadaczek, T. Bredow, *Applied Surface Science* **2014**, *288*, 275.
- [71] S. Yang, Y. Ishikawa, H. Itoh, Q. Feng, *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, *356*, 734.
- [72] N. M. Dimitrijević, Z. Šaponjiž, D. M. Bartels, M. C. Thurnauer, D. M. Tiede, T. Rajh, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 7368.

- [73] I. A. Janković, Z. v. Šaponjić, M. I. Čomor, J. M. Nedeljković, *The Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113*, 12645.
- [74] J. Thiebaud, A. Parker, C. Fittschen, G. Vincent, O. Zahraa, P.-M. Marquaire, *The Journal of Physical Chemistry C* **2008**, *112*, 7.
- [75] G. Cacciato, M. Zimbone, F. Ruffino, M. G. Grimaldi, *Green Nanotechnology - Overview and Further Prospects* **2016**.
- [76] N. Carslaw, D. J. Creasey, D. Harrison, D. E. Heard, M. C. Hunter, P. J. Jacobs, M. E. Jenkin, J. D. Lee, A. C. Lewis, M. J. Pilling, S. M. Saunders, P. W. Seakins, *Atmospheric Environment* **2001**, *35*, 4725.
- [77] K. Das, A. Roychoudhury, *Frontiers in Environmental Science* **2014**, *0*, 53.
- [78] A.-P. Zhang, Y.-P. Sun, *World Journal of Gastroenterology : WJG* **2004**, *10*, 3191.
- [79] W. Macyk, K. Szaćłowski, G. Stochel, M. Buchalska, J. Kuncewicz, P. Łabuz, *Coordination Chemistry Reviews* **2010**, *254*, 2687.
- [80] G. Kim, W. Choi, *Applied Catalysis B: Environmental* **2010**, *100*, 77.
- [81] R. Jono, J. Fujisawa, H. Segawa, K. Yamashita, *Journal of Physical Chemistry Letters* **2011**, *2*, 1167.
- [82] Y. Liu, J. I Dadap, D. Zimdars, K. B. Eiseenthal, *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 2480.
- [83] Z. Barbieriková, D. Dvoranová, V. Brezová, E. Džunuzović, D. N. Sredojević, V. Lazić, J. M. Nedeljković, *Optical Materials* **2019**, *89*, 237.
- [84] Y. Wang, B. Wen, A. Dahal, G. A. Kimmel, R. Rousseau, A. Selloni, N. G. Petrik, Z. Dohnálek, *The Journal of Physical Chemistry C* **2020**, *124*, 20228.
- [85] A. Abdelhaleem, W. Chu, *Journal of Hazardous Materials* **2017**, *338*, 491.
- [86] K. Wada, C. S. K. Ranasinghe, R. Kuriki, A. Yamakata, O. Ishitani, K. Maeda, *ACS Applied Materials and Interfaces* **2017**, *9*, 23869.
- [87] M. Nešić, J. Žakula, M. Stepić, M. Nešić, J. Žakula, L. Korićanac, M. Stepić, M. Radoičić, I. Popović, Z. Šaponjić, M. Petković, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2017**, *347*, 55.
- [88] M. Matijević, M. Nešić, M. Stepić, M. Radoičić, Z. Šaponjić, M. Petković, *Optical and Quantum Electronics* **2018**, *50*.
- [89] C. Pérez León, L. Kador, B. Peng, M. Thelakkat, *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 8723.
- [90] J. Liu, Y. Chen, G. Li, P. Zhang, C. Jin, L. Zeng, L. Ji, H. Chao, *Biomaterials* **2015**, *56*, 140.
- [91] J. de Tovar, F. Rataboul, L. Djakovitch, *Journal of Catalysis* **2021**, *398*, 133.
- [92] F. Huang, A. Yan, H. Zhao, in *Semiconductor Photocatalysis - Materials, Mechanisms and Applications*, InTech, **2016**.
- [93] J. Yu, G. Dai, Q. Xiang, M. Jaroniec, *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21*, 1049.
- [94] S. A. Ansari, M. M. Khan, M. O. Ansari, M. H. Cho, *New Journal of Chemistry* **2016**, *40*, 3000.
- [95] C. C. Yang, C. X. Wang, C. Y. Kuan, C. Y. Chi, C. Y. Chen, Y. Y. Lin, G. S. Chen, C. H. Hou, F. H. Lin, *Antioxidants* **2020**, *9*, 1.
- [96] Q. Chen, C. Tang, G. Zheng, *Physica B: Condensed Matter* **2009**, *404*, 1074.

