

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Jovana D. Paunović Pantić

**PROMENE U STRUKTURI HROMATINA  
HEPATOOCITA I PARAMETRI OKSIDATIVNOG  
STRESA U JETRI NAKON IZLAGANJA  
NANOČESTICAMA GVOŽĐE (II, III) OKSIDA**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF MEDICINE

Jovana D. Paunović Pantić

**CHANGES IN HEPATOCYTE CHROMATIN  
STRUCTURE AND PARAMETERS OF LIVER  
OXIDATIVE STRESS AFTER EXPOSURE TO  
IRON (II,III) OXIDE NANOPARTICLES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

**Mentor:**

Prof. dr Danijela Vučević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu,  
Medicinski fakultet

**Članovi komisije:**

Prof. dr Tatjana Radosavljević  
Redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Ivana Novaković  
Redovni profesor, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Biserka Vukomanović Đurđević  
Vanredni profesor, Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije  
Univerzitet odbrane Beograd

**Datum odbrane:**

## **Promene u strukturi hromatina hepatocita i parametri oksidativnog stresa u jetri nakon izlaganja nanočesticama gvožđe (II, III) oksida**

### **SAŽETAK**

I pored postojanja studija koje ukazuju da nanočestice oksida gvožđa ne izazivaju značajne morfološke promene u jetri, i dalje je nepoznato da li i u kojoj meri ove čestice utiču na strukturu i distribuciju jedarnog hromatina hepatocita. Danas je ovakve promene moguće indirektno detektovati i kvantifikovati korišćenjem savremenih kompjuterskih metoda zasnovanih na algoritmima fraktalne i teksturalne analize. Cilj ove disertacije je bio da se utvrdi da li nakon izlaganja nanočesticama gvožđe (II, III) oksida u hepatocitima dolazi do ovakvih diskretnih promena koje do sada nisu bile uočljive upotrebom konvencionalne mikroskopije, kao i da se utvrdi da li su promene praćene pojavom oksidativnog stresa u jetri. Istraživanje je urađeno na ukupno 90 miševa soja C57BL/6 koji su bili izloženi nanočesticama u različitim dozama. Digitalni mikrografi tkiva jetre su analizirani korišćenjem savremenih softverskih platformi pri čemu su za više od 2000 hromatinskih struktura hepatocita kvantifikovane vrednosti fraktalne dimenzije, lakunarnosti, angularnog drugog momenta, inverznog momenta razlike, teksturalnog kontrasta, teksturalne korelacije, teksturalne varijanse i još četiri parametra Harove diskretne vejevlet transformacije. Za svaku životinju su takođe određeni konvencionalni parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite jetre. Rezultati istraživanja ukazuju da je savremeni i inovativni metod teksturalne analize zasnovan na matriksu simultanog pojavljivanja sivih vrednosti rezolucionih jedinica u mogućnosti da detektuje diskretne strukturne promene hromatina hepatocita uzrokovane nanočesticama gvožđe (II, III) oksida. Izlaganje nanočesticama gvožđe (II, III) oksida dovodi do značajnih promena u teksturalnoj homogenosti i uniformnosti hromatina što je praćeno promenama u oksidativnom statusu jetre. Ovi nalazi predstavljaju osnovu za dalja istraživanja potencijalnih toksičnih efekata gvozdenih nanomaterijala kao i morfoloških promena u jetri koje nastaju kao posledica akutne i hronične izloženosti nanočesticama oksida gvožđa.

**Ključne reči:** hromatin, fraktal, magnetit, nanočestica, tekstura, oksidativni status

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna medicina

**UDK broj:**

## **Changes in hepatocyte chromatin structure and parameters of liver oxidative stress after exposure to iron (II, III) oxide nanoparticles**

### **SUMMARY**

Despite the existence of studies indicating that iron oxide nanoparticles do not cause significant morphological changes in the liver, it is still unknown whether and to what extent these particles affect the structure and distribution of hepatocyte nuclear chromatin. Today, such changes can be indirectly detected and quantified using modern computational methods based on fractal and textural analysis algorithms. The aim of this dissertation was to determine whether after exposure to iron (II, III) oxide nanoparticles in hepatocytes, such discrete changes, previously not visible using conventional microscopy, can occur, as well as to determine whether the changes are accompanied by liver oxidative stress. The study was performed on a total of 90 C57BL/6 mice that were exposed to nanoparticles at different doses. Digital micrographs of liver tissue were analyzed using contemporary software platforms, and for more than 2000 chromatin structures of hepatocytes we quantified values of fractal dimension, lacunarity, angular second moment, inverse difference moment, textural contrast, textural correlation, textural variance and four other parameters of Harr discrete wavelet transformation. Conventional parameters of oxidative stress and antioxidant protection in liver were also determined for each animal. The results indicate that the modern and innovative method of textural analysis based on the gray level co-occurrence matrix of resolution units is able to detect discrete structural changes of hepatocyte chromatin caused by iron (II, III) oxide nanoparticles. Exposure to iron (II, III) oxide nanoparticles leads to significant changes in the textural homogeneity and uniformity of chromatin, which is accompanied by changes in the oxidative status of the liver tissue. These findings are the basis for further research into the potential toxic effects of iron nanomaterials as well as morphological changes in the liver resulting from acute and chronic exposure to iron oxide nanoparticles.

**Keywords:** chromatin, fractal, magnetite, nanoparticle, texture, oxidative status  
**Research area:** Medicine

**Research field:** Molecular medicine

**UDC number:**

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Primena savremenih kompjuterskih tehnologija u medicini.....</i>	<i>1</i>
1.2. <i>Fraktalna, teksturalna i vejvlet analiza jedarne strukture i hromatinske organizacije.....</i>	<i>3</i>
1.3. <i>Ekvilibrijumski i fraktalni model organizacije jedarnog hromatina.....</i>	<i>8</i>
1.4. <i>Organizacija jedarnog hromatina hepatocita i promene nakon dejstva toksina.....</i>	<i>10</i>
1.5. <i>Nanočestice gvožđa i njihova potencijalna citotoksičnost i hepatotoksičnost.....</i>	<i>12</i>
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>18</b>
3.1. <i>Eksperimentalni protokol.....</i>	<i>18</i>
3.2. <i>Biohemijske analize krvi i tkiva jetre.....</i>	<i>19</i>
3.3. <i>Histološka obrada tkiva jetre i kompjuterska analiza hromatinske organizacije hepatocita.....</i>	<i>19</i>
3.3.1. <i>Teksturalna analiza upotrebom GLCM algoritma.....</i>	<i>21</i>
3.3.2. <i>Diskretna vejvlet transformacija.....</i>	<i>25</i>
3.3.3. <i>Fraktalna analiza.....</i>	<i>28</i>
3.4. <i>Statistička analiza.....</i>	<i>32</i>
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>33</b>
4.1. <i>Rezultati GLCM analize.....</i>	<i>33</i>
4.2. <i>Rezultati fraktalne analize.....</i>	<i>37</i>
4.3. <i>Rezultati Harove diskretne vejvlet transformacije.....</i>	<i>40</i>
4.4. <i>Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.....</i>	<i>42</i>
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>46</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>86</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>87</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Primena savremenih kompjuterskih tehnologija u medicini

Tokom poslednje dve decenije, došlo je do ubrzanog razvoja inovativnih informacionih tehnologija sa potencijalnom primenom u biomedicinskim naukama. Napravljeni su novi, savremeni programski jezici poput PHP, JavaScript, Java i Python pomoću kojih je moguće kreirati brze, fleksibilne i pristupačne aplikacije za personalne kompjutere. Poslednjih godina mnoge aplikacije se sa uspehom koriste u medicini, kako u istraživačke svrhe, tako i u cilju unapređenja dijagnostičkih i terapijskih postupaka u kliničkoj praksi. Ove nove tehnologije omogućile su uštedu vremena tokom rada, kao i unapređenje preciznosti, senzitivnosti i objektivnosti velikog broja procedura u naučnoistraživačkom radu i radu sa pacijentima u okviru primarne, sekundarne i tercijarne zdravstvene zaštite (Servant et al. 2014; Brüggemann et al. 2019; Jibb et al. 2020; Monteiro et al. 2020).

Osnovna prednost uvođenja savremenih kompjuterskih tehnologija u medicinska istraživanja i praksu je mogućnost automatizacije, odnosno obrade velikog broja signala, zapisa i drugih unosa tokom kratkog vremenskog perioda. Takođe, značajna prednost je objektivnost i nepristrasnost informacionih tehnologija u odnosu na nalaze i mišljenja lekara i naučnika. Stepenn saglasnosti mišljenja dva nezavisna stručnjaka prilikom analize nekog signala mnogo je manji u odnosu na stepenn saglasnosti dva kompjuterska programa. Takođe, primenom inovativnih kompjuterskih metoda u nauci omogućen je znatno veći stepenn reproducibilnosti, odnosno mogućnosti da se prilikom ponavljanja eksperimenta dobiju isti ili slični rezultati (Motwani et al. 2017; Liang et al. 2019; Dong et al. 2020; Sumitomo et al. 2020).

U naučnom radu od posebnog su značaja nove, savremene aplikacije za obradu medicinskih signala. Ovi signali mogu, na primer, biti relativno prosti zapisi poput akcionog potencijala nervne ćelije ili miograma (zapis kontrakcije mišićne ćelije), ali danas postoje programi koji sa uspehom mogu da analiziraju složene dvodimenzionalne signale poput radiološkog zapisa ili mikrografa. Analiza slike u medicini je danas jedna od najbrže rastućih oblasti u fundamentalnim medicinskim istraživanjima, upravo zahvaljujući dostupnosti velikog broja novih kompjuterskih metoda koje sa uspehom mogu izvršiti veliki broj kvantifikacija vezanih za teksturu, homogenost, kompleksnost i druge parametre dvodimenzionalnog signala (Ibrahim et al. 2019; Li et al. 2021; Serpytis et al. 2021; Kasi et al. 2021; Fang et al. 2021).

U kliničkom radu, kompjuterske metode za analizu slike su od posebnog značaja u radiologiji, gde se sa uspehom koriste za evaluaciju rendgenskih snimaka, snimaka kompjuterizovane tomografije, ultrazvuka, i nuklearne magnetne rezonance. Pojedine bolnice imaju čak i specijalizovane sisteme za dijagnostiku bazirane na kompjuterskoj analizi slike, koje

pomažu radiologu i drugim lekarima pri postavljanju adekvatne dijagnoze (Muscogiuri et al. 2021; Anssens et al. 2021). Danas neke od ovih metoda uključuju tehnologiju veštačke inteligencije, gde se korišćenjem neuronskih mreža na osnovu ulaznih signala (parametri slike) dobija izlazni signal u vidu dijagnoze. Od kako je ovakva tehnologija počela da se primenjuje u pojedinim bolnicama, značajno je povećana efikasnost rada pojedinih odeljenja i smanjen broj grešaka u dijagnostici (Muscogiuri et al. 2021; Anssens et al. 2021; Park et al. 2021; Shen et al. 2021).

Kompjuterske tehnike za analizu slike imaju potencijalno široku primenu u oblasti patologije i mikroskopije (Majumder et al. 2021; Katz et al. 2021; Gomariz et al. 2021; Swinkels et al. 2021; Capaccio et al. 2021). Ovo je posebno važno imajući u vidu da je patohistološki nalaz u medicini osnova za donošenje brojnih terapijskih odluka, i greške u ovakvom nalazu mogu dovesti do teških posledica po pacijenta. Nažalost, veliki broja patohistoloških analiza i danas često zavisi od subjektivnog mišljenja i procene patologa, odnosno vrlo je mali broj preciznih i objektivnih metoda pomoću kojih se može izvršiti kvantifikacija uočenih promena. Danas su u procesu razvoja brojne kompjuterske tehnologije za kvantifikaciju parametara mikroskopske slike, poput homogenosti, uniformnosti, entropije (neuređenosti), doduše sa vrlo ograničenom primenom u savremenoj patološkoj praksi. Senzitivnost, specifičnost i validnost ovih metoda je još uvek nedovoljno ispitana. Smatra se da će u budućnosti one biti sa uspehom uključene, makar kao pomoćno sredstvo tokom patohistološke evaluacije ćelija i tkiva i sastavljanja patohistološkog nalaza u medicinskoj praksi (Majumder et al. 2021; Katz et al. 2021; Gomariz et al. 2021; Swinkels et al. 2021; Capaccio et al. 2021).

Još jedna značajna prednost kompjuterskih aplikacija u medicini i medicinskim istraživanjima je činjenica da su mnoge od njih relativno pristupačne i jednostavne za korišćenje. Na primer, jedan od najčešće korišćenih softvera za analizu slike u medicinskim istraživanjima je ImageJ, program dizajniran od strane Nacionalnog instituta za zdravlje SAD. Ovaj program je besplatan, slobodno dostupan za preuzimanje i korišćenje i lako se instalira na skoro svakom kompjuteru. Pored toga, postoje stotine podprograma i drugih dodataka (plugin) za ovaj softver, koje se lako mogu instalirati i slobodno koristiti (Rossi et al. 2021; Hamada et al. 2021).

Kompjuterske aplikacije sa primenom u medicini mogu biti napravljene korišćenjem jednog ili više programskih jezika. Klasična aplikacija koja zahteva instalaciju na hard disku personalnog kompjutera je obično napisana u C familiji programskih jezika. Međutim danas su aktuelne i takozvane veb aplikacije koje se pokreću korišćenjem veb pregledača poput Google Chrome, Internet Explorer ili Mozilla Firefox. Mnogi interaktivni sistemi za skladištenje, čuvanje i obradu medicinskih podataka pacijenata u bolnicama su napravljene na ovaj način. Sa druge strane, programi za analizu medicinskih signala su najčešće u obliku klasičnog softvera koji se instalira nezavisno od veb pregledača (Fowler et al. 2019; Ghousaini et al. 2021).



Konačno, potrebno je napomenuti da je tokom poslednjih deset godina došlo do ubrzanog razvoja veštačke inteligencije, koja je omogućila još veći stepen automatizacije u obradi medicinskih signala i ostalih parametara u kliničkoj praksi i medicinskim istraživanjima (Sawano et al. 2021; Gomariz et al. 2021; Liang et al. 2021). Veštačka inteligencija se uglavnom zasniva na konceptu neuronskih mreža, gde se na osnovu ulaznih signala (npr. parametri mikroskopske slike) propuštanjem informacija kroz niz povezanih veštačkih "neurona" dobija odgovarajući izlazni signal (Sawano et al. 2021; Gomariz et al. 2021; Liang et al. 2021). Neuronska mreža se prethodno "trenira" tako što se izlaže velikom broju ulaznih i izlaznih signala. Iako cilj ove disertacije nije bio kreiranje neuronske mreže i sistema baziranog na veštačkoj inteligenciji, nije teško zamisliti da bi u budućnosti takav sistem mogao biti formiran na osnovu korišćenih parametara mikroskopske slike.

Nažalost, preterano oslanjanje na informacione tehnologije u medicini ima određene mane, i u pojedinim slučajevima može dovesti do grešaka u kliničkom i istraživačkom radu. Za uspešno korišćenje kompjuterskih aplikacija potrebno je određeno znanje i iskustvo iz oblasti informacionih tehnologija, koje lekari često nemaju. To ponekad dovodi do korišćenja aplikacije bez shvatanja kako aplikacija zaista funkcioniše u smislu kompjuterskih algoritama, što može dovesti do pogrešne interpretacije dobijenih rezultata. Zbog toga će u budućnosti, naročito u naučnoistraživačkom radu gde se primenjuju kompjuterske metode, biti preporučljivo kreiranje multidisciplinarnih timova, uz uključivanje stručnjaka sa odgovarajućim predznanjem u razvoju softvera i ostalim računarskim tehnologijama.

## **1.2. Fraktalna, teksturalna i vejevlet analiza jedarne strukture i hromatinske organizacije**

Poslednjih godina u naučnoistraživačkom radu iz oblasti ćelijske biologije i molekularne medicine, posebno su aktuelne kompjuterske tehnike za analizu dvodimenzionalnih signala koje se zasnivaju na inovativnim matematičkim algoritmima (Kott et al. 2021; Marsden et al. 2021). Neke od ovih inovativnih metoda obuhvataju tehnike fraktalne, teksturalne i vejevlet analize, uz pomoć kojih se mogu evaluirati promene unutar digitalnih zapisa poput mikrografa ili radioloških slika. Ove metode su se pokazale kao precizne i objektivne, odnosno rezultati dobijeni njihovom primenom ne zavise od subjektivnog mišljenja patologa, histologa ili radiologa. U prethodnoj deceniji publikovan je veliki broj radova koji su imali za cilj da utvrde njihovu senzitivnost u detekciji strukturnih alteracija u ćelijama i tkivima tokom različitih eksperimentalnih uslova (Pantic et al. 2016; Bulloni et al. 2021; Jurczynszyn et al. 2021). Moguće je da su ove metode sposobne da na indirektni način kvantifikuju strukturne promene u ćelijskom jedru ne samo u smislu ultrastrukture posmatrane elektronskim mikroskopom, već i primenom konvencionalne svetlosne mikroskopije. Ovo je posebno značajno za moguću detekciju strukturnih promena u jedarnom hromatinu koje se dešavaju tokom različitih patoloških procesa. Hromatin bojen specijalnim

histološkim tehnikama, poput Toluidin plavo bojenja ili Felgen bojenja, pokazuje specijalne obrasce (engl. "Structural patterns") u svojoj distribuciji koji u teoriji mogu da se zapaze ili čak identifikuju na ovaj način (Pantic et al. 2017; Paunovic et al. 2019).

Fraktalna analiza je savremeni i inovativni metod pomoću kojeg se mogu na objektivan način odrediti promene u strukturnoj kompleksnosti, odnosno nivou detalja neke strukture (Krupickova et al. 2021; Wang et al. 2021; da Silva et al. 2021). Zasniva se na konceptu "samosličnosti", odnosno opserviranoj pojavi da mnoge biološke strukture posmatrane na različitim skalama imaju sličnost u svojoj unutrašnjoj organizaciji. Samosličnost je relativno često prisutna u biologiji, pa se danas smatra da se mnogi kompleksni molekuli i jedinjenja odlikuju ovim fenomenom. Primer bi bili neki proteini odnosno pojedini aspekti njihove tercijarne strukture, ili molekul ribonukleinske ili dezoksiribonukleinske kiseline.

Hromatin kao makromolekul takođe pokazuje sličnosti u različitim nivoima svoje organizacije, odnosno moguće je da se na njega mogu primeniti pojedini principi karakteristični za fraktale (Li et al. 2021; Lieberman-Aiden et al. 2009). Neki autori smatraju da tradicionalni model ekvilibrijumske globule ne može adekvatno da predstavi sve molekularne, biohemijske i biofizičke aspekte hromatinske organizacije i distribucije. Zbog toga je pre više godina predstavljen takozvani model "fraktalni globule" kao alternativni pristup u izučavanju hromatinske ultrastrukture i interakcija koje se dešavaju u ćelijskom jedru.

Nezavisno od ovog modela, fraktalna analiza se može primeniti u evaluaciji strukturnih promena u jedru ćelije, kao metod za kvantifikaciju kompleksnosti, odnosno minimalnih promena u kompleksnosti koje se dešavaju u ćelijama kao posledica različitih biohemijskih procesa (Dincic et al. 2021). Jedan od najznačajnijih parametara fraktalne analize, fraktalna dimenzija je svojevrsni indikator kompleksnosti, i danas postoje brojne matematičke i kompjuterske tehnike za njeno računanje. Moguće je da se fraktalna dimenzija u pojedinim delovima jedra može menjati u zavisnosti od lokalne transkripcione aktivnosti. Neki autori tvrde da transkripciono aktivni euhromatin i neaktivni heterohromatin u pojedinim okolnostima mogu imati različite vrednosti fraktalne dimenzije (Cherkezyan et al. 2014; Pantic et al. 2016). Još uvek je nepoznato da li je ovo slučaj u svim ćelijama i eksperimentalnim uslovima, kao ni da li je ovaj fenomen prisutan kada se hromatin oboji različitim histološkim tehnikama. Takođe nije poznato da li i u kojoj meri fraktalna analiza može da se primeni u cilju detekcije i merenja promena u odnosu euhromatin/heterohromatin (engl. "euchromatin / heterochromatin ratio"). Ono što jeste poznato je da se fraktalna analiza može upotrebiti za detekciju diskretnih promena koje se dešavaju u ćelijskom jedru i hromatinu kada je ćelija izložena potencijalno štetnim spoljnim ili unutrašnjim agensima (Pantic et al. 2012; Liu et al. 2017). Oštećenje ćelije veoma često ima za rezultat promenu u ekspresiji gena. Neki od ovih gena mogu biti uključeni u sistem DNK popravke, dok su drugi odgovorni za brojne metaboličke procese. Postoji čitava grupacija

gena koji se nazivaju hromatinskim regulatorima, koji direktno ili indirektno utiču na pakovanje DNK i proteina unutar hromatinskog makromolekula. Moguće je da u pojedinim eksperimentalnim okolnostima sve ovo utiče na stepen kompleksnosti jedarne strukture a samim tim i na vrednosti fraktalnih paerametara poput fraktalne dimenzije ili lakunarnosti.

Primer uspešne upotrebe fraktalne analize u detekciji promena koje su rezultat oštećenja ćelije je njena upotreba u evaluaciji ranih procesa koji se u jedru dešavaju tokom apoptoze, odnosno programirane ćelijske smrti (Castelli & Losa, 2001; Pantic et al. 2012; Liu et al. 2017). Apoptoza, u ranim fazama može (ali i ne mora) biti praćena morfološkim promenama u hromatinu, poput marginalizacije i kondenzacije. Takođe, ovo može biti praćeno promenom zapreminskog i masenog odnosa euhromatin / heterohromatin. Moguće je da su pojedini parametri fraktalne analize poput lakunarnosti jednako senzitivni u detekciji rane apoptoze kao i tehnike zlatnog standarda poput metoda protočne citofluorometrije. Prethodne studije su ukazale da čak i tokom konfokalne mikroskopije živih, nebojenih ćelija u kulturi, fraktalni parametri mogu sa velikom preciznošću kvantifikovati diskretne strukturne alteracije u jedru nakon letalnog izlaganja ultraljubičastim zracima (Pantic et al. 2012).

Teksturalna analiza je u osnovi još jedan metod koji se danas kao dodatak fraktalnoj analizi, ili nezavisno od nje, koristi za analizu medicinskih signala (Horvat et al. 2021; Korda et al. 2021). Ovo je, tačnije, čitav skup tehnika koje se mogu upotrebiti za kvantifikovanje teksturalnih obrazaca dvodimenzionalnih zapisa, poput radioloških slika ili mikrografa. Teksturalni obrasci se često menjaju, čak i kada su promene u zapisu veoma diskretne i neprimetne za ljudsko oko. Ovakva senzitivnost teksturalne analize je doprinela tome da se ona danas uveliko koristi u naučnoistraživačkom radu u radiologiji, patologiji, histologiji i ćelijskoj biologiji. Postoji mnogo načina za adekvatno sprovođenje teksturalne analize mikrografa, i oni često uključuju kompleksne matematičke algoritme, odnosno primenu statistike drugog reda na vrednosti rezolucionih jedinica.

Jedan od danas najpoznatijih algoritama teksturalne analize je zasnovan na matriksu simultanog pojavljivanja sivih vrednosti rezolucionih jedinica, odnosno GLCM (Gray level co-occurrence matrix). GLCM metoda se bazira na dodeljivanju numeričke vrednosti svakoj rezolucioj jedinici na digitalnom zapisu, nakon čega se umesto pojedinačnih jedinica (što je slučaj kod nekih drugih metoda) analiziraju njihovi parovi (Horvat et al. 2021; Korda et al. 2021). Parovi jedinica ne moraju nužno da budu horizontalno orijentisani, pa čak ni jedinice ne moraju da budu u neposrednoj blizini jedna drugoj. Nakon toga se primenjuju tehnike takozvane "statistike drugog reda" čime se izračunavaju GLCM parametri. Danas postoji nekoliko savremenih i inovativnih softverskih platformi za teksturalnu analizu, koje omogućavaju čak i korisnicima sa ograničenim znanjem u oblasti matematike da kvantifikuju čitav niz teksturalnih parametara.

GLCM analiza se pre desetak godina uglavnom primenjivala u radiologiji u cilju detekcije i evaluacije patoloških promena u parenhimatoznim organima. Primer bi bila njena upotreba u cilju detekcije lezija u mozgu tokom nekih hroničnih neuroloških poremećaja (Wang et al. 2019). Pokazano je da je ovu metodu moguće primeniti kao svojevrsni kompjuterski automatizovani dodatak konvencionalnoj analizi zapisa dobijenih kompjuterizovanom tomografijom, ili drugim tehnikama tokom kojih se koristi X zračenje (Huang et al. 2021). Takođe, brojne studije su sa uspehom primenile GLCM algoritam u analizi promena u tkivima i organima tokom nuklearne magnetne rezonance. Ponekad su indikatori teksture bili visoko senzitivni u detekciji stanja i bolesti u poređenju sa subjektivnim mišljenjem i nalazom radiologa.

Poslednjih godina, sve je više studija koje pokušavaju da primene GLCM metodu u mikroskopiji i ćelijskoj biologiji (Nikolovski et al. 2019; Topalovic et al. 2021; Alsaade et al. 2021;). Danas postoje kamere za razne tipove svetlosnih i drugih mikroskopa koje su u mogućnosti da proizvedu mikrografe veoma velikih dimenzija i rezolucije. Takođe, brojni programi za obradu slike mogu da mikrograf u digitalnom formatu modifikuju na način da se pojedine karakteristike i detalji bioloških struktura dodatno istaknu i postanu vidljivi tokom konvencionalne histopatološke evaluacije. Teksturalna analiza u ovakvim uslovima rezultuje veoma preciznim i senzitivnim kvantifikacijama teksturalne homogenosti, uniformnosti, neuređenosti i drugih pokazatelja strukturne organizacije ćelija i tkiva.

Na mikrografima se GLCM analiza može uspešno primeniti na nivou celog tkiva u cilju kvantifikacije promena u citoarhitekturi (Shamir et al. 2009; Rajkovic et al. 2016; Bhattacharjee et al. 2019). Na ovaj način specifičnosti u međućelijskoj komunikaciji mogu da se iskažu i pored toga što za profesionalnog patologa (ili histologa) one ne moraju biti vidljive. Teksturalna analiza tkivne citoarhitektonike je do sada sa uspehom realizovana na obojenim preparatima slezine i bubrega. Na primer, pokazano je da se pojedini aspekti teksturalne organizacije bubrežne medule razlikuju kod organa koji je pretrpeo ishemijsko - reperfuzijsko oštećenje u laboratorijskim uslovima na animalnom eksperimentalnom modelu u poređenju sa kontrolom. Razlike u tkivnoj arhitekturi između oštećenog i neoštećenog organa su bile toliko velike da je zaključeno da GLCM metod sam po sebi ima veliku diskriminatornu moć u separaciji dve grupe (Pantic et al. 2016). Još jedan primer bi bio primena teksturalne analize u evaluaciji strukturne dezorganizacije tkiva tokom procesa fiziološkog starenja. Ovakva istraživanja su započeta još 2009. godine, kada su Shamir i saradnici pokazali da na eksperimentalnom modelu *Caenorhabditis elegans* pojedini indikatori teksture mogu biti validni i dragoceni kvantitativni pokazatelj i starenja mišićnog tkiva (Shamir et al. 2009).

Teksturalna analiza se pored evaluacije citoarhitektonike, danas u mikroskopiji uspešno primenjuje i za evaluaciju individualnih ćelija i ćelijskih komponenti (Kanai et al. 2020). Kvantifikacija teksturalnih obrazaca se može sprovesti kako na nivou cele ćelije, tako i na nivou

citoplazme, jedra ili drugih organela (Martinovic et al. 2018). Ovo se u praksi izvodi bilo kreiranjem mikrografa pojedinačnih ćelija, bilo stvaranjem "regiona interesa" pojedine ćelijske komponente u nekom softveru za analizu slike. Moguće je da je jedro danas u najvećem fokusu ovakvih studija pošto se teksturalni obrasci hromatinske organizacije i distribucije drastično mogu menjati čak i tokom minimalnih fizioloških ili patoloških promena u okruženju ćelije. Redistribucija euhromatina i heterohromatina koja nastaje kao posledica epigenetskih promena (povećane ili smanjene ekspresije pojedinih gena) veoma često utiče na ove teksturalne obrasce i to se može manifestovati kroz drugačije vrednosti pojedinih GLCM parametara (Kanai et al. 2020).

U prošlosti, GLCM parametri poput angularnog drugog momenta i inverznog momenta razlike su se pokazali veoma senzitivnim za otkrivanje promena u teksturalnim obrascima hromatinske strukture. Ovi parametri kvantifikuju teksturalnu homogenost, uniformnost i ostale karakteristike strukture i sa uspehom se mogu koristiti za evaluaciju morfoloških alteracija u jedru nakon dejstva nekog spoljašnjeg ili unutrašnjeg faktora. Na primer, tokom maligne transformacije ćelije, jedro može pretrpeti određene promene u teksturalnoj homogenosti. Prethodna istraživanja su pokazala da su GLCM hromatinski indikatori potencijalni biomakeri nekih maligniteta kao što je papilarni tiroidni karcinom (Dincic et al. 2020).

Teksturalna analiza je takođe prethodno sa uspehom primenjena u cilju kvantifikacije redistribucije hromatina koja se odvija tokom programirane ćelijske smrti (Losa & Casteli, 2005). Slično kao kod fraktalne analize pojedini GLCM parametri su potencijalno senzitivni u identifikaciji ćelija koje su u ranoj apoptozi, odnosno neposredno nakon delovanja proapoptotskog hemijskog agensa. Moguće je da kondenzacija i marginalizacija hromatina, odnosno promena odnosa heterohromatin / euhromatin i ovde ima veliki značaj, slično kao kod računanja fraktalne dimenzije i lakunarnosti. Ovakvo korišćenje GLCM je značajno i zbog činjenice da je ova metoda relativno brza, pristupačna i ne zahteva značajna finansijska i materijalna sredstva, što često nije slučaj sa protočnom citofluorometrijom. Konačno, GLCM analiza se može upotrebiti u cilju evaluacije efekata potencijalno toksičnih supstanci na ćelijsko jedro i genom. Ovo je prethodno pokazano u *in vitro* eksperimentima sa neurotoksinom oksidopaminom (Dimitrijevic et al. 2016) i raznim nanomaterijalima poput nanočestica srebra i gvožđa (Nikolovski et al. 2019; Pantic et al. 2020). Posebno su od značaja skorašnja publikovana istraživanja urađena sa nanočesticama oksida gvožđa (magnetitne nanočestice) na eksperimentalnom ćelijskom modelu kvasnica, gde je pokazano da ovakvi materijali, čak i u veoma malim koncentracijama bitno utiču na teksturalne karakteristike ćelijskog jedra. Međutim i pored ovakvih studija, još uvek je nedovoljno poznato da li i u kojoj meri se GLCM i drugi teksturalni matematički algoritmi mogu koristiti za procenu toksičnih efekata različitih štetnih hemijskih agenasa.

Još jedan savremeni i inovativni komputacioni algoritam za kvantifikaciju teksture ćelija i tkiva je takozvana "vejvlet analiza" (Avci et al. 2014; Brandao et al. 2017; Paunovic et al. 2021). Ona se često koristi kao dodatak GLCM metodi i danas su razvijeni programi koji za digitalni zapis ili njegove komponente mogu sprovesti istovremeno i vejvlet i GLCM kvantifikacije (Avci et al. 2014; Brandao et al. 2017; Paunovic et al. 2021). Vejvlet analiza se zasniva na identifikaciji i matematičkoj analizi specifičnih talasa unutar nekog signala (najčešće dvodimenzionalnog). Postoji veliki broj, često veoma kompleksnih matematičkih postupaka pomoću kojih se ovo može ostvariti, ali jedan od konvencionalnih i široko prihvaćenih je takozvana "diskretna vejvlet transformacija". Ovom tehnikom se mogu kvantifikovati vejvlet koeficijenti i njihove energije koje u osnovi predstavljaju još jedan deskriptor teksture (često kao dodatak standardnim GLCM parametrima). Strukturna heterogenost može u pojedinim eksperimentalnim okolnostima bitno uticati na vrednosti vejvlet koeficijenata. Od svih gorepomenutih metoda za analizu signala, barem kada su u pitanju primene u fundamentalnoj medicini, vejvlet analiza je najsavremenija i trenutno neznatan broj publikacija opisuje njenu upotrebu u mikroskopiji i ćelijskoj biologiji. Mnogi aspekti korišćenja vejvlet analize u medicini su neistraženi i ta činjenica otvara mogućnosti njene dalje primene u naučnoistraživačkom radu (Avci et al. 2014; Brandao et al. 2017; Paunovic et al. 2021).

### **1.3. Ekvilibrijumski i fraktalni model organizacije jedarnog hromatina**

Tokom poslednjih nekoliko decenija, takozvani ekvilibrijumski model je bio dominantan mehanizam kojim se objašnjavao način distribucije i pakovanja hromatina u jedru. Ovaj model uvažava nivoe slobodne energije polimera, težnju bioloških sistema ka povećanju entropije (stepena neuređenosti), kao i ostale biofizičke mehanizme u organizaciji polimera u živim organizmima. Po ovom modelu, kod relativno retko pakovanih polimera, postoji tendencija ka formiranju nasumičnih spirala i takozvanih idealnih lanaca. Idealni lanac podrazumeva polimer u kome je verovatnoća interakcije čak i veoma udaljenih monomera ekstremno mala. Nasumične spirale se u praksi zaista dešavaju kada je gustina pakovanja bioloških makromolekula veoma mala. Kad je u pitanju hromatin, ovo bi značilo da kod retkog pakovanja, verovatnoća kontakta i interakcije dva udaljena lokusa mala (Mirny, 2011; Li et al. 2021). Međutim, u većini slučajeva, hromatin se pakuje mnogo gušće, odnosno postoji mnogo veći broj lokusa po jedinici zapremine jedra. Ovo često onemogućava nasumičnu spiralizaciju i formiranje idealnih lanaca. Prema ekvilibrijumskom modelu, kada je polimer komprimovan u izuzetno malom prostoru, ili kada je stepen privlačenja monomera veći od tendencije sistema da povećava entropiju, dolazi do takozvane tranzicije „lanac - globula“ ili „lanac - ekvilibrijumska globula“. Tokom formiranja ekvilibrijumske globule, dolazi do povećanja gustine i smanjenja zapremine prostora koje zauzima polimer. Ova zapremina je u linearnoj korelaciji sa dužinom polimera dok sa druge strane gustina monomera je nezavisna od ove dužine. Frakcija volumena

koju zauzimaju monomeri ostaje konstantna. Ovo je bitna razlika u odnosu na biofizičke zakonitosti koje postoje kod nasumične spiralizacije i idealnih lanaca, jer kod njih monomeri zauzimaju veoma mali deo prostora u odnosu na polimer (Mirny, 2011).

Poslednjih godina pojavio se fraktalni model kao alternativa klasičnom ekvilibrijumskom modelu pakovanja i distribucije hromatina u ćelijskom jedru. Prema ovom modelu, ribonukleinska (RNK) i dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) u hromatinu se delimično organizuju prema fraktalnim principima. Uvijanje DNK oko histonskog oktamera u nukleozomu ima određene sličnosti sa uvijanjem veće grupe nukleozoma. Dalja spiralizacija kroz solenoidne strukture kao i formiranje hromatinskih niti pokazuje još veći stepen samosličnosti kada se posmatra na različitim skalama. Isto važi i za fenomen superspiralizacije DNK kojim se postiže još veća kompaktnost i gustina pakovanja hromatina. Ovakav način pakovanja omogućava da se veliki broj gena, a samim tim i velika količina informacija deponuje u relativno maloj zapremini jedra (Smrek & Grosberg, 2015; Zhou & Gao, 2020).

Prema fraktalnom modelu, tokom smanjenja zapremine polimera, odnosno povećanja njegove gustine, dolazi do formiranja takozvane „fraktalne globule“ (Smrek & Grosberg, 2015; Zhou & Gao, 2020). Za razliku od ekvilibrijumske globule, kod fraktalne globule skaliranje razdaljine između dva kraja lanca unutar polimera se odvija po drugačijim biofizičkim principima (Mirny, 2011). Skaliranje ove razdaljine se kod fraktalne globule odvija na jednotrećinski stepen, u poređenju sa stepenom od jedne polovine kod ekvilibrijumske globule. Kada bi se napravio grafikon kod koga se na apscisi nalazi verovatnoća kontakta između monomera, a na ordinati kvadrat rastojanja krajeva lanca u okviru polimera, kod fraktalne globule je ovaj odnos skoro linearan. Sa druge strane, kod ekvilibrijumske globule odnos je u početku linearan, a kasnije dostiže plato.

Verovatno jedna od najznačajnijih teorijskih karakteristika ekvilibrijumske globule je tendencija ka formiranju čvorova. Ovo proizilazi iz same nasumične organizacije polimera u ovakvom konceptu i dolazi do izražaja već u inicijalnim fazama tranzicije „lanac - globula“. Čvorovi se razlikuju po veličini, prostoru koji zauzimaju, kao i dinamičnom formiranju i nestajanju. Međutim u praksi, kod bioloških makromolekula poput hromatina, formiranje čvorova je relativno retko, što je potvrđeno kako biohemijskim metodama poput FISH tehnike, tako i kroz kreiranje matematičkih kompjuterskih modela. 3D kompjutersko modelovanje hromatinske organizacije je pokazalo da u okviru hromatinske strukture postoje relativno homogena polja sa visokim stepenom uniformnosti što bi bilo u suprotnosti sa organizacijom u kojoj dominiraju čvorovi manjih ili većih dimenzija. Ovo je verovatno jedan od najjačih argumenata protivnika ekvilibrijumskog modela hromatinske strukture i navelo je mnoge istraživače da prihvate fraktalni koncept (Smrek & Grosberg, 2015; Zhou & Gao, 2020).

Potrebno je istaći da mnogi aspekti vezani za fraktalnost DNK molekula i hromatina kao celini ostaju nejasni i neistraženi. Ovo se odnosi pre svega na biofizičke principe pakovanja hromatinskog makromolekula u jedru, ali i načina na koji spoljnji činioci utiču na tu fraktalnost. Nejasno je da li i u kojoj meri je fraktalna analiza hromatna uopšte primenljiva i značajna kada je u pitanju evaluacija hromatinske organizacije na različitim skalama. Takođe, ostaje nepoznato da li neki hemijski agensi poput nanomaterijala, koji imaju specifične hemijske i fizičke karakteristike zbog svojih malih dimenzija, mogu uticati na fraktalnu dimenziju i druge parametre hromatina koji se odnose na fraktalnost.

#### **1.4. Organizacija jedarnog hromatina hepatocita i promene nakon dejstva toksina**

Jedro hepatocita je okruglo i svojim oblikom na dvodimenzionalnom mikrografu često predstavlja savršenu kružnicu (cirkularnost jedarne membrane je veoma blizu vrednosti 1). Po ovoj karakteristici, hepatociti se često ističu u odnosu na ostale ćelije jetre (endotelijalne, Kupferove) koje često imaju izduženo ili poligonalno jedro. Hromatin hepatocita je u velikoj meri heterogen i ovo takođe predstavlja razliku u odnosu na druge ćelijske populacije kod kojih je hromatin u velikoj meri kondenzovan. Jedarce je često jasno vidljivo u centru jedra, a heterohromatina ima najviše blizu jedarne membrane.

Hromatin hepatocita pokazuje visok stepen varijabilnosti kako između različitih lobulusa, tako i u samom lobulusu (Muriel, 2017; Arias et al 2020). Dispergovanost euhromatina i heterohromatina često se značajno razlikuje u zavisnosti od toga da li je hepatocit bliže portalnom prostoru ili veni centralis. Takođe, parcijalni pritisak kiseonika, prisustvo nekih hranljivih materija, kao i pojedini hormoni mogu takođe uticati na distribuciju hromatina u jedru (što je uostalom slučaj i sa mnogim drugim ćelijama). Konačno, zapaljenski procesi, kao i dejstvo (direktno ili indirektno) ćelija imunskog sistema značajno utiču na procese kondenzacije i marginalizacije hromatina. Ovi procesi se javljaju i kada ćelija uđe u proces programirane ćelijske smrti, ili kada pretrpi određeno oštećenje.

Ono što hromatin hepatocita bitno razlikuje u odnosu na mnoge druge ćelijske populacije je fenomen poliploidije (Zhang et al. 2019; Barajas et al. 2021; Sladky et al. 2021). U prenatalnom razvoju i neposredno nakon rođenja, velika većina hepatocita je diploidna. Sa postnatalnim razvojem i tokom procesa starenja počinju da se uočavaju tetraploidni, pa i oktaploidni hepatociti. Kod glodara kao što su miševi, nije neuobičajeno da se u fiziološkim uslovima, na standardnom preparatu tkiva jetre obojenom hematoksilin eozinom rutinski uoče hepatociti sa dva jedra. Fiziološka svrha ove poliploidije još uvek nije dovoljno izučena, ali smatra se da je osnovni mehanizam njenog nastanka u promeni uobičajenog načina formiranja deobnog vretena i naknadne migracije hromozoma, ili u disfunkciji celog procesa citokineze. Naime, poliploidija kod drugih ćelijskih populacija je relativno retka u fiziološkim uslovima, i obično je pokazatelj težih



oštećenja genoma. Fenomeni poput tetraploidije obično ukazuju ili na sam početak ili na povećanu verovatnoću maligne transformacije. Poliploidija je takođe relativno česta kod kancerskih ćelija.

Kod nekih drugih ćelijskih vrsta, poliploidija nastaje kao posledica fuzije, ali kod hepatocita to izgleda nije slučaj. Moguće je da je poliploidija zaštitni mehanizam koji povećava otpornost ćelije na dejstvo fizičkih, hemijskih i bioloških faktora (Zhang et al. 2019; Barajas et al. 2021; Sladky et al. 2021). Oštećenje DNK kod poliploidije ne mora da rezultira smrću ćelije jer postoji rezerva DNK u vidu još jednog istog hromozoma. Druga mogućnost je da se kod poliploidije povećava proliferativni potencijal ćelije, odnosno sposobnost da dođe do rapidnog povećanja broja hepatocita odmah nakon nastanka oštećenja jetre. Ćelija koja već ima dupliran broj hromozoma mnogo brže će da se podeli na dve obične ćelije, pošto nema potrebe da se čeka na proces replikacije genetskog materijala.

Konačno, treba uzeti u obzir mogućnost da poliploidija kod hepatocita nema nikakvu značajnu fiziološku ulogu već da je prosto posledica oštećenja u procesu deobe ili ulaska u deobu već prethodno oštećene ćelije (Zhang et al. 2019; Barajas et al. 2021; Sladky et al. 2021). Činjenica je da su hepatociti izloženi velikom broju toksičnih supstanci, s obzirom da predstavljaju prvi filter i liniju odbrane za supstance koje bivaju apsorbirane u tankom i debelom crevu. Moguće je da je ova izloženost toksinima pa samim tim i stepen oštećenja mnogo veći u poređenju sa drugim ćelijskim populacijama, ili da sami hepatociti imaju nedostatak nekog odbrambenog mehanizma koji je karakterističan za druge ćelije. Takođe, štetni faktori koji izazivaju oštećenje genetskog materijala ne moraju uopšte biti poreklom iz spoljne sredine. Sama činjenica da hepatociti poseduju ogroman broj mitohondrija ukazuje na to da su u njima prisutni procesi (oksidativna fosforilacija, elektronski transport) koji prirodno, u fiziološkim uslovima indirektno dovode do stvaranja toksičnih produkata. Najozbiljniji kandidati za ovakve produkte su svakako slobodni kiseonični radikali. Ova teorija je u saglasnosti sa činjenicom da se broj hepatocita sa poliploidijom (i generalno hepatocita sa neobičnom distribucijom hromatina u jedru) povećava sa procesom fiziološkog starenja (Muriel, 2017; Arias et al 2020).

Jedarce kod hepatocita je u osnovi slično kao jedarce drugih ćelijskih vrsta. To je mesto gde dolazi do stvaranja ribozoma i u svom sastavu ima, pored DNK i određenu količinu RNK. Razne vrste proteina se takođe nalaze u jedarcu od kojih neki učestvuju u procesima transkripcije, dok drugi održavaju strukturni integritet jedarca (Muriel, 2017; Arias et al 2020). Većina hepatocita ima samo jedno jedarce, ali ponekad se mogu naći i hepatociti sa dva jedarca. Drugi satelitski nukleusi su obično specifični u svom proteinskom sastavu, i mogu u pojedinim situacijama da ukazuju na povećan stepen oštećenja hromatina izazvan bilo spoljnim ili unutrašnjim faktorima.

Dinamika hromatinske distribucije hepatocita, kao i kod drugih ćelija je veoma kompleksna i pod uticajem je velikog broja gena (Wang et al.

2019). Neki od njih, takozvani hromatinski regulatori mogu da regulišu stepen kondenzacije i prelazak euhromatina u heterohromatin. Neki geni ne utiču direktno na odnos euhromatin / heterohromatin, već samo na distribuciju. Heterohromatin blizu jedarne membrane je relativno stabilan i manje podložan promenama. Za razliku od njega, heterohromatin u unutrašnjosti jedra je veoma promenljiv, i u pogledu njegove lokalizacije, i u pogledu zapremine jedra koju zahvata. Ove promene naročito mogu da dođu do izražaja nakon toksičnog oštećenja jetre, odnosno tokom procesa regeneracije i reparacije jetrinog parenhima.

Nakon dejstva toksina, epigenetske promene koje se dešavaju u jedru hepatocita imaju veliki značaj u smislu određivanja dalje sudbine ćelije. Dediferencijacija u prekurzorske ćelije ili transdiferencijacija hepatocita su samo neke od posledica hromatinskog remodelovanja i drugih procesa vezanih za promenu u transkripciji pojedinig gena (Aloila, 2021). Acetilacija i deacetilacija u hromatinu, zatim promene u nivoima metilacije i hidrosimetilacije DNK molekula, kao i promene u stepenu metilacije histonskih proteina značajno menjaju strukturnu organizaciju hromatina hepatocita nakon povrede. Ovi procesi ne moraju da budu prisutni samo u akutnom oštećenju, već i kod mnogih hroničnih bolesti i stanja poput kancera jetre ili hronične hepatične insuficijencije (Aloila, 2021).

Tokom toksičnog oštećenja jetre, često postoji čitav niz proteina "hromatinskih remodelatora" koji su uključeni u odgovor hepatocita, odnosno odluke da li će ćelija proliferisati, ući u apoptozu ili se transformisati na neki specifični način, kao što su Brg1 protein (engl. "chromatin remodeling protein brahma related gene 1), hepatocitni nuklearni faktor 4 (hepatocyte nuclear factor 4 - HNF4) i mnogi drugi (Nan et al. 2018). Neki od ovih proteina i njihovih gena su povezani sa promenama u nivoima transaminaza u serumu. Takođe, aktivnost pojedinih hromatinskih remodelatora može biti povezana sa oksidativnim stresom, odnosno generisanjem reaktivnih kiseoničnih jedinjenja u hepatocitima i generalno u jetri.

I pored brojnih studija fokusiranih na faktore koji utiču na remodelovanje hromatina u jedru hepatocita, i dalje brojna pitanja ostaju otvorena. Nepoznato je da li kod subletalnih oštećenja ćelije koja nisu praćena radikalnim procesima, kao što su apoptoza ili nekroza, postoje promene u smislu značajne redistribucije euhromatina i heterohromatina. Takođe je nedovoljno izučeno u kojoj meri se epigenetski procesi u jedru hepatocita odražavaju na morfološke karakteristike jedra pri konvencionalnoj histopatološkoj analizi tkiva. Konačno, ne zna se da li i u kojem obimu pojedine potencijalno hepatotoksične supstance koje lako prolaze kroz biološke barijere, poput nekih nanomaterijala, mogu da utiču na proces remodelovanja hromatina hepatocita.

### **1.5. Nanočestice gvožđa i njihova potencijalna citotoksičnost i hepatotoksičnost**

Nanomaterijali bazirani na gvožđu su danas jedni od najčešće korišćenih nanomaterijala u medicinskim istraživanjima. Skoro sve danas poznate medicinske aplikacije nanočestica se mogu pripisati i ovim nanomaterijalima. Ovo uključuje korišćenja gvožđa u nano obliku kao nosača za razne lekove, potencijalnog kontrastnog sredstva, kao i upotrebu u svrhu kreiranja različitih bioeseja za detekciju i merenje biološki aktivnih molekula. Pored toga, ovi materijali imaju feromagnetna svojstva koja im daju potencijalne dodatne primene u medicini i biologiji. Uz to, gvožđe je važan hemijski element koji se normalno unosi hranom i u organizmu je od velikog značaja u brojnim fiziološkim funkcijama (Saha and Saha, 2021; Li et al. 2021; Akhmedov et al. 2021; García-Belda et al. 2021; Verma et al. 2021).

