

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Мирјана П. Мићевић

**Ефекти наночестица CeO_2 и ZnO на туморске (HeLa)
и нетрансформисане (MRC-5) хумане ћелије *in vitro*
проучавани вибрационом спектроскопијом и
микроскопијом на бази атомских сила**

докторска дисертација

Београд, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Mirjana P. Mićević

Effects of CeO₂ and ZnO nanoparticles on cancerous (HeLa) and non-cancerous (MRC-5) human cells *in vitro* studied by vibrational spectroscopy and atomic force microscopy

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Ментори:

др Соња Ашкрабић, виши научни сарадник

Универзитет у Београду, Институт за физику у Београду

др Горан Брајушковић, редовни професор

Универзитет у Београду, Биолошки факултет

Чланови комисије:

др Душанка Савић-Павићевић, редовни професор

Универзитет у Београду, Биолошки факултет

др Зорана Дохчевић-Митровић, научни саветник

Универзитет у Београду, Институт за физику у Београду

др Марко Даковић, ванредни професор

Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију

Датум одбране: _____

Захвалница

Тешко је одабрати речи захвалности мојој менторки, **др Соњи Ашкрабић**, без које ниједна страница ове дисертације не би постојала. Хвала Ти што си ме увела у један нови свет, хвала за поверење, за све чему си ме научила (а у то спада готово све што је исписано на предстојећим страницама), за сате проведене са мном у лабораторији, за дане у којима си чекала моје извештаје који касне, за одговоре на бескрајна питања, за разумевање, стрпљење, за поглед на леви плави Дунав и све заједничке дане. Никада нећу успети да Ти узвратим, али надам се да ћу се неком другом наћи као Ти мени.

Велику захвалност дугујем и свом другом ментору, **проф. др Горану Брајушковићу**, за подршку и помоћ у критичним тренуцима које је он вероватно заборавио али ја нисам, још од давног доба Молекуларне генетике, па до завршних фаза израде ове дисертације. Захвална сам на поверењу које је указао мени и овој помало необичној теми и прихватио менторство, као и на свим критикама и саветима који су допринели квалитету ове дисертације.

Такође огромну захвалност дугујем **др Зорани Дохчевић-Митровић**, за поверење и добру вољу да ме прими у своју лабораторију, и за помоћ у свим етапама израде ове дисертације, у свакој ситуацији у којој ми је помоћ била потребна. Посебно хвала за сате проведене са мном над радовима као и над текстом саме тезе, што је заиста много допринело њиховом квалитету.

Захвалност дугујем и проф. **др Душанки Савић-Павићевић** и проф. **др Марку Даковићу**, који су прихватили да буду чланови комисије за оцену ове дисертације. Хвала за конструктивне коментаре и питања, захваљујући којима су исправљени неки пропусти у дисертацији и који су ме инспирисали на дубље истраживање.

Такође велико хвала **др Драгици Радојковић**, члану саветодавне комисије ове докторске дисертације, која је помогла у почетним фазама дефинисања теме и овог докторског пројекта. Хвала на истраживачкој слободи коју ми је дала на њеном предмету у оквиру докторских студија и срдачном охрабривању да наставим овим путем.

Др Лели Корићанац и **др Јелени Жакули** хвала онолико пута колико су бунара са ћелијама поставиле за експерименте из ове дисертације, а тај број је огроман. Захвална сам што смо увек могли да се ослонимо да ће нам припремити ћелије и упустити се са нама у најразличитије а понекад и за њих нове експерименте, без којих такође ова дисертација не би могла да постоји. Хвала и што су ми омогућиле да се у лабораторији и даље осећам као биолог.

Др Александри Вилотић припада трећа захвалница за безбројне бунаре и флашкове и будно критичко око над свим дешавањима у ћелијској култури. Такође хвала на увек озбиљној дискусији резултата и експерименталних заврзлама и сугестијама везаним за ову тезу. Уз Александру, захвалност дугујем и **др Милицы Јовановић Кривокући**, за експерименте проточне цитофлуориметрије, као и **др Драгани Робајац**, која је на помало чудесан начин посредовала у овој плодносној сарадњи са ИНЕП-ом.

Проф. др Александри Кораћ и **др Игору Голићу** веома сам захвална за пружену могућност за експерименте на конфокалном и ТЕМ микроскопу као и за свесрдну помоћ и стрпљење коју су ми при томе пружили.

За AFM мерења, стрпљење са узорцима и дискусију резултата дугујем велику захвалност **др Бориславу Васићу**. Такође сам захвалне за читање и конструктивне коментаре дела ове дисертације који се тиче AFM-а.

Заиста велику захвалност упућујем колегама из Јене: **dr Iwan Schie, dr Jan Rüger, dr Abdullah Saif Mondol, dr Clara Stebeig, dr Vera Dogandžić** и **dr Natalie Töpfer**, за прилику за Раман мерења на систему који су сами развили али и за даноноћни рад у ћелијској култури, као и за различите друге експерименте које смо успут успели да урадимо. Тих шест месеци на IPHT на самом почетку рада било је од пресудног значаја за ову дисертацију. Хвала и мојој **др Марини Пекмезовић** што ми је пружила топли дом и сестринску подршку током тог периода.

Др Димитрију Степаненку, др Новици Пауновићу и др Бојану Стојадиновићу захвална сам на критичком читању предлога пројекта и теме ове дисертације, као и на преслушавању пред јавне презентације, што је пуно допринело мојим вештинама писања и излагања, мада је на том пољу још увек дуг пут преда мном.

Хвала пријатељима и куми, за љубав, логистичку подршку и за разумевање мојих безбројних „не могу, радим“ одговора у тренуцима кад сам им била потребна.

На самом крају, као потврда да редослед имена у овој захвалници није мера ничијег доприноса, захвалност упућујем својој породици: тати, мами, тетки, Јацки, мом Слободану, Кови, Брани и Јелени. Међу њима и баки која више није са нама, али чија ми се подршка на почетку овог подухвата урезала у срце. Старој породици за сва одрицања током дугог школовања, новој породици за стрпљиво подношење последњих неколико немогућих месеци. За све што само они знају. За љубав и подршку, одувек и заувек.

Ефекти наночестица CeO_2 и ZnO на туморске (HeLa) и нетрансформисане (MRC-5) хумане ћелије *in vitro* проучавани вибрационом спектроскопијом и микроскопијом на бази атомских сила

Сажетак

Потенцијално широка примена метал-оксидних наночестица условљена је повољним односом између корисних и штетних ефеката које испољавају на ћелијама човека. Наночестицама CeO_2 посебност даје променљивост оксидационог стања церијума захваљујући чему имитирају активност ћелијских ензима. Проучава се њихово селективно дејство на различите типове ћелија, што важи и за наночестице ZnO . У овој студији је показано да облагање наночестица CeO_2 декстраном драстично повећава њихову цитотоксичност. Биохемијске промене HeLa и MRC-5 ћелија изазване наночестицама CeO_2 (необложеним и декстраном обложеним) и ZnO проучаване су Рамановом спектроскопијом комбинованом са методама мултиваријантне статистике. Најупечатљивије регистроване дозно-зависне промене су пад интензитета Раманових модова нуклеинских киселина и пораст интензитета липидних модова код третираних ћелија. За мање оштећене ћелије карактеристични су спектрални маркери незасићених масти и фосфатидилсерина, повезани са раном апоптозом детектованом код ових ћелија. У касној апоптози описани маркери су мање изражени. Односи интензитета I_{-1270}/I_{-1300} и I_{-2850}/I_{-2930} предложени су за будућа истраживања као квантитативни параметри чија вредност расте услед цитотоксичног дејства наночестица. Ненегативна анализа главних компонената показала се корисном за анализу ћелијских Раманових спектра, а комбиновање различитих приступа анализи неопходним за адекватно разумевање спектралних промена. Микроскопијом на бази атомских сила добијене су топографске слике ћелија у високој резолуцији и описане морфолошке промене третираних ћелија. Дефинисана је површинска храпавост као квантитативни параметар који расте код третираних ћелија, без обзира на остале морфолошке карактеристике.

Кључне речи: наночестице, CeO_2 , ZnO , HeLa, MRC-5, цитотоксичност, Раманова спектроскопија, PCA, микроскопија на бази атомских сила, AFM

Научна област: Биологија

Ужа научна област: Биохемија и молекуларна биологија

Effects of CeO₂ and ZnO nanoparticles on cancerous (HeLa) and non-cancerous (MRC-5) human cells *in vitro* studied by vibrational spectroscopy and atomic force microscopy

Abstract

Potentially wide application of metal-oxide nanoparticles is determined by positive prevalence of their beneficial over harmful effects observed in studies on human cells.. The specificity of CeO₂ nanoparticles is switching between two oxidational states of cerium, which enables an enzyme-mimicking activity of nanoparticles in the cell. Selective action of CeO₂ and ZnO to different cell types has been studied. In this study, it is shown that coating of CeO₂ nanoparticles with dextran dramatically increases their cytotoxicity. Biochemical changes of HeLa and MRC-5 cells induced by CeO₂ (uncoated and dextran-coated) and ZnO nanoparticles are investigated by Raman spectroscopy combined with the methods of multivariate statistics. The most prominent dose-dependent changes that are registered include the decrease of nucleic acids' and increase of lipid's Raman modes. Partially damaged cells are characterized by Raman markers of unsaturated lipids and phosphatidylserine, correlated with early apoptosis detected in those cells. In late apoptosis, described spectral markers diminish. The increasing intensity ratios I_{1270}/I_{1300} and I_{2850}/I_{2930} are proposed as marker for the cytotoxic effect of nanoparticles that can be employed in future studies as quantitative parameters of this effect. Non-negative principal component analysis appeared to be useful for the cell Raman spectra analysis and combining different approaches in analysis was needed for comprehensive interpretation of spectral changes. High-resolution topographic images of the cells were obtained by atomic force microscopy and morphological changes of treated cells have been described. Surface roughness is defined as quantitative parameter increasing in treated cell, regardless other morphological characteristics.

Key words: nanoparticles, CeO₂, ZnO, HeLa, MRC-5, cytotoxicity, Raman spectroscopy, PCA, atomic force microscopy, AFM

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biochemistry and molecular biology

Листа скраћеница

А) Латиничне скраћенице, засноване на енглеским називима:

AFM	<i>atomic force microscopy</i> , микроскопија на бази атомских сила
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i> , фактор индукције апоптозе
ATP	<i>adenosine triphosphate</i> , аденозин трифосфат
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CD	<i>dextran coated</i> , ознака за наночестице обложене декстраном
DLS	<i>dynamic light scattering</i> , динамичко расејање светлости
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , етилендиамино-тетрасирћетна киселина
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	<i>electron microscopy</i> , електронска микроскопија
EMSC	<i>extended multiplicative scatter correction</i>
FCS	<i>fetal bovine serum</i> , говеђи фетални серум
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
IR	<i>infrared</i> , инфрацрвена
LD	<i>linear discriminant</i> , линеарна дискриминанта
LDA	<i>linear discriminant analysis</i> , линеарна дискриминациона анализа
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i> , митогеном активирани протеинске киназе
MTT	3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил тетразолиум бромид
NRU	<i>neutral red</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PC	<i>principal component</i> , главна компонента
PCA	<i>principal component analysis</i> , анализа главних компоненти
PEG	<i>polyethylene glycol</i> , полиетилен гликол
PI	<i>propidium iodide</i>
PLS	<i>Partial least squares</i> , парцијална регресија методом најмањих квадрата
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , реактивне кисеоничне врсте
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , натријум додецил сулфат
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> , скенирајућа електронска микроскопија
SERS	<i>surface-enhanced Raman spectroscopy</i> , површински појачана Раманова

	спектроскопија
SOD	<i>superoxid dismutase</i> , супероксид дисмутаза
SPRT	<i>self-propagating room temperature synthesis</i> , односно наночестице синтетисане наведеном методом
SRB	<i>sulforhodamine B</i> , сулфородамин Б
STM	<i>scanning tunneling microscope</i> , скенирајућа тунелска микроскопија
TEM	<i>transmission electron microscopy</i> , трансмисиона електронска микроскопија
TERS	<i>tip-enhanced Raman spectroscopy</i>
UV	<i>ultraviolet</i> , ултраљубичасто
XRD	<i>X-ray diffraction</i> , дифракција X зрачењем
2D/3D	у две/три димензије

Ћириличне скраћенице:

Арб. јед.	арбитрарне јединице
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
РНК	рибонуклеинска киселина
САД	Сједињене Америчке Државе

Садржај

1. Увод.....	1
1.1. Наночестице и њихове интеракције са ћелијама.....	1
1.1.1. Наночестице церијум диоксида.....	2
1.1.1.1. Основна физичкохемијска својства.....	2
1.1.1.2. Механизми интеракције са ћелијом.....	4
1.1.1.3. Ефекти наночестица CeO_2 на HeLa и MRC-5 ћелије.....	7
1.1.2. Наночестице цинк оксида.....	8
1.1.2.1. Основна физичкохемијска својства и примена.....	8
1.1.2.2. Механизми интеракције са ћелијом.....	10
1.1.2.3. Ефекти наночестица ZnO на HeLa и MRC-5 ћелије.....	11
1.2. Вибрациона спектроскопија ћелија третираних наночестицама.....	11
1.3. Морфолошке промене ћелија третираних наночестицама: осликавање на бази атомских сила.....	16
2. Циљеви рада.....	19
3. Методе.....	21
3.1. Синтеза и карактеризација наночестица и њихових дисперзија.....	21
3.1.1. Синтеза SPRT- CeO_2	21
3.1.2. Синтеза CD- CeO_2	21
3.1.3. Рентгенска дифракција наночестица.....	21
3.1.4. Одређивање хидродинамичког радијуса наночестица у дисперзији.....	22
3.2. Гајење ћелија у култури.....	22
3.3. Третман ћелија наночестицама.....	23
3.4. Трансмисиона електронска микроскопија.....	23
3.5. Раманово мапирање.....	24
3.6. Тестирање ћелијског раста и вијабилности.....	25

3.6.1. SRB тест.....	25
3.6.2. MTT тест.....	25
3.6.3. NRU тест.....	25
3.7. Детекција апоптозе: бојење анексином V и пропидијум јодидом.....	26
3.8. Одређивање расподеле ћелија по фазама ћелијског циклуса: проточна цитофлуориметрија	27
3.9. Вибрациона спектроскопија.....	28
3.9.1. Теоријска основа вибрационе спектроскопије	28
3.9.1.1. Молекулске вибрације.....	28
3.9.1.2. Основне методе вибрационе спектроскопије.....	31
3.9.1.3. Раманови вибрациони спектри	32
3.9.2. Експериментална поставка	34
3.9.2.1. Уређај NTEGRA.....	35
3.9.2.2. Некомерцијални уређај за брзо мерење Раманових спектра ћелија.....	36
3.9.2.3. Интервал мерења.....	37
3.9.3. Обрада Раманових спектра ћелија.....	38
3.9.3.1. Уклањање „спајкова“.....	39
3.9.3.2. Калибрација	39
3.9.3.3. Интерполација	40
3.9.3.4. Уклањање позадинског сигнала	40
3.9.3.5. Нормирање интензитета.....	42
3.9.3.6. Селекција спектра	42
3.9.4. Анализа усредњених Раманових спектра ћелија: одређивање интензитета Раманових модова	42
3.9.5. Мултиваријантна статистичка анализа Раманових спектра	43
3.9.5.1. PCA.....	44
3.9.5.2. PLS-LDA	46

3.10. AFM	48
4. Резултати.....	51
4.1. Синтеза и карактеризација наночестица	51
4.1.1. Потврда кристалне структуре наночестица рентгенском дифракцијом	51
4.1.2. Одређивање хидродинамичког радијуса методом DLS	52
4.2. Одређивање унутарћелијске локализације наночестица	53
4.3. Ефекат наночестица CeO ₂ на раст и вијабилност ћелија	54
4.3.1. Ефекат наночестица CeO ₂ на раст ћелија: оптимизација доза.....	54
4.3.1.1. Оптимизација доза наночестица CeO ₂ за третман HeLa ћелија.....	54
4.3.1.2. Оптимизација доза наночестица CeO ₂ за третман MRC-5 ћелија	57
4.3.2. Ефекат наночестица CeO ₂ на метаболичку активност ћелија	58
4.3.3. Ефекат наночестица CeO ₂ на индукцију апоптозе.....	59
4.4. Ефекат наночестица ZnO на раст и вијабилност ћелија	62
4.4.1. Ефекат наночестица ZnO на раст ћелија: оптимизација доза.....	62
4.4.1.1. Оптимизација доза наночестица ZnO за третман HeLa ћелија.....	62
4.4.1.2. Оптимизација доза наночестица ZnO за третман MRC-5 ћелија	62
4.4.2. Ефекат наночестица ZnO на метаболичку активност ћелија	64
4.4.3. Ефекат наночестица ZnO на индукцију апоптозе.....	65
4.4.4. Ефекат наночестица ZnO на расподелу HeLa и MRC-5 ћелија по фазама ћелијског циклауса.....	66
4.5. Раманова спектроскопија ћелија третираних наночестицама.....	67
4.5.1. Раманова спектроскопија HeLa ћелија третираних наночестицама CeO ₂	67
4.5.1.1. Анализа усредњених Раманових спектра HeLa ћелија третираних наночестицама CeO ₂	68
4.5.1.2. PCA Раманових спектра HeLa ћелија третираних наночестицама CeO ₂	69
4.5.1.3. Класификација HeLa ћелија третираних CeO ₂ наночестицама: PLS-LDA модел ..	71
4.5.2. Раманова спектроскопија MRC-5 ћелија третираних наночестицама CeO ₂	72

4.5.2.1. Анализа усредњених Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних наночестицама CeO_2	73
4.5.2.2. PCA Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних наночестицама CeO_2	75
4.5.2.3. PCA „у паровима“ Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних наночестицама CD- CeO_2	77
4.5.2.4. PCA „у паровима“ Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних наночестицама SPRT- CeO_2	80
4.5.3. Раманова спектроскопија HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO	83
4.5.3.1. Анализа усредњених Раманових спектра HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO.....	84
4.5.3.2. PCA Раманових спектра HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO: регион (600-1800) cm^{-1}	86
4.5.3.3. PCA „у паровима“ Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO: (600-1800) cm^{-1}	91
4.5.3.4. PCA Раманових спектра HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO: регион (2600-3700) cm^{-1}	93
4.5.4. Ефекти различитих типова и доза наночестица на MRC-5 ћелије: моделовање заједничких промена у ћелијским Рамановим спектрима	96
4.5.4.1. Испитивање корелација вредности параметра I_{1270}/I_{1300} са променама ћелијске вијабилности.....	96
4.5.4.2. PLS-LDA модел за класификовање различито третираних MRC-5 ћелија	97
4.5.5. Каталогизација ћелијских Раманових модова чији се интензитет након третмана наночестицама мења.....	98
4.6. Микроскопија на бази атомских сила	102
4.6.1. AFM осликавање HeLa ћелија третираних наночестицама CeO_2	102
4.6.2. AFM осликавање HeLa ћелија третираних наночестицама ZnO	104
5. Дискусија	106
6. Закључци.....	125

Литература.....	128
Прилози.....	151

1. Увод

1.1. Наночестице и њихове интеракције са ћелијама

Дуго је познато да су особине честица веома малих димензија другачије од особина истог материјала у волуминозном облику. Нанонаука и нанотехнологија, као области које проучавају особине материје на нанометарској скали почињу да се развијају крајем двадесетог века [1]. Године 1959. чувени физичар Ричард Фајнман је одржао предавање под називом „Има пуно простора доле“ (енгл. „*There's Plenty of Room at the Bottom*“), указујући на велики простор за манипулацију материјом на атомском нивоу. Идеје изложене на том предавању сматрају се зачетком онога што ће двадесетак година потом интензивно почети да расте као нанотехнологија [2]. Данас су наноматеријали део човекове свакодневице, присутни у бројним индустријским производима. Њихов потенцијал у медицини је огroman. Једна од највећих препрека на остваривању тог потенцијала је недостак података о ефектима наночестица на људско здравље [3].

Под наночестицама се подразумевају честице чија је бар једна димензија 1-100 nm (некада и до 1000 nm). Велики однос површине према запремини даје им специфичне физичкохемијске особине [4]. Неке од особина се не могу описати класичним моделима који се примењују на волуминозне материјале: код наночестица долазе до изражаја квантни ефекти [5, 6]. Начин синтезе наночестица је кључан за контролу њихових физичкохемијских особина [7]. Међутим, особине наночестица описане у лабораторијским условима нису једино што одређује њихове ефекте на биолошке системе. Уласком у ћелију, ткиво или телесну течност, на површину наночестице се адсорбују други присутни молекули. Наночестица тако задобија омотач, тзв. корону, који мења њене особине и афинитет према различитим молекулима и може пресудно утицати на ефекте наночестица на биолошке системе [8]. Уколико се наночестице већ у процесу синтезе обложе другим молекулом, то може спречити адсорпцију ћелијских молекула и модулацију оригиналних својстава синтетисаних наночестица [9, 10]. Наночестице се такође могу и функционализовати, везивањем за површину наночестице одређених молекула за препознавање, обележавање, транспорт лека у циљно ткиво, итд, чиме се могућности примене наночестица многоструко проширују [11-13].

Међу бројним наночестицама које данас постоје, метал-оксидне наночестице су вероватно највише коришћене и највише проучаване. Оне улазе у састав многих производа, укључујући медицинска средства и козметику, као што су креме за зарастање рана (ZnO) или за заштиту од UV зрачења (TiO₂, ZnO), зубни и коштани импланти (TiO₂), агенси који служе као контрастно средство у магнетној резонанцији (Fe₃O₄, Fe₂O₃), итд [14-17]. Испитује се њихово антибактеријско дејство, потенцијал у терапији тумора и производњи дијагностичких сензора [18, 19]. Са друге стране, показано је да све метал-оксидне наночестице могу имати цитотоксичне и проинфламаторне ефекте, изазване неодговарајућим физичкохемијским особинама и примењеним дозама, као и да се њихови ефекти на различите типове ћелија разликују [20]. Заједничка особина ових наночестица је стварање реактивних кисеоничних врста у ћелији (енгл. *reactive oxygen species*, ROS), а неке од њих делују и преко металног јона који отпуштају. Оба механизма деловања наночестица могу имати корисне и штетне ефекте на ћелију [19]. Поред

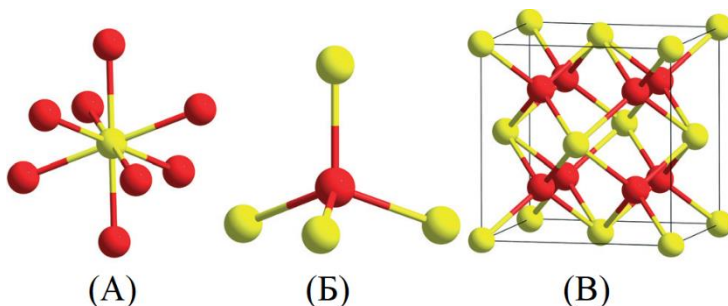
заједничких, свака врста метал-оксидних наночестица има своје специфичне карактеристике, па бројне студије истичу потребу за појединачним испитивањем утицаја различитих врста метал-оксидних наночестица на ћелију, односно њене сигналне путеве. У оквиру ове дисертације, биће испитивани ефекти наночестица CeO_2 и ZnO на ћелије човека.

1.1.1. Наночестице церијум диоксида

1.1.1.1. Основна физичкохемијска својства

Церијум је други по реду и најзаступљенији елемент из групе лантаноида или тзв. елемената ретких земаља [21]. Ретке земље карактеришу непопуњене $4f$ орбитале, заклоњене у унутрашњости атома електронима p и d орбитала, што овим елементима даје карактеристичне каталитичке, магнетне и електронске особине [22]. Церијум је први у низу елемената у периодном систему који садржи електроне у $4f$ орбитали ($\text{Xe } 4f^1 5d^1 6s^2$), захваљујући чему се може наћи у два оксидациона стања, Ce^{4+} и Ce^{3+} [2].

Оксид церијума, CeO_2 , је прашкасто једињење бледожуте боје, нерастворљиво у води; у форми нанокристала, боја праха је интензивнија, а под адекватним условима могуће је постићи његову делимичну растворљивост [23]. Одликује га висок индекс преламања, транспарентност у видљивој и блиској инфрацрвеној области и отпорност на високе температуре. Према електронској структури, CeO_2 је изолатор [24]. CeO_2 је флуоритне структуре, чија јединична ћелија има формулу Ce_4O_8 и приказана је на слици 1.1Ц [2]. Сваки атом церијума је координисан са по 8 атома кисеоника (слика 1.1А), док је сваки атом кисеоника координисан са по четири атома церијума (слика 1.1Б).

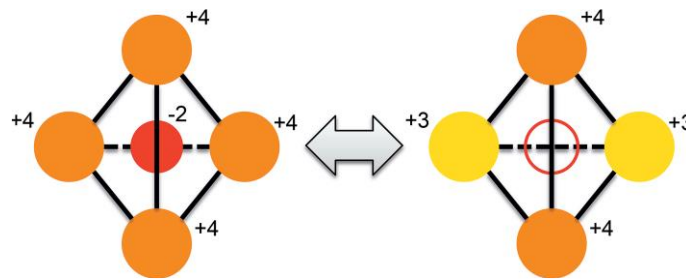


Слика 1.1. Кристална структура CeO_2 (атоми церијума су жуто обојени, атоми кисеоника црвено). (А) Осмоструко координисан атом церијума, (Б) четвороструко координисан атом кисеоника, (В) јединична ћелија кристала CeO_2 , где је димензија сваке ивице 0,51 nm. Преузето из [2].

Зависно од услова синтезе, један кристалит CeO_2 , основни градивни елемент наночестице, се може састојати од неколико или великог броја јединичних ћелија. Теоретски, најмањи могући кристалит CeO_2 састоји се од 8 јединица ($2 \times 2 \times 2$) и наночестица која га садржи има димензије (1,1 x 1,1 x 1,1) nm [25]. У пракси, наночестице CeO_2 се ретко састоје из само једног кристалита [26]. Саме наночестице CeO_2 се такође могу удруживати и формирати агрегате различитих (контролисаних) облика, нпр. сфере или штапиће, или се депоновати на површине у виду нанофилма [27-29]. Због тога су различите методе потребне за карактеризацију димензија и структуре наночестица: рендгенска дифракција показује величину кристалита и тип симетрије, електронска микроскопија величину саме наночестице, а метода динамичког расејања светлости

јонски радијус честице, тј. димензије честице или кластера честица (ако постоје) са јонима адсорбованим на површини [30].

Кристална решетка CeO_2 садржи значајну концентрацију унутрашњих дефеката, кисеоничних ваканција, које настају губљењем једног или више атома кисеоника [31, 32]. Укупно наелектрисање се одржава балансом између кисеоничних ваканција и валенце церијума (слика 1.2). Тако се стање решетке мења из CeO_2 у CeO_{2-x} , у исто време са променом односа концентрација $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ јона. Распоред и концентрација редукованих Ce^{3+} јона у односу на ваканцију је још увек предмет истраживања, али је недвосмислено да се концентрација Ce^{3+} јона и кисеоничних ваканција повећава са смањењем димензија наночестица [2, 26]. Управо та способност да, без нарушавања флуоритне структуре, лако отпусти из и прими у кристалну решетку атом кисеоника, даје велики каталитички потенцијал наночестицама CeO_2 . Тај потенцијал има своју индустријску примену [33], али је кључан и за биолошке активности CeO_2 [34]. Допирање CeO_2 атомима других метала такође може утицати на концентрацију кисеоничних ваканција, а тиме и на каталитичку активност наночестица [35].



Слика 1.2. Упрошћени шематски приказ прерасподеле наелектрисања у кристалној решетки CeO_2 након формирања кисеоничне ваканције. Са леве стране су приказани тетраедарски атоми Ce^{4+} (наранџасти кругови) са атомом кисеоника у центру (црвени круг). Са десне стране је приказана редукција Ce^{4+} у Ce^{3+} (жути кругови) која прати кисеоничну ваканцију (неиспуњена црвена кружница). Сива стрелица показује кружење између два приказана стања. Преузето из [36].

Развијене су бројне методе за синтезу наночестица CeO_2 , од којих су најчешће преципитација [37], хидротермална синтеза [38], самопропагирајућа синтеза на собној температури [39], сол-гел метода [40], итд. Полазне супстанце су по правилу извор Ce^{3+} јона и оксиданс који их конвертује у Ce^{4+} , уз присуство стабилизатора, од чије концентрације и особина зависи финална величина наночестице. Најпре настаје раствор презасићен јонима, у ком започиње нуклеација кристала. Стабилизатор прекида реакцију у жељеном моменту [2]. Постоје такође методе синтезе које подразумевају облагање честица супстанцама попут цитратних јона, декстрана, глукозе или синтетичких полимера, којима се неутралише површинско наелектрисање наночестица и спречава агрегација [41, 42]. На тај начин се могу добити веома стабилне дисперзије наночестица. Последњих године развијају се и методе тзв. зелене синтезе како ових, тако и других врста наночестица. У таквим процедурама као једна од полазних супстанци користе се биљке, гљиве, природни полимери и нутријенти [43-45]. На пример, синтетисане су CeO_2 наночестице коришћењем екстракта листа маслине [46] или меда [47] као стабилизатора. Оваква синтеза је еколошки и финансијски значајно повољнија од хемијске синтезе. Током синтезе, настоји се на строгој контроли свих њених корака, с обзиром да они утичу на величину и морфологију честице, а тиме на њену (ре)активност.

Церијум диоксид налази примену у индустрији од шездесетих година двадесетог века [2]. Користи се за хемијско механичко полирање оптичких елемената, декоративних стакала, огледала [2, 48], поларизацију полупроводника [49], затим као катализатор у филтерима аутомобила, где

катализује оксидацију угљен-моноксида [50]. Такође се користи и за израду електрода у гасним сензорима и у горивним ћелијама са чврстим оксидима [51]. У биомедицини се наночестице CeO_2 проучавају и развијају као антиоксиданси [52], лекови за различите болести укључујући малигне [53-55], бактерициди [44], затим као носачи лекова [56], базе за различите дијагностичке биосензоре [57, 58]. Због наведених потенцијала, већ постојеће примене и последичног депоновања у природи, веома је битно испитати могућу штетност CeO_2 за човека и његову околину. Бројне студије су посвећене овом проблему, али њихови резултати до данас нису усаглашени [59].

1.1.1.2. Механизми интеракције са ћелијом

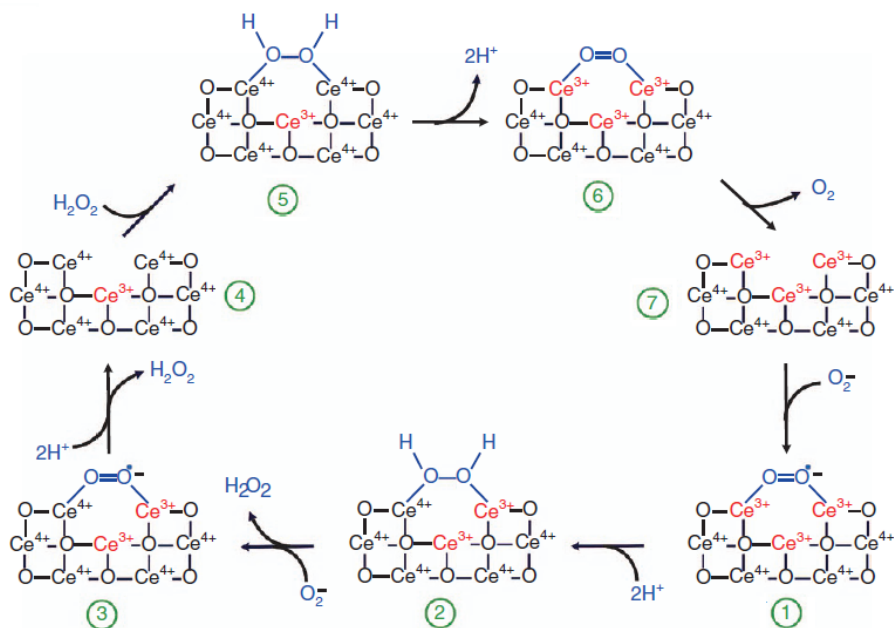
Наночестице CeO_2 се уносе у ћелију ендоцитозом, како зависном од клатрина, тако и неспецифичном: у експериментима, најчешће се кластери наночестица електростатички адсорбују на површину ћелије у култури, где их плазмемембрана обухвата и уноси у унутрашњост [60, 61]. Такође се могу унети и пасивном дифузијом кроз мембрану [62]. Тако унесене остају у цитоплазми, најчешће у перинуклеарним областима, или се ендозоми спајају са лизозомима и наночестице доспевају у киселу лизозомску средину [63]. Сматра се да различита окружења наночестица имају утицај на њихове активности унутар ћелије [35].

Највише истражена, а вероватно и најважнија активност наночестица CeO_2 у унутарћелијској средини је каталитичка активност, при којој наночестице имитирају ћелијске ензиме: супероксид дисмутазу (енгл. *-superoxide dismutase*, SOD), каталазу, пероксидазу, оксидазу, фосфатазу, итд [34, 64]. У истраживањима је посебно пажња посвећена SOD и каталазној активности, с обзиром да ова два ензима, разградњом супероксидног аниона ($\text{O}_2^{\cdot -}$), односно водоник пероксида (H_2O_2), штите ћелију од оксидативног стреса [55]. Осим ензимима сличне активности, наночестице CeO_2 имају способност некаталитичке хемијске редукције реактивних кисеоничних и азотних врста, где имају улогу редукционог средства а не катализатора [65]. Иако су ензимске и оксидо-редукционе активности наночестица CeO_2 у *in vitro* и *in vivo* системима потврђене [44, 66-68], познавање механизма њиховог остваривања је и даље претежно на нивоу теоријских хипотеза, постављених на основу познатих особина наночестица и рачунарских симулација [65, 69].

На слици 1.3 приказан је предложен механизам преко ког CeO_2 остварује тзв. миметичку (имитирајућу) активност SOD [70]. У кораку (1) $\text{O}_2^{\cdot -}$ се везује преко два атома Ce^{3+} за место кисеоничне ваканције у CeO_2 . Примањем два протона из окружења, један Ce^{3+} се оксидује у Ce^{4+} , а настаје и ослобађа се H_2O_2 (2). Тиме се отвара простор за везивање новог $\text{O}_2^{\cdot -}$ и процес се понавља (3), резултујући оксидацијом другог Ce^{3+} (4). За два оксидована атома церијума се затим везује H_2O_2 (5), који их редукује до Ce^{3+} (6). Ослобађањем кисеоника регенерише се почетна ваканција (7) и почиње нови редокс циклус.

Водоник пероксид који настаје у овој реакцији је такође штетан, јер као супстрат Фентонове реакције даје веома токсичне хидроксилне радикале, OH^{\cdot} [71]. Међутим, наночестице CeO_2 такође имају и каталазну активност, тј. посредују у деградацији H_2O_2 на сличан начин као природне ћелијске каталазе [72, 73]. Да би ове две каталитичке активности CeO_2 функционисале на ефикасан и координисан начин неопходни су одређени услови. Промена величине честице, односа $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$, јонског састава и киселости средине могу ову равнотежу померити, тако да једна од активности постане доминантна. Показано је да је каталазна активност CeO_2 израженија при вишој концентрацији Ce^{4+} , за разлику од SOD активности, која под истим условима слаби [73, 74]. Супротно, у киселој средини, каталазна активност CeO_2 слаби [21], а исто је показано и за способност елиминације OH^{\cdot} , што указује на антиоксидативну активност наночестица CeO_2 у

физиолошким условима [75]. Такође је показано да код наночестица у фосфатном пуферу слаби SOD-миметичка активност, а расте каталазна [76]. С обзиром да су фосфатни јони веома заступљени у унутарћелијској средини, каталитичка активност CeO_2 у ћелији тиме може бити модулисана.



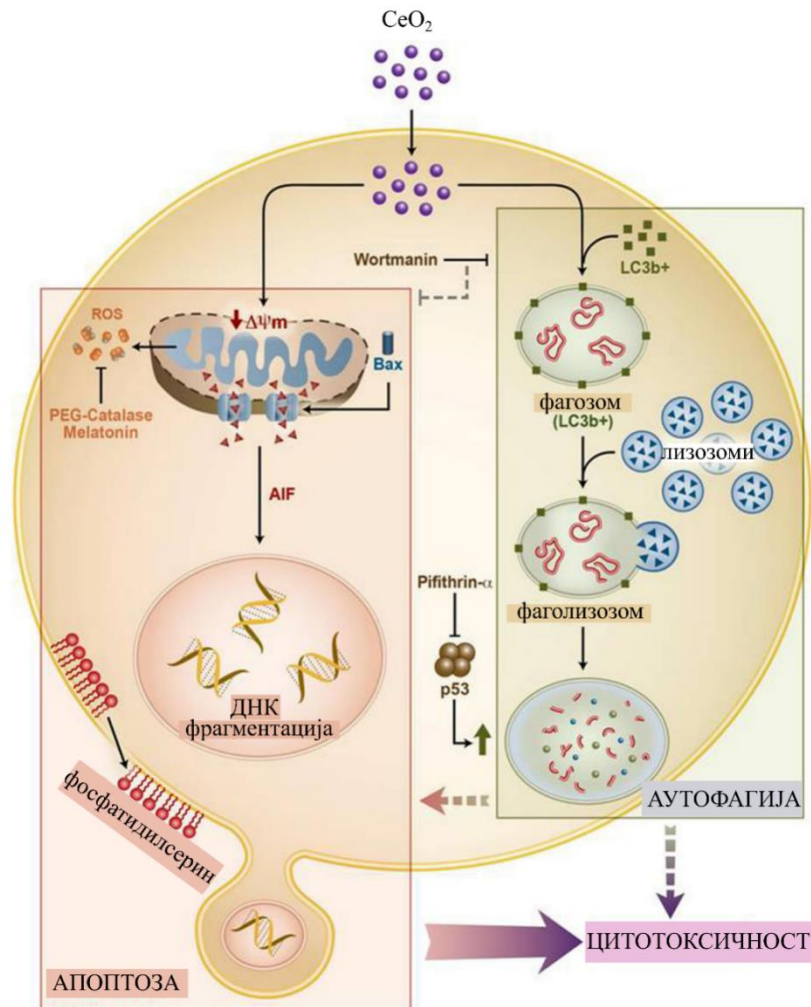
Слика 1.3. Предложени механизам SOD-миметичке активности наночестица CeO_2 (преузето из [70]).

Осим што делују као антиоксиданси, наночестице CeO_2 могу такође катализовати реакције оксидације разичитих супстрата [77, 78]. Реакције директне оксидације наночестицама CeO_2 су такође могуће, а однос анти- и про-оксидативне активности CeO_2 зависи од редокс-потенцијала супстрата као и од односа $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ на површини честице: у неколико студија се показало да је смањен однос $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ одговоран за доминацију оксидативних активности [35, 79]. Показано је такође да наночестице CeO_2 могу бити одговорне за пероксидацију липида и фосфолипида [80].

Још једна потенцијално важна ензимска улога наночестица CeO_2 је опонашање дејства фосфатазе, тј. улога у хидролизи фосфоестарских веза [81]. Показано је да овај ефекат наночестице CeO_2 могу испољавати на бројне биолошке молекуле који садрже фосфоестарску везу, међу којима су ДНК, АТР, фосфопротеини [69]. Предложени су различити механизми ове реакције, од којих се неки остварују посредством Ce^{3+} , а неки посредством Ce^{4+} [69, 82, 83].

Иако, дакле, по својим фичко-хемијским особинама наночестице CeO_2 имају потенцијал моћног антиоксиданса, прооксидативно дејство је такође очекивано, а дисбаланс међу њима може довести до цитотоксичних ефеката наночестица. Сматра се да је главни узрок токсичности CeO_2 , која је у неким случајевима показана у *in vitro* али и *in vivo* студијама, управо индукција оксидативног стреса, који резултује апоптозом [84-86]. Hussain и сарадници [87] су испитивали цитотоксични ефекат наночестица CeO_2 на моноците човека (слика 1.4). Детектована је фрагментација молекула ДНК, индукција ћелијске смрти доминантно апоптотског типа, уз деполаризацију мембрана митохондрија и колокализацију проапоптотских протеина Вах са митохондријама, што указује на унутрашњи (митохондријски) пут апоптозе. У истој студији детектована је и аутофагија третираних ћелија, и то не као протективни, већ као један од механизма ћелијске смрти, будући да је инхибиција аутофагије значајно повећала вијабилност

ћелија. У прилог индуковања апоптозе посредоване митохондријама говоре и студије у којима је детектован повећан ниво цитохрома Ц у цитоплазми ћелија третираних наночестицама CeO_2 [12, 88]. У овим ћелијама је такође детектована појачана активност каспаза 3 и 9, док се у студији на моноцитима активност ових ензима није могла регистровати. Показало се да је токсичност наночестица CeO_2 у великој мери зависна од величине наночестица, при чему су се, у општем случају, мање честице показале токсичнијим, а крупни агрегати потпуно нетоксичним [59].



Слика 1.4. Шематски приказ механизма ћелијске смрти индуковане наночестицама CeO_2 (преузето из [87]). Са леве стране је описан механизам апоптозе који укључује смањен мембрански потенцијал, колокализацију *Bax* протеина и фрагментацију ДНК, посредовану фактором индукције апоптозе, АИФ. Апоптоза је детектована на основу излагања фосфатидилсерина на спољашњој страни ћелијске мембране. Са десне стране је приказана аутофагија, која расте при инхибицији тумор протеина p53. За показивање механизма коришћена је селективна инхибиција аутофагије супстанцом Wortmanin, протеина p53 супстанцом Pifithrin- α и реактивних кисеоничних врста пореклом из оштећених митохондрија супстанцом каталаза PEG[87].

Међутим, изгледа да наночестице CeO_2 могу остварити антитуморско дејство и независно од оксидоредукционих процеса. У једној студији, наночестице CeO_2 су допиране самаријумом, чиме су изгубиле оксидоредукциони потенцијал, али је њихов позитиван утицај на радиосензитизацију HaCat кератиноцита ипак забележен [4]. Наиме, у ћелијама оштећеним

зрачењем, наночестице CeO_2 су допринеле поновном успостављању контролних тачака у ћелијском циклусу, у којима су регистрована непоправљива оштећења молекула ДНК и покренута апоптоза са циљем елиминације оштећене ћелије. У другој студији су наночестице CeO_2 инхибирале пролиферацију и миграцију ћелија тумора желуца активацијом пута преноса сигнала MAP киназа, без промене нивоа ROS у ћелији [89]. Механизми не-редокс дејства наночестица CeO_2 су и даље непознаница, мада је неколико објашњења предложено. Једно од њих говори да акумулација агломерата наночестица у ћелијама или органима доводи до оштећења органела и ослобађања протеаза, које активирају инфламацију и ћелијску смрт [59].

Постоје индикације да је оксидативно токсично дејство наночестица CeO_2 чешће код туморских него код неизмењених (нетрансформисаних) ћелија [4, 90, 91]. Овакав ефекат се углавном приписује разлици у рН вредности између туморске и неизмењене ћелије, односно између лизозома и цитосола, будући да су у неким случајевима наночестице CeO_2 локализоване у различитим одељцима код туморских и неизмењених ћелија [59, 92]. Кисела средина инхибира каталазну активност CeO_2 , те се тако фаворизује оксидативно дејство CeO_2 . Ипак, разлика у киселости између туморске и неизмењене ћелије је упитна, а свакако није велика [93], нарочито у *in vitro* условима ћелијске културе, па је објашњење које укључује лизозоме вероватније. Међутим, бројни су и случајеви са обрнутим исходом, тј. када су се наночестице CeO_2 показале токсичним за неизмењенисане и/или нетоксичним за туморске ћелије [94-96]. Уз специфичну природу наночестица CeO_2 , бројне чиниоце који одређују њихове особине и балансирање између супротстављених активности наночестица, не чуди што су различити сценарији у интеракцији са ћелијом могући. Све потенцијалне ефекте CeO_2 наночестица на ћелије је потребно што боље упознати, како бисмо се приближили синтези наночестица са жељеним улогама и особинама.

1.1.1.3. Ефекти наночестица CeO_2 на HeLa и MRC-5 ћелије

Због бројних потенцијалних примена наночестица CeO_2 у индустрији и биомедицини и њиховог могућег селективног дејства, важно је урадити студије ефеката ових наночестица на моделима туморских и неизмењених нетрансформисаних ћелија. У овој дисертацији су, као модел за туморске, коришћене ћелије карцинома грлића материце линије HeLa, и MRC-5, фетални фибробласти плућа, као модел за нетрансформисане ћелије. Због тога ће у овом поглављу бити изложен сажет преглед литературе о претходним студијама ефеката наночестица CeO_2 на HeLa и MRC-5 ћелије.

HeLa ћелије спадају у ћелијске линије у којима је, поред заштитног ефекта у условима оксидативног стреса, показан и директан цитотоксични ефекат наночестица CeO_2 . Чест је случај да је детектована цитотоксичност омогућена облагањем наночестица другим молекулима, као и да је везана за факторе средине. Liu и сарадници су синтетисали наночестице CeO_2 са метало-органичким омотачем, које изазивају апоптозу путем оксидативног стреса у хипоксичним HeLa ћелијама, у којима је проапоптотска активност необложених наночестица ниска [97]. У једном новијем истраживању је показано да наночестице CeO_2 обложене органичким молекулима који имитирају састав ћелијске мембране изазивају веома мали пад вијабилности HeLa ћелија у неутралној средини, те би се могле сматрати биокомпатибилним и користити, на пример, за производњу носача лекова или биосензора. Међутим, при паду рН средине, постају високо цитотоксичне [98]. Токсично дејство на HeLa ћелије је детектовано и у случају појединих необложених CeO_2 наночестица. На пример, дозно-зависно смањење вијабилности HeLa ћелија је показано након третмана наночестицама CeO_2 синтетисаним у зеленој синтези, коришћењем плодова бамије за добијање средства за редукцију и стабилизацију честица [99]. Наночестице

добијене једноставном синтезом, као што је метода преципитације, показале су токсичан ефекат уз високу продукцију реактивних кисеоничних врста код HeLa ћелија, док је код HFL-1 ћелија, неизмењених феталних фибробласта плућа, не само цитотоксичан ефекат, него и способност уласка у ћелију ових наночестица, била знатно нижа [100].

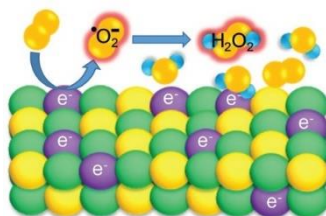
HFL-1 ћелије су веома сродне MRC-5 ћелијама. О токсичном дејству на саме MRC-5 ћелије у литератури има знатно мање података. У једној студији је показано да при мањим концентрацијама наночестице CeO_2 имају цитопротективно, а при већим концентрацијама цитотоксично дејство на MRC-5 ћелије, али да је за оба ефекта неопходна одређена стабилност расподеле величине наночестица, постигнута филтрирањем дисперзије. У другој студији, MRC-5 ћелије нису реаговале на третман необложеним наночестицама CeO_2 у трајању од 72 сата [39].

Овако разноврсни литературни подаци о ефектима наночестица CeO_2 на ћелије упућују на чињеницу да је потенцијал примене ових наночестица у биомедицини велики, уколико се механизми њиховог дејства и фактори од којих зависе довољно добро упознају.

1.1.2. Наночестице цинк оксида

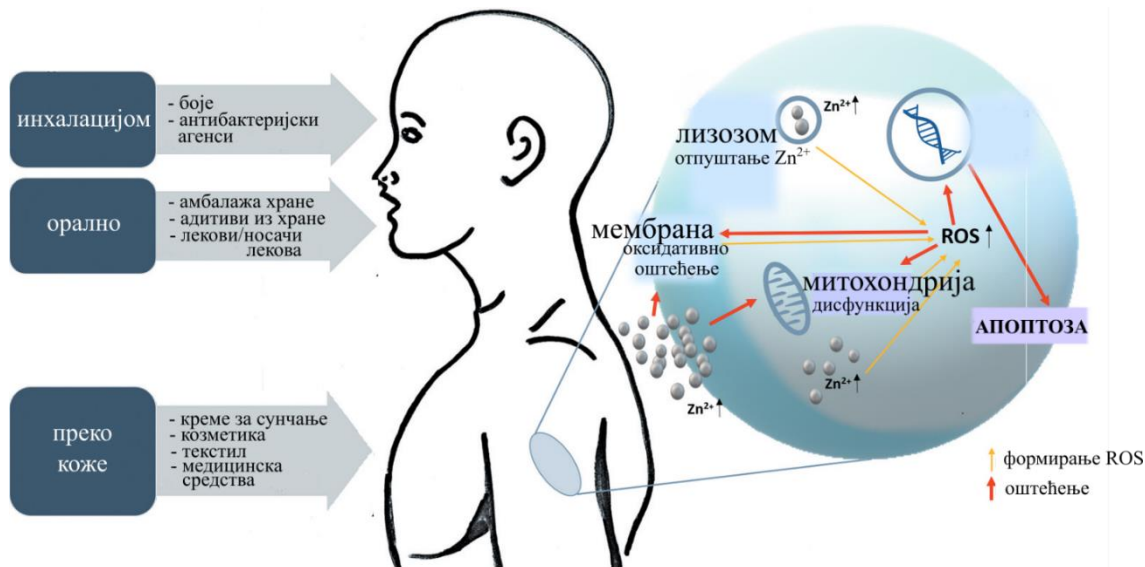
1.1.2.1. Основна физичкохемијска својства и примена

Цинк оксид (ZnO) је прашкасто кристално једињење беле боје, нерастворљиво у води. Када је у облику наночестица (димензија до 100 nm), растворљивост је побољшана, као и друге особине ZnO , које омогућавају његову широку примену [101]. ZnO је полупроводник, што је једно од његових најкориснијих својстава када је примена у питању. Код полупроводника се прелази електрона из валентне у проводну зону могу побудити зрачењем одређене енергије, услед чега у валентној зони остају шупљине. Електрони и шупљине се обично рекомбинују веома брзо, али могу и мигрирати на површину и реаговати са другим молекулима [102]. Овај потенцијал оксидоредукције је искоришћен у фотокаталитичкој примени наночестица ZnO , а такође игра кључну улогу у деловању на ћелије [103, 104]. Наиме, код наночестица ZnO и у одсуству електромагнетне побуде постоји велики број оваквих парова електрон-шупљина, јер са повећањем односа површина/запремина честице, расте број кисеоничних ваканција [105, 106]. Електрони се при томе понашају као редукујуће, а шупљине као оксидујуће врсте. Као резултат интеракције наночестица са атомима кисеоника, хидроксилним јонима и водом у ћелији, може се формирати читава каскада реактивних кисеоничних врста, које драматично утичу на ћелијску вијабилност (слика 1.5) [107].



Слика 1.5. Један од механизма генерисања ROS на површини наночестице ZnO . Жутим су приказани атоми кисеоника, љубичастим кисеоничне ваканције, зеленим атоми цинка, а плавим атоми водоника (преузето из [105]).

У колоидним растворима, на површини наночестица ZnO се хемисорбују протони, који имају кључну улогу у интеракцијама наночестица са другим молекулима [102, 108]. У киселој средини, хемисорбовани протони дају наночестици позитивно наелектрисање. У неутралној и базној средини, хемисорбовани протони напуштају површину наночестице, остављајући је негативно наелектрисаном. Захваљујући површинском наелектрисању, наночестице остварују електростатичке интеракције [109]. На физиолошким рН вредностима укупно наелектрисање наночестице ZnO је позитивно, што олакшава везивање за фосфатне групе мембранских фосфолипида и улазак у ћелију [110, 111]. Једноставна манипулација хидроксилним групама на површини наночестице олакшава њену функционализацију и примену као носача лека или биосензора [112, 113].



Слика 1.6. Начини уноса наночестица ZnO у организам човека и механизам могућег токсичног ефекта. Преузето и модификовано из [114].

За разлику од CeO_2 , наночестице ZnO су веома раширене у свакодневној употреби, а механизми њихове потенцијалне токсичности су знатно боље проучени. Примена наночестица ZnO се заснива на њиховим способностима антибактеријског деловања [115], заштити од ултраљубичастиг зрачења [116], топлотној проводљивости [117], каталитичким својствима, итд. На слици 1.6 приказани су најчешћи извори наночестица ZnO у свакодневици. Светска здравствена организација означила је производе који их садрже као безбедне [118]. Међутим, постоје ризици у случају гутања наночестица, које може оштетити унутрашње органе [119], као и удисања, које такође може изазвати обољења респираторних органа [120]. У комбинацији са неким другим материјама, као што је толуен у бојама, удисање може довести до испољавања изражене токсичности [121]. Истраживања су показала да наночестице ZnO не пролазе кожную баријеру, али у случају постојања рана, постоји могућност продирања у дубље слојеве коже [122, 123]. Због тако раширене употребе, наночестице ZnO се налазе у високој концентрацији у земљишту, а посебно у води [124, 125].

Морфолошке особине наночестица, растворљивост, површинско наелектрисање, понашање у одговору на киселост средине и сличне карактеристике зависе од начина синтезе честица. Они су у случају наночестица ZnO веома бројни и веома добро развијени, тако да је могуће постићи висок ниво контроле особина наночестица [126, 127]. У великом броју случајева

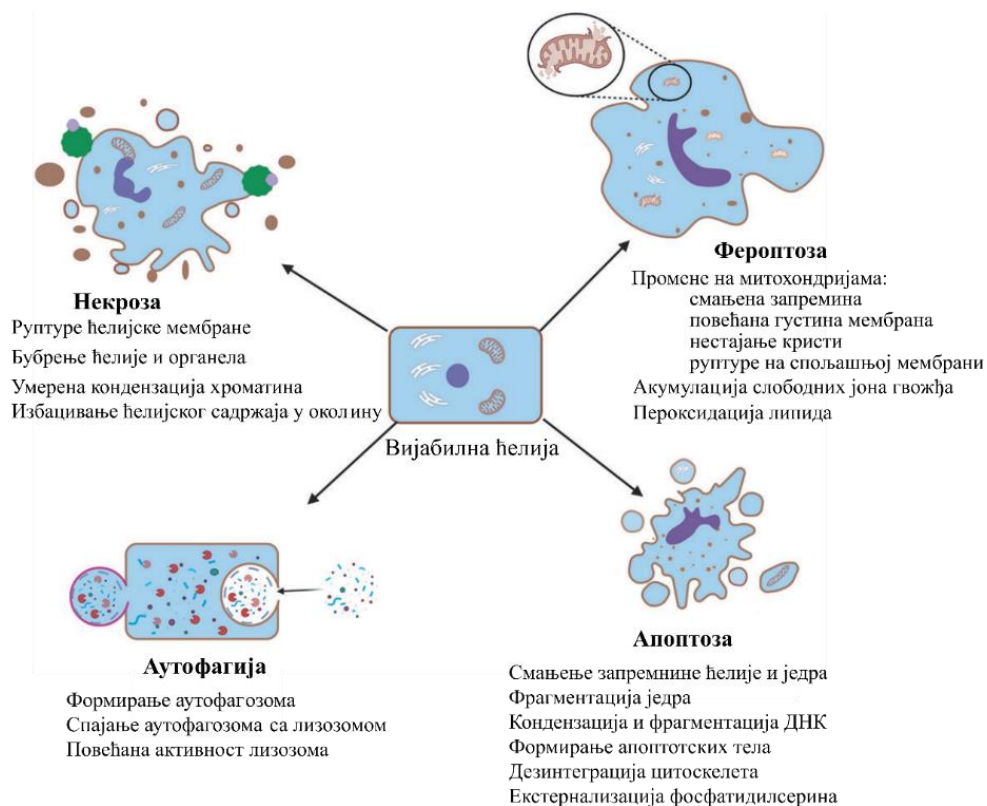
показано је да величина као ни облик наночестице ZnO нема велики утицај на токсичност, која највише зависи од ефеката површинског наелектрисања [128, 129].

1.1.2.2. Механизми интеракције са ћелијом

Основни механизам цитотоксичног деловања наночестица ZnO остварује се путем оксидативног стреса, који генеришу наночестице [102]. Стварање оксидативног стреса изазива и јон Zn^{2+} , који се издваја из наночестица у киселој средини [102, 128]. Оксидативни стрес узрокује индукцију апоптозе посредоване унутраћелијским сигнаlima. Овај механизам приказан је на слици 1.6 (десно). Будући да је јон Zn^{2+} кофактор важних ћелијских ензима и да је показано да 15 % ћелијских протеина има способност везивања цинка, висока концентрација ZnO може довести до поремећаја у активности протеина и процеса које протеини регулишу [118, 130, 131].

Иако је према досадашњим истраживањима апоптоза доминантан модалитет ћелијске смрти изазване наночестицама ZnO, и други типови ћелијске смрти су детектовани [132-134]. Пероксидација мембранских липида и денатурација протеина под утицајем реактивних кисеоничних врста може довести до некрозе [129, 135]. Аутофагија је детектована као механизам којим се ћелија штити од токсичности наночестица ZnO, али ефикасно функционише до одређеног степена: појачан интензитет аутофагије доводи до дисфункције лизозома, аутофагија се зауставља и ћелија умире [122, 136, 137]. На слици 1.7 приказане су основне карактеристике различитих врста ћелијске смрти изазваних наночестицама ZnO. Управо су биохемијске и морфолошке манифестације ћелијске смрти оно што се на третираним ћелијама проучава помоћу вибрационе спектроскопије, односно микроскопије на бази атомских сила.

Цитотоксични ефекти релативно ниске концентрације наночестица ZnO (углавном око 10 $\mu\text{g/ml}$) на еукариотске ћелије у култури показани су протеклих неколико деценија у великом броју студија [125, 138-141]. Ипак, постоје и студије у којима релативно високе дозе наночестица ZnO нису утицале на ћелијску вијабилност, као нпр. истраживање Reddy и сарадника [142]. Ови аутори испитују утицај дозе од 400 $\mu\text{g/ml}$ ZnO на бактеријске ћелије и лимфоците човека и закључују да наночестице делују селективно на бактерије, без токсичног утицаја на ћелије човека. У другим истраживањима, наночестице ZnO су се показале нетоксичним за примарне ћелије коже и плућног епитела, на супрот токсичном дејству на лимфоците и различите измењене ћелије [133, 143, 144].



Слика 1.7. Основне морфолошке и биохемијске карактеристике модалитета ћелијске смрти (слика преузета из Ni и модификована према [145])

1.1.2.3. Ефекти наночестица ZnO на HeLa и MRC-5 ћелије

Потенцијална селективност наночестица ZnO према туморским у односу на неизмењене ћелије је истраживана у бројним студијама на различитим ћелијским линијама, међу којима су и HeLa и MRC-5 ћелије. Цитотоксично дејство су код HeLa (туморских) ћелија показали Sirelkhatim и сарадници [141], као и Yang и сарадници [146]. Супротно, код MRC-5 (неизмењених) ћелија је показано одсуство токсичног ефекта у односу на неколико туморских ћелијских линија [147, 148]. У литератури нема података о ефектима наночестица ZnO на ове две ћелијске линије, а да су упоређени у заједничкој студији.

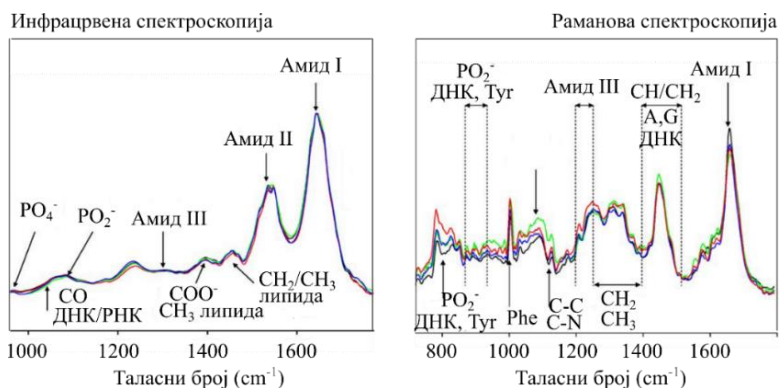
1.2. Вибрациона спектроскопија ћелија третираних наночестицама

Вибрациона спектроскопија као метода за проучавање промена на ћелијама развија се већ готово пола века [149]. За то постоји низ разлога: може се извести без компликоване припреме узорака, скупе хемикалије или боје [150]; уколико су експериментални услови адекватни, потпуно је недеструктивна по узорак [151]; уз одговарајућу опрему може се изводити на живим ћелијама и може пратити промене у реалном времену [152]; вибрациони спектар једне ћелије садржи у себи податке о вибрацијама веза свих ћелијских молекула и описује широк спектар хемијских и структурних промена, по чему би се ова метода могла убројати у методе системске биологије и

придружити низу дисциплина које у имену садрже „-омика“ [153-155]. Промене вибрационих модова указују на промене не само у садржају молекула или функционалних група у молекулима, већ и на њихове конформације и промене у окружењу [156, 157]. Вибрационом спектроскопијом се могу вршити анализе на нивоу појединачне ћелије (енгл. *single cell*), што омогућава детекцију финих промена и добијање довољне количине података из узорка од свега неколико десетина или неколико стотина ћелија [158].

Описане особине вибрациону спектроскопију чине корисном за базична научна испитивања ћелија. Будући да вибрациони спектри садрже велики број модова, анализа информација које крије један спектар није једноставна. Она се може засновати на праћењу спектралних маркера, тј. појединих модова или ширих спектралних трака, који су претходним истраживањима повезани са вибрацијама одређених молекула или конформација [159, 160]. Други приступ у анализи који не подразумева претходно познавање маркера промена је класификација ћелија, односно њихових спектара, неком од метода мултиваријантне статистике. Такве методе служе како за боље препознавање разлика међу спектрима које иначе нису лако уочљиве, тако и за грађење модела на основу ког ће спектри ћелија непознатих карактеристика бити препознати као припадници одређене класе ћелија [161]. Методе класификације имају нарочит потенцијал примене у медицинској дијагностици, у развијању сензора и алата за препознавање измењених ћелија [162-164].

Инфрацрвена и Раманова спектроскопија су две основне методе вибрационе спектроскопије и обе носе информацију о енергијама вибрационих прелаза анализата, у овом случају ћелијских молекула. Прва метода се заснива на мерењу апсорбоване енергије, која је једнака енергији вибрационог прелаза, док Раманова спектроскопија мери фреквенцију нееластично расејаног зрачења са вибрација анализата, на основу које се израчунава енергија вибрационих прелаза [151]. Због различитих механизма на којима се заснивају, изглед ова два спектра се разликује: они садрже различите вибрационе модове и делимично један другог допуњавају. На слици 1.8 приказана су два вибрациона спектра NaCaT ћелија, мерена инфрацрвеном и Рамановом спектроскопијом [165]. Теоријске основе вибрационе спектроскопије којима се дати механизми објашњавају детаљније су изложени у поглављу 3 ове дисертације. У истом поглављу дате су и теоријска и практична основа метода за анализу вибрационих спектара. У оквиру ове дисертације, за мерење вибрационих спектара ћелија третираних наночестицама коришћена је метода Раманове спектроскопије.



Слика 1.8. Вибрациони спектри NaCaT ћелија, преузети из рада Meade и сарадника [165]. Линијама различитих боја су представљени спектри добијени при различитим условима мерења. Стрелицама су обележени најважнији модови и назначени молекули или везе од којих потичу.

Раманова спектроскопија уз анализу спектра методама класификације може бити од користи при развијању нових врста наночестица и испитивању њихове (пожељне или непожељне) токсичности на различите ћелијске типове. Цитотоксичност наночестица се најчешће испитује преко стандардних тестова ћелијске вијабилности [166], који дају неистоветне а неретко и контрадикторне резултате [167]. Разлог томе је што се ови тестови базирају на једном од показатеља цитотоксичног ефекта, као што су нарушен интегритет ћелијске мембране [168, 169], смањење количине протеина у узорку ћелија [170], пад активности ћелијских митохондрија [171]. Тако, на пример, тест који се базира на оштећењима ћелијске мембране неће бити у стању да детектује ћелије у почетним фазама апоптозе изазване наночестицама [172]. Због тога се резултати једног теста обично верификују другим тестовима [173, 174]. Овакви тестови не дају објашњења механизма цитотоксичности, већ прате један општи параметар на ком су и засновани. За проучавање механизма цитотоксичности користе се захтевније и знатно скупље методе молекуларне биологије [175, 176]. Раманова спектроскопија, као метода којом се добија информација о широком опсегу промена у ћелији, у том контексту има очигледан потенцијал [177].

Испитивања интеракција између ћелије и наночестице помоћу Раманове спектроскопије најчешће се базирају на проучавању уласка наночестице у ћелију и њене унутарћелијске локализације техникама Рамановог мапирања, што се, пак, заснива на праћењу Раманових спектра наночестица и њиховог утицаја на ћелијски спектар [178, 179]. У литератури је описано свега неколико студија у којима се Рамановом спектроскопијом испитују промене самих ћелија третираних наночестицама [180, 181]. Међутим, постоји знатан број публикација које су се бавиле Рамановом спектроскопијом ћелија третираних другим цитотоксичним агенсима [182-184]. Њихови резултати пружају увид у спектралне манифестације догађаја попут ћелијске смрти и пропадања структуре и функције ћелијског материјала, што се може корелисати са променама узрокованим токсичним наночестицама.

Вероватно најчешће уочене спектралне промене при ћелијској смрти тичу се Раманових модова нуклеинских киселина, чији интензитет услед фрагментације молекула ДНК опада [185]. Међутим, у раним фазама апоптозе, интензитет ових модова може бити већи него код вијабилних ћелија, што је повезано са кондензацијом хроматина, односно згушњавањем молекула ДНК на мањем простору [182]. Такође, може се регистровати истовремени пораст интензитета једних и пад интензитета других Раманових модова нуклеинских киселина у ћелијском спектру. Наиме, модови ДНК потичу од вибрација фосфодиестарске везе у осовини молекула, али такође и од вибрација веза унутар азотних база, па и од дезоксирибозе [186]. Тако пораст интензитета модова азотних база уз пад интензитета модова окоснице ДНК може указивати на деградацију, односно већу изложеност азотних база услед хидролизе фосфодиестарске везе [187].

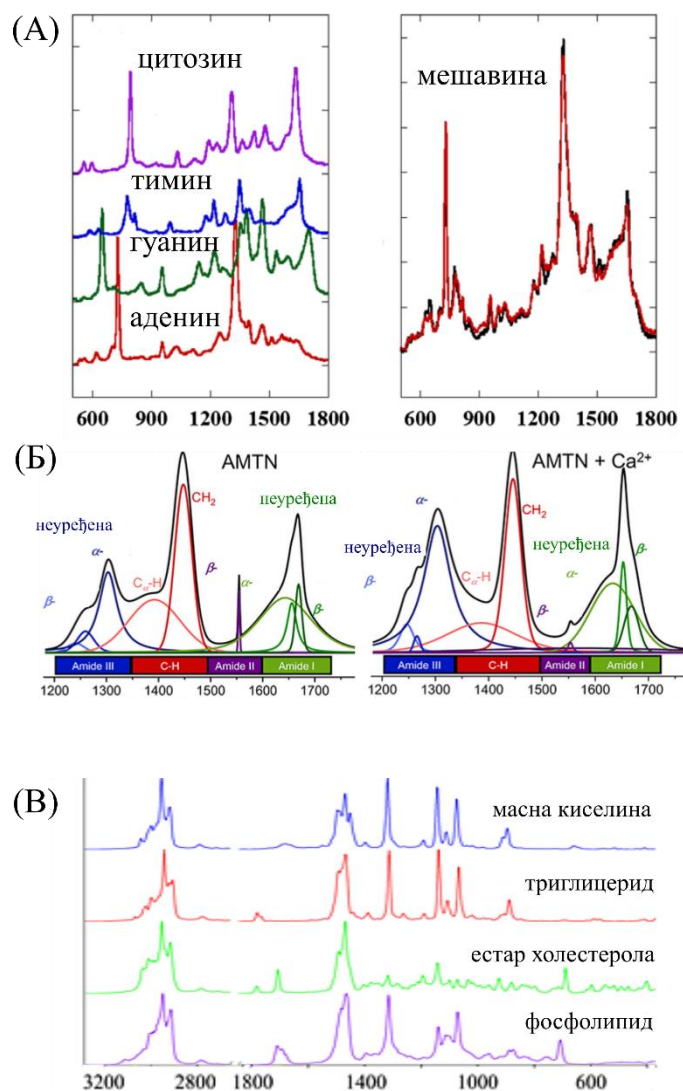
Сличан случај може се јавити и код протеина, променом односа модова пептидне везе и слободних аминокиселина [187]. Код протеина су уз то веома изражене спектралне траке (Амид I/II/III на слици 1.8) које се састоје из модова осетљивих на промене у секундарној структури и чија промена се такође може детектовати током апоптозе и некрозе [182, 188]. Такве промене могу рефлектовати агрегацију ћелијских протеина услед дисфункције метаболизма, денатурацију, реаранжман протеина ћелијске мембране или цитоскелета. Док се промене конформације одражавају на Раманов спектар на описан начин, хидролиза пептидне везе се може манифестовати као генерално опадање интензитета протеинских модова у спектру. Овакве промене регистроване су код ћелија у апоптози [182, 189], док су код некрозе мање изражене, вероватно услед интензивне агрегације протеина [182, 187]. Виши нивои организације нуклеинских киселина такође се одражавају на одговарајуће спектралне модове, што је опсежно испитивано на изолованој ДНК и РНК [190]. Резултати таквих мерења слабо су екстраполирани на анализу

ћелијских спектра, будући да ови модови нису толико интензивни као амидне траке, па модови других молекула у истој области отежавају једнозначно тумачење резултата.

Иако постоје значајне разлике између Раманових спектра липида који садрже различит садржај незасићених веза, стеролних структура или фосфатних група, ређи су извештаји о томе да је у ћелијском спектру детектован маркер одређене групе липида [191, 192]. Много чешћи је случај да се прати само интензитет најупечатљивијих липидних модова и тумачи као пад или пораст укупног садржаја липида [193, 194]. Тако је пораст садржаја липида детектован код ћелија у апоптози и секундарној некрози [182, 185]. Детаљнија анализа липидних модова могла би бити од посебног значаја за ћелије са израженом аутофагијом, као и за ћелије третиране наночестицама, с обзором на формирање аутофагозома, односно ендозома и значајан пораст мембранских структура унутар ћелије [136].

У Рамановом спектру ћелије јављају се и модови шећера, фосфата, као и појединих специфичних молекула, попут цитохрома или хема у еритроцитима, захваљујући посебном ефекту који металопротеини могу изазвати у интеракцији са побудним зрачењем [160, 195]. На слици 1.9 дати су примери Раманових спектра неких представника нуклеинских киселина, протеина и липида. Развијају се и алгоритми за анализу спектра којима се ћелијски спектри представљају преко комбинације спектра појединачних молекула и на тај начин се долази до разлика у заступљености датих молекула у различитим ћелијама [196, 197].