- [97] X. Pan, X. Liang, L. Yao, X. Wang, Y. Jing, J. Ma, Y. Fei, L. Chen, L. Mi, *Nanomaterials* **2017**, *7*, 338.
- [98] M. Matijević, J. Žakula, L. Korićanac, M. Radoičić, X. Liang, L. Mi, J. F. Tričković, A. V. Šobot, M. N. Stanković, Đ. Nakarada, M. Mojović, M. Petković, M. Stepić, M. D. Nešić, *Photochemical and Photobiological Sciences* **2021**, *20*, 1087.
- [99] K. M. Prabu, P. M. Anbarasan, *International Journal of Science and Research* **2014**.
- [100] K. Gupta, R. P. Singh, A. Pandey, A. Pandey, *Beilstein Journal of Nanotechnology* **2013**, *4*, 345.
- [101] M. Guo, J. Du, *International Journal of Modern Physics B* **2013**, *27*.
- [102] R. Asahi, T. Morikawa, T. Ohwaki, K. Aoki, Y. Taga, *Science* **2001**, *293*, 269.
- [103] X. Chen, Y.-B. Lou, A. C. S. Samia, C. Burda, J. L. Gole, *Advanced Functional Materials* **2005**, *15*, 41.
- [104] C. Burda, Y. Lou, X. Chen, A. C. S. Samia, J. Stout, J. L. Gole, *Nano Letters* **2003**, *3*, 1049.
- [105] J.-Y. Lee, J. Park, J.-H. Cho, *Citation: Applied Physics Letters* **2005**, *87*, 123913.
- [106] J. Wang, G. Zhou, C. Chen, H. Yu, T. Wang, Y. Ma, G. Jia, Y. Gao, B. Li, J. Sun, Y. Li, F. Jiao, Y. Zhao, Z. Chai, *Toxicology Letters* **2007**, *168*, 176.
- [107] F. Grande, P. Tucci, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2016**, *16*, 762.
- [108] M. Vujović, E. Kostić, *Journal of Cosmetic Science* **2019**, *70*, 223.
- [109] S. Ronald, D. K. Mills, *Journal of Functional Biomaterials* **2016**, *7*, 15.
- [110] M. Matijević, Đ. Nakarada, X. Liang, L. Korićanac, L. Rajsiglova, L. Vannucci, M. Nešić, M. Vranješ, M. Mojović, L. Mi, I. Estrela-Lopis, J. Böttner, Z. Šaponjić, M. Petković, M. Stepić, *Journal of Nanoparticle Research* **2020**, *22*, 175.
- [111] P. Thevenot, J. Cho, D. Wavhal, R. B. Timmons, L. Tang, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2008**, *4*, 226.
- [112] S. Wu, Z. Weng, X. Liu, K. W. K. Yeung, Paul. K. Chu, *Advanced Functional Materials* **2014**, *24*, 5464.
- [113] S. Jafari, B. Mahyad, H. Hashemzadeh, S. Janfaza, T. Gholikhani, L. Tayebi, *International Journal of Nanomedicine* **2020**, *15*, 3447.
- [114] Z. Li, X. Pan, T. Wang, P.-N. Wang, J.-Y. Chen, L. Mi, *Nanoscale Research Letters* **2013**, *8*:1, 1.
- [115] S. Yamaguchi, H. Kobayashi, T. Narita, K. Kanehira, S. Sonezaki, Y. Kubota, S. Terasaka, Y. Iwasaki, *Photochemistry and Photobiology* **2010**, *86*, 964.
- [116] Y. Kubota, T. Shuin, C. Kawasaki, M. Hosaka, H. Kitamura, R. Cai, H. Sakai, K. Hashimoto, A. Fujishima, *British Journal of Cancer* **1994**, *70*, 1107.
- [117] L. Kaiqi, H. Qiyun, C. Li, A. Baoquan, X. Jianwen, *Journal of Nanomaterials* **2015**, *2015*.
- [118] Y. Y. Xiong, C. F. Liang, H. Xiao, J. W. Xiong, *Advanced Materials Research* **2011**, *152–153*, 136.
- [119] P. F. Zeni, D. P. dos Santos, R. R. Canevarolo, J. A. Yunes, F. F. Padilha, R. L. C. de A. Júnior, S. M. Egues, M. L. Hernández-Macedo, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2017**, *18*, 3722.
- [120] A. Jańczyk, A. Wolnicka-Głubisz, K. Urbanska, H. Kisch, G. Stochel, W. Macyk, *Free Radical Biology and Medicine* **2008**, *44*, 1120.