Gvožđe kao metal i deo raznih jedinjenja je prisutno u ljudskom organizmu u relativno velikim količinama u poređenju sa nekim drugim hemijskim elementima. Prisutno je u okviru hemoglobina u krvi i mioglobina u mišićima, i ima veliku ulogu u transportu kiseonika od pluća do tkiva i deponovanju kiseonika u tkivima. Ćelijska respiracija i oksidativna fosforilacija u mitohondrijama su procesi koji u velikoj meri zavise od prisustva gvožđa u jonskom obliku. Značajne količine gvožđa se svakog dana unose u organizam putem hrane, ali i gube iz organizma putem gastrointestinalnog trakta. Metabolizam gvožđa u ljudskom organizmu predstavlja skup kompleksnih biohemijskih procesa, pri čemu postoji veliki broj enzima i hormona koji ga na direktan ili indirektan način regulišu (Crichton, 2016).

Iako je gvožđe od vitalnog značaja za obavljanje brojnih fizioloških i biohemijskih procesa u organizmu, ono, u pojedinim slučajevima može biti toksično. Gvožđa u slobodnom obliku ima veoma malo kako u ekstracelularnom, tako i u intracelularnom prostoru. Umesto toga, gvožđe je vezano za proteine, kofaktore ili za druga jedinjenja jakim ili slabim vezama. Na primer, hem je kofaktor veoma jakim vezama povezan sa gvožđem koje je u njemu "bezbedno". Sa druge strane, pojedini molekularni kompleksi za koje je gvožđe vezano slabim vezama mogu u patološkim uslovima osloboditi jon gvožđa u ćeliji ili njenoj okolini što dovodi do toksičnosti (Crichton, 2016; Kopec et al. 2021; Pérez-Peiró et al. 2021; Chen et al. 2021).

U kliničkoj praksi, toksičnost gvožđa se često uočava nakon ingestije velike količine mineralnih suplemenata (od kojih se mnogi slobodno mogu kupiti na tržištu), ili sirupa koji sadrže gvožđe u velikom procentu (ovo je jedan od najčešćih uzroka trovanja kod dece). Klinički znaci i simptomi trovanja uključuju abdominalne bolove, muku, povraćanje, pad krvnog pritiska, krvarenje, povećanje telesne temperature i kolaps kardiovaskularnog sistema. U najtežim slučajevima dolazi do metaboličke acidoze, otkazivanja jetre, otkazivanja bubrega, diseminovane intravaskularne koagulacije, šoka i smrti. Obično, unos gvožđa u količini većoj od 50 miligrama po kilogramu telesne mase je praćen simptomima i znacima teške kliničke slike koje potencijalno ugrožava život pacijenta. Lečenje trovanja gvožđem uključuje davanje helatnog agensa

deferoksamina, koji vezuje slobodno gvožđe, nakon čega se helat izbacuje iz organizma putem urina. Alternativa ili dodatak terapiji deferoksaminom je dijaliza koja se u kliničkoj praksi primenjuje sa ograničenim uspehom. Trovanje gvožđem svake godine je odgovorno za smrt velikog broja ljudi i smatra se da najveći procenat trovanja sa smrtnim ishodom dece ispod šest godina starosti otpada upravo na trovanje suplementima koji sadrže visok procenat gvožđa (Crichton, 2016; Bhandari et al. 2021; Kopeć et al. 2021).

Za razliku od klasičnog gvožđa, gvozdeni nanomaterijali imaju specifična fizička, hemijska i biološka svojstva koja utiču da njihova apsorpcija, biodistribucija, eliminacija bude nešto drugačija. Osnovni uslov da gvožđe ili jedinjenje gvožđa može da se klasifikuje kao nanomaterijal je da njihove čestice imaju dijamentar manji od 100 nanometara (što je uostalom uslov i za svaki drugi nanomaterijal). Danas se u medicinskim istraživanjima najčešće koriste nanočestice dva oksida gvožđa: gvožđe (II, III) oksida odnosno magnetita, i gvožđe (IV) oksida odnosno maghemita. Magnetitne nanočestice su se u praksi pokazale kao stabilne sa velikim potencijalom u smislu funkcionalizacije i drugih bioloških primena (Vu et al. 2021; Lemine et al. 2021).

Magnetitne nanočestice su danas u fokusu brojnih istraživačkih timova u oblasti istraživanja raka, radiologije i nuklearne medicine (Vu et al. 2021; Lemine et al. 2021). Superparamagnetske nanočestice kroz procese kovalentne i nekovalentne konjugacije se mogu vezati sa brojnim biološki aktivnim molekulima kao što su na primer antikancerski lekovi. Izmenom fizičkih ili hemijskih svojstava nanočestica se može postići specifično ciljanje tumorskog tkiva, odnosno na ovaj način zdravo tkivo se izlaže manjim dozama leka. Ova ciljana dostava leka (engl. "targeted drug delivery") nije karakteristična samo za magnetitne ili gvozdene nanočestice, već predstavlja potencijalnu primenu i za ostale metalne nanomaterijale (Hashemzadeh et al. 2021). Specifičnost magnetitnih nanočestica se odnosi na njihova superparamagnetska svojstva, odnosno mogućnost njihove kontrole modulacijom karakteristika magnetnog polja.

Još jedna važna medicinska primena magnetitnih nanočestica je u radiologiji u smislu proizvodnje savremenih kontrastnih agenasa. Ova kontrastna sredstva se najčešće primenjuju u nuklearnoj magnetnoj rezonanci sa ciljem povećanja rezolucije i drugih karakteristika slike čime postaju vidljiva određena patološka stanja i procesi. Nanočestice veoma malog dijametara (manjeg od pet nanometara) mogu da se koriste kao pozitivna kontrastna sredstva, dok se veće čestice koriste kao negativna (Shen et al. 2016). Možda je najbolji primer ovakve primene upotreba magnetitnih nanočestica za vizuelizaciju hroničnih neuroloških stanja i bolesti poput tumora mozga (Du et al. 2020).

Nanočestice gvožđe (II, III) oksida i drugih oksida gvožđa se danas takođe sa uspehom primenjuju u terapijskim strategijama magnetne hipertermije. Magnetna hipertermija predstavlja eksperimentalnu vrstu terapije za neke solidne tumore, i zasniva se na činjenici da neki materijali,

zahvaljujući svojim feromagnetnim svojstvima nakon izlaganja određenom (alterirajućem) elektromagnetnom polju mogu da transformišu elektromagnetnu energiju u toplotu. Kancerske ćelije su često osjetljivije na visoke temperature u poređenju sa (okolnim) zdravim ćelijama. Koristeći ovakav pristup, modulacijom elektromagnetnog polja moguće je naći optimalnu vrednost temperature pri kojoj dolazi do značajne redukcije tumora, a bez značajnog oštećenja zdravog tkiva (Gavilan et al. 2021; Storozhuk et al. 2021; Chen et al. 2021).

Jedan od glavnih razloga zašto su nanočestice gvožđa i oksida gvožđa poslednjih godina toliko popularne u medicinskim istraživanjima je pretpostavka da je njihova potencijalna toksičnost u ljudskom organizmu relativno mala ili čak zanemarljiva (Yadwade et al. 2021). Postoji percepcija da se ove čestice biološki transformišu i eliminišu na način koji nije štetan po ljudsko zdravlje. Takođe, ukupno opterećenje gvoždem tokom konvencionalne primene ovih nanočestica (npr. u svrhu magnetne hipertermije) nije toliko veliko da izazove značajne toksične efekte u jetri ili bubrezima. Takođe, u organizmu postoje brojni sistemi i biohemijski putevi za transport, deponovanje i modifikaciju gvožđa i jedinjenja gvožđa, i mnogi od njih mogu uspešno da redukuju potencijalnu štetu nastalu čak i pri većem i dužem izlaganju nanočesticama.

Nasuprot tome, poslednjih godina su sprovedena brojna istraživanja koja su ukazala na potencijalnu citotoksičnost gvozdenih nanomaterijala, dovodeći u pitanje ranije pretpostavke i zaključke na ovu temu. Moguće je da nanočestice oksida gvožđa na pojedinim ćelijskim populacijama dovode do povećanog stvaranja slobodnih kiseoničnih radikala poput superoksidnog anjona i hidrosilnog radikala (Karimi et al. 2020; Bakhtari et al. 2020; Verma et al. 2021). Ova jedinjenja imaju destruktivni efekat (direktno ili indirektno) na genetski materijal ćelije i dovode do aktivacije čitavog niza signalnih puteva u citoplazmi i jedru ćelije. Ako oštećenja ne mogu da se na adekvatan način poprave, može se pokrenuti proces programirane ćelijske smrti. Drugi potencijalni način na koji gvozdeno nanočestice iskazuju svoje citotoksične efekte je tako što dovode do povećane ili smanjene ekspresije pojedinih gena u jedru, odnosno uzrokuju epigenetske promene. Jedna od prethodnih studija je čak pronašla da u određenim dozama i eksperimentalnim uslovima strukturne promene u jedru izazvane magnetnim nanočesticama mogu biti čak i kvantifikovane gorepomenutim kompjuterskim algoritmom teksturalne analize (Nikolovski et al. 2019). Ipak, istraživanja iz ove oblasti su tek na početku, tako da generalno o citotoksičnosti ove vrste nanočestica u ovom trenutku ne možemo doneti bilo kakav zaključak. Isto važi i za preporuke vezane za bezbedno korišćenje sistema baziranih na ovim česticama u kliničkoj praksi.

Potencijalna hepatotoksičnost nanočestica gvožđa i oksida gvožđa je nedovoljno istražena, i do danas je publikovano samo nekoliko studija koje su ovaj problem ispitivale na animalnim eksperimentalnim modelima (Rajan et al. 2015; Easo et al. 2016; Che et al. 2020). Rezultati su uglavnom nejasni i često u suprotnosti jedni sa drugima. Pojedini autori tvrde da nakon

tretmana ovim nanočesticama ne dolazi do značajnih morfoloških promena u jedru dok drugi prijavljuju jasno vidljive strukturne alteracije u tkivu, kao i značajan stepen inflamacije i fibroze. Da li i na koji način magnetitne nanočestice utiču na sveukupni oksidativni status u tkivu jetre još uvek nije poznato. Takođe, nismo uspeli da pronađemo nijednu studiju koja je ispitivala potencijalni uticaj ovih nanočestica na epigenetski profil hepatocita, kao ni na distribuciju euhromatina i heterohromatina u jedru ovih ćelija.

Iz svega gorenavedenog se može zaključiti da, i pored velike potencijalne primene gvozdernih nanomaterijala u velikom broju medicinskih disciplina, njihova toksičnost je još uvek nedovoljno ispitana. Ovo se odnosi kako na citotoksičnost nanočestica u smislu proapoptotskog delovanja i oksidativnog stresa, tako i na njihovu moguću hepatotoksičnost. Takođe, korišćenjem savremenih informacionih tehnologija i modernih kompjuterskih algoritama, otvaraju se nove mogućnosti za evaluaciju dejstva gvozdernih nanočestica na morfološke, a možda i funkcionalne karakteristike hromatinske organizacije u jedru hepatocita. Stoga postoji potreba za sprovođenjem studije koja bi ove procese ispitivala, odnosno metode primenila na animalnom eksperimentalnom modelu, i time dala doprinos daljim istraživanjima u oblasti patološke fiziologije, toksikologije i mikroskopije.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati da li su metode fraktalne, teksturalne i vevjlet analize u mogućnosti da detektuju diskretne strukturne promene hromatina hepatocita uzrokovane nanočesticama gvožđe (II, III) oksida, koje nisu uočljive uz pomoć metoda konvencionalne svetlosne mikroskopije.
2. Istražiti uticaj nanočestica gvožđe (II, III) oksida na parametre oksidativnog stresa u jetri.
3. Odrediti da li postoji povezanost matematičkih parametara strukturne organizacije hromatina hepatocita i oksidativnog statusa jetre u fiziološkim uslovima i nakon izlaganja nanočesticama gvožđe (II, III) oksida.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Eksperimentalni protokol

Istraživanje je sprovedeno na miševima soja C57BL/6 muškog pola, starosti 16 nedelja, dobijenih iz ovlašćenog Vivarijuma Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu. Rad na ovoj doktorskoj disertaciji je odobren od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu 29.05.2020. kao i od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije - Uprava za veterinu (rešenje broj 323-07-07783/2020-05 od 23.07.2020). Svi eksperimenti su sprovedeni u skladu sa Univerzalnom deklaracijom o dobrobiti životinja (WSPA, London, 2000), Evropskom konvencijom o zaštiti kičmenjaka koji se koriste za ogledne i druge naučne svrhe (1998), kao i drugim nacionalnim i međunarodnim dokumentima koji se odnose na stručan i human rad sa oglednim životinjama i dobru laboratorijsku praksu.

Prvo preliminarno, pilot istraživanje, je sprovedeno na 10 životinja. Životinjama su uvedene u opštu anesteziju, odmah žrtvovane iskrvarenjem i uzeti su uzorci jetre, nakon čega su napravljeni mikroskopski preparati tkiva. Cilj ovog istraživanja je bila kalibracija kompjuterske opreme i softvera za fraktalnu, teksturalnu i Harovu vejevlet analizu na tkivu jetre u fiziološkim uslovima. Takođe, u okviru ovog rada ispitivani su različiti protokoli toluidin plavo bojenja, i izabran je onaj koji je bio najadekvatniji za fraktalnu i teksturalnu analizu. Ispitivane su varijacije u kompjuterskim parametrima hromatina unutar pojedinačnih uzoraka, na primer između periportalnih i perivenskih hepatocita. Takođe su poređeni rezultati dobijeni korišćenjem različitih softverskih platformi i na različitim formatima slike. Pojedini metodološki aspekti ovog dela disertacije su opisani u našoj publikaciji (Paunovic et al. 2019). Definisana je precizna protokol (opisan u daljem tekstu) u smislu bojenja, svetlosne ekspozicije, rezolucije mikrografa, i drugih parametara koji su bili primenjeni u daljem radu.

Glavni deo rada u okviru ove disertacije je bio podeljen na dva eksperimenta. Prvi eksperiment je urađen na 40 miševa koji su podeljeni u četiri grupe od po 10 životinja. Tri eksperimentalne grupe su intraperitonealno dobijale nanočestice gvožđe (II, III) oksida (Hongwu International Group Ltd. HWNANO materials, Guangzhou, Guangdong, Kina) svakog dana u dozi od 1mg/kg, 2 mg/kg, odnosno 3 mg/kg u periodu od 3 dana, dok je četvrta (kontrolna) grupa dobijala fiziološki rastvor. Nanočestice koje su upotrebljene u ovoj studiji i preliminarni rezultati vezani za njihov uticaj na strukturu i teksturu ćelijskog jedra su opisani u prethodnoj publikaciji (Nikolovski et al. 2019). Nakon isteka ovog perioda, životinje su žrtvovane i uzeti su uzorci krvi radi određivanja aktivnosti transaminaza u serumu, i uzorci jetre radi određivanja parametara oksidativnog stresa, kao i pravljenja obojenih preparata.



U drugom eksperimentu, 40 miševa je takođe bilo podeljeno u četiri grupe od po 10 životinja. Tri eksperimentalne grupe su intraperitonealno dobile nanočestice gvožđe (II, III) oksida svakog dana u dozi od 1mg/kg, 2 mg/kg, odnosno 3 mg/kg u periodu od 7 dana, dok je četvrta (kontrolna) grupa dobijala fiziološki rastvor. Slično prethodno opisanom protokolu, životinje su žrtvovane, nakon čega je urađena odgovarajuća biohemijska, mikroskopska i kompjuterska analiza. Na ovaj način, pored detekcije potencijalnih dozno-zavisnih promena, izvršena je i detekcija vremenski zavisnih promena u tkivu jetre i krvnom serumu (izlaganje nanočesticama u trajanju od 7 dana u poređenju sa izlaganjem u trajanju od 3 dana).

### 3.2. Biohemijske analize krvi i tkiva jetre

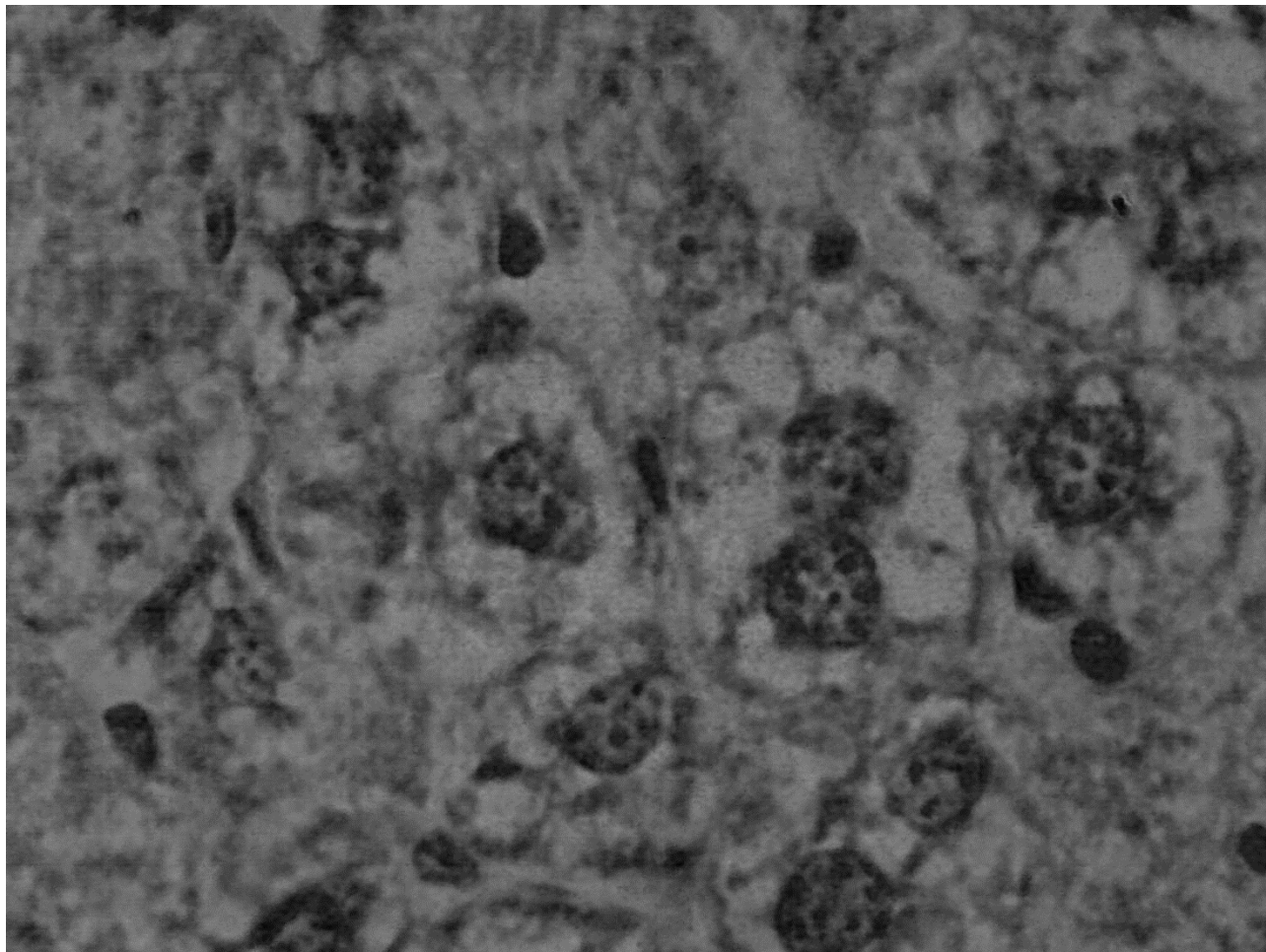
Iz krvi su određeni parametri oštećenja ćelija jetre u vidu aktivnosti alanin- i aspartat-aminotransferaze. Ova dva enzima se u kliničkim uslovima rutinski određuju kao svojevrsni biomarkeri funkcije i oštećenja jetre. Povišen nivo ovih enzima se često može detektovati nakon delovanja različitih hepatotoksičnih agenasa. Aktivnost transaminaza iz seruma je određivana sprektrofotometrijski u reakcijama oksidacije NADH. Ova tehnika je detaljno opisana u prethodno publikovanom radu (Huang et al. 2006).

Deo tkiva jetre je korišćen za određivanje parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite poput malondialdehida, glutationa, superoksid dismutaze i katalaze. Malondialdehid je određen spektrofotometrijski u reakciji sa tiobarbiturnom kiselinom, kao što je urađeno u prethodnoj studiji, pri čemu nastaje obojeni kompleks, a količina stvorenog MDA je izmerena spektrofotometrijski (Vučević et al. 2020). Sadržaj glutationa je određen spektrofotometrijski primenom 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoeve kiseline. Aktivnost superoksid dismutaze je određena spektrofotometrijski kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina u baznoj sredini. Konačno, aktivnost katalaze biće određena korišćenjem vodonik peroksida kao što je opisano u prethodno publikovanom radu (Vučević et al. 2020).

### 3.3. Histološka obrada tkiva jetre i kompjuterska analiza hromatinske organizacije hepatocita

Uzorci jetre su fiksirani, kalupljeni, isečeni i obojeni specijalnom modifikacijom toluidin plavo tehnike koja je korišćena u našoj prethodno publikovanoj studiji za teksturalnu analizu hromatina (Pantić et al. 2016). Ukratko, fiksacija je obavljena u Karnua rastvoru (engl. „Carnoy's solution“) koji se sastojao od 60% etanola, 30% hloroforma i 10% glacijalne sirćetne kiseline. Tkivo je zatim kalupljeno u Paraplastu, a zatim su napravljeni isečci debljine 5 mikrometara i položeni na predmetna stakla. Preparati su zatim tretirani ksilolom (dva tretmana u trajanju od 15 min) a zatim apsolutnim etanolom (2 × 2 min). Nakon toga je usledio tretman 96% etanolom (2 min), a zatim 70% etanolom (5 min). Za bojenje je korišćena toluidin plava boja u procentu 0.5% u 0.01 N hlorovodoničnoj kiselinu u

trajanju od 30 minuta. Na kraju, usledio je tretman apsolutnim etanolom i ksilolom u trajanju od 15 minuta, kao što je opisano u našem prethodno publikovanom radu(Pantic et al. 2016).



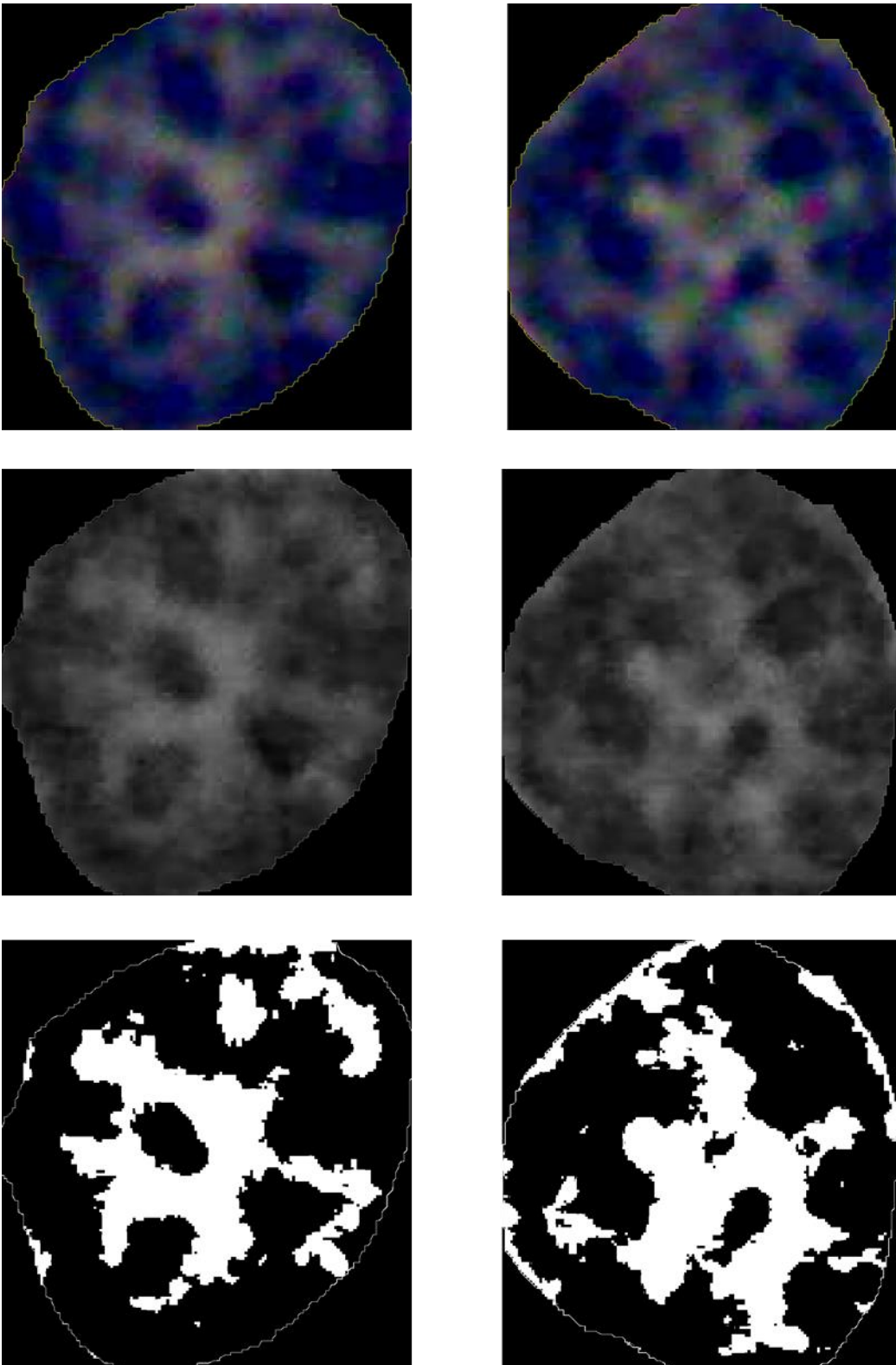
Slika 1. Digitalni mikrograf u 8-bit formatu sa vidljivim jedrima hepatocita.

Nakon bojenja, napravljeni su digitalni mikrografi tkiva (Slika 1) uz pomoć Pro-MicroScan DEM 200 instrumenta sa CMOS čipom velike brzine (Oplenic Optronics, Hangzhou, Kina), postavljenim na mikroskop Olympus CX21FS1 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Digitalni mikrografi tkiva su napravljeni i po uzoru na naše prethodno publikovane studije (Pantic et al. 2016; Pantic et al. 2017). Naime, dimenzije mikrografa su bile 1600 x 1200 rezolucioni jedinica, horizontalna rezolucija 96 dpi, vertikalna rezolucija 96 dpi a bitna dubina je imala vrednost 24. U pilot eksperimentu su mikrografi napravljeni u JPG formatu, a zatim konvertovani u 8-bit oblik, i mikrografi u BMP formatu dobijen konverzijom originalnog JPG formata. Nakon testiranja i analize na različitim softverskim platformama, odlučeno je da se za glavni deo studije koristi BMP format. Za svaku životinju napravljeno je najmanje 6 mikrografa, a na svakom mikrografu je analizirano najmanje 5 hromatinskih struktura hepatocita. Na ovaj način, u

okviru ove disertacije, analizirano je ukupno najmanje 2700 ćelija i dobijeno preko 30000 vrednosti fraktalnih, teksturalnih i vejevlet matematičkih parametara koji su zatim statistički obrađeni.

### *3.3.1. Teksturalna analiza upotrebom GLCM algoritma*

Teksturalna analiza je urađena na regionima interesa (engl. „Regions of interest“), koji su obuhvatili individualne hromatinske strukture hepatocita (Slika 2). Regioni od interesa su određivani direktno na BMP odnosno JPG mikrografu koji je po potrebi prethodno konvertovan u 8-bitni oblik u softveru ImageJ Nacionalnog instituta za zdravlje (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). U okviru pilot istraživanja, kalibrisane su i testirane dve softverske platforme za teksturalnu analizu. Prva platforma je predstavljala CellProfiler softver Masačusets instituta za tehnologiju i Univerziteta Harvard (CellProfiler software, Broad Institute of Harvard and Massachusetts Institute of Technology, MA, USA), dizajniran od strane Anne Carpenter, Thouis Jones i Lee Kamentsky. Ovaj algoritam je opisan u prethodnim publikacijama autora (Carpenter et al. 2006; Lamprecht et al. 2007; Kamentsky et al. 2011). Druga platforma je predstavljala softver Mazda, koji su dizajnirali Kociołek, Szczypinski i Strzelecki sa Tehničkog univerziteta Lođ u Poljskoj. Ovaj program je napisan u C++ and Delphi© programskim jezicima kao deo COST B21 projekta Evropske Unije pod nazivom “Physiological modelling of MR Image formation” i COST B11 projekta “Quantitative Analysis of Magnetic Resonance Image Texture”. Ove dve platforme se radikalno razlikuju u pristupu i protokolu vezanom za teksturalnu analizu. Pored ostalog, one koriste različite formate mikrografa za inicijalnu obradu, i algoritmi za ROI označavanje i obradu su takođe različiti. Što se reflektuje kroz izlazne vrednosti teksturalnih parametara. Mazda se takođe odlikuje integrisanom diskretnom vejevlet transformacijom tekture uz standardnu teksturalnu analizu. Nakon poređenja ove dve tehnike, za obradu naših mikrografa tkiva jetre u glavnom delu disertacije opredelili smo se za softver Mazda. Detalji kompjuterskog algoritma koji se ovde koristi se mogu naći u prethodnim publikacijama autora (Kociołek et al. 2001; Szczypinski et al. 2007; Szczypinski et al. 2009).



Slika 2. Regioni interesa dve hromatinske strukture. Izvršena je konverzija u 8-bit format pogodan za GLCM i vejevlet analizu, kao i binarizacija pogodna za fraktalnu analizu.

Teksturalna analiza je urađena upotrebom tehnike matriksa simultanog pojavljivanja sivih vrednosti rezolucionih jedinica (engl. „Gray level co-occurrence matrix, GLCM“). Svako rezoluciono jedinici je dodeljena odgovarajuća vrednost na osnovu intenziteta sive boje, a zatim su

izračunate distribucije parova sivih vrednosti i urađena je statistička analiza drugog reda. Na osnovu rezultata ove analize, za svaku hromatinsku strukturu, na platformi Mazda kvantifikovani su parametri poput angularnog drugog momenta, inverznog momenta razlike, GLCM kontrasta, GLCM korelacije i teksturalne varijanse (u programu Mazda suma varijanse).

Angularni drugi momenat (ASM) je izračunat na osnovu normalizovanog matriksa simultanog pojavljivanja (parova) rezolucionih jedinica (Santos et al. 2015), imajući u vidu (i,j)ti unos u matriksu označen kao  $p(i,j)$  u formuli:

$$ASM = \sum_i \sum_j \{p(i,j)\}^2$$

Angularni drugi momenat je parametar teksturalne uniformnosti, odnosno „regularne“ teksture koje imaju uravnoteženu distribuciju strukturnih elemenata, to jest imaju generalno veće vrednosti ovog indikatora (Santos et al. 2015).

Inverzni momenat razlike (IDM) je donekle sličan angularnom drugom momentu (mada postoje određene metodološke razlike) i izračunava se na osnovu sledeće formule:

$$IDM = \sum_i \sum_j \frac{1}{1+(i-j)^2} p(i,j)$$

Inverzni momenat razlike je način na koji se indirektno može kvantifikovati teksturalna homogenost. Ovaj parametar u osnovi zavisi od takozvane „glatkoće“ (engl. „Smoothness“) teksture (Santos et al. 2015). Sa angularnim drugim momentom može biti u statistički značajnoj korelaciji, ali jačina ovakve povezanosti varira i zavisi od predmeta teksturalne analize, odnosno uzorka koji se obrađuje.

Teksturalni kontrast (CON) je jedan od indikatora teksturalne heterogenosti. U ovom radu odnosno u korišćenoj softverskoj platformi, izračunat je kao:

$$CON = \sum_i \sum_j (i-j)^k P_d[i,j]^n$$

Kontrast u osnovi zavisi od stepena varijabilnosti teksture, odnosno od sporadične varijacije u sivim vrednostima rezolucionih jedinica (Santos et al. 2015). Lokalne promene u hromatinskoj strukturi poput prelaza iz euhromatina u heterohromatin će se verovatno prezentovati kroz povećanje teksturalnog kontrasta u tom delu jedra. Pošto je ovo u stvari jedan vid heterogenosti, za očekivati je da će ovaj indikator biti u obrnutoj korelaciji sa inverznim momentom razlika, mada slično prethodnom objašnjenju ova korelacije nije uvek najjasnija.

Teksturalna korelacija je indikator koji pri računanju uzima u obzir srednje vrednosti ( $\mu$ ) i standardne devijacije ( $\sigma$ ) za odgovarajući red (x) ili kolonu (y) u matriksu. Konvencionalni algoritmi je računaju se na sledeći način:

$$\text{COR} = \frac{\sum_i \sum_j (ij)p(i,j) - \mu_x \mu_y}{\sigma_x \sigma_y}$$

Teksturalna korelacija zavisi od linearne zavisnosti sivih vrednosti u matriksu, i ovo se najčešće odnosi na rezolucione jedinice koje su u neposrednoj blizini jedne drugoj. Velika linearna povezanost će imati vrednost blizu 1 ili -1, dok će odsustvo asocijacije će rezultovati vrednošću koja je bliža nuli.

U GLCM postavci, varijansa se odnosi na nivo disperzije distribucije sivih vrednosti oko neke centralne varijable. Ta varijabla je obično srednja vrednost. U okviru Mazda softverske platforme, određivali smo sumu varijanse (SVAR) koja se odnosi na sumu distribucije u digitalnom mikrografu:

$$\text{SVAR} = \sum \left[ i - \sum i p_{x-y}(i) \right]^2$$

Varijansa i suma varijanse takođe u značajnoj meri zavise od teksturalne heterogenosti. Prema našim još uvek nepublikovanim opservacijama na različitim ćelijskim modelima, varijansa, uz angularni drugi momenat i inverzni momenat razlike predstavlja jedan od najsenzitivnijih parametara GLCM analize, barem kada je u pitanju detektovanje strukturnih promena u ćelijskom jedru i promena u heterogenosti tkivne arhitekture. Detalji o GLCM algoritmu se mogu naći u

prethodnim publikacijama (Haralick et al. 1973; Nikolovski et al. 2019; Paunovic et al. 2021).

### 3.3.2. Diskretna vejevlet transformacija

Diskretna vejevlet transformacija (engl. „Discrete wavelet transform“) je u ovom istraživanju primenjena kao dodatak teksturalnoj GLCM analizi (Kociolek et al. 2001; Szczypinski et al. 2007; Szczypinski et al. 2009). Vejevlet je u osnovi svaka oscilacija u obliku talasa kod koje vrednost od nulte tačke raste do nekog maksimuma, a zatim se vraća na nultu tačku. Mnoge matematičke funkcije se mogu reprezentovati vejevletima, i taj proces se naziva vejevlet transformacija. Na primer, postoji takozvana ortonormalna vejevlet transformacija kod koje funkcija može da se upotrebi u cilju određivanja Hilbertove baze odnosno Hilbertovih prostora (ovde je u osnovi transformacija dvodimenzionalnih i trodimenzionalnih prostora u prostore se beskonačnom dimenzijom). Drugi primer bi bila integralna vejevlet transformacija, kod koje se vrši integracija / mapiranje funkcije iz prvobitnog prostora u prostor druge funkcije.

Kod diskretne vejevlet transformacije, izvršeno je diskretno uzorkovanje vejevleta. Ova tehnika se, pored ostalog, može koristiti za obradu dvodimenzionalnih signala tako što se kroz signal propuštaju odgovarajući visoki i niski filtri (engl. „high-pass filter“, „low-pass filter“). Filtriranje informacija u signalu se može koristiti za detektovanje lokalnih promena u osvetljenosti, saturaciji i drugim detaljima, nakon čega se rezultati mogu koristiti za dobijanje dodatnih informacija, poput granica pojedinih objekata na slici (Kociolek et al. 2001; Szczypinski et al. 2007; Szczypinski et al. 2009).

Postoji mnogo različitih pristupa diskretnoj vejevlet transformaciji. Primeri bi bili LeGall-Tabatabai (LGT) 5/3 vejevlet, Newland vejevlet transformacija, kompleksna vejevlet transformacija (engl. „Dual-tree complex wavelet transform“) i Daubechies vejevleti. Jedna od prvih diskretnih vejevlet transformacija je ona koju je predložio mađarski naučnik Alfred Haar, i po njemu se danas ova metoda zove Harova (Haar) transformacija. Ovo je jedan od najjednostavnijih, diskontinuiranih vejevleta.

Takozvana matična funkcija u Harovom vejevletu ( $\psi(t)$ ) se u stručnoj literaturi obično opisuje kao:

$$\psi(t) = \begin{cases} 1 & 0 \leq t < \frac{1}{2}, \\ -1 & \frac{1}{2} \leq t < 1, \\ 0 & \text{otherwise.} \end{cases}$$

Sa druge strane, takozvana "skejling" funkcija ( $\varphi(t)$ ) kod Harovog diskretnog vejevleta je definisana kao:

$$\varphi(t) = \begin{cases} 1 & 0 \leq t < 1, \\ 0 & \text{otherwise.} \end{cases}$$

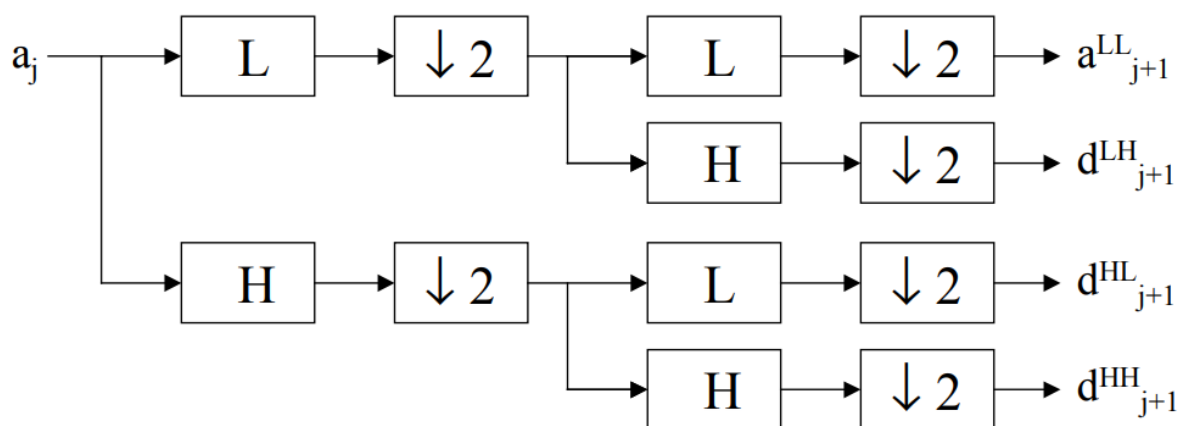
Ovaj koncept se u osnovi zasniva na ortonormalnom sistemu, a prostor je definisan u kviru jediničnog intervala [0, 1].

Na osnovu Harovog vejevleta se može napraviti odgovarajući matriks (Harov matriks). Veličina ovakvog matriksa može da varira, a primer (nenormalizovanog matriksa dimenzija 8 x 8 elementa bi bio:

$$H_8 = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & -1 & -1 & -1 & -1 \\ 1 & 1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & -1 & -1 \\ 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & -1 \end{bmatrix}$$

Haarova transformacija se vrši iz odgovarajućeg matriksa. U našem radu transformacija je obavljena automatski u gorepomenutoj softverskoj platformi Mazda. Prema autorima, tokom ovog algoritma, vrši se linearna transformacija data vektora podignutog na drugi stepen u numeričke vektore koji imaju istu dužinu (Kociołek et al., 2001; Paunovic et al. 2021). Parametri vejevlet analize se računaju nakon propuštanja podataka kroz "high-pass" (H) i "low-pass" (L) filtere. Program računa vejevlet koeficijente, odnosno energije vejevlet koeficijenata na odgovarajućim sub-skalama. Sledeća shema pokazuje tačan algoritam primenjen u Mazda softveru (preuzeto iz publikacije autora softvera, Kociołek et al., 2001) .





Ovde je opisan proces vejtlet razgradnje dvodimenzionalnih signala (npr. Mikrografa). Leva polovina algoritma se odnosi na redove unutar dvodimenzionalnog signal dok je desna polovina primenjena na kolone. Rezultat je računanje odgovarajućeg koeficijenta ( $d$ ) nakon propuštanja kroz "high-pass" i / ili "low-pass" filter.

Diskretnom vejtlet transformacijom obično nastaju 4 "subband" slike za svaku skalu kao što je prikazano na sledećoj shemi:

		$d^{HL}_2$	$d^{HL}_1$
$d^{LH}_2$		$d^{HH}_2$	
	$d^{LH}_1$		$d^{HH}_1$

"Subband" slika  $a^{LL}$  predstavlja ceo region od interesa pre nego što je podeljen na manje skale. Nakon određivanja koeficijenata, pristupa se računanju energija koeficijenata za svaki "subband", odnosno za  $d^{LH}$ ,  $d^{HH}$  i  $d^{HL}$ . Energije se računaju na osnovu sledeće formule:

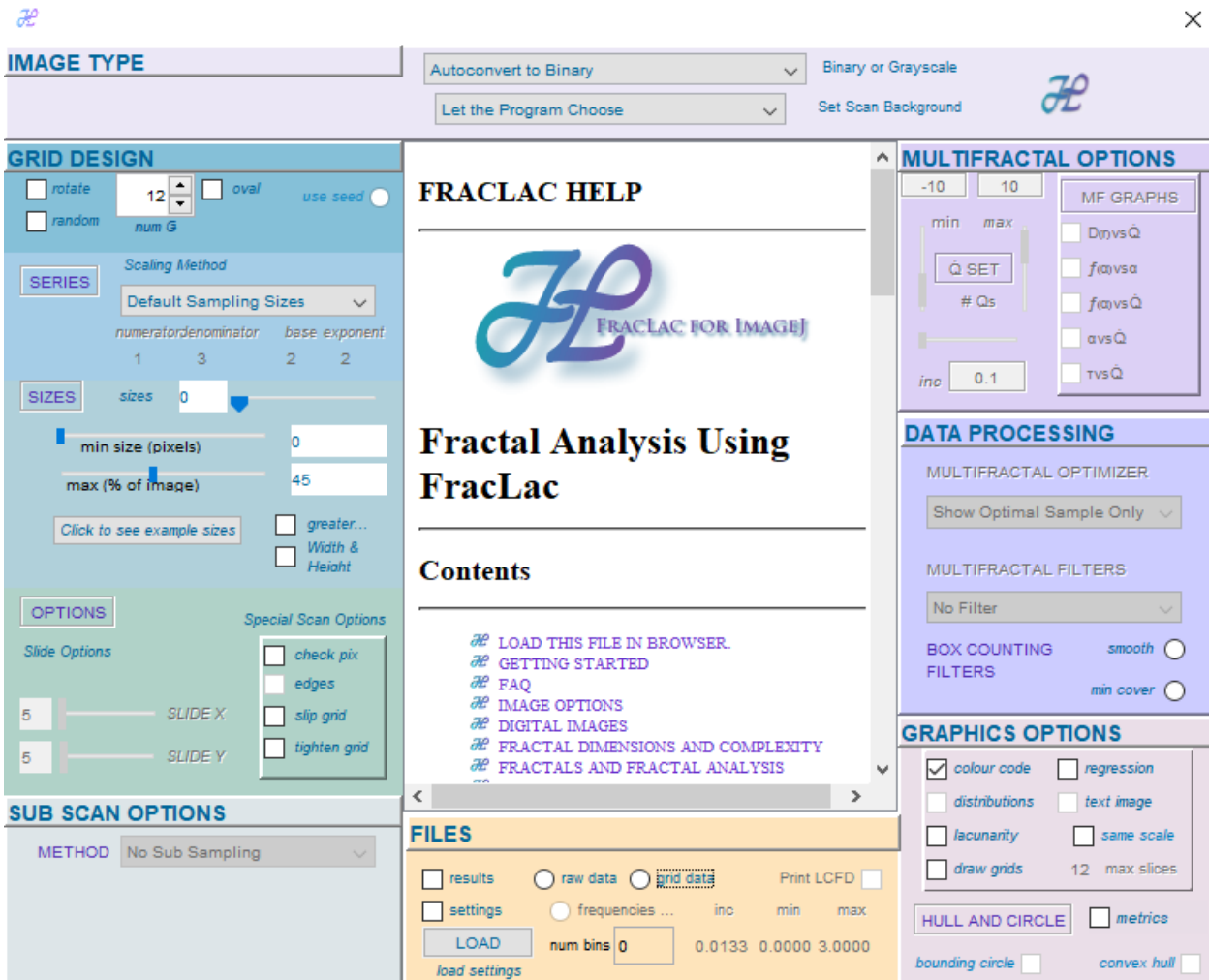
$$E = \frac{\sum_{x,y \in ROI} (d_{x,y}^{subband})^2}{n}$$

U ovoj formuli  $n$  predstavlja ukupan broj rezolucionih jedinica na analiziranoj slici, dok su  $x$  i  $y$  koordinate, odnosno lokacija za odgovarajući "subband" (Kociołek et al., 2001; Paunovic et al. 2021).

### 3.3.3. Fraktalna analiza

Fraktalna analiza je urađena u programu FracLac odnosno odgovarajućem podprogramu napravljenom za ImageJ (Nacionalni instituti za zdravlje, Betezda, Merilend, SAD). FracLac je inicijalno dizajnirala profesorka Odri Karperien sa Čarls Sturt Univerziteta iz Australije (Audrey Karperien, Charles Sturt University, Australia) i tokom poslednjih godina mnoge laboratorije širom sveta ga upotrebljavaju za fraktalnu analizu u medicinskim istraživanjima. Alternativni pristup u ImageJ je upotreba opcije "Fractal Box Count", koja obično dolazi kao sastavni deo softvera (Pantic et al. 2015; Dincic et al. 2020). Međutim, FracLac ima brojne prednosti u odnosu na ovu klasičnu opciju. Pored ostalog, one uključuju podešavanje brojnih parametara pri računanju fraktalne dimenzije, zatim mogućnost fraktalne analize mikrografa u različitim formatima, kao i računanje dodatnih atributa fraktalne analize poput lakunarnosti. Zbog toga smo se u našem istraživanju, opredelili da koristimo isključivo FracLac kao metodološki pristup pri kalkulacijama.

Fraktalna dimenzija je indikator kompleksnosti neke strukture. U FracLac-u postoji nekoliko opcija njenog računanja. Ovo uključuje pored ostalog rad na prethodno binarizovanim slikama (Slika 3), odnosno, ova opcija zahteva da istraživač manuelno konvertuje slike u binarni format (binarni format podrazumeva da rezoluciona jedinica može imati samo dve vrednosti: nula i jedan u zavisnosti od toga da li je crna ili bela). Druga mogućnost je da se dopusti softveru da sam tokom analize konvertuje sliku u binarni oblik (softver u ovom slučaju sam određuje granicu između crne i bele vrednosti). Ova opcija povećava brzinu analize, a prema našim opservacijama (iz preliminarnog istraživanja) ne kompromituje validnost metodologije. Treća mogućnost je da se uopšte ne vrši binarizacija već da se koriste alternativni pristupi poput diferencijalnog u kome se fraktalna dimenzija određuje na "gray scale" mikrografima slično kao kod GLCM teksturalne analize (Rajkovic et al. 2016; Pantic et al. 2017; Jurczynsyn et al. 2020).



Slika 3. Primer korisničkog interfejsa u programu FracLac koga je dizajnirala profesorka Odri Karperien sa Čarls Sturt Univerziteta iz Australije (Audrey Karperien, Charles Sturt University, Australia).