Из основне поставке методе Раманове спектроскопије произашло је више метода које у основи користе ефекат Рамановог расејања за добијање вибрационог спектра [198-201]. Коришћењем неких од њих, као што су SERS (енгл. *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*) и TERS (енгл. *Tip-Enhanced Raman Spectroscopy*), вишеструко се појачава сигнал, што омогућава да се уоче промене појединих иначе слабо изражених модова [202, 203]. Метода SERS подразумева појачавање интензитета расејања коришћењем плазмонских наночестица. Плазмонске наночестице се додатно могу обележити неким молекулом који служи за специфично везивање циљног молекула или молекулске секвенце у ћелији. На тај начин се могу селективно појачати спектрални модови који потичу од циљаних молекула. Ова метода је због бољег односа сигнал-шум и могућности да се анализа у извесној мери поједностави чешће коришћена за испитивање ћелија [204]. Такође, за обележиваче се могу додатно везати репортерски молекули који имају јачи SERS сигнал и преко њих посредно анализирати циљани ћелијски молекули. На пример, недавно је направљен SERS сензор за детектовање две микро РНК које се специфично експримирају у фероптози. Плазмонске наночестице су нанесене на хидрофобну хартију и тако је добијен SERS активни супстрат. За наночестицу су затим везане кратке ДНК секвенце, а за њих молекул боје који даје јак Раманов сигнал при датој фреквенцији ласера. ДНК секвенце су такве да се за њих са високим афинитетом везују поменуте микро РНК. Када се то догоди, молекул боје долази у контакт са SERS активним супстратом и региструје се интензиван Раманов сигнал [205]. Ипак, SERS подразумева коришћење додатних наночестица и хемикалија, знатно сложенији процес оптимизације мерења, али и резултате који више не представљају уопште или бар не у пуном смислу „отисак прста“ ћелије. И поред горе поменутих метода, конвенционална Раманова спектроскопија задржава своје предности и потенцијале и као таква је коришћена у оквиру ове докторске дисертације.



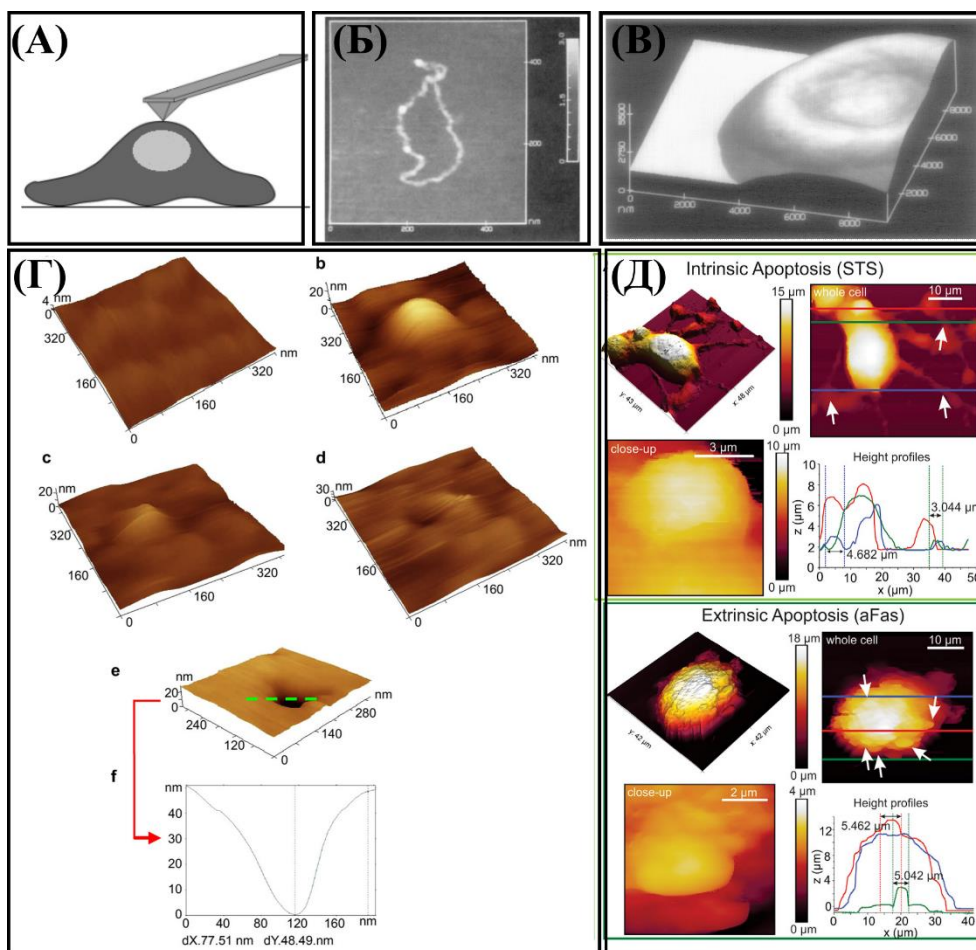
Слика 1.9. Примери Раманових спектра (А) нуклеобаза, (Б) протеина и (В) липида. У свим спектрима X оса представља таласни број (cm^{-1}) а Y оса интензитет Рамановог расејања (арбитарне јединице). (А) Лево су приказани Раманови спектри појединачних нуклеобаза, а десно спектар њихове мешавине [206]. (Б) Лево је приказан спектар протеина амелотина, а десно спектар истог протеина у присуству јона калцијума. Опсеци три амидне траке су означени зеленом, љубичастом и плавом бојом (изнад X осе), док су на спектрима приказани модови који сачињавају ове траке, а који одговарају структурама α -хеликса, β -плоча и неуређеној структури [207]. (В) Раманови спектри представника четири класе липида [183].

1.3. Морфолошке промене ћелија третираних наночестицама: осликавање на бази атомских сила

Микроскопија на бази атомских сила (енгл. *Atomic Force Microscopy*, AFM) спада у технике микроскопије скенирајућом сондом [208]. Сонда микроскопа се при мерењу налази веома близу узорку (на растојању од неколико атомских радијуса) и мери одређену физичку величину која се мења при интеракцији са узорком (слика 1.10А). На пример, могу се мерити међумолекулске силе одбијања, на основу којих ће се добити топографска слика узорка (видети поглавље 3.10). Сонда се креће изнад узорка по мрежи тачака дефинисаних координата и мерење се одвија на свакој од тачака, због чега се каже да сонда скенира узорак [209]. AFM, као и скенирајућа тунелска микроскопија (енгл. *Scanning Tunneling Microscope*, STM) [210] и скенирајућа електронска микроскопија (енгл. *Scanning Electron Microscopy*, SEM), омогућава добијање слика веома високе, чак и субнанометарске резолуције [211]. Све три технике се могу користити за осликавање биолошких узорака, али је примена STM ограничена због неопходне електричне проводљивости узорка или површине са којом узорак мора бити у тесном контакту [212]. Оно што разликује AFM од електронске микроскопије је могућност AFM-а да се добије права 3D слика узорка, односно његове површине, која је, када је, на пример, ћелија у питању, кључна за интеракцију са сигнаlima из спољашње средине. Такође, велика предност је и техника припреме узорка, која у случају AFM микроскопије ћелија не подразумева третирање узорка било каквим хемикалијама, које могу утицати на ћелијску структуру [213]. Штавише, мерења се могу вршити и у течности, у средини која је веома блиска физиолошкој, и на живим ћелијама [209].

Само две године пошто је направљен први AFM микроскоп [214], 1988. године публикована је прва AFM слика биолошког узорка. У питању су биле тзв. љубичасте мембране бактерије *Halobacterium halobium* [215]. Уследила су истраживања на другим биолошким структурама, укључујући и ћелије [216]. Убрзо је откривена могућност мерења у полуконтактном режиму, при ком узорак, због минимизираних контаката са сондом, практично не трпи оштећења, што је за биолошке узорке веома значајно [217]. Од тада ова микроскопска метода не престаје да се развија као техника за проучавање ћелија и ћелијских структура. Најчешће је употребљавана за добијање 3D слика ћелије у различитим контекстима и током различитих процеса, као што је ћелијска смрт [218], миграција ћелија [219], формирање синапси [220], разградња екстраћелијског матрикса при инвазији тумора [221], итд. Осим топографије, често се испитују и механичке особине ћелије, као што су еластичност и вискозност ћелије [222-224].

Када су у питању интеракције ћелије са наночестицама, AFM осликавање је коришћено углавном за проучавање уноса наночестица у ћелију [225-228] (слика 1.10Г). Различити модалитети ћелијске смрти, који могу бити узроковани интеракцијом ћелије са токсичним наночестицама, су нешто интензивније проучавани. Помоћу AFM микроскопа визуелизоване су руптуре на ћелијској мембрани у некрози, као и поре на једарној овојници у апоптози, деградација и фрагментација једра и формирање апоптотских тела [218, 229, 230]. На AFM сликама су уочене и деградационе промене различитих мембранских протрузија (филоподија, ламелиподија) и гликокаликса, повезане са ћелијском смрћу [224, 231].



Слика 1.10. AFM биолошких узорака. (А) Поједностављен приказ сонде AFM микроскопа током мерења на површини ћелије; (Б) Једна од првих AFM слика ДНК (плазмид *Escherichia coli*) [232]; (В) Једна од првих AFM слика ћелије (еритроцит човека) [216]; Г) AFM топографија неколико фаза проласка наночестице кроз ћелијску мембрану [226]; (Д) AFM топографије и висински профили ћелије у којој је апоптоза индукована унутрашњим (горње четири слике) и спољашњим путем (доње четири слике) [218].

Осим морфолошког осликавања, истраживања иду и у правцу дефинисања појединих квантитативних параметара који би уз статистичку анализу могли да служе за дискриминацију између ћелија у различитим физиолошким или патолошким стањима, на пример, између вијабилних и умирућих ћелија. На тај начин би AFM микроскопија могла да се користи у процени ефикасности деловања неког лека, или токсичности различитих агенаса, међу њима и наночестица [224]. Као такви параметри најчешће су испитиване висина и површинска храпавост ћелије. Kim и сарадници [233] су испитивали туморске ћелије третиране паклитакселом, хемотерапеутиком који индукује апоптозу, и утврдили пораст површинске храпавости третираних ћелија. Исто је показано у другој студији након третмана дексаметазоном [234]. Su и сарадници [231] су регистровали повећање храпавости HeLa ћелија у најранијем стадијуму апоптозе, и пре него што дође до екстернализације фосфатидилсерина, и показали да је повећање храпавости резултат дестабилизације актинског цитоскелета. Код ћелија у некрози такође је показана промена површинске храпавости. На пример, Kwon и сарадници [229] су испитивали морфологију ћелија третираних доксорубицином и етопсидом. Доксорубицин је индуковао

некрозу код већине ћелија, док је етопсид код једног процента ћелија довео до некрозе, а код другог до апоптозе. У оба случаја детектован је пораст просечне површинске храпавости и смањење висине у односу на нетретирание ћелије. Ипак, резултати појединих студија су у супротности са наведеним примерима и показују да површинска храпавост код ћелија у апоптози опада, што се објашњава хемијским променама ћелијске мембране и поремећајима цитоскелета [235-237]. Новија студија Van der Meeren и сарадника [218] је показала разлике у површинској храпавости и висинском профилу ћелија у различитим модалитетима ћелијске смрти, али такође и ћелија код којих је исти модалитет изазван различитим сигналним путевима (слика 1.10Д). Наиме, код ћелија код којих је апоптоза индукована спољашњим путем и код ћелија у фероптози примећен је изразит пораст површинске храпавости, за разлику од ћелија у апоптози индукованој унутрашњим путем и ћелија у некроптози. Иако су се на површини ћелија у апоптози покренутој унутрашњим путем могле уочити неправилне структуре, а код ћелија у некроптози поре на мембрани и заокругљивање, просечна висина ћелије је у оба случаја била мала, па су и колебања висине, којима је мерена храпавост, била ниска.

Један од разлога за контрадикторност резултата испитивања морфолошких параметара вероватно лежи у динамичности процеса ћелијског умирања, при ком ћелија пролази кроз различите фазе које између различитих експеримената нису синхронизоване. Површинској храпавости и висини ћелије могу допринети бројни фактори, као што су промене у цитоскелету, пупљење ћелијске мембране, формирање апоптотских тела и других мембранских структура, кондензација или фрагментација једра, бубрење цитоплазме и органела. Треба узети у обзир и методолошке аспекте, као што су начини на који су параметри измерени, израчунати и статистички процењени, који нису у различитим студијама истоветни. Такође, хемијски фиксативи могу узроковати промене у структури мембране и адхезивности ћелије, што ће се одразити на храпавост ћелије уколико је фиксирање претходило мерењу [238]. За напредак на пољу истраживања морфолошких квантитативних параметара као показатеља цитотоксичности потребно је још студија, које ће обухватити што већи број различито третираних узорака, уз што опсежнију паралелну карактеризацију испитиваних ћелија стандардним методама цитологије и молекуларне биологије.

2. Циљеви рада

Ово истраживање има два општа циља, који се затим гранају на више специфичних, али и међусобно зависних подциљева.

Први општи циљ је продубљивање сазнања о ефектима наночестица CeO_2 и ZnO на HeLa и MRC-5 ћелије, ћелијских линија које представљају типичне туморске, односно типичне неизмењене ћелије. Овај циљ се остварује испитивањем датих ефеката помоћу:

- стандардних биолошких метода,
- Раманове спектроскопије,
- микроскопије на бази атомских сила.

Циљ испитивања стандардним биолошким методама је одређивање уобичајено праћених параметара за процену цитотоксичности наночестица, као што су промене у ћелијском расту, метаболичкој активности и индукцији ћелијске смрти, којима ће ефекти наночестица бити окарактерисани у конкретним случајевима, тј. у датим комбинацијама типа ћелије и врсте и дозе наночестица. Ово је посебно значајно за наночестице CeO_2 , које одликују специфична оксидо-редукциона својства и чији су ефекти на различите типове ћелија у литератури неретко контрадикторно описани.

Други не мање важан циљ испитивања биолошким методама је могућност корелисања биолошких промена индукованих наночестицама са морфолошким променама и променама у вибрационим спектрима ћелија. Тиме се омогућава утемељенија и поузданија интерпретација вибрационих спектра и AFM слика и доприноси методолошком развоју примене ових метода у испитивању ћелијских промена (дато под другим општим циљем). У остваривању овог циља посебно је битна улога наночестица ZnO . На основу података из литературе, очекивано је њихово цитотоксично дејство, које води ка ћелијској смрти. Повезивање спектралних карактеристика ћелија третираних овим типом наночестица ће стога бити једнозначније и једноставније. На тај начин ће се помоћи остваривање дате корелације и код ћелија третираних другим типовима наночестицама.

Испитивање ефеката наночестица на ћелије Рамановом спектроскопијом, као једном од две основне методе вибрационе спектроскопије, има за циљ утврђивање дозно-зависних промена интензитета и положаја Раманових модова у спектрима третираних ћелија, који говоре о промени у садржају одговарајућих молекула или функционалних група. Другим речима, циљ овог аспекта студије је идентификовање „спектралног отиска“ ефеката које наночестице испољавају на ћелијама, који потенцијално носи нове информације о механизмима дејства наночестица.

Циљ испитивања AFM микроскопијом је добијање топографских слика које описују морфолошке промене третираних ћелија и дефинисање параметара за квантификацију индукованих морфолошких промена.

Други општи циљ је напредак у методолошком развоју вибрационе спектроскопије као технике за проучавање ефеката наночестица на ћелије. У оквиру овог циља дефинисано је неколико специфичних подциљева:

- дефинисање промена у Рамановим спектрима које су манифестација физиолошких и патолошких процеса у третираној ћелији,

- идентификовање општих спектралних маркера ћелијских промена индукованих различитим типовима наночестицама,
- постављање и тестирање модела за класификацију различито третираних ћелија на основу ћелијских Раманових спектра,
- испитивање и процена ефикасности различитих математичких метода и приступа у анализи Раманових спектра ћелија третираних наночестицама.

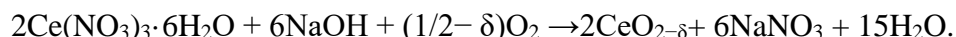
Рад на постављеним циљевима организован је у неколико целина. Прва, припремна целина обухвата синтезу и карактеризацију наночестица и проверу њихове интернализације у ћелијама. Друга целина обухвата испитивање ефеката наночестица стандардним биолошким методама, најпре ради одређивања оптималне дозе за коришћење у експериментима, а потом ради детаљнијег упознавања ефеката наночестица на ћелије. У следећу целину смештена је Раманова спектроскопија третираних ћелија, укључујући различите методе и модалитете за анализирање спектралних промена, као и постављање општих модела за праћење датих промена. Последњу целину чини описивање морфолошких промена третираних ћелија помоћу АФМ микроскопије.

3. Методе

3.1. Синтеза и карактеризација наночестица и њихових дисперзија

3.1.1. Синтеза SPRT-CeO₂

Самопропагирајућом методом на собној температури (енгл. *Self-Propagating Room Temperature Synthesis*, SPRT) из церијум нитрат хексахидрата и натријум хидроксида добија се кристални нанопрах CeO₂ према реакцији:



Церијум нитрат хексахидрат и натријум хидроксид мешају се у авану од алуминијум оксида око 5 минута, док мешавина не постане светло браон. Затим се смеша на три сата остави у додиру са кисеоником из ваздуха на собној температури. Након реакције са кисеоником, настала смеша поред CeO₂ садржи натријум нитрат, који се потом уклања четвороструким испирањем смесе у дестилованој води и двоструким испирањем у етанолу. При испирању коришћена је центрифуга Centurion 1020D (*Centurion Scientific*, Велика Британија) на 3500 обртаја у минути. Испрани материјал је у етанолу пребачен у сушницу и сушен на 60 степени. Нанопрах је затим диспергован у дејонизованој води у одговарајућим концентрацијама и добијене дисперзије су коришћене за третмане ћелије.

3.1.2. Синтеза CD-CeO₂

Наночестице CD-CeO₂ синтетисане су директно у воденом раствору према процедури коју су описали Karakoti и сарадници [42]. Најпре је припремљен 0,135 mM раствор декстрана T40 у дејонизованој води. Затим је у 50 ml припремљеног раствора додато 0,5 g церијум нитрат хексахидрата. Добијени раствор који је садржао Ce³⁺ јоне је затим оксидован са 0,05 ml 30% амонијака. Раствор је мешан 24 часа у магнетној мешалици. Хидродинамички радијус наночестица у раствору је одређен методом DLS, на исти начин као и за SPRT-CeO₂ наночестице.

3.1.3. Рентгенска дифракција наночестица

За потврђивање кристалне структуре CeO₂ и одређивање величине кристалита у синтетисаном праху SPRT-CeO₂, односно раствору CD-CeO₂ коришћена је метода рентгенске дифракције (енгл. *X-ray Diffraction*, XRD). Мерења су вршена на дифрактометрима Panalytical X'Pert Pro (*Malvern Panalytical*, Велика Британија) за CD-CeO₂ и Siemens D-5000 (*Siemens*, Немачка) за SPRT-CeO₂ коришћењем упадног зрачења CuK α . У овој методи се детектује зрачење рефлектовано са равни кристала, на основу ког се може одредити положај атома у кристалу, односно кристална структура једињења. За одређивање величине кристалита коришћена је Шерерова једначина [239]:

$$d = \frac{0,9 \lambda}{\beta \cos \theta},$$

где је d пречник кристалита, λ таласна дужина упадног зрачења, β ширина пика у дифракционом спектру на половини висине а θ угао између упадног зрачења и нормале кристала.

3.1.4. Одређивање хидродинамичког радијуса наночестица у дисперзији

Хидродинамички радијус наночестица у воденој дисперзији је одређен методом динамичког расејања светлости (енгл. *Dynamic Light Scattering*, DLS) на уређају Zetasizer Nano ZS90 (*Malvern Panalytical*). У оквиру DLS методе хидродинамички радијус се израчунава на основу мерења интензитета расејања светлости са честица. Под хидродинамичким радијусом се подразумева полупречник сфере коју чини честица са јонима и адсорбованим полимерима (нпр. декстраном) који су везани за њу. Честице у дисперзији су, услед дифузије и судара са честицама растварача, у Брауновом кретању. Интензитет расејане светлости ће због тога флукуирати у времену. Брзина флукуације сигнала зависи од брзине дифузије, односно од величине честице. Што је честица већа, брзина дифузије је мања. Из коефицијента дифузије могуће је преко Стокс-Ајнштајнове једначине [240] израчунати дијаметар честице:

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D},$$

где је d_H хидродинамички дијаметар честице, k Болцманова константа, T апсолутна температура, η вискозност, а D дифузиони коефицијент честица.

На тај начин може се одредити хидродинамички дијаметар (пречник) свих честица у раствору и изразити расподела честица по величини.

3.2. Гајење ћелија у култури

У општем случају, ћелије су гајене у фласковима за ћелијску културу површине 25 mm² (T-25) и 75 mm² (T-75), у зависности од потребе експеримента. За неке експерименте ћелије су гајене у плочама са бунарима (тестове вијабилности, различите микроскопске технике), што је назначено у одговарајућим поглављима посвећеним свакој од метода. Култивација се одвијала у стандардним условима за ћелијску културу (37°C, 5 % CO₂, 95 % влажности). Ћелије су субкултивисане два пута недељно, када достигну приближно 90 % пуне конfluентности. При субкултивацији ћелије су од подлоге одлепљиване помоћу раствора 0,25% трипсина и 0,53 mM EDTA у PBS-у. Исти раствор је коришћен у сваком експерименту који је захтевао одлепљивање ћелија са подлоге на којој су расле.

HeLa ћелије (ATCC, САД) су култивисане у DMEM/F12 медијуму (*Pan Biotech*, Немачка) који садржи запреминских 10 % топлотом инактивисаног говеђег феталног серума (FCS, *Sigma-Aldrich*, САД) и 1 % раствора са антибиотиком и антимиотиком (*Capricorn Scientific*, Немачка). На овај начин су HeLa ћелије култивисане за експерименте са наночестицама ZnO, док је за експерименте са CeO₂ коришћен незнатно другачији DMEM медијуму: са стабилним глутамином, 3,7 g/l NaHCO₃ и 4,5 g/l D-глукозе (*Biochrom AD*, Немачка), уз додатак 10 % FCS (*Sigma-Aldrich*) и 1 % раствора са антибиотиком и антимиотиком (*Capricorn Scientific*).

MRC-5 ћелије (ATCC) су култивисане у медијуму DMEM са високим садржајем глукозе („*high glucose*“, *Sigma-Aldrich*), који садржи запреминских 10 % топлотом инактивисаног FCS (*Sigma-Aldrich*) и 1 % раствора са антибиотиком и антимиотиком (*Capricorn Scientific*).

3.3. Третман ћелија наночестицама

Наночестице SPRT-CeO₂, синтетисане у виду праха, дисперговане су у дејонизованој води за примену на ћелијама. У првом кораку у нанопрах је додата мала количина воде и смеша је ултрасонирана 1-2 минута. Остатак воде је на исти начин додаван у неколико наредних корака, са обавезном ултрасоникацијом након сваког корака. На тај начин је направљен концентровани (енгл. *stock*) раствор од 4 mg/ml SPRT-CeO₂ који је чуван на + 4°C. Ова концентрација је изабрана да би била једнака концентрацији раствора CD-CeO₂, тј. да би у оба случаја ћелијама додавана једнака запремина воде. Иста запремина стерилне дејонизоване воде додавана је у медијум контролних узорака. Пред третирање ћелија, раствор је ултрасониран у ултразвучној кадици најмање 30 минута, а затим даље разблаживан у одговарајућем ћелијском медијуму до жељене концентрације. Разблаживање је настављено на исти начин као што је започело: додаване су мање запремине медијума у више корака, са кратком ултрасоникацијом између њих. Третман је изведен заменом комплетног ћелијског медијума медијумом који садржи наночестице.

Наночестице CD-CeO₂ су такође чуване на + 4°C, а због њихове изузетне стабилности, није било потребе за ултрасонирањем. За третирање ћелија су разблаживане до финалне концентрације у одговарајућем ћелијском медијуму. Раствор је измешан помоћу пипете. Медијум је одстрањен из посуда у којим су гајене ћелије и замењен новим медијумом са наночестицама.

Комерцијалне наночестице ZnO (*Sigma Aldrich*, код бр. 721077), чуване на собној температури, растваране су, као и SPRT-CeO₂, у дејонизованој води до концентрације 4 mg/ml. Добијени концентровани раствор је чуван на + 4°C, пред узорковање ултрасониран најмање 30 минута и у ћелијском медијуму разблаживан до финалних концентрација. Медијум у ћелијској култури замењен је медијумом са наночестицама.

Ћелије су за све експерименте третиране наночестицама 24±2 сата након засејавања.¹

3.4. Трансмисиона електронска микроскопија

Величина и морфологија наночестица одређена је са микрографија добијених трансмисионом електронском микроскопијом (ТЕМ) на уређају JEOL JEM-3010 (*JEOL*, Јапан) са електронским снопом енергије 300 keV. Ова метода користи трансмисију електронског снопа кроз узорак за добијање слике. Електронски снап одликују веома ниске таласне дужине (10⁶ пута краће него фотона у видљивом делу спектра), што обезбеђује субнанометарску резолуцију добијене слике [241].

За други сет TEM снимања коришћен је инструмент Philips CM12 (*Philips/FEI*, Холандија) на 60 keV, при чему су снимане ћелије третиране наночестицама у циљу потврде унутарћелијске локализације наночестица. Микроскоп је опремљен дигиталном камером SIS MegaView III

¹ Ради лакшег праћења резултата и дискусије, у тексту који следи ће се, у случајевима кад је потребно нагласити дозу наночестица, користити скраћенице типа: HeLa-CD-400/HeLa-SPRT-400, за HeLa ћелије третиране наночестицама CD-CeO₂/SPRT-CeO₂ у дози од 400 µg/ml; такође, MRC-CD-400/MRC-SPRT-400, за MRC-5 ћелије изложене аналогном третману. Исто важи и за третман наночестицама ZnO, нпр: HeLa-ZnO-20/MRC-ZnO-20, за HeLa/MRC-5 ћелије третиране наночестицама ZnO у дози од 20 µg/ml.

(*Olympus Soft Imaging Solutions*, Немачка). Припрема ћелија за електронску микроскопију обухватала је кораке фиксирања, дехидратације, калуђења, сечења и контрастирања. Ћелије су након инкубације са наночестицама трипсином одлепљене од подлоге, испране два пута PBS-ом и фиксиране 2,5% глутаралдехидом у 0,1 М какодилатном пуферу. Ћелије су затим пост-фиксиране 1% осмијум тетроксидом у истом пуферу и дехидриране у серији растућих концентрација етанола. Узорци су затим укалуђењем у Ерон (*Agar Scientific*, Велика Британија). Танки пресеци су прављени сечењем дијамантским ножем (*Diatome*, Швајцарска), монтирани на бакарне мрежице, а затим контрастирани уранил ацетатом и оловним цитратом помоћу уређаја *Leica EM STAIN* (*Leica Microsystems*, Немачка).

3.5. Раманово мапирање

При Рамановом мапирању у овом раду коришћен је alpha300 конфокални Раманов микроскоп (*WITec GmbH*, Немачка) са диодним ласером таласне дужине 785 nm (*Toptica Photonics*, Немачка) као извором побуде. Ласерски сноп је фокусиран на узорак преко имерзионог објектива *Nikon Fluor* (60x/1,00 NA, WD = 2,0 mm). Време експозиције је било 0,5 s. Спектрометром са решетком од 300 зареза/mm мерени су Раманови спектри са кораком од 0,5 μm по хоризонталној равни. Припрема узорака за мерење се састојала из наношења суспензије фиксираних ћелија на плочице од калцијум флуорида. Ћелије су претходно гајене и третиране наночестицама у фласковима и након потребног времена инкубације помоћу трипсина одлепљене са подлоге и фиксиране.

Раманове мапе су својеврсне слике (енгл. *image*) узорка чији сваки пиксел садржи информацију о интензитету и својствима Рамановог спектра измереног у датој тачки. Први корак у добијању мапа је мерење Раманових спектра у свакој тачки узорка једне равни, при чему величину тачке, односно пиксела, одређује резолуција уређаја. Затим се у спектру одабере Раманов мод или спектрална област од интереса за коју се израчуна интегрални Раманов интензитет (површина испод криве) у свакој мереној тачки посматране равни узорка. На основу израчунатих интензитета добије се мапа, односно слика узорка, на којој је интензитет обојености тачака пројекција интегралног Рамановог интензитета измереног у датој тачки. На тај начин, Раманове мапе у себи садрже информацију о просторном распореду биохемијског састава узорка.

У овом раду, ћелије третиране наночестицама су мапиране у неколико хоризонталних равни (*XY*), као и у вертикалној равни (*ZY*), при чему је узето да је хоризонтална (*XY*) раван нормална на правац упадног зрачења, док је вертикална (*ZY*) раван паралелна са правцем упадног зрачења. Моторизован сточић (енгл. *stage*) микроскопа омогућио је мерење Раманових спектра у мрежи тачака са размаком од 0,5 μm у *XY/YZ* равни. Конфокалност микроскопа је омогућила да се направи више мапа са више различитих хоризонталних равни, крећући се по дубини ћелије (*z*-оси) са кораком 1-2,5 μm .

3.6. Тестирање ћелијског раста и вијабилности

Ћелијски раст је тестиран методом SRB (енгл. *sulforhodamine B*) у циљу оптимизације доза наночестица. Вијабилност ћелија је одређивана методама МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5 дифенил тетразол бромид) и NRU (енгл. *neutral red*).

3.6.1. SRB тест

За извођење SRB теста, ћелије су гајене у плочама са 96 бунара и инкубирани са наночестицама 48 сати. Након тога су фиксиране трихлорсирћетном киселином и бојене 0,4 % SRB (*Sigma-Aldrich*) раствореним у 1 % сирћетној киселини. Инкубација са бојом је трајала 15 минута, након чега је вишак боје четири пута испран 1 % сирћетном киселином. Боја која је остала везана за узорак екстрахована је са 10 mM базом *Tris* (*Sigma-Aldrich*). Апсорбанца добијеног раствора мерена је на 550 nm помоћу спектрофотометра за микроплоче *Wallac, VICTOR2 1420* (*PerkinElmer*, Финска), уз референтну вредност мерену на 690 nm. SRB има висок афинитет везивања за протеине, па се узима да је промена интензитета измереног сигнала сразмерна промени у количини ћелијских протеина, односно у расту ћелијске културе. Добијени подаци су анализирани у програму R помоћу непараметарског ANOVA и *post-hoc* Wilcoxon тестова.

3.6.2. МТТ тест

Метаболичка активност ћелија третираних наночестицама испитивана је МТТ тестом. Овај тест се заснива на способности вијабилних ћелија да редукују МТТ до љубичасто обојеног формазана. Количина формазана која након инкубације са МТТ-ом настане у узорку сразмерна је броју метаболички активних ћелија у узорку. Присуство формазана се детектује колориметријски.

Ћелије су гајене у плочама са 96 бунара. Након 24 сата од засејавања ћелија медијум у бунарима је замењен са по 100 μ l одговарајућег медијума у ком су растворене наночестице. Како би се искључио утицај наночестица на мерења апсорбанце, као „*blank*” су постављени бунари без ћелија са одговарајућим концентрацијама наночестица. Након потребног времена инкубације, медијум са наночестицама је уклоњен и замењен са 100 μ l медијума који је садржао 0,5 mg/ml МТТ-а (*Sigma-Aldrich*). Ћелије су са МТТ-ом инкубирани 2 сата у инкубатуру (37 °C, 5 % CO₂), након чега је у сваки бунар додато 100 μ l 10 % SDS-а (0,01 N HCl). Инкубација се наставила у инкубатору преко ноћи. Наредног дана је мерена апсорбанца на 570 nm на спектрофотометру за микроплоче (*Epoch, BioTek*, САД). Вредност апсорбанце „*blank*” бунара одузимана је од вредности апсорбанце третираних узорака. Резултати су статистички анализирани у програму R помоћу једнофакторског ANOVA и *post-hoc* Tukey тестова.

3.6.3. NRU тест

NRU тест се заснива на способности вијабилних ћелија да преузму из медијума боју „*neutral red*” и уграде је у своје лизозоме. Код вијабилних ћелија, боја чије је нето наелектрисање приближно једнако нули проћи ће ћелијску мембрану и ући у негативно наелектрисане лизозоме,

где ће и сама задобити наелектрисање и услед тога бити задржана у лизозомима. У ћелијама које нису у стању да одржавају рН градијент у лизозомима, боја неће бити задржана. Из тога следи да ће количина везане боје бити пропорционална броју вијабилних ћелија.

Ћелије припремане за NRU есеј засејане су у плоче са 96 бунара и сутрадан третиране наночестицама раствореним у ћелијском медијуму (100 μ l раствора по бунару). Након инкубације од 48 сати у бунаре је додато по 100 μ l боје „*neutral red*“ (INC Biochemicals, САД) претходно растворене у одговарајућем ћелијском медијуму без серума, у концентрацији 50 μ g/ml и инкубирано 2 сата у инкубатору (37 °C, 5 % CO₂). Невезана боја је испрана PBS-ом, а затим је у сваки бунар додато по 100 μ l раствора за уклањање боје (50 % етанол, 1 % глацијална сирћетна киселина) како би се екстраховала боја везана за узорак. Након 10 минута мешања на ELISA шејкеру, апсорбанца је мерена на 540 nm на спектрофотометру за микроплоче (*Epoch, BioTek*). Као „*blank*“ су коришћени бунари без ћелија са одговарајућим концентрацијама наночестица. Вредност апсорбанце „*blank*“ бунара одузима се од вредности апсорбанце третираних узорака. Резултати су приказани у односу на средњу вредност контроле и статистички анализирани у програму *R* помоћу једнофакторског ANOVA и *post-hoc Tukey* тестова.

3.7. Детекција апоптозе: бојење анексином V и пропијидијум јодидом

У циљу регистравања ћелијске смрти по типу апоптозе, ћелије третиране наночестицама бојене су флуоресцентно обележеним анексином V и пропијидијум јодидом. Процент обојених ћелија је одређиван помоћу флуоресцентног микроскопа и упоређиван са нетретираном контролом. Анексин V је протеин који има висок афинитет везивања за фосфатидилсерин, који се у раној фази апоптозе експримира на спољашњој страни ћелијске мембране. PI је флуоресцентна боја која се везује за нуклеинске киселине али не продире у ћелију док је ћелијска мембрана неоштећена. У каснијим фазама апоптозе, као и у некрози, ћелијска мембрана губи интегритет и анексин V и PI продиру у унутрашњост ћелије. Произилази да су ћелије обојене само анексином V (анексин V +/PI -) у раној фази апоптозе, док су ћелије обојене и анексином V и PI (анексин V +/PI +) у касној фази апоптозе или у некрози. Обојеност се детектује захваљујући флуоресценцији PI и флуорофоре FITC конјуговане са анексином V.

За детекцију апоптозе коришћен је *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI* (*Biolegend*, САД). То је кит који садржи annexin-V-FITC, PI и пуфер који поспешује везивање анексина V. Праћен је протокол дат у спецификацији произвођача, прилагођен бојењу ћелија засејаних на микроскопским покровним плочицама. У пуфер за везивање анексина V додати су annexin-V-FITC и PI (на 100 μ l пуфера 5 μ l анексина V и 10 μ l PI). Плочице димензија 20x20 mm на којима су ћелије гајене су након уклањања медијума два пута испране PBS-ом, а затим урођене у пуфер са анексином V и PI и инкубиране 15 минута у мраку на собној температури. Покровне плочице су затим испране три пута са по 1 ml PBS-а и фиксирани у 1 ml комерцијалног фиксатива *Roti-Histofix 4 %* (*Roth*, Немачка). Након 15 минута инкубације, плочице су испране два пута PBS-ом и осушене на ваздуху. У финалном кораку припреме узорака, покровне плочице су монтиране на предметна стакла помоћу медијума за монтирање *Mowiol* (*SigmaAldrich*). Узорци су анализирани на конфокалном микроскопу *Leica TCS SP5 II* (*Leica Microsystems*), који садржи акусто-оптички подесиви филтер за контролу екситације (енгл. *Acusto-Optic Tunable Filter*, АОТФ) и акусто-оптички делитељ снопа (енгл. *Acusto-Optic Beam Splitter*, АОБС) за раздвајање екситационог и емитованог зрачења. Емитовано зрачење различитих таласних дужина се одводи на две фотомултипликаторске тубе (енгл. *Photomultiplier Tube*, PMD) за детекцију. Визуелизација

је постигнута екситовањем FITC-а Ag ласером таласне дужине 488 nm и PI HeNe ласером таласне дужине 543 nm. Емитована флуоресценција је детектована у секвенцијалном моду преко зеленог (FITC) и црвеног (PI) канала, како би се избегло преклапање сигнала између канала. Као негативне контроле коришћени су узорци са нетретираним ћелијама који су прошли потпуно исту процедуру бојења и припреме као третиране ћелије. Са сваког узорка снимљено је најмање шест видних поља. У њима су избројане ћелије у раној апоптози (зелено обојене) и ћелије у касној апоптози или некрози (црвено обојене). Њихов број је изражен као проценат у односу на укупан број ћелија уочен у датом видном пољу, а резултати са свих снимака за једну групу ћелија су усредњени. Статистичка значајност разликовања третираних ћелија у односу на контролу проверавана је за сваку групу Студентовим t-тестом ($p < 0,05$ је узето као праг значајности). Урађена су два независна експеримента и у сваком од њих су постављена по два узорка за сваку ћелијску групу.

3.8. Одређивање расподеле ћелија по фазама ћелијског циклуса: проточна цитофлуориметрија

Проточна цитофлуориметрија је коришћена за одређивање расподеле ћелија по фазама ћелијског циклуса. У овој методи ћелије се боје PI који ће се у ћелији везати за молекуле нуклеинских киселина, а затим се детектује сигнал пореклом од флуоресценције везаног PI. Узорци се пре тога третирају рибонуклеазама, како би се онемогућило да се боја веже за РНК, тј. како би детектовани сигнал био пропорционалан количини ДНК у ћелији. Да би PI јодид доспео у унутрашњост ћелије, потребно је претходно пермеабилитовати ћелијску мембрану, што се постиже фиксирањем ћелија етанолом. У зависности од фазе ћелијског циклуса у којој се налази, ћелија ће имати $2n$ (G_0 и G_1 фаза), $2n-4n$ (S фаза) или $4n$ (G_2 и M фаза) хромозома, где n означава број хромозома хаплоидне гарнитуре једне ћелије. У G_1 фази, ћелије расту и спремају се за репликацију молекула ДНК, која се одвија у S фази. До краја S фазе све ћелије ће имати дуплирану количину молекула ДНК и као такве ући у G_2 фазу, у којој се ћелије припремају за деобу (M фаза). Ћелије које се налазе у G_1 фази ћелијски циклус могу ући у фазу мировања (G_0). Сразмерно броју хромозомских гарнитуре мењаће се количина молекула ДНК у ћелији.

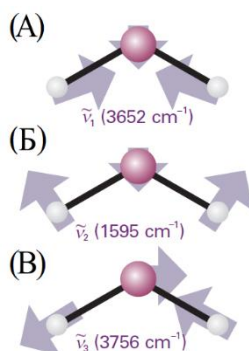
HeLa ћелије су засејане у плоче од 6 бунара у концентрацији 7×10^4 ћелија по бунару, а MRC-5 у концентрацији 5×10^4 ћелија по бунару и остављене да расту преко ноћи. Како би се синхронизовао ћелијски раст, инкубиране су 24 сата у одговарајућем медијуму без серума. Затим су ћелије инкубиране 48 сати са $10 \mu\text{g/ml}$, $20 \mu\text{g/ml}$ и $40 \mu\text{g/ml}$ (HeLa ћелије), односно $10 \mu\text{g/ml}$ и $20 \mu\text{g/ml}$ (MRC-5) наночестица ZnO, растворених у одговарајућем медијуму. Након третмана, адхерентне ћелије су помоћу трипсина/EDTA одлепљене од подлоге и спојене са ћелијама које су плутале у медијуму и све заједно испране три пута у PBS. Након тога су ћелије ресуспендоване у 70 % етанолу хлађеном у замрзивачу и у њему фиксиране 1 сат на 4°C . Након фиксације, ћелије су испране три пута у PBS-у и наредних 30 минута инкубиране у мраку на 37°C са раствором за бојење. Раствор за бојење је садржао $75 \mu\text{M}$ PI, $3,3 \text{ mM}$ натријум цитрат, $0,1 \%$ Triton X-100 и $0,5 \mu\text{g/ml}$ рибонуклеазе А (RNase A). Садржај ДНК у ћелији је мерен помоћу *BD LSR* проточног цитометра (*BD Biosciences*, САД). Из сваког узорка измерено је 2×10^4 појединачних догађаја. Резултати мерења су анализирани коришћењем FlowJo софтвера (*Flow Jo LLC*, САД). Са хистограма фреквенције ћелијског ДНК садржаја одређен је проценат ћелија у G_0/G_1 , S и G_2/M фази ћелијског циклуса. Експеримент је поновљен 5 пута за HeLa и 6 пута за MRC-5 ћелије. Статистичка анализа резултата урађена је помоћу ANOVA и Tukey *post-hoc* теста.

3.9. Вибрациона спектроскопија

3.9.1. Теоријска основа вибрационе спектроскопије

3.9.1.1. Молекулске вибрације

Вибрација је вид унутрашњег кретања молекула који подразумева периодичну промену равнотежног положаја атомских језгара у молекулу. Број могућих промена положаја, односно степена слободе вибрација, је код вишеатомних молекула једнак $3N - 6$ ($3N - 5$ за линеарне молекуле), где је N број атома у молекулу, коригован за вредност 6 (5) која представља збир 3 степена слободе translације (кретања молекула као целине у простору) и 3 степена слободе ротације (кретања молекула као целине око осе која пролази кроз центар његове масе) [151]. Код многоатомних молекула, какви су биолошки макромолекули, ова корекција је занемарљива а број могућих вибрација веома велики. На слици 3.1 приказан је једноставан пример вибрационог кретања троатомног молекула, молекула воде, и његова три степена слободе вибрација, тј. три нормална мода. У нормалним модовима сва језгра вибрирају у фази, тј. пролазе кроз свој равнотежни положај истовремено [242].



Слика 3.1. Нормални вибрациони модови молекула воде: (а) симетрично истезање веза, (б) савијање (енгл. *bending*), (в) асиметрично истезање. Треба напоменути да, у општем случају, појединачни модови не доводе искључиво до чистог истезања или савијања веза, него углавном до обе врсте кретања, од којих је једно доминантно (преузето и модификовано из [242]).

Основе механизма молекулских вибрација најједноставније се схватају на примеру вибрација двоатомних молекула. Класична механика даје модел по ком се вибрације у двоатомној молекули посматрају као осцилаторно кретање две честице повезане еластичном опругом, на које делује сила $\vec{F} = -k\vec{r}$ (Хуков закон [243]), где је k константа силе (еластичност опруге, тј. јачина везе), а \vec{r} укупни померај оба атома од равнотежног положаја (промена дужине везе). Потенцијална енергија V таквог система дата је изразом:

$$V = \frac{1}{2} k \vec{r}^2 .$$

Ова једначина даје параболу која описује енергију вибрација двоатомног молекула као хармонијског осцилатора [244].

Решавањем диференцијалне једначине у којој су комбиновани изрази за силу F дати преко Хуковог закона и Њутновог закона кретања [244] добија се једначина која описује кретање хармонијског осцилатора:

$$\vec{r} = \vec{r}_0 \sin(2\pi\nu t + \varphi),$$

где је \vec{r}_0 максимална амплитуда, φ је фазна константа, а ν вибрациона фреквенција. Преко другог извода ове једначине и Њутновог закона кретања добија се једначина за вибрациону фреквенцију [243]:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}},$$

где μ означава редуковану масу:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}.$$

Из једначине видимо да ће вибрациона фреквенција бити мања код молекула са јачом везом и већом редукованом масом, па ће се, на пример, у вибрационом спектру хелије мерене на подлози од CaF_2 модови подлоге јављати на мањим таласним бројевима него већина модова хелијских органских молекула.

Према класичној механици, енергија хармонијског осцилатора може имати било коју вредност, односно атоми у молекулу могу вибрирати било којом фреквенцијом. Квантна механика дефинише тачно одређене вибрационе енергетске нивое између којих су дозвољени прелази [242]. Вредности вибрационе енергије су дефинисане таласном функцијом Ψ , која се добија као решење Шредингерове једначине [244] и за дату параболу гласи:

$$\frac{d^2\Psi}{d\vec{r}^2} + \frac{8\pi^2\mu}{h^2} \left(E - \frac{1}{2} k\vec{r}^2 \right) \Psi(\vec{r}) = 0.$$

Дата таласна функција описује вибрационо стање молекула, а њене својствене вредности (енгл. *eigenvalues*) представљају дозвољене енергије вибрационих нивоа, E_v :

$$E_v = \left(v + \frac{1}{2} \right) h\nu = \left(v + \frac{1}{2} \right) hc\tilde{\nu},$$

где је v вибрациони квантни број који може имати вредности $v = 0, 1, 2, \dots$, а $\tilde{\nu}$ је таласни број: $\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c}$.

Из претходних израза видимо да по квантној механици вибрациона енергија молекула ни у равнотежном стању није једнака нули ($E_0 = \frac{1}{2} h\nu$), тј. молекул стално вибрира, иако вибрација у равнотежном стању није вибрација у класично-механичком смислу. Такође видимо да је разлика у енергији између два суседна вибрациона нивоа једнака $h\nu$.

У реалности, молекули су анхармонијски осцилатори. На слици 3.2 вибрациони енергетски нивои молекула као анхармонијског осцилатора приказани су помоћу тзв. Морзеоуе криве [243]. Она представљена енергију једног (основног) електронског стања молекула, у оквиру ког постоји

више вибрационих нивоа. Растојања између вибрационих нивоа тј. разлике у њиховим енергијама смањују се идући ка већим енергијама, што доводи до одступања Морзеве криве од облика параболе.

Увођењем у Шредингерову једначину Морзеве формуле за потенцијалну енергију [244]

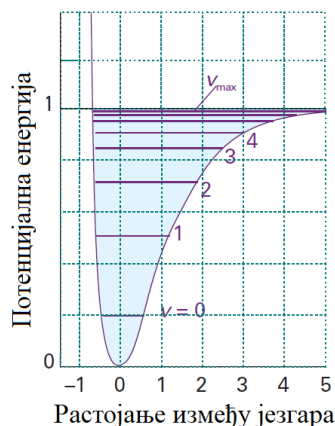
$$V = D_e(1 - e^{-\beta r}),$$

где је β мера закривљености дна потенцијалне јаме, добија се

$$E_v = hc\omega_e \left(v + \frac{1}{2}\right) - hc\chi_e\omega_e \left(v + \frac{1}{2}\right)^2 + \dots,$$

где је ω_e коригован таласни број, а $\chi_e\omega_e$ мера анхармоничности. Из једначине се види да вибрациони енергетски нивои ипак нису еквидистантни.

Нехармоничност за разлику од хармоничности омогућава не само вибрационе прелазе при којима је $\Delta v = \pm 1$, већ и $\Delta v = \pm 2, \pm 3 \dots$. Ти модови се називају овертонови. Ипак, најинтензивнији у спектрима су прелазии са основног на први наредни ниво и обрнуто ($v = 0 \leftrightarrow 1$) (Болцманова расподела [244]).



Слика 3.2. Морзеова крива потенцијалне енергије за једно електронско стање и више вибрационих нивоа у оквиру њега. Преузето и прилагођено из [242].

У вишеатомним молекулама, који имају $3N - 6$ ($3N - 5$) нормалних модова (слика 3.1), сваки мод се понаша као независан хармонијски осцилатор (апроксимативно), коме одговара одређена основна фреквенција вибрације. Та фреквенција је дефинисана истим чиниоцима као за двоатомни молекул, с тим што се израз за ефективну масу у овом случају добија комплекснијим рачуном [242]. Енергија вибрационих модова приказаних на слици 3.1 назначена је у виду одговарајућег таласног броја написаног уз шематски приказ молекула. Све три вредности припадају инфрацрвеној области, а најнижа енергија одговара савијајућем моду (б). Када се дати модови региструју у вибрационом спектру молекула, на основу њихових фреквенција/таласних бројева могуће је одредити (у комплекснијим случајевима претпоставити) од којих вибрација

потичу и тај поступак се назива асигнација мода. Асигнације се врше на основу прорачуна енергија и ранијег спектроскопског проучавања, датог у литератури. Код многоатомних молекула није могућа асигнација сваке вибрације, јер су многобројне и долази до њиховог суперпонирања. Уобичајен приступ је асигнација модова група, као што су CH_2 , CH_3 , $\text{C}=\text{O}$, ароматични прстенови, итд, код којих појединачне вибрације блиских енергија интерагују и као јединствен мод се обично јављају на истим позицијама у спектрима различитих молекула који их садрже [151]. У најкомплекснијим случајевима, какви су вибрациони спектри биолошких макромолекула, а посебно спектри ћелија и ткива, модови група су преклопљени и формирају карактеристичне структуре у виду асиметричних трака опсега и преко 100 cm^{-1} , какве су амидне траке у вибрационим спектрима протеина. Амидне траке настају мешањем различитих вибрација у пептидним везама и осетљиве су на промену конформација датих веза и њиховог окружења. Облик амидних трака и позиције њихових максимума карактеристичне за различите структуре протеина емпиријски су одређене и користе се при асигнацији и анализи Раманових спектра протеина [245]).

3.9.1.2. Основне методе вибрационе спектроскопије

Кретање позитивно наелектрисаних језгара при молекулској вибрацији утиче на расподелу густине наелектрисуња електронског облака који их окружује, па тако вибрација може довести до промене поларизабилности молекула. За такве вибрације кажемо да су рамански активне, односно да се јављају као модови у Рамановом спектру молекула. Вибрације такође могу довести до промене диполног момента. Такве вибрације дају модове у IR спектру и за њих кажемо да су IR активне. Код центросиметричних молекула промена поларизабилности искључује промену дипола, и обрнуто, док је код осталих типова симетрија могуће да вибрација буде и рамански и IR активна [244].

IR и Раманови спектри су две основне врсте вибрационих спектра молекула. Иако и једни и други као информацију носе карактеристичне енергије вибрационих прелаза, механизми којима настају су различити. IR спектри спадају у апсорпционе спектре. За побуђивање IR активних вибрација користи се континуално IR зрачење. При интеракцији са молекулом, фотони упадног зрачења чија је енергија једнака енергији вибрационих прелаза молекула бивају апсорбовани, што омогућава прелаз молекула из једног вибрационог стања у друго, у оквиру истог електронског стања. Апсорбовано зрачење се детектује тако што се директно мери разлика у енергији у односу на упадно зрачење, тако да у апсорпционом спектру x -оса показује енергију апсорбованог фотона, а y -оса количину апсорбованог зрачења [243]. У Рамановој спектроскопији за побуђивање вибрација користи се монохроматско зрачење, најчешће из видљивог дела спектра, а детектује се расејано зрачење чија се енергија (фреквенција) након интеракције са молекулом променила. У овом случају, x -оса показује померај у енергији у односу на (константну) енергију упадног зрачења, који је за сваки мод једнак разлици енергија побуђеног и почетног вибрационог стања, а y -оса показује интензитет расејања. Интензитет Рамановог расејања је квантитативно повезан са бројем односно вероватноћом вибрационих прелаза у аналиту, али је такође под утицајем природе вибрације и инструменталне и експерименталне поставке [151].

Са становишта квантне механике, интензитет вибрационих модова пропорционалан је вероватноћи прелаза са вибрационог нивоа m на ниво n која је дата квадратом интеграла

$$P_{nm} = \langle \psi_n^* | \hat{\Omega} | \Psi_m \rangle,$$

где су Ψ_m и Ψ_n таласне функције вибрационих стања m и n , а $\hat{\Omega}$ оператор који описује пертурбацију електронског облака молекула електромагнетним зрачењем. Овај оператор је код Раманових модова поларизабилност, а код IR оператор електричног диполног момента [243].

3.9.1.3. Раманови вибрациони спектри

Електромагнетно зрачење којим се молекул озрачује (ласерско зрачење) одликује јачина електричног поља E која се мења у времену t :

$$E = E_l \cos 2\pi \nu_l t,$$

где је E_l амплитуда, а ν_l фреквенција осциловања ласера [244]. Према класичној теорији Рамановог расејања у интеракцији са молекулом, зрачење ће индуковати диполни момент μ_{ind} , који је једнак производу јачине електричног поља и поларизабилности.

$$\vec{\mu}_{ind} = \alpha \vec{E}.$$

Поларизабилност је тензорска величина, па се представља матрицом чија структура односно вредност зависи од симетрије молекула [243].

Кретање атома у односу на равнотежни положај се може представити као

$$r = r_0 \cos 2\pi \nu_m t,$$

где је r_0 амплитуда, а ν_m фреквенција вибрације.

За мале амплитуде осцилације може се увести апроксимација да је поларизабилност линеарна функција растојања од равнотежног положаја, па важи

$$\alpha = \alpha_0 + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right)_0 r_0 + \dots,$$

где су индексом 0 означени поларизабилност и растојање, односно промена поларизабилности са растојањем који одговарају равнотежном положају.

Из претходне четири једначине изводи се једначина [244]:

$$\vec{\mu}_{ind} = \alpha_0 \vec{E}_0 \cos 2\pi \nu_l t + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right)_0 r_0 \vec{E}_0 \cos[2\pi t(\nu_l - \nu_m)] + \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \alpha}{\partial r} \right)_0 r_0 \vec{E}_0 \cos[2\pi t(\nu_l + \nu_m)].$$

Први израз са десне стране једначине описује расејање чија је фреквенција једнака фреквенцији упадног зрачења. Такво расејање је еластично и назива се Рејлијевим. Највећа је вероватноћа да настане, тј. највећи број фотона ће интераговати са молекулом на овај начин. Други и трећи израз описују Стоксово, односно анти-Стоксово Раманово расејање. Из њих видимо да је неопходан услов за Раманово расејање да се поларизабилност молекула током вибрације мења:

$$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial r}\right)_0 \neq 0.$$

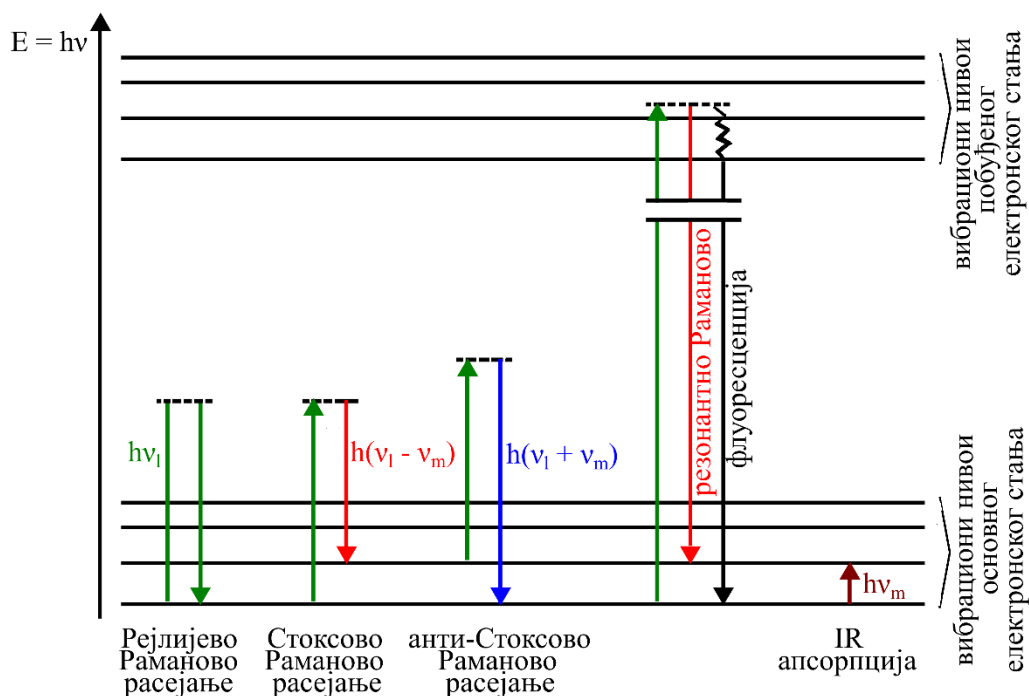
Ако овај услов није испуњен, вибрација није рамански активна.

У класичној механици Раманово расејање се објашњава модулацијом фреквенције дипола електромагнетног поља фреквенцијом вибрација.

Са аспекта квантне механике применом теорије пертурбација добија се формула сличног облика као претходна формула за електрични диполни момент, с тим што уместо осцилујућег електричног дипола и поларизабилности фигуришу тзв. прелазни електрични дипол и прелазна поларизабилност (под прелазним се мисли на прелаз између вибрационо-електронских стања молекула) [246].

Дијаграм на слици 3.3. илуструје процесе Рејлијевог и Рамановог расејања. Када електромагнетно зрачење интерагује са електронима молекула, долази до поларизације електрона, тј. дисторзије електронског облака молекула. Настало високоенергетско стање молекула је краткоживеће и деексцитује се расејањем пре него што језгро стигне да одговори померањем. Због тога настало стање не одговара ниједном стварном електронском стању молекула, па се обично назива виртуелним електронским стањем. Степен дисторзије електронског облака и енергија виртуелног нивоа зависе од енергије предате молекулу, тј. од фреквенције коришћеног ласера. При деексцитацији, молекул се може вратити на почетни вибрациони ниво и емитовати Рејлијево расејање, енергије $h\nu_l$. У другом случају, молекул се након ексцитације враћа на вибрациони ниво енергетски виши од почетног и емитује Стоксово Раманово расејање, енергије $h(\nu_l - \nu_k)$. У трећем случају, молекул који је пре озрачивања био на побуђеном вибрационом нивоу, након апсорпције фотона деексцитује се преласком на основни вибрациони ниво и емитује анти-Стоксово Раманово расејање, енергије $h(\nu_l + \nu_k)$. Стоксово и анти-Стоксово расејање носе исту информацију о вибрационим фреквенцијама, али је на собној температури анти-Стоксово расејање знатно слабијег интензитета јер је број молекула на побуђеним нивоима много мањи него број молекула на основном нивоу (Болцманова дистрибуција [242]). Зато се у Рамановој спектроскопији најчешће анализира Стоксово расејање.

Ако је енергија упадног зрачења блиска енергији електронског (апсорпционог) прелаза молекула, интензитет Раманових модова је за неколико редова величине појачан. Тај ефекат се назива резонантно Раманово расејање [151]. Резонантна Раманова спектроскопија се често користи за проучавање биолошких молекула који апсорбују у видљивој области, као што су пигменти и хемопротеини [247, 248]. Практичан проблем ове методе представља појава флуоресценције која отежава а некад и потпуно онемогућава мерење Раманових спектра, као и деградација узорка узрокована апсорпцијом. Флуоресценција се јавља када се након ексцитације на више вибрационо стање побуђеног електронског стања молекул најпре нерадијативно релаксира до основног вибрационог стања, па се затим емисијом деексцитује до основног електронског стања, што је приказано на слици 3.3. Енергија флуоресценције је тако нижа од енергије упадног зрачења и делимично залази у област енергије Рамановог Стоксовог расејања. Однос интензитета флуоресценције и Рамановог расејања зависиће од особина молекула и избора побудне фреквенције [243]. На слици 3.3 је ради поређења приказан и вибрациони прелаз чију енергију директно мери IR спектроскопија.

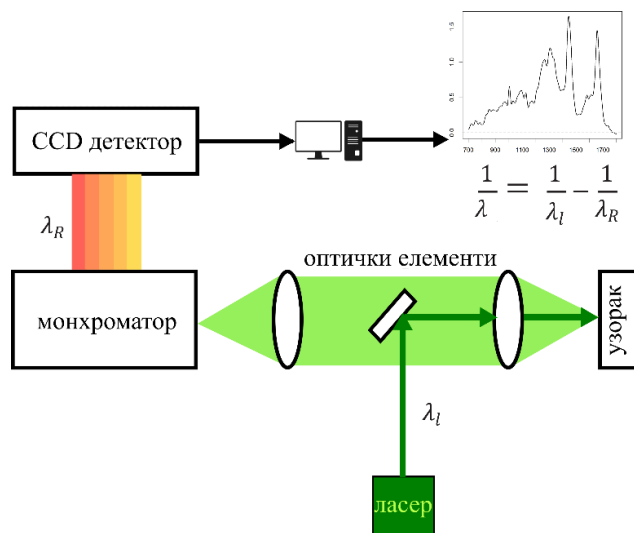


Слика 3.3. Дијаграм вибрационих прелаза молекула који резултују Рамановим расејањем, IR апсорпцијом и флуоресценцијом. Виртуелни енергетски нивои су приказани испрекиданим хоризонталним, а прави пуним хоризонталним линијама. *Напомена:* растојања између енергетских нивоа на дијаграму нису у реалним односима, већ су прилагођена читљивости дијаграма. Виртуелни нивои вибрација за најмање један ред величине су виши од енергије вибрационих прелаза. Исто важи и за енергију електронског прелаза, што је и назначено прекидима вертикалних линија у приказу резонантног Рамановог расејања и флуоресценције [244].

3.9.2. Експериментална поставка

Системи за мерење Раманових спектра коришћени у оквиру ове тезе спадају у микро-Раман системе, што значи да је са Рамановим спектрометром куплован микроскоп, преко ког се побудни сноп зрачења усмерава на узорак. Пошто је Раманово расејање слабог интензитета у односу на Рејлијево, за побуду се уобичајено користе ласери, тј. извори монохроматског зрачења великог интензитета, како би обезбедили велику густину зрачења на узорку мале површине. На слици 3.4 шематски је приказана општа структура микро-Раман конфигурације. Ласерско зрачење пролази кроз систем огледала и сочива и преко објектива се фокусира на узорак. Зрачење расејано под углом од 180° се преко истог објектива сакупља и одводи у монохроматор. Монохроматор садржи дифракционе решетке на којима се зрачење просторно раздваја према таласним дужинама. Дифракцију омогућавају зарези на решетки, а бројем зареза се регулише површина на детектору на коју пада зрачење, тј. спектрална резолуција (више зареза по милиметру значи већу резолуцију). Са монохроматора сноп долази до CCD детектора (енгл. *charge-coupled device*), где се по положајима на које падне одређује његова таласна дужина λ . Компјутерски програм на основу измерене таласне дужине прерачунава енергију детектованог фотона, коју одузима (ако се мери Стоксово расејање) од енергије фотона ласера и тако се рачунају вибрационе фреквенције

аналита. Вибрационе фреквенције се најчешће приказују изражене као таласни бројеви $\frac{1}{\lambda}$ у јединицама cm^{-1} . Број фотона који падне на детектор представља се као интензитет расејања у арбитрарним јединицама.



Слика 3.4. Упростијени шематски приказ система за мерење (Стоксових) Раманових спектра хелија

3.9.2.1. Уређај NTEGRA

Раманови спектри MRC-5 хелија третираних наночестицама CeO_2 , као и HeLa и MRC-5 хелија третираних наночестицама ZnO , мерени су на уређају NT-MDT NTEGRA Prima (NT-MDT, Холандија) у конфигурацији која одговара приказаној на слици 3.4. За екситацију је коришћено зрачење таласне дужине 532 nm које се преко објектива конфокалног микрокопа фокусира на узорак. Снага ласерског снопа на узорку је била 0,5 mW. Експозиција је трајала 120 s – 180 s у зависности од квалитета сигнал/шум за дату серију узорака. Понављањем мерења у истој тачки тестирано је да ли се спектар мења, тј. да ли примењени експериментални услови доводе до оштећења хелија. Спектри су се показали стабилним током читавог времена аквизиције. На монохроматору је коришћена решетка од 600 зареза/mm, која је омогућила мерења са кораком од $\sim 2,5 \text{ cm}^{-1}$. Спектри су мерени у области хелијског једра, а хелије на којима ће се мерити нису биране према неком критеријуму нпр. морфологији или величини већ насумично. Осим хелија, на уређају су измерени и Раманови спектри CeO_2 и ZnO , да би се проверио евентуални уплив њихових модова у хелијске спектре, као и спектри парацетамола, ради калибрације таласног броја.

Узорци су за мерење припремљени на следећи начин: хелије су гајене у фласковима у хелијској култури, у којима су и инкубирани са наночестицама. Након истека потребног времена инкубације, хелије су трипсином одлепљене са подлоге, испране PBS-ом, фиксирани 15 минута у комерцијалном фиксативу Roti-Histofix 4 %, још два пута испране и на крају ресуспендоване у PBS-у. Непосредно пред мерење, PBS је помоћу центрифугирања одстрањен, како се на површини хелија не би формирали кристали соли који би ометали Раманову спектроскопију, а хелије су

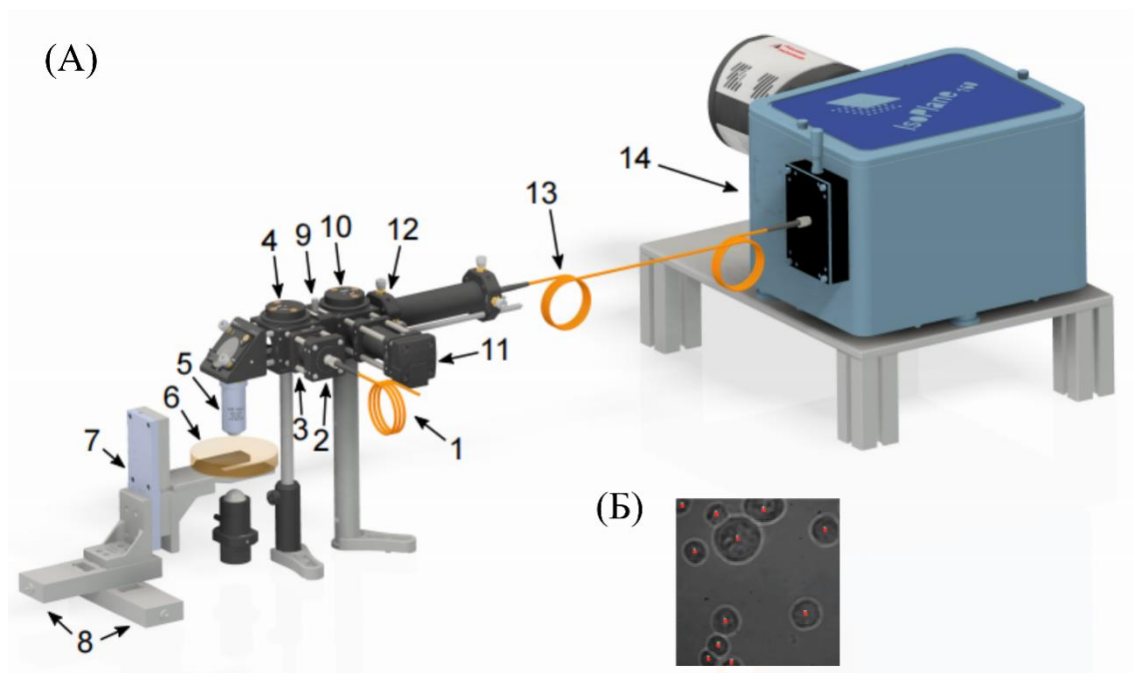
испране и ресуспендоване у дејонизованој води. По 10 μl ћелијске суспензије је накапано на плочицу од CaF_2 и остављено да се осуши на ваздуху.

3.9.2.2. Некомерцијални уређај за брзо мерење Раманових спектра ћелија

За Раманову спектроскопију HeLa ћелија третираних наночестицама CeO_2 коришћен је некомерцијални уређај развијен на институту Leibniz-IPHT у Јени (Немачка) [154]. Посебну прилагођеност за мерење ћелија овом систему даје коришћење имерзионог објектива за мерење ћелија у води, чиме се побољшава однос сигнал/шум, и аутоматизованост процеса мерења, који заједно омогућавају мерење и више хиљада ћелија у једном дану. Релативно велика ширина ласерског снопа на узорку, на уштрб спектралне резолуције, омогућава побуђивање и детекцију Рамановог расејања са читаве или готово читаве површине ћелије. Тиме се осигурава да Раманов спектар сваке ћелије носи информацију о њеном глобалном саставу.

Изглед система је приказан на слици 3.5А. За побуду зрачења коришћен је ласер таласне дужине 532 nm (*DPPS, Lasos*, Немачка), који преко једномодног оптичког влакна долази до усправног микроскопа, пролази кроз појасно-пропусни филтер којим се филтрира само ласерско зрачење и преко дихроичног „*notch*“ фитера рефлектује на имерзиони објектив. Зрак се даље кроз сочиво имерзионог објектива са увећањем 60x (NA 1,0; *Nikon*, Јапан) фокусира на раван узорка. Снага ласерског снопа на узорку је била 50 mW, при чему снага обасјава $\sim 10 \mu\text{m}^2$ површине ћелије. Овако широк дијаметар снопа омогућен је тиме што ласерски снап не осветљава у потпуности сочиво објектива. Време експозиције је било 0,5 s по спектру, односно ћелији. Раманово расејање се прикупља истим сочивом објектива, пролази кроз други „*notch*“ фитер где се одваја од ласерског зрачења и фокусира преко ахроматског 60 mm сочива на мултимодално језгро, које води сигнал у спектрометар са решетком од 400 зареза/mm (*IsoPlane160, Princeton Instruments*), и детектује се преко CCD детектора (*DCC1645C, Thorlabs, Germany*). Спектрална резолуција је била 9 cm^{-1} .

Аутоматизованост мерења омогућена је моторизованим сточићем микроскопа и програмираним поступком за препознавање ћелија на узорку. Узорак се поставља на сточић који је покретан по X и Y оси и повезан са аутоматизованим Z носачем које омогућава покретање по Z оси, односно фокусирање снопа на узорак. Најпре се узорак са доње стране осветљава белом LED светлошћу и „*bright-field*” слика (оптичка слика) узорка се детектује помоћу CCD камере. Алгоритам обрађује добијену слику на основу које детектује ћелије и бележи њихове координате, према којима ће се сточић током Раманове спектроскопије кретати и расејање са сваке од ћелија ће бити мерено (слика 3.5Б). Детаљан опис алгоритма за детекцију ћелија публиковали су Schie и сарадници [154].



Слика 3.5. (А) Платформа за „*high-throughput*“ мерења (брза мерења на великом броју узорка) Раманових спектра ћелија: (1) једномодно оптичко влакно (енгл. *single-mode fiber*), (2) улаз влакна у колиматор, (3) појасно-пропусни филтер (енгл. *band-pass filter*), (4) дихроични „*notch*“ филтер, (5) имерзиони објектив (за воду), (6) постолје за узорак, (7) носач за Z-позиционирање, (8) носачи за покретање по X, односно Y оси, (9) „*notch*“ филтер, (10) дихроично огледало, (11) камера за снимање у светлом пољу, (12) ахроматско сочиво објектива, (13) вишемодно оптичко влакно, (14) спектрометар. (Б) Слика детектованих ћелија под светлосним микроскопом; координате црвено обележених тачака се чувају и користе за позиционирање узорка у односу на ласерски сноп при мерењу Раманових спектра. Слика преузета и прерађена из [154]).