- [121] J. Xu, Y. Sun, J. Huang, C. Chen, G. Liu, Y. Jiang, Y. Zhao, Z. Jiang, *Bioelectrochemistry* **2007**, *71*, 217.
- [122] N. Lagopati, P. v. Kitsiou, A. I. Kontos, P. Venieratos, E. Kotsopoulou, A. G. Kontos, D. D. Dionysiou, S. Pispas, E. C. Tsilibary, P. Falaras, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2010**, *214*, 215.
- [123] T. Lopez, E. Ortiz, M. Alvarez, J. Navarrete, J. A. Odriozola, F. Martinez-Ortega, E. A. Páez-Mozo, P. Escobar, K. A. Espinoza, I. A. Rivero, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2010**, *6*, 777.
- [124] R. Cai, Y. Kubota, T. Shuin, H. Sakai, K. Hashimoto, A. Fujishima, *Cancer Research* **1992**, *52*.
- [125] D. Duan, H. Liu, Y. Xu, Y. Han, M. Xu, Z. Zhang, Z. Liu, *ACS Applied Materials and Interfaces* **2018**, *10*, 5278.
- [126] Z. Shah, S. Nazir, K. Mazhar, R. Abbasi, I. M. Samokhvalov, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2019**, *27*, 173.
- [127] M. Uribe-Robles, E. Ortiz-Islas, E. Rodriguez-Perez, T. Lim, A. A. Martinez-Morales, *MRS Communications* **2019**, *9*, 1242.
- [128] X. Pan, J. Xie, Z. Li, M. Chen, M. Wang, P. N. Wang, L. Chen, L. Mi, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, *130*, 292.
- [129] M. Yin, E. Ju, Z. Chen, Z. Li, J. Ren, X. Qu, *Chemistry* **2014**, *20*, 14012.
- [130] P. Xu, R. Wang, J. Ouyang, B. Chen, *Nanoscale Research Letters* **2015**, *10*, 1.
- [131] M. J. Uddin, D. Mondal, C. A. Morris, T. Lopez, U. Diebold, R. D. Gonzalez, *Applied Surface Science* **2011**, *257*, 7920.
- [132] G. Ou, Z. Li, D. Li, L. Cheng, Z. Liu, H. Wu, *Nano Research* **2016**, *9*, 1236.
- [133] W. Ren, Y. Yan, L. Zeng, Z. Shi, A. Gong, P. Schaaf, D. Wang, J. Zhao, B. Zou, H. Yu, G. Chen, E. M. B. Brown, A. Wu, *Advanced Healthcare Materials* **2015**, *4*, 1526.
- [134] X. Han, J. Huang, X. Jing, D. Yang, H. Lin, Z. Wang, P. Li, Y. Chen, *ACS Nano* **2018**, *12*, 4545.
- [135] Z. Wang, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2021**.
- [136] M. Sulyok, S. Hann, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, G. Stingeder, G. Koellensperger, *J. Anal. At. Spectrom.* **2005**, *20*, 856.
- [137] N. Cacita, S. Nikolaou, *Journal of Luminescence* **2016**, *169*, 115.
- [138] J. Sun, Y. Huang, C. Zheng, Y. Zhou, Y. Liu, J. Liu, *Biological Trace Element Research* **2015**, *163*, 266.
- [139] Lilianna Trynda-Lemiesz, *Acta Biochimica Polonica* **2004**, *51*.
- [140] N. A. Vyas, S. S. Bhat, A. S. Kumbhar, U. B. Sonawane, V. Jani, R. R. Joshi, S. N. Ramteke, P. P. Kulkarni, B. Joshi, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *75*, 375.
- [141] A. Casini, C. Gabbiani, F. Sorrentino, M. P. Rigobello, A. Bindoli, T. J. Geldbach, A. Marrone, N. Re, C. G. Hartinger, P. J. Dyson, L. Messori, *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 6773.
- [142] J. Maksimoska, L. Feng, K. Harms, C. Yi, J. Kissil, R. Marmorstein, E. Meggers, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 15764.
- [143] A. Bergamo, A. Masi, P. Dyson, G. Sava, *Int J Oncol* **2008**, *33*, 1281.
- [144] A. Bergamo, G. Sava, *Dalton Trans.* **2011**, *40*.

- [145] F. Schmitt, P. Govindaswamy, G. Süß-Fink, W. H. Ang, P. J. Dyson, L. Juillerat-Jeanneret, B. Therrien, *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 1811.
- [146] S. C. Boca, M. Four, A. Bonne, B. van der Sanden, S. Astilean, P. L. Baldeck, G. Lemercier, *Chemical Communications* **2009**, 4590.
- [147] C. Mari, V. Pierroz, R. Rubbiani, M. Patra, J. Hess, B. Spingler, L. Oehninger, J. Schur, I. Ott, L. Salassa, S. Ferrari, G. Gasser, *Chemistry - A European Journal* **2014**, *20*, 14421.
- [148] H. Huang, B. Yu, P. Zhang, J. Huang, Y. Chen, G. Gasser, L. Ji, H. Chao, *Angewandte Chemie* **2015**, *127*, 14255.
- [149] Y. Chen, W. Lei, G. Jiang, Y. Hou, C. Li, B. Zhang, Q. Zhou, X. Wang, *Dalton Transactions* **2014**, *43*, 15375.
- [150] S. Monro, K. L. Colón, H. Yin, J. Roque, P. Konda, S. Gujar, R. P. Thummel, L. Lilge, C. G. Cameron, S. A. McFarland, *Chemical Reviews* **2019**, *119*, 797.
- [151] P. Kumar, C. Joshi, N. Labhsetwar, R. Boukherroub, S. L. Jain, *Nanoscale* **2015**, *7*, 15258.
- [152] K. Nazeeruddin, R. Humphry-Baker, P. Liska, M. Grätzel, *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 8981.
- [153] K. Nazeeruddin, S. M. Zakeeruddin, H.-B. R., M. Jirousek, P. Liska, N. Vlachopoulos, V. Shklover, C.-H. Fischer, M. Gratzel, *Inorganic chemistry* **1999**, *38*, 6298.
- [154] M. Nešić, I. Popović, A. Leskovac, Z. Šaponjić, M. Radoičić, M. Stepić, M. Petković, *Optical and Quantum Electronics* **2016**, *48*, 119.
- [155] M. D. Nešić, Ispitivanje mogućnosti korišćenja nanočestica TiO₂ kao nosača za ciljanu i kontrolisanu dostavu lekova na bazi kompleksa prelaznih metala, Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, **2018**.
- [156] T. Rajh, Z. Šaponjić, J. Liu, N. M. Dimitrijević, N. F. Scherer, M. Vega-Arroyo, P. Zapol, L. A. Curtiss, M. C. Thurnauer, *Nano Letters* **2004**, *4*, 1017.
- [157] M. B. Radoičić, Z. v. Šaponjić, M. T. Marinović-Cincović, S. P. Ahrenkiel, N. M. Bibic, J. M. Nedeljković, *Journal of the Serbian Chemical Society* **2012**, *77*, 699.
- [158] W. Ren, Z. Ai, F. Jia, L. Zhang, X. Fan, Z. Zou, *Applied Catalysis B: Environmental* **2007**, *69*, 138.
- [159] L. X. Chen, T. Rajh, Z. Wang, M. C. Thurnauer, *Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101*, 10688.
- [160] N. Furusawa, A. Ozaki, M. Nakamura, Y. Morita, K. Okazaki, *Journal of Chromatography A* **1999**, *830*, 473.
- [161] M. Matijević, J. Miletić, M. Radoičić, *Hemijski Pregled* **2017**, *58*, 73.
- [162] A. Alonso, R. Sáez, A. Villena, F. M. Goñi, *The Journal of Membrane Biology* **1982**, *67*, 55.
- [163] G. Romero, I. Estrela-Lopis, J. Zhou, E. Rojas, A. Franco, C. S. Espinel, A. G. Fernández, C. Gao, E. Donath, S. E. Moya, *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 2993.
- [164] H. Zhang, C. Wang, B. Chen, X. Wang, *International Journal of Nanomedicine* **2012**, *7*, 235.
- [165] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M. R. Boyd, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **1990**, *82*, 1107.