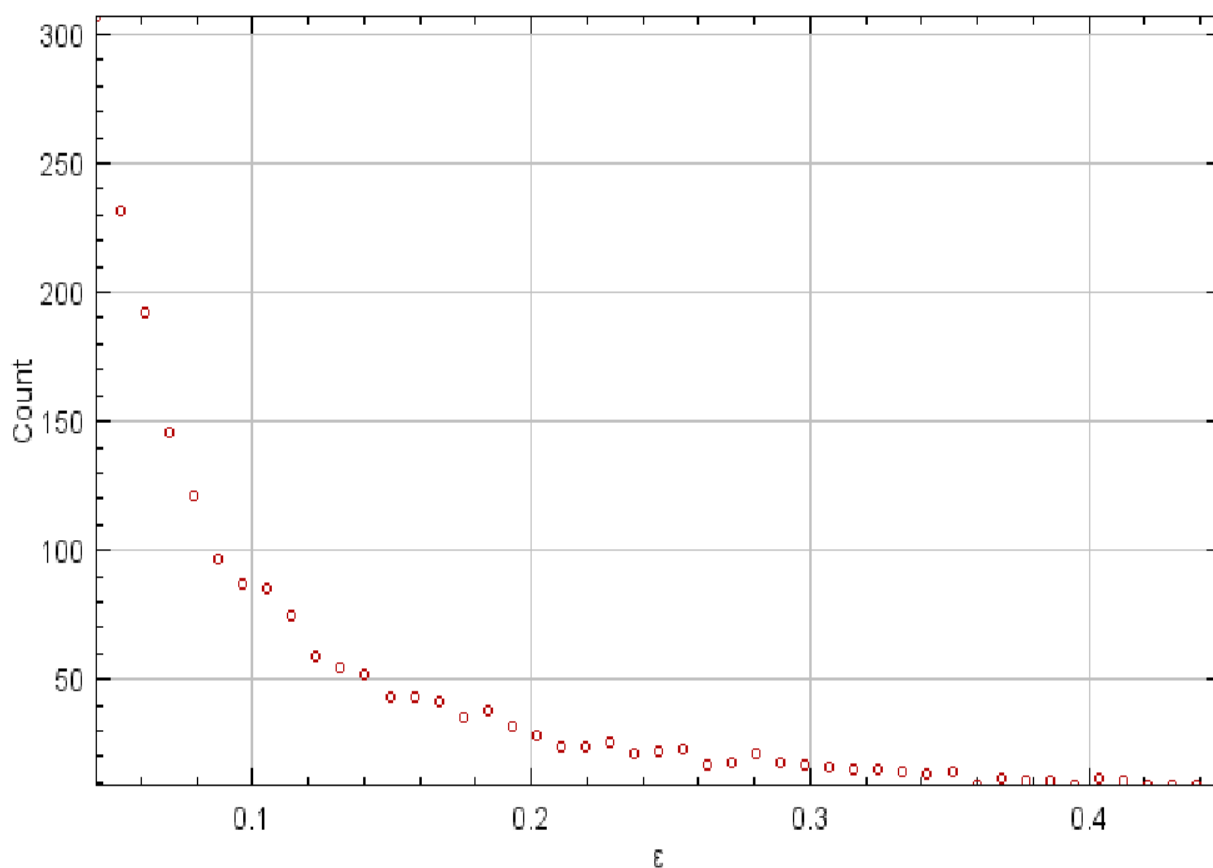
Potencijalni problem sa ovim trećim pristupom je činjenica da se u većini prethodno publikovanih studija, fraktalna analiza obavljala na binarizovanim mikrografima (barem kada su u pitanju medicinska istraživanja) (Pantic et al. 2016; Pantic et al. 2017). Drugim rečima, neznatan je broj validnih i kvalitetnih studija koje diferencijalnu fraktalnu dimenziju određuju na ćelijama i tkivima. Drugi potencijalni izazov je izuzetno mala varijabilnost diferencijalne fraktalne dimenzije (barem prema našim ranijim opservacijama). Strukture koje se često drastično razlikuju tokom konvencionalne svetlosne mikroskopije, nakon analize nemaju značajno različite vrednosti fraktalne dimenzije. Imajući sve ovo u vidu, u našoj studiji smo se opredelili za korišćenje pristupa gde se region interesa automatski konvertuje u binarni format.

Fraktalna dimenzija i lakunarnost su dva glavna rezultata fraktalne analize. Za njihovo računanje je korišćen "box-count" metod, odnosno tehnika brojanja kvadrata (Slika 4). Dvodimenzionalni signal se pokriva

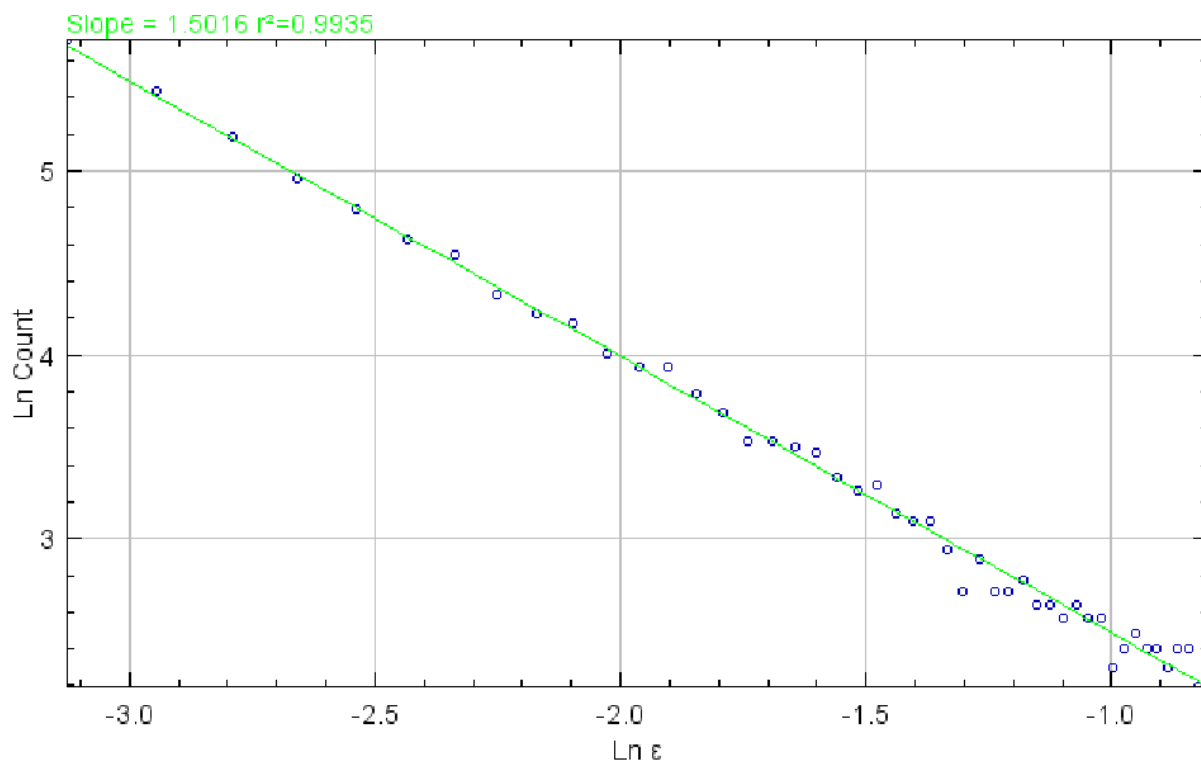
serijom kvadrata na različitim skalama a program broji kvadrata koji su makar delimično ispunjeni strukturom. Zatim se konstruiše grafikon gde je na ordinati broj kvadrata (N) a na apscisi skala ( $\epsilon$ ), odnosno dimenzija kvadrata. Zatim se grafikon pretvara u logaritamski format koji omogućava konstrukciju linije regresije. Linija regresije (Slika 5) ima svoj "pad" (engl. "regression slope") koji se može kvantifikovati, i na osnovu toga se računa vrednost fraktalne dimenzije (D):

$$D = \text{regression slope } [\ln(N) / \ln(\epsilon)]$$

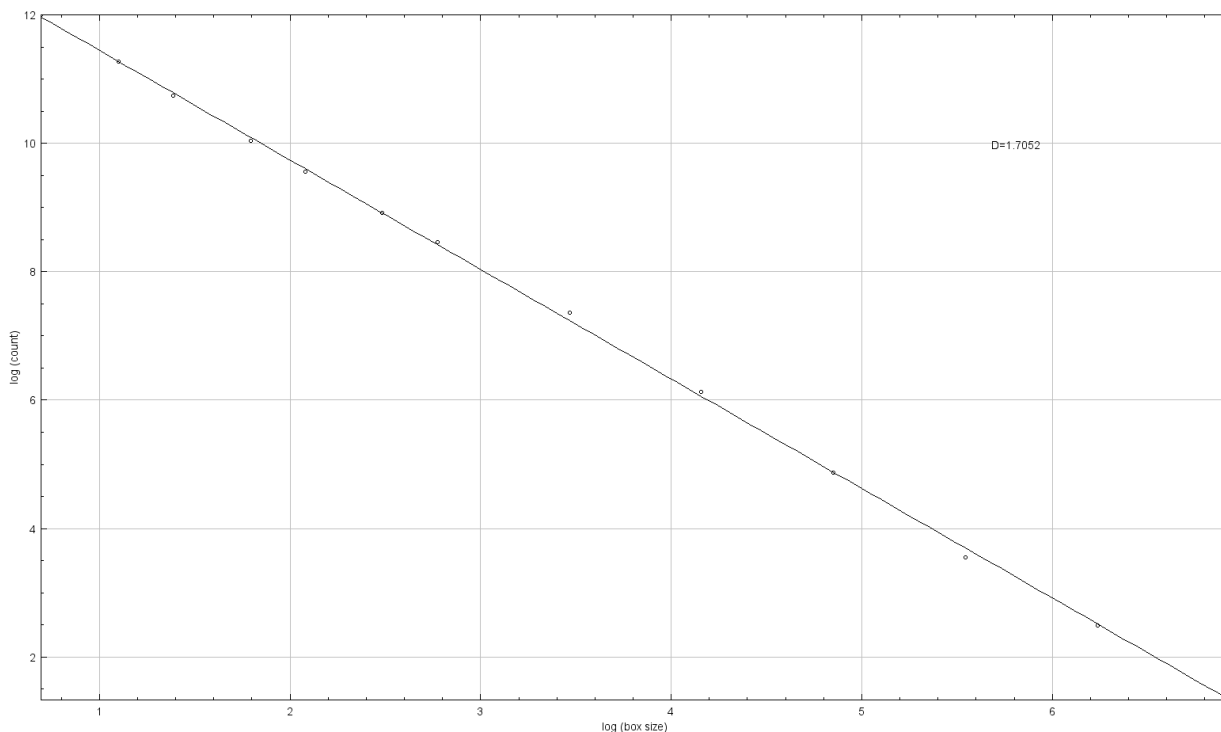
Vrednosti fraktalne dimenzije su obično između 1 i 2. Treba istaći da postoje alternativni pristupi računanju ovog indikatora (Slika 6) kada vrednost može biti manja od 1 i veća od 2 ali to nije bio slučaj u našem istraživanju (Rajkovic et al. 2016; Pantic et al. 2017; Jurczynszyn et al. 2020).



Slika 4. Primer grafikona koji se konstruiše prilikom određivanja vrednosti fraktalne dimenzije u FracLac programu.



Slika 5. Prethodni grafikon se pretvara u logaritamski format koji omogućava konstrukciju linije regresije. Linija regresije ima svoj "pad" (engl. "regression slope") koji se može kvantifikovati, i na osnovu toga se računa vrednost fraktalne dimenzije.



Slika 6. Alternativni pristup računanju fraktalne dimenzije u podprogramu „Fractal box count“ u okviru ImageJ.

Lakunarnost ( $\lambda$ ) je izračunata kao:

$$\lambda = CV^2_{\varepsilon,g} = (\sigma_{\varepsilon,g} / \mu_{\varepsilon,g})^2$$

gde je CV koeficijent varijacije,  $\mu$  srednja vrednost a  $\sigma$  standardna devijacija vrednosti na skali  $\varepsilon$ . Ovaj pristup za računanje lakunarnosti uzima u obzir i orijentaciju analizirane strukture.

Lakunarnost je indirektna mera heterogenosti fraktalne organizacije, mada ovo ne predstavlja uvek adekvatan opis. Ponekad se u stručnoj literaturi za ovaj indikator koristi engleska reč "gappiness" odnosno lakunarnost jednim delom zavisi od "rupičavosti" strukture. Velike i brojne praznine u strukturi bi trebalo da rezultuju većom vrednošću lakunarnosti. Ipak, potrebno je razlikovati lakunarnost od heterogenosti u GLCM analizi, jer lakunarnost se često odnosi na rotacionu i translacionu varijansu, a mere homogenosti u GLCM, poput inverznog momenta razlike se određuju primenom statistike drugog reda na parove rezolucionih jedinica. Drugim rečima, iako inverzni momenat razlike i druge mere GLCM matriksa sa jedne strane, i lakunarnost, sa druge strane, mogu ponekad biti u obrnutoj korelaciji ovo nikako ne treba shvatiti kao pravilo (Pantic et al. 2012).

Postoje različite vrste lakunarnosti, a uz to FracLac softver je u mogućnosti da računa pojedinačne lakunarnosti u različitim delovima mreže kvadrata. Ipak, logično je pretpostaviti da u biološkim eksperimentima promna jednog parametra će skoro uvek biti praćena sličnim promenama drugog. Stoga smo se u našem istraživanju opredelili isključivo za računanje srednje ukupne lakunarnosti za celokupni region interesa ćelijskog jedre.

#### *3.4. Statistička analiza*

Za procenu statističke značajnosti razlike između ispitivanih grupa koristili smo analizu varijanse (ANOVA), odnosno Bonferoni test. Za procenu statističke značajnosti povezanosti (korelacije) koristili smo Pirsonovu i Spirmanovu korelaciju kao i druge korelacione testove, u zavisnosti od parametarske prirode podataka i normalnosti distribucije. Nivo značajnosti od  $p < 0.05$  je smatran statistički signifikantnim, a  $p < 0.01$  statistički visoko signifikantnim.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati GLCM analize

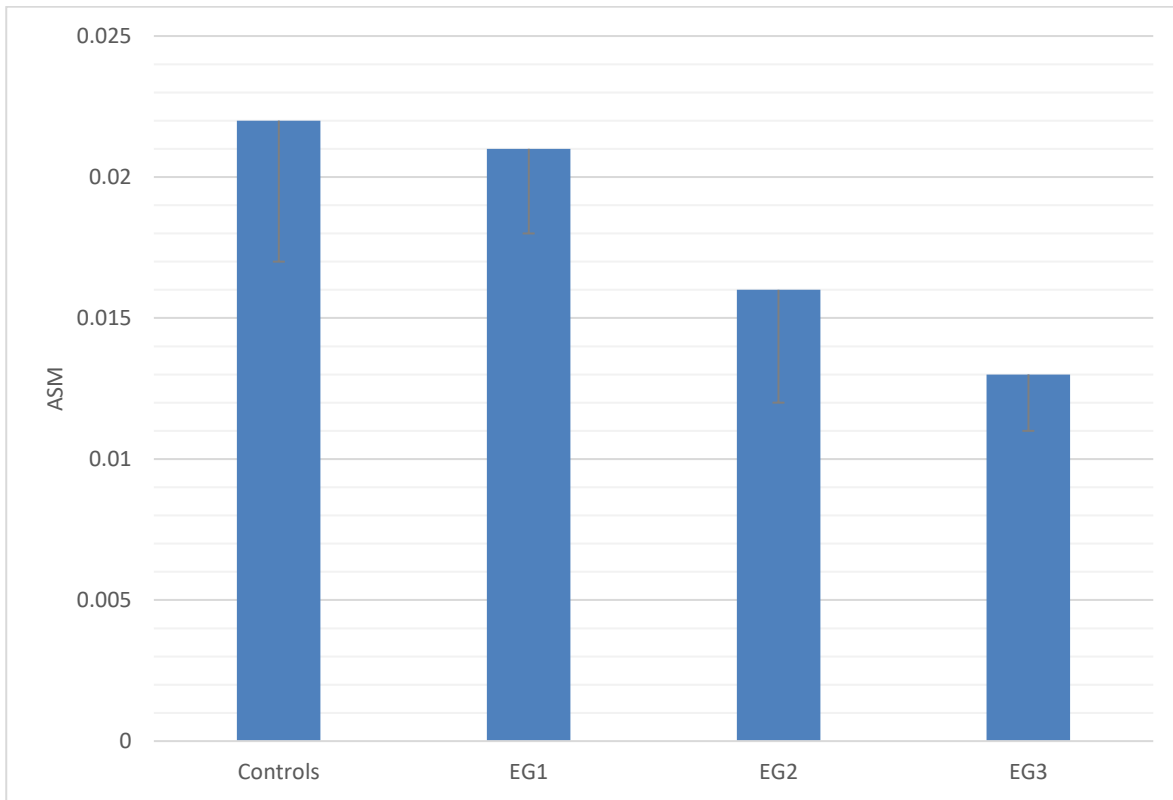
U eksperimentu u okviru koga su životinje dobijale nanočestice tokom 3 dana, prosečna vrednost angularnog drugog momenta je bila  $0.021 \pm 0.006$  u kontrolnoj grupi,  $0.033 \pm 0.007$  u prvoj eksperimentalnoj grupi (1 mg/kg),  $0.030 \pm 0.003$  u drugoj eksperimentalnoj grupi (2 mg/kg) i  $0.039 \pm 0.010$  u trećoj eksperimentalnoj grupi (3 mg/kg). Kao što se primećuje, došlo je do značajnog povećanja angularnog drugog momenta (Slika 7). U drugoj eksperimentalnoj grupi, ovo povećanje je bilo statistički značajno ( $p < 0.05$ ), a u prvoj i trećoj eksperimentalnoj grupi statistički visoko značajno ( $p < 0.01$ ).

Vrednost GLCM kontrasta se takođe značajno promenila nakon tretmana nanočesticama ( $0.96 \pm 0.11$ , odnosno  $0.78 \pm 0.09$ ,  $0.69 \pm 0.08$  i  $0.77 \pm 0.10$  u eksperimentalnim grupama). Ova smanjenja teksturalnog kontrasta su bila statistički visoko signifikantna u svim eksperimentalnim grupama ( $p < 0.01$ ). Ovaj rezultat je ukazao da ovaj parametar u ovakvim okolnostima značajan pokazatelj diskretnih promena u teksturalnim obrascima hromatinske organizacije.

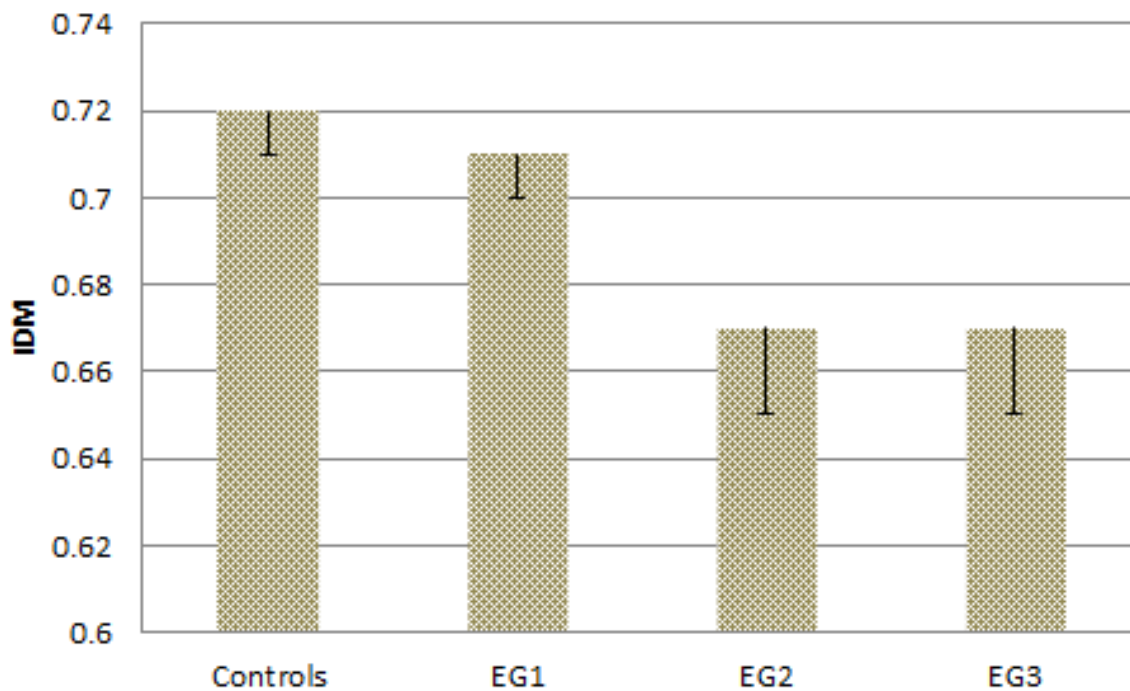
Vrednost inverznog momenta razlike hromatinske teksture se menjala na sličan način kao i vrednosti angularnog drugog momenta. Početna vrednost  $0.71 \pm 0.02$  se u prvoj eksperimentalnoj grupi povećala na  $0.74 \pm 0.01$  što je predstavljalo statistički visoko signifikantno povećanje ( $p < 0.01$ ). Inverzni momenat razlike je ostao sličan i u drugoj eksperimentalnoj grupi, ( $0.74 \pm 0.01$ ) dok je u trećoj eksperimentalno grupi ( $0.76 \pm 0.02$ ) došlo do dodatnog povećanja ( $p < 0.01$ ). Ovaj nalaz ukazuje na značajno dozno-zavisno povećanje teksturalne homogenosti hromatina hepatocita nakon trodnevnog tretmana magnetitnim nanočesticama.

Teksturalna korelacija hromatinske strukture se u okviru ovog eksperimenta takođe značajno promenila. U kontrolnoj grupi iznosila je  $0.985 \pm 0.004$ , a u eksperimentalnim grupama  $0.979 \pm 0.002$ ,  $0.980 \pm 0.001$ , odnosno  $0.979 \pm 0.002$ . Kao što se može primetiti, došlo je do statistički visoko signifikantnog smanjenja ( $p < 0.01$ ). Nalaz ukazuje na potencijalno visoku senzitivnost GLCM korelacije u detekciji diskretnih promena u jedarnom hromatinu nakon trodnevnog tretmana magnetitnim nanočesticama.

U eksperimentu u okviru koga su životinje dobijale nanočestice tokom 7 dana, srednja vrednost angularnog drugog momenta je iznosila  $0.022 \pm 0.005$  u kontrolnoj grupi,  $0.021 \pm 0.003$  u prvoj eksperimentalnoj grupi (1 mg/kg),  $0.016 \pm 0.004$  u drugoj eksperimentalnoj grupi (2 mg/kg) i  $0.013 \pm 0.002$  u trećoj eksperimentalnoj grupi (3 mg/kg). Nakon statističke analize, uočeno je značajno dozno-zavisno smanjenje ovog parametra ( $p < 0.01$ , Slika 7). Takođe, detektovan je statistički visoko značajan trend smanjenja teksturalne uniformnosti ( $p < 0.01$ ).



Slika 7. Vrednosti angularnog drugog momenta hromatinske strukture hepatocita (ASM).



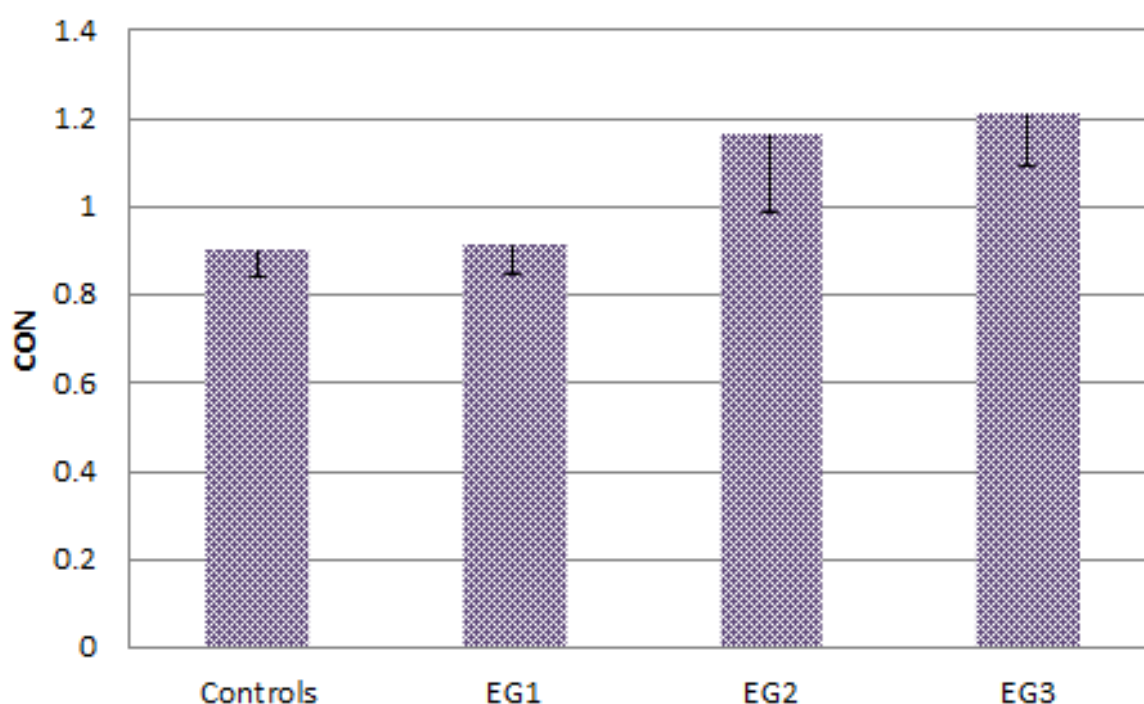
Slika 8. Vrednosti inverznog momenta razlike hromatinske strukture hepatocita (IDM).

Vrednost inverznog momenta razlike hromatinske teksture se menjala na sličan način kao i vrednosti angularnog drugog momenta. Od početne

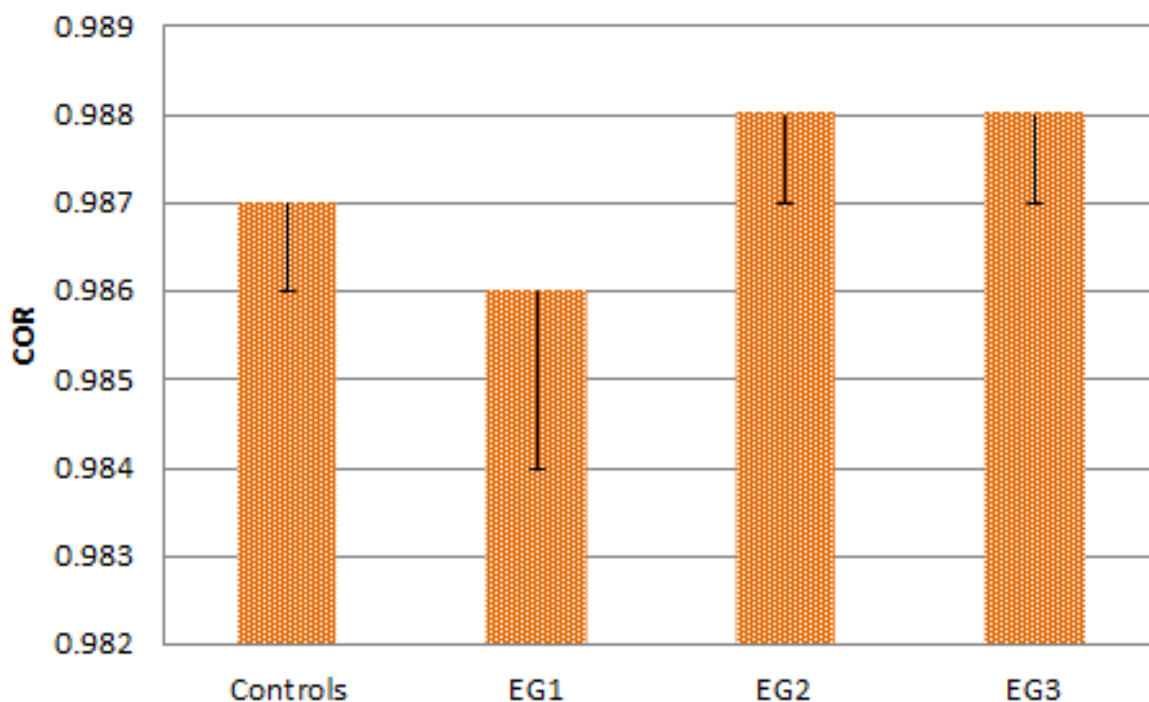


vrednosti  $0.72 \pm 0.01$ , došlo je do smanjenja na vrednost  $0.71 \pm 0.01$  u prvoj eksperimentalnoj grupi. Inverzni momenat razlike je nastavio da se smanjuje ( $p < 0.01$ ) i u drugoj ( $0.67 \pm 0.02$ ) i trećoj ( $0.67 \pm 0.02$ ) eksperimentalnoj grupi (Slika 8). Ovaj nalaz je ukazao na značajno smanjenje teksturalne homogenosti hromatina hepatocita nakon izlaganja nanočesticama magnetita u ovom vremenskom periodu.

Za razliku od angularnog drugog momenta, vrednost GLCM kontrasta se povećala nakon tretmana nanočesticama ( $0.90 \pm 0.06$ , odnosno  $0.91 \pm 0.06$ ,  $1.16 \pm 0.17$  i  $1.21 \pm 0.12$  u eksperimentalnim grupama). Povećanje je bilo dozno-zavisno ( $p < 0.01$ , Slika 9), i ukazalo je da je ovaj parametar potencijalno značajan pokazatelj diskretnih promena u teksturalnim obrascima hromatinske organizacije u ovakvim eksperimentalnim uslovima.

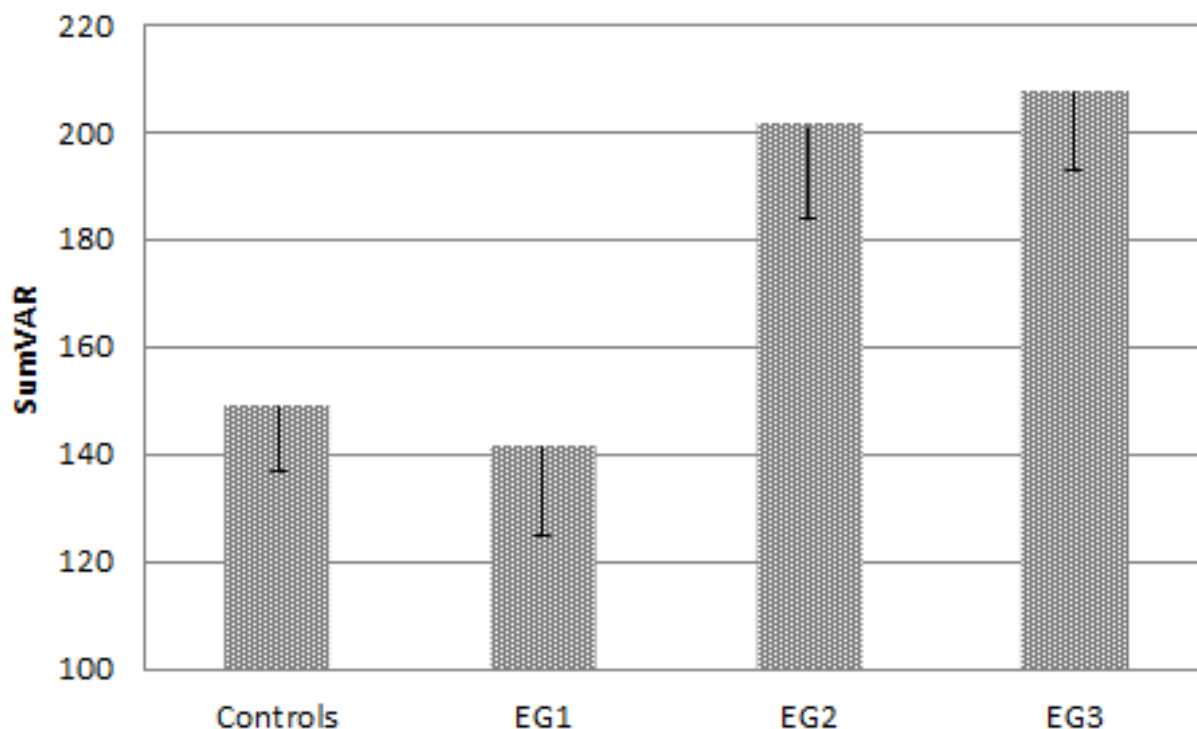


Slika 9. Vrednosti teksturalnog GLCM kontrasta hromatinske strukture hepatocita (CON).



Slika 10. Vrednosti teksturalne GLCM korelacije hromatinske strukture hepatocita (COR).

Teksturalna korelacija hromatinske strukture se u okviru ovog eksperimenta nije značajno menjala (Slika 10). U kontrolnoj grupi iznosila je  $0.987 \pm 0.001$ , a u eksperimentalnim  $0.986 \pm 0.002$  ( $p > 0.05$ ),  $0.988 \pm 0.001$  ( $p > 0.05$ ), odnosno  $0.988 \pm 0.001$  ( $p > 0.05$ ). Vrednost teksturalne varijanse se u početku nije značajno menjala nakon izlaganja nanočesticama (Slika 11). Od inicijalne vrednosti od  $148.9 \pm 11.9$  došlo je do blagog smanjenja na  $141.5 \pm 16.2$  ( $p > 0.05$ ) u prvoj eksperimentalnoj grupi, a zatim do značajnog povećanja na  $201.3 \pm 17.2$  i  $207.4 \pm 14.3$  u drugoj, odnosno trećoj eksperimentalnoj grupi. Ovo povećanje je bilo statistički visoko signifikantno i u drugoj i u trećoj grupi ( $p < 0.01$ ).

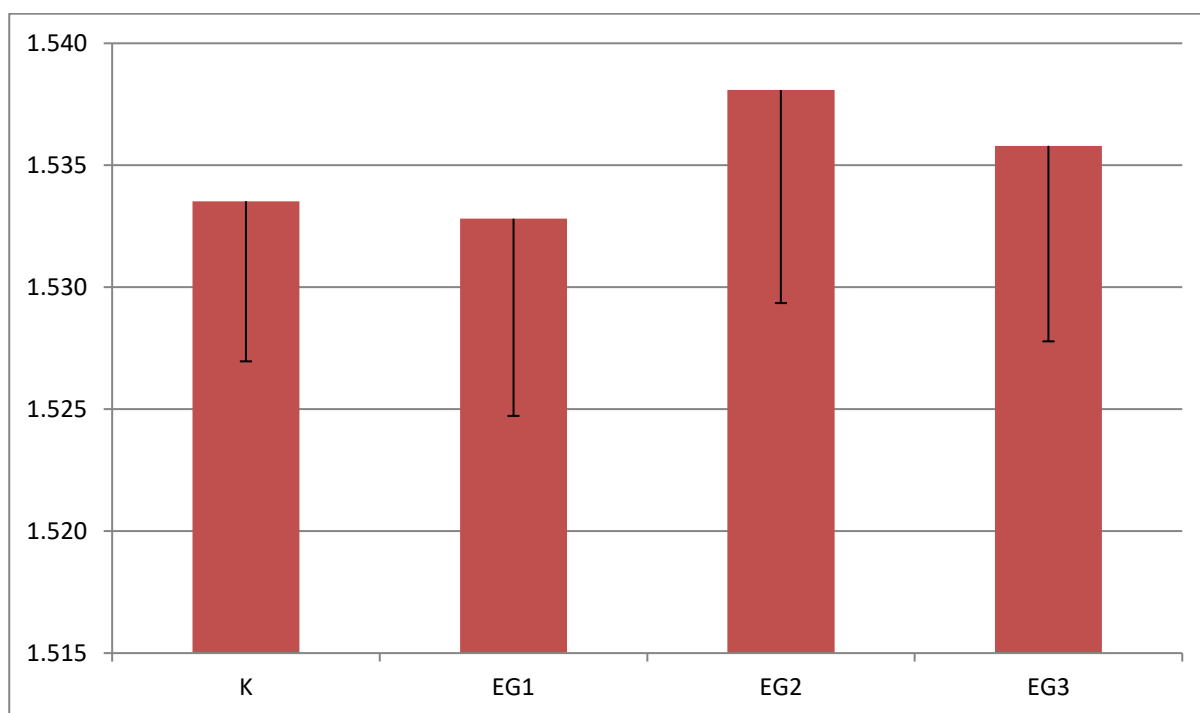


Slika 11. Vrednosti teksturalne GLCM sume varijanse hromatinske strukture hepatocita (SumVAR).

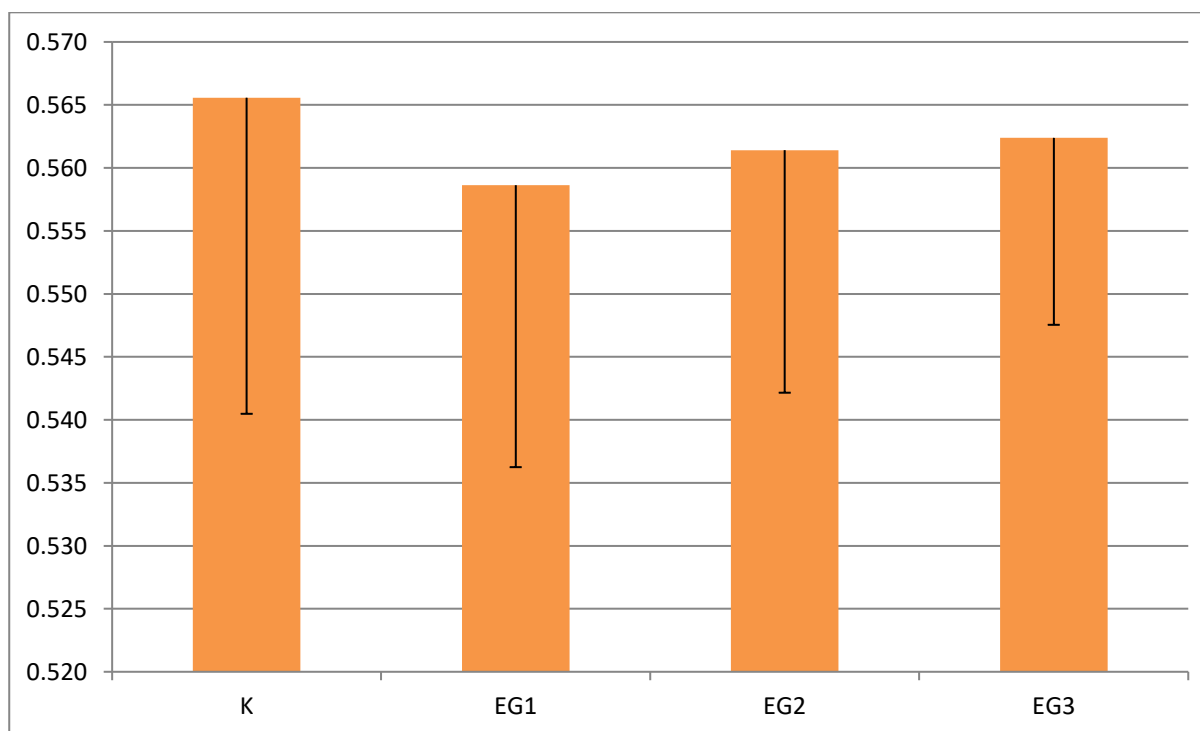
#### 4.2. Rezultati fraktalne analize

U eksperimentu u okviru koga su životinje dobijale nanočestice tokom 3 dana, srednja vrednost fraktalne dimenzije (dobijene nakon binarizacije regiona interesa) hromatinske strukture u kontrolnoj grupi je bila  $1.534 \pm 0.007$  (Slika 12). U prvoj eksperimentalnoj grupi, ova vrednost je iznosila  $1.533 \pm 0.008$ , odnosno nije došlo do statistički značajne promene ( $p > 0.05$ ). U drugoj eksperimentalnoj grupi, vrednost fraktalne dimenzije hromatina je iznosila  $1.538 \pm 0.009$ , što takođe nije bila statistički značajna promena ( $p > 0.05$ ). Uz to, u trećoj eksperimentalnoj grupi, vrednost fraktalne dimenzije se takođe nije značajno menjala i iznosila je  $1.536 \pm 0.008$  ( $p > 0.05$ ).

Srednja vrednost fraktalne lakunarnosti hromatinske strukture iznosila je  $0.566 \pm 0.025$  u kontrolnoj grupi životinja (Slika 13). U prvoj eksperimentalnoj grupi ova vrednost se smanjila na  $0.559 \pm 0.022$  što nije predstavljalo statistički značajnu razliku ( $p > 0.05$ ). U drugoj eksperimentalnoj grupi lakunarnost je iznosila  $0.561 \pm 0.019$ , odnosno nije bilo značajne razlike u odnosu na kontrolu ( $p > 0.05$ ). U trećoj eksperimentalnoj grupi prosečna lakunarnost je bila  $0.562 \pm 0.015$ , što takođe nije predstavljalo značajnu promenu u odnosu na kontrolnu grupu ( $p > 0.05$ ).



Slika 12. Srednja vrednost fraktalne dimenzije (dobijene nakon binarizacije regiona interesa) hromatinske strukture.

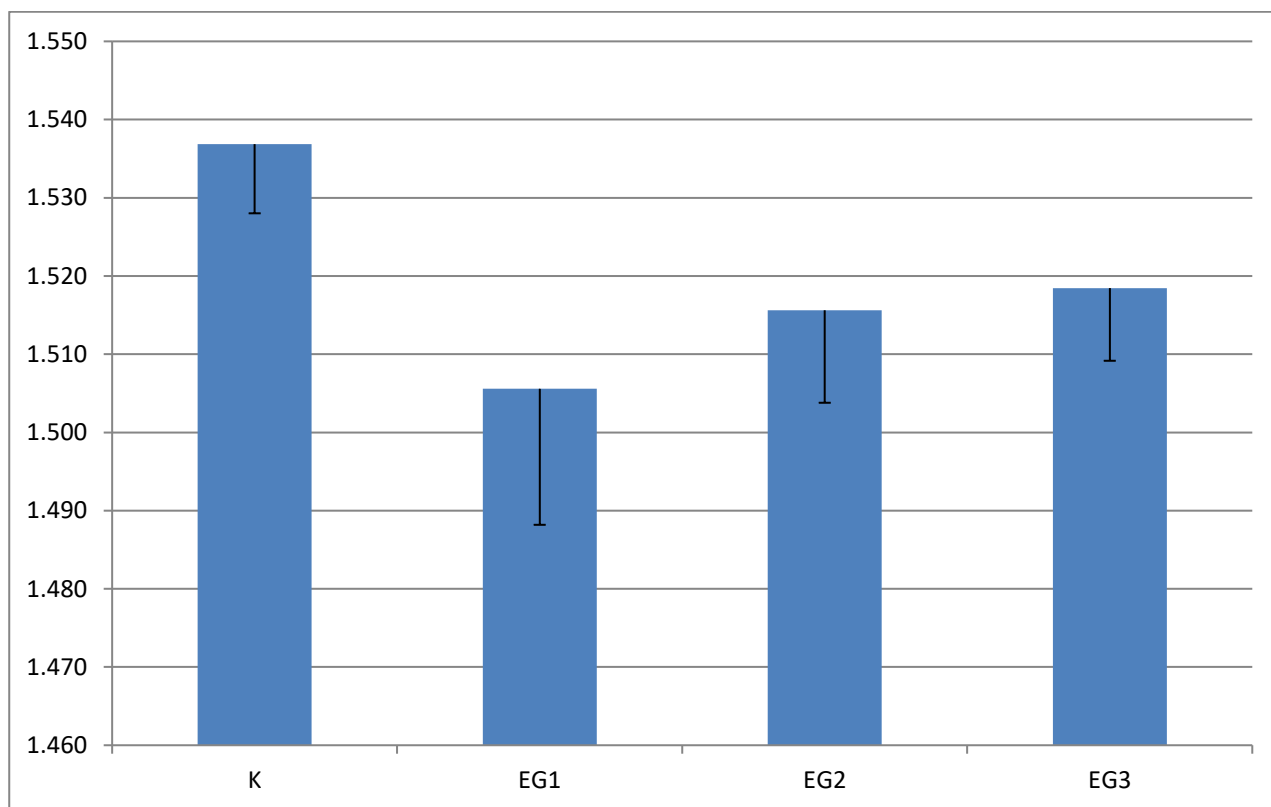


Slika 13. Srednja vrednost fraktalne lakunarnosti hromatinske strukture hepatocita.

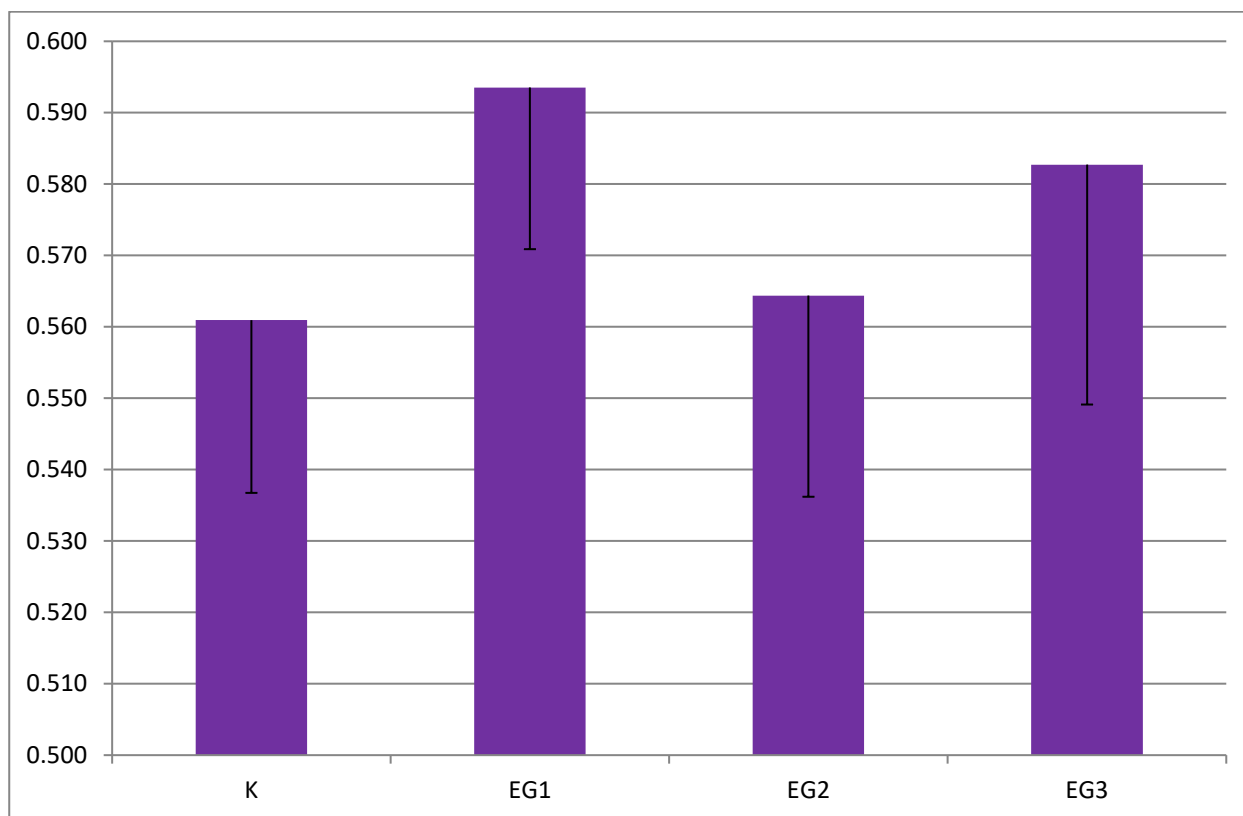
U eksperimentu u okviru koga su životinje dobijale nanočestice tokom 7 dana, srednja vrednost fraktalne dimenzije (dobijene nakon binarizacije regiona interesa) hromatinske strukture u kontrolnoj grupi je bila  $1.537 \pm$

0.009 (Slika 14). U prvoj eksperimentalnoj grupi, došlo je do statistički visoko signifikantnog smanjenja na vrednost  $1.506 \pm 0.017$  ( $p < 0.01$ ). U drugoj eksperimentalnoj grupi, vrednost ovog parametra je iznosila  $1.516 \pm 0.012$ , odnosno smanjenje je i dalje bilo statistički visoko signifikantno ( $p < 0.01$ ). Osim toga, u trećoj eksperimentalnoj grupi, vrednost fraktalne dimenzije se blago povećala u odnosu na drugu grupu ali je i dalje bila značajno manja u odnosu na kontrolu ( $1.518 \pm 0.009$ ,  $p < 0.05$ ).

Prosečna vrednost lakunarnosti, iznosila je  $0.561 \pm 0.024$  u kontrolnoj grupi životinja (Slika 15). U prvoj eksperimentalnoj grupi ova vrednost se povećala na  $0.594 \pm 0.023$ , što je predstavljalo statistički značajnu razliku ( $p < 0.05$ ). U drugoj eksperimentalnoj grupi lakunarnost je iznosila  $0.564 \pm 0.028$ , odnosno nije bilo značajne razlike u odnosu na kontrolu ( $p > 0.05$ ). U trećoj eksperimentalnoj grupi prosečna lakunarnost je bila  $0.583 \pm 0.034$ , što takođe nije predstavljalo značajnu promenu u odnosu na kontrolnu grupu ( $p > 0.05$ ).



