



**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU,
BIOHEMIJU I ZAŠTITU ŽIVOTNE
SREDINE**



MSc Danica Jović

**SINTEZA, KARAKTERIZACIJA I BIOLOŠKA ISPITIVANJA
FULERENOL/DOKSORUBICIN NANOKOMPOZITA**

-doktorska disertacija-

Novi Sad, 2017.



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DOKTORSKE AKADEMSKE STUDIJE HEMIJE

**SINTEZA, KARAKTERIZACIJA
I BIOLOŠKA ISPITIVANJA
FULERENOL/DOKSORUBICIN
NANOKOMPOZITA**
DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor: Prof. dr Aleksandar Đorđević
Kandidat: MSc Danica Jović

Novi Sad, 2017. godine

SADRŽAJ

Izvod na srpskom jeziku

Izvod na engleskom jeziku (Summary)

Zahvalnica

i UVOD.....	1
1. TEORIJSKI DEO.....	3
1.1. INTERAKCIJA NANOMATERIJALA SA ĆELIJAMA.....	3
1.1.1. USVAJANJE U ĆELIJE I OSOBINE NANOČESTICA.....	3
1.2. OSOBINE TUMORSKE VASKULARIZACIJE	8
1.3. HEMOTERAPIJA I TRENDOVI U NANOFORMULACIJAMA LEKOVA	9
1.3.1. SKLADIŠTENJE, PRENOS I OTPUŠTANJE LEKA IZ NANOFORMULACIJE	9
1.3.2. OSNOVNA PRAVILA ZA DIZAJN NANOČESTIČNE PLATFORME ZA DOSTAVU LEKA.....	10
1.4. FULERENOLI: SINTEZE, MEHANIZMI NASTAJANJA, FIZIČKO-HEMIJSKE OSOBINE VODENIH RASTVORA	12
1.4.1. SINTEZE	12
1.4.2. FIZIČKO-HEMIJSKE OSOBINE VODENIH RASTVORA FULERENOLA....	22
1.4.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST FULERENOLA	27
1.5. DOKSORUBICIN	39
1.5.1. FARMAKOKINETIKA DOKSORUBICINA	40
1.5.2. MEHANIZMI ANTINEOPLASTIČNOG DEJSTVA DOKSORUBICINA	41
1.5.3. NEŽELJENA DEJSTVA I TOKSIČNOST.....	44
1.5.4. STRATEGIJE ZA POBOLJŠANJE EFIKASNOSTI I/ILI SMANJENJE TOKSIČNOSTI DOKSORUBICINA	46
1.5.5. FORMULACIJE I NANOFORMULACIJE DOKSORUBICINA	47
1.5.6. NEDOSTACI I PREDNOSTI NANOFORMULACIJA DOX	58
ii CILJEVI ISTRAŽIVANJA	62

2. MATERIJAL I METODE	63
2.1. MATERIJAL	63
2.1.1. SINTEZA FULLERENOLA C ₆₀ (OH) ₂₄	63
2.1.2. PRIPREMA RASTVORA DOX	63
2.1.3. PRIPREMA FNP/DOX NANOKOMPOZITA	64
2.2. METODE	65
2.2.1. RENDGENSKA FOTOELEKTRONSKA SPEKTROSKOPIJA	65
2.2.2. DENZITOMETRIJA. VISKOZNOST. ELEKTRIČNA PROVODLJIVOST	69
2.2.3. NUKLEARNA MAGNETNA REZONANCA (NMR)	71
2.2.4. TEČNA HROMATOGRAFIJA VISOKE REZOLUCIJE UPLC/MS/MS; TOF MS ES+	71
2.2.5. RAMANSKA SPEKTROSKOPIJA	72
2.2.6. UV SPEKTROSKOPIJA	73
2.2.7. SPEKTROFLUOROMETRIJA	73
2.2.8. DINAMIČKO RASEJANJE SVETLOSTI (DLS)	74
2.2.9. MIKROSKOPIJA ATOMSKIH SILA (AFM)	77
2.2.10. TRANSMISIONA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (TEM)	80
2.2.11. RAČUNARSKE SIMULACIJE	81
2.2.12. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI <i>IN VITRO</i> NA ĆELIJSKIM LINIJAMA	83
2.2.13. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI <i>IN VIVO</i> NA MODELU ZEBRICE	86
3. REZULTATI	87
3.1. KARAKTERIZACIJA UZORAKA PRIMENOM XPS METODE	87
3.2. DENZITOMETRIJA I TRANSPORTNE OSOBINE	94
3.3. RAČUNARSKE SIMULACIJE	96
3.4. ISPITIVANJE I KARAKTERIZACIJA UZORAKA PRIMENOM UPLC/MS/MS	98
3.5. ISPITIVANJE I KARAKTERIZACIJA NANOKOMPOZITA FNP/DOX PRIMENOM NMR SPEKTROSKOPIJE	104
3.6. RAMANSKA SPEKTROSKOPIJA	106

3.7. ISPITIVANJE UZORAKA PRIMENOM UV/VIS SPEKTROSKOPIJE	108
3.8. ISPITIVANJE UZORAKA PRIMENOM SPEKTROFLUOROMETRIJE.....	110
3.9. KARAKTERIZACIJA UZORAKA PRIMENOM DLS	111
3.10. KARAKTERIZACIJA UZORAKA PRIMENOM AFM.....	116
3.11. KARAKTERIZACIJA UZORAKA PRIMENOM TEM	119
3.12. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI <i>IN VITRO</i> NA ĆELIJSKIM LINIJAMA	121
3.13. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI <i>IN VIVO</i> NA MODELU ZEBRICE	133
4. DISKUSIJA	138
4.1. XPS ANALIZA	138
4.2. VOLUMETRIJSKE I TRANSPORTNE OSOBINE.....	140
4.3. RAČUNARSKE SIMULACIJE	147
4.4. UPLC ANALIZA.....	148
4.5. NMR ANALIZA.....	150
4.6. RAMANSKA SPEKTROSKOPIJA	152
4.7. UV SPEKTROSKOPIJA	154
4.8. SPEKTROFLUOROMETRIJA.....	155
4.9. DLS	157
4.10. AFM ANALIZA	161
4.11. TEM ANALIZA	162
4.12. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI <i>IN VITRO</i> NA ĆELIJSKIM LINIJAMA	164
4.13. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI <i>IN VIVO</i> NA MODELU ZEBRICE	170
5. ZAKLJUČAK	173
6. LITERATURA	178
7. PRILOG	196
BIOGRAFIJA SA BIBLIOGRAFIJOM.....	222

Ključna dokumentacijska informacija

IZVOD

U radu je predstavljena sinteza i karakterizacija novog fulerenol/doksorubicin nanokompozita, sintetisanog sa ciljem dobijanja potencijalne nove nanoformulacije postojećeg antineoplastika doksorubicina, koja bi pokazala veću biološku aktivnost uz smanjenje neželjenih sporednih efekata koje sam lek izaziva, na prvom mestu kardiotsičnosti.

Nanokompozit fulerenol/doksorubicin je okarakterisan brojnim metodama prateći dva osnovna eksperimentalna pristupa: molekulsko-spektroskopske metode (XPS, denzitometrija i transportne osobine, NMR, UPLC, Ramanska i UV-spektroskopija, SFM) i metode nanokarakterizacije (DLS, AFM, TEM), kao i računске simulacije (RDF). Osnovni cilj ispitivanja je bila detekcija postojanja nekovalentnog nanokompozita koji ostvaruju doksorubicin i fulerenolske nanočestice u vodenom rastvoru. Rezultati karakterizacije jasno i nedvosmisleno ukazuju na postojanje nekovalentnih interakcija unutar nanokompozita, što dalje utiče na organizaciju i udruživanje čestica, a što uslovljava i drugačiju biološku aktivnost takvog sistema u odnosu na pojedinačne komponente. Rezultati bioloških ispitivanja na *in vitro* modelu različitih tumorskih ćelijskih linija pokazuju značajan antiproliferativni efekat nanokompozita, kao i selektivnost prema tumorskim u odnosu na zdravu ćelijsku liniju. Eksperimenti na *in vivo* modelu zebrića potvrđuju smanjenje toksičnosti nanokompozita u poređenju sa lekom, primarno kardiotsičnosti. Računske simulacije, mikroskopski i spektroskopski podaci, kao i rezultati *in vitro* i *in vivo* studija ukazuju na to da nekovalentne interakcije između fulerenola i doksorubicina mogu biti ključni korak u stvaranju sinergističkog sistema za dostavu leka u biološki sistem.

Multipotentnost fulerenola kao nanonosača lekova i nespecifičnost strukture doksorubicina kao leka, ukazuje na to da bi fulerenol mogao biti efikasan nanonosač i drugih antineoplastika, što daje prostora za unapređenje antitumorskih osobina lekova posredstvom istovremene administracije leka.

SUMMARY

The focus of this thesis was the synthesis and characterization of a novel fullereneol/doxorubicin nanocomposite, with the aim to obtain a potential nanoformulation of antineoplastic drug doxorubicin, which would express greater biological activity and lower level of adverse effects than the drug itself, in the first place cardiotoxicity.

Nanocomposite fullereneol/doxorubicin was characterized by means of numerous methods following two main experimental approaches: molecular-spectroscopic methods (XPS, densitometry and transport properties, NMR, UPLC, Raman and UV spectroscopy, SFM) and methods of nanocharacterisation (DLS, AFM, TEM), as well as computer simulations (RDF). The goal of characterization was detection of non-covalent interactions within nanocomposite that are established between fullereneol nanoparticles and doxorubicin in aqueous solution. The results clearly indicate the existence of non-covalent interactions within nanocomposite that affect the organization and assembling of the particles, which further exhibit different biological activity of such a system in comparison to components themselves. Results of biological activity on *in vitro* model of different tumor cell lines show significant antiproliferative effect of nanocomposite, as well as selectivity towards tumor cell lines. Experiments conducted on *in vivo* zebrafish model confirm the lowering of the adverse effects of the drug, especially cardiotoxicity, in case when nanocomposite was applied. Computer simulations, microscopic and spectroscopic results combined with encouraging *in vitro* and *in vivo* results point out that non-covalent interactions between fullereneol nanoparticles and doxorubicin may present the keyrole in formation of a synergistic system for nanodrug delivery into biological system. Multipotential of fullereneol nanoparticles as a nanocarrier and non-specific structure of doxorubicin as a drug imply that fullereneol may serve as a efficient nanocarrier of numerous other antineoplastics, which further allows the improvement of antitumor properties of drugs with simultaneous drug administration.

Hvala

Doktorska disertacija je urađena kao deo projekta III45005 „Funkcionalni, funkcionalizovani i usavršeni nanomaterijali” Ministarstva obrazovanja, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije rukovodioca dr Zlatka Rakočević, naučnog savetnika Instituta za nuklearne nauke Vinča i rukovodioca potprojekta dr Aleksandra Đorđević, redovnog profesora Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

Eksperimentalni deo istraživanja ove doktorske disertacije je urađen na Departmanu za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Zavodu za Eksperimentalnu onkologiju Instituta za Onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici, Tehnološkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, Institutu „Jožef Štefan” u Ljubljani, Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu, Departmanu za fiziku Prirodno-matematičkog fakulteta, Institutu za nuklearne nauke „Vinča” Univerziteta u Beogradu, kompaniji Krug International LTD Ogranak Beograd, Departmanu za farmaciju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu.

Redovnom profesoru dr Aleksandru Đorđević-profesoru, mentoru, učitelju, uvek više od profesora, nikad manje od Čoveka. Za ukazano poverenje, brižnost, pristojnu neformalnost i uljudnu prisnost, strpljenje za moje lutanje po temi, strpljenje za moje udublivanje u temu, primećivanje i uvažavanje svake promene i napretka. Za iskustvo, mulidisciplinarnost, dobre timove saradnika, sjajnu radnu atmosferu, podeljene uvide i shvatanja, razmišljanja, poverenje, savete i iskustvo.

Naučnom saradniku dr Jasminki Mrđanović za svu pomoć i vredan rad oko ćelija, interesovanje za tezu, provere, sugestije, korekcije koje su doprinele poboljšanju rada, za navigaciju i usmeravanje u savlađivanju „peščanog sata”, za primer pedantnosti i organizovanosti, podršku, ohrabrenje, realno sagledavanje zadataka koji su pred nama, strpljenje, agilnost i to sve u dugogodišnjoj saradnji.

Vanrednom profesoru dr Milanu Vraneš na sjajnoj saradnji, merenjima koja su izvedena u laboratoriji njegove istraživačke grupe, pomoći u diskusiji istih, posvećivanju pažnje i spremnosti za učestvovanje u svakom zadatku uz brz i detaljan odgovor na svaku molbu. Za odgovorno i visokokvalitetno, naučno, konstruktivno ukazivanje na mogućnosti poboljšanja rada.

Redovnom profesoru dr. Vladimiru Srdić za svu pomoć, interesovanje i saradnju tokom svih godina izrade doktorske disertacije, kao i tokom finalizacije iste. Za pristup DLS i prijatnu atmosferu u istraživačkoj laboratoriji tokom dugih sata okupiranja prostora.

Višem naučnom saradniku dr Nikoli Knežević, na saradnji, podsticaju, direktnom ukazivanju na mogućnosti poboljšanja rada i konstruktivne predloge i korekcije. Na naučnoj budnosti, interesovanju i ažurnosti. Pre svega na dugogodišnjem umreženom prijateljstvu.

Redovnom profesoru dr Đendi Vaštag, biseru toplog srca, na spremnosti da u svakom trenutku pruži pomoć i vredne smernice, podršku i razumevanje.

Naučnom savetniku dr Zlatku Rakočević i naučnom saradniku dr Nenadu Bundaleski na velikom trudu da uposle instrumentalne „zveri” XPS i AFM sa ciljem karakterizacije naših uzoraka, na rezultatima i pomoći u diskusiji istih.

Profesoru dr. Janezu Plavec sa Univerziteta u Ljubljani za pomoć oko snimanja i diskusije vezanih za NMR analizu uzoraka.

Uz „malu” pomoć mojih prijatelja

Naučnom saradniku dr Aleksandru Pavić na izvođenju i diskusiji *in vivo* eksperimenata, zalaganju, trudu, razumevanju, brzim i konstruktivnim korekcijama i sugestijama.

Asistentu dr Sanji Armaković i naučnom saradniku dr Stevanu Armaković na odgovornom, savesnom i detaljnom uključivanju, kao i konstruktivne i ekspeditivne sugestije vezane za računarske metode.

Ivanu Lazić i Milanu Janković iz kompanije Krug International LTD, Ogranak Beograd, na pomoći oko snimanja uzoraka, strpljenju i trudu, učestvovanje i spremnost da pomognu u bilo kom trenutku.

Vanrednom profesoru dr Branislavu Jović ☺ i istraživaču-saradniku MSc Branku Kordić za svu pomoć oko spektroskopskih UV i IR nedoumica, snimanja uzoraka, diskusije, za strpljenje, deljenje radova, tehničku i naučnu pomoć i kolegijalnost.

Istraživaču MSc Aleksandru Tot na kolegijalnosti i saradnji.

Docentu dr Branislavi Srđenović-Čonić za efikasnu saradnju i pomoć u izvođenju spektrofotometrijskih merenja.

Stručnom saradniku MSc Elviri Đurđić, za dugogodišnje strpljenje, upornost, neodustajanje, spremnost za još jedan pokušaj i kada ispucamo sve pokušaje na Ramanu.

Koleginici dr Ivani Borišev za sve razgovore i podršku, deljenje mudrosti, kolegijalnost, društvo, kao i za spremnost da da svoj kritički i prijateljski sud o radu ili bilo kojoj nedoumici.

Budućem dr Mariani Seke, na svoj pomoći i interesovanju, brzim odgovorima i iznad svega podršci i lepom druženju.

MSc Igoru Medić na lepoj saradnji, interesovanju za tezu i druženju.

Kolegama i prijateljima, na divnim novogodišnjim druženjima, Oficircima, filmskim okupljanjima, pevanjima, herojskom podnošenju *Allium sativum* u taksiju, kao i „Zoki” društvu na inspirativnim i mentalno razgaljujućim ručkovima.

Prijateljima, kumovima, rodbini-što delimo i uzajamno radosnim činimo naše puteve.

Svima koji su se našli na putu i pomogli da ponesem po koje drvce više, a slučajno su izostavljeni.

Onima kojima nisam stigla da zahvalim i zagrlim.

Branetu, što je počev od vodonične moj saputnik i u svim dalekosežnijim, sveobuhvatnijim i dubljim vezama i svemu što one donose i to prisutno, strpljivo/nestrpljivo i istrajno. Na Mili.

Mili. Njeno postojanje je dovoljni i najveći razlog.

Novi Sad, 15.12.2017.

Danica

i UVOD

Primena nanotehnologije u medicini dovela je do razvoja nove naučne discipline-nanomedicine, koja se bavi ispitivanjem nanomaterijala u cilju poboljšanja dijagnoze, kontrole, prevencije i tretmana različitih bolesti (Jain, Mehra, & Jain, 2014; O'Malley, 2010). Nanotehnologija u polju medicine se intenzivno istražuje sa ciljem poboljšanja trenutnih terapijskih strategija i istovremenim smanjenjem neželjenih sporednih efekata terapeutika. Istraživanja su dostigla izuzetan napredak, no za kliničku primenljivost neophodno je sprovesti dalja ispitivanja uzimajući u obzir promenljivo biološko okruženje, fiziološke barijere, kao i fizičko-hemijska svojstva novih nanolekova, posebno uzimajući u obzir jedinstvene fizičke, hemijske, mehaničke i optičke osobine koje ispoljavaju nanočestice (Florence, 2012; Muthu & Feng, 2010).

Nanočestice kao nosači lekova mogu imati nekoliko uloga tokom dostave lekova: enkapsulacija slabo rastvorljivih lekova (Kipp, 2004; Zhang i dr., 2008), zaštita terapijskih molekula (Whitehead, Langer, & Anderson, 2009), i promena distribucije leka i njegovog cirkulisanja u krvi (Alexis, Pridgen, Molnar, & Farokhzad, 2008; Bertrand & Leroux, 2012), što je u onkologiji veoma bitno jer omogućava enkapsulaciju citotoksičnih agenasa koji ispoljavaju neselektivnu toksičnost.

Nanočestice koje se primenjuju za isporuku lekova u tumore i dijagnostiku mogu biti na bazi polimera, lipozoma, peptidnih konjugata, ciklodekstrina, magnetnih, zlatnih, ugljeničnih i silicijumskih nanočestica (Dong i dr., 2018; Knežević & Kaluđerović, 2017; Ramya i dr., 2017; Teixeira, Carbone, & Souto, 2017; Chen, Chen, Duan, Jia, & Kong, 2016; Yu i dr., 2015; Ang i dr., 2014; Pouponneau, Soulez, Beaudoin, Leroux, & Martel, 2014;) i dr.

Da bi se razvio bezbedan nanolek neophodno je razmotriti sporedne efekte koji bi mogli biti ispoljeni usled specifičnih osobina nanomaterijala. Upravo zbog toga je veoma bitno detaljno ispitati interakcije između nanoleka i fiziološkog sistema, gde se posebna pažnja posvećuje vezi strukture i veličine sa efikasnošću i toksičnošću nanoleka. Nanonosajući koji se primenjuju u medicinske svrhe moraju biti biokompatibilni, što znači da ne dovode do pobuđivanja imunog sistema ili bilo kojeg drugog neželjenog efekta. Pored toga, moraju biti netoksični, tj. bezopasni za dati biološki sistem (Wilczewska, Niemirowicz, Markiewicz, & Car, 2012).

Za ispitivanje aktivnosti nanočestica u *in vivo* uslovima, kao i za utvrđivanje *in vitro* aktivnosti nanočestica na različitim tipovima ćelija, neophodno je da se nanočestice disperguju u različitim fiziološkim sredinama. Osobina nanočestica je da se u različitim fiziološkim sredinama mogu aglomerirati u veće čestice koje ponekada dostižu mikrometerske dimenzije (Buford, Hamilton, & Holian, 2007; Deguchi, Yamazaki, Mukai, Usami, & Horikoshi, 2007; Murdock, Braydich-Stolle, Schrand, Schlager, & Hussain, 2008), u kom slučaju pokazuju drugačije biološke efekte u poređenju sa dobro dispergovanim nanočesticama (Foucaud, Wilson, Brown, & Stone, 2007; Sager i dr., 2007; Wick i dr., 2007).

Rezultati pretrage literature ukazuju da postoji svega nekoliko studija koje su ispitivale osobine derivata fulerena, fulerenola, kao nosača antineoplastika (Blazkova i dr., 2014; Jović i dr., 2016; Liu i dr., 2010; Ye i dr., 2014). Sa druge strane, veliki broj istraživanja protektivnog efekta fulerenola tokom terapije antineoplastikom doksorubicinom (DOX) obiluje rezultatima koji ukazuju da fulerenol, odnosno fulerenolske nanočestice (FNP), smanjuje neželjene sporedne efekate nastale tretmanom ovim antraciklinskim citostatskim antibiotikom (Injac i dr., 2009; Injac, Perse, i dr., 2008; Injac, Perse, i dr., 2008; Injac, Perse, i dr., 2008, 2009; Injac, Radic, i dr., 2009; Torres i dr., 2010).

1. TEORIJSKI DEO

1.1. INTERAKCIJA NANOMATERIJALA SA ĆELIJAMA

Interakcije ćelija sa nanočesticama u velikoj meri zavise od hemijskog sastava, veličine, morfologije, površine i naelektrisanja čestica (Rauch, Kolch, Laurent, & Mahmoudi, 2013). Po unosu u biološki sistem, nanočestice mogu da intereaguju sa brojnim molekulima kao što su proteini, DNK, RNK, ugljeni hidrati, lipoproteini, različiti metaboliti i drugi. Proteini vezani za nanočestice mogu podleći strukturnim promenama, uključujući i denaturaciju (Sanvicens & Marco, 2008; Vertegel, Siegel, & Dordick, 2004). Adsorpcija proteina za posledicu može imati i aglomeraciju nanočestica koja dovodi do aktivacije komplementnog imunološkog sistema, tj. preuzimanja agregata od strane fagocita, adheriranje agregiranog materijala za zidove krvnih sudova, aktivaciju trombina usled povrede tkiva, anafilaksusa mogućim fatalnim ishodom.

Stoga, ključno u razvoju nanočestica sa maksimalnom biokompatibilnošću je pažljiv dizajn *in vitro* studija, čime se dobija uvid u ćelijski odgovor odabranih linija na dati sistem, dozu, vreme izlaganja i unutarćelijsku sudbinu nanočestica. Da bi se dizajnirale bezbedne i efikasne nanočestice neophodno je razumevanje odnosa fizičko-hemijskih osobina nanočestica i biološkog efekta koji izazivaju. Efekti nanočestica, kako željeni tako i oni neželjeni, zavise od njihove hidrodinamičke veličine, oblika, doze, površine, načina administracije, reakcije imunog sistema i zadržavanja u cirkulaciji (Wilczewska, Niemirowicz, Markiewicz, & Car, 2012).

1.1.1. USVAJANJE U ĆELIJE I OSOBINE NANOČESTICA

Imajući u vidu različite biološke efekte koje mogu izazvati čestice različitih veličina, veoma je bitno definisati način pripreme uzorka i okarakterisati njegovu stabilnost u fiziološkim uslovima. Disperzije se mogu stabilizovati na više načina. Najčešće korišćeni postupci su ultrazvučnim tretmanom i/ili dodatkom disperzionih stabilizatora (Mandzy, Grulke, & Druffel, 2005). Plućni surfaktant (lipidno-proteinska smeša koja oblaže zidove alveola u plućima), Tween (surfaktant), albumin ili serum se uglavnom primenjuju kao stabilizatori disperzija u fiziološkim rastvorima (Buford i dr., 2007; Murdock i dr., 2008; Sager i dr., 2007). Bihari i saradnici (2008) su detaljno analizirali važnost načina pripreme nanočestica i postavili optimizovani metod pripreme stabilnih disperzija nanočestica u fiziološkim uslovima za *in vitro* i *in vivo* primene.

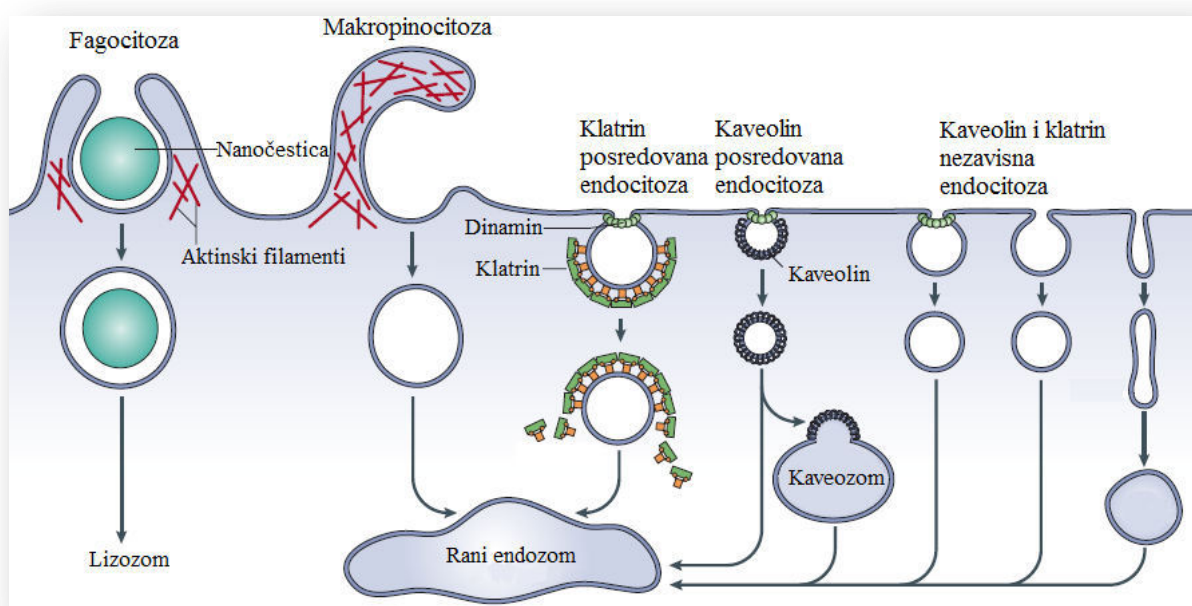
Stabilnost čestica zavisi od odnosa privlačnih i odbojnih sila između čestica. Generalno se smatra da je disperzija stabilna ako je vrednost zeta potencijala čestica viša od +30 mV ili niža od -30 mV, međutim ovo nije jedini parametar koji se posmatra u cilju određivanja stabilnosti čestica (Buford i dr., 2007; Deguchi i dr., 2007; Murdock i dr., 2008).

Termini agregat i aglomerat se često poistovećuju, no po standardu ISO/TS 27687:2008(en) agregat predstavlja grupaciju čestica koje su vezane snažnim interakcijama, kao što je npr. kovalentna veza, gde je ukupna spoljašnja površina agregata značajno manja od zbira površina pojedinačnih čestica. Aglomerat predstavlja grupaciju čestica i/ili agregata, vezanih slabim npr. van der Valsovim (van der Waals) interakcijama, čija je ukupna spoljašnja površina približno jednaka zbiru površina pojedinačnih čestica. Nichols i saradnici (2002) su, na primer, predložili da se aglomeratima nazivaju grupacije čestica koje se primenom određene sile (npr. soniciranje) raspadaju na manje grupe/čestice. Predlog je da se agregatima nazivaju strukture koje nastaju asocijacijom molekula u manje supramolekularne strukture, koje se dalje mogu udružiti u aglomerate.

Kako veličina nanočestica varira od svega nekoliko nanometara pa do nekoliko stotina nanometara, preuzimanje od ćelija uključuje i različite moguće mehanizme: pinocitoza, endocitoza, fagocitoza i druge (Rauch i dr., 2013). Veličina čestica u velikoj meri utiče na preuzimanje od ćelija. Pored veličine, bitnu ulogu prilikom preuzimanja ima i površinsko naelektrisanje čestica (Dausend i dr., 2008).

Dokazano je uopšteno da čestice manje od 100 nm mogu ući u ćelije, manje od 40 nm ulaze u jedro, dok čestice manje od 35 nm mogu proći krvno-moždanu barijeru (Dawson, Salvati, & Lynch, 2009). Rejman i saradnici su na ćelijama melanoma B-16 ispitivali unos nanočestica lateksa veličine 50-500 nm i dokazali da je moguće ćelijsko usvajanje čak i najvećih ispitanih čestica veličine 500 nm (Rejman, Oberle, Zuhorn, & Hoekstra, 2004). Mehanizmi unosa čestica u ćeliju pomenutim putevima su predstavljeni na slici 1.1. Endocitoza je osnovni ćelijski proces kojim se u ćeliju unose različiti sadržaji. S obzirom na to da se osobine molekula i čestica koji se unose u ćeliju razlikuju, tako se i način njihovog unosa u istu razlikuje. Makropinocitoza je pretežno aktin-zavisni mehanizam endocitoze kojim se u ćeliju unose velike količine tečnosti i faktora rasta posredstvom vezikula većih od 500 nm. Fagocitoza je takođe aktin-zavisni oblik endocitoze, posredovan membranskim produžecima oblika čaše, kojim se u ćeliju unose velike čestice (Mayor & Pagano, 2007). Klattrin- i kaveolin-posredovana endocitoza predstavlja unos čestica posredstvom klattrinskih/kaveolinskih vezikula, kojim se u ćeliju unose nanočestice veličine 100-150 nm i

50-80 nm, respektivno (Laurent, Burtea, Thirifays, Häfeli, & Mahmoudi, 2012). Slika 1.1. slikovito predstavlja moguće načine unosa nanočestica u ćeliju, bez vernog prikaza odnosa dimenzija nanočestica koje se unose kaveolin i klatriin-posredovanom endocitozom.



Slika 1.1. Prikaz mogućih načina unosa nanočestica u ćeliju. Preuzeto uz izmene iz (Mayor & Pagano, 2007)

Nekoliko publikacija ukazuje na to da je optimalni dijаметar nanočestica (nanočestice zlata, silikatne nanočestice, ugljenične nanočestice) za povećani intracelularni unos u nekim ćelijama sisara 50 nm (Chithrani & Chan, 2007; Jin, Heller, Sharma, & Strano, 2009; Fang Lu, Wu, Hung, & Mou, 2009).

Grupa Cabral i saradnici (2011) su takođe ispitivali uticaj veličine polimernih čestica (30, 50, 70 i 100 nm) na depoziciju u tumorima i zaključili da sve ove čestice mogu dospeti do hiperpermeabilnih tumora (adenokarcinom kolona miševa), ali da se samo one manje od 70 nm mogu efikasno akumulirati u slabo permeabilnim tumorima (humani adenokarcinom pankreasa). U slučaju humanog adenokarcinoma pankreasa zaključeno je da vaskularni zidovi, što se propustljivosti tiče, funkcionišu po principu „sve ili ništa” sa pragom 30-70 nm, gde se gornja granica može povećati iznad 70 nm ukoliko se tumor tretira TGF- β (transformirajući faktor rasta-beta) inhibitorom.

Akumulacija manjih nanočestica zlata (50 nm) u tumorima je potvrđena i od grupe Huo i saradnika (Huo i dr., 2013).

Wong i saradnici (2011) su razvili želatin nanočestice veličine 90 nm koje se dejstvom tumor proteinaza degradiraju u kvantne tačke (engl. quantum dots) veličine 10 nm. Ova studija takođe naglašava važnost veličine nanočestica na intersticijalnu difuziju čestica pošto su kvantne tačke pokazale da imaju širu distribuciju i dublje prodiranje u tumor nego silikatne nanočestice (oko 90 nm) koje ne podležu dejstvu proteinaza.

Jiang i saradnici su *in vitro* primenom zlatnih i srebrnih nanočestica sa vezanim anti-HER2 (HER2: humani epidermalni faktor rasta 2) antitelima utvrdili da je optimalno ćelijsko preuzimanje u ćelijama adenokarcinoma dojke postignuto sa česticama veličine 25-50 nm (sa antitelima: 45-80 nm) (Jiang, Kim, Rutka, & Chan, 2008).

U *in vivo* eksperimentu, Lee i saradnici su ispitivali uticaj aktivno ciljajućih blok-kopolimernih micela kao nanočestica (25 i 60 nm) na unutarćelijsko nakupljanje nanočestica (H. Lee, Fonge, Hoang, Reilly, & Allen, 2010). Potvrđeno je da je akumulacija čestica od 25 nm unutar tumora bila manja usled bržeg uklanjanja tih čestica od strane limfnog sistema, ali i da je distribucija ovih čestica u citoplazmi i jedru bila mnogo veća u poređenju sa česticama od 60 nm. U *in vivo* eksperimentu na miševima Dreher i saradnici (2006) su pratili kinetiku intratumorske akumulacije tokom 30 minuta i zaključili da manje nanočestice (2 i 3 nm) brže i dublje akumuliraju u tumor nego veće čestice (7 i 25 nm), no isto tako brzo difunduju i u vaskularne prostore, zbog čega se akumulacija u tumoru smanjuje.

Oblik nanočestica je takođe od veoma velikog značaja za ulazak u ćelije. Gratton i saradnici su dokazali da štapičaste čestice imaju najveće preuzimanje od HeLa ćelija, a zatim sferne, cilindrične i kockaste čestice (Gratton i dr., 2008). Druge studije ukazuju na to da kod čestica manjih od 10 nm prednost ima sferni oblik nad štapičastim (Chithrani & Chan, 2007; Qiu i dr., 2010).

Poput ostalih fizičko-hemijskih parametara, naelektrisanje nanočestica (Alexis i dr., 2008; Bertrand & Leroux, 2012) utiče na dužinu sistemske cirkulacije i intratumoralne procese (Dellian, Yuan, Trubetskoy, Torchilin, & Jain, 2000). Prisustvo naelektrisanja na površini nanočestice može promeniti opsonizaciju, prepoznavanje od ćelija i tok cirkulisanja plazmom (Alexis i dr., 2008; He, Hu, Yin, Tang, & Yin, 2010). Potvrđeno je da se pozitivne čestice u većoj meri nego neutralne i negativne unose u ćeliju endocitozom, jer negativno naelektrisanje ćelijskih membrana olakšava prolaz pozitivnih čestica (Marano, Hussain,

Rodrigues-Lima, Baeza-Squiban, & Boland, 2011). Pozitivno naelektrisanje verovatno favorizuje interakcije nanočestica sa krvnim sudovima tumora, zbog čega ne postoji mogućnost dubljeg prodiranja u tumor, dok je očuvana mogućnost redistribucije takvih nanočestica u sistemsku cirkulaciju. Ovaj fenomen je iskorišćen u terapeutske svrhe za ciljanje endotelijuma tumorskih krvnih sudova sa angiogenim lekovima u prekliničkom modelu (Schmitt-Sody i dr., 2003; Strieth i dr., 2004), a nedavno i na humanom modelu (Fasol i dr., 2012; Löhr i dr., 2012). Nomura i saradnici (Nomura, Saikawa, i dr., 1998; Nomura, Koreeda, Yamashita, Takakura, & Hashida, 1998) su ispitivali interakciju neutralnih i naelektrisanih koloida sa tumorom davanjem intratumoralne injekcije i zaključili da pozitivno naelektrisani koloidi duže intereaguju sa tumorom nego neutralni i negativni.

Ono što treba napomenuti je da nanočestice u ćelije ne stižu u nativnom obliku, već u dinamičkoj razmeni sa biološkim okruženjem preživljavaju promene i bivaju brzo obmotane biomolekulima i proteinima, koji se zajedničkim nazivom nazivaju korona (Lynch, Salvati, & Dawson, 2009), što utiče na dalju sudbinu nanočestica.

Ovo je veoma bitno kada se nanočestice primenjuju u *in vivo* sistemima. Dok se neutralne čestice najduže zadržavaju u cirkulaciji, one pozitivne se veoma brzo eliminišu iz krvi i dovode do komplikacija kao što je hemoliza i agregacija trombocita (Albanese, Tang, & Chan, 2012). Proteinska korona izgleda da je ključni faktor ovih razlika, jer drugačije površinske karakteristike čestica (morfologija i naelektrisanje) privlače različite proteine (imunoglobuline, lipoproteine i koagulacione faktore) tokom nastajanja korone (Cedervall i dr., 2007). Interakcija nanočestica sa proteinima krvi se smatra najkritičnijim korakom u određivanju biodistribucije, toksičnosti i efikasnosti nanočestica (Fenoglio, Fubini, Ghibaudi, & Turci, 2011).

Bihari i saradnici (2008) su ustanovili da albumin humanog seruma, nakon što se doda dispergovanim nanočesticama TiO_2 , adherira za površinu čestica, što se može pratiti merenjem promene dimenzija čestica dinamičkim rasejanjem svetlosti. Ovo je u saglasnosti sa teorijom o nastajanju tzv. nanočestica-protein korone do čijeg stvaranja dolazi nakon inkubacije nanočestice sa proteinima (Lynch & Dawson, 2008). Slično, Lindman i saradnici su utvrdili da čestice veće od 120 nm bivaju obavijene jednoslojnim proteinskim omotačem, odnosno da nanočestice nakon ulaska u cirkulaciju prvo dolaze u kontakt sa albuminom i ostalim proteinima seruma gradeći tako proteinsku koronu (Lindman i dr., 2007).

Do sada je primena različitih nanočestica *in vitro* za posledicu imala indukciju oksidativnog stresa, stvaranje citokina i apoptozu, međutim, nije neuobičajeno da su rezultati *in vitro* i *in*

in vivo istraživanja za iste čestice neusaglašeni (Laurent, Burtea, Thirifays, Häfeli, & Mahmoudi, 2012; Mahmoudi, Laurent, Shokrgozar, & Hosseinkhani, 2011). Temeljna fizičko-hemijska karakterizacija čestica i bolje razumevanje njihovih interakcija sa ćelijskim membranama i unutarćelijskim sadržajem bi doprineli razjašnjavanju razlika *in vivo* i *in vitro* rezultata. Rezultati studija kojima je ispitano preuzimanje različitih nanočestica od ćelija se razlikuju zbog različitih osobina ćelija, kao što je fluidnost membrane, ćelijski ciklus, prisustvo receptora itd.

S obzirom na brojne faktore koji mogu usloviti toksičnost nanočestica, veoma je teško pretpostaviti njihovo delovanje, stoga su potrebne detaljne toksikološke studije za svaku novu formulaciju. Međutim, uzimajući u obzir brojna ispitivanja, mogu se izvesti neki generalni zaključci po pitanju odnosa: osobina-toksičnost nanočestice. U pogledu veličine nanočestica, manje čestice imaju veću dodirnu površinu, stoga se smatraju reaktivnijim i toksičnijim. Čestice hidrodinamičkog dijametra 10-100 nm su pokazale optimalne farmakokinetičke osobine za *in vivo* primenu. Manje čestice podležu renalnom klirensu, dok veće bivaju brzo opsonizovane i uklonjene iz cirkulacije delovanjem makrofaga retikuloendotelijalnog sistema (Ai i dr., 2011).

1.2. OSOBINE TUMORSKE VASKULARIZACIJE

Usled farmakokinetičkih i farmakodinamičkih svojstava leka, ne može se sa velikom sigurnošću tvrditi da će ciljane ćelije ili tkiva primiti optimalne količine terapeutika. Distribucija leka u tumor se u velikoj meri pripisuje postojanju fenestracija u krvnim sudovima tumora, kao i slaboj limfnoj drenaži u tumorskom tkivu, što se naziva efektom povećane permeabilnosti i retencije. Ovi efekti zavise od tipa tumora, ali i od individualnih zdravstvenih karakteristika pacijenata (Bertrand & Leroux, 2012).

Kada solidni tumori dostignu određenu veličinu, normalna vaskulatura koja se nalazi u blizini nije dovoljna da obezbedi dovoljne količine kiseonika koji je potreban za dalju proliferaciju. Posledično, ćelije odumiru i luče faktore rasta koji su „okidači” za stvaranje novih krvnih sudova iz okolnih kapilara (Bates, Hillman, Williams, Neal, & Pocock, 2002). Ovaj proces, angiogeneza, podstiče brzi razvoj novih nepravilnih krvnih sudova koji imaju diskontinualni epitel i nedostatak bazalne membrane koja postoji u normalnim vaskularnim strukturama (Jain, 1998; Jain & Stylianopoulos, 2010). Kako je u tumorima limfna drenaža veoma umanjena (Padera i dr., 2004) i kako fenestracije omogućuju lakši ulazak komponenata u

tumorsko tkivo, čestice manje od 4 nm mogu da difunduju u tkivo, a zatim i u cirkulaciju (Jain, 1987; Noguchi i dr., 1998; Swartz, 2001), za razliku od većih čestica čija je difuzija u krvotok usled većih dimenzija otežana, zbog čega se veće nanočestice akumuliraju u tumorskom tkivu.

Smatra se da postoji nekoliko makromolekulskih puteva kroz vaskularizaciju tumora međutim, koji od njih je u najvećoj meri odgovoran za hiperpermeabilnost tumora i makromolekularni transvaskularni transport nije u potpunosti razjašnjeno (Brigger, Dubernet, & Couvreur, 2012; Hobbs i dr., 1998). Nevezano za transportni mehanizam, Hobs i saradnici, kao i Yuan i saradnici, su došli do zaključka da je kod nekoliko modela tumora maksimalna veličina pora u opsegu 380 - 780 nm (Hobbs i dr., 1998; Yuan i dr., 1995), što je u saglasnosti i sa istraživanjima Unezaki i saradnika, koji su *in vivo* fluorescentnom mikroskopijom potvrdili da je maksimalna veličina pora oko 400 nm (Unezaki i dr., 1996).

1.3. HEMOTERAPIJA I TRENDOWI U NANOFORMULACIJAMA LEKOVA

1.3.1. SKLADIŠTENJE, PRENOS I OTPUŠTANJE LEKA IZ NANOFORMULACIJE

Platforme bazirane na nanočesticama pružaju alternativni pristup smanjenju neželjenih efekata antineoplastika. Jedna od najvećih prednosti ovog pristupa je velika količina leka po nanonosaču, odnosno veliki lek/nosač odnos. Skladištenje leka u nanoformulacije se uglavnom postiže kovalentnim vezivanjem leka za dostavnu platformu (nanonosač) ili enkapsulacijom leka (npr. lipozomi). Kovalentno vezivanje podrazumeva raskidivi linker koji će efikasno osloboditi lek. U slučaju enkapsulacije leka postoji nekoliko različitih strategija u zavisnosti od permeabilnosti leka. U najjednostavnijem slučaju lek se može pasivno skladištiti u porozne čestice kao što je neki polimer ili neorganski materijal, npr. silikatne čestice (Knežević i dr., 2015; Knežević i dr., 2016). Kod ovih sistema lek kontinuirano difunduje iz platforme, stoga je neophodno da platforma bude osmišljena tako da obezbeđuje dovoljne koncentracije leka preferencijalno u obolelom tkivu. Otpuštanje leka u cirkulaciji može biti poboljšano stvaranjem platforme koja bi nakon preuzimanja od ćelija povećala brzinu otpuštanja leka. Ovo podstaknuto otpuštanje se može postići ili korišćenjem biohemijskih uslova u tumoru ili nekim spoljašnjim podsticajem, na primer ozračivanjem (Dawidczyk i dr., 2014; Knežević i dr., 2011).

Transport nanočestice u ćeliju uglavnom uključuje vezivanje za površinu ćelije, translokaciju kroz ćelijsku membranu i unutarćelijsko kretanje. Nanočestične platforme za dostavu lekova se uglavnom preuzimaju endocitozom (Slika 1.1.). U slučaju aktivnog ciljanja, grupe odgovorne za prepoznavanje u istraživanjima Doherty i saradnika i Paulos i saradnika su transferin i folna kiselina (Doherty & McMahon, 2009; Paulos, Reddy, Leamon, Turk, & Low, 2004).

Dok se transport nanočestice sa lekom u ćeliju efikasno odvija endocitozom, oslobađanje leka iz lizozoma ili endozoma može predstavljati izazov. Pošto endozomi i lizozomi imaju nisku pH vrednost i sadrže proteolitičke enzime, smatra se da se te osobine mogu iskoristiti kao ključni podsticaj za otpuštanje leka iz platforme kojom se prenosi.

1.3.2. OSNOVNA PRAVILA ZA DIZAJN NANOČESTIČNE PLATFORME ZA DOSTAVU LEKA

Mali broj nanoplatforami za dostavu leka koje je odobrila Uprava za hranu i lekove (*engl.* Food and Drug Administration, FDA) ukazuju na to da postoji potreba za poboljšanjem razumevanja fiziološki postavljenih prepreka, kao i odnosa strukture i osobina nanoplatforami.

Generalne preporuke (Dawidczyk i dr., 2014) za dizajn nanoplatforami za dostavu lekova su sledeće:

Stabilnost u cirkulaciji

Nanoplatforama bi trebalo da bude stabilna u cirkulaciji i ne bi trebalo da se degradira ili destabilizuje tokom protoka i na fiziološkoj temperaturi. Dalje, optimalno bi bilo da su čestice neutralnog ili blago negativnog zeta potencijala. Pored toga, čestice ne bi trebalo da se vezuju za komponente krvi, endotel ili mononuklearni fagocitni sistem (Ai i dr., 2011).

Selektivnija distribucija

Distribucija nanoplatforami bi trebalo da bude ograničena na dobro prokrvljena tkiva, kao što je tumorsko dok bi distribucija u normalna tkiva trebalo da je manja. Da bi se smanjila mogućnost nespecifičnog vezivanja za endotel, smatra se da čestice treba da imaju neutralne ili blago negativne vrednosti zeta potencijala, kao i da bi trebalo da budu hidrofilne. Često se čestica, da bi joj se povećalo vreme cirkulacije i smanjila mogućnost klirensa od mononuklearnog fagocitnog sistema, površinski modifikuje najčešće polietilen-glikolom (Barenholz, 2012; Gabizon, Shmeeda, & Barenholz, 2003).

Povećanje akumulacije u tumoru

Da bi se maksimalno iskoristio efekat povećane retencije i propustljivosti kod tumorskih tkiva, čestice ne bi trebalo da budu veće od 200 nm. Sa druge strane, trebalo bi da budu veće od 8 nm da bi se izbegla brza eliminacija (Ai i dr., 2011).

Skladištenje leka

Načini skladištenja leka u nanoplatforni predstavljaju brojne prepreke u dizajnu nanonosaa lekova. Konstantna difuzija leka iz pasivno napunjenih nanoplatforni otežava isporuku terapijske doze do tumora i povećava toksične efekte na normalnom tkivu. Sa druge strane, lekovi koji su kovalentno vezani za dostavljačku nanoplatformu moraju biti oslobođeni na mestu tumora da bi ispoljili dejstvo. Pored ovoga, bitno je da se po nanoplatforni nalaze dovoljne količine leka, jer bi i u manjim dozama takve formulacije imale veći učinak nego slobodni lek (Dawidczyk i dr., 2014).

1.4.FULERENOLI: SINTEZE, MEHANIZMI NASTAJANJA, FIZIČKO-HEMIJSKE OSOBINE VODENIH RASTVORA

1.4.1. SINTEZE

Od otkrića 1985. godine fulerenima i njihovim derivatima su posvećena mnoga istraživanja, kako iz oblasti sinteze i karakterizacije materijala, tako i iz primene, koja ima zaista širok spektar, a od koje se bioaplikacija fulerenola izdvojila kao najinteresantnija i sa najvećim brojem naučnih publikacija u oblasti. Fulereni ($C_n, n \geq 60$) su slabo rastvorni u vodi, zbog čega se dovodi u pitanje njihova biokompatibilnost. Nerastvorljivost fulerena je jedan od izazova koji se mora premostiti da bi se oni mogli primenjivati u biološkim sistemima, tako da je funkcionalizaciji ovih molekula posvećen veliki broj istraživanja. Polihidroksilni derivati fulerena, fulerenoli, su rastvorni u vodi i odlikuju se biokompatibilnošću i biofunkcionalnošću (Kokubo, Shirakawa, Kobayashi, Aoshima, & Oshima, 2011). Vodorastvorni derivati fulerena su ispitivani na mnogim biološkim eksperimentalnim modelima, a hidroksilovani derivati, fulerenoli su nesumnjivo jedna od najispitivanijih grupa derivata C_{60} .

Sintetski putevi za dobijanje fulerenola se mogu klasifikovati na nekoliko načina, a neki od njih su po stepenu hidroksilacije finalnog proizvoda, pH vrednosti sredine, polaznom reagensu (fuleren ili derivat fulerena), prisustvu katalizatora itd. Većina sintetskih puteva fulerenola ne završava čistim hidroksilovanim derivatom $C_{60}(OH)_n$, već smešom proizvoda $C_{60}(OH)_{x-y}$, $C_{60}O_x(OH)_y$ ili $C_{60}(OH)_x(ONa)_y$ (Djordjevic i dr., 2015; Semenov i dr., 2016; Sillion i dr., 2013). Fulerenoli se mogu sintetisati oksidacijom u kiselim ili alkalnim uslovima, pri čemu se u baznim uslovima dobijaju proizvodi sa većim brojem hidroksilnih grupa, koji se uglavnom odlikuju većom rastvorljivošću u vodi (Wang, Wang, Lu, & Gao, 2015). Kratki pregled sinteza i karakterizacije sintetisanih fulerenola predstavljen je u tabeli 1.1.

Sinteza u kiseloj sredini je razvijena od strane Chiang i saradnika, uz primenu sumporne i azotne kiseline pri čemu nastaju derivati sa 14-16 hidroksilnih grupa i „nečistoćama” u vidu karbonilne, karboksilne i hemiacetalne grupe (Chiang, Swirczewski, i dr., 1992; Chiang i dr., 1993). Fulerenole sa manjim brojem hidroksilnih grupa, te nižom rastvorljivošću, ali bez prisustva drugih funkcionalnih grupa je isti tim sintetisao 1994 (Chiang, Wang, Swirczewski, Soled, & Cameron, 1994) hidrolizom ciklosulfonovanog prekursora.

Dalje, elektrofilnom adicijom nitronijum jona i NO₂ radikala na fuleren, za kojom je sledila bazna hidroliza, dobijeni su proizvodi sa više hidroksilnih grupa (Chiang i dr., 1996).

Tabela 1.1. Pregled sintetskih različitih fulerenola. Preuzeto uz izmene iz: (Djordjevic i dr., 2015)

Fulerenol	Sinteza	Karakterizacija	Reference
C₆₀(OH)_nO_m	C ₆₀ /70, H ₂ SO ₄ :SO ₃ , KNO ₃ , 5 °C, pH≥9, MeOH	3424, 1595, 1392, 1084, 593 cm ⁻¹ δ = 170,3; 140,3; 100,0; 79,0 ppm δ = 175,0; 141,1; 103,1; 78,3 ppm (čvr.stanje)	(Chiang i dr., 1993)
C₆₀(OH)₂₄₋₂₆	NaOH, TBAH, O ₂ , 23 °C	3430, 1400, 1070, 1600 cm ⁻¹ δ = 3,35 ppm, δ = 140 ppm	(Li i dr., 1993)
C₆₀(OH)₂₄	Br ₂ /FeBr ₃ , NaOH, EtOH, 23 °C	3426, 1596, 1359, 1062 cm ⁻¹ δ = 4,2 ppm; δ = 107,0; 158,8 ppm; t = 4,49 min, 10–50 nm, -49.8 mV	(Mirkov i dr., 2004)
C₆₀(OH)_{n1}O_{n2}(ONa)_{n3} C₆₀(OH)₂₂₋₂₄	NaOH, benzen	3420, 1590, 1450, 1040 cm ⁻¹ t = 6,1 min; m/z 1094–1128	(Semenov i dr., 2011)
C₆₀(OH)_n	NaOH, PEG400	3432, 1063, 1600 cm ⁻¹ , δ = 3,35 ppm	(Zhang, Yang, He, & Zhu, 2004)
C₆₀(OH)₃₆·8H₂O C₆₀(OH)₄₀·9H₂O	H ₂ O ₂ , 2-propanol, dietiletar, heksan, 60 °C	3400, 1080, 1370, 1620 cm ⁻¹ , 50–100 nm	(Kokubo, Matsubayashi, Tategaki, Takada, & Oshima, 2008)
C₆₀(OH)₄₄·8H₂O	H ₂ O ₂ , 2-propanol, dietiletar	3400, 1080, 1370, 1620 cm ⁻¹ , 1,46 ± 0,38 nm	(Kokubo i dr., 2011)
C₆₀(OH)_nX	BH ₃ -THF, NaOH, H ₂ O ₂	3430, 1631, 1385, 1090, 450–550 cm ⁻¹ δ = 5,88; 6,08; 6,03 ppm	(Schneider, Darwish, Kroto, Taylor, & Walton, 1994)

U uslovima u kojima se koristi smeša kiselina HNO₃/H₂SO₄ stvara se derivat C₆₀(OH)₁₈₋₂₀ (Chiang, Upasani, & Swirczewski, 1992). Sinteza fulerenola posredstvom hemiketalnih grupa se može odvijati na dva načina. U prvom, smeša fulerena C₆₀ i C₇₀ podleže reakciji sa oleumom (H₂SO₄-SO₃) u prisustvu KNO₃. Reakciona smeša se zatim dalje obrađuje: filtriranjem, neutralizacijom kiselog medijuma, centrifugiranjem, ispiranjem natrijum-hidroksidom i metanolom (Chiang i dr., 1993). Spektralne karakteristike na ovaj način dobijenih fulerenola su sledeće: IR = 3424 (–OH), 1595, 1392, 1084, i 593 cm⁻¹; ¹³C NMR (D₂O) δ = 170,3; 140,3; 100,0 i 79,0 ppm; ¹³C NMR δ = 175,0; 141,1; 103,1 i 78,3 ppm. Elementalnom analizom je ustanovljen sledeći sadržaj: C 43,5; H 3,1; O 46,9; N 0,52; Na 2,3 i S 1,6%.

Drugi način sinteze podrazumeva tretman smeše fulerena koncentrovanom sumpornom i azotnom kiselinom, praćeno postepenim zagrevanjem do 115 °C uz magnetno mešanje. Nakon čega je smeša dalje obrađivana po koracima navedenim u prethodnom postupku.

XPS (*engl.* X-ray Photoelectron Spectroscopy) tj. analiza rendgenskom fotoelektronskom spektroskopijom, dobijenog fulerenola ukazuje na prisustvo mono oksigenovanih ugljenikovih atoma (287,9 eV, 23%) kao što su etarski ili hidroksilovani ugljenik; zatim dioksigenovanih (289,7 eV, 9%) kao što su karbonilni, ketalni ili hemiketalni ugljenici i neoksigenovanih ugljenika kojih je najviše (286,1 eV, 68%). Procenjeni prosečni broj hidroksilnih grupa je 14-16, sa 6-7 hemiketalnih grupa po molekulu. ^{13}C NMR spektar pokazuje signale na $\delta = 79,0$ ppm; (hidroksilovani ugljenici), $\delta = 100,0$ ppm (hemiketalni ugljenici), $\delta = 140,3$ ppm (olefinski ugljenici) i $\delta = 170,3$ ppm (vinil-etarski ugljenici).

Za postizanje alkalne sredine tokom sinteze fulerenola u različitim sintetskim putevima primenjivani su rastvor natrijum-hidroksida ili čvrst natrijum- i kalijum-hidroksid, a sintetisani su sledeći derivati: $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24-26}$, $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$, $\text{C}_{60}(\text{OH})_{27,2}$ i $\text{C}_{60}(\text{OH})_{16,4}$ (Arrais & Diana, 2003; Li i dr., 1993; S. Wang, He, Zhang, Jiang, & Zhu, 2005; Zhang i dr., 2003).

Li i saradnici su 1993. sintetisali fulerenolske nanočestice (*engl.* Fullerol Nanoparticles, FNP) na sobnoj temperaturi uz prisustvo kiseonika i natrijum-hidroksida, kao i tetra-n-butilamonijum hidroksida (TBAH) kao katalizatora koji pokazuje visoku efikasnost pri sobnim uslovima, nakon čega je rađeno ispiranje i taloženje dobijenog proizvoda metanolom (Li i dr., 1993). Elementarnom analizom određeno je prisustvo 26,5 hidroksilnih grupa po molekulu fulerenola. Ponavljanje reakcije u atmosferi argona je dovelo do usporavanja reakcije i dobijanja niže hidroksilovanog fulerenola sa najviše 10 hidroksilnih grupa po molekulu. Na IR spektru su okarakterisane sledeće apsorpcione trake: 3430 cm^{-1} (–OH), 1400 , 1070 cm^{-1} (C–O), i 1600 cm^{-1} (C=C). ^1H NMR spektar u DMSO-*d*₆ ukazuje na signal na $\delta = 3.35$ ppm, dok se u D₂O *d*₆ signal nalazi na vrednosti $\delta = 3.10$ ppm; ^{13}C NMR spektar pokazuje jedan široki signal na $\delta = 140$ ppm.

Semenov i saradnici (2010) su sintetisali fulerenol polazeći od niže hidroksilovanog fulerenola u prisustvu benzena, NaOH i TBAH uz mešanje tokom 12-15 sati. Isoljavanje braon pahuljastog taloga je postignuto dodatkom metanola, nakon čega je talog odvojen i uzastopno ispiran metanolom do neutralne pH vrednosti rastvora, te osušen. FTIR spektar pokazuje sledeće pikove: 3420 cm^{-1} , 1590 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} i 1040 cm^{-1} . Na osnovu masenog spektra, prosečna formula ovako dobijenih fulerenola je $\text{C}_{60}(\text{OH})_{22-24}$.

Zang i saradnici (2004) su predložili sintezu u kojoj su kao katalizator koristili polietilen-glikol 400 (PEG) umesto TBAH, u prisustvu oksidujućeg agensa i vodenog rastvora NaOH.

Promenom reakcionih uslova je moguće dirigovati da li će se dobiti vodorastvoran ili vodonerastvoran derivat. Naime, sa povećanjem koncentracije PEG i NaOH, fuleren se mahom prevodi u vodonerastvorni fulerenol, dok se visoki procenat vodorastvornog derivata dobija kada se vodeni rastvor NaOH doda benzenskom rastvoru fulerena C₆₀. Oba fulerenola pokazuju slične IR spektre: 3432 cm⁻¹, 1063cm⁻¹, and 1600cm⁻¹, kao i ¹H NMR spektre koji pokazuju snažan signal na $\delta = 3,35$ ppm, koji odgovara protonima hidroksilne grupe.

Chiang i saradnici su razvili metod dobijanja fulerenola C₆₀(OH)₁₀₋₁₂ u visokom prinosu u kojem se vrši hidroliza policiklosulfonovanog derivata fulerena u prisustvu vode/vodenom rastvoru NaOH (Chiang i dr., 1994).

Direktnom reakcijom fulerena i smeše vodonik-peroksida i natrijum-hidroksida se takođe može sintetisati fulerenol (Wang i dr., 2005).

Nedostatak sinteze fulerenola u baznoj sredini u prisustvu natrijum-hidroksida je taj što se u proizvodu neizbežno nalaze ostaci jona natrijuma, te odvajanje istih od fulerenola predstavlja izazov. Prisustvo natrijumovih soli kod vodorastvornih fulerenola se može naći kao posledica primene NaOH tokom sintetskog puta za potrebe hidroksilacije ili neutralizacije, kao i otežanog potpunog uklanjanja jona natrijuma iz slabo-kiselih rastvora fulerenola (Husebo, Sitharaman, Furukawa, Kato, & Wilson, 2004; Vilenko i dr., 2006). Osim primene jonoizmenjivačkog i hromatografskog tretmana, jone natrijuma je teško u potpunosti ukloniti iz rastvora fulerenola.

U cilju dobijanja fulerenola oslobođenog od prisustva jona natrijuma, Kokubo i saradnici (2011) su kao oksidativni agens primenili vodonik-peroksid koristeći i za proizvod dobili C₆₀(OH)₃₆x8H₂O (Kokubo i dr., 2008), odnosno C₆₀(OH)₄₄x8H₂O).

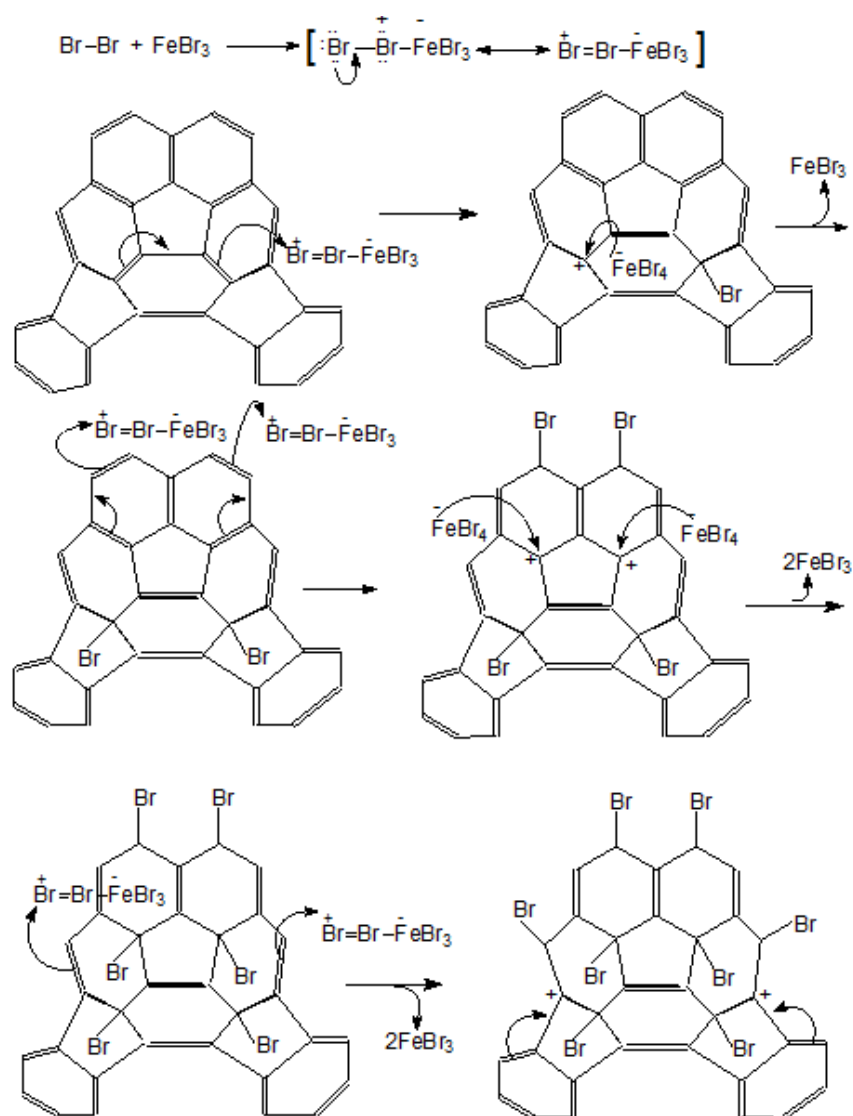
Sinteza fulerenola C₆₀(OH)₄₄ u jednom koraku je predložena od Kokubo i saradnika (2011). Fuleren C₆₀ u toluenskom rastvoru se hidroksiluje vodonik-peroksidom u prisustvu katalizatora TBAH uz mešanje na vazduhu na 60 °C. Vodeni rastvor se zatim odvaja, odakle se smešom rastvarača: 2-propanol, dietil-etar i heksan taloži proizvod. Vršiti se ponovno ispiranje etrom, nakon čega se talog osuši. Ostaci TBAH se uklanjaju propuštanjem vodenog rastvora dobijenog fulerenola kroz magnezijum-silikat.

S obzirom na to da niska rastvorljivost nehidroksilovanih fulerena smanjuje brzinu direktne reakcije fulerena i vodonik-peroksida, Kokubo i saradnici su predložili sintetski put visoko hidroksilovanih fulerena u kojem se umesto sa fulerenom kreće sa hidroksilovanim fulerenom sa 12 hidroksilnih grupa C₆₀(OH)₁₂, koji je nakon dodavanja 30% vodonik-

peroksida mešan na 60 °C 4 dana. Nakon toga je postignuto postepeno izdvajanje taloga dodavanjem sledećih rastvarača: 2-propanola, dietil-etra i heksana, nakon čega je u suvom ostatku zaostao proizvod $C_{60}(OH)_{36} \times 8H_2O$. Promena vremena trajanja sinteze sa 4 dana na 2 nedelje pri istim ostalim uslovima kao proizvod daje fulerenol $C_{60}(OH)_{40} \times 9H_2O$, što je potvrđeno elementalnom i TG analizom. IR spektri ovih fulerenola pokazuju sledeće pikove: 3400, 1620 1370, 1080 cm^{-1} .

Hidroboracioni postupak sinteze fulerenola se ogleda u sledećem: na toluenski rastvor fulerena je dodat višak BH_3 u THF, nakon čega se talog reakcione smeše u kojoj se nalazi intermedijer tretira vodonik-peroksidom, a zatim i natrijum-hidroksidom (Schneider i dr., 1994). Ovaj način sinteze rezultuje derivatom sa promenljivim brojem hidroksilnih, ali i ostalih funkcionalnih grupa. IR spektar čvrstog uzorka pokazuje sledeće signale: 3430, 1631, 1385, 1090 i 450–550 cm^{-1} trake koje pripadaju neizreagovanom fulerenu. U drugom načinu sinteze su reakcioni uslovi malo promenjeni, a intermedijer je tretiran glacijalnom sirćetnom kiselinom i ispiran rastvorom natrijum-hidrogenkarbonata. IR spektar čvrstog uzorka u toluenu pokazuje sledeće karakteristične signale C-H istezanja i -OH grupa; dok 1H NMR spektar u C_6D_6 pokazuje signale na $\delta = 5,88$ ppm (C–H), kao i dva neidentifikovana pika na $\delta = 6,08$ i 6,03 ppm.

Put katalitičke sinteze fulerenola bromovanjem fulerena C_{60} elementarnim bromom u prisustvu $FeBr_3$ kao katalizatora je opisan u radu Đorđević i saradnika (1998), ujedno to je sinteza kojom je sintetisan fulerenol za potrebe eksperimentalnog dela ovog doktorata. Pretpostavljeni mehanizam katalitičkog bromovanja fulerena C_{60} je predstavljen na slici 1.2.



Slika 1.2. Pretpostavljeni mehanizam katalitičkog bromovanja fulerena C₆₀ (Djordjević i dr., 1998)

Ovim sintetskim putem se dobija samo jedan reakcioni proizvod, C₆₀Br₂₄ bez okludovanih molekula Br₂, što je potvrđeno TG/MS analizom. Blagim zagrevanjem uz mešanje se eliminiše neizreagovani Br₂, a ispiranjem u vodenom rastvoru kiseline (pH<2) se uklanja katalizator FeBr₃. Dalje, polihidroksilni polianjonski derivat C₆₀(OH)_{24-n}O_n⁻Na_n⁺ je dobijen iz polibromnog derivata C₆₀Br₂₄ potpunom supstitucijom (S_N2 mehanizmom) atoma broma hidroksilnim grupama u alkalnom (pH=12) vodenom rastvoru (Mirkov i dr., 2004). Reakciona smeša je ispirana 98% etanolom, zatim obrađena na jonoizmenjivačkoj koloni i uparena pod sniženim pritiskom do tamno-braon amornog fulerenola C₆₀(OH)_{24-n}O_n⁻Na_n⁺. Rastvorljivost ovako dobijenog fulerenola u vodi je 11 mg/cm³, a u smeši DMSO/voda (9/1)

rastvorljivost je više od 37 mg/cm^3 . FTIR analiza dobijenog proizvoda ukazuje na karakteristične pikove: 3426 cm^{-1} , 1596 cm^{-1} , 1359 cm^{-1} , 1062 cm^{-1} . ^1H NMR spektar (D_2O) pokazuje singlet na $\delta = 4,2 \text{ ppm}$ koji odgovara H-atomima hidroksilne grupe; dok ^{13}C NMR spektar pokazuje signale na $\delta = 107,0 \text{ ppm}$ i $\delta = 158,8 \text{ ppm}$, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima za sp^2 i sp^3 hibridizovan C atom.