- [166] M. Nešić, I. Popović, A. Leskovac, M. Petković, *BioMetals* **2016**, 29, 921.
- [167] G. R. Tan, S. S. Feng, D. T. Leong, *Biomaterials* **2014**, 35, 3044.
- [168] X. Xie, J. Liao, X. Shao, Q. Li, Y. Lin, *Scientific Reports* **2017**, 7, 1.
- [169] B. M. Rabatić, N. M. Dimitrijević, R. E. Cook, Z. v. Šaponjić, T. Rajh, *Advanced Materials* **2006**, 18, 1033.
- [170] W. F. Vevers, A. N. Jha, *Ecotoxicology* **2008**, 17, 410.
- [171] M. Matijević, Đ. Nakarada, X. Liang, L. Korićanac, L. Rajsiglova, L. Vannucci, M. Nešić, M. Vranješ, M. Mojović, L. Mi, I. Estrela-Lopis, J. Böttner, Z. Šaponjić, M. Petković, M. Stepić, *Journal of Nanoparticle Research* **2020**, 22, 1.
- [172] J. Xie, X. Pan, M. Wang, J. Ma, Y. Fei, P. N. Wang, L. Mi, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, 143, 148.
- [173] E. Joseph, G. Singhvi, in *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy*, Elsevier, **2019**, pp. 91–116.
- [174] L. B. Josefsen, R. W. Boyle, *Metal-based drugs* **2008**, 2008, 24.
- [175] B. Viswanathan, K. R. Krishanmurthy, *International Journal of Photoenergy* **2012**, 2012.
- [176] S. Hu, F. Li, Z. Fan, *Journal of Hazardous Materials* **2011**, 196, 248.
- [177] Y. Zhao, X. Qiu, C. Burda, *Chemistry of Materials* **2008**, 20, 8.
- [178] J. S. Souza, W. A. Alves, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2020**, 20, 5390.
- [179] M. Miyauchi, A. Ikezawa, H. Tobimatsu, H. Irie, K. Hashimoto, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2004**, 6, 865.
- [180] T. D. Savić, Z. v. Šaponjić, M. I. Čomor, J. M. Nedeljković, M. D. Dramićanin, M. G. Nikolić, D. Ž. Veljković, S. D. Zarić, I. A. Janković, *Nanoscale* **2013**, 5, 7601.
- [181] C. Pérez León, L. Kador, B. Peng, M. Thelakkat, *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, 110, 8723.
- [182] E. Bae, W. Choi, J. Park, H. S. Shin, S. B. Kim, J. S. Lee, *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, 108, 14093.
- [183] K. S. Finnie, J. R. Bartlett, J. L. Woolfrey, *Langmuir* **1998**, 14, 2741.
- [184] G. B. Deacon, R. J. Phillips, *Coordination Chemistry Reviews* **1980**, 33, 227.
- [185] R. S. Dubey, S. Singh, *Results in Physics* **2017**, 7, 1283.
- [186] S. Singh Surah, M. Vishwakarma, R. Kumar, R. Nain, S. Sirohi, G. Kumar, *Results in Physics* **2019**, 12, 1725.
- [187] Z. Yu, Q. Li, J. Wang, Y. Yu, Y. Wang, Q. Zhou, P. Li, *Nanoscale Research Letters* **2020**, 15.
- [188] C. Zhao, D. Huang, J. Chen, *Journal of Materiomics* **2018**, 4, 247.
- [189] T. Boningari, S. N. R. Inturi, M. Suidan, P. G. Smirniotis, *Chemical Engineering Journal* **2018**, 350, 324.
- [190] M. Chekini, M. R. Mohammadzadeh, S. M. Vaez Allaei, *Applied Surface Science* **2011**, 257, 7179.
- [191] L. Zhao, Q. Jiang, J. Lian, *Applied Surface Science* **2008**, 254, 4620.
- [192] J. Wang, C. Fan, Z. Ren, X. Fu, G. Qian, Z. Wang, *Dalton Transactions* **2014**, 43, 13783.
- [193] Y. Zhang, H. M. Yang, S. J. Park, *Current Applied Physics* **2018**, 18, 163.
- [194] A. Gabizon, T. And, D. Papahadjopoulos, *Medical Sciences* **1988**, 85, 6949