Узорак је за мерење припремљен на следећи начин: ћелије су гајене у фласковима, потом одлепљене са подлоге помоћу трипсина и фиксирани на начин описан одељку 3.9.2.1 (Раманова спектроскопија на уређају NTEGRA). Непосредно пред мерење, на плочице од CaF_2 нанесен је слој поли-L-лизина који побољшава адхезију ћелија за подлогу и након неколико минута, плочице су пребачене у комору за мерење. Комора је испуњена дејонизованом водом, а затим је на плочице под водом пипетом пажљиво нанета ћелијска суспензија. Око 30 минута је било довољно да ћелије падну и стабилизују се на подлози и узорак постане спреман за мерење. Осим ћелија, мерени су и Раманови спектри парацетамола и светлости калибрационе лампе, ради калибрације таласног броја, односно интензитета ћелијских спектра.

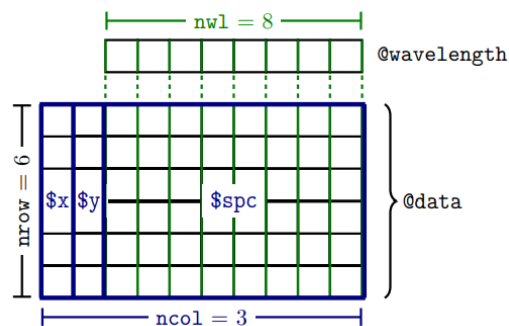
3.9.2.3. Интервал мерења

Спектри су мерени у опсегу $(68-3829) \text{ cm}^{-1}$, односно $(200-3760) \text{ cm}^{-1}$, у зависности од уређаја на ком су мерени и употребљене решетке. Сви су анализирани у приближно истим спектралним регионима: тзв. „*fingerprint*“ региону, $(600-1800) \text{ cm}^{-1}$ код спектра са некомерцијалног система, односно $(700-1800) \text{ cm}^{-1}$ код спектра са NTEGRA система, и региону

виших таласних бројева, (2600-3200) cm^{-1} код некомерцијалног система, односно (2700-3600) cm^{-1} код NTEGRA система. Ради једноставнијег излагања и дискутовања резултата, „*fingerprint*“ регион ће бити означен у овој дисертацији као нискофреквентни, на супрот другом региону, који ће бити означен као високофреквентни. Велика већина ћелијских Раманових модова, приписаних нуклеинским киселинима, аминокиселинама, протеинима, липидима итд, јавља се у нискофреквентном региону, па су у њему очекиване најзначајније промене индуковане наночестицама [160]. Високофреквентни регион ћелијског Рамановог спектра садржи знатно мањи број модова пореклом од вибрација СН, ОН и NH група који нису специфични строго за ћелијске молекуле. Међутим, ранија истраживања су показала да се однос интензитета модова у овом делу Рамановог спектра може корелисати са односом садржаја липида и протеина у ћелијама, као и да овај регион показује изванредан дијагностички потенцијал у Рамановој спектроскопији ткива [249].

3.9.3. Обрада Раманових спектра ћелија

Након мерења Раманових спектра, неопходно је проћи кроз процесе њихове основне обраде (енгл. *pre-processing*), како би анализа спектра била релевантна. Целокупан „*pre-processing*“ је рађен у програму *R*, коришћењем пакета *hyperSpec* [250] *hyperSpec* је направљен специјално за манипулисање хиперспектралним подацима. Омогућава да се сирови спектри увезу у програм и организују у објекте специфичне структуре. *hyperSpec* објекат може садржати један или много спектра који деле заједничку X-осу, уз придружене информације и експерименталне белешке. Таква структура омогућава примењивање операција на велики број спектра истовремено, што олакшава манипулисање великим сетовима података. Структура *hyperSpec* објекта дата је на слици 3.6. У овом пакету написане су бројне функције и састављени алгоритми за основну обраду спектра, али и за њихову статистичку анализу.



Слика 3.6. Структура података у *hyperSpec* објекту. Приказан је објекат који се састоји из 6 спектра, од којих сваки садржи по 8 тачака ($nwl = 8$). Објекат има 6 редова ($nrow = 6$) и 3 колоне ($ncol = 3$). У прве две колоне смештени су подаци који описују спектре (као што су њихова имена и локације са којих су учитани у програм), а у трећој се налази матрица која садржи интензитета модова у спектру. Један ред матрице носи интензитета у свим тачкама за један спектар, а једна колона носи интензитета на једној таласној дужини за све спектре у објекту. Слика преузета из туторијала за *hyperSpec* [250].

„*Pre-processing*“ Раманових спектра ћелија је обухватао: 1) уклањање „спајкова“ (енгл. *spike*) тј. нежељених улива космичке радијације у Раманов спектар, 2) калибрацију таласног

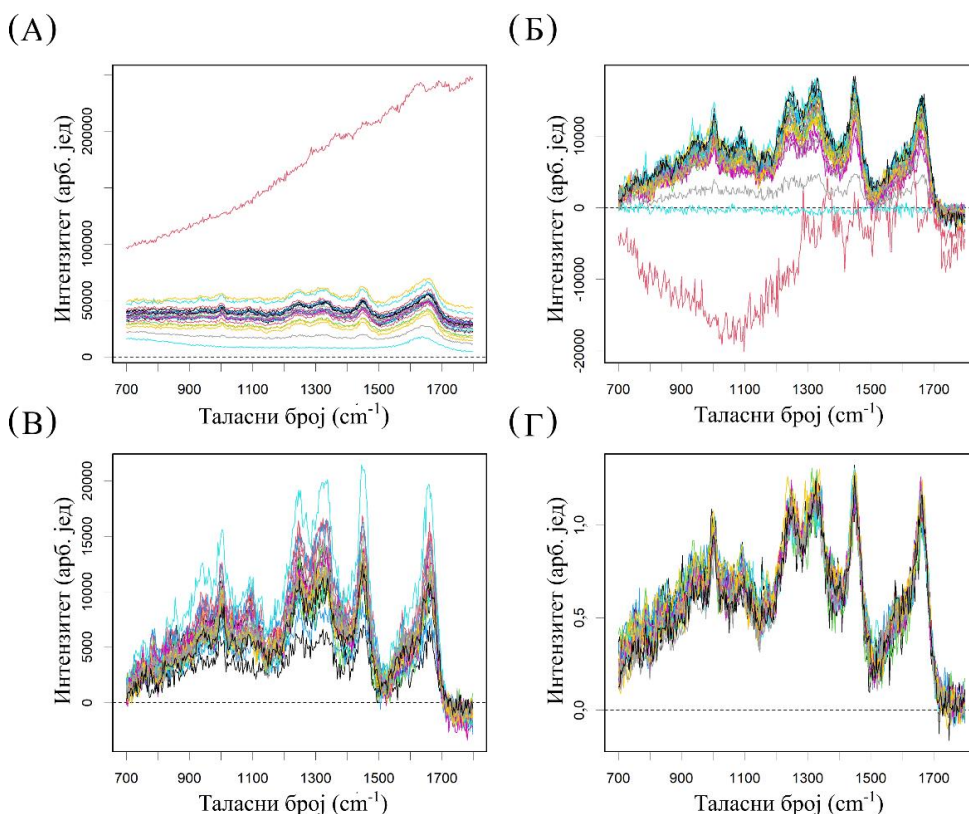
броја и интензитета, 3) интерполацију, 4) уклањање позадинског сигнала (енгл. *background*), 5) нормирање интензитета. На слици 3.7 приказани су резултати обраде хелијских Раманових спектра у корацима.

3.9.3.1. Уклањање „спајкова“

Спајкови су уклоњени процедуром која подразумева идентификовање и уклањање пикова који се од Раманових мода разликују по изразито високом интензитету и веома малим ширинама, а чије су позиције у спектру насумичне. Тачке у спектру између којих је спајк уклоњен повезане су накнадно интерполацијом помоћу функције *spline.approx* из пакета *hyperSpec*.

3.9.3.2. Калибрација

Калибрација таласног броја је вршена према Рамановим спектрима спрашеног парцетамола (ацетаминофен, Sigma-Aldrich), а интензитета према емисионом спектру калибрационе волфрам-халогене лампе (Kosi, САД). На почетку и на крају сваког мерног дана измерено је по неколико спектра парцетамола, односно лампе. Усредњени калибрациони спектри су коришћени за калибрацију хелијских спектра измерених истог дана.



Слика 3.7. Резултати основне обраде Раманових спектра HeLa хелија мерених на некомерцијалном уређају. Ради прегледности приказан је само нискофреквентни регион 50

насумично изабраних спектра. Раманови спектри након: (А) калибрације, (Б) одузимања позадинског сигнала методом EMSC, (В) селекције спектра, (Г) одузимања базне линије и нормирања.

Парацетамол је нарочито погодан за калибрацију комплексних спектра јер његов Раманов спектар садржи велики број модова у широком опсегу таласних дужина, што калибрацији даје велику поузданост. У овом раду је за калибрацију коришћено 17 модова парацетамола у нискофреквентном и 2 мода у високофреквентном спектралном региону. Калибрација је рађена према алгоритму који обухвата следеће кораке: мерење Рамановог спектра парацетамола, визуелну идентификацију модова измереног спектра са референтним модовима из каталошког спектра парацетамола [250], додељивање тачног (каталошког) таласног броја идентификованим модовима, полиномску калибрацију измереног спектра парацетамола, замену X осе хелијских спектра X осом калибрисаног спектра парацетамола.

Калибрација интензитета је вршена тако што је прво измерен референтни спектар лампе и подељен са емисионим спектром који даје спецификација произвођача лампе, а затим су добијеном функцијом подељени остали експериментални спектри.

3.9.3.3. Интерполација

Како би се на спектре мерене различитог дана и калибрисане у односу на различите X осе парацетамола могле применити исте операције у циљу њихове анализе, била је неопходна интерполација свих спектра на јединствен интервал таласних бројева на X оси. Истоветност два интервала значи да имају исти почетак и исти завршетак и да су све тачке унутар два интервала исте. Интерполација је вршена помоћу функције *spc.loess* из пакета *hyperSpec*. Ова функција уз интерполацију истовремено врши равнање (енгл. *smoothing*) спектра, тј. уклањање шума. Улазни параметри функције су почетна и крајња вредност таласног броја на X оси и корак који одређује просторно растојање између две тачке у спектру. Битно је задати корак којим се постиже жељено смањење шума, али тако да се не утиче на интензитет Раманових модова и не унесу вештачке промене у вибрациону информацију коју спектар носи. У овом раду корак за интерполацију је постављан тако да буде приближно једнак спектралној резолуцији, те је равнање било минимално. Тиме је избегнут негативан утицај интерполације, а постигнуто је да спектри добију јединствену осу таласних бројева.

3.9.3.4. Уклањање позадинског сигнала

У Рамановој спектроскопији биолошких узорака, посебно кад се користе ласерске линије из видљивог дела спектра, флуоресценција је у мањој или већој мери незаобилазан нежељени ефекат. Разлог је што биолошки узорци садрже бројне флуорофоре, као што су флавинске или порфиринске групе, које апсорбују у областима блиским енергији побудне ласерске линије. Исте, тзв. унутрашње флуорофоре доводе до нежељене аутофлуоресценције у методама које се заснивају на флуоресцентном обележавању, као што је проточна цитофлуориметрија. Због тога је, у општем случају, увек неопходно минимизирати допринос флуоресценције Рамановим

спектрима ћелија. Флуоресценција даје сигнал велике ширине (неколико стотина cm^{-1}) и високог интензитета који се споро мења, па се уобичајено апроксимира полиномом n -тог реда и као таква одузима од оригиналног спектра. Тај начин одузимања позадинског сигнала у овом раду примењен је на спектре мерене на уређају NTEGRA, и то одвојено на нискофреквентни и високофреквентни регион, због велике разлике у интензитету и облику ова два региона. Регион који се налази између два поменута региона, $(1800-2700) \text{ cm}^{-1}$, је изузет из анализе, пошто ћелијски спектар у том региону не садржи информативне Раманове модове. Позадински сигнал је апроксимиран линеарном функцијом јер је кроз радове у области показано да одузимање полинома вишег реда може да унесе вештачке разлике у експерименталне спектре.

Осим флуоресценције, позадински сигнал чине и друга неспецифична расејања, као што је квазиеластично расејање са наночестица, што је посебно било изражено у спектрима ћелија третираних наночестицама SPRT-CeO₂. Због тога је процедура за уклањање позадинског сигнала код ових ћелија прилагођавана и њен исход је на сваком обрађеном спектру строго контролисан.

Код спектра мерених на некомерцијалном уређају у воденој средини, осим флуоресценције и неспецифичног расејања, део позадинског сигнала долази и од расејања са молекула воде. У овом случају примењена је процедура EMSC (енгл. *Extended Multiplicative Scatter Correction*) за уклањање позадинског сигнала. Овај метод је осмишљен специјално за корекцију сложеног позадинског сигнала у вибрационим спектрима [251]. Функција *emsc* је имплементирана у R пакет *cbmodels* [252]. Заснива се на фитовању линеарне комбинације унапред дефинисаних референтних података на оригинални спектар методом најмањих квадрата, по моделу [253]:

$$S(\tilde{\nu}) = a + b \cdot m(\tilde{\nu}) + d_1 \cdot \tilde{\nu} + d_2 \cdot \tilde{\nu}^2 + \dots + d_n \cdot \tilde{\nu}^n + \epsilon(\tilde{\nu}),$$

где је S оригинални спектар који се моделује према референтном спектру $m(\tilde{\nu})$. Референтни спектар је апроксимација идеалног спектра без позадинског сигнала. Параметар a одређује ефекат базне линије (зависи од детектора), а резидуал ϵ описује немоделоване ефекте, тј. остале неспецифичне доприносе оригиналном спектру, укључујући и шум. Средишњи изрази $d_1 \cdot \tilde{\nu} + d_2 \cdot \tilde{\nu}^2 + \dots + d_n \cdot \tilde{\nu}^n$ представљају полиноме који описују неконстантне доприносе базној линији, као што су флуоресценција, расејање на супстанци растварача и сл. Параметри a , b и $d_1 \dots d_n$ се рачунају као коефицијенти фитовања методом најмањих квадрата. На основу параметара одређених из фита оригинални спектри се коригују у $S_k(\tilde{\nu})$ према изразу

$$S_k(\tilde{\nu}) = \frac{S(\tilde{\nu}) - a - d_1 \cdot \tilde{\nu} - d_2 \cdot \tilde{\nu}^2 - \dots - d_n \cdot \tilde{\nu}^n - \epsilon(\tilde{\nu})}{b}.$$

Основни модел EMSC се може проширити увођењем додатних изрази који описују друге познате изворе варијабилности међу спектрима ирелевантне за циљ и предмет анализе.

Процедура EMSC подразумева да су познате компоненте које дају позадински сигнал у вибрационом спектру, односно њихови вибрациони спектри. У случају ћелијских спектра мерених у води, било је потребно прво измерити Раманов спектар воде. Такође је за извођење процедуре потребан спектар чисте супстанце, коју бисмо у овом сучају могли да назовемо идеалном ћелијом. У ту сврху, прво је процедура EMSC изведена фитовањем спектра воде на оригиналне спектре и одузимањем његовог доприноса. Од резултујућих спектра, на основу емпиријског искуства изабран је један који би одговарао спектру идеалне ћелије и од њега је позадински сигнал пореклом од флуоресценције одузет фитовањем базне линије полиномом или

помоћу *hyperSpec* функције *spc.rubberband*. Тај спектар је означен као референтни, тј. као апроксимација спектра идеалне хелије. Затим су оригинални спектри фитовани горе описаном методом најмањих квадрата. Коефицијенти добијени у фитовању помножени су са спектром позадине и производ је одузет од оригиналних спектара. Као резултат, добијени су спектри ослобођени доприноса воде, флуоресценције и другог неспецифичног расејања.

3.9.3.5. Нормирање интензитета

Циљ нормирања је да се разлике у целокупном интензитету спектара које потичу од јачине сигнала, при анализи не урачунавају као део варијабилности међу спектрима. У ту сврху спектри су нормирани помоћу функције *rowMeans*, тако што је интензитет сваког спектра подељен својим усредњеним интегралним интензитетом.

3.9.3.6. Селекција спектара

Услед аутоматизованости мерења у случају „*high-throughput*” система, међу хелијским спектрима постоје они у којима доминирају Раманови модови воде, CaF_2 и различитих нечистоћа, као и спектри код којих је и након обраде изузетно висок допринос флуоресценције. Због тога су нормирани спектри упоређени са изабраним референтним спектром и на основу израчунатог Пирсоновог корелационог коефицијента из даље анализе су искључени сви спектри са коефицијентом $\leq 0,9$. Из изабраних спектара су издвајани нискофреквентни и високофреквентни регион и њихове базне линије су даље кориговане полиномом првог реда. Региони су поново спојени тако да чине један спектар. Сви спектри који ће бити анализирани заједно нормирани су на начин описан у поглављу 3.9.3.5.

Пошто у случају спектара мерених на уређају NTEGRA није коришћен алгоритам за идентификацију хелија, корак селекције је вршен пре процесирања спектара, тј спектри са изразито високом флуоресценцијом или изразито високим интензитетом модова CaF_2 су искључивани одмах након мерења.

3.9.4. Анализа усредњених Раманових спектара хелија: одређивање интензитета Раманових модова

Модови у Рамановом спектру се уобичајено математички описују Лоренцовом функцијом, тзв. лоренцијаном облика:

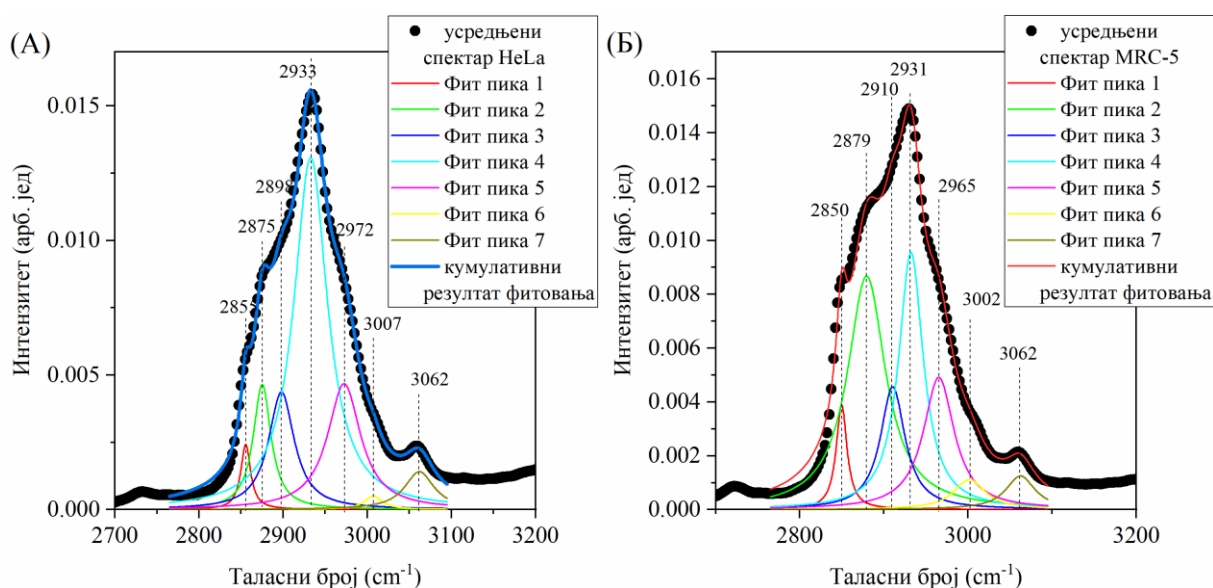
$$I_L(\omega) \equiv \frac{\frac{I_{L0}}{\pi\Gamma}}{1 + \left(\frac{\omega - \omega_0}{\Gamma}\right)^2},$$

где је I_L интензитет пика у функцији фреквенције ω , I_{L0} максимална амплитуда пика, ω_0 позиција пика, а Γ полуширина [254]. При фитовању криве Рамановог спектра овом функцијом за сваки

мод се подешавају вредности параметара I_{L0} , ω_0 и Γ док се не постигне најбоља могућа апроксимација фитоване криве са експерименталном.

Описана метода је коришћена при анализи промене интензитета Раманових модова у високофреквентном региону усредњених Раманових спектра. Површина испод криве уфитованог мода узимана је као интегрални интензитет датог мода. На слици 3.8 приказан је резултат фитовања лоренцијанима контролних спектра HeLa (А) и MRC-5 (Б) ћелија.

Високофреквентни спектрални регион није богат модовима као нискофреквентни, а позиције модова су углавном добро познате и визуелно релативно лако уочљиве, што је обезбедило поуздане полазне параметре у процедури фитовања. Нискофреквентни регион је, међутим, веома богат модовима који се преклапају, због чега није могуће на поуздан начин извршити фитовање већине модова. У овом случају, за вредности интензитета модова у усредњеним спектрима узимана је висина пика.



Слика 3.8. Фитовање високофреквентног региона спектралне криве усредњених Раманових спектра (А) HeLa, (Б) MRC-5 ћелија.

3.9.5. Мултиваријантна статистичка анализа Раманових спектра

Раманови модови ћелијских спектра потичу од вибрација функционалних група које улазе у састав различитих молекула. Следи да промена интензитета једног мода може указивати на промене у заступљености већег броја молекула/конформација, док, са друге стране, промена у заступљености једног молекула/конформације доводи до промена интензитета већег броја модова. Такође, велики број модова се састоји из више мањих модова различитог порекла, тако да је из спектра могуће одредити само њихов збирни интензитет. Због тога су методе мултиваријантне статистике знатно прикладније за анализу вибрационих спектра ћелија него поређење интензитета појединачних модова.

Методе мултиваријантне статистике анализирају објекте и групе објеката које карактерише већи број променљивих и за циљ имају издвајање променљивих чије се промене симултано дешавају. Промене могу бити толико мале амлитуде, да би се њихов значај без мултиваријантне статистике превидео. Неки аутори наводе људско лице као добар модел мултиваријантног објекта, објашњавајући да два људска лица не морају имати различиту боју очију и облик носа да би их други људи савршено разликовали међу собом, већ се суштинска разлика може огледати у низу других, мање уочљивих променљивих [255]. Приступ униваријантне статистике би било упоређивање једног по једног унапред одређеног параметра, почев од најупечатљивијих, у циљу дефинисања разлика. Мултиваријантна статистика, пак, анализира промене свих параметара симултано и дефинише оне који чине разлику.

У сврху дефинисања промена Раманових спектра хелија узрокованих дејством наночестица у овом раду је коришћена мултиваријантна метода анализе главних компоненти или РСА (енгл. *principal component analysis*). Неке од метода мултиваријантне статистике служе да се направи модел за предвиђање припадности једног објекта (нпр. спектра) одређеној групи објеката. У ту сврху, у овом раду су коришћене линеарна регресија методом најмањих квадрата или PLS (енгл. *partial least squares regression*) и линеарна дискриминациона анализа (енгл. *linear discriminant analysis*).

3.9.5.1. РСА

РСА се заснива на редукцији димензионалности, тј. на трансформацији великог броја променљивих у мањи број нових променљивих које на адекватан начин описују систем. На конкретном примеру, свака од више стотина тачака једног спектра представља једну променљиву, али није свака од њих значајна за описивање разлика између спектра третираних и нетретираних хелија. РСА улазне променљиве приказује преко њихових међусобно ортогоналних линеарних комбинација које најбоље осликавају разлике између свих анализираних спектра. Тако настале комбинације – главне компоненте (PC), представљају нове променљиве. Прва компонента, PC1, је линеарна комбинација која описује највећи проценат укупне варијабилности међу спектрима, а свака наредна PC обухвата све мањи проценат варијабилности. Због тога се анализа базира углавном на првих неколико компоненти, најчешће прве две или три (PC1-PC3).

Теоријска основа РСА може се изложити на примеру анализе вибрационих спектра [256]. Спектри који улазе у анализу могу се представити као матрица S са $m \times n$ димензија:

$$S = \begin{bmatrix} a_{11} & a_{12} & \dots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & \dots & a_{2n} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ a_{m1} & a_{m2} & \dots & a_{mn} \end{bmatrix},$$

где је m број спектра, а n број тачака (број променљивих, тј. таласних дужина) у сваком спектру. Вредности параметара a_{ij} представљају нормирани интензитети у спектру на одређеним таласним бројевима. Сингуларном декомпозицијом матрице S , добија се израз

$$S = UV^T + E.$$

Матрица U садржи првих x својствених вектора (енгл. *eigenvectors*) матрице SS^T , који се у РСА називају скорови. Матрица V садржи првих x својствених вектора матрице $S^T S$, који се означавају као вектори оптерећења (енгл. *loadings*). У презентацији резултата, сами вектори

оптерећења се често означавају као РС, што ће бити случај и у овој дисертацији². Матрица Λ представља дијагоналну $x \times x$ матрицу која садржи првих x сингуларних вредности матрице S (позитивне вредности квадратног корена својствених вредности матрица SS^T и $S^T S$). E је резидуална матрица која садржи део оригиналних података који није обухваћен са првих x сингуларних вредности, тј. првих x главних компоненти. Израз се даље може скратити у

$$S = PL^T + E,$$

где P представља $m \times x$ матрицу скорова, L представља $n \times x$ матрицу РС (*loadings*) вектора. Суштински, вектори оптерећења представљају нове, ортогоналне „правце” у простору променљивих а скорови су ортогоналне пројекције оригиналних спектра на векторе оптерећења. Параметар x је број главних компоненти којима ће се описати варијабилност спектра. Циљ је да овај број буде што мањи, како би се почетни скуп спектра са великим бројем варијабли описао преко мањег броја нових варијабли (скорова) и тиме олакшала интерпретација резултата анализе. С друге стране важно је да овај број буде и довољан да се обухвати што већи проценат укупне варијабилности међу свим спектрима, тј. да важне информације не буду задржане у резидуалној матрици.

РСА спада у тзв. ненадзиране методе, што значи да припадност објекта, у овом случају спектра, једној од група објеката, нпр. третираним или контролним ћелијама, није унапред позната. Потребно је испитати да ли РС генерисане према матрици која садржи све спектре свих група, описују и разлике међу датим групама. Одговор на то питање дају скорови. Скорови представљају координате сваког спектра у новом простору који формирају РС, односно показују просторни распоред свих спектра у односу на дате РС. Уколико су спектри третираних ћелија довољно удаљени од спектра контролних ћелија, тј. уколико су њихове ортогоналне пројекције на одређену РС на довољно великом растојању, кажемо да је дата РС значајна за раздвајање ћелија. Она садржи информације о Рамановим модовима чији је интензитет и/или позиција након третмана промењен. Поступак тумачења резултата РСА описан је кроз конкретне примере из ове дисертације у поглављу 4.5.1.2, а индиректно и у осталим поглављима после овог која се тичу РСА.

За анализу Раманових спектра ћелија третираних наночестицама ZnO, коришћена је нестандартна варијанта РСА, **ненегативна РСА** (енгл. *non-negative PCA*). Стандардна РСА резултује компонентама које садрже како позитивне, тако и негативне пикове, па једна РСА истовремено представља супротстављене промене у анализираним ћелијама. С обзиром да су интензитети свих модова у Рамановим спектрима позитивне вредности, интуитивније је промене у њима пратити преко компоненти које такође имају само позитивне вредности. У таквим компонентама лакше је препознати на које се молекуле или класе молекула односе промене обухваћене једном РС. Код биолошких узорака, чији Раманови спектри обилују у великој мери преклопљеним модовима, ненегативна РСА се показала нарочито корисном. То је разлог што започиње њена примена на пољу спектроскопије биолошких узорака [196, 257, 258]. Принцип ове методе је исти као и стандардне РСА, али се при рачунању линеарних комбинација поставља услов ненегативности за РС. Ненегативна РСА је изведена помоћу функције *nsprcomp* из истоименог пакета у програму *R* [259].

² Заправо, РС је линеарна комбинација оригиналних променљивих, а „loading“ вектор чине коефицијенти који дефинишу РС као правац у простору n променљивих.

Када се анализирају вибрациони спектри ћелија третираних различитим дозама наночестица или различитим наночестицама методом PCA, било да се ради о стандардној или ненегативној варијанти, може се кренути од два различита приступа. Први подразумева да се PCA примени на све анализирание групе заједно, а други да се групе анализирају по паровима, упоређујући по једну од доза са контролом, или две различите дозе између себе. Први приступ се у литератури некада означава као „*multiway*“ а други као „*pairwise*“ и оба су коришћена у овој дисертацији. PC добијене из анализе различитих парова су међу собом упоређиване. При поређењу компоненти добијених у анализама различитих парова нису релевантни апсолутни интензитети локалних максимума/минимума. Значај сваке компоненте за одређени спектар одређен је вредношћу скорa за дати спектар и губи информативност ако се посматра ван контекста PCA у којој је добијена. Због тога у анализи резултата нису поређени апсолутни интензитети, него релативни односи интензитета појединих пикова у свакој од компоненти.

Два приступа су такође коришћена и при избору спектралних региона који ће бити анализирани методом PCA. Неке анализе су вршене на спектрима у целокупном опсегу (нискофреквентни + високофреквентни), а већина њих засебно на нискофреквентном и високофреквентном региону. Високофреквентни регион је неколико пута интензивнији од нискофреквентног. Када се два региона анализирају заједно, високофреквентни регион има велики утицај на изглед главних компоненти, односно на начин на који ће се ћелије у односу на њих груписати. Овај регион, са друге стране, садржи знатно мањи број модова него нискофреквентни регион, а модови који се у њему налазе нису високоспецифични за ћелију. Када се два спектрална региона анализирају одвојено, обезбеђује се да се оба региона користе као равноправни и независни критеријуми за разликовање третираних ћелија.

3.9.5.2. PLS-LDA

За класификацију спектра и предвиђање припадности спектра непознатог порекла једној од група узорака изграђен је PLS-LDA модел, што практично значи да су компоненте добијене у PLS анализи искоришћене за конструкцију LDA модела.

Као и код PCA, циљ PLS методе је да податке представи преко малог броја линеарних комбинација, али тако да оне обухвате што више разлика између унапред задатих група [260]. Због тога је PLS, за разлику од PCA, надзирана метода, тј. припадност спектра матрице S једној од група је дефинисана као улазни параметар и представљена као вектор категоријских променљивих у матрици Y . Задатак PLS анализе је да моделује односе између две матрице, S и Y , тј. да израчуна скорове и компоненте из матрице S , тако да коваријанса између S и Y буде што већа. Променљиве из матрице S означавају се као предикторске променљиве, јер предвиђају исход зависних променљивих у Y , према моделу

$$Y = SB + E,$$

где је B матрица коефицијената регресије, а E матрица резидуала. Што је боља предикција, то су резидуали мањи. Због тога се за рачунање B користи метода најмањих квадрата, тј. критеријум минимизирања суме квадрата резидуала (узима се квадратна вредност да се позитивне и негативне вредности резидуала не би поништиле).

Прва PLS компонента представља линеарну комбинацију предикторских променљивих којом се постиже највећа корелација предикторских променљивих са исходом, тј. где су

корелациони коефицијенти између предикторских и исходних променљивих највећи. Свака следећа компонента носи све мању корелацију са Y и према томе је мање релевантна за предвиђање исхода. PLS подразумева да ће број компоненти којима ће анализа резултовати, тј. преко којих ће бити описане разлике између група спектара, бити задат као параметар на почетку анализе. То са једне стране даје предност значајне редукције димензионалности, а с друге стране представља опасност по исправност модела и захтева искуство у раду [260].

PLS је изведена помоћу функције *widekernelpls.fit* из R пакета *pls* [261]. Ова функција садржи алгоритам за израчунавање PLS компоненти прилагођен случајевима када је број променљивих (тачака у спектру) много већи од броја објеката (спектара), што је класичним алгоритмом споро и рачунарски захтевно [262]. Задато је израчунавање пет компоненти, од којих ће затим започети LDA.

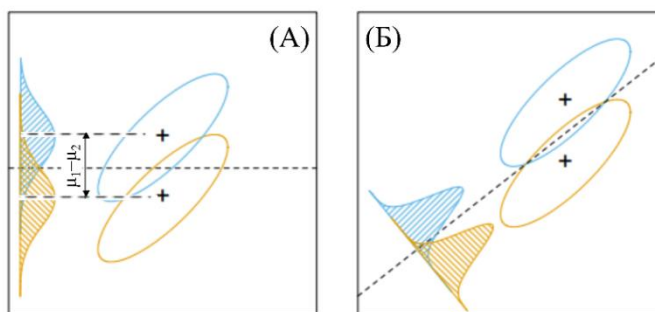
LDA је такође надзирана метода која има за циљ редукцију димензија, али и класификацију објеката, за шта је у овом раду и коришћена. LDA модел за класификацију се гради тако што се одабере један сет података (насумично изабрани спектри из сваке од група) на којима се анализа изводи и модел тренира, а затим се на сету преосталих података модел тестира. Сваком објекту сета за тренирање се унапред додељује класа којој припада и претпоставља се да су објекти у класама распоређени у складу са Гаусовом (нормалном) расподелом, тј. да имају униформне (стандардизоване) матрице коваријансе. На слици 3.9. су приказане две групе објеката, код којих је униформност коваријансе представљена истим облицима елипсоидне криве, а вероватноћа класификације објекта у једну од група приказана је Гаусовим функцијама у облику звона. Параметри испрекидане линије која их дели (линеарне дискриминанте, LD) се подешавају на основу података сета за тренирање, тако да се постигне највећа удаљеност између центроида, $(\hat{\mu}_2 - \hat{\mu}_1)$, али уз што мању варијансу унутар група. Слика 3.9А показује слабо раздвајање између група (велико преклапање Гаусових кривих, тј. велику вероватноћу погрешне класификације), док је на слици 3.9Б постигнуто оптималније раздвајање група. Математички услов да би се један објекат класификовао у групу 2 (окер боја на слици) је следећи [263]:

$$x^T \hat{\Sigma}^{-1} (\hat{\mu}_2 - \hat{\mu}_1) > \frac{1}{2} \hat{\mu}_2^T \hat{\Sigma}^{-1} \hat{\mu}_2 - \frac{1}{2} \hat{\mu}_1^T \hat{\Sigma}^{-1} \hat{\mu}_1 + \log\left(\frac{N_1}{N}\right) - \log\left(\frac{N_2}{N}\right),$$

где је N укупан број објеката, N_k број објеката класе k , а $\hat{\Sigma}$ коваријанса сваке класе, која се добија када се сума коваријанси за све класе нормира у односу на број објеката и класа:

$$\hat{\Sigma} = \frac{1}{N - K} \sum_{k=1}^K n_k \hat{\Sigma}_k.$$

Ако услов није испуњен, објекат се придружује класи 1 (плава боја на слици). Уколико је број променљивих у сету података већи од броја објеката, што је случај када се анализира неколико стотина спектара који садрже неколико хиљада тачака, матрица коваријансе се не може израчунати исправно и LDA се не примењује [264]. Због тога је у овом раду уместо оригиналних спектара узето пет PLS компоненти, које и јесу репрезентација оригиналних спектара приказана преко пет димензија.



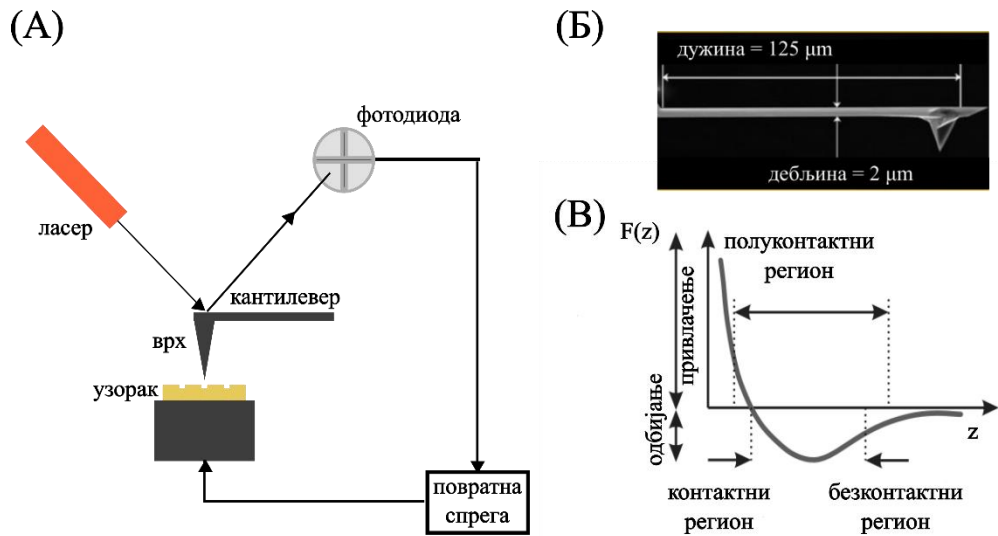
Слика 3.9. Класификација објеката у две групе линеарном дискриминацијом: (А) слабија класификација, због преклапања Гаусових расподела; (Б) класификација оптимизована увођењем новог правца дискриминације. Слика преузета и модификована из [263].

LDA је изведена помоћу функције *lda* из *R* пакета *MASS* [265]. За тестирање модела тј. предикцију припадности непознатог спектра некој од група коришћена је функција *predict* из пакета *stats* [266]. Сваки трећи спектар из свих група је издвојен у сет за тестирање модела.

3.10. AFM

Микроскопија на бази атомских сила, као вид скенирајуће пробне микроскопије са веома великом резолуцијом, може се користити за испитивање морфологије, растојања у хоризонталној равни као и у вертикалном правцу, храпавости и других особина микро- и наноструктурних површина. Овај тип микроскопије заснива се на мерењу интензитета силе генерисане у интеракцији сонде AFM микроскопа и атома узорка. Интензитет силе зависи од растојања између сонде и узорка, тако да се може апроксимирати Ленард-Џонсовом кривом (слика 3.10В): удаљавањем сонде од узорка расту силе привлачења, а приближавањем силе одбијања [267]. У основном моду рада, скенирање је засновано на одржавању силе интеракције константном. Због тога ће скенер са узорком да се помери на доле у случају наиласка на избочину (на површини узорка) која доводи до повећања силе. И супротно, у случају наиласка на удубљење, сила се смањује, тако да ће скенер узорак померити на горе. Резултујуће померање скенера у вертикалном правцу одговара слици површине узорка.

На слици 3.10А шематски су приказани најважнији делови AFM микроскопа. Сонду микроскопа чини гредица или танка гредица са оштрим врхом (енгл. *tip*) на слободном крају. Преко врха се остварују интеракције са узорком. Гредица је са друге стране везан за носач којим се подешава висина сонде у односу на узорак. На горњу површину гредице фокусиран је ласерски зрак, који се рефлектује и усмерава на четворосегментну фотодиоду. Промена јачине силе доводи до деформације гредице, при чему се оптички пут ласера мења, док ласерски зрак пада на различит сегмент фотодиоде. Када гредица осцилује по *Z* оси (горе-доле), ласерски зрак мења позицију између горња два и доња два сегмента; када на гредицу делују и латералне силе, зрак мења позицију између левих и десних сегмената фотодиоде. Промена разлике у јачини струје између сегмената даје повратни сигнал који долази до носача гредице. Висина гредице се затим подешава тако да се сила одржава константном. На основу измерених промена висине гредице на мрежи тачака узорка конструише се мапа која показује висину узорка.



Слика 3.10. Принцип рада AFM микроскопа: (А) Шематски приказ AFM микроскопа, Б) Бочни изглед AFM гредице NTEGRA NSG01 коришћеног у екпериментима (слика преузета од произвођача и модификована), (В) Ленард-Џонсова крива која описује промену силе у функцији растојања између врха гредице и узорка.

Постоји више режима рада AFM микроскопа, од којих су основни контактни, полуконтактни и бесконтактни режим. У оригиналној публикацији у којој је 1986. године објављено откриће AFM микроскопа [214] описан је његов рад у контактном режиму. Подразумева да се врх микроскопа налази у физичком контакту са површином узорка. Што је површина узорка виша, тј. ближа врху сонде, силе одбијања које деформишу гредицу су јаче. Сигнал се повратном спрегом доводи до носача гредице и подешава се растојање између врха и узорка тако да се вредност силе врати на почетну задату вредност. Промена растојања између врха микроскопа и узорка, Δz , директно је сразмерна сили F , као што описује Хуков закон: $F = -k\Delta z$ (k је константа еластичности гредице).

У бесконтактном режиму, врх сонде осцилује изнад узорка својом резонантном (или блиском) фреквенцијом. Када се врх приближи површини узорка, силе привлачења почињу да расту. Међумолекулске силе на тој удаљености су веома слабог интензитета, али се могу регистровати посредно преко утицаја на амплитуду осцилација гредице. Промена амплитуде се поново детектује на фотодиоди и преко система повратне спреге преноси на Z постоље. Висина гредице се прилагођава тако да се амплитуда осцилација врха врати на почетну задату вредност.

Трећи основни режим рада AFM микроскопа је полуконтактни или наизменични (енгл. *tapping* или *intermittent*). Овај режим такође подразумева мерење амплитуде осцилација гредице, али за разлику од бесконтактног, укључује краткотрајно остваривање физичког контакта AFM врха са узорком („тапкање“ површине узорка). Између врха и узорка се при томе јавља шири опсег сила привлачења и одбијања (слика 3.10В). Осим коришћења промене амплитуде за топографско осликавање, у овом режиму се на основу фазног кашњења осцилација могу испитивати и промене механичких својстава материјала.

Вредност резонантне фреквенције, ω_0 , одређена је константном еластичности и масом гредице, m :

$$\omega_0 = \sqrt{\frac{k}{m}}.$$

Да би се регистровале разлике у slabим међумолекулским силама, потребно је да се вредност k у једначини Хуковог закона минимизира. Са друге стране, како би се спречио утицај акустичних таласа и вибрација, резонантна фреквенција треба да остане висока, тј. потребно је минимизирати масу гредице [267]. Због тога гредица мора бити микрометарских димензија и специфичног облика (слика 3.10Б).

У оквиру ове дисертације, сва AFM снимања ћелија третираних наночестицама и контролних ћелија изведена су у полуконтактном режиму. Мерења су вршена на уређају NT-MDT NTEGRA Prima под амбијенталним условима (влажност ваздуха 30-40 %). Коришћени су NSG01(NT-MDT) врхови са константом силе $k = 5,1 \text{ Nm}^{-1}$ и типичном резонантном фреквенцијом 150 Hz. Сlike су добијане на два начина: мерењем промене силе, односно растојања AFM врха од узорка (2D и 3D топографије), и такође мерењем амплитуде осцилација гредице.

Осим за осликавање, AFM је коришћен и за одређивање два морфолошка параметра: површинске хrapавости и просечне висине ћелије. Висина ћелије је измерена на мрежи тачака преко читаве површине ћелије и изражена као средња вредност мерења. Површинска хrapавост је израчуната као средње квадратно одступање корена (енгл. *Root Mean Square Deviation*, RMSD) висине ћелије:

$$S_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_i^2},$$

где је z_i висина сваке од N тачака на узорку [268].

У општем случају, AFM микроскопија не захтева специфичну припрему узорака за мерење, па је такав случај и са мерењима на ћелијама. HeLa и MRC-5 ћелије су за AFM гајене на покровним стакалцима пречника 10 mm, смештеним у плоче са шест бунара. Након потребног времена инкубације са наночестицама, медијум са наночестицама је уклоњен и ћелије су два пута испране PBS-ом. Затим су 15 минута инкубиране у у комерцијалном фиксативу Histofix и након тога два пута испране PBS-ом. Стакалца са ћелијама су до почетка мерења чувана на 4°C у PBS-у. Непосредно пред мерење, PBS је одстрањен, ћелије су два пута испране водом и осушене на собној температури.

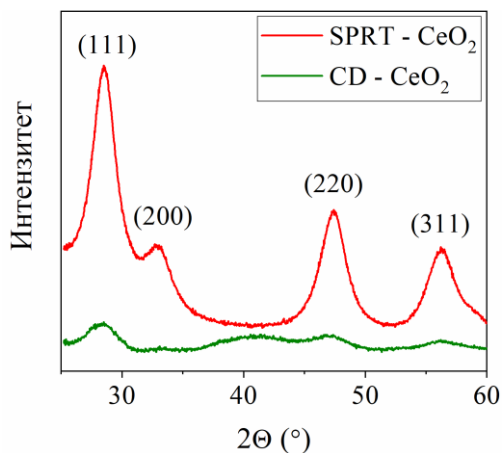
4. Резултати

4.1. Синтеза и карактеризација наночестица

Након синтезе SPRT-CeO₂ самопропагирајућом методом на собној температури и CD-CeO₂ директном методом у раствору у присуству молекула декстрана молекулске масе 40 kDa, уследила је карактеризација добијених честица. Карактеризација је обухватала потврђивање кристалне структуре CeO₂, одређивање величине кристалита, величине саме честице (зрна) у дисперзији, као и тенденције наночестица да формирају агрегате. Наночестице ZnO коришћене у овом раду су набављене комерцијално, те су њихове карактеристике добијене од произвођача унапред биле познате.

4.1.1. Потврда кристалне структуре наночестица рентгенском дифракцијом

Рентгенском дифракцијом на праху SPRT-CeO₂ и вишеслојном размазу CD-CeO₂ добијени су дифракциони спектри наночестица, приказани на слици 4.1. Они су представљени као интензитет зрачења рефлектованог са узорка у функцији угла између правца простирања упадног зрачења и нормале на површину узорка. Сваки пик у спектру представља расејање под одређеним углом, дефинисаним кристалном структуром материјала. Положај пикова, њихов интензитет и ширина дају дифракциони образац кристала. Бројевима изнад пикова означена је кристална раван са које је зрачење рефлектовано.



Слика 4.1. XRD спектри SPRT-CeO₂ (црвено) и CD-CeO₂ (зелено) наночестица

Добијени дифракциони спектри су упоређени са литературним спектрима CeO₂ из базе података за софтвер и потврђена је флуоритна *Fm-3m* кристална структура CeO₂ код обе врсте наночестица. Низак интензитет спектра CD-CeO₂ је последица мале масе CeO₂ у узорку, с обзиром да се синтезом CD-CeO₂ добија раствор концентрације 4 mg/ml, док је SPRT-CeO₂ мерен као чист нанопрах. Применом Шерерове једначине израчуната је величина кристалита CeO₂ од 4 nm код SPRT-CeO₂ и 3,5 nm код CD-CeO₂ [239].

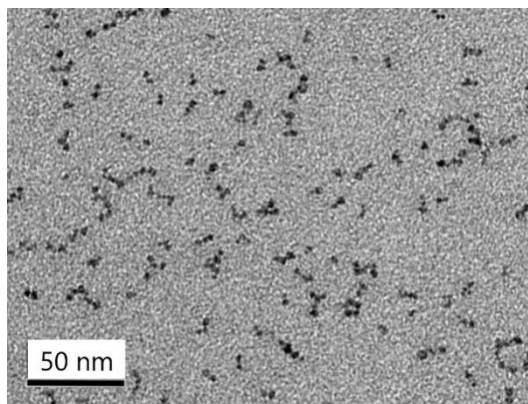
4.1.2. Одређивање хидродинамичког радијуса методом DLS

Мерењима методом DLS показано је да је хидродинамички радијус SPRT-CeO₂ знатно већи него што су димензије кристалита одређене рентгенском дифракцијом (Табела 4.1). Од раније је познато да је величина честице SPRT-CeO₂ већа од величине кристалита, односно да више кристалита чини једну честицу [269]. Моделовањем Раманових модова израчуната је величина честице 8-10 nm [269, 270], док је са AFM микрографија очитана величина до 20 nm [271]. Такође је раније помоћу TEM показано да ове честице имају тенденцију формирања агломерата микронских димензија [272]. Хидродинамички радијус од 849 nm добијен методом DLS у овом раду потврђује постојање крупних агломерата SPRT-CeO₂ у воденом раствору. Како би се редуковао степен агломерације, дисперзије ових честица су непосредно пред третман ћелија ултрасониране најмање 30 минута.

Табела 4.1. Карактеристике наночестица одређене методама XRD (величина кристалита) и DLS (просечни хидродинамички радијус честице)

Наночестица	Величина кристалита (XRD)	Хидродинамички радијус (DLS)
SPRT-CeO ₂	4 nm	849 nm
CD-CeO ₂	3,5 nm	47 nm

За разлику од SPRT-CeO₂, хидродинамички радијус CD-CeO₂ од 47 nm сведочи да декстраном обложене наночестице не формирају агломерате, тј. да су знатно стабилније у воденом раствору од необложених честица. Како би се додатно испитала величина и агломерација ових честица, урађена су TEM мерења CD-CeO₂. Добијене микрографије су потврдиле да су ове наночестице у дисперзији стабилне као појединачне честице и да величина честице (око 4 nm) приближно одговара величини кристалита израчунатој преко XRD (слика 4.2).



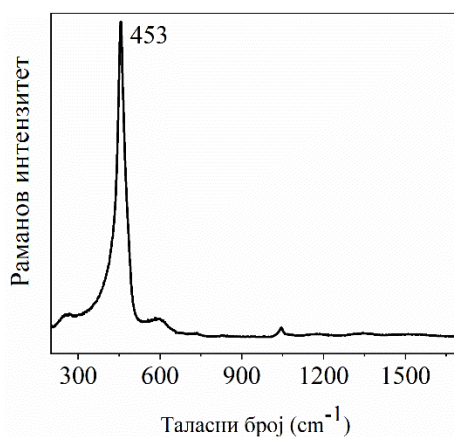
Слика 4.2. TEM микрографија CD-CeO₂ наночестица

4.2. Одређивање унутарћелијске локализације наночестица

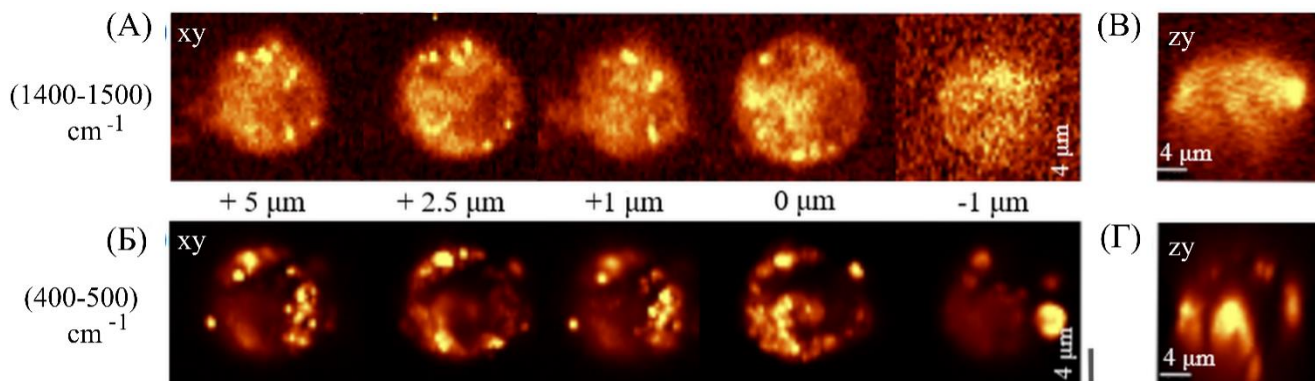
Присуство наночестица у ћелијама утврђивано је коришћењем две технике: Рамановог мапирања и ТЕМ осликавања.

Рамановим мапирањем било је могуће показати присуство SPRT-CeO₂ унутар HeLa ћелија, док присуство CD-CeO₂, због малих димензија наночестица и њихове распршености у раствору, није могло бити детектовано на тај начин. Из истог разлога није било могуће добити ни Раманов спектар самих CD-CeO₂ честица на уређају који је коришћен у овој студији.

За добијање Раманових мапа HeLa ћелија третираних SPRT-CeO₂ наночестицама коришћени су интегрални Раманови интензитети (површина испод спектралне криве) у области (400-500) cm⁻¹, којој припада најинтензивнији мод Рамановог спектра SPRT-CeO₂ (слика 4.3) и у којој се не појављују карактеристични ћелијски модови, и области (1400-1500) cm⁻¹, којој, супротно, припада типичан мод пореклом од вибрација CH₂ и CH₃ група у протеинима и липидима, присутан у свим ћелијама, док модови SPRT-CeO₂ у том спектралном региону одсуствују. Раманове мапе су креиране на различитим дубинама ћелије померањем објектива са кораком (0,5-5) μm.



Слика 4.3. Раманов спектар SPRT-CeO₂ наночестица

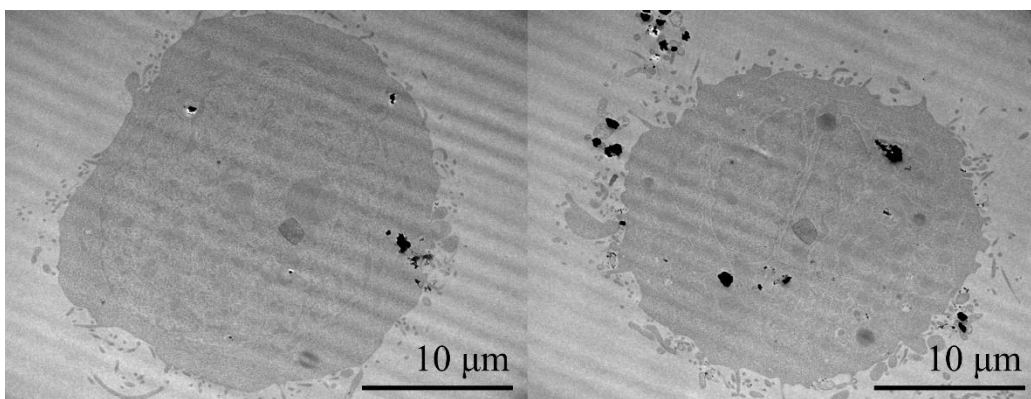


Слика 4.4. Раманове мапе HeLa ћелија третираних SPRT-CeO₂ наночестицама у концентрацији 400 μg/ml: (A) мапе XY равни добијене на основу интензитета ћелијског Рамановог мода; (Б) мапе XY равни добијене на основу интензитета Рамановог мода CeO₂; В) мапе ZY равни добијене на

основу интензитета ћелијског Рамановог мода; Г) мапе ZY равни добијене на основу интензитета Рамановог мода CeO₂.

Слика 4.4А представља Раманове мапе ћелија у хоризонталном пресеку на различитим удаљеностима од полазне равни у којој је направљена прва ћелијска мапа (означена на слици са 0 μm), док слика 4.4В представља мапу ћелије у вертикалном пресеку. Мапе приказане на сликама 4.4Б и 4.4Г показују да се у читавој запремини ћелије, тј. на различитим дубинама ћелије, може детектовати присуство Рамановог мода SPRT-CeO₂. Имајући у виду конфокалност система, може се сматрати да су овим мерењима детектоване наночестице унутар ћелије а не само на њеној површини, тј. да оне, упркос томе што део честица формира крупне агломерате, доспевају у ћелијску унутрашњост.

ТЕМ осликавање је потврдило присуство мањег броја крупних агломерата SPRT-CeO₂ наночестица у HeLa ћелијама и показало да су оне лоциране доминантно у областима цитоплазме уз једру, као и на површини ћелије.



Слика 4.5. TEM слике две HeLa ћелије третиране наночестицама SPRT-CeO₂

4.3. Ефекат наночестица CeO₂ на раст и вијабилност ћелија

4.3.1. Ефекат наночестица CeO₂ на раст ћелија: оптимизација доза

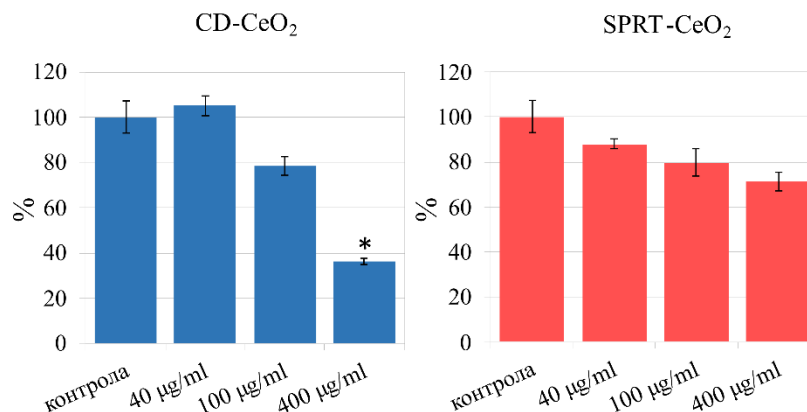
Након што су наночестице синтетисане и окарактерисане, требало је изабрати дозу наночестица и време инкубације чији ће цитотоксични ефекти бити проучавани Рамановом спектроскопијом. У ту сврху примењена је SRB метода за праћење промена у ћелијском расту.

4.3.1.1. Оптимизација доза наночестица CeO₂ за третман HeLa ћелија

Најпре је одређивана оптимална доза наночестица CeO₂ за третирање HeLa ћелија. У литератури постоји несклад у терминологији кад су у питању резултати које овај тест даје: у различитим случајевима се наводи да се њиме тестира ћелијска вијабилност, густина ћелија или ћелијски раст [273, 274]. Мерећи релативну количину протеина, SRB тест не показује да ли су адхерентне ћелије у култури вијабилне или су већ у неком стадијуму ћелијске смрти, тј. не прати стање појединачних ћелија, већ статус ћелијске културе у целини. Због тога је термин „ћелијски раст“, односно раст ћелијске културе, изабран као најприкладнији за презентацију резултата

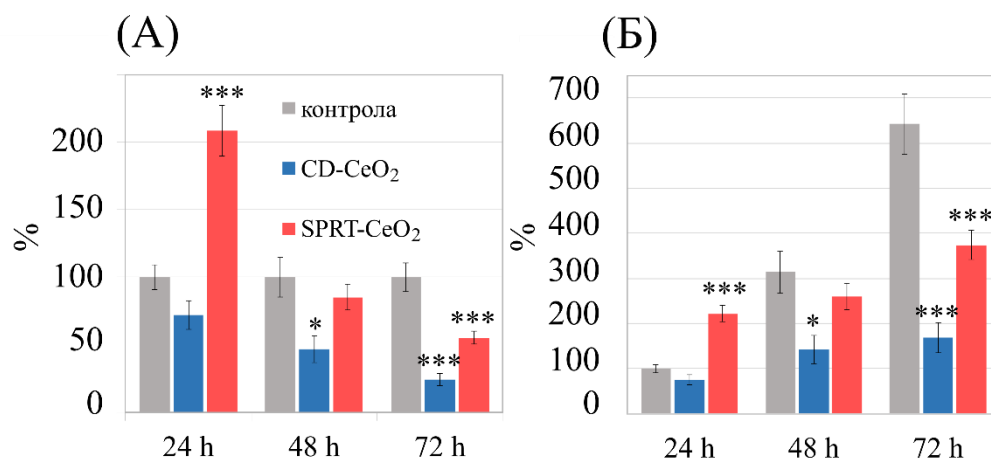
добијених SRB методом у овој студији. Овим тестом је одређено која је доза наночестица потребна да доведе до значајних промена у ћелијском расту, односно у броју ћелија у култури.

Почетне дозе и време инкубације изабране су на основу литературних података за наночестице CeO₂. У првом експерименту HeLa ћелије су 48 сати инкубирани са наночестицама CD-CeO₂ (слика 4.6 лево) и SPRT-CeO₂ (слика 4.6 десно) у концентрацијама 40 µg/ml, 100 µg/ml и 400 µg/ml. Значајан пад ћелијског раста измерен је код ћелија HeLa-CD-100 (79 %) и HeLa-CD-400 (36 % у односу на контролу). Исте дозе SPRT-CeO₂ нису изазвале статистички значајне промене у ћелијском расту, мада је изванредан тренд опадања ћелијског раста регистрован и са овим наночестицама.



Слика 4.6. Цитотоксични ефекат различитих концентрација наночестица CD-CeO₂ (лево, плави графикон) и SPRT-CeO₂ (десно, црвени графикон) на HeLa ћелије испитивани тестом SRB. Време инкубације је било 48 сати у оба случаја. Подаци су представљени као средња вредност ± стандардна грешка, при чему је средња вредност за контролну групу узета као 100 % а вредности за третиране групе изражене процентуално у односу на контролу. Статистички значајна разлика у односу на контролу означена је симболом * ($p < 0,05$). Експеримент је урађен у пет поновака ($n = 5$).

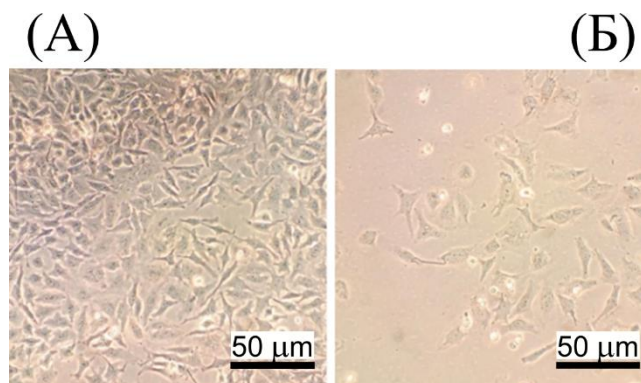
У другом експерименту примењена је само доза од 400 µg/ml обе врсте наночестица али у трајању од 24 и 72 сата. Након 24 сата регистрован је драстичан пораст у ћелијском расту код HeLa-SPRT-400 (слика 4.7А, Б, црвена колона) у односу на контролу. Након 72 сата, њихов раст је био значајно нижи него раст ћелија контролне групе. Исто важи и за раст ћелија HeLa-CD-400. Међутим, по истеку 72 сата раст контролних ћелија је надмашио оптималан број у ћелијској култури, те као такве не могу бити сматране репрезентативним вијабилним ћелијама. Уколико би се ћелије приликом постављања експеримента засејале у мањој густини, тако да контроле након 72 сата остану на оптимуму ћелијског раста, број ћелија HeLa-CD-400 не би био довољан за одговарајућа „high-throughput” мерења Раманових спектра, што је и експериментално показано.



Слика 4.7. Ефекат варирања времена инкубације HeLa ћелија са наночестицама CD-CeO₂ (плаво) и (црвено) у концентрацији 400 µg/ml испитиван тестом SRB. Подаци су представљени као средња вредност ± стандардна грешка. (А) Средња вредност за контролну групу (сиво) приказана је као 100 % а вредности за третиране групе изражене процентуално у односу на контролу. (Б) Средња вредност за контролну групу након 24 сата (сиво) приказана је као 100 %, док су вредности за све остале групе узорака, укључујући и контроле након 48 и 72 сата, изражене процентуално у односу на контролу након првог дана. Статистички значајна разлика у односу на контролу означена је симболима *** (p < 0,001) и * (p < 0,05). Експеримент је урађен у осам поновака (n = 8).

Доза од 400 µg/ml обе врсте наночестица и време инкубације од 48 сати изабрани су као оптимални за примену у експериментима Раманове спектроскопије. Под овим експерименталним условима долази до значајног смањења раста HeLa-CD-400 ћелија, не долази до прекомерног умножавања контролних ћелија, док је код ћелија HeLa-SPRT-400 назначен али не и потврђен пад у ћелијском расту.

На слици 4.9 приказан је микроскопски изглед ћелија у култури пре и након 48 сати инкубације са 400 µg/ml CD-CeO₂.

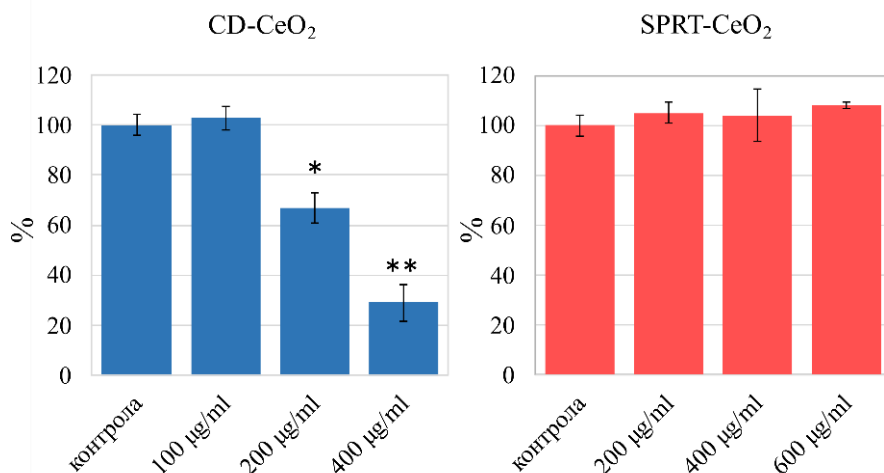


Слика 4.9. Изглед HeLa ћелија пре (А) и након 48 сати инкубације са 400 µg/ml CD-CeO₂ (Б), снимљен под објективом светлосног микроскопа.

Како би се потврдило да је цитотоксичан ефекат индукован наночестицама CD-CeO₂, а не самим декстраном, HeLa ћелије су третиране воденим раствором декстрана у количини у којој је садржан у одговарајућој запремини наночестица. Третман декстраном није имао ефекта на ћелијску вијабилност, просечан апсолутни број ћелија у култури, као ни на одлепљивање ћелија са подлоге.

4.3.1.2. Оптимизација доза наночестица CeO₂ за третман MRC-5 ћелија

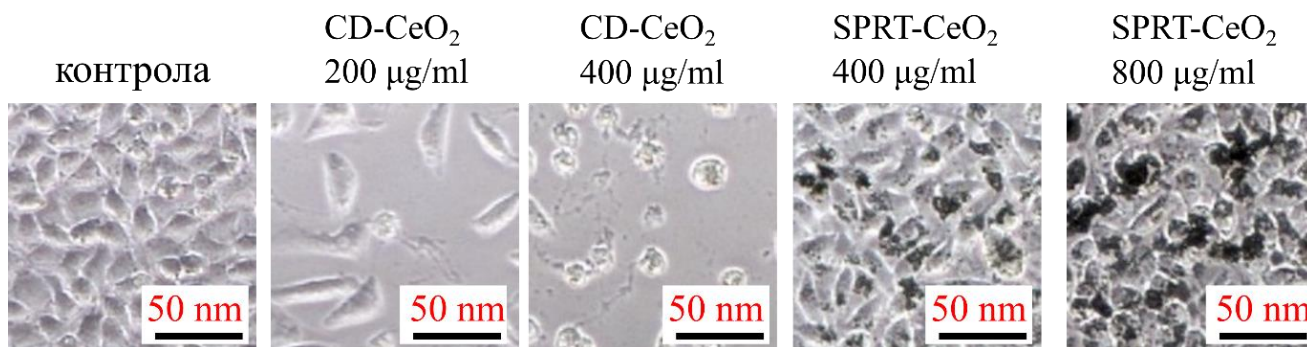
За третман MRC-5 ћелија наночестицама CD-CeO₂ у SRB експерименту изабране су дозе које су у случају HeLa ћелија оствариле цитотоксични ефекат (100 µg/ml и 400 µg/ml) и уведена додатна доза између њих (200 µg/ml) (слика 4.10 лево). Пошто се код HeLa ћелија показало да наночестице SPRT-CeO₂ остварују веома слаб ефекат, при тестирању MRC-5 ћелија уведене су концентрације од 200 µg/ml и 600 µg/ml а елиминисане концентрација од 40 µg/ml и 100 µg/ml SPRT-CeO₂ (слика 4.10 десно).



Слика 4.10. Цитотоксични ефекат различитих концентрација наночестица CD-CeO₂ (лево) и SPRT-CeO₂ (десно) испитивани тестом SRB након 48 сати инкубације са MRC-5 ћелијама. Подаци су представљени као средња вредност ± стандардна грешка, при чему је средња вредност за контролну групу узета као 100 % а вредности за третиране групе изражене процентуално у односу на контролу. Статистички значајна разлика у односу на контролу означена је симболима ** ($p < 0,01$) и * ($p < 0,05$). Експеримент је урађен у пет поновака ($n = 5$).

Наночестице CD-CeO₂ примењене у концентрацији 200 µg/ml смањују раст MRC-5 ћелија на 67 %, док у концентрацији 400 µg/ml драстично редукују ћелијски раст на 29 % у односу на контролу. SPRT-CeO₂ ни у једној од примењених концентрација не доводе до смањења ћелијског раста. Поредићи на основу SRB теста ефекте две врсте наночестица CeO₂ на два типа ћелија, може се увидети да HeLa ћелије показују већу осетљивост на обе врсте честица него MRC-5 ћелије (мања доза је потребна да доведе до цитотоксичног ефекта), као и да оба типа ћелија показују већу осетљивост на CD-CeO₂ него на SPRT-CeO₂ наночестице.

На слици 4.11 приказан је микроскопски изглед MRC-5 ћелија у култури пре и након 48 сати инкубације са наночестицама CD-CeO₂ и SPRT-CeO₂.



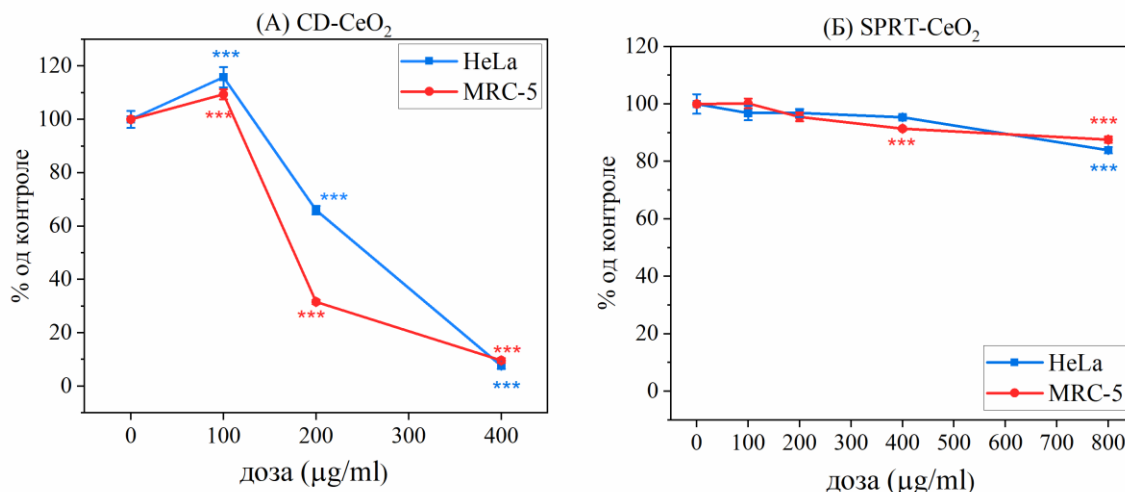
Слика 4.11. Изглед MRC-5 ћелија пре (контрола) и након инкубације са наночестицама CeO₂, снимљен под објективом светлосног микроскопа.

На основу резултата SRB теста, концентрација од 400 µg/ml CD-CeO₂ и време инкубације од 48 сати су задржани као оптимални за третман MRC-5 ћелија, због могућности поређења ефеката истог третмана на два различита типа ћелија. За третман наночестицама SPRT-CeO₂ предложена је концентрација виша од испитиваних у овом тесту: 800 µg/ml.

4.3.2. Ефекат наночестица CeO₂ на метаболичку активност ћелија

Како би се ефекти наночестица на ћелије боље упознали а резултати који ће бити добијени у експериментима Раманове спектроскопије и микроскопије на бази атомских сила могли успешније корелисати са изазваним биолошким променама, испитиван је утицај наночестица на метаболичку активности ћелија (МТТ тест) и индукцију ћелијске смрти (конфокална флуоресцентна микроскопија ћелија бојених анексином V, видети поглавље 4.3.3).