Slika 14. Srednje vrednosti fraktalne dimenzije (dobijene nakon binarizacije regiona interesa) hromatinske strukture

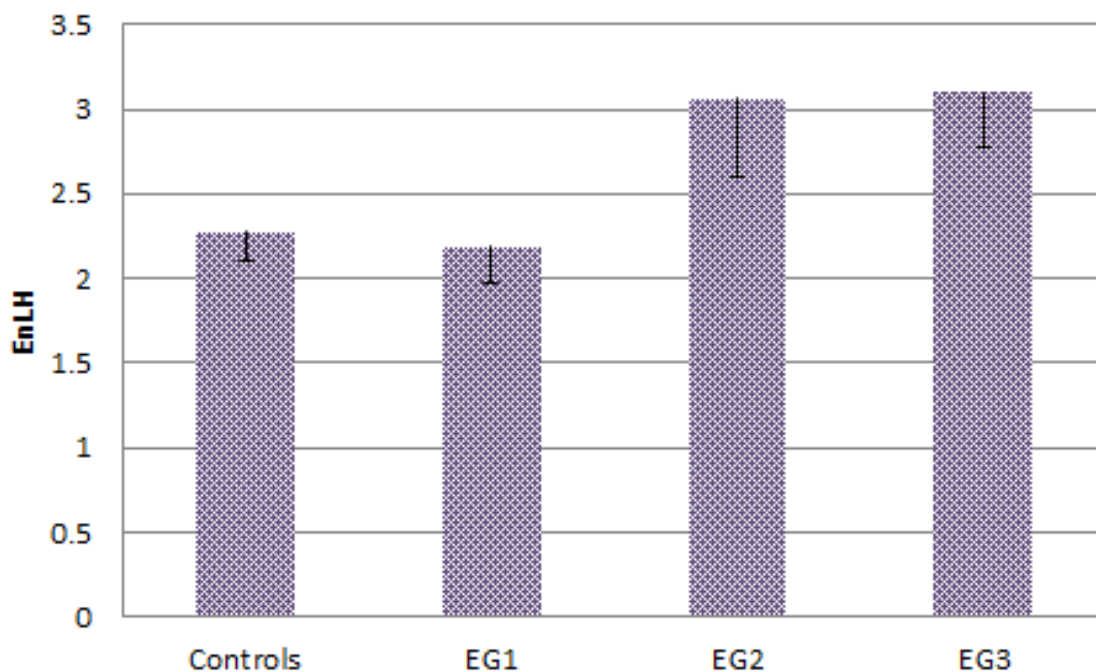


Slika 15. Srednja vrednost fraktalne lakunarnosti hromatinske strukture hepatocita.

#### 4.3. Rezultati Harove diskretne vejolet transformacije

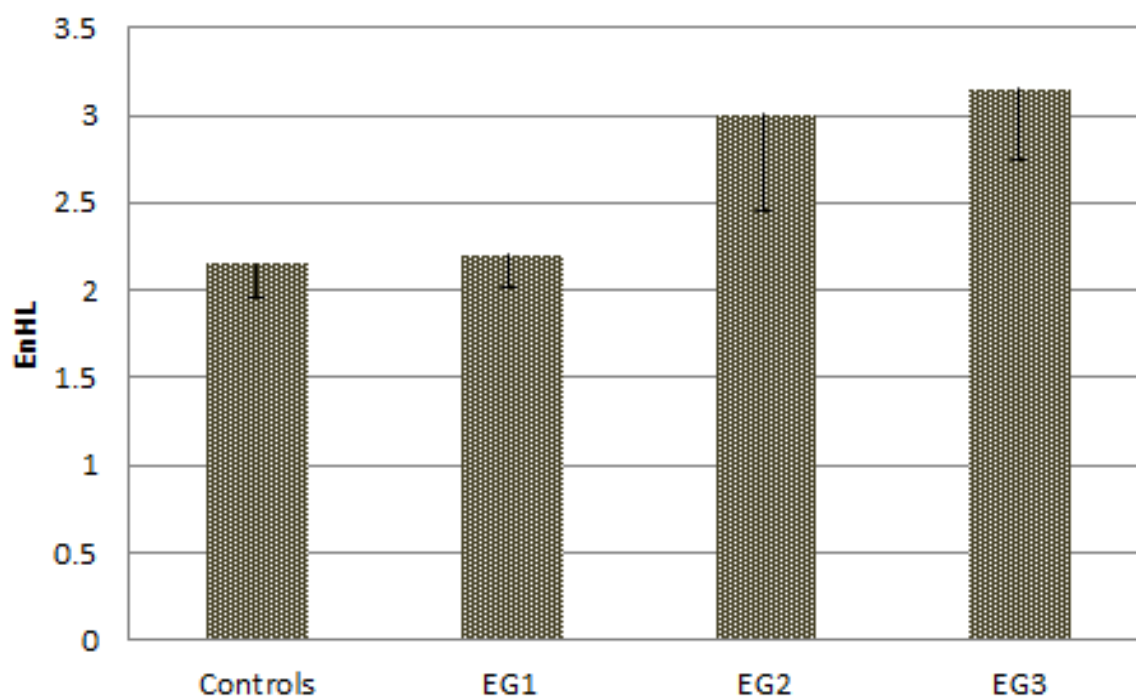
U eksperimentu u okviru koga su životinje dobijale nanočestice tokom 3 dana srednje vrednosti energijskih koeficijenata EnLH, EnHL, i EnHH su bile  $2.59 \pm 0.38$ ,  $2.30 \pm 0.37$ , odnosno  $0.110 \pm 0.014$  u kontrolnoj grupi. U prvoj eksperimentalnoj grupi iznosile su  $2.08 \pm 0.33$ ,  $1.64 \pm 0.27$ , odnosno  $0.116 \pm 0.006$ . Ove promene su bile statistički visoko značajne za vrednosti EnLH i EnHL ( $p < 0.01$ ), dok nije utvrđena statistička značajnost za EnHH ( $p > 0.05$ ). U drugoj eksperimentalnoj grupi vrednosti su se dodatno smanjile na  $1.97 \pm 0.25$ ,  $1.55 \pm 0.18$ , odnosno  $0.114 \pm 0.005$ , a razlike u odnosu na kontrolu su bile statistički značajne, kao i ranije, za vrednosti EnLH i EnHL ( $p < 0.01$ ), dok nije utvrđena statistička značajnost za EnHH ( $p > 0.05$ ). U trećoj eksperimentalnoj grupi došlo je do još većeg smanjenja na vrednosti  $1.79 \pm 0.27$ ,  $1.40 \pm 0.25$ , odnosno  $0.107 \pm 0.006$ . Za vrednosti EnLH i EnHL utvrđeno je da je smanjenje statistički visoko značajno u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.01$ ), dok nije utvrđena statistička značajnost za vrednosti EnHH ( $p > 0.05$ ).

U eksperimentu u okviru koga su životinje dobijale nanočestice tokom 7 dana, srednje vrednosti energijskih koeficijenata EnLH, EnHL, i EnHH su bile  $2.28 \pm 0.18$ ,  $2.15 \pm 0.20$ , odnosno  $0.095 \pm 0.003$  u kontrolnoj grupi (Slike 16-18). U prvoj eksperimentalnoj grupi iznosile su  $2.19 \pm 0.22$ ,  $2.20 \pm 0.19$ , odnosno  $0.094 \pm 0.002$ .



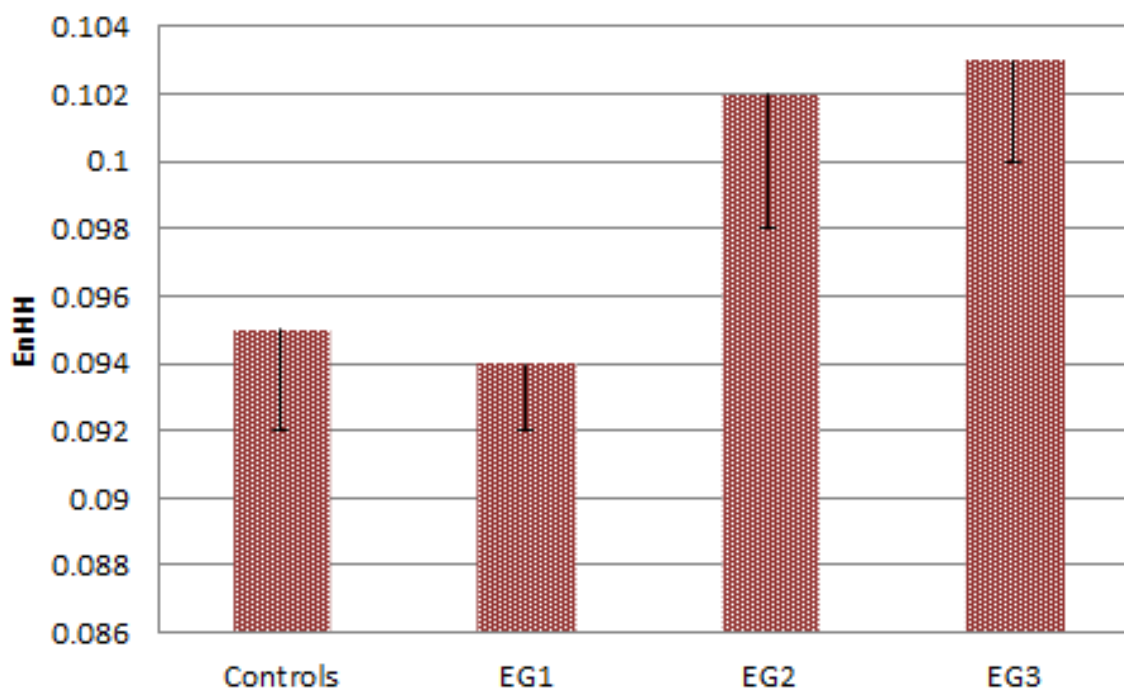
Slika 16. Vrednosti EnLH energije vejevlet koeficijenta hromatinske strukture hepatocita dobijene nakon diskretne vejevlet transformacije.

Ove promene nisu bile statistički značajne ( $p > 0.05$ ). U drugoj eksperimentalnoj grupi vrednosti su se povećale na  $3.06 \pm 0.46$ ,  $3.01 \pm 0.56$ , odnosno  $0.102 \pm 0.004$ , a razlike u odnosu na kontrolu su bile statistički značajne. U trećoj eksperimentalnoj grupi došlo je do još većeg povećanja na vrednosti  $3.10 \pm 0.33$ ,  $3.15 \pm 0.41$ , odnosno  $0.103 \pm 0.003$ , što je takođe bilo statistički značajno ( $p < 0.01$ ).





Slika 17. Vrednosti EnHL energije vejevlet koeficijenta hromatinske strukture hepatocita dobijene nakon diskretne vejevlet transformacije.

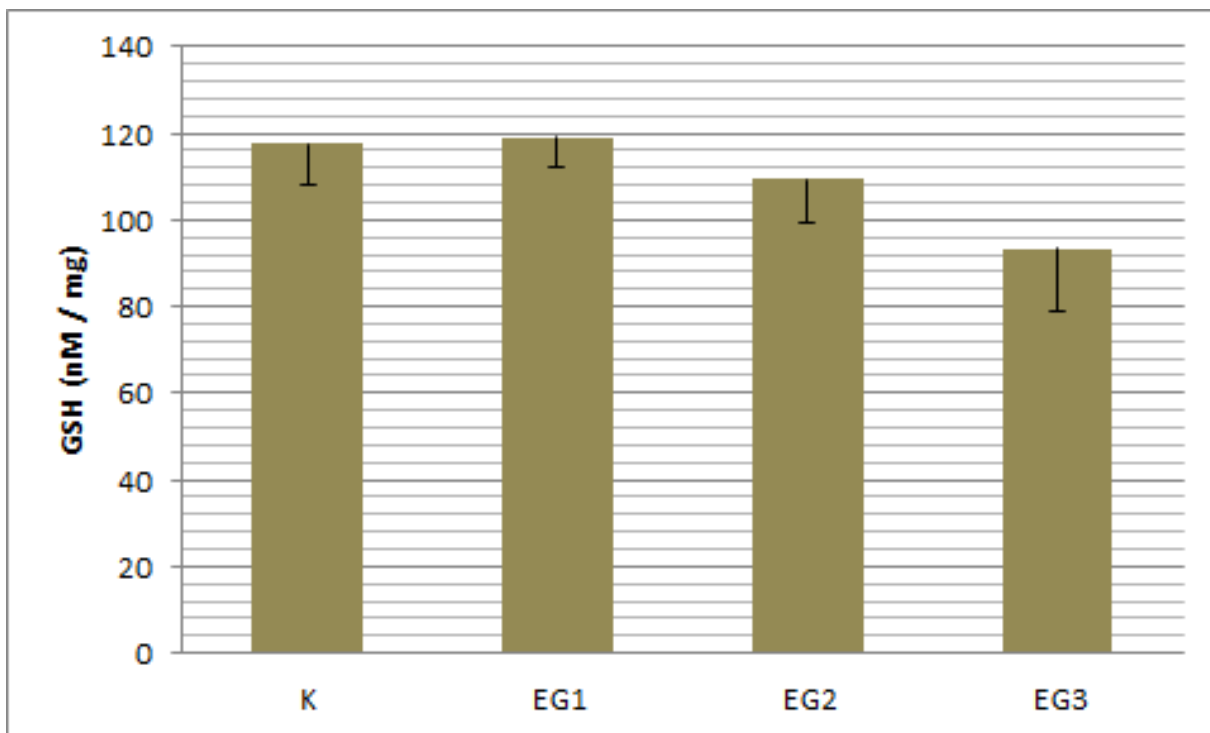


Slika 18. Vrednosti EnLH energije vejevlet koeficijenta hromatinske strukture hepatocita dobijene nakon diskretne vejevlet transformacije.

#### 4.4. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

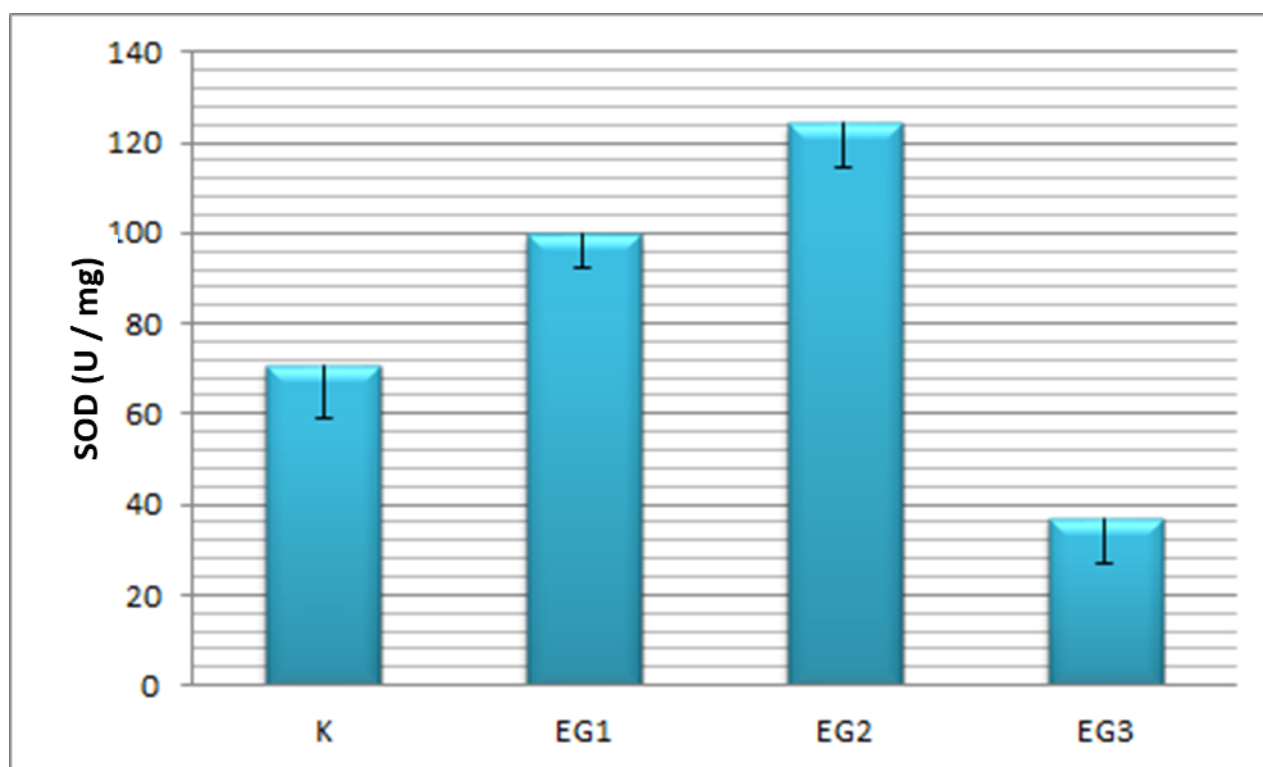
U eksperimentu u okviru koga su životinje dobijale nanočestice tokom 7 dana došlo je do značajne redukcije GSH u trećoj eksperimentalnoj grupi (životinje tretirane nanočesticama u dozi od 3 mg/kg dnevno). U kontrolnoj grupi vrednost GSH je iznosila  $117.51 \pm 9.67$  nM/mg proteina, u prvoj eksperimentalnoj grupi je došlo do blagog povećanja ovog parametra na  $119.02 \pm 6.82$  nM/mg koje nije bilo statistički signifikantno (Slika 19). Nasuprot tome, u drugoj grupi je došlo do blagog smanjenja GSH na  $109.42 \pm 10.02$  nM/mg koje takođe nije bilo statistički signifikantno ( $p > 0.05$ ). Međutim, u trećoj eksperimentalnoj grupi, došlo je do relativno velikog smanjenja ove vrednosti na  $93.38 \pm 14.61$  što je predstavljalo statistički visoko značajnu redukciju. U eksperimentu u okviru koga su životinje dobijale nanočestice tokom 3 dana sa druge strane nije uočena statistički značajna promena ovog parametra oksidativnog statusa ( $p > 0.05$ ). Takođe, nije utvrđena statistički značajna povezanost između ovog parametra i indikatora fraktalne, GLCM i vejevlet analize ni u jednom eksperimentu ( $p > 0.05$ ).





Slika 19. Srednje vrednosti koncentracije GSH u tkivu jetre.

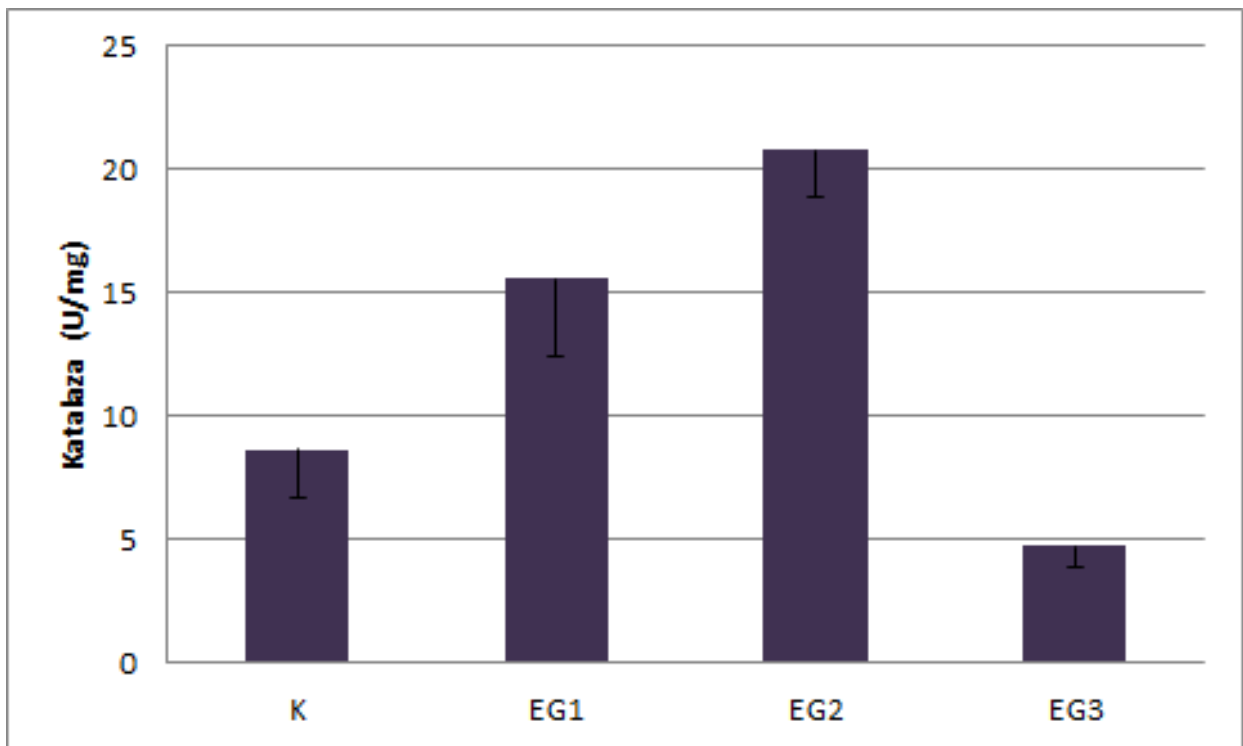
Kada su u pitanju vrednosti koncentracija superoksid dismutaze (SOD), takođe, primećene su statistički značajne promene u eksperimentu u okviru koga su životinje dobijale nanočestice tokom 7 dana (Slika 20). U poređenju sa kontrolnom grupom životinja kod koje je vrednost SOD iznosila  $70.98 \pm 12.08$  U/mg, u prvoj eksperimentalnoj grupi došlo je do značajnog povećanja na  $99.83 \pm 7.44$  U/mg ( $p < 0.01$ ) a u drugoj eksperimentalnoj grupi vrednost se dodatno povećala na  $124.12 \pm 9.76$  U/mg ( $p < 0.01$ ). Međutim, u trećoj eksperimentalnoj grupi došlo je do značajnog smanjenja SOD na  $36.87 \pm 9.77$  U/mg ( $p < 0.01$ ). Slično kao i kod GSH vrednosti, nije uočena statistički značajna povezanost između SOD i vrednosti fraktalnih, teksturalnih i vejvlet indikatora hromatinske organizacije u jedrima hepatocita.



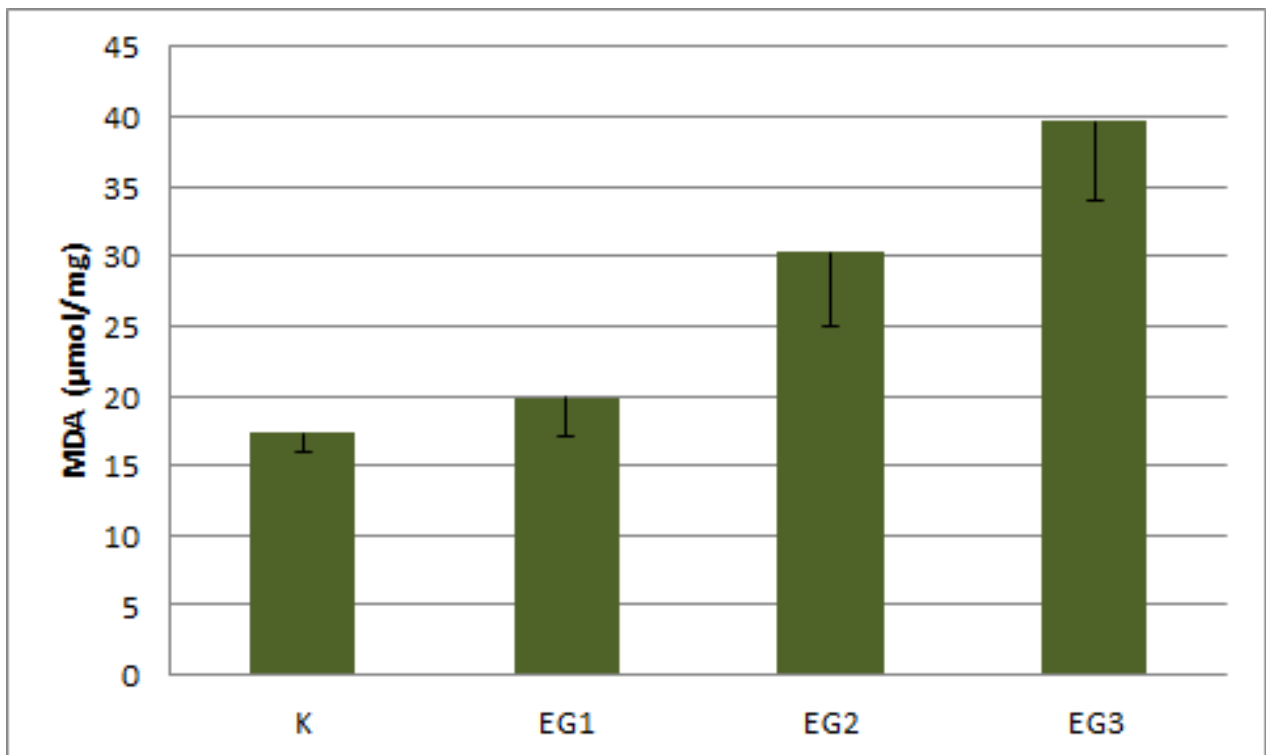
Slika 20. Srednje vrednosti koncentracije SOD u tkivu jetre.

Koncentracija enzima katalaze je takođe pretrpela značajne promene u eksperimentu u okviru koga su životinje dobijale nanočestice tokom 7 dana (Slika 21). U poređenju sa inicijalnom vrednošću  $8.63 \pm 1.92$  U/mg proteina u kontrolnoj grupi, došlo je do statistički značajnog povećanja u prvoj eksperimentalnoj grupi ( $15.56 \pm 3.13$  U/mg,  $p < 0.01$ ) i drugoj eksperimentalnoj grupi ( $20.77 \pm 1.94$  U/mg,  $p < 0.01$ ). U trećoj eksperimentalnoj grupi, došlo je do statistički signifikantnog smanjenja vrednosti na  $4.74 \pm 0.92$  U/mg ( $p < 0.05$ ) u odnosu na kontrolnu grupu. Slično vrednostima SOD, nije uočena statistički značajna korelacija sa kompjuterskim indikatorima hromatinske strukture i distribucije ( $p > 0.05$ ).

Vrednosti koncentracija MDA su se takođe značajno promenile u eksperimentu u okviru koga su životinje dobijale nanočestice tokom 7 dana (Slika 22). U poređenju sa kontrolnom grupom ( $17.35 \pm 1.38$   $\mu\text{mol/mg}$  proteina), u prvoj eksperimentalnoj grupi je došlo do značajnog rasta na prosečnu vrednost od  $19.84 \pm 2.82$   $\mu\text{mol/mg}$ , što je predstavljalo statistički visoko signifikantno povećanje ( $p < 0.01$ ). U drugoj eksperimentalnoj grupi, ova vrednost je nastavila da se povećava na  $30.23 \pm 5.22$   $\mu\text{mol/mg}$  ( $p < 0.01$ ). U trećoj eksperimentalnoj grupi je došlo do dodatnog povećanja na  $39.64 \pm 5.74$   $\mu\text{mol/mg}$  ( $p < 0.01$ ). Uočen je statistički visoko značajan trend povećanja ovog parametra oksidativnog stresa ( $p < 0.01$ ). Međutim, kao ni kod predhodnih parametara, nije uočena statistički značajna korelacija sa kompjuterskim indikatorima hromatinske strukture i distribucije ( $p > 0.05$ ).



Slika 21. Srednje vrednosti koncentracije katalaze u tkivu jetre.



Slika 22. Srednje vrednosti koncentracije MDA u tkivu jetre.

## 5. DISKUSIJA

Tokom poslednje dve decenije, paralelno sa tehnološkim razvojem, došlo je do pojave nove discipline, nanotehnologije, bazirane na česticama izuzetno malog dijametra sa specifičnim fizičkim, hemijskim i biološkim svojstvima. Pojedinačne nanočestice su po pravilu prečnika manjeg od 100 nanometara i mogu imati različite oblike poput sferičnog (nanosfere) ili cilindričnog (nanotube, nanocilindri). Nanotehnologija je napravila revolucionarne promene u skoro svim oblastima medicinskih istraživanja, a pojedini nanomaterijali su počeli da se primenjuju, osim u naučnoistraživačkom radu, i u kliničkoj praksi (Zinger et al. 2018; Zhu et al. 2018; Zurob et al. 2019; Urdinguio et al. 2019; Zubar et al. 2020).

Mali dijametar velikog broja nanočestica im omogućava da nesmatano prolaze kroz različite fiziološke barijere, uključujući krvno-moždanu barijeru, endotel kapilara ili filtracionu barijeru u bubregu. Takođe, pojedine nanočestice mogu prolaziti i kroz ćelijske membrane, bilo kroz lipidni dvosloj, bilo kroz pukotine između transmembranskih proteina ili proteina i lipidnog dvosloja. Jednom kada se nađu u ćeliji, one mogu pokrenuti različite signalne puteve i pokrenuti određene fiziološke ili patološke procese u citoplazmi ili jedru. Mali dijametar nanočestice takođe dovodi do specifične interakcije sa raznim enzimima, faktorima rasta, citokinima, nukleinskim kiselinama i drugim jedinjenjima (Pedroso-Santana et al. 2020; Yang et al. 2020; Antonio et al. 2021).

Nanočestice takođe imaju još jednu važnu osobinu koja proističe iz njihovog malog dijametra. Naime, njihova površina je veoma velika, odnosno nanočestice imaju veliku vrednost odnosa površina/volumen. Ovo ih značajno razlikuje od takozvanih "filih čestica" ("fine particles", dijametar 1-1000 mikrometara), gde je volumen mnogo veći u odnosu na površinu. Velika površina čestice može znatno izmeniti neke fizičke i hemijske karakteristike poput površinskog napona, količine naelektrisanja itd (Tomoda et al. 2008; Belut et al. 2019).

Nanomaterijali imaju specifičan odnos sa rastvaračem (obično vodom) koji se razlikuje u poređenju sa materijalom koji nije u nano formi (Jacobson et al. 2015; Wei et al. 2020). Na primer, mnogi nerastvorljivi materijali, kada se nađu u obliku nanočestica postaju rastvorljivi. Afinitet između rastvarača i nanočestice u nekim uslovima može biti veoma veliki. Ponekad joni i ostali molekuli prisutni u rastvaraču formiraju poseban interfacijalni omotač oko nanočestice koji takođe može na različite načine da reaguje kako sa samim rastvaračem, tako i sa drugim rastvorenim supstancama. Ove osobine mogu uticati i na pokretljivost nanočestica u rastvoru, odnosno difuziju u fiziološkim uslovima (kretanje iz mesta veće koncentracije u mesto manje koncentracije). U tom kontekstu, sam rastvarač poprima specifične fizičke i hemijske karakteristike kada se u njemu nađe nanomaterijal u poređenju sa „običnim“ materijalima. Ovo može uticati na proces osmoze (kretanje vode kroz polupropustljivu membranu iz mesta manje koncentracije supstance u

mesto veće koncentracije rastvora) kao i na vrednosti osmotskog pritiska u rastvoru (Jacobson et al. 2015; Wei et al. 2020).

Većina nanočestica ima u svom sastavu tri morfološki i funkcionalno različita sloja (Yang et al. 2018; Khan et al. 2019; Magro et al. 2020; Wei et al. 2020). Središnji sloj ili jezgro nanočestice ("core layer") je u principu odgovoran za masu čestice. Čestice sa velikim jezgrom su teške i imaju tendenciju da u rastvoru padnu na dno pod uticajem gravitacije. Lake nanočestice sa malim jezgrom ponekad, u zavisnosti od spoljnih faktora i interakcije sa njima, da "lebde" u rastvaraču, odnosno gravitacija na njih ima manji uticaj. Sledeći sloj je takozvana "ljuska" ("shell layer") koja je odgovorna za pojedina fizička i hemijska svojstva čestice mada ne dolazi direktno u kontakt sa spoljnom sredinom. Treći sloj je površinski ("surface layer") i on je često odgovoran za interakcije sa biološki aktivnim molekulima. Površinski sloj se može funkcionalizovati dodavanjem različitih markera, liganda, peptida i drugih jedinjenja koje mogu da odrede dalju sudbinu čestice kada se nađe u organizmu (Khan et al. 2019; Yang et al. 2018; Magro et al. 2020).

Nanočestice se mogu hemijski modifikovati na različite načine. Na primer, na njihovu površinu se mogu zakačiti razne hidrofilne i lipofilne supstance, zatim supstance koje nose različita naelektrisanja, kao i supstance koje se ponašaju kao receptori za različite farmakološki aktivne supstance. Možda još važnije, nanočestice se mogu povezati sa različitim lekovima i tako postati njihovi nosači („drug carriers“). Na ovaj način se može promeniti celokupna farmakokinetika, pa i farmakodinamika određenog leka. Lekovi prikačeni za nanočesticu mogu imati različitu apsorpciju u digestivnom traktu (ustima, želucu, crevima), biodistribuciju u organizmu, eliminaciju u jetri ili bubregu. Takođe, ovakvi lekovi mogu na različit način interagovati sa svojim receptorom u ciljnom tkivu, na ćelijskoj membrani, ili sa nekim jedinjenjem u citosolu ili jedru ćelije (Li et al. 2021; Kaduri et al. 2021).

Vezivanje nanočestica sa biološkim molekulima danas je predmet mnogobrojnih istraživanja u svetu. Ovi biološki molekuli na primer mogu biti monoklonska antitela koja su dizajnirana da se vezuju specifično za ciljno tkivo poput tumora. Različiti peptidi napravljeni u svrhu ciljanja patološki izmenjenog tkiva takođe mogu biti vezani za nanočesticu. Ovo je od posebnog značaja u istraživanju raka jer se na ovaj način lek (citostatik) može brzo i efikasno odvesti do tumorskih ćelija a da pri tome ne dođe u kontakt sa zdravim tkivima. Moguće je da se pomoću nanočestica, hepatotoksičnost, nefrotoksičnost i neurotoksičnost mnogih antikancerskih farmakološki aktivnih supstanci može značajno smanjiti (Hong et al. 2021; Amani et al. 2021).

Nanočestice u medicini se mogu koristiti i kao kontrastna sredstva prilikom obavljanja različitih složenih dijagnostičkih procedura. Do sada su uspešno primenjene kao alternativa kontrastima u kompjuterizovanoj tomografiji, nuklearnoj magnetnoj rezonanci i pozitronskoj emisijonj

tomografiji. Biofizička osnova uspeha nanočestica kao kontrastnog sredstva se zasniva na činjenici da materijali veće gustine i sa većim atomskim brojem apsorbuju veću količinu rendgenskih zraka, pa samim tim tkivima daju veću oštrinu na dobijenoj radiološkoj slici. U ovu svrhu se često koriste metalne nanočestice, poput gvožđa, srebra, zlata, iridijuma ili platine. Trenutno veliki broj ovih nanomaterijala su u fazi ispitivanja njihove bezbednosti (toksičnosti), sa ciljem da se u budućnosti uvrste u konvencionalne dijagnostičke protokole u radiologiji (Kosuge et al. 2021; Li et al. 2021).

Jedna od značajnih prednosti pojedinih metalnih nanočestica u radiologiji u poređenju sa standardnim kontrastnim sredstvima je činjenica da se renalni klirens nanočestica može menjati. Mogućnost da se ovo obavi, pored ostalog je i promena dijametra nanočestice u smislu da što je čestica manja, to je klirens veći (mada to ne mora uvek biti slučaj). Druga mogućnost je konjugacija nanočestice sa nekim drugim molekulom koji povećava ili smanjuje renalni klirens. Takođe, nanočestice imaju specifičnu interakciju sa monocitno-makrofagnim sistemom koja se može do određene mere kontrolisati hemijskim inženjeringom. Veoma male nanočestice, naročito one manje od 10 nanometara, su često nevidljive za ćelije imunskog sistema pa samim tim se izbegava njihovo deponovanje u slezini i limfnim čvorovima (Naseri et al. 2018). Takođe, na ovaj način se izbegava potencijalno imunomodulatorno dejstvo kontrastnog sredstva u smislu izazivanja alergijskih reakcija, supresije imunskog sistema ili imunotoksičnosti.

Sledeća potencijalna primena nanomaterijala u medicini je kreiranje savremenih, inovativnih biosenzora i senzorskih sistema za detekciju i merenje koncentracije raznih bioloških molekula (Ibrahim et al. 2021; Ali et al. 2021). Senzori se mogu koristiti u *in vitro* uslovima, na primer kada je u kulturi ćelija potrebno odrediti prisustvo i koncentraciju nekog polisaharidnog lanca ili proteina na površini ćelijske membrane. Takođe je na ovaj način moguće sa velikim stepenom senzitivnosti izmeriti koncentraciju nekih kompleksnih jedinjenja u rastvoru. Poslednjih godina, u fokusu velikog broja istraživačkih timova je dizajn nanosenzora koji bi bili u mogućnosti da izvrše odgovarajuća merenja u *in vivo* uslovima, u životinjskom ili ljudskom organizmu (Ibrahim et al. 2021; Ali et al. 2021). Ovakvi senzori bi, na primer, mogli da se sastoje od metalne nanočestice koja sa jedne strane ima prikačeno jedinjenje koje se može meriti (npr. emituje signal u vidu fluorescencije ili radioaktivnosti), a sa druge strane je povezana sa jedinjenjem koje poseduje veliki afinitet za ciljno tkivo. U ciljnom tkivu, nanočestica se može vezati za neki receptor, faktor rasta, hormon ili sistem sekundarnog glasnika. Jedinjenje za koje se vezuje čestica bi trebalo da bude specifično za to tkivo, odnosno da se ne nalazi u drugim tkivima. Moguće je na ovaj način napraviti i senzorni sistem koji je specifičan ne za određeno tkivo/organ već za jednu vrstu ćelija koja je locirana u mnogo različitih tkiva. Primer bi bili hipotetički senzori za neke subpopulacije limfocita, hormonski aktivne ćelije, neke ćelije prisutne u

vezivnom tkivu, ili kancerske ćelije u raširenim metastazama u nekoliko različitih organa.

Posebno su interesantni nanosenzorni sistemi bazirani na fluorescenciji kao deo većih bioeseja za detekciju biološki aktivnih molekula (Zhang et al. 2021). Neke nanočestice same po sebi mogu biti fluorescentne i dovoljno je da se izvrši njihova konjugacija sa jedinjenjem koje je sposobno da „cilja“ ono što želimo da izmerimo. Druge nanočestice se asociraju sa fluorescentnim molekulima koji emituju zasebni signal. Osnovna prednost korišćenja nanočestica u okviru ovakvih eseja je oštija slika kada se preparat posmatra pod mikroskopom, odnosno veći stepen kontrasta između „označenog“ tkiva i ćelija i okoline. Takođe, stabilnost fluorescentnih nanomaterijala je veća u poređenju sa ostalim materijalima, jednim delom zbog manje fotosenzitivnosti. Iz ovoga proističe duže trajanje fluorescencije, mogućnost dugih i višekratnih merenja, kao i potencijalna otpornost prema brojnim sredinskim (fizičkim, hemijskim i biološkim faktorima).

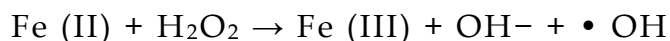
Postoji veliki broj različitih klasifikacija nanočestica. Prethodno je već pomenuta klasifikacija prema obliku (sferične, cilindrične itd.) (Ali et al. 2021; Zhang et al. 2021). Međutim, u naučnoj literaturi, danas je najprisutnija podela prema tipu samog materijala od koga je čestica napravljena. Tako nanočestice delimo na metalne, ugljenikove, odnosno bazirane na ugljeniku, keramičke, polimerne, lipidne i poluprovodničke. Ovo ne mora da znači da nanočestice koje pripadaju istoj kategoriji imaju iste hemijske, fizičke i biološke karakteristike. Na primer, grafenske i dijamantske nanočestice, iako obe spadaju u kategoriju ugljenikovih se značajno razlikuju i prema funkcionalnosti, i prema morfologiji (dvodimenzionalna rešetka grafena u poređenju sa trodimenzionalnom sferom / elipsom dijamanta).

U medicinskim istraživanjima, verovatno najčešće korišćeni tip nanočestica su one napravljene od metala i metalnih oksida (Ali et al. 2021; Ibrahim et al. 2021). Tako razlikujemo nanočestice gvožđa i oksida gvožđa, srebra (uključujući i koloidno srebro), zlata, platine, titanijuma (obično u formi titanijum dioksida), cinka, bakra, kobalta (ponekad u radioaktivnoj formi), iridijuma, galijuma i druge (Ali et al. 2021; Ibrahim et al. 2021). U odnosu na druge materijale, metali imaju određene prednosti. Kao prvo, metalne nanočestice se relativno lako proizvode. Jedan miligram nanočestica gvožđe (II,III) oksida (magnetitne nanočestice) je mnogo jeftiniji i lakši za proizvodnju u poređenju sa jednim miligramom grafena (materijal na bazi ugljenika). Drugo, u poređenju sa nekim drugim materijalima, metalne nanočestice veoma malog dijametara (1-10 nanometara) je relativno lako proizvesti. Ovako mali dijametar omogućava brz i efikasan prolaz kroz većinu bioloških barijera. Treće, interakcija metala sa važnim enzimima i signalnim putevima u organizmu je već u određenoj meri izučena što nije slučaj sa ostalim, novim materijalima, poput polimera (Ali et al. 2021; Ibrahim et al. 2021). Metalne nanočestice u organizmu posle određenog vremena imaju tendenciju da se ukupne i stvaraju aglomerate, ili da se pretvore u jonski oblik. Primer bi bile nanočestice koloidnog srebra koje u

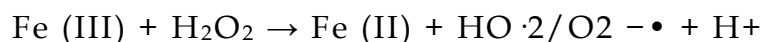
ćeliji se pretvore u običan srebrni jon. Dalja sudbina metala u običnom, jonskom obliku je poznata, u smislu njegove eliminacije, tendencije deponovanja i toksičnosti.

Nažalost, pojedini metalni nanomaterijali imaju i svoje mane u odnosu na nemetalne nanočestice. Moguće je da neki metali, kada se nađu u jonskom obliku, na specifičan način reaguju sa pojedinim hemijskim medijatorima izazivajući proces programirane ćelijske smrti. Ovo proapoptotsko delovanje pojedinih metalnih nanočestica je ponekad u osnovi njihove citotoksičnosti. Takođe, neke metalne nanočestice dovode do povećane proizvodnje slobodnih kiseoničnih radikala, poput vodonik peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superoksidnog anjona ( $\text{O}_2^-$ ) ili hidroksilnog anjona ( $\text{OH}^-$ ). Nastanak drugih slobodnih radikala takođe nije isključeno. Sve ovo u nekim (ne svim) slučajevima može dovesti do hepatotoksičnosti, nefrotoksičnosti i neurotoksičnosti, što bitno smanjuje verovatnoću da će jednog dana te nanočestice moći da se uspešno primenjuju u kliničkoj praksi (i pored odličnih rezultata u pogledu senzitivnosti, prenosa lekova i ostalih mogućnosti primene). Danas preovlađuje mišljenje da toksičnost metalnih nanomaterijala još uvek nije dovoljno izučena, i veliki broj istraživačkih timova u svetu se trudi da ove probleme razjasni (Ali et al. 2021; Ibrahim et al. 2021; Jamaluddin et al. 2021; Li et al. 2021). Ovo se posebno odnosi na potencijalnu sposobnost metalnih nanomaterijala da aktiviraju apoptotske i neke druge signalne puteve u ćelijskoj citoplazmi i jedru putem oksidativnog stresa.

Gvožđe u organizmu aktivno učestvuje u brojnim oksido-reduktivnim i drugim reakcijama. Stoga ne začuđuje podatak da u velikim dozama, ono može povećati generisanje reaktivnih kiseoničnih jedinjenja. Hidroksilni anjon kao potencijalno najopasniji slobodni radikal (najreaktivniji je i dovodi do potencijalno velikog oštećenja u genetskom materijalu ćelije) se stvara nakon što gvožđe u svom Fe(II) obliku interaguje sa vodonik peroksidom (Paunovic et al. 2020):



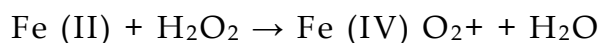
Ovo je klasična homogena Fentonova reakcija. U *in vivo* uslovima, Fentonova reakcija je relativno česta, ali se ne događa uvek. Homogena reakcija nalik na Fentonovu (classic homogeneous Fenton reaction) je takođe moguća u pojedinim slučajevima:



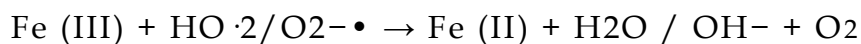
Kao što je prikazano, tokom ove reakcije, gvožđe u Fe(III) obliku prelazi u Fe(II) oblik pri čemu se može stvoriti velika količina superoksidnih i hidroksilnih anjona kao i vodonikovih jona.

Dejstvom gvožđa na  $\text{H}_2\text{O}_2$  ne mora uvek da se dobije radikal. U takozvanoj neradikalnoj reakciji, gvožđe poprima Fe(IV) oblik i stvara se oksid:

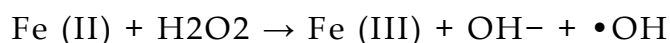




Pored Fentonove reakcije, Haber-Vajsova reakcija (Haber-Weiss reaction) takođe može dovesti do stvaranja slobodnih kiseoničnih radikala i oksidativnog stresa. U prvom delu gvožđe u kontaktu sa već postojećim slobodnim kiseoničnim radikalima, u određenim uslovima prelazi iz Fe (III) u Fe (II) oblik (Paunovic et al. 2020):



U sledećoj fazi Fe (II) gvožđe reaguje sa vodonik peroksidom pri čemu se stvara visoko reaktivni hidroksilni anjon koji je najodgovorniji za dalja oštećenja:



Treba napomenuti da se i Fentonova i Haber-Vajsova reakcija dešavaju i u fiziološkim uslovima, odnosno ne moraju da se dešavaju isključivo kao deo nekog citotoksičnog mehanizma pri unosu prekomerne količine gvožđa. Na kraju krajeva slobodni kiseonični radikali se redovno stvaraju u fiziološkim uslovima i u pojedinim normalnim ćelijskim funkcijama (primer je funkcionisanje pojedinih ćelija imunskog sistema) imaju važnu ulogu. Ipak, koncentracija svih slobodnih radikala, pa i onih kiseoničnih se normalno drži pod strogom kontrolom, a ovo se posebno odnosi na hidroksilni anjon koji je i potencijalno najdestruktivniji (Duca et al. 2019; Paunovic et al. 2020; Bhandari, 2021).

Postoji više od deset različitih oksida gvožđa. U prirodnim naukama najznačajniji oksidi su gvožđe(II) oksid (FeO, vustit), gvožđe (II,III) oksidi i gvožđe(III) oksid (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Gvožđe (II,III) oksidi mogu imati u svom sastavu tri, četiri, pet ili više atoma gvožđa i imaju hemijske formule Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>4</sub>O<sub>5</sub>, Fe<sub>5</sub>O<sub>6</sub>, Fe<sub>5</sub>O<sub>7</sub>, Fe<sub>13</sub>O<sub>19</sub> itd. Od njih je najznačajniji Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> pod nazivom magnetit. On je u osnovi kombinacija gvožđe(II) oksid i gvožđe(III) oksida, ili FeO·Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. U istraživanjima iz oblasti nanotehnologija i nanomedicine, od posebnog značaja su gvožđe(III) oksid (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, hematit) i magnetit, i njihove nanočestice se često vezuju sa raznim biološki značajnim jedinjenjima. Magnetitne nanočestice su veoma stabilne u fiziološkim uslovima i relativno lako se prave u laboratorijskim uslovima. Takođe bitno je napomenuti i da je njihova cena na tržištu relativno mala u poređenju sa nekim drugim nanomaterijalima, odnosno da su pristupačne za veliki broj laboratorija koje se bave nanomedicinom (Crichton, 2016; Cotin et al. 2021; Serio et al. 2021).

Kao što mu samo ime pokazuje, magnetit je materijal sa feromagnetnim svojstvima, odnosno spada u grupu feromagnetnih minerala. Pojam feromagnetizma se odnosi na osobinu materijala koji u svom sastavu imaju gvožđe da ih privlače prirodni ili arteficialni magneti, i da sami pod određenim uslovima mogu postati magneti. Pored feromagnetizma, postoji još nekoliko drugih tipova magnetizma poput paramagnetizma u kojima su magnetne sile između materijala i magneta slabije. Feromagnetski materijal,

kada se nađe u blizini magnetnog polja (poreklom od pravog magneta) i sam poprima svojstva magneta. Ova osobina postoji zbog tendencije magnetnih dipola materijala da se usmere u pravcu magnetnog polja. Broj magnetnih domena u feromagnetnom materijalu je ograničen, odnosno sposobnost materijala da poprimi svojstva magneta ima svoj maksimum tj. zasićenje. Kada se feromagnetni materijal ukloni iz magnetnog polja, njegove magnetne osobine oslabe, ali ne isčeznu u potpunosti, odnosno postoji takozvana remenentna magnetizacija (Rodrigues et al. 2020, Gavilán et al. 2021; Wei et al. 2021).