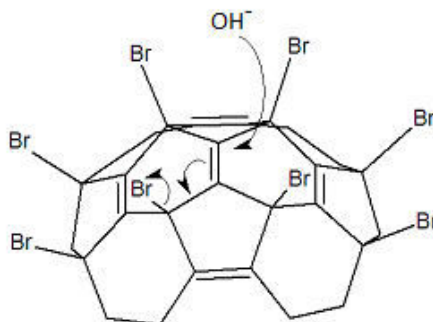
Mehanizmi nastajanja fulerenola

$\text{S}_{\text{N}}2$ mehanizam nukleofilne supstitucije (Slika 1.3.) generalno favorizuju voluminozne odlazeće grupe, kao što je Br^- (March J., 1992) u slučaju supstitucije atoma broma hidroksilnim grupama:



Slika 1.3. Mehanizam $\text{S}_{\text{N}}2$ supstitucije (March J., 1992)

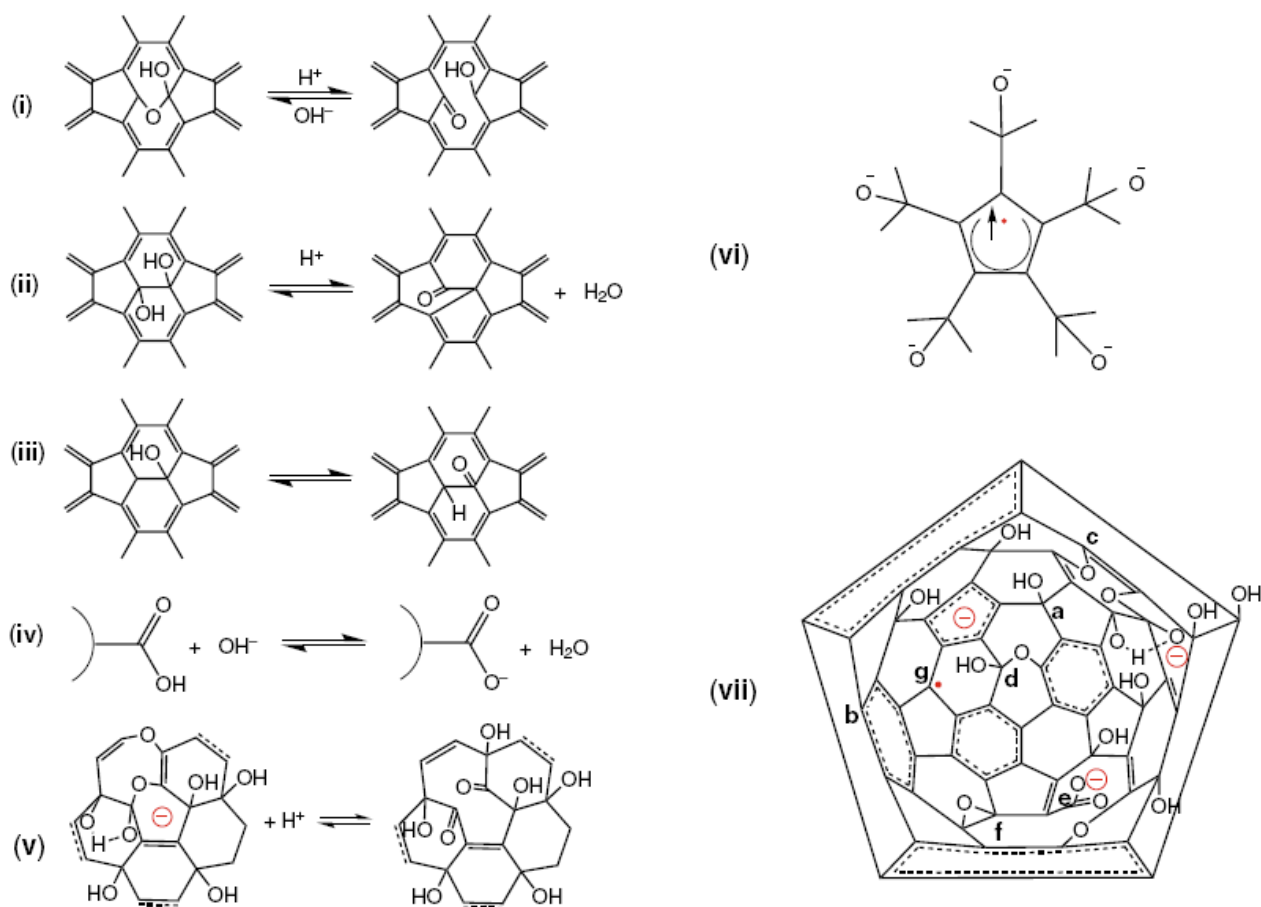
Supstitucija broma hidroksilnom grupom (Slika 1.4.) mogla bi se prikazati sledećim mehanizmom:



Slika 1.4. Mehanizam supstitucije atoma Br hidroksilnim grupama

Karakteristični infracrveni apsorpcioni pikovi fulerenola C_{60} su: 1080 (mC-O) , 1370 (dSC-O-H) , 1620 (mC=C) i $3400 \text{ cm}^{-1} \text{ (mO-H)}$, čime se potvrđuje hidroksilacija fulerena (Chiang i dr., 1996; Chiang i dr., 1993; Kokubo i dr., 2008). Prisustvo apsorpcionog pika na 1720 cm^{-1} koji potiče od mC=O (Husebo i dr., 2004; Wang i dr., 2005) se primećuje po obradi proizvoda sinteze hlorovodoničnom kiselinom, dok nakon tretiranja reakcione smeše

natrijum-hidroksidom ovaj pik nestaje. Ova pH-zavisna strukturalna konverzija je i predmet istraživanja, a nekoliko grupa (Chiang i dr., 1993; Husebo i dr., 2004; Kokubo i dr., 2008; Wang, Lu, Zhao, & Gao, 2015) je objasnilo ove rezultate (Slika 1.5.).



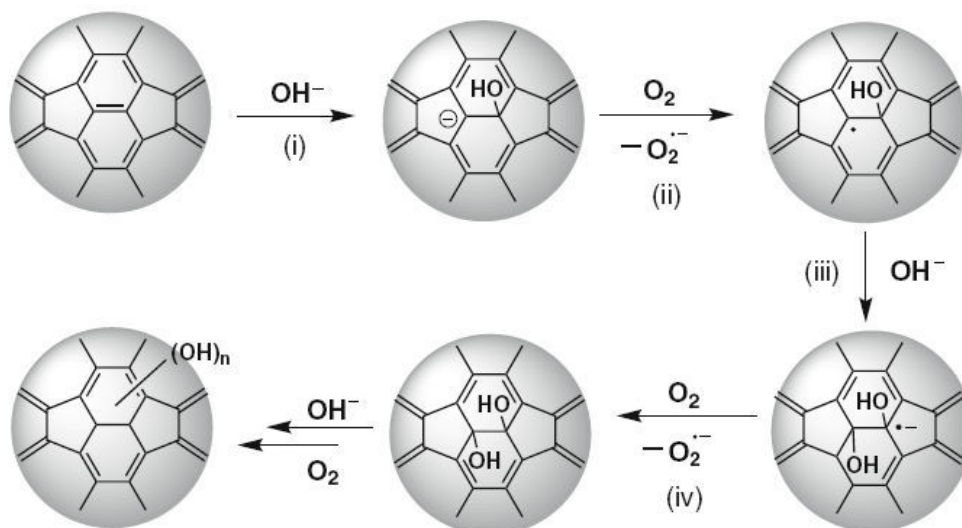
Slika 1.5. Mehhanizmi pH-zavisne konverzije karbonilne grupe fulerenola (i-v); predloženo objašnjenje radikalanijskih osobina fulerenola (vi); strukturalni model fulerenola (vii) (Wang, i dr., 2015)

Chiang i saradnici (1993) su predložili postojanje hemiacetalne strukture i tautomerizam između hemiacetala i ketona (Slika 1.5. i, ii), ali su obe reakcije nezavisne od pH vrednosti. Xing i saradnici su predložili rešenje koje je predstavljeno na slici 1.5. iii, međutim u tom slučaju karbonilni ugljenik ima pet veza (Xing i dr., 2004). Reakcija koja je na slici 1.5. predstavljena pod (iv) je moguća iako ne obezbeđuje dalje informacije o tome kako je karboksilna grupa formirana (Kokubo i dr., 2008), što je ključ za razumevanje strukture fulerenola.

Što se elektronskih osobina tiče, Husebo i saradnici (2004) su otkrili da su fulerenoli dobijeni različitim sintetskim putevima stabilni radikalni anjoni. Ova osobenost može poticati od

prisustva ciklopentadienskih centara koji postoje u fulerenolima (Slika 1.5. vi). Međutim, ciklopentadienil ne može istovremeno biti i anjon i radikal zbog toga što pentagoni prsten sa šest π -elektrona ima stabilnu nemagnetnu elektronsku strukturu neradikalne prirode.

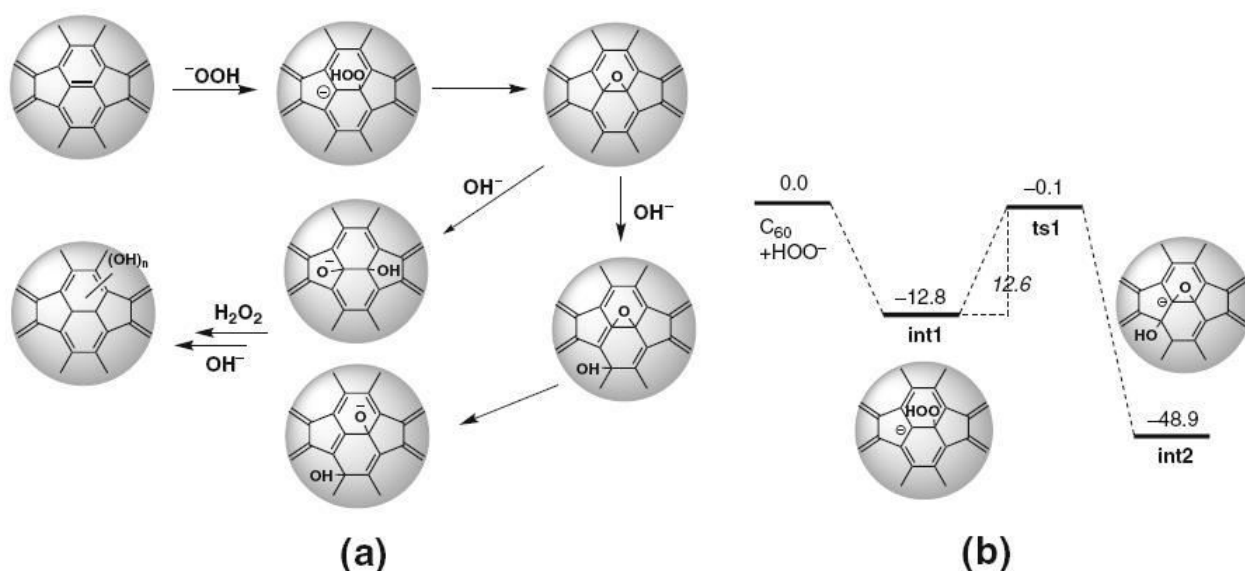
Wang i saradnici (2015) su predložili strukturni model fulerenola predstavljen na slici 1.6. vii. U alkalnim uslovima, model na tri mesta ima negativna naelektrisanja, jednu radikalsku i nijednu keto funkciju, što je u saglasnosti sa nestajanjem IR apsorpcionog pika karbonylne grupe na 1720 cm^{-1} . Nakon dodatka hlorovodonične kiseline karbonylna grupa se nagrađuje po reakciji koja je predstavljena reakcijama na slici 1.5. iv, v, i ovim se objašnjava pH-zavisno pojavljivanje ovog apsorpcionog pika, a strukturni model prikazan na slici 1.5. vii detaljno objašnjava radikalsko-anjonsku prirodu fulerenola.



Slika 1.6. Pretpostavljeni mehanizam nastajanja fulerenola u prisustvu NaOH i kiseonika (Wang i dr., 2015)

Različiti putevi sinteze uključuju različite mehanizme nastajanja fulerenola. Pretpostavljeni mehanizam prikazan na slici 1.6. predložen od Husebo i saradnika (2004) je u prisustvu natrijum-hidroksida i kiseonika. Reakcija se odvija u četiri koraka: (i) fuleren C_{60} reaguje sa OH^- , stvarajući C_{60}OH^- , (ii) C_{60}OH^- predaje jedan elektron kiseoniku, pri čemu nastaju $\text{C}_{60}\text{OH}^\bullet$ i $\text{O}_2^{\bullet-}$, (iii) adicija još jedne hidroksilne grupe dovodi do nastajanja $\text{C}_{60}(\text{OH})_2^{\bullet-}$, (iv) kiseonik vezuje jedan elektron iz $\text{C}_{60}(\text{OH})_2^{\bullet-}$ što rezultuje stvaranjem $\text{C}_{60}(\text{OH})_2$ i novog $\text{O}_2^{\bullet-}$. Kako reakcija napreduje, fulerenoli koji sadrže jone natrijuma se formiraju. Pomenutim mehanizmom se ne može interpretirati nastajanje karbonylnih i ostalih grupa koje nastaju u anjon radikalskim fulerenolima dobijenim u prisustvu NaOH/ O_2 (Wang, i dr., 2015).

Sa druge strane, fulerenoli sintetisani u prisustvu $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TBAH}$ nemaju IR apsorpcioni pik na 1720 cm^{-1} , već se kao intermedijeri reakcije dobijaju C_{60} epoksidi. Tokom reakcije, koncentracija epoksidnih grupa (C_{60}O , C_{60}O_2 i C_{60}O_3) raste, da bi se kako reakcija odmiče smanjivala (Kokubo i dr., 2011). Mehanizam hidroksilacije fulerena u sistemu $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TBAH}$ je predstavljen na slici 1.7. U prvom koraku, vodonik-peroksid se usled veće kislosti u odnosu na vodu deprotonuje i daje HOO^- anjon, nakon čega $-\text{OOH}$ jon sa fulerenom gradi fuleren-epoksid C_{60}O , koji je podložan uzastopnim nukleofilnim napadima $-\text{OH}$ i $-\text{OOH}$: (i) nukleofilna adicija HOO^- na fuleren C_{60} pri čemu nastaje $\text{C}_{60}\text{OOH}^-$, (ii) strukturna preraspodela $\text{C}_{60}\text{OOH}^-$ na C_{60}O uz oslobađanje OH^- i konačno (iii) adicija hidroksilne grupe na epoksidni intermedijer, što je praćeno strukturnom izomerizacijom. Na slici 1.7. b) je predstavljen energetski profil ovih reakcija, po kojem je prvi korak u reakcijama egzoterman, a sve zbog elektron-defictarne prirode fulerena C_{60} (Hirsch, 1999).



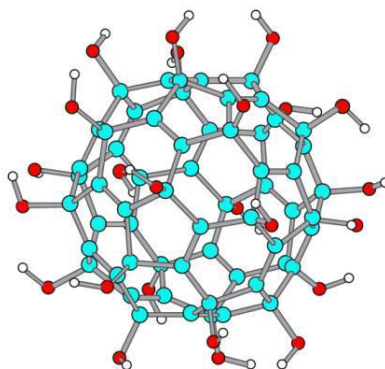
Slika 1.7. Pretpostavljeni mehanizam nastajanja fulerenola sintezom u prisustvu $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TBAH}$ (Wang i dr. 2015)

Strukturno preraspoređivanje intermedijera 1 preko epoksida do intermedijera 2 po mišljenju grupe Wang i saradnika nije osnovan te postoji potreba za boljim predloženim mehanizmom sinteze fulerenola u prisustvu $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TBAH}$ (Kokubo i dr., 2011; Wang, i dr., 2015).

1.4.2. FIZIČKO-HEMIJSKE OSOBINE VODENIH RASTVORA FULERENOLA

Dobijanje vodorastvornih derivata fulerena omogućilo je ispitivanje ovih jedinjenja u vodenim rastvorima, a samim tim i istraživanje i primenu u biološkim *in vitro* i *in vivo* sistemima.

Molekul fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$, dijametra oko 1 nm, čine simetrično raspoređene hidroksilne grupe oko sfere C_{60} , kako je predstavljeno na slici 1.8.



Slika 1.8. Struktura fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ (Bogdanović & Djordjevic, 2008)

Fulerenol je smeđa, amorfna, higroskopna praškasta supstanca, rastvorljiva u vodi i dimetilsulfoksidu (DMSO) i nerastvorna u etanolu, metanolu i acetonitrilu. Stabilan je pri dnevnoj svetlosti na sobnoj temperaturi u čvrstom stanju, dok je u vodenom rastvoru fotosenzitivan. Sa jonima metala, osim alkalnih, formira smeđ talog. U kiseljoj sredini je stabilan, dok je u alkalnoj u jonizovanom obliku $C_{60}(OH)_{24-n}(ONa)_n$. Fulerenol rastvoren u vodi gradi polianjonske nanoagregate (Slavic i dr., 2013; Vilenko i dr., 2006), čija veličina i naelektrisanje zavise od eksperimentalnih uslova (koncentracije, pH-vrednosti i temperature). Rastvorljivost fulerenola zavisi od stepena hidroksilacije, tako su fulerenoli $C_{60}(OH)_{10-12}$ rastvorljivi u rastvaračima kao što su THF, DMF, DMSO; dok se fulerenoli $C_{60}(OH)_{16}$ i $C_{60}(OH)_{20-24}$ lako rastvaraju u vodi. Specifične osobine fulerenola su posledica njihove strukturne fleksibilnosti, rotacija -OH grupa, kao i rasporeda istih po sferi molekula C_{60} .

Organizacija, agregacija/aglomeracija fulerenola u vodenim rastvorima

Poznato je da neorganski joni manjeg radijusa i većeg naelektrisanja, odnosno joni koji imaju veću gustinu naelektrisanja, jače privlače molekule vode, odnosno da su ti joni jače hidratizirani. To utiče na promene u strukturi i načinu povezivanja molekula vode u okruženju jona (ne mora da bude isključivo u hidratacionoj sferi) u odnosu na čistu vodu. Potrebno je da se napomene, da se ova osobina ne odnosi na jačinu vodoničnih veza, kao i da ne dolazi do

dramatične promene u strukturi vode po dodatku jona, odnosno da molekuli vode ne prelaze velika rastojanja da bi ušli u hidratacionu sferu, već samo do blage distorzije vodonične mreže u okolini jona. Ukoliko dodati jon jače privlači molekule vode nego što bi to činio drugi molekul vode u čistoj vodi, odnosno ako je rastojanje između centra naelektrisanja nekog, na primer, katjona (K) i atoma kiseonika u molekulu vode kraće nego što je rastojanje između dva atoma kiseonika u molekulima vode u odsustvu katjona ($r(\text{K}-\text{O}_{\text{voda}}) < r(\text{O}_{\text{voda}}-\text{O}_{\text{voda}})$), onda za te katjone kažemo da su *structure makers (cosmotropes)*. To praktično znači da ti joni povećavaju stepen povezivanja molekula vode u svom okruženju.

Sa druge strane, ukoliko je ($r(\text{K}-\text{O}_{\text{voda}}) > r(\text{O}_{\text{voda}}-\text{O}_{\text{voda}})$), onda se ti joni nazivaju *structure breakers (chaotropes)*, odnosno da ti joni „guraju“ molekule vode od sebe i čine vodu manje uređenom.

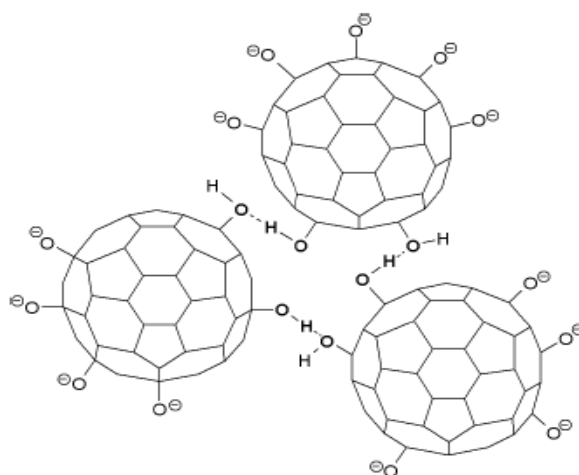
Structure making/breaking osobine se ogledaju i na makrosopskom nivou, odnosno utiču na brojne fizičko-hemijske karakteristike rastvora, kao što su viskoznost, provodljivost, volumetrijske osobine i sl. Tako, na primer, dodatkom *structure making* jona u vodu povećava se viskoznost u odnosu na čistu vodu, dok dodatkom *structure breaking* jona viskoznost opada (Marcus, 2009).

Osobina jona da utiče na uređenost molekula vode u svojoj okolini može da se poveže sa promenom entropije sistema. Tako na primer, joni koji ispoljavaju *structure making* osobine, odnosno koji su u vodi jako solvatisani imaju negativnu promenu entropije solvatacije ($\Delta S_{\text{sol}} < 0$), dok *structure breakers* joni imaju $\Delta S_{\text{sol}} > 0$. Međutim kako se entropija solvatacije odnosi isključivo na interakciju između jona i molekula vode, a *structure breaking/making* osobina se odnosi na uređenost molekula vode u celoj zapremini odnosno na promenu načina vezivanja molekula vode van solvatacione sfere, ona sama nije dovoljan indikator uticaja jona na strukturu vode (Zhao, 2006).

Mehanizam kojim fulerenol smanjuje potrebni rad za umetanje u mrežu vodoničnih veza između molekula vode je udruživanje u agregate, jer se tako kida manji broj vodoničnih veza nego u slučaju umetanja pojedinačnih molekula fulerenola. Pored ovog, postoji još jedan razlog zbog kojeg molekuli fulerenola agregiraju, a koji prozilazi iz činjenice da svaki molekul poseduje istovremeno privlačna (C-OH) i repulzivna mesta na molekulu (C-O-).

Hidroksilne grupe na fulerenolskim nanočesticama pomažu rastvaranje angažovanjem vodoničnih veza sa molekulima vode. Ukoliko je hidroksilna grupa vezana za šestočlani prsten na površini fulerenola, ona se može ponašati kao fenolna grupa i odajući proton postati negativno naelektrisana. Generisani fenoksidni jon se može stabilizovati kao rezultat

delokalizacije naelektrisanja koju podržavaju π -veze u šestočlanom prstenu fulerenola. Minimalne promene u agregaciji fulerenolskih nanočestica sa promenom pH vrednosti medijuma se upravo ovom činjenicom objašnjavaju (Assemi i dr., 2010). Vileno i saradnici su pretpostavili strukturu fulerenolskih klastera, gde su vodonične veze između molekula odgovorne za kohezivne sile smeštene u unutrašnjosti jezgra klastera, dok se repulzivne negativno naelektrisane grupe nalaze na površini klastera, kako je prikazano na slici 1.9. (Vileno i dr., 2006). Agregacija se smatra odgovornom i za otpuštanje malog broja protona tokom titracione analize. Naime, titrimetrijskim praćenjem pH vrednosti rastvora fulerenola $C_{60}(OH)_{36}$ milimolarnih koncentracija, ustanovljeno je da je samo 10 protona od mogućih 36 hemijski aktivno, dok ostatak učestvuje u formiranju mreže međumolekulskih vodoničnih veza u unutrašnjosti klastera.



Slika 1.9. Pretpostavljena struktura $C_{60}(OH)_x(O^-)_y$ klastera u vodenom rastvoru (Vileno i dr., 2006)

Brant i saradnici (2007) su dokazali da fulerenolski klasteri u prisustvu elektrolita tokom vremena formiraju velike i srednje nanočestice ili slabe asocijacije. Distribucija je široka i pokazuje intenzivan pik na oko 106 nm, kao i jedan manje intenzivan na oko 68 nm, što ukazuje da fulerenoli grade polidisperzne rastvore. TEM snimci fulerenolskih klastera pokazuju srednju vrednost prečnika od oko 100 nm. Povećanjem pH-vrednosti rastvora naelektrisanje molekula fulerenola raste i moglo bi se očekivati smanjenje srednje vrednosti veličine klastera, međutim to nije slučaj. Iznenadjuće je da se klasteri ne razaraju u manje jedinice kako uslovi postaju bazni, a elektrostatičke repulzije jače, što se može desiti kada su klasteri formirani relativno slabim vezama, kao što su vodonične veze. Rezultati ovog istraživanja, stoga, predlažu jak vezujući mehanizam na koji ne utiču promene pH-vrednosti.

Sonikacijom rastvora fulerenola se pospešuje njihova aglomeracija, usled čega se stvaraju klasteri dimenzija oko 10 i oko 100 nm, kao najstabilniji i energetski favorizovani (Assemi i dr., 2010; Djordjevic i dr., 2015; Jović i dr., 2016; Vilenko i dr., 2006), međutim istraživanja ukazuju i na postojanje aglomerata opsega dijametra od svega nekoliko desetina do 250 nm. AFM studije (Jovic i dr. 2016; Assemi i dr. 2010) fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ potvrđuje da oni mogu postojati i kao veoma mali klasteri od svega nekoliko molekula pri baznoj pH vrednosti sredine i niskoj koncentraciji soli, što nije u saglasnosti sa rezultatima dobijenim metodom rasejanja svetlosti gde se prosečna veličina čestica meri sa oko 100 nm (Brant i dr., 2007). Ova razlika u rezultatima se može objasniti time što se intenzitet rasejane svetlosti menja sa šestim stepenom prečnika čestice (Jednačina 1.1.), prisustvom artefakta u rastvoru, te otud i tolike varijacije u veličini čestica dobijenim različitim metodama.

$$I = I_0 \frac{1 + \cos^2 \theta}{2R^2} \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^4 \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2}\right)^2 \left(\frac{d}{2}\right)^6 \quad (1.1.)$$

gde je:

I =intenzitet rasejane svetlosti

I_0 =intenzitet upadne svetlosti

θ =ugao rasejanja

R =udaljenost od čestice

λ =talasna dužina upadne svetlosti

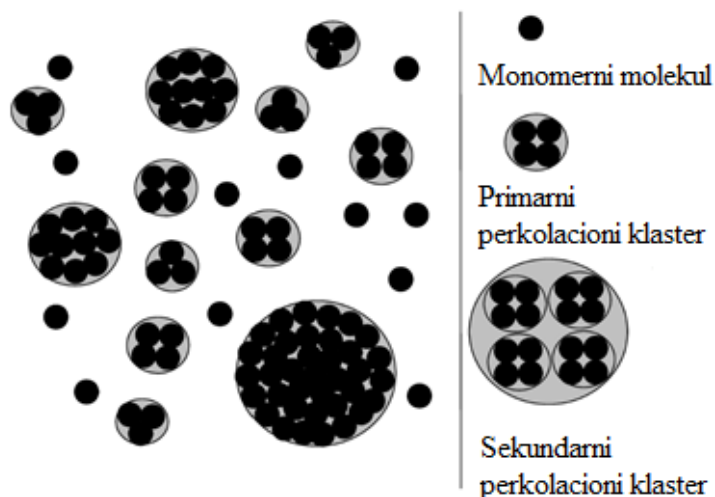
n =refraktivni indeks čestice

d = dijametar čestice

U prisustvu soli alkalnih metala različite koncentracije (Assemi i dr., 2010), veličina čestica fulerenola može da varira od 1,8 do 6,7 nm. Ovi rezultati ukazuju na to da se molekuli udružuju u tzv. „dublete” koji mogu biti umnoženi. Raspodela čestica fulerenola sa porastom koncentracije soli se širi i pik maksimuma se pomera ka većim vrednostima i po istraživanjima ove grupe, interakcije između nanočestica fulerenola su vođene silama električnog dvosloja i na veličinu agregata se može uticati promenom pH vrednosti rastvora i jonske jačine. Agregacija nanočestica fulerenola je supresovana niskom jonskom jačinom i baznim vrednostima medijuma, te ne dolazi do stvaranja većih agregata, a sve kao rezultat elektrostatičkih repulzija. Pri većim jonskim jačinama medijuma, električni dvosloj se komprimuje i dolazi do agregacije.

Grupa Semenov i saradnici (2011) nudi idejna rešenja o načinu udruživanja hidratisanih molekula fulerenola, što je i prikazano na slici 1.10. Molekuli fulerenola se udružuju po

jednom od dva moguća principa: u klastere različitog nepravilnog broja molekula (slika 1.10. levo), što nije primećeno u rastvorima, kao i na sledeći način: molekuli se udružuju u primarne klastere, koji se zatim udružuju u sekundarne i tercijarne (slika 1.10. desno).



Slika 1.10. Načini udruživanja fulerenolskih nanočestica (Semenov i dr., 2011)

Ova grupa je ispitala različite uticaje na agregaciju/aglomeraciju fulerenola, tako je ispitan koncentracioni opseg vodenih rastvora fulerenola $0,0137-18,3 \text{ g/dm}^3$. Na osnovu rezultata izveden je zaključak da sa porastom koncentracije fulerenola raste srednja vrednost dijametra asocijata, kao i da se agregati stvaraju čak i pri veoma visokim razblaženjima. Što se organizacije tiče, monomerni molekuli stvaraju primarne perkolacione klastere, koji se dalje udružuju u sekundarne, koji udruživanjem grade tercijarne perkolacione klastere.

Raspodela čestica fulerenola dobijena od strane Kokuba i saradnika (2011) je uska i obuhvata dimenzije oko 1-2 nm. Mala veličina čestica i njihova uska raspodela ukazuju na visoko dispergovan fulerenol u vodi, kao i da agregacija čestica u ovom slučaju nije dominantna. Ovo se objašnjava time što su molekuli okruženi vodom, te postoji jaka vodonična veza sa hidroksilnim grupama. Prosečna veličina čestica je takođe određena, $1,46 \text{ nm} \pm 0,38 \text{ nm}$, što je u saglasnosti sa teorijskim modelom grupe Semenov i saradnici (2011). Piatek i saradnici su postavili teoretski model koji kao najstabilniji klaster predstavljaju malo udruženje 7 molekula fulerenola $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ (Piątek, Dawid, & Gburski, 2011).

Rezultati grupe Semenov i saradnika (2016) ukazuju na kompleksno ponašanje fulerenola u vodenim rastvorima, koje je posebno izraženo pri niskim koncentracijama fulerenola. Pri niskim koncentracijama fulerenola, oni se javljaju u obliku hidratiranih monomer, dok se pri

koncentracijama koje se dobijaju kada je maseni udeo fulerenola viši od 0,00015, dolazi do samoagregacije molekula fulerenola, što za posledicu ima manji efektivni kontakt sa vodom, a samim tim i manji efekat na strukturnu uređenost molekula vode oko agregata.

1.4.3. BIOLOŠKA AKTIVNOST FULERENOLA

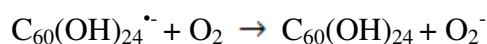
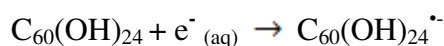
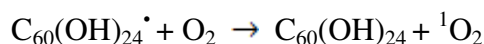
Biološka aktivnost fulerenola je tema mnogih istraživanja (Bogdanović & Djordjević, 2016; Djordjevic, Injac, Jovic, Mrdjanovic, & Seke, 2014; Djordjevic i dr., 2015; Grebowski, Kazmierska, & Krokosz, 2013; Petrović, Seke, Srdjenovic, & Djordjevic, 2015; Semenov i dr., 2016) poslednjih decenija zbog toga što fulerenol ispoljava raznovrsnu biološku aktivnost, od koje je do sada najviše ispitana mogućnost „hvatanja” slobodnih radikala i prevencija toksičnosti nekih hemoterapeutika. Sa druge strane, sferni oblik, šupljina u molekulu, hidrofilnost i nanoveličina ovih molekula, kao i njihovo specifično ponašanje u vodenim rastvorima (Vranes i dr., 2017) omogućuju brojne obećavajuće biološki aktivne uloge, od kojih je jedna od značajnijih nanonosac lekova (Bogdanović & Djordjević, 2016; Chaudhuri, Paraskar, Soni, Mashelkar, & Sengupta, 2009; Djordjevic i dr., 2014; Djordjevic i dr., 2015; Grebowski, Kazmierska, i dr., 2013; Jović i dr., 2016).

Antioksidativna aktivnost

Jedinstveni sistem elektrona koji postoji kod fulerena i njegovih derivata, čini ih potencijalnim fotosenzitajzerima nakon apsorpcije UV ili vidljivog zračenja, pod čijim dejstvom fulerenol stvara reaktivne kiseonične vrste (Pickering & Wiesner, 2005).

Jedan od mogućih mehanizama antioksidativne aktivnosti fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ je dozno-zavisna radikalsko-adiciona reakcija hidroksilnih radikala na preostale dvostruke veze fulerenolskog jezgra, što rezultuje stvaranjem $C_{60}(OH)_{24+2n}$, ($n=1-12$), proizvoda. Drugi mehanizam podrazumeva sposobnost hidroksilnog radikala da veže vodonik iz fulerenola, pri čemu nastaje relativno stabilan radikal $C_{60}(OH)_{23}O^{\cdot}$ (Djordjevic i dr., 2004). Pored toga, hidroksilni radikal može vezati jedan elektron iz fulerenola, stvarajući tako $C_{60}(OH)_{24}^+$. Budući da fulerenol ima brojne slobodne elektronske parove koji potiču od kiseonika raspoređenih oko fulerenolske nanočestice, ova anjonska nanočestica ima veliki kapacitet za građenje koordinativnih veza sa jonima metala, koji se ponašaju kao prooksidansi (Anderson & Barron, 2005).

Nakon izlaganja fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ svetlosti talasne dužine od 400 nm, primećeno je stvaranje superoksid anjon radikala. Potencijalni mehanizam reakcije fotosenzitivnog stvaranja slobodnih kiseoničnih radikala fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ (Pickering & Wiesner, 2005) se može predstaviti sledećim reakcijama:



Poredeći fototoksičnost fulerenola i fulerena C_{60} okruženog ciklodekstrinima prema HaCaT (zdravi humani keratinociti), Zhao i saradnici su dobili rezultate koji ukazuju na nižu fototoksičnost fulerenola (B. Zhao i dr., 2009). Sposobnost fulerenola da u vodenom rastvoru stvara agregate navodno dovodi do smanjenja fotohemijske reaktivnosti u smislu stvaranja superoksida i singletnog kiseonika (B. Zhao, Bilski, He, Feng, & Chignell, 2008).

Zahvaljujući prisustvu velikog broja konjugovanih dvostrukih π veza koje veoma lako mogu preuzeti elektron, fulereni i derivati se generalno smatraju izuzetno efikasnim hvatačima slobodnih radikala (Djordjevic i dr., 2015). Antioksidativne osobine fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ su ispitane elektron spin rezonancom (ESR) (Djordjevic, Canadanovic-Brunet, Vojinovic-Miloradov, & Bogdanovic, 2004; Kato, Aoshima, Saitoh, & Miwa, 2009), a merena je i sposobnost hvatanja stabilnog DPPH (2,2,-difetil-1-pikrilhidrazin) i hidroksi radikala (Djordjevic i dr., 2004). Rezultati ukazuju da su visoke koncentracije fulerenola (0,71–0,88 mmol/dm³) efikasnije u hvatanju hidroksi radikala u poređenju sa DPPH.

Sposobnost fulerenola za hvatanje kiseoničnih radikalskih vrsta je ispitana i potvrđena *in vivo* na modelu psa tokom transplantacije tankog creva (Lai, Chen, Chen, Chang, & Chiang, 2000) tokom koje oksidativni stres nastaje kao posledica ishemično-reperfuzione povrede (Lai, Chen, & Chiang, 2000).

Fulerenol $C_{60}(OH)_{22-24}$ povećavajući antioksidativni kapacitet hepatocita pacova ispoljava protektivno dejstvo tokom tretmana ugljen-tetrahloridom (Xu i dr., 2010).

Pored hvatanja kiseoničnih radikalskih vrsta, fulerenol ispoljava značajnu aktivnost i prema azot(II)-oksidu (Mirkov i dr., 2004), koji predstavlja signalni molekul uključen u mnoge fiziološke procese, ali koji pri višim koncentracijama ispoljava citotoksični efekat. Mirkov i

saradnici (2004) su ispitali aktivnost fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ *in vivo* na modelu pacova koristeći predtretman fulerenolom pre aplikacije natrijum-nitroprusida, donora NO. Rezultati eksperimenta ukazuju da fulerenol u potpunosti sprečava smanjenje aktivnosti određenih antioksidativnih enzima intersticijalnih ćelija testisa pacova (Nielsen, Roursgaard, Jensen, Poulsen, & Larsen, 2008), a do čega inače dolazi nakon primene natrijum-nitroprusida.

Antioksidativna svojstva fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ su dovedena u vezu sa Nrf2 faktorom, transkripcionim faktorom koji reguliše ekspresiju gena nekoliko antioksidativnih enzima (Ye i dr., 2014). Smatra se da fulerenol može povećati nuklearnu translokaciju ovog faktora, što u ćelijama A549 dovodi do povećane ekspresije antioksidativnih enzima kao što su hem oksigenaza-1, NAD(P)H:kinin oksidoreduktaza i γ -glutamat-cistein ligaza. Pored toga, predtretman fulerenolom je umanjio apoptozu indukovanu vodonik-peroksidom.

Novosintetisani glukozamin-fulerenol konjugati (GlcN-F) ispoljavaju protektivni efekat tokom cerebralne inflamacije i oštećenja ćelija uzrokovanih srčanim udarom na modelu pacova (normo i hipertenzivne grupe), a što je dokazano praćenjem životinja magnetnom rezonancom, što ovo jedinjenje čini atraktivnim izborom za lečenje pacijenata koji su pretrpeli infarkt miokarda (Fluri i dr., 2015).

Iako je skoro kompletna antioksidativna aktivnost fulerenola zasnovana na sposobnosti hvatanja slobodnih radikala, detaljni mehanizmi još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni (Wang i dr. 2015).

Za neutralisanje hidroksi radikala moguća su dva mehanizma, gde niže hidroksilovani fulerenoli podležu adicionom mehanizmu, a oni više hidroksilovani vodonik-akceptorskom mehanizmu. „Opređenost” za mehanizam se može objasniti time što fulerenoli sa manjim brojem hidroksilnih grupa imaju veći broj sp^2 ugljenikovih atoma, za razliku od druge grupe fulerenola koji obiluju hidroksilnim grupama, što dovodi do većeg napona ugljeničnog kaveza. Eliminacijom $\bullet OH$ vezivanjem sa vodonikom dovodi do reorganizacije skeletne strukture ugljeničnog kaveza, te smanjivanja napona (Djordjevic i dr., 2004; Ueno, Yamakura, Arastoo, Oshima, & Kokubo, 2014).

Radioprotektivni efekat

Tokom tretmana zračenja u procesu lečenja malignih oboljenja zaštita okolnog zdravog tkiva i organa od štetnog delovanja zračenja je veoma bitna. Potencijalno protektivni agensi bi omogućili povećanje radijacione doze, čime bi se mogao poboljšati ishod radioterapije

(Grebowski, Kazmierska, i dr., 2013). Jonizujuće zračenje indukuje ekspresiju proapoptotskih gena, kao i kiseonične slobodne radikale, koji dalje dovode do apoptoze. Fulerenoli ispunjavaju sve uslove dobrog radioprotektora: prisustvo dvostrukih veza, visok afinitet ka elektronu, sposobnost radikalskog vezivanja, kao i reaktivnost ka nukleofilnim supstituentima (Grebowski & Krokosz, 2010).

Procena radioprotektivnog dejstva fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ je izvršena na *in vitro* modelu ćelijskih linija podvrgnutih zračenju u visokim dozama (Bogdanović i dr., 2008), gde je potvrđeno da efikasnost radioprotekcije zavisi od ćelijske linije, kao i koncentracije fulerenola. Pored toga, fulerenol je inhibirao inaktivaciju antioksidativnih enzima kao što su superoksid dismutaza i glutacion peroksidaza, a koja nastaje kao posledica zračenja. Dalje, fulerenol je uticao na smanjenje aktivnosti enzima gama-glutamil transferaze. Zaštitna uloga fulerenola tokom zračenja se oslanja na njegovu antioksidativnu sposobnost, te mogućnost hvatanja ROS, što svrstava fulerenol u potencijalne radioprotektore.

Na *in vivo* modelu ozračenih miševa i pacova je takođe ispitana i dokazana radioprotekcija fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ (Trajković i dr., 2007; Trajkovic, Dobric, Djordjevic, Dragojevic-Simic, & Milovanovic, 2005). Životinje su pre zračenja (6-8 Gy) pretretirane intraperitonealno različitim dozama fulerenola (10 i 100 mg/kg), a rezultati ukazuju na veću telesnu masu miševa tretiranih višom dozom fulerenola, kao i produžetak srednjeg letalnog vremena ozračenih miševa, posebno pri višim dozama zračenja (Trajkovic i dr., 2005).

U studijama (Jačević i dr. 2016; Trajković i dr. 2007) u kojima je poređen efekat radioprotektora amifostina (WR-2721) sa radioprotektivnim efektom fulerenola na *in vivo* modelu ozračenih pacova pokazana je protektivna selektivnost, gde fulerenol ispoljava bolju radioprotektivnost na nivou prevencije smanjenja broja limfocita i granulocita, kao i u pogledu inhibicije histopatoloških promena na slezini, tankom crevu i plućima, dok je amifostin pokazao bolju protektivnost po pitanju očuvanja srca, jetre i bubrega. Obe supstance su produžile postradijacioni životni vek pacova nakon izlaganja letalnoj dozi radijacije od 8 Gy. Zaključak koji proizilazi iz ovih istraživanja ukazuje na to da fulerenol može imati dvojaku ulogu-omogućiti više doze zračenja, kao i ublažiti sporedne neželjene efekte zračenja.

Cai i saradnici potvrđuju prethodne rezultate eksperimentom na miševima pretretiranim fulerenolom (40 mg/kg) tokom 14 dana pre izlaganja letalnoj dozi zračenja od 8 Gy (Cai i dr., 2010). U poređenju sa kontrolnom grupom u kojoj je stopa preživljavanja 0%, u grupi pretretiranoj fulerenolom je stopa preživljavanja 73%. Pored toga, fulerenol je imao pozitivni uticaj na enzim superoksid-dismutazu, zatim sprečio je oksidaciju glutaciona, kao i smanjio

lipidnu peroksidaciju u jetri. Dalje, fulerenol je pokazao protektivno dejstvo i prema mitohondrijalnim proteinima.

Koncentraciona zavisnost protektivnog dejstva fulerenola ($C_{60}(OH)_{18-22}$) je dokazana i u istraživanju Zhao i saradnika (Q. Zhao, Li, Xu, Liu, & Li, 2005) sprovedenom na bakterijama *Stylomychia mytilus*, gde je u koncentracijama 0,06-0,1 mg/cm³ fulerenol ispoljio radioprotektivno dejstvo od gama-zračenja pri dozama do 1500 Gy, za razliku od koncentracije 0,25 mg/cm³, pri kojoj se pokazao kao radiosenzitajzer, te doveo do promena u aktivnosti superoksid-dismutaze i katalaze, kao i povećane lipidne peroksidacije.

Organoprotektivni efekat

Fulerenol na modelu pacova aplikovan u predtretmanu ugljen-tetrahlorida se pokazao kao efikasan u smanjenju hepatotoksičnosti i nefrotoksičnosti izazvane ovim agensom (Xu i dr., 2010), a zaštita se, po rezultatima, zasnivala na povećanoj sposobnosti antioksidativne odbrane.

Dimetil-sulfoksid (DMSO) je u širokoj primeni kao rastvarač i krioprezervativni agens, koji može negativno uticati na protok krvi, plućni edem, zastoj srca, bronhijalni spazam (Santos, Figueira-Coelho, Martins-Silva, & Saldanha, 2003). Iako su neželjeni efekti DMSO retki kada se primenjuje u klinički ispitanim koncentracijama, u slučaju predoziranja ne postoji bezbedan antagonist. Slavić i saradnici (Slavic i dr., 2013) su tretirali izolovane uteruse pacova DMSO-om i $C_{60}(OH)_{24}$ fulerenolskim nanočesticama. Rezultati ukazuju da DMSO smanjuje kako spontane, tako i kalcijum-indukovane kontrakcije, dok fulerenol smanjuje samo spontane kontrakcije. Fulerenol smanjuje aktivnost Cu-Zn superoksid-dismutaze i sprečava DMSO-izazvano povećanje aktivnosti glutation-reduktaze. Ovi rezultati ukazuju na to da fulerenol može biti dobar izbor za modulaciju aktivnosti DMSO, čime se umanjuju sporedni štetni efekti DMSO.

Potvrda kardioprotektivnog efekta fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ na doksorubicinom-izazvanu kardiotoksičnost je dobijena u *in vivo* eksperimentu na pacovima, gde je administracija fulerenola (u dozama 50, 100 i 200 mg/kg) izvršena 30 min. pre jednokratne administracije doksorubicina (8 mg/kg). Istraživanja su dalje nastavljena na pacovima kod kojih je bio hemijski-indukovan (1-metil-1-nitrozourea; 50 mg/kg; ip) kolorektalni i kancer dojke (Injac, Perse, i dr., 2008; Injac, Boskovic, i dr., 2008; Injac, Perse, i dr., 2009; Injac, Radic, i dr., 2009), gde su životinje pre tretmana doksorubicinom podvrgnute predtretmanu fulerenolom (100 mg/kg ip, 30 minuta pre DOX, 8 mg/kg ip). Dokazan je uticaj fulerenola na smanjenje doksorubicinom-izazvanih sporednih efekata, kao što su: oksidativni stres, lipidna

peroksidacija i poremećaj odnosa GSH/GSSH u bubrezima pacova (Injac & Boskovic, 2008), čime je potvrđen nefroptotektivni efekat fulerenola u akutnoj fazi toksičnosti. Pored toga, potvrđeno je i smanjenje doksorubicinom-izazvanog oštećenja jetre i pluća (Injac, Perse, i dr., 2008, 2009; Injac, Radic, i dr., 2009). Primena samog fulerenola u dozi 100 mg/kg je izazvala samo reverzibilne vaskularne promene.

Pored intraperitonealnog predtretmana fulerenolom, slični rezultati koji ukazuju na protektivno dejstvo fulerenola se dobijaju i nakon oralne aplikacije fulerenola kod pacova tretiranih doksorubicinom (Ičević i dr., 2011).

Tokom ispitivanja hepatoprotektivne uloge fulerenola na doksorubicinom-izazvanu toksičnost na *in vivo* modelu pacova i *in vitro* (humani hepatocelularni karcinom, kolorektalni adenokarcinom) dobijeni su rezultati koji ukazuju na protektivni efekat fulerenola, ali i na pojavu zadržavanja crnih/braon čestica u abdomenu, na jetri što može dovesti do sekundarnih promena na tkivu jetre (Injac, Perse, i dr., 2008), pankreasu, slezini i testikularnim ovojnicama.

Imajući u vidu da je toksičnost doksorubicina jednim delom zasnovana na stvaranju slobodnih radikala, može se zaključiti da se protektivna uloga fulerenola oslanja na njegov visoki antioksidativni potencijal, gde se ponaša kao hvatač slobodnih radikala i/ili gde uklanja slobodne jone gvožđa čime sprečava Fenton/Haber-Vajsovu reakciju (Torres i dr., 2010). Srđenović i saradnici su praćenjem antioksidativnih enzima kod pacova tretiranih samim doksorubicinom, kao i kod pacova intraperitonealno (i.p.) tretiranih fulerenolom u dozama 50 i 100 mg/kg pre tretiranja doksorubicinom u dozi 10 mg/kg, zaključili da primenom predtretmana dolazi do prevencije oksidativnog stresa u bubrezima, testisima i plućima pacova (Srdjenovic i dr., 2010). Sa druge strane, grupa pacova pretretirana fulerenolom u dozi od 100 mg/kg je u poređenju sa kontrolnom grupom pokazala veći stepen lipidne peroksidacije, no u manjoj meri nego grupa tretirana samim doksorubicinom.

Protekcija ćelija fulerenolom je potvrđena i rezultatima *in vitro* eksperimenata na humanim malignim kontinualnim ćelijskim linijama dojke (MCF-7 i MDA-MB-231) tretiranim fulerenolom, kao i kombinacijom sa nekim antineoplastičnim lekom (doksorubicin, cisplatina, taksol, tiazofurin). Sam fulerenol je u maloj meri inhibirao rast ćelijskih linija, dok je u simultanom tretmanu sa antineoplastičnim lekovima (doksorubicin, cisplatina, tiazofurin, taksol) u najvećoj meri smanjio citotoksičnost izazvanu doksorubicinom, pri čemu rezultati ukazuju i na to da fulerenol u ispitanim koncentracijama ne ispoljava genotoksičnost (Kojić, Jakimov, Bogdanović, & Djordjević, 2005; Mrđanović i dr., 2009). Utvrđeno je da je

protektivni efekat fulerenola izražen u slučaju primene antineoplastičnih lekova čija se aktivnost uglavnom zasniva na stvaranju slobodnih radikala. Činjenica da fulerenol smanjuje citotoksičnost i tiazofurina i taksola, lekova koji svoju aktivnost ostvaruju mehanizmom koji nije slobodno-radikalni, ukazuje na dualnu protektivnu sposobnost fulerenola.

Chadhuri i saradnici (Chaudhuri i dr., 2009) su iskoristili fulerenol kao nanonosac i sintetisani konjugat fulerenol-doksorubicin, iz kojeg se aktivni princip oslobađa po inkubaciji sa lizatom tumorske ćelije, ispitali na sledećim ćelijskim linijama: mišji melanom, mišji karcinom pluća, metastazne humane ćelije kancera dojke. Rezultati ukazuju na supresiju proliferacije svih ispitanih ćelijskih linija, sa tim da je pokazana veća efikasnost kod mišjih ćelijskih linija, što se povezuje sa različitom podložnošću ćelijskih linija ka unošenju konjugata lek-nanonosac u ćelije i lizosome. U *in vivo* modelu na miševima je ispitana efikasnost doksorubicina i konjugata fulerenol-doksorubicin, gde je u slučaju primene konjugata pokazana uporediva antitumorska efikasnost uz smanjenje sistemske toksičnosti koja nastupa pri primeni samog doksorubicina.

Brojne hidroksilne grupe po površini fulerenola omogućuju ne samo vezivanje različitih aktivnih principa, nego i stvaranje mnogih vodoničnih veza sa različitim komponentama bioloških sistema, kao što su domeni membranskih proteina ili hidrofine lipidne glave (Grebowski, Krokosz, & Puchala, 2013). Istraživanja (Krantz, 1997) pokazuju da se fulerenol može adsorbovati na protein citoskeleta, kao i da se ova interakcija može iskoristiti za transportni mehanizam lekova.

Antiproliferativni efekat fulerenola C₆₀(OH)₂₄

Ispitivanje antiproliferativnog efekta odnosno citotoksičnosti novih jedinjenja je nezaobilazan segment u analizi biološke aktivnosti. Ono podrazumeva tretman ćelijskih linija u kontrolisanim uslovima supstancom od interesa tokom različitih vremenskih perioda, najčešće 24, 48 ili 72h. Antiproliferativna aktivnost na ćelijskim linijama se može pratiti na dva načina: procenom vijabilnosti ćelija pri čemu se primenjuje bojenje bojama ili određivanjem relativnog odnosa netretiranih i tretiranih ćelija tako da se dobije kriva preživljavanja u zavisnosti od koncentracije ispitivane supstance. Parametri koji se najčešće primenjuju za određivanje citotoksičnosti su: ćelijska smrt koja nastaje najčešće kao posledica oštećenja membrane (Borenfreund & Puerner, 1985), zatim oslobađanje laktat-

dehidrogenaze (Decker & Lohmann-Matthes, 1988) ili praćenje sadržaja proteina (Balls & Bridges, 1984, Skehan i dr. 1990).

Osetljivost citotoksičnih esejja se može povećati praćenjem ranih promena u homeostazi ćelija, koje pod dejstvom toksične supstance pre smrti ispoljavaju određene biohemijske promene (Jondeau, Dahbi, Bani-Estivals, & Chagnon, 2006). Stoga, dejstvo agenasa koji utiču na ćelijski rast se može pratiti kroz promenu u preuzimanju nutrijenata (Koren, 1980), odnosno kroz promenu brzine sinteze RNK ćelija.

Postoje brojni testovi citotoksičnosti, a neki od najčešće primenjivanih su:

Sinteza RNK je proporcionalna kvadratu ćelijskog rasta (Kjeldgaard N.O., 1963), a sam test se zasniva na kvantitativnoj inhibiciji sinteze RNK ćelija izloženih toksičnim supstancama. Naime, radioobeleženi uridin se dodaje u ćelijski medijum, nakon čega se meri količina inkorporiranog uridina u ćelijsku RNK. Brzina sinteze RNK se zatim određuje računskim putem i poredi sa rezultatima dobijenim na istim ćelijama samo u prisustvu medijuma. Rezultat se izražava procentualno u odnosu na kontrolu (Valentin-Severin, Laignelet, Lhuguenot, & Chagnon, 2002). Ovaj esej, kao i ATP i Alamar Blue, pripada grupi subletalnih esejja (Koren, 1980) i predstavlja pouzdan i najosetljiviji test citotoksičnosti koji omogućuje diferencijacije mehanizma delovanja različitih toksičnih jedinjenja.

ATP i Alamar Blue testovi su veoma osetljivi testovi koji mere morbiditet ćelija. Ćelije koriste ATP za održavanje života i odvijanje mnogih ćelijskih procesa, te se ovaj test koristi za procenu funkcionalnog integriteta živih ćelija. Test je ponovljiv i pouzdan, može se primeniti za karakterizaciju efekata lekova ili citotoksičnih supstanci na humanim ćelijskim linijama ili uzorcima tumora. Alamar Blue se usvaja od ćelija pasivnom difuzijom, gde se redukuje, usled čega menja boju iz plave u fluorescentnu crvenu. Primenjuje se za određivanje relativne citotoksičnosti agenasa unutar određenih hemijskih klasa (Jondeau i dr., 2006).

MTT esej je kolorimetrijski esej za merenje aktivnosti enzima koji redukuju žuti MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum-bromid) do ljubičastog formazana. Osnovna primena ovog esejja je određivanje vijabilnosti i proliferativnosti ćelija, te se može koristiti za određivanje citotoksičnosti jedinjenja od potencijalnog medicinskog značaja. Prednosti testa su preciznost, kao i jednostavno izvođenje jer u postupku nema nijednog koraka ispiranja.

SRB (Sulforodamin B) test je brz, osetljiv i ekonomičan način za merenje ukupne količine proteina adheriranih ćelija u suspenziji u mikrotitar pločama. Sulforodamin B je anjonska boja koja se u blago-kiseloj sredini elektrostatički vezuje za pozitivno naelektrisane aminokiselinske ostatke ćelijskih proteina. U blago baznoj sredini se SRB rastvara,

kvantitativno ekstrahuje iz ćelije nakon čega ga je moguće odrediti kvantitativnim kolorimetrijskim testom po Skehan-u (Skehan i dr. 1990), te utvrditi relativni ćelijski rast ili vijabilnost ćelija jer je zavisnost rezultata SRB testa i broja ćelija linearna. Iako je SRB test u poređenju sa MTT testom kompleksniji po pitanju načina izvođenja, velika prednost SRB testa je veća osetljivost.

Antiproliferativni i citotoksični efekat vodorastvornih derivata fulerena, fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$, je ispitan na različitim eksperimentalnim modelima. Brojne studije ukazuju na odsustvo citotoksičnosti fulerenola (Saathoff, Inman, Xia, Riviere, & Monteiro-Riviere, 2011, Isakovic i dr., 2006; Sayes i dr., 2004). Sa druge strane, u radu Jiao i saradnika (2010) ispitana je antiproliferativna aktivnost fulerenola prema tri humane ćelijske linije kancera dojke, a rezultati ukazuju na inhibiciju ćelijskog rasta koja pokazuje vremensku i koncentracionu zavisnost. Komparativne studije citotoksičnosti fulerena C_{60} i vodorastvornog derivata ukazuju na nižu, skoro zanemarljivu, citotoksičnost derivata, čime se potvrđuje da se derivatizacijom površine fulerena može značajno uticati na smanjenje citotoksičnosti (Isakovic i dr., 2006; Sayes i dr., 2004).

Neuroprotektivnost fulerenola

Nervne ćelije su bogate lipidima, sa aerobnim mehanizmima i relativno niskom aktivnošću antioksidativnih enzima koji neutrališu reaktivne kiseonične vrste, što zajedno čini ove ćelije glavnim mestom slobodno-radikalnih reakcija (Buonocore, Perrone, & Bracci, 2001), a čije se posledice povezuju sa nekim patološkim stanjima kao što su cerebralna ishemija, Alchajmerova bolest i sl. (Calissano, Matrone, & Amadoro, 2009; Dragunow i dr., 1995). Toksičnost jona nekih metala, kao npr. jona gvožđa, se u velikoj meri zasniva na sposobnosti da iniciraju procese kao što je lipidna peroksidacija, tokom koje dekompozicijom lipidnih peroksida dolazi do stvaranja slobodnih radikalnih vrsta. Povećan nivo jona gvožđa je primećen u sivoj masi pacijenata koji boluju od Parkinsonove bolesti (Fahn & Cohen, 1992; Halliwell, B., & Gutteridge, 1999). S obzirom na to da ne postoje efikasni tretmani neurodegenerativnih bolesti, bitno je pronaći načine kojima bi se negativni efekti oksidativnog stresa u mozgu sprečili u što većoj meri. Jedan od pristupa je primena antioksidanasa, među koje se ubraja i fulerenol, za sprečavanje nastajanja amiloidnog plaka karakterističnog za Alchajmerovu bolest (Kim & Lee, 2003; Lee i dr., 2011; Podolski i dr., 2007), kao i u svojstvu protektivnog jedinjenja za tretiranje drugih neurodegenerativnih stanja i bolesti, a koja nastaju kao rezultat oksidativnog disbalansa u ćelijama. Hidrofilni derivati fulerena, koji pokazuju višu antioksidativnu zaštitu u poređenju sa konvencionalnim

antioksidantima (Ali, Hardt, & Dugan, 2008; Dugan, Gabrielsen, Yu, Lin, & Choi, 1996; Lotharius, Dugan, & O'Malley, 1999; Ye i dr., 2014) su obećavajući kandidati za neuroprotektivnu i antioksidativnu primenu.

Cai i saradnici (Cai i dr., 2008) su ukazali na potencijal fulerenola kao efektivnog neuroprotektora na celularnom modelu Parkinsonove bolesti.

Nanočestice fulerenola kao teranostici

Pod nanočestičnim teranosticima se podrazumevaju one nanočestice koje istovremeno ispoljavaju više od jedne funkcionalnosti, kao npr. targetiranje, „imidžing” i dostava leka. Metalofulerenol $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$ je ispitan u *in vivo* istraživanju na miševima sa malignom neoplazmom dojke i jetre, a rezultati pokazuju značajno smanjenje rasta tumora (X. Ma, Zhao, & Liang, 2011). Inhibicija rasta tumora se ostvaruje stimulacijom T-limfocita i makrofaga, kao i smanjenjem tumorske mikrocirkulacije, čime se usporava dotok krvi u tumorsko tkivo bez uticaja na zdrave kapilare. Toksičnost teranostika može biti smanjena u poređenju sa samim lekom. Koadministracija nanočestica sa lekom cisplatinom je uticala na aktivaciju endocitoze u humanim cisplatina-rezistentnim malignim ćelijama, čime se povećala intracelularna koncentracija leka i stvaranje cisplatina-DNK kompleksa. $[Gd@C_{82}(OH)_{22}]_n$ je „hvatanjem” slobodnih kiseoničnih radikala i inhibicijom lipidne peroksidacije *in vivo* štitio zdrave ćelije i time doprineo nižoj toksičnosti teranostika u poređenju sa samim lekom.

U istraživanju Liu i saradnika (2015) je ispitana antineoplastična aktivnost $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ na zdravoj ćelijskoj liniji epitelijalnih ćelija dojke prema kojoj je ispoljio netoksičnost, kao i na kontinualnim malignim ćelijama dojke prema kojima je ovaj metalofulerenol pokazao inhibitornu aktivnost.

Farmakokinetika, toksičnost i biokompatibilnost fulerenola

Toksičnost ugljeničnih nanomaterijala, kao i njihov štetni efekat na zdravlje ljudi i životnu sredinu su teme kojim je potrebno posvetiti dosta istraživanja i koje do sada nisu dovoljno istražene, posebno zbog toga što se određene fizičko-hemijske osobine nanočestica mogu povezati sa potencijalnom štetnosti po zdravlje.

Farmakokinetičko istraživanje vodenih rastvora fulerenola i njihovog metabolizma je preduslov za dalje ispitivanje procene njihove aktivnosti kao potencijalnih lekova/nosača lekova. Da bi se pratila apsorpcija, raspodela i ekskrecija, u eksperimentalnim studijama

fulereni su radioobeleženi tehnecijumom (Djordjević i dr., 2011; Maksin, Djokic, Jankovic, Djordjevic, & Neskovic, 2007). S obzirom na to da izloženost fulerenima može biti preko različitih puteva (oralno, dermalno, pulmonarno, injekciono) toksičnost na mestu izloženosti je veoma bitna. Scintigrafskim praćenjem radioobeleženog [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$]- $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ u *in vivo* modelu psa dobijeni su podaci o biodistribuciji, koji ukazuju na prisustvo radiofarmaceutika tokom prvih 30 minuta u srcu, jetri i slezini. Nakon sat vremena, prisustvo je primećeno u srcu, jetri, slezini, crevima, kao i pljuvačnim žlezdama nakon 4 sata. 21 sat nakon administracije, radiofarmaceutik je detektovan u slezini, jetri, pljuvačnim žlezdama, bubrezima i urinarnom traktu, ali ne i u tankom crevu. 24 časa nakon administracije, γ -aktivnost je primećena samo u jetri, slezini i urinarnom traktu, a tim putem se i eliminiše (Chiang, Wang, Tseng, Wu, & Hsieh, 1995; Chiang, Lee, & Kuo, 1995; Djordjević i dr., 2011).

Okularna toksičnost. Fotosenzitivni aspekt toksičnosti fulerenola je takođe ispitan i potvrđeno je da dovodi do okularne toksičnosti koju podstiče izlaganje UVA i vidljivom zračenju.

Dermalna toksičnost. Potencijalna toksičnost fulerenola je ispitana i na ćelijama humanih epidermalnih keratinocita, koji su bilo izloženi fulerenolima različitog stepena hidroksilacije: $\text{C}_{60}(\text{OH})_{20}$, $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ i $\text{C}_{60}(\text{OH})_{32}$ u koncentracijama 0,000544-42,5 mg/cm³ tokom 24 i 48h (Saathoff, Inman, Xia, Riviere, & Monteiro-Riviere, 2011). Statistički značajno smanjenje vijabilnosti ćelija je primećeno samo kod tretmana $\text{C}_{60}(\text{OH})_{32}$ u najvišoj koncentraciji nakon 24-časovnog tretmana. Rezultati ukazuju da do koncentracija 8,55 mg/cm³ fulerenoli različitog stepena hidroksilacije ne ispoljavaju citotoksičnost, niti dovode do inflamacije.

Genotoksična svojstva vodorastvornih fulerena. Za razliku od mutagenih i fototoksičnih efekata fulerena C_{60} , fulerenol do miligramskih koncentracija ne pokazuje mutagene niti genotoksične efekte (Nielsen i dr., 2008). Genotoksični efekat fulerenola $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ je ispitan *in vitro* na ovarijalnim ćelijama hrčka (CHO) u opsegu koncentracija 11-221 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (Mrđanović i dr. 2009), kao i na humanim limfocitima iz periferne krvi (PBL) u opsegu koncentracija 5,54-221,60 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i u svim eksperimentima je potvrđeno odsustvo genotoksičnosti fulerenola (Mrđanovic i dr. 2012) uz genoprotektivno dejstvo istog.

Pulmonarna toksičnost fulerenola je ispitana od Xu i saradnika na modelu pacova tokom 3-dnevnog inhalacionog eksperimenta pri kojem su životinje izlagane dozama od 1, 5 ili 10 mg

fulerenola po pacovu (Xu i dr., 2009). Izlaganje najnižoj dozi fulerenola nije dovelo do pulmonarne toksičnosti, dok su dve više koncentracije izazvale oksidativni stres i inflamaciju, ukazujući time na dozno-zavisnu pulmonarnu toksičnost fulerenola.

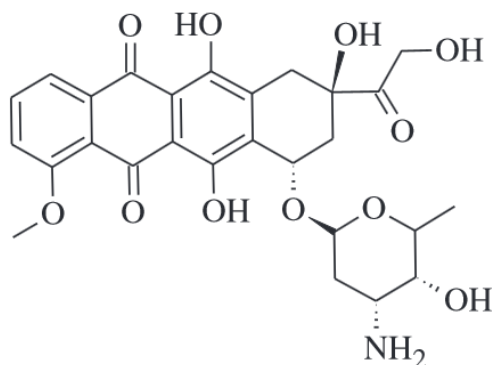
Povrede ćelijske membrane. Sposobnost fulerenola $C_{60}(OH)_{18}$ da nakon fotoaktivacije uzrokuje povredu ćelijske membrane je ispitana na mikrozomima jetre pacova (Kamata, Devasagayama, Priyadarsinib, & Mohan, 2000). Rezultati istraživanja govore da dolazi do dozno- i vremenski-zavisnog oksidativnog oštećenja lipida i proteina ćelijskih membrana posredstvom radikalskih vrsta. S obzirom na to da se fulerenol može potencijalno aplikovati intravenozno, Grebowski i saradnici (Grebowski & Krokosz, 2015) su ispitali interakciju fulerenola $C_{60}(OH)_{36}$ sa membranama eritrocita, te dobili rezultate koji ukazuju da fulerenol posebno pri višim koncentracijama može ulaziti u hidrofobni deo lipidnog dvosloja. Fulerenol povećava fluidnost lipidnog dvosloja u hidrofobnoj regiji interreagujući sa proteinima membrane eritrocita preko proteinskih sulfhidrilnih grupa.

Povrede ćelijskih organela. Fulerenol u milimolarnom opsegu doza, se smatra da dovodi do disrupcije citoskeleta, zatim aktivacije autofagije i narušavanja integriteta mitohondrija, što rezultuje smrću ćelija (Johnson-Lyles i dr., 2010). U studiji Liu i saradnika (Yang Liu, Wang, & Wang, 2015) je ispitana promena morfologije i biomehaničkih svojstava humanih malignih ćelija jetre nakon tretmana fulerenolom gde se ispoljilo smanjenje čvrstoće ćelija, što se povezuje sa narušavanjem citoskeletne mreže, a što može biti koristan parametar pri proceni efekta fulerenola na ćelije, kao i pri otkrivanju ćelijske dinamike.

Hematotoksičnost. Negativan efekat fulerenola (u koncentraciji 10-100 mg/cm³) na eritrocite se ispoljava kroz odlaganje maturacije, diferencijacije, kao i kroz supresiju ponovnog uključivanja makrofaga u eritroblastna ostrva (Tishevskaya i dr., 2014).