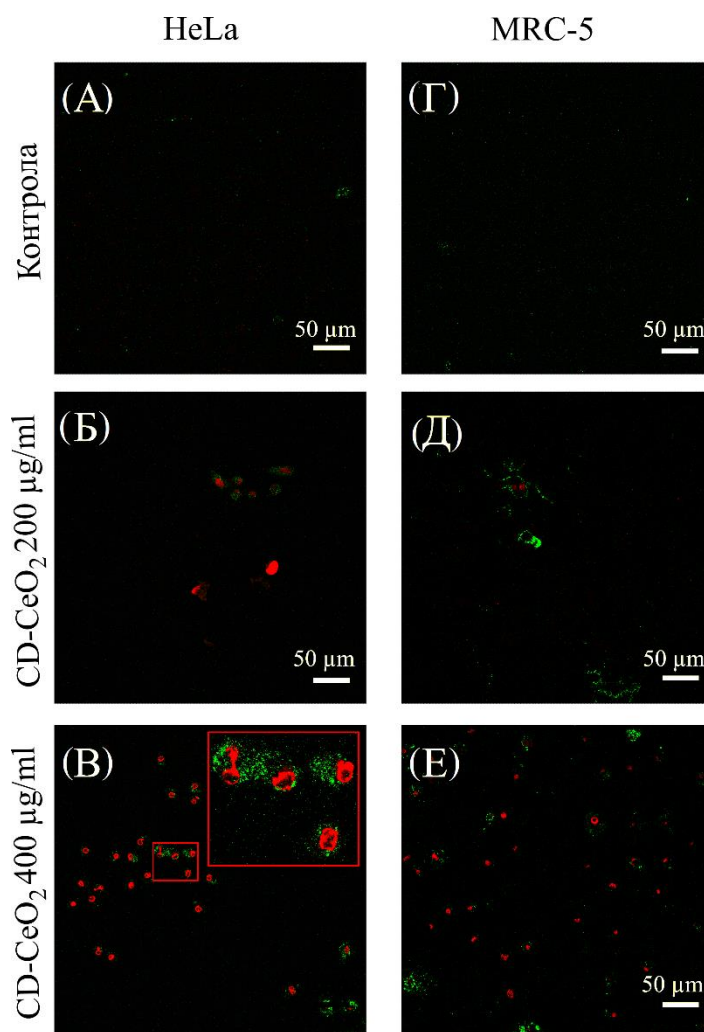
Кад су у питању наночестице CD-CeO₂ (слика 4.12А), МТТ тест је показао значајан пад вијабилности HeLa и MRC-5 ћелија на дози од 200 µg/ml наночестица (66 % код HeLa, 31,6 % код MRC-5, у односу на контролу), а још драстичнији на дози од 400 µg/ml (7,6 % код HeLa, 9,6 % код MRC-5). На најмањој дози, 100 µg/ml, вијабилност оба типа ћелија је била благо али статистички значајно повишена у односу на контролу (115,8 % код HeLa, 109,4 % код MRC-5). Утицај наночестица SPRT-CeO₂ на вијабилност мерену МТТ тестом је код оба типа ћелија био знатно слабији у односу на наночестице CD-CeO₂ (слика 4.12 Б). Код HeLa ћелија доза од 800 µg/ml је била потребна да доведе до значајног смањења вијабилности и то само до 83,3 % у односу на контролу. Код MRC-5 ћелија, доза од 400 µg/ml је довела до пада вијабилности на 91,4 %, а доза од 800 µg/ml до пада вијабилности на 87,6 %, у односу на контролу.



Слика 4.12. Цитотоксични ефекат наночестица (А) CD-CeO₂ и (Б) SPRT-CeO₂ на HeLa и MRC-5 ћелије испитиван МТТ тестом. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна грешка и изражени процентуално у односу на контролу. Статистички значајне разлике између средњих вредности за различите концентрације наночестица означене су симболама *** (p < 0,05). Експеримент је поновљен 3 пута у по 3 поновка (n = 9).

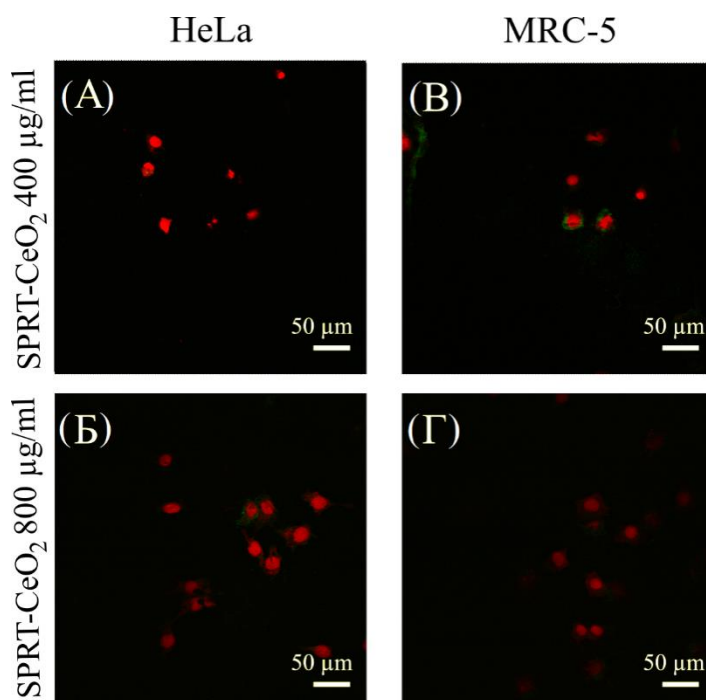
4.3.3. Ефекат наночестица CeO₂ на индукцију апоптозе

Да би се испитало да ли наночестице доводе до индукције апоптозе у третираним ћелијама, ћелије су након третмана бојене annexin-V-FITC-ом и PI, након чега су посматране под флуоресцентним конфокалним микроскопом. Снимљене микрографије су приказане на сликама 4.13 и 4.14. На слици 4.13А и Г приказани су снимци контролних узорака, на којима, као што је очекивано, након бојења није детектован флуоресцентни сигнал. На слици 4.13Б и В приказани су снимци HeLa ћелија третираних наночестицама CD-CeO₂, док су на слици 4.13Д и Е приказане MRC-5 ћелије третиране истим наночестицама. Може се уочити да се при нижој концентрацији наночестица (200 µg/ml) сигнал пореклом од annexin-V-FITC-а код оба типа ћелија појављује, али да је само код HeLa ћелија детектован и сигнал PI. При вишој концентрацији наночестица (400 µg/ml), уочен је велики број и HeLa и MRC-5 ћелија у којима је детектован сигнал пореклом од обе употребљене боје, указујући на висок проценат ћелија у касној апоптози или некрози. Графикон на слици 4.15 показује квантификацију промена у броју ћелија у раној односно касној апоптози, за дозе од 400 µg/ml наночестица. Код оба типа ћелија третираних са CD-CeO₂ висок је проценат ћелија у касној апоптози или некрози, али ипак знатно виши код HeLa (80 %) него код MRC-5 ћелија (55 %). Број ћелија у раној апоптози није статистички значајно већи него у контролној групи (Студентов t-тест). Са снимака је такође уочљиво да су ове ћелије мањих димензија од ћелија третираних наночестицама SPRT-CeO₂ (слике 4.14 и 4.15).

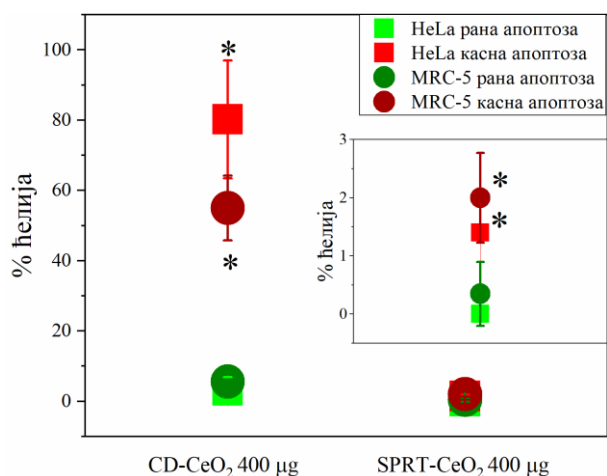


Слика 4.13. Детекција апоптозе код (Б, В) HeLa и (Д, Е) MRC-5 ћелија третираних двама дозама наночестица CD-CeO₂ након бојења annexin-V-FITC-ом и PI. Ћелије обојене зелено су у раној фази апоптозе (анексин V +/PI -), а ћелије код којих је видљив и црвено обојено једро су у касној апоптози или некрози (анексин V +/PI +). Код нетретираних ћелија (А, Г) није детектован флуоресцентни сигнал коришћених боја.

Слика 4.14 показује да се и код ћелија третираних наночестицама SPRT-CeO₂ детектује одређен број ћелија у ћелијској смрти. Међутим, када се број таквих ћелија изрази у односу на укупан број ћелија у узорку, добије се да је проценат како HeLa, тако и MRC-5 ћелија у апоптози или некрози веома низак (највише 2 %) и да по овом критеријуму не постоји статистички значајна разлика између два типа ћелија (слика 4.15). Ипак, може се констатовати да је код оба типа ћелија проценат ћелија у раној апоптози статистички значајно нижи од процента ћелија у касној апоптози/некрози (Студентов t-тест, резултат није приказан на слици).



Слика 4.14. Детекција апоптозе код (А, Б) HeLa и (Б, Г) MRC-5 ћелија третираних двама дозама наночестица SPRT-CeO₂ након бојења annexin-V-FITC-ом и PI. Ћелије обојене зелено су у раној фази апоптозе (анексин V +/PI -), а ћелије код којих је видљив и црвено обојено једро су у касној апоптози или некрози (анексин V +/PI +).



Слика 4.15. Графички приказ процента HeLa и MRC-5 ћелија у апоптози индукованој наночестицама CeO₂ (број апоптотских ћелија у односу на укупан број ћелија у видном пољу). Подаци су дати као средња вредност ± стандардна девијација. На уметнутом графику ради прегледности је увећано приказан резултат за ћелије третиране наночестицама SPRT-CeO₂. Симболом (*) приказано је статистички значајно разликовање у односу на контролну групу (Студентов t-тест, $p < 0,05$).

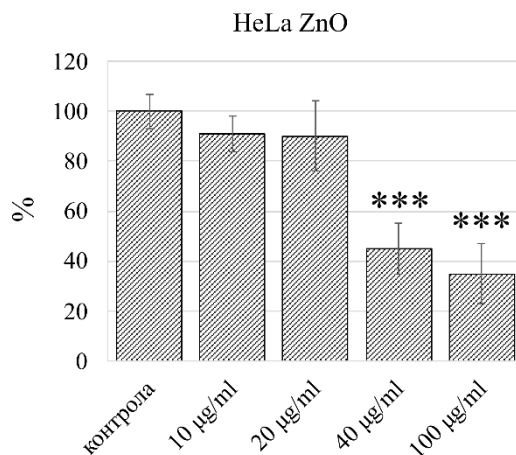
4.4. Ефекат наночестица ZnO на раст и вијабилност ћелија

4.4.1. Ефекат наночестица ZnO на раст ћелија: оптимизација доза

Како би се одабрале дозе наночестица ZnO којима ће се ћелије третирати у Рамановим експериментима, и у овом случају је, као и код наночестица CeO₂, употребљен SRB тест.

4.4.1.1. Оптимизација доза наночестица ZnO за третман HeLa ћелија

На основу литературних података одређене су дозе од 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml и 100 µg/ml за третман ћелија у трајању од 48 сати, јер је раније уочено да већ дозе ниже од 50 µg/ml појединих врста наночестица ZnO изазивају пад вијабилности HeLa и MRC-5 ћелија [134, 147]. SRB тест је показао смањење ћелијског раста на 45 % у односу на контролу при 40 µg/ml, односно на 35 % у односу на контролу при 100 µg/ml наночестица ZnO. Мање дозе нису довеле до статистички значајног смањења раста. На основу резултата SRB теста, одабране су концентрације од 20 µg/ml и 40 µg/ml ZnO за коришћење у Рамановим експериментима: 40 µg/ml због потврђене цитотоксичности, а 20 µg/ml како би се испитало постоје ли промене које се Рамановом спектроскопијом могу детектовати већ на тој концентрацији.

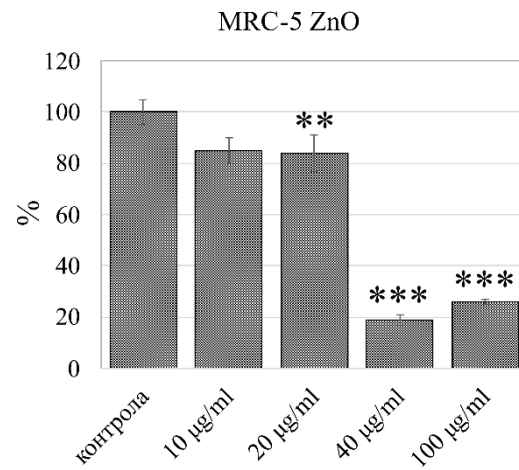


Слика 4.16. Цитотоксични ефекат различитих концентрација наночестица ZnO на раст HeLa ћелија испитиван SRB методом. Резултати су представљени процентуално у односу на контролу, при чему је статистички значајно разликовање од контроле обележено симболом *** ($p < 0,001$). Експеримент је урађен два пута у по четири поновка.

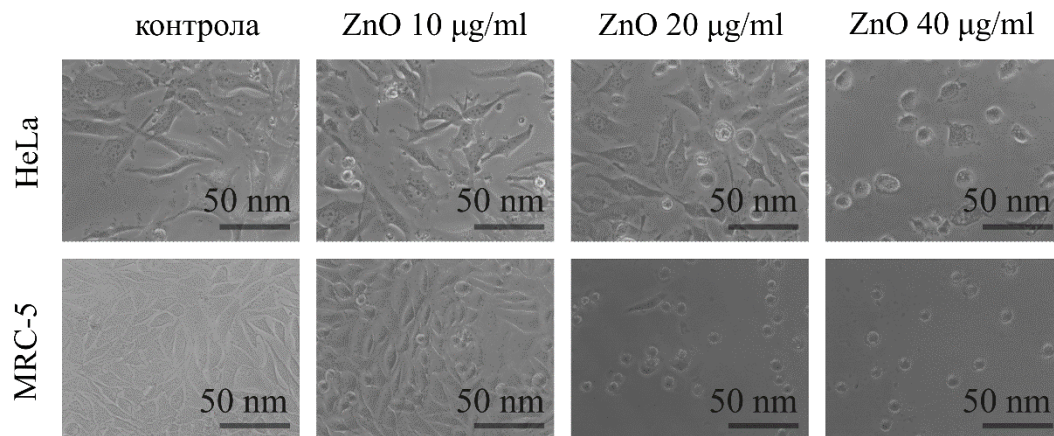
4.4.1.2. Оптимизација доза наночестица ZnO за третман MRC-5 ћелија

Исте дозе наночестица ZnO примењене код HeLa ћелија примењене су и на MRC-5 ћелије. Добијени резултати SRB теста, представљени на слици 4.17, показују су MRC-5 ћелије већ на 20 µg/ml наночестица ZnO одговориле статистички значајним смањењем раста на 84 % у односу на контролу, док је доза од 40 µg/ml смањила раст на чак 19 %, а доза од 100 µg/ml на 26 %. Другим

речима, MRC-5 ћелије показују већу осетљивост на третман наночестицама ZnO него HeLa ћелије. То се може увидети и посматрањем ћелијских култура под светлосним микроскопом (слика 4.18).



Слика 4.17. Цитотоксични ефекат различитих концентрација наночестица ZnO на раст MRC-5 ћелија испитиван SRB методом. Резултати су представљени процентуално у односу на контролу, при чему је статистички значајно разликовање од контроле обележено симболима ** ($p < 0,01$) и *** ($p < 0,001$). Експеримент је урађен два пута у по четири поновка.



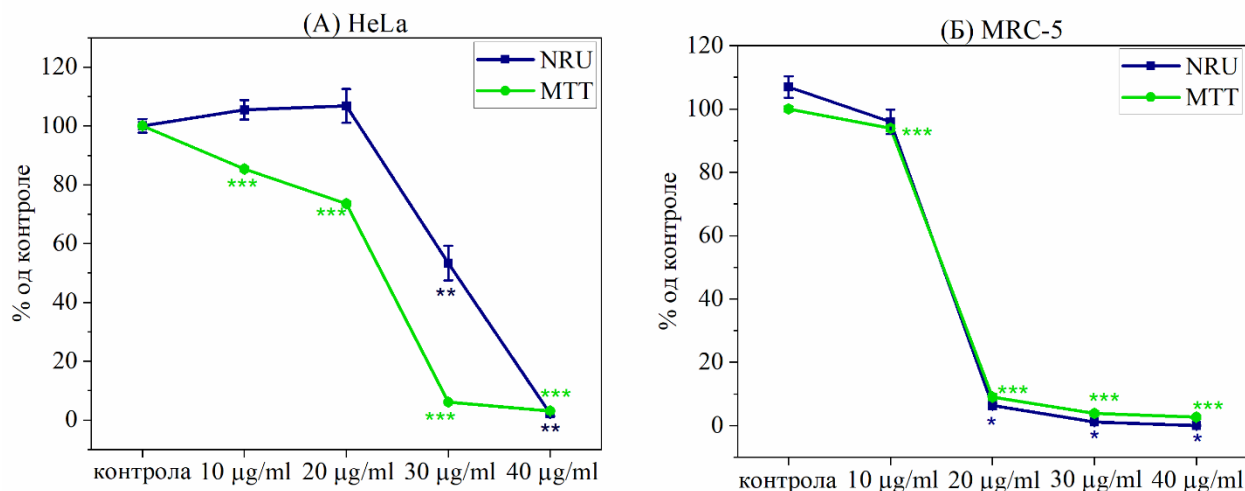
Слика 4.18. Оптичке микрографије HeLa (горњи ред) и MRC-5 (доњи ред) ћелија третираних различитим концентрацијама наночестица ZnO у трајању од 48 сати; увећање 20x.

На основу резултата SRB теста, за примену у Рамановим експериментима одабране су концентрације од 10 µg/ml, 20 µg/ml и 40 µg/ml: 20 µg/ml и 40 µg/ml како би се ефекти на тим концентрацијама могли упоредити међусобно и са ефектима истих концентрација на HeLa ћелије, а 10 µg/ml како би се испитало постоје ли промене које се Рамановом спектроскопијом могу детектовати већ на тој концентрацији.

4.4.2. Ефекат наночестица ZnO на метаболичку активност ћелија

Метаболичка активност ћелија након третмана наночестицама ZnO испитивана је МТТ тестом, уз који је ради детаљнијег увида у ефекат на вијабилност додат и NRU тест. Примењене су исте концентрације као за SRB и додата концентрација од 30 $\mu\text{g/ml}$. SRB тест је показао драстичну разлику у расту HeLa-ZnO-20 и HeLa-ZnO-40 ћелија, па је доза од 30 $\mu\text{g/ml}$ уведена како би се испитало да ли постоји критична концентрација која доводи до наглог пада ћелијске вијабилности.

Резултати NRU теста приказани су плавом линијом на слици 4.19А за HeLa и 4.19Б за MRC-5 ћелије. Они показују да се вијабилност HeLa-ZnO-10 и HeLa-ZnO-20 није променила у односу на нетретирану контролу. Вијабилност HeLa-ZnO-30 ћелија је значајно смањена ($53,4 \pm 6,2$ % у односу на контролу), а код HeLa-ZnO-40 вијабилност се готово потпуно губи ($2,1 \pm 0,8$ % у односу на контролу). Код MRC-5 ћелија, NRU тест региструје драстичан пад вијабилности већ код ћелија MRC-ZnO-20 ($6,1 \pm 0,6$ % у односу на контролу), док је код виших концентрација наночестица вијабилност на граници детекције.

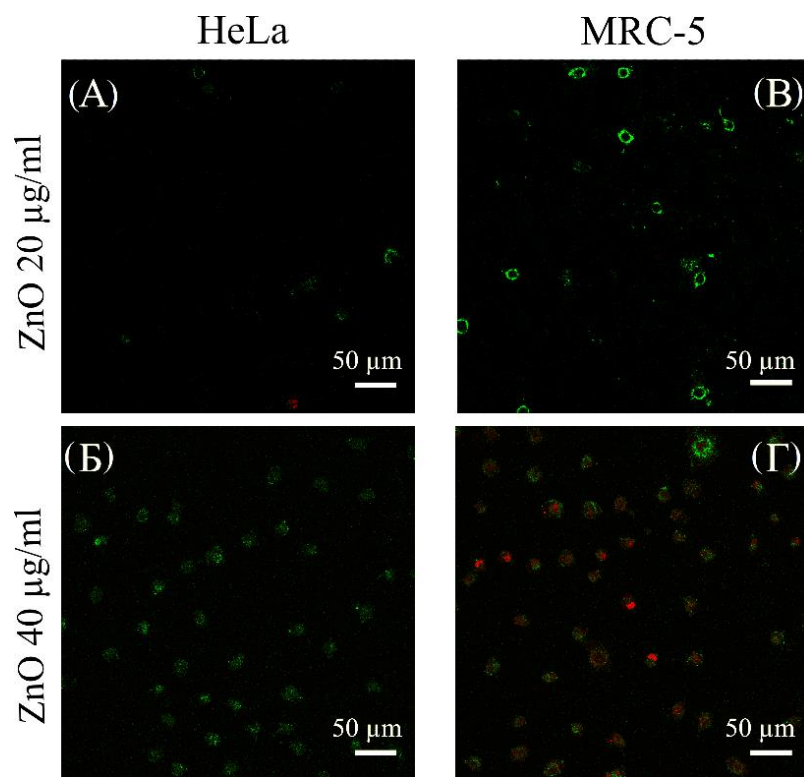


Слика 4.19. Цитотоксични ефекат наночестица ZnO на (А) HeLa и (Б) MRC-5 ћелије испитиван NRU и МТТ тестовима. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна грешка и изражени процентуално у односу на контролу. Статистички значајне разлике између средњих вредности за различите концентрације наночестица означене су симболима ** ($p < 0,01$) и *** ($p < 0,001$). МТТ експеримент је поновљен 3 пута у по 5 поновка ($n = 15$), а NRU 3 пута у по 3 поновка ($n = 9$) за HeLa и 2 пута у по 3 поновка ($n = 6$) за MRC-5 ћелије.

Резултати МТТ теста приказани су зеленом линијом на слици 4.19А за HeLa и 4.19Б за MRC-5 ћелије. Овај тест је показао мали али статистички значајан пад метаболичке активност HeLa-ZnO-10 ($85,3 \pm 0,7$ % у односу на контролу) и MRC-ZnO-10 ћелија ($93,9 \pm 1$ % у односу на контролу). Код HeLa ћелија, доза од 20 $\mu\text{g/ml}$ доводи до пада метаболичке активности на $73,6 \pm 0,7$ %, док је пад код доза од 30 $\mu\text{g/ml}$ и 40 $\mu\text{g/ml}$ драматичан ($6,1 \pm 0,1$ %, односно $3,0 \pm 0,08$). Као и SRB и NRU, МТТ тест показује већу осетљивост MRC-5 ћелија на наночестице ZnO, па тако метаболичка активност MRC-ZnO-20 износи $9 \pm 0,9$ % у односу на контролу. Више концентрације наночестица ZnO даље смањују вијабилност на дозно-зависан начин, долазећи код MRC-ZnO-40 до вредности 0.

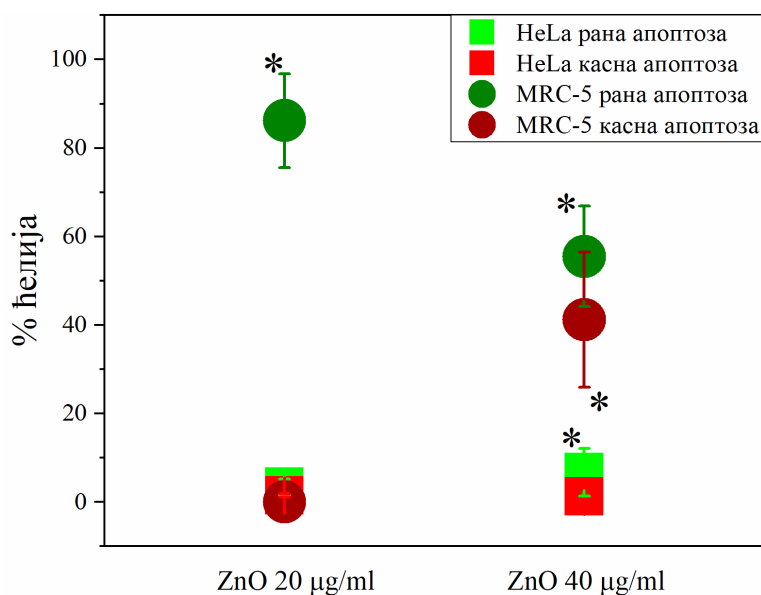
4.4.3. Ефекат наночестица ZnO на индукцију апоптозе

На слици 4.20 приказане су флуоресцентне микрографије HeLa и MRC-5 ћелија инкубираних 48 сати са наночестицама ZnO и потом бојене аннексин-V-FITC-ом и PI. У складу са тестовима вијабилности, бојење апоптотских ћелија показује већу осетљивост MRC-5 него HeLa ћелија на наночестице ZnO: доза од 20 $\mu\text{g/ml}$ ZnO код HeLa ћелија не доводи до појаве апоптозе (слика 4.20A), док се на истој концентрацији наночестица код MRC-5 детектује висок проценат ћелија у раној апоптози (86 % од укупног броја ћелија у видном пољу, слика 4.20B). Доза од 40 $\mu\text{g/ml}$ ZnO доводи код HeLa ћелија до појаве ране апоптозе (7 % ћелија, слика 4.20Б), док је иста доза код MRC-5 довела до смрти 96 % ћелија, и то просечно 55 % ћелија до ране апоптозе и 41 % до касне апоптозе или некрозе (слика 4.20Г). На контролним узорцима, као ни на узорцима HeLa-ZnO-10, нису дететоване ћелије у апоптози (није приказано на слици).



Слика 4.20. Детекција апоптозе код (А, Б) HeLa и (B, Г) MRC-5 ћелија третираних двама дозама наночестица ZnO након бојења аннексин-V-FITC-ом и PI. Ћелије обојене зелено су у раној фази апоптозе (анексин V +/PI -), а ћелије обојене зелено и црвено у касној апоптози или некрози (анексин V +/PI +).

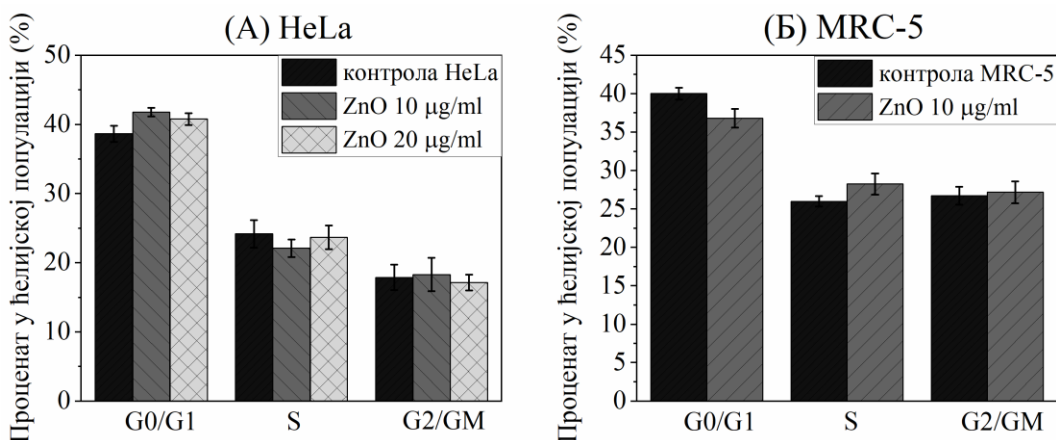
На слици 4.21 графички су приказане разлике у појави апоптозе код различито третираних HeLa и MRC-5 ћелија. Разлике су квантификоване бројањем обојених ћелија у сваком од посматраних микроскопских видних поља (6-10 поља снимљено по узорку) и изражавањем добијеног броја ћелија у виду процента од укупног броја ћелија у видном пољу.



Слика 4.21. Графички приказ процента HeLa и MRC-5 ћелија у раној (зелено), односно касној апоптози (црвено) индукованој наночестицама ZnO (број апоптотских ћелија у односу на укупан број ћелија у видном пољу). Подаци су дати као средња вредност \pm стандардна девијација. Симболом (*) приказано је статистички значајно разликовање у односу на контролну групу (Студентов t-тест, $p < 0,05$).

4.4.4. Ефекат наночестица ZnO на расподелу HeLa и MRC-5 ћелија по фазама ћелијског циклуса

У циљу даљег испитивања ефеката наночестица ZnO и корелације са информацијама добијеним из вибрационих спектра третираних ћелија, промене у ћелијском циклусу HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO испитиване су проточном цитофлуориметријом. На основу сигнала пореклом од PI, односно количине ДНК у ћелији, одређена је расподела по фазама ћелијског циклуса ћелија након 48 сати инкубације са наночестицама. Код ћелија HeLa-ZnO-10 и HeLa-ZnO-20, као и код MRC-ZnO-10 ћелија, није детектована значајна промена у ћелијском циклусу у односу на одговарајуће контроле (слика 4.22). Овим је показано да наночестице ZnO у датим експерименталним условима не доводе до задржавања ћелија у некој од фаза ћелијског циклуса. На вишим дозама већина ћелија је већ у процесу ћелијске смрти. Те ћелије се означавају као subG0/G1 ћелије, јер садрже $< 2n$ хромозома, тј. мање него G0/G1 ћелије. Због тога при високим концентрацијама наночестица није било могуће добити карактеристичан и информативан профил ћелијског циклуса.



Слика 4.22. Ефекат наночестица ZnO на расподелу (А) HeLa и (Б) MRC-5 ћелија по фазама ћелијског циклуса испитиван проточном цитофлуориметријом. Експеримент је изведен на 5 узорака HeLa ћелија ($n = 5$) и на 6 узорака MRC-5 ћелија ($n = 6$). Резултати су изражени као проценат од укупне ћелијске популације и приказани као средња вредност \pm стандардна девијација.

4.5. Раманова спектроскопија ћелија третираних наночестицама

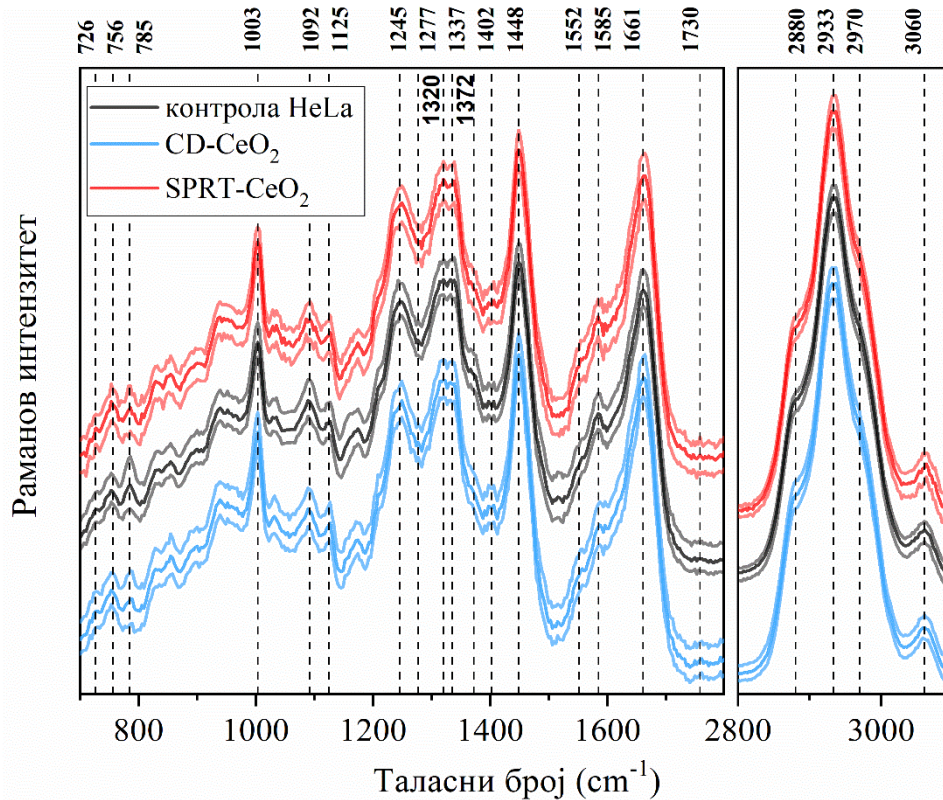
4.5.1. Раманова спектроскопија HeLa ћелија третираних наночестицама CeO₂

Раманови спектри HeLa ћелија третираних наночестицама CeO₂ мерени су на некомерцијалном Рамановом уређају, који су креирали истраживачи групе за Мултимодалну инструментацију на Лајбницовом институту IPHT у Јени, где је и изведен овај сет Раманових експеримента. Уређај је направљен тако да буде посебно прилагођен за мерење биолошких узорака и омогућава мерење неколико хиљада Раманових спектра за свега неколико десетина минута. Остали Раманови експерименти изведени су на комерцијалном уређају, на ком је коришћена дужа експозиција него на некомерцијалном, што је негативно утицало на временску ефикасност мерења, али су измерени спектри били интензивнији и бољег односа сигнал-шум. Раманови спектри измерени на ова два уређаја нису међусобно упоредиви у смислу да се могу користити у заједничкој анализи, али заједно дају увид у утицај поставки мерења на квалитет и особине ћелијских спектра.

У експерименте Раманове спектроскопије HeLa ћелија третираних наночестицама CeO₂ биле су укључене три групе ћелија: ћелије 48 сати инкубиране са 400 µg/ml наночестица SPRT-CeO₂, ћелије 48 сати инкубиране са 400 µg/ml наночестица CD-CeO₂ и контролне (нетретиране ћелије). Измерени спектри су обрађени на начин описан у поглављу 3.9.3. Све наредне анализе обухватале су два изабрана спектрална региона у којима се јавља највећи број ћелијских Раманових модова: (700-1800) cm⁻¹ (нискофреквентни регион) и (2700-3200) cm⁻¹ (високофреквентни регион).

4.5.1.1. Анализа усредњених Раманових спектра HeLa ћелија третираних наночестицама CeO₂

Најпре су описани усредњени спектри за сваку од три групе, приказани на слици 4.23 Раманови модови присутни у спектрима су обележени испрекиданом линијама, а њихови таласни бројеви назначени уз одговарајућу испрекидану линију. Асигнације Раманових модова дате су у Табели 4.3 (поглавље 4.5.5).



Слика 4.23. Раманови спектри контролних ћелија (црно), ћелија третираних наночестицама SPRT-CeO₂ (црвено) и ћелија третираних наночестицама CD-CeO₂ (плаво), представљени као средња вредност ± стандардна девијација. Спектри третираних ћелија су вертикално транслирани у односу на контролне спектре да би се омогућила већа прегледност на графикону, тако да разлике у њиховим интензитетима не представљају реалне разлике. Раманов интензитет у региону (2800-3200) cm⁻¹ помножен је код све три ћелијске групе са фактором 1/3 такође ради добре прегледности оба спектрална региона.

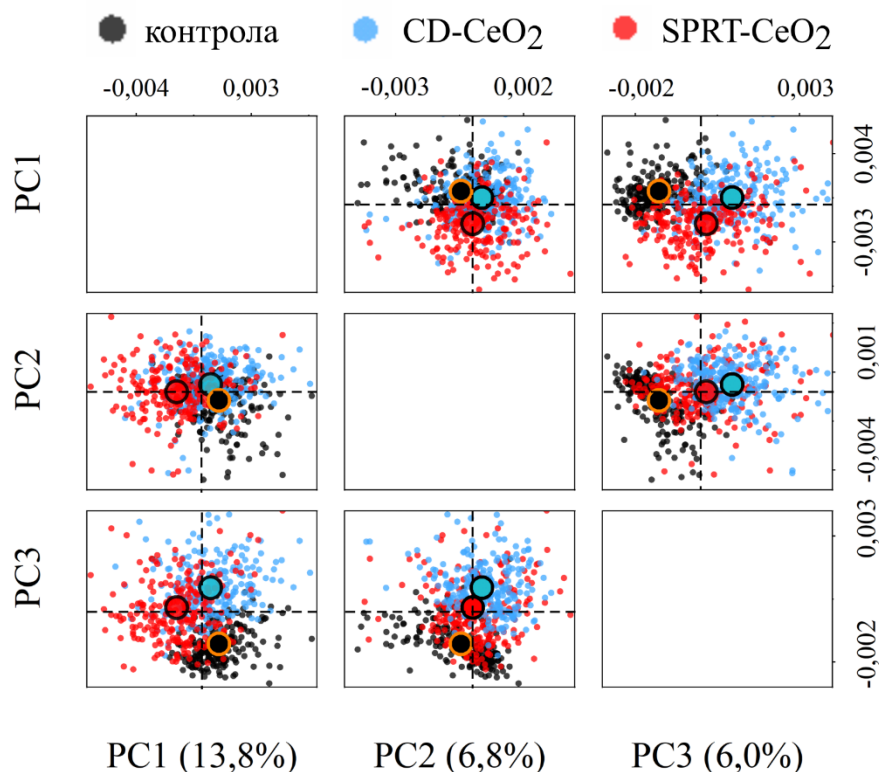
У региону (700-1800) cm⁻¹ свих усредњених спектра по интензитету су најоучљивији типични ћелијски Раманови модови: мод пореклом од вибрација фенилаланина (Phe) на 1003 cm⁻¹, амидне траке: амид III, у области ~ (1230-1270) cm⁻¹, и амид I, у области ~ (1600-1700) cm⁻¹, затим област ~ (1270-1370) cm⁻¹ у којој се јављају бројни модови пореклом од протеина, липида и нуклеинских киселина, као и мод на 1448 cm⁻¹, који такође у себи садржи више модова пореклом од вибрација CH/CH₂/CH₃ група претежно липида и протеина. Нешто су мање уочљиви модови који се повезују са вибрацијама нуклеинских киселина: 726 cm⁻¹, 785 cm⁻¹, 1092 cm⁻¹, 1585 cm⁻¹. Регион (2700-3200) cm⁻¹ се састоји из неколико широких модова који воде порекло од вибрација различитих група липида и протеина (Табела 4.3, поглавље 4.5.5). Они су преко три пута интензивнији од најинтензивнијих Раманових модова у нискофреквентном спектралном региону.

4.5.1.2. PCA Раманових спектра HeLa ћелија третираних наночестицама CeO₂

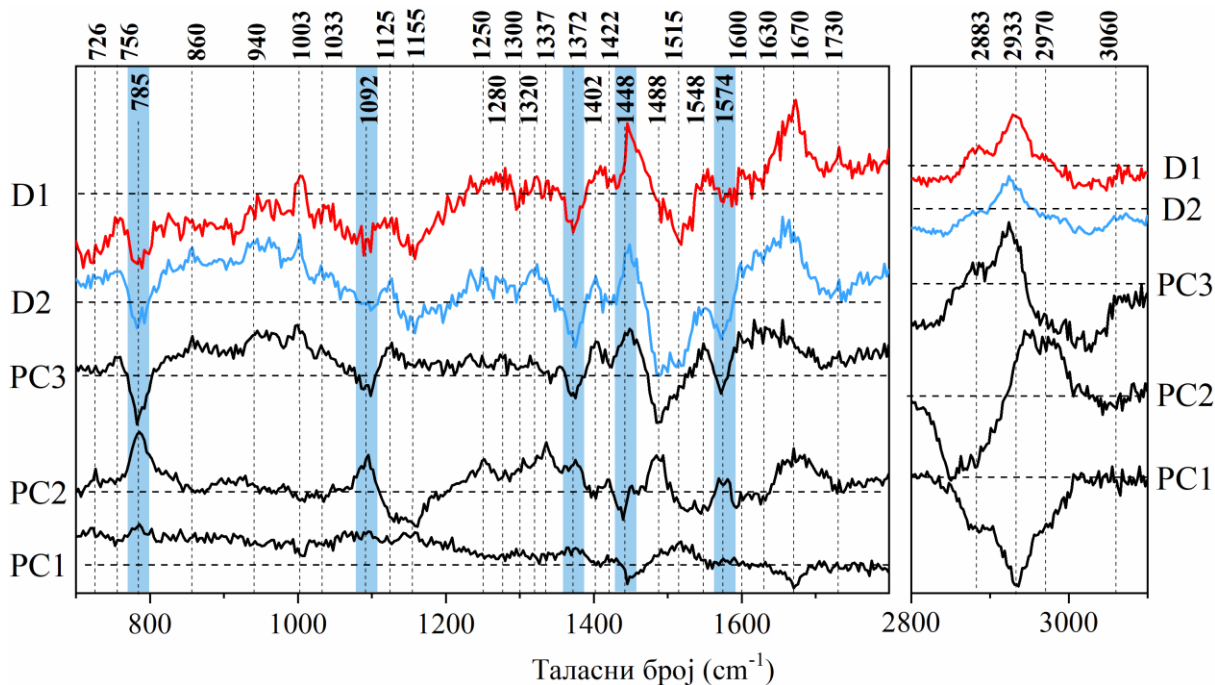
Раманови спектри HeLa-CD-400 и HeLa-SPRT-400, заједно са спектрима контролних ћелија, анализирани су PCA методом. Два спектрална региона, (700-1800) cm⁻¹ и (2700-3200) cm⁻¹, су спојена и анализирана као једна целина. Прве три PC којима је резултовала анализа (PC1-PC3) заједно објашњавају 26,6 % варијације међу спектрима (13,8 % + 6,8 % + 6,0 %). Пројекција једног спектра на једну PC компоненту даје коефицијент који се назива скор. Разлагање једног спектра на све PC компоненте даје низ скорова карактеристичних за тај спектар. Дводимензионални графикони на којима су координате сваке тачке одређене вредностима PC скорова за две одабране PC компоненте приказан је на слици 4.24. Црне тачке представљају спектре контролних ћелија, црвене тачке спектре HeLa-SPRT-400, а плаве представљају спектре HeLa-CD-400 ћелија. Усредњене вредности скорова свих тачака једне групе означене су центроидима, крупнијим уоквиреним кружићима одговарајуће боје. Испрекидане линије означавају координатне почетке. Видимо да се по PC1 издваја црвени центроид, односно да ова компонента показује спектралне карактеристике по којима се HeLa-SPRT-400 ћелије разликују од контролних ћелија, али и од HeLa-CD-400 ћелија. За овај центроид вредност PC1 скорa је негативна (мања од нуле), што значи да ће се позитивни пикови (локални максимуми) које садржи PC1 тумачити као пад интензитета одговарајућих Раманових модова у спектру HeLa-SPRT-400 ћелије, док ће се негативни пикови (локални минимума) које садржи PC1 тумачити као пораст интензитета одговарајућих Раманових модова. PC2 не показује значајно раздвајање група спектра (све центроиде обухватају нулту вредност коефицијента за PC2), док PC3 показује разлике између контроле и HeLa-CD-400 ћелија. HeLa-SPRT-400 ћелије по вредности скорова за PC3 су између контроле и HeLa-CD-400 ћелија: приближно половина ових ћелија ближа је контролним ћелијама, а друга половина HeLa-CD-400 ћелијама. У случају PC3, вредности скорa за третиране ћелије су у просеку позитивне, те ће се позитивни пикови PC3 тумачити као пораст интензитета одговарајућих Раманових модова у спектрима третираних ћелија, а негативни пикови као пад одговарајућих модова [275].

Иако се у области (700-1800) cm⁻¹ код PC1 не издвајају пикови високог интензитета, може се уочити неколико слабије интензивних локалних максимума и нешто интензивнијих локалних минимума. Сви максимуми могу се повезати са вибрацијама молекула нуклеинских киселина: 785 cm⁻¹ је типичан маркер нуклеинских киселина, истог су порекла Раманови модови на 726 cm⁻¹ и на 1372 cm⁻¹, мод на 1092 cm⁻¹ потиче такође од нуклеинских киселина али конкретно од вибрација фосфодиестарске везе, док се мод на 1422 cm⁻¹ може повезати са дезоксирибозом. Локални минимума PC1 јављају се на 756 cm⁻¹, 1003 cm⁻¹, 1125 cm⁻¹, 1402 cm⁻¹, 1448 cm⁻¹, 1670 cm⁻¹. Раманови модови на 756 cm⁻¹ и 1003 cm⁻¹ резултат су вибрација у ароматичним аминокиселинама триптофану, односно фенилаланину. Вибрације CH₃ група протеина резултују Рамановим модом на 1402 cm⁻¹, док мод на 1670 cm⁻¹ припада амид I траци и повезан је са протеинском секундарном структуром. Преостала два минимума у PC1, на 1125 cm⁻¹ и 1448 cm⁻¹, могу се повезати како са протеинским тако и са липидним Рамановим модовима. Узевши у обзир све пикове који се појављују у региону (700-1800) cm⁻¹ у PC1, може се констатовати да ова компонента указује на опадање садржаја нуклеинских киселина, а пораст садржаја липида и протеина у HeLa-SPRT-400 ћелијама.

У региону (2700-3200) cm⁻¹ најизраженија су два интензивна и широка пика, са минимумима на 2883 cm⁻¹ и 2933 cm⁻¹. Они такође указују на пораст доприноса липидних и протеинских модова у Рамановим спектрима HeLa-SPRT-400.



Слика 4.24. Графикони PC скорова за прве три PC проистекле из PCA Раманових спектра HeLa-SPRT-400 ћелија (црвено), HeLa-CD-400 (плаво) и спектра контролних ћелија (црно). Уоквирени кружићи представљају центроиде - средње вредности скорова за сваку од три групе ћелија и њихове боје су усклађене са бојама одговарајућих скорова.



Слика 4.25. Прве три PC (PC1-PC3, одоздо нагоре) добијене из PCA ћелија третираних двама типовима наночестица CeO₂ и контролних ћелија. Изнад су приказани диференцијални спектри

добијени одузимањем усредњеног спектра контролних HeLa ћелија од усредњеног спектра HeLa-SPRT-400 ћелија (D1, црвено) и одузимањем усредњеног спектра HeLa контролних ћелија од усредњеног спектра HeLa-CD-400 ћелија (D2, плаво). Таласни бројеви пикова у РС односно Раманових модова у диференцијалним спектрима означени су бројевима уз вертикалне испрекидане линије, а најистакнутији пикови/модови осенчени су плавом бојом у позадини. Хоризонталне испрекидане линије означавају нулте вредности интензитета за сваку РС/диференцијални спектар.

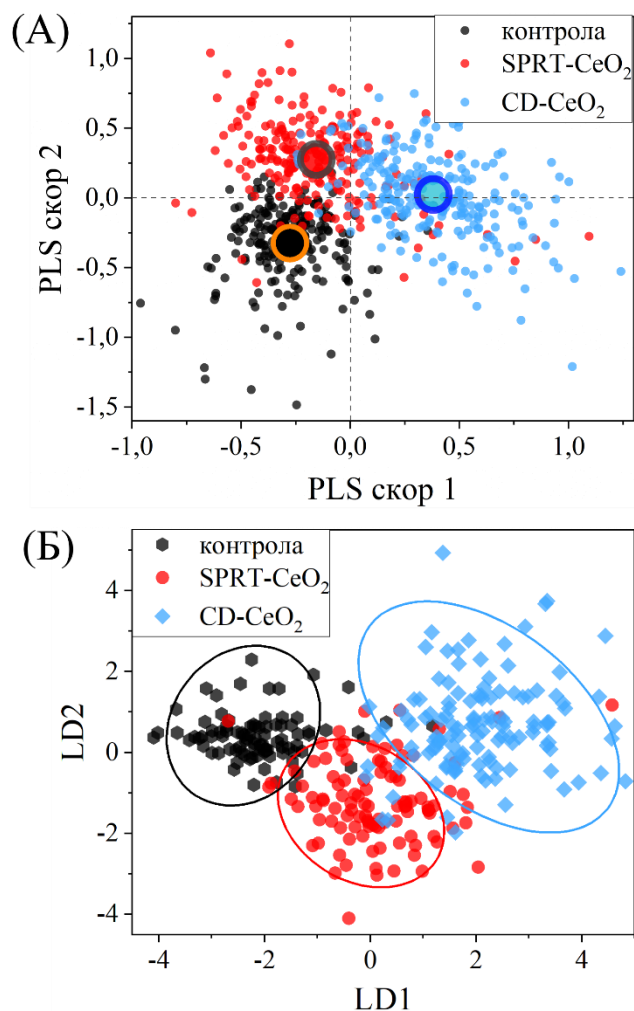
Супротно од РС1, РС3 као локалне минимуме садржи пикове повезане са Рамановим модовима нуклеинских киселина: на таласним бројевима 785 cm^{-1} , 1092 cm^{-1} , затим нешто слабијег интензитета на 1372 cm^{-1} и 1422 cm^{-1} , као и два пика који се нису јављали у РС1, на 1488 cm^{-1} и 1574 cm^{-1} . Међутим, просечан РС3 скор за HeLa-CD-400 ћелије је позитиван, тако да и ова компонента, као и РС1, указује на смањење садржаја нуклеинских киселина у третираним ћелијама. Максимуми у РС3 који се јављају на 756 cm^{-1} , 1003 cm^{-1} , 1402 cm^{-1} и 1630 cm^{-1} могу се повезати са вибрацијама у протеинима и заједно указују на пораст садржаја протеина у третираним ћелијама. Раманов мод на 1630 cm^{-1} , као и мод на 1670 cm^{-1} , припада амид I траци и указује на разлике у променама секундарне структуре протеина између ћелија третираних двама типовима наночестица CeO_2 . Раманови модови на 1125 cm^{-1} и 1448 cm^{-1} , који се такође јављају као максимуми РС3, могу се приписати и протеинима и липидима, што може указивати да је садржај липида, а не само протеина, повишен у HeLa-CD-400 ћелијама.

Регион ($2700\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$) РС3 садржи исте пикове као одговарајући регион РС1, али су они супротног знака. Пик који је у РС1 прочитан на 2933 cm^{-1} у РС3 је померен на 2924 cm^{-1} . Иако се сви Раманови модови у овом региону могу повезати и са протеинима и са липидима, сматра се да је мод на $2924\text{ cm}^{-1}/2933\text{ cm}^{-1}$ претежно протеински, док је мод на 2883 cm^{-1} претежно липидног порекла.

Када се упореде главне компоненте са диференцијалним спектрима, приказаним на слици 4.25 црвеном и плавом линијом, може се увидети велика сличност између РС1 и D1, добијеног одузимањем усредњеног спектра контролних ћелија од усредњеног спектра HeLa-SPRT-400 ћелија, као и између РС3 и D2, добијеног одузимањем усредњеног спектра контролних ћелија од усредњеног спектра HeLa-CD-400 ћелија.

4.5.1.3. Класификација HeLa ћелија третираних CeO_2 наночестицама: PLS-LDA модел

PLS регресиона анализа је примењена заједно на контролне HeLa ћелије, HeLa-SPRT-400 ћелије и HeLa-CD-400 ћелије. На слици 4.26А приказан је графикон вредности ћелијских Раманових спектра за прве две PLS компоненте, PLS1 и PLS2. Он показује веома добро раздвајање експерименталних група добијено овом надзираном методом. Првих пет компонената је даље употребљено за LDA, у којој је насумичних 360 спектра, по 120 из сваке групе, искоришћено за тренирање модела, док су преостала 323 спектра коришћена за тестирање модела. Тестирање је показало да је сензитивност предикције модела (број ћелија чија је припадност одређеној класи исправно одређена у односу на укупан број ћелија) најмање 88 %, док је специфичност модела (број ћелија чија је неприпадност одређеној класи исправно одређена у односу на укупан број ћелија) најмање 92 %.



Слика 4.26. (А) PLS анализа: графикон скорова прве две PLS компоненте. Црне тачке представљају спектре HeLa контролних ћелија, црвене тачке спектре HeLa-SPRT-400 ћелија, плаве тачке спектре HeLa-CD-400 ћелија. Средње вредности скорова за сваку групу (центроиди) означене су уоквиреним кружићима одговарајућих боја. (Б) LDA: графикон пројекција ћелијских спектра на прве две LDA компоненте. Шема боја као под А.

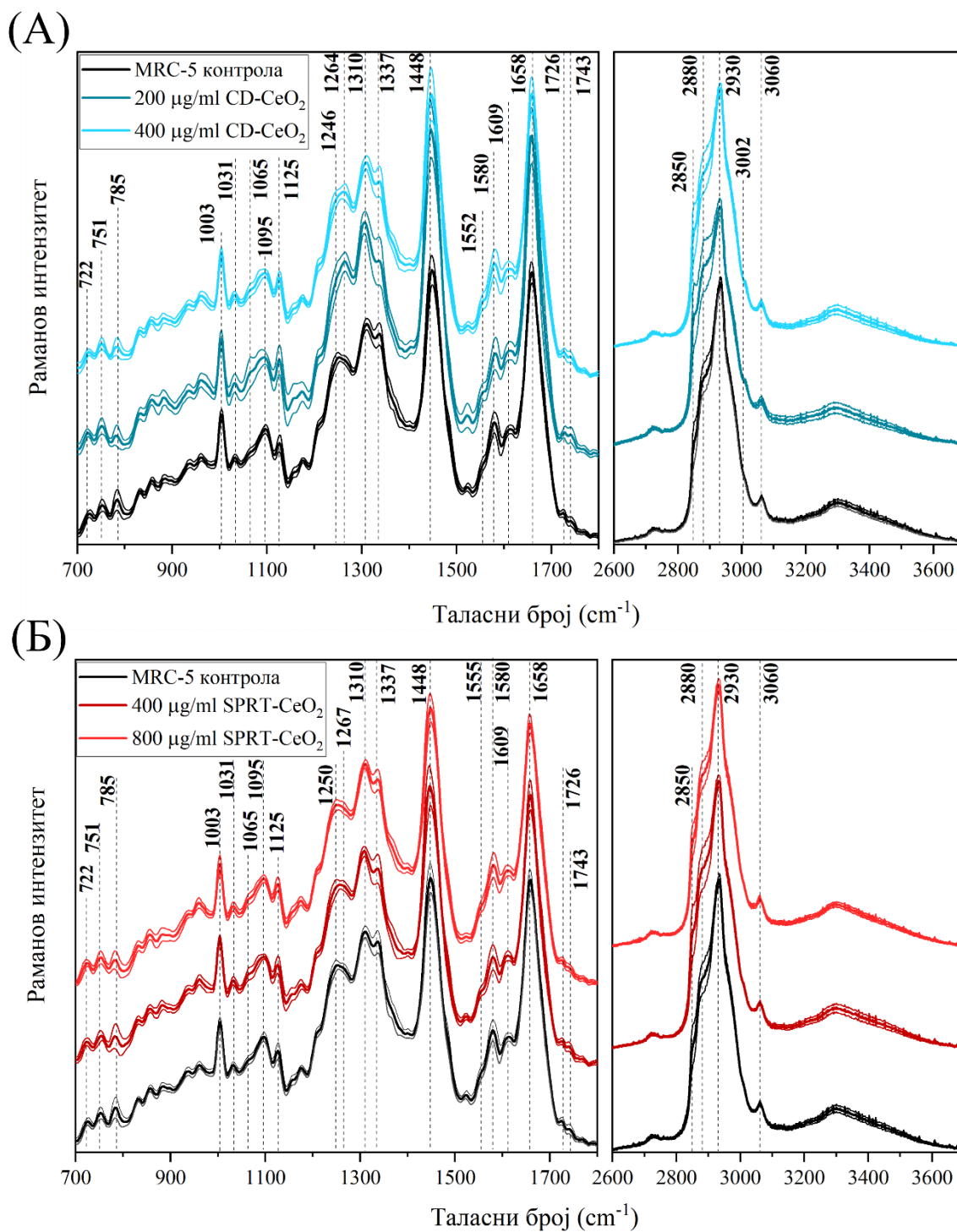
4.5.2. Раманова спектроскопија MRC-5 ћелија третираних наночестицама CeO_2

Раманови спектри MRC-5 ћелија третираних наночестицама CeO_2 , мерени су, као и код HeLa ћелија, у опсегу $(700-3200) \text{ cm}^{-1}$. За разлику од HeLa ћелија, у овом случају су анализирана засебно два спектрална региона, $(700-1800) \text{ cm}^{-1}$ и $(2700-3200) \text{ cm}^{-1}$, како би се испитале могућности сваког од два региона у класификовању третираних ћелија помоћу PCA и како би се у PCA избегла доминација региона $(2700-3200) \text{ cm}^{-1}$ чији је интензитет знатно већи. Други искорак у односу на анализу HeLa ћелија је увођење додатних концентрација наночестица: $200 \mu\text{g/ml}$ CD- CeO_2 и $800 \mu\text{g/ml}$ SPRT- CeO_2 , у циљу проучавања дозно-зависних разлика у Рамановим спектрима третираних ћелија.

4.5.2.1. Анализа усредњених Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних наночестицама CeO₂

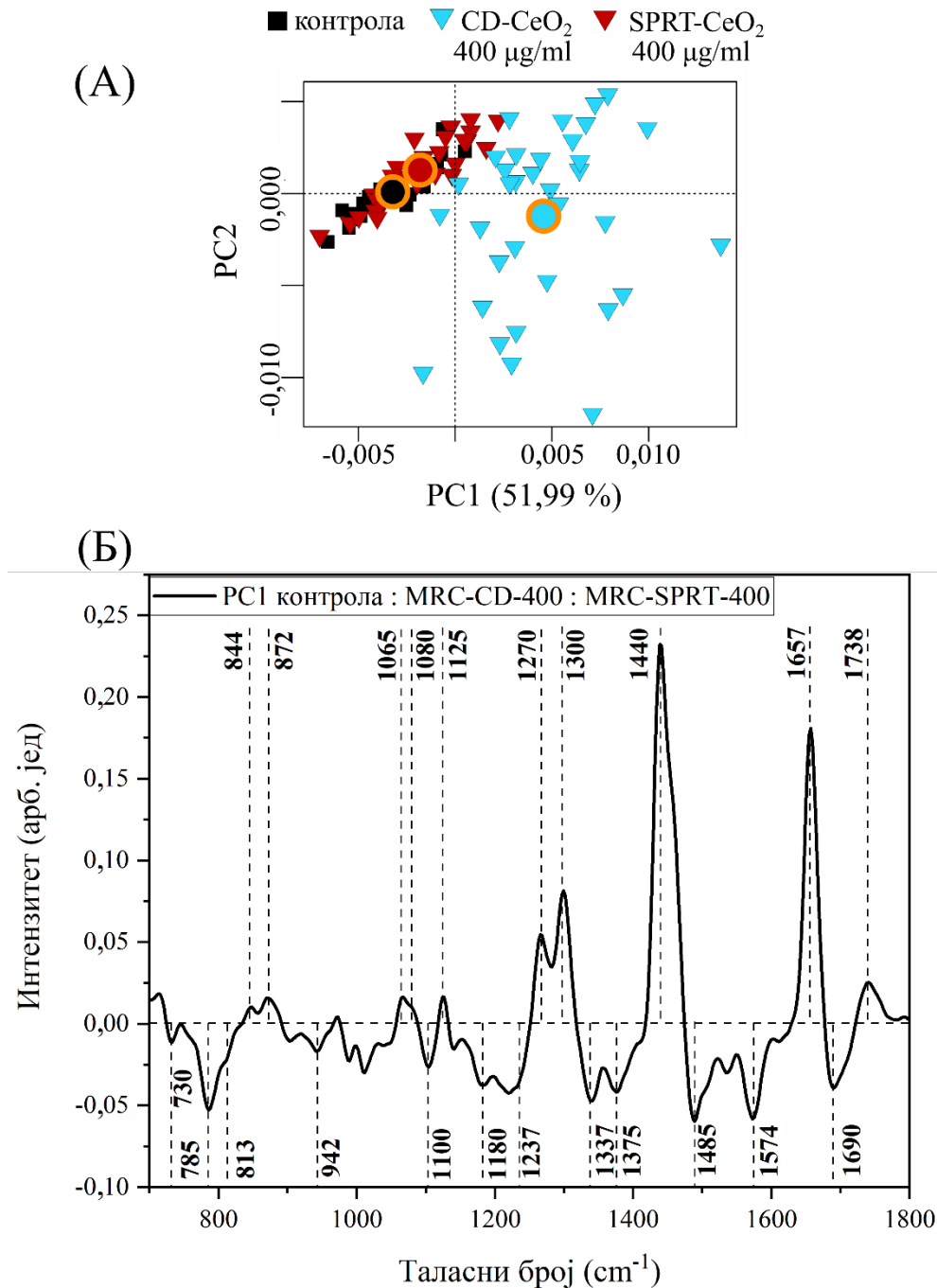
На слици 4.27А приказани су усредњени Раманови спектри са стандардним девијацијама измерени на MRC-CD-200 (тамноплаве линије) и MRC-CD-400 (светлоплаве линије) ћелијама. У њима се могу регистровати Раманови модови пореклом од вибрација у ћелијским макромолекулима (видети Табелу 4.3, поглавље 4.5.5). Минималне разлике усредњених спектра третираних ћелија у односу на контролу се могу уочити и без мултиваријантне статистичке анализе: пад интензитета модова на 785 cm⁻¹, 1095 cm⁻¹ и 1337 cm⁻¹, сва три повезана са нуклеинским киселинама, као и пораст интензитета модова на 1264 cm⁻¹, 1448 cm⁻¹ и 1657 cm⁻¹, повезаних са липидима и протеинима. Све наведене промене су израженије код ћелија третираних јачом дозом наночестица, код којих је посебно изражен и пораст липидног Рамановог мода на 1310 cm⁻¹. Такође се уочава широк опсег стандардне девијације усредњеног спектра MRC-CD-200 ћелија, указујући да су при овој дози различите ћелије измењене у различитом степену. У спектралном региону (2700-3200) cm⁻¹ уочава се пораст претежно липидних модова на 2850 cm⁻¹ и 2880 cm⁻¹, посебно изражен код MRC-CD-400 ћелија, код којих је додатно регистрован и пад интензитета претежно протеинског мода на 2930 cm⁻¹. Међутим, с обзиром на велики број модова у сваком спектру и чињеницу да интензитети готово сваког од њих подлежу мањој или већој промени, проблематично је одредити мод у спектрима који се може сматрати непроменљивим и у односу на кога би требало поредити промене интензитета других модова. Због тога је након анализе разлика у усредњеним спектрима уследила PCA, којом ће дате промене бити поузданије и детаљније окарактерисане.

У Рамановим спектрима ћелија третираних наночестицама SPRT-CeO₂, који су приказани на слици 4.27Б, смер промена интензитета модова слабије корелише са порастом дозе наночестица. Код MRC-SPRT-400 ћелија уочава се пад Раманових модова нуклеинских киселина на 785 cm⁻¹, 1337 cm⁻¹ и 1580 cm⁻¹, као и пораст фосфолипидног мода на 1065 cm⁻¹, док се код MRC-SPRT-800 ћелија уочава пораст интензитета мода на 1310 cm⁻¹. У региону (2700-3200) cm⁻¹ код MRC-SPRT-400 ћелија бележи се пораст интензитета липидних модова на 2850 cm⁻¹ и 2880 cm⁻¹, док се код MRC-SPRT-800 ћелија пораст липидних Раманових модова више не уочава, али се бележи пад интензитета претежно протеинског Рамановог мода на 2930 cm⁻¹. Другим речима, однос интензитета липидних и протеинских модова у овом делу спектра повећан је применом обе наведене дозе наночестица. Такође се може уочити да је стандардна девијација око средње вредности повећана код обе примењене дозе наночестица у односу на контролу, мада у нешто мањој мери него код MRC-CD-200 ћелија.



Слика 4.27. Раманови спектри MRC-5 ћелија третираних наночестицама (A) CD-CeO₂ у две различите концентрације и (B) SPRT-CeO₂, такође у две концентрације, упоређени са спектрима нетретираних MRC-5 (црно). Сви спектри су приказани као усредњени Раманов спектар ± стандардна девијација. Типични ћелијски Раманови модови означени су испрекиданим линијама уз које су записани одговарајући таласни бројеви.

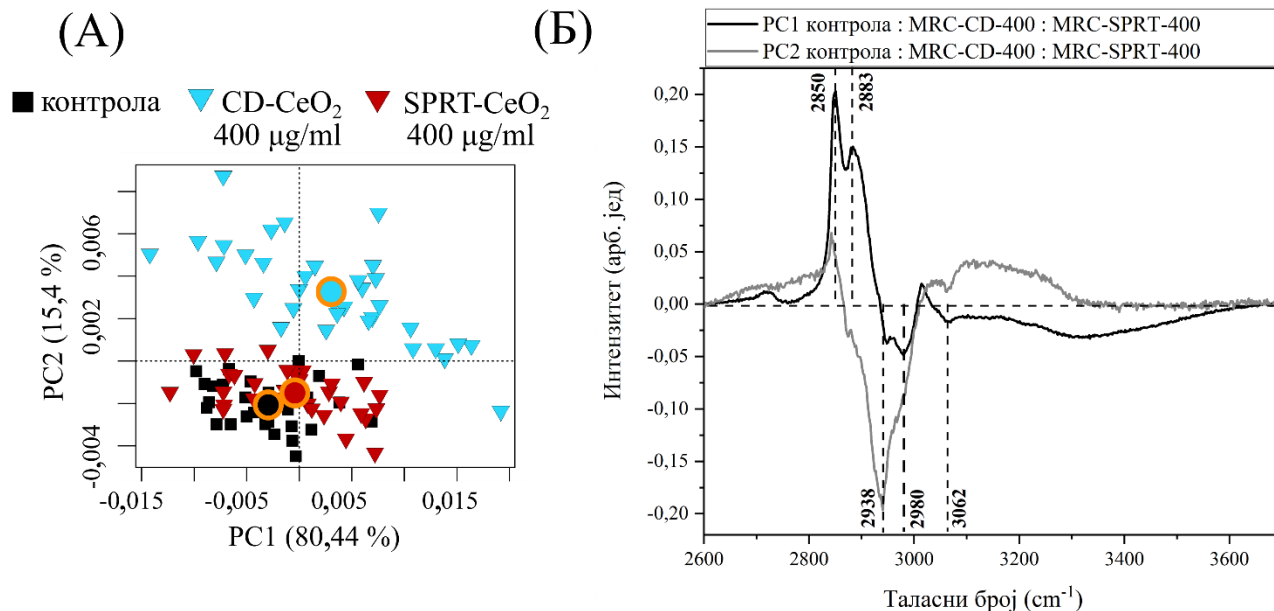
4.5.2.2. PCA Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних наночестицама CeO₂



Слика 4.28. PCA региона (700-1800) cm⁻¹ Раманових спектра MRC-SPRT-400, MRC-CD-400 и контролних (нетретираних) ћелија. (А) Графикон PC1 и PC2 скорова: контролне ћелије су означене црном, MRC-SPRT-400 ћелије црвеном, а MRC-SPRT-400 плавом бојом. Нулте вредности на осама означене су испрекиданим линијама, а средње вредности скорова за сваку групу означене су уоквиреним кружићима одговарајућих боја. (Б) PC1 добијена у анализи, са означеним најзначајнијим пиковима.

PCA је најпре примењена на спектре MRC-SPRT-400 и MRC-CD-400 ћелија (слике 4.28 и 4.29), како би се резултати могли упоредити са резултатима аналогне анализе HeLa ћелија (слике 4.24 и 4.25). Резултати су показали да у спектралном региону ($700\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$) PC1 има највећи потенцијал раздвајања третираних ћелија од контролних (слика 4.28A). Међутим, по тој компоненти је могуће раздвојити једино MRC-CD-400 ћелије, док се MRC-SPRT-400 ћелије на овај начин не могу разликовати од контролних. PC1 добијена у овој анализи објашњава 51,99 % укупне варијансе међу спектрима. У спектралном региону ($2600\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$) поред PC1, на сличан начин PC2 раздваја спектре третираних ћелија од контролних (слика 4.29B). PC1 и PC2 из ове анализе заједно обухватају 95,8 % укупне варијансе међу спектрима у овом спектралном региону.

PC1 добијена у анализи нискофреквентног спектралног региона приказана је на слици 4.28B. Просечан скор MRC-CD-400 ћелија за ову компоненту је позитиван (слика 4.28A), из чега следи да локални максимуми PC1 показују пораст интензитета одговарајућих Раманових модова у односу на контролу. Супротно, локални минимуми показују пад интензитета одговарајућих Раманових модова. Међу Рамановим модовима чији интензитет опада најбројнији су модови повезани са вибрацијама у нуклеинским киселинама: 730 cm^{-1} , 785 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} , 1180 cm^{-1} , 1337 cm^{-1} , 1375 cm^{-1} и 1574 cm^{-1} . Преостали модови, на 942 cm^{-1} , 1237 cm^{-1} и 1690 cm^{-1} могу се повезати са протеинима и указивати на промену у њиховој конформацији. Сви пикови на позитивној страни PC1 (локални максимуми) одговарају Рамановим модовима липида, посебно фосфолипида. Нарочито је упадљива сличност ове компоненте са Рамановим спектром фосфатидилсерина [196].



Слика 4.29. PCA региона ($2600\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$) Раманових спектра MRC-SPRT-400, MRC-CD-400 и контролних (нетретираних) ћелија. (A) Графикон PC1 и PC2 скорова: контролне ћелије су означене црном, MRC-SPRT-400 ћелије црвеном, а MRC-CD-400 плавом бојом. Нулте вредности на осама означене су испрекиданим линијама, а средње вредности скорова за сваку групу означене су уоквиреним кружићима одговарајућих боја. (B) PC1 (црно) и PC2 (сиво), добијене у анализи, са означеним најзначајнијим пиковима.

Обе компоненте из анализе спектралног региона ($2600\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$) значајне за раздвајање ћелија, PC1 и PC2, имају позитивне вредности скорова код спектра MRC-CD-400 ћелија (слика 4.29A). Тако PC1 указује на пораст претежно липидних модова на 2850 cm^{-1} и 2883 cm^{-1} , док PC2

указује на пад претежно протеинских модова на 2939 cm^{-1} и 2980 cm^{-1} код MRC-CD-400 ћелија (слика 4.29Б).