Gvožđe, kao i većina oksida gvožđa imaju feromagnetne osobine (Jacob et al. 2017). U industriji, ali i drugim oblastima, najinteresantniji su materijali koji, pored gvožđa u svom sastavu imaju gvožđe(II,III) oksid i gvožđe(III) oksid u različitim odnosima. Dodavanje drugih metala poput magnezijuma, olova ili bakra i njihovih oksida može promeniti fizička i hemijska svojstva oksida gvožđa. Prednost oksida gvožđa u kombinaciji sa ostalim metalima u odnosu na elementarno gvožđe je činjenica da oni imaju relativno veliku električnu rezistenciju.

Gvožđe(II,III) oksid, od svih jedinjenja gvožđa je „najmagnetičniji“, odnosno ima najstabilnija i najintenzivnija feromagnetska svojstva (Xue et al. 2009). Spada u takozvane teseralne kristalne sisteme, sa oktaedarskim kristalnim habitusom i neravnim prelomom. Prosečna gustina magnetita kao minerala je oko 5,2 grama po kubnom centimetru, dok tvrdoća po Mohs skali iznosi oko 6 jedinica. Relativna gustina ovog materijala iznosi oko 5,18. U Nickel-Strunz klasifikaciji minerala, gvožđe(II,III) oksid nosi oznaku 4.BB.05, a spada spinelnu grupu oksidnih minerala.

Gvožđe(II,III) oksid kao mineral je prisutan u različitim tkivima i organima gde može (i ne mora) obavljati važne fiziološke funkcije. Mnogi kičmenjaci su sposobni da endogeno stvaraju magnetit koji je delimično odgovoran za nastanak slabih magnetnih polja u *in vivo* uslovima. Kod nekih životinja, magnetit je deo receptorskog senzornog sistema za orijentaciju u prostoru i delimično zahvaljujući njemu, životinja je sposobna da usmeri pravac svog kretanja ka severnom ili južnom magnetnom polu planete. Ovaj fenomen korišćenja feromagnetskog materijal u cilju navigacije i orijentacije u prostoru se naziva magnetocepcija (Hiscock et al. 2019).

U ljudskom organizmu, gvožđe(II,III) oksid takođe može da se endogeno proizvodi, i jedan određeni procenat gvožđa je zaista vezan, odnosno nalazi se u ovom obliku (mada je ovaj procenat manji u poređenju sa drugim nosačima gvožđa poput hema i feritina). Magnetit je naročito prisutan u centralnom nervnom sistemu, i to u onim delovima koji su odgovorni za motorne funkcije, koordinaciju pokreta i regulaciju mišićnog tonusa. Bazalne ganglije, mali mozak i delovi međumozga su oblasti u kojima je potvrđeno prisustvo ovog minerala. Neki autori su čak svojevremeno postavili hipotezu, da zbog prisustva feromagnetskih materijala u centralnom nervnom sistemu, čovek možda poseduje posebno,

magnetno čulo, odnosno sposobnost da (nesvesno) modifikuje svoje motorne aktivnosti i ponašanjem u skladu sa magnetnim poljima. Ova hipoteza još uvek nije potvrđena (Vanderstraeten et al. 2012).

Čestice gvožđe(II,III) oksida u ljudskim organima i tkivima ne moraju da imaju isključivo endogeno poreklo. Značajan procenat ovih čestica potiče iz spoljne sredine, odnosno putem zagađenog vazduha ulazi u pluća, a zatim putem krvi dolazi do skoro svih tkiva. Osobe koje žive u zagađenim sredinama poput velikih gradova imaju veću količinu magnetitnih čestica (običnih, ne u nano formi) u mozgu. Ove čestice se donekle hemijski razlikuju od endogenih i moguće je da imaju određene toksične efekte u organizmu, naročito tokom dužeg vremenskog perioda (Pirela et al. 2015; Paunovic et al. 2020).

Postoje određene indicije da magnetitne čestice mogu u određenim slučajevima biti toksične. Ovo se pre svega odnosi na male (ali ne nano) čestice poreklom iz spoljne sredine. Za sada nema čvrstih dokaza o akutnoj toksičnosti gvožđe(II,III) oksida u malim dozama, dok u velikim dozama, toksičnost se ispoljava u vidu trovanja gvožđem. Ekspozicija velikim dozama ovih čestica u kratkom vremenskom periodu je retka i moguća je u vidu industrijskih akcidenata. Udisanje zagađenog vazduha po pravilu ne može da dovede do velike ekspozicije i akutnih toksičnih efekata. Sa druge strane, dugogodišnji boravak u sredini sa velikom koncentracijom PM2.5 i PM10 partikula može povećati količinu magnetitnih nanočestica u pojedinim unutrašnjim organima. Da li i u kojoj meri, ova hronična ekspozicija može dovesti do negativnih efekata po ljudsko zdravlje je još uvek nedovoljno poznato (Malhotra et al. 2020; Rodrigues et al. 2020; Wei et al. 2021).

Poslednjih godina, intenzivna su istraživanja o hroničnoj neurotoksičnosti oksida gvožđa u smislu povećane verovatnoće da hronično izlaganje ovim česticama izazove određene neurološke poremećaje (Malhotra et al. 2020). Kao što je prethodno pomenuto, magnetit se u određenim manjim količinama može naći u nekim subkortikalnim strukturama koje su uključene u motorne aktivnosti poput bazalnih ganglija. Hipokampus i moždano stablo takođe u fiziološkim uslovima mogu da sadrže manje količine gvožđe(II,III) oksida. Međutim, hemijske karakteristike i morfološke osobine ovog endogenog magnetita se donekle razlikuju u poređenju sa onim koji je poreklom iz spoljne sredine. Za sada je još uvek nejasno da li se ove razlike odražavaju u na toksični potencijal u mozgu ili drugim tkivima i organima. U svakom slučaju, koncentracija ukupnog gvožđa u pojedinim delovima mozga može biti povećana kod nekih neurodegenerativnih oboljenja.

Alchajmerova bolest je možda najbolji primer neurodegenerativne bolesti kod koje gvožđe može potencijalno da se akumulira. Nivoi feritina u cerebrospinalnoj tečnosti su čak i relativno pouzdan prediktor prognoze kod ove bolesti, kao što je pokazano u ranijoj studiji (Ayton et al. 2015). Feritin je bio povezan sa padom kognitivnih performansi kod ispitanika. Ovo je u skladu sa nalazima da postoji značajna akumulacija gvožđa u neokorteksu,

naročito kod mlađih pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti. Moguće je takođe da terapijska strategija usmerena ka smanjenju moždanog opterećenja gvoždem i jedinjenjima gvožđa može pomoći pacijentima u smislu usporavanja progresije bolesti (Aytton et al. 2015).

Magnetitne nanočestice imaju potencijalno široku primenu u medicini, a jedna od oblasti koja je predmet intenzivnog istraživanja tokom poslednjih godina je njihova aplikacija u onkologiji (Saha & Saha, 2021; Li et al. 2021; Akhmedov et al. 2021). Nanočestice sa feromagnetskim svojstvima, naime, poseduju važnu osobinu koja nije prisutna kod drugih materijala. Pri povremenom, intermitentnom izlaganju oscilirajućem magnetnom polju, u određenim uslovima, njihova magnetna energija se pretvara u toplotnu energiju, odnosno dolazi do oslobađanja toplote. Sa druge strane, odavno je poznato da su mnoge kancerske ćelije osetljivije na temperature preko 42°C u poređenju sa normalnim ćelijama okolnog (maligno neizmenjenog) tkiva (Rodrigues et al. 2020; Serio et al. 2021; Cotin et al. 2021).

Hipertermija u tumorskom tkivu izaziva smanjenje aktivnosti vitalnih ćelijskih enzima i pokretanje signalnih puteva koji aktiviraju proces programirane ćelijske smrti. U pojedinim slučajevima dolazi i do oštećenja kancerske ćelije u toj meri da se apoptoza ne može pokrenuti već dolazi do nasilne smrti odnosno nekroze. Sa druge strane, ovo je praćeno minimalnim promenama u zdravim ćelijama što je bitna razlika ovakvog terapijskog modaliteta u odnosu na primenu jonizujućeg zračenja. Intenzitet magnetne hipertermije je takođe moguće precizno kontrolisati, kao i granice područja koje je izloženo magnetnom polju, što obično nije slučaj sa jonizujućim zračenjem. Uz to, magnetna hipertermija ne izaziva direktne mutacije i aberacije u genetskom materijalu već na genetski materijal deluje indirektno, preko signalnih puteva iz citoplazme (Rodrigues et al. 2020; Serio et al. 2021; Cotin et al. 2021).

Danas je moguće dodatno povećati kako efikasnost, tako i bezbednost hipertermijske terapije tumora magnetnim nanočesticama tako što se čestice na razne načine funkcionalizuju. Ovo se obavlja dodavanjem različitih antitela, polimernih molekula, pa čak i virusnih partikula na njihovu površinu (Bañobre-López et al. 2013). Ovo dovodi do toga da se nanočestica može prikačiti ciljano za specifični receptor ili neki drugi molekul koji sa nalazi isključivo (ili u većoj količini) na kancerskoj ćeliji. Funkcionalizacija gvozdenih nanočestica može značajno doprineti i njihovoj stabilnosti u telesnim tečnostima. Na primer, moguće je na ovaj način modifikovati interakciju nanočestice sa rastvaračem (vodom), ili ih učiniti otpornim na promene u aciditetu u ekstracelularnoj tečnosti.

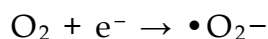
Takođe jedna od prednosti upotrebe nanočestica gvožđa i oksida gvožđa u terapiji tumora je činjenica da je moguće napraviti nanočestice veoma malog dijametra (manjeg od 20 nanometara) koje veoma lako prolaze različite barijere poput krvno-moždane barijere (Paunovic et al. 2020). Ovo omogućava primenu magnetne hipertermije kod solidnih tumora centralnog nervnog sistema. Takođe, za razliku od konvencionalnih citostatika, ovako

male magnetne nanočestice lako i brzo prodiru kroz sve delove kancerskog tkiva, i njihova distribucija u tkivu je relativno ravnomerna (citostatik često deluje samo na spoljne delove tumora dok je njegova koncentracija u unutrašnjosti znatno manja).

Oksidativni stres predstavlja jednu od najaktuelnijih tema u savremenoj molekularnoj medicini i danas u svetu postoji veliki broj laboratorija koje su specijalizovane isključivo za izučavanje ovog fenomena. Skoro da ne postoji bolest, a da oksidativni stres nije bar jednom predložen kao potencijalni deo patofiziološkog mehanizma njenog nastanka. Unosom termina „oxidative stress“ u PubMed bazu podataka, dobija se skoro 250 000 rezultata u vidu originalnih radova, revijskih radova i drugih publikacija (Zhu et al. 2019; Zimmer et al. 2020). Nema sumnje da je oksidativno oštećenje ćelija posledica dejstva brojnih fizičkih, hemijskih i bioloških faktora, poreklom kako iz spoljne sredine, tako i iz unutrašnjosti ćelije (Zulato et al. 2018; Ziv et al. 2020). Takođe, činjenica je da on često može pokrenuti veliki broj signalnih puteva u citoplazmi i jedru ćelije, koji mogu dovesti do programirane ćelijske smrti, autofagije, a u nekim slučajevima i maligne transformacije. Ipak, treba uvek imati u vidu da je oksidativni stres samo jedan od brojnih mehanizama ćelijskog oštećenja i da njegova uloga i značaj u fiziološkim i patološkim procesima znatno varira od situacije do situacije (Marine et al. 2018; Aljobaily et al. 2020).

Da bismo razumeli šta je oksidativni stres, potrebno je prvo objasniti pojam „slobodni kiseonični radikal“. Slobodni kiseonični radikali (Reaktivne vrste kiseonika, engl. Reactive oxygen species) su molekuli visokog stepena reaktivnosti koji nastaju kao posledica tendencije kiseonika da primi elektron, kao i hemijskim reakcijama koje nastaju kao posledica. Tri najznačajnija slobodna kiseonična radikala su superoksidni anjon, vodonik peroksid i hidrosilni radikal (Madkour et al. 2020; Schmidt et al. 2021).

Kada molekul kiseonika prihvati jedan elektron, nastaje superoksidni anjon:



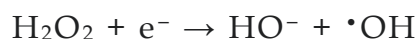
Superoksidni anjon može reagovati sa vodonikovim jonom, pri čemu nastaje vodonik peroksid:



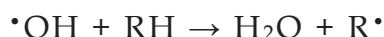
Vodonik peroksid može dalje da reaguje sa elektronom, odnosno da se redukuje na dva načina. Prvo, u prisustvu vodonikovih jona, moguće je da dođe do neutralizacije i stvaranja vode:



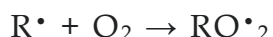
Manje povoljna opcija po ćeliju uključuje reakciju sa jednim elektronom, bez vodonikovog jona:



Na ovaj način se stvara hidroksilni radikal, veoma reaktivan i citotoksičan. Ovaj molekul može u kontaktu sa velikim brojem jedinjenja i njih same ponekad da pretvori u slobodne radikale i na taj način se potencijal za izazivanje oštećenja povećava. Kod nekih jedinjenja, sposoban je da ukloni vodonikov atom pri čemu se stvara takozvani alkil radikal koji je sposoban da ulazi u dalje reakcije (Madkour et al. 2020; Schmidt et al. 2021):

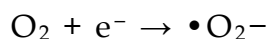


Alkil radikal dalje često se sjedinjuje sa molekulom kiseonika formirajući peroksi radikal:



Prethodne dve reakcije su karakteristične za volatilna organska jedinjenja (engl. volatile organic compounds), odnosno supstance koje imaju relativno malu tačku ključanja (manju od 250°C) i visoke vrednosti pritiska kada se nađu u gasovitom agregatnom stanju. Volatilna organska jedinjenja se često nalaze u atmosferi, ponekad se svrstavaju u komponente zagađenog vazduha, ali prisutna su takođe i u živim organizmima gde obavljaju razne fiziološke a ponekad i patološke uloge (Madkour et al. 2020; Schmidt et al. 2021).

Slobodni kiseonični radikali se proizvode tokom nekoliko važnih fizioloških procesa, od kojih je možda najvažniji oksidativna fosforilacija u mitohondrijama. Tokom oksidativne fosforilacije na unutrašnjoj membrani mitohondrije dolazi do transfera protona (jona vodonika) i elektrona, odnosno elektroni prelaze sa jednog proteina na drugi. Ovo se dešava sa ciljem konverzije energije u ATP, takozvanu „energetsku monetu“ organizma. Krajnje odredište za elektrone je molekul kiseonika, pri čemu se kiseonik pretvara u vodu. Ovaj proces nije potpuno efikasan, čak ni u optimalnim uslovima, jer (relativno mali) deo kiseonika reaguje sa elektronom na način da se stvara superoksidni anjon:



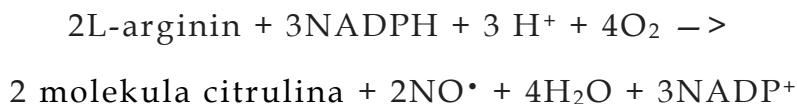
Drugi važan izvor slobodnih kiseoničnih radikala u fiziološkim uslovima su ćelije imunskog sistema koji radikale koriste u cilju borbe protiv mikroorganizma. U njima postoji poseban enzimski kompleks, NADPH oksidaza (engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase) koji je odgovoran za katalisanje ove reakcije (Kim et al. 2021). Glavni radikal koji se stvara je superoksidni anjon koji nastaje tako što NADPH reaguje sa dva molekula kiseonika. Pored dva superoksidna anjona, u ovoj reverzibilnoj reakciji nastaje NADP<sup>+</sup> i jedan jon vodonika:



Superoksidni anjon dalje može reagovati sa vodonik peroksidom kao što je ranije opisano, pri čemu nastaje hidroksilni radikal. Vodonik peroksid

sam po sebi može nastati iz superoksidnog anjona uz pomoć enzima mijeloperoksidaze ili superoksid dismutaze.

Osim toga, u imunskim ćelijama, često je stvaranje slobodnog radikala poreklom iz NADPH koji može i ne mora da bude deo metabolizma kiseoničnih reaktivnih molekula. To je azot monoksidni radikal koji nastaje na sledeći način:



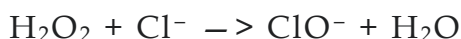
Ova forma azot oksida može nezavisno ispoljavati svoje toksične efekte na razne biološke molekule a može zajedno sa azot oksidom izgraditi takođe relativno toksičan peroksinitritni anjon (strukturni izomer nitrata koji se ponaša kao oskidans):



Ovu reakciju katališe kalcijum nezavisna, inducibilna sintaza azot oksida (engl. Inducible nitric oxide synthase, iNOS) koja se aktivira posredstvom interleukina 1 (IL-1), tumor nekrosis faktora alfa (TNF $\alpha$ ), interferona gama (IF $\gamma$ ), i ostalih citokina i hemijskih medijatora (Kondo et al. 2021).

Peroksinitritni anjon može dovesti do oštećenja ćelijske membrane, nukleinskih kiselina, kao i velikog broja proteina. Rezultat je često smrt ćelije u obliku nekroze ili apoptoze. Baktericidni efekti su posledica ili direktnog dejstva ovog molekula, ili indirektnog delovanja preko Fentonove reakcije pri čemu nastaje gvožđe u jonskom obliku. Takođe, ovaj anjon ima tendenciju da reaguje sa cisteinskim nastavcima u proteinskoj strukturi (proteini u bakterijama često u sebi imaju ovakvu strukturu), što dovodi do cisteinke oksidacije i oštećenja tercijerne strukture i gubitka funkcije proteina (bakterijskog enzima ili kanala) (Madkour et al. 2020; Schmidt et al. 2021).

U pojedinim imunskim ćelijama, poput neutrofilnih granulocita, slobodni kiseonični radikali mogu delovati antibakterijski na još jedan indirektni način: proizvodnjom hipohloraste kiseline. Hipohlorasta kiselina se stvara reakcijom vodonik peroksida i hloridnog anjona (vodonik peroksid često prethodno nastane sjedinjavanjem dva superoksidna anjona i jona vodonika, kao što je prethodno navedeno):



Ovu reakciju katališe enzim mijeloperoksidaza u neutrofilima (Raskovalova et al. 2021). Anjon hipohloraste kiseline ima veoma izražena antibakterijska svojstva, a sam po sebi je netoksičan za normalne ćelije organizma, što ga čini idealnim dezinficijansom. Za razliku od slobodnih kiseoničnih radikala, ne oštećuje nukleinske kiseline ćelija, pa samim tim ne ispoljava ni mutagena ni kancerogena svojstva.



Gore navedeni molekuli sa antibakterijskim dejstvima se uglavnom stvaraju u organelama lizozomima u fagocitima, odnosno u takozvanim fagolizozomima tokom procesa varenja fagocitovanih mikroorganizama. Na membrani fagolizozoma nalaze se brojni hlorni i vodonikovi kanali koji omogućavaju ulazak ovih jona iz citoplazme u organelu. Takođe na membrani su aktivni brojni enzimi, poput već navedene mijeloperoksidaze, NADPH oksidaze 2 (Nox2) i sintaze azot oksida. NADPH oksidaza 2 je kao što je prethodno naznačeno odgovorna za proizvodnju superkosidnog anjona, a sintaza azot oksida obezbeđuje dovoljne količine azotnog oksida radi kasnijeg formiranja peroksinitritnog anjona (Madkour et al. 2020; Schmidt et al. 2021).

Stvaranje slobodnih kiseoničnih radikala radi borbe protiv mikroorganizama je karakteristično za neurofilne granulocite i makrofage, odnosno ćelije koje su po svojoj prirodi fagociti. Kod limfocita je ovaj proces izražen u mnogo manjoj meri, mada nije isključeno da kod njih slobodni radikali učestvuju u nekom od signalnih puteva koji potencijalno dovode do modulacije enzimske aktivnosti tokom stvaranja antitela. Kod fagocitima, monociti i makrofagi takođe imaju značajno manju brzinu stvaranja slobodnih radikala, i ta brzina je pod velikim uticajem citokina poput IL 1 i IF $\gamma$  (Nathan & Cunningham-Bussel, 2013; Zhong et al. 2021).

U neutrofilnim granulocitima, posebno važan enzim koji reguliše stvaranje slobodnih kiseoničnih radikala je već pomenuta mijeloperoksidaza (Siraki, 2021). Ona može da učestvuje u stvaranju vodonik peroksida i hipohloraste kiseline samo uz prisustvo hema kao kofaktora. Ovaj enzim katalizuje i još neke potencijalno važne reakcije poput oksidacije nekih aminokiselina. Posebno je važna oksidacija tirozina uz pomoć vodonik peroksida u tirozil radikal. Tirozil radikal takođe ispoljava toksični efekat na membranu i intraćelijske komponente bakterija.

U normalnim uslovima, postoji ravnoteža između stvaranja slobodnih kiseoničnih radikala i sposobnosti organizma da te radikale modifikuje, ukloni ili popravi oštećenja koja oni izazivaju. Kada se ova ravnoteža poremeti u smeru slobodnih radikala, nastaje oksidativni stres. Smatra se da veliki broj bolesti nastaje kao posledica dugotrajnog oksidativnog stresa u pojedinim organima i tkivima, ili da oksidativni stres predstavlja barem doprinoseći činilac u njihovom razvoju. Neke od ovih bolesti su koronarna bolest kao posledica ateroskleroze, neka maligna oboljenja, bolesti jetre i bubrega, plućne bolesti kao i Parkinsonova bolest i drugi neurološki poremećaji (Santini et al. 2020).

Nivo oksidativnog stresa u tkivu se može meriti na različite načine. Iako je u brojnim biološkim uzorcima moguće izmeriti koncentraciju superoksidnog anjona, vodonik peroksida i hidrosilnog radikala, ovo je u većini slučajeva nije praktično, takođe nije potrebno, i zahteva specifična znanja i finansijska sredstva, barem kada su u pitanju živi sistemi (ćelija, tkiva). Umesto toga, većina istraživača danas meri indirektne pokazatelje oksidativnog oštećenja i na taj način se zaključuje o prisustvu i koncentraciji reaktivnih kiseoničnih jedinjenja, i drugih slobodnih radikala (Madkour et al. 2020; Schmidt et al. 2021).



Pošto slobodni radikali oštećuju nukleinske kiseline, proizvodi ove interakcije su potencijalno dobar parametar prisustva radikala u ćeliji. Kada je u pitanju DNK, 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) (Tirri et al. 2021) je verovatno najsenzitivniji indikator, i danas postoje brojni bioeseji i druge metode za njegovo određivanje. Neki autori smatraju da je ovaj molekul najznačajniji pokazatelj DNK oštećenja tokom oksidativnog stresa, mada je danas najveći broj publikacija fokusiran na parametre poput onih koji nastaju oštećenjem ćelijske membrane.

Proteinska karbonilacija i proteinska nitracija su takođe procesi koji se dešavaju kao posledica prisustva slobodnih kiseoničnih radikala. Ovo je naročito prisutno u tkivima bogatim proteinima poput vezivnog tkiva. Ukupna koncentracija proteinskih karbonilnih jedinjenja je takođe jedna od istraživačkih strategija merenja oksidativnog stresa. Ovakve metode su po svojoj prirodi kvantitativne i mogu biti fluorometrijske, kao i zasnovane na ELISA tehnici i tehnici vestern blota. Kao reagens se često koristi 2,4-dinitrofenilhidrazin (Burcham, 2017). Ove metode se odlikuju relativno visokim stepenom senzitivnosti, i veoma su važne kada želimo da procenimo stepen ukupnog proteinskog oštećenja kao posledica dejstva reaktivnih jedinjenja poput hidroksilnog anjona.

Sledeći način za procenu oksidativnog statusa i oksidativnog stresa u tkivima je merenje parametara lipidnog oštećenja. U kontaktu reaktivnih kiseoničnih radikala sa lipidima (naročito membranama pošto se one sastoje od lipidnog dvosloja) dolazi do lipidne peroksidacije. Tokom peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina, nastaje jedinjenje malondialdehid (engl. Malondialdehyde, MDA), koji se može kvantifikovati u uzorcima. Za kvantifikaciju se koriste supstance reaktivne na tiobarbiturnu kiselinu (engl. thiobarbituric acid reactive substances, TBARS). Tokom reakcije malondialdehida i TBARS supstanci oslobađaju se jedinjenja crvene boje, koja se može meriti kolorimetrom. Jedna od prednosti ove metode je to što je brza, efikasna, i ne zahteva puno resursa. Mana metode je činjenica da mnoga druga jedinjenja u ćeliji, koja ne moraju imati veze sa oksidativnim stresom, mogu reagovati sa TBARS, i na taj način dovesti do lažno pozitivnog nalaza ili rezultata koji ukazuje da je oksidativno oštećenje veće nego što je u stvarnosti (Katerji et al. 2019; Lambadiari et al. 2021; Turan & Şimşek. 2021).

Alternativa merenju malondialdehida bi bilo određivanje drugih jedinjenja koja nastaju tokom procesa lipidne peroksidacije poput 8-izo-prostaglandina F<sub>2</sub>α (8-iso-prostaglandin F<sub>2</sub>α, 8-iso-PGF<sub>2</sub>α). Ovaj marker nastaje kao posledica interakcije slobodnih kiseoničnih radikala sa arahidonskom kiselinom (prisutnom u membranama ćelija). Prednost ove metode je što je preciznija od one sa malondialdehidom i moguće je izvršiti određen stepen automatizacije pri radu (obrađivanje velikog broja uzoraka u kratkom vremenskom periodu). Mana metode je što zahteva upotrebu masene spektrometrije i hromatografije (engl. rapid ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry) koja zahteva

komplikovanu i skupu laboratorijsku opremu i osposobljenost istraživača za rad na njoj (Katerji et al. 2019).

Treba istaći da direktno merenje koncentracije slobodnih radikala u pojedinim biološkim uzorcima, ne samo da je moguće, već se odlikuje potencijalno većim stepenom senzitivnosti u detekciji oksidativnog stresa. Na primer, danas postoje različite fluorescentne probe za reaktivna jedinjenja kiseonika, poput 5-6-karboksi-2,7-dihlorodihidrofluorescein diacetata (engl. 5-6-carboxy-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFDA). Ova proba nakon prolaska kroz ćelijsku membranu i intracelularne modifikacije interaguje sa vodonik peroksidom pri čemu nastaje 2,7-dihlorofluorescein koji emituje fluorescentni signal na specifičnim talasnim dužinama (Katerji et al. 2019). Činjenica je da većina laboratorija koristi indirektno metode, naročito parametre lipidne peroksidacije prevashodno zbog jednostavnosti i pristupačnosti. Međutim kada su u pitanju prvenstveno metodološka istraživanja gde se insistira na senzitivnosti merenja, direktne metode imaju svoje prednosti.

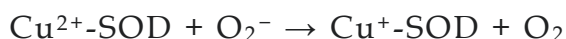
Još jedan, ne manje važan način procene oksidativnog statusa i oksidativnog stresa u tkivu je merenje koncentracije i aktivnosti antioksidanasa i enzima koji imaju antioksidativnu aktivnost. Danas postoje testovi koji su sposobni da izmere totalni antioksidativni kapacitet (engl. total antioxidant capacity). Oni se zasnivaju na mogućnosti kvantifikacije sposobnosti uzorka da spreči proces oksidacije i da ukloni slobodne kiseonične radikale i druga jedinjenja koja imaju oksidativni potencijal (Rubio et al. 2016). Jedan od najčešće korišćenih ovakvih testova je Trolox (engl. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid assay), ili Trolox ekvivalent antioksidativni kapacitet (engl. Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC assay). Test se zasniva na sposobnosti uzorka da redukuje ABTS radikal (2,2'-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid) pri čemu dolazi do promene boje rastvora koja se može kolorimetrijski meriti. Ovaj test je veoma koristan za merenje antioksidativne sposobnosti plazme, zbog sposobnosti da indirektno kvantifikuje aktivnost albumina, vitamina C i vitamina E (Rubio et al. 2016).

Još jedan koristan test za određivanje totalnog antioksidativnog kapaciteta uzorka je FRAP test (engl. Ferric reducing ability of plasma). Test je dizajniran tako da detektuje promene u boji rastvora (takođe kolorimetrijski) koja nastaje zbog redukcije feri-tripiridiltriazin ( $Fe^{3+}$ -TPTZ) kompleksa u fero oblik tripiridiltriazina ( $Fe^{2+}$ -TPTZ). Verovatno najvažiji biološki antioksidans koji dovodi do ove redukcije je mokraćna kiselina, a u manjoj meri i vitamin C i vitamin E (Rubio et al. 2016).

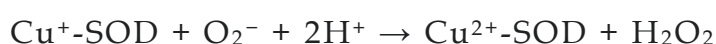
U principu, antioksidativni status nekog uzorka se danas najčešće određuje ili merenjem aktivnosti značajnih antioksidativnih enzima, ili merenjem koncentracije malih antioksidativnih molekula, koji sami po sebi nisu enzimi već direktno neutrališu slobodne radikale. Kad su u pitanju enzimi, posebno se ističu njih četiri: superoksid dizmutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx) i glutation S transferaza (GST).

Prisustvo slobodnih radikala nažalost nije jedini faktor koji aktivira ove enzime, stoga radi procene oksidativnog stresa, potrebno je meriti i još neki parametar oštećenja tkiva poput malondialdehida (MDA) (Leskova, 1999; Chistiakov et al. 2002).

Superoksid dismutaza je jedan od najznačajnijih detoksikacionih enzima u ljudskom organizmu (Leskova, 1999; Chistiakov et al. 2002). Kao što joj samo ime kaže, ona katališe dismutaciju, odnosno razgradnju superoksidnog anjona. Za celu reakciju neophodan je jon bakra koji se u reakciji redukuje pri čemu dolazi do oksidacije superoksida:



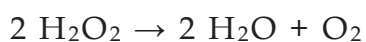
Moguća je i druga reakcija pri čemu se bakar oksiduje, a superoksidni anion redukuje:



Bakar nije jedini metal koji može biti vezan za superoksid dismutazu. Drugi metali poput cinka i mangana takođe mogu na ovaj način da se oksiduju ili redukuju.

Superoksid dismutaza je naročito značajna u tkivu jetre gde se obavljaju različiti biohemijski procesi uključeni u metabolizam ugljenih hidrata, masti i proteina. Neki enzimi uključeni u ciklus limunske kiseline poput akotinaze su posebno osetljivi na dejstvo superoksida, i bez ovog enzima bi brzo bili inaktivisani, što bi zaustavilo proces stvaranja ATP i dovelo do smrti ćelije bilo u vidu apoptoze ili nekroze (Madkour et al. 2020; Schmidt et al. 2021).

Katalaza je još jedan važan enzim sposoban da makar delimično neutrališe štetno dejstvo slobodnih kiseoničnih radikala u organizmu (Parihar et al. 2017). Prisutan je ne samo kod čoveka, već i kod velikog broja životinjskih vrsta, i odlikuje se velikom efikasnošću i brzinom (broj slobodnih radikala koje može da neutrališe u jedinici vremena). Dejstvo katalaze u telesnim tečnostima se može primetiti čak i golim okom: u kontaktu sa vodonik peroksidom dolazi do formiranja mehurića, zbog njegove razgradnje i oslobađanja kiseonika:

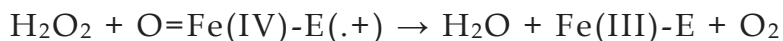


Ovo se može videti kada vodonik peroksid dođe u kontakt sa tkivom i tečnostima poput krvi, gnoja, uzorcima raznih ćelijskih kultura i mikroorganizama.

Za normalno funkcionisanje katalaze, neophodan je jon gvožđa koje je u sastavu hem grupe kao deo samog enzima (E). Tokom reakcije sa vodonik peroksidom dolazi do oksidacije gvožđa, i na taj način nastaje O=Fe(IV)-E(.+) kao relativno nestabilni intermedijer:

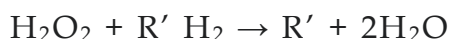


Zatim dolazi do reakcije sa još jednim molekulom vodonik peroksida pri čemu nastaje kiseonik u vidu gasa i inicijalno, relativno stabilno jedinjenje sa enzimom u kome se gvožđe nalazi u Fe(III) obliku:



Fe(III)-E jedinjenje se može dalje ponovo koristiti za neutralizaciju drugih molekula vodonik peroksida. S obzirom da se enzim na ovaj način „ne troši“ i ne razgrađuje, reakcija neutralizacije se može ponavljati više hiljada, a možda i više miliona puta što čini katalazu jednim od najefikasnijih enzima u ljudskom organizmu.

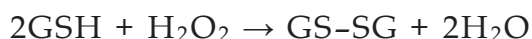
Najveće koncentracije enzima aktalaze su prisutne intracelularno, u organelama peroksizomima. Peroksizomi su izuzetno važni za normalno odvijanje metaboličkih osidativnih procesa, poput beta oksidacije polinezasićenih masnih kiselina. Katalaza u ovim organelama pored ostalog, koristi vodonik peroksid za oksidaciju potencijalno toksičnih supstanci tako što uklanja H<sub>2</sub> nastavak:



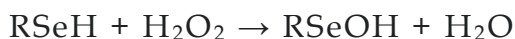
Na ovaj način katalaza ostvaruje dvostruki protektivni efekat. Vodonik peroksid se redukuje i nastaje voda. Međutim, možda još važnije od toga, toksično jedinjenje se oksiduje što ga ponekad u potpunosti neutrališe, a ponekad ga pretvori u manje toksičnu formu. Primer bi bio alkohol koji se u jetri tokom ovog i drugih procesa pretvara u acetaldehid. Mnogi fenoli, toksična aromatična jedinjenja, i toksični metaboliti pojedinih supstanci mogu na ovaj način da se oksiduju. Jetra je primarno mesto obavljanja ovih reakcija (u manjoj meri i bubreg), a hepatociti su najvažnija ćelijska populacija u ovom procesu.

Još jedan važan enzim sa antioksidativnim dejstvom je glutation peroksidaza (Madkour et al. 2020; Schmidt et al. 2021). Ovo u stvari nije jedan enzim već je u pitanju cela familija enzima, koja koristi glutation u cilju redukcije jedinjenja sa oksidativnim potencijalom. Danas se zna za 8 različitih varijanti glutation peroksidaze označenih brojevima od 1 do 8. Na primer, glutation peroksidaza 1 (GPx1) je prisutna u skoro svim tkivima dok su druge varijante u nekim slučajevima specifične za neko tkivo ili sistem organa (npr. gastrointestinalni trakt u kome ima posebno puno glutation peroksidaze 2 - GPx2). Selen je najvažniji metal koji se nalazi u većini varijanti. Njegova uloga tokom procesa oksidacije, redukcije i detoksikacije štetnih materija još uvek nije dovoljno izučena, ali smatra se da nedostatak selena značajno može smanjiti aktivnost enzima u pojedinim tkivima (Schmidt et al. 2021; Madkour et al. 2020).

Najvažnija reakcija koju glutation peroksidaza katališe je reakcija glutationa sa vodonik peroksidom. Pri ovoj reakciji nastaje glutation disulfid i dva molekula vode:



Moguća uloga selena u ovom procesu se zasniva na njegovoj sposobnosti da se oksiduje u formi selenske kiseline:



Glutation redukuje selen na njegovo prvobitno stanje pri čemu se glutacion oksiduje u glutacion disulfid. Zalihe redukovanog glutaciona se obnavljaju prevashodno dejstvom enzimaglutation reduktaze uz pomoć NADPH i jona vodonika:



Glutation peroksidaza sama po sebi, nije vitalni enzim, odnosno u slučaju njegovog nedostatka, drugi antioksidativni enzimi mogu da kompenzuju smanjenu redukciju vodonik peroksida. Ipak, danas postoje dokazi da smanjena aktivnost glutacion peroksidaze može biti povezana sa nastankom brojnih hroničnih nezaraznih bolesti, pogotovu onih asociranim sa procesom starenja (Shifrin et al. 1997; Hambright et al. 2017).

Još jedan važan enzim koji koristi glutacion u cilju ostvarivanja antioksidativnih efekata je glutacion S-transferaza (Andújar-Sánchez et al. 2015). Ovo je takođe relativno velika familija enzima podeljena na nekoliko klasa. Neke klase su prisutne u citosolu ćelija dok su neke aktivne u organelama poput mitohondrija. Jedna od osnovnih funkcija ovog enzima je da omogućava dejstvo glutaciona na elektrofilne centre raznih organskih peroksida, ali i drugih potencijalno toksičnih jedinjenja (ksenobiotika). Kod lipofilnih ksenobiotika, glutacion S-transferaza katališe konjugaciju sa glutacionom. Ovaj proces se obavlja u jetri i bubregu i občno predstavlja deo takozvane druge faze detoksikacije (prva faza je modifikacija kroz oksidaciju, redukciju i hidrolizu). Nakon ove faze, po potrebi sledi treća faza u kome se konjugati ksenobiotika dodatno metabolišu kako bise učinili hidrosolubilnim. Završni korak predstavlja, sledi proces ekskrecije putem bubrega.

Kao što je gore pomenuto, enzimi sa antioksidativnim dejstvom su od izuzetne važnosti za normalno funkcionisanje organizma, i u njegovoj borbi protiv oksidativnog stresa i oštećenja koje je njegova posledica (Madkour et al. 2020; Schmidt et al. 2021). Nedostatak ili disfunkcija ovih enzima može biti urođena, pa tako postoje ljudi koji imaju prirodno smanjenu aktivnost katalaze. Takođe smanjena aktivnost nekog od ovih enzima može biti i stečena, zbog dejstva nekog spoljašnjeg hemijskog ili biološkog agensa. Na primer, bakar i neki drugi metali u većim koncentracijama se mogu ponašati kao nekompetitivni inhibitori katalaze. Ovo urođeno ili stečeno smanjenje funkcije enzima može u pojedinim slučajevima proći bez značajnih posledica po zdravlje, zato što drugi enzimi mogu donekle da kompenzuju nedostatak. Ipak, pojedini autori napominju da je smanjena aktivnost ovih enzima povezana sa razvojem velikog broja patoloških stanja i bolesti koja u osnovi nastaju kao posledica oksidativnog oštećenja genetskog materijala ćelije. Od velikog značaja u fundamentalnim medicinskim istraživanjima je postojanje

biohemijskih tehnika za merenje njihove koncentracije i aktivnosti jer se tako stiče uvid u brojne fiziološke i patofiziološke mehanizme u organizmu (Madkour et al. 2020; Schmidt et al. 2021).

Jetra je aksesorni organ digestivnog sistema i vitalni organ u ljudskom organizmu odgovoran za veliki broj funkcija. Prosečna težina jetre iznosi 1,5 kilogram što je čini najtežim unutrašnjim organom. Anatomski je podeljena na četiri lobusa: levi, desni, repati (kaudatni, lobus caudatus) i četvrtasti (lobus quadratus). Vaskularizacija jetre se značajno razlikuje u odnosu na druge unutrašnje organe. Krv u jetru ulazi preko portne vene (vena porte) i hepatične arterije (arteria hepatica propria). Portna vena ima veoma velike vrednosti protoka krvi, oko 1,2 litara za jedan minut i procenjuje se da je odgovorna za 80% snabdevanja. Razlog za ovako veliki krvni priliv je činjenica da skoro celokupne hranljive i druge materije (npr. toksini) koji se apsorbuju u tankom i debelom crevu odlaze na ovaj način u jetru gde se obavlja značajan deo njihovog metabolizma i eventualne detoksikacije. Potpuno otkazivanje jetre (hepatična insuficijencija) se po pravilu završava smrtnim ishodom, osim u slučaju kada usledi transplantacija (Muriel, 2017; Arias et al 2020).

Jetra nije samo odgovorna za digestivne funkcije (stvaranje žuči) i detoksikacione procese u organizmu. Značajan deo metabolizma ugljenih hidrata, masti i aminokiselina se odvija u ovom organu. Na primer, u jetri se stvara i deponuje velika količina glikogena koji je svojevrsni „pufer“ za glukozu i na taj način se nivo glukoze u krvi održava u fiziološkom opsegu (Muriel, 2017; Arias et al 2020). U jetri (i delom u bubrezima) se obavlja ponovno stvaranje glukoze iz laktata, piruvata i aminokiselina, kroz proces glukoneogeneze. Takođe stvaranje lipoproteina, nosača za holesterol i lipide, kao i dobar deo beta oksidacije masne kiseline i sinteze holesterola obavlja se u ovom organu pod dejstvom brojnih enzima.

Jetra je odgovorna za sintezu skoro svih albumina u krvi, i na taj način daje ključan doprinos održavanju koloidno-osmotskog (onkotskog) pritiska krvi (Feldman et al. 2016). Kod hepatične insuficijencije nastaju periferni edemi, pored ostalog i zbog hipoalbuminemije i rezultujućeg pada ovog pritiska (što dovodi do prelaska tečnosti iz krvi u intersticijum). Albumini su pored održavanja ovog pritiska odgovorni za brojne druge funkcije krvi, poput transportne uloge za razne hormone (npr. hormone štitaste žlezde), faktore rasta, masne kiseline, hemijske medijatore i lekove (Feldman et al. 2016).

Jetra je takođe mesto sinteze fibrinogena, ključnog proteina za proces koagulacije krvi. Takođe, brojni faktori koagulacije kao što su II, V, VII, IX, X, XI i XII se ovde sintetišu. Isto se odnosi i za protein C, protein S i antitrombin, kao i trombopoetin, glavni hormon koji utiče na stvaranje trombocita u kostnoj srži. U slučaju hepatične insuficijencije, proces koagulacije i hemostaze su značajno kompromitovani. Jetra je takođe i značajan rezervoar krvi, odgovorna je za skladištenje oko 10 procenata ukupnog krvnog volumena (oko 500 mililitara) koji se po potrebi može

mobilisati (u slučaju gubitka ili preraspodele u mišiće tokom fizičke aktivnosti) (Feldman et al. 2016).

Jetra je svojevrsno skladište velikog broja vitamina, minerala, hormona i hemijskih medijatora (Feldman et al. 2016). Ovo se naročito odnosi na liposolubilne vitamine: vitamin A (depo koji može da traje par godina), vitamin D (nekoliko meseci), vitamin E i vitamin K. Od vitamina B kompleksa, posebno je potrebno istaći vitamin B12, koji se skladišti u količinama dovoljnim za višegodišnju rezervu. Za ovu disertaciju, od posebne je važnosti činjenica da jetra predstavlja depo gvožđa i prekomerno opterećenje gvožđem može izazvati značajno oštećenje na ćelijskom i tkivnom nivou (Muriel, 2017; Arias et al 2020).

Jetra ima i značajne uloge u imunskom sistemu. Mononuklearni fagocitni sistem (retikuloendotelijalni sistem) jetre je veoma razvijen, sastoji se od velikog broja aktivnih ćelija, koje su angažovane u uklanjanju toksičnih supstanci i mikroorganizama koji ulaze u krv iz tankog i debelog creva. Kupferove ćelije (Kupffer-Browicz ćelije, stelatni makrofagi) su verovatno druga po značaju ćelijska populacija, odmah posle hepatocita. Ovaj sistem je veoma kompleksan i na različite načine komunicira sa ostalim delovima imunskog sistema, onosno limfatičnim organima, poput slezine i limfnih čvorova. Jetra je odgovorna za proizvodnju velike količine limfe: pretpostavlja se da više od polovine limfe se stvara u njenom tkivu. Uz to, veliki broj enzima važnih za normalno funkcionisanje imunskih ćelija (poput gore pomenute katalaze) se sintetiše i oslobađa u ovom organu (Muriel, 2017; Arias et al 2020).

Detoksifikacioni procesi u jetri se konstantno obavljaju, i ovo se ne odnosi samo na iz spoljašnje sredine unete otrove, već i na potencijalno toksične supstance koje se prirodno stvaraju u organizmu. Tako na primer veliki deo amonijaka koji se stvara u crevima (od strane normalne bakterijske flore) mora na ovaj način da bude deaktivisan, jer bi u suprotnom došlo do katastrofalnog toksičnog oštećenja centralnog nervnog sistema. U slučaju čak i delimične hepatične insuficijencije mnogi lekovi u svojim normalnim, terapijskim koncentracijama mogu postati toksični. Na kraju, treba istaći da se veliki broj hormona, poput insulina, razgrađuje i inaktivira u jetri, i u slučaju njene disfunkcije dolazi do značajnih poremećaja u celokupnom endokrinom sistemu (Feldman et al. 2016).

Osnovna morfološka i funkcionalna jedinica jetre je lobulus. Lobulus se sastoji od nekoliko miliona hepatocita koji su organizovani u obliku šestougaoih ploča, a više lobulusa je međusobno razdvojeno vezivnim tkivom (Feldman et al. 2016). Kroz centar lobulusa prolazi centralna vena (vena centralis), a na granici 3 lobulusa se nalazi portalna trijada koja se obično sastoji od pet komponenti: arterija hepatica propria, hepatična portalna vena, žučni kanalići (jedan ili dva), limfni sudovi i grane vagusa (Feldman et al. 2016). Krv nakon ulaska u lobulus prolazi kroz sistem sinusoidalnih kapilara. Ovi kapilari, za razliku od običnih kapilara, većeg su dijametra i zapremine, i nemaju kontinuirani endotelni sloj. U

sinusoidalnim kapilarima dolazi do mešanja krvi koja je poreklom iz portalnog sistema (dovodi hranljive materije i toksine iz digestivnog trakta) i krvi poreklom iz hepatične arterije koja je bogata kiseonikom. Dezoksigenisana i detoksikovana krv iz kapilara odlazi u centralnu venu, a zatim u hepatičnu venu (Feldman et al. 2016).

Najbrojnija i najvažnija ćelijska populacija jetrinog parenhima su hepatociti, koji čine više od dve trećine svih ćelija. Hepatociti, zbog svoje veličine, zauzimaju još veći udeo u ukupnoj zapremini tkiva. Ostale značajne ćelije su Kupferove ćelije, sinusoidalne endotelne ćelije, hepatične stelatne ćelije i različite ćelije imunskog sistema poreklom iz krvi. Sinusoidalne endotelne ćelije jetre (engl. liver sinusoidal endothelial cells, LSEC), za razliku od običnih endotelnih ćelija imaju specifičnu morfologiju i funkcije (Feldman et al. 2016). Nemaju strukturisanu bazalnu laminu, ali imaju veliki broj relativno krupnih pora ili fenestri kroz koje hranljive i druge materije ulaze u Disov prostor i dalje brzo difunduju ka hepatocitima. LSEC ćelije su suštinski deo retikuloendotelijalnog sistema i imaju značajnu ulogu u urođenoj, a možda i stečenoj imunosti. Na njihovoj površini nalaze se brojni receptori od kojih neki mogu da pokrenu signalne puteve uključene u proces inflamacije. Disfunkcija LSEC ćelija predstavlja značajan doprinoseći činilac razvoju procesa fibroze i ciroze hepatičnog tkiva. Pretpostavlja se da i mnoge druge, sistemske bolesti i stanja u svojoj patogenezi makar delimično uključuju poremećaje u radu ovih ćelija (Muriel, 2017; Arias et al 2020).

Hepatične stelatne ćelije (Ito ćelije, perisinusoidalne ćelije) su ćelije zvezdastog oblika locirane uglavnom u Disovim prostorima. Većina ih je u inaktivisanom stanju (engl. quiescent state), a nakon povrede ili toksičnog oštećenja jetre postaju aktivne i sekretuju brojne proteine ekstracelularnog matriksa. Danas se smatra da ove ćelije imaju ključnu ulogu u procesu formiranja ožiljaka i zamene jetrinog parenhima vezivnim tkivom nakon oštećenja. Na površini membrane imaju brojne receptore od kojih im neki omogućavaju komunikaciju sa nekim ćelijama imunskog sistema kao što su limfociti. Ito ćelije takođe funkcionišu kao svojevrsni depo vitamina A, provitamin A karotenoida i drugih jedinjenja koja su bitna za njegovu sintezu u fiziološkim uslovima (Feldman et al. 2016).

Kupferove ćelije (Kupfer-Brovic ćelije, stelatni makrofagi) su glavna populacija makrofaga jetre, locirani u sinusoidalnim kapilarima. Ameboidnog su oblika, velike i nepravilne površine sa brojnim pseudopodijama i mikrovilima. Imaju veoma kratak životni vek od samo nekoliko dana. Kao i svi drugi makrofagi, njihova osnovna funkcija je fagocitoza i delimično pinocitoza (za male čestice). Kupferove ćelije mogu internalizovati čestice različitog oblika i veličine od bakterija do delova celih ćelija poput drugih makrofaga i eritrocita (Muriel, 2017; Arias et al 2020). Kupferove ćelije, za razliku od klasičnih makrofaga (poreklom od monocita krvi) mogu da proliferišu u samom tkivu i na taj način održavaju i obnavljaju svoju populaciju. Ove ćelije mogu da stvaraju veliki broj citokina i hemijskih medijatora koje ponekad koriste za komunikaciju sa drugim



ćelijama imunskog sistema poput limfocita, monocita i neutrofilnih granulocita. Takođe, Kupferove ćelije proizvode značajne količine reaktivnih kiseoničnih radikala, poput vodonik peroksida i superoksidnog anjona koje koriste u borbi protiv raznih mikroorganizama (Muriel, 2017; Arias et al 2020).