1.5. DOKSORUBICIN

Doksorubicin je antraciklinski antibiotik koji je zajedno sa daunorubicinom 60-ih godina prošlog veka izolovan iz bakterije *Streptomyces peucetius* subsp. *Caesius*. Antraciklini su po hemijskoj strukturi glikozidi iz grupe hinona. Pored doksorubicina i daunorubicina, u grupu antraciklina se ubrajaju još i idarubicin, epirubicin, aklarubicin i mitoksantron.



Slika 1.11. Strukturna formula doksorubicina

Struktura doksorubicin hidrohlorida, predstavljena na slici 1.11. je planarna i sastoji se iz tetraciklinskog jezgra, aglikona adriamicinona, za koje je glikozidnom vezom na C-7 u prstenu A vezan monosaharid daunozamin. U tetraciklinskom aglikonu se u prstenvima C i B nalaze hinonske, odnosno hidrohinske grupe, zatim na položaju C-4 u prstenu D metoksi supstituent, a u položaju C-9 prstena A kratki bočni lanac sa karbonilnom grupom u položaju C-13 (Minotti, 2004). Zahvaljujući prisustvu tri glavne jonizujuće grupe, DOX ispoljava tri različite pK_a vrednosti: $pK_1 = 8,15$ (amino grupa šećerne komponente), $pK_2 = 10,16$ (fenolna grupa na C₁₁) i $pK_3 = 13,2$ (fenolna grupa na C₆) (Bouma, Beijnen, Bult, & Underberg, 1986; Fiallo, Tayeb, Suarato, & Garnier-Suillerot, 1998). Doksorubicin se nalazi u obliku crvenih igličastih prah kristala, dobro se rastvara u vodi, dok se u hloroformu, etru i drugim organskim rastvaračima ne rastvara. Na sobnoj temperaturi je stabilan, ali se degradira u prisustvu UV/VIS zraka.

Uprava za hranu i lekove (*engl.* Food And Drug Administration, FDA) je 1974. godine odobrila DOX za lečenje sledećih neoplastičnih stanja: akutna limfoblastna leukemija, akutna mijeloblastna leukemija, sarkomi mekog i koštanog tkiva, karcinom dojke, karcinom jajnika, tireoidni karcinom, gastrični karcinom, Hodžkinov sindrom, maligni limfom i bronhogeni karcinom (mikrocelularni tip) (C. Carvalho i dr., 2009). Može se naći pod nekoliko različitih

zaštićenih naziva, odnosno komercijalnih preparata: Adriacin[®], Adriblastina[®], Adriamycin[®], Caelyx[®], Myocet[®], Doxorubicin Teva[®], Sindroxocin[®].

Iako su jedni od najefikasnijih antineoplastičnih lekova, primena antraciklina je ograničena zbog neželjenih efekata koje izazivaju, a to su: kardiotoksičnost, pulmotoksičnost, hepatotoksičnost, nepovoljno dejstvo na gastrointestinalni trakt i mijelosupresija (Carvalho i dr., 2014).

1.5.1. FARMAKOKINETIKA DOKSORUBICINA

Rezultati farmakokinetičkih istraživanja ukazuju da se između 50-85% doksorubicina i njegovog glavnog metabolita doksorubicinola vezuje za protein plazme, nakon čega brzo prelazi u tkiva sa najvećim koncentracijama leka u bubrezima, slezini i plućima. Hepatički metabolizam i bilijarni klirens su glavni putevi ekskrecije. Više od 40% aplikovane doze se izlučuje putem žuči u roku od 5 dana, dok se 5-12% leka i njegovih metabolita izlučuje urinom. (Greene, Collins, Jenkins, Speyer, & Myers, 1983). Oko 50% primenjene doze se zadržava u organizmu (Advani i dr., 1994). Poluvreme eliminacije je oko 30 časova (Wisher, 2012), a iz organizma se izlučuje nakon 5-7 dana. Razvoj osetljivih i pouzdanih analitičkih metoda za detekciju i determinaciju doksorubicina i njegovih metabolita omogućuje potencijalnu primenu istih za praćenje ekskrecije leka, ali i njegovog metabolizma, čime bi bilo omogućeno personalizovano doziranje terapijom doksorubicinom i optimizovana individualna terapijska doza (Álvarez-Cedrón, Sayalero, & Lanao, 1999; Anderson, Gergen, & Arriaga, 2002; Oliveira-Brett, Piedade, & Chiorcea, 2002; Vajdle i dr., 2014).

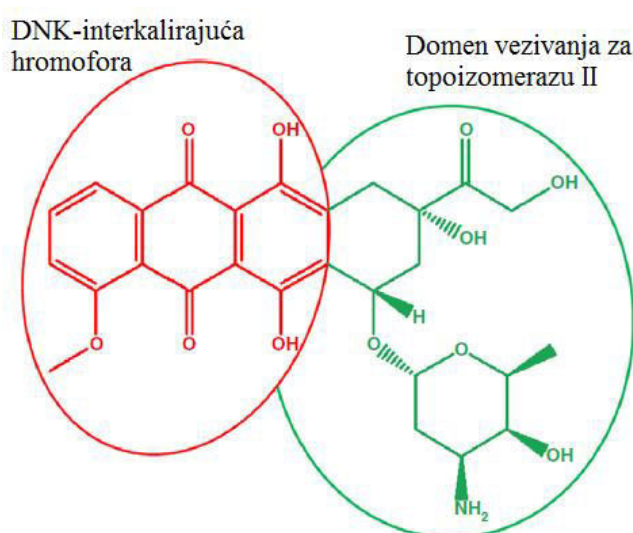
Lek se brzo metaboliše, uglavnom u jetri, u svoje aktivne metabolite od kojih je najpoznatiji doksorubicinol. Poput doksorubicina svi nastali metaboliti imaju sposobnost stvaranja slobodnih radikala, što dovodi do akutne i hronične toksičnosti leka.

Do rezistencije na doksorubicin može doći zbog nekoliko razloga. Jedan od njih je prekomerna ekspresija P-170 glikoproteina u membranama malignih ćelija, koji predstavlja jonsku pumpu i odgovoran je za ubrzanu eliminaciju doksorubicina iz ćelije. U pojedinim malignim ćelijama je aktivnost enzima topoizomeraze II (TOP2), pomoću koga se ostvaruje jedan od osnovnih mehanizama antitumorskog dejstva doksorubicina, smanjena.

1.5.2. MEHANIZMI ANTINEOPLASTIČNOG DEJSTVA DOKSORUBICINA

Smatra se da svoju aktivnost doksorubicin duguje sadejstvu više različitih mehanizama (J. Fang, Nakamura, & Iyer, 2007), od kojih su najistaknutiji inhibicija enzima topoisomerase II i I, interkalacija u molekul DNK i stvaranje slobodnih radikala.

Za kombinovani citotoksični efekat doksorubicina odgovorna je njegova struktura (Slika 1.12.), u kojoj se mogu prepoznati dva dela sa različitim mehanizmom delovanja. Semihinonski deo leka interkalira u DNK umetanjem između susednih baznih parova DNK. Ovaj hromoforni deo molekula DOX je uključen i u proces stvaranja slobodnih radikala, te može dovesti do oštećenja DNK i lipidne peroksidacije. Međutim, glavni biološki efekat odgovoran za citotoksičnost ovog leka je interakcija sa enzimom TOPII (Cagel, Grotz, Bernabeu, Moretton, & Chiappetta, 2017).



Slika 1.12. Prikaz odnosa aktivnost-struktura DOX sa označenim delovima molekula odgovornim za različitu citotoksičnu aktivnost. Preuzeto uz izmene iz: (Cagel i dr., 2017)

Uticaj doksorubicina na DNK

Doksorubicin ulazi u ćelije kancera prostom difuzijom, gde se velikim afinitetom vezuje za proteazome u citoplazmi formirajući doksorubicin-proteazom kompleks koji se translocira u jedro kroz jedarne ATP-zavisne pore. U jedru se doksorubicin odvaja od proteazoma i vezuje za DNK zahvaljujući većem afinitetu za vezivanje za DNK, nego za proteazom, što dovodi do apoptoze, na čemu se i zasniva antitumorska terapija (Kiyomiya, Matsuo, & Kurebe, 2001; Minotti, 2004).

Delovanje DOX na nukleinske kiseline ćelija u deobi se može svesti na dva osnovna mehanizma:

- (1) interkalaciju između baznih parova u DNK lancu, čime se inhibira sinteza DNK i RNK blokiranjem replikacionih i transkripcionih procesa (Thorn, Caroline; Oshiro, Connie; Marsh, Sharon; Hernandez-Boussard, Tina; McLeod, Howard; Klein, Teri; Altman, 2010);
- (2) stvaranjem slobodnih radikala, uzrokujući oksidativno oštećenje na ćelijskim membranama, proteinima i DNK.

Jedan od mehanizama kojim doksorubicin ispoljava svoju genotoksičnost je stvaranje metabolita, pri čemu istovremeno dolazi do nastajanja slobodnih radikala. Hinonska struktura DOX učestvuje u redoks reakcijama kao elektron akceptor, pri čemu se prevodi u semihinonski slobodni radikal dejstvom nekoliko enzima: mitohondrijalne NADH dehidrogenaze, citosolne NAD(P)H dehidrogenaze, ksantin oksidaze i endotelijalne azot(II)-oksid sintaze (La Ferla i dr., 2011; Thorn, Caroline; Oshiro, Connie; Marsh, Sharon; Hernandez-Boussard, Tina; McLeod, Howard; Klein, Teri; Altman, 2010). Ovaj nestabilni metabolit može direktno oštetiti DNK ili se može prevesti ponovo u hinonski oblik, pri čemu se stvaraju reaktivne kiseonične vrste (*engl.* Reactive Oxygen Species, ROS), kao što su superoksid, hidroksi radikal i peroksid (Gewirtz, 1999). ROS mogu uzrokovati oksidativni stres, lipidnu peroksidaciju, oštećenje membrane i DNK i biti okidači apoptoze (Doroshov, 1986). Proces lipidne peroksidacije iniciraju slobodni radikali, a kao rezultat nastaje nekoliko relativno stabilnih produkata među kojima je i malonildialdehid, MDA (Janero, 1990; Minotti, 2004), koji može reagovati sa slobodnim amino grupama deoksiguanozina, deoksiadenozina i deoksicitidina formirajući alkilovane proizvode datih baza. Ove reakcije pokazuju njegovo mutageno dejstvo koje se najviše uočava na parovima baza guanina i citozina brojnim insercijama i delecijama (Niedernhofer, Daniels, Rouzer, Greene, & Marnett, 2003).

Doksorubicin kao inhibitor topoizomeraze

Osnovni toksični efekat delovanja doksorubicina je, prema literarnim podacima i rezultatima istraživanja, inhibicija enzima topoizomeraze II, zbog čega je onemogućena relaksacija superzavojnice DNK, čime se sprečava replikacija i transkripcija DNK, kao i njena popravka (Tewey, Rowe, Yang, Halligan, & Liu, 1984).

Topoizomeraze igraju veoma važnu ulogu u procesu transkripcije i replikacije DNK u periodu ćelijske deobe i aktivnost im je povišena kod proliferišućih ćelija, kakve su i tumorske. Ovi enzimi dovode do privremenog isecanja jednog (topoizomeraza I) ili oba lanca

DNK (topoizomeraza II), što omogućuje odvijanje navedenih procesa bez promena u strukturi i sekvenci nukleotida u DNK molekulu.

Antraciklini, u koje se ubraja i doksorubicin, stabilizuju kompleks koji nastaje u reakciji topoizomeraze II i DNK, u kojem su presečeni DNK lanci kovalentno vezani za tirozinske ostatke topoizomeraze II. Na osnovu ovoga se potvrđuje hipoteza da su za aktivnost antraciklina važnija gen specifična oštećenja nego masivno oštećenje DNK. Ponovno povezivanje lanaca DNK je usled stabilizacije kompleksa antraciklinom onemogućeno, što dovodi do zaustavljanja čitavog procesa replikacije, ćelijskog rasta u G₁ i G₂ fazi ćelijskog ciklusa i na kraju dolazi do programirane ćelijske smrti, apoptoze (Binaschi i dr., 2001; Binaschi, Farinosi, Borgnetto, & Capranico, 2000; Lage, Helmbach, Dietel, & Schadendorf, 2000; Yi i dr., 2007).

Uloga slobodnih radikala

Stvaranje slobodnih radikala i oksidativni stres su u tesnoj vezi sa antitumorskom aktivnošću doksorubicina, ali isto tako i toksičnim efektima koje izaziva primena ovog citostatika.

Postoji nekoliko načina nastanka slobodnih radikala dejstvom doksorubicina (Minotti, 2004):

- 1) **Nastajanjem semihinona:** DOX se redukcijom transformiše u semihinonski slobodni radikal u prisustvu različitih NAD(P)H zavisnih reduktaza. Semihinon dalje reaguje sa kiseonikom dajući superoksid anjon radikal, koji se dalje dejstvom superoksid dismutaze prevodi u vodonik-peroksid, dok se semihinon vraća u hinonsku strukturu.
- 2) **Neenzimskim mehanizmom:** DOX ulazi u neenzimske metaboličke reakcije u kojima učestvuju joni gvožđa, usled čega dolazi do stvaranja nove količine slobodnih radikala (semihinon, superoksid anjon radikal i vodonik-peroksid). Ovo dovodi do oslobađanja gvožđa iz feritina i citoplazmatske akonitaze, čime se utiče na metabolizam gvožđa. Pored toga, u toku ovih procesa nastaje i hidroksi radikal.
- 3) **Metabolizmom DOX-a:** redukcijom karbonilne grupe DOX u položaju C13 nastaje metabolit doksorubicina-sekundarni alkohol doksorubicinol, koji može osloboditi gvožđe iz citoplazmatske akonitaze, utičući tako na metabolizam gvožđa i prouzrokujući oksidativni stres. Pored ovoga, DOX može biti metabolisan i u lipofilni aglikon koji se pod dejstvom sukcinat-dehidrogenaze redukuje, postaje lipofilniji i ugrađuje u membranske strukture ćelije, gde se i akumulira stvarajući slobodne radikale i narušavajući funkcionalni integritet respiratornog lanca (Licata, Saponiero, Mordente, & Minotti, 2000).

Iako i superoksid anjon radikal, $O_2^{\cdot-}$ i vodonik-peroksid, H_2O_2 mogu dovesti do oštećenja pojedinih ćelijskih struktura, od većeg je značaja njihova međusobna interakcija u kojoj dolazi do nastanka hidroksilnog radikala, za koju je neophodno prisustvo metala sa promenljivom valencom, što su najčešće slobodni joni gvožđa (Richardson, 2005). Uticaj antraciklina na homeostazu gvožđa je prilično kompleksan proces jer ova grupa lekova i njihovi metaboliti utiču na ćelijski metabolizam gvožđa na mnoge načine (Minotti, Cairo, & Monti, 1999).

Hidroksilni radikali dovode do lipidne peroksidacije i stvaranja lipidnih radikala, što oštećuje ćelijske membrane. Pored toga, reaktivni oblici kiseonika remete funkciju mnogih proteina (od kojih su veoma značajni jonski kanali i transporteri) intereagujući sa njihovim aktivnim centrima. Krajnji ishod delovanja slobodnih radikala je apoptoza (Minotti i dr., 1999).

1.5.3. NEŽELJENA DEJSTVA I TOKSIČNOST

Jedno od najizraženijih neželjenih dejstava doksorubicina koje ograničava kliničku primenu je kardiotoksičnost (Singal, Li, Kumar, Danelisen, & Iliskovic, 2000), dok je mijelosupresija glavni dozno-limitirajući neželjeni efekat ovog leka i to najčešće u obliku leukopenije i/ili granulocitopenije. Kao posledice mijelosupresije mogu se javiti temperatura, infekcija, sepsa, septički šok, hemoragije, tkivna hipoksija i u najgorem slučaju smrt (Hoekman, Van der Vijgh, & Vermorken, 1999). Oštećenje bubrega, nastalo najverovatnije usled oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije, je takođe jedan od neželjenih efekata antraciklinskih antibiotika (Giri i dr., 2004; Venkatesan, Punithavathi, & Arumugam, 2000).

Citostatici deluju podjednako na sve ćelije koje brzo proliferišu, uključujući i ćelije reproduktivnog sistema. Na eksperimentalnim životinjama pokazano je da doksorubicin dovodi do smanjene pokretljivosti spermatozoida, njihove apoptoze i na kraju do sterilnosti i potpunog gubitka funkcije testisa, a sve kao posledica oksidativnog stresa (Hou i dr., 2005; Prahalathan, Selvakumar, & Varalakshmi, 2005; Yeh i dr., 2007).

Dejstvo doksorubicina na sluznicu gastrointestinalnog trakta za posledicu ima apoptozu epitelijalnih ćelija. Moguća je pojava mukozitisa, što može izazvati ozbiljne ulceracije i biti poreklo opasnih infekcija.

Intenzivni metabolizam doksorubicina u jetri dovodi do stvaranja slobodnih radikala koji mehanizmom lipidne peroksidacije oštećuju membrane hepatocita (Injac, Perse, i dr., 2009).

Dokсорubicinol, metabolit dokсорubicina, pored toga što stvara slobodne radikala (u manjoj meri nego dokсорubicin), utiče i na enzim citosolnu akonitazu remeteći tako homeostazu gvožđa. Smatra se da je dokсорubicinol odgovoran za razvoj hronične kardiomiopatije, dok dokсорubicin produkcijom velike količine slobodnih radikala uzrokuje akutnu kardiotoksičnost (Licata i dr., 2000; Minotti i dr., 1998).

Osnovi kardiotoksičnosti dokсорubicina

Oštećenje srčanog mišića tokom primene dokсорubicina se usko povezuje sa povećanjem oksidativnog stresa u srčanom mišiću, koji dovodi do smanjenog stvaranja energije, oksidacije mitohondrijalne DNK i gubitka potencijala mitohondrijalne membrane usled stvaranja permeabilnih tranzitnih pora. Dokсорubicin ima mogućnost da menja hemijski sastav, strukturu i funkciju bioloških membrana, uglavnom na mitohondrijalnom nivou, što rezultuje akumulacijom ovog leka unutar srčanih ćelija, koje obiluju mitohondrijama.

Postoji nekoliko objašnjenja koja obrazlažu veliku podložnost srca oksidativnom stresu prouzrokovanom primenom antraciklina (Šimunek i dr., 2009):

- Antraciklini se u kardiomiocitima zadržavaju duže nego u drugim ćelijama
- Usled nedostatka enzima katalaze, srčano tkivo ima slabiju antioksidativnu zaštitu
- Kardiomiociti obiluju mitohondrijama, koje su i izvor i meta slobodnih radikala
- Veliki afinitet kardiolipina, mahom kardiospecifičnog fosfolipida, ka antraciklinima.

Istraživanja ukazuju na značajnu akumulaciju pozitivno naelektrisanog DOX u mitohondrijama miocita zbog visokog afiniteta ka negativno naelektrisanom lipidu kardiolipinu, koji se u najvećoj meri nalazi u mitohondrijalnim membranama u srčanom tkivu. Ovo dalje dovodi do smanjenja aktivnosti kardiolipin-zavisnih mitohondrijalnih enzima (Ichikawa i dr., 2014).

Iako tačan mehanizam kardiotoksičnosti DOX još uvek nije u potpunosti razjašnjen, smatra se da je u tesnoj vezi sa stvaranjem slobodnih radikala i kompleksa dokсорubicina sa jonom gvožđa u mitohondrijalnoj membrani, što povećava permeabilnost unutrašnje membrane mitohondrija u srcu, narušavajući membranski potencijal i oslobađajući preakumulirane jone kalcijuma, zbog čega dolazi do disfunkcije mitohondrija i srčanog oštećenja (Rahman, Yusuf, & Ewer, 2007). Oštećenje miofibrila i intracelularni poremećaj regulacije kalcijumovih jona su važni mehanizmi u oštećenju srčanog mišića primenom dokсорubicina (Octavia i dr., 2012). Oksidativni stres, koji nastaje kao posledica tretmana dokсорubicinom, oštećuje

izoenzime kreatin kinaze usled čega oni gube svoju funkciju. Stimulativni efekat kreatina na respiraciju se prekida, što se verovatno dešava i u mitohondrijama ćelija srčanog mišića, čime se može objasniti toksičnost ovog leka na srce (Tokarska-Schlattner i dr., 2007).

1.5.4. STRATEGIJE ZA POBOLJŠANJE EFIKASNOSTI I/ILI SMANJENJE TOKSIČNOSTI DOKSORUBICINA

Neke od strategija koje se primenjuju u cilju smanjenja sistemske toksičnosti doksorubicina uz zadržavanje efikasnosti leka su: izmena načina doziranja, sinteza hemijskih analoga leka, razvoj novih tumor-ciljajućih derivata, različitih farmaceutskih formulacija, kao i primena nanonosaa i protektivnih agenasa.

Hemijskim modifikacijama molekula doksorubicina sintetisani su brojni analozi, ali je samo nekoliko njih dospelo do kliničkih faza ispitivanja. Većina novosintetisanih analoga izaziva rezistentnost tumorskih ćelija u manjoj meri nego doksorubicin, međutim istovremeno ispoljavaju i veću kardiotoksičnost (Minotti, 2004).

Vezivanjem jona gvožđa, koji se ponašaju kao prooksidansi, helirajućim agensima se zaustavlja dalja produkcija slobodnih radikala, čime se sprečava oksidativno oštećenje okolnog tkiva (Lipshultz i dr., 2004).

Imajući u vidu da toksični efekti doksorubicina potiču uglavnom od produkcije ROS u ćelijama, najčešće se kao protektivni agensi ispituju antioksidansi. *In vivo* ispitivanja na životinjskom modelu pokazala su da nanočestice fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ ispoljavaju antioksidativnu aktivnost i zbog toga je uključen u *in vivo* istraživanja kao potencijalni organoprotektor pri doksorubicinskoj terapiji (Injac, Perse, i dr., 2008; Injac, Boskovic, i dr., 2008; Injac, Perse, i dr., 2008; Injac, Radic, i dr., 2009; Torres i dr., 2010, Srdjenovic i dr., 2010).

1.5.5. FORMULACIJE I NANOFORMULACIJE DOKSORUBICINA

Prvi nanosistemi za tretman neoplastičnih promena su razvijeni u cilju poboljšanja dijagnostičkih metoda, efikasnosti i bezbednosti određenih lekova koje karakteriše niska biodostupnost i dozno-zavisni sporedni efekti. Ovi novi pristupi terapiji kancera su zasnovani na efektu povećane permeabilnosti i zadržavanja (*engl.* Enhanced Permeability and Retention, EPR) koji je karakterističan za solidne tumore i koji ih zbog anatomije i fiziopatoloških specifičnosti odvaja od zdravog tkiva. Naime, endotelijalne ćelije u krvnim sudovima malignih tkiva imaju veoma velike šupljine veličine od 100 nm pa sve do nekoliko stotina nanometara, za razliku od zdravog tkiva gde su veličine ovih šupljina mnogo manje (5-10 nm). Zatim, u zdravom tkivu se nanosistemi ispunjeni lekovima dalje metabolišu posredstvom limfnog puta, dok je limfni sistem kod solidnih tumora izmenjen, te dolazi do selektivnog zadržavanja nanonosača (Maeda, Nakamura, & Fang, 2013; A. Z. Wang, Langer, & Farokhzad, 2012). Prva komercijalno dostupna formulacija DOX je bio Adriamycin[®], koji je FDA odobrila 1974. godine (<https://dtp.cancer.gov/timeline/flash/FDA.htm>).

Pasivni „targeting”/ciljanje uključuje razvoj dostavnih sistema lekova sposobnih da izbegnu mehanizme eliminacije iz organizma (metabolizam, ekskrecija i opsonizacija praćena fagocitozom) povećavajući tako vreme cirkulacije i selektivnu akumulaciju u ciljanom tkivu. Ovo se može postići promenom određenih osobina, kao što su molekulska težina i veličina nanonosača, njegovo površinsko naelektrisanje, hidrofilna ili hidrofobna priroda. Ugradnja DOX u liposome predstavlja vodeći metod za pasivni unos antraciklina u tumore (Andreopoulou i dr., 2007).

Aktivni „targeting”/ciljanje podrazumeva konjugaciju specifične grupe (antitela, folna kiselina, monosaharidi ili neki ligandi) na površinu nosača. Idealno, ove grupe bivaju prepoznate od specifičnih receptora koji se nalaze na površinama ćelija određenog tkiva i dostavljene na mesto za koje je nosač namenjen.

Glavni ciljevi nanomaterijala kao nosača lekova su: aktivni prenos do specifičnog tkiva ili tipa ćelija, razvoj novih kontrolisanih dostavnih sistema lekova, razmatranje koenkapsuliranja više od jednog aktivnog principa u nanonosač, poboljšanje farmakokinetičkih i farmakodinamičkih parametara, bezbednosti lekova, kao i umanjeње neželjenih sporednih efekata (Minotti, 2004). Pregled formulacija doksorubicina zasnovanih na nanotehnologiji koje se nalaze u upotrebi ili su u fazi kliničkih ispitivanja je dat u tabeli 1.2.

Tabela 1.2. Pregled formulacija doksorubicina zasnovanih na nanotehnologiji koje se nalaze u upotrebi ili su u fazi kliničkih ispitivanja Preuzeto uz izmene iz: (Cagel i dr., 2017)

Nanosistem	Naziv	Veličina (nm)	Primena	Status
Lipozomi	Doxil [®] /Caelyx ^{®a}	80-90	AIDS-povezan Kapošijev sarkom; ovarijalni kancer; metastazni kancer dojke; multipli mijelom	Odobren Odobren
	Myocet [®]	190	Kancer dojke (metastaze)	Odobren ^b
	Lipo-Dox [®]	Nema podataka	AIDS-povezan Kapošijev sarkom; ovarijalni kancer; metastaze (metastaze)	Faza III
	ThermoDox [®]	100	Primarni kancer jetre	
Nanočestice	Livatag [®]	100-300	Primarni kancer jetre	Faza III
Konjugati polimer-lek	FCE28068/PK1	Nema podataka	Kancer dojke, nemikrocelularni kancer pluća, kolorektalni kancer	Faza II Faza II
	FCE28069/PK2	Nema podataka	Kancer jetre (primarni ili metastaze)	
Polimerne micele	SP1049C	20-27	Adenokarcinom ezofagusa	Faza III Faza II
	NK911	40	Kancer pankreasa (metastaze)	

^a Formulacija je u SAD komercijalizovana kao Doxil[®], u EU kao Caelyx[®]

^b Odobren u Tajvanu

Lipozomi

Lipozomi su vezikule formirane od koncentričnog lipidnog dvosloja (fosfolipidi, lecitin i/ili holesterol) koji ima hidrofilno jezgro. Hidrofobni lekovi se mogu inkorporirati u lipidni dvosloj, dok se hidrofilnim lekovima mogu napuniti jezgra ovih vezikula. Biodegradibilnost, biokompatibilnost, niska toksičnost, veličina i hidrofobni/hidrofilni karakter su osobine lipozoma koje ih svrstavaju u obećavajuće dostavne sisteme za lekove (Muthu & Feng, 2010). Lipozomalna inkorporacija lekova predstavlja vodeći način za pasivno ciljanje antraciklina do mesta tumora. Antraciklini enkapsulirani lipozomima se odlikuju sledećim osobinama:

- Duži poluživot u odnosu na čist lek
- Ograničena transformacija u aglikon ili sekundarni alkoholni metabolit
- Željena akumulacija u tkivima koje odlikuje propustljiva vaskulatura (tumori) ili u organima u kojima se nalaze makrofagi retikuloendotelijalnog sistema (jetra, slezina)

- Produženo otpuštanje leka u tumorskom okruženju
- Ograničena akumulacija u zdravim tkivima (npr. srce) sa normalnim endotelijalnim barijerama

Uspešno ostvarenje svih ovih ciljeva zavisi od veličine lipozomalnog nosača, njegovog klirensa iz plazme, kao i od stabilnosti lipozom-lek formulacije u krvotoku ili tumorskom okruženju. Akumulacija lipozoma u tumorima je favorizovana ne samo propustljivom mikrovaskulaturom, nego i nedovoljnom limfnom drenažom. Mehanizmi kojima se postiže oslobađanje doksorubicina iz lipozoma i preuzimanje od ćelija tumora su još uvek nedovoljno detaljno istraženi, međutim postoji nekoliko mehanizama kojim se ovi procesi mogu objasniti: disrupcijom fosfolipidnog dvosloja dejstvom fosfolipaze, narušavanjem gradijenta amonijumove soli ili preuzimanjem i oslobađanjem od makrofaga na mestu tumora (Barenholz, 2012; Gabizon, Shmeeda, & Barenholz, 2003). Mikrookruženje tumora doprinosi destabilizaciji lipidnog nosača usled blago kisele sredine intersticijalnih fluida, oslobađanjem lipaza iz odumirućih tumorskih ćelija, kao i oslobađanjem enzima i oksidujućih agenasa od strane inflamatornih ćelija.

Omotači kao što je polietilen-glikol (PEG) koji se mogu vezati za površinu lipozoma čine ove nosače „nevidljivim” za retikuloendotelijalni sistem, onemogućuju adheziju proteina i obezbeđuju duže vreme cirkulacije, što je od osnovnog značaja da bi se postigla pasivna akumulacija na mestu tumora. Pegilacija, odnosno površinsko modifikovanje polietilen-glikolom, štiti lipozome od prepoznavanja od mononuklearnog fagocitnog sistema, smanjuje se opsonizacija i preuzimanje od fagocita, čime se produžava poluvreme eliminacije leka (Boers-Sonderen i dr., 2014). Lipozomi su dovoljno mali da prođu kroz vaskularizaciju koja ima povećanu propustljivost, kao npr. u koži i tumorima sa povećanom neoangiogenezom, rezultujući akumulacijom u intersticijalnom prostoru tumora (Barenholz, 2012; Gabizon i dr., 2003). Istraživanja Gabizon i saradnika i Mross i saradnika (Gabizon i dr., 2003; Mross i dr., 2004) ukazuju da zdrava tkiva ispoljavaju minimalno preuzimanje lipozoma, za razliku od samog leka, koji biva u značajnoj meri preuzet i od zdravih tkiva (Gustafson, Rastatter, Colombo, & Long, 2002).

Doxil[®] (Sequus Pharmaceuticals, Menlo Park, CA, USA)/Caelyx[®] (Janssen Australia)

Ovu dugoživeću formulaciju čine lipozomalne čestice veličine 80-90 nm koje po lipozomu sadrže 10.000–15.000 molekula doksorubicina. Skladištenje leka u lipozome se ostvaruje

posredstvom mehanizma izmene baza. Naime, lipozomi sadrže visoku koncentraciju amonijum-sulfata, odakle se amonijum joni zamenjuju lekom koji se ponaša kao baza (Barenholz, 2012). Koncentracija doksorubicina u doksil lipozomima je oko 45 nmol/dm^3 , što prevazilazi granicu rastvorljivosti, usled čega se kristali doksorubicin-sulfata talože u lipozomu. Spoljašnja površina čestica je "presvučena" hidrofilnim polietilen-glikolom, odnosno pegilovana. Pegilacijom je unapređena već postojeća lipozomalna formulacija, kod koje je farmakokinetika leka pokazala da se lek iz lipozoma u plazmi oslobađao veoma brzo, što je dovodilo do neželjene kardiotoksičnosti, a pored toga i do brze eliminacije lipozoma od retikuloendotelijalnog sistema u jetri, slezini i koštanoj srži. Uprkos tome što je postignuto dugoživoće cirkulisanje doksila u humanoj plazmi, novi sporedni dozno-zavisni efekti su se javili u vidu dlan-stopalo sindroma. Ovaj sindrom obuhvata crvenilo, osetljivost i ljuštenje kože. Nakon administracije hemoterapeutika, male količine leka izlaze iz kapilara dlanova i stopala. Izlaganje ovih delova tela toploti i trenju povećava količinu leka u kapilarima i izaziva crvenilo, oteke i bol na dlanovima i stopalima, nekada dovodi čak i do pojave plikova (Yokoyama, 2005). Studijom kojom je ispitana biodistribucija ove formulacije utvrđeno je da je akumulacija znatno veća u slučaju tumora mozga u poređenju sa zdravim mozgom, što se objašnjava prolaskom lipozomalnog doksorubicina kroz krvno-moždanu barijeru u tumorskim predelima (Koukourakis i dr., 2000), za razliku od doksorubicina koji sam ne prolazi krvno-moždanu barijeru.

Komponente doksila su ispoljile i sporedne efekte poznate kao pseudoalergiju povezanu sa aktivacijom komplementa, koja se ogleda u plitkom disanju i kratkom dahu. U poređenju sa primenom samog DOX, ova formulacija je pokazala značajno nižu toksičnost i veću efikasnost (Northfelt, 1998; O'Brien i dr., 2004; Stewart i dr., 1998), a određeni sporedni efekti, među kojima je i „curenje” leka i stabilnost u cirkulaciji, se mogu ublažiti/izbeći (Haran, Cohen, Bar, & Barenholz, 1993; Lasic, Frederik, Stuart, Barenholz, & McIntosh, 1992; Szebeni & Barenholz, 2012).

Myocet® (Teva UK Limited)

Miocet je nepegilovana formulacija koja u poređenju sa konvencionalnim doksorubicinom pokazuje poboljšanja po pitanju farmakokinetičkog i profila toksičnosti, a koji u poređenju sa pegilovanim formulacijama izaziva slabije izražene sporedne efekte tipa „dlan-stopalo sindrom” (Banerjee, 2001; Y. Fan & Zhang, 2013; Minotti, 2004). Miocet lipozomi nisu pegilovani i osmišljeni su da budu fagocitovani od monocita u cirkulaciji, čime se dobija efekat spore infuzije, odnosno obezbeđuje se postepeno oslobađanje leka iz lipozoma

(Immordino, Dosio, & Cattel, 2006). Ovu formulaciju čine fosfatidilholin i holesterol organizovani kao lipozomalna membrana veličine 190 nm, u koju je fizički „zarobljen” lek. Rezultati istraživanja sprovedenih na pacijentima kojima je uporedo aplikovana terapija doksorubicinom i miocetom ukazuju na značajno nižu kardiotoksičnost ove lipozomalne formulacije uz poredivu efikasnost (Batist i dr., 2001; Harris i dr., 2002). Međutim, u kliničkom ispitivanju (faza III) Čen i saradnika, grupa koja je primila miocet je imala lošije hematološke rezultate, značajno viši nivo neutropenije, dok je kardiotoksičnost i procenat preživljavanja u obe grupe slična (Chan i dr., 2004).

Lipo-Dox[®] (Sun Pharma Global FZE)

Zahvaljujući prisustvu zasićenih masnih kiselina postignuta je veća stabilnost i smanjeno „curenje” leka iz ove pegilovane lipozomalne formulacije u poređenju sa doksilom. Iako studije koje su obuhvatale ispitivanje Lipo-Dox[®]-a nisu dospеле do III faze kliničkih ispitivanja, rezultati aplikacije ovog leka u poređenju sa doksilom ukazuju na duže *in vivo* cirkulaciono vreme, bez drugih značajnijih poboljšanja (Y. Fan & Zhang, 2013; Hong & Tseng, 2001).

ThermoDox[®] (Celsion Corporation)

Termosenzitivna lipozomalna doksorubicinska formulacija, koja još uvek nije odobrena, je pokazala ohrabrujuće rezultate u kliničkim ispitivanjima u slučajevima tretiranja mikroskopskih lezija na jetri koje zaostaju i nakon terapije radiofrekventnom ablacijom (Goldberg i dr., 2002; Poon & Borys, 2009). Ovi lipozomi veličine 100 nm sadrže tri sintetička fosfolipida koji su temperaturno osetljivi, te pri blagom zagrevanju (40-45 °C) dolazi do oslobađanja leka u ciljnom tumorskom tkivu usled otvaranja lipozoma (Swenson i dr., 2015). Farmaceutska kompanija koja proizvodi ovu formulaciju je sprovela fazu III kliničkog ispitivanja terapije termodoksom u kombinaciji sa radiofrekventom ablacijom i ukazala na bolji klinički ishod preživljavanja pacijenata sa pojedinačnim lezijama (<http://celsion.com/thermodox/>).

Polimerne nanočestice

Ovoj grupi nanonosaa pripadaju polimerne čestice veličine 100-1000 nm, koje mogu biti prirodnog ili sintetskog porekla, od kojih su neki odobreni kao biokompatibilni, npr. polimlečna kiselina, poliglikolna kiselina, polimetilmetakrilat. Lekovi se na nanonosaa mogu fizički inkorporisati, hemijski vezati, ili ad/absorbovati. Prednost nanočestica u poređenju sa nekim drugim sistemima karakteriše stabilnost nakon administracije, naročito u telesnim tečnostima (Cagel i dr., 2017; Koo, Rubinstein, & Onyuksel, 2005; Kreuter, 1994).

Livata[®] (Onxeo orphan oncology products)

Livata[®] doksorubicinom napunjene nanočestice veličine 100-300 nm su u fazi III kliničkih ispitivanja na pacijentima sa hepatocelularnim karcinomom kod kojih je prethodna terapija sorafenibom bila neuspešna ili na koju je postojala intolerancija. Rezultati ispitivanja pokazuju značajno poboljšanje vremena preživljavanja pacijenata u poređenju sa standardnom citostatskom terapijom (Alphandéry, Grand-Dewyse, Lefèvre, Mandawala, & Durand-Dubief, 2015).

Polimer-lek konjugati

Polimer-lek konjugati se sastoje od tri glavne komponente: polimernog nosaa, leka i linkera koji povezuje lek i nosaa. Pored ovoga, ovoj kompleksnoj strukturi je moguće dodati targetne rezidue ili rezidue koje bi omogućile „imidžing”. U pogledu dostavnih osobina nanonosaa uglavnom postoje dve glavne strategije dostave hemoterapeutika do mesta tumora: umetanjem leka u hidrofobno jezgro elektrostatičkim/hidrofobnim interakcijama ili konjugacijom antineoplastičnog leka sa hidrofilnim/amfifilnim polimerom kovalentnim vezivanjem. Konjugati polimer-lek se, u poređenju sa drugim formulacijama, odlikuju solidnom *in vivo* stabilnošću i sprečavaju brzo oslobađanje leka u cirkulaciji (Cagel i dr., 2017; Fang i dr., 2016). Vezivanje doksorubicina za polimere se smatra pristupom koji bi poboljšao ciljanu dostavu do određenog tumora gde bi polimeri bili prepoznati od strane receptora koji su ekspresovani u slučaju određenih tumora.

FCE28068/PK1

PK1 je prvi neciljajući doksorubicin-polimer konjugat koji je dospao do faze II kliničkog ispitivanja na pacijentima sa različitim tipovima refraktornih ili rezistentnih kancera. Sastoji se od N-(2-hidroksipropil)metakrilat kopolimera kovalentno vezanog za doksorubicin

peptidnim „linkerom”. Na mestu ovog linkera se dejstvom lizozomalnih enzima veza cepa po preuzimanju pinocitozom od malignih ćelija, čime se favorizuje oslobađanje aktivnog leka na mesto tumora. U poređenju sa doksorubicinom, ova formulacija ima značajno manji klirens. Pored toga, nije primećeno kongestivno oštećenje srca, a dozno-ograničavajuća toksičnost se ogledala u mukozitisu i febrilnoj neutropeniji (Vasey i dr., 1999). Rezultati faze II kliničkih ispitivanja na pacijentima sa kolorektalnim nemikrocelularnim kancerom i kancerom dojke ukazuju da kod pacijenata sa kolorektalnim kancerom nije bilo odgovora na terapiju ovom formulacijom (Seymour i dr., 2002).

FCE28069/PK2

PK2 je jedini ciljajući doksorubicin-polimer konjugat. To je formulacija u kojoj je doksorubicin vezan preko lizozomalno degradabilne tetrapeptidne sekvence za kopolimer (*N*-(2-hidroksipropil)metakrilamid), koji za sebe ima vezan ostatak galaktozamina koji bi trebalo da je prepoznat od glikoproteinskih receptora jetre (Julyan i dr., 1999). U krvotoku se veoma male količine slobodnog doksorubicina mogu detektovati, a studija koja je ispitivala biodistribuciju polimera ukazuje na selektivnu akumulaciju u jetri, za razliku od neciljajuće formulacije (Seymour i dr., 2002), dok je eksperimentima na pacovima utvrđeno da je kardiotoksičnost PK2 značajno umanjena u poređenju sa ekvivalentnom dozom samog doksorubicina (Hopewell, Duncan, Wilding, & Chakrabarti, 2001).

Antitelo-lek konjugati

Prednost terapije ciljajućim antitelima smanjuje toksične efekte antikancerne lekova na zdrave ćelije i tkiva na taj način što ciljano reaguju sa površinskim receptorima na ciljnim ćelijama, nakon čega direktno ili indirektno ubijaju maligne ćelije (Dawidczyk i dr., 2014).

Indirektne strategije uključuju imuni odgovor koji vodi do apoptoze malignih ćelije ili do inhibicije angiogeneze (Firer, 2012; Galluzzi i dr., 2012; Scott, Allison, & Wolchok, 2012).

Kombinovanjem antitela i citotoksičnog leka dobija se sistem u kojem je antitelo zaduženo za ciljanje, odnosno prepoznavanje molekula koji su u velikoj meri ekspresovani na malignim ćelijama, dok lek dovodi do smrti ćelija (Chari, Miller, & Widdison, 2014; Scott i dr., 2012).

Konjugaciono mesto na antitelu je uglavnom neka aminokiselinska rezidua, kao npr. lizin sa reaktivnom amino grupom u bočnom nizu. Na ovaj način se po antitelu može vezati nekoliko molekula leka. Međutim, mana ovog pristupa je što može doći do blokiranja antigen-vezujućeg mesta na antitelu. Pored ovoga, mnogi lekovi imaju ograničenu rastvorljivost, te se

za „linker” često vezuje polietilen-glikol. Još jedno ograničenje ovog pristupa je što se po antitelu mogu vezati i isporučiti tek nekoliko molekula leka do ciljanog mesta.

Polimerne micelle

Ova grupa nanonosaa je veličine 20-200 nm i sastoji se od amfifilnih kopolimera koji se samoudružuju u sferne strukture. U hidrofobnu unutrašnjost micelle se mogu smestiti lekovi slabo rastvorljivi u vodi, dok spoljašnja hidrofilna korona stabilizuje enkapsulirani lek, a može dodatno biti funkcionalizovana različitim grupama u cilju postizanja ciljajućeg nosaa, pH- i/ili temperaturne osetljivosti (Torchilin, 2001, 2002; Z. Zhang i dr., 2014). Postoji veliki broj polimera koji se primenjuju za formiranje micela, međutim za ispitivanje u kliničkim studijama polimeri moraju zadovoljiti određene kriterijume, a jedan od najvažnijih je biokompatibilnost.

SP1049C

Micelarna formulacija SP1049C ispunjena doksorubicinom je stigla do faze III kliničkog ispitivanja. U njen sastav ulaze polietilen-oksidi (PEO) koji čini hidrofilnu koronu, i polipropilen-oksidi (PPO) koji formira hidrofobni segment u koji se smešta doksorubicin. Veličina čestica ove formulacije je u opsegu 22-27 nm (Sutton, Nasongkla, Blanco, & Gao, 2007).

NK911

Ova micelarna formulacija je prva iz svoje grupe koja je dospela u fazu kliničkih ispitivanja. Sastoji se od doksorubicin-konjugovane poliaspartamske kiseline kao nosaa i veličine je 40 nm (Nakanishi i dr., 2001). Trenutno je fazi II kliničkog ispitivanja.

Ekstracelularno tumorom aktivirani prolekovi

Alternativa lipozomalnim formulacijama uključuje sintezu prolekova koji kao takvi ne ulaze u ćeliju, sve dok se proteolitički ne aktiviraju peptidazama koje luče maligne ćelije. Jedan od primera je doksorubicin kovalentno vezan za *N*-glutaril-(4-hidroksiprolil)-Ala-Ser-cikloheksaglicil-Glu-Ser-Leu koji se aktivira u prisustvu malignih ćelija prostate, koje luče serin proteazu prostata-specifični antigen (PSA), nakon čega se doksorubicin unosi do ciljnih ćelija. Prolek pokazuje značajniju toksičnost i manje neželjenih sistemskih i kardiotoksičnih sporednih efekata nego doksorubicin (Nakanishi i dr., 2001).

Još jedan prolek iz ove grupe je tetrapeptidni derivat doksorubicina (*N*-sukcinil-Ala-L-Leu-L-Ala-L-Leu-DOX) pod nazivom CPI-0004Na, koji se aktivira peptidazama tumora. Na eksperimentu sa miševima je potvrđena niža toksičnost u poređenju sa doksorubicinom, i to kao posledica manje akumulacije u srcu i ostalom zdravom tkivu (Nakanishi i dr., 2001). Zahvaljujući većoj selektivnosti, moguća je primena većih doza u slučaju nekih tumora, kao npr. tumora debelog creva.

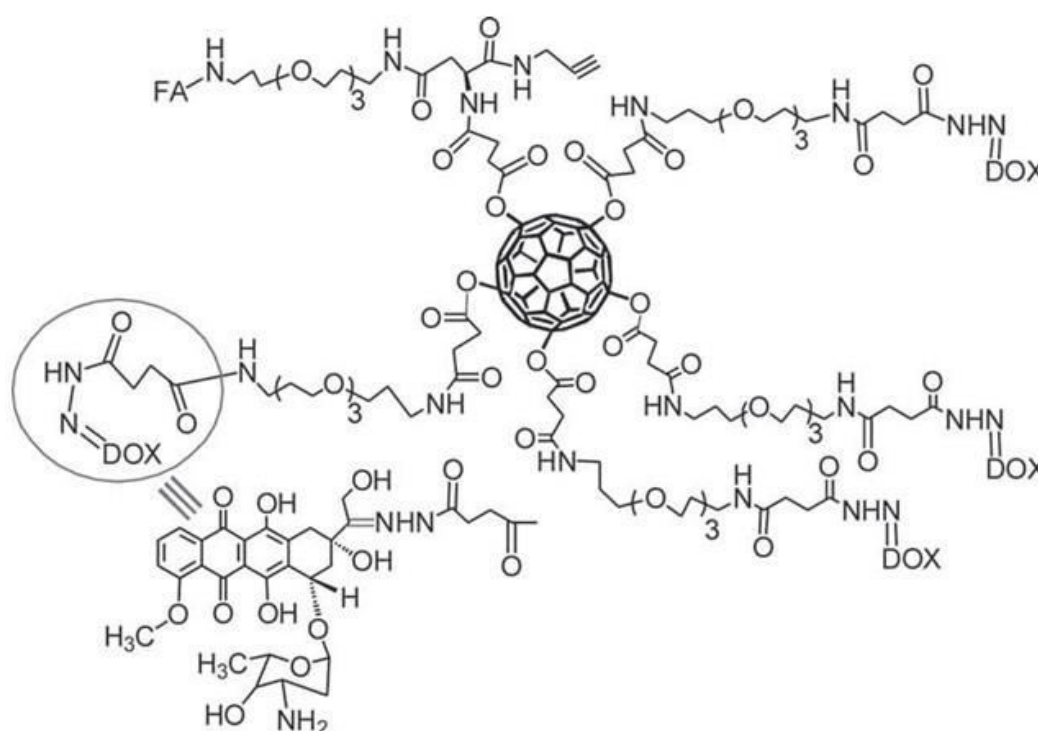
Nanokonjugati i derivati fulerena i DOX

Makromolekularni prolekovi često pokazuju prednosti u poređenju sa lekovima manjih molekularnih masa, i to produženi poluživot u plazmi, selektivna akumulacija u tumorima, kao i kontrolisano otpuštanje leka tokom produženog perioda (Dai i dr., 2008; Kaneda i dr., 2004; Veronese i dr., 2005). Jedan od glavnih izazova pri dizajnu makromolekularnih prolekova je efikasno intracelularno oslobađanje leka sa nanonosača. Za razliku od malih molekularnih lekova, makromolekularni lekovi ulaze u ćeliju endocitozom i bivaju obuhvaćeni endozomom i lipozomom. Upravo je razumevanje intracelularnog puta leka nakon preuzimanja putokaz pri dizajnu i razvoju efikasnih nanonosača lekova.

Mnogi citostatici, kao i doksorubicin, su fluorescentni što omogućuje praćenje leka primenom različitih mikroskopskih vizualizacionih tehnika. Ono što se javlja kao problem prilikom vizualizacije samog leka i leka sa nanonosačem je nemogućnost razlikovanja slobodnog i vezanog leka, međutim, primenom fluorescentne „lifetime“ imidžing mikroskopije (*engl.* Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM) i konfokalne mikroskopije se ovaj nedostatak može prevazići. Naime, Dai i saradnici (Dai i dr., 2008) su u živim HeLa ćelijama uspešno razlikovali slobodan doksorubicin i doksorubicin vezan za pseudopeptidni nosač. Ispitali su preuzimanje (*engl.* uptake) slobodnog doksorubicina i doksorubicina sa nosačem, pri čemu su zaključili da se lek sa nosačem preuzima endocitozom i dostiže maksimalnu koncentraciju 24h nakon inkubacije, nakon čega opada; dok se sam doksorubicin preuzima na brži način, difuzijom i aktivnim transportom. Još jedna bitna razlika je lokalizacija nosača sa lekom i samog leka; doksorubicin se akumulira u ćelijskom jedru, dok se doksorubicin sa nosačem zadržava u citoplazmi sa zanemarljivom akumulacijom u jedru tokom 72-časovnog inkubacionog perioda. Prolek, odnosno lek vezan za nosač, je pokazao smanjenje citotoksičnosti u poređenju sa lekom, kao i veću vijabilnost ćelija. Citotoksičnost enkapsuliranog doksorubicina zavisi od količine otpuštenog leka, jer polimerni nosač onemogućava interkalaciju doksorubicina sa DNK. Primećeno povećanje

poluživota nuklearnog doksorubicina u poređenju sa onim u citoplazmi se može prepisati interkalaciji leka sa DNK pri čemu doksorubicin gradi π - π veze sa aromatičnim grupama baznih parova DNK, što smanjuje izlaganje doksorubicina reagensima kao što je npr. kiseonik. Membranski vezan doksorubicin može takođe u manjoj meri doprineti povećanju poluživota zbog toga što doksorubicin, kao pozitivno naelektrisan u datim uslovima, teži da se veže za membranu.

Fan i saradnici (J. Fan, Fang, Zeng, Wang, & Wu, 2013) su objavili sintezu i ispitali multifunkcionalni antineoplastični prolek zasnovan na vodorastvornim agregatima fulerena, koji je prikazan na slici 1.12.

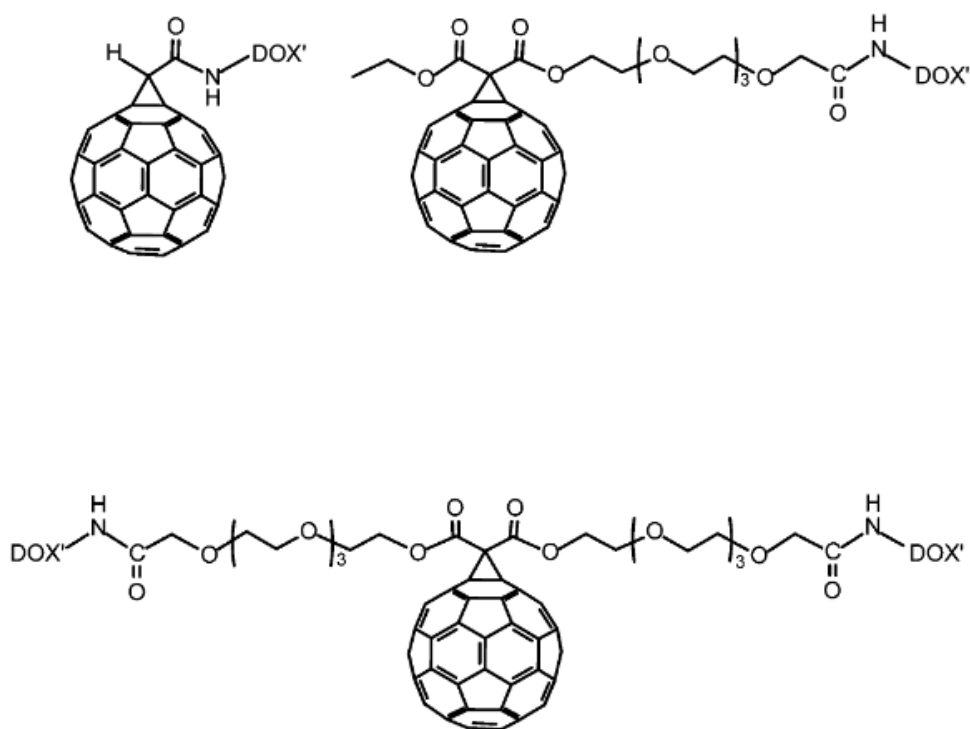


Slika 1.12. Struktura proleka (doksorubicin-hidrazin-fulerenol-folna kiselina). Preuzeto uz izmene iz (Fan i dr., 2013)

Naime, oni su kovalentno vezali prolek na bazi doksorubicina za fulerenol, pri čemu je takva struktura u vodenom rastvoru gradila nanoagregate od 130 nm. Sam funkcionalizovani nanonosac hidrazin-fulerenol-folna kiselina ne ispoljava negativne efekte na vijabilnost ćelija, zbog čega se smatra da nije citotoksičan. Doksorubicin se iz agregata oslobađao u kiseloj sredini usled raskidanja veze između nosača i leka. Funkcionalizacijom sa folnom kiselinom favorizivano je ciljano usvajanje od ćelija sa receptorima za folnu kiselinu (HeLa ćelije), što ovaj prolek čini specifičnim, selektivnim antineoplastičnim sistemom sa visokim

kapacitetom za skladištenje leka (oko 23% masenih). Pored toga, ovaj nanoagregat nakon izlaganja svetlosti ispoljava fotodinamički efekat na HeLa ćelijama. Kovalentnim vezivanjem kraćeg lanca etilen-glikola (EG) za fulerenol uticalo se na smanjenje pojave nespecifične interakcije između nanočestice i bioloških molekula usled neutralnih i hidrofilnih osobina etilen-glikola, što omogućava produženo vreme cirkulacije takvog leka. Veliki broj hidrofilnih EG linkera, hidrazinskih i amidnih grupa na površini fulerena utiče na postojanje jakih međumolekulskih interakcija (npr. vodonične veze), što promoviše stvaranje agregata u vodi.

Jedan od glavnih ciljeva u razvoju novih nanoformulacija je poboljšanje vodorastvorljivosti i kompatibilnosti fuleren-doksorubicin konjugata. Doksorubicin se koristi u obliku komercijalne formulacije kao doksorubicin-hidrochlorid i kao takav rastvorljiv je u vodi. Lu i saradnici (Lu i dr., 2009) su objavili sinteze i ispitali antineoplastične osobine tri kovalentna konjugata (Slika 1.13.) doksorubicina sa metanoderivatima fulerena C_{60} , u kojima je rastvorljivost, ili kompatibilnost u vodenom sistemu, bila veća u odnosu na sam fuleren, a antineoplastična aktivnost doksorubicina zadržana, što je dokazano rezultatima *in vitro* eksperimenta na MCF-7 humanim ćelijama kancera dojke.



Slika 1.13. Kovalentni derivati metanofulserena i doksorubicina. Preuzeto uz izmene iz (Lu i dr., 2009)

Poboljšana kompatibilnost u vodenom sistemu je postignuta uvođenjem hidrofilnog etilen-glikola u strukturu konjugata, dok je antineoplastično dejstvo doksorubicina zadržano vezivanjem doksorubicina i metanoderivata fulerena preko amidne veze.

Grupa Chaudhuri i saradnici ističu da mogućnost podešavanja veličine čestica, kao i potencijal fulerenolskih konjugata za povećano deponovanje leka olakšavaju dostavu aktivnih agenasa do tumora uz smanjene gubitke leka u retikuloendotelijalnom sistemu (Chaudhuri i dr., 2009). Pored toga, produženo otpuštanje leka omogućuje dužu izloženost tumorskih ćelija aktivnom agensu. Takođe, prisustvo hidroksilnih grupa utiče na hidrofilnost, što može biti korisno za dostavu kako vodorastvornih, tako i hidrofobnih citotoksičnih agenasa. Multivalentnost fulerenola omogućava kombinatnu terapiju koja bi se postigla tretmanom istom česticom, ili česticom koja se može funkcionalizovati grupama koje bi omogućile ciljanu dostavu leka. Chaudhuri i saradnici su primetili da fulerenoli teže da grade monodisperzne agregate veličine 50-80 nm. Smatraju da ti agregati nastaju udruživanjem čestica međumolekulskim interakcijama tipa vodoničnih veza.

Ono što je posebno istaknuto je da je veličina svih agregata bila manja od 100 nm, što je bitno sa farmakokinetičke tačke gledišta. Naime, pegilovane nanočestice koje su manje od 100 nm se uglavnom dopremaju u tumore putem propustljive tumorske neovaskulature usled povećane permeabilnosti i retencionog efekta (Peer i dr., 2007).

1.5.6. NEDOSTACI I PREDNOSTI NANOFORMULACIJA DOX

Pregled nedostataka i prednosti različitih terapijskih strategija koje za cilj imaju smanjenje toksičnosti i/ili pospešivanje efikasnosti određenog leka su predstavljene u tabeli 1.3.

Tabela 1.3. Prednosti i nedostaci različitih terapijskih strategija primene nanomedicinskih antineoplastičnih terapeutika. Preuzeto uz izmene iz (Wicki, Witzigmann, Balasubramanian, & Huwyler, 2015))

Nanoterapeutska strategija	Prednosti	Nedostaci/Izazovi
Pasivno ciljanje	Veliko kliničko iskustvo Produženo vreme cirkulisanja	Nespecifična dostava lekova Anatomske i fiziološke barijere
Aktivno ciljanje	Povećano preuzimanje od ciljnih ćelija Manje neželjenih efekata Prevazilaženje rezistencije na lek	Izostanak pokušaja masovne proizvodnje Potrebno specifično ciljanje Blokada vezujućih mesta
Sistemi zavisni od stimulusa	Visoka specifičnost	Visoko- sofisticirana

	Povećano oslobađanje leka	proizvodnja	
		Neophodnost ciljanja	specifičnog
Konjugati leka	U kliničkoj su upotrebi Manjih dimenzija	Ograničenog kapaciteta za prenos leka	
Antitelo-lek konjugati	Aktivni targeting	Strategija kuplovanja	
		Neophodnost targetiranja	specifičnog
Polimer-lek konjugati	Usmerena biositribucija leka	Uglavnom pasivni targeting	
Lipidni nanonosai	U kliničkoj su upotrebi Biokompatibilni/biodegradabilni		
Konvencionalni lipozomi	Smanjeni neželjeni efekti leka	Brza eliminacija preko RES	
Pegilovani lipozomi	Pasivni targeting Smanjenje toksičnosti	Nedovoljna efikasnost Zavise od EPR efekta	
Proteinski nanonosai	U kliničkoj su upotrebi	Imunogeni Metabolički nestabilni	
Polimerni nanonosai	Hemijska raznolikost	Potrebno odobrenje za aplikaciju	
		Degradacioni nanonosai	proizvodi
Neorganske nanočestice	Mogu poboljšati vizualizaciju	Nemogućnost dostave leka	
		Degradacioni nanonosai	proizvodi

Potruga za „boljim antraciklinom” se i dalje nastavlja (Weiss, 1992). Do sada su lipozomalne formulacije ostale najbolja poznata alternativa za poboljšanje terapijskog indeksa i spektra aktivnosti doksorubicina u kliničkim postavkama (Gabizon i dr., 2003). Visoki troškovi polaznih materijala, potreba za dugotrajnim, često kompleksnim, procesima čine proizvodnju nanomedicinskih terapeutika skupom. Na primer, proizvodnja komercijalno dostupne formulacije doksorubicina Doxil[®] je mnogo skuplja u odnosu na proizvodnju samog leka (Resnik & Tinkle, 2007). Iako je kardiotoksičnost u slučaju primene ovih formulacija smanjena, ostaje pitanje da li dostava leka može biti produktivnija, a da pri tome ne dolazi do promene strukture leka, te promene aktivnosti leka u malignim ćelijama. S obzirom na dug put od sinteze novog leka do odobrenja njegove primene, stvaranje novih lekova crpi mnoge resurse, od kojih je za pacijente možda najbitnije vreme.

Panchuk i saradnici (2015) su ispitivali novosintetisani i okarakterisani stabilni nekovalentni C₆₀-DOX kompleks u vodenom rastvoru (Prylutsky i dr., 2015) u *in vitro* i *in vivo* studiji (Panchuk i dr., 2015), gde je dokazano da nekovalentna interakcija doksorubicina sa fulerenom dovodi do značajnog povećanja toksičnosti leka prema različitim humanim tumorskim ćelijskim linijama, uključujući i one kod kojih se javljaju različiti mehanizmi rezistencije na lek. Tretman miševa sa karcinomom pluća kompleksom C₆₀-DOX je rezultovao značajnom inhibicijom rasta tumora (2,5x), kao i produženjem dužine života tretiranih životinja u odnosu na tretman samim doksorubicinom ili doksorubicinom primenjenim nakon predtretmana fulerenom. Pored toga, *in vitro* (Panchuk i dr., 2015; Skamrova i dr., 2014) i *in vivo* (Prylutska i dr., 2014; Skamrova i dr., 2014) studije su potvrdile da imobilizacija doksorubicina na fuleren smanjuje toksični efekat ovog leka kod zdravih ćelija, dok je akumulacija u tumorskim ćelijama povećana. Ovi rezultati su ohrabrujući po pitanju razvoja novih hemoterapeutika za kliničku primenu. Nedostaci ovog kompleksa bi se mogli ogledati u njihovoj veličini. Naime, autori (Panchuk i dr., 2015; Prylutsky i dr., 2015) u uzorku nekovalentnog C₆₀-DOX kompleksa navode veličinu čestica od oko 600 nm, čime se dovodi u pitanje efikasan unos istog u ćeliju (Ai i dr., 2011).

Pored brojnih neželjenih sporednih efekata, jedan od glavnih problema u terapiji malignih neoplazmi je što tokom primena većine antineoplastika već u toku prve godine terapije dolazi do razvijanja rezistencije na lek, koja može biti rezultat nekoliko različitih mehanizama kao što su: overekspresija ABC-transportnih proteina (P-glikoprotein, MRP-1, bcrp), mutacija gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa i apoptozu i drugi (Gottesman, Fojo, & Bates, 2002).

Dobar biološki sinergizam je primećen pri istovremenom unosa nanonosača i doksorubicina. Biološki sinergizam različitih aromatičnih molekula (uključujući i DOX) i npr. nanonosača, koji potiče od nekovalentnih interakcija, poznat je u literaturi (Maxim P. Evstigneev, 2014; Traganos, Kapuscinski, & Darzynkiewicz, 1991) i ukazuje na to da načini biološke interakcije ispitivanog leka u većoj meri zavise od fizičko-hemijskih parametara udruženih molekula, nego hemijskih osobina (antioksidativna/prooksidativna uloga) svakog pojedinačnog molekula. Ova činjenica postavlja jedan široki poligon za ispitivanje fulerenola kao nanonosača različitih, i ne isključivo aromatičnih, lekova. Sposobnost stvaranja uređenih nanočestičnih struktura koje bi sadržale molekule fulerena sa umetnutim aromatičnim molekulima između sebe je poznata u hemiji fulerena (Boyd & Reed, 2005). I zasniva se na pretpostavci da bi aromatični molekuli između fulerena mogli poslužiti kao

„lepak” držeći ih na okupu zahvaljujući van der Waalsovima interakcijama smanjujući elektrostatička odbijanja u rastvoru. Prednost jednog ovakvog sistema je u tome što je količina doksorubicina koja se dostavlja na ovaj način „zarobljena” u klasteru fulerenola značajno veća.

Povećana senzitivnost malignih ćelija na nanokompozit se može objasniti povećanim unosom leka u citosol tumorskih ćelija posredstvom nanonosaa, usled čega je P-glikoprotein, inače odgovoran za izbacivanje leka iz ćelije, onemogućen da „ispumpa” svu količinu doksorubicina iz tumorskih ćelija (Panchuk i dr., 2015). Pored toga, fluorescentnom mikroskopijom MCF-7humanih malignih ćelija dojke pokazano je da je unos doksorubicina u jedro značajno veći u slučaju tretmana kompleksom, u odnosu na slučaj kada se primenjuje sam lek (Panchuk i dr., 2015).

ii CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ove doktorske disertacije je sinteza, fizičko-hemijska karakterizacija, kao i testiranje antikancerogene aktivnosti novog nanokompozita FNP/DOX. Očekuje se da novosintetisani nanokompozit pokaže bolju biološku aktivnost u odnosu na komercijalni antineoplastični lek čija je aktivna komponenta DOX, uz istovremeno smanjenje toksičnosti na zdrave ćelije. Primarni efekat se očekuje na smanjenju kardiotoksičnosti, koja je jedan od neželjenih sporednih efekata i glavni limitirajući faktor primene leka DOX.

Taksativno, ciljevi istraživanja se mogu predstaviti kroz sledeće stavke:

1. sinteza stabilnog nanokompozita komercijalnog antineoplastika doksorubicina sa nanonosaćem fulerenolom
2. fizičko-hemijska karakterizacija i ispitivanje stabilnosti novog nanokompozita fulerenol/doksorubicin
3. upoređivanje citotoksične aktivnosti komercijalnog antineoplastika doksorubicina i novog nanokompozita fulerenol/doksorubicin *in vitro* na 4 maligne humane ćelijske linije i jednoj zdravoj humanoj ćelijskoj liniji
4. ispitivanje efekta fulerenola, doksorubicina i nanokompozita fulerenol/doksorubicin na *in vivo* modelu zebrića.

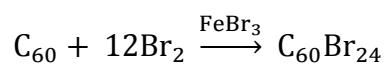
2. MATERIJAL I METODE

2.1. MATERIJAL

2.1.1. SINTEZA FULERENOLA C₆₀(OH)₂₄

Polihidroksilni vodorastvorni derivat fulerena C₆₀(OH)₂₄ je sintetisan potpunom supstitucijom atoma broma u molekulu C₆₀Br₂₄ hidroksilnim grupama sintezom koja se može podeliti u dva koraka: sinteza polibromnog derivata C₆₀Br₂₄ i dobijanje hidroksilnog derivata supstitucijom u alkalnoj sredini uz završnu obradu reakcionog proizvoda.

C₆₀Br₂₄ je dobijen katalitičkim bromovanjem fulerena C₆₀ (99,8 %, MER) sa elementarnim bromom u prisustvu FeBr₃ kao katalizatora kako je opisano i okarakterisano u radu Đorđević i saradnika (Djordjević i dr., 1998). Katalizator FeBr₃ je sintetisan dodatkom elementarnog broma na opiljke gvožđa uz mešanje na sobnoj temperaturi tokom 1h. Nakon sinteze katalizatora, fuleren C₆₀ je dodat i reakciona smeša je mešana na magnetnoj mešalici naredna 3 h na sobnoj temperaturi. Višak broma je uklonjen otparavanjem na sobnoj temperaturi tokom noći. Proizvod je ispiran rastvorom HCl (pH = 1) do potpunog uklanjanja gvožđa. Kiseo rastvor je zatim ispiran demineralizovanom vodom do dobijanja pH vrednosti rastvora pH = 6,5.