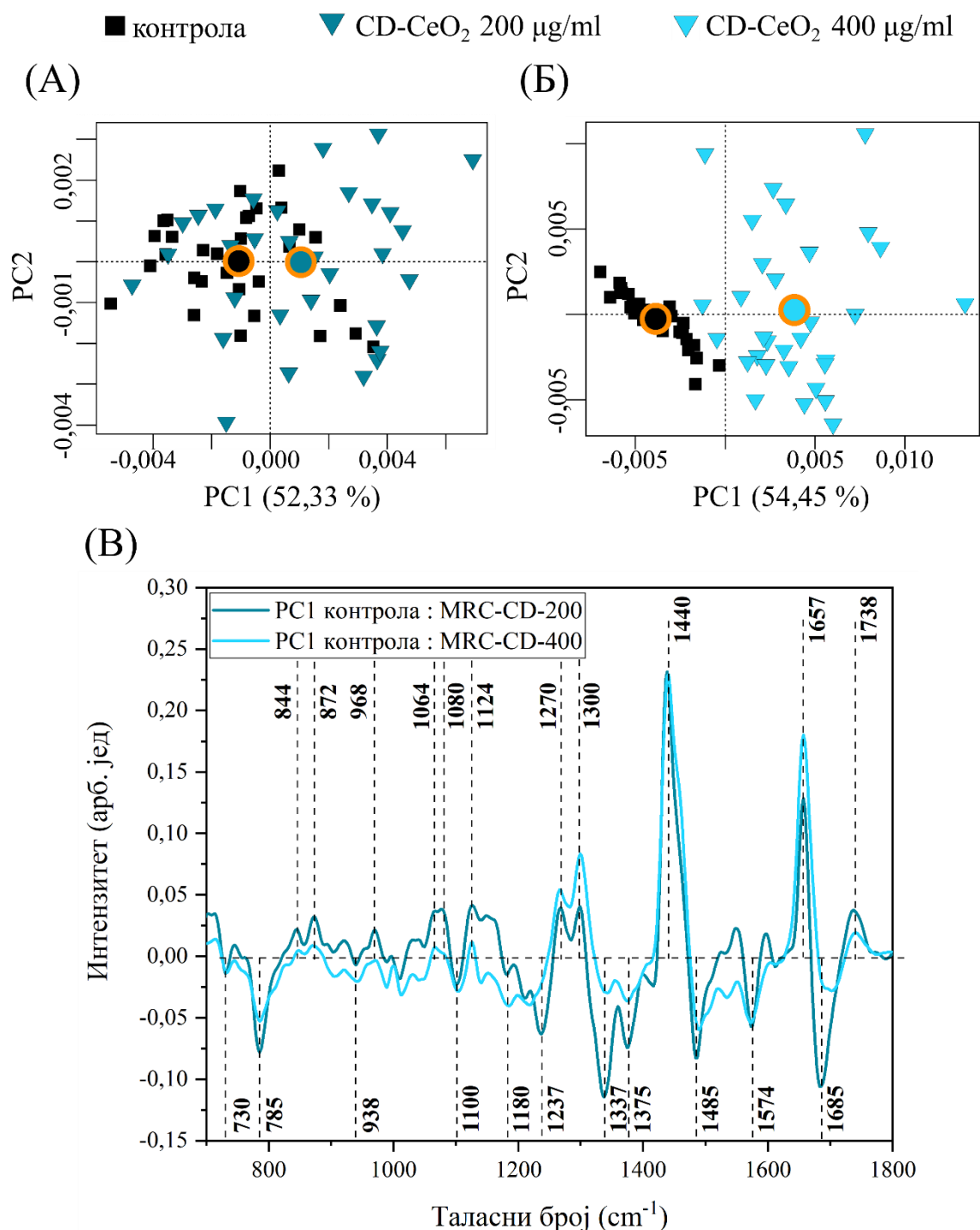
4.5.2.3. PCA „у паровима“ Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних наночестицама CD-CeO₂

Пошто PCA изведена на две експерименталне групе често има капацитет да детектује разлике међу њима које нису биле детектоване заједничком анализом свих група истовремено, у наредним експериментима настављена је PCA спектра третираних ћелија по паровима. Парове су чиниле контролна група и група ћелија третираних једном од одабраних доза и врста наночестица. На сликама 4.30 и 4.31 приказани су резултати PCA парова контрола:MRC-CD-200 и контрола:MRC-CD-400, у нискофреквентном (слика 4.30) и високофреквентном (слика 4.31) спектралном региону. Резултати који се односе на MRC-CD-200 приказани су тамноплавом, а резултати који се односе на MRC-CD-400 светлоплавом бојом. У обе анализе PC1 је компонента која најбоље представља разлике међу третираним и контролним ћелијама. Раздвајање је боље, односно разлике од контроле су веће, код ћелија третираних вишом дозом наночестица (слике 4.30Б и 4.31Б). Код анализе ћелија третираних нижом концентрацијом наночестица, раздвајање које се постиже преко PC1 иако је мање, статистички јесте значајно.

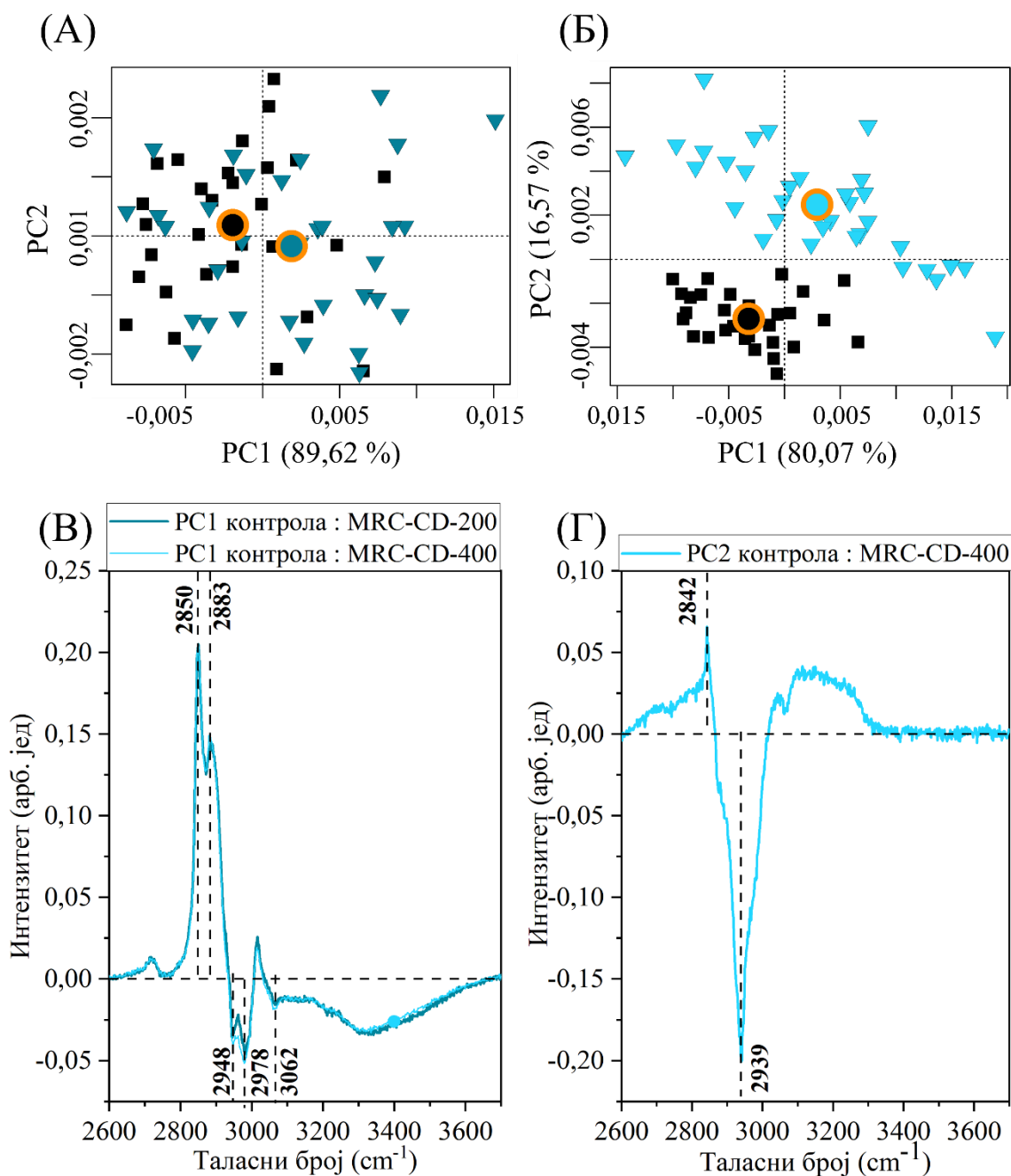
На слици 4.30В представљене су PC1 добијене у анализи нискофреквентног спектралног региона код парова контрола:MRC-CD-200 (тамније плаво) и контрола:MRC-CD-400 (светлије плаво). Њиховом упоредном анализом може се увидети велика сличност између две компоненте, али и постојање разлика у релативном односу интензитета пикова. Код PC1 проистекле из анализе контрола:MRC-CD-200 ћелија могу се уочити пикови који указују на опадање садржаја нуклеинских киселина и пораст садржаја липида, по Рамановом спектру веома сличних фосфатидилсерину. Липидни део PC1 проистекле из анализе ћелија третираних вишом концентрацијом наночестица (локални максимуми) је мање интензиван у односу на део повезан са нуклеинским киселинама (локални минимуми) и по односу интензитета пикова мање сличан молекулу фосфатидилсерина. Такође, односи интензитета пикова I_{1270}/I_{1300} , као и I_{1657}/I_{1440} , који се сматрају маркерима незасићености липида, виши је у PC1 добијеној из анализе ћелија третираних нижом концентрацијом наночестица.

На слици 4.32 приказана је PC1 добијена анализом нискофреквентног спектралног региона пара MRC-CD-200:MRC-CD-400. Просечни скор за ову компоненту код MRC-CD-400 има негативну, а код MRC-CD-200 позитивну вредност (није приказано), што значи да максимуми представљају Раманове модове чији интензитет код MRC-CD-400 опада у односу на MRC-CD-200 (нуклеинске киселине), док минимуми представљају Раманове модове чији интензитет код MRC-CD-400 расте у односу на MRC-CD-200 (липиди).

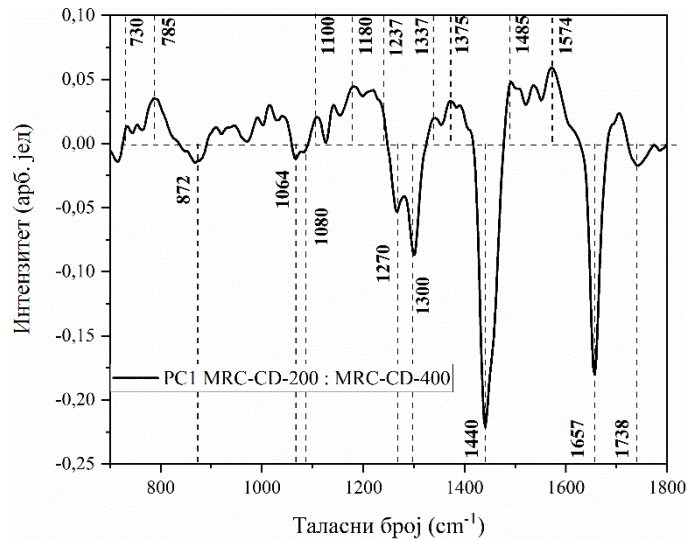
PC1 добијене анализом високофреквентног спектралног региона спектра MRC-CD-200 и MRC-CD-400 ћелија готово су идентичне (слика 4.31В). У оба случаја, PC1 описују пораст претежно липидних модова на 2850 cm^{-1} и 2883 cm^{-1} , уз мање изражен пад претежно протеинских модова на 2948 cm^{-1} и 2978 cm^{-1} . Међутим, у анализи спектра MRC-CD-400 ћелија статистички значајно раздвајање спектра третираних ћелија у односу на контролне добија се и преко PC2. У овој компоненти посебно је наглашен локални минимум на 2939 cm^{-1} , подвлачећи пад протеинских модова у Рамановим спектрима ћелија третираних вишом дозом наночестица.



Слика 4.30. PCA региона (700-1800) cm⁻¹ Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних двама концентрацијама наночестица CD-CeO₂ и контролних (нетретираних) ћелија. (A) Графикон PC1 и PC2 скорова добијен у PCA пара контрола:MRC-CD-200 ћелија. (B) Графикон PC1 и PC2 скорова добијен у PCA пара контрола:MRC-CD-400 ћелија. Нулте вредности на осам под А и Б означене су испрекиданим линијама, а средње вредности скорова за сваку групу означене су уоквиреним кружићима одговарајућих боја. (C) PC1 добијена у PCA пара контрола:MRC-CD-200 ћелија, односно контрола:MRC-CD-400 ћелија, са означеним најзначајнијим пиковима.



Слика 4.31. PCA региона ($2600\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$) Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних двама концентрацијама наночестица CD-CeO₂ и контролних (нетретираних) ћелија. (А) Графикон PC1 и PC2 скорова добијен у PCA пара контрола:MRC-CD-200. (Б) Графикон PC1 и PC2 скорова добијен у PCA пара контрола:MRC-CD-400. Нулте вредности на осам под А и Б означене су испрекиданим линијама, а средње вредности скорова за сваку групу означене су уоквиреним кружићима одговарајућих боја. (В) PC1 добијене у PCA пара контрола:MRC-CD-200, односно контрола:MRC-CD-400 ћелија, са означеним најзначајнијим пиковима. (Г) PC2 добијена у PCA пара контрола:MRC-CD-400 ћелија, са означеним најзначајнијим пиковима.



Слика 4.32. PC1 пара MRC-CD-200:MRC-CD-400 (негативна вредност скорa код MRC-CD-400)

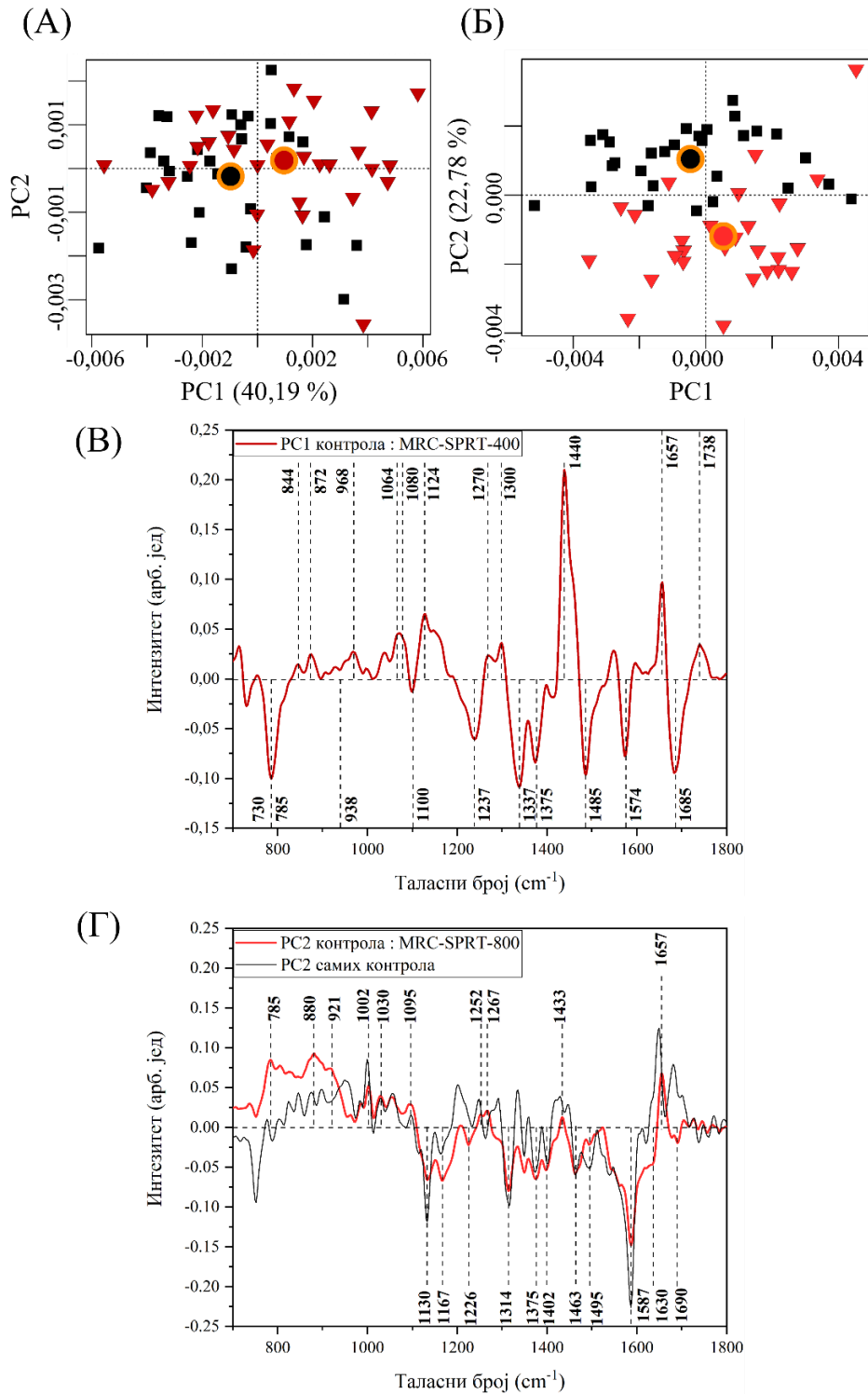
4.5.2.4. PCA „у паровима“ Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних наночестицама SPRT-CeO₂

PCA Раманових спектра ћелија третираних наночестицама SPRT-CeO₂ такође је изведена засебно за парове контрола:MRC-SPRT-400 и контрола:MRC-SPRT-800, одвојено за нискофреквентни (слика 4.32) и високофреквентни спектрални регион (слика 4.33).

У нискофреквентном спектралном региону, Раманови спектри MRC-SPRT-400 ћелија могу се са статистичком значајношћу раздвојити од спектра контролних ћелија помоћу компоненте PC1, која обухвата 40,19 % укупне спектралне варијабилности међу ћелијама (слика 4.33А). PC1 и у овој анализи као локалне максимуме садржи пикове асоциране са липидним Рамановим модовима, а као локалне минимуме пикове асоциране претежно са Рамановим модовима нуклеинских киселина (слика 4.33В). Липидни део компоненте и у овом случају показује сличност са Рамановим спектром фосфатидилсерина и указује на повишен проценат незасићених липида у третираним ћелијама. Међутим, анализа MRC-SPRT-800 ћелија даје нешто другачије резултате. У овом случају, PC1 компонента није значајна за раздвајање третиране од контролне групе. Раздвајање је ипак омогућено наредном компонентом, PC2 (слика 4.33Б). PC2 из ове анализе приказана је на слици 4.32Г и упоређена са PC2 добијеном из анализе самих контрола. Две компоненте су веома сличне, што значи да представљају извесне разлике које природно постоје међу ћелијама. PC2 добијена у анализи контролних и третираних ћелија ипак поседује и одређене карактеристике које омогућавају раздвајање ових двају група. Уочљиве разлике су позадински сигнал у региону (750-850) cm⁻¹, пореклом вероватно од расејања на великим кластерима наночестица, из ког се истичу пикови на 785 cm⁻¹ и 880 cm⁻¹, као и различит облик амидних региона. У амид III траци појављује се локални максимум на 1267 cm⁻¹, а у амид I траци минимуми на 1630 cm⁻¹ и 1690 cm⁻¹, док је максимум са 1650 cm⁻¹ померен на 1657 cm⁻¹.

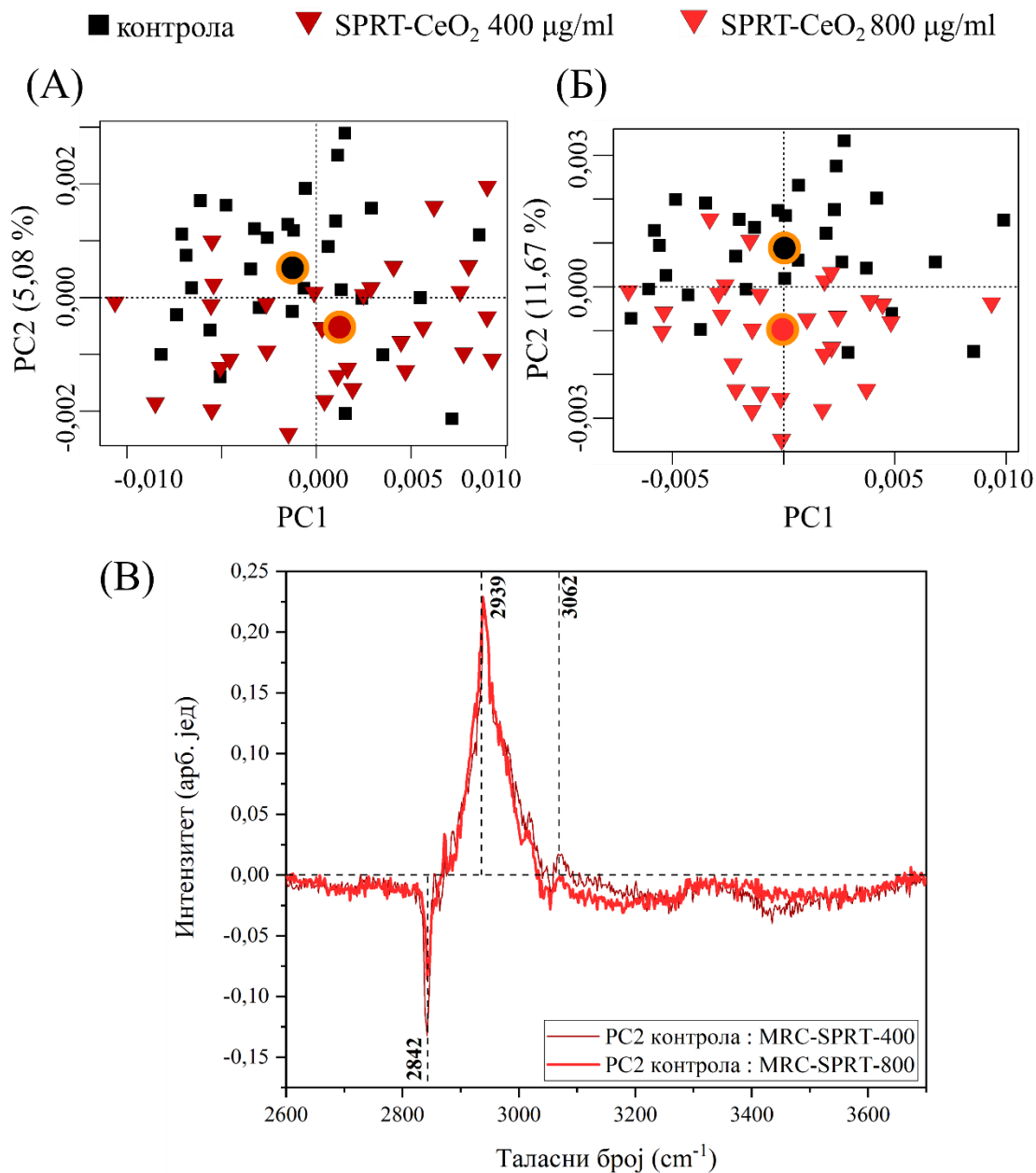
У високофреквентном спектралном региону ћелије MRC-SPRT-800 (слика 4.34А), као и ћелије MRC-SPRT-400 (слика 4.34Б), могу се раздвојити од контролних ћелија помоћу PC2. PC2 у оба случаја садржи минимум на 2842 cm⁻¹ и максимум на 2939 cm⁻¹ (слика 4.34В), указујући на повећање односа садржаја липида према садржају протеина у третираним ћелијама у односу на

контролу. PC2 добијене у две анализе су готово идентичне, са минималном разликом у односу I_{2842}/I_{2939} , која указује на незнатно виши однос липида према протеинима у ћелијама MRC-SPRT-400.



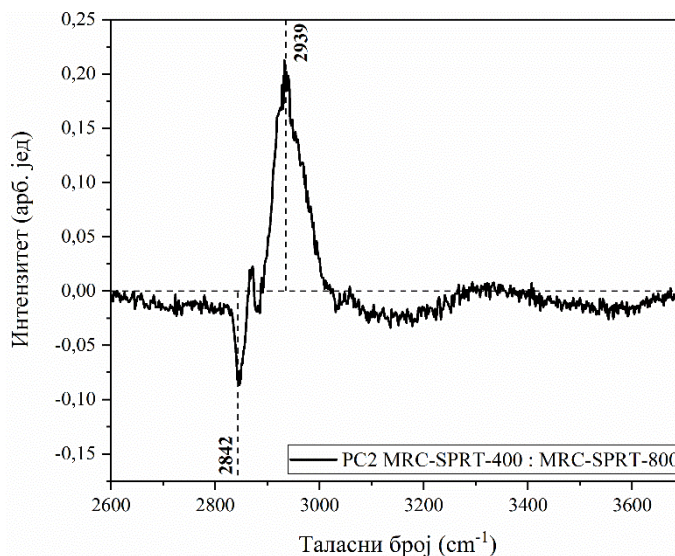
Слика 4.33. PCA региона (700-1800) cm^{-1} Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних двама концентрацијама наночестица SPRT- CeO_2 и контролних (нетретираних) ћелија. (А) Графикон PC1 и PC2 скорова добијен у PCA анализи пара контрола:MRC-SPRT-400. (Б) Графикон PC1 и PC2 скорова добијених у PCA анализи пара контрола:MRC-SPRT-400 и контрола: MRC-SPRT-

800. Нулте вредности на осама под А и Б означене су испрекиданим линијама, а средње вредности скорова за сваку групу означене су уоквиреним кружићима одговарајућих боја. (Б) PC1 добијена у PCA анализи пара контрола:MRC-SPRT-400. (Г) PC2 добијене у PCA анализи пара контрола:MRC-SPRT-800, односно у PCA анализи самих контролних ћелија, са означеним најзначајнијим пиковима.



Слика 4.34. PCA региона (2600-3700) cm⁻¹ Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних двама концентрацијама наночестица SPRT-CeO₂ и контролних (нетретираних) ћелија. (А) Графикон PC1 и PC2 скорова добијен у PCA пара контрола:MRC-SPRT-400. (Б) Графикон PC2 и PC3 скорова добијен у PCA пара контрола:MRC-SPRT-800. Нулте вредности на осама под А и Б означене су испрекиданим линијама, а средње вредности скорова за сваку групу означене су уоквиреним кружићима одговарајућих боја. (Б) PC2 добијене у PCA пара контрола:MRC-SPRT-400, односно пара контрола:MRC-SPRT-800, са означеним најзначајнијим пиковима.

На слици 4.35 приказана је PC2 добијена у анализи високофреквентног спектралног региона пара MRC-SPRT-400:MRC-SPRT-800. Просечан скор за ову компоненту код MRC-SPRT-400 има позитивну, а код MRC-SPRT-800 негативну вредност, што значи да минимуми представљају Раманове модове чији се интензитет код MRC-SPRT-800 повећава (претежно липидни), а максимуми Раманове модове чији се интензитет код MRC-SPRT-800 смањује (претежно протеински). Анализа овог пара, дакле, показује да се однос липидног према протеинском садржају код MRC-SPRT-800 повећава у односу на MRCSPRT-400.



Слика 4.35. PC2 високофреквентног региона пара MRCSPRT-400:MRC-SPRT-800 (негативна вредност код MRC-SPRT-800)

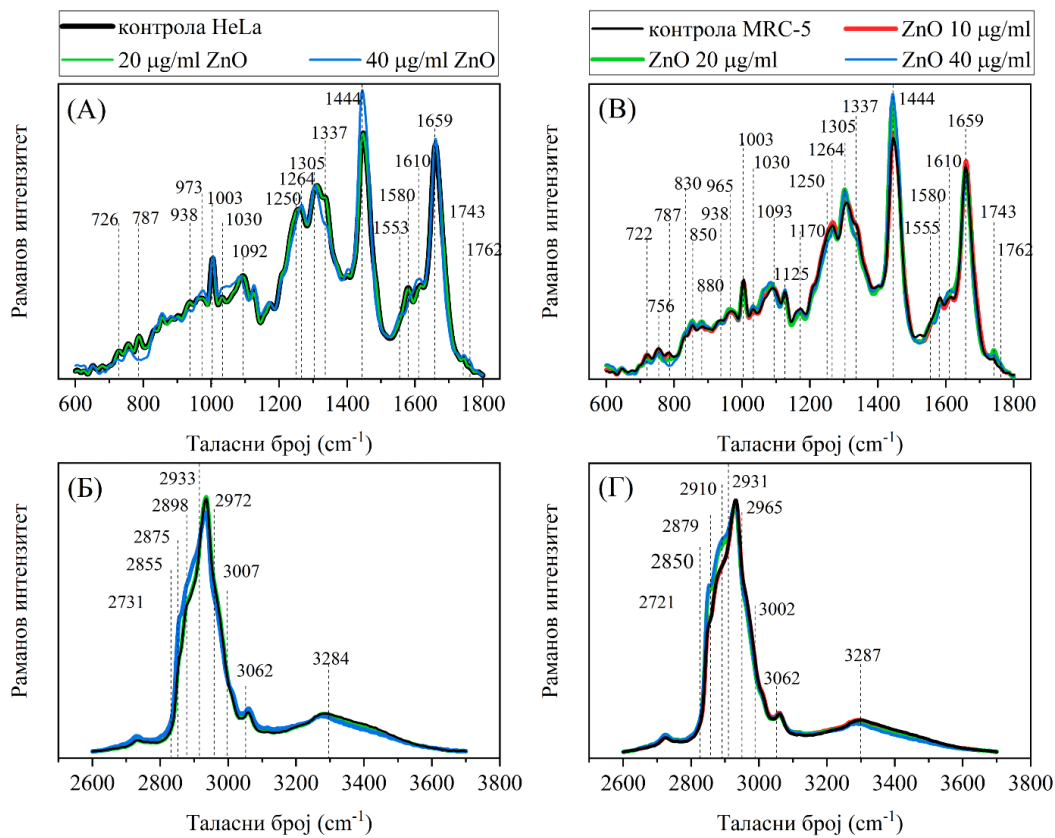
4.5.3. Раманова спектроскопија HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO

Раманови спектри HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO мерени су у опсегу фреквенција, (700-3200) cm^{-1} , са истом ласерском линијом (532 nm).

Након 48 сати инкубације HeLa ћелија са 20 $\mu\text{g/ml}$ и 40 $\mu\text{g/ml}$ наночестица ZnO и MRC-5 ћелија са 10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ и 40 $\mu\text{g/ml}$ наночестица ZnO, мерени су Раманови спектри третираних ћелија, као и нетретираних контрола. Спектри су обрађени како је описано у поглављу 3.9.3 и као такви анализирани засебно у два спектрална региона: (600-1800) cm^{-1} (нискофреквентни регион) и (2600-3700) cm^{-1} (високофреквентни регион). Такође је измерен Раманов спектар наночестица ZnO (Прилог 1) како би се могао елиминисати његов евентуални допринос ћелијским спектрима. Мерење је изведено под истим условима као и мерење ћелијских спектра. У измереним ћелијским спектрима није утврђено присуство Раманових мода наночестица ZnO.

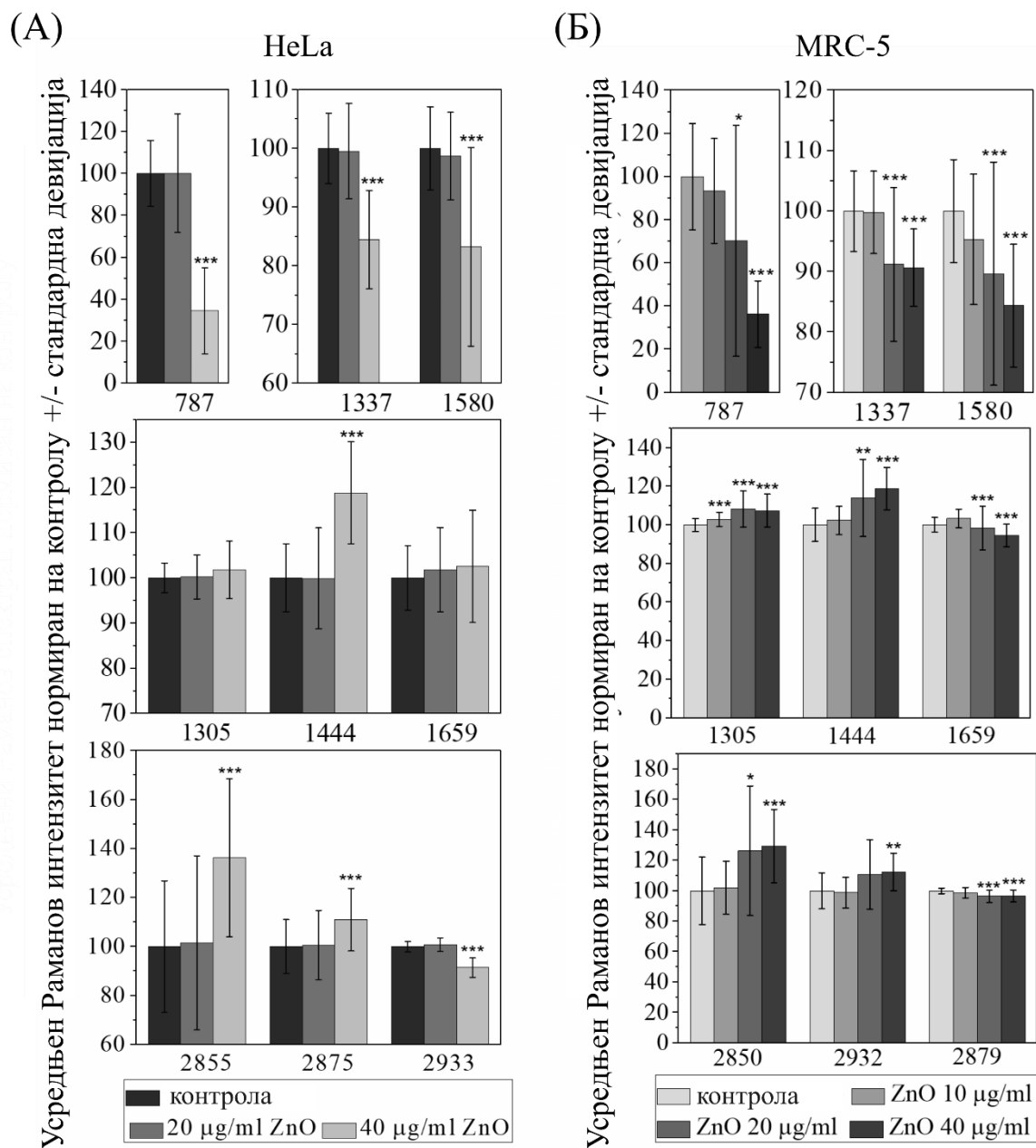
4.5.3.1. Анализа усредњених Раманових спектра HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO

Усредњени Раманови спектри HeLa ћелија третираних наночестицама ZnO приказани су на сликама 4.36А (нискофреквентни регион) и 4.36Б (високофреквентни регион). Линија усредњеног спектра за ћелије HeLa-ZnO-20 (зелена) готово потпуно се поклапа са линијом усредњеног спектра контролних ћелија (црно), тј. између ова два спектра се не запажају разлике у интензитету Раманових модова. У спектру ћелија HeLa-ZnO-40 (плава боја) уочавају се разлике у појединим Рамановим модовима. У нискофреквентном спектралном региону то су пре свега модови повезани са нуклеинским киселинама: 787 cm^{-1} , 1337 cm^{-1} , 1580 cm^{-1} . Веома изражен је и пораст интензитета мода на 1444 cm^{-1} , који може потицати од различитих биолошких молекула. Такође се уочавају промене у облику амидне траке I ($\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ - $\sim 1700\text{ cm}^{-1}$) и III ($\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ - $\sim 1280\text{ cm}^{-1}$). У високофреквентном спектралном региону запажа се пораст интензитета модова на 2855 cm^{-1} и 2875 cm^{-1} и пад интензитета мода на 2933 cm^{-1} . Графикони на слици 4.37А илуструју забележене промене у интензитету Раманових модова третираних HeLa ћелија. Интензитет очитан на највишој тачки датог Рамановог мода контролних ћелија представљен је као 100 %, док су интензитети одговарајућег мода код третираних узорака изражени процентуално у односу на контролу. На слици 4.37Б приказане су промене интензитета истих Раманових модова код третираних MRC-5 ћелија. Подаци на графиконима су груписани тако да модови у првом реду указују на промене у нуклеинским киселинама, у другом реду су Раманови модови повезани са липидима и протеинима, а у трећем модови из високофреквентног спектралног региона, такође повезани са липидима и протеинима.



Слика 4.36. Усредњени Раманови спектри ћелија третираних наночестицама ZnO и контролних ћелија. Различите концентрације наночестица су означене различитим бојама: 10 µg/ml црвено,

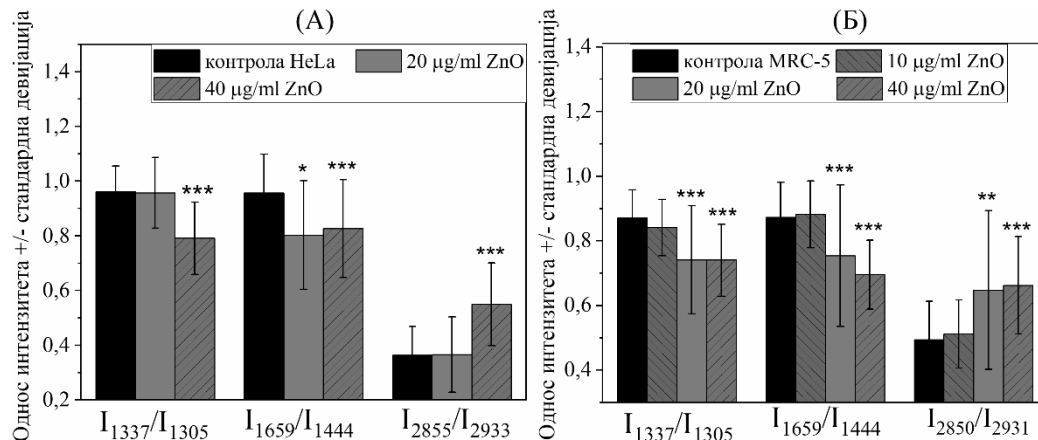
20 $\mu\text{g/ml}$ зелено, 40 $\mu\text{g/ml}$ плаво, док су контроле представљене црно. Регион (600-1800) cm^{-1} усредњених Раманових спектра (А) HeLa и (Б) MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO; регион (2600-3700) cm^{-1} усредњених Раманових спектра (Б) HeLa и (Г) MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO. Уочљиви ћелијски Раманови модови означени су испрекиданим линијама, са одговарајућим таласним бројевима написаним уз линије.



Слика 4.37. Разлике у интензитету Раманових модова (Y оса) на одређеном таласном броју (X оса) за (А) HeLa, односно (Б) MRC-5 ћелије, третиране различитим дозама наночестица ZnO. Подаци су представљени као средње вредности са стандардним девијацијама. Симбол (*) означава статистички значајну разлику у односу на контролу: * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), процењену помоћу непараметарског ANOVA теста.

Усредњени Раманови спектри MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO приказани су на сликама 4.36B (нискофреквентни регион) и 4.36Г (високофреквентни регион). Уочава се да су

у спектрима контролних MRC-5 ћелија модови нуклеинских киселина мање изражени него у спектрима контролних HeLa ћелија (Прилог 2). У спектрима MRC-5 ћелија третираним наночестицама ZnO запажају се промене у интензитету истих мода као код третираних HeLa ћелија, али и мода на 1305 cm^{-1} чији интензитет расте и на 1659 cm^{-1} , чији интензитет опада (слика 4.37Б). Промене су приметне већ код HeLa-ZnO-20 (зелена линија на слици 4.36) и задржавају се код HeLa-ZnO-40 ћелија (плава линија на слици 4.36). Спектар HeLa-ZnO-10 ћелија (црвена линија на слици 4.36) се веома мало разликује од спектра контролних ћелија (црна линија на слици 4.36), али се ипак неке мале разлике уочавају. Једна од њих, пораст претежно липидног Рамановог мода на 1305 cm^{-1} , показала се статистички значајном променом у односу на контролу. Додатно, на основу промене облика спектралог региона ($1280\text{--}1360\text{ cm}^{-1}$) индуковане наночестицама ZnO, уочена је корелација између пада интензитета мода на 1337 cm^{-1} и пораста интензитета мода на 1305 cm^{-1} , како код HeLa, тако и код MRC-5 ћелија. Промена односа интензитета ова два мода је квантификована и резултати су представљени на слици 4.38. Такође су квантификоване и промене у односима I_{1659}/I_{1444} и I_{2855}/I_{2933} , које указују на промене у односима садржаја протеина према садржају липида, односно садржаја липида према садржају протеина. Промена у сва три односа интензитета су показане код HeLa-ZnO-20 ћелија (слика 4.38А), као и код MRC-ZnO-20 и MRC-ZnO-40 ћелија, без статистички значајне разлике између две примењене дозе (слика 4.38Б).



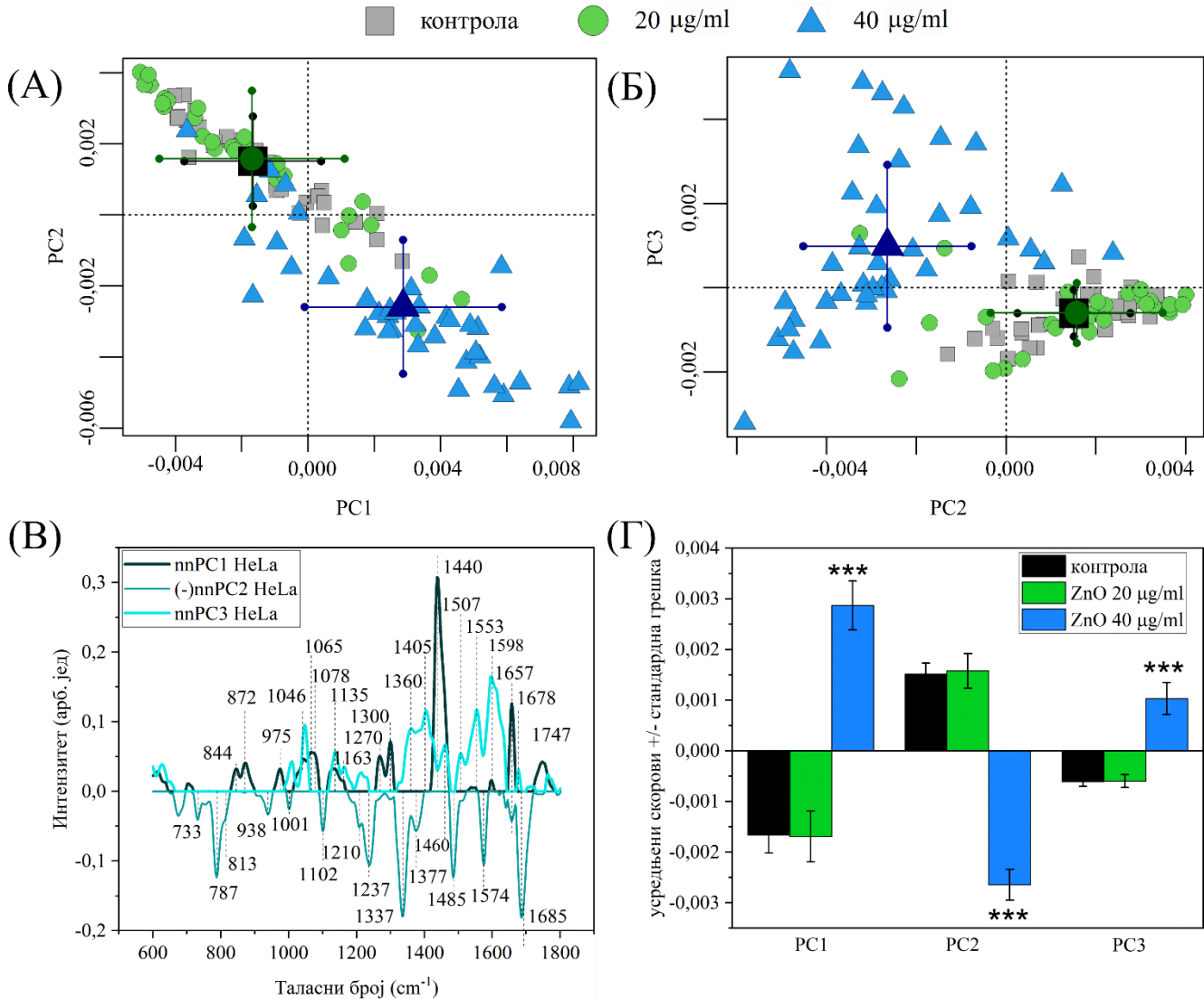
Слика 4.38. Промене у односима интензитета одабраних Раманових мода узроковане третманом (А) HeLa и (Б) MRC-5 ћелија наночестицама ZnO, представљени као средње вредности са стандардним девијацијама. Статистички значајне разлике обележене су симболом (*): * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), на основу непараметарског ANOVA теста.

4.5.3.2. PCA Раманових спектра HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO: регион ($600\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$)

Раманови спектри контролних и третираних HeLa и MRC-5 ћелија подвргнути су PCA одвојено у два спектрална региона: нискофреквентном ($600\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$) и високофреквентном ($2600\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$). Спектри су анализирани стандардном и ненегативном PCA. Ненегативна PCA је дала компоненте у којима су се лакше препознавале карактеристике спектра одређених биолошких класа молекула, па је ова метода изабрана као погоднија за коришћење.

На слици 4.39 приказани су резултати ненегативне PCA за нискофреквентни спектрални регион HeLa ћелија третираних наночестицама ZnO. Графикони скорова за прве три компоненте (слика 4.39А и Б) показују да постоје разлике између контролних ћелија и HeLa-ZnO-40 ћелија.

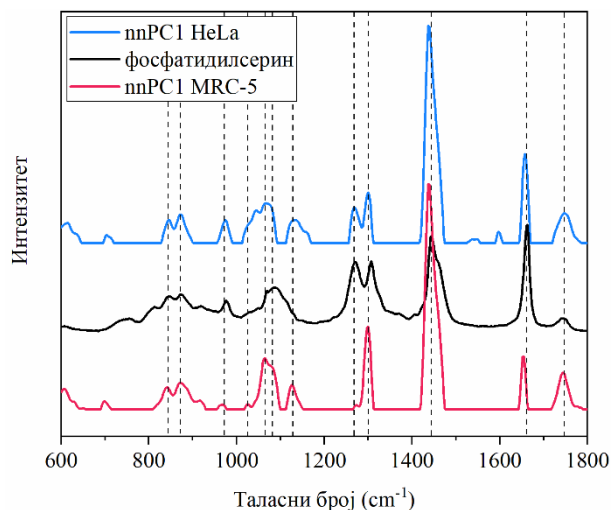
На слици 4.39Г графички су представљене средње вредности РС скорова и означене статистички значајне разлике између њих. PC1 за третиране ћелије има позитиван предзнак, па пикови које ова компонента садржи представљају пораст интензитета одговарајућих Раманових модова код третираних ћелија. Исто важи и за PC3, док PC2 има негативан предзнак, па пикови ове компоненте показују пад интензитета одговарајућих Раманових модова у спектрима третираних ћелија. Прве три компоненте заједно описују 74,11 % од укупне варијабилности међу спектрима.



Слика 4.39. Ненегативна PCA интервала (600-1800) cm⁻¹ Раманових спектра HeLa ћелија третираних наночестицама ZnO. На графиконима скорова за (A) PC1 и PC2 и (B) PC2 и PC3 средње вредности скорова за контролну групу су приказане црним квадратом, за HeLa-ZnO-20 групу тамнозеленим кругом, а за HeLa-ZnO-40 групу ћелија тамноплавим троуглом, на којима су хоризонталним и вертикалним линијама назначене стандардне девијације по X, односно Y оси. (C) Прве три PC, помножене са предзнаком одговарајућег просечног скор за третиране ћелије, ради лакшег праћења смера промене интензитета. (D) Просечне вредности скорова за прве три PC, са назначеним стандардним грешкама и статистичком значајношћу разлике у односу на контролу: *** (p < 0,001).

PC1 добијена у анализи HeLa ћелија третираних наночестицама ZnO садржи пикове који претежно одговарају Рамановим модовима липида (слика 4.39B, Табела 4.3). Међу њима се као

посебно значајни истичу висок однос интензитета I_{1270}/I_{1300} , као и низак однос интензитета I_{1657}/I_{1440} , који се сматрају маркерима незасићености липида. Произилази да HeLa-ZnO-40 ћелије одликује пораст садржаја незасићених липида у односу на контролу. Упадљива је велика сличност ове PC1 са Рамановим спектром фосфатидилсерина (слика 4.40).

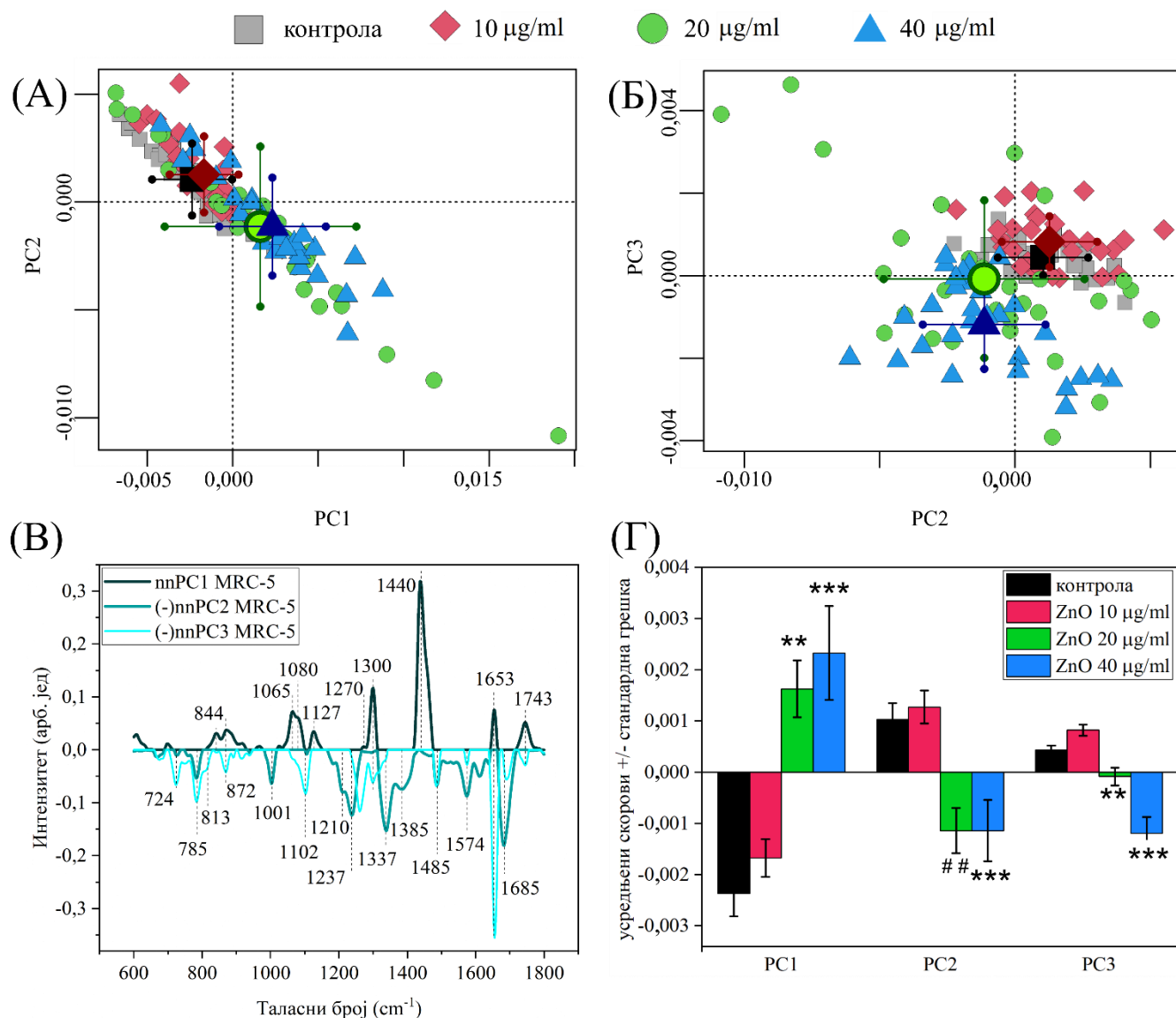


Слика 4.40. Ненегативне PC1 добијене из анализе HeLa (плаво) и MRC-5 (црвено) ћелија третираних наночестицама ZnO, упоређене са Рамановим спектром фосфатидилсерина (црно). Спектар фосфатидилсерина преузет уз допуштење Kirsty Milligan [196].

PC2 добијена у анализи HeLa ћелија третираних наночестицама ZnO састоји се из пикова који највећим делом одговарају Рамановим модовима нуклеинских киселина (слика 4.39B): 733 cm^{-1} , 787 cm^{-1} , 1337 cm^{-1} , 1485 cm^{-1} , 1574 cm^{-1} . Пикови повезани са протеинима су такође присутни у овој компоненти: 1001 cm^{-1} , 1210 cm^{-1} , 1237 cm^{-1} , 1685 cm^{-1} . Због негативног предзнака скорова HeLa-ZnO-40 ћелија за PC2 (слика 4.39Г), ова компонента указује на пад Раманових модова пореклом од нуклеинских киселина и протеина, односно на смањење количине нуклеинских киселина и протеина у третираним ћелијама.

PC3 из исте анализе (слика 4.39B) својим целокупним изгледом не може се повезати са Рамановим спектром неког одређеног ћелијског молекула нити одређене класе молекула. Најизраженији пикови које ова компонента садржи су регистровани на 1046 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} , 1405 cm^{-1} , 1553 cm^{-1} и 1598 cm^{-1} . Раманови модови на свим наведеним фреквенцијама осим 1046 cm^{-1} могу се повезати са аминокиселинама (Табела 4.3, поглавље 4.5.5). PC3 скорови имају позитиван предзнак за HeLa-ZnO-40 ћелије (слика 4.39Г).

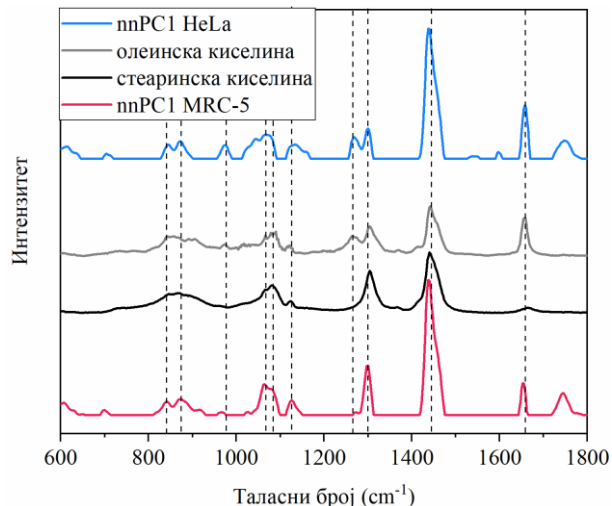
Резултати ненегативне PCA за спектрални регион $(600-1800)\text{ cm}^{-1}$ MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO приказани су на слици 4.39. Анализа је показала да се на основу прве три компоненте могу разликовати MRC-ZnO-20 и MRC-ZnO-40 ћелије од контролних ћелија и MRC-ZnO-10 ћелија (слика 4.39 Г). Међусобно се не могу разликовати MRC-ZnO-20 и MRC-ZnO-40 ћелије, као ни MRC-ZnO-10 од контролних ћелија. PC1 има позитиван предзнак скорова код MRC-ZnO-20 и MRC-ZnO-40 ћелија, док PC2 и PC3 имају негативан предзнак код наведених група ћелија.



Слика 4.41. Ненегативна PCA интервала (600-1800) cm⁻¹ Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO. На графиконима скорова за (A) PC1 и PC2 и (Б) PC2 и PC3 средње вредности скорова за контролну групу су приказане црним квадратом, за групу MRC-ZnO-10 тамноцрвеним ромбом, за групу MRC-ZnO-20 јаркозеленим кругом, а за групу MRC-ZnO-40 ћелија тамноплавим троуглом, на којима су хоризонталним и вертикалним линијама назначене стандардне девијације по X, односно Y оси. (В) Прве три PC, помножене са предзнаком одговарајућег просечног скорa за третиране ћелије, ради лакшег праћења смера промене интензитета. (Г) Просечне вредности скорова за прве три PC, са назначеним стандардним грешкама и статистичком значајношћу разлике: ** (p < 0,01 у односу на контролу), *** (p < 0,001 у односу на контролу), ## (p < 0,01 у односу на третман дозом 10 μg/ml).

PC1 добијена у ненегативној PCA нискофреквентног региона Раманових спектра MRC-5 ћелија описује 48,92 % укупне варијабилности међу спектрима. Пикови које садржи одговарају Рамановим модовима липида (слика 4.41В, Табела 2). Њихови таласни бројеви су исти као у PC1 добијеној из аналогне анализе HeLa ћелија, али се односи интензитета појединих пикова разликују. Упечатљива је разлика у односима интензитета I₁₂₇₀/I₁₃₀₀ који је мањи и I₁₆₅₇/I₁₄₄₀ који је већи него код третираних HeLa ћелија. Тако ова PC1 има мање изражене карактеристике

незасићених липида. Целокупан изглед PC1 такође мање подсећа на Раманов спектар фосфатидилсерина него што је то био случај код HeLa ћелија. На слици 4.42 упоређене су PC1, добијене из анализе HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO, са Рамановим спектрима типичне засићене (стеаринске) и типичне незасићене (олеинске) масне киселине. Поређење потврђује виши степен засићености липида чије се садржај повећава код третираних MRC-5 ћелија, у односу на липиде чији се садржај повећава код третираних HeLa ћелија.

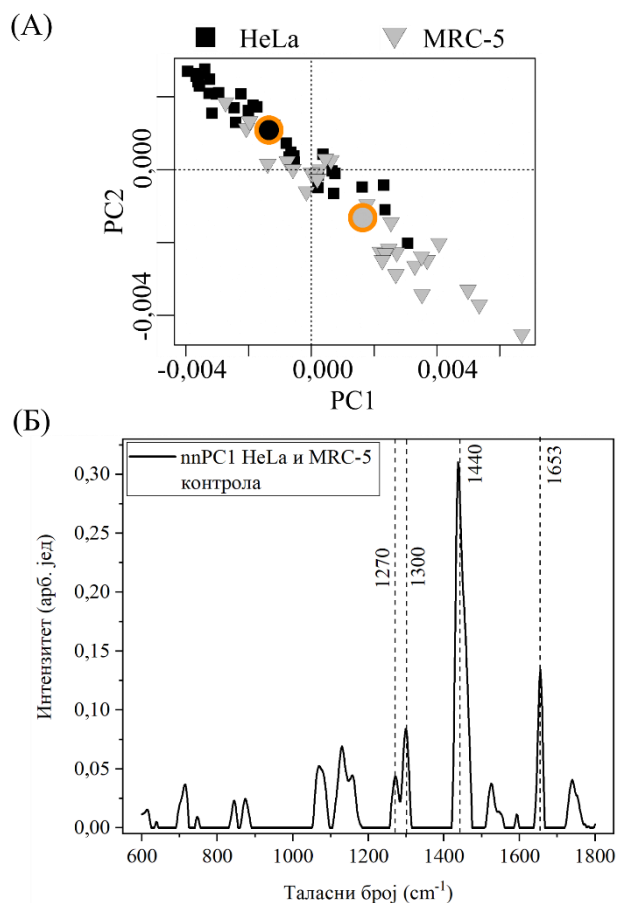


Слика 4.42. Ненегативне PC1 добијене из анализе HeLa (плаво) и MRC-5 (црвено) ћелија третираних наночестицама ZnO, упоређене са Рамановим спектрима стеаринске киселине (црно) и олеинске киселине (сиво). Спектри стеаринске и олеинске киселине преузети уз допштење Kirsty Milligan [196].

Како би се испитале инхерентне разлике у липидном садржају контролних HeLa и MRC-5 ћелија, примењена је ненегативна PCA на Раманове спектре ове две групе ћелија заједно. Резултати су приказани на слици 4.43. Показано је да постоје разлике између два типа ћелија које се базирају на њиховом липидном саставу, а представљене су компонентом PC1 (слика 4.43Б). Ова компонента има изражене маркере незасићености липида и позитиван предзнак за MRC-5 ћелије (слика 4.43А), указујући тиме на виши садржај незасићених липида код контролних MRC-5 ћелија.

PC2 добијена у ненегативној PCA анализи MRC-5 ћелија (слика 4.41В) показује велику сличност са одговарајућом PC2 добијеној у анализи HeLa ћелија. Она описује промене у паду интензитета типичних модела нуклеинских киселина (724 cm⁻¹, 785 cm⁻¹, 1337 cm⁻¹, 1485 cm⁻¹, 1574 cm⁻¹) и протеина (1001 cm⁻¹, 1210 cm⁻¹, 1237 cm⁻¹, 1685 cm⁻¹) код третираних ћелија и обухвата 23,24 % укупне варијансе међу спектрима.

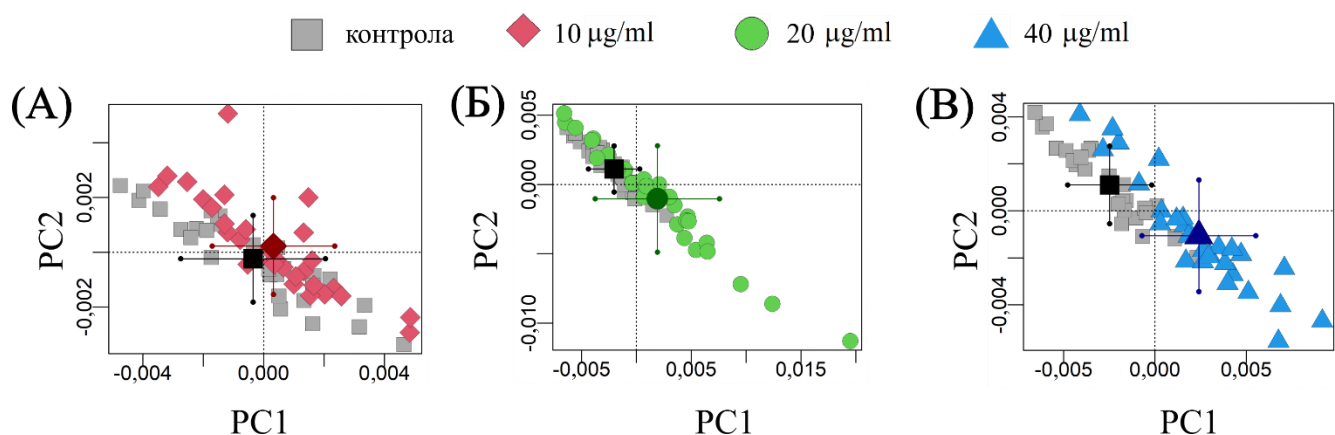
PC3 проистекла из ненегативне PCA анализе MRC-5 ћелија садржи пикове који одговарају Рамановим модовима липида и нуклеинских киселина. Покрива 5,77 % варијансе међу спектрима. С обзиром на негативан предзнак, PC3 указује на опадање садржаја нуклеинских киселина и липида код третираних ћелија. Липиде на чије је опадање овом компонентом указано карактерише висок удео незасићених веза. Произилази да PC1 и PC3 комплементарно указују на већи садржај засићених, односно мањи садржај незасићених липида код MRC-5 ћелија третираним наночестицама ZnO.



Слика 4.43. Ненегативна PCA контролних HeLa и MRC-5 ћелија. (A) графикон скорова PC1:PC2, са средњим вредностима скорова означеним црним (HeLa) и сивим (MRC-5) круговима. (B) PC1 проистекла из анализе.

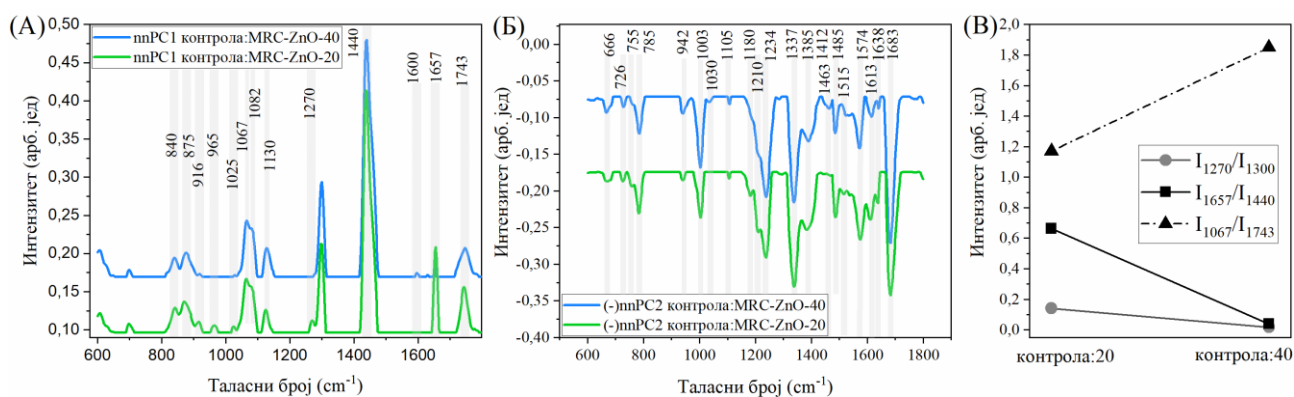
4.5.3.3. PCA „у паровима“ Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO: (600-1800) cm⁻¹

Како би се боље испитале дозно-зависне промене у Рамановим спектрима MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO, примењена је ненегативна PCA на парове група: контрола:MRC-ZnO-10 (слика 4.44A), контрола:MRC-ZnO-20 (слика 4.44Б) и контрола:MRC-ZnO-40 (слика 4.44В). Анализа је примењена на спектрални регион (600-1800) cm⁻¹. Раздвајање између контроле и MRC-ZnO-10 ћелија ни на овај начин није постигнуто (слика 4.44Б). У паровима контрола:MRC-ZnO-20, слика 4.43Б, и контрола:MRC-ZnO-40, слика 4.44В, статистички значајно раздвајање је омогућено на основу PC1 и PC2. Ове две компоненте, добијене из анализа два различита пара, су компаративно окарактерисане (слика 4.45).



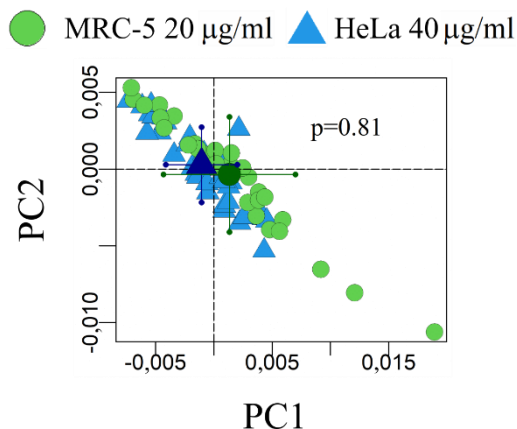
Слика 4.44. Графикони PC1:PC2 скорова добијени у ненегативној PCA парова: (A) контрола:MRC-ZnO-10, (Б) контрола:MRC-ZnO-20, (В) контрола:MRC-ZnO-40. Средње вредности скорова приказане су црним квадратом (контрола), тамноцрвеним ромбом (MRC-ZnO-10), тамнозеленим кругом (MRC-ZnO-20) и тамноплавим троуглом (MRC-ZnO-40), са означеном вредношћу стандардне девијације.

PC1 проистекле из анализе парова контрола:MRC-ZnO-20 и контрола:MRC-ZnO-40 су у оба случаја липидне компоненте, које се међу собом незнатно разликују у релативним интензитетима појединих пикова, као и у присуству неколико пикова у региону $(900-1000) \text{ cm}^{-1}$ (слика 4.45A). Интензитети пикова на 1270 cm^{-1} и 1657 cm^{-1} , као и односи интензитета I_{1270}/I_{1300} и I_{1657}/I_{1440} нижи су код пара контрола:MRC-ZnO-40 него код пара контрола:MRC-ZnO-20 (слике 4.45A и B). Произилази да су липиди чији садржај код MRC-ZnO-40 расте мање незасићени него липиди чији садржај расте код MRC-ZnO-20 ћелија. Однос интензитета I_{1067}/I_{1743} , који позитивно корелише са дужином липидног ланца, виши је у PC1 пара контрола:MRC-ZnO-40 (слике 4.45A и B). Мод на 1744 cm^{-1} је не само мање изражен, него и померен на 1747 cm^{-1} у PC1 пара контрола:MRC-ZnO-40. Коначно, PC1 пара контрола:MRC-ZnO-20 садржи пикове на 916 cm^{-1} и 965 cm^{-1} , који се не јављају у PC1 пара контрола:MRC-ZnO-40.



Слика 4.45. (A) Ненегативне PC1 добијене у анализи парова контрола:MRC-ZnO-20 (зелена линија) и контрола:MRC-ZnO-40 (плава линија), са засенченим најважнијим пиковима. (Б) Ненегативне PC2 добијене у анализи парова контрола:MRC-ZnO-20 (зелена линија) и контрола:MRC-ZnO-40 (плава линија), помножене са предзнаком одговарајућег скор за третиране ћелије, са засенченим најважнијим пиковима. (В) Односи интензитета пикова у PC1 из анализе парова контрола:MRC-ZnO-20 и контрола:MRC-ZnO-40, који указују на незасићеност липида и дужину липидног ланца.

Када се упореде PC1 добијене у анализи парова HeLa и MRC-5 ћелија, очигледна је сличност PC1 из анализе парова контрола:MRC-ZnO-20 и контрола:HeLa-ZnO-40. Због тога је додатно урађена анализа пара HeLa-ZnO-40:MRC-ZnO-20 (слика 4.46), која је показала да се ове две групе ћелија не разликују по PC1 ($p = 0,81$ према непараметарском ANOVA тесту).