Kao što je rečeno ranije, hepatociti predstavljaju najbrojniju i funkcionalno najznačajniju ćelijsku populaciju jetrinog parenhima. To su veoma velike ćelije i mogu imati dijametar od čak više od 150 mikrometara (u svrhu poređenja, dijametar eritrocita je od 7 do 8 mikrometara), mada njihova veličina značajno varira u zavisnosti od lokalizacije i aktivnosti. Citoplazma hepatocita je voluminozna, sa brojnim i velikim organelama od kojih su najznačajniji glatki endoplazmin retikulum i mitohondrije. Ponekad se u citoplazmi uočavaju strukture braon boje, koje se uglavnom sastoje od pigmenta lipofuscina (Feldman et al. 2016).

Bitna karakteristika hepatocita, po kojoj se razlikuju od većine drugih ćelija je velika količina glikogena u citoplazmi. Glikogen je polimer glukoze i u hepatocitu postoje enzimi koji ga sintetišu i razgrađuju u zavisnosti od potreba organizma za glukozom. Brojni hormoni regulišu proces sinteze i razgradnje glikogena (pa samim tim i njegovu količinu u hepatocitu) od kojih su najznačajniji insulin i glukagon. Hepatociti su stoga svojevrsni „pufer“ za glukozu koji održava glikemiju u fiziološkim granicama (3.9-6.1 mmol/L). Čak i kod standardnih bojenja, glikogen se može uočiti u vidu agregata, koji su veliki ako je jetra pre fiksacije bila izložena velikim količinama glukoze (Muriel, 2017; Arias et al 2020). Primer bi bilo tkivo jetre uzeto od laboratorijske životinje koja je pre žrtvovanja konzumirala obrok velike kalorijske vrednosti. Sa druge strane jetra laboratorijskih životinja koje su gladovale više dana pre žrtvovanja je takva da se u hepatocitima skoro uopšte ne mogu uočiti depoi glikogena. Glikogen se posebno dobro uočava kada se koristi histološka tehnika bojenja zvana „periodic acid-Schiff“ (PAS bojenje pri kome su depozitiglikogena ružičasto obojeni) (Muriel, 2017; Arias et al 2020).

Još jedna važna uloga hepatocita je stvaranje lipoproteina. Hepatociti u *in vivo* uslovima stvaraju u velikim količinama lipoproteine veoma male gustine (very low-density lipoprotein, VLDL), lipoproteine male gustine (low-density lipoprotein, LDL) i lipoproteine velike gustine (high-density lipoprotein (HDL). U laboratorijskim uslovima, moguće je relativno lako napraviti ćelijske kulture hepatocita koji su sposobni da u medijum sekretuju ove proteine. Samo prisustvo triglicerida u ekstracelularnoj tečnosti je važan faktor koji reguliše brzinu stvaranja lipoproteina, naročito VLDL. Imajući u vidu ovako značajnu ulogu hepatocita u metabolizmu masti i proteina, nije neobično što u svojoj citoplazmi imaju veoma razvijen i razgranat glatki i granulisani engoplazmastični retikulum. Takođe Goldžijev aparat je veoma velike zapremine što je očekivano imajući u vidu veliku sekretornu aktivnost ovih ćelija (Feldman et al. 2016).

## 5.5. Strukturna organizacija ćelijskog jedra i hromatina

Ćelijsko jedro je glavna regulatorna organela ćelije i mesto gde se nalazi najveći deo genetskog materijala (manji deo se nalazi u mitohondrijama). Jedro sadrži gene koji se sastoje od lanaca dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), od kojih su neki neaktivni, a neki se aktivno prepisuju u informacionu ribonukleinsku kiselinu, koja na ovaj način dobija informaciju o budućem polipeptidnom lancu koji će biti sintetisan u citoplazmi (Pollard et al. 2016; Alberts & Hopkin, 2019). Kod kičmenjaka, većina ćelija ima samo jedno jedro, mada postoje brojni izuzeci poput eritrocita (bez jedra), skeletnih mišićnih vlakana (po pravilu više jedara) ili hepatocita (jedno do dva jedra).

Jedro ima svoju ovojniciu (nuklearni omotač), koja se bitno razlikuje od membrane same ćelije. U njen sastav ulaze dve membrane sačinjene od lipidnog dvosloja. Spoljna membrana je faktički deo endoplazmnog retikuluma i zajedno sa njim čini jednu funkcionalnu celinu. Unutrašnji lipidni dvosloj je u bliskom kontaktu sa mrežom intermedijernih (prelaznih) filamenata koji se zovu lamini i preko njih je u komunikaciji sa genetskim materijalom. Ovi filamenti grade jedarnu laminu, specijalizovan omotač koji je pored ostalog odgovoran za strukturni integritet i oblik ćelijskog jedra (Chai et al, 2021; Sferra et al. 2021). Između spoljnog i unutrašnjeg lipidnog dvosloja jedarne ovojnice nalazi se perinuklearni prostor. Debljina ovojnice iznosi oko 30 nanometara, mada postoje značajne varijacije u zavisnosti od tipa ćelije.

Na jedarnoj ovojnici nalaze se brojni otvori koji se zovu jedarne pore. Sam dijametar otvora (kanala) je oko 5 do 10 nanometara. Ovo nisu obični kanali, već su deo mnogo složenije mreže proteina, koja se zove „kompleks jedarne pore“. Obično u ovom kompleksu postoji nekoliko stotina proteina i nekoliko desetina nukleoproteina koji su spolja u vezi sa endoplazminim retikulumom a unutra su u kontaktu sa jedarnom laminom. Broj jedarnih pora značajno varira između različitih ćelijskih populacija, kao i unutar same populacije u zavisnosti od transkripcione aktivnosti jedra, kao i faze ćelijskog ciklusa (Pollard et al. 2016; Alberts & Hopkin, 2019).

Razni proteini i kompleksi proteina, su vezani za spoljni ili unutrašnji lipidni dvosloj, i njihova uloga varira od održavanja strukturnog integriteta jedra do ubrzavanja transporta jedinjenja iz jedra u citoplazmu i obratno. Jedan od ovih kompleksa je takozvani LINC kompleks (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) koji predstavlja svojevrsni „most“ između hromatinske strukture i citoskeleta (Ostlund Folker et al. 2009; Chang et al. 2015). On je povezan sa oba lipidna dvosloja i njegovi domeni se vezuju za jedarnom laminom, mikrotupulskim filamentima, perinuklearnim prostorom, centromerom i drugim delovima citoskeleta. Smatra se da ima veliku ulogu tokom procesa mitoze i mejoze, tokom formiranja centrozoma i migracije hromozoma. Takođe, ova proteinska grupa učestvuje u formiranju jedarnih pora i održavanju njihove funkcionalnosti u fiziološkim uslovima.

Hromatin je kompleks velikog broja makromolekula i u njegov sastav, pored nukleinskih kiselina DNK i RNK ulazi veliki broj različitih proteina. Termin „hromatin“ je prvi uveo u 19. veku Valter Fleming, nemački biolog i osnivač citogenetike. Hromatin omogućava gusto pakovanje DNK molekula i na taj način veoma dugačak lanac DNK (dužine preko dva metra u prosečnoj diploidnoj ćeliji) se može uskladištiti u relativno malu zapreminu ćelijskog jedra. Ova gustina pakovanja i strukturna organizacija hromatina je još više fascinantna ako se ima u vidu da se u jedru stalno obavljaju različiti procesi transkripcije DNK za koje je neophodno da se DNK lanac „otpakuje“ u dovoljnoj meri kako bi postao dostupan enzimima (Pollard et al. 2016; Alberts & Hopkin, 2019).

Osnovni nivo hromatinske organizacije u eukariotama je nukleozom. Nukleozom se sastoji od segmenta DNK lanca koji je obmotan oko oktamera proteina koji se zovu histoni. Postoje četiri tipa histonskih proteina: H2A, H2B, H3, i H4. Hromatin jedra se sastoji od nekoliko desetina miliona nukleozoma, koji su međusobno povezani segmentom DNK koji se zove „linker“. Linker DNK je asocirana sa H1 histonskim proteinom (Willcockson et al. 2021; Yusufova et al. 2021). Ovakva repetitivna organizacija DNK i proteina na elektronskom mikroskopu podseća na „perle na koncu“ (engl. „beads on a string“) i tako se vrlo često opisuje u savremenoj literaturi.

H1 histon, osim što je deo spojnice između histona, ima veliku ulogu u stepenu kompakcije hromatina. Drugim rečima, stepen „uvijenosti“ nukleozoma, odnosno ugao pod kojim će jedna grupa nukleozoma biti postavljena prema drugoj, u određenoj meri zavisi od ovog proteina. U poređenju sa drugim histonima, H1 poseduje najveći stepen varijabilnosti u svojoj strukturi, kako između različitih životinjskih vrsta, tako i unutar jedne vrste. Takođe, H1 donekle stabilizuje DNK navoj oko histonske perle, odnosno sprečava njeno odmotavanje u fiziološkim uslovima (Vilema-Enríquez et al. 2020; Serna-Pujol et al. 2021).

Linker H1 histon je veoma dinamičan protein, i odlikuje se mnogo većim stepenom pokretljivosti u jedru u poređenju sa ostalim histonima. Velikom brzinom može prelaziti iz jednog hromatinskog regiona u drugi, za razliku od nukleozomske perle koja ostaje relativno stacionarna. Ovo je zaista neobična i nedovoljno izučena osobina H1 histona imajući u vidu da je istovremeno sastavni deo organizacione strukture hromatina (i grupe nukleozoma) i učestvuje u njegovoj stabilizaciji i očuvanju strukturnog integriteta. Dinamika H1 histona u jedru zavisi od mnogobrojnih faktora poput faze ćelijskog ciklusa, stepena fosforilacije i glikozilacije, aktivacije različitih signalnih puteva u jedri itd (Chaves-Arquero et al. 2018; Shakibapour et al. 2019).

Posttranslaciona modifikacija H1 histona je redovna pojava u jedru i takođe utiče na stepen njegovog afiniteta za razne hromatinske regione (Izquierdo-Bouldstridge et al. 2017; Bednar et al. 2017). Acetilacija i metilacija lizinom, kao i fosforilacija treoninom se veoma često dešavaju i moguće je da utiču na procese poput odgovora DNK na oštećenje (npr.

produkcima oksidativnog stresa, zračenjem itd.). Kod matičnih i progenitorskih ćelija, ove promene u H1 histonu u nekim slučajevima mogu da daju određeni doprinos procesu diferencijacije i opredeljivanju ćelije ka određenoj ćelijskoj liniji. Uz to, neke posttranslacione modifikacije H1 proteina mogu da donekle utiču na stepen transkripcije DNK u hromatinskom regionu gde je histon prisutan (Izquierdo-Bouldstridge et al. 2017; Bednar et al. 2017).

U osnovi, postoji četiri nivoa u organizaciji odnosno pakovanju hromatina. Prvi nivo se odnosi na nukleozome, odnosno spoj histona i lanca DNK. Drugi nivo predstavlja vlakno dijametara od 30 nanometara u kome su nukleozomi povezani histonom H1. Ovim se vrši kompresija informacija od najmanje sto puta, što je i dalje nedovoljno da bi se genetski materijal na adekvatni način upakovao u zapreminu jedra. Treći nivo predstavljaju petlje koje hromatinska vlakna formiraju ponekad slučajno, a češće kao posledica kompleksnih interakcija sa nehistskim proteienima. Smatra se da i jedarna membrana ima potencijalno značaju ulogu u formiranju petlji. Četvrti nivo organizacije, odnosno pakovanja, predstavlja hromatin koji se viđa tokom pripreme ćelije za deobu, odnosno u metafazi. Hromatin u metafazi se odlikuje veoma visokim stepenom kondenzacije (Pollard et al. 2016; Alberts & Hopkin, 2019).

Hromatin u jedru može da se nađe u obliku euhromatina i heterohromatina. Heterohromatin je „gušće pakovana“, odnosno više kondenzovana forma hromatina i manje je transkripciono aktivan, dok je euhromatin bogat genima sa kojih se dobija informacija neophodna za sintezu proteina. Euhromatin se uglavnom javlja u vidu mikrofibrila dijametara oko 10 nanometara što je jednim delom odgovorno za svetliji izgled tokom mikroskopiranja. Heterohromatin se javlja u dve glavne forme: konstitutivni heterohromatin i fakultativni heterohromatin. Konstitutivni heterohromatin je mnogo manje aktivan u smislu potencijalne transkripcije, odnosno prelaza u euhromatin. Fakultativni heterohromatin sa druge strane često može da se pretvori u euhromatin pod dejtvom različitih spoljnjih ili unutrašnjih činioca. Čak i u fiziološkim uslovima, faktori koji utiču na stepen hromatinske kondenzacije ne moraju nužno da se nalaze u jedru ćelije. Primer bi bio protein kondenzin I koji je tokom interfaze prisutan u citoplazmi, a dejstvuje na hromosome tek nakon završetka profaze kada dođe do degradacije jedarne ovojnice (Pollard et al. 2016; Alberts & Hopkin, 2019).

Gledano svetlosnim i elektronskim mikroskopom, hromatin u interfaznom jedru se prezentuje različitim strukturnim obrascima (engl. „structural patterns“). Ovi obrasci uveliko zavise od tipa ćelije (Pollard et al. 2016; Alberts & Hopkin, 2019). Na primer, limfociti imaju raltivno homogenu i tamno prebojeno jedro, za razliku od hepatocita gde je uočljiv mnogo veći stepen heterogenosti. Presentacija strukturnih obrazaca hromatinske organizacije tokom konvencionalne mikroskopije uveliko zavisi i od histološke tehnike bojenja koja je upotrebljena. Na primer, klasično hematoksilin / eozin bojenje i toluidin plavo bojenje (koje je upotrebljeno u

ovoj disertaciji) rezultuje potpuno drugačijim izgledom ćelijskog jedra, ne samo hepatocita, već i bilo koje druge ćelijske populacije.

Danas je uglavnom nepoznanica kako i na koji način pojedini faktori deluju na strukturne (i teksturalne) obrasce hromatinske organizacije u interfazi. Ovo se odnosi i na razne vrste nanočestica koje ponekad mogu direktno da deluju na ćelijsko jedro. Različiti signalni putevi koji se pokreću kada se neki protein, hormon ili faktor rasta veže za ćelijsku membranu mogu da utiču na distribuciju euhromatina i heterohromatina u jedru (Pollard et al. 2016; Alberts & Hopkin, 2019). Takođe, pojedini toksini indirektno mogu da dovedu do ovih promena tako što dovedu do smanjene ili povećane ekspresije nekih gena. Konačno, neke supstance se odlikuju povećanim generisanjem reaktivnih jedinjenja kiseonika, i na taj način indirektno oštećuju DNK izazivajući aktivaciju brojnih mehanizama popravke, što takođe može biti praćeno promenama u hromatinskoj strukturi i distribuciji.

Prema našim saznanjima, istraživanje opisano u ovoj disertaciji je jedno od prvih u svetu koje je primenilo savremene informacione tehnologije u cilju kvantifikacije promene teksturalnih obrazaca hromatina izazvanih metalnim nanomaterijalima. Takođe, ovo je prvo istraživanje koje je na ovaj način istraživalo promene u strukturi i distribuciji hromatina na ćelijskoj populaciji hepatocita jetre. Dobijeni rezultati predstavljaju potencijalno vrednu osnovu za buduća istraživanja vezana za spoljašnje toksične činioce, koji dovode do reorganizacije hromatinskog makromolekula u ovim ćelijama.

## **5.6. Primena fraktalne analize u ćelijskoj biologiji i molekularnoj medicini**

Fraktalna analiza je savremeni matematički, fizički i kompjuterski metod za evaluaciju fenomena samosličnosti u različitim signalima i strukturama. Fraktal kao pojam je dosta teško definisati, a najprecizniji opis fraktala koji se danas može naći u literaturi je: obrazac koji se odlikuje (skoro) beskonačnom kompleksnošću, u kome postoji sličnost na različitim skalama posmatranja. Drugim rečima, sistemi koji imaju fraktalne osobine se odlikuju sličnošću između većih i malih delova sistema, odnosno sličnošću delova sistema i sistema kao celine. Dimenzija fraktala je veća odnjegove topološke dimenzije pa se stoga fraktal teško opisuje uz pomoć parametara Euklidske geometrije (Sakata et al. 2019; Lagatuz et al. 2021). U prirodi, savršeni fraktali ne postoje (oni se mogu kompjuterski generisati). Međutim, mnoge biološke strukture i signali makar delimično nalikuju na fraktale. Primeri su brojni u svetu biljaka gde se samoponavljajući i samoslični obrasci mogu naći na listovima, korenju, laticama cveća, mnogim plodovima itd. Mnogi prirodni fenomeni vezani za vremenske obrasce, geografske karakteristike planete Zemlje itd. takođe imaju ove osobine.

Dva najznačajnija parametra fraktalne analize su fraktalna dimenzija i lakunarnost. Fraktalna dimenzija se može izračunati korišćenjem različitih

metoda, pri čemu je danas najčešće u upotrebi klasična box-counting metoda (Andronache et al. 2019; Wei et al. 2021). Ona se sprovodi korišćenjem relativno komplikovanog matematičkog algoritma koji je opisan u metodološkoj sekciji ove disertacije, odnosno binarizacijom dvodimenzionalnog signala (mikrografa), a zatim prekrivanjem serijom kvadrata na različitim skalama. Ovde treba napomenuti da ovakav pristup nije jedini, niti je moguće tvrditi da je bolji ili manje dobar u poređenju sa drugim strategijama. Na primer, u pojedinim softverskim platformama, poput FracLac moguće je odrediti fraktalnu dimenziju na nebinarizovanim, crno-belim slikama (Gray Scale format), pri čemu se često računa vrednost takozvane diferencijalne fraktalne dimenzije. Postoje i tipovi fraktalne dimenzije koji nisu dobijeni box-counting metodom. Ipak, naša je pretpostavka da su promene u jednoj dimenziji često praćene i promenama u dimenziji dobijenoj drugom metodom, odnosno da je eventualno postojanje razlike ili korelacije u klasičnoj fraktalnoj dimenziji, praćeno sličnim promenama i u ostalim takvim parametrima dobijenim drugačijim matematičkim pristupima.

Lakunarnost je u principu znatno teže definisati u odnosu na fraktalnu dimenziju. Ovaj parametar u osnovi zavisi od veličine i broja praznina u fraktalnoj organizaciji, odnosno strukturi (Cabral et al. 2020; Aranda et al. 2021). Veći broj i dimenzije ovih praznina (lakuna) dovode do povećane lakunarnosti mada to ne mora uvek biti slučaj. Prema našem dosadašnjem iskustvu, strukture koje imaju veoma velika prazna polja koja zahvataju najveći deo površine na mikrografu ne moraju obavezno imati veliku lakunarnost. Naprotiv, nedostatak vidljive tkivne ili ćelijske strukture povećava donekle stepen homogenosti, pa bi po tom rezonovanju lakunarnost trebalo biti manja. Lakunarnost i fraktalna dimenzija su često u negativnoj korelaciji, odnosno sa povećanjem jednog parametra smanjuje se drugi i obrnuto. Doduše, jačina i uopšte postojanje ove korelacije znatno zavisi od načina računanja ovih parametara, od primenjene softverske platforme, kao i od mnogih drugih faktora.

Tokom poslednje dve decenije, nekoliko istraživačkih timova je pokušalo, sa manjim ili većim uspehom da primeni fraktalnu analizu u cilju ispitivanja i detekcije programirane ćelijske smrti. Ovo se bazira na činjenici da tokom apoptoze, odnosno makar u njenim ranim fazama, kod mnogih ćelijskih populacija dolazi do strukturnih promena u jedarnom hromatinu. Ove promene se pre svega odnose na proces kondenzacije, odnosno do smanjenja zapreminskog odnosa euhromatin / heterohromatin. Kod mnogi ćelija, kada se pokrene signalni put koji prethodi apoptozi, mnogi geni (često i zbog oštećenja genoma koje obično pokreće ovaj signalni put) postaju transkripciono neaktivni.

Neki autori smatraju da euhromatin ima veće vrednosti fraktalne dimenzije u poređenju sa heterohromatinom (Bancaud et al. 2012). Ovo je logično imajući u vidu da je heterohromatin u osnovi manje kompleksnija struktura zbog veće gustine i stepena pakovanja i spiralizacije. Prema tome, moguće je da jedro koje je transkripciono manje aktivno, odnosno ono koje

je na putu da započne apoptotski proces ima manju vrednost fraktalne dimenzije. Ipak, ovo je samo pretpostavka koja nije dokazana kroz sveobuhvatnu i validnu studiju, pogotovu kada je u pitanju svetlosna mikroskopija i konvencionalna bojenja.

Još jedna strukturna promena u hromatinu koja je karakteristična za programiranu ćelijsku smrt, makar u nekim ćelijskim populacijama je marginalizacija hromatina, odnosno pomeranje gusto pakovanih hromatinskih regiona uz ćelijsku membranu (Valdez et al. 2017; Pulikkan et al. 2018). Ovo bi u teoriji trebalo da smanji vrednost fraktalne dimenzije zato što je struktura takvog jedra uniformnija u poređenju sa jedrom u kome su gusto pakovani regioni nasumice (haotično) raspoređeni. Ipak ovo treba uzeti sa dozom rezerve pošto marginalizacija nije prisutna tokom apoptoze u svim ćelijama. Takođe veliki broj ćelija (a tu spadaju i hepatociti) čak i kada su u fiziološkim uslovima imaju zanačajni deo heterohromatina koji je raspoređen upravo uz ćelijsku membranu. Stoga ostaje nejasno da li se i kako takva ćelija tokom apoptoze razlikuje od normalne, zdrave ćelije u pogledu hromatinske distribucije u jedru. Takođe je nejasno da li se i u kojoj meri vrednost fraktalne dimenzije jedra kod takvih ćelija menja.

Jedna od prvih studija o potencijalnoj primeni fraktalne analize u detekciji programirane ćelijske smrti je objavljena 2001. godine od strane švajcarskih naučnika Lose i Kastelija (Casteli & Losa, 2001). Istraživanje je urađeno na kulturi estrogen nesenzitivnih ćelija karcinoma dojke soja SK-BR-3. Apoptoza je kod ovih ćelija izazvana hemijskom supstancom kalcimicin, koja u primenjenoj dozi od 1mM obično izaziva smrt ćelije u roku od 96 časova. Za detekciju apoptoze korišćene su savremene citofluorometrijske tehnike poput Aneksin-V obeležavanja (tretman adhezionim molekulom koji se u prisustvu kalcijuma vezuje za fosfatidilserin na spoljnoj strani ćelijske membrane) i TUNEL tehnike (engl. "Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling assay"). Takođe je u cilju karakterizacije apoptotskih ćelija primenjen esej membranske permeabilnosti tretmanom sa propidium jodidom.

U gorenavedenoj studiji, fraktalna analiza je urađena u Fanal ++ softveru koji pored ostalog omogućava klasičnu "box-counting" analizu. Merena je fraktalna dimenzija kako hromatina, tako i manjih komponenti hromatina, kao i površine ćelijske membrane ("nuclear membrane outline"). Rezultati su pokazali da se fraktalna dimenzija u skoro svim uslovima smanjuje nakon tretmana proapoptotskom supstancom što u osnovi znači da je došlo do smanjenja strukturne kompleksnosti. Najvažniji nalaz ovog rada je činjenica da je do smanjenja došlo pre nego što su konvencionalni citofluorometrijski metodi pokazali postojanje, odnosno početak programirane ćelijske smrti (Casteli & Losa, 2001). Drugim rečima, ova relativno jednostavna i pristupačna metoda je pokazala znatno veći stepen senzitivnosti u poređenju sa znatno kompleksnijim biohemijskim metodama zlatnog standarda.

Losa i Kasteli su nastavili svoje istraživanje iz oblasti fraktalne analize uradivši 2005. godine novu studiju na kulturi ćelija karcinoma dojke (Losa & Casteli, 2005). Slično prethodnom istraživanju, ovde je apoptoza izazvana dejtvom hemijskog toksina kalcimicina, a za detekciju ćelijske smrti korišćen je esej membranske permeabilnosti, TUNEL i aneksin-V obeležavanje. Takođe je urađena analiza sfingolipida kroz ekstrakciju ukupnih lipida i izolaciju gangliozida i glikosfingolipida. Analiza ćelijskog ciklusa je obavljena određivanjem sub-G0/G1 pika. Specifičnost ove studije je i ta što je kao dodatak fraktalnoj analizi urađena teksturalna analiza uz pomoć matriksa simultanog pojavljivaja sivih vrednosti. Kvantifikovani su parametri poput angularnog drugog momenta, korelacije, kontrasta, inverznog momenta razlike i entropije. Utvrđeno je da se pojedini GLCM parametri hromatina poput teksturalne varijanse i GLCM korelacije značajno menjaju veoma brzo nakon delovanja proapoptotskog toksina. Ovaj nalaz ukazuje na značaj kombinovanja fraktalne i teksturalne (GLCM) analize u detekciji strukturnih i funkcionalnih promena u ćeliji tokom veoma ranih faza programirane ćelijske smrti, kada one još uvek nisu detektibilne korišćenjem standarnih biohemijskih tehnika (Losa & Casteli, 2005).

Još jedna eksperimentalna studija iz oblasti primene fraktalne analize u izučavanju apoptoze je objavljena 2012. godine u Časopisu teoretske biologije (Pantic et al. 2012). Autori su izazivali apoptozu na ćelijama U251 humanog glioblastoma uz pomoć ultraljubičastih UVB zraka. Napravljeni su digitalni mikrofotografije korišćenjem fazno-kontrastnog mikroskopa, za zatim je, slično protokolu u ovoj disertaciji urađena fraktalna analiza korišćenjem FracLac softvera. Ćelije su slikane na svakih 30 minuta nakon tretmana do isteka 5 časova, kao i neposredno pre i nakon izlaganja UV zracima. Pored fraktalne dimenzije, ovde je kvantifikovana i fraktalna lakunarnost, parametar koji je indirektni indikator postojanja praznina ("rupa") u fraktalnoj strukturi (Pantic et al. 2012). Fraktalna analiza je sprovedena kako na nivou jedarne strukture, tako i na nivou celokupnih ćelija (ovakav pristup je moguć kada se na mikrofotografima ćelijska membrana jasno uočava) U studiji je urađena relativno detaljna citofluorometrijska analiza. Pored ostalog, urađeno je duplo bojenje sa aneksinom i propidium jodidom, kao i određivanje aktivnosti kaspaza kao enzima ključnih za pokretanje procesa programirane ćelijske smrti. Takođe je kvantifikovan proces fragmentacije dezoksiribonukleinske kiseline kroz analizu ćelijskog ciklusa (Pantic et al. 2012).

Interesantno je da se u ovoj studiji fraktalna dimenzija jedarne strukture nije značajno menjala čak ni nakon 5 sati od tretmana. Sa druge strane, fraktalna dimenzija cele ćelije je se smanjila (što ukazuje na smanjenje kompleksnosti). Ovo smanjenje je postalo statistički signifikantno već nakon 30 minuta od tretmana. Fraktalna lakunarnost jedra se značajno smanjila odmah nakon tretmana da bi se nakon 2 časa povećala do nivoa kontrole. Konvencionalni citofluorometrijski parametri poput fragmentacije DNA i aneksin PI su se značajno promenili tek 2h nakon tretmana. Ovi



rezultati su ukazali da relativno jednostavna mikroskopsko-matematička analiza pokazuje veći stepen senzitivnosti u detekciji ranih stadijuma apoptoze u porećenju sa konvenionalnom FACS analizom. Autori su zaključili da bi u budućnosti, fraktalna analiza mogla da postane značajni dodatak etabliranim metodama za identifikaciju apoptotskih ćelija u kulturi u različitim fiziološkim i patološkim uslovima.

Jedna od skorašnjih studija koja je primenila metodu fraktlane analize na ćelijskim kulturama je urađena na hematopoetskim kancerskim ćelijama (T-limfoblastoidna linija - JURKAT i B - limfoidna linija - CCRF-SB). Za razliku od prethodnih istraživanja, ovde je apoptoza izazivana tranzientnom normobaričkom hipoksijom (De Bels et al. 2020). Programirana ćelijska smrt je dokazana povećanjem nivoa kaspaza (konkretno kaspaze 3). Rezultati su pokazali da je došlo do inicijalnog povećanja strukturne kompleksnosti kod JURKAT i CCRF-SB ćelija. Ovaj nalaz je u suprotnosti sa našim opservacijama da je oštećenje ćelije i generalno procesi koji su u vezi sa destvom nekog toksičnog agensa uglavnom praćeno smanjenjem strukturne kompleksnosti. Ova diskrepanca može biti posledica razlike u metodološkim pristupima koji su primenjeni u različitim studijama (De Bels et al. 2020).

### **5.7. Teksturalna analiza hromatinske strukture u sklopu biosenzora za detekciju ćelijskog oštećenja**

U jednoj od prethodnoj studija o promeni GLCM metode u medicini, vršeno je ispitivanje parametara teksture jedarnog hromatina limfocita periferne krvi nakon izazivanja ćelijskog oštećenja (Pantic et al, 2016). Ćelije su tretirane oksidopaminom, derivatom dopamina koji ima tosične efekte na genetski materijal ćelije. Oksidopamin je u osnovi neurotoksin i koristi se u eksperimentalnoj fiziologiji za izazivanje animalnih eksperimentalnih modela Parkinsonove bolesti i hiperkinetičkog poremećaja. Njegov najverovatniji mehanizam dejstva u neuronima i drugim ćelijama je stvaranje reaktivnih kiseoničnih radikala poput vodonik peroksida, superoksidnog anjona i hidrosilnog radikala. Nakon toga dolazi do oštećenja genetskog materijala ćelije i odgovarajućih promena u jedarnoj strukturi.

U limfocitima, oksidopamin u manjim koncentracijama dovodi do pokretanja signalnih puteva koji ultimativno pokreće proces programirane ćelijske smrti (Del Rio & Velez-Pardo, 2002; Pantic et al. 2016). Ovo je pokazano do sada na nekoliko eksperimenata, i najverovatnije se apoptoza indukuje nemogućnošću mehanizama popravke u jedru da saniraju oštećenje izazvanog oksidativnim stresom. U jedru tokom rane apoptoze dolazi do kondenzacije hromatina, smanjenja transkripcionih procesa, povećanja odnosa heterohromatin / euhromatin, i marginalizacije dela heterohromatina uz jedarnu membranu. Tokom ovakvih procesa, logično bi bilo smanjenje kompleksnosti jedra, odnosno fraktalne dimenzije, a možda i povećanje lakunarnosti.

U gorepomenutoj studiji, ćelije su izlagane oksidopaminu u koncentracijama 100, 200 i 300 mM, a nakon 120 minuta obavljena je fiksacija metanolom. Ćelije su obojene Felgen metodom koja za razliku od toluidin plave (korišćene u ovom doktoratu, specifična generalno za nukelinske kiseline) je specifična skoro isključivo za molekule DNK. GLCM analiza je obavljena na platformi ImageJ Nacionalnog instituta za zdravlje koja se zasniva na podprogramima Texture Analyzer i GLCM\_TextureToo. Od parametara teksture, izračunati su angularni drugi moment, inverzni moment razlike, teksturalna korelacija, GLCM entropija i GLCM varijansa. Utvrđeno je da je došlo do dozno-zavisnog povećanja teksturalne entropije (indikator neuređenosti) hromatina, kao i do sličnog povećanja GLCM varijanse. Sa druge strane, oksidopamin je izazvao dozno-zavisno smanjenje angularnog drugog momenta hromatinske strukture, kao i teksturalne korelacije.

Zanimljivo je da je i u ovoj studiji urađena ROC (engl. Receiver operating characteristic) analiza za teksturalne parametre. Ovom statističkom metodom, testirana je diskriminatorna sposobnost teksturalne analize, odnosno sposobnost razlikovanja tretiranih od netretiranih (intaktnih) ćelija. Utvrđeno je da GLCM varijansa ima izuzetnu diskriminatornu moć (engl. outstanding discriminatory power) u razlikovanju ćelija tretiranih oksidopaminom u koncentraciji 300 mM od kontrole.

Ovo istraživanje sa oksidopaminom je prema našim saznanjima bilo prvo u svetu koje je testiralo sposobnost teksturalne analize kao svojevrsnog biosenzora za indirektno detektovanje promena u hromatinskoj strukturi nakon indukcije oštećenja. Kad je u pitanju ova doktorska disertacija, studija je relevantna zato što je posredno na ovaj način ispitivana mogućnost GLCM metoda da detektuje promene uzrokovane oksidativnim oštećenjem (ako prihvatimo teoriju da oksidopamin dominantno izaziva oštećenje generisanjem slobodnih kiseoničnih radikala). Zaključci studije su, pored ostalog, da se GLCM algoritam ima odrađeni potencijal da se koristi kao deo budućeg biosenzora za detekciju ćelijskog oštećenja, barem kada su u pitanju ćelije obojene DNK specifičnom Felgen metodom. Za sada je još uvek nepoznato da li bi se isti ili slični rezultati dobili kod limfocita obojenih toluidin plavim (specifično generalno za nukleinske kiseline), Gimzom (pogodno bojenje za vizuelizaciju hromozoma) ili hematoksilin - eozin (pristupačno i često korišćeno bojenje prilikom histopatološke analize tkiva).

Još jedna važna studija o primeni GLCM metode za detekciju promena u jedarnoj strukturi izazvanih oksidopaminom je objavljena 2019. godine (Nikolovski et al. 2019). Autori su ovde koristili model ćelija kvasnica (*Saccharomyces cerevisiae*) koji je i do sada bio u širokoj upotrebi u molekularnoj biologiji i genetici. Ovaj model je od posebnog značaja za istraživanje hromatinske organizacije pošto su skoro svi geni koji učestvuju u distribuciji hromatina mapirani. Kvasnice imaju i druge prednosti u odnosu na neke druge in vitro modele, a to je pre svega relativno velika

otpornost ovih ćelija na promenljive ambijetalne uslove, laka manipulacija prilikom tretmana različitim supstancama, mogućnost fiksiranja različitim fiksativima, kao i veliki izbor tehnika bojenja koje uspešno mogu da vizuelizuju hromatin i njegovu distribuciju u jedru.

Autori su u ovoj studiji ćelije tretirali oksidopaminom u dozi od 300  $\mu\text{M}$  (doza koja je prethodno na limfocitima uzrokovala relativno velike promene u GLCM parametrima). Takođe, jedna grupa ćelija je tretirana magnetitnim nanočesticama u dozi 100 mg/L. Ove nanočestice su faktički identične onim koje su korišćene u okviru ove doktorske disertacije. Nakon tretmana kvasnica, posmatrane su ćelije u različitim vremenskim tačkama (30 min, 60 min i 120 min nako tretmana) i na taj način je ispitivana vremenska zavisnost, odnosno promene GLCM parametara u zavisnosti od protoka vremena. Slično ovoj doktorskoj disertaciji, za određivanje GLCM parametara korišćena je platforma Mazda napravljena od strane istraživača Tehničkog univerziteta Lođ (Institut za elektroniku). Za svaku jedarnu strukturu, izračunate su vrednosti angularnog drugog momenta, inverznog momenta razlike, GLCM kontrasta, testuralne korelacije i sume varijanse GLC matriksa.

Zanimljivo je da je ovde oksidopamin doveo vremenski - zavisnog smanjenja angularnog drugog momenta dok su nanočestice gvožđa oksida dovele do suprotnog efekta, takođe vremenski - zavisnog. Suma varijanse GLCM se povećala nakon tretmana oksidopaminom dok je ekspozicija nanočesticama dovela opet do suprotnog efekta. Iz svega se može zaključiti da oksidopamin donekle povećava sveukupnu heterogenost jedra na ovom eksperimentalnom modelu, dok nanočestice imaju delimično protektivno dejstvo na njegove toksične efekte. Moguće je da procesi u hromatinu koji prethode programiranoj ćelijskoj smrti povećavaju strukturnu heterogenosti jedra, a da se protektivni efekat nanočestica ispoljava kroz povećanje homogenosti.

Potrebno je ove rezultate posmatrati sa određenom rezervom, pre svega zbog činjenice da je GLCM relativno nova metoda u patologiji i toksikologiji i mnogi mehanizmi koji potencijalno mogu da utiču na teksturalne parametre (pre svega na angularni drugi momenat i inverzni momenat razlike) još uvek nisu dovoljno istraženi. Činjenica da oksidopamin smanjuje angularni drugi momenat (pa samim tim i uniformnost tekture) ćelijskog jedra ne mora nužno biti posledica toksičnog ili proapoptotskog efekta ove supstance. Iako deluje logično da svaki proces koji dovodi do oštećenja jedra uzrokuje njegovu strukturnu degradaciju i time smanjuje homogenost, ovo ne mora biti slučaj na svim ćelijskim populacijama i u svim eksperimentalnim uslovima. Takođe, suprotni efekat koji na ćelijama izazivaju nanočestice gvožđa ne mora nužno da ukazuje na njihovo protektivno dejstvo. Moguće je jednostavno da dolazi do aktivacije nekog signalnog puta koji u jedru dovodi do redistribucije euhromatina i heterohromatina, i da ta redistribucija nema nikakve veze ni sa oštećenjem genetskog materijala, ni sa programiranom ćelijskom smrti.

Gorenavedena studija je u suprotnosti sa rezultatima ove disertacije, barem kada je u pitanju efekat magnetitnih nanočestica. Naročito je izražena diskrepanca u rezultatima vezanim za angularni drugi momenat i inverzni momenat razlike. Ipak potrebno je primetiti značajnu razliku u metodološkom pristupu u ova dva istraživanja. U studiji sa saharomicetama korišćene su značajno veće doze nanočestica u poređenju sa dozama koje bi se u disertaciji očekivale da budu prisutne u jetrinom parenhimu, odnosno u neposrednoj blizini hepatocita. Drugo, metabolizam i razgradnja nanočestica u jetri i dalje nije izučena, odnosno u jetri postoji specifična mikrosredina sa velikim brojem različitih hemijskih medijatora i drugih supstanci od kojih svaka može potencijalno da reaguje sa nanočesticama, a zatim i sa samim hepatocitima. Treće, potrebno je razmotriti razlike u histološkoj obradi ćelija, odnosno tkiva. U disertaciji je tkivo jetre bilo obojeno toluidin plavo tehnikom (boja koja se dominantno vezuje za nukleinske kiseline) dok u studiji sa kvasnicama to nije bio slučaj. Konačno, kvasnice kao eksperimentalni model se fundamentalno razlikuju od ćelija jetre i u morfološkom i u funkcionalnom smislu. Broj gena i broj hromozoma je drugačiji kao i pojedini aspekti replikacije DNK. Ćelijski ciklus i signalni putevi asocirani sa njim se bitno razlikuju. Kvasnice takođe imaju drugačiju permeabilnost za veliki broj eksternih supstanci, odnosno potencijalnih toksina u poređenju sa hepatocitima.

#### **5.8. Budućnost i ograničenja primene kompjuterskih metoda u detekciji strukturnih i funkcionalnih promena u ćelijskom jedru**

Kao što je prethodno rečeno, razvoj informacionih tehnologija u 21. veku je doveo do velikih promena u naučnoistraživačkom radu kako u fundamentalnim tako i u kliničkim medicinskim naukama (Pollen et al. 2014; Kel et al. 2019; Liu et al. 2020). Savremeni programski algoritmi za analizu signala su doveli do toga da mnogi fenomeni i zakonitosti iz oblasti ćelijske biologije i molekularne medicine budu opisani i objašnjeni (Pollen et al. 2014; Kel et al. 2019; Liu et al. 2020). Ipak, primena metoda softverskog inženjerstva u medicini je još uvek slabo izučena, i relativno mali broj istraživačkih timova se upušta u projekte ovog tipa. Ovo je pre svega zbog kompleksnosti i multidisciplinarnosti ovakvih pristupa. Doktori medicine uključujući i one koji se bave komputacionom biologijom, često nemaju adekvatno programersko i matematičko znanje neophodno za rad na odgovarajućem softveru, kao ni dovoljno iskustva kako bi na odgovarajući način protumačili dobijene rezultate. Programeri sa druge strane često nemaju dovoljno medicinskog i biološkog znanja da bi napravili softverski algoritam primenljiv u fundamentalnoj ili kliničkoj medicini. U ovakvim uslovima, ponekad jedino rešenje je formiranje velikih multidisciplinarnih naučnih timova uz uključivanje stručnjaka iz IT industrije, odnosno programerskih firmi koji imaju adekvatnu ekspertizu u razvoju softvera. U ovakve timove poželjno je učešće i molekularnih biologa koji često bolje od lekara poznaju kompleksne molekularne procese i signalne puteve koji se odvijaju u ćelijskom jedru i u drugim ćelijskim komponentama (Pollen et al. 2014; Kel et al. 2019; Liu et al. 2020).

Danas je jasno da ubrzani razvoj veštačke inteligencije i mašinskog učenja predstavlja budućnost primene većine, ako ne i svih informacionih tehnologija u medicinskom naučnoistraživačkom radu, a verovatno i u kliničkoj praksi. Fraktalna, teksturalna i vejevlet analiza ni ovde ne predstavljaju izuzetke. Veštačka inteligencija predstavlja širi pojam od mašinskog učenja i predstavlja sve tehnologije pri kojima mašine obavljaju funkcije koje su karakteristične za humanu inteligenciju. Ovde spadaju različiti oblici vizuelne rekognicije, prepoznavanja jezika i auditornih signala, donošenja odluka i rešavanje kompleksnih problema (Falk et al. 2019; Santucci-Pereira et al. 2019; Meng et al. 2020).

Tokom poslednjih desetak godina, predloženi su brojni modeli mašinskog učenja koji bi sa uspehom mogli da se upotrebe za analizu dvodimenzionalnih signala, ili numeričkih podataka asociranim sa takvim signalima u medicini (Beig et al. 2019; Omta et al. 2020). Obično se klasifikuju u tri grupe: mašinsko učenje pod supervizijom (engl. "supervised machine learning"), mašinsko učenje bez supervizije (engl. "unsupervised machine learning") i mašinsko učenje sa potkrepljivanjem (engl. "reinforced machine learning"). Kada su u pitanju numerički podaci analize digitalnih mikrografa poput onih dobijenih GLCM metodom, verovatno su najadekvatniji metodi mašinskog učenja sa supervizijom. Kod ovakvih tehnika, mašina (model mašinskog učenja) se izlaže seriji ulaznih vrednosti i odgovarajuće izlazne vrednosti. Drugim rečima, supervizor daje mašini veliki broj primera gde ulazni podaci su asocirani sa ciljem (izlaznim podacima). Mašina vremenom pronađe obrasce i zakonitosti i na osnovu njih postaje sposobna da kasnije sama klasifikuje ili predvidi izlaznu vrednost (Winkel et al. 2020; Beig et al. 2019; Omta et al. 2020; Zhao et al. 2020).

Neki od danas najčešće korišćenih metoda mašinskog učenja pod supervizijom su: neuralne mreže (primer: neuralna mreža zasnovana na višeslojnom perceptronu), linearni regresioni modeli, modeli zasnovani na logističkoj regresiji (primer bi bila binarna logistička regresija), Bajesove mreže, linearna diskriminantna analiza, algoritam K-najbližeg suseda i takozvani "Support-vector machine" model (Maroco et al. 2011; Bartmann et al. 2017; Tyasi et al. 2020). Ovde takođe spadaju i modeli koji se baziraju na drvu odluke. Drva odluke mogu da koriste brojne komputacione algoritme poput CART (Classification and Regression Trees), CHAID (Chi-square automatic interaction detection), kondicionalnih interferentnih drva (Conditional Inference Trees) i multivarijantnih adaptivnih regresionih grana (Multivariate Adaptive Regression Splines) (Maroco et al. 2011; Bartmann et al. 2017; Tyasi et al. 2020).

Posebna forma mašinskog učenja koja se danas sve češće koristi u kako u fundamentalnim, tako i u kliničkim medicinskim istraživanjima je duboko učenje (Hannigan et al. 2019; Jiao et al. 2020). Ova forma učenja obuhvata kompleksne pristupe zasnovane na neuralnim mrežama poput konvolucionih neuronskih mreža i rekurentnih mreža Hannigan et al. 2019; Jiao et al. 2020). Ove metode su posebno atraktivne u računarskoj viziji za prepoznavanje i klasifikovanje slika, kao i za predviđanje složenih

fenomena u samim slikama. Prema našim saznanjima, kombinacija ovih strategija veštačke inteligencije i GLCM metoda još uvek nije pokušana, ali ne postoji nijedan metodološki problem koji bi sprečio buduća istraživanje iz ove oblasti (Davidovic et al 2021).

Primer upotrebe mašinskog učenja pod supervizijom za podatke dobijene radom na ovoj disertaciji bi bio da se kreira model gde bi angularni drugi moment, inverzni moment razlike, GLCM kontrast, GLCM korelacija i teksturalna varijansa bile ulazne vrednosti. Izlazna vrednost bi mogao biti podatak da li je ćelija bila izložena magnetitnim nanočesticama (dihotomna varijabla poput tretman=0 ili tretman=1). Jedan od najjednostavnijih modela koji bi u ovom slučaju mogao da se kreira je onaj zasnovan na binarnoj logističkoj regresiji. Binarna logistička regresija, iako relativno jednostavan pristup se u našim dosadašnjim, još uvek nepublikovanim istraživanjima na ćelijskim eksperimentalnim modelima pokazala kao pouzdana strategija mašinskog učenja sa klasifikacionim preciznošću samo nešto manjom od mnogo kompleksnijih neuralnih mreža.

Prema našim dosadašnjim iskustvima, neuralne mreže zasnovane na perceptronu su se pokazale kao veoma korisne za integraciju podataka dobijenih fraktalnom, teksturalnom i vejevlet analizom. Koncept perceptona se zasniva na arhitekturi koja ima ulazni sloj, jedan ili više skrivenih slojeva neurona i izlazni sloj. U ovakvom pristupu, ulazni sloj bi se snabdevao informacijama o vrednostima fraktalne dimenzije, lakunarnosti, angularnog drugog momenta, inverznog momenta razlike, kontrasta i vejevlet energetske koeficijenta. Model bi mogao imati veći broj skrivenih slojeva neurona, mada prema našim opservacijama često je dovoljno jedan do dva sloja za postizanje relativno velike klasifikacione preciznosti. Na primer, u prethodnom istraživanju (Davidovic et al. 2021) je predložena arhitektura mreže od dva sloja od kojih prvi ima četiri dok drugi ima tri neurona. Izlazni sloj se zasniva na dihotomnoj varijabli u smislu da li je ćelija oštećena ili ne (intaktna). Neuronska mreža se može trenirati sa na primer par hiljada primera gde se mašini prezentuju ulazne i izlazne vrednosti. Vremenom, model počne da selektivno usmerava protok signala ka specifičnim neuronima podešavajući takozvane težine/tegove i tako spozna obrazac odnosno zakonitost koja asocira teksturu jedra/hromatina sa pripadnošću ćelije eksperimentlanoj odnosno kontrolnoj grupi.

Za razliku od nekih kompleksnijih pristupa, za stvaranje perceptronskog modela često nije neophodno značajna ekspertiza iz oblasti informacionih tehnologija, odnosno znanje programskog jezika. Savremene platforme za modelovanje podataka često imaju relativno jednostavan korisnički grafički interfejs koji na intuitivni način omogućava treniranje raznih modela mašinskog učenja. Primer bi bio softverski paket SPSS Modeler (IBM, SPSS Corporation, SAD). U ovom programu moguće je istovremeno razviti i testirati više od deset različitih modela mašinskog učenja, a perceptron je samo jedan od njih. U okviru perceptrona, dozvoljena je arhitektura sa do dva skrivena sloja, a korisnik može sam da bira koliko će neurona imati svaki sloj. Korisnik takođe može birati varijable

koje će biti ulazne, odnosno ciljnu varijablu. Takođe, može se odabrati koliko će procenat uzorka biti korišćen za treniranje mreže, a koliki za njeno testiranje. Obično se koristi nepisano pravilo da 70% uzorka bude upotrebljeno sa ciljem da se model "nauči" određenom pravilu, a ostalih 30% služi da se odredi preciznost odnosno diskriminatorna moć modela.