Prah simetričnog polibromnog derivata C₆₀Br₂₄ (50 mg) je tretiran rastvorom NaOH (pH = 10, 5 cm³), nakon čega je reakciona smeša mešana na magnetnoj mešalici na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 sata, sve do nastajanja homogene smeše. Nakon završetka reakcije, rastvarač je uparen na 40 °C, a smeša pet puta isprana etanolom (10 cm³) (Mirkov i dr., 2004). U vodeni rastvor fulerenola (20 cm³) sa rezidualnim količinama NaOH, NaBr i FeBr₃ je dodato 0,3 g jonoizmenjivačke kolone (20 g DOWEX MB50 QC121815 R1). Rastvor je ostavljen da stoji 24h uz povremeno mešanje na magnetnoj mešalici.

2.1.2. PRIPREMA RASTVORA DOX

U bočicu sa prahom komercijalnog leka (Adriblastina[®] RD Pfizer: doksorubicin – hidrohlorid 10 mg, laktoza 50 mg, metil-p-hidroksibenzoat 1 mg) je ubrizgano 5 cm³ vode za injekcije, pri čemu je dobijena koncentracija DOX c = 2 mg/cm³. Alikvot V = 2 cm³ je zatim razblažen sa 2 cm³ bidestilovane vode, pri čemu je dobijena koncentracija DOX 1 mg/cm³. 4 cm³ takvog rastvora je uzeto za pripremu uzorka nanokompozita FNP/DOX.

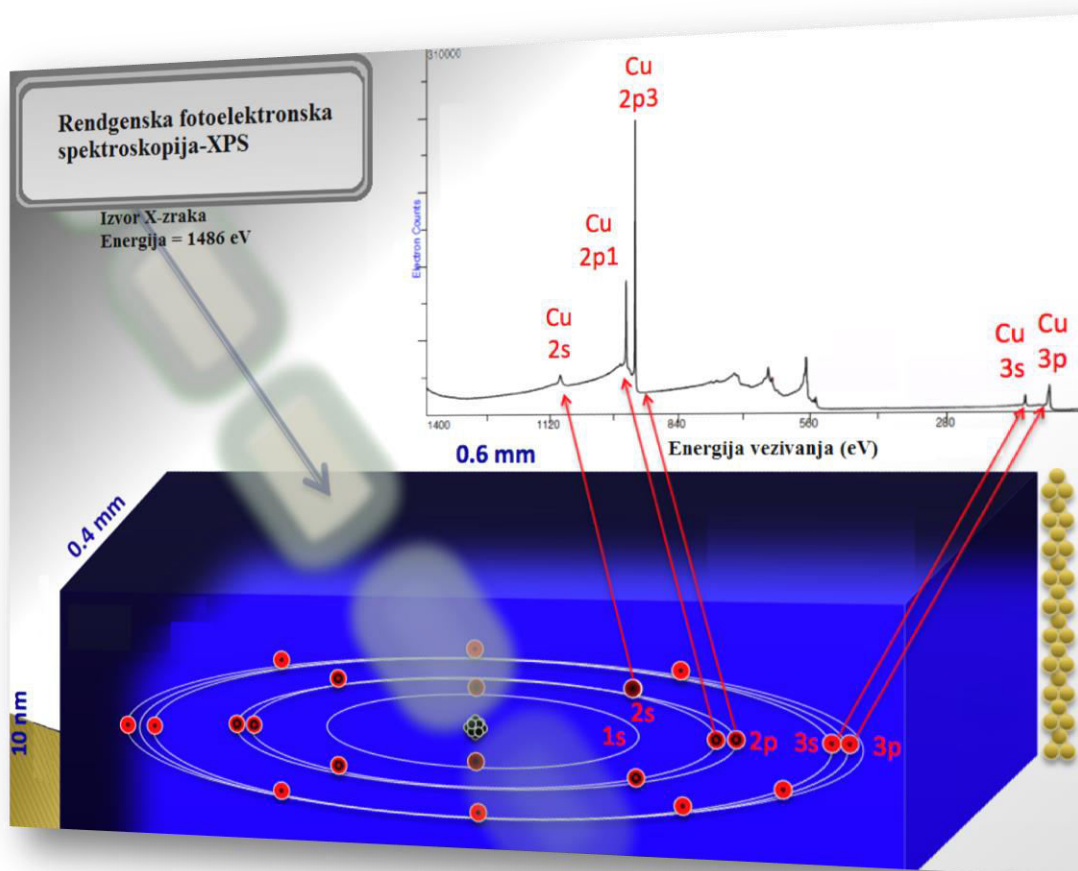
2.1.3. PRIPREMA FNP/DOX NANOKOMPOZITA

Prah fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ je rastvoren u prokuvanoj demineralizovanoj vodi, soniciran (Bandelin Sonorex RK100H, Germany, 80/320 W, 35 kHz) u trajanju od 20 minuta pri ambijentalnim uslovima, a zatim propušten kroz filter veličine pora 450 nm (Rotilabo® Spritzenefilter, PVDF). $0,8\text{ cm}^3$ rastvora fulerenola koncentracije $0,125\text{ mg/cm}^3$ (pH 6,5) je dodato rastvoru doksorubicina (4 cm^3 , 1 mg/cm^3), nakon čega je smeša sonicirana u trajanju od 3 minuta, a zatim čuvana u mraku na sobnoj temperaturi tokom 48h, posle čega je fizičko-hemijski okarakterisana i korišćena za biološka istraživanja.

2.2. METODE

2.2.1. RENDGENSKA FOTOELEKTRONSKA SPEKTROSKOPIJA

Rendgenska fotoelektronska spektroskopija (*engl.* X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS) poznata i pod nazivom elektronska spektroskopija za hemijsku analizu (ESCA), je analitička tehnika koja se primenjuje za dobijanje podataka o kvantitativnom atomskom sastavu i hemijskim osobinama elemenata ispitivanog materijala. Ovom metodom se mogu analizirati kako izolatori, tako i provodnici.



Slika 2.1. Šematski prikaz rada XPS uređaja (B. Vincent Crist, Ohio, USA)

Tokom XPS eksperimenta, uzorak se ozračuje x-zracima koji interreaguju sa elektronima atoma materijala izazivajući emisiju elektrona, koji se nazivaju fotoelektroni (slika 2.1.). Pod dejstvom upadnog snopa x-zraka, na površini ispitivanog uzorka dolazi do Ožeovog (Auger) procesa u kome učestvuju tri elektrona. Energije elektrona (jednačina 2.1.) su karakteristične za svaki hemijski element u uzorku.

$$E_{veze} = E_{fotona} - (E_k + \varphi) \quad (2.1.)$$

gde je:

E_{veze} = energija vezivanja elektrona

E_{fotona} = energija fotona rendgenskog zračenja

E_k = kinetička energija elektrona merena instrumentom

φ = radna funkcija spektrometra

Emitovani fotoelektroni se pomoću sistema ekstrakcionih sočiva fokusiraju i upućuju na ulazni otvor analizatora. Da bi se odredila raspodela elektrona po energijama, elektroni se posle prolaska i fokusiranja u ekstrakcionim sočivima, izlažu zakočnom polju koje tokom eksperimenta linearno raste od nule do maksimalne energije jednake ili veće energiji kvantata snopa X- zračenja. Tako svi elektroni iz očekivanog intervala energija u jednom trenutku dobijaju onu energiju koja im omogućuje da prođu kroz analizator i registruju se na izlaznom detektoru u vidu jačine struje detektora. Primena XPS omogućava kvalitativnu analizu na osnovu položaja maksimuma intenziteta fotoelektrona. S obzirom na to da je energija veze valentnih elektrona poznata karakteristika elemenata, analizom fotoelektronske emisije, ili prosto poređenjem spektra sa tabličnim spektrima moguće je identifikovati element.

Broj fotoelektrona u jedinici vremena, I , koji je nosilac informacija o ispitivanom elementu se određuje primenom izraza:

$$I = Nf\sigma\theta P\lambda A\varepsilon \quad (2.2.)$$

gde je:

N = broj atoma datog elementa u uzorku

f = fluks fotona upadnih X-zraka

σ = fotoelektricni poprečni presek atomske orbitale od interesa

θ = faktor efikasnosti analizatora detektora (razlika uglova upadnih i emitovanih zraka)

P = verovatnoća formiranja fotoelektrona u fotoelektronskom procesu

λ = slobodni put fotoelektrona u uzorku

A = površina uzorka sa kojih su fotoelektroni detektovani

ε = efikasnost detekcije emitovanih fotoelektrona

Mada je većina navedenih članova složena funkcija, kako ispitivanih materijala tako i karakteristika analizatora, njihov proizvod se može iskazati kao konstantna vrednost koja se naziva atomskim faktorom osetljivosti S :

$$I = NS \quad (2.3.)$$

odakle je broj atoma N (u 1 cm^3 ispitivanog uzorka) proporcionalan intenzitetu fotoelektrona, I :

$$N = I/S \quad (2.4.)$$

Ukoliko se u 1 cm^3 uzorka nalaze dve različite vrste atoma a i b , njihov relativni odnos je srazmeran odnosu intenziteta njihovih signala I_a i I_b :

$$N_a/N_b = (I_a/S_a)/(I_b/S_b) \quad (2.5.)$$

odakle je molski udeo, x , pojedinog konstituenta ispitivanog materijala, pri čemu je $S_{a/b}$ određen na bazi površine najizraženijih energetskih linija čistih materijala:

$$x_a = (I_a/S_a)/(I_a/S_a + I_b/S_b) \quad (2.6.)$$

Ako se ispitivani element nađe u sastavu nekog hemijskog jedinjenja, njegov XPS spektar se menja zbog hemijskog pomaka. Do hemijskog pomaka dolazi zbog izmena elektronske konfiguracije usled formiranja hemijskog jedinjenja/neke interakcije sa drugim atomima, zbog čega se menja energija orbitale. Stoga je XPS jedna od najboljih metoda ispitivanja strukture elektronskog omotača i izmena koje se dešavaju prilikom formiranja hemijskih jedinjenja. Tipičan XPS spektar predstavlja se kao dijagram broja detektovanih elektrona (y -osa) u odnosu na energiju vezivanja registrovanih elektrona (x -osa). Svaki element proizvodi karakterističan skup XPS pikova kojima odgovaraju karakteristične vrednosti energija vezivanja, koje direktno identifikuju svaki element koji postoji u/na površini materijala koji se analizira. Ovi karakteristični pikovi odgovaraju elektronskoj konfiguraciji elektrona unutar atoma ($1s$, $2s$, $2p$, $3s$, itd.). Broj registrovanih elektrona u svakom od karakterističnih pikova

direktno je povezan sa količinom elementa u oblasti (zapremeni), koja je ozračena. Da bi se dobile atomske vrednosti izražene u procentima, svaki izvorni XPS signal mora biti ispravljen, tako što se intenzitet datog signala (broj detektovanih elektrona) deli sa faktorom „relativne osetljivosti” i normalizuje u odnosu na sve elemente koji su registrovani. Prebrojavanje broja elektrona kod XPS za svaku vrednost kinetičke energije, uz minimalnu grešku, mora biti izvedeno u uslovima ultra-visokog vakuuma, jer je detektor za brojanje elektrona u XPS instrumentu udaljen za oko 1m od materijala izloženog rendgenskim zracima. XPS otkriva samo one elektrone koji su „izbegli” vakuum instrumenta. Foto-emitovani elektroni koji su „izbegli” vakuum instrumenta su elektroni koje potiču iz dubine prvih 10-12 nm materijala. Svi dublje foto-emitovani elektroni bivaju ponovo zahvaćeni ili zarobljeni u različitim pobuđenim stanjima unutar datog materijala.

Ova nedestruktivna tehnika omogućuje definisanje hemije površine bilo kog materijala. XPS detektuje sve elemente sa rednim brojem većim od 3 (litijum). Ova metoda ne može da se koristi za detekciju vodonika ($Z = 1$) ili helijuma ($Z = 2$), jer je prečnik njihovih orbitala toliko mali, da smanjuje verovatnoću interakcije rendgenskog zračenja sa elektronima koji se nalaze u njihovim orbitalama skoro na nulu. Granice detekcije za većinu elemenata su reda ppm, pri čemu, da bi se postigao takav nivo detekcije neophodno je ispuniti određene posebne uslove, kao npr. da je dati element koncentrisan na gornjoj površini ili da je na raspolaganju tokom veoma dugog vremena prikupljanja signala (prikupljanje signala tokom cele noći). XPS se rutinski koristi za analizu neorganskih jedinjenja, metalnih legura, poluprovodnika, polimera, elemenata, katalizatora, keramika, boja, zuba, kosti, medicinskih implanata, bio-materijala, viskoznih ulja, lepkova, jonski modifikovanih materijala itd.

Ograničenja koja se javljaju kod primene XPS su granica određivanja, koja može dosegnuti ppm samo u specijalnim eksperimentalnim uslovima, kao i uslovi vakuuma u kojima se analiza uzorka mora izvršiti, što predstavlja problem kod analize bioloških uzoraka. Za sve druge vrste uzoraka, XPS je efikasna i nedestruktivna metoda koja će dati hemijske podatke o površini bilo kog ispitivanog materijala (*Handbook Of Analytical Methods For Materials*, 2010).

U ovom istraživanju, uzorak u formi tablete debljine oko 1 mm i prečnika oko 10 mm se nekoliko dana pre stavljanja uzorka u komoru nalazio u eksikatoru, nakon čega je prenet u uvodnu komoru u trajanju od 48h pri pritisku od oko $1 \cdot 10^{-7}$ mbar.

Uzorci fulenerola (fulerenol kompanije Merck – fulerenol M i fulerenol sintetisan za potrebe ovog doktorata – fulerenol NS) su analizirani metodom rendgenske fotoelektronske

spektroskopije na UHV (ultra-visoko vakuumskom) sistemu SPECS, koji čine PHOIBOS 100 spektrometar sa poziciono osetljivim detektorom (kombinacija dva channelplate-a, fosfornog ekrana i CCD kamere), monohromatski izvor rendgenskog zračenja sa Al i Ag anodama i izvor sporih elektrona za kompenzaciju naelektrisanja u slučaju analize neprovodnih uzoraka. Spektri su snimani pomoću monohromatske Al K α linije energije fotona 1486,74 eV. Pregledni XPS spektri su snimani u režimu FAT 40 (energija prolaza elektrona u analizatoru je 40 eV, energijska rezolucija oko 1 eV) sa korakom od 0,5 eV i vremenom akvizicije od 0,2 s po kanalu. Detaljni spektri fotoelektronskih linija su snimani u režimu FAT 20 (energijska rezolucija od oko 0,5 eV), sa korakom od 0,1 eV i vremenom akvizicije od 2 s po kanalu. Kvantitativni sastav površine uzoraka određivan je na osnovu intenziteta karakterističnih fotoelektronskih linija detektovanih elemenata (definisanih površinama ispod linija posle oduzimanja pozadine), primenom odgovarajućih faktora osetljivosti koje je dostavio proizvođač XPS sistema. Uzorci fulerenola u formi praha su bili utisnuti u indijum, kako bi se obezbedio električni kontakt, kao i mehaničko fiksiranje.

2.2.2. DENZITOMETRIJA. VISKOZNOST. ELEKTRIČNA PROVODLJIVOST

U cilju dobijanja uvida o međumolekulskim interakcijama između vode i fulerenolskih nanočestica primenom eksperimentalnog pristupa ispitan je proces građenja nanoaglomerata na različitim temperaturama. Gustina, električna provodljivost i dinamička viskoznost vodenih rastvora FNP su merene eksperimentalno, a na osnovu rezultata ovih merenja izračunate su termodinamičke veličine kao što su prividna molarna zapremina i parcijalna molarna zapremina vode i fulerenola.

Struktuiranje i samoudruživanje FNP u vodenim rastvorima je od velikog značaja, ne samo zbog toga što su brojne formulacije lekova u obliku vodenih rastvora, već i zbog toga što nakon aplikacije u vaskularni sistem, u zavisnosti od osobina čestica, one dalje bivaju metabolisane na različite načine (Longmire, Choyke, & Kobayashi, 2008).

Denzitometrija

Za potrebe određivanja gustine primenjivan je Rudolph Research Analytical DDM 2911 denzitometar sa tačnošću i preciznošću $\pm 0.00001 \text{ g/cm}^3$. Standardna nesigurnost merenja je manja od $8,2 \cdot 10^{-4} \text{ g/cm}^3$. Određivana je gustina rastvora FNP molaliteta do 0,01311 mol/kg u temperaturnom opsegu (293,15-313,15) K. Instrument je termostatiran unutar opsega $\pm 0,01$ K, i rezultati merenja automatski korigovani. Kalibracija instrumenta je vršena pre svake serije merenja na atmosferskom pritisku i vazduhu sa bidestilovanom vodom visoke čistoće u temperaturnom opsegu (293,15-313,15) K. Svaka vrednost eksperimentalno određene gustine je srednja vrednost tri merenja na određenoj temperaturi. Rezultati ponovljenih merenja ukazuju na ponovljivost od 0,01%.

Viskoznost

Merenja viskoznosti binarnih smeša fulerenol-voda su izvršena Ubbelohde viskozimetrom merenjem protoka u uzorcima opsega molaliteta fulerenola do 0,03724 mol/kg.

Viskozimetar je kalibrisan rastvorom KCl (NIST standard) koncentracije 0,1000 mol/dm³ i bidestilovanom dejonizovanom vodom u temperaturnom opsegu (293,15-313,15) K.

Merenja su izvršena tako što je viskozimetar napunjen ispitivanim rastvorom i postavljen uspravno u stakleni termostat ($\pm 0,01$ K) sa standardnom nesigurnošću kontrolisanja temperature $\pm 0,02$ K. Nakon uspostavljanja toplotne ravnoteže praćen je protok tečnosti pomoću digitalne štoperice tačnosti $\pm 0,01$ s. Rezultati predstavljaju srednju vrednost deset merenja viskoznosti. Relativna standardna nesigurnost Ubbelohde viskozimetrom je manja od 1%.

Električna provodljivost

Merenja električne provodljivosti vodenih rastvora fulerenola molaliteta (0,00098-0,04894) mol/kg u temperaturnom opsegu (293,15-313,15) K su izvedena u Pyrex ćeliji sa platinskim elektrodama na konduktometru Jenco 3107 primenom jednosmerne struje. Relativna standardna nesigurnost ove metode je niža od 1,5 %. Eksperimentalna ćelija je kalibrisana rastvorom KCl koncentracije 0,1000 mol/dm³ prethodno pomenutom eksperimentalnom procedurom. Konduktometrijska ćelija zapremine 14 cm³ je prethodno osušena u atmosferi azota i termostatirana u trajanju od 20 minuta sa tačnošću $\pm 0,01$ K. U intervalima od 5s urađeno je deset merenja. Svi predstavljeni rezultati su srednja vrednost merenja.

2.2.3. NUKLEARNA MAGNETNA REZONANCA (NMR)

Nuklearnom magnetnom rezonancom (^1H NMR) na uređaju Varian Unity Inova 300 MHz, ID/PFG su dobijeni NMR spektri ispitivanih uzoraka. Hemijski pomeraži izražavani su u ppm (*engl.* parts-per-million) koristeći tetrametilsilan kao standard. Ovom metodom su ispitani efekti različitog molarnog odnosa FNP i DOX u nanokompozitu na hemijski pomeraž aromatičnih protona i metil grupe doksorubicina. Uzorak molarnog odnosa (nFNP : nDOX = 1 : 13) kod kojeg je praćen pomeraž metil grupe je praćen sat vremena nakon pripreme, kao i mesec dana nakon pripreme, dok je praćenje pomeraža aromatičnih protona doksorubicina posmatrano u koncentrovanijem i razblaženijem uzorku.

2.2.4. TEČNA HROMATOGRAFIJA VISOKE REZOLUCIJE UPLC/MS/MS; TOF MS ES+

UPLC/MS/MS predstavlja tečnu hromatografiju visoke rezolucije sa tandem masenim detektorom. Ova tehnika visoke senzitivnosti i selektivnosti kombinuje fizičko odvajanje primenom tečne hromatografije i masenu analizu uzoraka primenom masene spektrometrije. Uspešno se može primenjivati za detekciju i potencijalnu identifikaciju komponenata u kompleksnoj smeši. TOF MS ESI+ (*engl.* Time-of-Flight Mass Spektrometry Electrospray Ionization/pozitivni mod) predstavlja vrstu masene spektrometrije gde dolazi do jonizacije uzorka do pozitivnih jona propuštanjem rastvora uzorka kroz usku zagrejanu kapilaru (protok 1-10 dm³/min) u električno polje, nakon čega fine kapljice i gde joni iz uzorka različitih masa bivaju ubrzani do iste kinetičke energije. Ono što se meri je vreme potrebno svakom od jona da stigne do detektora na poznatoj udaljenosti. Ovaj podatak se predstavlja kao odnos mase i naelektrisanja, odnosno m/z . Osobnost ESI koja je iskorišćena je mogućnost da se ovom jonizacionom tehnikom uzorak analizira direktno u vodenom rastvoru u uslovima sličnim onima u biološkim fluidima.

Konfiguracija Waters uređaja primenjenog za analizu uzoraka za potrebe doktorata se sastojala iz: pumpe Acquity BSM (binary solvent manager), autosemplera Acquity SM (sample manager), detektora Acquity TUV (tunable Ultra violet), masenog detektora Q-Tof Micro (Quadrupole - Time of flight), kolone CSH C18 (1,7 μm , 2,1 mm x 50 mm).

Temperatura kolone je bila 40 °C, kao rastvarač je korišćena smeša voda:acetonitril (90:10, 40:60, 20:80). TOF MS parametri: Polarity ES+, Mass range: 50 to 1000/1500, Scan duration 0,20 s, Interscan delay 0,10 s, TOF Flight Tube 5630,0 V; TDC Start 700,0000 mV, TDC Stop 200,0000 mV. TUV parametri: λ 215 nm i 476 nm.

Eksperiment kvantifikacije DOX u nanokompozitu FNP/DOX u različitim vremenskim intervalima (0h/24h/48h):

Kalibracione krive su dobijene injektovanjem uzorka doksorubicina (u obliku komercijalnog leka Adriablastina[®]) koncentracije 1 mg/cm^3 varijabilnih zapremina: 0,5 μl ; 1 μl ; 1,5 μl ; 2 μl i 2,5 μl , dok je injektovana zapremina uzorka nanokompozita FNP/DOX bila 1 μl .

2.2.5. RAMANSKA SPEKTROSKOPIJA

Ramanska spektroskopija se zasniva na rasejanju zračenja na uzorku. To je neelastično rasejanje koje potiče od interakcije upadnog monohromatskog zračenja (najčešće UV/VIS) sa električnim dipolom molekula. Pri neelastičnom sudaru dolazi do razmene unutrašnje energije molekula i fotona upadnog zračenja, te foton gubi ili dobija energiju u zavisnosti od toga da li je molekul pre sudara bio u osnovnom ili pobuđenom stanju. Stoga, ramanski rasejano zračenje može biti niže (Stoksovo ramansko rasejanje) ili više frekvencije (anti-Stoksovo ramansko rasejanje) u odnosu na upadno zračenje. Ova razlika se naziva ramanski pomeraj i izražava se u cm^{-1} . Nezavisan je od frekvencije upadnog zračenja i karakteristika je molekulske vrste.

Ova tehnika daje informacije o sastavu i vrsti hemijskih interakcija u materijalu koji se ispituje. Na osnovu specifičnog položaja traka funkcionalnih grupa kod organskih jedinjenja i traka anjona kod neorganskih jedinjenja moguća je kvalitativna karakterizacija uzorka.

Prednosti ove spektroskopije su: nedestruktivnost, minimalna priprema uzorka i mogućnost ispitivanja uzorka u sva tri osnovna agregatna stanja. Posebnu primenu nalazi u ispitivanju neorganskih uzoraka niskih vibracionih frekvencija koji su van mernih opsega infracrvene spektroskopije. Jedna od glavnih prednosti ove metode je što se može primenjivati na biološke uzorke u vodenom rastvoru zato što su molekuli vode slabi ramanski „rasejači” (Lin, Lin, Wang, & Sridhar, 2014a). Nedostatak ove metode se ogleda u velikoj fluorescenciji, koja ili onemogućava ili otežava tumačenje dobijenih spektara.

Ramanski spektri na kojima je predstavljena zavisnost fulerenola od snage lasera, kao i od koncentracije fulerenola su snimljeni Horiba XploRA Ramanskim spektrometrom sa x10 objektivom i ekscitacionom talasnom dužinom 523 nm (Hajdelberg).

Za potrebe ispitivanja interakcija između fulerenola i doksorubicina u nanokompozitu FNP/DOX pripremljeni su rastvori nanokompozita različitog odnosa fulerenola i doksorubicina, gde je koncentracija leka zadržana kao konstantna i bila je $0,01383 \text{ mg/cm}^3$, dok su koncentracije fulerenola bile $3,47 \cdot 10^{-5} \text{ mg/cm}^3$ (FNP/DOX1), $3,47 \cdot 10^{-4} \text{ mg/cm}^3$

(FNP/DOX2), $3,47 \cdot 10^{-3}$ mg/cm³ (FNP/DOX3). Spektri su snimani na uređaju Thermo Scientific DXR Raman Microscope, koji je opremljen laserom talasne dužine $\lambda=780$ nm. Ozračivanje uzorka, koji su pre merenja čuvani u mraku na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C) tokom 48h, je vršeno 5 puta sa trajanjem od 30s. Snop laserskog zračenja je na uzorak bio fokusiran objektivom sa uvećanjem od 10 puta. Blenda uređaja je podešena na kružni otvor (pinhole) veličine 50 μ m. Kao detektorski sistem korišćena je CCD kamera zajedno sa difrakcionom rešetkom koja ima 400 zarez/mm. Primenjena snaga zračenja lasera je 10 mW. Pripremljeni rastvori su nakon 48h stajanja u mraku na sobnoj temperaturi snimljeni na zlatnoj pločici odmah nakon nanošenja uzorka automatskom pipetom, kao i 3h i 24h nakon sušenja na pločici.

2.2.6. UV SPEKTROSKOPIJA

U cilju proučavanja mogućih nekovalentnih interakcija između doksorubicina i fulerenola izvršeno je UV/VIS spektroskopsko ispitivanje vodenih rastvora sa različitim odnosima ove dve komponente. U svim ispitivanim rastvorima koncentracija doksorubicina je bila konstantna i iznosila je 0,01383 mg/cm³, dok su koncentracije fulerenola rasle redosledom $3,47 \cdot 10^{-5}$ mg/cm³, $3,47 \cdot 10^{-4}$ mg/cm³, $3,47 \cdot 10^{-3}$ mg/cm³. Snimanja UV/VIS spektara urađena su na aparatu Spectrophotometer UV-1800 u kvarcnim kivetama dužine 1 cm i opsegu talasnih dužina 200-600 nm pri rezoluciji od 0,2 nm. Kao uzorci „background” pozadine snimani su rastvori fulerenola onih koncentracija koje odgovaraju koncentracijama fulerenola u ispitanim uzorcima. Spektri su obrađeni u softveru Origin 8.0.

2.2.7. SPEKTROFLUOROMETRIJA

Spektrofluorometrija je primenjena sa ciljem da se prouče interakcije između doksorubicina i fulerenola. U tu svrhu ispitani su vodeni rastvori nanokompozita FNP/DOX konstantne koncentracije doksorubicina ($0,01383$ mg/cm³) i promenljive koncentracije FNP ($3,47 \cdot 10^{-5}$ mg/cm³, $3,47 \cdot 10^{-4}$ mg/cm³, $3,47 \cdot 10^{-3}$ mg/cm³). Fluorescentni spektri uzoraka su snimljeni na fluorescentnom spektrofotometru Cary Eclipse (Agilent) u standardnim fluorimetarskim ćelijama sa poklopcem AMTAST, sa talasnom dužinom ekscitacije 470 nm i emisije 450 nm u opsegu 470-800 nm.

2.2.8. DINAMIČKO RASEJANJE SVETLOSTI (DLS)

Dinamičko rasejanje svetlosti (*engl.* Dynamic Light Scattering, DLS) je tehnika koja se koristi za merenje veličine čestica manjih od 1 mikrometra. Primena ove tehnike omogućava ispitivanje stabilnosti, agregacije, kao i formiranje kompleksa. Uobičajena DLS tehnika se odnosi na merenje veličine čestica suspendovanih u tečnosti, izgled uređaja, kao i šematski prikaz njegovog rada je predstavljen na slici 2.2. DLS se zasniva na praćenju vremenske fluktuacije intenziteta rasejane svetlosti pod određenim uglom sa čestica koje se braunovski kreću i čija je veličina značajno manja u odnosu na talasnu dužinu lasera. Veličina čestica, odnosno hidrodinamički dijametar, se izvodi iz podataka vremenske fluktuacije rasejane svetlosti primenom Stoks-Ajnštajnovne formule predstavljene jednačinom 2.7.:

$$d(H) = kT / 3\pi\eta D \quad (2.7.)$$

gde je:

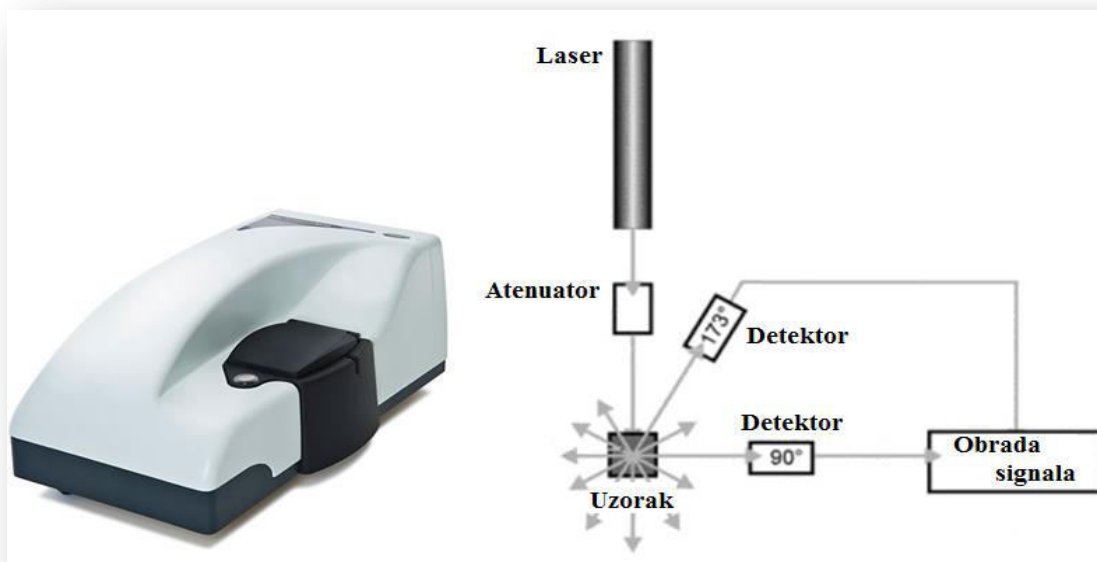
$d(H)$ = hidrodinamički dijametar (nm)

D = translacioni difuzioni koeficijent ($\text{cm}^2 \cdot \text{sec}^{-1}$)

k = Bolcmanova konstanta ($1,38054 \cdot 10^{-23}$ J/K)

T = apsolutna temperatura (K)

η = viskoznost (Pa·sec)



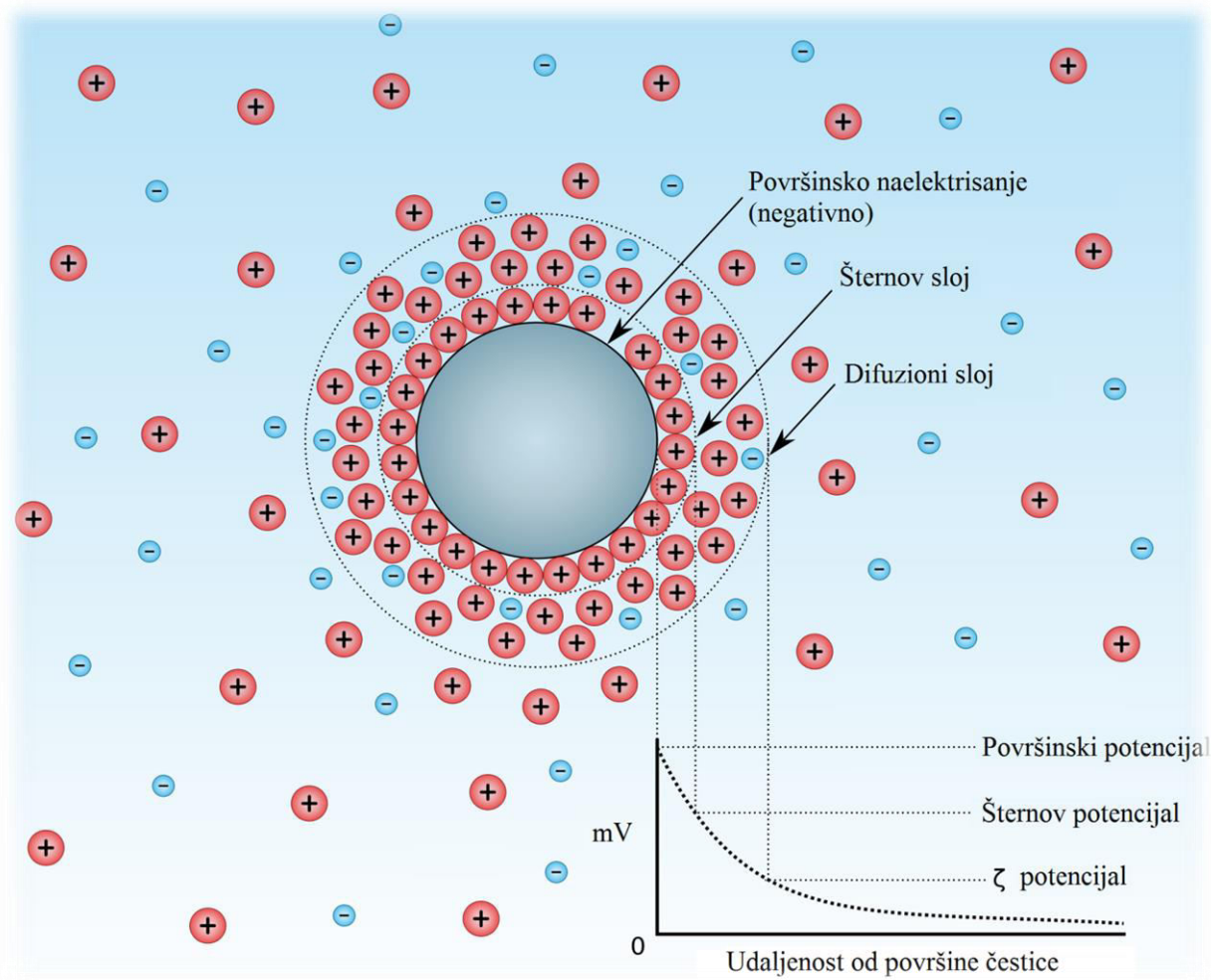
Slika 2.2. Izgled (levo) i šematski prikaz rada (desno) uređaja Malvern Zetasizer Nano ZS (<https://www.malvern.com/en/products/product-range/zetasizer-range/zetasizer-nano-range/zetasizer-nano-zs>, <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3662>)

Prednosti ove metode su: neinvazivnost, brzo dobijanje rezultata i kratko trajanje merenja, preciznost pri određivanju veličine čestica monodisperznog uzorka, merenje u tečnim uzorcima velikog raspona koncentracija.

Sa druge strane, prisustvo čestica prašine koje interferiraju u rasejanju svetlosti i relativno mali opseg veličine čestica koje meri (1 nm – 3 μ m) su neke od slabosti ove metode.

Zeta potencijal čestica

Naelektrisanje čestica je od velikog značaja zbog toga što determiniše mnoge osobine rastvora. Pojava naelektrisanja na površini čestice utiče na distribuciju jona u okolnom međučestičnom prostoru, što rezultuje povećanom koncentracijom jona suprotnog naelektrisanja u blizini površine čestice.



Slika 2.3. Ilustrativni prikaz dvojnog električnog sloja negativno naelektrisane čestice

Zato oko svake čestice postoji dvojni električni sloj kako je ilustrativno prikazano na slici 2.3.: unutrašnji (Šternov sloj), u kojem su joni snažno vezani, i spoljašnji slabije asocirani difuzioni sloj. Unutar difuzionog sloja postoji zamišljena granica unutar koje joni i čestice formiraju stabilnu celinu. Kada se čestica kreće, joni koji se nalaze unutar te granice se pokreću zajedno sa njima. Joni van te granice ostaju dispergovani u rastvaraču. Potencijal koji se javlja na ovoj granici (površina hidrodinamičkog omotača) naziva se zeta potencijal. Važna posledica postojanja električnog naelektrisanja na površini čestica jeste njihova interakcija sa primenjenim električnim poljem.

Energetska barijera koja postoji između čestica zahvaljujući odbojnim silama onemogućava da se one približe jedna drugoj i adheriraju međusobno. Ukoliko su repulzivne sile dovoljno jake čestice će se međusobno odbijati, međutim ukoliko su slabe, čestice će se grupisati i tako graditi rastuće agregate. Čestice koje imaju vrednosti zeta potencijala koje su pozitivnije od +30 mV ili negativnije od -30 mV se smatraju stabilnim, te da bi se obezbedila stabilnost sistema i izbeglo taloženje agregata, potrebno je održavati zeta potencijal iznad/ispod tih vrednosti. Sistem je stabilan ukoliko su repulzivne sile među česticama dovoljno jake da prevaziđu van der Waals-ove interakcije, što se može postići na nekoliko načina:

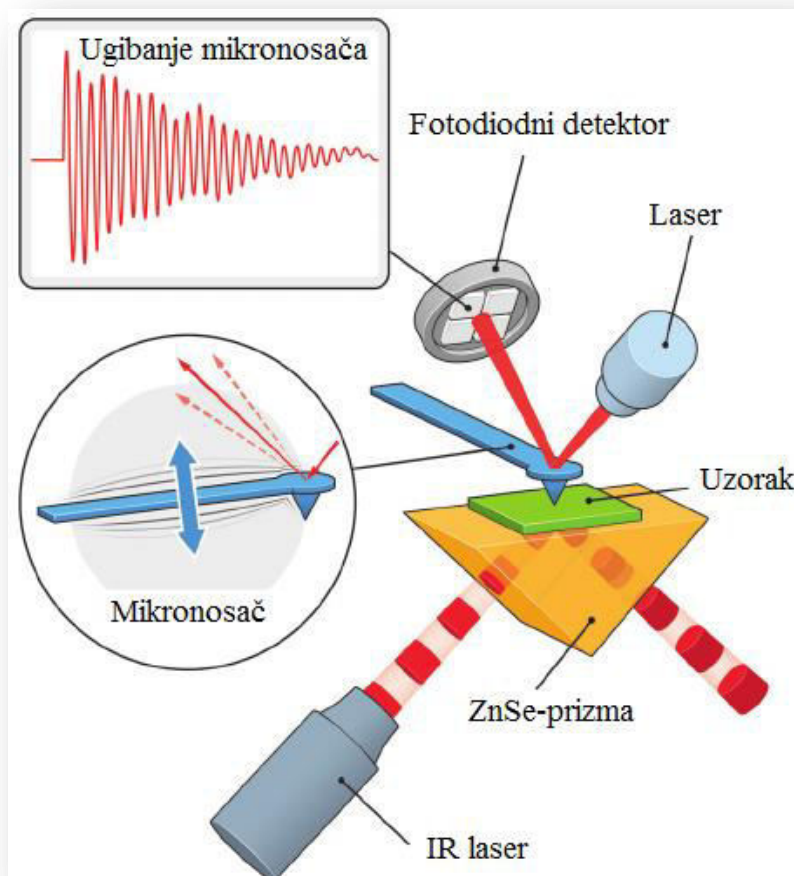
- podešavanjem pH vrednosti rastvora
- dodatkom surfaktanta ili naelektrisanog polimera
- dodatkom nekog visoko adsorptivnog jona

U ovom radu merenje raspodele čestica po veličini i zeta potencijala je vršeno na uređaju Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, koji kao izvor svetlosti koristi helijum-neonski laser (HeNe) talasne dužine 633 nm, koji se pomoću optičkih sočiva fokusira na uzorak. Detektor pomoću kojeg se svetlost rasuta na česticama prikuplja je pozicioniran na 173° u odnosu na pravac upadne svetlosti. Za merenje elektroforetske pokretljivosti, odnosno određivanje zeta potencijala, korišćene su kapilarne ćelije sa elektrodama oznake DTS1060, na koje se primenjuju električna polja koja dovode do kretanja čestica.

Sve supstance su bile u vidu bistrog obojenog vodenog rastvora, svaki uzorak je meren u triplikatu (veličina) i duplikatu (naelektrisanje). Rezultati su interpretirani uz pretpostavku da je viskoznost rastvora jednaka viskoznosti vode na 25 °C.

2.2.9. MIKROSKOPIJA ATOMSKIH SILA (AFM)

Jedna od tri glavne tehnike koja se koristi za karakterizaciju nanomaterijala, nanočestica i nanokomponenti je Mikroskopija atomskih sila (*engl.* Atomic Force Microscopy, AFM).



Slika 2.4. Šema AFM uređaja. Preuzeto uz izmene iz: (Gruszecki i dr. 2015)

AFM omogućava dobijanje slike i 3D profila posmatrane površine na nanometarskom nivou. Može se primeniti za ispitivanje veličine, oblika, strukture, sorpcije i agregacije nanomaterijala. Mikroskop (Slika 2.4.) koristi posebno dizajnirane sonde koje se sastoje od šiljka (vrha, tip) prečnika manjeg od 10 nm postavljenog na mikronosač/držač (obično od silikona ili silicijum-nitrida). Topografska slika uzorka se dobija tako što se mere sile interakcije između šiljka i površine uzorka prevlačenjem šiljka po površini uzorka na veoma maloj udaljenosti (0,2 - 10 nm). Kako je šiljak postavljen na slobodan kraj fleksibilnog držača, pri interakciji šiljka i uzorka dolazi do ugibanja držača, tako da držač možemo posmatrati kao oprugu određenog koeficijenta elastičnosti. Sila interakcije između šiljka i uzorka zavisiće od elastičnosti držača i od njihove međusobne udaljenosti. Jačina sile između

igle uređaja i uzorka se uglavnom kreće u opsegu od 10^{-11} do 10^{-6} N. Poređenja radi, jačina interakcija između dva kovalentno vezana atoma na rastojanju od oko 0,1 nm je reda veličine 10^{-9} N, stoga AFM predstavlja nedestruktivni „imidžing“ (*engl. imaging*) (Meyer, Amer i dr., & Meyer, 1992).

Ugib, odnosno defleksija, se određuje merenjem snopa laserskog zraka reflektovanog sa poleđine držača koji se detektuje na fotodiodama.

Povratni mehanizam održava rastojanje uzorak-igla konstantnim pomeranjem skenera duž z-ose. Bez delovanja ovog povratnog mehanizma, igla bi se sudarila sa uzorkom, usled čega bi moglo doći do oštećenja uzorka, ali i šiljka. Održavanje rastojanja igla-uzorak konstantnim i Hukov zakon (jednačina 2.8.) po kojem je:

$$F = -kx \quad (2.8.)$$

gde je:

F = sila

k = konstanta elastičnosti

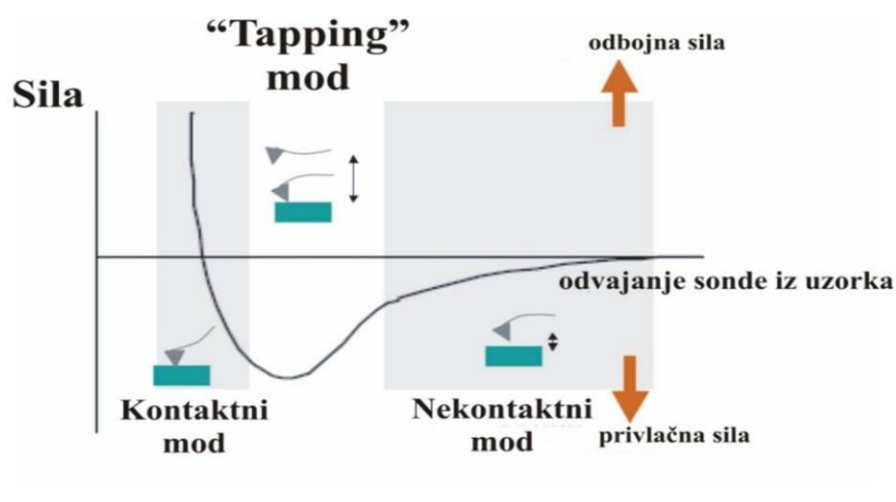
x = povijanje držača

omogućuju da se izračuna jačina sile između igle i uzorka, nakon čega se generiše topografska slika površine ispitivanog uzorka. Veličina površine uzorka koja se može meriti može biti veličine i do $100 \mu\text{m}^2$, odnosno manja od 100nm^2 .

Režimi rada AFM

- Kontaktni mod - vrh držača je u direktnom kontaktu sa površinom uzorka
- Bezkontaktni mod - vrh držača se nalazi na određenoj udaljenosti od površine uzorka
- Polukontaktni, „tapping“ ili tapkajući mod - vrh držača tapka po površini uzorka u određenim tačkama

Svakom režimu rada odgovaraju određene promene sila interakcija i one predstavljaju suštinsku razliku između modova.



Slika 2.5. Režimi/modovi rada AFM - dijagram Lenard-Džonsovog potencijala, zavisnost sila interakcija od udaljenosti šiljka i uzorka (<http://mee-inc.com/afm.html>)

Kao što se vidi na slici 2.5., pri velikim udaljenostima ne postoje sile koje deluju između vrha šiljka i površine uzorka. Kako je površina bliža vrhu šiljka tako počinju da deluju privlačne, Van der Valsove, sile koje vuku vrh držača ka površini uzorka. Nakon što je kontakt ostvaren, javljaju se odbojne sile. Dominantne sile interakcija u AFM su Van der Valsove sile, dok se magnetne i elektrostatičke sile javljaju na većim udaljenostima od uzorka. U kontaktnom režimu rada na vrh držača deluju odbojne Van der Valsove sile. Kako se vrh udaljava od površine uzorka, u bezkontaktnom režimu, na savijanje držača će uticati privlačne Van der Valsove sile, dok u polukontaktnom režimu naizmenično deluju i privlačne i odbojne sile.

Za razliku od drugih mikroskopija, AFM daje trodimenzionalni profil površine i ne zahteva prethodnu pripremu uzorka, provodljive površine uzorka, kao ni specijalno okruženje tipa vakuumu, već se merenja mogu vršiti u atmosferskim uslovima, što omogućava proučavanje bioloških makromolekula i živih organizama. Pored toga, rezolucija AFM-a se može porediti sa rezolucijom transmisiona elektronske mikroskopije (TEM).

Neki od nedostataka ove tehnike bi bili manja brzina skeniranja, zatim greške merenja koje potiču usled neadekvatno odabrane tehnike ili neadekvatnog šiljka, kao i nemogućnost merenja strmih zidova i izbočina zbog čega se javlja greška dimenzije vrha sonde.

Morfologija i struktura FNP i FNP/DOX nanokompozita u vodenom rastvoru su ispitivani u ambijentalnim uslovima aparatom za mikroskopiju atomskih sila AFM (Multimode quadrex SPM with a Nanoscope IIIa controller, Veeco Instruments, Inc. NanoScience-Team Nanotec

GmbH), tapkajućim modom uz primenu SNC (Solid Nitride Cone) šiljka sa radijusom manjim od 10 nm, sa visoko-orijentisanim pirolitičkim grafitom kao podlogom. Rastvori FNP i FNP/DOX nanokompozita su pre merenja čuvani na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C) u mraku tokom 48 h. Snimanje uzoraka je ponovljeno nakon 30 dana, tokom kojih su uzorci čuvani pod istim uslovima.

2.2.10. TRANSMISIONA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (TEM)

U transmisionoj elektronskoj mikroskopiji (TEM) snop elektrona, za razliku od SEM-a, prolazi kroz uzorak koji mora biti veoma tanak. Elektroni, rasejani ili nerasejani, se zatim usmeravaju serijom elektromagnetnih sočiva i projektuju na ekranu pri čemu se dobija difrakcija elektrona, amplitudno-kontrastna slika, fazno-kontrastna slika ili osenčena slika različitog intenziteta osenčenosti, što zavisi od gustine nerasejanih elektrona (Lin, Lin, Wang, & Sridhar, 2014b). TEM može raditi u svetlom ili tamnom polju. Prvi način je uglavnom primenljiv i u ovom modu slika se formira direktno absorpcijom elektrona od strane uzorka. Gušći regioni bivaju tamniji, dok regioni manje gustine (i u smislu kristalne rešetke ili atomskog broja) ili bez uzorka na putu elektrona bivaju svetliji. Ovaj način predstavlja dvodimenzionu projekciju uzorka. Veoma mala talasna dužina elektrona koji se usmeravaju kao izvor elektromagnetnog zračenja omogućuje da se postigne veoma visoka rezolucija. Mod tamnog polja koristi elektrone koji se odbijaju od jednog ili više kristalografskih slojeva uzorka. U ovom modu slika se formira tako što delovi na kojima nema uzorka ostaju tamni. Ova dva moda se mogu kombinovati i tada se dobija TEM visoke rezolucije (HR-TEM). Iako TEM nije specifično površinska metoda, neophodna priprema preseka masivnih uzoraka uglavnom može obezbediti informacije o karakteristikama površine, elementalnog sastava, kontaminaciji, oštećenjima, modifikacijama kristalne rešetke, kao i amorfности površine uzorka (Fenoglio i dr., 2011). Mane ove metode su prisustvo visokog vakuuma, potreba za tankim uzorkom i provodljivim uzorkom, priprema uzorka usled koje može doći do onečišćenja uzorka, kao i mogućnost oštećenja uzorka visoko-voltažnim snopom elektrona.

U radu je za određivanje morfologije i strukture uzoraka korišćen uređaj za transmisionu elektronsku mikroskopiju (JEM 2010F, STEM unit, BF, DF STEM detector, Oxford instruments ISIS 300 EDXS, Gatan PEELS 677, Gatan off-axis TC camera, Auto-alignment system Jeol Motor driven OA). Vodeni rastvor FNP ($0,111$ mmol/dm³) je nanet na bakarnu mrežicu, osušen na sobnoj temperaturi, nakon čega je podvrgnut merenju. Uzorci su mereni

odmah nakon sonikacije, kao i nakon 48-časovnog stajanja u mraku na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C).

2.2.11. RAČUNARSKE SIMULACIJE

Simulacija molekulske dinamike i funkcija radijalne raspodele

U cilju boljeg razumevanja eksperimentalno dobijenih rezultata, samoorganizacije fulerenola u rastvorima FNP, kao i interakcija FNP sa vodom, sprovedene su simulacije na nivou molekulske dinamike (MD) na osnovu kojih su izračunate radijalne distributivne funkcije (RDF).

Postavka računarske simulacije

Za MD simulacije korišćen je program Desmond, implementiran u programski paket Schrödinger Materials Science Suite 2015-4 (SMSS) (Guo i dr., 2010; Shivakumar i dr., 2010; K. J. Bowers, E. Chow, H. Xu, R. O. Dror, M. P. Eastwood, B. A. Gregersen, J. L. Klepeis, I. Kolossvary, M. A. Moraes, F. D. Sacerdoti, J. K. Salmon, Y. Shan and D. E. Shaw, Presented at: SC 2006 Conference, Proceedings of the ACM/IEEE. Tampa, Florida, 2006; Schrödinger Release 2015-4: Desmond Molecular Dynamics System, version 4.4, D. E. Shaw Research, New York, 2015. Maestro-Desmond Interoperability Tools, version 4.4, Schrödinger, New York, 2015).

Sistem za MD simulaciju modeliran je postavljanjem jednog molekula fulerenola u kubičnu kutiju sa 3000 molekula vode. Prethodno je upotrebom programa Jaguar 9.0 iz SMSS paketa izvršena geometrijska optimizacija fulerenola korišćenjem B3LYP hibridnog izmenskorelacionog funkcionala (Becke, 1993) sa 6-31G(d) bazisnim skupom. Nakon geometrijske optimizacije sprovedena je vibraciona analiza na istom nivou teorije, koja je odsustvom imaginarnih frekvencija potvrdila pravo ravnotežno stanje fulerenola.

Za MD simulaciju iskorišćeno je OPLS 2005 polje sila (Banks i dr., 2005). Sistem je posmatran kao NPT tip ansambla, dok je za vreme simulacije odabrana vrednost od 5 ns. Ostali parametri MD simulacije podrazumevaju pritisak u vrednosti od 1,01325 bar i temperaturu u vrednosti od 300 K. Proračuni dalekosežnih interakcija su vršeni Evaldovim metodom (Essmann i dr., 1995), ograničenjem radijusa interakcije na 12 Å. Tokom prvih 100 ps simulacije sistem je najpre optimizovan poput NVT tipa ansambla, u svrhe relaksacije. Naelektrisanja su bila generički regulisana potencijalom sila, dok je rastvarač bio regulisan modelom prostih tačkastih naelektrisanja (*engl.* Single Point Charge, SPC) (Van Gunsteren & Hermans, 1999). Geometrijski parametri fulerenola dobijeni optimizacijom klasičnim

(potencijalom sila OPLS 2005) i DFT metodom su međusobno upoređeni, čime je ustanovljeno izuzetno dobro slaganje (za dužine veza RMSE je iznosio 0.0315 Å) i izvršena validacija upotrebe OPLS 2005 potencijala sila u slučaju fulerenola. Za geometrijsku optimizaciju fulerenola potencijalom sila korišćen je program MacroModel (Schrödinger Release 2015-4: MacroModel, version 11.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2015. Schrödinger Release 2015-4: MacroModel, version 11.0, Schrödinger, LLC, New York, 2015), takođe iz SMSS paketa. Za ispitivanje uticaja temperature na organizaciju FNP, sprovedene su simulacije sistema od 32 molekula fulerenola na dve različite temperature.

2.2.12. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI *IN VITRO* NA ĆELIJSKIM LINIJAMA

Ispitivanje antiproliferativnog efekta, odnosno citotoksičnosti, podrazumeva tretman ćelijskih linija u kontrolisanim uslovima supstancom od interesa tokom različitih vremenskih perioda, najčešće 24, 48 ili 72h.

Gajenje i pregled ćelijskih linija

Za određivanje uticaja ispitivanih supstanci na rast ćelija korišćene su humane tumorske ćelijske linije MDA MB-231, MCF-7, Hs-294 T i U-251, kao i linija humanih zdravih ćelija MRC-5 (Tabela 1). Ćelijske linije su održavane u flaskovima površine 25cm² (Costar, USA) u 10 cm³ DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) medijuma, obogaćenog sa 4,5% glukoze, 5% FCS (Fetal calf serum, PAA), sa dodatkom antibiotika 100 IU/cm³ penicilina i 100 µg/cm³ streptomicina na 37 °C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Pun sloj ćelija je odlepljen od podloge sa 0,25% tripsinom i 0,05% EDTA (Sigma-Aldrich), a odgovarajući alikvoti su korišćeni za pasažiranje.

Tabela 2.1. Pregled ćelijskih linija korišćenih u eksperimentima

Ćelijska linija	Pun naziv	Kataloški broj	Vrsta (Species)	Organ	Vreme udvajanja* (h)
MRC-5	Humani fibroblasti pluća (zdravo tkivo)	ECACC 84101801	Čovek (<i>Homo sapiens</i>)	Pluća	27
MDA-MB-231	Humani karcinom dojke ER-	ATCC® HTB-26™		Dojka	38 (41,9)
MCF-7	Humani karcinom dojke ER+	ATCC® HTB-22™		Dojka	35
Hs-294 T	Humani melanom	ATCC® HTB-140™		Koža	29
U-251	Humani glioblastom	ECACC 09063001		Mozak	23,8

*Vreme potrebno da se broj ćelija uveća dva puta
 ECACC - European Collection of Authenticated Cell Cultures
 ATCC - American Type Culture Collection

Tretman ćelija

U svaki otvor mikrotitar ploče (Sarstedt, Newton, USA) je posejano 180 µl ćelijske suspenzije različite gustine u medijumu sa 5% FCS na 37 °C. Za 24 h tretman je za sve ćelijske linije sejano po 1x10⁴ ćelija po otvoru, za 48 h tretman 5x10³ ćelija, dok je za 72 h tretman posejano 2,5x10³ ćelija. Pre tretmana, ćelije su preinkubirane u trajanju od 24h.

Dužina tretmana je bila 24h, 48h i 72h na 37 °C uz 5% CO₂. U našim eksperimentima je broj ćelija bio 2.500–10.000, u zavisnosti od vremena trajanja tretmana, a što je odabrano na osnovu vremena udvajanja ćelija, odnosno vremena koje je potrebno da se broj ćelija dvostruko uveća.

Ćelije, osim kontrole, su tretirane sa po 20 µl doksorubicina i nanokompozita fulerenol/doksorubicin u 5 različitih finalnih koncentracija (10; 1; 0,1; 0,01 i 0,001 µmol/dm³ računato na DOX), dok je u kontrole dodata ekvivalentna zapremina medijuma. Nakon tretmana je izvršen protokol za SRB test i očitane su apsorbance na spektrofotometru.

Ispitivanje citotoksičnosti

Rast ćelijskih linija je praćen kolorimetrijskim SRB testom prema Skehan-u (Skehan i dr. 1990). Ćelije su nakon tretmana doksorubicinom i nanokompozitom fiksirane 50% trihlorsirćetnom kiselinom (1 h, +4 °C), isprane 4 puta bidestilovanom vodom (Wellwash 4, Labsystems; Helsinki, Finland) i bojene 0,4% SRB bojom (Sigma-Aldrich) 30 min na 22 °C. Mikrotitar ploče su zatim isprane 1% sirćetnom kiselinom radi uklanjanja nevezane boje. Boja vezana za proteine je ekstrahovana 10 mmol/dm³ TRIS bazom (tris[hidroksimetil]aminometan). Apsorbanca je očitavana na spektrofotometru (Multiscan Ascent, Labsystems; Helsinki, Finland) na talasnim dužinama 540 nm (specifična talasna dužina za SRB) i 620 nm (referentna talasna dužina za uklanjanje apsorbance pozadine). Absorbanca je dobijena kao razlika apsorbance pozadine i apsorbance na 540 nm. Eksperimenti su urađeni u kvadriplikatu za svaku ispitivanu ćelijsku liniju, koncentraciju supstance i vreme izloženosti supstancama. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost 4 nezavisna merenja.

Obrada i predstavljanje rezultata

Efekat na ćelijski rast je prikazan kao procenat u odnosu na kontrolu, što je računato prema formuli:

$$K = (A_t/A_k) \times 100\% \quad (2.9.)$$

gde je:

K = procenat od kontrole

A_t = apsorbanca testirane supstance

A_k = apsorbanca kontrole

Antiproliferativna aktivnost ekstrakta izražena je kao EC_{50} vrednost, gde EC_{50} predstavlja polovinu maksimalne efektivne koncentracije, odnosno koncentraciju koja dovodi do polovine maksimalnog odgovora. Vrednosti EC_{50} su računane primenom softvera Biosoft CalcuSyn, a na osnovu krivih koje predstavljaju odnos između koncentracije supstance i efekta na ćelijski rast.

Statistička obrada rezultata antiproliferativne aktivnosti, koje su grafički predstavljene, je urađena u programu Microsoft Excel 2007 primenom t–testa razlike između aritmetičkih sredina dva mala nezavisna uzorka sa istaknutim statistički značajnim razlikama ($p < 0,05$) za rezultate dobijene pri primeni samog DOX i nanokompozita FNP/DOX.

U cilju određivanja selektivnosti ispitivane supstance prema tumorskim u odnosu na zdrave ćelijske linije, određen je ne-tumor/tumor odnos (NT/T).

Odnos NT/T predstavlja količnik EC_{50} vrednosti dobijenih za netumorsku i tumorske ćelijske linije i ukoliko je > 1 , ispitivana supstanca je selektivnija za tumorske u poređenju sa zdravim ćelijama.

2.2.13. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI *IN VIVO* NA MODELU ZEBRICE

Odrasle jedinke zebrića (*Danio rerio*) su nabavljene od komercijalnog dobavljača (Pet Centar, Beograd, Srbija) i gajene pod odgovarajućim životnim uslovima: ISO voda sastava ($2 \text{ mmol/dm}^3 \text{ CaCl}_2$; $0,5 \text{ mmol/dm}^3 \text{ MgSO}_4$; $0,7 \text{ mmol/dm}^3 \text{ NaHCO}_3$; $0,07 \text{ mmol/dm}^3 \text{ KCl}$) temperatura $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ i svetlosni režim 14 h svetlo/10 h mrak. Životinje su hranjene dva puta dnevno komercijalnom suvom hranom (TetraMinTM flakes; Tetra Melle, Germany) kao i sveže pripremljenim kulturama artemija (*Artemia nauplii*). Dan pre mresta, mužjaci i ženke, u odnosu 2:3, su odvojeni u posebne akvarijume za mrest. Mrest je indukovan sledećeg dana, neposredno nakon paljenja svetla. Položena jaja su sakupljena, isprana nekoliko puta ISO vodom za gajenje zebrića, nakon čega su neoplođena jaja uklonjena. Oplođena jaja (embrioni) u stadijumu 4 hpf (*engl.* hours post fertilization, hpf) su tretirana različitim koncentracijama ispitivanih supstanci, kao i 0,25% dimetil-sulfoksidom (DMSO) kao negativnom kontrolom. Tretmani su vršeni u mikrotitar pločama sa 24 bunarčića, pri čemu je svaki bunarčić sadržao 1 ml ispitivane supstance rastvorene u ISO vodi i 10 embriona. Svaka supstanca je ispitivana u šest različitih koncentracija (2,3; 4,6; 9,2; 46; 92 i $920 \text{ } \mu\text{mol/dm}^3$, odnosno μM) koje su pripremljene razblaživanjem rastvora u ISO vodi. Eksperimenti su ponovljeni tri puta, sa po 30 embriona po koncentraciji.

Procena embriotoksičnosti (letalni i teratogeni efekat) je praćena na svakih 24h tokom 4 uzastopna dana pomoću invertnog mikroskopa (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan) prema standardizovanom protokolu za ispitivanje hemikalija na zebrićama (OECD (236) 2013). 96h nakon fertilizacije, embrioni su anestetizirani dodatkom 0,1% (w/v) rastvora trikaina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), fotografisani i usmrćeni smrzavanjem na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 24h. Morfološke abnormalnosti su tabelarno prikazane. Letalne koncentracija koja izaziva letalni efekat kod 50% embriona (LC_{50}) je određena pomoću ToxRatPro programa (ToxRat[®], Software for the Statistical Analysis of Biotests, ToxRat Solution GmbH, Alsdorf, Germany, Version 2.10.05) primenom „maximum likelihood” regresione analize.

Svi eksperimenti na zebrićama su realizovani u Laboratoriji za molekularnu genetiku i ekologiju mikroorganizama na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI) u Beogradu, Univerzitet u Beogradu, a u skladu sa evropskom direktivom 2010/63/EU i etičkim pravilima o brizi i upotrebi laboratorijskih životinja IMGGI-ja.

3. REZULTATI

Fulerenol kao molekul i nanočestica, kao i nanokompozit FNP/DOX, se mogu okarakterisati prateći dva različita pristupa: molekulsko-spektralne metode (XPS, FTIR, MS, NMR, UV, SFM) i metode nanokarakterizacije (AFM, TEM, DLS).

3.1. KARAKTERIZACIJA UZORAKA PRIMENOM XPS METODE

Budući da su uzorci neprovodni, njihovo ozračivanje rendgenskim zračenjem je dovelo do naelektrisanja površine usled elektronske emisije, što za posledicu ima pomeraj svih položaja prema većim energijama veze. Ovaj tehnički problem je rešavan istovremenim ozračivanjem uzorka rendgenskim zračenjem i izvorom sporih elektrona kako bi se kompenzovao manjak elektrona u uzorku. Kriterijum za intenzitet fluksa sporih elektrona je bio da glavna fotoelektronska linija ugljenika, C 1s, bude pozicionirana na 284,8 eV, što je očekivana pozicija ove linije za fulerenole (Wang i dr., 2012; Friedrich i dr., 2011).

Na slici 3.1. je prikazan pregledni XPS spektar uzorka fulerenol M, na kome se jasno uočavaju najintenzivnije fotoelektronske i Auger (Ože) linije ugljenika, kiseonika i natrijuma, kao i osnovna fotoelektronska linija indijuma (In 3d), koja potiče od podloge uzorka. Pregledni XPS spektar uzorka sintetisanog fulerenola S izgleda kvalitativno isto. Na osnovu intenziteta fotoelektronskih linija C 1s, O 1s, Na 1s i In 3d, utvrđen je sastav uzoraka koji je predstavljen u Tabeli 3.1.

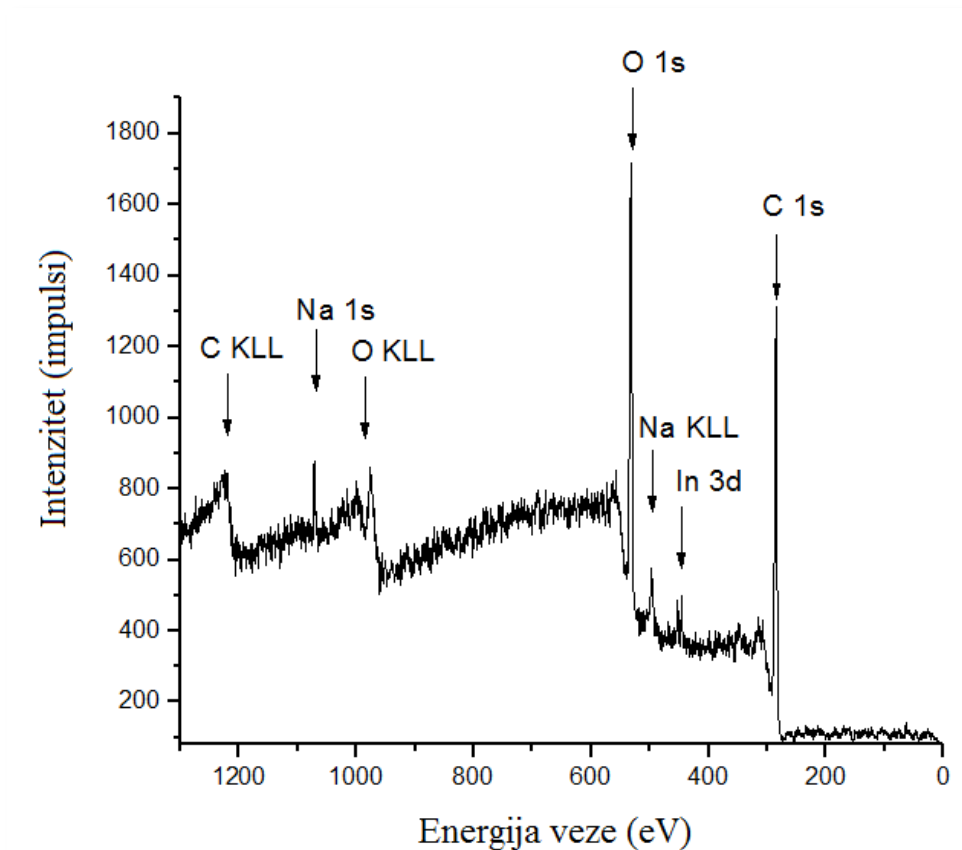
Tabela 3.1. Hemijski sastav uzoraka fulerenola u atomskim procentima izmeren metodom XPS

Uzorak	C (at. %)	O (at. %)	Na (at. %)	In (at. %)
Fulerenol M	50,5	47,2	1,7	0,6
Fulerenol S	54,0	41,3	2,5	2,2

Razlika u količinama detektovanog indijuma dva uzorka je isključivo posledica njihove pripreme i ne nosi nikakvu dodatnu informaciju. Iz rezultata se vidi da fulenerol S ima nešto više natrijuma i manje kiseonika, no u oba uzorka se uočava daleko više kiseonika nego što bi se na prvi pogled očekivalo: sastav $C_{60}(OH)_{24}$ bi trebalo da bude 71,4% C i 28,6% O budući da se vodonik ne može detektovati ovom metodom. Najverovatniji razlog povišene koncentracije kiseonika je adsorbovana voda, koja relativno lako gradi vodoničnu vezu sa OH grupama fulerenola. Ovo je i osnovni razlog zašto se XPS karakterizacija fulerenola vrši

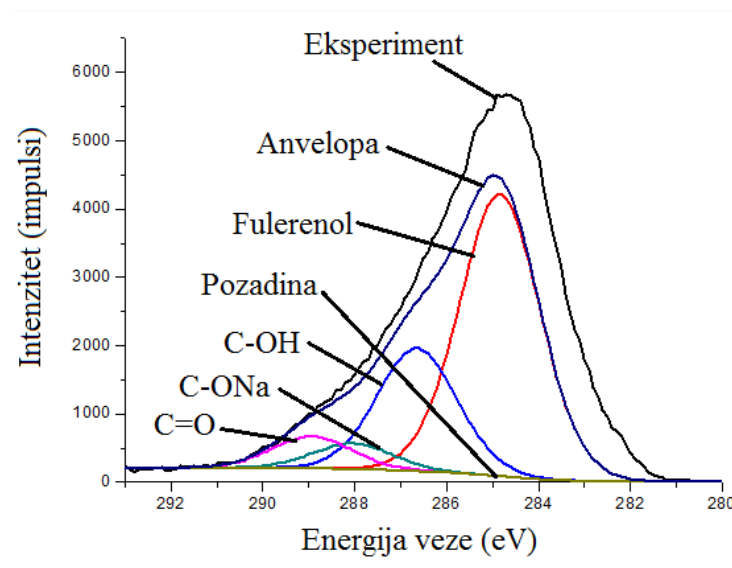
gotovo isključivo na osnovu detaljne analize C 1s linije. Prisustvo natrijuma najverovatnije predstavlja posledicu sintetskog puta fulerenola (Djordjević i dr. 1998; Mirkov i dr. 2004). Rezultati atomske apsorpcione spektrometrije takođe ukazuju na prisustvo natrijuma od 7,3% u uzorku fulerenola (rezultati nisu prikazani).