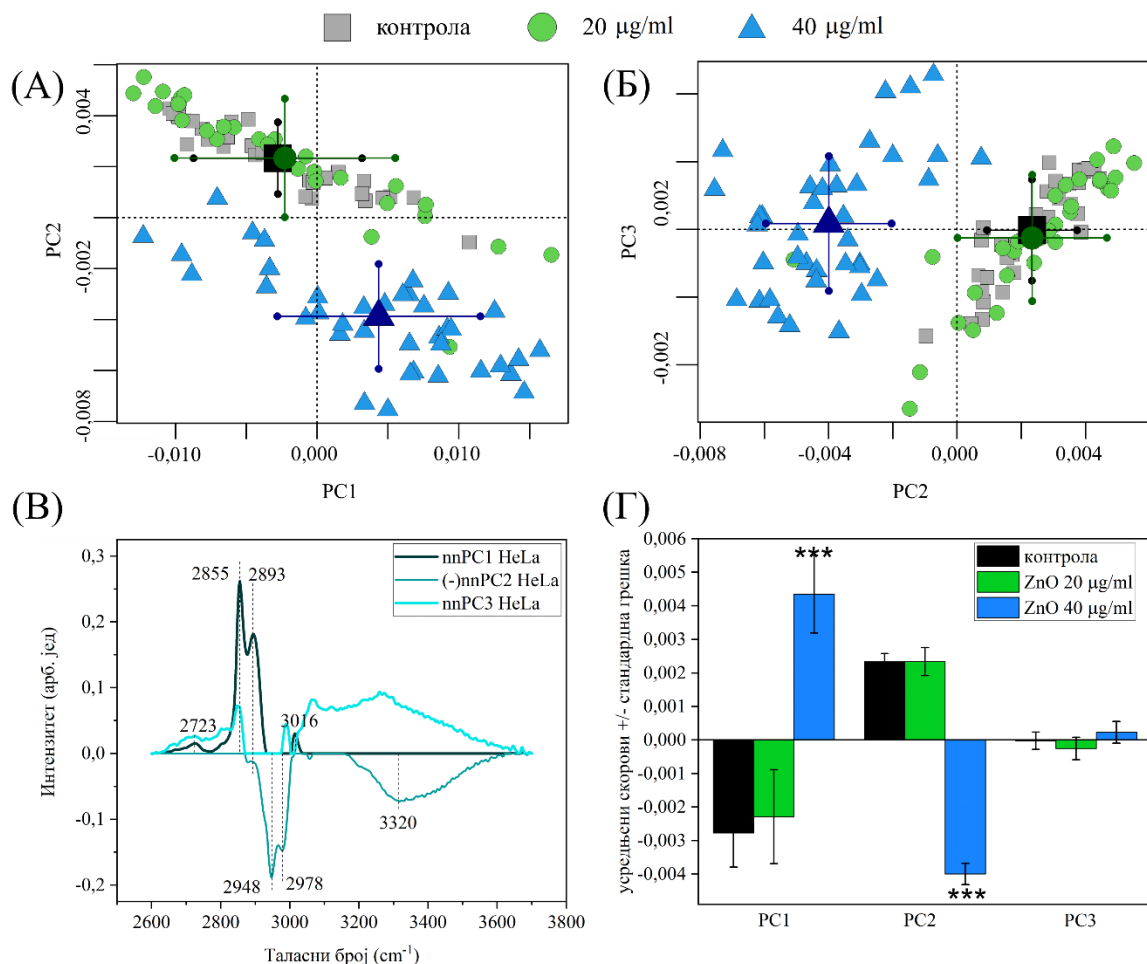


Слика 4.46. Графикони PC1:PC2 скорова добијени у ненегативној PCA пара MRC-ZnO-20:HeLa-ZnO-40, Средње вредности скорова приказане су тамнозеленим кругом (MRC-ZnO-20) и тамноплавим троуглом (HeLa-ZnO-40), са означеном вредношћу стандардне девијације.

PC2 добијене из анализе парова контрола:MRC-ZnO-20 и контрола:MRC-ZnO-40 иако веома сличне, показују извесне разлике у релативном односу интензитета пикова (слика 4.45Б). Пикови повезани са Рамановим модовима протеина (942 cm^{-1} , 1003 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} , 1234 cm^{-1} , 1683 cm^{-1}) су код пара контрола:MRC-ZnO-40 више изражени него пикови повезани са модовима нуклеинских киселина. Супротно, код пара контрола:MRC-ZnO-20, више су изражени модови нуклеинских киселина у односу на модове протеина, посебно на таласним бројевима 1385 cm^{-1} и 1574 cm^{-1} .

4.5.3.4. PCA Раманових спектра HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO: регион ($2600\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$)

PCA региона ($2600\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$) Раманових спектра HeLa ћелија третираних наночестицама ZnO је показала разлике између HeLa-ZnO-40 и контролних ћелија (слика 4.47А и Б). Разлике су описане првом и другом компонентом, при чему је PC1 позитивног предзнака за третиране ћелије и представља 18,36 % укупне варијабилности, док је PC2 негативног предзнака и представља 7,11 % укупне варијабилности међу ћелијским спектрима (слика 4.47Г). У PC1 доминирају пикови који одговарају претежно липидним (2855 cm^{-1} и 2893 cm^{-1}), а у PC2 претежно протеинским Рамановим модовима (2948 cm^{-1} и 2978 cm^{-1}) (слика 4.47В). Произилази да PC1 и PC2 заједно описују повећање липидног и смањење протеинског садржаја, односно повећање односа садржаја липида према садржају протеина у HeLa-ZnO-40. Као и у случају нискофреквентног спектралног региона, ни у овом региону нису уочене промене у HeLa-ZnO-20 ћелијама. PC1 такође садржи пик на 3016 cm^{-1} , који је у литератури означен као маркер незасићености липида у овом спектралном региону.

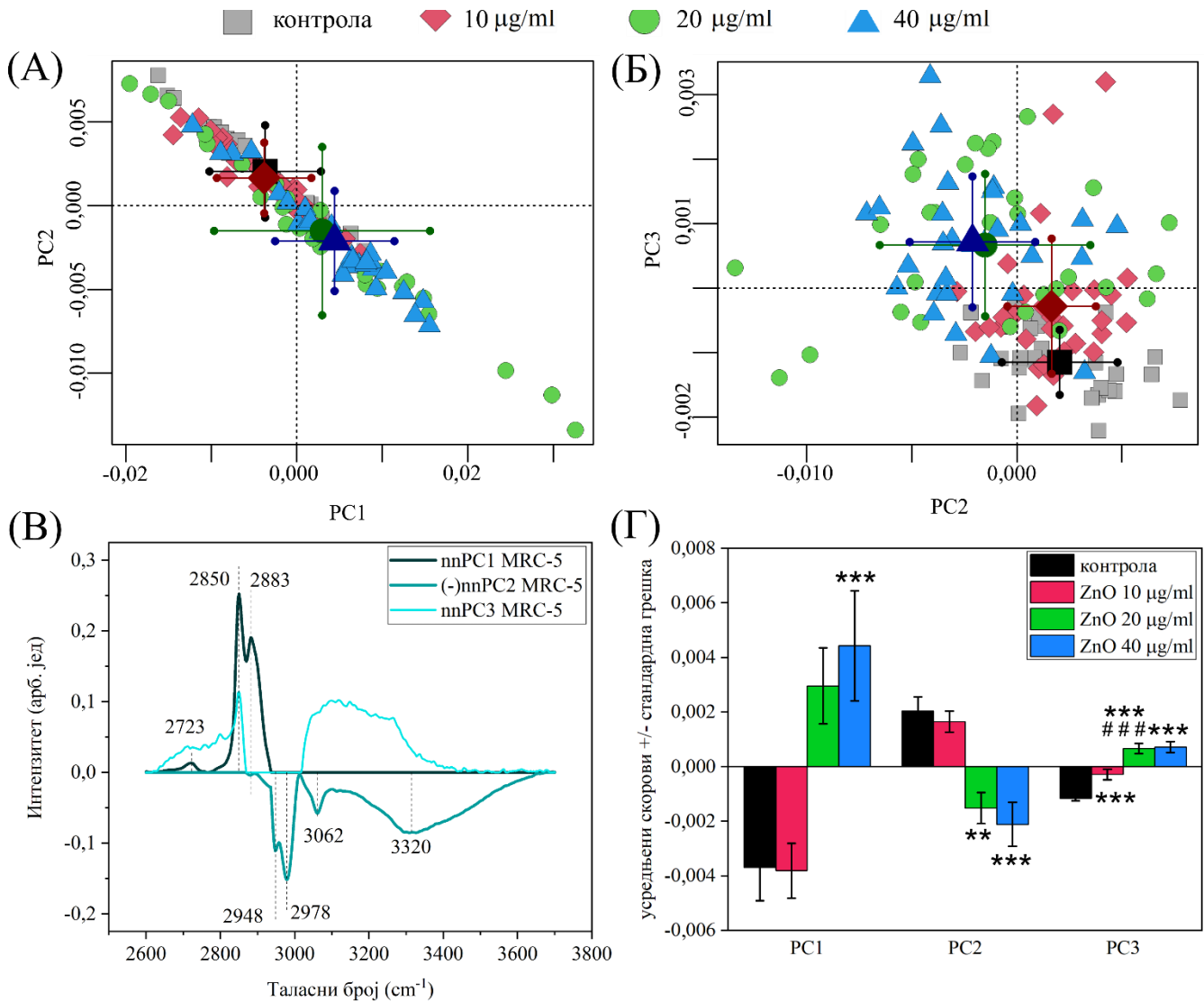


Слика 4.47. Ненегативна PCA интервала (2600-3700) cm^{-1} Раманових спектра HeLa ћелија третираних наночестицама ZnO. На графиконима скорова за (A) PC1 и PC2 и (Б) PC2 и PC3 средње вредности скорова за контролну групу су приказане црним квадратом, за групу HeLa-ZnO-20 тамнозеленим кругом, а за групу HeLa-ZnO-40 ћелија тамноплавим троуглом, на којима су хоризонталним и вертикалним линијама назначене стандардне девијације по X, односно Y оси. (B) Прве три PC, помножене са предзнаком одговарајућег просечног скорa за третиране ћелије, ради лакшег праћења смера промене интензитета. (Г) Просечне вредности скорова за прве три PC, са назначеним стандардним грешкама и статистичком значајношћу разлике у односу на контролу: *** ($p < 0,001$).

PC1 добијена у анализи Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO у региону (2600-3700) cm^{-1} раздваја MRC-ZnO-20 и MRC-ZnO-40 ћелије (слика 4.48A), мада је раздвајање статистички значајно само код MRC-ZnO-40 (слика 4.48Г). Ова компонента садржи доминантно липидне модове (2850 cm^{-1} и 2883 cm^{-1}) и показује пораст одговарајућих Раманових модова у спектрима третираних ћелија (слика 4.48B). Обухвата 78,62 % укупне спектралне варијансе.

PC2 садржи претежно протеинске Раманове модове (2948 cm^{-1} и 2978 cm^{-1} , слика 4.48B) и својим негативним предзнаком показује статистички значајан пад у садржају протеина MRC-ZnO-20 и MRC-ZnO-40, не разликујући ове две групе међусобно (слика 4.48A, Б и Г). PC2 обухвата 14,84 % укупне варијансе за овај регион Рамановог спектра.

PC3 је једина компонента која показује промене у MRC-ZnO-10 ћелијама, поред промена у ћелијама третираним вишим дозама наночестица (слика 4.48Б, Г). Ова компонента показује и статистички значајну разлику између MRC-ZnO-10 и MRC-ZnO-20 ћелија. PC3 садржи претежно липидни Раманов мод на 2850 cm^{-1} и изражен позадински сигнал у региону ($3100\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$) (слика 4.48Б). Описује 2,14 % спектралне варијабилности међу испитиваним ћелијама.



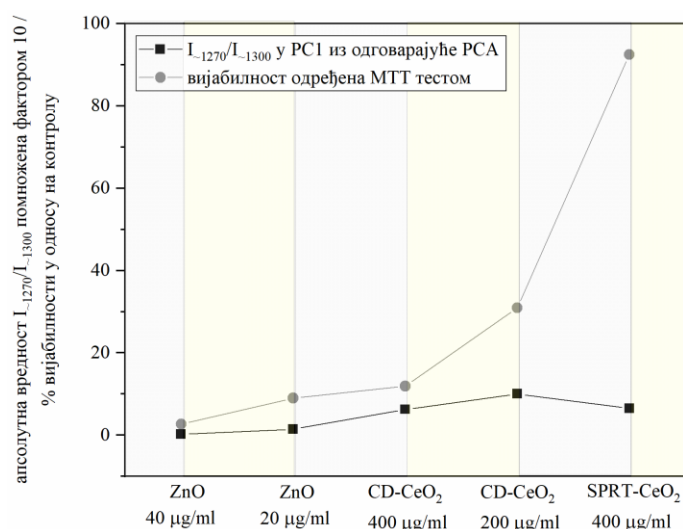
Слика 4.48. Ненегативна PCA интервала ($2600\text{--}3700\text{ cm}^{-1}$) Раманових спектра MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO. На графиконима скорова за (А) PC1 и PC2 и (Б) PC2 и PC3 средње вредности скорова за контролну групу су приказане црним квадратом, за групу MRC-ZnO-10 тамноцрвеним ромбом, за групу MRC-ZnO-20 јаркозеленим кругом, а за групу MRC-ZnO-40 тамноплавим троуглом, на којима су хоризонталним и вертикалним линијама назначене стандардне девијације по X, односно Y оси. (В) Прве три PC, помножене са предзнаком одговарајућег просечног скорa за третиране ћелије, ради лакшег праћења смера промене интензитета. (Г) Просечне вредности скорова за прве три PC, са назначеним стандардним грешкама и статистичком значајношћу разлике: ** $p < 0,01$, у односу на контролу; *** ($p < 0,001$ у односу на контролу), ## ($p < 0,01$ у односу на третман дозом 10 $\mu\text{g/ml}$).

4.5.4. Ефекти различитих типова и доза наночестица на MRC-5 ћелије: моделовање заједничких промена у ћелијским Рамановим спектрима

4.5.4.1. Испитивање корелација вредности параметра I_{1270}/I_{1300} са променама ћелијске вијабилности

Из сваке PCA анализе парова третираних и контролних MRC-5 ћелија израчуната је вредност параметра I_{1270}/I_{1300} у PC1. Апсолутне вредности овог параметра упоређене су међусобно и са одговарајућим вредностима ћелијске вијабилности добијене у МТТ тесту (слика 4.49). Циљ поређења је био испитати да ли је тренд промене односа I_{1270}/I_{1300} у корелацији са трендом промене ћелијске вијабилности. Показало се да вишу вијабилност ћелија прати виша вредност односа I_{1270}/I_{1300} , односно виши степен незасићености, осим у случају MRC-SPRT-400 ћелија, чија је вијабилност екстремно висока. Треба нагласити да је дати параметар упоређен само за дозе на којима је PCA показала да се третиране ћелије статистички значајно разликују од контролних и за које је показан макар минималан али статистички значајан пад вијабилности.

Одређивање вредности параметра I_{1270}/I_{1300} за HeLa ћелије третиране наночестицама CeO_2 није било могуће због слабијег односа сигнал/шум у њиховим Рамановим спектрима, узрокованог кратким временом експозиције. Стога је поређење дато на слици 4.49 урађено само за MRC-5 ћелије. Такође, вредности параметра I_{1270}/I_{1300} код HeLa и MRC-5 ћелија нису међусобно поређене, јер је различитим ћелијским типовима инхерентна разлика у степену засићености ћелијских липида.



Слика 4.49. Вредности I_{1270}/I_{1300} у PC1 компонентама добијеним у PCA парова третираних и контролних MRC-5 ћелија (црна линија). Упоредо су приказане одговарајуће вредности ћелијске вијабилности одређене МТТ тестом (сива линија).

4.5.4.2. PLS-LDA модел за класификовање различито третираних MRC-5 ћелија

Ради испитивања могућности класификације Раманових спектра MRC-5 ћелија на основу различитих третмана наночестицама, односно ефеката које су третмани изазвали, конструисан је PLS-LDA модел. LDA модел је изведен полазећи од пет PLS компоненти. Акцент је стављен на спектралну област која садржи маркере незасићености липида, због чега је анализа рађена на региону (1200-1800) cm^{-1} . Валидација модела је показала високу тачност класификације за све испитиване групе ћелија (Табела 4.2). Највећи број погрешно класификованих ћелија је из групе MRC-ZnO-20, која је по степену оштећења између најоштећенијих и најмање оштећених група ћелија.

Табела 4.2. Валидација PLS-LDA модела за класификовање MRC-5 ћелија третираних наночестицама

Група	Бр. тестираних	Бр. тачно груписаних	Тачност (%)*	Сензитивност (%)**	Специфичност (%)***
MRC-ZnO-10	20	19	93	95	93
MRC-ZnO-20	20	10	84	50	93
MRC-ZnO-40	20	14	89	70	94
MRC-CD-400	20	17	97	85	100
MRC-SPRT-400	21	21	97	100	96

$$\text{*Тачност} = \frac{\text{ИП} + \text{ИН}}{\text{укупан бр. тестираних из свих група}} * 100$$

$$\text{**Сензитивност} = \frac{\text{ИП}}{\text{укупан бр. тестираних из дате групе}} * 100$$

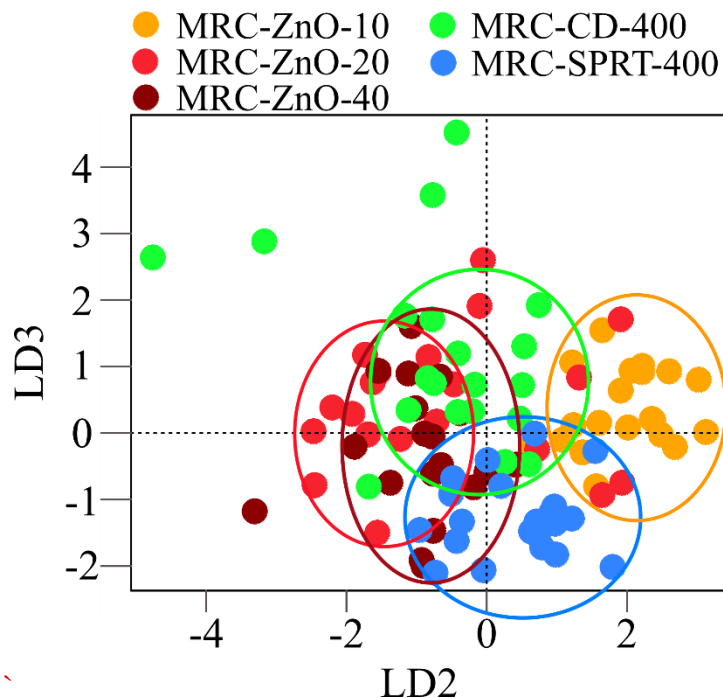
$$\text{***Специфичност} = \frac{\text{ИН}}{\text{укупан бр. тестираних из осталих група}} * 100, \text{ при чему су:}$$

ИП - истински позитивни: број тачно класификованих у датој групи;

ИН - истински негативни: број тачно класификованих да нису у датој групи, чак и ако су погрешно класификовани што се њихове групе тиче.

Прва LDA компонента овог модела показује разлике између ћелија третираних наночестицама CeO_2 и ћелија третираних наночестицама ZnO . Детектоване разлике нису последица реалних ефеката наночестица, већ неспецифичних разлика између различитих сетова мерења. Наредне две компоненте садрже информације које се могу сматрати реално повезаним са ефектима наночестица. График LD2:LD3 скорова на слици 4.50 показује успешно раздвајање најмање оштећених (MRC-ZnO-10 и MRC-SPRT-400) од веома оштећених ћелија (MRC-ZnO-40 и MRC-CD-400), док умерено оштећене ћелије имају најширу дисперзију – неке од њих су

груписане са оштећенијим, неке са мање оштећеним ћелијама. Управо ове две компоненте и садрже маркере незасићености липида.



Слика 4.50. Тестирање PLS-LDA модела за класификацију различито третираних MRC-5 ћелија: пројекције тестираних ћелија на LD2 и LD3. Елипсом је визуелизована област са минимално 80 % објеката.

4.5.5. Каталогизација ћелијских Раманових модова чији се интензитет након третмана наночестицама мења

На основу резултата анализе Раманових спектра ћелија и података из литературе, направљена је табела која садржи таласне бројеве и ознаке Раманових модова чији се интензитет мења код ћелија третираних наночестицама (Табела 4.3). У првој колони табеле дате су тачне позиције модова или ужи региони у којима је дати мод регистрован у различитим усредњеним Рамановим спектрима или главним компонентама PCA анализе спектра. У другој колони је на основу података из литературе дата хемијска веза и/или молекула са чијим се вибрацијама дати модови могу повезати. У трећој колони табеле је назначено код које ћелијске линије и код ког типа третмана је промена датог мода забележена, при чему су HeLa и MRC-5 ћелије третиране наночестицама CeO_2 означене као HeLa- CeO_2 , односно MRC- CeO_2 , а ћелије третиране наночестицама ZnO као HeLa-ZnO, односно MRC-ZnO. У случајевима када се промена одређеног мода јавила искључиво код ћелија третираних наночестицама CD- CeO_2 а не и SPRT- CeO_2 , или обрнуто, у скраћеници је наглашена и врста наночестица CeO_2 која је изазвала промену (MRC-CD- CeO_2 , MRC-SPRT- CeO_2). Модови уз које нема ознака одговарајућег третмана су регистровани у Рамановим ћелијским спектрима али њихова промена није утврђена, те се наводи само њихово претпостављено порекло.

Табела 4.3. Раманови модови HeLa и MRC-5 ћелија третираних наночестицама CeO₂ и ZnO и њихово претпостављено порекло (асигнација)

Таласни број (cm ⁻¹)	Могуће порекло вибрације	Група ћелија у чијим се спектрима јавља
666	Гуанин, тимин (прстен) [160]	MRC-ZnO
674-677	Гуанин (прстен) [276]	
722-733	Аденин, нуклеинске киселине [276, 277]	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
746	Тимин (прстен), цитохром Ц [160, 278]	
751	Трп, ДНК [160, 279]	
756	Трп [160]	HeLa-CeO ₂ , MRC-ZnO
785-787	Урацил, тимин, цитозин; PO ₂ ⁻ нуклеинских киселина [160, 280]	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
813	РНК (фосфодиестарске везе) [277, 280]	MRC-CeO ₂
840-844	(Поли)сахариди, фосфатидилсерин, гликоген [160, 196]	MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
850	Тур, Pro, Val [281, 282]	
860	Тур, фосфатидинска киселина [160, 283]	HeLa-CeO ₂
872-875	Pro, Val, Трп, (поли)сахариди, фосфатидилсерин [160, 196, 284]	MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
880	протеини [159]	MRC-SPRT-CeO ₂
916-921	Глукоза, рибоза, Pro, гликоген [160]	MRC-SPRT-CeO ₂ , MRC-ZnO
938-942	С-С истезање у протеинима [285]	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
965-968	Липиди, цитохром Ц [278, 286]	MRC-CeO ₂ , MRC-ZnO
973-975	Протеини, рибоза [160]	HeLa-ZnO
1001-1003	Phe [287]	HeLa-CeO ₂ , MRC-SPRT-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1025	Гликоген, угљени хидрати [279]	MRC-ZnO
1030-1033	Phe [288]	HeLa-CeO ₂ , MRC-SPRT-CeO ₂ , MRC-ZnO
1046	PO ₄ ³⁻ [289]	HeLa-ZnO
1065-1067	С-С липида, масне киселине [276, 283]	MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1078-1082	Фосфолипиди, фосфатидилсерин [160, 290]	MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1092-1095	PO ₂ ⁻ (DNA), Phe [277, 280, 291]	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂

1100-1112	Нуклеинске киселине, Phe, угљени хидрати [160]	MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1125-1135	C-N протеина, C-C липида, C-O угљених хидрата, гликоген, цитохром Ц [278, 284, 287, 292]	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1150-1155	Гликоген, протеини, каротеноиди [160]	HeLa-CeO ₂
1163	Тур [288]	HeLa-ZnO
1167-1170	Тур, липиди [286, 288]	MRC-SPRT-CeO ₂
1180	Цитозин, гуанин, аденин, цитохром Ц [160, 278]	MRC-CD-CeO ₂ , MRC-ZnO
1210-1213	Phe, Trp, Тур, нуклеотиди [160, 281]	HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1226-1236	Амид III, PO ₂ ⁻ нуклеинских киселина [281, 292]	MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1246	Амид III, цитозин, гуанин (NH ₂) [160]	
1250-1264	Амид III, липиди, нуклеинске киселине [281, 286, 291]	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂
1267-1270	Типични фосфолипиди, C=C липида [286]	MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1277-1280	Амид III (α), нуклеинске киселине, фосфати [160]	HeLa-CeO ₂
1300-1310	Масне киселине, фосфолипиди, триглицериди, цитохром Ц [160, 278]	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1314	Липиди, протеини, цитохром Ц [160, 278]	MRC-SPRT-CeO ₂
1320	Гуанин, протеини [285]	HeLa-CeO ₂
1337	ДНК, СН протеина и липида, гликоген [287]	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1360	Аминокиселине, гуанин [160]	HeLa-ZnO
1372-1377	CH ₃ , нуклеинске киселине [291]	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO
1385	Нуклеинске киселине, CH ₃ [283, 293]	MRC-ZnO
1402-1405	CH ₃ протеина, Arg, His [294]	HeLa-CeO ₂ , MRC-SPRT- CeO ₂ , HeLa-ZnO
1412	COO ⁻ [160]	MRC-ZnO
1422	Нуклеинске киселине, дезоксирибоза [291]	HeLa-CeO ₂
1430-1433	CH ₂ , CH ₃ липида [295]	MRC-SPRT-CeO ₂
1440	Деформације CH ₂ у протеинима и липидима [276]]	MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1444	Протеини, липиди [160, 286]	
1448	CH/CH ₂ /CH ₃ протеина и липида [159, 283, 285]	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂
1460-1463	Липиди, протеини [160]	MRC-SPRT-CeO ₂ ,

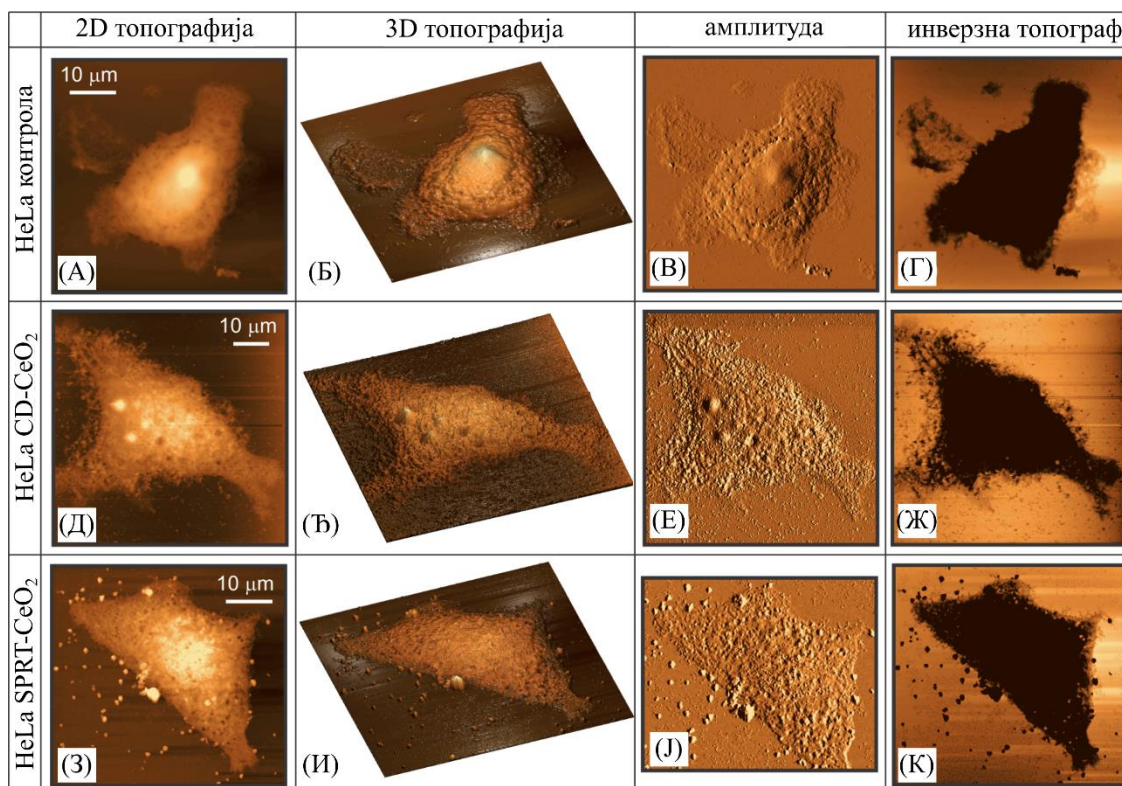
		HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1485-1488	Гуанин, аденин [276]	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1495	CN, CH [160]	MRC-SPRT-CeO ₂
1507-1515	Аденин, цитозин, каротеноиди [160]	HeLa-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1548-1555	Трп [294]	HeLa-CeO ₂ , HeLa-ZnO
1574	Нуклеинске киселине, протеини [296]	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1580-1587	Нуклеинске киселине, цитохром Ц [278, 287]	MRC-SPRT-CeO ₂
1598-1600	C=C у липидима, Phe, Тур, нуклеинске киселине [160, 297, 298]	HeLa-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1610	Цитозин [291]	MRC-SPRT-CeO ₂
1613	Тур, Трп [280]	MRC-ZnO
1630	амид I, C=C у липидима [160, 281, 297]	HeLa-CeO ₂ , MRC-SPRT-CeO ₂
1638	Амид I (α и β) [160]	MRC-ZnO
1653-1657	Амид I (α), C=C липида, ДНК [281, 296, 299] Li 2015]	MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1661	Амид I (β) [281]	
1670	Амид I (β , полипролин II) [281]	HeLa-CeO ₂
1678-1680	Амид I (неуређена структура) [160]	HeLa-ZnO
1682-1690	Амид I (неуређена структура, полипролин II), C=O [160, 281]	MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1726-1747	C=O, липиди, фосфолипиди [159, 160, 296]3	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
1762	C=O, фосфолипиди [159, 300]	
2842	Липиди [286]	MRC-CeO ₂
2850-2855	Симетрично истецање =CH ₂ у липидима [292]	MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
2875-2893	Асиметрично истецање CH ₂ у липидима и протеинима [160, 292]	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
2924-2933	Асиметрично истецање CH ₂ , симетрично истецање CH ₃ претежно у протеинима [301]	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂ , HeLa-ZnO
2939	CH у липидима и протеинима [160]	MRC-CeO ₂
2948-2950	CH протеина и липида, CH ₂ липида, асиметрично истецање =CH ₃ липида [160, 292]	MRC-CD-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO

2970-2972	Асиметрично истезање CH_3 [160]	HeLa-CeO ₂
2978-2980	Протеини [302]	MRC-CD-CeO ₂ , HeLa-ZnO, MRC-ZnO
3002-3016	СН липида, =СН [160, 286]	HeLa-ZnO
3060-3062	С=СН, протеини [302, 303]	HeLa-CeO ₂ , MRC-CeO ₂ , MRC-ZnO
3320	ОН [160]	HeLa-ZnO, MRC-ZnO

4.6. Микроскопија на бази атомских сила

4.6.1. AFM осликавање HeLa ћелија третираних наночестицама CeO₂

Морфолошка својства HeLa-CD-400 и HeLa-SPRT-400 ћелија, као и контролних (нетретираних) ћелија испитивана су AFM осликавањем. На слици 4.50 приказане су 2D (прва колона слева) и 3D топографије (друга колона), као и слике амплитуде осцилација AFM гредице (трећа колона). У четвртој колони су дате топографске слике са инвертованим контрастом. У првом реду су приказане контролне ћелије, а у наредна два ћелије третиране наночестицама.

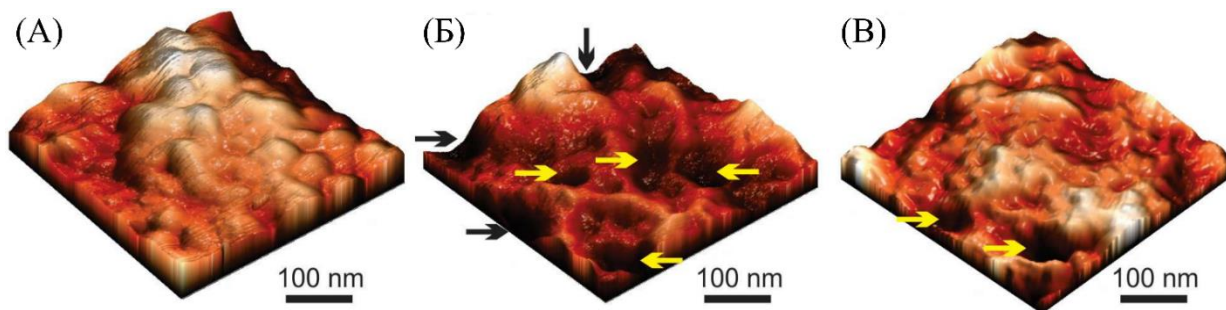


Слика 4.50. AFM слике HeLa ћелија: контролне ћелије (први ред), ћелије третиране наночестицама CD-CeO₂ (други ред) и ћелије третиране наночестицама SPRT-CeO₂ (трећи ред). Прва и друга колона слева приказују 2D (А, Д, З), односно 3D (Б, Ђ, И) топографске слике ћелија. Трећа колона приказује ћелије осликане на основу амплитуде осцилације AFM гредице (В, Е, Ј). У четвртој

колони су топографске слике ћелија са инвертованим контрастом (Г, Ж, К). Скале висине ћелија: (А) 1000 nm, (Д) и (З) 700 nm.

На топографским сликама контролних ћелија (слике 4.50А и Б) може се уочити да је њихова површина глатка, једро и једарце компактни и изражени, а ћелијске контуре и ламелиподије јасно дефинисане. На топографијама ћелија третираним наночестицама CD-CeO₂ изглед ћелије је промењен: једро више није јасно дефинисано, једараца су фрагментисана, а површина ћелије је храпава, са бројним улегнућима у ћелијској мембрани (слика 4.50Д и Ђ). Коначно, ћелије третиране наночестицама SPRT-CeO₂ су прекривене крупним кластерима наночестица, испод којих су видљива улегнућа већих димензија, док се једро и једарца уопште не уочавају (слика 4.50 З и И).

Улегнућа мембране третираних ћелија јасније су видљива на слици 4.51. На њој су приказане 3D AFM топографије високе резолуције добијене снимањем малих области (500×500 nm²) на површини ћелије. На слици 4.51А може се видети глатка површина и грануларна структура мембране контролних ћелија, коју формирају бројна испупчења. Сlike 4.51Б и В показују да на мембрани ћелија третираних наночестицама CD-CeO₂ и SPRT-CeO₂ нестају испупчења, уместо којих се формирају удубљења (депресије) дијаметра 50-100 nm.

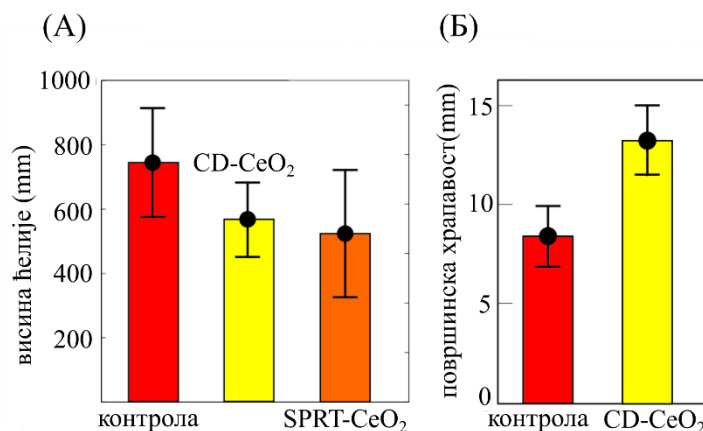


Слика 4.51. 3D топографске AFM слике високе резолуције (А) контролних HeLa ћелија, (Б) HeLa ћелија третираних наночестицама CD-CeO₂ и (В) ћелија третираних наночестицама SPRT-CeO₂. Скале висина су 20 nm (А), 16 nm (Б) и 15 nm (В). Локалне депресије (улегнућа у ћелијској мембрани) означене су стрелицама.

Сlike добијене на основу амплитуде осилација AFM гредице приказане на слици 4.50. у трећој колони потврђују структурну униформност површине контролних ћелија, нарочито у области једра, насупротив набраној површини третираних ћелија. На овим сликама се такође уочавају дефинисане ламелиподије код контролних ћелија. Како би се јасније приказале ламелиподије и „ивице“ ћелија, 3D топографије су инверзно контрастиране и као такве приказане у четвртој колони слева на слици 4.50. На слици 4.50Г може се уочити мрежа мембранских четкастих израштаја (енгл. *cell brushes*) код контролних ћелија, која код ћелија третираних наночестицама CD-CeO₂ почиње да се фрагментира (слика 4.50Ж). Четкасти израштаји се више не могу уочити на сликама ћелија третираних наночестицама SPRT-CeO₂ (слика 4.50К). Уместо тога, у околини ових ћелија уочљиви су бројни агломерати наночестица.

У циљу квантификације површинске храпавости ћелија, мерена је висина ћелије и израчунато средње квадратно одступање висине, које је узето за меру храпавости ћелије. На слици 4.52Б графички је представљен израчунат пораст храпавости ћелија третираних наночестицама CD-CeO₂ (13 nm) у односу на контролу (8 nm). Пошто су ћелије третиране наночестицама SPRT-CeO₂ прекривене крупним агломератима наночестица, у њиховом случају одређивање висине, па

тима и површинске хртавости, на овај начин не би било адекватно. У том случају измерена је само висина на највишој тачки ћелијског једра и упоређена са контролом и ћелијама третираним наночестица CD-CeO₂. На слици 4.52А може се видети да висина ћелије на тај начин измерена статистички значајно опада након третмана обема врстама наночестица, у односу на контролу (једнофакторски ANOVA тест).

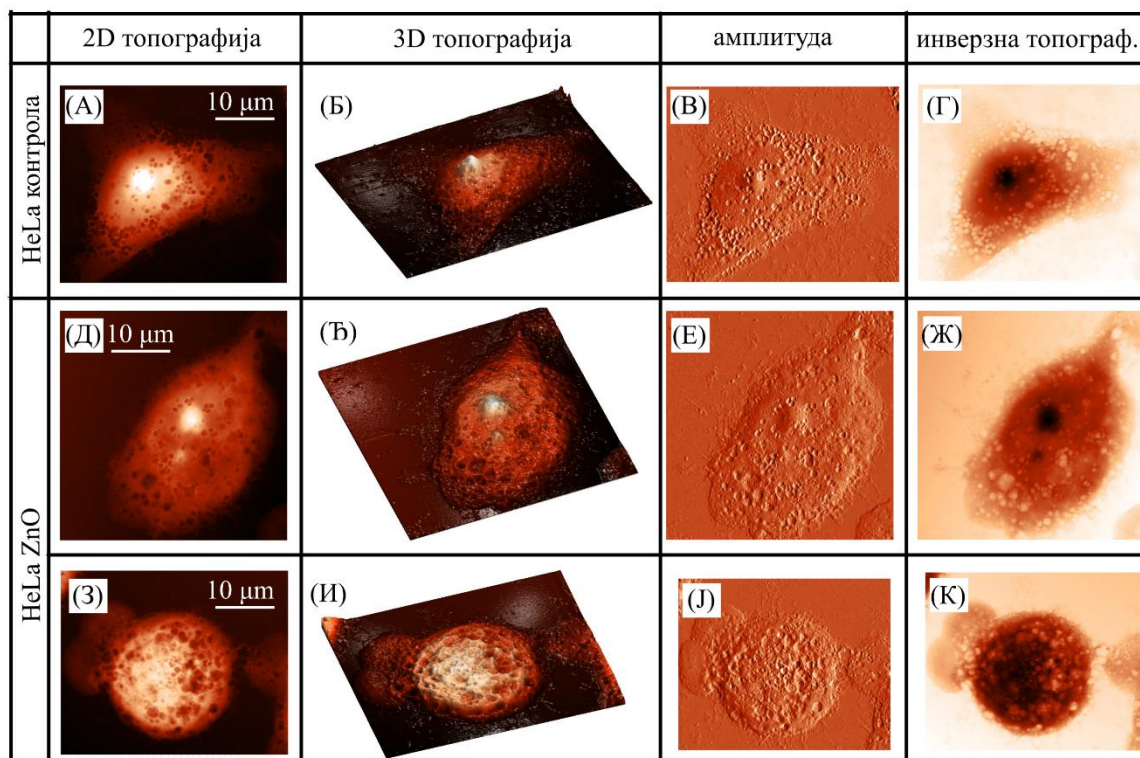


Слика 4.52. Морфолошке промене HeLa ћелија узроковане третманом наночестицама CeO₂, анализирание AFM-ом: (А) висина ћелије, (Б) површинска хртавост.

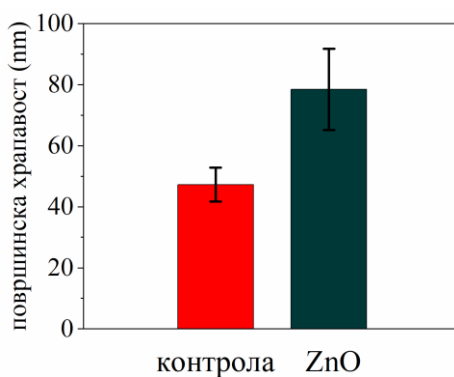
4.6.2. AFM осликовање HeLa ћелија третираних наночестицама ZnO

AFM слике HeLa ћелија снимљене пре и након третмана наночестицама ZnO у дози од 40 µg/ml приказане су на слици 4.53. Облик ћелије и морфолошке карактеристике унутар групе третираних ћелија варирају. Једна суб-популација ћелија је овалног облика и добро израженог једра и једарцета, а тиме и веће сличности са контролним ћелијама (слика 4.53Д-Ж). Ипак, облик ћелије одступа од вретеног који доминира код контроле, површина је неравнија и границе једра су слабије дефинисане. Границе читаве ћелије су такође неравније, што се посебно може видети на сликама добијеним преко амплитуде осцилације гредице (слика 4.53В и 4.53Е). Просечна висина третиране ћелије је већа, и то не само на једру, него и на осталом делу ћелије. Другу ћелијску суб-популацију представљају заокружљене ћелије, мањег дијаметра и висине него издужене, са делимично деградираним једарним садржајем и без уочљивог једарцета (слика 4.53 З-К). Уз ћелијску мембрану се уочавају структуре мањих димензија од ћелије, које подсећају на крупнија апоптотска тела такође у процесу деградације.

Међутим, проблем у овом сету AFM експеримената је што се и код контролних и код третираних ћелија уочавају бројна удубљења на површини ћелија, која су вероватно последица утицаја фиксатива на ћелијску мембрану или неадекватне фиксације. Упркос томе, када се квантификује просечна површинска хртавост контролних и третираних ћелија (без обзира на морфологију), видимо да она код третираних ћелија значајно расте (слика 4.54).



Слика 4.53. AFM слике HeLa ћелија пре и након третмана наночестицама ZnO: контролне ћелије (први ред) и две различите морфологије третираних ћелија (издужене у другом реду, заокружене у трећем реду). Прва и друга колона слева приказују 2D (А, Д, З), односно 3D (Б, Ђ, И) топографске слике ћелија. Трећа колона приказује ћелије осликане на основу амплитуде осцилације AFM гредице (В, Е, Ј), док су у четвртој топографске слике ћелија са инвертованим контрастом (Г, Ж, К). Скале висине ћелија: (А) 1200 nm, (Д) 1600 nm и (З) 1200 nm.



Слика 4.54. Површинска хрпаваост HeLa ћелија пре и након третмана наночестицама ZnO, анализирана AFM-ом.

5. Дискусија

Метал-оксидне наночестице, у које спадају наночестице CeO_2 и ZnO , улазе у састав производа које савремени човек већ деценијама сусреће у свакодневном животу. Могућности њихове примене су неупоредиво веће од до сада искоришћених и интензивно се проучавају у бројним студијама. Важан аспект тих студија је испитивање потенцијалних ефеката различитих метал-оксидних наночестица на ћелије човека.

У овој студији испитиван је утицај две врсте наночестица CeO_2 (необложених и декстраном обложених) и наночестица ZnO на раст и вијабилност третираних HeLa и MRC-5 ћелија коришћењем стандардних биолошких метода, као и потенцијал вибрационе Раманове спектроскопије и AFM микроскопије у регистровању биохемијских и морфолошких промена насталих код третираних HeLa и MRC-5 ћелија.

Ради процене ефеката наночестица на ћелије рађени су стандардни биолошки тестови. Циљ ових експеримената је био двострук: најпре, да се одреде дозе наночестица које утичу на ћелијску вијабилност, како би се њиховим коришћењем у даљем раду индуковане промене могле пратити Рамановом спектроскопијом и AFM микроскопијом, а потом, да се стекне што бољи увид у ефекте и механизме којима наночестице делују на ћелије, како би се резултати добијени Рамановом спектроскопијом и AFM-ом могли боље корелисати са биолошким променама у ћелијама.

SRB тест је изведен на HeLa ћелијама третираним CeO_2 (HeLa-SPRT и HeLa-CD), након ког је доза од $400 \mu\text{g/ml}$ и време инкубације од 48 сати изабрано за коришћење у Рамановој спектроскопији и AFM-у. Резултати овог теста нису показали постојање статистички значајно смањење ћелијског раста код ћелија третираних наночестицама SPRT- CeO_2 . Тест је ипак наговештавао да постоји опадајући тренд ћелијског раста и код третмана овим наночестицама, који због високе вредности стандардне девијације у односу на број узорака није статистички значајан. Због тога је највиша доза тестирана у овом тесту изабрана за примену, као доза која доводи (код CD- CeO_2), односно потенијално доводи (код SPRT- CeO_2), до смањења раста HeLa ћелија и уједно омогућава поређење ефекта исте дозе декстраном обложених и „чистих“ наночестица CeO_2 .

Оптимизација доза наночестица CeO_2 за третирање MRC-5 је такође извршена помоћу SRB теста. Тест је показао да је доза од $200 \mu\text{g/ml}$ CD- CeO_2 довољна да доведе до значајног смањења раста MRC-5 ћелија у односу на контролу. Код ћелија третираних наночестицама SPRT- CeO_2 ни доза од $600 \mu\text{g/ml}$ није довела до смањења ћелијског раста. Уместо тога, све примењене дозе изазвале су благу, али статистички непотврђену стимулацију ћелијског раста. За коришћење у експериментима Раманове спектроскопије изабране су дозе од $200 \mu\text{g/ml}$ и $400 \mu\text{g/ml}$ CD- CeO_2 , да би се испитале дозно-зависне спектралне разлике међу ћелијама. У случају SPRT- CeO_2 задржана је доза од $400 \mu\text{g/ml}$, како би се могли упоредити ефекти исте дозе CD- CeO_2 и SPRT- CeO_2 на HeLa и MRC-5 ћелије, односно на њихове Раманове спектре, и предложена доза од $800 \mu\text{g/ml}$, виша од највише дозе примењене у SRB тесту.

Експерименти који су имали за циљ да се ефекти наночестица на ћелије боље проуче рађени су уз помоћ конвенционалних биолошких метода. Први од њих био је МТТ тест, који је

урађен на HeLa и MRC-5 ћелијама третираним наночестицама CD-CeO₂ и SPRT-CeO₂. Резултати овог теста показали су да 100 µg/ml CD-CeO₂ доводи до благе али статистички значајне стимулације метаболичке активности оба типа ћелија, док даље повећање доза доводи до драстичног опадања метаболичке активности. У литератури постоје подаци да ниже дозе наночестице CeO₂ стимулишу пролиферацију и диференцијацију примарних остеобласта и фибробласта миша, док повећање дозе истог типа наночестица CeO₂ мање стимулише и коначно инхибира пролиферацију и диференцијацију ћелија [68, 304]. Стимулација пролиферације се објашњава директним антиоксидативним својствима CeO₂, али и активацијом сигналних протеина и транскрипционих фактора који регулишу пролиферацију и експресију антиоксидативних ензима, што заједно смањује оксидативни стрес и повећава метаболичку активност ћелије [305]. На високим дозама наночестица CeO₂, како објашњавају Роров и сарадници, због веома високе антиоксидативне активности, концентрација ROS у ћелијама пада испод физиолошког нивоа који је неопходан за функционисање ћелијског метаболизма [304].

Овде треба напоменути да је у SRB тестирању урађеном на самом почетку експеримената у циљу оптимизације доза, раст HeLa ћелија након 24 сата третмана наночестицама SPRT-CeO₂ био значајно повећан у односу на контролу, да би у наредна 24 сата знатно опао, а након 72 сата инкубације пао испод нивоа раста контроле. Дакле, и у овом случају је регистрован ефекат стимулације пролиферације, али не на ниским дозама, као код CD-CeO₂, него при краћем времену инкубације. Могло би се претпоставити да после дуже инкубације, односно више дозе, убрзана пролиферација покреће апоптозу [306], или супротно, да је убрзавање пролиферације ћелија индуковано апоптозом њима суседних ћелија [307, 308], као и да се ради о померању равнотеже између различитих механизма дејства наночестица. За проверу наведених претпоставки неопходна су додатна испитивања.

Ефекат наночестица SPRT-CeO₂ на HeLa и MRC-5 ћелије региструје се МТТ тестом тек на дози од 800 µg/ml за HeLa, односно 400 µg/ml за MRC-5, и испољава као смањење метаболичке активности ћелија на нешто више од 80 % у односу на контролу. Код крупних агрегата и агломерата смањен је однос површине и запремине, а тиме и реактивност у односу на неагрегиране наночестице [35]. Ова у литератури описана појава може објаснити изостанак ефекта SPRT-CeO₂ наночестица. Ипак, при високим дозама регистрован је негативан утицај на ћелијски метаболизам. Не може се са сигурношћу одговорити на питање да ли он потиче од незнатног броја наночестица које и поред агломерације остају мањих димензија, или је последица неког другачијег ефекта који крупни агломерати остварују. Коначно, резултати МТТ теста су показали да је избор доза од 400 µg/ml и 800 µg/ml SPRT-CeO₂ за третман MRC-5 ћелија у експериментима Раманове спектроскопије оправдан, иако SRB тестом нису доказани њихови ефекти.

Извесне разлике у резултатима SRB и МТТ теста су приметне. Код MRC-5 ћелија, резултати ова два теста показују исти тренд промена, с тим што МТТ региструје промене и у случајевима у којима их SRB тест не региструје. То је случај код ћелија MRC-CD-100, код којих МТТ тест показује пораст метаболичке активности у односу на контролу, и код ћелија MRC-SPRT-400 и MRC-SPRT-800, код којих МТТ тест показује пад метаболичке активности у односу на контролу. Пошто ова два теста не мере исте параметре у ћелијској култури, није зачуђујуће да показују на овај начин различите резултате, тј. да се промене у метаболичкој активности ћелија могу регистровати пре него што се испољи њихов ефекат на ћелијски раст. Код резултата тестова за HeLa ћелије ситуација је унеколико сложенија: МТТ тест на дози од 100 µg/ml CD-CeO₂

показује значајан пораст метаболичке активности, док SRB тест показује статистички значајан пад метаболичке активности третираних HeLa ћелија. Гледано са становишта да је стимулативни односно инхибиторни потенцијал наночестица CeO₂ одређен равнотежом између нивоа ROS и концентрације CeO₂ у ћелији [304], као и антиоксидативне и прооксидативне активности наночестица CeO₂ [4], вероватно је да постоје прелазне концентрације на којима се различити ефекти сусрећу. Могло би се претпоставити да у пресеку различитих ефеката може настати ситуација у којој унеколико смањен број ћелија у култури показује повећану метаболичку активност. Раније студије су такође показале нескладе у процени ефекта наночестица CeO₂ изведене коришћењем различитих метода [309]. Коначно, МТТ тест показује да су MRC-5 ћелије нешто осетљивије на обе врсте наночестица CeO₂ него HeLa ћелије, док резултати SRB теста указују на супротно. Разлике у интеракцији наночестица са различитим типовима ћелија, које су такође у литератури много пута описане, могу на различит начин утицати на сигналне путеве у ћелијама и активирати различит след догађаја који ће се детектовати примењеним тестовима. Крајњи исход који показују оба теста на вишим концентрацијама наночестица, које су и одабране за коришћење у даљим експериментима, је исти: велики и дозно-зависан пораст цитотоксичности наночестица на обе врсте ћелија.

Ради бољег упознавања ефеката наночестица на ћелије и евентуалног повезивања биохемијских промена које су детектоване у Рамановим експериментима са биохемијским карактеристикама модалитета ћелијске смрти, ћелије третиране наночестицама CD-CeO₂ и SPRT-CeO₂ су бојене аннексин-V-FITC-ом и PI, а обојеност ћелија анализирана под флуоресцентним конфокалним микроскопом. У овом експерименту анализирани су ћелије третиране дозама од 200 µg/ml и 400 µg/ml CD-CeO₂ и дозама од 400 µg/ml и 800 µg/ml SPRT-CeO₂.

На нижој дози наночестица CD-CeO₂, код малог броја ћелија и једног и другог типа, регистрована је ћелијска смрт, али се у случају MRC-5 ради о раној, а у случају HeLa ћелија о касној апоптози/некрози. На вишој дози наночестица CD-CeO₂, регистрована је касна апоптоза/некроза код оба типа ћелија, али у знатно већој мери код MRC-5 него код HeLa ћелија. Ови експерименти, као и SRB тест, указују да су у смислу индукције апоптозе HeLa ћелије нешто осетљивије на CD-CeO₂ него MRC-5 ћелије. За бољи увид у ефекте наночестица на индукцију апоптозе, а с обзиром да се до тренутка бојења један део већ мртвих ћелија одлепио са подлоге, било би упутно овај експеримент извести и након краћих интервала инкубације ћелија са наночестицама (24 или 36 сати). Међутим, с обзиром да су у експериментима Раманове спектроскопије коришћене искључиво ћелије које су након 48 сати од третмана остале залепљене за подлогу, резултати које смо добили били су довољни за корелисање са спектралним подацима.

У случају третмана наночестицама SPRT-CeO₂ у дози од 400 µg/ml, флуоресцентном конфокалном микроскопијом је регистрован веома мали број HeLa и MRC-5 ћелија (око 2 %) у касној апоптози или некрози, али је промена ипак статистички значајна у односу на контролу, у којој се обојене ћелије уопште не уочавају. Третман дозом од 800 µg/ml наночестица SPRT-CeO₂ доводи такође до појаве касне апоптозе или некрозе код малог броја ћелија, који ни код HeLa ни код MRC-5 ћелија није статистички значајно већи него у случају дозе од 400 µg/ml.

Оптимизација доза ZnO наночестица за коришћење у експериментима Раманове спектроскопије и AFM извршена је помоћу SRB теста. Затим су ефекти наночестица ZnO на HeLa и MRC-5 ћелије испитивани МТТ и NRU тестом.

Сви примењени биолошки тестови, SRB, MTT и NRU, у процени ефеката наночестица ZnO дали су резултате који прате исте трендове промена: сва три показују дозно-зависно смањење ћелијске вијабилности оба типа ћелија и сва три недвосмислено указују на већу осетљивост MRC-5 ћелија. Ово запажање се може довести у везу са претпостављеним мање комплексним механизмом деловања наночестица ZnO и њиховом високом цитотоксичношћу, што је и био разлог за избор ZnO за третман ћелија у овој студији. Наиме, пошто су литературни подаци за цитотоксичност наночестица CeO₂ различити и често опречни, ради бољег тумачења спектроскопских података и евентуалног изграђивања општег модела за процену ефеката различитих типова наночестица на ћелије, у студију је било потребно укључити још један тип наночестица чија је висока цитотоксичност несумњиво потврђена. Такође, заједничко за MTT и NRU, а делимично и SRB тест, је да на одређеним концентрацијама ZnO ћелијска вијабилност нагло опада.

MTT тест се показао најосетљивијим на промене изазване наночестицама ZnO, јер је, за разлику од друга два теста, регистровао пад метаболичке активности третираних HeLa и MRC-5 ћелија на свим тестираним дозама ZnO. Ови резултати указују да је губитак митохондријалне активности, на коју MTT указује, ако не основни, онда један од главних чинилаца цитотоксичног ефекта наночестица ZnO. То је у складу са претходним истраживањима, која су показала да наночестице ZnO индукују прекомерно стварање ROS, што доводи до оштећења митохондрија и, коначно, ћелијске смрти [134, 310, 311].

Као и у случају CeO₂, ћелије третиране наночестицама ZnO су бојене анексином V и PI у циљу процене степена индуковања апоптозе. И ова метода показује већу осетљивост MRC-5 ћелија, код којих је за индукцију апоптозе потребна нижа доза ZnO него код HeLa ћелија. За разлику од MTT и NRU теста, ова метода показује и несумњиве разлике између HeLa и MRC-5 ћелија третираних највишом дозом наночестица ZnO (40 µg/ml): код HeLa ћелија региструје се само рана апоптоза, а код MRC-5 и рана апоптоза и касна апоптоза/некроза. Међу резултатима које је дала ова метода привлачи пажњу чињеница да је код ZnO ћелија третираних дозом од 40 µg/ml ипак процентуално мали број ћелија код којих је детектована рана апоптоза у односу на укупан број ћелија (~7 %), упркос томе што су друге методе показале високу цитотоксичност ове дозе. Ови резултати отварају простор за истраживање и других модалитета смрти HeLa ћелија изазваних наночестицама ZnO, које не одликује екстернализација фосфатидилсерина. Међу њима су фероптоза и аутофагија. Фероптоза индукована наночестицама ZnO је у најновијим истраживањима потврђена код неколико типова ћелија карцинома грлића материце, међу којима су и HeLa ћелије [312], док је укљученост аутофагије у механизме цитотоксичности наночестица ZnO показана код других ћелијских типова [313, 314].

Анализа ћелијског циклуса бојењем PI и проточном цитофлуориметријом HeLa и MRC-5 ћелија није показала да постоје промене у расподели фаза ћелијског циклуса индуковане наночестицама. Такав резултат показује да наночестице ZnO не остварују свој цитотоксични ефекат путем блокирања ћелијског циклуса у некој од његових фаза, већ другим механизмима доводе до ћелијске смрти, услед којих се може детектовати једино повећан број sub-G ћелија (< 2n хромозома). Овај податак је од значаја за анализу Раманових спектра третираних ћелија, тј. тумачење промена у Рамановим модовима повезаним са молекулом ДНК.

Централни део ове дисертације је посвећен Рамановој спектроскопији две врсте ћелија третираних CeO₂ и ZnO наночестицама. Главна замисао је била да се измере Раманови спектри

туморских HeLa и неизмењених MRC-5 ћелија третираних наночестицама CD-CeO₂, SPRT-CeO₂ и ZnO, као и контролних (нетретираних ћелија); затим да се анализирају спектралне разлике индуковане применом различитих врста и доза оксидних наночестица; и на крају да се испита потенцијал ове методе у класификовању третираних ћелија.

Сви Раманови спектри су анализирани у приближно истим спектралним регионима: нискофреквентном (*Fingerprint*) и високофреквентном региону. У области између ова два региона $\sim(1800-3200) \text{ cm}^{-1}$ се не јављају се модови у Рамановим спектрима ћелија, па ова област није анализирана.

У потрази за појединачним маркер-модовима утицаја наночестица, анализирани су интензитети модова у усредњеним Рамановим спектрима различитих група ћелија и поређени међусобно. Ипак, најбитније и најрелевантније резултате дала је мултиваријантна статистичка анализа Раманових спектра, коју су представљале методе PCA, PLS и LDA. У мултиваријантној статистичкој анализи испитане су могућности више приступа добијеним подацима тј. Рамановим спектрима ћелија: анализирана су оба спектрална региона заједно, али и одвојено сваки од региона; анализа је вршена на већем броју различито третираних ћелијских група, али такође и на паровима група, поредећи једну по једну групу са контролом.

Раманови спектри HeLa ћелија третираних једнаком дозом (400 $\mu\text{g/ml}$) наночестица CD-CeO₂ и SPRT-CeO₂ су измерени и анализирани заједно са спектрима контролних ћелија. Затим су измерени спектри MRC-5 ћелија третираних истим наночестицама у истим дозама, уз које је уведена још по једна додатна доза за сваки тип наночестица. При анализи спектра MRC-5 уведен је такође и приступ PCA по паровима (контрола и једна третирана група), поред заједничке анализе неколико група.

Измерено је по неколико стотина Раманових спектра за сваку HeLa ћелијску групу (контроле, HeLa-CD-400 и HeLa-SPRT-400), од којих је након обраде и одбацивања спектра са лошим односом сигнал/шум за анализу преостало 200-250 по групи. У поређењу са другим публикованим студијама овог типа, може се сматрати да је то неуобичајено велики број узорака, који анализи даје значајну статистичку поузданост.

Визуелним поређењем усредњених спектра све три групе уочљиве су веома мале разлике међу њима. Оне се огледају једино у промени релативног односа интензитета појединих модова, као и у вредности стандардне девијације у појединим областима или модовима. Показано је да је стандардна девијација средњег спектра у области мода на 785 cm^{-1} нешто већа код ћелија HeLa-CD-400 него код контроле. Из тога се може даље закључити да се ове ћелије по садржају нуклеинских киселина разликују међу собом више него што се контролне ћелије међу собом разликују, односно да је третман довео до смањења садржаја нуклеинских киселина у извесном проценту ћелија. Такође, вредност интензитета Рамановог мода се може прочитати из пикова позиционираних на 785 cm^{-1} (мод нуклеинских киселина) и 1003 cm^{-1} (протеински мод) и израчунати да је њихов релативни однос код HeLa-CD-400 ћелија нижи у односу на исти однос код контроле. То може указивати на промену у релативном односу протеина и нуклеинских киселина код третираних ћелија (смањењу садржаја нуклеинских киселина и/или повећању садржаја протеина). Међутим, због преклапања модова на блиским положијама, за већину модова анализом усредњених спектра не може се утврдити јасна асигнација мод-молекула.

У PCA анализи Раманових спектра HeLa ћелија третираних наночестицама CeO₂ (SPRT-CeO₂ и CD-CeO₂) нискофреквентни и високофреквентни регион су анализирани заједно, као

целина која даје потпуну спектроскопску информацију о испитиваним ћелијама. У овој анализи постигнуто је раздвајање у односу на прву и трећу РС компоненту.

РС1 компонента није значајна за разликовање спектра HeLa-CD-400 ћелија од контроле, али добро описује разлике између спектра HeLa-SPRT-400 и спектра контролних ћелија. Она јасно показује да Раманове спектре HeLa-SPRT-400 ћелија у нискофреквентном региону одликује слабији интензитет модова нуклеинских киселина, тј. да ове ћелије садрже мању количину нуклеинских киселина него контроле. Иако се у литератури неки од модова идентификованих у РС1 неретко означавају као Раманови модови ДНК, то се не може тврдити. Раманови спектри изолованих ДНК и РНК су много пута мерени и у литератури описани, при чему њихове карактеристике (позиције модова) варирају. Ове варијације потичу претежно од различитих просторних конформација које ови молекули заузимају, односно од интра- и интермолекулских нековалентних веза које граде, а не од тога да ли је у питању ДНК или РНК. Ипак, неки аутори наводе да позиције модова у региону (700-850) cm^{-1} разликују ова два молекула и посебно истичу мод на 813 cm^{-1} као специфичан за РНК [277, 280]. Међутим, наведени регион код РС1 садржи само мод на 756 cm^{-1} , који не потиче од нуклеинских киселина, и модове на 726 cm^{-1} и 785 cm^{-1} , који се јављају код свих нуклеинских киселина. Због свега наведеног, не можемо одредити које су то нуклеинске киселине којих у HeLa-SPRT-400 ћелијама има мање него у контролним. При оксидативном оштећењу ћелија долази до фрагментације и деградације ДНК, што може смањити интензитет Рамановог расејања са ДНК. Са друге стране, смањена метаболичка активност ових ћелија, показана МТТ тестом, условиће и смањење синтезе РНК. Треба напоменути и да у ћелији већи масени проценат отпада на РНК (~20 μg по ћелији код сисара) него на ДНК (~7 μg по ћелији) [315]. Раманови спектри ћелија у овој студији мерени су у региону једра и требало би да се информација коју носе у највећем делу односе на једро и мали део цитоплазме око њега. У једру је локализовано 10-20 % укупне ћелијске РНК (2-4 μg), те ни по том критеријуму није занемарљива вероватноћа да се регистроване промене у Рамановим спектрима ћелија односе делимично и на РНК [316].

РС1 такође показује да Раманови модови повезани са протеинима расту у спектрима HeLa-SPRT-400. Један од протеинских модова који расте према позицији на 1670 cm^{-1} улази у састав амид I траке. У Рамановим спектрима протеина, α структура резултује модом на ~1650 cm^{-1} , док β структура даје модове на нешто вишим таласним бројевима: ~1665 cm^{-1} (амидне групе у унутрашњости β ланаца) и (1670-1680) cm^{-1} (кратке пептидне секвенце које припадају протеинима организованим у β плоче али нису у њиховој унутрашњости већ су слободне у простору). Позиција на ~1670 cm^{-1} такође се повезује и са тзв. полипролин II конформацијом [281], а таласни бројеви преко 1680 cm^{-1} са неуређеним протеинским структурама. Због тога не можемо са сигурношћу одредити на који начин се код третираних ћелија мења структура протеина, али можемо претпоставити да пораст мода на 1670 cm^{-1} указује на промену у расподела различитих структура међу протеинима у HeLa-SPRT-400 ћелијама, и то у смеру смањења удела α структура у односу на други тип или типове структура. Неки од протеинских модова на чији пораст интензитета указује РС1 могу потицати и од липида. То је случај са модовима на 1125 cm^{-1} и 1448 cm^{-1} и посебно са модовима у високофреквентном спектралном региону, на 2883 cm^{-1} , 2933 cm^{-1} , 2970 cm^{-1} и 3060 cm^{-1} . Пошто је интензитет свих модова високофреквентног региона у РС1 мањи од нуле, он показује глобално повећање удела липидних и протеинских модова у Рамановим спектрима HeLa-SPRT-400.

РС3 у значајној мери осликава разлике између спектра HeLa-CD-400 и контролних ћелија, али уз то показује да се спектри HeLa-SPRT-400 у односу на РС3 разликују приближно

једнако од контроле и од HeLa-CD-400. Другим речима, PC3 описује промене изазване третманом наночестицама које су код HeLa-CD-400 израженије него код HeLa-SPRT-400 ћелија.

Најупечатљивији пикови у PC3 одговарају Рамановим модовима нуклеинских киселина. Они су у овој компоненти израженији и бројнији него у PC1 и указују да је најбитнија одлика HeLa-CD-400 ћелија пад садржаја нуклеинских киселина. HeLa-SPRT-400 садрже нешто већу количину нуклеинских киселина него HeLa-CD-400, али мању него нетретиране ћелије. То указује на деградацију ДНК код HeLa-SPRT-400, иако у мањој мери него код HeLa-CD-400. PC3, као ни PC1, не садржи пикове који би могли да укажу на коју се специфичну класу неуклеинских киселина промене односе.

PC3 такође указује на пораст садржаја протеина код HeLa-CD и HeLa-SPRT ћелија, што се види из неколико типичних Раманових модова аминокиселина, као и амидне траке. Облик амид I траке различит је у односу на исту амидну траку у PC1: овде је она широка и са максимумом на $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$, мада обухвата и мод на $\sim 1670\text{ cm}^{-1}$. Раманов мод на 1630 cm^{-1} може се повезати са вибрацијама карбонилних група протеина у добро организованим β структурама, али и са амидним везама у другим протеинским структурама [160, 281, 317]. PC3, дакле, сугерише да HeLa-CD-400 ћелије одликује пораст садржаја протеина, али нешто другачије секундарне структуре него HeLa-SPRT-400 ћелије. Могуће је да упућује на већу уређеност β структура која је последица вишег степена агрегације протеина [317].

Раманови модови на 1125 cm^{-1} и 1448 cm^{-1} , као и модови високофреквентног региона, могу потицати не само од протеина, већ и од липида, и сугеришу да је код HeLa-CD-400 и у нешто мањој мери код HeLa-SPRT-400 ћелија третман наочестицама довео до повећања липидног садржаја. Том закључку у прилог иде присуство мода на 1730 cm^{-1} , типичног за липиде, који је у PC3 услед високог нивоа шума дискутабилног интензитета, али је јасно присутан у диференцијалном спектру насталом одузимањем усредњеног Рамановог спектра контроле од усредњеног Рамановог спектра HeLa-CD-400 ћелија.

У целини сагледано, PCA Раманових спектра HeLa-CD-400, HeLa-SPRT-400 и контролних ћелија је показала смањење садржаја нуклеинских киселина код третираних ћелија, посебно изражено након третмана наночестицама CD-SeO₂, као и повећање садржаја липида и протеина код ћелија третираних и једним и другим наночестицама. Такође је показано да је секундарна структура протеина измењена у односу на контролне ћелије, али на нешто различит начин код HeLa-CD-400 него код HeLa-SPRT-400 ћелија. Код HeLa-CD-400 доминира област амидне траке I повезана са добро уређеним β структурама, мада је удео и осталих типова структура (α хеликс, неуређене структуре), приказан високим интензитетом читаве амидне траке I, велики. Код HeLa-SPRT-400 ћелија се повећава интензитет ужег дела амидне траке I који се повезује са структурама веће неуређености.

Будући да је PCA показала потенцијал груписања ћелија третираних наночестицама SeO₂ и помогла да се окарактеришу биохемијске разлике међу њима, било је упутно методу надоградити другим методама мултиваријантне статистике које би имале за циљ формирање модела за класификацију ћелија на основу Раманових спектра. Такав модел би убудуће Раманове спектре ћелија третираних наночестицама класификовао у једну од постојећих група и на тај начин процењивао ефекат наночестица на ћелије. У ту сврху коришћене су методе PLS и LDA. PLS је успешно генерисала компоненте којима се постиже веома добро раздвајање унапред дефинисаних ћелијских група. Затим су компоненте добијене у PLS анализи искоришћене за

изградњу PLS-LDA модела. Добијени модел је показао високу сензитивност (најмање 88 %) и специфичност (најмање 92 %) за сваку ћелијску групу. То практично значи да је у најмање 88 % тестираних случајева модел успео да спектар (моделу) непознате ћелије исправно класификује у једну од група, односно да је у 92 % случајева исправно одредио да спектар не припада једној од ћелијских група, што чини овај модел задовољавајућим.

Промене у интензитетима Раманових модова MRC-5 ћелија третираних наночестицама CeO_2 такође су анализиране на два начина: преко усредњених Раманових спектра и помоћу PCA анализе.

У усредњеним Рамановим спектрима MRC-5 ћелија третираних наночестицама CD- CeO_2 упечатљив је пад интензитета модова повезаних са нуклеинским киселинама, у односу на контролне спектре. Пад је израженији код MRC-CD-400 него код MRC-CD-200 ћелија. Код MRC-CD-400 ћелија је такође посебно изражен пораст интензитета липидних модова, као и неких модова нискофреквентног региона који могу потицати и од липида и од протеина (1264 cm^{-1} , 1448 cm^{-1} и 1657 cm^{-1}). Међутим, пораст интензитета претежно липидних модова у високофреквентном региону уз пад интензитета претежно протеинског мода на 2930 cm^{-1} прецизније указује на дозно-зависно повећање односа липидног према протеинском садржају третираних ћелија.

Код усредњених спектра MRC-5 ћелија третираних наночестицама SPRT- CeO_2 такође је уочљиво повећање односа липида према протеинима, али је он код различитих доза наночестица представљен различитим модovima: код MRC-SPRT-400 се јавља пораст интензитета липидних модова на 1065 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} и 2880 cm^{-1} , док се код MRC-SPRT-800 интензитет датих модова не мења, али се бележи пораст интензитета липидног мода на 1310 cm^{-1} и пад протеинског на 2930 cm^{-1} . Интензитети модова нуклеинских киселина су код MRC-SPRT-400 нижи него код контролних ћелија, али ова разлика не постоји између MRC-SPRT-800 и контролних ћелија. Добијени резултати сугеришу да се код MRC-5 ћелија третираних наночестицама SPRT- CeO_2 јављају додатни ефекти наночестица, који нарушавају дозно-зависну правилност. Ефекти могу бити повезани са изразито крупним кластерима наночестица у високој концентрацији, али могу бити и само артефакти мерења: одузимање позадинског расејања пореклом од наночестица, које је нарочито изражено у региону у ком се јављају карактеристични модови нуклеинских киселина (до 900 cm^{-1}), може отежати поређење тих спектра са другима.