Tokom testiranja perceptrona, a i nekih drugih modela mašinskog učenja potrebno je uraditi analizu diskriminatorne sposobnosti modela u smislu mogućnosti razlikovanja eksperimentalnih (tretiranih) od netretiranih ćelija (ili životinja ili nekih drugih statističkih jedinica posmatranja). Na primer, napravili smo neuronsku mrežu tako što smo je izložili velikom broju GLCM vrednosti (za veliki broj ćelija) i za svaku ćeliju je izložili vrednostima izlazne (target) varijable. Model je napravljen i testiran na određenom uzorku. Radi određivanja diskriminatorne moći modela, potrebno je uraditi takozvanu ROC (Receiver operating characteristics) analizu. Tokom ove analize, konstruiše se kriva u sistemu gde je na ordinati prikazana senzitivnost, a na apscisi prikazana 1-specifičnost modela. Zatim se izvrši merenje površine grafikona (u procentima) koji se nalazi ispod krive. Površina između 90% i 100% bi ukazala na izuzetnu diskriminatornu moć. Površina između 80% i 90% bi bila odlična diskriminatorna moć. U principu test (ili model) kod koga je površina ispod ROC krive manja od 60% ne bi bio koristan za dijagnostičke ili istraživačke svrhe. Prema našim dosadašnjim opservacijama, modeli mašinskog učenja za prepoznavanje oštećenja ćelije zasnovani na GLCM parametrima često imaju ovu površinu oko 80% što ih čini potencijalno korisnim u brojnim oblastima patologije (kao dodatak konvencionalnim metodama tokom patohistološke analize tkiva) i patofiziologije. Ipak, ovaj podatak treba uzeti sa rezervom pošto klasifikaciona preciznost i uopšte senzitivnost ovakvih modela može značajno da varira. Ovo je u osnovi posledica same varijabilnosti većine GLCM vrednosti u različitim eksperimentalnim uslovima, odnosno činjenici da ovi parametri teksture značajno zavise od protokola bojenja, tipa ćelija koje se koriste u eksperimentalnom radu, softverske platforme (na primer CellProfiler prema Mazda softveru) koja se koristi za GLCM analizu, kao i samih uslova tokom mikroskopije (osvetljenost, kontrast slike, saturacija itd.)

Ovde treba napomenuti da kod uzoraka koji su dovoljno veliki, ROC analizu nije neophodno raditi na modelima mašinskog učenja, već se ona može sprovesti za svaki GLCM (ili fraktalni, vejvlet ili neki drugi parametar) individualno. Ovakav pristup je već ranije sproveden u studiji gde su se poredili GLCM indikatori jedarne strukture kortikalnih i medularnih limfocita u timusu (Pantic et al. 2013). Na primer, u pojedinim slučajevima moguće je da inverzni moment razlike (koji je često jedan od najsenzitivnijih parametara GLCM analize) sam po sebi ima veoma veliku diskriminatornu moć u separaciji dve populacije ćelija u fiziološkim ili patološkim uslovima.

Kada su u pitanju neuronske mreže, treba reći da je perceptron u osnovi samo jedna od brojnih opcija koja može da se koristi za pospešivanje

senzitivnosti GLCM analize. Perceptron je u stvari jedan od najjednostavnijih ako ne najjednostavniji pristup u kreiranju neuronskih mreža. Jedna od danas često korišćenih alternativa u mašinskom učenju su konvolucione neuronske mreže (engl. „Convolutional neural network“), takođe poznate kao prostorno invarijantne veštačke neuronske mreže (engl. „Shift invariant artificial neural networks“, „Space invariant artificial neural networks“). Konvolucione neuronske mreže imaju nekoliko bitnih razlika u odnosu na perceptron koje mogu da ih učine efiksnijim u predikciji kako medicinskih, tako i nemedicinskih fenomena (Saltz et al 2018; Bos et al. 2021).

Konvencionalni perceptron ima takvu arhitekturu da svi neuroni jednog (npr. skrivenog) sloja korespondiraju sa neuronima sledećeg sloja dok kod konvolucionih neuronskih mreža to nije slučaj. Povezanost „svako sa svakim“ može dovesti do fenomena koji je u statistici i mašinskom učenju poznat kao „overfitting“ (Chang et al. 2018; Wen et al. 2020). Ovo u osnovi znači da mašina donosi zaključke o obrascima i zakonitostima organizacije podataka uzimajući u obzir razne rezidualne varijacije varijabli odnosno buku u podacima (engl. „noise“), iako ova varijabilnost ne bi trebalo da bude značajan faktor pri kreiranju modela. Da bi se ovaj fenomen izbegao, ili makar ublažio, potrebno je na neki način regulisati mrežu, a konvolucione neuronske mreže upravo predstavljaju takvu regulisanu verziju standardnog perceptrona. One tačnije aplikuju takozvani „hijerarhijski obrazac u podacima“, odnosno model počinje da se stvara prvo od najjednostavnijih obrazaca, a zatim se nadograđuje učenjem kroz sve kompleksnije i kompleksnije obrasce organizovanja podataka (Chang et al. 2018; Wen et al. 2020).

Interesantno je da se konvolucione neuronske mreže upravo imaju potencijalno najveći značaj u računarskoj viziji (Arafati et al. 2020; Maassen et al. 2021). Prepoznavanje slika i video zapisa, odnosno traženje specifičnih obrazaca u organizaciji i distribuciji rezolucioničkih jedinica su potencijalno važne primene ovakvog pristupa. Danas su ove mreže često u upotrebi kao deo softvera za prepoznavanje lica, ili programa za prepoznavanje rukopisa, ali njihova primena u medicinskim istraživanjima (a naročito u radiologiji i mikroskopiji) je danas u sve većem porastu. Fraktalna, teksturalna i vejevlet matematička analiza u osnovi ne daju vizuelne već numeričke podatke, ali si i podaci u takvom obliku mogu koristiti za treniranje ovakvih modela. Procene su da će u budućnosti konvolucione neuronske mreže značajno unaprediti razvoj opšte veštačke inteligencije (eng. „Artificial general intelligence“), ako se ispostavi da se ona uopšte može razviti (Arafati et al. 2020; Maassen et al. 2021).

Alternativa uključivanju GLCM i drugih parametara u razvoj mašinskog učenja bi bilo stvaranje takozvanih „skoring“ sistema, odnosno manuelno dodeljivanje ocena svakom parametru teksturalne, fraktalne odnosno vejevlet analiza. Ovakvi sistemi već postoje u raznim oblastima patologije i njima se može donekle povećati senzitivnost različitih testova i eseja. Način na koji ispituje diskriminatornu moć ovih sistema je sličan



kao i za pojedinačne parametre: najčešće je to ROC analiza odnosno merenje površine ispod ROC krive.

Pre bilo kakve praktične upotrebe kompjuterskih metoda opisanih u ovoj disertaciji, potrebno ih je detaljno ispitati i validovati na drugim ćelijskim populacijama i na drugim eksperimentalnim uslovima. Kao što je ranije rečeno, činjenica da nanočestice utiču na promene GLCM parametara hromatina hepatocita obojenih toluidin plavim bojenjem, ne mora nužno da znači da su slične promene uočljive kod hepatocita obojenih nekom drugim metodom. Sličnu analogiju možemo izvesti i kada razmatramo povezanost kompjuterskih parametara strukturne organizacije hromatina ćelija jetre sa indikatorima oksidativnog stresa. Konačno slična istraživanja će biti neophodno sprovesti i na drugim animalnim eksperimentalnim modelima da bismo izvukli konačan zaključak o korisnosti ovih kompjuterskih algoritama.

Sama činjenica da su u pojedinim slučajevima promene u GLCM parametrima praćene promenama u oksidativnom statusu, predstavlja veoma važan rezultat ovog istraživanja. Oksidativni stres i uopšte promene oksidativnog statusa tkiva su veoma važni fenomeni ne samo u oblasti toksikologije, već u celokupnoj patološkoj fiziologiji. Veliki broj bolesti i stanja su asocirane sa oksidativnim stresom. Ovo ne važi samo za one bolesti koje su posledica toksičnog delovanja nekog hemijskog agensa. Hronične nezarazne bolesti poput dijabetesa, neurološke bolesti poput Alchajmerove i Parkinsonove (za koje se inače ne zna tačan uzrok), čak i neke psihijatrijske bolesti se mogu makar na neki način povezati sa promenama u oksidativnom statusu u pojedinim tkivima. Oksidativni stres je generalno poslednjih decenija postao veoma aktuelna tema u fundamentalnim medicinskim istraživanjima i danas postoji veliki broj laboratorija i naučnih timova širom sveta kojima je ovo glavni predmet istraživanja (Mecocci et al. 2018).

Postoji mogućnost da će u budućnosti kompjuterski algoritmi korišćeni u ovoj disertaciji moći da se upotrebe u cilju predikcije oksidativnog stresa u in vitro uslovima, odnosno u ćelijskim kulturama. Reaktivna jedinjenja kiseonika oštećuju genetski materijal ćelije i mogu da dovedu do različitih strukturnih promena u jedru. Neke od tih promena su veoma male i ne mogu se uočiti ni standardnom mikroskopijom ni primenom nijednog trenutno poznatog kompjuterskog algoritma (Nathan & Cunningham-Bussel, 2017). Primeri bi bili pojedinačni prekidi ili mutacije u lancu DNK, ili male lokalne izmene u spiralizaciji DNK molekula. Ipak, oksidativni stres može da izazove i mnogo veće promene ekspresije pojedinih gena, kao i promene u aktivnosti čitavih hromatinskih regiona. U nekim slučajevima, ovo je praćeno redistribucijom hromatina u ćelijskom jedru i promenom odnosa euhromatin / heterohromatin. Ovakve epigenetske alteracije je ponekad moguće uočiti tokom patohistološke evaluacije ali u većini slučajeva one ostaju neprimećene. Ovo je zato što u normalnim, fiziološkim uslovima distribucija hromatina u jedru pokazuje značajan stepen varijabilnosti. Ova varijabilnost nije ista u svim ćelijama.

Primer bi bili upravo hepatociti kod kojih postoje značajne individualne razlike između ćelija. Ćelije u kulture sa druge strane imaju znatno manji stepen heterogenosti, delom zbog njihove morfološke i fiziološke specifičnosti, odnosno načina kultivisanja.

Konačno, oksidativni stres često dovodi do pokretanja signalnih puteva u jedru i citoplazmi koji prethode ili čine deo programirane ćelijske smrti (Nathan & Cunningham-Bussel, 2017). Ove putevi mogu (ali i ne moraju) da budu praćeni morfološkim promenama u jedru. Ove promene, kao što je ranije rečeno mogu da obuhvataju kondenzaciju hromatina i njegovu marginalizaciju, a to ne samo da je moguće detektovati analizom teksture nego je često jasno vidljivo čak i korišćenjem običnog svetlosnog mikroskopa.

Kada je u pitanju detekcija oksidativnog stresa, u budućnosti, verovatno će najveći potencijal GLCM i drugih metoda biti u identifikacije promena u hromatinu koje su po veličini manje od kondenzacije i marginalizacije, a veće od tačkastih mutacija i ekspresije pojedinačnih gena. Ovi procesi se u principu ne mogu videti svetlosnom mikroskopijom, a sa druge strane dovoljno su veliki da kompjuterski (možda uz pomoć veštačke inteligencije) ipak budu uočeni. Međutim, istraživanja ovog tipa, još uvek su na početku i biće potrebno još puno napora da se ispita primenljivost i reproducibilnost ovakvog pristupa.

Moguće je da će u budućnosti najveća prepreka primeni GLCM i drugih metoda u istraživačkom radu kliničkoj praksi biti potencijalne prepreke i nejasnoće u samom metodološkom pristupu, odnosno postojanje različitih metodoloških pristupa i strategija za računanje tekturalnih i fraktalnih parametara. Kad je u pitanju fraktalna analiza, očigledan primer bi bio postojanje brojnih softverskih platformi i činjenica da sve platforme ne koriste istu tehniku računanja fraktalne dimenzije. Samo u okviru ImageJ programa Nacionalnog instituta za zdravlje SAD postoje dva različita podprograma za fraktalnu analizu. Jedan pod nazivom „Fractal Box Count“ je uključen u standardnu postavku ImageJ i omogućava jednostavnu konstrukciju linije regresije u logaritamskom sistemu brojanja kvadrata na različitim skalama. Drugi podprogram je mnogo kompleksniji FracLac koji je korišćen i u okviru naše disertacije, koji često ne dolazi kao deo inicijalnog paketa ImageJ već ga je potrebno preuzeti i instalirati. Sam FracLac ima veliki broj opcija i metodoloških pristupa u računanju fraktalnih parametara. Ovo uključuje standardni „box count“ na binarizovanim slikama, automatsko konvertovanje u binarnu formu, kao i diferencijalnu fraktalnu dimenziju. Rezultati fraktalne dimenzije ova dva podprograma na istim ćelijama se često značajno razlikuju. Razlike su još veće kada se fraktalna analiza radi u nekom drugom programu (koji nije deo softvera ImageJ). Ovakve metodološke i tehničke nedoumice predstavljaju značajnu prepreku uspešnoj primeni fraktalne medicine u kliničkoj praksi. Zato će u budućnosti biti neophodno izvršiti neki vid standardizacije različitih kompjuterskih metoda, barem kada je u pitanju njihova primena u medicinskim naukama.

Kada je u pitanju GLCM analiza, postoje slična ograničenja u pogledu postojanja različitih softverskih platformi koji na istom uzorku ćelija ili životinja mogu proizvesti potpuno različite rezultate. Očigledan primer je drastična razlika koja postoji između softvera Mazda i CellProfiler. Međutim, možda još značajnije ograničenje je u činjenici da rezultati dobijeni u jednom istom softveru mogu značajno varirati između individualnih eksperimenata. Primer bi bilo postojanje očigledne razlike u vrednostima GLCM parametara dobijenim u fiziološkim uslovima, ali uz relativno male varijacije u ekspoziciji, osvetljenju saturaciji i drugim parametrima tokom dobijanja samih mikroskopskih slika. Prilikom mikroskopiranja, čak i male promene u uslovima mikroskopiranja (npr. količina prirodne svetlosti u prostoriji tokom pravljenja slika) može bitno uticati na konačne GLCM vrednosti. Zbog toga je neophodno uvek slikanje preparata za sve grupe unutar istog eksperimneta raditi u isto vreme, pod istim uslovima, a takođe za svaki eksperiment je neophodno imati zasebnu kontrolnu grupu životinja, odnosno ćelija.

Ipak, i pored očiglednih ograničenja kompjuterskih metoda u analizi hromatinske organizacije, one imaju nesumnjive prednosti. Sposobne su da na objektivan, nepristrasan način izvrše određene kalkulacije, i one ne zavise od subjektivne procene i mišljenja istraživača, odnosno lekara. Sa ovog aspekta, kada se porede nalazi dva ili više istrživača, reproducibilnost metoda je praktično 100% što nikad nije slučaj kada patolog dodeljuje ocene (skorove) tokom konvencionalne patohistološke analize.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Savremeni i inovativni metod GLCM analize je u pojedinim okolnostima u mogućnosti da detektuje diskretne strukturne promene hromatina hepatocita uzrokovane nanočesticama gvožđe (II, III) oksida, koje nisu uočljive uz pomoć metoda konvencionalne svetlosne mikroskopije. Parametri fraktalne analize hromatinske organizacije hepatocita jetre se ne menjaju značajno nakon izlaganje nanočesticama gvožđe (II, III) oksida.
2. Izlaganje nanočesticama gvožđe (II, III) oksida u trajanju od sedam dana dovodi do značajnih promena u oksidativnom statusu jetre koje ukazuju na postojanje oksidativnog stresa.
3. Nije utvrđena povezanost matematičkih parametara strukturne organizacije hromatina hepatocita i oksidativnog statusa jetre u fiziološkim uslovima i nakon izlaganja nanočesticama gvožđe (II, III) oksida.
4. Parametri teksturalne analize hromatinske organizacije imaju potencijalnu primenu u stvaranju savremenih i inovativnih tehnika mašinskog učenja i veštačke inteligencije u cilju boljeg razumevanja diskretnih promena u tkivu jetre izazvanih metalnim nanomaterijalima.

## 7. LITERATURA

1. Akhmedov S, Afanasyev S, Trusova M, Postnikov P, Rogovskaya Y, Grakova E, Kopeva K, Carreon Paz RK, Balakin S, Wiesmann HP, Opitz J, Kruppke B, Beshchasna N, Popov S. Chemically Modified Biomimetic Carbon-Coated Iron Nanoparticles for Stent Coatings: In Vitro Cytocompatibility and In Vivo Structural Changes in Human Atherosclerotic Plaques. *Biomedicines*. 2021;9(7):802.
2. Alberts B, Hopkin K. *Essential Cell Biology 5E ISE + Reg Card Paperback*. T&F/GARLAND; 5th Revised edition (June 1, 2019). ISBN-10 : 0393680398. ISBN-13 : 978-0393680393. GARLAND, New York.
3. Ali A, Shah T, Ullah R, Zhou P, Guo M, Ovais M, Tan Z, Rui Y. Review on Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Diverse Applications. *Front Chem*. 2021;9:629054.
4. Aloia L. Epigenetic Regulation of Cell-Fate Changes That Determine Adult Liver Regeneration After Injury. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:643055.
5. Alsaade FW, Aldhyani THH, Al-Adhaileh MH. Developing a Recognition System for Diagnosing Melanoma Skin Lesions Using Artificial Intelligence Algorithms. *Comput Math Methods Med*. 2021;2021:9998379.
6. Aljobaily N, Viereckl MJ, Hydock DS, Aljobaily H, Wu TY, Busekrus R, Jones B, Alberson J, Han Y. Creatine Alleviates Doxorubicin-Induced Liver Damage by Inhibiting Liver Fibrosis, Inflammation, Oxidative Stress, and Cellular Senescence. *Nutrients*. 2020;13(1):41.
7. Amani A, Dustparast M, Noruzpour M, Zakaria RA, Ebrahimi HA. Design and Invitro Characterization of Green Synthesized Magnetic Nanoparticles Conjugated with Multitargeted Poly Lactic Acid Copolymers for Co-delivery of siRNA and Paclitaxel. *Eur J Pharm Sci*. 2021;167:106007.
8. Andronache I, Marin M, Fischer R, Ahammer H, Radulovic M, Ciobotaru AM, Jelinek HF, Di Ieva A, Pintilii RD, Drăghici CC, Herman GV, Nicula AS, Simion AG, Loghin IV, Diaconu DC, Peptenatu D. Dynamics of Forest Fragmentation and Connectivity Using Particle and Fractal Analysis. *Sci Rep*. 2019;9(1):12228.
9. Andújar-Sánchez M, Smith AW, Clemente-Jimenez JM, Rodriguez-Vico F, Las Heras-Vazquez FJ, Jara-Pérez V, Cámara-Artigas A. Crystallographic and thermodynamic analysis of the binding of S-octylglutathione to the Tyr 7 to Phe mutant of glutathione S-transferase from *Schistosoma japonicum*. *Biochemistry*. 2005;44(4):1174-83.

10. Anssens LP, Weston AD, Singh D, Spears G, Harmsen WS, Takahashi N, Philbrick KA, Erickson BJ, Abu Dayyeh BK, Chari ST, Chandrasekhara V, Gleeson FC, Levy MJ, Pearson RK, Petersen BT, Vege SS, Majumder S. Determining age and sex-specific distribution of pancreatic whole-gland CT attenuation using artificial intelligence aided image segmentation: Associations with body composition and pancreatic cancer risk. *Pancreatology*. 2021;S1424-3903(21)00527-5.
11. Antonio E, Dos Reis Antunes Junior O, Marcano RGDJV, Diedrich C, da Silva Santos J, Machado CS, Khalil NM, Mainardes RM. Chitosan modified poly (lactic acid) nanoparticles increased the ursolic acid oral bioavailability. *Int J Biol Macromol*. 2021;172:133-142.
12. Arafati A, Morisawa D, Avendi MR, Amini MR, Assadi RA, Jafarkhani H, Kheradvar A. Generalizable fully automated multi-label segmentation of four-chamber view echocardiograms based on deep convolutional adversarial networks. *J R Soc Interface*. 2020;17(169):20200267.
13. Aranda J, Fernández-Arjona MDM, Alén F, Rivera P, Rubio L, Smith-Fernández I, Pavón FJ, Serrano A, Serrano-Castro PJ, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. Sudden cessation of fluoxetine before alcohol drinking reinstatement alters microglial morphology and TLR4/inflammatory neuroadaptation in the rat brain. *Brain Struct Funct*. 2021;226(7):2243-2264.
14. Arias I, Alter HJ, Boyer JL, Cohen DE, Shafritz DA, Thorgeirsson SS, Wolkoff AW. *The Liver: Biology and Pathobiology*, Sixth Edition. 2020 John Wiley & Sons Ltd. New York. Print ISBN:9781119436829. Online ISBN:9781119436812.
15. Avci D, Leblebicioglu MK, Poyraz M, Dogantekin E. A new method based on Adaptive Discrete Wavelet Entropy Energy and Neural Network Classifier (ADWEENN) for recognition of urine cells from microscopic images independent of rotation and scaling. *J Med Syst*. 2014;38(2):7.
16. Ayton S, Faux N, Bush A et al. Ferritin levels in the cerebrospinal fluid predict Alzheimer's disease outcomes and are regulated by APOE. *Nat Commun* 6. 2015: 6760.
17. Bakhtari A, Nazari S, Alaei S, Kargar-Abarghouei E, Mesbah F, Mirzaei E, Molaei MJ. Effects of Dextran-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles on Mouse Embryo Development, Antioxidant Enzymes and Apoptosis Genes Expression, and Ultrastructure of Sperm, Oocytes and Granulosa Cells. *Int J Fertil Steril*. 2020;14(3):161-170.
18. Bancaud A, Lavelle C, Huet S, Ellenberg J. A fractal model for nuclear organization: current evidence and biological implications. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(18):8783-92.

19. Bañobre-López M, Teijeiro A, Rivas J. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*. 2013;18(6):397-400.
20. Barajas JM, Lin CH, Sun HL, Alencastro F, Zhu AC, Aljuhani M, Navari L, Yilmaz SA, Yu L, Corps K, He C, Duncan AW, Ghoshal K. METTL3 Regulates Liver Homeostasis, Hepatocyte Ploidy, and Circadian Rhythm-Controlled Gene Expression in Mice. *Am J Pathol*. 2021:S0002-9440(21)00430-2.
21. Barragán-Montero A, Javaid U, Valdés G, Nguyen D, Desbordes P, Macq B, Willems S, Vandewinckele L, Holmström M, Löfman F, Michiels S, Souris K, Sterpin E, Lee JA. Artificial intelligence and machine learning for medical imaging: A technology review. *Phys Med*. 2021;83:242-256.
22. Bartmann C, Diessner J, Blettner M, Häusler S, Janni W, Kreienberg R, Krockenberger M, Schwentner L, Stein R, Stüber T, Wöckel A, Wischnowsky M. Factors influencing the development of visceral metastasis of breast cancer: A retrospective multi-center study. *Breast*. 2017;31:66-75.
23. Bednar J, Garcia-Saez I, Boopathi R, Cutter AR, Papai G, Reymer A, Syed SH, Lone IN, Tonchev O, Crucifix C, Menoni H, Papin C, Skoufias DA, Kurumizaka H, Lavery R, Hamiche A, Hayes JJ, Schultz P, Angelov D, Petosa C, Dimitrov S. Structure and Dynamics of a 197 bp Nucleosome in Complex with Linker Histone H1. *Mol Cell*. 2017 Jun 1;66(5):729. Erratum for: *Mol Cell*. 2017;66(3):384-397.e8.
24. Beig N, Khorrami M, Alilou M, Prasanna P, Braman N, Orooji M, Rakshit S, Bera K, Rajiah P, Ginsberg J, Donatelli C, Thawani R, Yang M, Jacono F, Tiwari P, Velcheti V, Gilkeson R, Linden P, Madabhushi A. Perinodular and Intranodular Radiomic Features on Lung CT Images Distinguish Adenocarcinomas from Granulomas. *Radiology*. 2019;290(3):783-792.
25. Belut E, Sánchez Jiménez A, Meyer-Plath A, Koivisto AJ, Koponen IK, Jensen ACØ, MacCalman L, Tuinman I, Fransman W, Domat M, Bivolarova M, van Tongeren M. Indoor dispersion of airborne nano and fine particles: Main factors affecting spatial and temporal distribution in the frame of exposure modeling. *Indoor Air*. 2019;29(5):803-816.
26. Bhandari S. Impact of intravenous iron on cardiac and skeletal oxidative stress and cardiac mitochondrial function in experimental uraemia chronic kidney disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2021;26(9):442-464.
27. Bhattacharjee S, Kim CH, Park HG, Prakash D, Madusanka N, Cho NH, Choi HK. Multi-Features Classification of Prostate Carcinoma Observed in Histological Sections: Analysis of Wavelet-Based Texture and Colour Features. *Cancers (Basel)*. 2019;11(12):1937.

28. Bos JM, Attia ZI, Albert DE, Noseworthy PA, Friedman PA, Ackerman MJ. Use of Artificial Intelligence and Deep Neural Networks in Evaluation of Patients With Electrocardiographically Concealed Long QT Syndrome From the Surface 12-Lead Electrocardiogram. *JAMA Cardiol.* 2021;6(5):532-538.
29. Brandao LM, Monhart M, Schötzau A, Ledolter AA, Palmowski-Wolfe AM. Wavelet decomposition analysis in the two-flash multifocal ERG in early glaucoma: a comparison to ganglion cell analysis and visual field. *Doc Ophthalmol.* 2017;135(1):29-42.
30. Brüggemann M, Kotrová M, Knecht H, Bartram J, Boudjogrha M, Bystry V, Fazio G, Froňková E, Giraud M, Grioni A, Hancock J, Hancock J, Herrmann D, Jiménez C, Krejci A, Moppett J, Reigl T, Salson M, Scheijen B, Schwarz M, Songia S, Svaton M, van Dongen JJM, Villarese P, Wakeman S, Wright G, Cazzaniga G, Davi F, García-Sanz R, Gonzalez D, Groenen PJTA, Hummel M, Macintyre EA, Stamatopoulos K, Pott C, Trka J, Darzentas N, Langerak AW; EuroClonality-NGS working group. Standardized next-generation sequencing of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations for MRD marker identification in acute lymphoblastic leukaemia; a EuroClonality-NGS validation study. *Leukemia.* 2019; 33(9): 2241-2253.
31. Bulloni M, Sandrini G, Stacchiotti I, Barberis M, Calabrese F, Carvalho L, Fontanini G, Alì G, Fortarezza F, Hofman P, Hofman V, Kern I, Maiorano E, Maragliano R, Marchiori D, Metovic J, Papotti M, Pezzuto F, Pisa E, Rimmelink M, Serio G, Marzullo A, Trabucco SMR, Pennella A, De Palma A, Marulli G, Fassina A, Maffeis V, Nesi G, Naheed S, Rea F, Ottensmeier CH, Sessa F, Uccella S, Pelosi G, Pattini L. Automated Analysis of Proliferating Cells Spatial Organisation Predicts Prognosis in Lung Neuroendocrine Neoplasms. *Cancers (Basel).* 2021;13(19):4875.
32. Burcham PC. Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: a new tool for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2007;56(1):18-22.
33. Cabral D, Coscas F, Pereira T, François C, Geraldès C, Laiginhas R, Rodrigues C, Kashi AK, Nogueira V, Falcão M, Papoila AL, Lupidi M, Coscas G, Cohen SY, Souied E. Quantitative Optical Coherence Tomography Angiography Biomarkers in a Treat-and-Extend Dosing Regimen in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Transl Vis Sci Technol.* 2020;9(3):18.
34. Capaccio C, Perrier JR, Cunha L, Mahnke RC, Lörch T, Porter M, Smith CL, Damer K, Bourland JD, Frizzell B, Torelli J, Vasquez M, Brower JB, Doyle-Eisele M, Taveras M, Turner H, Brenner DJ, Kowalski R. CytoRADx: A High-Throughput, Standardized Biodosimetry



- Diagnostic System Based on the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay. *Radiat Res.* 2021: in press.
35. Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, Guertin DA, Chang JH, Lindquist RA, Moffat J, Golland P, Sabatini DM (2006) CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 7(10):R100.
  36. Castelli C, Losa GA. Ultrastructural complexity of nuclear components during early apoptotic phases in breast cancer cells. *Anal Cell Pathol.* 2001;23(1):1-9.
  37. Chai RJ, Werner H, Li PY, Lee YL, Nyein KT, Solovei I, Luu TDA, Sharma B, Navasankari R, Maric M, Sim LYE, Loh YJ, Aliwarga E, Cheong JWL, Chojnowski A, Autio MI, Haiyang Y, Boon Tan KK, Keng CT, Ng SL, Chew WL, Ferenczi M, Burke B, Foo RSY, Stewart CL. Disrupting the LINC complex by AAV mediated gene transduction prevents progression of Lamin induced cardiomyopathy. *Nat Commun.* 2021;12(1):4722.
  38. Chang K, Bai HX, Zhou H, Su C, Bi WL, Agbodza E, Kavouridis VK, Senders JT, Boaro A, Beers A, Zhang B, Capellini A, Liao W, Shen Q, Li X, Xiao B, Cryan J, Ramkissoon S, Ramkissoon L, Ligon K, Wen PY, Bindra RS, Woo J, Arnaout O, Gerstner ER, Zhang PJ, Rosen BR, Yang L, Huang RY, Kalpathy-Cramer J. Residual Convolutional Neural Network for the Determination of IDH Status in Low- and High-Grade Gliomas from MR Imaging. *Clinical Cancer Research.* 2018;24(5):1073-1081.
  39. Chang W, Antoku S, Östlund C, Worman HJ, Gundersen GG. Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex-mediated actin-dependent nuclear positioning orients centrosomes in migrating myoblasts. *Nucleus.* 2015;6(1):77-88.
  40. Chaves-Arquero B, Pantoja-Uceda D, Roque A, Ponte I, Suau P, Jiménez MA. A CON-based NMR assignment strategy for pro-rich intrinsically disordered proteins with low signal dispersion: the C-terminal domain of histone H1.0 as a case study. *J Biomol NMR.* 2018;72(3-4):139-148.
  41. Che L, Yao H, Yang CL, Guo NJ, Huang J, Wu ZL, Zhang LY, Chen YY, Liu G, Lin ZN, Lin YC. Cyclooxygenase-2 modulates ER-mitochondria crosstalk to mediate superparamagnetic iron oxide nanoparticles induced hepatotoxicity: an in vitro and in vivo study. *Nanotoxicology.* 2020;14(2):162-180.
  42. Chen N, Li Z, Huang Y, Xiao C, Shen X, Pan S, Su Q, Wang Z. Iron parameters in pregnant women with beta-thalassaemia minor combined with iron deficiency anaemia compared to pregnant women with iron deficiency anaemia alone demonstrate the safety of iron supplementation in beta-thalassaemia minor during pregnancy. *Br J Haematol.* 2021: in press.

43. Chen Z, Peng Y, Li Y, Xie X, Wei X, Yang G, Zhang H, Li N, Li T, Qin X, Li S, Wu C, You F, Yang H, Liu Y. Aptamer-Dendrimer Functionalized Magnetic Nano-Octahedrons: Theranostic Drug/Gene Delivery Platform for Near-Infrared/Magnetic Resonance Imaging-Guided Magnetochemotherapy. *ACS Nano*. 2021: in press.
44. Cherkezyan L, Stypula-Cyrus Y, Subramanian H, White C, Dela Cruz M, Wali RK, Goldberg MJ, Bianchi LK, Roy HK, Backman V. Nanoscale changes in chromatin organization represent the initial steps of tumorigenesis: a transmission electron microscopy study. *BMC Cancer*. 2014;14:189.
45. Chistiakov DA, Savost'ianov KV, Chugunova LA, Shamkhalova MSh, Shestakova MV, Milen'kaia TM, Nosikov VV, Dedov II, Debabov VG. Assotsiativnyĭ analiz svyazi mutatsii C1167T v gene katalazy i polimorfnoĭ markera D6S392 riadom s genom Mn-zavisimoĭ superoksiddismutazy s diabeticheskimi mikroangiopatiiami [Associative analysis of the connection between mutation C1167T in the catalase gene and polymorphic marker D6S392 nearby the Mn-dependent superoxide dismutase gene with diabetic microangiopathies]. *Ter Arkh*. 2002;74(10):28-30.
46. Cotin G, Blanco-Andujar C, Perton F, Asín L, de la Fuente JM, Reichardt W, Schaffner D, Ngyen DV, Mertz D, Kiefer C, Meyer F, Spassov S, Ersen O, Chatzidakis M, Botton GA, Hénoumont C, Laurent S, Greneche JM, Teran FJ, Ortega D, Felder-Flesch D, Begin-Colin S. Unveiling the role of surface, size, shape and defects of iron oxide nanoparticles for theranostic applications. *Nanoscale*. 2021;13(34):14552-14571.
47. Crichton R. Iron Metabolism: From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences, Fourth Edition. ISBN:9781118925614. Online ISBN:9781118925645. DOI:10.1002/9781118925645 2016 John Wiley & Sons, Ltd. New York.
48. da Silva LG, da Silva Monteiro WRS, de Aguiar Moreira TM, Rabelo MAE, de Assis EACP, de Souza GT. Fractal dimension analysis as an easy computational approach to improve breast cancer histopathological diagnosis. *Appl Microsc*. 2021;51(1):6.
49. Davidovic LM, Laketic D, Cumic J, Jordanova E, Pantic I. Application of artificial intelligence for detection of chemico-biological interactions associated with oxidative stress and DNA damage. *Chem Biol Interact*. 2021;345:109533.
50. De Bels D, Tillmans F, Corazza F, Bizzari M, Germonpre P, Radermacher P, Orman KG, Balestra C. Hyperoxia Alters Ultrastructure and Induces Apoptosis in Leukemia Cell Lines. *Biomolecules*. 2020;10(2):282.
51. Dinčić M, Todorović J, Nešović Ostojić J, Kovačević S, Dunđerović D, Lopičić S, Spasić S, Radojević-Škodrić S, Stanisavljević D, Ilić AŽ. The

- Fractal and GLCM Textural Parameters of Chromatin May Be Potential Biomarkers of Papillary Thyroid Carcinoma in Hashimoto's Thyroiditis Specimens. *Microsc Microanal.* 2020;26(4):717-730.
52. Dong D, Fang MJ, Tang L, Shan XH, Gao JB, Giganti F, Wang RP, Chen X, Wang XX, Palumbo D, Fu J, Li WC, Li J, Zhong LZ, De Cobelli F, Ji JF, Liu ZY, Tian J. Deep learning radiomic nomogram can predict the number of lymph node metastasis in locally advanced gastric cancer: an international multicenter study. *Annals Oncology.* 2020;31(7):912-920.
  53. Du J, Zhang Y, Jin Z, Wu H, Cang J, Shen Y, Miao F, Zhang A, Zhang Y, Zhang J, Teng G. Targeted NIRF/MR dual-mode imaging of breast cancer brain metastasis using BRBP1-functionalized ultra-small iron oxide nanoparticles. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020;116:111188.
  54. Duca L, Ottolenghi S, Coppola S, Rinaldo R, Dei Cas M, Rubino FM, Paroni R, Samaja M, Chiumello DA, Motta I. Differential Redox State and Iron Regulation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Acute Respiratory Distress Syndrome and Coronavirus Disease 2019. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(9):1460.
  55. Easo SL, Mohanan PV. Hepatotoxicity evaluation of dextran stabilized iron oxide nanoparticles in Wistar rats. *Int J Pharm.* 2016 Jul 25;509(1-2):28-34. Erratum in: *Int J Pharm.* 2021;607:121028.
  56. Falk T, Mai D, Bensch R, Çiçek Ö, Abdulkadir A, Marrakchi Y, Böhm A, Deubner J, Jäckel Z, Seiwald K, Dovzhenko A, Tietz O, Dal Bosco C, Walsh S, Saltukoglu D, Tay TL, Prinz M, Palme K, Simons M, Diester I, Brox T, Ronneberger O. U-Net: deep learning for cell counting, detection, and morphometry. *Nat Methods.* 2019 Jan;16(1):67-70. Erratum in: *Nat Methods.* 2019;16(4):351.
  57. Fang M, Chanwimol K, Maram J, Datto O'Keefe GA, Wykoff CC, Sarraf D, Brown A, Lampen SIR, Zhou B, Rusakevich AM, Sadda S. Morphological characteristics of eyes with neovascular age-related macular degeneration and good long-term visual outcomes after anti-VEGF therapy. *British Journ Ophthalmol.* 2021:bjophthalmol-2021-319602.
  58. Feldman M, Friedman LC, Brandt LJ. *Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease E-Book: Pathophysiology, Diagnosis, Management.* 10th edition. Elsevier Health Sciences, 2015. ISBN1455749893, 9781455749898.
  59. Fowler JC, Cope N, Knights J, Phiri P, Makin A, Peters-Strickland T, Rathod S. Hummingbird Study: a study protocol for a multicentre exploratory trial to assess the acceptance and performance of a digital medicine system in adults with schizophrenia, schizoaffective disorder or first-episode psychosis. *BMJ Open.* 2019;9(6):e025952.

60. García-Belda P, Prima-García H, Aliena-Valero A, Castelló-Ruiz M, Ulloa-Navas MJ, Ten-Esteve A, Martí-Bonmatí L, Salom JB, García-Verdugo JM, Gil-Perotín S. Intravenous SPION-labeled adipocyte-derived stem cells targeted to the brain by magnetic attraction in a rat stroke model: An ultrastructural insight into cell fate within the brain. *Nanomedicine*. 2021;102464.
61. Gavilán H, Avugadda SK, Fernández-Cabada T, Soni N, Cassani M, Mai BT, Chantrell R, Pellegrino T. Magnetic nanoparticles and clusters for magnetic hyperthermia: optimizing their heat performance and developing combinatorial therapies to tackle cancer. *Chem Soc Rev*. 2021;50(20):11614-11667.
62. Gavilán H, Simeonidis K, Myrovali E, Myrovali E, Mazarío E, Chubykalo-Fesenko O, Chantrell R, Balcells L, Angelakeris M, Morales MP, Serantes D. How size, shape and assembly of magnetic nanoparticles give rise to different hyperthermia scenarios. *Nanoscale*. 2021;13(37):15631-15646.
63. Ghossaini M, Mountjoy E, Carmona M, Peat G, Schmidt EM, Hercules A, Fumis L, Miranda A, Carvalho-Silva D, Buniello A, Burdett T, Hayhurst J, Baker J, Ferrer J, Gonzalez-Uriarte A, Jupp S, Karim MA, Koscielny G, Machlitt-Northen S, Malangone C, Pendlington ZM, Roncaglia P, Suveges D, Wright D, Vrousseau O, Papa E, Parkinson H, MacArthur JAL, Todd JA, Barrett JC, Schwartzentruber J, Hulcoop DG, Ochoa D, McDonagh EM, Dunham I. Open Targets Genetics: systematic identification of trait-associated genes using large-scale genetics and functional genomics. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D1311-D1320.
64. Gomariz A, Portenier T, Helbling PM, Isringhausen S, Suessbier U, Nombela-Arrieta C, Goksel O. Modality Attention and Sampling Enables Deep Learning with Heterogeneous Marker Combinations in Fluorescence Microscopy. *Nat Mach Intell*. 2021;3(9):799-811.
65. Hamada K, Kuroda M, Yoshimura Y, Khasawneh A, Barham M, Tekiki N, Sugianto I, Bamgbose BO, Konishi K, Sugimoto K, Ishizaka H, Kurozumi A, Matsushita T, Ohno S, Kanazawa S, Asami J. Evaluation of the Imaging Process for a Novel Subtraction Method Using Apparent Diffusion Coefficient Values. *Acta Med Okayama*. 2021;75(2):139-145.
66. Hambright WS, Fonseca RS, Chen L, Na R, Ran Q. Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration. *Redox Biol*. 2017;12:8-17.
67. Hannigan GD, Prihoda D, Palicka A, Soukup J, Klempir O, Rampula L, Durcak J, Wurst M, Kotowski J, Chang D, Wang R, Piizzi G, Temesi G, Hazuda DJ, Woelk CH, Bitton DA. A deep learning genome-mining strategy for biosynthetic gene cluster prediction. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(18):e110.

68. Hashemzadeh N, Dolatkah M, Aghanejad A, Barzegar-Jalali M, Omid Y, Adibkia K, Barar J. Folate receptor-mediated delivery of 1-MDT-loaded mesoporous silica magnetic nanoparticles to target breast cancer cells. *Nanomedicine (Lond)*. 2021;16(24):2137-2154.
69. Hiscock HG, Hiscock TW, Kattnig DR, Scrivener T, Lewis AM, Manolopoulos DE, Hore PJ. Navigating at night: fundamental limits on the sensitivity of radical pair magnetoreception under dim light. *Q Rev Biophys*. 2019;52:e9.
70. Hong Z, Sun X, Sun X, Cao J, Yang Z, Pan Z, Yu T, Dong J, Zhou B, Bai J. Enzyme-induced morphological transformation of drug carriers: Implications for cytotoxicity and the retention time of antitumor agents. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;129:112389.
71. Horvat N, Araujo-Filho JAB, Assuncao-Jr AN, Machado FAM, Sims JA, Rocha CCT, Oliveira BC, Horvat JV, Maccali C, Puga ALBL, Chagas AL, Menezes MR, Cerri GG. Radiomic analysis of MRI to Predict Sustained Complete Response after Radiofrequency Ablation in Patients with Hepatocellular Carcinoma - A Pilot Study. *Clinics (Sao Paulo)*. 2021;76:e2888.
72. Huang F, Pariante CM, Borsini A. From dried bear bile to molecular investigation: A systematic review of the effect of bile acids on cell apoptosis, oxidative stress and inflammation in the brain, across pre-clinical models of neurological, neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. *Brain Behavior Immunity*. 2021;99:132-146.
73. Huang L, Feng B, Li Y, Liu Y, Chen Y, Chen Q, Li C, Huang W, Xue H, Li X, Zhou T, Li R, Long W, Feng ST. Computed Tomography-Based Radiomics Nomogram: Potential to Predict Local Recurrence of Gastric Cancer After Radical Resection. *Front Oncol*. 2021;11:638362.
74. Huang XJ, Choi YK, Im HS, Yarimaga O, Yoon E, Kim HS. Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques. *Sensors (Basel)*. 2006;6:756-82.
75. Ibrahim A, Vallières M, Woodruff H, Primakov S, Beheshti M, Keek S, Refaee T, Sanduleanu S, Walsh S, Morin O, Lambin P, Hustinx R, Mottaghy FM. Radiomics Analysis for Clinical Decision Support in Nuclear Medicine. *Semin Nucl Med*. 2019;49(5):438-449.
76. Ibrahim N, Jamaluddin ND, Tan LL, Mohd Yusof NY. A Review on the Development of Gold and Silver Nanoparticles-Based Biosensor as a Detection Strategy of Emerging and Pathogenic RNA Virus. *Sensors (Basel)*. 2021;21(15):5114.
77. Izquierdo-Bouldstridge A, Bustillos A, Bonet-Costa C, Aribau-Miralbés P, García-Gomis D, Dabad M, Esteve-Codina A, Pascual-Reguant L, Peiró S, Esteller M, Murtha M, Millán-Ariño L, Jordan A. Histone H1 depletion triggers an interferon response in cancer cells

- via activation of heterochromatic repeats. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(20):11622-11642.
78. Jacob PJ, Masarudin MJ, Hussein MZ, Rahim RA. Facile aerobic construction of iron based ferromagnetic nanostructures by a novel microbial nanofactory isolated from tropical freshwater wetlands. *Microb Cell Fact.* 2017;16(1):175.
79. Jacobson KH, Gunsolus IL, Kuech TR, Troiano JM, Melby ES, Lohse SE, Hu D, Chrisler WB, Murphy CJ, Orr G, Geiger FM, Haynes CL, Pedersen JA. Lipopolysaccharide Density and Structure Govern the Extent and Distance of Nanoparticle Interaction with Actual and Model Bacterial Outer Membranes. *Environ Sci Technol.* 2015;49(17):10642-50.
80. Jiao W, Atwal G, Polak P, Karlic R, Cuppen E; PCAWG Tumor Subtypes and Clinical Translation Working Group, Danyi A, de Ridder J, van Herpen C, Lolkema MP, Steeghs N, Getz G, Morris Q, Stein LD; PCAWG Consortium. A deep learning system accurately classifies primary and metastatic cancers using passenger mutation patterns. *Nat Commun.* 2020;11(1):728.
81. Jibb L, Nathan PC, Breakey V, Fernandez C, Johnston D, Lewis V, McKillop S, Patel S, Sabapathy C, Strahlendorf C, Victor JC, Moretti ME, Nguyen C, Hundert A, Cassiani C, El-Khechen Richandi G, Insull H, Hamilton R, Fang G, Kuczynski S, Stinson J. Pain Squad+ smartphone app to support real-time pain treatment for adolescents with cancer: protocol for a randomised controlled trial. *BMJ Open.* 2020;10(3):e037251.
82. Jurczynszyn K, Trzeciakowski W, Kozakiewicz M, Kida D, Malec K, Karolewicz B, Konopka T, Trzeciakowski W Zborowski J. Fractal Dimension and Texture Analysis of Lesion Autofluorescence in the Evaluation of Oral Lichen Planus Treatment Effectiveness. *Materials (Basel).* 2021;14(18):5448.
83. Kaduri M, Sela M, Kagan S, Poley M, Abumanhal-Masarweh H, Mora-Raimundo P, Ouro A, Dahan N, Hershkovitz D, Shklover J, Shainsky-Roitman J, Buganim Y, Schroeder A. Targeting neurons in the tumor microenvironment with bupivacaine nanoparticles reduces breast cancer progression and metastases. *Science Advice.* 2021;7(41):eabj5435.
84. Kametsky L, Jones TR, Fraser A, Bray MA, Logan DJ, Madden KL, Ljosa V, Rueden C, Eliceiri KW, Carpenter AE (2011) Improved structure, function and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. *Bioinformatics* 27(8):1179-1180.
85. Kanai R, Ohshima K, Ishii K, Sonohara M, Ishikawa M, Yamaguchi M, Ohtani Y, Kobayashi Y, Ota H, Kimura F. Discriminant analysis and interpretation of nuclear chromatin distribution and coarseness using

- gray-level co-occurrence matrix features for lobular endocervical glandular hyperplasia. *Diagn Cytopathol.* 2020;48(8):724-735.
86. Karimi S, Tabatabaei SN, Gutleb AC, Ghaffari Novin M, Ebrahimzadeh-Bideskan A, Shams Mofarahe Z. The effect of PEGylated iron oxide nanoparticles on sheep ovarian tissue: An ex-vivo nanosafety study. *Heliyon.* 2020;6(9):e04862.
  87. Kasi PM, Sawyer S, Guilford J, Munro M, Ellers S, Wulff J, Hook N, Krinshpun S, Koyen Malashevich A, Malhotra M, Rodriguez A, Moshkevich S, Grothey A, Kopetz S, Billings P, Aleshin A. BESPOKE study protocol: a multicentre, prospective observational study to evaluate the impact of circulating tumour DNA guided therapy on patients with colorectal cancer. *British Medical Journal Open.* 2021;11(9):e047831.
  88. Katz BZ, Feldman MD, Tessema M, Benisty D, Toles GS, Andre A, Shtreker B, Paz FM, Edwards J, Jengehino D, Bagg A, Avivi I, Pozdnyakova O. Evaluation of Scopio Labs X100 Full Field PBS: The first high-resolution full field viewing of peripheral blood specimens combined with artificial intelligence-based morphological analysis. *Int J Lab Hematol.* 2021: in press.
  89. Kel A, Boyarskikh U, Stegmaier P, Leskov LS, Sokolov AV, Yevshin I, Mandrik N, Stelmashenko D, Koschmann J, Kel-Margoulis O, Krull M, Martínez-Cardús A, Moran S, Esteller M, Kolpakov F, Filipenko M, Wingender E. Walking pathways with positive feedback loops reveal DNA methylation biomarkers of colorectal cancer. *BMC Bioinformatics.* 2019;20(Suppl 4):119.
  90. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry.* 2019;12(7): 908-931
  91. Kim S, Lee H, Lim JW, Kim H. Astaxanthin induces NADPH oxidase activation and receptor-interacting protein kinase 1-mediated necroptosis in gastric cancer AGS cells. *Molec Med Rep.* 2021;24(6):837.
  92. Kociołek M, Materka A, Strzelecki M & Szczypinski P (2001). Discrete wavelet transform-derived features for digital image texture analysis. In *Proc. Of International Conference on Signals and Electronic Systems*, 18–21 September 2001, pp. 163–168.
  93. Kondo T, Otsuka Y, Aoki H, Goto Y, Kawaguchi Y, Waguri-Nagaya Y, Miyazawa K, Goto S, Aoyama M. The inducible nitric oxide synthase pathway promotes osteoclastogenesis under hypoxic culture conditions. *Am J Pathol.* 2021:S0002-9440(21)00390-4.
  94. Kopeć Z, Starzyński RR, Jończy A, Mazgaj R, Lipiński P. Role of Iron Metabolism-Related Genes in Prenatal Development: Insights from Mouse Transgenic Models. *Genes (Basel).* 2021;12(9):1382.
  95. Korda AI, Ruef A, Neufang S, Davatzikos C, Borgwardt S, Meisenzahl EM, Koutsouleris N. Identification of voxel-based texture

- abnormalities as new biomarkers for schizophrenia and major depressive patients using layer-wise relevance propagation on deep learning decisions. *Psychiatry Research Neuroimaging*. 2021;313:111303.
96. Kosuge H, Nakamura M, Oyane A, Tajiri K, Murakoshi N, Sakai S, Sato A, Taninaka A, Chikamori T, Shigekawa H, Aonuma K. Potential of Gold Nanoparticles for Noninvasive Imaging and Therapy for Vascular Inflammation : Gold Nanoparticles for Vascular Imaging and Therapy. *Mol Imaging Biol*. 2021: in press.
  97. Kott KA, Morel-Kopp MC, Vernon ST, Takagi Y, Di Bartolo BA, Peter K, Yang JY, Grieve SM, Ward C, Figtree GA. Association of Global Coagulation Profiles With Cardiovascular Risk Factors and Atherosclerosis: A Sex Disaggregated Analysis From the BioHEART-CT Study. *J Am Heart Assoc*. 2021;10(20):e020604.
  98. Krupickova S, Hatipoglu S, DiSalvo G, Voges I, Redfearn D, Foldvari S, Eichhorn C, Chivers S, Puricelli F, Delle-Donne G, Barth C, Pennell DJ, Prasad SK, Daubeney PEF. Left ventricular noncompaction in pediatric population: could cardiovascular magnetic resonance derived fractal analysis aid diagnosis? *J Cardiovasc Magn Reson*. 2021;23(1):90.
  99. Lagatuz M, Vyas RJ, Predovic M, Lim S, Jacobs N, Martinho M, Valizadegan H, Kao D, Oza N, Theriot CA, Zanello SB, Taibbi G, Vizzeri G, Dupont M, Grant MB, Lindner DJ, Reinecker HC, Pinhas A, Chui TY, Rosen RB, Moldovan N, Vickerman MB, Radhakrishnan K, Parsons-Wingerter P. Vascular Patterning as Integrative Readout of Complex Molecular and Physiological Signaling by VESsel GENERation Analysis. *J Vasc Res*. 2021;58(4):207-230.
  100. Lambadiari V, Thymis J, Kouretas D, Skaperda Z, Tekos F, Kousathana F, Kountouri A, Balampanis K, Parissis J, Andreadou I, Tsoumani M, Chania C, Katogiannis K, Dimitriadis G, Bamias A, Ikonomidis I. Effects of a 12-Month Treatment with Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonists, Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors, and Their Combination on Oxidant and Antioxidant Biomarkers in Patients with Type 2 Diabetes. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(9):1379.
  101. Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE (2007) CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques* 42(1):71-75.
  102. Lemine OM, Madkhali N, Alshammari M, Algessair S, Gismelseed A, El Mir L, Hjiri M, Yousif AA, El-Boubbou K. Maghemite ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-TiO<sub>2</sub> Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Applications: Synthesis, Characterization and Heating Efficiency. *Materials (Basel)*. 2021;14(19):5691.