- [195] J. Llop, I. Estrela-Lopis, R. F. Ziolo, A. González, J. Fleddermann, M. Dorn, V. G. Vallejo, R. Simon-Vazquez, E. Donath, Z. Mao, C. Gao, S. E. Moya, *Particle and Particle Systems Characterization* **2014**, *31*, 24.
- [196] Z. Li, L. Mi, P. N. Wang, J. Y. Chen, *Nanoscale Research Letters* **2011**, *6*, 1.
- [197] K. Chu, N. Teele, M. W. Dewey, N. Albright, W. C. Dewey, *Radiation Research* **2004**, *162*, 270.
- [198] M. Kostić, N. Krunić, S. Najman, **2010**, *26*, 62.
- [199] X. Liang, Y. Xie, J. Wu, J. Wang, M. Petković, M. Stepić, J. Zhao, J. Ma, L. Mi, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2021**, *215*, 112122.
- [200] S. Sheibani, H. Vali, S. Laurent, B. Rothen-Rutishauser, K. Azadmanesh, M. Mahmoudi, M. A. Shokrgozar, C. Burtea, M. Hassanlou, S. N. Saedi-Eslami, H. R. Kalhor, *Nanoscale* **2012**, *4*, 5461.
- [201] M. Arbyn, E. Weiderpass, L. Bruni, S. de Sanjosé, M. Saraiya, J. Ferlay, F. Bray, *The Lancet Global Health* **2020**, *8*, e191.
- [202] T. Muroya, Y. Suehiro, K. Umayahara, T. Akiya, H. Iwabuchi, H. Sakunaga, M. Sakamoto, T. Sugishita, Y. Tenjin, *Gan to Kagaku ryoho. Cancer & Chemotherapy* **1996**, *23*, 47.
- [203] P. S. Oh, H. Hwang, H. S. J. Jeong, J. Kwon, H. S. Kim, M. Kim, S. Lim, M. H. Sohn, H. S. J. Jeong, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **2016**, *70*, 13.
- [204] J. D. Williams, Y. Bermudez, S. L. Park, S. P. Stratton, K. Uchida, C. A. Hurst, G. T. Wondrak, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2014**, *132*, 56.
- [205] P. S. Oh, H. S. Kim, E. M. Kim, H. Hwang, H. H. Ryu, S. T. Lim, M. H. Sohn, H. J. Jeong, *Journal of Cellular Physiology* **2017**, *232*, 3444.
- [206] J. Zhuang, Y. Liu, Q. Yuan, J. Liu, Y. Liu, H. Li, D. Wang, *Oncology Letters* **2018**, *15*, 6291.
- [207] B. A. Bello, S. A. Khan, J. A. Khan, F. Q. Syed, Y. Anwar, S. B. Khan, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2017**, *175*, 99.
- [208] C. N. Waer, P. Kaur, Z. Tumor, D. Dee Hui, B. Le, C. Guerra, B. Henson, D. Seleem, J. Lewis, *Anticancer Research* **2020**, *40*, 751.
- [209] V. Tuloup-Minguez, A. Greffard, P. Codogno, J. Botti, *Autophagy* **2011**, *7*, 27.
- [210] E. D. Yoboue, R. Sitia, T. Simmen, *Cell Death and Disease* **2018**, *9*, 1.
- [211] E. Ullman, Y. Fan, M. Stawowczyk, H. M. Chen, Z. Yue, W. X. Zong, *Cell Death and Differentiation* **2008**, *15*, 422.
- [212] C. E. Diaz-Uribe, M. C. Daza, F. Martínez, E. A. Páez-Mozo, C. L. B. Guedes, E. Di Mauro, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2010**, *215*, 172.
- [213] N. J. F. Dodd, A. N. Jha, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2009**, *660*, 79.
- [214] R. Konaka, E. Kasahara, W. C. Dunlap, Y. Yamamoto, K. C. Chien, M. Inoue, *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, *27*, 294.
- [215] M. Hardy, A. Rockenbauer, J. Vásquez-Vivar, C. Felix, M. Lopez, S. Srinivasan, N. Avadhani, P. Tordo, B. KalyanaRaman, *Chemical Research in Toxicology* **2007**, *20*, 1053.
- [216] F. A. Villamena, C. M. Hadad, J. L. Zweier, *Journal of Physical Chemistry A* **2003**, *107*, 4407.