Промене у Рамановим спектрима ћелија узроковане наночестицама CeO_2 анализиране су затим методом PCA. PCA анализа у којој учествује велики број група може бити компликована за тумачење али и недовољно адекватна: иако генерисане РС показују разлике између највише измењене групе и контроле, те разлике некад неће на адекватан начин представљати и промене у мање измењеним групама [318, 319]. Стога је PCA примењена на три одабране групе ћелија: MRC-CD-400, MRC-SPRT-400 и контролне ћелије.

PCA нискофреквентног региона Раманових спектра MRC-CD-400, MRC-SPRT-400 и контролних ћелија показује да се MRC-CD-400 значајно разликују од остале две групе ћелија, док се MRC-SPRT-400 не разликују од контроле. Компонента која највише доприноси разликовању MRC-CD-400 је PC1. PC1 указује претежно на опадање интензитета модова нуклеинских киселина код MRC-CD-400. Захваљујући бољем односу сигнал/шум, у овој компоненти могу се јасније видети подструктуре у оквиру ширих модова, па тако и мод на 813 cm^{-1} , у виду „рамена“ интензивнијег мода на 785 cm^{-1} . Мод на 813 cm^{-1} , повезан са истезањем фосфодиестарских веза рибоза у РНК ланцу, указује да код MRC-CD-400 ћелија опада садржај РНК, мада се тиме не искључује смањење садржаја ДНК.

PC1 такође показује смањење интензитета Рамановог мода на 1690 cm^{-1} , што указује на промену у протеинској структури код MRC-CD-400 ћелија, и то највероватније на смањење неуређености [160]. Међутим, интензитет пика на 1657 cm^{-1} , који припада и липидном и протеинском Рамановом спектру, у PC1 расте. Не може се одредити колики је удео протеинских вибрација у овом моду. Могућ би био случај да представља искључиво повећање садржаја липида, и да би у случају да се липиди не мењају, овај пик у PC1 био истог знака као пик на 1690 cm^{-1} . Због тога се не може са сигурношћу рећи да ли PCA указује на смањење удела одређене протеинске структуре или на генерално смањење садржаја протеина код MRC-CD-400 ћелија.

Као што су у негативном делу PC1 лако препознатљиви Раманови модови нуклеинских киселина, тако је уочљива сличност позитивног дела PC1 са Рамановим спектрима липида. Изражени пикови на 1270 cm^{-1} и 1657 cm^{-1} указују на висок степен незасићености липида чији садржај код MRC-CD-400 расте. Наиме, код засићених липида однос интензитета I_{1270}/I_{1300} и I_{1657}/I_{1440} је низак; са повећањем броја двоструких веза у масним киселинама које улазе у састав липида, интензитет Раманових модова на 1270 cm^{-1} и 1657 cm^{-1} расте, те се поменути односи интензитета повећавају. Пошто су Раманови спектри ћелије веома комплексни, разлике међу њима се могу повезати са одређеном класом макромолекула, али ретко са неким специфичним молекулом. Ипак, даља анализа кроз поређење са подацима из литературе показала је нарочиту сличност компоненте PC1 са Рамановим спектрима фосфолипида: сви максимуми из PC1 налазе се и у Рамановим спектрима већине диацилглицеридних мембранских фосфолипида. Модови по којима се највише међусобно разликују Раманови спектри фосфолипида јављају се у региону ($800\text{-}1000$) cm^{-1} [159]. У датом региону PC1 компоненте јављају се само два неспецифична пика, па ова компонента не даје ближи увид у промене у фосфолипидном саставу MRC-CD-400 ћелија. С обзиром да у овој компоненти нису присутни ни пикови карактеристични за Раманове спектре холестерола (702 cm^{-1} , 1674 cm^{-1}), који заузима велики део ћелијске мембране [159, 286], повећање садржаја фосфолипида могло би се довести у везу са повећањем неких других мембранских површина у којима је холестерол мање заступљен, као што су ендозоми и лизозоми, а такође и са експримирањем фосфатидилсерина на спољашњој страни ћелијске мембране, карактеристичним за апоптозу [320].

PCA високофреквентног региона Раманових спектра MRC-CD-400, MRC-SPRT-400 и контролних ћелија показује пораст интензитета претежно липидних (PC1) и пад интензитета претежно протеинских Раманових модова (PC2) код MRC-CD-400 ћелија. Група MRC-SPRT-400 је по просечном скору за обе компоненте незнатно ближа групи MRC-CD-400 него контролној групи. Високофреквентни регион, дакле, наговештава да постоје мале промене и у MRC-SPRT-400 ћелијама.

Како би се проучиле дозно-зависне разлике у карактеристикама Раманових спектра ћелија, примењена је PCA на парове група, најпре на нискофреквентни регион парова контрола: MRC-CD-200 и контрола: MRC-CD-400. У оба случаја резултат је показао да се третиране ћелије по својим Рамановим спектрима значајно разликују од контролних и да њихово разликовање најбоље описује прва компонента. PC1 добијене у ове две анализе на први поглед веома личе, али даља компаративна анализа показује да разлике између две различите дозе ипак постоје. Заправо, PC1 пара контрола: MRC-CD-400 готово је идентична PC1 добијеној из претходно описане анализе (контрола, MRC-CD-400 и MRC-SPRT-400). То није зачуђујуће: пошто се MRC-CD-400 највише разликују од контроле, PCA готово у целости показује особености ове групе ћелија, док евентуалне мање изражене особености ћелија MRC-SPRT-400 не долазе до изражаја. Ово још једном подвлачи потребу да се групе ћелија анализирају у паровима.

Анализа парова је омогућила да се региструју разлике између ћелија третираних двама дозама CD-CeO₂. Уочено да су код PC1 из анализе контрола:MRC-CD-200, у односу на PC1 из анализе контрола:MRC-CD-400, посебно изражени минимума на 1237 cm⁻¹, 1337 cm⁻¹ и 1685 cm⁻¹. Све три позиције се, осим са нуклеинским киселинама, могу повезати и са протеинима, па је могуће да опадање протеинског садржаја уз опадање садржаја нуклеинских киселина додатно појачава интензитет ових минимума код MRC-CD-200 ћелија. Са друге стране, локални минимум на 813 cm⁻¹, специфичан за молекуле РНК, регистрован је у анализи MRC-CD-400 ћелија. Код MRC-CD-200 ћелија, иако су други пикови нуклеинских киселина веома изражени, овај пик се готово не уочава.

За тумачење промена у нуклеинским киселинама поред анализе апоптозе коришћени су и резултати МТТ теста: при смањеној метаболичкој активности ћелија, очекивано је и смањење синтезе РНК. Постоје студије које су пратиле деградацију молекула РНК током апоптозе; њихови резултати говоре да се информациона РНК разлаже у раним фазама апоптозе, док се молекули некодирајуће РНК разлажу касније [321]. Недавна студија потврђује да ћелијску смрт изазвану оксидативним оштећењима прати екстензивна деградација молекула рибозомалних РНК [322]. Најмање 90% укупне РНК отпада на некодирајуће РНК (чак 80 % на рибозомалну), па би и било очекивано да сигнал РНК у Рамановом спектру ћелије почне значајно да опада у каснијим фазама апоптозе, када почне разградња већинског дела РНК. Ипак, треба узети у обзир и да су ове студије углавном анализирале деградацију укупне РНК у ћелији. С обзиром на место на ћелији где је фокусиран упадни сноп при мерењу, очекујемо да Раманови спектри претежно показују промене у једарној РНК. Можемо претпоставити да се деградација РНК у једру одвија сличном динамиком као и деградација једарне ДНК, тј. да се појачава са појачаном активношћу нуклеаза и протеаза која води коначној фрагментацији читавог једра, како демонстрира и мод на 813 cm⁻¹.

Посебно су интересантне разлике у позитивном делу PC1, тј. у односу интензитета локалних максимума. Сличност ове компоненте са Рамановим спектром фосфолипида код пара контрола:MRC-CD-200 је још већа него код пара контрола:MRC-CD-400. Пошто је регион (800-1000) cm⁻¹ код PC1 пара контрола:MRC-CD-200 богат пиковима, са асигнацијама се може ићи дубље и тако увидети да се таласни бројеви готово свих пикова ове компоненте подударују са Рамановим модовима фосфатидилсерина. Поред сличности са фосфатидилсерином, не може се искључити ни допринос других фосфолипида, па ни осталих класа липида, који деле велики број Раманових модова. Неколико позитивних пикова у PC1 јавља се и у Рамановим спектрима цитохорма Ц (746 cm⁻¹, 968 cm⁻¹, 1080 cm⁻¹, 1125 cm⁻¹, 1300 cm⁻¹). Оно што се дефинитивно може тврдити јесте да је однос I₁₂₇₀/I₁₃₀₀ код MRC-CD-200 ћелија већи него код MRC-CD-400 ћелија, што значи да липиди код MRC-CD-200 ћелија садрже већи удео незасићених веза. Такође се може увидети да је однос интензитета I₁₀₆₄/I₁₀₈₀ знатно мањи код MRC-CD-200 ћелија, што указује на већи садржај *gauche* конформера, односно на мању уређеност липидних структура код ових ћелија. Међу локалним максимумима уочљиво је и померање позиције једног пика: пик који је се код MRC-CD-200 ћелија јавља на 1738 cm⁻¹ померен је на 1741 cm⁻¹ код MRC-CD-400 ћелија. Овај пик се повезује са вибрацијама карбоксилних група липида и примећено је да се код липида са дужим ланцима масних киселина јавља на вишој позицији [297].

Коначно, када се PCA примени на пар MRC-CD-200:MRC-CD-400, резултат показује да се ове две групе ћелија разликују само по PC1, која указује на смањење садржаја нуклеинских киселина и пораст садржаја липида код MRC-CD-400 ћелија у односу на MRC-CD-200 ћелије. На основу анализе сва три пара, можемо закључити да је смањење садржаја нуклеинских киселина и повећање садржаја липида код MRC-5 ћелија третираних наночестицама CD-CeO₂ сразмерно примењеној дози наночестица, али да осим квантитативне, постоји и квалитативна разлика: са повећањем дозе, липиди чији садржај код третираних ћелија расте су засићенији и мање слични

фосфатидилсерину, док нуклеинске киселине чији садржај код третираних ћелија опада имају већи удео молекула РНК са повећањем дозе.

Објашњење за промене у липидима нуди раније описана анализа апоптозе помоћу бојења анексином V: код мањег броја MRC-CD-200 ћелија региструје се рана апоптоза, односно фосфатидилсерин се експримира на спољашњој страни ћелијске мембране, док се код великог броја MRC-CD-400 ћелија региструје касна апоптоза/некроза. У касној апоптози нема даље повећања експресије фосфатидилсерина, али почињу да се формирају апоптотска тела, чиме се повећава удео липидних модова у Рамановим спектрима ћелија. Због тога код MRC-CD-400 ћелија укупно повећање сигнала пореклом од мембранских липида надмашује повећање сигнала пореклом од самог фосфатидилсерина. Познато је да су незасићени липиди подложнији оксидацији од засићених; код MRC-CD-400 ћелија, код којих је оксидативни стрес интензивнији, долази до пероксидације и разградње најпре незасићених липида, што може бити разлог губљења карактеристика незасићености у Рамановим спектрима ових ћелија. Неуређеност липида на коју указују Раманови спектри MRC-CD-200 ћелија може се повезати са ремоделовањем ћелијске мембране и екстернализацијом фосфатидилсерина на почетку апоптозе. Смањење неуређености у каснијим фазама апоптозе у складу је са показаном доминацијом више засићених липида код MRC-CD-400 ћелија, који граде уређеније липидне структуре [323]. Коначно, повећање интензитета маркера за дужину липидног ланца код MRC-CD-400 ћелија у складу је са формирањем апоптотских тела и липидних капи код ових ћелија: масне киселине веома дугих ланаца (енгл. *Very Long Chain Fatty Acids*, VLCFA) најзаступљеније су у мембранским липидима, а апоптотска тела, као и липидне капи, оивичени су фосфолипидном мембраном [324].

РСА анализа високофреквентног региона рађена по паровима указује на опадање садржаја протеина, посебно изражено код MRC-CD-400 ћелија. Наиме, PC1 добијене у анализи парова контрола:MRC-CD-200 и контрола:MRC-CD-400 показују пораст липидног у односу на протеински садржај код третираних ћелија, али се између ове две PC1 не уочавају значајне квалитативне разлике. Међутим, код пара контрола:MRC-CD-400 издваја се и PC2 као битна за разликовање третираних од контролних ћелија. PC2 показује посебно изражен пад интензитета доминантно протеинског мода на 2939 cm^{-1} , подвлачећи тиме смањење протеинског садржаја код MRC-CD-400 ћелија. Смањење протеинског садржаја у ћелијама које су у апоптози је очекивано и последица је активирања низа протеолитичких ензима.

Анализа пара контрола:MRC-SPRT-400 показала је да PC1 добро раздваја третиране од контролних ћелија и указује на пораст интензитета липидних модова и пад интензитета Раманових модова нуклеинских киселина у третираним ћелијама у односу на контролу. Ова компонента је веома слична PC1 добијеној из анализе пара контрола:MRC-CD-400. Сличност се огледа у маркерима незасићености липида, дужине липидних ланаца и слабијем подударану са Рамановим спектром фосфатидилсерина. Овај резултат је у сагласности са претходно извршеном анализом апоптозе помоћу конфокалног микроскопа: код MRC-SPRT-400 се не уочавају ћелије у раној апоптози, као код MRC-CD-200, већ само ћелије у касној апоптози/некрози, као код MRC-CD-400 узорка. Број таквих ћелија је код MRC-SPRT-400 ипак знатно мањи него код MRC-CD-400. Међутим, РСА указује да постоје и разлике у биохемијским променама између MRC-CD-400 и MRC-SPRT-400 ћелија: код MRC-SPRT-400 изражени су бројни модови у региону ($800\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$). Као што је већ речено, то је регион у ком се Раманови спектри различитих фосфолипида највише разликују. Није јасно да ли ови модови упућују на повећање садржаја неких специфичних фосфолипида, али могуће је да су повезани са липидним саставом бројних и великих ендоцитотских везикула које обухватају крупне кластере наночестица SPRT-CeO₂. Познато је да се липидни састав ендозома, посебно касног, разликује од састава ћелијске мембране и мембране апоптотских тела [325].

За разлику од свих претходних анализираних група ћелија, MRC-SPRT-800 ћелије се могу раздвојити од контролних ћелија преко PC2, која указује на промене у амидним тракама, односно у заступљености различитих протеинских структура код MRC-SPRT-800 у односу на контролу, као и на смањење садржаја нуклеинских киселина код третираних ћелија, у извесној мери маскирано позадинским сигналом пореклом од расејања са наночестица. Уочене промене у Рамановим спектрима не могу се јасно повезати са биолошким и биохемијским променама у ћелијама. SPRT-CeO₂ наночестице формирају веома крупне агломерате, чији се број и димензије повећавају при веома високим концентрацијама наночестица (800 µg/ml). Могуће је да кластери на површини ћелије делимично маскирају сигнал пореклом са одређених ћелијских структура. Мали пад вијабилности код ових ћелија постоји и детектован је биолошким тестовима, али Раманова спектроскопија у датим условима наилази на, највероватније, методолошка ограничења.

Нешто је повољнија ситуација код анализе високофреквентног спектралног региона. Она показује повећан однос садржаја липида према садржају протеина код ћелија третираних обема дозама наночестица SPRT-CeO₂ у односу на контролу. Анализа пара MRC-SPRT-400:MRC-SPRT-800 показује да је однос липида према протеинима још већи код MRC-SPRT-800 него код MRC-SPRT-400 ћелија. Овај тренд се очигледно увиђа код свих до сада анализираних третираних ћелија. Високофреквентни регион садржи свега неколико модова невелике специфичности па његова анализа не носи висок потенцијал за одређивање квалитативних разлика између различито третираних ћелија, али може се успешно користити као генерални показатељ цитотоксичног ефекта наночестица.

Дозно-зависни ефекти наночестица ZnO на HeLa и MRC-5 ћелије, односно манифестације ефеката наночестица у Рамановим спектрима третираних ћелија, праћени су паралелно. Интензитети појединих модова из усредњених Раманових спектра су квантификовани у циљу одређивања потенцијалних Раманових маркера цитотоксичности наночестица ZnO. Тако је утврђено да три Раманова мода пореклом од нуклеинских киселина (787 cm⁻¹, 1337 cm⁻¹ и 1580 cm⁻¹) падом својих интензитета (у односу на контролне ћелије) маркирају оштећења код оба типа третираних ћелија. Иако се два најинтензивнија ћелијска мода, на 1444 cm⁻¹ и 1659 cm⁻¹, такође мењају код оба типа третираних ћелија у односу на контролне, није поуздано користити их појединачно као маркере ћелијских оштећења. Разлог томе је што су оба мода заправо широке траке, сачињене од мноштва мањих модова који потичу од различитих хемијских веза и у протеинима и у липидима. Међутим, раније је показано да релативни однос њихових интензитета, I₁₆₅₉/I₁₄₄₄, опада са опадањем односа протеинског према липидном садржају у ћелији [181]. Слично је са односом I₂₈₅₅/I₂₉₃₃, који расте са порастом липидног у односу на протеински садржај [181, 301]. Оба наведена односа су се показала као потенцијални маркери и у случају цитотоксичног ефекта наночестица ZnO на HeLa и MRC-5 ћелије, мењајући се код оштећених ћелија у смеру повећаног односа липидног према протеинском садржају. Поред њих, релативни однос I₁₃₃₇/I₁₃₀₅, који показује смањење удела нуклеинских киселина у односу на липиде у Рамановим спектрима третираних ћелија, може се користити као маркер код оба типа ћелија, макар у опсегу доза примењеном у овој студији. Разлагање биолошких макромолекула (ДНК и протеина), као и формирање фосфолипидних мембранских структура и липидних капи су очекивани у апоптози, која је показана код ћелија третираних наночестицама ZnO, па ни утврђени маркери оштећења нису неочекивани. Међутим, ниједан од описаних маркера не мења се значајно између различитих доза наночестица. Значајна промена вредности маркера се догађа на одређеном прагу

цитотоксичности, а затим остаје на приближно истом нивоу. Праг на ком се промене јављају је код HeLa ћелија виши (40 $\mu\text{g/ml}$) него код MRC-5 ћелија (20 $\mu\text{g/ml}$).

Ради интуитивнијег тумачења РС компонентни, у анализи Раманових спектра ћелија третираних наночестицама ZnO примењена је нестандартна варијанта PCA – ненегативна PCA. Ненегативна PCA је примењена најпре на три групе Раманових спектра HeLa ћелија (контролне и третиране двама дозама наночестица), затим на четири групе MRC-5 ћелија (контролне и третиране трима дозама наночестица). На крају је изведена анализа по паровима, које су чиниле по две групе ћелија (контрола и ћелије третиране једном дозом ZnO, или ћелије третиране двама различитим дозама ZnO). Све ове анализе дале су одређене информације о ефектима наночестица на ћелије, које су се добрим делом свакако поклапале, али и једна другу допуњавале.

Ненегативна PCA Раманових спектра HeLa-ZnO-20, HeLa-ZnO-40 и контролних ћелија резултовала је компонентама које су у оба спектрална региона (нискофреквентном и високофреквентном) издвајале HeLa-ZnO-40 ћелије као различите од остале две групе. Такав резултат је у складу са резултатима свих претходно урађених стандардних биолошких тестова, осим МТТ теста. МТТ је регистровао да метаболичка активност ћелија опада и код HeLa-ZnO-20 ћелија, мада не тако драстично као код HeLa-ZnO-40. На основу ових резултата, промене које детектује Раманова спектроскопија код ових ћелија нису, макар највећим делом, биохемијске промене на нивоу митохондрија. С обзиром да су Раманови спектри мерени у делу ћелије који обухвата једно, мањи део цитоплазме око њега и део ћелијске мембране који тај регион обухвата, очекивано је да се у спектру највећим делом очитују карактеристике једра и ћелијске мембране, које се код HeLa-ZnO-20 вероватно још увек не догађају.

Најупечатљивије промене у HeLa-ZnO-40 ћелијама детектоване ненегативном PCA показују пораст садржаја липида и смањење садржаја нуклеинских киселина, као што је то био случај и код ћелија третираних наночестицама CeO_2 . PC1 нискофреквентног спектралног региона у целости одговара Рамановом спектру липида и карактерише се израженим одликама фосфолипида и великом сличношћу са Рамановим спектром фосфатидилсерина. Маркери незасићености липида (I_{1270}/I_{1300} и I_{1657}/I_{1440}) су такође веома изражени. Иако највећим делом описује Раманов спектар нуклеинских киселина, PC2 нискофреквентног региона има изражене и пикове повезане са протеинским Рамановим модовима, и то не само са амидним тракама, него и са фенилаланином. То указује да се у HeLa-ZnO-40 ћелијама укупан протеински садржај смањује. Високофреквентни спектрални регион указује на слично: PCA овог региона резултује компонентама које показују пораст липидног у односу на протеински садржај и такође пораст интензитета маркера незасићености липида у овом региону (3016 cm^{-1}) код HeLa-ZnO-40 ћелија у односу на контролу. Анализа HeLa-ZnO-40 ћелијама под флуоресцентним конфокалним микроскопом је показала обојеност ћелија која одговара раним фазама апоптозе, у којима још није дошло до руптуре ћелијске мембране. Такво стање одликује присуство фосфатидилсерина на спољашњој страни ћелијске мембране, експанзија мембранских структура, разлагање нуклеинских киселина и протеина, што је у складу са резултатима PCA Раманових спектра [182]. У овој анализи интересантна је и PC3, која такође веома добро раздваја HeLa-ZnO-40 ћелије од контролних. Ова компонента се у целини не може повезати са Рамановим спектром неког биолошког молекула. Највећи број њених пикова може се приписати Рамановим модовима аминокиселина, што упућује на пораст садржаја слободних аминокиселина насупрот садржају аминокиселина везаних у протеине. Такође, већина пикова тачно или приближно одговара и положајима Раманових модова цитохрома Ц [278], што би се такође могло довести у везу са

ослобађањем цитохрома Ц из митохондрије у иницијацији апоптозе. Због своје неубичајености, ова компонента је вредна пажње и осврта у будућим истраживањима.

РСА анализа MRC-5 ћелија третираних наночестицама ZnO резултовала је компонентама које генерално описују исти смер промена липида, нуклеинских киселина и протеина као и код третираних HeLa ћелија. Међутим, битна разлика у односу на HeLa ћелије постоји у липидној компоненти оба спектрална региона: маркери незасићености липида су знатно мање изражени него код HeLa ћелија и сличност са спектром фосфатидилсерина је мања. Због претпоставке да би разлика у спектрима третираних HeLa и MRC-5 ћелија била последица инхерентних разлика између ова два типа ћелија, РСА је примењена на контролне ћелије оба типа. Супротно претпостављеном, показало се да контролне MRC-5 ћелије садрже више незасићених (фосфо)липида него контролне HeLa ћелије. Литературни подаци такође говоре да код HeLa ћелија 67,5 % липида чине засићени, док код феталних фибробласта плућа сличних MRC-5 ћелијама 35,4 % укупних липида у ћелији спада у незасићене [326]. Описане анализе нису у стању да објасне различите промене у садржају незасићених липида код третираних HeLa и MRC-5 ћелија, због чега је касније рађена РСА анализа парова.

РС3 која раздваја MRC-ZnO-20 и MR-ZnO-40 од контроле сугерише да је након дејства наночестица ZnO дошло до оксидативне разградње незасићених липида, а не само до повећања концентрације засићених. Ова компонента управо указује на пад садржаја засићених липида. Поред тога, у овој компоненти су поново издвојени неки од пикова који одговарају Рамановим модовима нуклеинских киселина, међу којима се налази и мод на 813 cm^{-1} . Могуће је да РС3 издваја промене РНК од промена ДНК, које се виде кроз РС1.

РСА анализа контролних HeLa и MRC-5 ћелија резултовала је и једним споредним, али битним запажањем. Наиме, указала је да висок степен незасићености ћелијских липида може бити повезан са већом осетљивошћу ћелија на наночестице ZnO. Познато је да су незасићени липиди подложнији оксидацији од засићених, због чега ће у условима оксидативног стреса изазваног наночестицама брже деградирати [326]. У овој студији, све коришћене методе су показале већу осетљивост MRC-5 него HeLa ћелија на наночестице ZnO, а Раманова спектроскопија је, у складу са литературним подацима, показала већи садржај незасићених липида у MRC-5 него у HeLa ћелијама.

Иако би се из резултата РСА анализе три групе HeLa ћелија, односно четири групе MRC-5 ћелија, могло закључити да код HeLa ћелија након третмана наночестицама ZnO удео незасићених липида расте, а код MRC-5 опада, даља РСА примењена на парове група (контрола са сваком од третираних група појединачно) показала је другачије. Наиме, показано је да су маркери незасићености липида изражени код MRC-ZnO-20 ћелија, по чему су ове ћелије сличне HeLa-ZnO-40 ћелијама, док се код MRC-ZnO-40 дати маркери редукују. Такође је код MRC-ZnO-20 ћелија израженија сличност РС1 нискофреквентног региона са Рамановим спектром фосфатидилсерина. Гледано из ове перспективе коју нам је омогућила анализа по паровима, можемо закључити да се интензитет маркера незасићености (фосфо)липида, као и маркера фосфатидилсерина, корелише са степеном оштећења ћелије узрокованим наночестицама ZnO. HeLa-ZnO-40 и MRC-ZnO-20 су у раним стадијумима апоптозе, док су MRC-ZnO-40 ћелије у великом проценту у касној фази апоптозе, па се заступљеност различитих мембранских липида мења у односу на MRC-ZnO-20 ћелије. РСА пара HeLa-ZnO-40:MRC-ZnO-20 потврдила је да не постоје значајне разлике између ове две ћелијске групе.

Однос интензитета I_{1270}/I_{1300} у компонентама PCA ћелијских Раманових спектра у овој студији се показао потенцијалним маркером оштећења третираних ћелија, имајући вишу вредност код ћелија у раној апоптози него у касној апоптози/некрози, без обзира на тип ћелија и тип честица. Због тога су упоређене вредности овог параметра код PC1 добијене из PCA парова контрола:MRC-CD-200, контрола:MRC-CD-400, контрола:MRC-SPRT-400, контрола:ZnO-20 и контрола:ZnO-40. Из поређења су изузете ћелије MRC-SPRT-800, пошто се компонента која садржи ове пикове није показала значајном за разликовање ових ћелија од контроле. Резултати су показали да су ћелије са највишом вредношћу I_{1270}/I_{1300} , тј. са највећим садржајем незасићених липида, MRC-ZnO-40. Затим следе MRC-ZnO-20, MRC-SPRT-400, MRC-CD-400 и, коначно, MRC-CD-200. Ако се изузму MRC-SPRT-400, овај редослед се поклапа са редоследом опадања вијабилности ћелија одређене МТТ тестом. Ћелије третиране наночестицама ZnO показују знатно мању вијабилност (~3-9 %) од ћелија третираних наночестицама CD-CeO₂ (~12-31 %). Међутим, вијабилност ћелија третираних наночестицама MRC-SPRT-400 је према МТТ тесту веома висока (преко 90 %), тако да се у њиховом случају однос I_{1270}/I_{1300} не корелише са степеном оштећења ћелија. Можемо претпоставити да је овакав резултат повезан са агломерацијом честица и формирањем бројних ендоцитотских везикула, или да је потребно да цитотоксични ефекат наночестица пређе одређени праг да би параметар I_{1270}/I_{1300} био релевантан. PLS-LDA моделом за класификацију ћелија заснованим на области спектра која садржи маркере незасићености липида постигнуто је добро раздвајање екстремних група, тј. изразито оштећених од готово неоштећених ћелија. Потребно је проширити истраживања на већи број наночестица, па и типова ћелија, да би се испитало да ли и на који начин се параметар I_{1270}/I_{1300} као и дати модел за класификацију ћелија може користити у процени ефеката наночестица на ћелије. Судећи по резултатима ове студије, I_{1270}/I_{1300} , али и читава липидна компонента ћелијских Раманових спектра, има велики потенцијал на том пољу. Методе за анализу ћелијског липида нису толико развијене и стандардизоване колико је то случај са методама геномике и протеомике. Стандардне методе за одређивање цитотоксичности се промена у липидном саставу тек дотичу и то индиректно, или преко промена у пропустљивости ћелијске мембране, или користе боје које се специфично везују за мембранске липиде (фосфатидилсерин), а које су веома скупе и веома нестабилне. Мада је познато је да ћелије производе десетак хиљада различитих липида који имају структурну и сигналну улогу, њихове функције, интеракције и специфична регулација липидног састава у ћелији су недовољно истражени [325, 327]. Раманова спектроскопија, комбинована са другим методама, има потенцијал за употребу и на пољу липидомике, која би, осим нових увида у промене липида, могла да понуди и параметре на основу којих би се развијали нови тестови цитотоксичности наночестица, али и других агенаса.

У делу студије праћене су морфолошке промене HeLa ћелија након третмана наночестицама CD-CeO₂, SPRT-CeO₂ и ZnO које се могу уочити коришћењем AFM-а. Морфолошке промене су одређиване квалитативно визуелном анализом AFM слика и квантитативно преко параметара површинске хртавости и/или висине ћелије.

На AFM сликама контролних HeLa ћелија уочавају се ћелије глатке површине, без присуства улегнућа или руптура на ћелијској мембрани, са јасно оивиченим цитоплазматским протрузијама, добро дефинисаним једром и једарцетом. Основни облик третираних ћелија није промењен у односу на контролне, већ је генерално одређен степеном локалне адхезије за супстрат на ком је мерено (покривно стакалце), али су видљиве значајне промене на површини ћелијске мембране.

Површина HeLa-CD-400 ћелија је хртава, са бројним дубоким улегнућима или руптурама, пречника 50–100 nm. Руптуре су вероватно отвори на оштећеној мембрани, чије је присуство

показано бојењем ћелија PI. Једро није јасно издвојено од остатка ћелије, што је последица деградације хроматина, једарне овојнице и ламина [328], а једарца су бројнија и ситнија него код контролних ћелија. Познато је да величина једараца корелише са метаболичком активношћу ћелије [329], а стресни услови доводе до сегрегације и фрагментације једараца [330]. Метаболичка активност HeLa-CD-400 ћелија је, према МТТ тесту, готово непостојећа, али поред тога, за фрагментацију једараца ових ћелија свакако је од пресудног значаја деградација узрокована високом активношћу апоптотских протеаза и рибонуклеаза.

Површина HeLa-SPRT-400 ћелија је изразито неравна и прекривена крупним кластерима наночестица, услед којих се теже сагледавају промене на мембрани. Наночестице прекривају и предео једра, па су једро и једарце тешко уочљиви. На топографским сликама ових ћелија су такође уочена удубљења на ћелијској мембрани пречника 50–100 nm, мада се појављују ређе него код HeLa-CD-400 ћелија. Бојење PI је показало да је и међу HeLa-SPRT-400 ћелијама одређен проценат ћелија у касној апоптози/некрози, али је тај број значајно мањи него код HeLa-CD-400 ћелија. AFM слике су, међутим, показале удубљења на мембрани готово свих снимљених HeLa-SPRT-400 ћелија (15 насумично изабраних ћелија). У случају ових ћелија, вероватно се не ради о отворима на мембрани који комуницирају са цитоплазматским садржајем, него о ендоцитотским улегнућима мембране, која настају приликом уношења наночестица у ћелију [226, 331].

Инверзне топографске AFM слике показују добро развијену мрежу четкастих израштаја на површини контролних ћелија. Овај термин се обично користи у литератури која описује морфолошке карактеристике ћелија које се детектују AFM-ом и означава шећере и гликозиловане протеине на површини ћелијске мембране који имају функцију у комуникацији ћелије са околином, а обухвата и мале мембранске израштаје са припадајућим цитоскелетним елементима [332]. Ћелијске четкице су код HeLa-CD-400 фрагментисане. Код HeLa-SPRT-400 ћелија ћелијске четкице нису видљиве због присуства наночестица, али о њиховој деградацији закључујемо индиректно, на основу фрагмената у околини ћелија, на којима су накупљене агломерисане наночестице.

Површинска храпавост ћелија квантификована је као средње квадратно одступање висине ћелије измерене на великом броју тачака по читавој њеној површини. Тако израчуната храпавост код HeLa-CD-400 ћелија значајно је већа него храпавост контролних ћелија. Због велике количине наночестица на површини HeLa-SPRT-400 ћелија, није могуће на овај начин доћи до информације о реалној висини саме ћелије, па квантификовање површинске храпавости на овај начин није меродавно. За висину ових ћелија узета је највиша тачка на површини ћелије и упоређена са највишом тачком контролних и HeLa-CD-400 ћелија. Утврђено је да висина ћелија након оба типа третмана опада, незнатно више код HeLa-SPRT-400 него код HeLa-CD-400 ћелија. Иако разлика у висини између HeLa-SPRT-400 и HeLa-CD-400 ћелија није статистички значајна, битно је приметити да је висина SPRT-400 ћелија опала у односу на контролу, упркос крупним кластерима наночестица за које би се очекивало да ће висину ћелије повећати. То може бити последица апоптотске регулације ћелијске запремине, тј. скупљања HeLa-SPRT-400 ћелија на почетку апоптозе [333], и/или деградације једра, на коме се очекује највећа висина ћелије. Након бојења HeLa-SPRT-400 ћелија анексином V и PI, на флуоресцентним микрографијама нису регистроване ћелије у раној апоптози, тј. ћелије обојене само анексином V. Међутим, можемо приметити да је обојеност анексином V веома слаба и на ћелијама обојеним PI и претпоставити да наночестице на површини ћелије ометају везивање анексина V за фосфатидилсеринске остатке. Тако AFM, поред Раманове спектроскопије и МТТ теста, пружа још један аргумент о цитотоксичности наночестица SPRT-CeO₂.

Иако се не може увек са сигурношћу одредити биохемијска и функционална позадина морфолошких промена које уочавамо на AFM сликама, на основу њих можемо са сигурношћу разликовати третиране ћелије од контролних, као и HeLa-CD-400 и HeLa-SPRT-400 ћелије међусобно. Морфологија површине ћелије и једра даје директан и визуелни увид у промене које су детектоване Рамановом спектроскопијом, потврдивши да постоји значајно ремоделовање ћелијске мембране и деградација једра и продубљујући тумачења резултата Раманове спектроскопије. На пример, AFM слика деградираниог једра HeLa-CD-400 ћелије, осим деградације ДНК, својим фрагментисаним једарцима показује и деградацију молекула РНК. Иста слика показује и да су хистони и ламини важни кандидати међу протеинима на чију промену структуре указује Раманова спектроскопија. AFM такође наговештава да при тумачењу резултата Раманове спектроскопије треба узети у обзир промене у саставу шећера, гликопротеина и гликолипида, молекула на које се у анализи ћелијских вибрационих спектра ретко обраћа довољна пажња.

Промене које су уочене на AFM сликама HeLa-ZnO-40 ћелија се значајно разликују од промена уочених код HeLa-CD-400 ћелија. С обзиром да је бојење анексином V показало да су HeLa-ZnO-40 ћелије у највећем проценту у раној апоптози, док су HeLa-CD-400 у касној апоптози или некрози, очекивано је да се њихове морфологије разликују. На AFM сликама HeLa-ZnO-40 ћелија могу се уочити две суб-популације ћелија различите морфологије: ћелије овалног и округлог облика. Иако овалне третиране ћелије на први поглед изгледају као контролне, запажа се да је њихова висина већа и да је облик унеколико промењен, као и да границе једра више нису строго дефинисане. Површинска храпавост ових ћелија такође је значајно већа него код контролних. Таква морфологија би се могла довести у везу са самим почетком апоптотских процеса, када почиње пуњење ћелијске мембране, што би објаснило повећану просечну висину и храпавост [218, 233]. У другој суб-популацији, ћелије су већ округлог облика и адхезија за површину је смањена, једарни и цитоплазматски садржај делимично деградиран, а пуњење ћелије је резултовало формирањем апоптотских тела [233, 334]. Овалне ћелије су у том случају прелазна форма између неизмењених и драстично измењених (округлих) ћелија. Међутим, не може се искључити ни постојање различитих типова или комбинација типова ћелијске смрти међу HeLa-ZnO-40 ћелијама. На пример, овалне третиране ћелије би могле представљати и ћелије у аутофагији, повећане висине и храпавости због формирања аутофагних везикула и увећавања појединих органа [335]. Раније је показано да наночестице ZnO могу изазвати аутофагију [313, 314]. Појава руптура у ћелијској мембрани упућује и на облике ћелијске смрти по типу некрозе, међутим, с обзиром да се руптуре уочавају и на контролним ћелијама, и да је у другом експерименту бојење пропидијум јодидом HeLa-ZnO-40 ћелија показало да је интегритет ћелијских мембрана након третмана очуван, руптуре су највероватније артефакт припреме узорка, па некротски типови смрти у овом случају нису разматрани.

AFM мерења HeLa-ZnO-40 ћелија предочавају проблеме које уводи фиксирање ћелија у проучавање њихове морфологије. Оштећења мембране контролних ћелија ометају праћење промена на мембранама третираних ћелија, тј. разликовање руптура на мембрани индукованих фиксативом и наночестицама. Иако су ове ћелије фиксирани на исти начин као у експерименту у ком је проучаван утицај наночестица CeO₂, ефекат је драстично другачији. Мале и током рада често неприметне варијације у протоколу за фиксирање могу довести до драматично различитих исхода фиксирања [336, 337]. Мада је често захтевно за организацију (потребно је да иста или просторно блиске лабораторије располажу опремом за гајење ћелија у култури и AFM мерења), најпожљније и најинформативније је AFM мерења изводити на живим уместо на фиксираним ћелијама [218].

Иако је због свега наведеног уочене морфолошке промене тешко недвосмислено повезати са (пато)физиолошким догађајима у ћелији, недвосмислени резултат ове студије је да се просечна површинска храпавост ћелија може користити као показатељ ефеката наночестица ZnO, као и CeO₂, без обзира на општу морфолошку нехомогеност третираних ћелија.

AFM мерења на живим ћелијама спрегнута са Рамановом спектроскопијом значајно би допринела разумевању спектралног „отиска“ ефеката наночестица на ћелије, што би у целини водило методолошком напретку у испитивању цитотоксичног дејства наночестица и његових механизма.

Када се сумира претходно изложено, следећи закључци се могу извести. Наночестице CeO₂ обложене декстраном делују цитотоксично на HeLa (туморске) и MRC-5 (неизмењене) ћелије. Необложене наночестице CeO₂ склоне су агломерацији која драстично умањује њихове ефекте на ћелије и отежава проучавање ефеката. Ипак, Раманова спектроскопија омогућила је да се дати ефекти необложених CeO₂ наночестица уоче и опишу на одговарајућим дозама наночестица, на којима конвенционалне методе за праћење цитотоксичности нису регистровале уопште или су регистровале веома мале промене. Наночестице ZnO су високоцитотоксичне за оба типа ћелија, а посебно за MRC-5. Захваљујући својој недвосмисленој токсичности и индуковању апоптозе, наночестице ZnO су помогле да се одреде маркери апоптотских промена у Рамановим спектрима третираних ћелија.

Заједничке промене за све Раманове спектре ћелија третираних цитотоксичним дозама наночестица су пад интензитета модова нуклеинских киселина и протеина и пораст интензитета липидних Раманових модова. Све наведене промене сразмерне су употребљеној цитотоксичној дози декстраном обложених CeO₂ односно ZnO наночестица. Између спектра ћелија третираних различитим дозама уочавају се разлике које указују на квалитативне промене повезане са ендоцитозом наночестица и догађајима у процесу ћелијске смрти, а односе се на све три главне групе ћелијских макромолекула: нуклеинске киселине, протеине и липиде. Посебно су истакнуте разлике у маркерима незасићености липида и фосфатидилсерина, чији интензитет код мање токсичних доза расте, а код најтоксичнијих се редукује. Такође се јављају разлике у протеинској структури и интензитету Рамановог мода који је повезан са РНК.

Морфолошке промене које се помоћу AFM микроскопије уочавају се разликују код ћелија третираних различитим врстама наночестица. Разлике се могу повезати са различитим фазама и типовима ћелијске смрти, чиме указују на различите механизме деловања ZnO и CeO₂ наночестица. Повећање површинске храпавости ћелија третираних наночестицама, без обзира на њихове остале морфолошке карактеристике, у овој студији се показало као маркер цитотоксичног дејства обе врсте наночестица.

Дефинисање маркера цитотоксичности наночестица, пре свега промена интензитета два Раманова мода чији однос показује степен незасићености липида (I_{1270}/I_{1300}), а који се на исти начин мења код оба типа ћелија и наночестица, важан је резултат ове студије и носи потенцијал за даљи методолошки развој примене Раманове спектроскопије у праћењу цитотоксичности наночестица. Са методолошке стране, важни закључци ове студије су и потреба за вишеструким PCA анализама, „*multiway*“ и „*pairwise*“ типа, којима се разјашњавају неодоумице и избегавају погрешни трагови на које би нас само једна PCA могла навести, као и изузетна практична корист од употребе у спектроскопији досад ретко коришћене ненегативне PCA. Коначно, показано је да AFM микроскопија има потенцијал бољег упознавања ефеката и механизма дејстава

наночестица, као и бољег разумевања промена у ћелијским вибрационим спектрима, посебно оних који се односе на мембранске структуре.

6. Закључци

- Необложене наночестице CeO_2 остварују слаб ефекат на HeLa и MRC-5 ћелије, који се при дозама примењеним у овој студији региструје као пад метаболичке активности на $>85\%$ у односу на контролу.
- Облагање наночестица CeO_2 декстраном спречава њихову агломерацију. Тако обложене наночестице остварују знатно јачи ефекат на HeLa и MRC-5 ћелије од необложених. Примењене у истом опсегу доза као необложене, оне смањују метаболичку активност на $<10\%$ у односу на контролу и доводе до апоптозе код $>50\%$ ћелија у култури.
- Све примењене методе, укључујући Раманову спектроскопију, сагласно указују на већу осетљивост MRC-5 него HeLa ћелија на наночестице ZnO. Већа осетљивост може бити повезана са већим садржајем несатурисаних, оксидацији подложнијих липида у MRC-5 ћелијама, који је такође показан у Рамановим спектрима.
- Промене митохондријалне активности третираних ћелија драстичније су и региструју се углавном при нижим дозама наночестица него промене у ћелијском расту, што указује да се механизам деловања наночестица CeO_2 и ZnO остварује преко утицаја на митохондријалну активност.
- За HeLa ћелије третиране наночестицама **CD-CeO₂** (400 $\mu\text{g/ml}$) показано је смањење ћелијског раста (36 %), пад метаболичке активности (8 %) и касна апоптоза/некроза у 80 % ћелија. Раманови спектри указују на смањење садржаја нуклеинских киселина, повећање садржаја липида и већи садржај протеинске конформације карактерисане променом интензитета Рамановог мода на 1670 cm^{-1} у односу на контролу. На AFM сликама видљиве су бројне руптуре ћелијске мембране, повећана површинска храпавост, фрагментисане цитоплазматске протрузије и „ћелијске четкице“, недефинисане границе слабо израженог једра са бројним и фрагментисаним једарцима.
- За HeLa ћелије третиране наночестицама **SPRT-CeO₂** (400 $\mu\text{g/ml}$) нису показане промене у ћелијском расту и метаболичкој активности, а 2 % ћелија је у касној апоптози/некрози. Раманови спектри указују на смањење садржаја нуклеинских киселина, повећање садржаја липида и повећање садржаја протеинске конформације коју карактерише изражен мод на 1670 cm^{-1} , али и знатно израженији мод на 1630 cm^{-1} . Због прекривености ћелије кластерима наночестица, AFM слике не носе пуно информација. Показују ендоцитотска улегнућа на мембрани и смањену максималну висину ћелије, која може бити последица деградације хроматина.
- За MRC-5 ћелије третиране наночестицама **CD-CeO₂** (200 $\mu\text{g/ml}$ и 400 $\mu\text{g/ml}$) показано је дозно-зависно смањење ћелијског раста (67 % / 29 %), дозно-зависно смањење метаболичке активности (32 % / 10 %); при нижој дози 14 % ћелија је у раној апоптози; при вишој дози 55 % ћелија је у касној апоптози/некрози. Раманови спектри указују на дозно-зависно смањење садржаја нуклеинских киселина и протеина и повећање садржаја липида. Код ниже дозе посебно су изражени маркери незасићености липида, фосфатидилсерина и неуређености липидних ланаца. Код више дозе наглашено је смањење интензитета Рамановог мода на 813 cm^{-1} повезаног са деградацијом РНК.

- За **MRC-5** третиране наночестицама **SPRT-CeO₂** (400 µg/ml и 800 µg/ml) показано је дозно-зависно смањење метаболичке активности (91 % / 88 %) и касна апоптоза/некроза код 2 % ћелија. Раманови спектри у вискофреквентном региону указују на дозно-зависно повећање односа садржаја липида према садржају протеина. Нискофреквентни регион код ниже дозе указује на пораст садржаја липида без одлика фосфатидилсерина. Код више дозе нискофреквентни регион показује специфичне промене највероватније повезане са променом структуре протеина.
- За **HeLa** ћелије третиране наночестицама **ZnO** (40 µg/ml) показано је смањење ћелијског раста (45 %), смањење метаболичке активности (3 %) и рана апоптоза код 7 % ћелија. Раманови спектри указују на пораст садржаја липида високе незасићености, који имају велику сличност са фосфатидилсерином, смањење садржаја нуклеинских киселина, смањење садржаја протеина и промену протеинске структуре. AFM слике упућују на ћелије у различитим фазама формирања апоптотских тела и/или аутофагозома, уз недвосмислено повећање просечне површинске храпавости ћелије.
- За **MRC-5** ћелије третиране наночестицама **ZnO** (20 µg/ml и 40 µg/ml) показано је: дозно-зависно смањење ћелијског раста (на 84 % / 20 % у односу на контролу), дозно-зависно смањење метаболичке активности (на 20 % / 3 %); код ниже дозе 88 % ћелија у раној апоптози; код више дозе 55 % ћелија у раној апоптози и 41 % у касној апоптози/некрози. Раманови спектри код ниже дозе показују исте промене као код HeLa-ZnO-40. Код више дозе редуковани су маркери незасићености липида и фосфатидилсерина.
- Нискофреквентни спектрални регион успешно показује дозно-зависне разлике између ћелија третираних наночестицама, посебно преко промене односа интензитета липидних модова.
- Као маркери за праћење цитотоксичног ефекта наночестица могу се користити: пад Раманових модова нуклеинских киселина, посебно на $\sim 785\text{ cm}^{-1}$, а довољно поуздано и на $\sim 1092\text{ cm}^{-1}$, $\sim 1337\text{ cm}^{-1}$ и $\sim 1580\text{ cm}^{-1}$; пораст интензитета липидног Рамановог мода на $\sim 2850\text{ cm}^{-1}$; пораст односа интензитета претежно липидног мода на 2850 cm^{-1} и претежно протеинског мода на 2930 cm^{-1} , I_{-2850}/I_{-2930} .
- Маркери незасићености липида у Рамановим спектрима, посебно I_{-1270}/I_{-1300} , а најчешће и I_{-1650}/I_{-1440} , у вези су са фазом ћелијске смрти у којој се третиране ћелије налазе. Најинтензивнији су у раној апоптози. Вредности ових маркера не могу се пратити у самим Рамановим спектрима због преклапања са другим модовима, већ се до њих долази преко РСА анализе.
- РСА Раманових спектра ћелија у раној апоптози издваја компоненте са обележјима фосфатидилсерина. Код ћелија у каснијим фазама апоптозе обележја фосфатидилсерина слабе.
- На основу липидних модова издвојених кроз РСА може се стећи бољи увид у промене фосфолипидног састава (посебно регион $(800-1000)\text{ cm}^{-1}$), уређености липида (I_{1064}/I_{1080}) и дужине липидних ланаца (позиција мода на $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$), што је повезано са различитим мембранским структурама које се дејством наночестица формирају или ремоделирају: раних и касних ендцитотских везикула, липидних капи, пупљења ћелијске мембране, апоптотских тела.
- Високофреквентни спектрални регион $\sim (2600-3700)\text{ cm}^{-1}$ подједнако успешно, а у неким случајевима и успешније од нискофреквентног, показује разлике између третираних и контролних ћелија. Недостатак овог региона је неспецифичност Раманових модова које

садржи, па се могу регистровати само промене у квантитативном односу укупног липидног и протеинског садржаја у ћелији. Заједничко за све ћелије са смањеном вијабилношћу је пораст липидног у односу на протеински садржај представљен променама у високофреквентном региону. Овај регион се ретко може искористити за разликовање ћелија третираних различитим цитотоксичним дозама наночестица.

- Предност РСА више група Раманових спектра измерених на ћелијама третираним различитим дозама наночестица (тзв. „*multiway*“ приступ) је поређење дозно-зависног интензитета заједничких промена на заједничкој скали. Предност РСА парова група (тзв. „*pairwise*“ приступ) је откривање квалитативних разлика у променама појединачних група преко промена односа интензитета пикова у главним компонентама, а такође и детектовање промена код група које се слабије разликују од контроле. Најкомплетнију слику ефеката наночестица на ћелије даје комбинација ова два приступа.
- Нестандардна варијанта РСА, ненегативна РСА, се показала посебно погодном за анализу разлика између ћелијских Раманових спектра, будући да је у главним компонентама којима је резултовала било лако препознати карактеристике Раманових спектра одређених молекула, посебно липида.
- Однос интензитета I_{1270}/I_{1300} у компоненти РС1 је потенцијални семи-квантитативни параметар за праћење цитотоксичности наночестица помоћу Раманове спектроскопије.
- Промене на ћелијама изазване дејством наночестица које се могу пратити АФМ микроскопијом обухватају деградацију једарног садржаја и разнолике промене на ћелијској мембрани: формирање ендозома, апоптотских тела, промене гликокаликса и цитоплазматских протрузија, губљење интегритета мембране.
- Повећање просечне храпавости ћелије измерене помоћу АФМ-а је поузданији параметар за праћење утицаја наночестица него промена просечне или максималне висине ћелије.
- Уколико се на површини ћелијске мембране формирају велики кластери наночестица, АФМ слике третираних ћелија неће бити информативне.
- При фиксацији ћелија за АФМ мерења мало одступање од оптималног протокола може имати последице на квалитет резултата. Идеално би било мерења вршити на живим, нефиксираним ћелијама.

Литература

- [1] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, F. Rizzolio, The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine, *Molecules*, 25 (2019).
- [2] K. Reed, A. Cormack, A. Kulkarni, M. Mayton, D. Sayle, F. Klaessig, B. Stadler, Exploring the properties and applications of nanoceria: is there still plenty of room at the bottom?, *Environmental Science: Nano*, 1 (2014) 390-405.
- [3] R. Foulkes, E. Man, J. Thind, S. Yeung, A. Joy, C. Hoskins, The regulation of nanomaterials and nanomedicines for clinical application: current and future perspectives, *Biomaterials Science*, 8 (2020) 4653-4664.
- [4] F. Corsi, F. Caputo, E. Traversa, L. Ghibelli, Not Only Redox: The Multifaceted Activity of Cerium Oxide Nanoparticles in Cancer Prevention and Therapy, *Frontiers in Oncology*, 8 (2018).
- [5] P. Kambhampati, Nanoparticles, Nanocrystals, and Quantum Dots: What are the Implications of Size in Colloidal Nanoscale Materials?, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 12 (2021) 4769-4779.
- [6] A.J. Heinrich, W.D. Oliver, L.M.K. Vandersypen, A. Ardavan, R. Sessoli, D. Loss, A.B. Jayich, J. Fernandez-Rossier, A. Laucht, A. Morello, Quantum-coherent nanoscience, *Nature Nanotechnology*, 16 (2021) 1318-1329.
- [7] N. Thakur, P. Manna, J. Das, Synthesis and biomedical applications of nanoceria, a redox active nanoparticle, *Journal of Nanobiotechnology*, 17 (2019) 84.
- [8] M. Mahmoudi, M.P. Landry, A. Moore, R. Coreas, The protein corona from nanomedicine to environmental science, *Nature Reviews Materials*, (2023).
- [9] F.S.M. Tekie, M. Hajiramezanali, P. Geramifar, M. Raoufi, R. Dinarvand, M. Soleimani, F. Atyabi, Controlling evolution of protein corona: a prosperous approach to improve chitosan-based nanoparticle biodistribution and half-life, *Scientific Reports*, 10 (2020) 9664.
- [10] D.F. Moyano, K. Saha, G. Prakash, B. Yan, H. Kong, M. Yazdani, V.M. Rotello, Fabrication of Corona-Free Nanoparticles with Tunable Hydrophobicity, *ACS Nano*, 8 (2014) 6748-6755.
- [11] N. Tuccitto, L. Riela, A. Zammataro, L. Spitaleri, G. Li-Destri, G. Sfuncia, G. Nicotra, A. Pappalardo, G. Capizzi, G. Trusso Sfrassetto, Functionalized Carbon Nanoparticle-Based Sensors for Chemical Warfare Agents, *ACS Applied Nano Materials*, 3 (2020) 8182-8191.
- [12] N. Babu Varukattu, W. Lin, R. Vivek, C. Rejeeth, S. Sabarathinam, Z. Yao, H. Zhang, Targeted and Intrinsic Activity of HA-Functionalized PEI-Nanoceria as a Nano Reactor in Potential Triple-Negative Breast Cancer Treatment, *ACS Applied Bio Materials*, 3 (2020) 186-196.
- [13] R. Thiruppathi, S. Mishra, M. Ganapathy, P. Padmanabhan, B. Gulyás, Nanoparticle Functionalization and Its Potentials for Molecular Imaging, *Advanced science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, 4 (2017) 1600279.
- [14] C. Cole, T. Shyr, H. Ou-Yang, Metal oxide sunscreens protect skin by absorption, not by reflection or scattering, *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 32 (2016) 5-10.

- [15] M.A. Shalaby, M.M. Anwar, H. Saeed, Nanomaterials for application in wound Healing: current state-of-the-art and future perspectives, *Journal of Polymer Research*, 29 (2022) 91.
- [16] R. Schenk, The Corrosion Properties of Titanium and Titanium Alloys, in: D.M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen (Eds.) *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2001, pp. 145-170.
- [17] C. Chen, J. Ge, Y. Gao, L. Chen, J. Cui, J. Zeng, M. Gao, Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles: A next generation contrast agent for magnetic resonance imaging, *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 14 (2022) e1740.
- [18] U. Kadiyala, N.A. Kotov, J.S. VanEpps, Antibacterial Metal Oxide Nanoparticles: Challenges in Interpreting the Literature, *Current pharmaceutical design*, 24 (2018) 896-903.
- [19] R. Augustine, A.P. Mathew, A. Sosnik, Metal Oxide Nanoparticles as Versatile Therapeutic Agents Modulating Cell Signaling Pathways: Linking Nanotechnology with Molecular Medicine, *Applied Materials Today*, 7 (2017) 91-103.
- [20] A.B. Sengul, E. Asmatulu, Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles: a review, *Environmental Chemistry Letters*, 18 (2020) 1659-1683.
- [21] C. Xu, X. Qu, Cerium oxide nanoparticle: a remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications, *NPG Asia Materials*, 6 (2014) e90-e90.
- [22] C. Bouzigues, T. Gacoin, A. Alexandrou, Biological Applications of Rare-Earth Based Nanoparticles, *ACS Nano*, 5 (2011) 8488-8505.
- [23] M.-L. Avramescu, M. Chénier, S. Beauchemin, P. Rasmussen, Dissolution Behaviour of Metal-Oxide Nanomaterials in Various Biological Media, *Nanomaterials*, 13 (2023) 26.
- [24] H.W. Song, C.S. Lee, D.G. Kim, K. No, Characterization of CeO₂ thin films as insulator of metal ferroelectric insulator semiconductor (MFIS) structures, *Thin Solid Films*, 368 (2000) 61-66.
- [25] R.K. Hailstone, A.G. DiFrancesco, J.G. Leong, T.D. Allston, K.J. Reed, A Study of Lattice Expansion in CeO₂ Nanoparticles by Transmission Electron Microscopy, *The Journal of Physical Chemistry C*, 113 (2009) 15155-15159.
- [26] K.R.B. Singh, V. Nayak, T. Sarkar, R.P. Singh, Cerium oxide nanoparticles: properties, biosynthesis and biomedical application, *RSC Advances*, 10 (2020) 27194-27214.
- [27] S.C. Kuiry, S.D. Patil, S. Deshpande, S. Seal, Spontaneous self-assembly of cerium oxide nanoparticles to nanorods through supraaggregate formation, *The journal of physical chemistry. B*, 109 (2005) 6936-6939.
- [28] N. Sabari Arul, D. Mangalaraj, P.C. Chen, N. Ponpandian, C. Viswanathan, Self assembly of Co doped CeO₂ microspheres from nanocubes by hydrothermal method and their photodegradation activity on AO7, *Materials Letters*, 65 (2011) 3320-3322.
- [29] S. Yang, L. Gao, Controlled Synthesis and Self-Assembly of CeO₂ Nanocubes, *Journal of the American Chemical Society*, 128 (2006) 9330-9331.
- [30] T. Yokoyama, Chapter 1 - Basic Properties and Measuring Methods of Nanoparticles, in: M. Naito, T. Yokoyama, K. Hosokawa, K. Nogi (Eds.) *Nanoparticle Technology Handbook (Third Edition)*, Elsevier, 2018, pp. 3-47.

- [31] F. Esch, S. Fabris, L. Zhou, T. Montini, C. Africh, P. Fornasiero, G. Comelli, R. Rosei, Electron localization determines defect formation on ceria substrates, *Science (New York, N.Y.)*, 309 (2005) 752-755.
- [32] C.T. Campbell, C.H.F. Peden, Oxygen Vacancies and Catalysis on Ceria Surfaces, *Science (New York, N.Y.)*, 309 (2005) 713-714.
- [33] Y. Ma, W. Gao, Z. Zhang, S. Zhang, Z. Tian, Y. Liu, J.C. Ho, Y. Qu, Regulating the surface of nanoceria and its applications in heterogeneous catalysis, *Surface Science Reports*, 73 (2018) 1-36.
- [34] C. Walkey, S. Das, S. Seal, J. Erlichman, K. Heckman, L. Ghibelli, E. Traversa, J.F. McGinnis, W.T. Self, Catalytic properties and biomedical applications of cerium oxide nanoparticles, *Environmental Science: Nano*, 2 (2015) 33-53.
- [35] B.H. Chen, B. Stephen Inbaraj, Various physicochemical and surface properties controlling the bioactivity of cerium oxide nanoparticles, *Critical reviews in biotechnology*, 38 (2018) 1003-1024.
- [36] E. Shoko, M.F. Smith, R.H. McKenzie, Charge distribution near bulk oxygen vacancies in cerium oxides, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 22 (2010) 223201.
- [37] T.S. Cam, S.O. Omarov, M.I. Chebanenko, S.G. Izotova, V.I. Popkov, Recent progress in the synthesis of CeO₂-based nanocatalysts towards efficient oxidation of CO, *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 7 (2022) 100399.
- [38] J. Li, Z. Zhang, Z. Tian, X. Zhou, Z. Zheng, Y. Ma, Y. Qu, Low pressure induced porous nanorods of ceria with high reducibility and large oxygen storage capacity: synthesis and catalytic applications, *Journal of Materials Chemistry A*, 2 (2014) 16459-16466.
- [39] M. Pešić, A. Podolski-Renić, S. Stojković, B. Matović, D. Zmejkoski, V. Kojić, G. Bogdanović, A. Pavićević, M. Mojović, A. Savić, I. Milenković, A. Kalauzi, K. Radotić, Anti-cancer effects of cerium oxide nanoparticles and its intracellular redox activity, *Chemico-biological interactions*, 232 (2015) 85-93.
- [40] H.-W. He, X.-Q. Wu, W. Ren, P. Shi, X. Yao, Z.-T. Song, Synthesis of crystalline cerium dioxide hydrosol by a sol-gel method, *Ceramics International*, 38 (2012) S501-S504.
- [41] M. Connolly, D. Hernández-Moreno, E. Conde, A. Garnica, J.M. Navas, F. Torrent, I. Rucandio, M.L. Fernandez-Cruz, Influence of citrate and PEG coatings on the bioaccumulation of TiO₂ and CeO₂ nanoparticles following dietary exposure in rainbow trout, *Environmental Sciences Europe*, 34 (2022) 1.
- [42] A.S. Karakoti, S.V.N.T. Kuchibhatla, K.S. Babu, S. Seal, Direct Synthesis of Nanoceria in Aqueous Polyhydroxyl Solutions, *The Journal of Physical Chemistry C*, 111 (2007) 17232-17240.
- [43] M. Darroudi, M. Sarani, R. Kazemi Oskuee, A. Khorsand Zak, H.A. Hosseini, L. Gholami, Green synthesis and evaluation of metabolic activity of starch mediated nanoceria, *Ceramics International*, 40 (2014) 2041-2045.
- [44] S.N. Patil, J.S. Paradeshi, P.B. Chaudhari, S.J. Mishra, B.L. Chaudhari, Bio-therapeutic Potential and Cytotoxicity Assessment of Pectin-Mediated Synthesized Nanostructured Cerium Oxide, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180 (2016) 638-654.
- [45] A. Arumugam, C. Karthikeyan, A.S. Haja Hameed, K. Gopinath, S. Gowri, V. Karthika, Synthesis of cerium oxide nanoparticles using *Gloriosa superba* L. leaf extract and their structural, optical and antibacterial properties, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 49 (2015) 408-415.

- [46] Q. Maqbool, M. Nazar, S. Naz, T. Hussain, N. Jabeen, R. Kausar, S. Anwaar, F. Abbas, T. Jan, Antimicrobial potential of green synthesized CeO₂ nanoparticles from *Olea europaea* leaf extract, *International journal of nanomedicine*, 11 (2016) 5015-5025.
- [47] M. Darroudi, S.J. Hoseini, R. Kazemi Oskuee, H.A. Hosseini, L. Gholami, S. Gerayli, Food-directed synthesis of cerium oxide nanoparticles and their neurotoxicity effects, *Ceramics International*, 40 (2014) 7425-7430.
- [48] C. Zhou, X. Xu, L. Dai, H. Gong, S. Lin, Chemical-mechanical polishing performance of core-shell structured polystyrene@ceria/nanodiamond ternary abrasives on sapphire wafer, *Ceramics International*, 47 (2021) 31691-31701.
- [49] S. Samiee, E.K. Goharshadi, Effects of different precursors on size and optical properties of ceria nanoparticles prepared by microwave-assisted method, *Materials Research Bulletin*, 47 (2012) 1089-1095.
- [50] H. Jung, D.B. Kittelson, M.R. Zachariah, The influence of a cerium additive on ultrafine diesel particle emissions and kinetics of oxidation, *Combustion and Flame*, 142 (2005) 276-288.
- [51] R.V. Mangalaraja, S. Ananthakumar, A. Schachtsiek, M. López, C.P. Camurri, R.E. Avila, Synthesis and mechanical properties of low temperature sintered, Sm³⁺ doped nanoceria electrolyte membranes for IT-SOFC applications, *Materials Science and Engineering: A*, 527 (2010) 3645-3650.
- [52] R.A. Madero-Visbal, B.E. Alvarado, J.F. Colon, C.H. Baker, M.S. Wason, B. Isley, S. Seal, C.M. Lee, S. Das, R. Mañon, Harnessing nanoparticles to improve toxicity after head and neck radiation, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 8 (2012) 1223-1231.
- [53] J.L.Y. Tang, S.S. Moonshi, H.T. Ta, Nanoceria: an innovative strategy for cancer treatment, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 80 (2023) 46.
- [54] M. Das, S. Patil, N. Bhargava, J.F. Kang, L.M. Riedel, S. Seal, J.J. Hickman, Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons, *Biomaterials*, 28 (2007) 1918-1925.
- [55] A. Pinna, M. Torki Baghbaderani, V. Vigil Hernández, P. Naruphontjirakul, S. Li, T. McFarlane, D. Hachim, M.M. Stevens, A.E. Porter, J.R. Jones, Nanoceria provides antioxidant and osteogenic properties to mesoporous silica nanoparticles for osteoporosis treatment, *Acta Biomaterialia*, 122 (2021) 365-376.
- [56] M.A. Damle, V.G. Shetty, A.P. Jakhade, R. Kaul-Ghanekar, R.C. Chikate, Bi-functional nature of nanoceria: pro-drug and drug-carrier potentiality towards receptor-mediated targeting of doxorubicin, *New Journal of Chemistry*, 44 (2020) 17013-17026.
- [57] A. Hayat, J. Cunningham, G. Bulbul, S. Andreescu, Evaluation of the oxidase like activity of nanoceria and its application in colorimetric assays, *Analytica Chimica Acta*, 885 (2015) 140-147.
- [58] Y.W. Hartati, S.N. Topkaya, S. Gaffar, H.H. Bahti, A.E. Cetin, Synthesis and characterization of nanoceria for electrochemical sensing applications, *RSC Adv*, 11 (2021) 16216-16235.
- [59] R.A. Yokel, S. Hussain, S. Garantziotis, P. Demokritou, V. Castranova, F.R. Cassee, The yin: an adverse health perspective of nanoceria: uptake, distribution, accumulation, and mechanisms of its toxicity, *Environmental Science: Nano*, 1 (2014) 406-428.
- [60] V. Singh, S. Singh, S. Das, A. Kumar, W.T. Self, S. Seal, A facile synthesis of PLGA encapsulated cerium oxide nanoparticles: release kinetics and biological activity, *Nanoscale*, 4 (2012) 2597-2605.

- [61] S. Patil, A. Sandberg, E. Heckert, W. Self, S. Seal, Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential, *Biomaterials*, 28 (2007) 4600-4607.
- [62] J.A. Vassie, J.M. Whitelock, M.S. Lord, Endocytosis of cerium oxide nanoparticles and modulation of reactive oxygen species in human ovarian and colon cancer cells, *Acta Biomater*, 50 (2017) 127-141.
- [63] J. Das, Y.-J. Choi, J.W. Han, A.M.M.T. Reza, J.-H. Kim, Nanoceria-mediated delivery of doxorubicin enhances the anti-tumour efficiency in ovarian cancer cells via apoptosis, *Scientific Reports*, 7 (2017) 9513.
- [64] N. Feng, Y. Liu, X. Dai, Y. Wang, Q. Guo, Q. Li, Advanced applications of cerium oxide based nanozymes in cancer, *RSC Advances*, 12 (2022) 1486-1493.
- [65] Z. Wang, X. Shen, X. Gao, Y. Zhao, Simultaneous enzyme mimicking and chemical reduction mechanisms for nanoceria as a bio-antioxidant: a catalytic model bridging computations and experiments for nanozymes, *Nanoscale*, 11 (2019) 13289-13299.
- [66] M. Ganesana, J.S. Erlichman, S. Andreescu, Real-time monitoring of superoxide accumulation and antioxidant activity in a brain slice model using an electrochemical cytochrome c biosensor, *Free radical biology & medicine*, 53 (2012) 2240-2249.
- [67] A. Karakoti, S. Singh, J.M. Dowding, S. Seal, W.T. Self, Redox-active radical scavenging nanomaterials, *Chemical Society Reviews*, 39 (2010) 4422-4432.
- [68] X. Zhou, L.L. Wong, A.S. Karakoti, S. Seal, J.F. McGinnis, Nanoceria inhibit the development and promote the regression of pathologic retinal neovascularization in the Vldlr knockout mouse, *PloS one*, 6 (2011) e16733.
- [69] M.H. Kuchma, C.B. Komanski, J. Colon, A. Teblum, A.E. Masunov, B. Alvarado, S. Babu, S. Seal, J. Summy, C.H. Baker, Phosphate ester hydrolysis of biologically relevant molecules by cerium oxide nanoparticles, *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 6 (2010) 738-744.
- [70] I. Celardo, J.Z. Pedersen, E. Traversa, L. Ghibelli, Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles, *Nanoscale*, 3 (2011) 1411-1420.
- [71] P. Nicholls, Classical catalase: ancient and modern, *Archives of biochemistry and biophysics*, 525 (2012) 95-101.
- [72] R. Singh, S. Singh, Role of phosphate on stability and catalase mimetic activity of cerium oxide nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 132 (2015) 78-84.
- [73] T. Pirmohamed, J.M. Dowding, S. Singh, B. Wasserman, E. Heckert, A.S. Karakoti, J.E. King, S. Seal, W.T. Self, Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity, *Chemical communications (Cambridge, England)*, 46 (2010) 2736-2738.
- [74] A.S. Karakoti, S. Singh, A. Kumar, M. Malinska, S.V.N.T. Kuchibhatla, K. Wozniak, W.T. Self, S. Seal, PEGylated Nanoceria as Radical Scavenger with Tunable Redox Chemistry, *Journal of the American Chemical Society*, 131 (2009) 14144-14145.
- [75] Y. Xue, Q. Luan, D. Yang, X. Yao, K. Zhou, Direct Evidence for Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Cerium Oxide Nanoparticles, *The Journal of Physical Chemistry C*, 115 (2011) 4433-4438.
- [76] R.N. McCormack, P. Mendez, S. Barkam, C.J. Neal, S. Das, S. Seal, Inhibition of Nanoceria's Catalytic Activity due to Ce³⁺ Site-Specific Interaction with Phosphate Ions, *The Journal of Physical Chemistry C*, 118 (2014) 18992-19006.