Prema (Friedrich, Henkel, Richter, & Schmeißer, 2011), C 1s se fituje na 4 doprinosa koje interpretiramo kao C-C veze (doprinos 1 na 284,8 eV), C-OH veze (doprinos 2 na oko 286,6 eV), C-O⁻, koje u radu Wang i saradnika (Fang Fang Wang, Wang, Liu, Tian, & Li, 2012) interpretiraju kao C-ONa veze (doprinos 3 na oko 288,0 eV) i C=O veze na (288,9 eV). Sve energije veze su pomerene za 0,3 eV prema nižim energijama veze u referenci (Friedrich i dr., 2011) zato što se osnovna linija nalazi na 284,8 eV, umesto na 285,1 eV. Tačan položaj prvog doprinosa nema mnogo značaja zato što je on podešavan izborom intenziteta fluksa sporih elektrona pri kompenzaciji naelektrisanja.



Slika 3.1. Pregledni XPS spekatar uzorka fulerenol M sa položajima najintenzivnijih linija označenim strelicama

Uvedeno je i fizički potpuno opravdano ograničenje da sve linije imaju jednaku poluširinu. Primenom navedenog modela objašnjenog u uvodnom delu metode, dobija se rezultat fitovanja C 1s linije uzorka fulerenol M, koji je prikazan na slici 3.2.

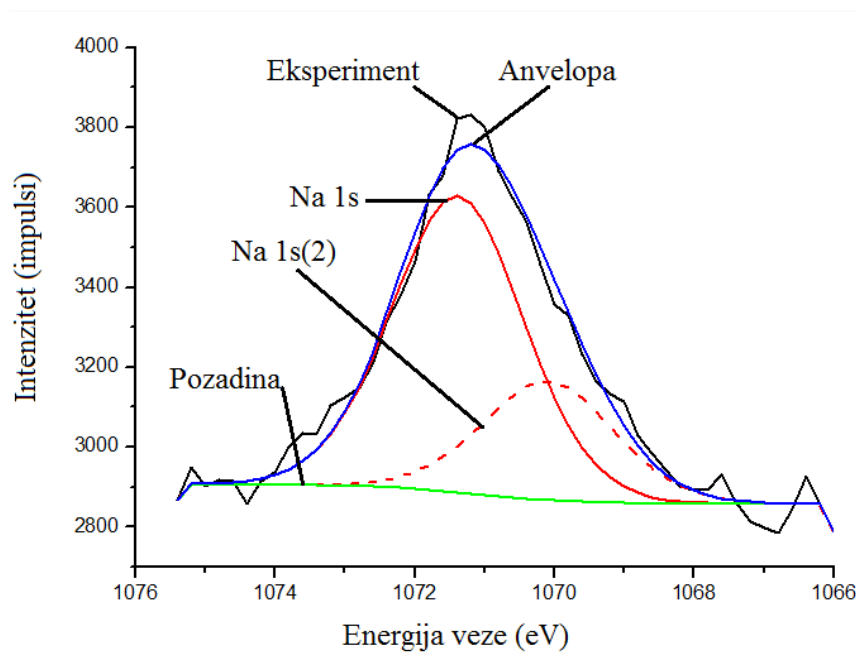


Slika 3.2. C 1s fotoelektronska linija snimljena sa uzorka fulerenol M na osnovu modela predloženog u (Friedrich i dr., 2011)

Rezultat fitovanja je kranje nezadovoljavajući, posebno u oblasti manjih energija veze gde nedostaje bar još jedan doprinos. Međutim, dodavanje ovakvog doprinosa ne bi imalo fizičkog smisla, jer se na energijama veze od oko 283 eV nalaze doprinosi za karbide različitih metala. Stvarni razlog neuspelog modelovanja C 1s linije je u prisustvu efekta nehomogenog naelektrisanja uzorka: različiti delovi uzorka se nalaze na različitim potencijalima, tako da će elektroni emitovani iz atoma koji se nalaze u istom hemijskom okruženju, ali u različitim delovima uzorka, imati pri detekciji različitu kinetičku energiju što se vidi kao različita energija veze. Efekat nehomogenog naelektrisanja površine je verovatno najsloženiji problem pri XPS karakterizaciji. Uzevši pomenuto u obzir, problemu se dalje pristupa na originalan način, polazeći od analize Na 1s fotoelektronske linije. Anvelopa predstavlja rezultujuću krivu u spektru koja obuhvata modeliranu krivu koja obuhvata sve preklapajuće pikove različitih energija koji se pojavljuju u određenoj oblasti spektra.

Na slici 3.3. je prikazan XPS spektar Na 1s linije snimljene sa uzorka fulerenol M. Za očekivati je da natrijum, koji je uvek u oksidacionom stanju +1, ima samo jedan doprinos. U ovom pristupu pretpostavlja se da je prisustvo drugog doprinosa (Na 1s(2)) isključivo posledica neuniformnog naelektrisanja površine, odnosno u pitanju je jedan vid sistematske greške pri merenju. Sistematske greške nastaju zbog nesavršenosti ili neispravnosti mernih instrumenata; tokom više merenja iste merene veličine ostaju stalne ili se menjaju na predvidiv način. Pošto nema interpretacije vezane za hemijsko okruženje emitujućeg atoma,

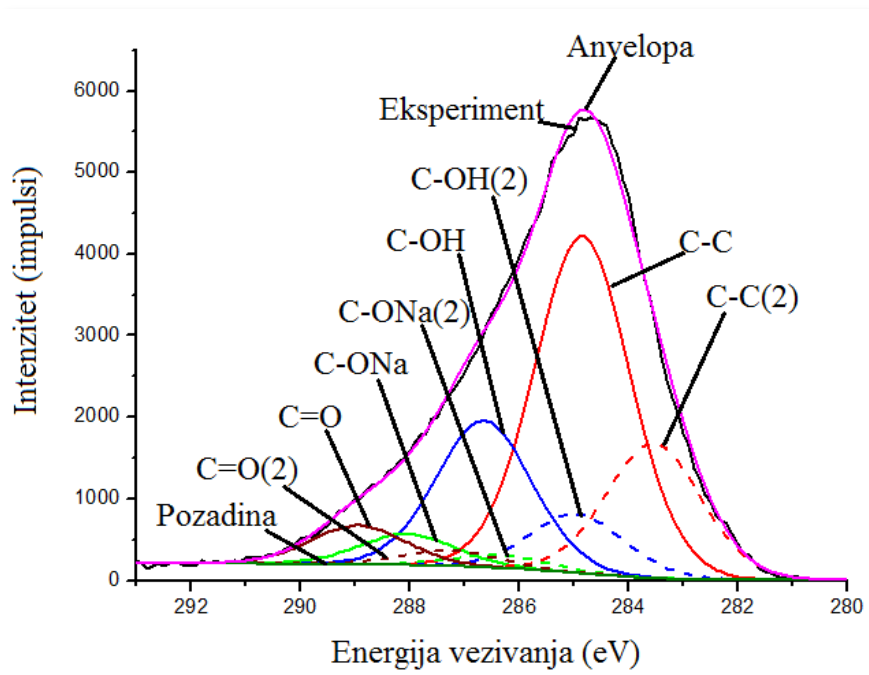
ovaj doprinos zove se replika osnovne linije. Položaj, poluširina i relativan intenzitet (u odnosu na intenzitet glavne linije) replike su definisani raspodelom naelektrisanja u uzorku. Prema tome, bilo koji doprinos svake linije u XPS spektru će imati potpuno istu repliku, jednake poluširine, jednakog pomaka u odnosu na original i jednakog relativnog intenziteta u odnosu na original. U ovom slučaju koristi se Na 1s linija radi utvrđivanja parametara replike koji su navedeni u Tabeli 3.2., a koja će se koristiti pri fitovanju C 1s linije. Vrednosti poluširine trake mogu biti važni indikatori koji ukazuju na promene, odnosno, veća proširenje pika može ukazivati na: promenu broja hemijskih veza, stanja uzorka i/ili promenljivog naelektrisanja površine.



Slika 3.3. Na 1s fotoelektronska linija uzorka fulerenol M, i njen fit na dva doprinosa

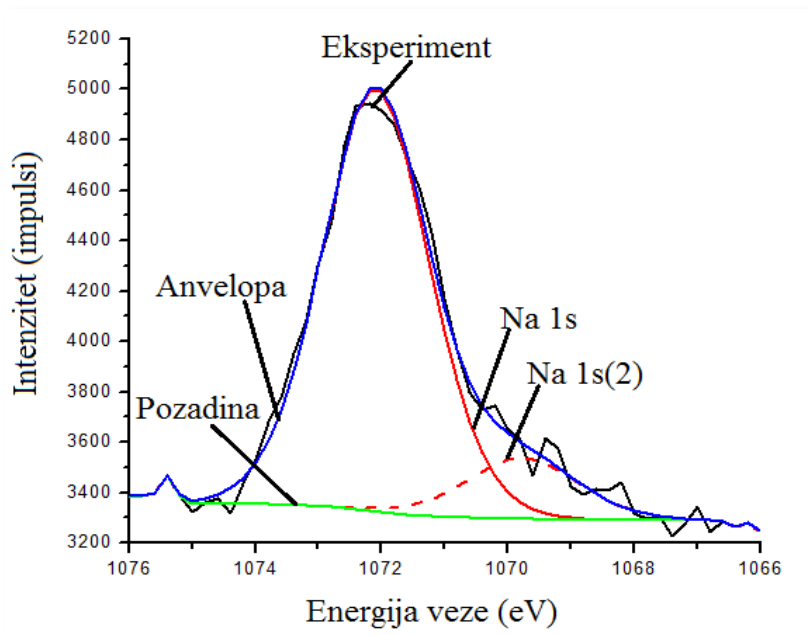
Na slici 3.4. je prikazan XPS spektar C 1s linije uzorka fulerenol M zajedno sa fitom na 4 doprinosa od kojih se svaki sastoji od originala i replike definisane na osnovu fita Na 1s linije (ukupno osam pikova). Važno je napomenuti da je broj slobodnih parametara za fitovanje ove linije potpuno isti kao i u slučaju fita prikazanom na slici 3.2., budući da je svaka replika u potpunosti determinisana originalom. Na osnovu relativnih intenziteta svake od linija, koji su dati u Tabeli 3.3., može se proceniti srednji broj OH grupa, ONa grupa i C=O grupa po jednom molekulu fulerenola. Na osnovu rezultata fitovanja C 1s linije (Slika 3.4.) molekul fulerenola u uzorku fulerenol M ima u proseku 21 OH grupu, jednu ONa grupu i 3 C=O grupe, što je relativno blizu očekivanom $C_{60}(OH)_{24}$. Samim tim, izvodi se zaključak da je

predloženi model karakterizacije fulerenola dovoljno dobar za procenu karakteristika uzorka fulerenol S.



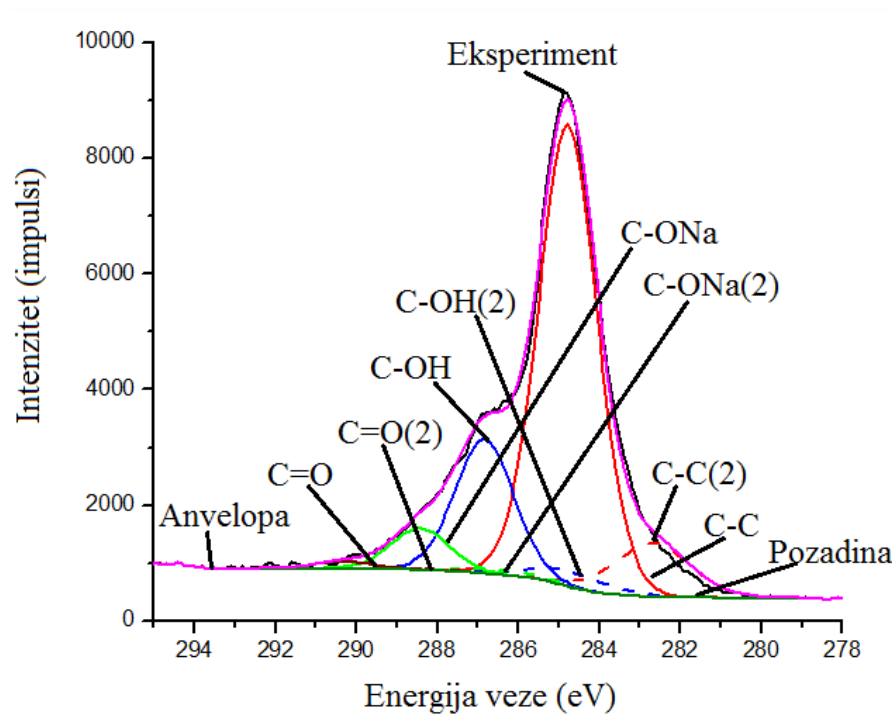
Slika 3.4. XPS spektar C 1s linije uzorka fulerenol M, i odgovarajući fit na osnovu modela definisanom fitovanjem odgovarajuće Na 1s linije

Na slici 3.5. je prikazan XPS spektar Na 1s linije uzorka fulerenol S, zajedno sa odgovarajućim fitom, odakle se mogu definisati parametri replike za svaki doprinos bilo koje linije ovog uzorka. Ovi parametri su dati u Tabeli 3.2.



Slika 3.5. Na 1s fotoelektronska linija uzorka fulerenol S, i njen fit na dva doprinosa

Sada se model definisan na osnovu fita Na 1s linije primenjuje na fitovanje C 1s linije na isti način kao i u slučaju uzorka fulerenol M. Rezultat je prikazan na slici 3.6.



Slika 3.6. XPS spektar C 1s linije uzorka fulerenol S, i odgovarajući fit na osnovu modela definisanom fitovanjem odgovarajuće Na 1s linije

Replika prvog doprinosa (C-C) je prevelikog intenziteta, ali se radi doslednosti veza između originala i replike ipak zadržava. Što se same linije tiče, u ovom slučaju je jasno izraženiji doprinos C-OH nego u slučaju uzorka fulerenol M (Slika 3.4). Osim toga, doprinosi C=C, C-OH, C-ONa su pomereni ka većim energijama veze za oko 0,5 eV u odnosu na vrednosti navedene u (Friedrich i dr., 2011). S druge strane, treba imati u vidu da su položaji ovih doprinosa u drugim radovima zaista na nešto višim energijama u odnosu na rad Friedrich i saradnika.

Tabela 3.2. Rezultati parametara replike u odnosu na original usled nehomogenog naelektrisanja na osnovu fita Na 1s linije

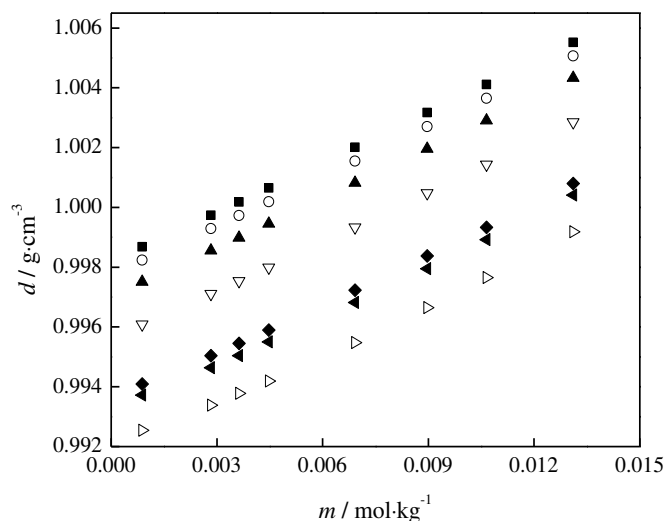
Uzorak	Pomeraj položaja (eV)	Relativni intenzitet	Poluširina (eV)
Fulerenol M	-1,3	0,4	2,1
Fulerenol S	-2,3	0,150	2,2

Tabela 3.3. Rezultati fitovanja C 1s linije uzoraka fulerenol M i fulerenol S

Uzorak	C-C		C-OH		C-ONa		C=O	
	eV	%	eV	%	eV	%	eV	%
Fulerenol M	284,8	60,9	286,6	26,5	288,0	5,4	288,9	7,0
Fulerenol S	284,8	71,5	287,0	20,8	288,6	6,5	289,5	1,2

3.2. DENZITOMETRIJA I TRANSPORTNE OSOBINE

Eksperimentalno dobijene vrednosti gustine su predstavljene grafički na slici 3.7. i u tabeli P1 (Prilog). Ove eksperimentalno dobijene vrednosti su iskorišćene za izračunavanje sledećih termodinamičkih veličina: prividna molarna zapremina V_ϕ , parcijalna molarna zapremina vode V_1 i parcijalna molarna zapremina fulerenola V_2 na način kako je predstavljeno u radovima Vraneš i saradnika (2016; 2015).



Slika 3.7. Zavisnost gustine sistema {fulerenol + voda} od molalnosti fulerenola na različitim temperaturama: T = (■) 293,15; (○) 295,15; (▲) 298,15; (▽) 303,15; (◆) 309,15; (◄) 310,15 K; (▷) 313,15 K (Vranes i dr., 2017)

Viskoznost

Dinamička viskoznost je izračunata primenom jednačine 3.1. i eksperimentalno dobijene vrednosti su predstavljene grafički na slici 3.8., kao i u tabeli P2:

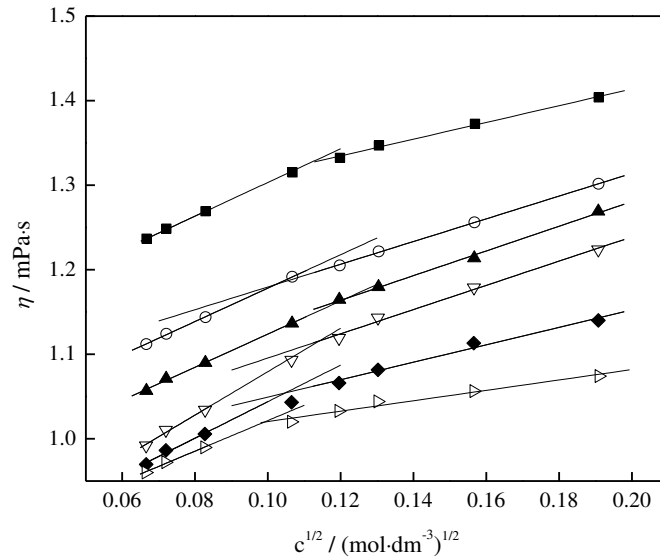
$$\eta = (Kt - L/t)d \quad (3.1)$$

gde je:

K, L = konstante viskozimetra

t = vreme protoka

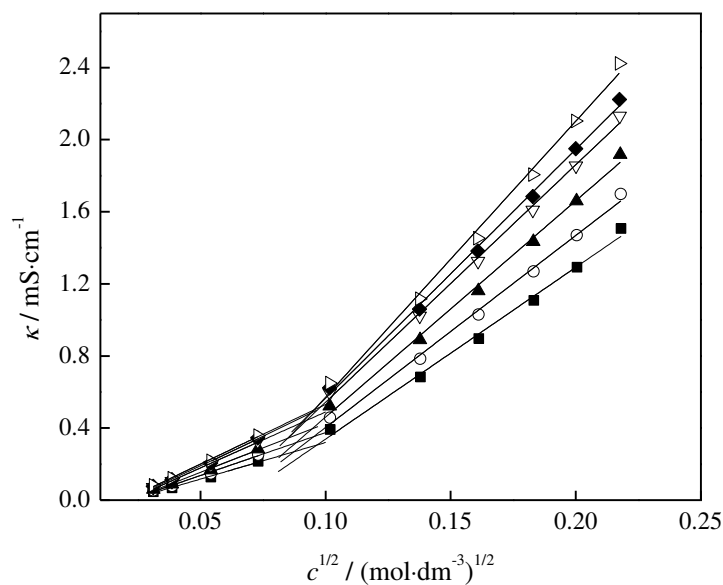
d = eksperimentalno određena gustina tečnosti



Slika 3.8. Zavisnost viskoznosti sistema {fulerenol + voda} od koncentracije fulerenola pri različitim temperaturama: T = (■) 293,15; (○) 298,15; (▲) 303,15; (▽) 309,15 ; (◆) 310,15; (▷) 313,15 K (Vranes i dr., 2017)

Električna provodljivost

Vrednosti koje su eksperimentalno dobijene su predstavljene u tabeli P3, a zavisnost električne provodljivosti od koncentracije fulerenola je grafički prikazana na slici 3.9.

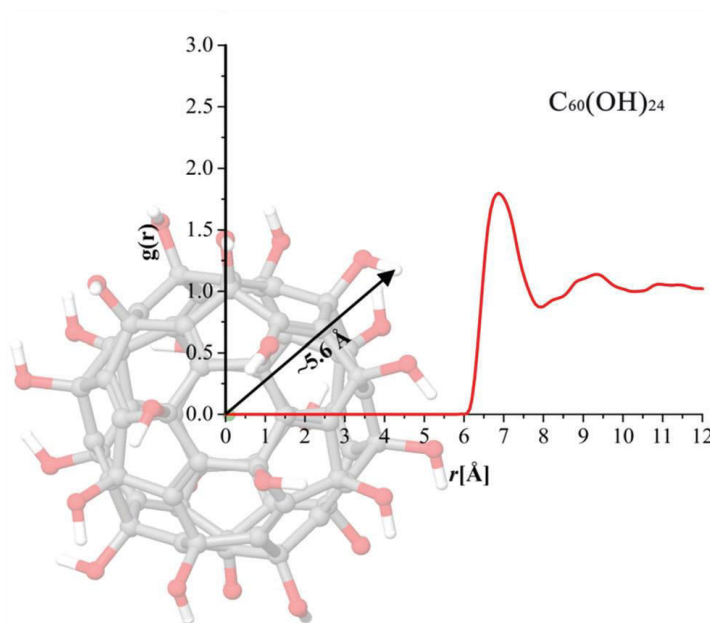


Slika 3.9. Zavisnost električne provodljivosti od kvadratnog korena koncentracije fulerenola na temperaturama: T = (■) 293,15; (○) 298,15; (▲) 303,15; (▽) 309,15; (◆) 310,15; (▷) 313,15 K (Vranes i dr. 2017)

3.3. RAČUNARSKE SIMULACIJE

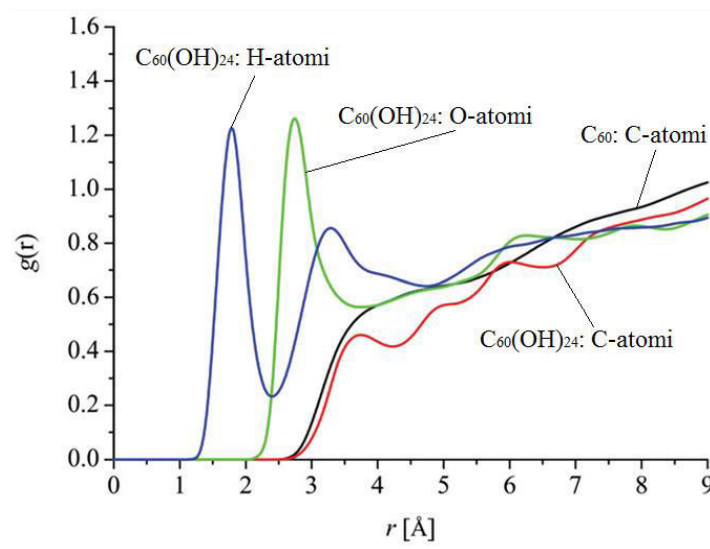
Interakcija između posmatranog molekula i rastvarača se može efikasno ispitati RDF analizom. RDF, $g(r)$, opisuje verovatnoću nalaženja čestice na udaljenosti r od druge čestice (Vaz, Gomes, & Silva, 2016). U cilju dobijanja uvida u raspodelu molekula vode oko fulerenola, izračunate su odgovarajuće RDF. Profil krive, kao i udaljenost pika dobijene krive ukazuje na afinitet nekog od atoma molekula ka uspostavljanju interakcija sa molekulima vode. Oštrij pikovi sa maksimalnim vrednostima $g(r)$ na što kraćim udaljenostima ukazuje na izraženije interakcije sa molekulima rastvarača.

RDF u odnosu na rastojanje između centra mase (CM) fulerenola i atoma kiseonika u molekulima vode pokazuje da se maksimalne vrednosti $g(r)$ nalaze na udaljenost od 0,67 nm (6,7 Å) (slika 3.10.).



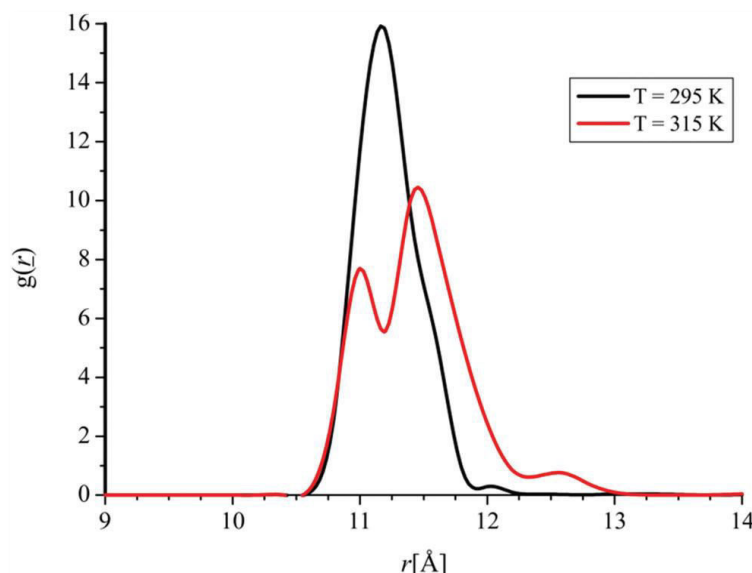
Slika 3.10. RDF u odnosu na CM fulerenola i atoma kiseonika iz vode i naznačeni poluprečnik fulerenola (Vranes i dr. 2017)

Detaljniji uvid u interakcije fulerenola sa molekulima vode je dobijen računanjem RDF između atoma iz fulerenola i atoma kiseonika iz vode, što je predstavljeno na slici 3.11. U slučaju atoma vodonika, maksimalne vrednosti $g(r)$ su locirane na rastojanjima znatno ispod 2 Å. Pored toga, primećuje se pojava dve odvojene solvacione sfere, gde se pik udaljenije sfere nalazi na udaljenosti od oko 3,2 Å. Udaljenost pika atoma kiseonika iznosi nešto više od 2,5 Å. Kako u slučaju atoma kiseonika, tako i vodonika, RDF imaju maksimalne $g(r)$ vrednosti u iznosu od oko 1,2. Što se tiče pika atoma ugljenika u fulerenolu, rastojanje maksimalne vrednosti $g(r)$ je oko 3,5 Å.



Slika 3.11. RDF između atoma iz fulerenola i atoma kiseonika iz vode (Vranes i dr. 2017)

Uzimajući u obzir važnost struktuiranja fulerenola u zavisnosti od temperature, ispitane su RDF sistema 32 molekula fulerenola na dve različite temperature, 295 i 315 K. RDF je posmatrana u odnosu na rastojanje CM jednog molekula fulerenola od CM preostalih molekula fulerenola, slika 3.12., gde se može videti da pri temperaturi od 315 K $g(r)$ ima praktično upola manju maksimalnu vrednost, lociranu na približno istom rastojanju, u odnosu na temperaturu od 295 K.

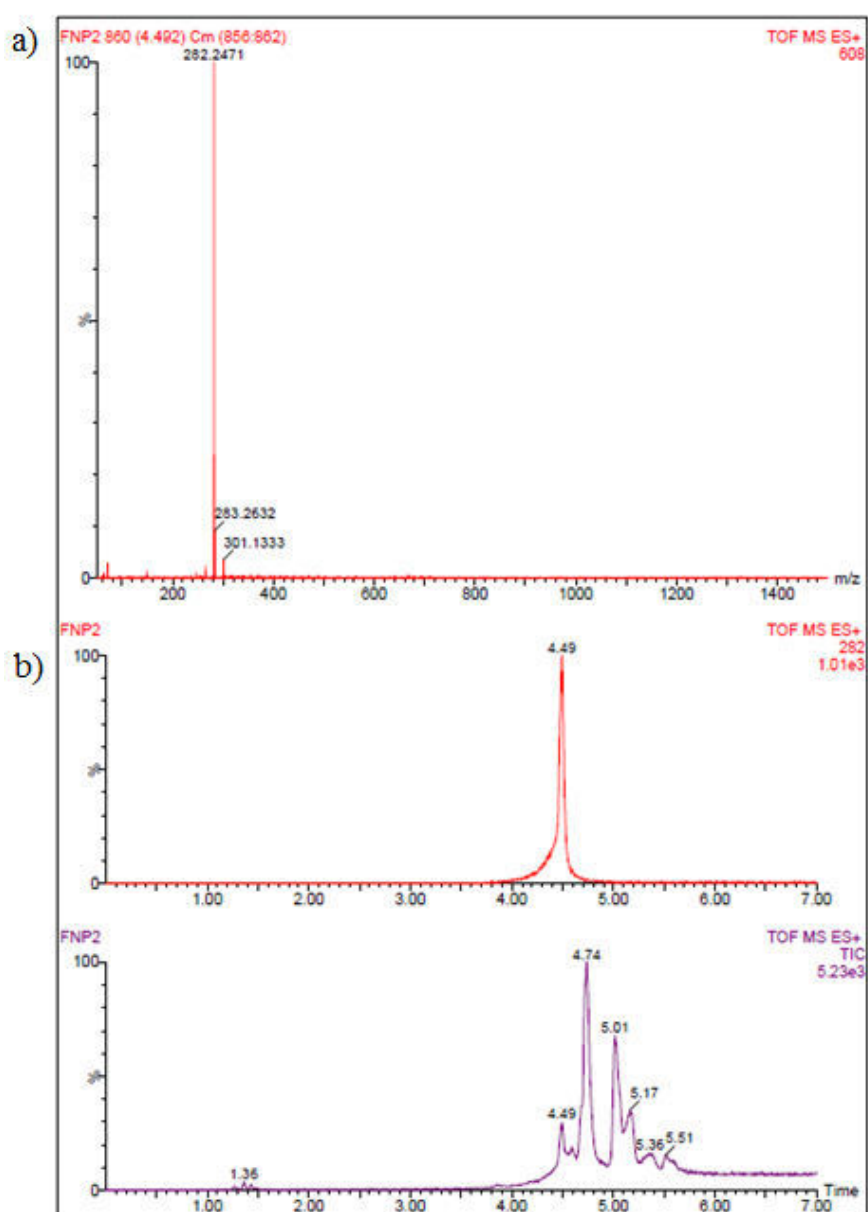


Slika 3.12. RDF u odnosu na rastojanje CM jednog molekula fulerenola od CM preostalih molekula fulerenola na temperaturama od 295 (crna boja) i 315 K (crvena boja) u sistemu od 32 molekula fulerenola (Vranes i dr. 2017)

3.4. ISPITIVANJE I KARAKTERIZACIJA UZORAKA PRIMENOM UPLC/MS/MS

Fulerenol

Hromatogrami i maseni spektar fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ su predstavljeni na slici 3.13. Hromatogram (Slika 3.13.b) ukazuje na retenciono vreme 4,49. Pregledom masenih spektara svakog pika utvrđeno je da hromatografski pik koji se nalazi na 4,49 min potiče od fulerenola čija je masa 1128,8196 Da. MS spektar predstavlja potomke (m/z 282,2471) nastale fragmentacijom polianjonskog molekula fulerenola sa 24 hidroksilne grupe (m/z $1128,8196/4 = 282,205$).

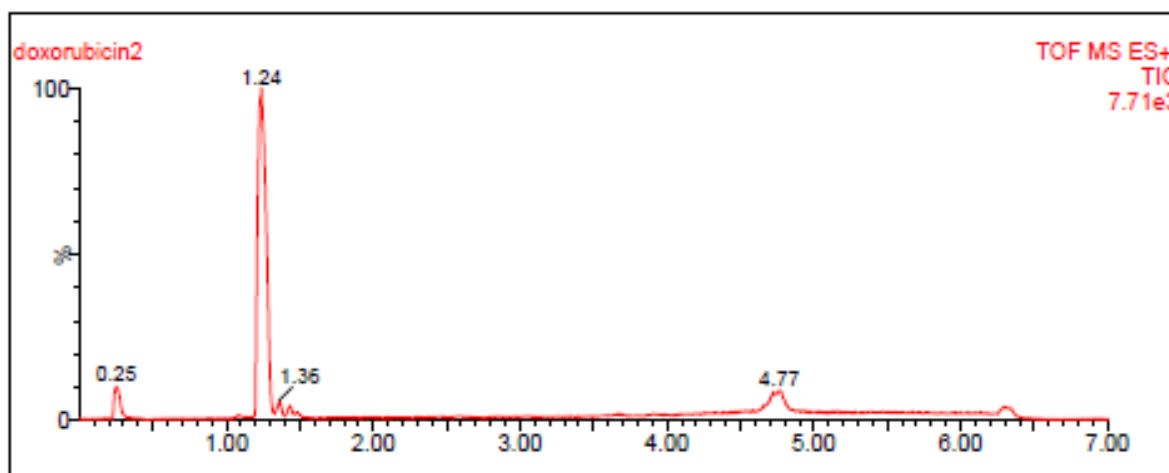


Slika 3.13. TOF ES+ Maseni spektar a) i hromatogram i b) fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ (Preuzeto i modifikovano iz: (Seke i dr., 2016)

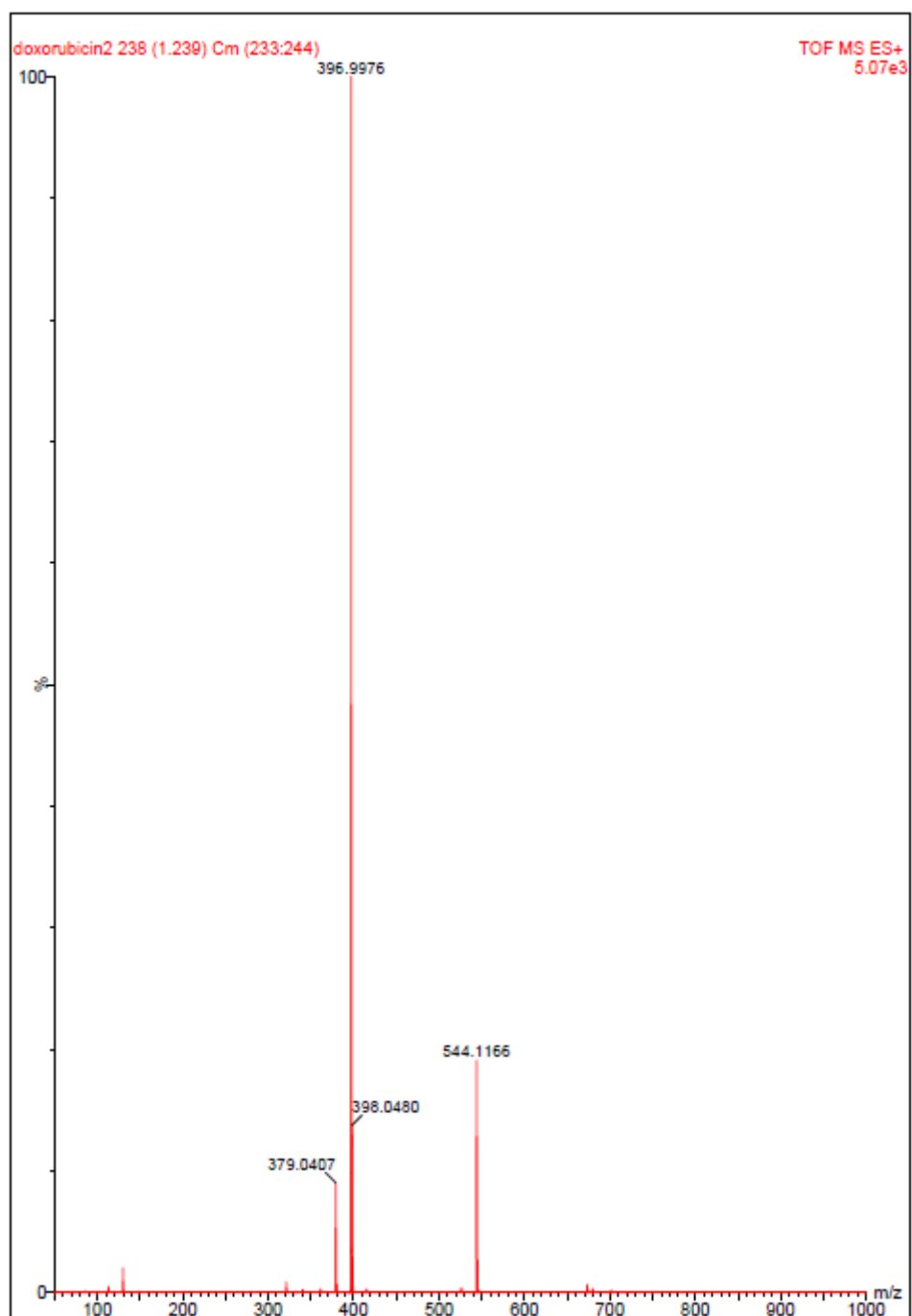
Doksorubicin

Na slici 3.14. je predstavljen hromatogram komercijalnog leka Adriblastina®/Adriamycin® Pfizer sa aktivnim principom doksorubicinom, dok slike 3.15. i 3.16. predstavljaju MS i MS/MS spektar doksorubicina, redom, gde je propuštajući samo jon doksorubicina i izlažući ga gasu u kolizionoj ćeliji i odgovarajućoj energiji dobijena njegova fragmentacija i skeniranjem snimljen spektar njegovih potomaka. ESI izvor je bio operativan u pozitivnom jonizacionom modu po ugledu na literaturne podatke (Ma i dr. 2015).

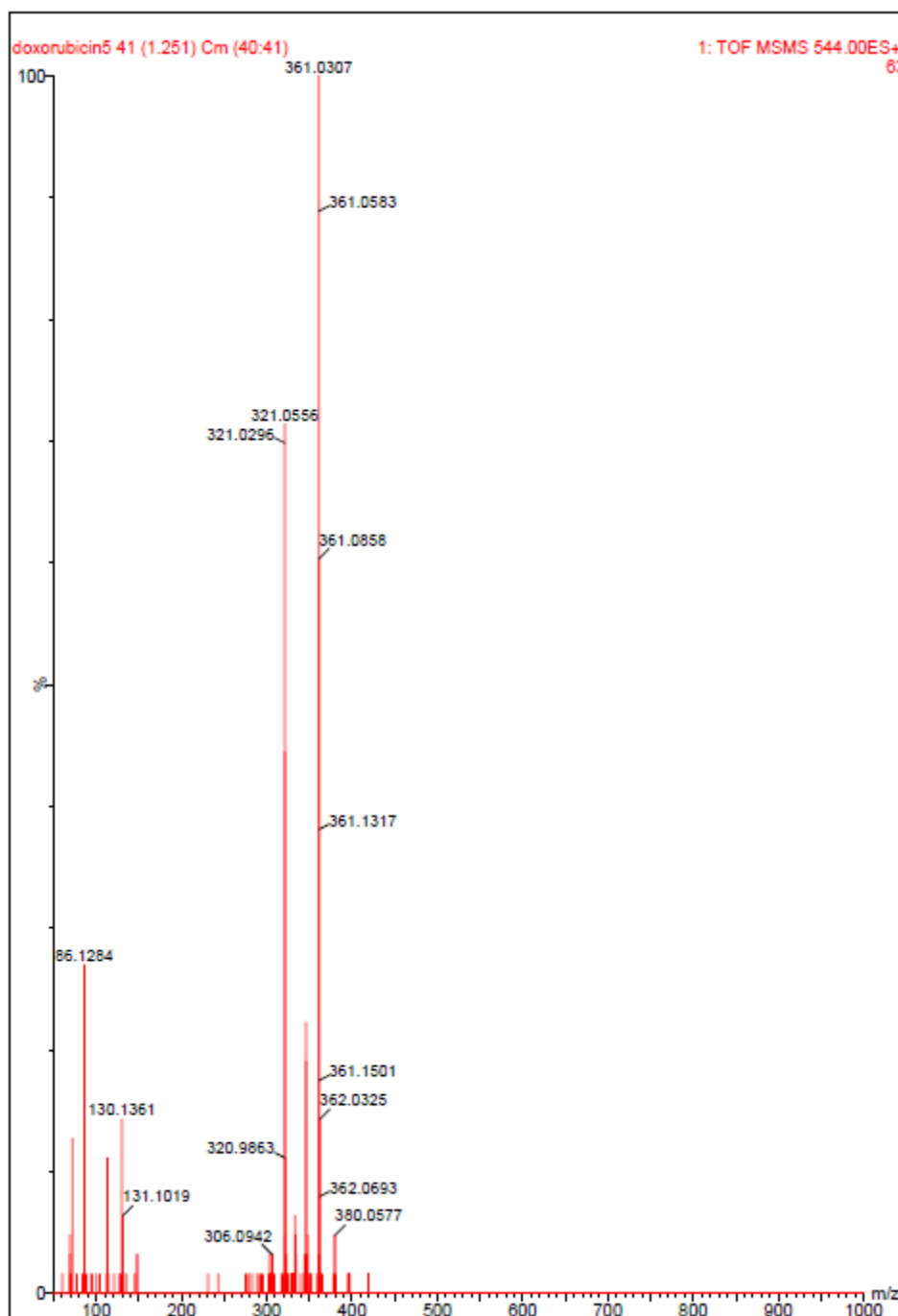
U spektrima komercijalnog proizvoda u kojem se nalazi doksorubicin, fragment koji se nalazi na vrednosti 544,1166 predstavlja molekularni jon čija masa je umanjena za jedan elektron. Ta informacija je dalje korišćena pri MS/MS eksperimentima.



Slika 3.14. Hromatogram ADRIBLASTINA®RD (aktivni princip doksorubicin; RV=1,24)



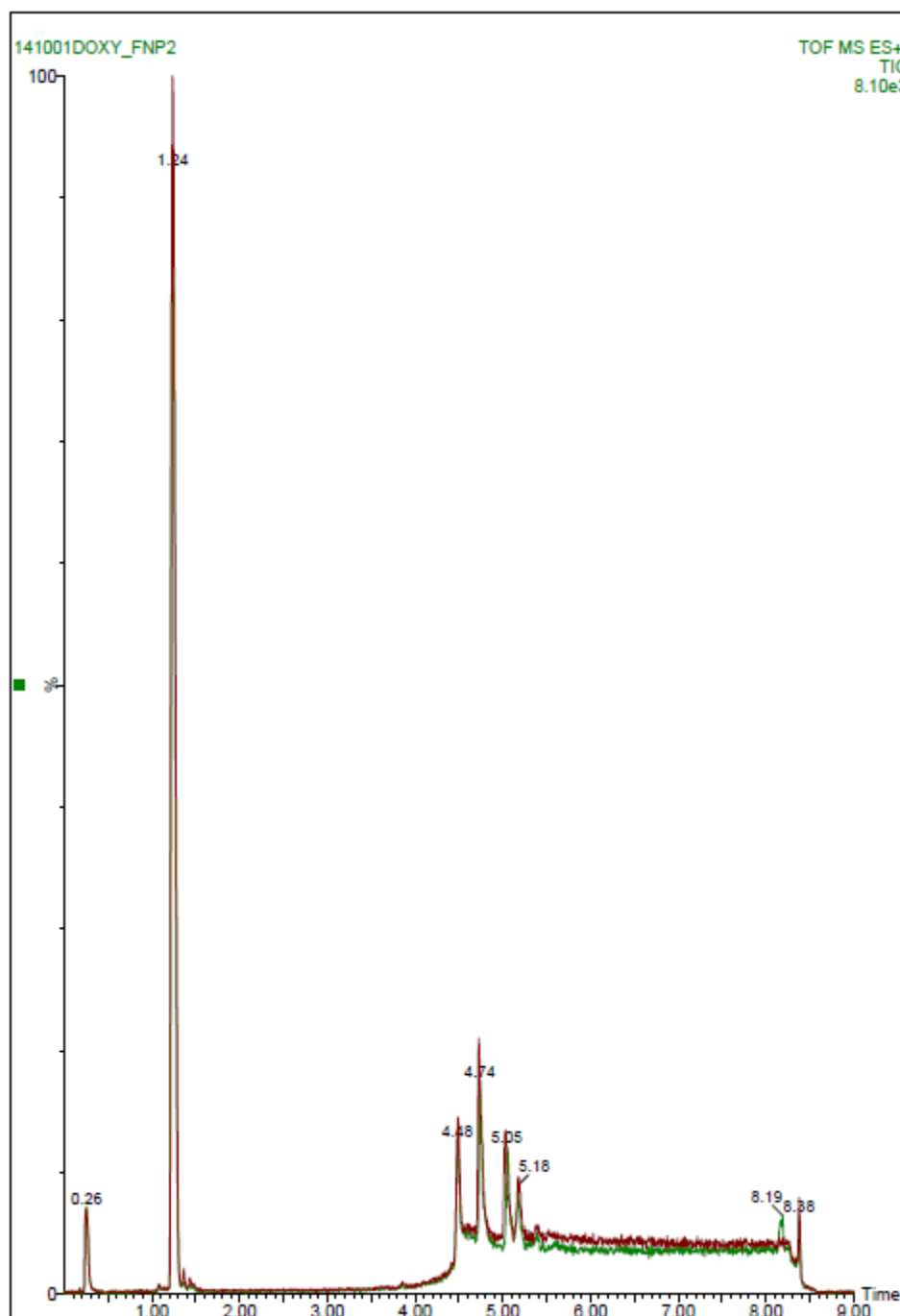
Slika 3.15. TOF ES+ MS spektar ADRIBLASTINA[®] RD (aktivni princip: doksorubicin)
(Seke i dr. 2016)



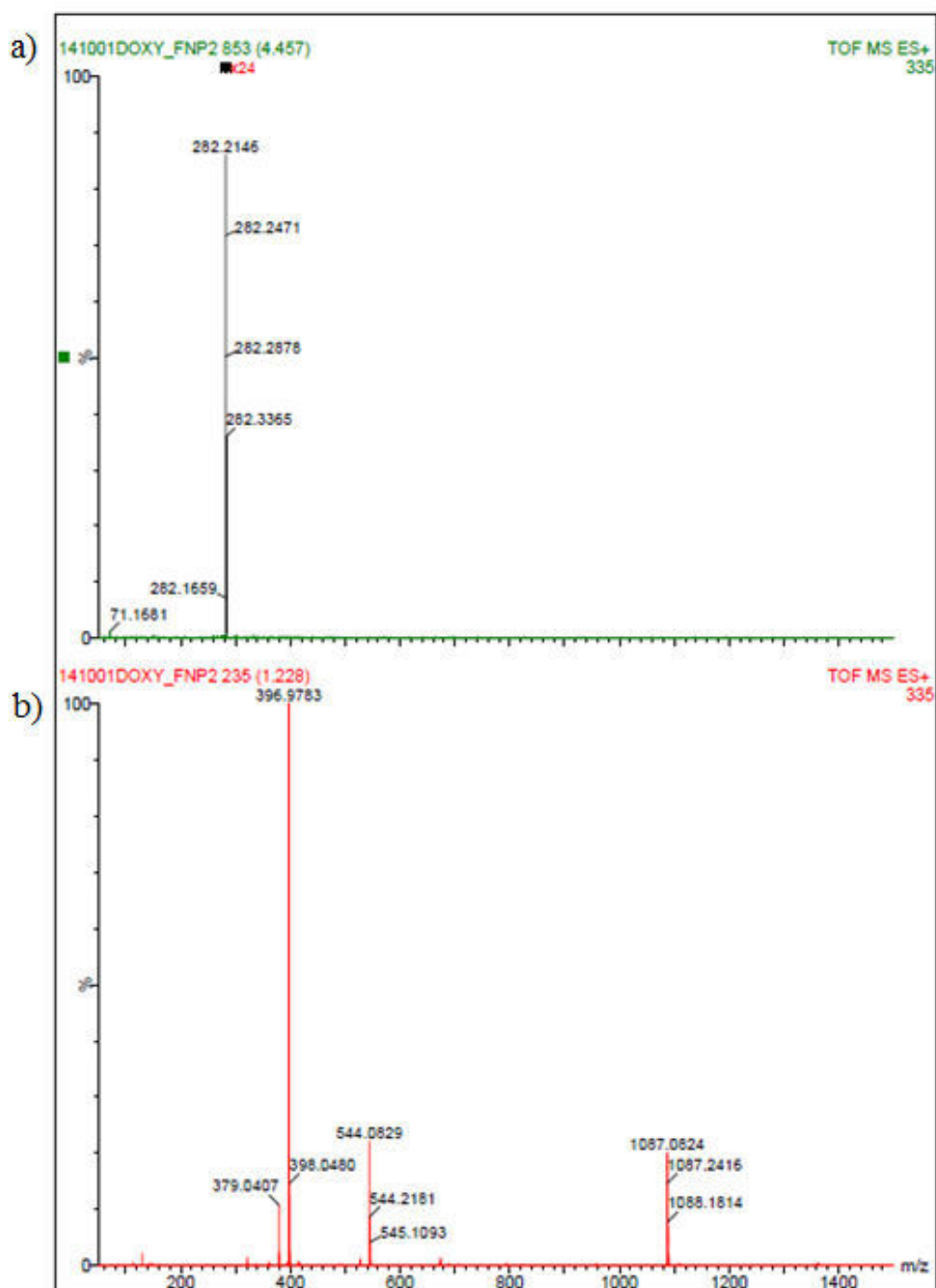
Slika 3.16. TOF ES+ MS/MS spektar ADRIBLASTINA[®] RD (aktivni princip: doksorubicin)
(Seke i dr. 2016)

Nanokompozit

Na slikama 3.17. i 3.18. predstavljeni su hromatogram i MS spektar nanokompozita FNP/DOX, redom.



Slika 3.17. Hromatogram nanokompozita FNP/DOX



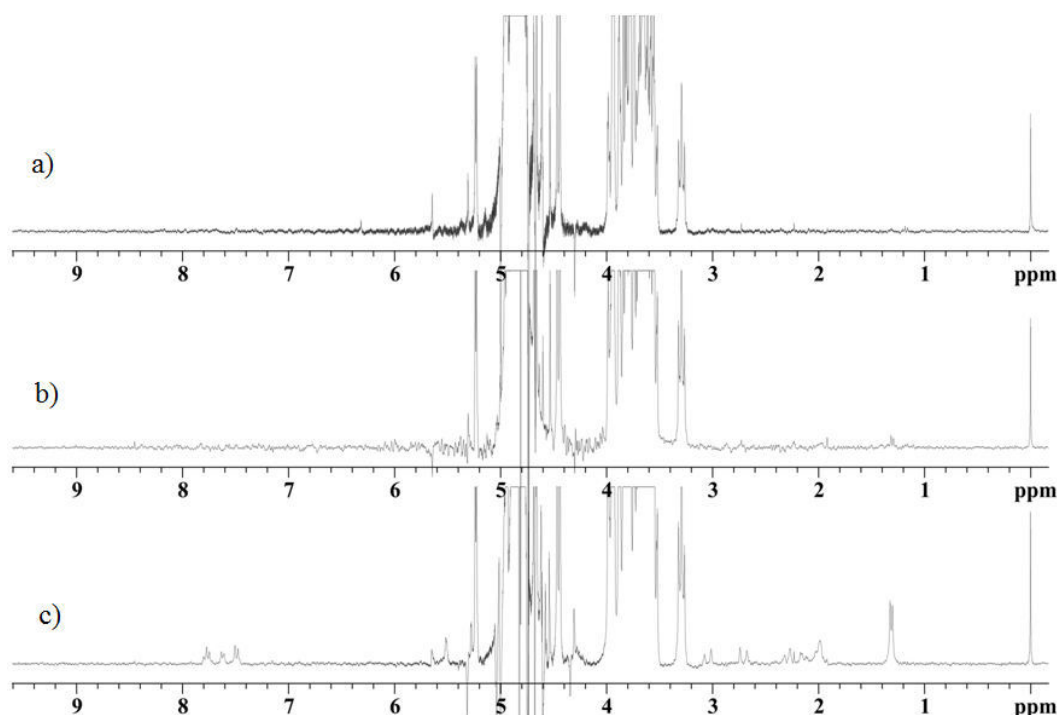
Slika 3.18. TOF ES+ MS spektar nanokompozita FNP/DOX

- spektar pika na 4,457 min (FNP)
- spektar pika na 1,228 min (DOX)

U cilju ispitivanja stabilnosti, kao i utvrđivanja mogućih kovalentnih interakcija između FNP i DOX u nanokompozitu FNP/DOX urađena je kvantifikacija uzoraka na dve talasne dužine (215 i 476 nm) tako što je praćen samo fragment 544,1122. Rezultati ovog eksperimenta su priloženi u Prilogu ove disertacije.

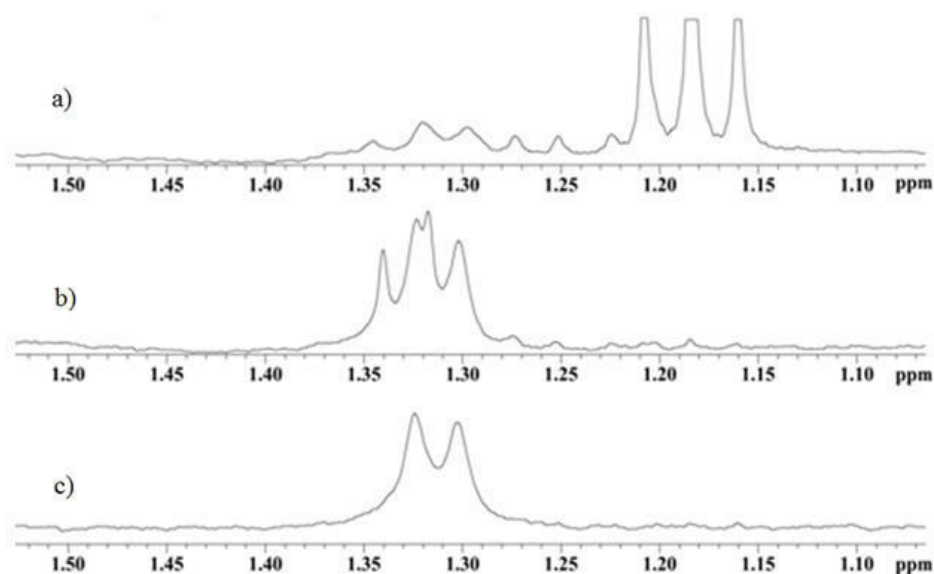
3.5. ISPITIVANJE I KARAKTERIZACIJA NANOKOMPOZITA FNP/DOX PRIMENOM NMR SPEKTROSKOPIJE

^1H NMR spektri uzoraka različitih moljskih odnosa nFNP:nDOX (8:13, 4:13 i 1:13) su snimljeni u cilju istraživanja međumolekulskih interakcija između fulerenola i doksorubicina u nanokompozitu FNP/DOX. Porast moljskog udela FNP vodi do smanjenja i gubitka signala aromatičnih protona na δ 7,76 ppm (t), 7,64 ppm (d), 7,48 ppm (d), i signala asigniranog kao metil grupa šećerne komponente doksorubicina na δ 1,32 ppm (d) (Slika 3.19.). Pored toga, primetno je i nestajanje signala na sledećim ppm: 2,0; 2,2; 2,3; 2,7; 3,0; 5,5.



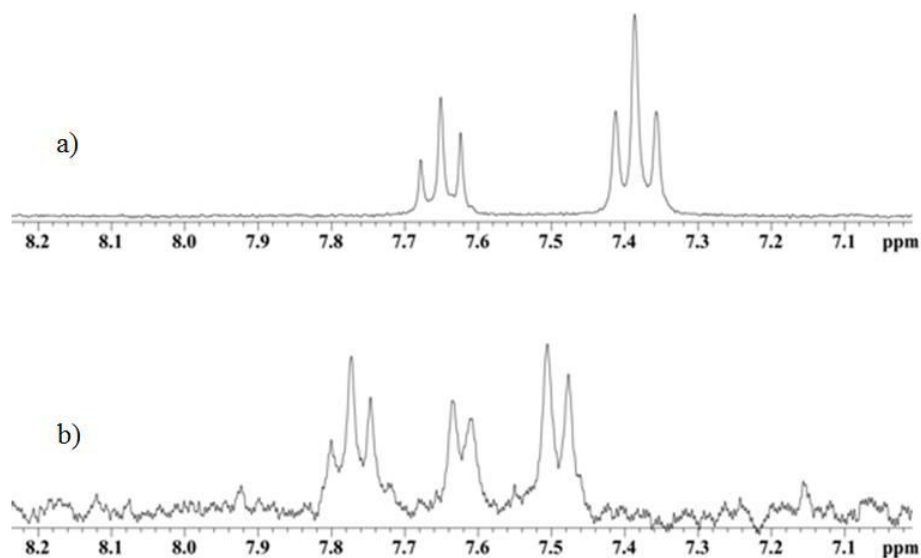
Slika 3.19. Uticaj različitog moljskog odnosa fulerenola i doksorubicina (Jović i dr., 2016)
a) 8:13 b) 4:13 c) 1:13 na hemijski pomeraj aromatičnih protona i metil grupe doksorubicina

Sa „starenjem” uzorka (slika 3.20.) oblik i položaj signala metil grupe šećerne komponente doksorubicina se značajno menjaju. Odmah nakon pripreme uzorka primećuje se dublet na δ 1,32 ppm. Nakon sedam dana od pripreme se primećuje triplet, dok mesec dana nakon pripreme predominantni signal postaje triplet na δ 1,18 ppm.



Slika 3.20. Hemijski pomeraj signala metil grupe šećerne komponente doksorubicina u uzorku molskog odnosa $n_{\text{FNP}}:n_{\text{DOX}} = 1:13$ nakon mesec dana b) nakon sedam dana c) nakon pripreme (Jović i dr. 2016)

Druga familija detaljnije ispitivanih signala su aromatični protoni doksorubicina, čiji su hemijski pomeraji prikazani na slici 3.21.

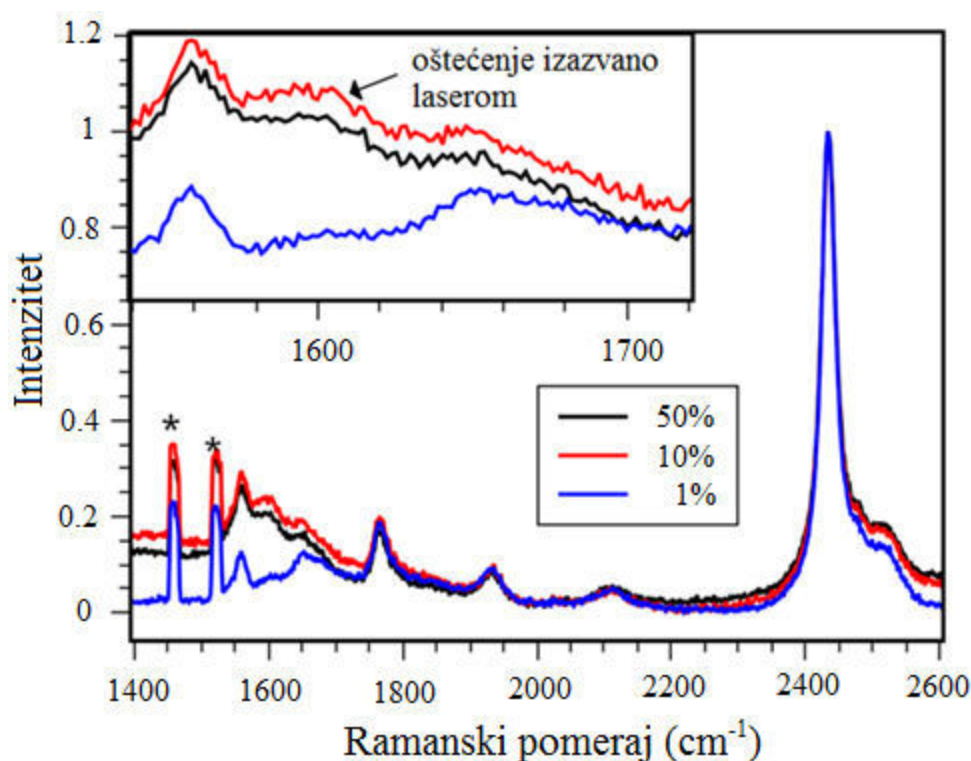


Slika 3.21. Hemijski pomeraj aromatičnih protona u uzorku molskog odnosa $n_{\text{FNP}}:n_{\text{DOX}} = 1:13$ a) u koncentrovanom uzorku b) u razblaženom uzorku (1:6) (Jović i dr. 2016)

Kod koncentrovanijeg uzorka dominantni signali su sledeći: δ 7,34 ppm (t) i δ 7,62 (t). Sa razblaženjem uzorka dolazi do transformacije pikova i pomeraja ka nižem magnetnom polju te su signali sledeći: 7,46 (d), 7,60 (d) i 7,74 (t).

3.6. RAMANSKA SPEKTROSKOPIJA

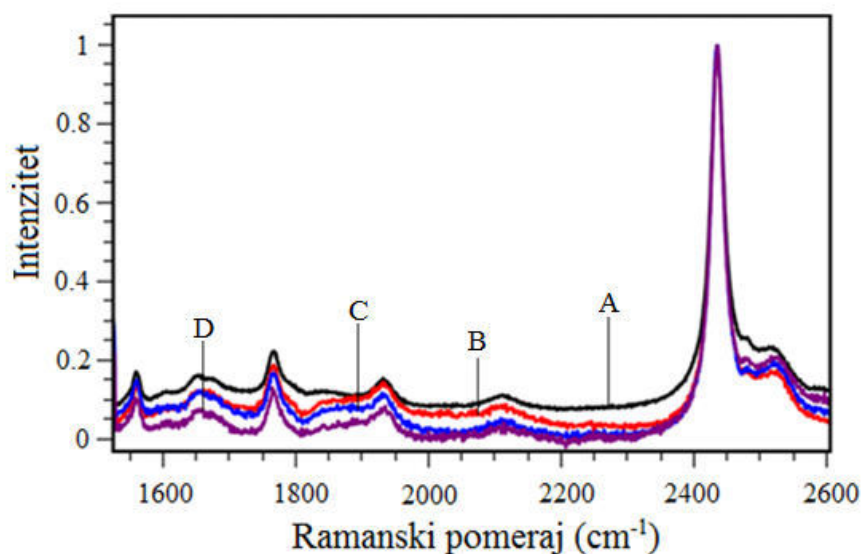
Pre pristupanja karakterizaciji ugljeničnih nanomaterijala Ramanskom spektroskopijom, neophodno je razumeti uticaj jačine lasera na jedan takav uzorak (Hodkiewicz & Scientific, bez dat.). Pored mogućnosti oštećenja uzorka moguće je i pregrevanje uzorka, što bi dovelo do neadekvatnih spektara. Stoga, da bi se uzorkom bezbedno rukovalo i merenja bila pouzdana, potrebno je ispitati gornje granice snage lasera, zbog čega je prvi korak bio ispitivanje odgovora fulerenola na različite jačine lasera. Rezultat je predstavljen na slici 3.22. Meren je uzorak fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ u čvrstom stanju, a primenjene snage lasera su bile sledeće: 1, 10, 50 mW.



Slika 3.22. Ramanski spektar praša fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ na različitim snagama lasera

Snimanjem fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ dobijaju se Ramanski spektri na kojima se uočavaju maksimumi traka na sledećim približnim vrednostima talasnih brojeva: 1460, 1520, 1560, 1650, 1770, 1930, 2110 i 2450 cm^{-1} . Uveličani deo spektra na slici 3.22. ukazuje na pojavu maksimuma na oko 1600 cm^{-1} , okarakterisanih kao degradacija uzorka usled primene neodgovarajuće snage lasera (Hodkiewicz & Scientific, bez dat.).

Pored utvrđivanja odgovarajuće snage lasera, ispitana je i zavisnost Ramanskih spektara od koncentracije fulerenola u vodenim rastvorima (A: 12 mg/cm³, B: 125 mg/cm³, C: 625 mg/cm³ i D: 5 g/cm³) i rezultati su predstavljeni na slici 3.23.



Slika 3.23. Zavisnost Ramanskih spektara od koncentracije fulerenola_(aq)

Snimanjem vodenih rastvora različitih koncentracija fulerenola C₆₀(OH)₂₄ dobijaju se Ramanski spektri na kojima se uočavaju maksimumi traka na sledećim približnim vrednostima talasnih brojeva: 1560, 1650, 1770, 1930, 2110 i 2450 cm⁻¹.

Vodeni rastvori predstavljaju najpogodnije okruženje za proučavanje interakcija fulerenola sa doksorubicinom, gde je Ramanska spektroskopija jedna od retkih koja daje uvid u strukturne detalje. S obzirom na snažnu fluorescenciju doksorubicina pri ekscitaciji laserom talasne dužine 488 nm, koja onemogućuje dalje tumačenje Ramanskih spektara, ispitivanje vodenih rastvora nanokompozita FNP/DOX, kao i samog leka, je izvršeno primenom lasera talasne dužine 785 nm.