103. Leskova GF. Zashchitnyĭ éffekt razlichnykh form superoksidodismutazy na fosfolipidnyĭ sostav plazmaticheskikh membran gepatotsitov i adipotsitov i spektr lipoproteinov krovi pri gemorragicheskom shoke u koshek [Protective effect of various forms of superoxide dismutase on phospholipid composition of hepatocyte and adipocyte plasma membranes and blood lipoprotein spectrum during hemorrhagic shock on cats]. *Vopr Med Khim.* 1999; 45(5):389-97.
104. Li C, Zhu Y, Zhang T, Nie Y, Shi W, Ai S. Iron nanoparticles supported on N-doped carbon foam with honeycomb microstructure: An efficient potassium peroxymonosulfate activator for the degradation of fluoranthene in water and soil. *Chemosphere.* 2021;286(Pt 1):131603.
105. Li D, Cui Y, Hou L, Bian Z, Yang Z, Xu R, Jia Y, Wu Z, Yang X. Diffusion kurtosis imaging-derived histogram metrics for prediction of resistance to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal adenocarcinoma: Preliminary findings. *Eur Journal Radiol.* 2021; 144: 109963.
106. Li X, Li B, Liu R, Dong Y, Zhao Y, Wu Y. Development of pH-responsive nanocomposites with remarkably synergistic antibiofilm activities based on ultrasmall silver nanoparticles in combination with aminoglycoside antibiotics. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2021;208:112112.
107. Li Y, Eshein A, Virk RKA, Eid A, Wu W, Frederick J, VanDerway D, Gladstein S, Huang K, Shim AR, Anthony NM, Bauer GM, Zhou X, Agrawal V, Pujadas EM, Jain S, Esteve G, Chandler JE, Nguyen TQ, Bleher R, de Pablo JJ, Szleifer I, Dravid VP, Almossalha LM, Backman V. Nanoscale chromatin imaging and analysis platform bridges 4D chromatin organization with molecular function. *Sci Adv.* 2021;7(1):eabe4310.
108. Li Y, Qin C, Song Y, Yan H, Han S, Zhou H, Wei A, Zhang G, Chen R, Hu J, Jing M, Xiao L, Jia S. Great enhancement on two-photon photoluminescence imaging contrast of Au nanoparticles via double-pulse femtosecond laser excitation with controlled phase differences. *Opt Express.* 2021;29(15):22855-22867.
109. Liang H, Tsui BY, Ni H, Valentim CCS, Baxter SL, Liu G, Cai W, Kermany DS, Sun X, Chen J, He L, Zhu J, Tian P, Shao H, Zheng L, Hou R, Hewett S, Li G, Liang P, Zang X, Zhang Z, Pan L, Cai H, Ling R, Li S, Cui Y, Tang S, Ye H, Huang X, He W, Liang W, Zhang Q, Jiang J, Yu W, Gao J, Ou W, Deng Y, Hou Q, Wang B, Yao C, Liang Y, Zhang S, Duan Y, Zhang R, Gibson S, Zhang CL, Li O, Zhang ED, Karin G, Nguyen N, Wu X, Wen C, Xu J, Xu W, Wang B, Wang W, Li J, Pizzato B, Bao C, Xiang D, He W, He S, Zhou Y, Haw W, Goldbaum M, Tremoulet A, Hsu CN, Carter H, Zhu L, Zhang K, Xia H. Evaluation

- and accurate diagnoses of pediatric diseases using artificial intelligence. *Nat Med*. 2019;25(3):433-438.
110. Liang W, Liu Y, Zhou K, Jian P, Zhang Q, Chang Z, Wu L, Chang H, Zhang L. Ginsenoside Rb1 prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior by inhibiting inflammation and neural dysfunction and F2 elicits a novel antidepressant-like effect: A metabolite-based network pharmacology study. *J Ethnopharmacol*. 2021;114655.
111. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, Amit I, Lajoie BR, Sabo PJ, Dorschner MO, Sandstrom R, Bernstein B, Bender MA, Groudine M, Gnirke A, Stamatoyannopoulos J, Mirny LA, Lander ES, Dekker J. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*. 2009;326(5950):289-93.
112. Liu D, Shoag JE, Poliak D, Goueli RS, Ravikumar V, Redmond D, Vosoughi A, Fontugne J, Pan H, Lee D, Thomas D, Salari K, Wang Z, Romanel A, Te A, Lee R, Chughtai B, Olumi AF, Mosquera JM, Demichelis F, Elemento O, Rubin MA, Sboner A, Barbieri CE. Integrative multiplatform molecular profiling of benign prostatic hyperplasia identifies distinct subtypes. *Nat Commun*. 2020;11(1):1987.
113. Liu S, Wang Y, Xu K, Wang Z, Fan X, Zhang C, Li S, Qiu X, Jiang T. Relationship between necrotic patterns in glioblastoma and patient survival: fractal dimension and lacunarity analyses using magnetic resonance imaging. *Sci Rep*. 2017;7(1):8302.
114. Losa GA, Castelli C. Nuclear patterns of human breast cancer cells during apoptosis: characterisation by fractal dimension and co-occurrence matrix statistics. *Cell Tissue Res*. 2005;322(2):257-67.
115. Maassen O, Fritsch S, Palm J, Deffge S, Kunze J, Marx G, Riedel M, Schuppert A, Bickenbach J. Future Medical Artificial Intelligence Application Requirements and Expectations of Physicians in German University Hospitals: Web-Based Survey. *J Med Internet Res*. 2021;23(3):e26646.
116. Madkour, LH. Reactive Oxygen Species (ROS), Nanoparticles, and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced Cell Death Mechanisms. 2020 Academic Press - Elsevier Inc. ISBN 978-0-12-822481-6.
117. Magro M, Cozza G, Molinari S, Venerando A, Baratella D, Miotto G, Zennaro L, Rossetto M, Frömmel J, Kopečná M, Šebela M, Salviulo G, Vianello F. Role of carboxylic group pattern on protein surface in the recognition of iron oxide nanoparticles: A key for protein corona formation. *Int J Biol Macromol*. 2020;164:1715-1728.
118. Majumder P, Singh A, Wang Z, Dutta K, Pahwa R, Liang C, Andrews C, Patel NL, Shi J, de Val N, Walsh STR, Jeon AB, Karim B,

- Hoang CD, Schneider JP. Surface-fill hydrogel attenuates the oncogenic signature of complex anatomical surface cancer in a single application. *Nat Nanotechnol.* 2021: in press.
119. Malhotra N, Lee JS, Liman RAD, Ruallo JMS, Villaflores OB, Ger TR, Hsiao CD. Potential Toxicity of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles: A Review. *Molecules.* 2020;25(14):3159.
  120. Marin DE, Pistol GC, Gras M, Palade M, Taranu I. A comparison between the effects of ochratoxin A and aristolochic acid on the inflammation and oxidative stress in the liver and kidney of weanling piglets. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018;391(10):1147-1156.
  121. Maroco J, Silva D, Rodrigues A, Guerreiro M, Santana I, de Mendonça A. Data mining methods in the prediction of Dementia: A real-data comparison of the accuracy, sensitivity and specificity of linear discriminant analysis, logistic regression, neural networks, support vector machines, classification trees and random forests. *BMC J Res Notes.* 2011; 4:299.
  122. Marsden T, Lomas DJ, McCartan N, Hadley J, Tuck S, Brown L, Haire A, Moss CL, Green S, Van Hemelrijck M, Coolen T, Santaolalla A, Isaac E, Brembilla G, Kopcke D, Giganti F, Sidhu H, Punwani S, Emberton M, Moore CM; ReIMAGINE Study Group. ReIMAGINE Prostate Cancer Screening Study: protocol for a single-centre feasibility study inviting men for prostate cancer screening using MRI. *BMJ Open.* 2021;11(9):e048144.
  123. Martinovic T, Ciric D, Pantic I, Lalic K, Rasulic I, Despotovic S, Lalic I, Djuricic D, Bumbasirevic V, Kravic-Stevovic T. Unusual shape and structure of lymphocyte nuclei is linked to hyperglycemia in type 2 diabetes patients. *Tissue Cell.* 2018;52:92-100.
  124. Mecocci P, Boccardi V, Cecchetti R, Bastiani P, Scamosci M, Ruggiero C, Baroni M. A Long Journey into Aging, Brain Aging, and Alzheimer's Disease Following the Oxidative Stress Tracks. *J Alzheimers Dis.* 2018;62(3):1319-1335.
  125. Meghri Katerji, Maria Filippova, Penelope Duerksen-Hughes, "Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2019: 1279250.
  126. Meng L, Huang Q, Li X, Liang P, Li Y, Huang X, Zhao J, Chen Q, Qiu R, Li L, Jian C, Yao H, Huang J, Tang X, Wang Z, Wei Z, Wu J, Wei L, Wei Q, Tang Q, Huang L, Wei J, Lu D, Luo Q, Xie K, Ouyang Y, Chen J, Li G, Luo L, He L, Zhuo C, Xu A, Meng L. Genes Induced by *Panax Notoginseng* in a Rodent Model of Ischemia-Reperfusion Injury. *J Immunol Res.* 2020;2020:8873261.
  127. Mirny LA. The fractal globule as a model of chromatin architecture in the cell. *Chromosome Res.* 2011;19(1):37-51.

128. Monteiro M, Newcombe VFJ, Mathieu F, Adatia K, Kamnitsas K, Ferrante E, Das T, Whitehouse D, Rueckert D, Menon DK, Glocker B. Multiclass semantic segmentation and quantification of traumatic brain injury lesions on head CT using deep learning: an algorithm development and multicentre validation study. *Lancet Digit Health*. 2020;2(6):e314-e322.
129. Motwani M, Dey D, Berman DS, Germano G, Achenbach S, Al-Mallah MH, Andreini D, Budoff MJ, Cademartiri F, Callister TQ, Chang HJ, Chinnaiyan K, Chow BJ, Cury RC, Delago A, Gomez M, Gransar H, Hadamitzky M, Hausleiter J, Hindoyan N, Feuchtner G, Kaufmann PA, Kim YJ, Leipsic J, Lin FY, Maffei E, Marques H, Pontone G, Raff G, Rubinshtein R, Shaw LJ, Stehli J, Villines TC, Dunning A, Min JK, Slomka PJ. Machine learning for prediction of all-cause mortality in patients with suspected coronary artery disease: a 5-year multicentre prospective registry analysis. *Eur Heart J*. 2017;38(7):500-507.
130. Muriel P. *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. 2017. Elsevier Science, New York, ISBN 0128043210, 9780128043219.
131. Muscogiuri G, Martini C, Gatti M, Dell'Aversana S, Ricci F, Guglielmo M, Baggiano A, Fusini L, Bracciani A, Scafuri S, Andreini D, Mushtaq S, Conte E, Gripari P, Annoni AD, Formenti A, Mancini ME, Bonfanti L, Guaricci AI, Janich MA, Rabbat MG, Pompilio G, Pepi M, Pontone G. Feasibility of late gadolinium enhancement (LGE) in ischemic cardiomyopathy using 2D-multisegment LGE combined with artificial intelligence reconstruction deep learning noise reduction algorithm. *Int J Cardiol*. 2021:S0167-5273(21)01335-8.
132. Naseri N, Ajorlou E, Asghari F, Pilehvar-Soltanahmadi Y. An update on nanoparticle-based contrast agents in medical imaging, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 2018;46:1111-1121.
133. Nathan C, Cunningham-Bussel A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(5):349-61.
134. Nikolovski D, Cumic J, Pantic I. Application of Gray Level co-Occurrence Matrix Algorithm for Detection of Discrete Structural Changes in Cell Nuclei After Exposure to Iron Oxide Nanoparticles and 6-Hydroxydopamine. *Microsc Microanal*. 2019;25(4):982-988.
135. Omta WA, van Heesbeen RG, Shen I, de Nobel J, Robers D, van der Velden LM, Medema RH, Siebes APJM, Feelders AJ, Brinkkemper S, Klumperman JS, Spruit MR, Brinkhuis MJS, Egan DA. Combining Supervised and Unsupervised Machine Learning Methods for Phenotypic Functional Genomics Screening. *SLAS Discov*. 2020;25(6):655-664.
136. Ostlund C, Folker ES, Choi JC, Gomes ER, Gundersen GG, Worman HJ. Dynamics and molecular interactions of linker of

- nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex proteins. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 22):4099-108.
137. Pantic I, Cumic J, Skodric SR, Dugalic S, Brodski C. Oxidopamine and oxidative stress: Recent advances in experimental physiology and pharmacology. *Chem Biol Interact.* 2021;336:109380.
138. Pantic I, Harhaji-Trajkovic L, Pantovic A, Milosevic NT, Trajkovic V. Changes in fractal dimension and lacunarity as early markers of UV-induced apoptosis. *J Theor Biol.* 2012;303:87-92.
139. Pantic I, Jeremic R, Dacic S, Pekovic S, Pantic S, Djelic M, Vitic Z, Brkic P, Brodski C. Gray-Level Co-Occurrence Matrix Analysis of Granule Neurons of the Hippocampal Dentate Gyrus Following Cortical Injury. *Microsc Microanal.* 2020;26(1):166-172.
140. Pantic I, Nestic Z, Paunovic Pantic J, Radojević-Škodrić S, Cetkovic M, Basta Jovanovic G. Fractal analysis and Gray level co-occurrence matrix method for evaluation of reperfusion injury in kidney medulla. *J Theor Biol.* 2016;397:61-7.
141. Pantic I, Pantic S, Paunovic J, Perovic M. Nuclear entropy, angular second moment, variance and texture correlation of thymus cortical and medullar lymphocytes: grey level co-occurrence matrix analysis. *An Acad Bras Cienc.* 2013;85(3):1063-72.
142. Pantic I, Paunovic J, Vucevic D, Radosavljevic T, Dugalic S, Petkovic A, Radojevic-Skodric S, Pantic S. Postnatal Developmental Changes in Fractal Complexity of Giemsa-Stained Chromatin in Mice Spleen Follicular Cells. *Microsc Microanal.* 2017; 23(5):1024-1029.
143. Pantic I, Petrovic D, Paunovic J, Vucevic D, Radosavljevic T, Pantic S. Age-related reduction of chromatin fractal dimension in toluidine blue - stained hepatocytes. *Mech Ageing Dev.* 2016;157:30-34.
144. Parihar AKS, Srivastava S, Patel S, Singh MR, Singh D. Novel catalase loaded nanocores for the treatment of inflammatory bowel diseases. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017;45(5):981-989.
145. Park CJ, Cho YS, Chung MJ, Kim Nishi T, Yamashiro S, Okumura S, Takei M, Tachibana A, Akahori S, Kaji M, Uekawa K, Amadatsu T. Artificial Intelligence Trained by Deep Learning Can Improve Computed Tomography Diagnosis of Nontraumatic Subarachnoid Hemorrhage by Nonspecialists. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2021 Sep 16. doi: 10.2176/nmc.oa.2021-0124. YK, Kim HJ, Kim K, Ko JW, Chung WH, Cho BH. A Fully Automated Analytic System for Measuring Endolymphatic Hydrops Ratios in Patients With Ménière Disease via Magnetic Resonance Imaging: Deep Learning Model Development Study. *J Med Internet Res.* 2021;23(9):e29678.
146. Paunovic J, Vucevic D, Radosavljevic T, Pantic S, Veskovic M, Pantic I. Gray-level co-occurrence matrix analysis of chromatin

- architecture in periportal and perivenous hepatocytes. *Histochem Cell Biol.* 2019;151(1):75-83.
147. Paunovic J, Vucevic D, Radosavljevic T, Vukomanovic Djurdjevic B, Stankovic S, Pantic I. Effects of Iron Oxide Nanoparticles on Structural Organization of Hepatocyte Chromatin: Gray Level Co-occurrence Matrix Analysis. *Microsc Microanal.* 2021; 27(4): 889-896.
148. Paunovic J, Vucevic D, Radosavljevic T, Mandić-Rajčević S, Pantic I. Iron-based nanoparticles and their potential toxicity: Focus on oxidative stress and apoptosis. *Chem Biol Interact.* 2020; 316:108935.
149. Paunovic J, Vucevic D, Radosavljevic T, Pantic S, Veskovic M, Pantic I. Gray-level co-occurrence matrix analysis of chromatin architecture in periportal and perivenous hepatocytes. *Histochem Cell Biol.* 2019;151(1):75-83.
150. Pedroso-Santana S, Lamazares Arcia E, Fleitas-Salazar N, Gancino Guevara M, Mansilla R, Gómez-Gaete C, Altamirano C, Fernandez K, Ruiz A, Toledo Alonso JR. Polymeric nanoencapsulation of alpha interferon increases drug bioavailability and induces a sustained antiviral response in vivo. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020;116:111260.
151. Pérez-Peiró M, Martín-Ontiyuelo C, Rodó-Pi A, Piccari L, Admetlló M, Durán X, Rodríguez-Chiaradía DA, Barreiro E. Iron Replacement and Redox Balance in Non-Anemic and Mildly Anemic Iron Deficiency COPD Patients: Insights from a Clinical Trial. *Biomedicines.* 2021;9(9):1191.
152. Pirela SV, Sotiriou GA, Bello D, Shafer M, Bunker KL, Castranova V, Thomas T, Demokritou P. Consumer exposures to laser printer-emitted engineered nanoparticles: A case study of life-cycle implications from nano-enabled products. *Nanotoxicology.* 2015;9(6):760-8.
153. Pollard T, Earnshaw W, Lippincott-Schwartz J, Johnson G. *Cell Biology 3rd Edition.* Elsevier; 3rd edition (December 14, 2016). ISBN-10 : 9780323341264. ISBN-10 : 9780323341264. Elsevier, New York.
154. Pollen AA, Nowakowski TJ, Shuga J, Wang X, Leyrat AA, Lui JH, Li N, Szpankowski L, Fowler B, Chen P, Ramalingam N, Sun G, Thu M, Norris M, Lebofsky R, Toppani D, Kemp DW 2nd, Wong M, Clerkson B, Jones BN, Wu S, Knutsson L, Alvarado B, Wang J, Weaver LS, May AP, Jones RC, Unger MA, Kriegstein AR, West JA. Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex. *Nat Biotechnol.* 2014;32(10):1053-8.
155. Pulikkan JA, Hegde M, Ahmad HM, Belaghzal H, Illendula A, Yu J, O'Hagan K, Ou J, Muller-Tidow C, Wolfe SA, Zhu LJ, Dekker J, Bushweller JH, Castilla LH. CBF $\beta$ -SMMHC Inhibition Triggers

- Apoptosis by Disrupting MYC Chromatin Dynamics in Acute Myeloid Leukemia. *Cell*. 2018;174(1):172-186.e21.
156. Rajan B, Sathish S, Balakumar S, Devaki T. Synthesis and dose interval dependent hepatotoxicity evaluation of intravenously administered polyethylene glycol-8000 coated ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticle on Wistar rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015;39(2):727-35.
157. Rajković N, Kolarević D, Kanjer K, Milošević NT, Nikolić-Vukosavljević D, Radulovic M. Comparison of Monofractal, Multifractal and gray level Co-occurrence matrix algorithms in analysis of Breast tumor microscopic images for prognosis of distant metastasis risk. *Biomed Microdevices*. 2016;18(5):83.
158. Rodrigues HF, Capistrano G, Bakuzis AF. In vivo magnetic nanoparticle hyperthermia: a review on preclinical studies, low-field nano-heaters, noninvasive thermometry and computer simulations for treatment planning. *Int J Hyperthermia*. 2020;37(3):76-99.
159. Rossi R, Molina S, Mereuta OM, Douglas A, Fitzgerald S, Tierney C, Pandit A, Brennan P, Power S, O'Hare A, Gilvarry M, McCarthy R, Magoufis G, Tsivgoulis G, Nagy A, Vadász Á, Jood K, Redfors P, Nordanstig A, Ceder E, Dunker D, Carlqvist J, Psychogios K, Szikora I, Tatlisumak T, Rentzos A, Thornton J, Doyle KM. Does prior administration of rtPA influence acute ischemic stroke clot composition? Findings from the analysis of clots retrieved with mechanical thrombectomy from the RESTORE registry. *J Neurol*. 2021: in press.
160. Rubio CP, Hernández-Ruiz J, Martínez-Subiela S, Tvarijonaviciute A, Ceron JJ. Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. *BMC Vet Res*. 2016;12(1):166.
161. Saha PK, Saha L. Iron nanoparticles and its potential application: A literature review. *Indian J Pharmacol*. 2021;53(4):339-340.
162. Sakata D, Lampe N, Karamitros M, Kyriakou I, Belov O, Bernal MA, Bolst D, Bordage MC, Breton V, Brown JMC, Francis Z, Ivanchenko V, Meylan S, Murakami K, Okada S, Petrovic I, Ristic-Fira A, Santin G, Sarramia D, Sasaki T, Shin WG, Tang N, Tran HN, Villagrasa C, Emfietzoglou D, Nieminen P, Guatelli S, Incerti S. Evaluation of early radiation DNA damage in a fractal cell nucleus model using Geant4-DNA. *Phys Med*. 2019;62:152-157.
163. Saltz J, Gupta R, Hou L, Kurc T, Singh P, Nguyen V, Samaras D, Shroyer KR, Zhao T, Batiste R, Van Arnem J; Cancer Genome Atlas Research Network, Shmulevich I, Rao AUK, Lazar AJ, Sharma A, Thorsson V. Spatial Organization and Molecular Correlation of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Using Deep Learning on Pathology Images. *Cell Rep*. 2018;23(1):181-193.e7.

164. Santini SJ, Cordone V, Falone S, Mijit M, Tatone C, Amicarelli F, Di Emidio G. Role of Mitochondria in the Oxidative Stress Induced by Electromagnetic Fields: Focus on Reproductive Systems. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Nov 8;2018:5076271. doi: 10.1155/2018/5076271. Erratum in: *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:5203105.
165. Santos TA, Maistro CE, Silva CB, Oliveira MS, França MC Jr, Castellano G. MRI Texture Analysis Reveals Bulbar Abnormalities in Friedreich Ataxia. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015;36(12):2214-8.
166. Santucci-Pereira J, Zeleniuch-Jacquotte A, Afanasyeva Y, Zhong H, Slifker M, Peri S, Ross EA, López de Cicco R, Zhai Y, Nguyen T, Sheriff F, Russo IH, Su Y, Arslan AA, Bordas P, Lenner P, Åhman J, Landström Eriksson AS, Johansson R, Hallmans G, Toniolo P, Russo J. Genomic signature of parity in the breast of premenopausal women. *Breast Cancer Res*. 2019;21(1):46.
167. Sawano S, Kodera S, Katsushika S, Nakamoto M, Ninomiya K, Shinohara H, Higashikuni Y, Nakanishi K, Nakao T, Seki T, Takeda N, Fujiu K, Daimon M, Akazawa H, Morita H, Komuro I. Deep learning model to detect significant aortic regurgitation using electrocardiography: Detection model for aortic regurgitation. *J Cardiol*. 2021:S0914-5087(21)00232-X.
168. Schmidt H, Ghezzi H, Cuadrado A. *Reactive Oxygen Species; Network Pharmacology and Therapeutic Applications*. 2021 Springer Nature Switzerland AG. Hardcover ISBN 978-3-030-68509-6, eBook ISBN 978-3-030-68510-2.
169. Serio F, Silvestri N, Kumar Avugadda S, Nucci GEP, Nitti S, Onesto V, Catalano F, D'Amone E, Gigli G, Del Mercato LL, Pellegrino T. Co-loading of doxorubicin and iron oxide nanocubes in polycaprolactone fibers for combining Magneto-Thermal and chemotherapeutic effects on cancer cells. *J Colloid Interface Sci*. 2021;607(Pt 1):34-44.
170. Serna-Pujol N, Salinas-Pena M, Mugianesi F, Lopez-Angueta N, Torrent-Llagostera F, Izquierdo-Bouldstridge A, Marti-Renom MA, Jordan A. TADs enriched in histone H1.2 strongly overlap with the B compartment, inaccessible chromatin, and AT-rich Giemsa bands. *FEBS J*. 2021;288(6):1989-2013.
171. Serpytis R, Majauskiene E, Navickas P, Lizaitis M, Glaveckaite S, Rucinskas K, Petrulioniene Z, Valeviciene N, Samalavicius RS, Berukstis A, Baranauskas A, Gargalskaite U, Laucevicius A, Chen QM, Alpert JS, Serpytis P. Randomized pilot trial on optimal treatment strategy, myocardial changes, and prognosis of patients with myocardial infarction with non-obstructive coronary arteries (MINOCA). *Am J Med*. 2021:S0002-9343(21)00586-6.
172. Servant N, Roméjon J, Gestraud P, La Rosa P, Lucotte G, Lair S, Bernard V, Zeitouni B, Coffin F, Jules-Clément G, Yvon F, Lermine A,



- Poullet P, Liva S, Pook S, Popova T, Barette C, Prud'homme F, Dick JG, Kamal M, Le Tourneau C, Barillot E, Hupé P. Bioinformatics for precision medicine in oncology: principles and application to the SHIVA clinical trial. *Front Genet.* 2014;5:152.
173. Sferra A, Fortugno P, Motta M, Aiello C, Petrini S, Ciolfi A, Cipressa F, Moroni I, Leuzzi V, Pieroni L, Marini F, Pieroni L, Marini F, Boespflug Tanguy O, Eymard-Pierre E, Danti FR, Compagnucci C, Zambruno G, Brusco A, Santorelli FM, Chiapparini L, Francalanci P, Loizzo AL, Tartaglia M, Cestra G, Bertini E. Biallelic mutations in RNF220 cause laminopathies featuring leukodystrophy, ataxia and deafness. *Brain.* 2021:awab185.
174. Shakibapour N, Dehghani Sani F, Beigoli S, Sadeghian H, Chamani J. Multi-spectroscopic and molecular modeling studies to reveal the interaction between propyl acridone and calf thymus DNA in the presence of histone H1: binary and ternary approaches. *J Biomol Struct Dyn.* 2019;37(2):359-371.
175. Shamir L, Wolkow CA, Goldberg IG. Quantitative measurement of aging using image texture entropy. *Bioinformatics.* 2009;25(23):3060-3.
176. Shen Y, Shamout FE, Oliver JR, Witowski J, Kannan K, Park J, Wu N, Huddleston C, Wolfson S, Millet A, Ehrenpreis R, Awal D, Tyma C, Samreen N, Gao Y, Chhor C, Gandhi S, Lee C, Kumari-Subaiya S, Leonard C, Mohammed R, Moczulski C, Altabet J, Babb J, Lewin A, Reig B, Moy L, Heacock L, Geras KJ. Artificial intelligence system reduces false-positive findings in the interpretation of breast ultrasound exams. *Nat Commun.* 2021;12(1):5645.
177. Shen Z, Wu A, Chen X. Iron Oxide Nanoparticle Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Mol Pharm.* 2017;14(5):1352-1364.
178. Shifrin MA, Zaikin VN, Garmash VIa, Tikhaze AK, Kotelevtseva NV. Izmenenie aktivnosti gliutation-peroksidazy i gliutation-reduktazy v krovi pri nespetsificheskikh vospalitel'nykh zabolevaniyakh legkikh [Changes in the activity of glutathione peroxidase and glutathione reductase in the blood in nonspecific inflammatory lung diseases]. *Ter Arkh.* 1977;49(12):50-5.
179. Siraki AG. The many roles of myeloperoxidase: From inflammation and immunity to biomarkers, drug metabolism and drug discovery. *Redox Biol.* 2021;46:102109.
180. Smrek J, Grosberg AY. Facilitated diffusion of proteins through crumpled fractal DNA globules. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 2015;92(1):012702.
181. Soda P, D'Amico NC, Tessadori J, Valbusa G, Guarrasi V, Bortolotto C, Akbar MU, Sicilia R, Cordelli E, Fazzini D, Cellina M, Oliva G, Callea G, Panella S, Cariati M, Cozzi D, Miele V, Stellato E,

- Carrafiello G, Castorani G, Simeone A, Preda L, Iannello G, Del Bue A, Tedoldi F, Ali M, Sona D, Papa S. AIforCOVID: Predicting the clinical outcomes in patients with COVID-19 applying AI to chest-X-rays. An Italian multicentre study. *Med Image Anal.* 2021;74:102216.
182. Storozhuk L, Besenhard MO, Mourdikoudis S, LaGrow AP, Lees MR, Tung LD, Gavriilidis A, Thanh NTK. Stable Iron Oxide Nanoflowers with Exceptional Magnetic Heating Efficiency: Simple and Fast Polyol Synthesis. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2021;13(38):45870-45880.
183. Sumitomo M, Teramoto A, Toda R, Fukami N, Fukaya K, Zennami K, Ichino M, Takahara K, Kusaka M, Shiroki R. Deep learning using preoperative magnetic resonance imaging information to predict early recovery of urinary continence after robot-assisted radical prostatectomy. *Int J Urol.* 2020;27(10):922-928.
184. Swinkels M, Atiq F, Bürgisser PE, Slotman JA, Houtsmuller AB, de Heus C, Klumperman J, Leebeek FWG, Voorberg J, Jansen AJG, Bierings R. Quantitative 3D microscopy highlights altered von Willebrand factor  $\alpha$ -granule storage in patients with von Willebrand disease with distinct pathogenic mechanisms. *Res Pract Thromb Haemost.* 2021;5(6):e12595.
185. Szczypinski P, Strzelecki M & Materka. MaZda - A software for texture analysis. *Proc. of ISITC.* 2007;2007:245-249.
186. Szczypinski P, Strzelecki M, Materka A & Klepaczko A. MaZda - A software package for image texture analysis. *Comput Meth Prog Bio.* 2009; 94(1): 66-76.
187. Tirri M, Frisoni P, Bilel S, Arfè R, Trapella C, Fantinati A, Corli G, Marchetti B, De-Giorgio F, Camuto C, Mazzarino M, Gaudio RM, Serpelloni G, Schifano F, Botrè F, Marti M. Worsening of the Toxic Effects of ( $\pm$ )Cis-4,4'-DMAR Following Its Co-Administration with ( $\pm$ )Trans-4,4'-DMAR: Neuro-Behavioural, Physiological, Immunohistochemical and Metabolic Studies in Mice. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8771.
188. Tomoda K, Ohkoshi T, Nakajima T, Makino K. Preparation and properties of inhalable nanocomposite particles: effects of the size, weight ratio of the primary nanoparticles in nanocomposite particles and temperature at a spray-dryer inlet upon properties of nanocomposite particles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2008; 64(1):70-6.
189. Topalovic N, Mazic S, Nesic D, Vukovic O, Cumic J, Laketic D, Stasevic Karlicic I, Pantic I. Association between Chromatin Structural Organization of Peripheral Blood Neutrophils and Self-Perceived Mental Stress: Gray-Level Co-occurrence Matrix Analysis. *Microsc Microanal.* 2022:1-7: in press.

190. Turan E, Şimşek A. Effects of lyophilized black mulberry water extract on lipid oxidation, metmyoglobin formation, color stability, microbial quality and sensory properties of beef patties stored under aerobic and vacuum packaging conditions. *Meat Scien.* 2021; 178: 108522.
191. Tyasi TL, Eydurán E, Celik S. Comparison of tree-based regression tree methods for predicting live body weight from morphological traits in Hy-line silver brown commercial layer and indigenous Potchefstroom Koekoek breeds raised in South Africa. *Trop Anim Health Prod.* 2020;53(1):7.
192. Urdinguio RG, Lopez V, Bayón GF, Diaz de la Guardia R, Sierra MI, García-Toraño E, Perez RF, García MG, Carella A, Pruneda PC, Prieto C, Dmitrijeva M, Santamarina P, Belmonte T, Mangas C, Diaconu E, Ferrero C, Tejedor JR, Fernandez-Morera JL, Bravo C, Bueno C, Sanjuan-Pla A, Rodriguez RM, Suarez-Alvarez B, López-Larrea C, Bernal T, Colado E, Balbín M, García-Suarez O, Chiara MD, Sáenz-de-Santa-María I, Rodríguez F, Pando-Sandoval A, Rodrigo L, Santos L, Salas A, Vallejo-Díaz J, C Carrera A, Rico D, Hernández-López I, Vayá A, Ricart JM, Seto E, Sima-Teruel N, Vaquero A, Valledor L, Cañal MJ, Pisano D, Graña-Castro O, Thomas T, Voss AK, Menéndez P, Villar-Garea A, Deutzmann R, Fernandez AF, Fraga MF. Chromatin regulation by Histone H4 acetylation at Lysine 16 during cell death and differentiation in the myeloid compartment. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(10):5016-5037.
193. Valdez BC, Li Y, Murray D, Liu Y, Nieto Y, Champlin RE, Andersson BS. Combination of a hypomethylating agent and inhibitors of PARP and HDAC traps PARP1 and DNMT1 to chromatin, acetylates DNA repair proteins, down-regulates NuRD and induces apoptosis in human leukemia and lymphoma cells. *Oncotarget.* 2017; 9(3):3908-3921.
194. Vanderstraeten J, Verschaeve L, Burda H, Bouland C, de Brouwer C. Health effects of extremely low-frequency magnetic fields: reconsidering the melatonin hypothesis in the light of current data on magnetoreception. *J Appl Toxicol.* 2012;32(12):952-8.
195. Verma SK, Thirumurugan A, Panda PK, Patel P, Nandi A, Jha E, Prabakaran K, Udayabhaskar R, Mangalaraja RV, Mishra YK, Akbari-Fakhrabadi A, Morel MJ, Suar M, Ahuja R. Altered electrochemical properties of iron oxide nanoparticles by carbon enhance molecular biocompatibility through discrepant atomic interaction. *Mater Today Bio.* 2021;12:100131.
196. Vilema-Enríquez G, Quinlan R, Kilfeather P, Mazzone R, Saqlain S, Del Molino Del Barrio I, Donato A, Corda G, Li F, Vedadi M, Németh AH, Brennan PE, Wade-Martins R. Inhibition of the SUV4-20 H1 histone methyltransferase increases frataxin expression in

- Friedreich's ataxia patient cells. *J Biol Chem.* 2020; 295(52):17973-17985.
197. Vu HD, Huynh PT, Ryu J, Kang UR, Youn SW, Kim H, Ahn HJ, Park K, Hwang SK, Chang YC, Lee YJ, Lee HJ, Lee J. Melittin-loaded Iron Oxide Nanoparticles Prevent Intracranial Arterial Dolichoectasia Development through Inhibition of Macrophage-mediated Inflammation. *Int J Biol Sci.* 2021;17(14):3818-3836.
198. Vucevic D, Borozan S, Radenkovic A, Radosavljevic M, Mladenovic D, Jorgacevic Bojan, Samardzic J, Veskovic M, Vukicevic D, Radosavljevic T. Galectin-3 Deficiency Reduces Cardiac and Renal Antioxidant Capacity in Mice. *Folia Biologica.* 2020;68:73-80.
199. Wang AW, Wang YJ, Zahm AM, Morgan AR, Wangenstein KJ, Kaestner KH. The Dynamic Chromatin Architecture of the Regenerating Liver. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2020;9(1):121-143.
200. Wang BT, Liu MX, Chen ZY. Differential Diagnostic Value of Texture Feature Analysis of Magnetic Resonance T2 Weighted Imaging between Glioblastoma and Primary Central Neural System Lymphoma. *Chin Med Sci J.* 2019;34(1):10-17.
201. Wang Y, Hu Z, Zhu T, Su Z, Fang X, Lin J, Chen Z, Su Z, Ye P, Ma J, Zhang L, Li J, Feng L, Sun CB, Zhang Z, Shentu X. Optical Coherence Tomography Angiography-Based Quantitative Assessment of Morphologic Changes in Active Myopic Choroidal Neovascularization During Anti-vascular Endothelial Growth Factor Therapy. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:657772.
202. Wei FF, Thijs L, Melgarejo JD, Cauwenberghs N, Zhang ZY, Liu C, Kuznetsova T, Struijker-Boudier HAJ, Verhamme P, Dong YG, Staessen JA. Diastolic left ventricular function in relation to the retinal microvascular fractal dimension in a Flemish population. *Hypertens Res.* 2021;44(4):446-453.
203. Wei H, Hu Y, Wang J, Gao X, Qian X, Tang M. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Cytotoxicity, Metabolism, and Cellular Behavior in Biomedicine Applications. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:6097-6113.
204. Wei MY, Lei XP, Fu JJ, Chen MY, Li JX, Yu XY, Lin YL, Liu JP, Du LR, Li X, Zhang Y, Miao YL, Huang YG, Liang L, Fu JJ. The use of amphiphilic copolymer in the solid dispersion formulation of nimodipine to inhibit drug crystallization in the release media: Combining nano-drug delivery system with solid preparations. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020;111:110836.
205. Wen J, Thibeau-Sutre E, Diaz-Melo M, Samper-González J, Routier A, Bottani S, Dormont D, Durrleman S, Burgos N, Colliot O; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative; Australian Imaging Biomarkers and Lifestyle flagship study of ageing. Convolutional

- neural networks for classification of Alzheimer's disease: Overview and reproducible evaluation. *Med Image Anal.* 2020;63:101694.
206. Willcockson MA, Skoultchi I, Heaton SE, Weiss CN, Bartholdy BA, Botbol Y, Mishra LN, Sidhwani DS, Wilson TJ, Pinto HB, Maron MI, Skalina KA, Toro LN, Zhao J, Lee CH, Hou H, Yusufova N, Meydan C, Osunsade A, David Y, Cesarman E, Melnick AM, Sidoli S, Garcia BA, Edelmann W, Macian F, Skoultchi AI. H1 histones control the epigenetic landscape by local chromatin compaction. *Nature.* 2021;589(7841):293-298.
207. Winkel DJ, Breit HC, Block TK, Boll DT, Heye TJ. High spatiotemporal resolution dynamic contrast-enhanced MRI improves the image-based discrimination of histopathology risk groups of peripheral zone prostate cancer: a supervised machine learning approach. *Eur Radiol.* 2020;30(9):4828-4837.
208. Yadwade R, Kirtiwar S, Ankamwar B. A Review on Green Synthesis and Applications of Iron Oxide Nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol.* 2021;21(12):5812-5834
209. Yang G, Li Z, Wu F, Chen M, Wang R, Zhu H, Li Q, Yuan Y. Improving Solubility and Bioavailability of Brevescapine with Mesoporous Silica Nanoparticles Prepared Using Ultrasound-Assisted Solution-Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids Method. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:1661-1675.
210. Yang N, Ding Y, Zhang Y, Wang B, Zhao X, Cheng K, Huang Y, Taleb M, Zhao J, Dong WF, Zhang L, Nie G. Surface Functionalization of Polymeric Nanoparticles with Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell Membrane for Tumor-Targeted Therapy. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(27):22963-22973.
211. Yusufova N, Kloetgen A, Teater M, Osunsade A, Camarillo JM, Chin CR, Doane AS, Venters BJ, Portillo-Ledesma S, Conway J, Phillip JM, Elemento O, Scott DW, Béguelin W, Licht JD, Kelleher NL, Staudt LM, Skoultchi AI, Keogh MC, Apostolou E, Mason CE, Imielinski M, Schlick T, David Y, Tsigos A, Allis CD, Soshnev AA, Cesarman E, Melnick AM. Histone H1 loss drives lymphoma by disrupting 3D chromatin architecture. *Nature.* 2021;589(7841):299-305.
212. Zhang S, Lin YH, Tarlow B, Zhu H. The origins and functions of hepatic polyploidy. *Cell Cycle.* 2019;18(12):1302-1315.
213. Zhang Y, Hou D, Wang Z, Cai N, Au C. Nanomaterial-Based Dual-Emission Ratiometric Fluorescent Sensors for Biosensing and Cell Imaging. *Polymers (Basel).* 2021;13(15):2540.
214. Zhao Y, Pan Z, Namburi S, Pattison A, Posner A, Balachander S, Paisie CA, Reddi HV, Rueter J, Gill AJ, Fox S, Raghav KPS, Flynn WF, Tothill RW, Li S, Karuturi RKM, George J. CUP-AI-Dx: A tool for inferring cancer tissue of origin and molecular subtype using RNA

- gene-expression data and artificial intelligence. *EBioMedicine*. 2020;61:103030.
215. Zhong J, Li Q, Luo H, Holmdahl R. Neutrophil-derived reactive oxygen species promote tumor colonization. *Commun Biol*. 2021;4(1):865.
216. Zhou R, Gao YQ. Polymer models for the mechanisms of chromatin 3D folding: review and perspective. *Phys Chem Chem Phys*. 2020;22(36):20189-20201.
217. Zhu W, Zhao Z, Chou FJ, Zuo L, Liu T, Bushinsky D, Chang C, Zeng G, Yeh S. The Protective Roles of Estrogen Receptor  $\beta$  in Renal Calcium Oxalate Crystal Formation via Reducing the Liver Oxalate Biosynthesis and Renal Oxidative Stress-Mediated Cell Injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:5305014.
218. Zhu Y, Podolak J, Zhao R, Shukla AK, Moore RJ, Thomas GV, Kelly RT. Proteome Profiling of 1 to 5 Spiked Circulating Tumor Cells Isolated from Whole Blood Using Immunodensity Enrichment, Laser Capture Microdissection, Nanodroplet Sample Processing, and Ultrasensitive nanoLC-MS. *Anal Chem*. 2018;90(20):11756-11759.
219. Zimmer A, Teixeira RB, Bonetto JHP, Bahr AC, Türck P, de Castro AL, Campos-Carraro C, Visioli F, Fernandes-Piedras TR, Casali KR, Scassola CMC, Baldo G, Araujo AS, Singal P, Belló-Klein A. Role of inflammation, oxidative stress, and autonomic nervous system activation during the development of right and left cardiac remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension. *Mol Cell Biochem*. 2020;464(1-2):93-109.
220. Zinger A, Adir O, Alper M, Simon A, Poley M, Tzror C, Yaari Z, Krayem M, Kasten S, Nawy G, Herman A, Nir Y, Akrish S, Klein T, Shainsky-Roitman J, Hershkovitz D, Schroeder A. Proteolytic Nanoparticles Replace a Surgical Blade by Controllably Remodeling the Oral Connective Tissue. *ACS Nano*. 2018;12(2):1482-1490.
221. Ziv E, Zhang Y, Kelly L, Nikolovski I, Boas FE, Erinjeri JP, Cai L, Petre EN, Brody LA, Covey AM, Getrajdman G, Harding JJ, Sofocleous C, Abou-Alfa GK, Solomon SB, Brown KT, Yarmohammadi H. NRF2 Dysregulation in Hepatocellular Carcinoma and Ischemia: A Cohort Study and Laboratory Investigation. *Radiology*. 2020;297(1):225-234.
222. Zubar T, Fedosyuk V, Tishkevich D, Kanafyev O, Astapovich K, Kozlovskiy A, Zdorovets M, Vinnik D, Gudkova S, Kaniukov E, Sombra ASB, Zhou D, Jotania RB, Singh C, Trukhanov S, Trukhanov A. The Effect of Heat Treatment on the Microstructure and Mechanical Properties of 2D Nanostructured Au/NiFe System. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(6):1077.
223. Zulato E, Ciccarese F, Agnusdei V, Pinazza M, Nardo G, Iorio E, Curtarello M, Silic-Benussi M, Rossi E, Venturoli C, Panieri E, Santoro MM, Di Paolo V, Quintieri L, Ciminale V, Indraccolo S. LKB1 loss is

associated with glutathione deficiency under oxidative stress and sensitivity of cancer cells to cytotoxic drugs and  $\gamma$ -irradiation. *Biochem Pharmacol.* 2018;156:479-490.

224. Zurob E, Dennett G, Gentil D, Montero-Silva F, Gerber U, Naulín P, Gómez A, Fuentes R, Lascano S, Rodrigues da Cunha TH, Ramírez C, Henríquez R, Del Campo V, Barrera N, Wilkens M, Parra C. Inhibition of Wild Enterobacter cloacae Biofilm Formation by Nanostructured Graphene- and Hexagonal Boron Nitride-Coated Surfaces. *Nanomaterials (Basel).* 2019;9(1):49.

## **Biografija autora**

Asist. dr Jovana Paunović Pantić je rođena 13.01.1990. u Kladovu, Republika Srbija. Završila je gimnaziju "Sveti Sava" u Kladovu 2008. godine sa odličnim uspehom. Upisala je Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu 2008. godine a diplomirala 2014. sa prosečnom ocenom 8,57. Specijalističke akademske studije iz oblasti mikroskopije i ćelijske biologije završila je 2018. godine odbranivši završni rad pod naslovom „Faktori koji utiču na strukturu i distribuciju euhromatina i heterohromatina u jedru“ i mentorstvom Prof. dr Danijele Vučević. 23.11.2016. izabrana je u zvanje Saradnika u nastavi za užu naučnu oblast Patološka fiziologija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. 26.12.2018. godine, izabrana je u zvanje Asistenta za istu užu naučnu oblast. Tokom dosadašnje karijere je bila član jednog nacionalnog i dva međunarodna naučna projekta. Od maja 2021. godine, akademski je urednik i član uređivačkog odbora istaknutog međunarodnog časopisa Computational and Mathematical Methods in Medicine (M22). Do sada je publikovala 16 in extenso naučnih radova u međunarodnim časopisima indeksiranih u JCR bazi.



## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Јована Пауновић Пантић

Број индекса 2016/5051

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Промене у структури хроматина хепатоцита и параметри оксидативног стреса у јетри након  
излагања честицама гвожђе (II, III) оксида

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

### Потпис аутора

У Београду, 13.12.2021.



\_\_\_\_\_

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јована Пауновић Пантић  
Број индекса 2016/5051  
Студијски програм Молекуларна медицина  
Наслов рада Промене у структури хроматина хепатоцита и параметри оксидативног стреса у јетри након излагања честицама гвожђе (II, III) оксида  
Ментор Проф. др Данијела Вучевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора**

У Београду, 13.12.2021.



\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

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

Промене у структури хроматина хепатоцита и параметри оксидативног стреса у јетри  
након излагања честицама гвожђе (II, III) оксида

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

**Потпис аутора**

У Београду, 13.12.2021.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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 прерада.** Дозвољаваате 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.** Дозвољаваате 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.