- [77] B. Liu, Z. Huang, J. Liu, Boosting the oxidase mimicking activity of nanoceria by fluoride capping: rivaling protein enzymes and ultrasensitive F⁻ detection, *Nanoscale*, 8 (2016) 13562-13567.
- [78] A. Asati, S. Santra, C. Kaittanis, S. Nath, J.M. Perez, Oxidase-like activity of polymer-coated cerium oxide nanoparticles, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 48 (2009) 2308-2312.
- [79] G. Pulido-Reyes, I. Rodea-Palomares, S. Das, T.S. Sakthivel, F. Leganes, R. Rosal, S. Seal, F. Fernández-Piñas, Untangling the biological effects of cerium oxide nanoparticles: the role of surface valence states, *Scientific Reports*, 5 (2015) 15613.
- [80] M.M. Sozarukova, E.V. Proskurnina, A.L. Popov, A.L. Kalinkin, V.K. Ivanov, New facets of nanozyme activity of ceria: lipo- and phospholipoperoxidase-like behaviour of CeO₂ nanoparticles, *RSC Advances*, 11 (2021) 35351-35360.
- [81] A. Dhall, A. Burns, J. Dowding, S. Das, S. Seal, W. Self, Characterizing the phosphatase mimetic activity of cerium oxide nanoparticles and distinguishing its active site from that for catalase mimetic activity using anionic inhibitors, *Environmental Science: Nano*, 4 (2017) 1742-1749.
- [82] M.J. Manto, P. Xie, C. Wang, Catalytic Dephosphorylation Using Ceria Nanocrystals, *ACS Catalysis*, 7 (2017) 1931-1938.
- [83] A.A. Vernekar, T. Das, G. Muges, Vacancy-Engineered Nanoceria: Enzyme Mimetic Hotspots for the Degradation of Nerve Agents, *Angewandte Chemie International Edition*, 55 (2016) 1412-1416.
- [84] E. Nourmohammadi, H. Khoshdel-Sarkarizi, R. Nedaenia, H.R. Sadeghnia, L. Hasanzadeh, M. Darroudi, R. Kazemi Oskuee, Evaluation of anticancer effects of cerium oxide nanoparticles on mouse fibrosarcoma cell line, *Journal of cellular physiology*, 234 (2019) 4987-4996.
- [85] S.K. Jana, P. Banerjee, S. Das, S. Seal, K. Chaudhury, Redox-active nanoceria depolarize mitochondrial membrane of human colon cancer cells, *Journal of Nanoparticle Research*, 16 (2014) 2441.
- [86] S. Mittal, A.K. Pandey, Cerium oxide nanoparticles induced toxicity in human lung cells: role of ROS mediated DNA damage and apoptosis, *BioMed research international*, 2014 (2014) 891934.
- [87] S. Hussain, F. Al-Nsour, A.B. Rice, J. Marshburn, B. Yingling, Z. Ji, J.I. Zink, N.J. Walker, S. Garantziotis, Cerium Dioxide Nanoparticles Induce Apoptosis and Autophagy in Human Peripheral Blood Monocytes, *ACS Nano*, 6 (2012) 5820-5829.
- [88] A. Datta, S. Mishra, K. Manna, K.D. Saha, S. Mukherjee, S. Roy, Pro-Oxidant Therapeutic Activities of Cerium Oxide Nanoparticles in Colorectal Carcinoma Cells, *ACS Omega*, 5 (2020) 9714-9723.
- [89] Y.F. Xiao, J.M. Li, S.M. Wang, X. Yong, B. Tang, M.M. Jie, H. Dong, X.C. Yang, S.M. Yang, Cerium oxide nanoparticles inhibit the migration and proliferation of gastric cancer by increasing DHX15 expression, *International journal of nanomedicine*, 11 (2016) 3023-3034.
- [90] G.-M. Lyu, Y.-J. Wang, X. Huang, H.-Y. Zhang, L.-D. Sun, Y.-J. Liu, C.-H. Yan, Hydrophilic CeO₂ nanocubes protect pancreatic β -cell line INS-1 from H₂O₂-induced oxidative stress, *Nanoscale*, 8 (2016) 7923-7932.
- [91] I. Kalashnikova, J. Mazar, C.J. Neal, A.L. Rosado, S. Das, T.J. Westmoreland, S. Seal, Nanoparticle delivery of curcumin induces cellular hypoxia and ROS-mediated apoptosis via modulation of Bcl-2/Bax in human neuroblastoma, *Nanoscale*, 9 (2017) 10375-10387.

- [92] M.S. Lord, B. Tsoi, C. Gunawan, W.Y. Teoh, R. Amal, J.M. Whitelock, Anti-angiogenic activity of heparin functionalised cerium oxide nanoparticles, *Biomaterials*, 34 (2013) 8808-8818.
- [93] G. Hao, Z.P. Xu, L. Li, Manipulating extracellular tumour pH: an effective target for cancer therapy, *RSC Advances*, 8 (2018) 22182-22192.
- [94] L. Rubio, R. Marcos, A. Hernández, Nanoceria acts as antioxidant in tumoral and transformed cells, *Chemico-biological interactions*, 291 (2018) 7-15.
- [95] E.J. Park, J. Choi, Y.K. Park, K. Park, Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells, *Toxicology*, 245 (2008) 90-100.
- [96] T. Xia, M. Kovochich, M. Liong, L. Mädler, B. Gilbert, H. Shi, J.I. Yeh, J.I. Zink, A.E. Nel, Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties, *ACS Nano*, 2 (2008) 2121-2134.
- [97] J. Liu, L.Y. Ye, W.H. Xiong, T. Liu, H. Yang, J. Lei, A cerium oxide@metal-organic framework nanoenzyme as a tandem catalyst for enhanced photodynamic therapy, *Chemical Communications*, 57 (2021) 2820-2823.
- [98] Z. Liu, P. Wan, M. Yang, F. Han, T. Wang, Y. Wang, Y. Li, Cell membrane camouflaged cerium oxide nanocubes for targeting enhanced tumor-selective therapy, *Journal of Materials Chemistry B*, 9 (2021) 9524-9532.
- [99] H.E. Ahmed, Y. Iqbal, M.H. Aziz, M. Atif, Z. Batool, A. Hanif, N. Yaqub, W.A. Farooq, S. Ahmad, A. Fatehmulla, H. Ahmad, Green Synthesis of CeO₂ Nanoparticles from the *Abelmoschus esculentus* Extract: Evaluation of Antioxidant, Anticancer, Antibacterial, and Wound-Healing Activities, *Molecules*, 26 (2021) 4659.
- [100] Z. Diaconeasa, D. Rugină, C. Coman, C. Socaciu, L.F. Leopold, A. Vulpoi, F. Tăbăran, M. Suci, A. Mesaroş, L.M. Popa, O.L. Pop, S. Simon, A. Pintea, New insights regarding the selectivity and the uptake potential of nanoceria by human cells, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 532 (2017) 132-139.
- [101] C.A. David, J. Galceran, C. Rey-Castro, J. Puy, E. Companys, J. Salvador, J. Monné, R. Wallace, A. Vakourov, Dissolution Kinetics and Solubility of ZnO Nanoparticles Followed by AGNES, *The Journal of Physical Chemistry C*, 116 (2012) 11758-11767.
- [102] J.W. Rasmussen, E. Martinez, P. Louka, D.G. Wingett, Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications, *Expert opinion on drug delivery*, 7 (2010) 1063-1077.
- [103] Z. Mirzaeifard, Z. Shariatinia, M. Jourshabani, S.M. Rezaei Darvishi, ZnO Photocatalyst Revisited: Effective Photocatalytic Degradation of Emerging Contaminants Using S-Doped ZnO Nanoparticles under Visible Light Radiation, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 59 (2020) 15894-15911.
- [104] F.A. Alharthi, A.A. Alghamdi, N. Al-Zaqri, H.S. Alanazi, A.A. Alsyaqi, A.E. Marghany, N. Ahmad, Facile one-pot green synthesis of Ag-ZnO Nanocomposites using potato peel and their Ag concentration dependent photocatalytic properties, *Scientific Reports*, 10 (2020) 20229.
- [105] A. Biswas, U. Kar, N.R. Jana, Cytotoxicity of ZnO nanoparticles under dark conditions via oxygen vacancy dependent reactive oxygen species generation, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 24 (2022) 13965-13975.

- [106] S.K. Sharma, P.K. Pujari, K. Sudarshan, D. Dutta, M. Mahapatra, S.V. Godbole, O.D. Jayakumar, A.K. Tyagi, Positron annihilation studies in ZnO nanoparticles, *Solid State Communications*, 149 (2009) 550-554.
- [107] I.A. Salem, Catalytic Decomposition of H₂O₂ over Supported ZnO, *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*, 131 (2000) 1139-1150.
- [108] F. Qu, P.C. Morais, Energy levels in metal oxide semiconductor quantum dots in water-based colloids, *The Journal of Chemical Physics*, 111 (1999) 8588-8594.
- [109] A. Tiwari, A. Prince, M. Arakha, S. Jha, M. Saleem, Passive membrane penetration by ZnO nanoparticles is driven by the interplay of electrostatic and phase boundary conditions, *Nanoscale*, 10 (2018) 3369-3384.
- [110] B. Dumontel, M. Canta, H. Engelke, A. Chiodoni, L. Racca, A. Ancona, T. Limongi, G. Canavese, V. Cauda, Enhanced biostability and cellular uptake of zinc oxide nanocrystals shielded with a phospholipid bilayer, *Journal of Materials Chemistry B*, 5 (2017) 8799-8813.
- [111] J. Yu, M. Baek, H.E. Chung, S.J. Choi, Effects of physicochemical properties of zinc oxide nanoparticles on cellular uptake, *Journal of Physics: Conference Series*, 304 (2011) 012007.
- [112] R.K. Sahoo, S. Rani, V. Kumar, U. Gupta, 17 - Zinc oxide nanoparticles for bioimaging and drug delivery, in: K. Awasthi (Ed.) *Nanostructured Zinc Oxide*, Elsevier, 2021, pp. 483-509.
- [113] M.S. Krishna, S. Singh, M. Batool, H.M. Fahmy, K. Seku, A.E. Shalan, S. Lanceros-Mendez, M.N. Zafar, A review on 2D-ZnO nanostructure based biosensors: from materials to devices, *Materials Advances*, 4 (2023) 320-354.
- [114] A. Czyżowska, A. Barbasz, A review: zinc oxide nanoparticles – friends or enemies?, *International Journal of Environmental Health Research*, 32 (2022) 885-901.
- [115] A. Sirelkhatim, S. Mahmud, A. Seenii, N.H.M. Kaus, L.C. Ann, S.K.M. Bakhori, H. Hasan, D. Mohamad, Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism, *Nano-micro letters*, 7 (2015) 219-242.
- [116] I. Rabani, S.-H. Lee, H.-S. Kim, J. Yoo, S. Hussain, T. Maqbool, Y.-S. Seo, Engineering-safer-by design ZnO nanoparticles incorporated cellulose nanofiber hybrid for high UV protection and low photocatalytic activity with mechanism, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9 (2021) 105845.
- [117] S. Sulaiman, S. Izman, M.B. Uday, M.F. Omar, Review on grain size effects on thermal conductivity in ZnO thermoelectric materials, *RSC Advances*, 12 (2022) 5428-5438.
- [118] G. Bisht, S. Rayamajhi, ZnO Nanoparticles: A Promising Anticancer Agent, *Nanobiomedicine*, 3 (2016) 9.
- [119] M. Esmaeillo, M. Moharamnejad, R. Hsankhani, A.A. Tehrani, H. Maadi, Toxicity of ZnO nanoparticles in healthy adult mice, *Environmental toxicology and pharmacology*, 35 (2013) 67-71.
- [120] R. Bengalli, M. Gualtieri, L. Capasso, C. Urani, M. Camatini, Impact of zinc oxide nanoparticles on an in vitro model of the human air-blood barrier, *Toxicology Letters*, 279 (2017) 22-32.
- [121] S. Jain, M. Rachamalla, A. Kulkarni, J. Kaur, K. Tikoo, Pulmonary fibrotic response to inhalation of ZnO nanoparticles and toluene co-exposure through directed flow nose only exposure chamber, *Inhalation Toxicology*, 25 (2013) 703-713.

- [122] Y.H. Mohamed, S.B. Deborah, H. Amy, G. Jeffrey, S.R. Michael, Noninvasive *in vivo* human multiphoton microscopy: a key method in proving nanoparticulate zinc oxide sunscreen safety, *Journal of Biomedical Optics*, 25 (2020) 014509.
- [123] M.D. Newman, M. Stotland, J.I. Ellis, The safety of nanosized particles in titanium dioxide- and zinc oxide-based sunscreens, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 61 (2009) 685-692.
- [124] Y. Ge, J.P. Schimel, P.A. Holden, Evidence for Negative Effects of TiO₂ and ZnO Nanoparticles on Soil Bacterial Communities, *Environmental Science & Technology*, 45 (2011) 1659-1664.
- [125] M. Ghosh, A. Jana, S. Sinha, M. Jothiramajayam, A. Nag, A. Chakraborty, A. Mukherjee, A. Mukherjee, Effects of ZnO nanoparticles in plants: Cytotoxicity, genotoxicity, deregulation of antioxidant defenses, and cell-cycle arrest, *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 807 (2016) 25-32.
- [126] S.S. Kumar, P. Venkateswarlu, V.R. Rao, G.N. Rao, Synthesis, characterization and optical properties of zinc oxide nanoparticles, *International Nano Letters*, 3 (2013) 30.
- [127] J.E. Rodríguez-Paéz, A.C. Caballero, M. Villegas, C. Moure, P. Durán, J.F. Fernández, Controlled precipitation methods: formation mechanism of ZnO nanoparticles, *Journal of the European Ceramic Society*, 21 (2001) 925-930.
- [128] W. Song, J. Zhang, J. Guo, J. Zhang, F. Ding, L. Li, Z. Sun, Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles, *Toxicol Lett*, 199 (2010) 389-397.
- [129] W. Lin, Y. Xu, C.-C. Huang, Y. Ma, K.B. Shannon, D.-R. Chen, Y.-W. Huang, Toxicity of nano- and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells, *Journal of Nanoparticle Research*, 11 (2009) 25-39.
- [130] M.W. Thompson, Regulation of zinc-dependent enzymes by metal carrier proteins, *BioMetals*, 35 (2022) 187-213.
- [131] C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, Counting the Zinc-Proteins Encoded in the Human Genome, *Journal of Proteome Research*, 5 (2006) 196-201.
- [132] M.J. Akhtar, M. Ahamed, S. Kumar, M.M. Khan, J. Ahmad, S.A. Alrokayan, Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species, *International journal of nanomedicine*, 7 (2012) 845-857.
- [133] K. Meyer, P. Rajanahalli, M. Ahamed, J.J. Rowe, Y. Hong, ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways, *Toxicology in Vitro*, 25 (2011) 1721-1726.
- [134] V. Sharma, D. Anderson, A. Dhawan, Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2), *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 17 (2012) 852-870.
- [135] J.-H. Kim, M.S. Jeong, D.-Y. Kim, S. Her, M.-B. Wie, Zinc oxide nanoparticles induce lipoxygenase-mediated apoptosis and necrosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Neurochemistry International*, 90 (2015) 204-214.
- [136] W.-S. Cho, R. Duffin, S.E.M. Howie, C.J. Scotton, W.A.H. Wallace, W. MacNee, M. Bradley, I.L. Megson, K. Donaldson, Progressive severe lung injury by zinc oxide nanoparticles; the role of Zn²⁺ dissolution inside lysosomes, *Particle and Fibre Toxicology*, 8 (2011) 27.

- [137] B. Wang, J. Zhang, C. Chen, G. Xu, X. Qin, Y. Hong, D.D. Bose, F. Qiu, Z. Zou, The size of zinc oxide nanoparticles controls its toxicity through impairing autophagic flux in A549 lung epithelial cells, *Toxicol Lett*, 285 (2018) 51-59.
- [138] D. Sahu, G.M. Kannan, R. Vijayaraghavan, Size-Dependent Effect of Zinc Oxide on Toxicity and Inflammatory Potential of Human Monocytes, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 77 (2014) 177-191.
- [139] P.J. Moos, K. Chung, D. Woessner, M. Honeggar, N.S. Cutler, J.M. Veranth, ZnO Particulate Matter Requires Cell Contact for Toxicity in Human Colon Cancer Cells, *Chemical Research in Toxicology*, 23 (2010) 733-739.
- [140] C.T. Ng, L.Q. Yong, M.P. Hande, C.N. Ong, L.E. Yu, B.H. Bay, G.H. Baeg, Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung fibroblasts and *Drosophila melanogaster*, *International journal of nanomedicine*, 12 (2017) 1621-1637.
- [141] A. Sirelkhatim, S. Mahmud, A. Seeni, N.H.M. Kaus, Preferential cytotoxicity of ZnO nanoparticle towards cervical cancer cells induced by ROS-mediated apoptosis and cell cycle arrest for cancer therapy, *Journal of Nanoparticle Research*, 18 (2016) 219.
- [142] K.M. Reddy, K. Feris, J. Bell, D.G. Wingett, C. Hanley, A. Punnoose, Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems, *Applied physics letters*, 90 (2007) 2139021-2139023.
- [143] W. Wu, J.M. Samet, D.B. Peden, P.A. Bromberg, Phosphorylation of p65 is required for zinc oxide nanoparticle-induced interleukin 8 expression in human bronchial epithelial cells, *Environmental health perspectives*, 118 (2010) 982-987.
- [144] C. Hanley, A. Thurber, C. Hanna, A. Punnoose, J. Zhang, D.G. Wingett, The Influences of Cell Type and ZnO Nanoparticle Size on Immune Cell Cytotoxicity and Cytokine Induction, *Nanoscale Research Letters*, 4 (2009) 1409.
- [145] J. Li, F. Cao, H.-l. Yin, Z.-j. Huang, Z.-t. Lin, N. Mao, B. Sun, G. Wang, Ferroptosis: past, present and future, *Cell Death & Disease*, 11 (2020) 88.
- [146] Y. Yang, Z. Song, W. Wu, A. Xu, S. Lv, S. Ji, ZnO Quantum Dots Induced Oxidative Stress and Apoptosis in HeLa and HEK-293T Cell Lines, *Frontiers in Pharmacology*, 11 (2020).
- [147] M. Ebadi, M.R. Zolfaghari, S.S. Aghaei, M. Zargar, M. Shafiei, H.S. Zahiri, K.A. Noghabi, A bio-inspired strategy for the synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using the cell extract of cyanobacterium *Nostoc* sp. EA03: from biological function to toxicity evaluation, *RSC Advances*, 9 (2019) 23508-23525.
- [148] C. Hanley, J. Layne, A. Punnoose, K.M. Reddy, I. Coombs, A. Coombs, K. Feris, D. Wingett, Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles, *Nanotechnology*, 19 (2008) 295103.
- [149] S.J. Webb, Laser-Raman spectroscopy of living cells, *Physics Reports*, 60 (1980) 201-224.
- [150] S.F. El-Mashtoly, K. Gerwert, Diagnostics and Therapy Assessment Using Label-Free Raman Imaging, *Analytical Chemistry*, 94 (2022) 120-142.
- [151] R. Smith, K.L. Wright, L. Ashton, Raman spectroscopy: an evolving technique for live cell studies, *Analyst*, 141 (2016) 3590-3600.

- [152] J.H. Lee, H.J. Shin, Y.D. Kim, D.-K. Lim, Real-time surface-enhanced Raman scattering-based live cell monitoring of the changes in mitochondrial membrane potential, *Nanoscale Advances*, 3 (2021) 3470-3480.
- [153] D. Uzunoglu, M. Altunbek, G. Kuku, M. Culha, Chapter 8 - Single-Cell Omics in Noninvasive Diagnosis and Testing—Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Based Approach, in: D. Barh, V. Azevedo (Eds.) *Single-Cell Omics*, Academic Press, 2019, pp. 153-177.
- [154] I.W. Schie, J. Rüger, A.S. Mondol, A. Ramoji, U. Neugebauer, C. Krafft, J. Popp, High-Throughput Screening Raman Spectroscopy Platform for Label-Free Cellomics, *Analytical Chemistry*, 90 (2018) 2023-2030.
- [155] A. Gallud, K. Klöditz, J. Ytterberg, N. Östberg, S. Katayama, T. Skoog, V. Gogvadze, Y.-Z. Chen, D. Xue, S. Moya, J. Ruiz, D. Astruc, R. Zubarev, J. Kere, B. Fadeel, Cationic gold nanoparticles elicit mitochondrial dysfunction: a multi-omics study, *Scientific Reports*, 9 (2019) 4366.
- [156] A. Mizuno, Y. Ozaki, K. Itoh, S. Matsushima, K. Iriyama, Raman spectroscopic evidence for the microenvironmental change of some tyrosine residues of lens proteins in cold cataract, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 119 (1984) 989-994.
- [157] J.G. Duguid, V.A. Bloomfield, J.M. Benevides, G.J. Thomas, DNA melting investigated by differential scanning calorimetry and Raman spectroscopy, *Biophysical Journal*, 71 (1996) 3350-3360.
- [158] J.R. Heath, A. Ribas, P.S. Mischel, Single-cell analysis tools for drug discovery and development, *Nature Reviews Drug Discovery*, 15 (2016) 204-216.
- [159] G. Pezzotti, Raman spectroscopy in cell biology and microbiology, *Journal of Raman Spectroscopy*, 52 (2021) 2348-2443.
- [160] Z. Movasaghi, S. Rehman, I.U. Rehman, Raman Spectroscopy of Biological Tissues, *Applied Spectroscopy Reviews*, 42 (2007) 493-541.
- [161] S. Guo, P. Rösch, J. Popp, T. Bocklitz, Modified PCA and PLS: Towards a better classification in Raman spectroscopy-based biological applications, *Journal of Chemometrics*, 34 (2020) e3202.
- [162] F.L. Cals, S. Koljenović, J.A. Hardillo, R.J. Baatenburg de Jong, T.C. Bakker Schut, G.J. Puppels, Development and validation of Raman spectroscopic classification models to discriminate tongue squamous cell carcinoma from non-tumorous tissue, *Oral oncology*, 60 (2016) 41-47.
- [163] W. Huang, Q. Shang, X. Xiao, H. Zhang, Y. Gu, L. Yang, G. Shi, Y. Yang, Y. Hu, Y. Yuan, A. Ji, L. Chen, Raman spectroscopy and machine learning for the classification of esophageal squamous carcinoma, *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 281 (2022) 121654.
- [164] S. Managò, P. Mirabelli, M. Napolitano, G. Zito, A.C. De Luca, Raman detection and identification of normal and leukemic hematopoietic cells, *Journal of Biophotonics*, 11 (2018) e201700265.
- [165] A.D. Meade, F.M. Lyng, P. Knief, H.J. Byrne, Growth substrate induced functional changes elucidated by FTIR and Raman spectroscopy in in-vitro cultured human keratinocytes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (2007) 1717-1728.
- [166] N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, Cytotoxicity of Nanoparticles, *Small*, 4 (2008) 26-49.
- [167] J.M. Wörle-Knirsch, K. Pulskamp, H.F. Krug, Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays, *Nano Letters*, 6 (2006) 1261-1268.

- [168] P. Kumar, A. Nagarajan, P.D. Uchil, Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay, *Cold Spring Harb Protoc*, 2018 (2018).
- [169] I. Madar, G. Sultan, R. Chelliah, D.-H. Oh, Screening for Anticancer Activity: Trypan Blue Exclusion Assay, in: D. Dharumadurai (Ed.) *Methods in Actinobacteriology*, Springer US, New York, NY, 2022, pp. 443-448.
- [170] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M.R. Boyd, New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *Journal of the National Cancer Institute*, 82 (1990) 1107-1112.
- [171] T.L. Riss, R.A. Moravec, A.L. Niles, S. Duellman, H.A. Benink, T.J. Worzella, L. Minor, Cell Viability Assays, in: S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, T.D.Y. Chung, N.P. Coussens, J.L. Dahlin, V. Devanarayan, T.L. Foley, M. Glicksman, K. Gorshkov, J.V. Haas, M.D. Hall, S. Hoare, J. Inglese, P.W. Iversen, S.C. Kales, M. Lal-Nag, Z. Li, J. McGee, O. McManus, T. Riss, P. Saradjian, G.S. Sittampalam, M. Tarselli, O.J. Trask, Jr., Y. Wang, J.R. Weidner, M.J. Wildey, K. Wilson, M. Xia, X. Xu (Eds.) *Assay Guidance Manual*, Bethesda (MD), 2004.
- [172] A.C. Lo, L.J. Houenou, R.W. Oppenheim, Apoptosis in the nervous system: morphological features, methods, pathology, and prevention, *Archives of histology and cytology*, 58 (1995) 139-149.
- [173] A. Gallud, M. Delaval, P. Kinaret, V.S. Marwah, V. Fortino, J. Ytterberg, R. Zubarev, T. Skoog, J. Kere, M. Correia, K. Loeschner, Z. Al-Ahmady, K. Kostarelos, J. Ruiz, D. Astruc, M. Monopoli, R. Handy, S. Moya, K. Savolainen, H. Alenius, D. Greco, B. Fadeel, Multiparametric Profiling of Engineered Nanomaterials: Unmasking the Surface Coating Effect, *Advanced Science*, 7 (2020) 2002221.
- [174] S.M. Hussain, D.B. Warheit, S.P. Ng, K.K. Comfort, C.M. Grabinski, L.K. Braydich-Stolle, At the Crossroads of Nanotoxicology in vitro: Past Achievements and Current Challenges, *Toxicological Sciences*, 147 (2015) 5-16.
- [175] L.R. Farcas, C. Uboldi, D. Mehn, G. Giudetti, P. Nativo, J. Ponti, D. Gilliland, F. Rossi, A. Bal-Price, Mechanisms of toxicity induced by SiO₂ nanoparticles of in vitro human alveolar barrier: effects on cytokine production, oxidative stress induction, surfactant proteins A mRNA expression and nanoparticles uptake, *Nanotoxicology*, 7 (2013) 1095-1110.
- [176] R.K. Shukla, A. Badiye, K. Vajpayee, N. Kapoor, Genotoxic Potential of Nanoparticles: Structural and Functional Modifications in DNA, *Frontiers in Genetics*, 12 (2021).
- [177] K. Paunovska, D. Loughrey, C.D. Sago, R. Langer, J.E. Dahlman, Using Large Datasets to Understand Nanotechnology, *Advanced Materials*, 31 (2019) 1902798.
- [178] L. Ahlinder, B. Ekstrand-Hammarström, P. Geladi, L. Osterlund, Large uptake of titania and iron oxide nanoparticles in the nucleus of lung epithelial cells as measured by Raman imaging and multivariate classification, *Biophys J*, 105 (2013) 310-319.
- [179] M.P. Harvanova, J. Jiravova, J. Malohlava, K.B. Tomankova, D. Jirova, H. Kolarova, Raman imaging of cellular uptake and studies of silver nanoparticles effect in BJ human fibroblasts cell lines, *International journal of pharmaceutics*, 528 (2017) 280-286.
- [180] E. Fazio, B. Gökce, A. De Giacomo, M. Meneghetti, G. Compagnini, M. Tommasini, F. Waag, A. Lucotti, C.G. Zanchi, P.M. Ossi, M. Dell'Aglio, L. D'Urso, M. Condorelli, V. Scardaci, F. Biscaglia, L.

- Litti, M. Gobbo, G. Gallo, M. Santoro, S. Trusso, F. Neri, *Nanoparticles Engineering by Pulsed Laser Ablation in Liquids: Concepts and Applications*, Nanomaterials (Basel, Switzerland), 10 (2020).
- [181] M. Lasalvia, G. Perna, V. Capozzi, *Biochemical Changes in Human Cells Exposed to Low Concentrations of Gold Nanoparticles Detected by Raman Microspectroscopy*, *Sensors*, 19 (2019) 2418.
- [182] E. Brauchle, S. Thude, S.Y. Brucker, K. Schenke-Layland, *Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy*, *Scientific Reports*, 4 (2014) 4698.
- [183] K. Czamara, F. Petko, M. Baranska, A. Kaczor, *Raman microscopy at the subcellular level: a study on early apoptosis in endothelial cells induced by Fas ligand and cycloheximide*, *Analyst*, 141 (2016) 1390-1397.
- [184] M. Okada, N.I. Smith, A.F. Palonpon, H. Endo, S. Kawata, M. Sodeoka, K. Fujita, *Label-free Raman observation of cytochrome c dynamics during apoptosis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109 (2012) 28-32.
- [185] S. Rangan, S. Kamal, S.O. Konorov, H.G. Schulze, M.W. Blades, R.F.B. Turner, J.M. Piret, *Types of cell death and apoptotic stages in Chinese Hamster Ovary cells distinguished by Raman spectroscopy*, *Biotechnology and Bioengineering*, 115 (2018) 401-412.
- [186] J.M. Benevides, S.A. Overman, G.J. Thomas Jr, *Raman, polarized Raman and ultraviolet resonance Raman spectroscopy of nucleic acids and their complexes*, *Journal of Raman Spectroscopy*, 36 (2005) 279-299.
- [187] B. Kang, S.-S. Li, Q.-Y. Guan, A.-P. Chen, P.-K. Zhang, L.-B. Zhang, J.-W. Wei, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, *Plasmon-enhanced Raman spectroscopic metrics for in situ quantitative and dynamic assays of cell apoptosis and necrosis*, *Chemical Science*, 8 (2017) 1243-1250.
- [188] H.J. Shin, J.H. Lee, Y.D. Kim, I. Shin, T. Sim, D.-K. Lim, *Raman-Based in Situ Monitoring of Changes in Molecular Signatures during Mitochondrially Mediated Apoptosis*, *ACS Omega*, 4 (2019) 8188-8195.
- [189] L. Xiao, S. Shelake, M. Ozerova, K.M. Balss, K. Amin, A. Tsai, *Spectral Markers for T Cell Death and Apoptosis—A Pilot Study on Cell Therapy Drug Product Characterization Using Raman Spectroscopy*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110 (2021) 3786-3793.
- [190] J.M. Benevides, G.J. Thomas, Jr., *Characterization of DNA structures by Raman spectroscopy: high-salt and low-salt forms of double helical poly(dG-dC) in H₂O and D₂O solutions and application to B, Z and A-DNA*, *Nucleic Acids Research*, 11 (1983) 5747-5761.
- [191] K. Wieland, M. Masri, J. von Poschinger, T. Brück, C. Haisch, *Non-invasive Raman spectroscopy for time-resolved in-line lipidomics*, *RSC Advances*, 11 (2021) 28565-28572.
- [192] M.C. Potcoava, G.L. Futia, E.A. Gibson, I.R. Schlaepfer, *Lipid profiling using Raman and a modified support vector machine algorithm*, *Journal of Raman Spectroscopy*, 52 (2021) 1910-1922.
- [193] K.W. Short, S. Carpenter, J.P. Freyer, J.R. Mourant, *Raman Spectroscopy Detects Biochemical Changes Due to Proliferation in Mammalian Cell Cultures*, *Biophysical Journal*, 88 (2005) 4274-4288.
- [194] W.J. Tipping, L.T. Wilson, C. An, A.A. Leventi, A.W. Wark, C. Wetherill, N.C.O. Tomkinson, K. Faulds, D. Graham, *Stimulated Raman scattering microscopy with spectral phasor analysis: applications in assessing drug–cell interactions*, *Chemical Science*, 13 (2022) 3468-3476.

- [195] B.R. Wood, K. Kochan, K.M. Marzec, Chapter 13 - Resonance Raman spectroscopy of hemoglobin in red blood cells, in: Y. Ozaki, M. Baranska, I.K. Lednev, B.R. Wood (Eds.) *Vibrational Spectroscopy in Protein Research*, Academic Press, 2020, pp. 375-414.
- [196] K. Milligan, X. Deng, P. Shreeves, R. Ali-Adeeb, Q. Matthews, A. Brolo, J.J. Lum, J.L. Andrews, A. Jirasek, Raman spectroscopy and group and basis-restricted non negative matrix factorisation identifies radiation induced metabolic changes in human cancer cells, *Scientific Reports*, 11 (2021) 3853.
- [197] A.N. Kuzmin, A. Pliss, A. Rzhetskii, A. Lita, M. Larion, BCABox Algorithm Expands Capabilities of Raman Microscope for Single Organelles Assessment, *Biosensors*, 8 (2018) 106.
- [198] J. Langer, D. Jimenez de Aberasturi, J. Aizpurua, R.A. Alvarez-Puebla, B. Auguie, J.J. Baumberg, G.C. Bazan, S.E.J. Bell, A. Boisen, A.G. Brolo, J. Choo, D. Cialla-May, V. Deckert, L. Fabris, K. Faulds, F.J. García de Abajo, R. Goodacre, D. Graham, A.J. Haes, C.L. Haynes, C. Huck, T. Itoh, M. Käll, J. Kneipp, N.A. Kotov, H. Kuang, E.C. Le Ru, H.K. Lee, J.-F. Li, X.Y. Ling, S.A. Maier, T. Mayerhöfer, M. Moskovits, K. Murakoshi, J.-M. Nam, S. Nie, Y. Ozaki, I. Pastoriza-Santos, J. Perez-Juste, J. Popp, A. Pucci, S. Reich, B. Ren, G.C. Schatz, T. Shegai, S. Schlücker, L.-L. Tay, K.G. Thomas, Z.-Q. Tian, R.P. Van Duyne, T. Vo-Dinh, Y. Wang, K.A. Willets, C. Xu, H. Xu, Y. Xu, Y.S. Yamamoto, B. Zhao, L.M. Liz-Marzán, Present and Future of Surface-Enhanced Raman Scattering, *ACS Nano*, 14 (2020) 28-117.
- [199] Z. Zhang, S. Sheng, R. Wang, M. Sun, Tip-Enhanced Raman Spectroscopy, *Analytical Chemistry*, 88 (2016) 9328-9346.
- [200] J.-X. Cheng, Y.K. Jia, G. Zheng, X.S. Xie, Laser-Scanning Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy and Applications to Cell Biology, *Biophysical Journal*, 83 (2002) 502-509.
- [201] F. Nicolson, M.F. Kircher, N. Stone, P. Matousek, Spatially offset Raman spectroscopy for biomedical applications, *Chemical Society Reviews*, 50 (2021) 556-568.
- [202] K. Kneipp, A.S. Haka, H. Kneipp, K. Badizadegan, N. Yoshizawa, C. Boone, K.E. Shafer-Peltier, J.T. Motz, R.R. Dasari, M.S. Feld, Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Single Living Cells Using Gold Nanoparticles, *Applied Spectroscopy*, 56 (2002) 150-154.
- [203] N. Kumar, M.M. Drozd, H. Jiang, D.M. Santos, D.J. Vaux, Nanoscale mapping of newly-synthesised phospholipid molecules in a biological cell using tip-enhanced Raman spectroscopy, *Chemical Communications*, 53 (2017) 2451-2454.
- [204] L. Li, M. Liao, Y. Chen, B. Shan, M. Li, Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) nanoprobes for ratiometric detection of cancer cells, *Journal of Materials Chemistry B*, 7 (2019) 815-822.
- [205] Y. Wang, B. Chen, J. Fan, Z. Wang, A simple and efficient strategy for trace detection of ferroptosis-related miRNAs based on novel hydrophobic paper-based plasmonic substrate and "inverse molecular sentinel (iMS)" nanoprobes, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 11 (2023) 1146111.
- [206] Y. Fukunaga, M. Harada, T. Okada, Surface-enhanced Raman scattering of DNA bases using frozen silver nanoparticle dispersion as a platform, *Microchimica Acta*, 188 (2021) 406.
- [207] M. Yu, L. Wang, W. Zhang, B. Ganss, An Evolutionarily Conserved Subdomain in Amelotin Promotes Amorphous Calcium Phosphate-to-Hydroxyapatite Phase Transition, *Crystal Growth & Design*, 19 (2019) 2104-2113.

- [208] K. Bian, C. Gerber, A.J. Heinrich, D.J. Müller, S. Scheuring, Y. Jiang, Scanning probe microscopy, *Nature Reviews Methods Primers*, 1 (2021) 36.
- [209] V. Shahin, N.P. Barrera, Chapter Six - Providing Unique Insight into Cell Biology via Atomic Force Microscopy, in: K.W. Jeon (Ed.) *International Review of Cytology*, Academic Press, 2008, pp. 227-252.
- [210] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel, Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy, *Physical Review Letters*, 49 (1982) 57-61.
- [211] S.A. Parsons, B. Jefferson, Chapter 15 - Adhesion analysis of scaling systems, in: G. Newcombe, D. Dixon (Eds.) *Interface Science and Technology*, Elsevier, 2006, pp. 257-277.
- [212] B. Michel, STM in Biology, in: L. Esaki (Ed.) *Highlights in Condensed Matter Physics and Future Prospects*, Springer US, Boston, MA, 1991, pp. 549-572.
- [213] K. El Kirat, I. Burton, V. Dupres, Y.F. Dufrene, Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy, *Journal of Microscopy*, 218 (2005) 199-207.
- [214] G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, Atomic Force Microscope, *Physical Review Letters*, 56 (1986) 930-933.
- [215] D.L. Worcester, R.G. Miller, P.J. Bryant, Atomic force microscopy of purple membranes, *Journal of Microscopy*, 152 (1988) 817-821.
- [216] H.J. Butt, E.K. Wolff, S.A.C. Gould, B. Dixon Northern, C.M. Peterson, P.K. Hansma, Imaging cells with the atomic force microscope, *Journal of Structural Biology*, 105 (1990) 54-61.
- [217] H.G. Hansma, J.H. Hoh, Biomolecular imaging with the atomic force microscope, *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 23 (1994) 115-139.
- [218] L. Van der Meeren, J. Verduijn, D.V. Krysko, A.G. Skirtach, AFM Analysis Enables Differentiation between Apoptosis, Necroptosis, and Ferroptosis in Murine Cancer Cells, *iScience*, 23 (2020) 101816.
- [219] S. Wang, J. Wang, T. Ju, F. Yang, K. Qu, W. Liu, Z. Wang, Study of NSCLC cell migration promoted by NSCLC-derived extracellular vesicle using atomic force microscopy, *Analytical Methods*, 13 (2021) 1455-1462.
- [220] Y. Ju, M. Nicola, H. Steven Glenn, J.-M. John Anthony, Y. Rafael, L. Roger, S. Ozgur, Extreme stiffness of neuronal synapses and implications for synaptic adhesion and plasticity, *bioRxiv*, (2020) 2020.2008.2031.273466.
- [221] M. Li, N. Xi, Y.-c. Wang, L.-q. Liu, Atomic force microscopy for revealing micro/nanoscale mechanics in tumor metastasis: from single cells to microenvironmental cues, *Acta Pharmacologica Sinica*, 42 (2021) 323-339.
- [222] N.I. Nikolaev, T. Müller, D.J. Williams, Y. Liu, Changes in the stiffness of human mesenchymal stem cells with the progress of cell death as measured by atomic force microscopy, *Journal of biomechanics*, 47 (2014) 625-630.
- [223] C. Rianna, M. Radmacher, Influence of microenvironment topography and stiffness on the mechanics and motility of normal and cancer renal cells, *Nanoscale*, 9 (2017) 11222-11230.

- [224] X. Yun, M. Tang, Z. Yang, J.J. Wilksch, P. Xiu, H. Gao, F. Zhang, H. Wang, Interrogation of drug effects on HeLa cells by exploiting new AFM mechanical biomarkers, *RSC Advances*, 7 (2017) 43764-43771.
- [225] B. Ding, Y. Tian, Y. Pan, Y. Shan, M. Cai, H. Xu, Y. Sun, H. Wang, Recording the dynamic endocytosis of single gold nanoparticles by AFM-based force tracing, *Nanoscale*, 7 (2015) 7545-7549.
- [226] J.K. Vasir, V. Labhasetwar, Quantification of the force of nanoparticle-cell membrane interactions and its influence on intracellular trafficking of nanoparticles, *Biomaterials*, 29 (2008) 4244-4252.
- [227] C. Peetla, V. Labhasetwar, Effect of Molecular Structure of Cationic Surfactants on Biophysical Interactions of Surfactant-Modified Nanoparticles with a Model Membrane and Cellular Uptake, *Langmuir*, 25 (2009) 2369-2377.
- [228] P.R. Leroueil, S. Hong, A. Mecke, J.R. Baker, Jr., B.G. Orr, M.M. Banaszak Holl, Nanoparticle Interaction with Biological Membranes: Does Nanotechnology Present a Janus Face?, *Accounts of Chemical Research*, 40 (2007) 335-342.
- [229] H.-K. Kwon, J.-H. Lee, H.-J. Shin, J.-H. Kim, S. Choi, Structural and functional analysis of cell adhesion and nuclear envelope nano-topography in cell death, *Scientific Reports*, 5 (2015) 15623.
- [230] Y. Liu, T. Zhang, Y. Zhou, J. Li, X. Liang, N. Zhou, J. Lv, J. Xie, F. Cheng, Y. Fang, Y. Gao, N. Wang, B. Huang, Visualization of perforin/gasdermin/complement-formed pores in real cell membranes using atomic force microscopy, *Cellular & molecular immunology*, 16 (2019) 611-620.
- [231] X. Su, L. Zhang, H. Kang, B. Zhang, G. Bao, J. Wang, Mechanical, nanomorphological and biological reconstruction of early-stage apoptosis in HeLa cells induced by cytochalasin B, *Oncol Rep*, 41 (2019) 928-938.
- [232] C. Bustamante, J. Vesenka, C.L. Tang, W. Rees, M. Guthold, R. Keller, Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy, *Biochemistry*, 31 (1992) 22-26.
- [233] K.S. Kim, C.H. Cho, E.K. Park, M.H. Jung, K.S. Yoon, H.K. Park, AFM-detected apoptotic changes in morphology and biophysical property caused by paclitaxel in Ishikawa and HeLa cells, *PloS one*, 7 (2012) e30066.
- [234] M. Hu, J. Wang, H. Zhao, S. Dong, J. Cai, Nanostructure and nanomechanics analysis of lymphocyte using AFM: from resting, activated to apoptosis, *Journal of biomechanics*, 42 (2009) 1513-1519.
- [235] H. Jin, X. Zhong, Z. Wang, X. Huang, H. Ye, S. Ma, Y. Chen, J. Cai, Sonodynamic effects of hematoporphyrin monomethyl ether on CNE-2 cells detected by atomic force microscopy, *Journal of Cellular Biochemistry*, 112 (2011) 169-178.
- [236] H. Jin, H. Zhao, L. Liu, J. Jiang, X. Wang, S. Ma, J. Cai, Apoptosis Induction of K562 Cells by Lymphocytes: An AFM Study, *Scanning*, 35 (2013) 7-11.
- [237] R. Al-Majmaie, E. Kennedy, M. Al-Rubeai, J.H. Rice, D. Zerulla, AFM-based bivariate morphological discrimination of apoptosis induced by photodynamic therapy using photosensitizer-functionalized gold nanoparticles, *RSC Advances*, 5 (2015) 82983-82991.
- [238] Weyn, Kalle, S. Kumar, M. Van, Tanke, Jacob, Atomic force microscopy: influence of air drying and fixation on the morphology and viscoelasticity of cultured cells, *Journal of Microscopy*, 189 (1998) 172-180.

- [239] A.L. Patterson, The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination, *Physical Review*, 56 (1939) 978-982.
- [240] S. Berkowicz, F. Perakis, Exploring the validity of the Stokes–Einstein relation in supercooled water using nanomolecular probes, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 23 (2021) 25490-25499.
- [241] M. Malatesta, Transmission Electron Microscopy as a Powerful Tool to Investigate the Interaction of Nanoparticles with Subcellular Structures, *Int J Mol Sci*, 22 (2021).
- [242] P.W. Atkins, J. De Paula, *Atkins' Physical chemistry*, 8th ed ed., Oxford University Press, Oxford, 2006.
- [243] F. Siebert, P. Hildebrandt, *Vibrational Spectroscopy in Life Science*, Wiley, 2007.
- [244] J.R. Ferraro, K. Nakamoto, C.W. Brown, Chapter 1 - Basic Theory, in: J.R. Ferraro, K. Nakamoto, C.W. Brown (Eds.) *Introductory Raman Spectroscopy (Second Edition)*, Academic Press, San Diego, 2003, pp. 1-94.
- [245] V.A. Lorenz-Fonfria, Infrared Difference Spectroscopy of Proteins: From Bands to Bonds, *Chemical Reviews*, 120 (2020) 3466-3576.
- [246] D.A. Long, Quantum Mechanical Theory of Rayleigh and Raman Scattering, in: *The Raman Effect*, 2002, pp. 49-84.
- [247] D.F. Ghanotakis, J.C. de Paula, D.M. Demetriou, N.R. Bowlby, J. Petersen, G.T. Babcock, C.F. Yocum, Isolation and characterization of the 47 kDa protein and the D1-D2-cytochrome b-559 complex, *Biochimica et biophysica acta*, 974 (1989) 44-53.
- [248] F. Kruse, A.D. Nguyen, J. Dragelj, J. Heberle, P. Hildebrandt, M.A. Mroginski, I.M. Weidinger, A Resonance Raman Marker Band Characterizes the Slow and Fast Form of Cytochrome c Oxidase, *Journal of the American Chemical Society*, 143 (2021) 2769-2776.
- [249] L.F.C.S. Carvalho, F. Bonnier, C. Tellez, L. dos Santos, K. O'Callaghan, J. O'Sullivan, L.E.S. Soares, S. Flint, A.A. Martin, F.M. Lyng, H.J. Byrne, Raman spectroscopic analysis of oral cells in the high wavenumber region, *Experimental and Molecular Pathology*, 103 (2017) 255-262.
- [250] C. Beleites, V. Sergo, hyperSpec: a package to handle hyperspectral data sets in R, in, 0.100.0,
- [251] H. Martens, E. Stark, Extended multiplicative signal correction and spectral interference subtraction: New preprocessing methods for near infrared spectroscopy, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 9 (1991) 625-635.
- [252] C. Beleites, cbmodels, in, <https://rdrr.io/rforge/cbmodels/>
- [253] S. Guo, A. Kohler, B. Zimmermann, R. Heinke, S. Stöckel, P. Rösch, J. Popp, T. Bocklitz, Extended Multiplicative Signal Correction Based Model Transfer for Raman Spectroscopy in Biological Applications, *Analytical Chemistry*, 90 (2018) 9787-9795.
- [254] F.C. Tai, S.C. Lee, J. Chen, C. Wei, S.H. Chang, Multiplex fitting analysis of Raman spectra on DLCH film, *Journal of Raman Spectroscopy*, 40 (2009) 1055-1059.
- [255] H. Chernoff, The Use of Faces to Represent Points in k-Dimensional Space Graphically, *Journal of the American Statistical Association*, 68 (1973) 361-368.
- [256] H. Shinzawa, K. Awa, W. Kanematsu, Y. Ozaki, Multivariate data analysis for Raman spectroscopic imaging, *Journal of Raman Spectroscopy*, 40 (2009) 1720-1725.

- [257] A.L. Blee, J.C.C. Day, P.E.J. Flewitt, A. Jeketo, D. Megson-Smith, Non-negative assisted principal component analysis: A novel method of data analysis for raman spectroscopy, *Journal of Raman Spectroscopy*, 52 (2021) 1135-1147.
- [258] M. Zhao, Q. Wang, Q. Wang, P. Jia, Z. Zhao, Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data: features and perspectives, *BMC Bioinformatics*, 14 (2013) S1.
- [259] C. Sigg, nsprcomp: Non-Negative and Sparse PCA, in: <https://cran.r-project.org/web/packages/nsprcomp/index.html>,
- [260] S. Wold, M. Sjöström, L. Eriksson, PLS-regression: a basic tool of chemometrics, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58 (2001) 109-130.
- [261] K.H. Liland, B.-H. Mevik, R. Wehrens, P. Hiemstra, pls: Partial Least Squares and Principal Component Regression, in: <https://cran.r-project.org/web/packages/pls/index.html>,
- [262] S. Rännar, F. Lindgren, P. Geladi, S. Wold, A PLS kernel algorithm for data sets with many variables and fewer objects. Part 1: Theory and algorithm, *Journal of Chemometrics*, 8 (1994) 111-125.
- [263] T. Hastie, R. Tibshirani, J. Friedman, Linear Methods for Classification, in: T. Hastie, R. Tibshirani, J. Friedman (Eds.) *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction*, Springer New York, New York, NY, 2009, pp. 101-137.
- [264] M. Lasalvia, V. Capozzi, G. Perna, A Comparison of PCA-LDA and PLS-DA Techniques for Classification of Vibrational Spectra, in: *Applied Sciences*, 2022.10.3390/app12115345
- [265] B. Ripley, B. Venables, D.M. Bates, K. Hornik, A. Gebhardt, D. Firth, MASS: Support Functions and Datasets for Venables and Ripley's MASS, in: <https://cran.r-project.org/web/packages/MASS/index.html>,
- [266] The R Stats Package, in: <https://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/DESCRIPTION>,
- [267] E. Meyer, Atomic force microscopy, *Progress in Surface Science*, 41 (1992) 3-49.
- [268] J. Gros-Otero, S. Ketabi, R. Cañones-Zafra, M. Garcia-Gonzalez, C. Villa-Collar, S. Casado, M.A. Teus, Atomic force microscopy comparative analysis of the surface roughness of two posterior chamber phakic intraocular lens models: ICL versus IPCL, *BMC Ophthalmology*, 21 (2021) 280.
- [269] Z.V. Popović, Z. Dohčević-Mitrović, A. Cros, A. Cantarero, Raman scattering study of the anharmonic effects in CeO₂-y nanocrystals, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 19 (2007) 496209.
- [270] R. Kostić, S. Aškračić, Z. Dohčević-Mitrović, Z.V. Popović, Low-frequency Raman scattering from CeO₂ nanoparticles, *Applied Physics A*, 90 (2008) 679-683.
- [271] S. Aškračić, Z.D. Dohčević-Mitrović, V.D. Araújo, G. Ionita, M.M. de Lima, A. Cantarero, F-centre luminescence in nanocrystalline CeO₂, *Journal of Physics D: Applied Physics*, 46 (2013) 495306.
- [272] M. Stojmenović, S. Bošković, S. Zec, B. Babić, B. Matović, D. Bučevac, Z. Dohčević-Mitrović, F. Aldinger, Characterization of nanometric multidoped ceria powders, *Journal of Alloys and Compounds*, 507 (2010) 279-285.
- [273] V. Vichai, K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, *Nature Protocols*, 1 (2006) 1112-1116.

- [274] S. Kamiloglu, G. Sari, T. Ozdal, E. Capanoglu, Guidelines for cell viability assays, *Food Frontiers*, 1 (2020) 332-349.
- [275] M. Miletić, S. Aškračić, J. Rüger, B. Vasić, L. Korićanac, A.S. Mondol, J. Dellith, J. Popp, I.W. Schie, Z. Dohčević-Mitrović, Combined Raman and AFM detection of changes in HeLa cervical cancer cells induced by CeO₂ nanoparticles – molecular and morphological perspectives, *Analyst*, 145 (2020) 3983-3995.
- [276] N. Stone, C.A. Kendall, Raman Spectroscopy for Early Cancer Detection, Diagnosis and Elucidation of Disease-Specific Biochemical Changes, in: P. Matousek, M.D. Morris (Eds.) *Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010, pp. 315-346.
- [277] A.Z. Samuel, K. Sugiyama, M. Ando, H. Takeyama, Direct imaging of intracellular RNA, DNA, and liquid–liquid phase separated membraneless organelles with Raman microspectroscopy, *Communications Biology*, 5 (2022) 1383.
- [278] S. Hu, I.K. Morris, J.P. Singh, K.M. Smith, T.G. Spiro, Complete assignment of cytochrome c resonance Raman spectra via enzymic reconstitution with isotopically labeled hemes, *Journal of the American Chemical Society*, 115 (1993) 12446-12458.
- [279] R.K. Dukor, *Vibrational Spectroscopy in the Detection of Cancer*, in: *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, 2001.
- [280] J.W. Chan, D.S. Taylor, T. Zwerdling, S.M. Lane, K. Ihara, T. Huser, Micro-Raman spectroscopy detects individual neoplastic and normal hematopoietic cells, *Biophys J*, 90 (2006) 648-656.
- [281] N.C. Maiti, M.M. Apetri, M.G. Zagorski, P.R. Carey, V.E. Anderson, Raman Spectroscopic Characterization of Secondary Structure in Natively Unfolded Proteins: α -Synuclein, *Journal of the American Chemical Society*, 126 (2004) 2399-2408.
- [282] M. Gniadecka, H.C. Wulf, N. Nymark Mortensen, O. Faurskov Nielsen, D.H. Christensen, Diagnosis of Basal Cell Carcinoma by Raman Spectroscopy, *Journal of Raman Spectroscopy*, 28 (1997) 125-129.
- [283] C. Krafft, L. Neudert, T. Simat, R. Salzer, Near infrared Raman spectra of human brain lipids, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61 (2005) 1529-1535.
- [284] E. Wiercigroch, E. Szafranec, K. Czamara, M.Z. Pacia, K. Majzner, K. Kochan, A. Kaczor, M. Baranska, K. Malek, Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 185 (2017) 317-335.
- [285] I. Notingher, C. Green, C. Dyer, E. Perkins, N. Hopkins, C. Lindsay, L.L. Hench, Discrimination between ricin and sulphur mustard toxicity in vitro using Raman spectroscopy, *Journal of the Royal Society, Interface*, 1 (2004) 79-90.
- [286] K. Czamara, K. Majzner, M.Z. Pacia, K. Kochan, A. Kaczor, M. Baranska, Raman spectroscopy of lipids: a review, *Journal of Raman Spectroscopy*, 46 (2015) 4-20.
- [287] M. Lasalvia, G. Perna, P. Pisciotta, F.P. Cammarata, L. Manti, V. Capozzi, Raman spectroscopy for the evaluation of the radiobiological sensitivity of normal human breast cells at different time points after irradiation by a clinical proton beam, *Analyst*, 144 (2019) 2097-2108.
- [288] W.T. Cheng, M.T. Liu, H.N. Liu, S.Y. Lin, Micro-Raman spectroscopy used to identify and grade human skin pilomatrixoma, *Microscopy research and technique*, 68 (2005) 75-79.

- [289] F.A. Shah, Towards refining Raman spectroscopy-based assessment of bone composition, *Scientific Reports*, 10 (2020) 16662.
- [290] S.-K. Hark, J.T. Ho, Raman study of calcium-induced fusion and molecular segregation of phosphatidylserine/dimyristoyl phosphatidylcholine-d54 membranes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 601 (1980) 54-62.
- [291] A.J. Ruiz-Chica, M.A. Medina, F. Sánchez-Jiménez, F.J. Ramírez, Characterization by Raman spectroscopy of conformational changes on guanine–cytosine and adenine–thymine oligonucleotides induced by aminoxy analogues of spermidine, *Journal of Raman Spectroscopy*, 35 (2004) 93-100.
- [292] N. Feuerer, J. Marzi, E.M. Brauchle, D.A. Carvajal Berrio, F. Billing, M. Weiss, M. Jakobi, N. Schneiderhan-Marra, C. Shipp, K. Schenke-Layland, Lipidome profiling with Raman microspectroscopy identifies macrophage response to surface topographies of implant materials, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118 (2021) e2113694118.
- [293] V. Baumruk, C. Gouyette, T. Huynh-Dinh, J.S. Sun, M. Ghomi, Comparison between CUUG and UUCG tetraloops: thermodynamic stability and structural features analyzed by UV absorption and vibrational spectroscopy, *Nucleic Acids Res*, 29 (2001) 4089-4096.
- [294] G. Zhu, X. Zhu, Q. Fan, X. Wan, Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78 (2011) 1187-1195.
- [295] J.P. Kitt, D.A. Bryce, S.D. Minter, J.M. Harris, Raman Spectroscopy Reveals Selective Interactions of Cytochrome c with Cardiolipin That Correlate with Membrane Permeability, *Journal of the American Chemical Society*, 139 (2017) 3851-3860.
- [296] N. Stone, C. Kendall, J. Smith, P. Crow, H. Barr, Raman spectroscopy for identification of epithelial cancers, *Faraday Discussions*, 126 (2004) 141-157.
- [297] J.R. Beattie, S.E.J. Bell, B.W. Moss, A critical evaluation of Raman spectroscopy for the analysis of lipids: Fatty acid methyl esters, *Lipids*, 39 (2004) 407-419.
- [298] Y.H. Ong, M. Lim, Q. Liu, Comparison of principal component analysis and biochemical component analysis in Raman spectroscopy for the discrimination of apoptosis and necrosis in K562 leukemia cells, *Opt. Express*, 20 (2012) 22158-22171.
- [299] R. Daum, E.M. Brauchle, D.A.C. Berrio, T.P. Jurkowski, K. Schenke-Layland, Non-invasive detection of DNA methylation states in carcinoma and pluripotent stem cells using Raman microspectroscopy and imaging, *Scientific Reports*, 9 (2019) 7014.
- [300] K.J. Rothschild, I.M. Asher, E. Anastassakis, H.E. Stanley, Raman spectroscopic evidence for two conformations of uncomplexed valinomycin in the solid state, *Science (New York, N.Y.)*, 182 (1973) 384-386.
- [301] N.J. Kline, P.J. Treado, Raman Chemical Imaging of Breast Tissue, *Journal of Raman Spectroscopy*, 28 (1997) 119-124.
- [302] C. Krafft, Raman Spectroscopy of Proteins and Nucleic Acids: From Amino Acids and Nucleotides to Large Assemblies, in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2018, pp. 1-15.
- [303] H.G.M. Edwards, D.W. Farwell, L. Daffner, Fourier-transform Raman spectroscopic study of natural waxes and resins. I, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 52 (1996) 1639-1648.

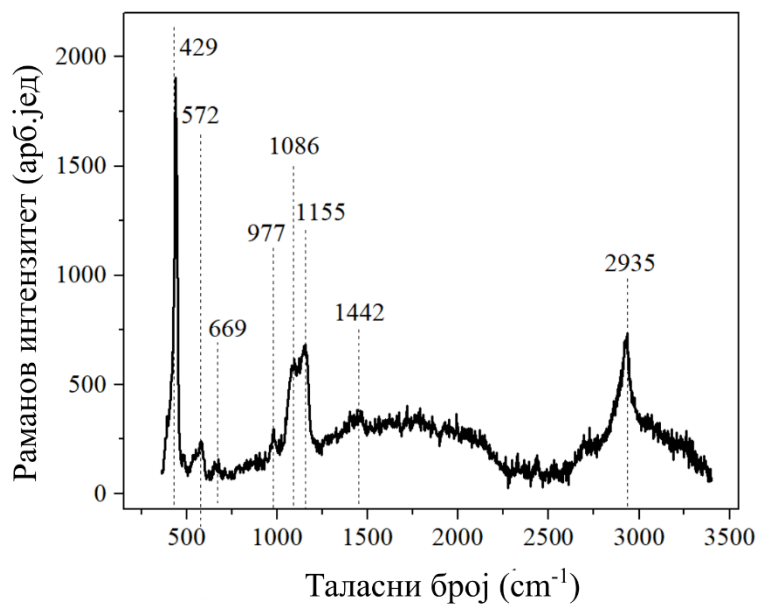
- [304] A.L. Popov, N.R. Popova, Selezneva, II, A.Y. Akkizov, V.K. Ivanov, Cerium oxide nanoparticles stimulate proliferation of primary mouse embryonic fibroblasts in vitro, *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 68 (2016) 406-413.
- [305] A. Ermakov, A. Popov, O. Ermakova, O. Ivanova, A. Baranchikov, K. Kamenskikh, T. Shekunova, A. Shcherbakov, N. Popova, V. Ivanov, The first inorganic mitogens: Cerium oxide and cerium fluoride nanoparticles stimulate planarian regeneration via neoblastic activation, *Materials Science and Engineering: C*, 104 (2019) 109924.
- [306] M. Guo, B.A. Hay, Cell proliferation and apoptosis, *Current Opinion in Cell Biology*, 11 (1999) 745-752.
- [307] G. Ichim, S.W. Tait, A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process, *Nature reviews. Cancer*, 16 (2016) 539-548.
- [308] R.-A. Wang, Q.-L. Li, Z.-S. Li, P.-J. Zheng, H.-Z. Zhang, X.-F. Huang, S.-M. Chi, A.-G. Yang, R. Cui, Apoptosis drives cancer cells proliferate and metastasize, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17 (2013) 205-211.
- [309] M. Bushell, F. Kunc, X. Du, A. Zborowski, L.J. Johnston, D.C. Kennedy, Characterization of Engineered Cerium Oxide Nanoparticles and Their Effects on Lung and Macrophage Cells, *International Journal of Translational Medicine*, 2 (2022) 522-536.
- [310] D.P. Bai, X.F. Zhang, G.L. Zhang, Y.F. Huang, S. Gurunathan, Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells, *International journal of nanomedicine*, 12 (2017) 6521-6535.
- [311] C. Wang, X. Hu, Y. Gao, Y. Ji, ZnO Nanoparticles Treatment Induces Apoptosis by Increasing Intracellular ROS Levels in LTEP-a-2 Cells, *BioMed research international*, 2015 (2015) 423287.
- [312] J.-Y. Lei, S.-X. Li, F. Li, H. Li, Y.-S. Lei, Zinc oxide nanoparticle regulates the ferroptosis, proliferation, invasion and steaminess of cervical cancer by miR-506-3p/CD164 signaling, *Cancer Nanotechnology*, 13 (2022) 33.
- [313] Z. Liu, X. Lv, L. Xu, X. Liu, X. Zhu, E. Song, Y. Song, Zinc oxide nanoparticles effectively regulate autophagic cell death by activating autophagosome formation and interfering with their maturation, *Particle and Fibre Toxicology*, 17 (2020) 46.
- [314] J. Zhang, X. Qin, B. Wang, G. Xu, Z. Qin, J. Wang, L. Wu, X. Ju, D.D. Bose, F. Qiu, H. Zhou, Z. Zou, Zinc oxide nanoparticles harness autophagy to induce cell death in lung epithelial cells, *Cell Death & Disease*, 8 (2017) e2954-e2954.
- [315] J. Wu, J. Xiao, Z. Zhang, X. Wang, S. Hu, J. Yu, Ribogenomics: the science and knowledge of RNA, *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 12 (2014) 57-63.
- [316] M. Piwnicka, Z. Darzynkiewicz, M.R. Melamed, RNA and DNA content of isolated cell nuclei measured by multiparameter flow cytometry, *Cytometry*, 3 (1983) 269-275.
- [317] R. Gómez de la Cuesta, R. Goodacre, L. Ashton, Monitoring Antibody Aggregation in Early Drug Development Using Raman Spectroscopy and Perturbation-Correlation Moving Windows, *Analytical Chemistry*, 86 (2014) 11133-11140.
- [318] F. Bonnier, H.J. Byrne, Understanding the molecular information contained in principal component analysis of vibrational spectra of biological systems, *Analyst*, 137 (2012) 322-332.

- [319] E. Efeoglu, A. Casey, H.J. Byrne, In vitro monitoring of time and dose dependent cytotoxicity of aminated nanoparticles using Raman spectroscopy, *Analyst*, 141 (2016) 5417-5431.
- [320] E. Agmon, B.R. Stockwell, Lipid homeostasis and regulated cell death, *Current opinion in chemical biology*, 39 (2017) 83-89.
- [321] M.P. Thomas, X. Liu, J. Whangbo, G. McCrossan, K.B. Sanborn, E. Basar, M. Walch, J. Lieberman, Apoptosis Triggers Specific, Rapid, and Global mRNA Decay with 3' Uridylated Intermediates Degraded by DIS3L2, *Cell reports*, 11 (2015) 1079-1089.
- [322] P. Butler, I. Pascheto, M. Lizzi, R. St-Onge, C. Lanner, B. Guo, T. Masilamani, L.B. Pritzker, A.T. Kovala, A.M. Parissenti, RNA disruption is a widespread phenomenon associated with stress-induced cell death in tumour cells, *Scientific Reports*, 13 (2023) 1711.
- [323] H.I. Ingólfsson, M.N. Melo, F.J. van Eerden, C. Arnarez, C.A. Lopez, T.A. Wassenaar, X. Periole, A.H. de Vries, D.P. Tieleman, S.J. Marrink, Lipid Organization of the Plasma Membrane, *Journal of the American Chemical Society*, 136 (2014) 14554-14559.
- [324] A. Kihara, Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders, *Journal of biochemistry*, 152 (2012) 387-395.
- [325] G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson, Membrane lipids: where they are and how they behave, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9 (2008) 112-124.
- [326] P.L. Else, The highly unnatural fatty acid profile of cells in culture, *Progress in Lipid Research*, 77 (2020) 101017.
- [327] G.E. Atilla-Gokcumen, E. Muro, J. Relat-Goberna, S. Sasse, A. Bedigian, M.L. Coughlin, S. Garcia-Manyes, U.S. Eggert, Dividing cells regulate their lipid composition and localization, *Cell*, 156 (2014) 428-439.
- [328] E.A. Prokhorova, A.V. Zamaraev, G.S. Kopeina, B. Zhivotovsky, I.N. Lavrik, Role of the nucleus in apoptosis: signaling and execution, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72 (2015) 4593-4612.
- [329] P. Donizy, P. Biecek, A. Halon, A. Maciejczyk, R. Matkowski, Nucleoli cytomorphology in cutaneous melanoma cells – a new prognostic approach to an old concept, *Diagnostic Pathology*, 12 (2017) 88.
- [330] S. Boulon, B.J. Westman, S. Hutten, F.M. Boisvert, A.I. Lamond, The nucleolus under stress, *Molecular cell*, 40 (2010) 216-227.
- [331] L.A. Chtcheglova, P. Hinterdorfer, Simultaneous AFM topography and recognition imaging at the plasma membrane of mammalian cells, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 73 (2018) 45-56.
- [332] M. Dokukin, Y. Ablaeva, V. Kalaparthi, A. Seluanov, V. Gorbunova, I. Sokolov, Pericellular Brush and Mechanics of Guinea Pig Fibroblast Cells Studied with AFM, *Biophysical Journal*, 111 (2016) 236-246.
- [333] F. Lang, E. Gulbins, I. Szabo, A. Lepple-Wienhues, S.M. Huber, C. Duranton, K.S. Lang, P.A. Lang, T. Wieder, Cell volume and the regulation of apoptotic cell death, *Journal of molecular recognition : JMR*, 17 (2004) 473-480.
- [334] S. Rello, J.C. Stockert, V. Moreno, A. Gámez, M. Pacheco, A. Juarranz, M. Cañete, A. Villanueva, Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments, *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 10 (2005) 201-208.

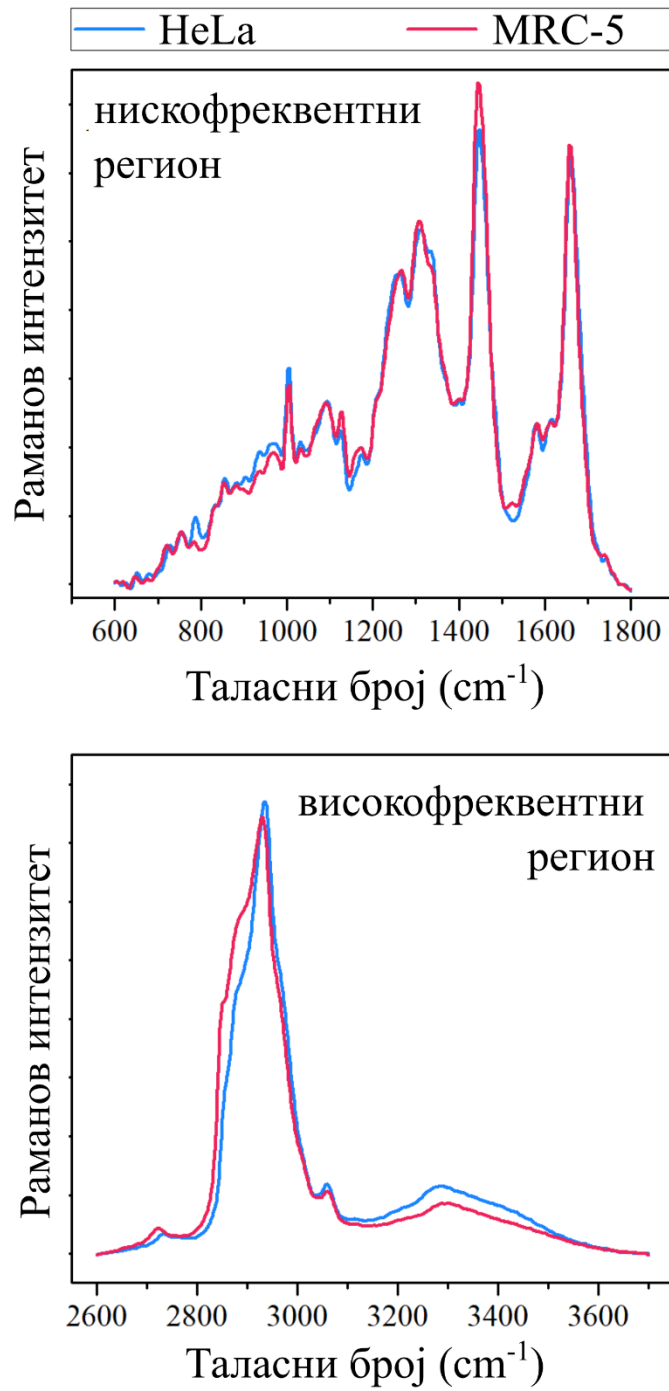
- [335] K.R. Parzych, D.J. Klionsky, An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation, *Antioxidants & redox signaling*, 20 (2014) 460-473.
- [336] K.A. Tanaka, K.G. Suzuki, Y.M. Shirai, S.T. Shibutani, M.S. Miyahara, H. Tsuboi, M. Yahara, A. Yoshimura, S. Mayor, T.K. Fujiwara, A. Kusumi, Membrane molecules mobile even after chemical fixation, *Nature methods*, 7 (2010) 865-866.
- [337] S.O. Kim, J. Kim, T. Okajima, N.J. Cho, Mechanical properties of paraformaldehyde-treated individual cells investigated by atomic force microscopy and scanning ion conductance microscopy, *Nano convergence*, 4 (2017) 5.

Прилози

Прилог 1. Раманов спектар размаза наночестица ZnO мерен на плочици од CaF₂ (експозиција 180 s)



Прилог 2. Усредњени Раманови спектри контролних HeLa и MRC-5 ћелија



Биографија аутора

Мирјана П. Мићевић (рођена Милетић) је рођена 1985. године у Горњем Милановцу, где је завршила основну школу „Момчило Настасијевић“ и Гимназију „Таковски устанак“. Као полазник Регионалног центра за таленте Чачак у завршном разреду гимназије освојила је прву награду на републичкој смотри из биологије. Биолошки факултет Универзитета у Београду уписала је 2004. године на студијској групи Молекуларна биологија и физиологија. Дипломирала је са просечном оценом 8,59 и оценом 10 на дипломском раду „Детекција изоформи естрогенског рецептора бета (ER β) имунопреципитацијом и Рамановом спектроскопијом“, рађеном на Институту за нуклеарне науке Винча и Институту за физику у Београду. На Биолошком факултету је 2015. године уписала докторске студије, на модулу Молекуларна биологија еукариота. Запослена је на Институту за физику, у Лабораторији за наноструктуре Центра за чврсто стање и нове материјале, где је била ангажована на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја „Физика наноструктурних оксидних материјала и јако корелисаних система“. Као носилац DAAD стипендије за кратке истраживачке боравке, провела је шест месеци (децембар 2017 – мај 2018) на *Leibniz Institute for Photonic Technologies* у Јени у Немачкој. Полазник је летње школе за клиничку биофотонику у Коимбри (Португал), организовану у оквиру COST акције „*Biomedicine and Molecular Biosciences Raman-based applications for clinical diagnostics (Raman4clinics)*“ октобра 2018. Има објављена три рада у врхунским међународним часописима и шест конгресних саопштења на скуповима међународног значаја.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Мирјана П. Мићевић _____

број индекса _____ 3018/2015 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ефекти наночестица CeO_2 и ZnO на туморске (HeLa) и нетрансформисане (MRC-5) хумане ћелије *in vitro* проучавани вибрационом спектроскопијом и микроскопијом на бази атомских сила

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 26.6.2023. године

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мирјана П. Мићевић

Број индекса M3018/2015

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Ефекти наночестица CeO_2 и ZnO на туморске (HeLa) и нетрансформисане (MRC-5) хумане ћелије *in vitro* проучавани вибрационом спектроскопијом и микроскопијом на бази атомских сила

Ментор др Соња Ашкрабић и проф. др Горан Брајушковић

Потписани/а Мирјана Мићевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 26.6.2023. године

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Ефекти наночестица CeO_2 и ZnO на туморске (HeLa) и нетрансформисане (MRC-5) хумане ћелије *in vitro* проучавани вибрационом спектроскопијом и микроскопијом на бази атомских сила

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 26.6.2023. године

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.