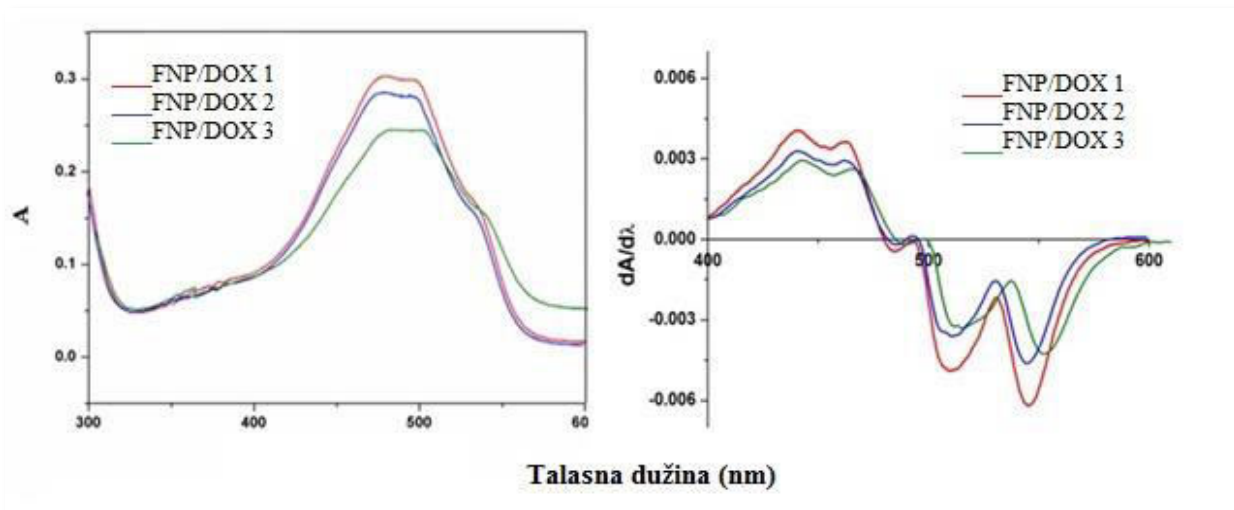
Na slikama priloženim u Prilogu P7-9 su predstavljeni uporedni Ramanski spektri doksorubicina i nanokompozita FNP/DOX različitih odnosa komponenti snimljeni u vodenom rastvoru odmah po nanošenju na podlogu, kao i nakon 3h i 24h sušenja na podlozi, redom. Većina traka se javlja u opsegu 300-500 cm⁻¹, kao i u opsegu 1000-1700cm⁻¹, gde su najintenzivniji maksimumi na sledećim približnim vrednostima talasnog broja: 440, 760, 1210-1240, 1330, 1450, 1630 cm⁻¹.

3.7. ISPITIVANJE UZORAKA PRIMENOM UV/VIS SPEKTROSKOPIJE

U cilju proučavanja mogućih nekovalentnih interakcija između doksorubicina i fulerenola izvršeno je UV/VIS spektroskopsko ispitivanje vodenih rastvora sa različitim odnosima ove dve komponente. Pretpostavka je da doksorubicin kao derivat antraciklina i molekul sa nekoliko elektron-donorskih (karbonilne grupe, elektronski π -sistemi aromatičnih prstenova) i elektron-akceptorskih grupa (hidroksilna i amino grupa) može graditi molekulske komplekse povezane slabim nekovalentnim interakcijama. Sa druge strane, fulerenol takođe poseduje slične donorsko-akceptorske grupe i kao takav može graditi agregate nekovalentnog tipa. Promena položaja i oblika traka ovih funkcionalnih grupa ukazivala bi na građenje pretpostavljenih molekulskih kompleksa.

Doksorubicin, kao i ostali derivati antraciklina, u UV/VIS spektralnoj oblasti u opsegu talasnih dužina 290-480 nm pokazuju trake elektronskih prelaza $n-\pi^*$ i $\pi-\pi^*$ tipa. Naime, traka (rame) u opsegu od 320-350 nm pripada asociranim prelazima $n-\pi^*$ tipa karbonilnih grupa doksorubicina. Traka na 480 nm pripada $\pi-\pi^*$ prelazima konjugovanih elektrona planarnog aromatičnog sistema antraciklina. Ova traka najčešće se ispituje kod agregacije antraciklinskih jedinjenja, karakteristike ove trake veoma zavise od samoagregacije, agregacije i pH vrednosti (Samorì i dr., 1987). U ovom ispitivanju posmatrane su promene spektralnih karakteristika ove trake.

Na slici 3.24. prikazani su spektri koji predstavljaju zavisnost apsorbancije doksorubicina na različitim talasnim dužinama u prisustvu različitih koncentracija fulerenola, takođe dati su i prvi izvodi spektara. Absorpcioni spektar doksorubicina u vidljivoj oblasti pokazuje tri trake: 479, 496 i 529 nm.

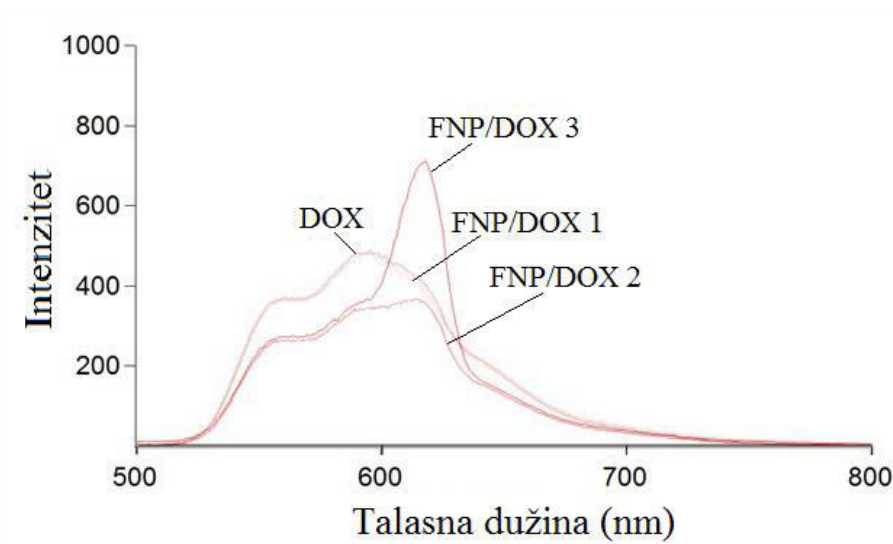


Slika 3.24. Zavisnost apsorbancije doksorubicina na različitim talasnim dužinama u prisustvu fulerenola različitih koncentracija (levo): $3,47 \cdot 10^{-5} \text{ mg/cm}^3$ (FNP/DOX 1); $3,47 \cdot 10^{-4} \text{ mg/cm}^3$ (FNP/DOX 2); $3,47 \cdot 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$ (FNP/DOX 3) i prvi izvodi krivih (desno)

Kako se na slici može uočiti, sa povećanjem koncentracije fulerenola dolazi do hipohromnog efekta i blagog crvenog pomeranja traka. Takođe, izobestička tačka može se uočiti na talasnoj dužini od 538 nm. U odnosu na trake nanokompozita dobijene za koncentracije $3,47 \cdot 10^{-5} \text{ mg/cm}^3$ i $3,47 \cdot 10^{-4} \text{ mg/cm}^3$, traka nanokompozita sa $3,47 \cdot 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$ značajno je niže apsorbancije i pomerena je ka višim vrednostima talasnih dužina.

3.8. ISPITIVANJE UZORAKA PRIMENOM SPEKTROFLUOROMETRIJE

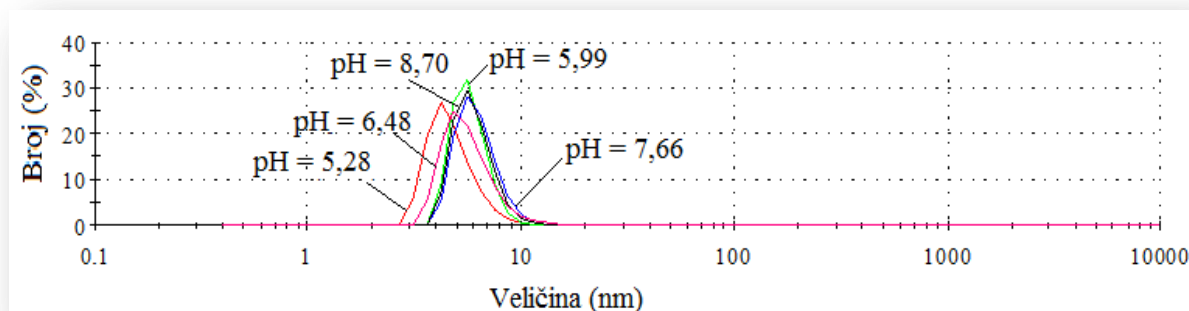
Doksorubicin po ekscitaciji izvorom svetlosti talasne dužine od 480 nm pokazuje dva maksimuma fluorescentnog pika, na oko 560 nm i na oko 590 nm, što je iskorišćeno za praćenje građenja nekovalentnih interakcija između doksorubicina i fulerenolskih nanočestica u vodenim rastvorima različitih odnosa ove dve komponente. Sa slike 3.25. na kojoj je predstavljena zavisnost fluorescencije doksorubicina na različitim talasnim dužinama u prisustvu fulerenola različitih koncentracija ($3,47 \cdot 10^{-5} \text{ mg/cm}^3$; $3,47 \cdot 10^{-4} \text{ mg/cm}^3$; $3,47 \cdot 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$) se može primetiti da sa porastom koncentracije fulerenola u nanokompozitu FNP/DOX, pri istoj koncentraciji DOX, dolazi do smanjenja intenziteta oba maksimuma (560 nm i 590 nm) DOX, i pojave novog maksimuma na nešto višoj talasnoj dužini, oko 610 nm.



Slika 3.25. Zavisnost fluorescencije doksorubicina na različitim talasnim dužinama u prisustvu fulerenola različitih koncentracija: $3,47 \cdot 10^{-5} \text{ mg/cm}^3$ (FNP/DOX 1); $3,47 \cdot 10^{-4} \text{ mg/cm}^3$ (FNP/DOX 2); $3,47 \cdot 10^{-3} \text{ mg/cm}^3$ (FNP/DOX 3)

3.9. KARAKTERIZACIJA UZORAKA PRIMENOM DLS

U cilju ispitivanja uticaja pH vrednosti sredine na veličinu fulerenolskih nanočestica urađena su DLS merenja veličine čestica i zeta potencijala čestica vodenih uzoraka FNP u rastvorima sledećih pH vrednosti: 5,28; 5,99; 6,48; 7,66; 8,70 i rezultati merenja su predstavljeni na slici 3.26. i tabeli 3.4. (zeta-potencijal).



Slika 3.26. Zavisnost raspodele veličine čestica po broju u vodenom rastvoru FNP ($c=0,125 \text{ mg/cm}^3$) od pH medijuma

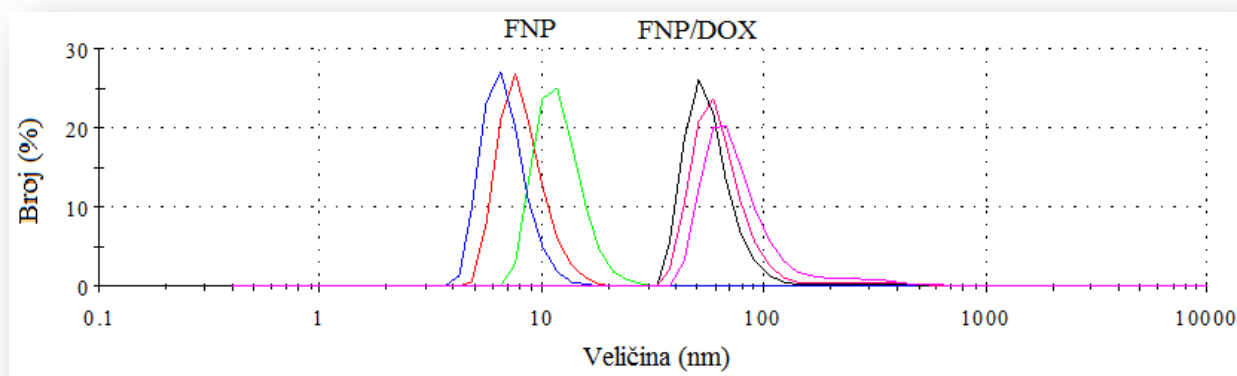
Rezultati DLS merenja na slici 3.26. prikazuju raspodelu čestica po broju i ukazuju na to da je u svim ispitivanim rastvorima najveći broj čestica srednje veličine dijametra oko 5-6 nm, sa opsegom veličina čestica 2-10 nm.

Tabela 3.4. Zeta potencijal čestica u vodenim rastvorima FNP različite pH vrednosti pri koncentraciji FNP $c=0,125 \text{ mg/cm}^3$

pH medijuma	ζ-potencijal čestica [mV]	Detaljni prikaz ζ-potencijala čestica		
5,28	-15,9	39,8%: $-31,2 \pm 6,92$	27%: $-50,4 \pm 9,37$	6,2%: $-5,13 \pm 4,74$
5,99	-22,4	69,8%: $-37,7 \pm 9,18$	8,7%: $-14 \pm 4,61$	5,7%: $-65,8 \pm 5,38$
6,48	-10,3	96,8%: $-9,64 \pm 4,03$	3,2%: $-32,3 \pm 3,56$	/
7,66	-22,2	99,8%: $-22,1 \pm 8,83$	0,2%: $-112 \pm 1,53$	0,1%: $45,9 \pm 0,871$
8,70	-28	55,5%: $-18,1 \pm 8,27$	33,4%: $-36,8 \pm 5,13$	3,9%: $-61,3 \pm 7,45$

Veličina nanonosaa, kao i nove nanoformulacije leka imaju ključnu ulogu u njihovoj bioaktivnosti i biodostupnosti. Nanočestice veće od 300 nm aktiviraju komplementni sistem koji uklanja čestice iz organizma (Dobrovolskaia, Aggarwal, Hall, & Mcneil, 2009), zbog čega je fokus bio na odabiru FNP nanokompozita manjih dimenzija od ovih. Da bi se ispitale osobine sistema FNP/DOX u vodenom rastvoru, tj. njihova aglomeracija, veličina čestica i

zeta potencijal, pripremljena su tri sistema FNP/DOX pri čemu je koncentracija DOX zadržana konstantnom, dok je koncentracija FNP bila promenljiva. Raspodele veličina čestica vodenih rastvora FNP i FNP/DOX po broju su predstavljeni na slici 3.27., dok su zeta potencijali uzoraka predstavljeni u tabeli 3.5.



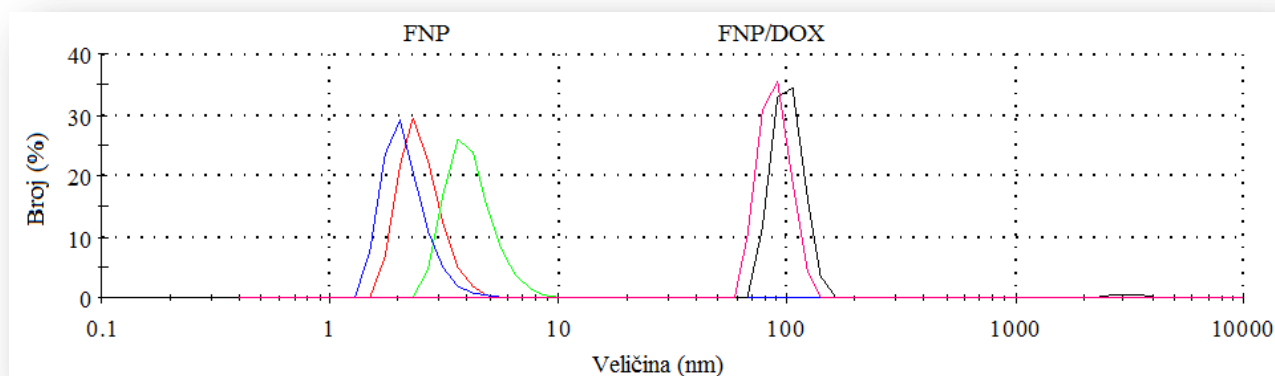
Slika 3.27. Raspodela veličine čestica po broju u vodenim rastvorima nanokompozita FNP/DOX i FNP pri inicijalnoj koncentraciji FNP $c=0,0125 \text{ mg/cm}^3$

Pri ispitivanju rastvora dobijenog mešanjem rastvora FNP koncentracije $c=0,0125 \text{ mg/cm}^3$ sa rastvorom DOX (Slika 3.28.) dobijeni su rezultati koji ukazuju na postojanje familija čestica opsega 30-100 nm, gde je najveći procenat čestica veličine 50-60 nm. Raspodela čestica po broju u uzorku vodenog rastvora FNP se proteže od 4-30 nm, sa najvećem brojem čestica veličine od oko 6, 8 i 10 nm.

Tabela 3.5. Zeta potencijal čestica u vodenim rastvorima nanokompozita FNP/DOX i FNP pri koncentraciji FNP $c=0,0125 \text{ mg/cm}^3$

FNP _{0,0125 mg/cm³} [mV]	FNP _{0,0125 mg/cm³} /DOX [mV]
-19,9	+28

Pri inicijalnoj koncentraciji FNP od $0,125 \text{ mg/cm}^3$ na slici 3.28. primećuje se postojanje familije čestica opsega veličina čestica 2-10 nm, sa najvećim procentom čestica veličine 2 i 5 nm, dok se u rastvoru nanokompozita FNP/DOX javlja familija čestica opsega veličina čestica 60-150 nm, sa najvećim brojem čestica nanokompozita FNP/DOX veličine 80-100 nm.



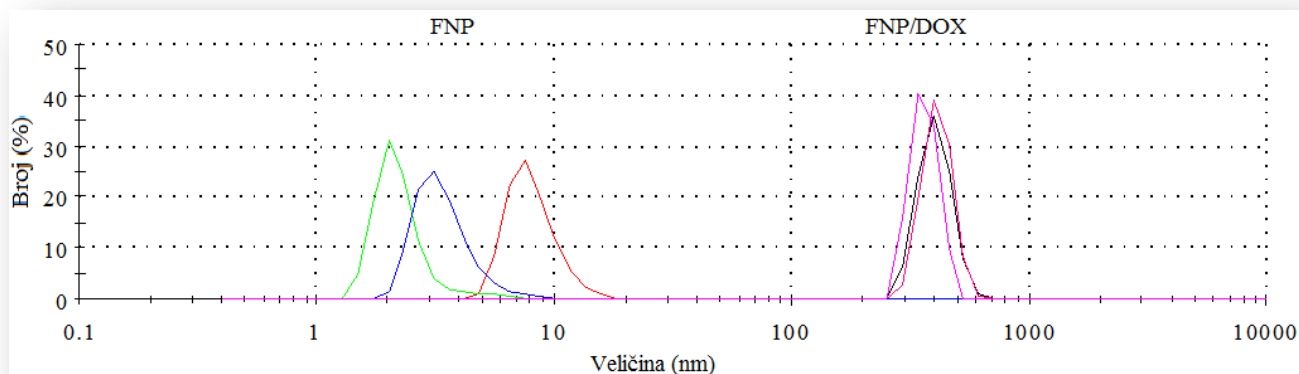
Slika 3.28. Raspodela veličine čestica po broju u vodenim rastvorima nanokompozita FNP/DOX i FNP pri inicijalnoj koncentraciji FNP $c=0,125 \text{ mg/cm}^3$

Zeta potencijal rastvora nanokompozita u kojem je koncentracija FNP $0,125 \text{ mg/cm}^3$ 48 h nakon pripreme rastvora ima vrednost $+35 \text{ mV}$; a 7 dana kasnije $+40,1 \text{ mV}$ (Tabela 3.6.). Ove vrednosti su više u poređenju sa vrednostima zeta potencijala $+28 \text{ mV}$ i $+28,9 \text{ mV}$ za nanokompozite u kojima je $c(\text{FNP})=0,0125 \text{ mg/cm}^3$ i $c(\text{FNP})=1,25 \text{ mg/cm}^3$, redom.

Tabela 3.6. Zeta potencijal čestica u vodenim rastvorima nanokompozita FNP/DOX i FNP pri koncentraciji FNP $c=0,125 \text{ mg/cm}^3$

FNP _{0,125 mg/cm³} [mV]	FNP _{0,125 mg/cm³} /DOX [mV]	FNP _{0,125 mg/cm³} /DOX [mV] nakon 7 dana
-27,4	+35	+40,1

U slučaju kada je koncentracija FNP $1,25 \text{ mg/cm}^3$, veličina čestica u rastvoru FNP se proteže od nepunih 2 nm do skoro 20 nm, sa najvećim brojem čestica veličine oko 2, 4 i 8 nm, dok je najveći procenat čestica nanokompozita FNP/DOX, čije se familije čestica javljaju u opsegu 250-700 nm, veličine 400-500 nm (slika 3.29.), dok je zeta potencijal čestica u vodenim rastvorima nanokompozita FNP/DOX i FNP pri koncentraciji FNP $c=1,25 \text{ mg/cm}^3$ predstavljen u tabeli 3.7.

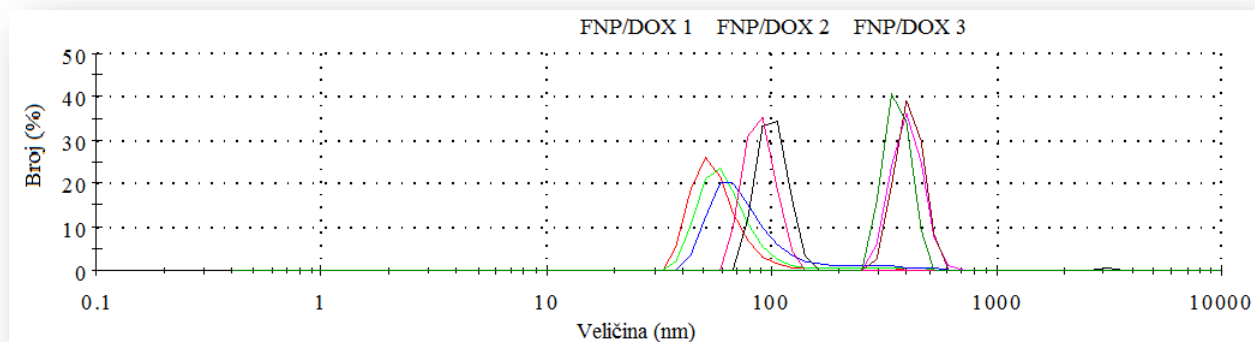


Slika 3.29. Raspodela veličine čestica po broju u vodenim rastvorima nanokompozita FNP/DOX i FNP pri inicijalnoj koncentraciji FNP $c=1,25 \text{ mg/cm}^3$

Tabela 3.7. Zeta potencijal čestica u vodenim rastvorima nanokompozita FNP/DOX i FNP pri koncentraciji FNP $c=1,25 \text{ mg/cm}^3$

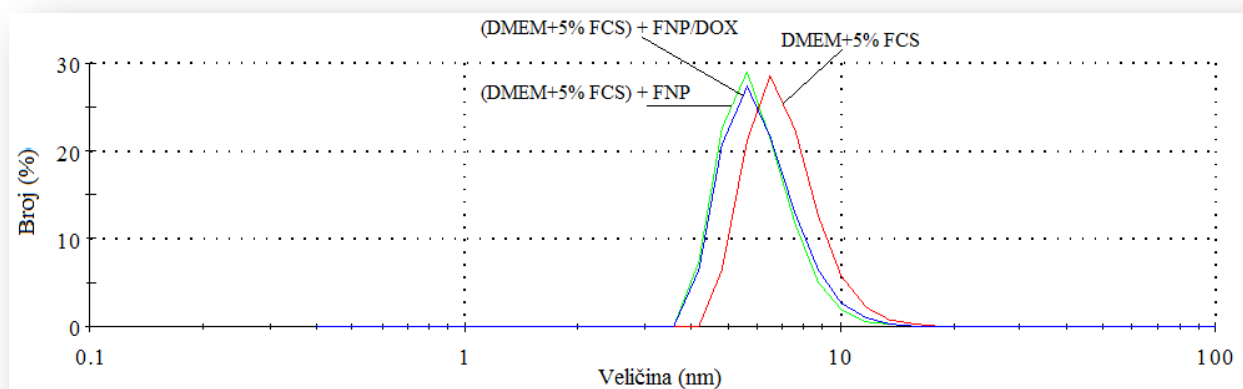
FNP _{1,25 mg/cm³} [mV]	FNP _{1,25 mg/cm³} /DOX [mV]
-23,7	+28,9

Sumarni prikaz raspodela veličine čestica po broju u vodenim rastvorima nanokompozita FNP/DOX pri različitim koncentracijama FNP je predstavljen na slici 3.30.



Slika 3.30. Pregled raspodele veličine čestica po broju u vodenim rastvorima nanokompozita FNP/DOX pri različitim koncentracijama FNP

Ćelijske linije se kultivišu u odgovarajućim ćelijskim medijumima, stoga da bi se mogao na validan način objasniti odgovor ćelija na primenu određene nanoformulacije, urađena su DLS merenja raspodele veličine čestica FNP i nanokompozita FNP/DOX u ćelijskom medijumu DMEM sa dodatkom 5% FCS. Rezultati merenja su predstavljeni na slici 3.31. i tabeli 3.8.



Slika 3.31. Raspodela veličine čestica FNP i nanokompozita FNP/DOX po broju u ćelijskom medijumu DMEM sa 5% FCS pri inicijalnoj koncentraciji FNP $c=0,125 \text{ mg/cm}^3$

Tabela 3.8. Zeta potencijal čestica medijuma, nanokompozita FNP/DOX i FNP u ćelijskom medijumu DMEM sa 5% FCS pri inicijalnoj koncentraciji FNP $c=0,125 \text{ mg/cm}^3$

DMEM+5% FCS [mV]	FNP u DMEM+5% FCS [mV]	FNP/DOX u DMEM+5% FCS [mV]
-7,83	-11,2	-8,62

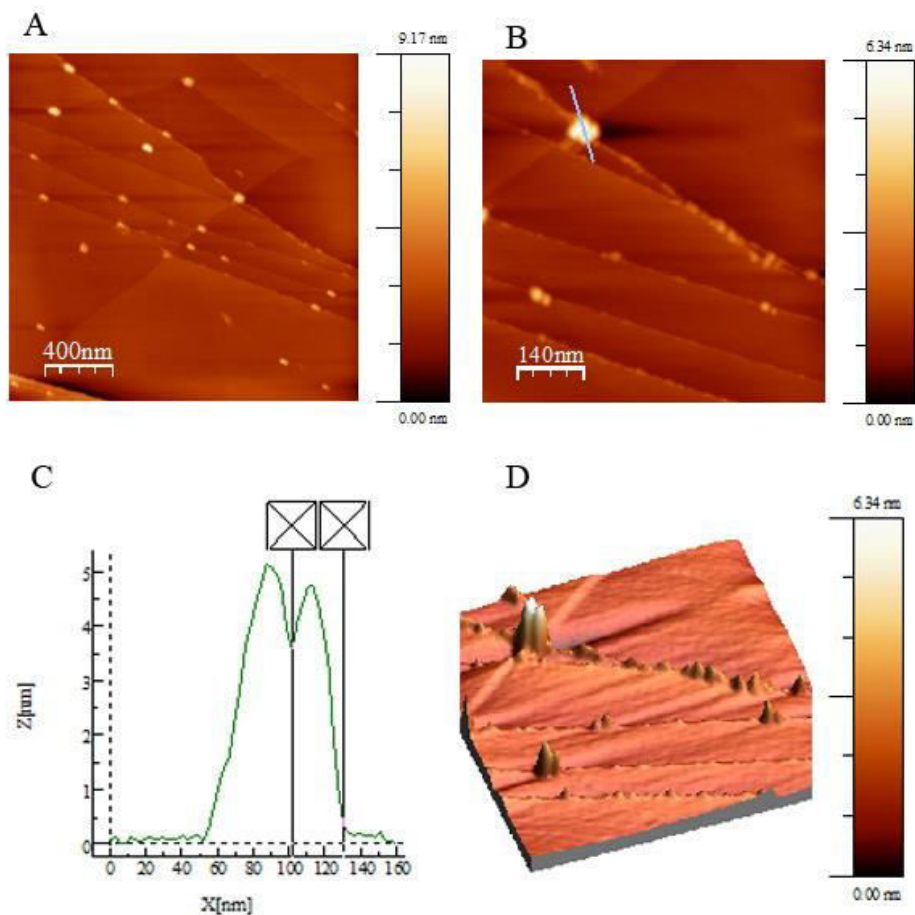
Rezultati raspodele veličine čestica po broju u ćelijskim medijumima za sva tri merena uzorka, medijum DMEM+5% FCS, FNP u medijumu, kao i FNP/DOX u medijumu, pokazuju skoro istovetni trend raspodele čestica (Slika 3.31.). U samom medijumu najveći broj čestica je veličine oko 8 nm, dok je u ostala dva uzorka najveći broj čestica veličine oko 6 nm.

Zeta potencijal FNP u medijumu (-11,2 mV) je, kako bi se i očekivalo, najniži. Zeta potencijal nanokompozita FNP/DOX u ćelijskom medijumu se očekivano povećava u poređenju sa zeta potencijalom FNP i dostiže vrednost -8,62 mV, što je u saglasnosti sa rezultatima Seke i saradnika (Seke i dr., 2016). S obzirom na to da su vrednosti zeta potencijala sva tri uzorka u opsegu $\pm 30 \text{ mV}$, može se sa vremenom očekivati dalja aglomeracija i udruživanje ovih manjih čestica u veće.

Ukoliko bi se rezultati merenja predstavili tako da se posmatra raspodela veličine čestica po intenzitetu, moguće je dobiti bolju predstavu o porodicama čestica koje postoje u ispitanim rastvorima (Slika P10).

3.10. KARAKTERIZACIJA UZORAKA PRIMENOM AFM

Nanokarakterizacija uzoraka FNP i FNP/DOX nanokompozita je urađena primenom mikroskopije atomskih sila. Uzorci su snimani 48 sati nakon pripreme, kao i nakon mesec dana, a u međuvremenu su čuvani na temperaturi od 22 °C u mraku.



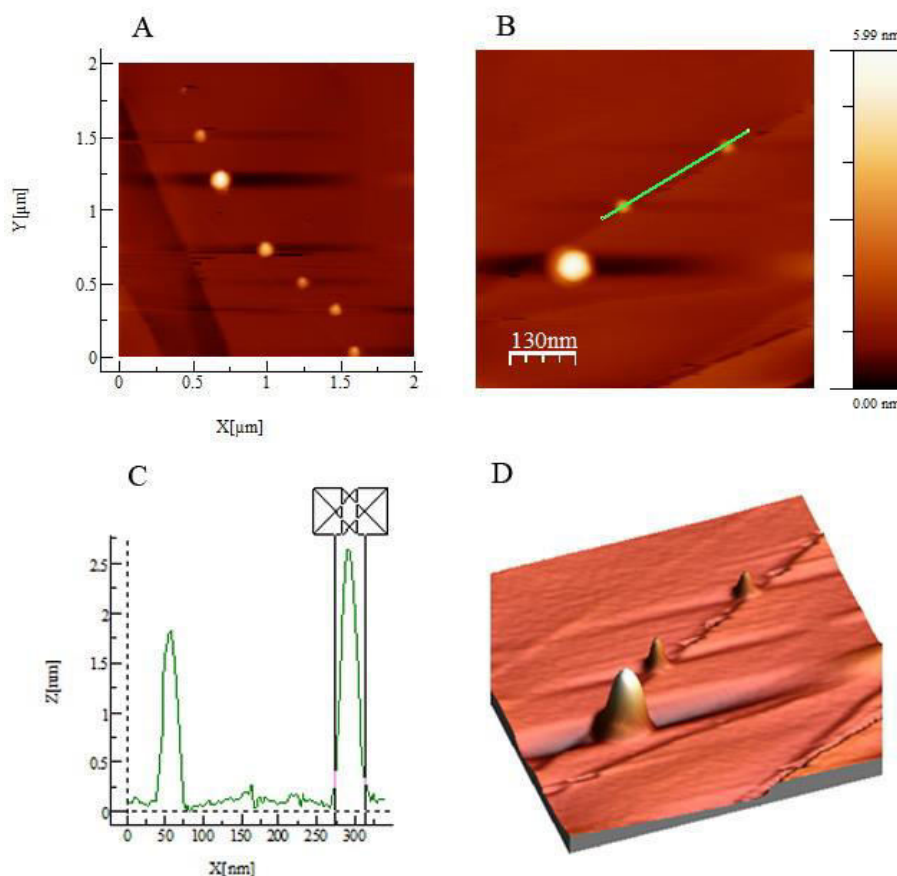
Slika 3.32. AFM rezultati merenja vodenog rastvora FNP nakon 48-časovnog stajanja u mraku na 22 °C na HOPG-u a) skala 2000 x 2000 nm² b) skala 710 x 710 nm² c) odgovarajući presek d) 3D prikaz (Jović i dr. 2016)

Na slici 3.32. su predstavljeni rezultati AFM merenja vodenog rastvora FNP (pH 6,5). Primećuje se nehomogenost uzorka, kao i prisustvo nanočestica, od kojih je analizirana čestica dijametra 79 nm, a sastavljena je od dve manje nanočestice veličina 29 i 50 nm i visine 5,1 nm. Ovi rezultati su poredivi sa rezultatima grupe Assemi i saradnika (Assemi i dr., 2010).

Veće čestice u uzorku su sačinjene od udruženih čestica (2-4) veličine 30 nm, pri čemu nije primećeno prisustvo čestica većih od 150 nm. Fulerenolske nanočestice su raspoređene po

terasama, što ukazuje na njihovu polarnost, što je u skladu sa merenjima zeta potencijala i literaturnim podacima (Vileno i dr. 2006).

Slika 3.33. predstavlja rezultat AFM merenja nanokompozita FNP/DOX snimljenog 48 h nakon pripreme i stajanja u mraku na 22 °C.

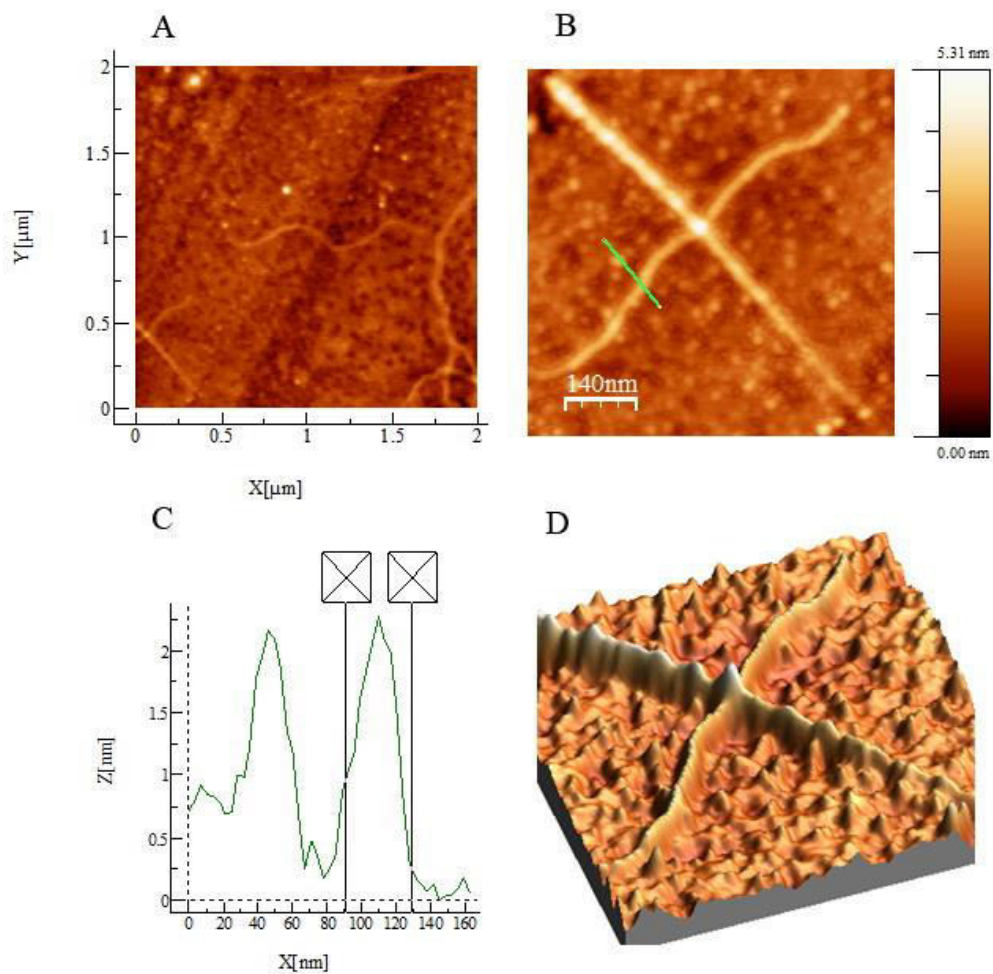


Slika 3.33. AFM rezultati merenja FNP/DOX nanokompozita nakon 48-časovnog stajanja u mraku na 22 °C a) skala 2000 x 2000 nm² b) skala 670 x 670 nm² c) odgovarajući presek d) 3D prikaz; čestice se nalaze na terasama HOPG a, što ukazuje na polarnost (Jović i dr. 2016)

Analizirane čestice u ovom uzorku su dijametra 37,5 nm, 39,2 nm i 86 nm i za razliku od FNP uzoraka ne može se jasno odrediti da li su sastavljene od više manjih čestica. Slika 3.33. c prikazuje odgovarajući presek analiziranih čestica, gde se vidi da je maksimalna visina 2,5 nm, dok je na slici 3.33. d predstavljen 3D prikaz čestica.

Slika 3.34. predstavlja AFM rezultate merenja FNP/DOX nanokompozita nakon 30-dnevnog stajanja u mraku na 22 °C. Morfološkom analizom je utvrđeno prisustvo dominantnih nanočestica veličine 30-40 nm, koje nanizane jedna do druge čine ukrštenu vlaknastu strukturu mikronskih dimenzija. Na d odeljku slike je predstavljen 3D prikaz FNP/DOX

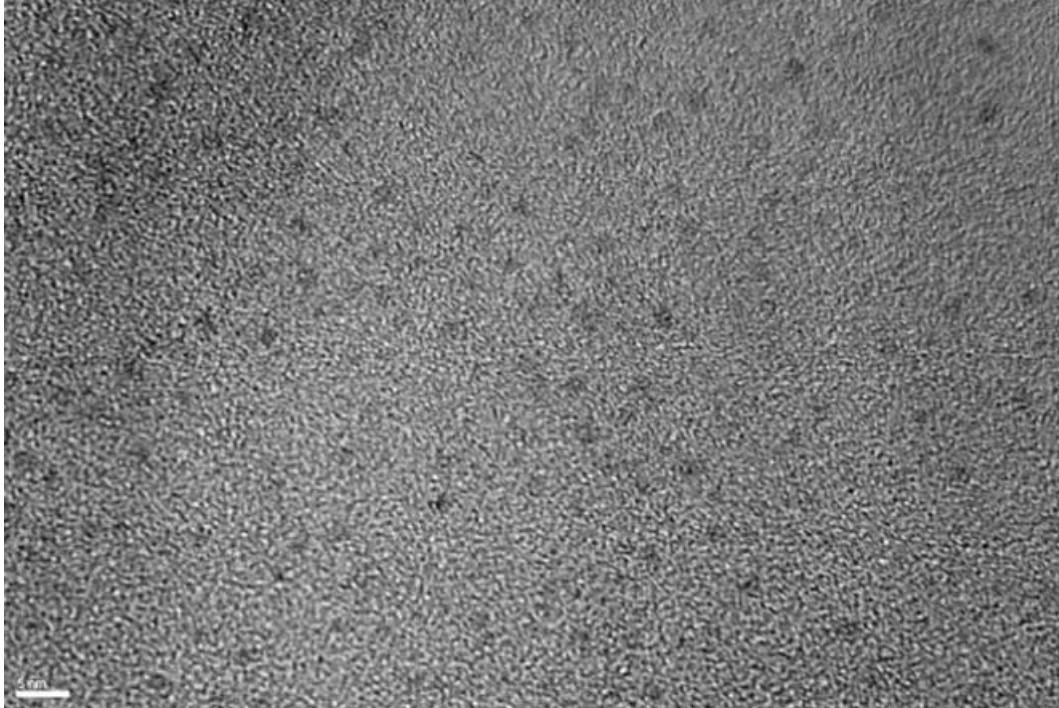
uzorka, gde se pored ukrštene vlaknaste strukture primećuje prisustvo čestica veličine i morfologije koja odgovara česticama starim 48 h.



Slika 3.34. AFM rezultati merenja FNP/DOX nanokompozita nakon 30-dnevnog stajanja u mraku na 22 °C a) skala 2000 x 2000 nm² b) skala 670 x 670 nm² c) odgovarajući presek d) 3D prikaz (Jović i dr. 2016)

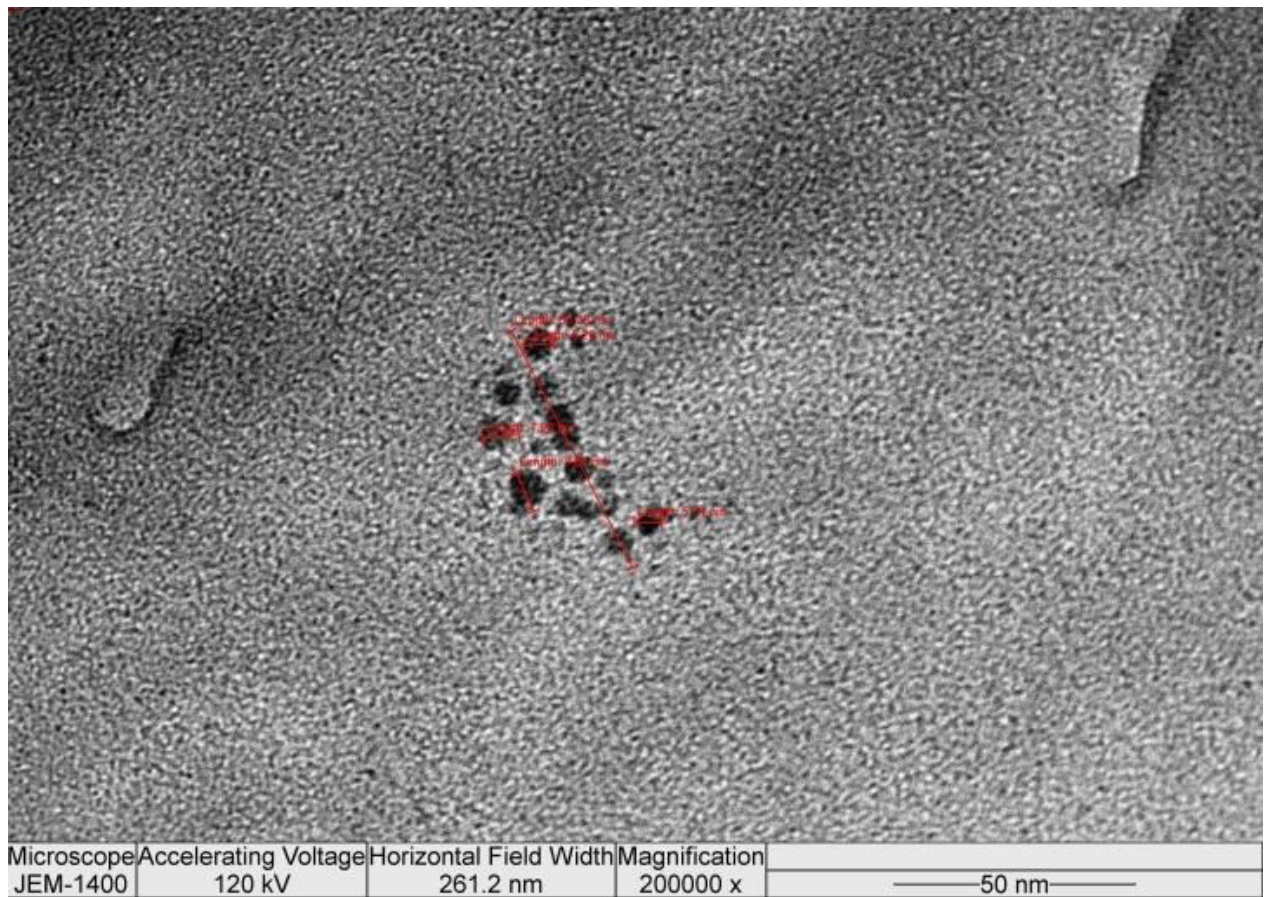
3.11. KARAKTERIZACIJA UZORAKA PRIMENOM TEM

Rezultati TEM merenja vodenog rastvora FNP nakon sonikacije su predstavljeni na slici 3.35., gde se mogu uočiti čestice veličine oko 2 nm.



Slika 3.35. Rezultati TEM merenja vodenog rastvora FNP nakon sonikacije (Jović i dr. 2016)

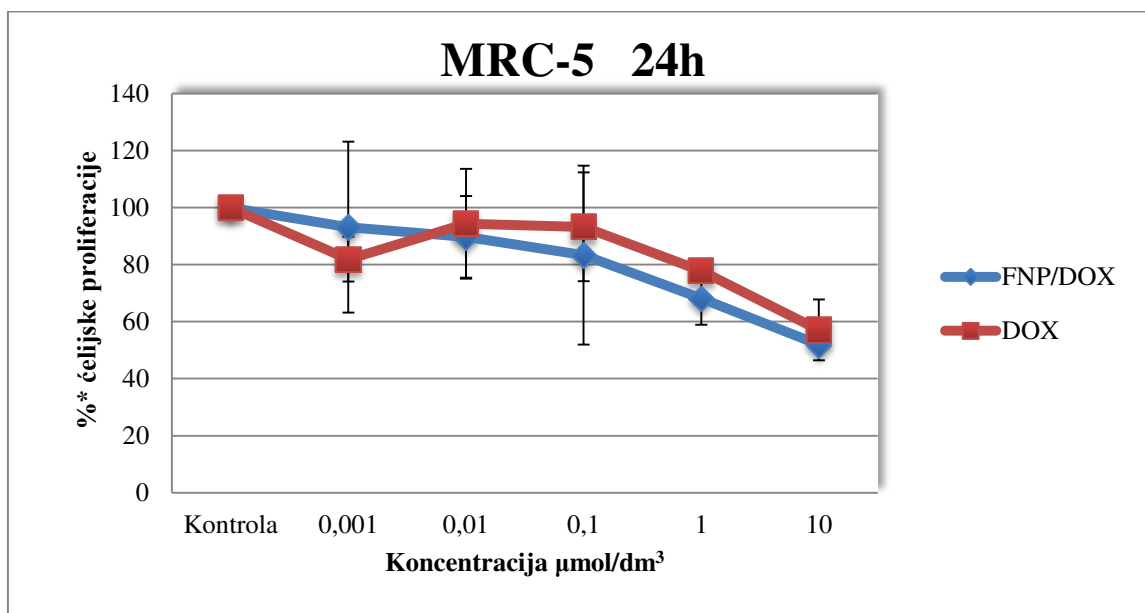
Na slici 3.36. se može videti TEM uzorka nanokompozita FNP/DOX, gde se mogu izdvojiti čestice različitih dijametara: 6,3; 7,6; 8,9 i 5,7 nm.



Slika 3.36. Rezultati TEM merenja vodenog rastvora FNP/DOX (Seke i dr. 2016)

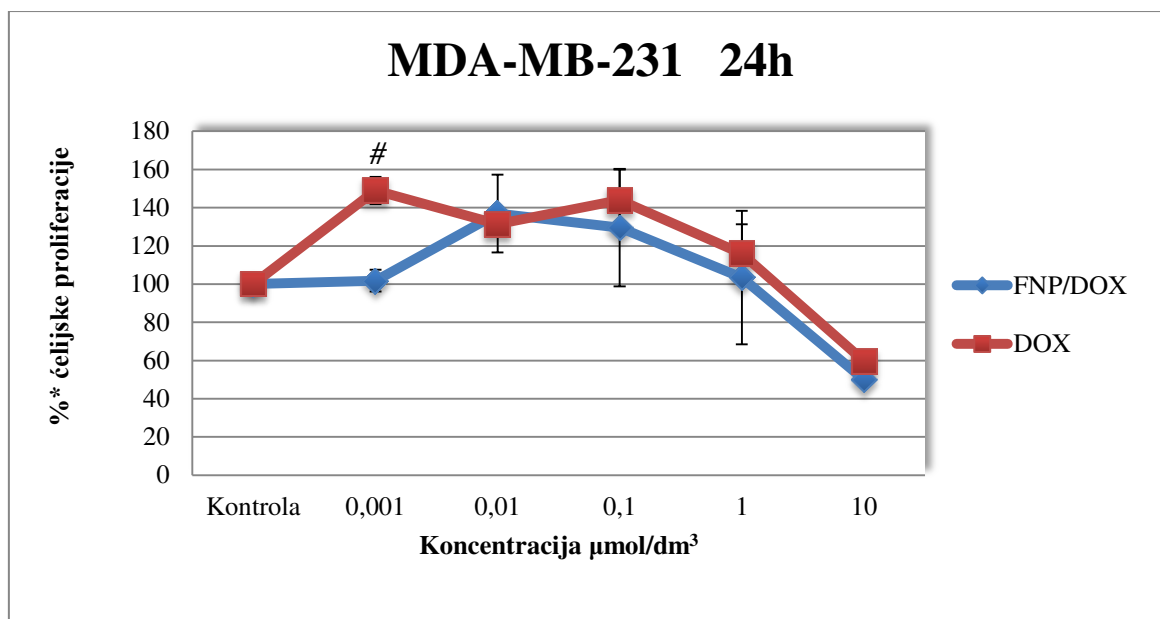
3.12. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI *IN VITRO* NA ĆELIJSKIM LINIJAMA

Ispitivanje antitumorske aktivnosti vodenih rastvora DOX i nanokompozita FNP/DOX je urađeno na jednoj zdravoj (MRC-5, humani fibroblasti pluća) i četiri tumorske ćelijske linije (MDA MB-231, humani karcinom dojke ER-; MCF-7, humani karcinom dojke ER+; Hs-294 T, humani melanom i U-251, humani glioblastom). Za određivanje intenziteta ćelijskog rasta korišćen je sulforodamin B (SRB) test (Skehan i dr., 1990). Antiproliferativna aktivnost izražena je kao EC₅₀ vrednost, a efekat na ćelijski rast je prikazan kao procenat u odnosu na kontrolu. Dobijeni rezultati su prikazani grafički na Slikama 3.37.-3.51.



* % u odnosu na kontrolu

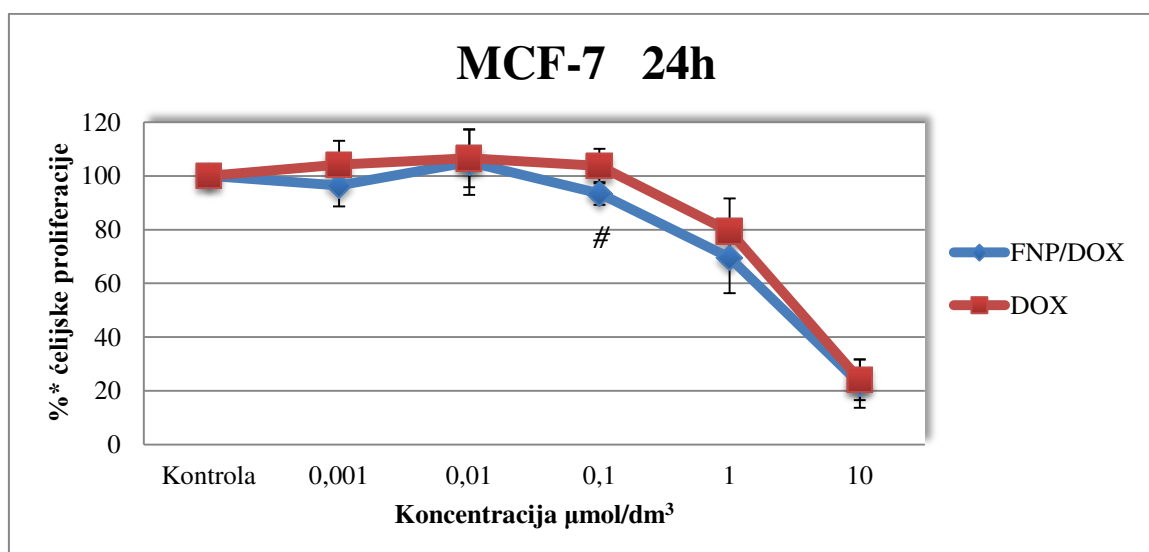
Slika 3.37. Grafički prikaz zavisnosti ćelijske proliferacije MRC-5 (humani fibroblasti pluća) od koncentracije FNP/DOX (računato na DOX) i DOX u 24-h tretmanu



* % u odnosu na kontrolu

statistički značajna razlika odgovora ćelija tretiranih DOX i FNP/DOX, $p < 0,05$

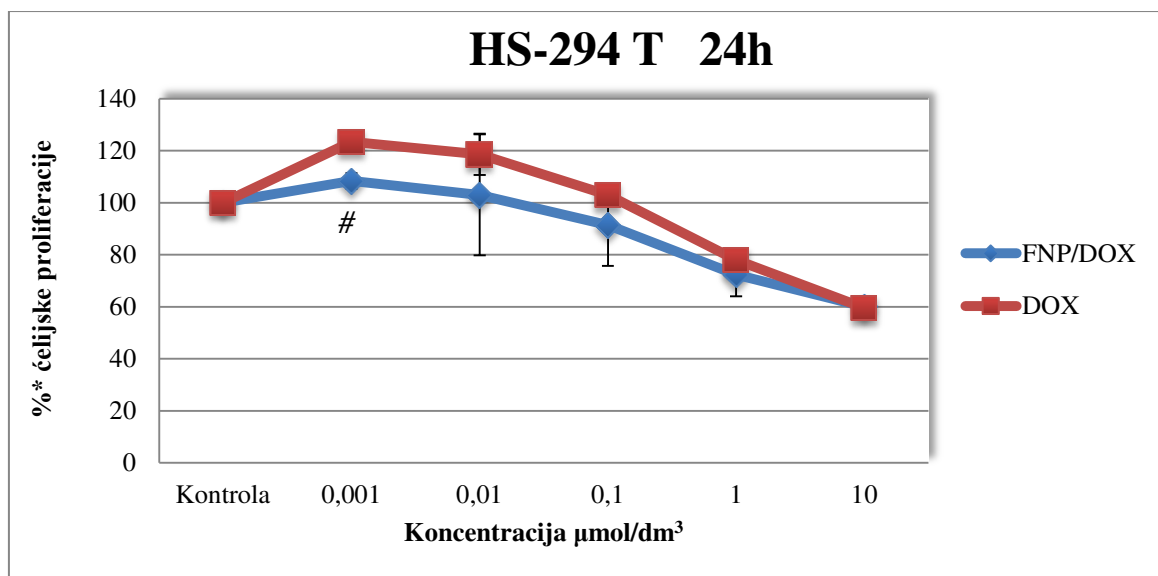
Slika 3.38. Grafički prikaz zavisnosti ćelijske proliferacije MDA-MB-231 (humani karcinom dojke ER-) od koncentracije FNP/DOX i DOX u 24-h tretmanu



* % u odnosu na kontrolu

statistički značajna razlika odgovora ćelija tretiranih DOX i FNP/DOX, $p < 0,05$

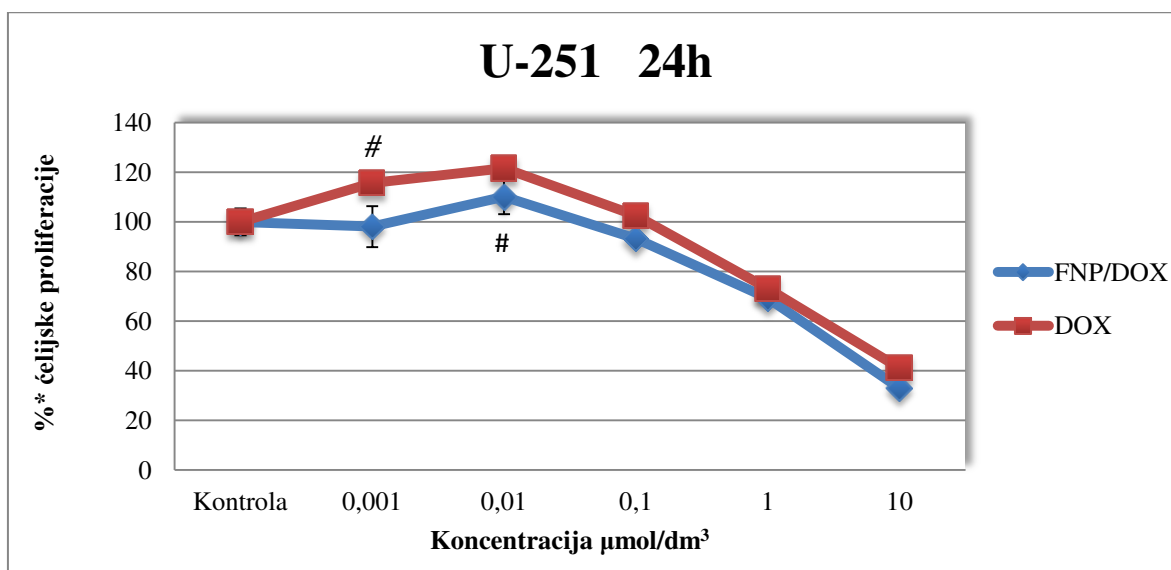
Slika 3.39. Grafički prikaz zavisnosti ćelijske proliferacije MCF-7 (humani karcinom dojke ER+) od koncentracije FNP/DOX i DOX u 24-h tretmanu



* % u odnosu na kontrolu

statistički značajna razlika odgovora ćelija tretiranih DOX i FNP/DOX, $p < 0,05$

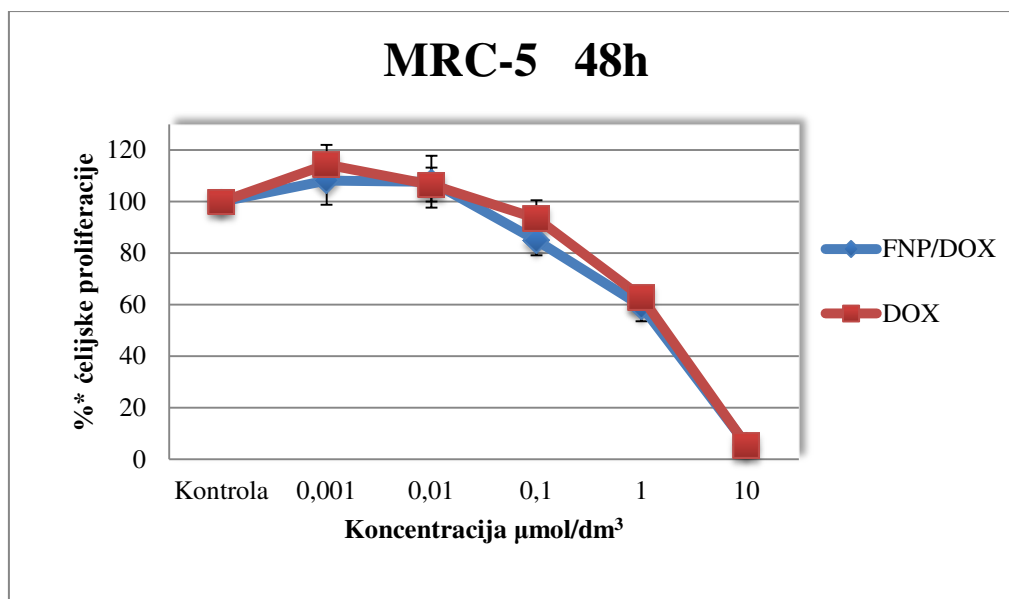
Slika 3.40. Grafički prikaz zavisnosti ćelijske proliferacije HS-294 T (humani melanom) od koncentracije FNP/DOX i DOX u 24-h tretmanu



* % u odnosu na kontrolu

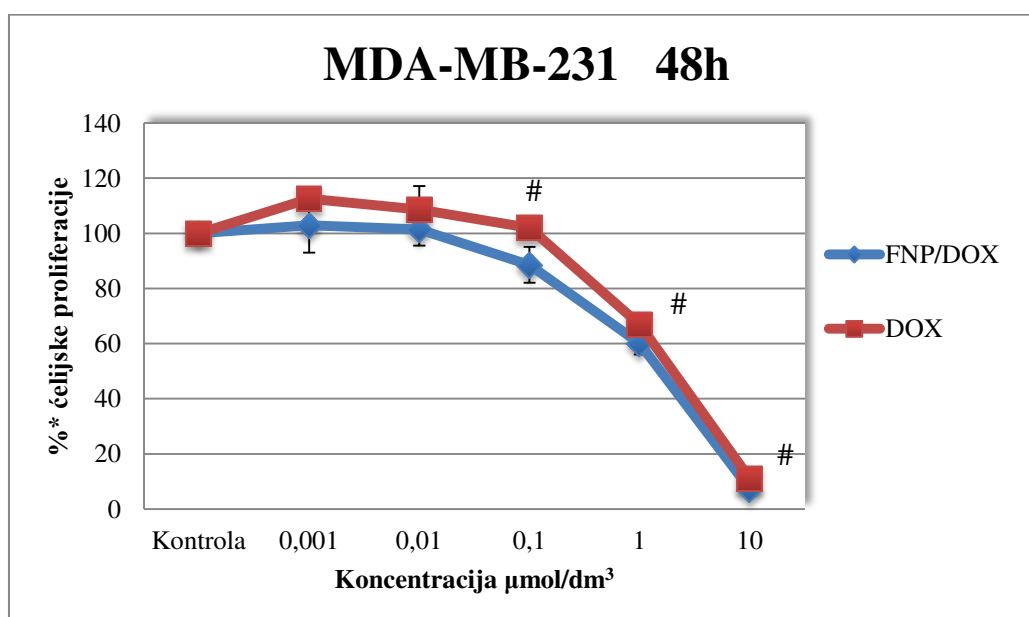
statistički značajna razlika odgovora ćelija tretiranih DOX i FNP/DOX, $p < 0,05$

Slika 3.41. Grafički prikaz zavisnosti ćelijske proliferacije U-251 (humani glioblastom) od koncentracije FNP/DOX i DOX u 24-h tretmanu



* % u odnosu na kontrolu

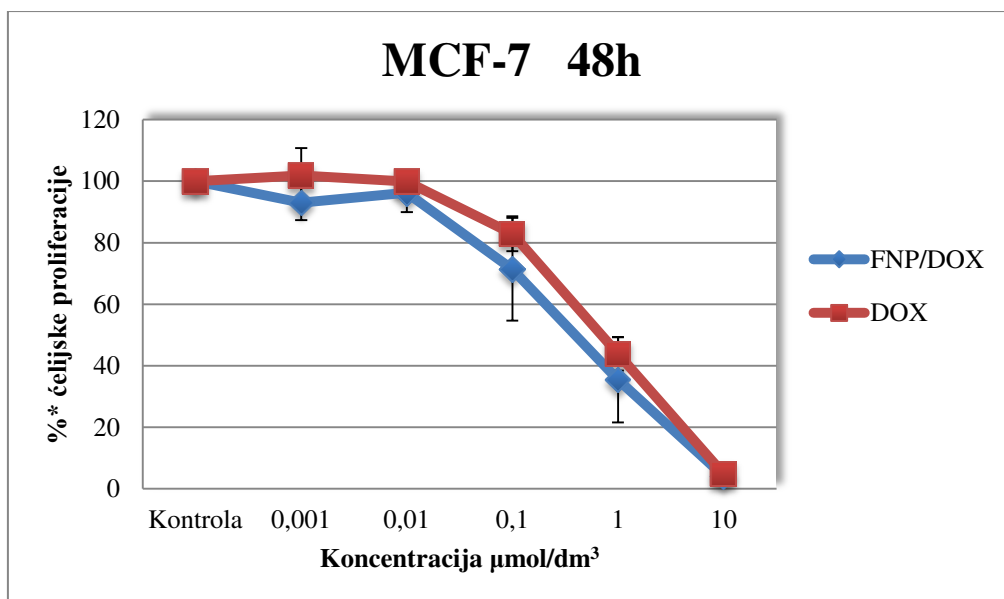
Slika 3.42. Grafički prikaz zavisnosti ćelijske proliferacije MRC-5 (humani fibroblasti pluća) od koncentracije FNP/DOX i DOX u 48-h tretmanu



* % u odnosu na kontrolu

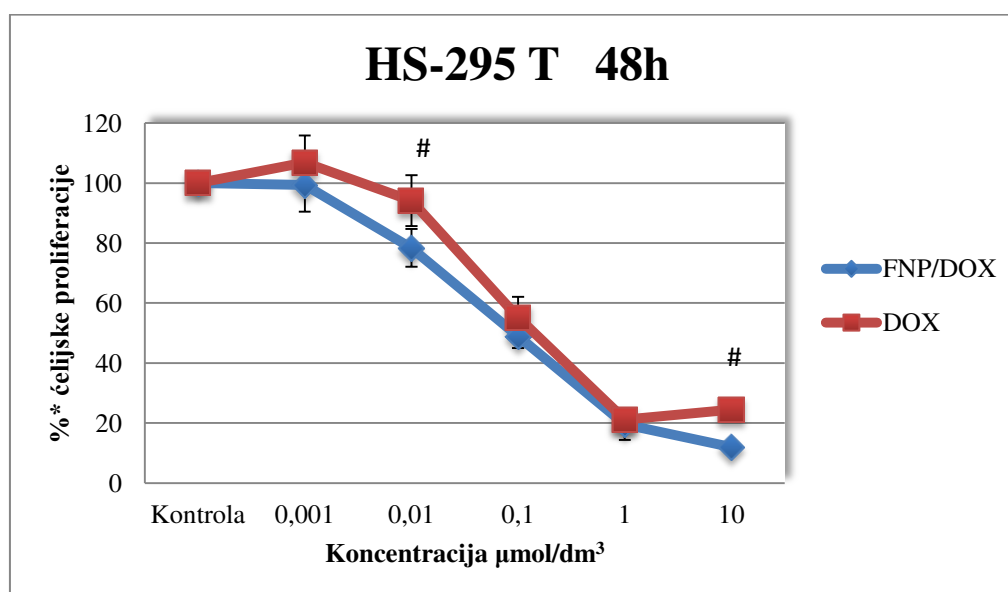
statistički značajna razlika odgovora ćelija tretiranih DOX i FNP/DOX, $p < 0,05$

Slika 3.43. Grafički prikaz zavisnosti ćelijske proliferacije MDA-MB-231 (humani karcinom dojke ER-) od koncentracije FNP/DOX i DOX u 48-h tretmanu