- [217] J. Zhang, C. Jiang, J. P. Figueiró Longo, R. B. Azevedo, H. Zhang, L. A. Muehlmann, *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2018**, 8, 137.
- [218] J. R. Gurr, A. S. S. Wang, C. H. Chen, K. Y. Jan, *Toxicology* **2005**, 213, 66.
- [219] S. Dalai, S. Pakrashi, R. S. S. Kumar, N. Chandrasekaran, A. Mukherjee, *Toxicology Research* **2012**, 1, 116.
- [220] D. T. Jayaram, S. Runa, M. L. Kemp, C. K. Payne, *Nanoscale* **2017**, 9, 7595.
- [221] K. Krumova, G. Cosa, in *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*{,} *Volume 1*, The Royal Society Of Chemistry, **2016**, pp. 1–21.

Prilog 1 Rezultati ispitivanja citotoksičnosti utvrđeni pomoću testova vijabilnosti

Tretman	Ćelijska linija	Inkubacija (h)	Test	Koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Jednofaktorska ANOVA
TiO ₂ NČ	3T3	24	CV	3, 6, 12	n.s. ($p \geq 0,05$)
				24	$p < 0,001$ (**)
				36	$p < 0,001$ (***)
				48	$p < 0,0001$ (****)
TiO ₂ NČ	3T3	120	CV	3, 6, 12	n.s. ($p \geq 0,05$)
				24, 36	$p < 0,001$ (**)
				48	$p < 0,0001$ (****)
TiO ₂ PNS	3T3	24	CV	3, 24, 36, 48	n.s. ($p \geq 0,05$)
				6, 12	$p < 0,001$ (**)
TiO ₂ PNS	3T3	120	CV	3	n.s. ($p \geq 0,05$)
				6	$p < 0,001$ (***)
				12, 24, 48	$p < 0,0001$ (****)
				36	$p < 0,05$ (*)
TiO ₂ NČ, TiO ₂ PNS	Splenociti	24, 120	MTT	6, 24, 48	n.s. ($p \geq 0,05$)
TiO ₂ PNS	A375	48	SRB	10	$p < 0,05$ (*)
				20	$p < 0,01$ (**)
				40	$p < 0,001$ (***)
TiO ₂ PNS	SKBR3	48	SRB	10, 20	$p < 0,01$ (**)
				40	n.s. ($p \geq 0,05$)
TiO ₂ PNS	PANC1	48	SRB	10	n.s. ($p \geq 0,05$)
				20	$p < 0,05$ (*)
				40	$p < 0,001$ (***)
N-TiO ₂ NČ	HeLa	48	SRB	5	n.s. ($p \geq 0,05$)
				50	n.s. ($p \geq 0,05$)
				100	$p < 0,05$ (*)
C-TiO ₂ NČ	HeLa	48	SRB	8, 80, 160	n.s. ($p \geq 0,05$)
[Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂]	HeLa	48	MTT ¹	5	n.s. ($p \geq 0,05$)
				50, 100	$p < 0,001$ (***)
[Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂]	HeLa	48	SRB	5	n.s. ($p \geq 0,05$)
[Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂]	A375	48	SRB	60	n.s. ($p \geq 0,05$)
[Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂]	SKBR3	48	SRB	60	$p < 0,05$ (*)
[Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂]	PANC1	48	SRB	60	n.s. ($p \geq 0,05$)
TiO ₂ NČ	HeLa	48	MTT ¹	15, 30	n.s. ($p \geq 0,05$)
				150	$p < 0,001$ (***)
TiO ₂ NČ	HeLa	48	SRB	70	n.s. ($p \geq 0,05$)
NČ NKS ²	HeLa	48	MTT ¹	1,25; 12,5; 25	n.s. ($p \geq 0,05$)
NČ NKS ²	HeLa	48	SRB	60	n.s. ($p \geq 0,05$)
PNS NKS ²	A375	48	SRB	60	$p < 0,0001$ (****)
PNS NKS ²	SKBR3	48	SRB	60	n.s. ($p \geq 0,05$)
PNS NKS ²	PANC1	48	SRB	60	$p < 0,001$ (***)

¹MTT test je rađen po izmenjenoj proceduri s WST-8 agensom za bojenje
²Koncentracija je izražena prema koncentraciji kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] u NKS

Prilog 2 Rezultati ispitivanja fotocitotoksičnosti utvrđeni pomoću SRB testa vijabilnosti