* % u odnosu na kontrolu

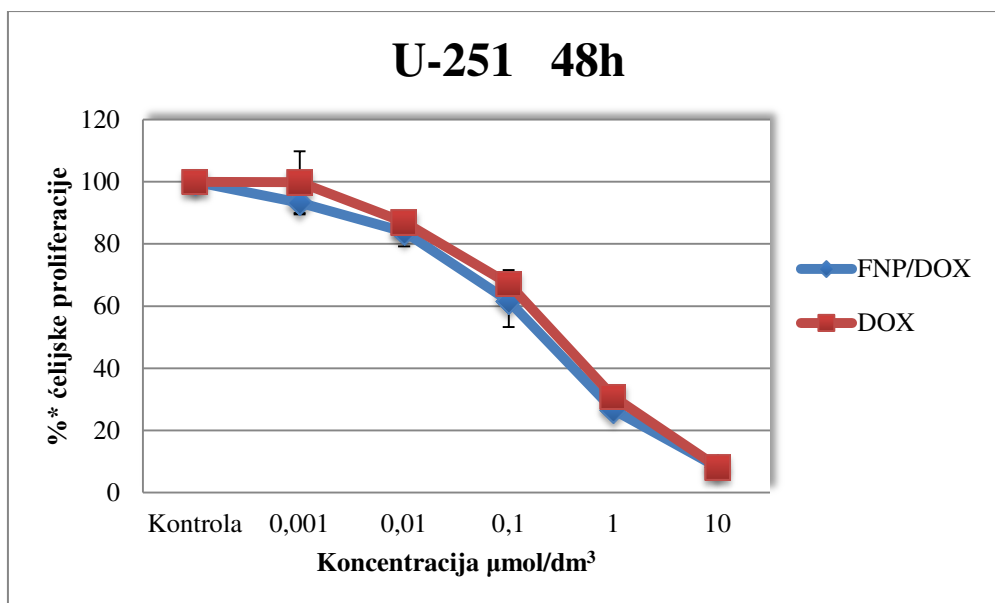
Slika 3.44. Grafički prikaz zavisnosti ćelijske proliferacije MCF-7 (humani karcinom dojke ER+) od koncentracije FNP/DOX i DOX u 48-h tretmanu



* % u odnosu na kontrolu

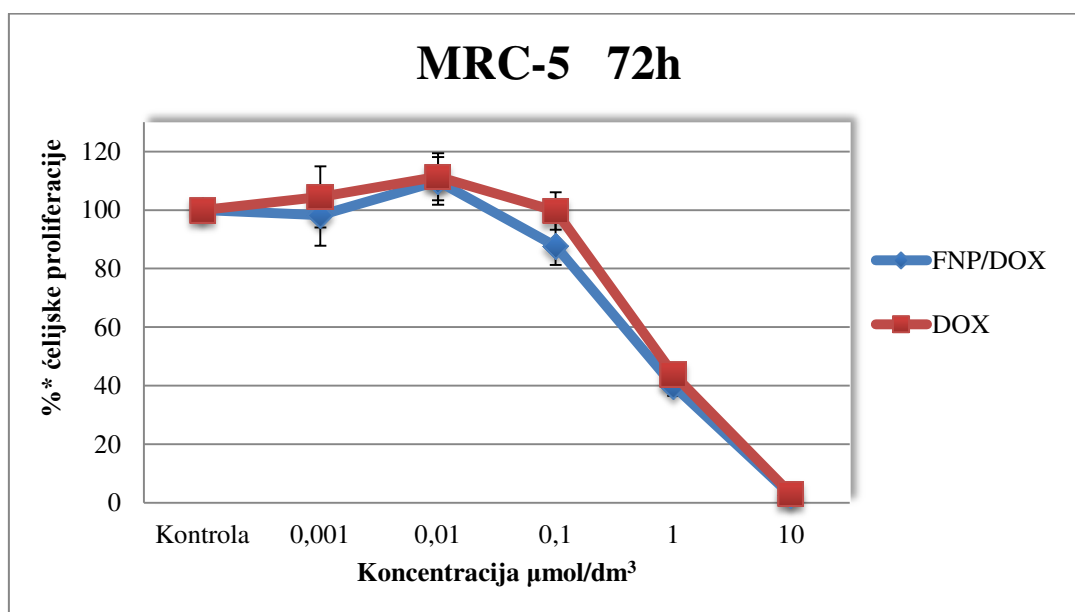
statistički značajna razlika odgovora ćelija tretiranih DOX i FNP/DOX, $p < 0,05$

Slika 3.45. Grafički prikaz zavisnosti ćelijske proliferacije HS-294 T (humani melanom) od koncentracije FNP/DOX i DOX u 48-h tretmanu



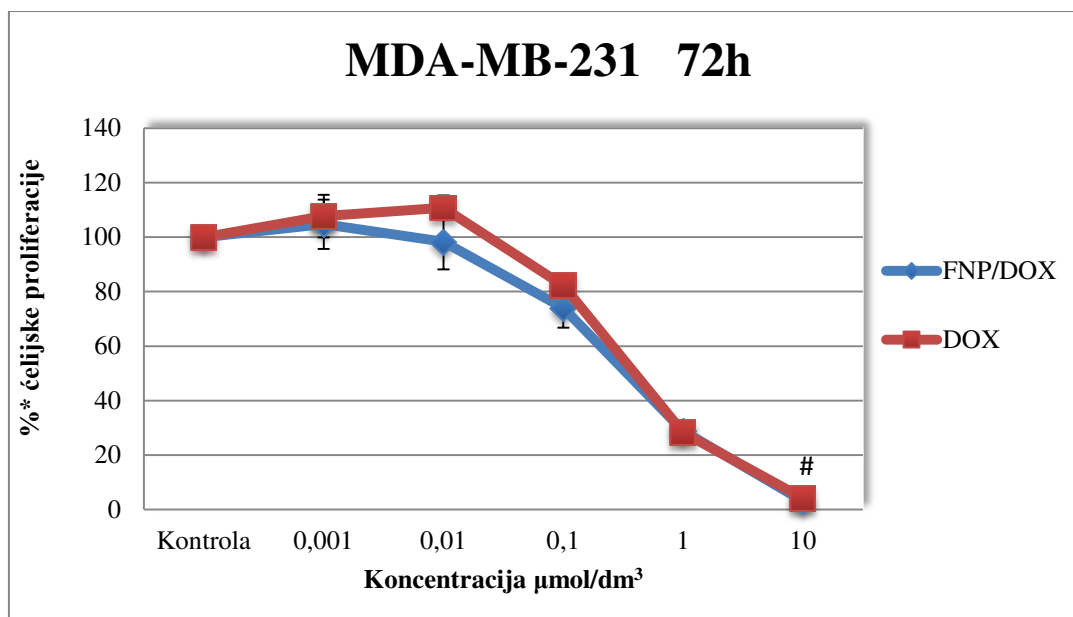
* % u odnosu na kontrolu

Slika 3.46. Grafički prikaz zavisnosti ćelijske proliferacije U-251 (humani glioblastom) od koncentracije FNP/DOX i DOX u 48-h tretmanu



* % u odnosu na kontrolu

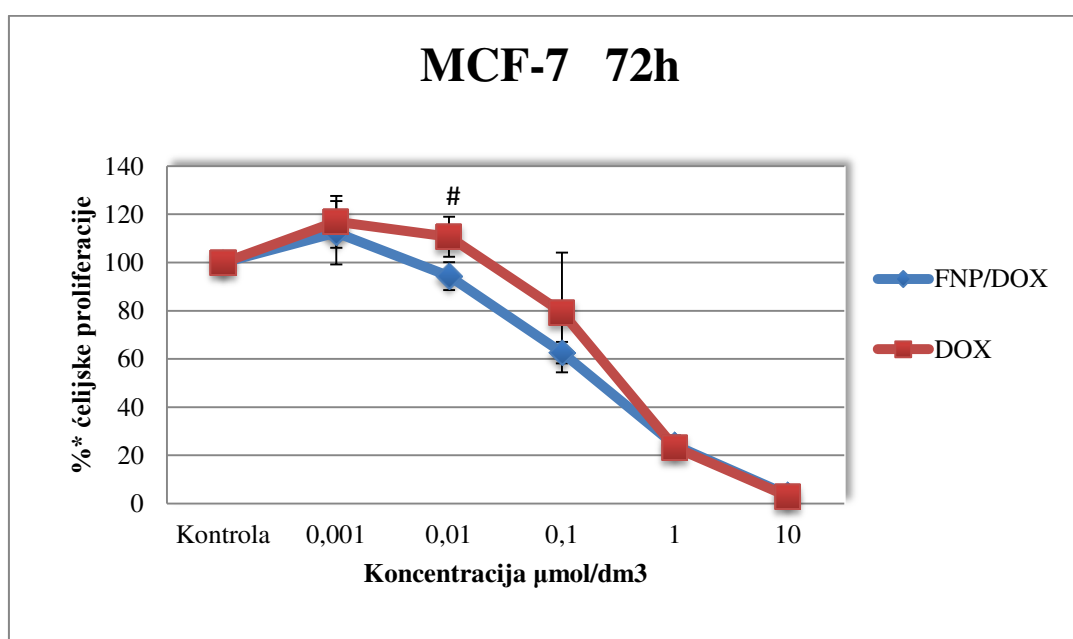
Slika 3.47. Grafički prikaz zavisnosti ćelijske proliferacije MRC-5 (humani fibroblasti pluća) od koncentracije FNP/DOX i DOX u 48-h tretmanu



* % u odnosu na kontrolu

statistički značajna razlika odgovora ćelija tretiranih DOX i FNP/DOX, $p < 0,05$

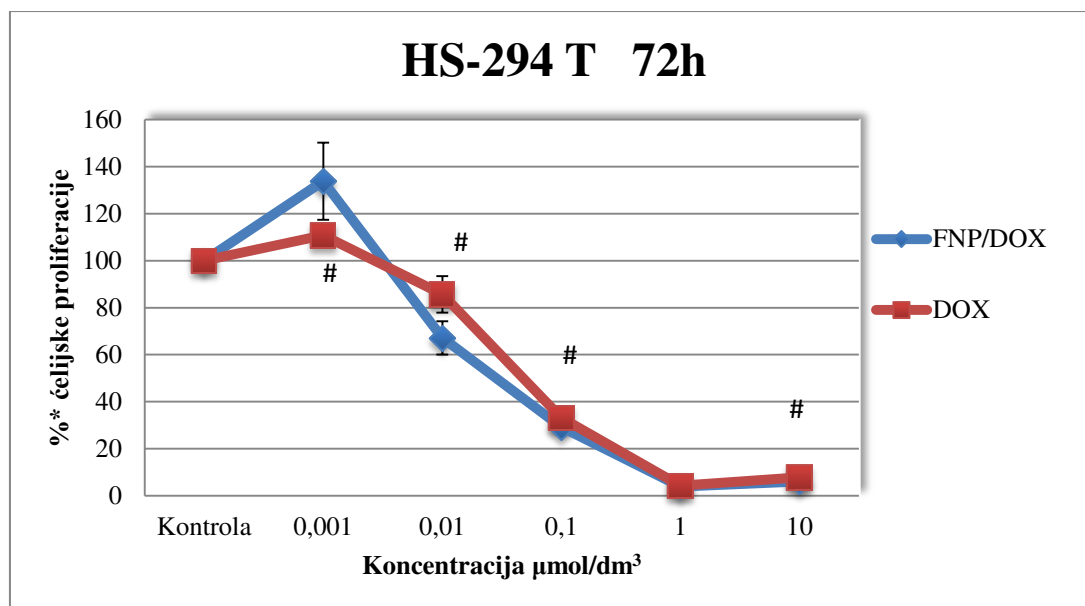
Slika 3.48. Grafički prikaz zavisnosti ćelijske proliferacije MDA-MB-231 (humani karcinom dojke ER-) od koncentracije FNP/DOX i DOX u 72-h tretmanu



* % u odnosu na kontrolu

statistički značajna razlika odgovora ćelija tretiranih DOX i FNP/DOX, $p < 0,05$

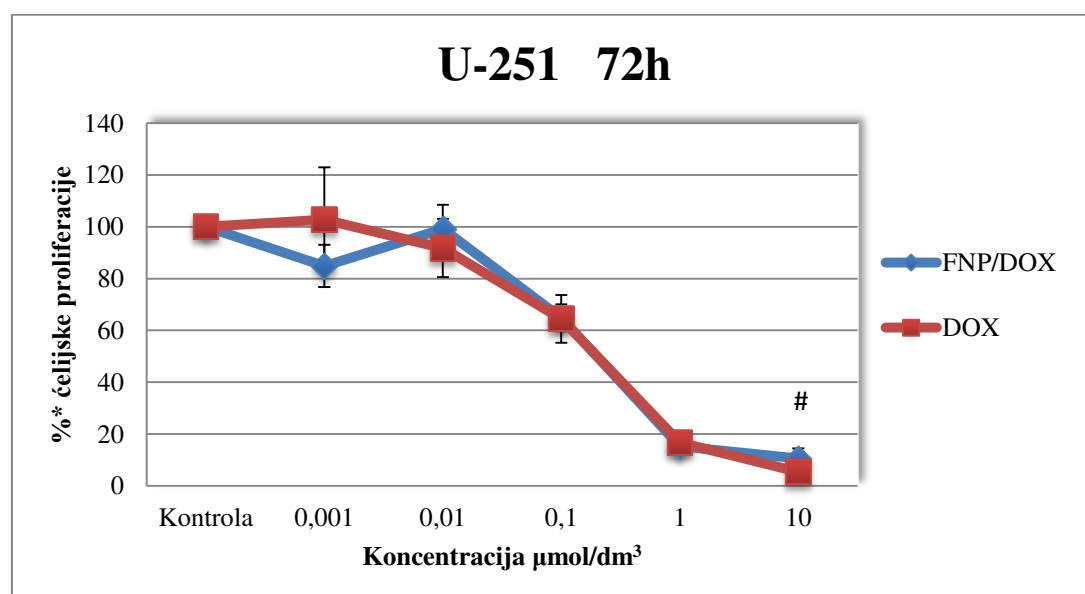
Slika 3.49. Grafički prikaz zavisnosti ćelijske proliferacije MCF-7 (humani karcinom dojke ER+) od koncentracije FNP/DOX i DOX u 72-h tretmanu



* % u odnosu na kontrolu

statistički značajna razlika odgovora ćelija tretiranih DOX i FNP/DOX, $p < 0,05$

Slika 3.50. Grafički prikaz zavisnosti ćelijske proliferacije HS-294 T (humani melanom) od koncentracije FNP/DOX i DOX u 72-h tretmanu



* % u odnosu na kontrolu

statistički značajna razlika odgovora ćelija tretiranih DOX i FNP/DOX, $p < 0,05$

Slika 3.51. Grafički prikaz zavisnosti ćelijske proliferacije U-251 (humani glioblastom) od koncentracije FNP/DOX i DOX u 72-h tretmanu

Uporedni pregled antitumorskog efekta

Doksorubicin i nanokompozit su u ispitanim koncentracijama ($0,001\text{--}10\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, računato na DOX) pokazali značajnu aktivnost u pogledu inhibicije ćelijskog rasta.

Poredeći senzitivnost ćelijskih linija uočava se da DOX ispoljava najveći citotoksični efekat na HS-294 T ($EC_{50} = 0,05\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) u 72-h tretmanu, zatim na HS-294 T ($EC_{50} = 0,18\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) u 48-h tretmanu i prema MCF-7 ($EC_{50} = 4,04\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) u 24-h tretmanu.

Ukoliko se poredi senzitivnost ćelijskih linija po pojedinačnim dužinama tretmana FNP/DOX nanokompozit ispoljava najveći citotoksični efekat na HS-294 T ($EC_{50} = 0,04\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) u 72-h tretmanu, zatim na U-251 ($EC_{50} = 0,16\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) u 48-h tretmanu i prema MCF-7 ($EC_{50} = 2,20\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) u 24-h tretmanu. Primenom serije različitih koncentracija DOX i FNP/DOX dobijen je vremenski- i koncentraciono-zavistan efekat. Uporednom analizom EC_{50} vrednosti za nanokompozit i DOX (Tabele 3.9.-3.11.) evidentno je da je antitumorska aktivnost nanokompozita FNP/DOX veća u poređenju sa efektom samog DOX na svim ćelijskim linijama (EC_{50} vrednosti FNP/DOX su bile niže od EC_{50} za DOX) pri svim dužinama tretmana, osim:

24-časovnog tretmana na HS-294 T, ($EC_{50\ \text{FNP/DOX}} = 18,65\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, $EC_{50\ \text{DOX}} = 6,16$);

48-časovnog tretmana na HS-294 T, ($EC_{50\ \text{FNP/DOX}} = 0,22\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, $EC_{50\ \text{DOX}} = 0,18$) i

72-časovnog tretmana na U-251, ($EC_{50\ \text{FNP/DOX}} = 0,47\ \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, $EC_{50\ \text{DOX}} = 0,20$).

U cilju određivanja selektivnosti za tumorske u odnosu na zdravu ćelijsku liniju određen je NT/T odnos, koji predstavlja količnik EC_{50} vrednosti dobijenih za netumorsku i tumorske ćelijske linije. Rezultati su prikazani u Tabelama 3.9.-3.11., μM predstavlja $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$.

Tabela 3.9. Pregled NT/T odnosa za FNP/DOX i DOX u 24-časovnom tretmanu ćelija

FNP/DOX 24 h			DOX 24 h		
Ćelijska linija	$EC_{50}\ \mu\text{M}$	NT*/T**	Ćelijska linija	$EC_{50}\ \mu\text{M}$	NT*/T**
MDA-MB-231	10,00	1,16	MDA-MB-231	>10,00	<1,54
MCF-7	2,20	5,25	MCF-7	4,04	3,80
HS-294 T	18,65	0,62	HS-294 T	6,16	2,49
U-251	3,52	3,28	U-251	4,86	3,16

* NT je: $EC_{50}(\text{MRC-5})$; $EC_{50\ \text{FNP/DOX}}(\text{MRC-5}) = 11,56$; $EC_{50\ \text{DOX}}(\text{MRC-5}) = 15,35$

** T je: EC_{50} ispitivanih tumorskih ćelijskih linija

Tabela 3.10. Pregled NT/T odnosa za FNP/DOX i DOX u 48-časovnom tretmanu ćelija

FNP/DOX 48 h			DOX 48 h		
Ćelijska linija	EC ₅₀ μM	NT*/T**	Ćelijska linija	EC ₅₀ μM	NT*/T**
MDA-MB-231	1,49	0,52	MDA-MB-231	3,32	0,33
MCF-7	0,35	2,23	MCF-7	0,84	1,30
HS-294 T	0,22	3,55	HS-294 T	0,18	6,06
U-251	0,16	4,88	U-251	0,38	2,87

* NT je: EC₅₀(MRC-5); EC_{50FNP/DOX}(MRC-5) = 0,78; EC_{50DOX}(MRC-5) = 1,09

**T je: EC₅₀ ispitivanih tumorskih ćelijskih linija

Tabela 3.11. Pregled NT/T odnosa za FNP/DOX i DOX u 72-časovnom tretmanu ćelija

FNP/DOX 72 h			DOX 72 h		
Ćelijska linija	EC ₅₀ μM	NT*/T**	Ćelijska linija	EC ₅₀ μM	NT*/T**
MDA-MB-231	0,38	1,40	MDA-MB-231	0,44	2,14
MCF-7	0,23	2,30	MCF-7	0,35	2,69
HS-294 T	0,04	13,25	HS-294 T	0,05	18,80
U-251	0,47	1,13	U-251	0,20	4,70

* NT je: EC₅₀ (MRC-5); EC_{50 FNP/DOX} (MRC-5) = 0,53; EC_{50 DOX} (MRC-5) = 0,94

**T je: EC₅₀ ispitivanih tumorskih ćelijskih linija

Odnos NT/T ukazuje na to da i u slučaju primene DOX i nanokompozita FNP/DOX postoji selektivna antiproliferativna aktivnost prema svim tumorskim ćelijama u poređenju sa netumorskim (odnos NT/T veći od 1), osim u slučaju: 24-časovnog tretmana na HS-294 T (NT/T_{FNP/DOX} = 0,62) i 48-časovnog tretmana na MDA-MB-231 (NT/T_{FNP/DOX} = 0,52; NT/T_{DOX} = 0,33).

Antitumorski efekat DOX

Najosetljivija tumorska ćelija na dejstvo DOX u 72-h tretmanu bila je HS-294 T (EC₅₀ = 0,05 μmol/dm³), zatim U-251 (EC₅₀ = 0,20 μmol/dm³), pa MCF 7 (EC₅₀ = 0,35 μmol/dm³), dok je

najmanju antitumorsku aktivnost DOX ispoljio prema MDA-MB-231 ($EC_{50} = 0,44 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$).

Pri 48-h tretmanu, redosled osetljivosti ćelijskih linija na DOX je isti kao u slučaju 72-h tretmana: HS-294 T ($EC_{50} = 0,18 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), U-251 ($EC_{50} = 0,38 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), MCF-7 ($EC_{50} = 0,84 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) i MDA-MB-231 ($EC_{50} = 3,32 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$). U 24-h tretmanu, najosetljivija je bila ćelijska linija MCF-7 ($EC_{50} = 4,04 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), zatim U-251 ($EC_{50} = 4,86 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), pa HS-294 T ($EC_{50} = 6,16 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) i najmanje osetljive u 24-časovnom tretmanu su bile ćelije MDA-MB-231 ($EC_{50} > 10,00 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$).

Kako što je i očekivano, sa povećanjem koncentracije DOX raste i inhibicija ćelijske proliferacije. Određena odstupanja od ove zavisnosti, odnosno veća inhibicija ćelijske proliferacije u odnosu na višu koncentraciju, se primećuju kod primene najniže koncentracije DOX ($0,001 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) na U-251 i zdravu MRC-5 (24-h tretman), kao i na MDA-MB-231 i zdravu MRC-5 (72-h tretman).

Pored koncentracione zavisnosti, postoji i vremenska zavisnost, odnosno uticaj dužine trajanja tretmana tokom kojeg je ćelijska linija bila izložena dejstvu DOX na ćelijsku proliferaciju. Ćelijska linija HS-294 T pokazuje najveću promenu inhibicije ćelijske proliferacije sa vremenom, gde je pri 72-h tretmanu vrednost EC_{50} ($0,05 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) približno 120 puta niža od EC_{50} vrednosti ($6,16 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) za 24-h tretman.

Što se selektivnosti prema tumorskim ćelijama u odnosu na netumorske tiče, poredeći NT/T odnose, u 24-h tretmanu se DOX pokazao najselektivnijim za MCF-7 ćelijsku liniju (NT/T = 3,80), međutim značajna selektivnost je iskazana i za ostale ćelijske linije: U-251 (NT/T = 3,16), HS-294 T (NT/T = 2,49) i MDA-MB-231 (NT/T < 1,54). Izostanak selektivnosti se primećuje u 48-h tretmanu u slučaju MDA-MB-231 ćelija gde je odnos NT/T niži od 1 (NT/T = 0,33). Prema ostalim ćelijskim linijama u 48-h tretmanu DOX je pokazao značajnu selektivnost u odnosu na zdravu ćelijsku liniju: MCF-7 (NT/T = 1,30), U-251 (NT/T = 2,87), dok je najveću selektivnost u ovom tretmanu DOX ispoljio prema HS-294 T (NT/T = 6,06). U 72-h tretmanu, doksorubicin je pokazao najveću selektivnost prema HS-294 T ćelijama melanoma (NT/T = 18,80), dok je redosled selektivnosti za tumorske u odnosu na zdrave ćelije bio sledeći: U-251 (NT/T = 4,70), MCF-7 (NT/T = 2,69) i MDA-MB-231 (NT/T = 2,14).

Antitumorski efekat nanokompozita FNP/DOX

Za nanokompozit FNP/DOX u 72-h tretmanu redosled tumorskih ćelija u pogledu osetljivosti je bio sledeći: HS-294 T ($EC_{50} = 0,04 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), MCF-7 ($EC_{50} = 0,23 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), MDA-

MB-231 ($EC_{50} = 0,38 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), U-251 ($EC_{50} = 0,47 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$). U 48-h tretmanu, nanokompozit je u najvećoj meri inhibirao ćelijsku proliferaciju kod U-251 ($EC_{50} = 0,16 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), zatim HS-294 T ($EC_{50} = 0,22 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), pa MCF-7 ($EC_{50} = 0,35 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), dok je najmanje citotoksičan bio za ćelije MDA-MB-231 ($EC_{50} = 1,49 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$). Najosetljivija ćelijska linija u 24-h tretmanu na dejstvo FNP/DOX je bila MCF-7 ($EC_{50} = 2,20 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), zatim U-251 ($EC_{50} = 3,52 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), pa MDA-MB-231 ($EC_{50} = 10,00 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) i na kraju HS-294 T ($EC_{50} = 18,65 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$).

Kako je i očekivano, sa povećanjem koncentracije FNP/DOX nanokompozita raste i inhibicija ćelijske proliferacije. Određena odstupanja od ove zavisnosti, odnosno veća inhibicija ćelijske proliferacije u odnosu na višu koncentraciju, se primećuju kod primene najnižih koncentracija nanokompozita ($0,001 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, računato na DOX) na U-251 (24-h i 72-h tretman), MCF-7 (24-h i 48-h tretman), kao i na MDA-MB-231 (24-h tretman), gde je pomenuto odstupanje najizraženije.

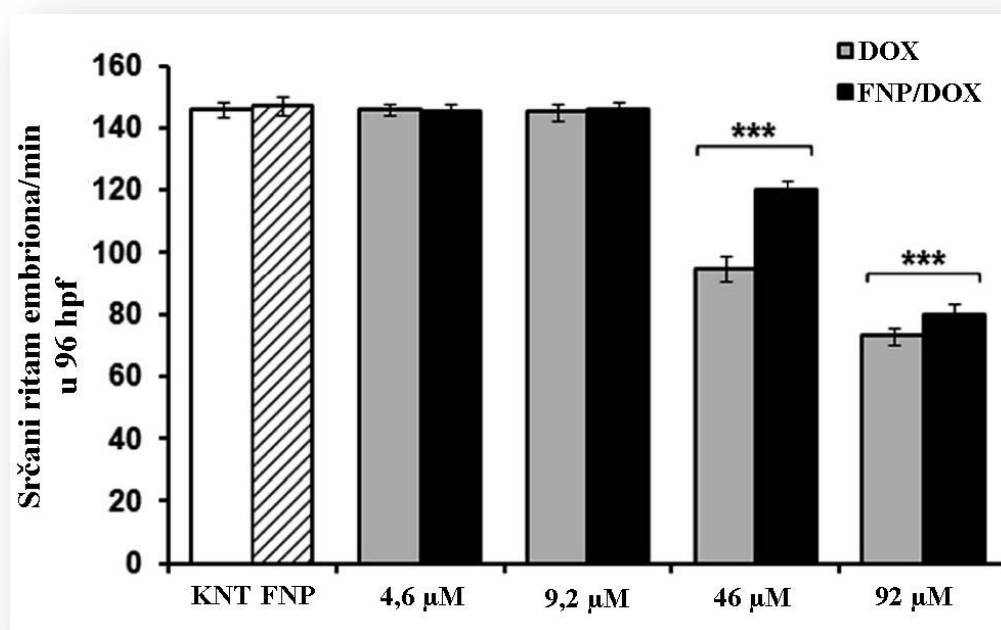
Pored koncentracione zavisnosti, postoji i vremenska zavisnost, odnosno uticaj dužine trajanja tretmana tokom kojeg je ćelijska linija bila izložena dejstvu nanokompozita, na ćelijsku proliferaciju. Ćelijska linija HS-294 T, kao i u slučaju tretmana samim DOX-om, pokazuje najveću promenu inhibicije ćelijske proliferacije sa vremenom, gde je pri 72-h tretmanu vrednost EC_{50} ($0,04 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) približno 470 puta niža od EC_{50} vrednosti ($18,65 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) za 24-h tretman.

Najveći efekat nanokompozita u poređenju sa DOX po vrednostima EC_{50} se uočava pri 48-h tretmanu kod U-251, MCF-7 i MDA-MB-231 gde je efikasnost nanokompozita 2,4; 2,4 i 2,2 puta, redom, veća u odnosu na sam DOX.

Najizraženija selektivnost nanokompozita FNP/DOX je iskazana u odnosu na HS-294 T ćelijsku liniju u 72-h tretmanu ($NT/T = 13,25$). Vrednosti odnosa NT/T za ostale ćelijske linije u 72-h tretmanu: MCF-7, MDA-MB-231 i U-251 su bile sledeće: 2,30; 1,40 i 1,13, redom. U 48-h tretmanu, FNP/DOX nanokompozit se pokazao kao neselektivan prema MDA-MB-231 ćelijama ($NT/T = 0,52$), dok je za ostale ćelijske linije pokazana značajna selektivnost u odnosu na zdravu ćelijsku liniju: U-251 ($NT/T = 4,88$), Hs-294 T ($NT/T = 3,55$) i MCF-7 ($NT/T = 2,23$). Rezultati selektivnosti 24-h testa se veoma razlikuju od prethodnih, pa tako u ovom slučaju FNP/DOX se pokazao kao neselektivan prema HS-294 T ćelijskoj liniji ($NT/T = 0,62$), dok je najveću selektivnost ispoljio prema MCF-7 ćelijama ($NT/T = 5,25$) i, u poređenju sa ovim vrednostima, umerenu selektivnost je iskazao prema: U-251 ($NT/T = 3,28$) i MDA-MB-231 ($NT/T = 1,16$).

3.13. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI *IN VIVO* NA MODELU ZEBRICE

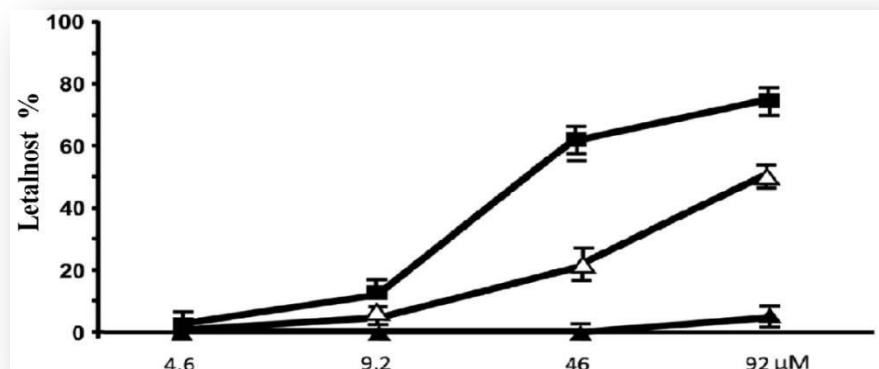
U ovom radu, zebriće su korišćene kao model sistem za evaluaciju *in vivo* toksičnosti nanokompozita u odnosu na doksorubicin i fulerenol. Praćeni su letalnost, morfološke abnormalnosti i kardiovaskularne funkcije kod tretiranih embriona. Tokom četvorodnevno ispitivanja, testirane supstance su ispoljile različit dozno- i vremenski-zavisani toksični efekat. Rezultati ispitivanja su predstavljeni na slikama 3.52-3.55., kao i u tabelama P8-P11, koje su date u prilogu.



Slika 3.52. Srčani ritam embriona zebrića starih 96h nakon tretmana različitim koncentracijama DOX i FNP/DOX; ***statistički značajna razlika posle tretmana DOX i FNP/DOX, $p < 0,001$ (Jović i dr. 2016)

Na slici 3.52. grafički su predstavljeni rezultati merenja srčanog ritma embriona zebrića koji su bili izloženi različitim koncentracijama FNP, samog DOX i nanokompozita FNP/DOX tokom 96-časovnog tretmana. Embrioni izloženi $8,9 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ FNP (odgovarajuća koncentracija FNP u nanokompozitu koncentracije $92 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), kao i DOX i FNP/DOX u koncentracijama $4,6$ i $9,2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ nisu imali izmenjen srčani ritam u odnosu na netretirane embrione (KNT). Međutim, kod embriona koji su bili izloženi koncentracijama supstanci $46 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i $92 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (računato na DOX) je vidan uticaj supstanci na smanjenje srčanog ritma, pri čemu je pri obe koncentracije nanokompozit FNP/DOX ispoljio blaži efekat u

odnosu na DOX. U slučaju primene koncentracije $46 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, razlika u uticaju na srčani ritam između samog DOX i FNP/DOX nanokompozita je najizraženija.

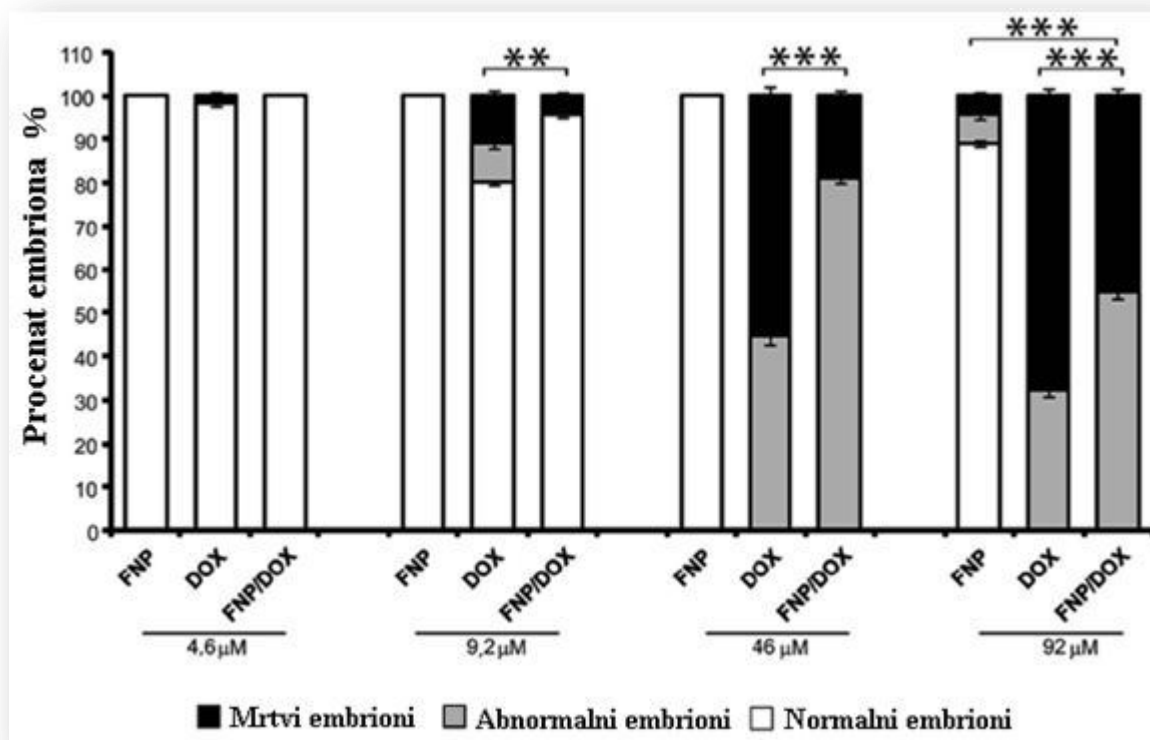


Slika 3.53. Dozno-zavisna kriva letalnosti embriona zebrica za fulerenol (FNP ▲), doksorubicin (DOX ■) i nanokompozit (FNP/DOX Δ) 96 hpf (Jović i dr. 2016)

Dozna-zavisnost letalnosti embriona zebrica od koncentracija FNP, DOX i nanokompozita FNP/DOX 96 hpf je grafički predstavljena na slici 3.53. Primenom serije koncentracija na embrione zebrica ustanovljena je dozna-zavisnost letalnosti embriona od primenjene koncentracije supstanci u sva tri slučaja. Letalnost prouzrokovana primenom FNP, čak i pri tretmanu najvišom koncentracijom, dostiže tek 5%, dok su te vrednosti za DOX i nanokompozit znatno više. Naime, pri primeni najviše koncentracije DOX i nanokompozita (računato na DOX) od $92 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, detektovana je letalnost od 70% i 50%, respektivno. Najveća razlika u letalnosti, kada se porede DOX i nanokompozit FNP/DOX, se primećuje pri koncentracije od $46 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, koja je imala letalni ishod kod oko 20% embriona u slučaju nanokompozita i više od 60% embriona pri primeni samog DOX, što čini razliku od čak 40% u korist nanokompozita.

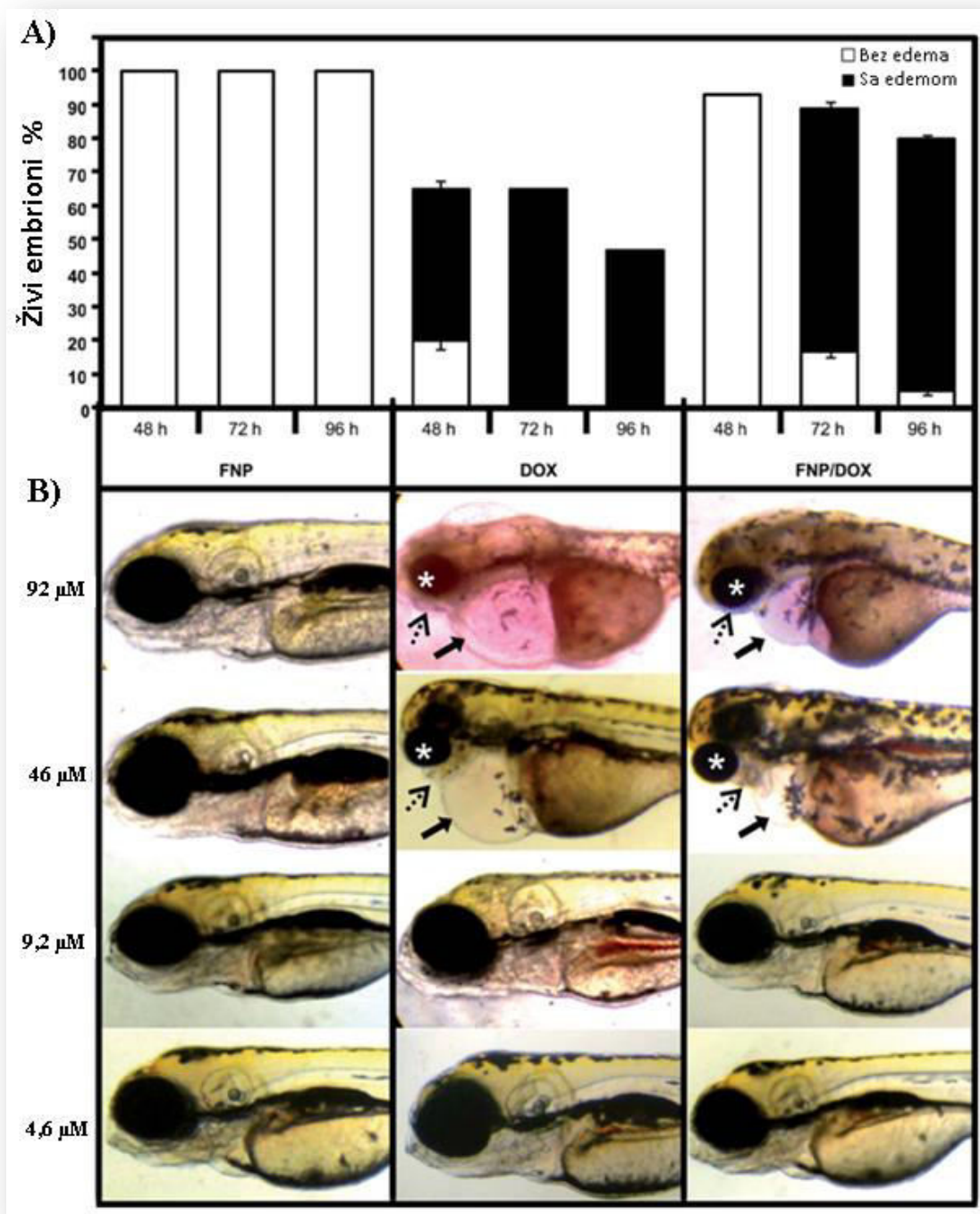
Pregled toksičnih efekata (teratogenost i mortalitet) na embrionima zebrica 96 hpf izazvanih dejstvom FNP, DOX i FNP/DOX je predstavljen na slici 3.54. U rezultate ukupne toksičnosti se ubrajaju kako mrtvi, tako i embrioni sa abnormalnostima. Pri primeni najniže doze ($4,6 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$), jedino se u grupi tretiranoj samim DOX javila toksičnost kod nekoliko % embriona. Pri duplo većoj koncentraciji ($9,2 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) 10% embriona je bilo mrtvo i 10% teratogeno, dok je u grupi tretiranoj FNP/DOX duplo manje embriona imalo negativne posledice i to bez teratogenih znaka. Na tretman koncentracijom $46 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ je grupa tretirana FNP ostala potpuno očuvana, u grupi tretiranoj FNP/DOX je bilo približno 80% abnormalnih embriona i oko 20% mrtvih embriona, dok je u grupi tretiranoj samim DOX

procenat abnormalnih embriona oko 45%, a procenat mrtvih embriona približno 55%, skoro trostruko viši u odnosu na mortalitet izazvan nanokompozitom.



Slika 3.54. Toksični efekti (mortalitet i teratogenost) na embrionima zebrića uzrokovani fulerenolom (FNP), doksorubicinom (DOX) i nanokompozitom (FNP/DOX) 96 hpf; Statistički značajne razlike u ukupnoj toksičnosti (zbir mrtvih i abnormalnih embriona) između ispitivanih supstanci je označena: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Jović i dr. 2016)

Konzentracija supstanci pri kojoj je FNP pokazao toksični efekat je bila $92 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, procenat abnormalnih embriona je u ovoj grupi bio oko 5%, isto koliko i mrtvih embriona. Grupa tretirana nanokompozitom je rezultirala sa približno 50% embriona sa abnormalnostima i oko 50% mrtvih embriona, dok je procenat u grupi tretiranoj samim DOX 30% i 70%, respektivno.



Slika 3.55. a) Efekti fulerenola FNP, doksorubicina DOX i nanokompozita FNP/DOX na preživljavanje embriona zebrica i razvoj perikardijalnog edema 48-96 hpf pri tretmanu koncentracijom 46 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (računato na DOX)

b) Dozno-zavisni efekat ispitanih supstanci na morfologiju embriona zebrica i veličina perikardijalnog edema 96 hpf; Perikardijalni edem (\rightarrow), nerazvijena vilica (\dashrightarrow) i nepotpuno razvijene oči (*) su označeni na slikama (Jović i dr. 2016)

Uticaj dužine tretmana (48-96 hpf), odnosno izloženosti embriona zebrica FNP, DOX i nanokompozitu FNP/DOX u koncentraciji $46 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$, na preživljavanje i razvoj perikardialnog edema je prikazan na slici 3.55. a).

FNP u primenjenoj koncentraciji nije pokazao letalni efekat, dok su rezultati za sam DOX i FNP/DOX drugačiji. Pri 48-h i 72-h tretmanu DOX-om, približno 65% embriona je preživelo, gde je pri 48-h tretmanu samo 20% embriona bilo znakova kardiovaskularne toksičnosti, odnosno bez perikardialnog edema. 96 hpf procenat živih embriona je bio oko 45% i svi preživeli embrioni su imali veoma velike perikardijalne edeme.

S druge strane, efekat nanokompozita FNP/DOX na preživljavanje i kardiotoksičnost tretiranih embriona je bio značajno bolji u odnosu na DOX. Naime, dok je većina embriona bila živa u 48-h tretmanu (stopa preživljanja je 95%) i bez znakova kardiotoksičnosti, procenat preživelih embriona 96 hpf je bio značajno veći nego embriona tretiranih samo DOX-om. Mada je 96 hpf većina embriona imala kardiotoksične sporedne efekte, vidljive u vidu perikardijalnog edema, veličina samih edema pod FNP-DOX tretmanom je bila značajno manja u odnosu na veličinu edema kod embriona tretiranih DOX-om. Komparacijom veličine perikardijalne duplje i preživljavanja jasno se vidi da je postignuto višestruko smanjenje kardiotoksičnosti u kombinaciji FNP/DOX u odnosu na DOX, a koja inače predstavlja najveći problem tokom ili posle terapije doksorubicinom kod pacijenata obolelih od kancera. Smanjenje kardiotoksičnosti nanokompozita FNP/DOX u odnosu na DOX, manifestovano je kroz daleko manji edem i bolje preživljavanje.

Na slici 3.55. b). je predstavljen dozno-zavisni efekat ispitivanih supstanci na morfologiju embriona zebrica i izraženost edema 96 hpf. Praćene morfološke promene su označene simbolima (edem-punom strelicom, nerazvijena vilica-isprekidanom strelicom, očizvezdicom).

Nijedna ispitana koncentracija FNP nije dovela do vidnih morfoloških promena na embrionima. Slika embriona nakon tretmana DOX je nešto drugačija. Naime, usled primenjene koncentracije 46 i $92 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ kod embriona se javlja malformacija očiju, nerazvijenost vilice, kao i izraženi perikardijalni edem. Pri primeni nanokompozita FNP/DOX u koncentracijama 46 i $92 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ pomenute malformacije su izražene značajno manje nego nakon primene DOX.

4. DISKUSIJA

4.1. XPS ANALIZA

Literaturni izvori koji se bave XPS analizom fulerenola su u nedovoljnoj meri zastupljeni. Pored toga, imajući u vidu da je XPS analiza ugljeničnih jedinjenja izuzetno zahtevna, kao i da je uzorak neprovodan što implicira naelektrisanje površine (a ovo pak pomeranje energijske ose), analiza je veoma složena i sa ograničenom pouzdanošću.

Kada je u pitanju pouzdanost kvantitativne karakterizacije XPS, treba napomenuti da XPS daje informaciju o prvim nekoliko nanometara uzorka (po dubini) i sastav na površini se može razlikovati od onog u zapremini uzorka. Pored toga, sastav je određen pod pretpostavkom da je uzorak homogen po dubini do 5-6 nm za neprovodne uzorke. Formiranje tankog sloja kontaminanata debljine par nanometara je uobičajen za gotovo sve uzorke i ovaj tanak sloj menja intenzitete linija koje potiču iz dubljih slojeva. Ova izmena će biti utoliko izraženija ukoliko je kinetička energija fotoelektrona manja. Dakle, prisustvo tankog sloja kontaminanata će dovesti do porasta intenziteta linije ugljenika u odnosu na intenzitete linija kiseonika i posebno natrijuma.

Po pravilu, kontaminirajući sloj se sastoji od adsorbovanih ugljovodonika i eventualno vodene pare. Kako su to sve jedinjenja ugljenika i kiseonika, sve ovo dodatno otežava analizu našeg uzorka. Obično se smatra da je doprinos kontaminirajućeg ugljenika koji je u formi zasićenih ugljovodonika na poziciji 284,8 eV, kao i glavni doprinos u slučaju fulerenola.

Treći problem je u vezi sa izuzetno kompleksnom hemijom ugljenika što značajno otežava interpretaciju XPS spektara.

Na osnovu relativnih intenziteta doprinosa na koje je linija C 1s fitovana, a koji su dati u Tabeli 3.3., može se proceniti usrednjena struktura molekula fulerenola: 17,5 OH grupa, 5,5 $-O^-Na^+$ grupa i 1 C=O grupa. Iako se zbog pomenutih razloga rezultati posmatraju sa ograničenom pouzdanošću, treba napomenuti da je na osnovu ove analize odnos koncentracije kiseonika i ugljenika u fulerenolu 24:60, kao što je i očekivano. Osim toga, prisustvo više $-O^-Na^+$ grupa u uzorku fulerenol S u odnosu na uzorak fulerenol M je u saglasnosti sa analizom sastava (Tabela 3.1).

Indeglia i saradnici ukazuju na to da pored kontrolisanih faktora tokom sinteze fulerenola u laboratoriji, postoje faktori na koje je teže uticati, a koji značajno mogu uticati na pojavu razlika u broju hidroksilnih grupa između sintetisanih fulerenola (Indeglia, Georgieva,

Krishna, & Bonzongo, 2014). Neki od tih faktora na koje je, uprkos svim preduzetim merama predostrožnosti, teško uticati su čistoća ili stabilnost reaktanata, kvalitet dejonizovane vode, temperatura, osvetljenje, izloženost vazduhu koji može u zavisnosti od aktivnosti u laboratoriji biti različitog sastava. XPS analizom su ispitivani različiti uzorci fulerenola i vrednosti koje se izdvajaju su sledeće: 284 eV, 286 eV i 288 eV (Indeglia i dr. 2014; Husebo i dr. 2004; Vileno i dr. 2006). Ove vrednosti energija u načelu odgovaraju različitim atomima ugljenika: neoksisgenovani ugljenik, monooksisgenovani ugljenik i dioksisgenovani ugljenik, respektivno. Monooksisgenovane grupe mogu biti hidroksilne, epoksidne ili etarske grupe, dok dioksisgenovane grupe mogu biti karbonilna, karboksilna ili hemiketalna grupa.

Poređenjem odnosa pikova moguće je odrediti broj različitih ugljenika u ispitivanom molekulu, kao i molarni odnos različitih atomskih vrsta. Po literaturnim podacima (Fang F. Wang, Li, Tian, Xia, & Xiao, 2010) energije vezivanja za ugljenik, natrijum i kiseonik u fulerenolu su sledeće: 284, 286 i 288 eV (ugljenik); 1070,9 (natrijum); 532,5 i 531,3 (kiseonik vezan kao -O-H i $\text{-O}^-\text{Na}^+$, respektivno).

Na osnovu relativnih intenziteta svake od linija, koji su dati u Tabeli 3.3., može se proceniti srednji broj OH grupa, ONa grupa i C=O grupa po jednom molekulu fulerenola. Na osnovu rezultata fitovanja C 1s linije (Slika 3.4.) molekul fulenerola u uzorku fulerenol M ima u proseku 21 OH grupu, jednu ONa grupu i 3 C=O grupe, što je relativno blizu očekivanom $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$. Samim tim, izvodi se zaključak da je predloženi model karakterizacije fulerenola dovoljno dobar za procenu karakteristika uzorka fulerenol S. Nakon fitovanja C 1s linije oba uzorka dobijaju se doprinosi u sledećim procentima: C-C (71,5%), C-OH (20,8%), C-ONa (6,5%) i C=O (1,2%). Doprinos koji potiče od C-ONa može oslikavati sintetski put kojim je fulerenol sintetisan (Djordjević i dr. 1998; Mirkov i dr. 2004), dok se prisustvo C=O veze smatra defektom u strukturi do koje može doći tokom sinteze fulerenola i niži procenat C=O grupa u fulerenolu S ukazuje na očuvaniju strukturu fulerenskog kaveza.

FTIR spektar predstavljen u Prilogu na slici P11 je u saglasnosti sa ovim rezultatima dobijenim z fulerenol S, jer se na spektru, pored karakterističnih signala fulerenola jasno vidi i signal na 1715 cm^{-1} koji se pripisuje prisustvu karbonilne grupe. Kombinacija FTIR signala koji nedvosmisleno ukazuju na fulerenol je sledeća: širok O-H signal na oko 3400 cm^{-1} , kao i tri karakteristična signala na 1070 , 1389 i 1626 cm^{-1} koji se pripisuju $\nu\text{C-O}$, $\delta\text{C-O-H}$ i $\nu\text{C=C}$ apsorpcijama, respektivno (Kokubo, Matsubayashi, Tategaki, Takada, & Oshima, 2008; Kokubo i dr., 2011; Vileno i dr., 2006; G. Zhang, Liu, Liang, Gan, & Li, 2010). Prisustvo C=O grupe u molekulu fulerenola se povezuje sa manjom stabilnošću takvog proizvoda u odnosu na proizvod bez tzv. nečistoća u vidu kiseoničnih grupa (Long Y. Chiang

i dr. 1992; Kokubo i dr. 2011, 2008b; Schneider i dr. 1994; Xing i dr. 2004) usled nastajanja strukture otvorenog kaveza.

4.2. VOLUMETRIJSKE I TRANSPORTNE OSOBINE

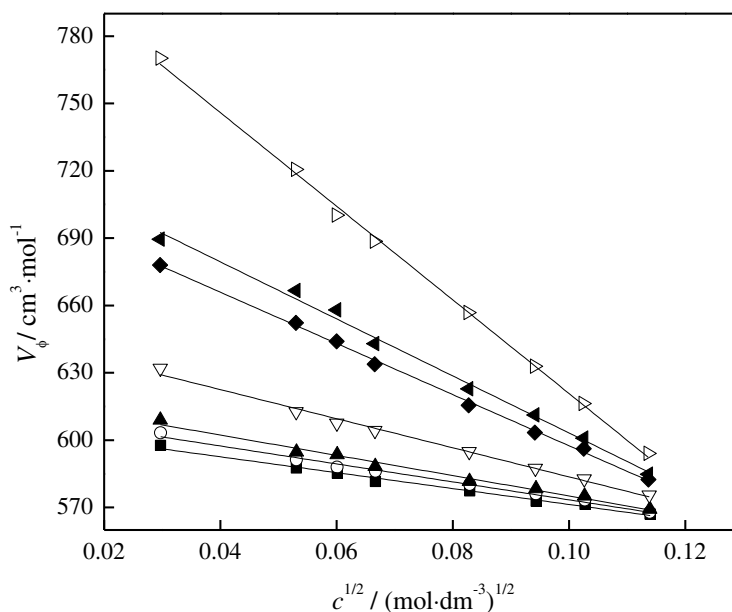
U cilju istraživanja prirode interakcija i uticaja molekula fulerenola na strukturnu organizaciju molekula vode u njegovoj okolini, odnosno „structure breaking/making” osobinama fulerenola, u ispitivanom binarnom sistemu {fulerenol + voda} se može zaključiti na osnovu nekoliko bitnih parametara, koji se mogu dobiti iz eksperimentalno dobijenih rezultata za gustinu, viskoznost i električnu provodljivost. Primenom Mejsonove jednačine

$$V_{\phi} = V_{\phi}^0 + S_V \sqrt{c} \quad (4.1.)$$

gde je:

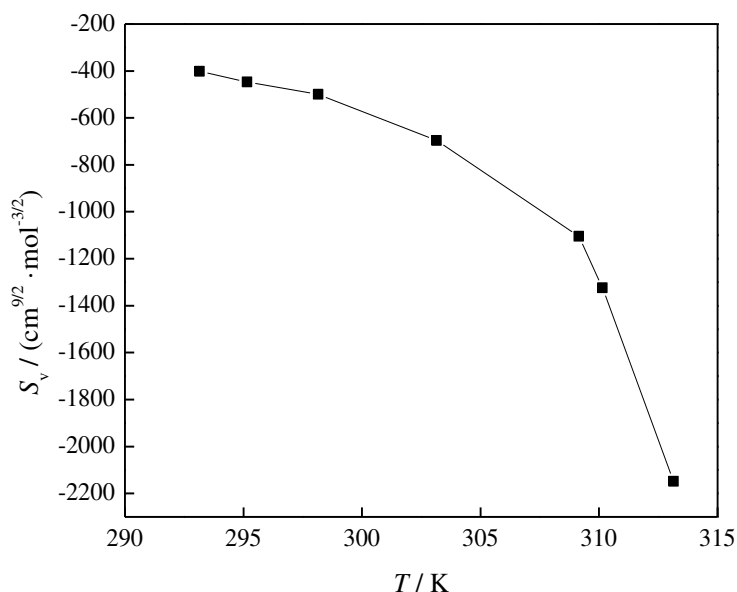
S_V = Mejsonov koeficijent

Uvrštavajući podatke za V_{ϕ} iz tabele iz Priloga P1 u jednačinu 4.1., moguće je dobiti vrednosti prividne molarne zapremine pri beskonačnom razblaženju V_{ϕ}^0 , slika 4.1., a što je predstavljeno i u tabeli P4.



Slika 4.1. Zavisnost prividne molarne zapremine od koncentracije fulerenola pri temperaturama: T = (■) 293,15; (○) 295,15; (▲) 298,15; (▽) 303,15 ; (◆) 309,15; (◄) 310,15 K; (▷) 313,15 K (Vranes i dr., 2017)

Negativne vrednosti Mejsenovog koeficijenta ukazuju na slabe interakcije između molekula rastvorka u ispitivanom sistemu. Promena Mejsenovog koeficijenta sa temperaturom je predstavljena grafički na slici 4.2. i ukazuje na to da se pri temperaturama iznad 309,15 K vrednost Mejsenovog koeficijenta značajno smanjuje, što ukazuje na smanjenje interakcija između FNP.



Slika 4.2. Promena Mejsenovog koeficijenta S_v sa promenom temperature (Vranes i dr., 2017)

Izračunate vrednosti granične prividne molarne ekspanzibilnosti, E_ϕ^0 , prikazane u tabeli 4.1. ukazuju na „structure-making” osobine fulerenola.

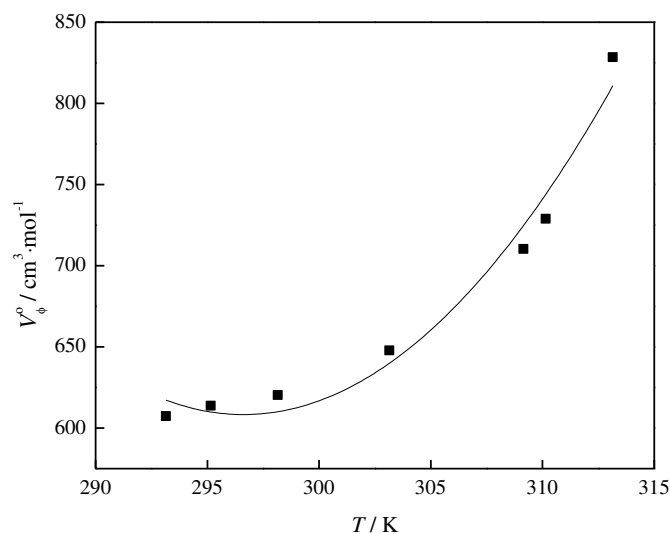
Tabela 4.1. Vrednosti prividne molarne ekspanzibilnosti na različitim temperaturama (Vranes i dr., 2017)

T [K]	293.15	295.15	298.15	303.15	309.15	310.15	313.15
E_ϕ^0 [cm ³ ·mol ⁻¹ ·K ⁻¹]	-5.15	-2.18	2.27	9.68	18.58	20.06	24.51

Ove vrednosti se mogu izračunati iz temperaturene zavisnosti prividne molarne zapremine pri beskonačnom razblaženju primenom jednačine drugog reda (4.2.) i Heplerovom (4.3.) jednačinom (Hepler, 1969), a rezultati su grafički prikazani na slici 4.3.:

$$E_\phi^o = \left(\frac{\partial V_\phi^o}{\partial T} \right)_p = \alpha_1 + 2\alpha_2 T \quad (4.2.)$$

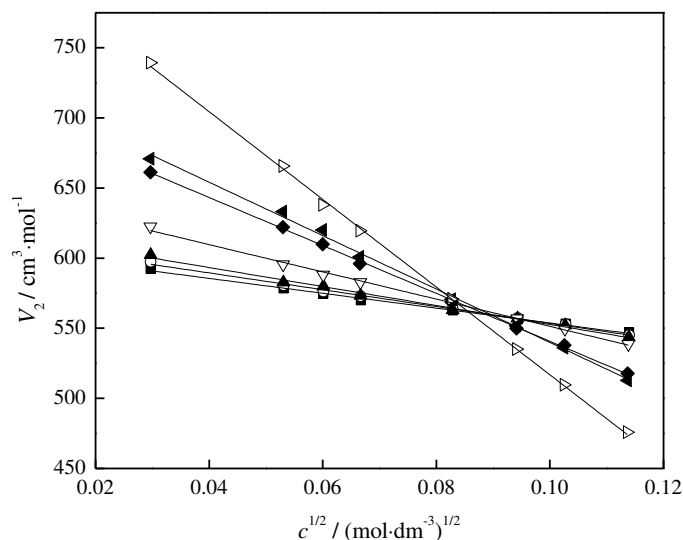
$$\left(\frac{\partial E_{\phi}^0}{\partial T}\right)_p = \left(\frac{\partial^2 V_{\phi}^0}{\partial T^2}\right)_p = 2\alpha_2 \quad (4.3.)$$



Slika 4.3. Zavisnost prividne molarne zapremine od temperature pri beskonačnom razblaženju (Vranes i dr., 2017)

Vrednosti E_{ϕ}^0 polako rastu sa porastom temperature, što ukazuje na to da dolazi do uklanjanja molekula vode iz hidratizane sfere fulerenola.

O „structure making/breaking” osobinama fulerenola se može zaključiti na osnovu promene parcijalne molarne zapremine sa koncentracijom. Na slici 4.4. je predstavljen grafik koji ukazuje na to da sa povećanjem koncentracije fulerenola dolazi do smanjenja parcijalne molarne zapremine, što ukazuje na kosmotropizam, odnosno „structure-making” svojstva. Pored toga, može se primetiti da pri koncentraciji fulerenola $0,007 \text{ mol/dm}^3$ V_2 na različitim temperaturama ima istu vrednost (presek pravih na slici 4.4.), odnosno može se zaključiti da se sistem drugačije ponaša na različitim temperaturama za koncentracije niže i više od $0,007 \text{ mol/dm}^3$.



Slika 4.4. Promena parcijalne molarne zapremine fulerenola, V_2 , sa promenom koncentracije fulerenola na temperaturama: $T = (\blacksquare)$ 293,15; (\circ) 295,15; (\blacktriangle) 298,15; (∇) 303,15; (\blacklozenge) 309,15; (\blacktriangleleft) 310,15 K; (\blacktriangleright) 313,15 K (Vranes i dr., 2017)

Eksperimentalni rezultati viskoznosti kao funkcija molalnosti fulerenola su predstavljeni na slici 3.8. i tabeli P5. Analizom grafika primećuju se dva regiona, pri nižim koncentracijama fulerenola do $0,1 \text{ mol/dm}^3$ viskoznost fulerenola eksponencijalno raste sa povećanjem koncentracije fulerenola. Nakon dostizanja koncentracije fulerenola $0,1 \text{ mol/dm}^3$, ne dolazi do značajnijih promena viskoziteta sa promenom koncentracije. Ovakvo ponašanje ukazuje na različitu strukturnu organizaciju molekula fulerenola u vodenom rastvoru ispod i iznad pomenute koncentracije, što je u saglasnosti sa volumetrijskim merenjima.

U cilju primene Džons-Dolove jednačine (Jones & Dole, 1929), redukovana viskoznost je fitovana u funkciji koncentracije FNP:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = 1 + A\sqrt{c} + Bc \quad (4.4)$$

gde je:

η_0 = viskoznost čiste vode

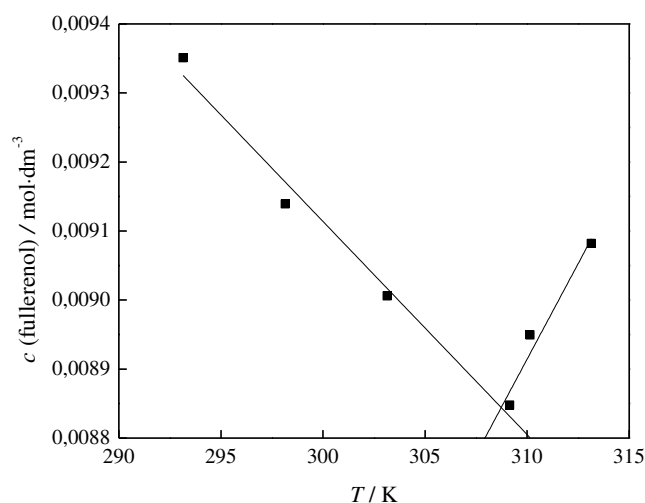
B = koeficijent, aditivna osobina jona i opisuje jon-solvent interakciju

$A\sqrt{c}$ = član identičan parametru dobijenom iz teorije elektrostatičkih interakcija dugog dometa u dielektričnom kontinuumu (Onsager & Fuoss, 1932)

Kriterijum za dodeljivanje „structure-making/breaking” osobina u sistemu je promena koeficijenta B sa temperaturom, odnosno dB/dT . Negativna vrednost ovog izraza ukazuje na jake interakcije između rastvorka i molekula vode, koje jačaju sa temperaturom, odnosno ukazuje na „structure-making” osobine.

Rezultati merenja električne provodljivosti (κ) mogu biti značajni pri određivanju jačine jon-jon interakcija, kao i formiranja jonskih parova u ispitivanom sistemu, međutim uspešno se mogu primeniti i na analizu interakcija između molekula/jona FNP u vodenom sistemu.

Promena električne provodljivosti (tabela P6) u zavisnosti od koncentracije fulerenola je predstavljena na slici 3.9., dok je molarna provodljivost binarne smeše fulerenol-voda u funkciji molalитета fulerenola merena u temperaturnom opsegu (293,15-313,15) K predstavljena u tabeli P7.



Slika 4.5. Promena koncentracije fulerenola sa promenom temperature kroz posmatranje samoudruživanja (Vranes i dr., 2017)

Na slici 4.5. su predstavljene koncentracije pri kojima dolazi do promene u trendu električne provodljivosti (Slika 3.9.) na različitim temperaturama. Na grafiku se jasno odvajaju dva trenda ponašanja: do temperature 309,5 K gde dolazi do stvaranja aglomerata i iznad te temperature, gde je aglomeracija manje favorizovana. Ispitivani sistem se nalazi u stanju dinamičke ravnoteže, što znači da su aglomerati različitih veličina međusobno promenljivi. Primarni perkolacioni klasteri (Semenov i dr., 2016) od svega nekoliko nanometara mogu postojati kao takvi ili se dalje udruživati u veće sekundarne klastere, kako je i potvrđeno metodama kao što su DLS, AFM i TEM. Interakcija između molekula fulerenola unutar

primarnog klastera je mnogo snažnija u odnosu na onu između primarnih klastera međusobno, što je i u saglasnosti sa rezultatima dobijenim za S_v , koja je imala negativni predznak.

Molarna provodljivost, čiji su rezultati predstavljeni na slici 4.6., se može izračunati iz jednačine 4.5.:

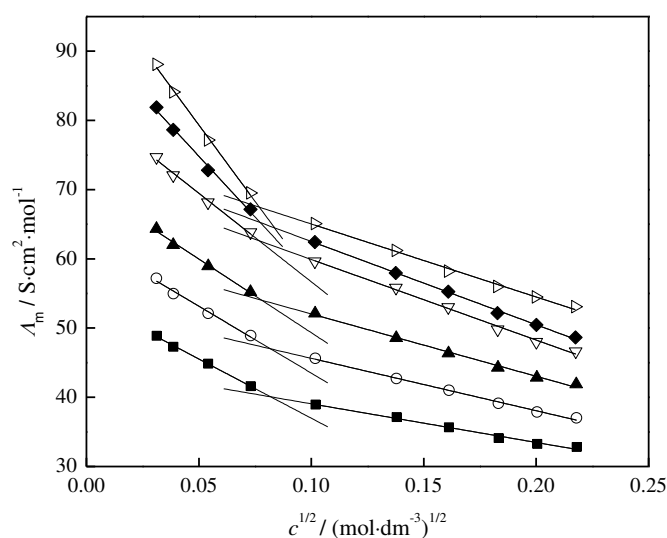
$$\Lambda_m = \kappa/c \quad (4.5.)$$

gde je:

Λ_m = molarna provodljivost

κ = provodljivost rastvora

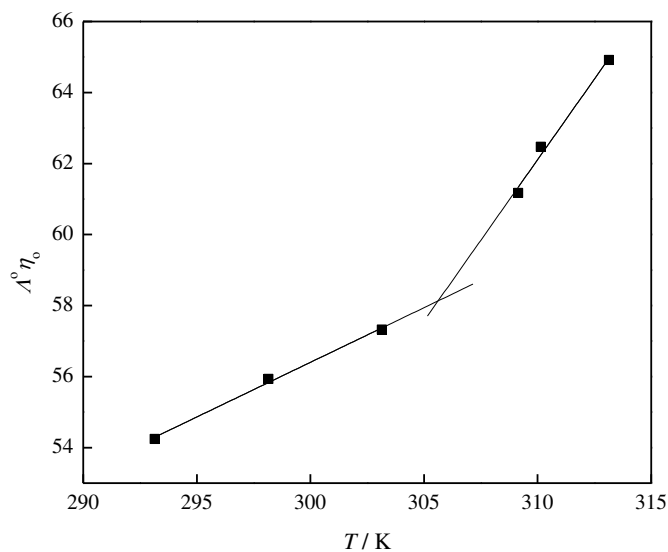
c = koncentracija rastvora



Slika 4.6. Promena molarne provodljivosti sa kvadratnim korenom koncentracije fulerenola pri temperaturama: T = (■) 293,15; (○) 298,15; (▲) 303,15; (▽) 309,15 ; (◆) 310,15; (▷) 313,15 K (Vranes i dr., 2017)

Ukoliko bi se linearni deo grafa ekstrapolisao na koncentracije niže od $0,01 \text{ mol/dm}^3$, dobija se vrednost granične molarne provodljivosti, Λ_0 .