Tretman	Ćelijska linija	Vreme pre-inkubacije ¹ (h)	Vreme post-inkubacije ² (h)	Svetlosni izvor	Snaga zračenja (mW)	Talasna dužina ³ (nm)	Vreme zračenja (min)	Koncentracija ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Jednofaktorska ANOVA
TiO ₂ PNS	A375	24	24	UVC	0,6	254	5	10, 20, 40	n.s. ($p \geq 0,05$)
TiO ₂ PNS	SKBR3	24	24	UVC	0,6	254	5	10, 20, 40	n.s. ($p \geq 0,05$)
TiO ₂ PNS	PANC1	24	24	UVC	0,6	254	5	10, 20, 40	n.s. ($p \geq 0,05$)
TiO ₂ NČ	HeLa	1	48	Plavo svetlo	0,12	450	15	160	n.s. ($p \geq 0,05$)
N-TiO ₂ NČ	HeLa	1	48	Plavo svetlo	0,12	450	15	50	n.s. ($p \geq 0,05$)
C-TiO ₂ NČ	HeLa	1	48	Plavo svetlo	0,12	450	15	160	$p < 0,01$ (**)
[Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂]	A375	24	24	UVC	0,6	254	5	60	n.s. ($p \geq 0,05$)
[Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂]	SKBR3	24	24	UVC	0,6	254	5	60	n.s. ($p \geq 0,05$)
[Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂]	PANC1	24	24	UVC	0,6	254	5	60	n.s. ($p \geq 0,05$)
[Ru(II)(dcbpy) ₂ Cl ₂]	HeLa	2	48	LED, hladno belo	50	350	5, 15	5	n.s. ($p \geq 0,05$)
TiO ₂ NČ	HeLa	2	48	LED, hladno belo	50	350	5, 15	70	n.s. ($p \geq 0,05$)
NČ NKS	HeLa	2	48	LED, hladno belo	50	350	5, 15	5	n.s. ($p \geq 0,05$)
PNS NKS ⁴	A375	24	24	UVC	0,6	254	5	60	n.s. ($p \geq 0,05$)
PNS NKS ⁴	SKBR3	24	24	UVC	0,6	254	5	60	n.s. ($p \geq 0,05$)
PNS NKS ⁴	PANC1	24	24	UVC	0,6	254	5	60	n.s. ($p \geq 0,05$)

¹Pre-inkubacija se odnosi na vreme u toku kojeg su ćelije bile izložene tretmanu pre zračenja

²Post-inkubacija se odnosi na vreme nakon zračenja, a pre izvođenja testa vijabilnosti

³Navedene su talasne dužine na kojima je merena snaga zračenja

⁴Koncentracija je izražena prema koncentraciji kompleksa [Ru(II)(dcbpy)₂Cl₂] u NKS

Biografija

Milica P. Matijević rođena je 15. juna 1984. godine u Zemunu, Republika Srbija. Osnovnu školu pohađala je u Novim Banovcima. U Beogradu je završila Desetu beogradsku gimnaziju "Mihajlo Pupin".

U julu 2014. godine je diplomirala na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, na odseku za Biotehnologiju i biohemijski inženjering. Diplomski rad pod nazivom *Simultano određivanje koncentracija makro i mikro nutrijenata u školjkama rendgenskom fluorescentnom spektrometrijom* je odbranjen sa srednjom ocenom 10,00.

Školske 2014/2015. upisala je doktorske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu, na Departmanu za Hemiju.

U maju 2015. godine je zasnovala radni odnos u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“, Univerziteta u Beogradu, u Laboratoriji za fizičku hemiju. Od marta 2018. radi u Laboratoriji za atomsku fiziku, takođe u okviru Instituta za nuklearne nauke „Vinča“.

Kao učesnik projekta multilateralne saradnje zemalja u Dunavskoj regiji, *Dunav upozna je omiku – Danomika* u periodu 2017-2018. godine boravila je na stručnim usavršavanjima u Institutu za Biomedicinska Istraživanja Slovačke Akademije Nauka (Bratislava, Slovačka) i Institutu za mikrobiologiju Češke Akademije Nauka (Prag, Češka). U okviru istraživačkih aktivnosti bilateralnog projekta Republike Srbije i Republike Kine, u junu 2018. godine boravila je na Fudan Univerzitetu, odeljenju za Optičke nauke i Inženjering (Šangaj, Kina). Pored navedenih istraživačkih aktivnosti, bila je sekretar međunarodne konferencije Fotonika2019, kao i jedan od urednika Knjige apstrakta.

Od 2015-2019. godine aktivno je učestvovala u aktivnostima grupe u okviru projekta popularizacije nauke *Vinčine naučionice*.

Bibliografija

Milica P. Matijević je autor više naučnih publikacija u domaćim i međunarodnim naučnim časopisima.

Radovi u istaknutim međunarodnim časopisima kategorije M22:

1. **Milica Matijević**, Jelena Žakula, Lela Korićanac, Marija Radoičić, Xinyue Liang, Lan Mi, Jelena Filipović Tričković, Ana Valenta Šobot, Maja N. Stanković, Đura Nakarada, Miloš Mojović, Marijana Petković, Milutin Stepić & Maja D. Nešić, *Controlled killing of human cervical cancer cells by combined action of blue light and C-doped TiO₂ nanoparticles*, Photochem Photobiol Sci 20, 1087–1098 (2021).
2. **Milica Matijević**, Đura Nakarada, Xinyue Liang, Lela Korićanac, Lenka Rajsiglova, Luca Vannucci, Maja Nešić, Mila Vranješ, Miloš Mojović, Lan Mi, Irina Estrela-Lopis, Julia Böttner, Zoran Šaponjić, Marijana Petković, Milutin Stepić, *Biocompatibility of TiO₂ prolate nanospheroids as a potential photosensitizer in therapy of cancer*, Journal of Nanoparticle Research 22, 175 (2020)

Radovi u međunarodnim časopisima kategorije M23:

1. **Milica Matijević**, Maja Stanković, Nenad Krstić, Milica Nikolić, Danijela Kostić, *Application of oxidation processes in the purification of wastewaters from phenolic compounds*, Revue Roumaine de Chimie 65, 4 (2020) 313-327.
2. **Milica Matijević**, Maja Nešić, Milutin Stepić, Marija Radoičić, Zoran Šaponjić, Marijana Petković, *Light controllable TiO₂-Ru nanocomposite system encapsulated in phospholipid unilamellar vesicles for anti-cancer photodynamic therapy*, Optical and Quantum Electronics 50, 232 (2018)

Radovi u nacionalnom časopisu kategorije M53:

1. **Milica Matijević**, Iva Popović, Milutin Stepić, Maja Nešić, Marija Radoičić, Maja Stanković, Zoran Šaponjić, Marijana Petković, *Inorganic nanoparticles in biology: drug carriers and auxiliary tools in bioimaging and bioanalytics*, Biologica Nyssana –

Journal of Biological Sciences, University of Niš, Faculty of Sciences and Mathematics, Niš 9, 1 (2018) 1 - 20, 2217-4478.

2. **Milica Matijević**, Jadranka Miletić, Marija Radoičić, Todor Cvetanović, *Nanokompozitni fotodinamički sistem za kontrolisanu dostavu medikamenata baziranih na kompleksima prelaznih metala*, Hemijski pregled 58, 3 (2017) 73-82.

Saopštenje s međunarodnog skupa štampano u celini M33:

Milica Matijević, Milovan Stoiljković, Miloš Momčilović, Jelena Savović, Jovan Ciganović, Miroslav Kuzmanović, *Laser-Induced Breakdown Spectroscopy at a Solid-Aqueous Aerosol Interface*, Contributed papers & abstracts of invited lectures, topical invited lectures, progress reports and workshop lectures, 28th Summer School and International Symposium on the physics of the ionized gases, (2016) 348 - 351, 978-86-84539-14-6

Saopštenja s međunarodnog skupa štampano u izvodu M34:

1. Jelena Žakula, Maja D. Nešić, **Milica Matijević**, Milutin Stepić, Marijana Petković, Lela Korićanac, *Antitumor effect of Ru(II) complex on A375 and Hela cell growth, migration and adhesion ability*, Serbian Biochemical Society Tenth Conference, 2021, Kragujevac, Serbia
2. **Milica Matijević**, Milutin Stepić, Marija Radoičić, Marijana Petković, Maja D. Nešić, *Visible light-responsiveness of the nanocarrier/drug complex based on the TiO₂ nanoparticles and Ru complex*, PHOTONICA2021 VIII International School and Conference on Photonics, Beograd, 2021, 109, ISBN 978-86-82441-53-3
3. **Milica Matijević**, Marijana Petković, Irina Estrela-Lopis, Marija Radoičić, Milutin Stepić, Maja Nešić, *Investigation of cytotoxicity and internalization of the metallo-drug delivery system based on the TiO₂ nanocrystalline and Ru-complex*, RICT – 56th international conference on medicinal chemistry, 2021
4. **Milica Matijević**, Marijana Petković, Milutin Stepić, Maja Nešić, *Blue light-enhanced cytotoxic activity of nitrogen doped TiO₂ nanoparticles in human cervical cancer cells*, 28th Young Research Fellow Meeting, 2021

5. **Milica Matijević**, Mario Cindrić, Marijana Petković, Marija Nišavić, *Structural characterization of transferrin-bound ruthenium(II) terpyridine complexes*, FEBS Open Bio, WILEY, 8, P.18-062-Tue, (2018) 406-407.
6. **Milica Matijević**, Maja Nešić, Iva Popović, Milutin Stepić, Marija Radoičić, Zoran Šaponjić, Marijana Petković, *Light controllable TiO₂-Ru nanocomposite system encapsulated in small unilamellar vesicles for anti-cancer photodynamic therapy*, Book of abstracts PHOTONICA 2017 The Sixth International School and Conference on Photonics, (2017) 111 - 111. 978-86-82441-46-5

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Испитивање интеракције фотоосетљивог нанокмпозитног система базираног на недопираним и допираним честицама титанијум (IV) оксида с биомолекулима и хелијама

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивала на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредила ауторска права, нити злоупотребила интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 25.01.2022.

Потпис аутора дисертације:


Милица П. Матијевић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

Испитивање интеракције фотоосетљивог нанокмпозитног система базираног на недопираним и допираним честицама титанијум (IV) оксида с биомолекулима и хелијама

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предала за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 25.01.2022.

Потпис аутора дисертације:


Милица П. Матијевић

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

Испитивање интеракције фотоосетљивог нанокмпозитног система базираног на недопираним и допираним честицама титанијум (IV) оксида с биомолекулима и хелијама

Дисертацију са свим прилозима предала сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучила.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 25.01.2022.

Потпис аутора дисертације:


Милица П. Матијевић