Strukturiranje vode i promena sa temperaturom se može okarakterisati primenom Valdenovog pravila, koji predstavlja promenu tzv. Valdenovog proizvoda ($\Lambda_0\eta_0$) sa temperaturom (Jones & Dole, 1929; Kay & Evans, 1966). Na slici 4.7. je predstavljena promena Valdenovog proizvoda sa temperaturom, a pozitivni predznak nagiba ukazuje na „structure-making” osobine ispitanog fulerenola.



Slika 4.7. Promena Waldenovog proizvoda sa promenom temperature (Vranes i dr., 2017)

Pored toga, na grafiku se opet jasno izdvajaju dva različita trenda—niže i više od 309,15 K, što bi ukazivalo na razlike u strukturnoj organizaciji na temperaturama ispod i iznad 309,15 K. Povećanje temperature dovodi do smanjenja broja molekula vode oko fulerenola, što rezultuje smanjenjem lokalne viskoznosti. Stoga, električna provodljivost sistema se povećava sa povećanjem temperature.

4.3. RAČUNARSKE SIMULACIJE

U cilju dobijanja uvida u raspodelu molekula vode oko fulerenola, izračunate su odgovarajuće RDF. RDF u odnosu na rastojanje između centra mase (CM) fulerenola i atoma kiseonika u molekulima vode pokazuje da se maksimalne vrednosti $g(r)$ nalaze na udaljenost od 0,67 nm (6,7 Å) (Slika 3.10.). Uzimajući u obzir da poluprečnik fulerenola (izračunat kao rastojanje od CM fulerenola do atoma vodonika fulerenola) iznosi ~5,6 Å, dolazi se do zaključka da je verovatnoća pronalaženja molekula vode najveća na udaljenosti od fulerenola od oko 1,1 Å. Ovaj rezultat ukazuje na izraženu interakciju fulerenola sa vodom.

RDF u odnosu na rastojanja atoma kiseonika i vodonika iz $C_{60}(OH)_{24}$ sa jedne strane i atoma kiseonika iz molekula vode sa druge strane (Slika 3.11.), ukazuju na ostvarivanje jakih interakcija između fulerenola i molekula vode. Ovaj zaključak je posebno izražen u slučaju atoma vodonika, čije su maksimalne vrednosti $g(r)$ locirane na rastojanjima znatno ispod 2 Å. Pored toga, primećuje se pojava dve odvojene solvatacione sfere, gde se pik udaljenije sfere nalazi na udaljenosti od oko 3,2 Å. Udaljenost pika atoma kiseonika iznosi nešto više od 2,5 Å. Kako u slučaju atoma kiseonika, tako i vodonika, RDF imaju maksimalne $g(r)$ vrednosti u iznosu od oko 1,2. Što se tiče pika atoma ugljenika u fulerenolu, rastojanje maksimalne vrednosti $g(r)$ je oko 3,5 Å.

Uzimajući u obzir važnost struktuiranja fulerenola u zavisnosti od temperature, ispitane su RDF sistema 32 molekula fulerenola na dve različite temperature, 295 i 315 K (Slika 3.12.). Upola manja maksimalna vrednost $g(r)$ na višoj temperaturi ukazuje na to da je verovatnoća pronalaženja molekula fulerenola od odnosu na posmatrani molekul fulerenola upola manja na temperaturi od 315 K, u odnosu na temperaturu od 295 K. Na višoj temperaturi se takođe može uočiti i formiranje dve solvatacione sfere, što je u saglasnosti sa eksperimentalno dobijenim rezultatima volumetrijskih analiza koji takođe ukazuju na razlike u organizaciji molekula fulerenola sa promenom temperature.

4.4. UPLC ANALIZA

Grupa Sillion i saradnika je jedna od retkih grupa koje su uspešno okarakterisale fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ primenom elektrosprej masene spektrometrije (ESI-MS) (Sillion i dr., 2013). Ova grupa je demonstrirala da je ESI-MS pogodan metod ispitivanja fulerenola, kako u čistoj vodi, tako i u amonijačnom rastvoru. Pri modu negativne jonizacije kao predominantni pik se pokazuje pik na m/z 1127, dok je u pozitivnom modu predominantni višestruko naelektrisan pik na m/z 279.

Hromatogram fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ (Slika 3.13. b) ukazuje na retenciono vreme 4,49 i pregledom masenih spektara svakog pika utvrđeno je da potiče od polianjonskog molekula fulerenola sa 24 hidroksilne grupe naelektrisanog na 4 mesta, koji fragmentacijom daje jone m/z 282,2471 (m/z 1128,8196/4 = 282,205), a što je u saglasnosti sa sintetskim putem potpunom supstitucijom atoma broma polibromnog derivata $C_{60}Br_{24}$ hidroksilnim grupama (Djordjević i dr., 1998).

Spektri uzoraka formulacije (Slika 3.15.) u kojima doksorubicin predstavlja aktivnu komponentu pokazuju osnovni jon (fragment najvećeg inteziteta) na m/z vrednosti 396,9879, koji direktno nastaje fragmentacijom molekulskog jona (544,1166 Da) odvajanjem šećerne komponente (146 Da) iz molekula doksorubicina. Za dobijanje MS/MS spektra primenjen je MS/MS režim pri čemu je instrument podešen da snima samo fragmente koji nastaju od molekulskog jona (544,1166 Da), pri čemu se dobija intezivnija fragmentacija (Slika 3.16.). Rezultati su u saglasnosti sa literaturnim podacima (Kaushik & Bansal, 2015) i u ovom slučaju ukazuju na glavne fragmentacione produkte doksorubicina (361 Da i 321 Da).

Pregledom hromatograma i spektara koji se odnose na smeše, na osnovu spektara pojedinačnih komponenti smeše utvrđeno je prisustvo obe komponente: fulerenola i doksorubicina. Iz dobijenih rezultata (Slika 3.17.) MS spektara i na osnovu nepromenjenih retencionih vremena pojedinačnih komponenti koja se javljaju u hromatogramu nanokompozita, može se primetiti da ne dolazi do promene usled mešanja doksorubicina sa FNP nakon pripremanja smeše, čime se potvrđuje da ne dolazi do kovalentnog vezivanja između fulerenola i doksorubicina tokom trajanja eksperimenta.

Detaljnijim pregledom MS spektra nanokompozita FNP/DOX, odnosno spektra pika doksorubicina, primećuje se signal na m/z 1088 (Slika 3.18.). Ovaj signal se pripisuje dimerizovanom doksorubicinu, koji je poznat u literaturi i opisan je u istraživanju Agrawal i

saradnika (Agrawal, Barthwal, & Barthwal, 2009). MS-ESI+ analiza stoga pokazuje da u ispitivanom uzorku postoji antraciklinski lek kako u obliku dimera, tako i u obliku monomera, što može ukazivati na mogućnost specifične i multipotentne organizacije ne samo leka, već i FNP/DOX nanokompozita u celosti. Ovi rezultati su u saglasnosti sa drugim metodama primenjenim u ovom doktoratu za karakterizaciju nanokompozita FNP/DOX.

U cilju ispitivanja stabilnosti, kao i utvrđivanja mogućih kovalentnih interakcija između FNP i DOX u nanokompozitu FNP/DOX urađena je kvantifikacija uzoraka na dve talasne dužine (215 i 476 nm) tako što je praćen samo fragment 544,1122. Rezultati ovog eksperimenta su priloženi u Prilogu. Praćenjem koncentracija DOX u uzorcima nanokompozita FNP/DOX odmah po pripremi uzorka, kao i 24h i 48h nakon pripreme, dobijaju se skoro identične vrednosti koje ukazuju na to da ne dolazi do hemijske promene doksorubicina, odnosno do promene koncentracije doksorubicina u nanokompozitu tokom 48h od pravljenja uzorka nanokompozita.

Potencijalnu „pretnju” po stabilnost nekovalentnog kompozita FNP/DOX predstavlja upravo elektrosprej jonizacija u pozitivnom modu, usled koje se može očekivati protonacija hidroksilnih grupa fulerenola koje nisu angažovane u agregaciji, usled čega bi se elektrostatičke interakcije koje kao polianjon u vodenom rastvoru gradi sa protonovanim doksorubicinom (poseban osvrt na amino grupu šećerne komponente leka) narušile. Međutim, pored elektrostatičkih interakcija, u ovom kompozitu postoje i međumolekulske interakcije tipa vodoničnih veza, koje tretman prilikom elektrosprej jonizacije u pozitivnom modu ne narušava (Rosu, Pirote, Pauw, & Gabelica, 2006). Stoga, ukoliko bi se pristupilo detaljnijem analiziranju nanokompozita, te određivale konstante vezivanja u okviru nanokompozita, poželjno bi bilo da se eksperimenti nanokompozitnog leka i nosača izvode u negativnom jonizacionom modu, uz dodatnu primenu pozitivnog moda koji bi dao više informacija o prirodi međumolekulskih interakcija.

4.5. NMR ANALIZA

Molekulske interakcije između DOX i FNP su posmatrane praćenjem hemijskih pomeraja aromatičnih protona, kao i protona metil grupe šećerne komponente doksorubicina. Ispitan je uticaj različitog molskog udela FNP i DOX, kao i „starenja” uzorka na hemijski pomeraj pomenutih signala, čime se može steći uvid u promenu okruženja delova molekula, što ukazuje na angažovanost u građenju nekovalentnih interakcija u nanokompozitu.

Sa povećanjem molskog udela fulerenola ^1H NMR signali koji potiču od antraciklinskih protona i metil grupe u šećernoj komponenti doksorubicina (Jović i dr., 2016; Karagoz i dr., 2014) menjaju oblik i nestaju (Slike 3.19. i 3.20.), što znači da menjaju svoje okruženje tokom formiranja FNP/DOX nanokompozita. Na osnovu rezultata koji pokazuje pomeraj signala metil grupe šećerne komponente ka nižim vrednostima može se pretpostaviti da okruženje metil grupe biva zaklonjenije, te manje podložno dejstvu magnetnog polja kada se nađe u nanokompozitu sa višim molskim udelom fulerenola, usled dijamagnetne zaštite na površini fulerenola.

Pored toga, primetno je i nestajanje signala na sledećim ppm: 2; 2,2; 2,3; 2,7; 3; 5,5. Ovi signali su okarakterisani (Agrawal i dr., 2009) kao: aksijalni proton C_2 atoma šećerne komponente; aksijalni i ekvatorijalni proton na C_8 aglikonskog dela DOX; ekvatorijalni i aksijalni proton na C_{10} aglikonskog dela DOX i proton C_1 atoma šećerne komponente, redom. Na osnovu rezultata se može zaključiti da delovi molekula iz prethodnog niza ne učestvuju direktno u međumolekulskim interakcijama, odnosno da su ti delovi sa spoljašnjosti nastale strukture, zbog čega su izloženi delovanju rastvarača te im se i signal gubi. Sa druge strane, nestajanje signala bi moglo da ukazuje i na neposredni dodir sa površinom FNP, no pošto atomi nisu fiksirani na površini, signali ovih protona se šire i nestaju. Na primer, protoni C_2 šećerne komponente različitih molekula DOX se po malo razlikuju po okruženju jer su na različitim pozicijama na površini FNP i zato se dobija mnogo različitih signala koji se stapaju u jedan veoma široki, tj. nevidljivi signal.

Takođe, ispitivanjem koncentrovanog i razblaženog (6x) uzorka nanokompozita molskog odnosa 1:13 (u korist doksorubicina) se može primetiti transformacija pikova asigniranih kao antraciklinski protoni doksorubicinskog prstena D na položajima 1, 2 i 3 (Slika 1.11.) i pomeraj istih ka nižim vrednostima (Slika 3.2.1.) u slučaju koncentrovanog uzorka. Ova promena bi mogla ukazivati na postojanje međumolekulskih interakcija, odnosno agregacije između molekula doksorubicina (Agrawal i dr., 2009), koje dolaze do izražaja u

koncentrovanijem uzorku. Mala vrednost pomeraja protona doksorubicina ka nižim vrednostima usled pretpostavljenog stvaranja nanokompozita ne može sa sigurnošću da ukaže na postojanje nanokompozita. Male vrednosti hemijskih pomeraja protona DOX, uprkos postojanju interakcija sa FNP, bi se mogle objasniti i prisustvom hidratacionih sfera, čime se udaljenosti između FNP i DOX u vodenom rastvoru povećavaju (Prylutsky i dr., 2014a).

Studija LaPlante i saradnika (Laplante i dr., 2013) prethodno pomenute promene signala objašnjava agregacionom težnjom materije, što jeste osobina kako pojedinačnih komponenti, tako i samog nanokompozita FNP/DOX. Naime, spektri neagregirajuće materije usled razblaženja menjaju jedino intenzitet signala, za razliku od materije koja pokazuje težnju ka agregacijom, čiji se ^1H NMR spektri razlikuju ne samo po intenzitetu, već i po broju, obliku i pomeraju signala. NMR studija Agrawal i saradnika koja je ispitivala uticaj promene koncentracije antraciklina i temperature na hemijske pomeraje i promene signala NMR spektara je rezultovala značajnim saznanjima po pitanju samoudruživanja antraciklinskih molekula (Agrawal i dr., 2009). Na osnovu hemijskih pomeraja aromatičnih protona, zaključeno je da se sa porastom koncentracije leka favorizuje udruživanje molekula angažovanjem interakcija između aromatičnih prstenova, koje se sa porastom temperature narušavaju, zbog čega lek na višim temperaturama egzistira ponovo kao predominantno monomerni oblik. Sugerisano je, takođe, da pored dimer-monomer ravnoteže, hemijskim pomerajima sa promenom temperature doprinose i vodonične veze, kao i strukturne promene. Ovi rezultati, koreliraju sa rezultatima dobijenim različitim metodama nanokarakterizacije u ovom doktoratu, sa kojima upotpunjuju saznanja o ponašanju i organizaciji nanokompozita FNP/DOX.

Izvedeni su i difuzioni eksperimenti (DOSY) uzorka doksorubicina i uzorka nanokompozita FNP/DOX molarnog odnosa 1:13. Slični difuzioni koeficijenti doksorubicina i nanokompozita FNP/DOX ($\sim 2,5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$) ukazuju na međumolekulske interakcije u nastajanju FNP/DOX nanokompozita, ali i dimera doksorubicina. Ovi podaci su u saglasnosti sa literaturnim podacima difuzionih konstanti dobijenih za doksorubicin u istraživanju Agrawal i saradnika (Agrawal i dr., 2009). Inače, smanjenje difuzionog koeficijenta ukazuje na stvaranje kompleksa, ali Prylutsky i saradnici su odstupanje od značajno različitih vrednosti koeficijenata difuzije objasnili na primeru kompleksa fulerena i doksorubicina. Slični difuzioni koeficijenti dobijeni u NMR studiji u ovom doktoratu se objašnjavaju osobinama klastera u vodenom rastvoru, tj. efektom interakcije. Naime, fulerenoli

međusobno grade klastere koji međusobno interreaguju i kao takvi se braunovski kreću povećavajući svoju srednju vrednost brzine, usled čega ne dolazi do smanjenja vrednosti difuzionog koeficijenta (Prylutsky i dr., 2014a). Ova pretpostavka je potkrepljena i rezultatima drugih metoda, koje ukazuju na postojanje čestica nanokompozita većih dimenzija.

4.6. RAMANSKA SPEKTROSKOPIJA

Rezultati na slici 3.22., koji predstavljaju spektre fulerenola nastalih primenom različite snage lasera, ukazuju na to da sa promenom jačine lasera dolazi do promene Ramanskog signala fulerenola kao posledica degradacije uzorka. Pretragom literaturnih podataka ustanovljeno je da signal na oko 1460 cm^{-1} opisuje vibraciju fulerenskog kaveza (Takaya, Michihata, Hayashi, Murai, & Kano, 2013; Tung i dr., 2011), što ukazuje na očuvanje skeletne strukture C_{60} u uzorku FNP. Dawid i saradnici (Dawid, Górny, & Gburski, 2017) su u DFT studiji ispitali uticaj položaja hidroksilnih grupa na vibracione spektre izomera fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$. Naime, C-C istezanja u Ramanskom spektru ovog molekula su predstavljena kao potencijalni indikator različite distribucije hidroksilnih grupa po kavezu fulerena C_{60} , no ovi rezultati nisu uporedivi sa Ramanskim spektrima dobijenim analizom uzoraka u ovom doktoratu.

Poređenjem Ramanskih spektara vodenih rastvora fulerenola različitih koncentracija fulerenola prikazanih na slici 3.23. se može zaključiti da se u smislu položaja i kvaliteta Ramanske trake fulerenola ne menjaju sa promenom koncentracije fulerenola u koncentracionom opsegu 12 mg/cm^3 - 5 g/cm^3 .

Vodeni rastvori predstavljaju najpogodnije okruženje za proučavanje interakcija fulerenola sa doksorubicinom, te su rastvori nanokompozita FNP/DOX različitih odnosa FNP i DOX ispitani u cilju razjašnjenja načina interakcija u okviru nanokompozita (Slike P7-P9).

Većina traka doksorubicina se javlja u opsegu 300 - 500 cm^{-1} , kao i u opsegu 1000 - 1700 cm^{-1} . Spektri doksorubicina su uporedivi sa spektrima dobijenih od strane drugih grupa i okarakterisani su po uzoru na literaturne podatke (Hillig & Morris, 1976; Szafraniec i dr., 2016). Poređenjem spektara vodenog rastvora doksorubicina i nanokompozita može se uočiti da dolazi do promene određenih intenzivnih traka doksorubicina, što ukazuje na postojanje interakcija između ove dve komponente u nanokompozitu FNP/DOX. Naime, izgledi

maksimuma na 1330 i 1210 cm^{-1} se menjaju i ove najintenzivnije trake su pripisane deformacionim vibracijama u ravni i skeletnim vibracijama antrahinonskog prstena, kao i savijanju hidroksilne grupe vezane za aromatični prsten, redom. Pored toga, ističe se i traka istezanja C=O grupe (1630 cm^{-1}) angažovane u građenju vodonične veze. Ovi rezultati se mogu objasniti činjenicom da dolazi do promene u elektronskoj gustini usled prisustva fulerenolskih nanočestica hromofornom, inače veoma rigidnom, delu molekula antrahinonskog antibiotika doksorubicina (Szafraniec i dr., 2016).

Spektri uzoraka DOX i tri nanokompozita FNP/DOX različitih odnosa komponenti koji se dobijaju nakon 3h (Slika P8) i 24h sušenja (Slika P9) na zlatnoj podlozi ukazuju na promene na sledećim približnim vrednostima talasnih brojeva: 1630, 1440-1400, 1330, 1240, 1210, 1083, 450 cm^{-1} . Traka na 1630 cm^{-1} odgovara istezanju karbonilne grupe. Maksimum na oko 1440 cm^{-1} se pripisuje vibracijama aromatičnog prstena; na 1083 cm^{-1} se mogu posmatrati ili istezanje metoksi C-O veze ili savijanje vodonika vezanih za ugljenike aromatičnog prstena; dok intenzivne trake na 450 cm^{-1} karakterišu vibracije savijanja karbonilne grupe, udruženo sa savijanjem prstena doksorubicina (Hillig & Morris, 1976; Szafraniec i dr., 2016). Hidroksiantrahinoni, u koje se ubraja i doksorubicin, obično pokazuju dve ili tri trake u regionu 1200-1300 cm^{-1} usled udruženog istezanja veze fenolnog ugljenika i kiseonika i savijanja hidroksilne grupe. Strekal i saradnici ukazuju da do promene intenziteta određenih maksimuma može doći usled uspravljanja molekula iz planarnog "ležećeg" položaja (Strekal, German, Gachko, Maskevich, & Maskevich, 2001), odnosno do reorganizacije molekula doksorubicina u prisustvu FNP, stoga naši rezultati u oblasti tzv. dubleta na 1200 cm^{-1} , koji predstavljaju vibracioni odgovor OH grupa ukazuju na angažovanje tog dela molekula doksorubicina (prsten B/C doksorubicina) u interakcijama u nanokompozitu. Intramolekulska vodonična veza između fenolne i karbonilne grupe je razlog što se maksimum koji odgovara fenolnoj grupi doksorubicina nalazi na 1330 cm^{-1} umesto na nižim vrednostima talasnog broja od oko 1100 cm^{-1} (Szafraniec i dr., 2016). Na osnovu dobijenih Ramanskih spektara, odnosno promene odgovarajućih maksimuma doksorubicina nakon nastanka nanokompozita, moglo bi se pretpostaviti da je interakcija između fulerenolskih nanočestica i doksorubicina u nanokompozitu FNP/DOX praćena promenama na nivou π - π interakcija, kao i parcijalnom reorganizacijom intra i intermolekulskih vodoničnih veza. Ovo je posebno istaknuto u uzorku nanokompozita FNP/DOX sa odnosom komponentata koji je primarni predmet istraživanja ove doktorske disertacije. Razlika u odnosu na druga dva ispitana uzorka nanokompozita bi,

pored pomenutog, eventualno mogla ukazati i na specifičnosti fulerenolskih nanočestica (Vraneš i dr., 2017) u vodenom rastvoru, odnosno na određeno uređenje nanočestica tipa agregacije/samoagregacije.

4.7. UV SPEKTROSKOPIJA

Jedan od mogućih načina dokazivanja elektrostatičkih interakcija između fulerenolskih nanočestica i doksorubicina u nanokompozitu FNP/DOX je ispitivanje UV spektroskopijom. Ovaj pristup je u literaturi poznat i primenjivan je kako na ispitivanje nekovalentnih interakcija između doksorubicina i DNK (Liao, Zhou, & Xiao, 2005), tako i na ispitivanje interakcija doksorubicina i fulerena (Manet i dr., 2011).

U cilju proučavanja mogućih nekovalentnih interakcija između doksorubicina i fulerenola izvršeno je UV/VIS spektroskopsko ispitivanje vodenih rastvora sa različitim odnosima ove dve komponente. Promena položaja i oblika traka određenih ispitivanih funkcionalnih grupa ukazivala bi na građenje pretpostavljenih nanokompozita.

Na osnovu pomeraja traka koji su prikazani na slici 3.24. moglo bi se pretpostaviti da interakcija doksorubicina sa fulerenolom postaje intenzivnija od neke granične koncentracije fulerenola. U prilog ovoj pretpostavci idu rezultati istraživanja predstavljena u radu Vraneš i saradnika (Vranes i dr., 2017). UV spektroskopska ispitivanja interakcija kod sistema nanostruktura-lek predmet su ispitivanja značajnog broja istraživačkih grupa. Manet i saradnici su ispitivali sistem fuleren–doksorubicin, gde su uočeni hipohromni i batohromni efekat objašnjavali slabim π - π interakcijama (Manet i dr., 2011). Hipohromni efekat je potvrđen i u studijama koje su ispitivale interakcije između fulerena C₆₀ i aromatičnih lekova, gde je ukazano na stvaranje stabilnog nekovalentnog kompleksa C₆₀-DOX u različitim vodenim sredinama (Evstigneev, 2014; Evstigneev i dr., 2013; Prylutsky i dr., 2015). Sličan efekat može se uočiti i pri interakciji doksorubicina sa nanočesticama zlata (S. A. Kumar, Peter, & Nadeau, 2009). Hajian i saradnici za interakciju doksorubicina sa DNK takođe dobijaju slične spektralne promene na osnovu kojih čak objavljuju vrednost konstante vezivanja (Hajian, Shams, & Mohagheghian, 2009).

Hipohromne promene apsorpcionog maksimuma sa blago batohromnim pomerajem se mogu primetiti sa povećanjem koncentracije fulerenola, što je potvrda nastajanja nanokompozita FNP/DOX (Slika 3.24.). Ovi rezultati su u saglasnosti sa sličnim interakcijama lek-ugljenični sistem (Prylutsky i dr., 2014a).

Traka na 480 nm u velikoj meri zavisi od samoagregacije i protonacije aglikonskog dela molekula, dok se sa protonacijom daunosaminske komponente molekula doksorubicina ne menja. Pri neutralnim pH vrednostima aglikonski deo je neutralan, dok je šećerna komponenta protonovana (Agrawal i dr., 2009; Fiallo i dr., 1998; Menozzi, Valentini, Vannini, & Arcamone, 1984).

Radi sticanja što boljeg uvida u mehanizam stvaranja nekovalentnih molekulskih kompleksa između doksorubicina i fulerenola ova istraživanja je potrebno proširiti i intezivirati. Buduća istraživanja mogla bi uključivati određivanje konstante vezivanja, ispitivanje šireg opsega koncentracija, uticaj pH medijuma i prisustvo različitih rastvarača.

4.8. SPEKTROFLUOROMETRIJA

Spektrofluorometrijsko ispitivanje vodenih rastvora različitog odnosa koncentracija doksorubicina i fulerenola je urađeno sa ciljem praćenja nekovalentnih interakcija između ove dve komponente. Doksorubicin po ekscitaciji talasnom dužinom od 480 nm pokazuje dva maksimuma fluorescentnog pika (560 nm i 590 nm). Sa porastom koncentracije fulerenola u nanokompozitu FNP/DOX pri istoj koncentraciji DOX, primećuje se smanjenje intenziteta oba maksimuma DOX, i pojave novog maksimuma na oko 610 nm (Slika 3.25.). Smanjenje intenziteta maksimuma DOX (Hajian i dr., 2009) sa povećanjem koncentracije fulerenola se može objasniti angažovanjem doksorubicina u građenju nanokompozita. Yang i saradnici (Yang i dr., 2008) su smanjenje intenziteta emisionog maksimuma (*engl.* quenching) doksorubicina u prisustvu grafen-oksida pripisali stvaranju kompleksa sa prenosom naelektrisanja posredstvom π - π interakcija, stoga pojava novog maksimuma na većoj talasnoj dužini može ukazati na postojanje nanokompozita i to sa prenosom naelektrisanja, u kojem doksorubicin predstavlja elektron-donor (Singh & Goswami, 2007; Yang i dr., 2008). Rezultati studije u kojoj su ispitivali interakcije između doksorubicina i DNK, Hajian i saradnici su gašenje signala doksorubicina takođe objasnili interakcijama između ove dve komponente (Hajian i dr., 2009). Blazkova i saradnici su za novosintetisani konjugat fuleren-DOX takođe objavili smanjenje fluorescencije doksorubicina kao posledicu stvaranja konjugata (Blazkova i dr., 2014).

U literaturnim podacima se takođe, mogu pronaći i rezultati koji gašenje signala doksorubicina pripisuju građenju samoagregata, tj. dimera doksorubicina (Agrawal i dr., 2009). Naime, hromofore antraciklina kao planarne poseduju neravnomernu raspodelu

elektrona i kao takve favorizuju formiranje dimera u vodenom rastvoru, a što je favorizovano porastom koncentracije leka. Ovo ponašanje dovodi do toga da se intenzitet odgovora sa porastom koncentracije DOX gasi. Pored angažovanja u nanokompozitu, promena intenziteta maksimuma doksorubicina može ukazati i na građenje dimera doksorubicina. Potencijalna dimerizacija bi mogla biti objašnjena prisustvom polianjonskih fulerenolskih nanočestica, koje kao takve mogu favorizovati π - π interakcije između molekula doksorubicina. Imajući u vidu da doksorubicin u svojoj strukturi sadrži i amino grupu, koja se može protonovati, moglo bi se pretpostaviti da doksorubicin postoji kao monomer, ali i kao dimer, i da svojim slobodnim amino grupama interreaguje sa fulerenolskim nanočesticama. S obzirom na to da antraciklini u vodenim rastvorima pokazuju sposobnost asocijacije, predominantno dimerizacije u paralelnoj i antiparalelnoj orijentaciji (Agrawal i dr., 2009; Evstigneev, Khomich, & Davies, 2006; Menozzi i dr., 1984), ispitivanje samoasocijacije molekula lekova je od velikog značaja. Istraživanjima Agrawal i saradnika (Agrawal i dr., 2009) je potvrđeno da strukturne razlike u pakovanju molekula u dimeru dovodi do različitog farmakološkog odgovora. Saznanje o načinu samoudruživanja molekula leka bi trebalo da poboljša efikasnost leka jer bi omogućilo razumevanje farmakokinetičkog profila, što bi za rezultat imalo dizajn najpogodnije formulacije datog leka.

Samoudruživanje lekova utiče i na selektivni transport ovih supstanci kroz ćelijske membrane, kao i na multirezistenciju na lek izazvanu proteinima koji u membranskom lipidnom dvosloju stvara kanale (Kumar i dr., 2015; Trent, Marullo, Lin, Black, & Tirrell, 2011). Imajući u vidu sposobnost antraciklina da grade komplekse sa različitim molekulima (Menozzi i dr., 1984) smatra se da bi istovremena aplikacija sa odgovorajućim npr. nosačem mogla biti potencijalna terapija koja bi smanjila posledice predoziranja leka uz antimutageni efekat na *in vivo* modelu. U isto vreme, pošto bi tako nagrađeni kompleks bio većih dimenzija, jednom kada ga ćelija usvoji, izlazak kroz kanale ćelijske membrane bi praktično bio onemogućen, čime bi se povećala efikasnost leka. Metabolizam doksorubicina je praćen stvaranjem velike količine slobodnih radikala i raskidanje glikozidne veze između aglikona i šećerne komponente u molekulu doksorubicina se smatra odgovornim za razvijanje kardiotoksičnosti (Wang Ma, Cheetham, & Cui, 2016). Nekovalentne interakcije leka i nosača koje bi dozvolile ispoljavanje antineoplastičnih osobina leka i istovremeno onemogućila metabolisanje doksorubicina u smislu odvajanja šećerne komponente od aglikona bi, stoga, bila obećavajuća terapija visoke efikasnosti uz smanjenu kardiotoksičnost.

4.9. DLS

U cilju ispitivanja uticaja pH vrednosti sredine na veličinu fulerenolskih nanočestica urađena su DLS merenja vodenih uzoraka FNP koncentracije $0,125 \text{ mg/cm}^3$ u rastvorima sledećih pH vrednosti: 5,28; 5,99; 6,48; 7,66; 8,70. Ove vrednosti su izabrane na osnovu pH vrednosti krvi (7,35-7,45), stoga izabrane pH vrednosti rastvora za ispitivanje osobina čestica omogućuju simulaciju biološke sredine.

Rezultati DLS merenja na slici 3.26. prikazuju raspodelu čestica po broju i ukazuju na to da je najveći broj čestica veličine 5-6 nm u svim ispitivanim rastvorima, na osnovu čega se može zaključiti da se pri ispitanim pH vrednostima sredine čestice ponašaju, tj. organizuju na veoma sličan način, odnosno da pH vrednost rastvora u ispitanom opsegu ne utiče na veličinu i organizaciju čestica. Pri ovim uslovima i ovoj koncentraciji FNP, čestice grade aglomerate pomenutih veličina kao najstabilnije za date uslove. Prisustvo većih i manjih agregata u manjoj meri postoji, što dokazuju i rezultati merenja (rezultati nisu prikazani), no oni se mahom radi postizanja veće stabilnosti ili razlažu na manje ili udružuju u čestice većih dimenzija što je energetski favorizovano (Konstantin N. Semenov, Charykov, i Keskinov 2011).

Sa druge strane, rezultati merenja zeta-potencijala predstavljeni u tabeli 3.4. pokazuju određenu pH-zavisnost, što je u saglasnosti sa rezultatima drugih grupa (Assemi i dr., 2010; Brant i dr., 2007; Indeglia i dr., 2014). Iako ne u velikoj meri, srednja vrednost zeta-potencijala se ipak razlikuje u različitim sredinama, a jednoobrazni trend ponašanja čestica nije moguće izvesti. Naime, sa povišenjem pH vrednosti primećuje se trend rasta zeta potencijala čestica, međutim na srednjoj ispitanjoj pH vrednosti medijuma (6,48) dolazi do njegovog pada, nakon čega zeta potencijal ponovo raste. Razlog višeg zeta potencijala pri nižim pH vrednostima bi se mogao objasniti protonacijom polianjonske čestice FNP, te lakšom aglomeracijom i obratno, pri višim pH vrednostima je veći broj hidroksilnih grupa u fulerenolu deprotonovan, usled čega je i zeta potencijal niži. Ovo bi dalje, sa gledišta međumolekulskih interakcija, trebalo da rezultuje i različitim veličinama čestica usled različitih stupnjeva protonacije čestica, što se može potvrditi blagim pomerajem raspodele veličine čestica za najnižu pH vrednost ka nižim vrednostima veličine čestica. Odstupanje pri pH vrednosti 6,48 bi se moglo objasniti različitom organizacijom čestica u ovom u odnosu na ostale rastvore, gde jedan deo hidroksilnih grupa (protonovanih ili ne) pojedinačnih molekula ostaje „zarobljen” u centralnom delu aglomerata koji nastaju specifičnim udruživanjem molekula pri tim uslovima (Vileno i dr.). Samoudruživanje negativno naelektrisanih molekula

fulerenola u aglomerate dovodi do unutrašnje nestabilnosti jer su molekuli udruženi hidrofobnim interakcijama i vodoničnim vezama, a po prirodi se razilaze usled elektrostatičkih odbijanja. Detaljniji pregled rezultata zeta potencijala ukazuje na postojanje različito naelektrisanih familija čestica, čime se potvrđuje kompleksnost i polimorfnost uzoraka koji se ispituju. Indeglia i saradnici (Indeglia i dr., 2014) su DLS ispitivanjem rastvora fulerenola u koncentracionom opsegu 2-2000 mg/dm³ doveli u vezu povećanje afiniteta ka stvaranju agregata sa porastom koncentracije fulerenola, gde je pri najnižim koncentracijama rezultat merenja ukazivao na prisustvo čak i pojedinačnih molekula, dok se pri najvećim koncentracijama rastvor ponaša bimodalno, odnosno u rastvoru postoje porodice čestica sa najdominantnijim česticama veličine oko 36,1 nm i 102 nm, gde je interval veličina kod veće porodice čestica 33,1-315 nm. Brant i saradnici (2007) su objavili slične podatke, njihovi rezultati pokazuju pik distribucije oko 100 nm pri koncentraciji fulerenola 44 mg/dm³. Pored ovoga, ova grupa autora tvrdi da je aglomeracija favorizovana interakcijama kakve su npr. hidrofobne interakcije, a na osnovu izostanka uticaja pH vrednosti sredine na aglomeraciju čestica. Sa druge strane, Kokubo i saradnici (2008) za veličinu čestica fulerenola dobijaju opseg veličina koje bi odgovarale kako pojedinačnim molekulima fulerenola 1,1 nm, tako i aglomeratima od 100 nm.

Pri ispitivanju rastvora dobijenog mešanjem rastvora FNP koncentracije $c=0,0125$ mg/cm³ sa rastvorom DOX (Slika 3.27.) dobijeni su rezultati koji ukazuju na to da je najveći procenat čestica veličine 50-60 nm, dok su veličine samih FNP čestica u vodenom rastvoru pri pomenutoj koncentraciji u najvećem procentu oko 6, 8 i 10 nm. Sličan trend se ponavlja i kod druga dva sistema. Pri koncentraciji FNP od 0,125 mg/cm³ (Slika 3.28.) veličina čestica FNP je oko 2 i 5 nm, dok je najveći broj čestica nanokompozita FNP/DOX veličine 80-100 nm, što je u saglasnosti sa rezultatima Seke i saradnika (2016), čiji rezultati ukazuju na prisustvo čestica nanokompozita FNP/DOX veličine 18–105 nm, kao i na pomeranje raspodele veličine čestica ka višim vrednostima sa vremenom (nakon 72h 32–122 nm; nakon 96 h 32–141 nm). U slučaju kada je koncentracija FNP 1,25 mg/cm³ (Slika 3.29.), veličina čestica u rastvoru FNP je oko 2, 4 i 8 nm, dok je najveći procenat čestica nanokompozita FNP/DOX veličine 400-500 nm. Slični rezultati, ali za kompleks C₆₀-DOX su objavljeni u literaturi (Panchuk i dr., 2015; Prylutsyy i dr., 2015), gde je primećeno da je u vodenom rastvoru bez dodatka soli veličina čestica fulerena bila oko 100 nm, dok su u fiziološkom rastvoru čestice fulerena bile prosečne veličine oko 33 nm. Ovo smanjenje prosečnih vrednosti veličina čestica se objašnjava prisustvom natrijumovih i hloridnih jona u fiziološkom rastvoru. Sa druge strane,

u uzorcima kompleksa C₆₀-DOX u vodenom rastvoru veličina čestica je bila oko 600 nm, a u fiziološkom rastvoru oko 132 nm i ovo povećanje veličine čestica u uzorku kompleksa u odnosu na veličinu čestica fulerena u oba medijuma ukazuje na stvaranje kompleksa između doksorubicina i fulerena.

Sumarni pregled raspodele veličine čestica po broju nanokompozita FNP/DOX pri različitim koncentracijama FNP je dat na slici 3.30., gde se jasno odvajaju tri grupisane familije čestica u zavisnosti od koncentracije FNP u nanokompozitu, gde čestice nanokompozita iz rastvora sa najnižom koncentracijom FNP imaju najmanje veličine. Objašnjenje ovakvog ponašanja bi mogao biti uticaj rastvarača koji do izražaja dolazi u razblaženijim rastvorima, usled čega je moguća pojava čak i monomernih oblika iz agregata. Zeta potencijal rastvora nanokompozita u kojem je koncentracija FNP 0,125 mg/cm³ (+35 mV; a nakon 7 dana +40,1 mV) je veći u poređenju sa vrednostima zeta potencijala za nanokompozit u kojima je c(FNP)=0,0125 mg/cm³ (+28 mV) i c(FNP)=1,25 mg/cm³ (+28,9 mV). Fulerenolski klasteri u vodenom rastvoru su negativno naelektrisani, te im je vrednost zeta potencijala negativna. Sa dodatkom DOX, ova vrednost se znatno pomera ka pozitivnim vrednostima i dostiže vrednost +40,1 mV. Slične rezultate za kompleks fulerena i doksorubicina su objavili i Panchuk i saradnici (2015). Ova promena vrednosti zeta potencijala vrlo lako može biti posledica interakcija fulerenolskih nanočestica doksorubicina, koji obavija ove klasterne, te menja površinsko naelektrisanje. S obzirom na to da se sistemi u kojima je zeta potencijal izvan opsega ±30 mV smatraju stabilnim (Clogston & Patri, 2011), možemo zaključiti da je sistem FNP/DOX sa koncentracijom FNP 0,125 mg/cm³ najstabilniji. Ovo, međutim, ne može objasniti zbog čega dolazi do tolikog raskoraka u dimenzijama čestica u druga dva sistema nanokompozita. Objašnjenje za ovakvo ponašanje bi moglo biti u osobini rastvora viših koncentracija da grade veće aglomerate, što je u saglasnosti sa ranije objavljenim rezultatima (Indeglia i dr. 2014), a što opet rađa pitanje zbog čega se rastvori samog FNP različitih koncentracija ne ponašaju po tom istom principu.

Rezultati raspodele veličine čestica po broju za sva tri merena uzorka u ćelijskom medijumu DMEM+5% FCS, FNP u medijumu, kao i FNP/DOX u medijumu, pokazuju skoro istovetni trend raspodele čestica (Slika 3.31.). U samom medijumu najveći broj čestica je veličine oko 8 nm, dok je u ostala dva uzorka najveći broj čestica veličine oko 6 nm. Blago pomeranje raspodele veličine čestica ka nižim vrednostima se može objasniti stabilizacijom čestica prisustvom proteina koji se nalaze u medijumu.

Zeta potencijal FNP u medijumu (-11,2 mV) je, kako bi se i očekivalo, najniži. Zeta potencijal čestica (Tabela 3.8.) u rastvoru nanokompozita FNP/DOX se očekivano povećava u poređenju sa zeta potencijalom FNP i dostiže vrednost -8,62 mV, što je u saglasnosti sa rezultatima Seke i saradnika (2016). S obzirom na to da su vrednosti zeta potencijala sva tri uzorka u opsegu ± 30 mV, može se sa vremenom očekivati dalja aglomeracija. Ukoliko bi se rezultati merenja predstavili tako da se posmatra raspodela veličine čestica po intenzitetu, moguće je dobiti bolju predstavu o porodicama čestica koje postoje u ispitanim rastvorima.

Naime, raspodele veličine čestica po intenzitetu (Slika P10) pokazuju skoro istovetni trend raspodele čestica FNP i FNP/DOX u ćelijskom medijumu, gde postoje 3 familije čestica u uzorku nanokompozita FNP/DOX, odnosno 4 familije čestica u uzorku FNP.

Najmanja familija od četiri postojeće u FNP uzorku sadrži čestice veličine 2,5-5 nm, srednja čestice dimenzija 6-25 nm, sledeća familija sadrži čestice 25-180 nm, dok u nanometarski najveću familiju spadaju čestice veličine 200-600 nm. Slična podela je i u uzorku nanokompozita FNP/DOX, gde postoje sledeće familije čestica: 4-20 nm, 20-200 nm i 200-800 nm. Poslednja grupa u oba uzorka može poticati i od artefakata, a kao posledica manuelne obrade uzorka, kao i prenošenja uzorka u zeta kivetu u kojoj se odvija merenje. S obzirom na to da je intenzitet rasejanja svetlosti te porodice u odnosu na veličinu čestica kojima odgovara veoma mali, kao i to da čestice tih dimenzionih opsega izlaze iz okvira teme i primene ove disertacije, o njima dalje neće biti reči.

Sa druge strane, postojanje familije čestica opsega veličina 4-20 nm, kao i 20-200 nm, je u saglasnosti sa rezultatima grupa koje su se bavile karakterizacijom i primenom ovakvih sistema (Borišev i dr., 2016; Brant i dr., 2007; Jović i dr., 2016; Sayes i dr., 2004; Su i dr., 2010). Pored toga, postojanje ovih familija čestica je između ostalog, i posledica kompleksnih zeta potencijala ovih čestica, koji su sada jasniji i bolje koreliraju sa raspodelom čestica.

Kako Semenov i saradnici (2011) objašnjavaju slika 1.10., a što je u saglasnosti i sa rezultatima Vraneš i saradnika (2017), hidratisani molekuli fulerenola se udružuju u različite tzv. perkolacione primarne, sekundarne i tercijarne klastere, koji su različitih veličina, a između kojih je ostvarena svojevrsna dinamička ravnoteža, stoga se prisustvo svakog od pomenutih klastera može u određenoj meri pronaći u ispitivanim uzorcima.

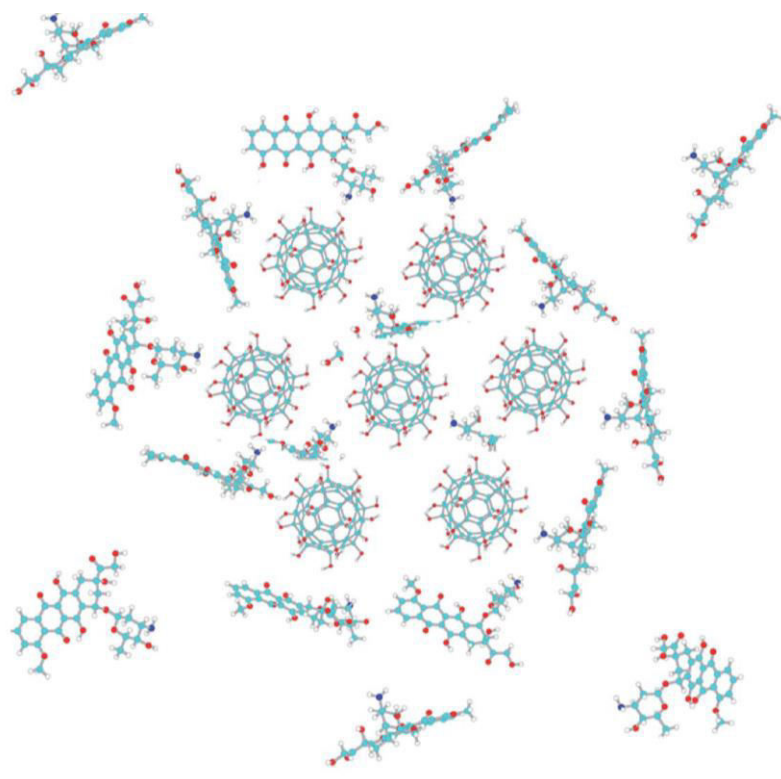
4.10. AFM ANALIZA

Veličinu čestica u rastvorima FNP, kao i njihovu topografiju okarakterisao je znatan broj istraživačkih grupa (Assemi i dr., 2010; Borišev i dr., 2016; Jović i dr., 2016; Seke i dr., 2016; Vileno i dr., 2006), gde npr. Borišev i saradnici AFM analizom vodenih rastvora FNP uočavaju prisustvo čestica veličine 55-70 nm. Većina FNP čestica se nalazila raspoređena po terasama HOPG, što je u skladu sa hidrofilnošću ovih čestica, dok je jedan deo stupio u hidrofobne interakcije sa nepolarnom HOPG podlogom. Slične rezultate objavljuju dve istraživačke grupe (Husebo i dr. 2004; Brant i dr. 2007). Veoma bitno za analizu AFM je činjenica da je lateralna adsorpcija fulerenola na površinu visoko-orijentisanog pirolitičkog grafitu osobenost koja potiče od interakcija površine i agregata, te se treba posmatrati kao veličina za sebe, i ne opisuje stanje agregacije fulerenola u rastvoru. Stoga, samo veličina čestica po vertikali može dati uvid u stvarni dijametar agregata koji se kao takvi iz rastvora talože na grafitu.

AFM studija nanokompozita FNP/DOX staloženih na HOPG podlogu (3.33.) ukazuje na postojanje pravilnih sfernih čestica. Posmatrana raspodela čestica se u odnosu na istu u rastvoru fulerenola (3.32.) razlikuje i formiranje ovakvih struktura se ne može pripisati samom DOX ili FNP, te bi se moglo zaključiti da DOX kao pozitivno naelektrisani molekul pri približno neutralnoj pH vrednosti medijuma (Agrawal i dr., 2009; Fiallo i dr., 1998; Menozzi i dr., 1984) gradi interakcije sa polianjonskim FNP, smanjujući time elektrostatičke repulzije među njima. Imajući ovo na umu, može se reći da se na slici 3.33. vidi struktura formiranog nanokompozita FNP/DOX.

Praćenjem starenja uzorka FNP/DOX dolazi se do zaključka da se čestice veličine 30-40 nm samoudružuju u nanovlakna mikronskih dužina (Slika 3.34.), verovatno uzajamnim privlačnim polarnim interakcijama. Slične rezultate i način udruživanja fulerenoloskih nanočestica objavljuju Vileno i saradnici (2006). Sa druge strane, rezultati AFM studije Prylutskyy i saradnika (2015) ukazuju na to da molekuli doksorubicina u fiziološkom rastvoru grade uređene dugolančane razgranate strukture visine 6-20 nm, a slične strukture u fiziološkom rastvoru gradi i kompleks C₆₀-DOX. Stoga, vlaknaste strukture na slici 3.34. bi mogle poticati od samoasocijacije doksorubicina, ali i od nagrađenog nanokompozita. Moguće je i da na terasama HOPG, na kojima se zadržavaju, čestice međusobno interreaguju gradeći nanoniti. Promene u morfologiji uzorka nanokompozita FNP/DOX u poređenju sa FNP česticama ukazuju na promene u organizaciji čestica fulerenola u prisustvu doksorubicina. Pretpostavka je da slobodni molekuli doksorubicina tokom formiranja

stabilnog FNP/DOX nanokompozita ostaju „zarobljeni” unutar nanočestice (Slika 4.8.) i raspoređeni oko FNP (Jovic i dr. 2016).



Slika 4.8. Hipotetički prikaz FNP/DOX nanokompozita (Jovic i dr., 2016)

4.11. TEM ANALIZA

Rezultati TEM merenja uzorka FNP nakon sonikacije ukazuju da u uzorku postoji osnovni motiv FNP, koje imaju potencijal za daljim udruživanjem u veće aglomerate/čestice. Rezultati TEM merenja Vraneš i saradnika (2017) ukazuju na organizaciju čestica FNP u aglomerate veličine 6-9 nm, za koje autori pretpostavljaju dalji stepen aglomeracije do većih aglomerata, što je u saglasnosti i sa rezultatima drugih grupa (Cai i dr., 2008; Semenov i dr., 2011; Semenov i dr., 2016).

Indeglia i saradnici objašnjavaju aglomeraciju kao odgovor na umanjeње razlika u polarnosti molekula (Indeglia i dr., 2014). Rezultati TEM merenja Seke i saradnika potvrđuju prisustvo manjih čestica veličina između 5-8 nm, za koje se pretpostavlja da se dalje udružuju u aglomerate većih dimenzija od oko 50 nm (Seke i dr., 2016) što je u skladu sa radovima Andrievski i saradnika (Andrievski). Potencijal ka stvaranju aglomerata fulerenola u vodi i

ćelijskom medijumu je ispitivala grupa Canvas i saradnika (Semenov i dr., 2016), koja je za veličinu aglomerata u vodi dobila vrednosti oko 30 nm, dok je TEM analiza ukazala na prisustvo manjih čestica veličine 12-20 nm. Merenja su ponovljena i nakon inkubacije u DMEM medijumu, gde su se veličine čestica povećale na oko 80 nm, usled agregacije čestica koja može poticati od prisustva nutrijenata u ćelijskom medijumu, ili proteina u serumu. Pored toga, u ćelijskom medijumu dolazi i do pomeraja vrednosti zeta potencijala ka pozitivnijim vrednostima (od -37,5 mV do -22,6 mV). Do sličnih rezultata su došli i Su i saradnici (2010).

Eventualna „neslaganja” TEM rezultata sa DLS rezultatima po pitanju veličine čestica leže u činjenici da mikroskopija određuje veličinu čestica na sasušenom uzorku, dok se DLS analiza vrši u rastvorima, gde izmereni rezultat predstavlja hidrodinamički dijametar čestica. Stoga, odstupanja mogu poticati od prisustva hidratacione sfere koja okružuje česticu u vodenom uzorku. Pored toga, priprema uzoraka za TEM snimanje zahteva veoma visoka razblaženja, zbog čega je izazovno dostići zadovoljavajući i reprezentativni broj čestica u polju, kao i dostići visok kvalitet slike.

Poređenjem TEM rezultata homogenog uzorka FNP (Slika 3.35.) sa česticama FNP/DOX nanokompozita (3.36.), primećuju se razlike po pitanju veličine i oblika agregata. Naime, u uzorku nanokompozita se manje čestice udružuju, te grade aglomerate dijametara do 7 nm, što bi moglo ukazivati na postojanje interakcija između FNP i DOX, ali i na aglomeraciju samih molekula fulerenola.

4.12. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI *IN VITRO* NA ĆELIJSKIM LINIJAMA

U ovom radu ispitana je antiproliferativna aktivnost vodenih rastvora DOX i nanokompozita FNP/DOX prema jednoj zdravoj (MRC-5) i četiri tumorske ćelijske linije (MDA MB-231, MCF-7, Hs-294 T i U-251). Za određivanje intenziteta ćelijskog rasta korišćen je sulforodamin B (SRB) test. Za ispitivanje antiproliferativne aktivnosti ispitivanih supstanci odabran je test sulforodamin B (SRB) jer je potvrđena njegova veća osetljivost u odnosu na MTT test (Četojević-Simin, 2005). Detaljnom optimizacijom SRB metode takođe je utvrđeno da koncentracija telećeg seruma od 5% doprinosi najmanjoj grešci prilikom upotrebe SRB testa, što je veoma korisno naročito kod ispitivanja nanokompozita zbog potencijalnog uticaja proteina iz medijuma na biološki efekat (Četojević-Simin, Doktorska disertacija). Antiproliferativna aktivnost izražena je kao EC_{50} vrednost, a efekat na ćelijski rast je prikazan kao procenat u odnosu na kontrolu. U cilju određivanja selektivnosti za tumorske u odnosu na zdravu ćelijsku liniju određen je odnos NT/T, koji predstavlja količnik EC_{50} vrednosti dobijenih za netumorsku i tumorske ćelijske linije.

1. Upoređivanje antiproliferativnog uticaja nanokompozita sa efektima samog DOX

Rezultati dobijeni tokom različitih perioda tretmana ćelijskih linija pokazuju da nanokompozit FNP/DOX deluje inhibitory na rast ćelija u većoj meri nego sam DOX. Najveći efekat nanokompozita FNP/DOX u poređenju sa DOX, sudeći po EC_{50} vrednostima, se uočava pri 48-h tretmanu kod tumorskih ćelijskih linija U-251, MCF-7 i MDA-MB-231, gde je efikasnost nanokompozita bolja i do 2,4 puta od DOX na U-251 i MCF-7 ćelijskim linijama. Veći antiproliferativni efekat nanokompozita u odnosu na sam lek je primećen i pri 24h tretmanu na MCF-7 i U-251 ćelijskim linijama, gde je efikasnost nanokompozita bolja 1,8 i 1,4 puta, redom. U 72-časovnom tetmanu je efikasnost nanokompozita bila veća na svim ćelijskim linijama osim U-251.

Antitumorska efikasnost se može dovesti u vezu sa načinom i brzinom unosa u ćeliju. Naime, razlike u načinu internalizacije i opsegu ćelijskog unosa slobodnog DOX i različitih nanočestica koje nose DOX se mogu naći u literaturnim podacima (Upadhyay i dr., 2010; Zou i dr., 2012). Za razliku od DOX-a, koji u ćelije ulazi difuzijom ili putem nosača raspoređujući se u citoplazmi i jedru, nešto veće nanočestice se unose endocitozom i zadržavaju uglavnom u citoplazmi (Dai i dr. 2008). Prisustvo nanonosaa olakšava unos leka

u ćeliju i smanjuje mogućnost interakcije DOX sa transmembranskim pumpama čime se zaobilazi pojava rezistencije na lek (Dong i Mumper 2010), odnosno efluksa istog. Sa druge strane, fulerenolske nanočestice kao polianjonski nanonosac „maskiraju” pozitivno naelektrisanje doksorubicina, čime je unos difuzijom kroz ćelijsku membranu olakšan (Seke, Doktorska disertacija). Chithrani i saradnici su ukazali na to da proteini seruma mogu usled adsorpcije diktirati preuzimanje nanočestica. Moguća veza između sposobnosti „kompleksiranja” i biološkog sinergizma fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ i doksorubicina može biti u vezi sa mogućnošću aromatičnog molekula leka da gradi nekovalentne hetero-komplekse, čime dolazi do promene biološkog efekta leka, što je opisano i poznato u literaturi (Prylutsky i dr., 2014; Skamrova i dr., 2014; Evstigneev i dr., 2013). Imajući u vidu literaturne podatke, moglo bi se pretpostaviti da nanokompozit FNP/DOX pozitivnog zeta potencijala posredstvom receptorskog mehanizma ulazi u ćelije endocitozom (Xie i dr., 2006; Chithrani i dr., 2006). Povećani citotoksični efekat FNP/DOX nanokompozita bi se mogao objasniti povećanim ćelijskim usvajanjem nanokompozita u odnosu na sam lek (Jović i dr, 2016).

2. Razlike u efektima u odnosu na različite vremenske intervale

Poredeći rezultate EC_{50} vrednosti za različite vremenske tretmane ćelijskih linija može se zaključiti da nanokompozit FNP/DOX u većoj meri nego DOX inhibira ćelijski rast posebno u 48-časovnom tretmanu, gde se na dve ćelijske linije (MCF-7 i U-251) primećuje bolja aktivnost nanokompozita 2,4 puta. Trend rezultata dobijenih za MCF-7 ćelijsku liniju su u saglasnosti sa trendom rezultata dobijenih u istraživanju Jović i saradnika (2016). Sa druge strane, poredeći vrednosti EC_{50} za sve tretmane i sve ćelijske linije, primetno je da se najniža EC_{50} vrednost, odnosno najveća antiproliferativna aktivnost, nanokompozita FNP/DOX beleži pri 72-časovnom tretmanu na HS-294T ćelijskoj liniji. Osim toga, poredeći EC_{50} vrednosti za 24-časovni i 72-časovni tretman nanokompozitom na ovoj ćelijskoj liniji, može se primetiti porast antiproliferativne vrednosti sa dužinom tretmana 466 puta.

U istraživanju Gao i saradnika (2011) gde je ispitano oslobađanje doksorubicina sa mezoporoznih silika nanočestica u dve maligne ćelijske linije (DOX-rezistentne MCF-7/ADR i DOX-osetljive MCF-7) dobijeni su rezultati koji ukazuju na različitu toksičnost pri različitim vremenskim tretmanima. Naime, potvrđeno je da se sa povećanjem vremena inkubacije povećava i unutarćelijska koncentracija leka, čime se ovaj sistem predlaže kao primer kontrolisanog otpuštanja leka. Gao i saradnici (2011) ovu osobenost objašnjavaju postepenim oslobađanjem leka sa nanočestica uz istovremeno smanjenje efluksa leka usled

smanjenja ekspresije P-glikoproteina i nivoa ATP, do kojih dolazi zbog prisustva nanonosača, a koji su odgovorni za „curenje” leka iz ćelija. Unutarćelijska raspodela samog doksorubicina i doksorubicina vezanog za nosač potvrđena konfokalnom mikroskopijom ukazuje na to da tokom 24h dolazi do raspodele leka u citoplazmi, dok se prelazak u jedro zapaža nakon 48h, čime je potvrđeno efikasno usvajanje ovako formulisanog leka u ćelije uz postepeno oslobađanje sa nosača. Najveća efikasnost nanokompozita FNP/DOX nakon 48h tretmana bi se, stoga, mogla pripisati tempu unošenja i raspodele samog leka i leka vezanog u obliku nanokompozita u ćeliju i jedro, kao i potencijalnom uticaju nanokompozita na smanjenje efluksa leka iz ćelija, usled čega doksorubicin biva „zatočen“ u ćeliji duži vremenski period, čime je uslovljeno i bolje antiproliferativno dejstvo u 48h tretmanu.

Sa druge strane, imajući u vidu da je poluživot DOX oko 30h, da lako izlazi iz ćelija aktivnim transportom (Tacar i dr., 2013; Goren i dr, 2000), kao i da se usled tretmana doksorubicinom u ćelijskim linijama kancera dojke (MCF-7 i MDA-MB-231) u većoj meri sintetišu MDR-1 (*eng.* Multi-drug resistance gene-1) proteini, može se pretpostaviti da različit odgovor ćelija potiče i od promenljive količine doksorubicina usled metabolisanja leka.

Rezultat najvećeg efekta nanokompozita FNP/DOX nakon 48 h na ćelijsku liniju U-251 se može objasniti i specifičnim stečenim „senescence” fenotipom ove ćelijske linije, odnosno ispoljavanjem „odložene smrti”, kako u literaturi objašnjavaju Rebbaa i saradnici (2003), u čijem istraživanju je dokazano da doksorubicin može izazvati čak tri različita načina smrti ćelija i to u zavisnosti od koncentracije leka i dužine tretmana. Primećeno je da ćelije tretirane niskim dozama leka dobijaju osobine „senescence” fenotipa, što je praćeno odloženom smrću ćelija. „Senescence” se može posmatrati kao „sigurni mod” u koji mnoge eukariotske ćelije ulaze pošto napuste ćelijski ciklus u koji dospevaju kao odgovor na neki onkogen (Serrano i dr., 1997), i ova pojava se smatra tumor-supresujućim programom ćelije. Imajući ovo u vidu, razvoj molekula koji bi ćelije dovodili u „zaštitni mod”, te u odloženu smrt, pre nego vodili u apoptozu se smatra mogućim terapeuskim pristupom za prevenciju i/ili lečenje kancera. Schmitt i Lowe (2002) su na *in vivo* modelu miša istakli veću važnost ovakvog odgovora ćelija u poređenju sa apoptozom u određivanju ishoda hemoterapeuskih intervencija. Različito antiproliferativno dejstvo na različitim vremenskim tretmanima bi se, stoga, moglo pripisati ne samo specifičnosti nanokompozita, načinu unosa nanokompozita, metabolizmu doksorubicina, već i specifičnostima samih ćelijskih linija.

3. Selektivnost

Odnos NT/T ukazuje na to da i u slučaju primene DOX i nanokompozita FNP/DOX postoji selektivna antiproliferativna aktivnost prema tumorskim ćelijama, osim u 24h na HS-294 T i 48h na MDA-MB-231. Najveću selektivnost FNP/DOX nanokompozit ispoljava prema HS-294T ćelijskoj liniji u 72h, prema U-251 u 48h i prema MCF-7 u 24h tretmanu. Povećanje odnosa NT/T pri primeni nanokompozita FNP/DOX u odnosu na DOX u 24h/48h na MCF-7 i 48h na U-251 ćelijske linije ukazuje na povećanje selektivnosti prema tumorskim ćelijskim linijama pri primeni nanokompozita FNP/DOX. Razlog veće selektivnosti nanokompozita u 48h tretmanu prema U-251 ćelijama bi se i u ovom slučaju moglapripisati specifičnosti U-251 ćelija, kod kojih je primećeno da ćelije tretirane niskim dozama leka dobijaju osobine „senescence” fenotipa, što je praćeno odloženom smrću ćelija (Rebbaa i dr., 2003).

Na povećanje senzitivnosti ćelija može uticati inhibicija ćelijskih transportera za lek (Chaisit, Siripong, & Jianmongkol, 2017), što se postiže kod npr. prevazilaženja rezistentnosti malignih ćelija na lek. Ovi transporteri su od najvećeg značaja za lekove koji se u ćeliju unose pasivnom difuzijom, gde se ubraja i doksorubicin, te bi se veća selektivnost nanokompozita, odnosno povećana citotoksičnost prema MCF-7 ćelijama, mogla pripisati upravo pomenutom mehanizmu.

Veća selektivnost prema tumorskim ćelijama može biti posledica udruženog dejstva specifičnosti tumorskih ćelijskih linija u odnosu na zdrave i potencijalnoj osobini nanokompozita FNP/DOX da utiče na inhibiciju transportera za lek.

4. Iznenadjenja/pojedine koncentracije

Antitumorska aktivnost kako nanokompozita FNP/DOX i DOX pokazuje vremensku i doznu zavisnost, odnosno sa povećanjem dužine tretmana i koncentracije supstanci antiproliferativna aktivnost raste. Kod zdrave ćelijske linije MRC-5, u 24h tretmanu, sa porastom koncentracije takođe dolazi do smanjenja ćelijske proliferacije, gde nanokompozit to čini u većoj meri nego sam DOX, osim pri najnižoj koncentraciji.

Na ćelijskoj liniji MDA-MB-231 u 24h tretmanu se primećuje odstupanje od pomenutog trenda, odnosno, dobija se uporediv odgovor ćelija na tretman najnižom ($0,001 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) i 1000x višom koncentracijom nanokompozita. Slično, u 24h na U-251 odgovor ćelija pri primeni najniže koncentracije je uporediv sa odgovorom koji se dobija po primeni koncentracije između $0,1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ i $0,01 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Pored toga, u 72h tretmanu na MRC-5 ćelijama je takođe primećeno da je odgovor ćelija na primenu najniže koncentracije uporediv

sa odgovorom ćelija koji grafički odgovara vrednosti koncentracije koja se nalazi između 100 i 1000x više koncentracije.

U istraživanju (Chaisit, Siripong, & Jianmongkol, 2017) je MTT-testom utvrđeno sinergističko dejstvo doksorubicina i bioaktivnog naftohinonskog estera prirodnog porekla u najvećoj meri u 48h tretmanu, koje se postiže istovremenim tretmanom MCF-7 ćelija ovim komponentama, dok se u pojedinačnim tretmanima citotoksičnost ne ispoljava. Veći antiproliferativni efekat nanokompozita FNP/DOX pri najnižim koncentracijama bi se, imajući u vidu literaturne podatke, mogao pripisati sinergističkom dejstvu nanonosača i doksorubicina u okviru nanokompozita FNP/DOX i to verovatno zahvaljujući olakšanom ulasku doksorubicina u ćelije koji omogućuje prisustvo nanonosača, usled čega dolazi do nakupljanja doksorubicina u ćelijama. Kombinacija citotoksičnog leka i netoksičnog „senzitajzera”, u ovom slučaju nanonosača leka, bi doprinela tretmanu kancera, posebno s obzirom na to što bi taj pristup omogućio primenu niže koncentracije leka nego što bi to bilo u slučaju primene samog leka (Chaisit, Siripong, & Jianmongkol, 2017).

Najizraženiji antiproliferativni efekat se pri primeni DOX na U-251 ćelije dobija pri primeni najniže koncentracije DOX, što se razlikuje od rezultata objavljenih u literaturi, gde rezultati *in vitro* istraživanja Holst i saradnika na U-251 ćelijskoj liniji ukazuju da komercijalni lek sa doksorubicinom kao aktivnom komponentom prouzrokuje inhibiciju rasta ćelija srazmerno povećanju koncentracije leka (von Holst i dr., 1990). Rezultati istraživanja na pacijentima sa malignim gliomom ukazuju da je efekat primenjenog leka slab usled nedovoljne akumulacije leka u tumorskom tkivu (von Holst i dr., 1990). Ovaj nedostatak može poticati od osobine tumorskog tkiva (Ai i dr. 2011) i promene u veličini čestica bi mogle doneti promene po pitanju akumulacije aktivne komponente na mesto tumora, gde do izražaja dolazi veličina nanokompozita FNP/DOX, koji kao veći i drugačijeg naelektrisanja od samog leka može pokazati drugačije, te obećavajuće osobine u *in vivo* sistemu po pitanju akumulacije u tumorsko tkivo.

U literaturi (Tarasenko i dr., 2014) se mogu naći tumačenja koja bi objasnila veći efekat nanokompozita u odnosu na DOX na U-251 ćelijskoj liniji, a obrazloženje se nalazi u sinergizmu/aditivnim efektima leka i nanonosača u zavisnosti od primenjene koncentracije.

***In vivo* model: uporedno ispitivanje nanokompozita FNP/DOX i DOX u drugim studijama**

FNP/DOX nanokompozit je uporedo sa samim doksorubicinom ispitan i na *in vivo* modelu pacova (Seke i dr., 2016). Rezultati dokazuju da nanokompozit, primenjen u koncentraciji

uporedivoj sa samim doksorubicinom, izaziva manje štetnih efekata na srčano tkivo zdravih pacova. Naime, nanokompozit smanjuje nivo oksidativnog stresa i apoptozu ćelija srčanog tkiva. Ova studija obezbeđuje značajne uvide u kompleksnu interakciju doksorubicina, fulerenola i kardiomiocita, kao i bitne vodilje koje se tiču dizajna lekova.

Na istom modelu ispitano je i upoređeno dejstvo doksorubicina i nanokompozita FNP/DOX na zaštitu tkiva jetre (Seke i dr., in press). Pokazano je da sam DOX prouzrokuje mnogo štetnije efekte na jetru u poređenju sa nanokompozitom FNP/DOX, čime se još jednom ističe efikasnost nanokompozita sa istovremeno ostvarenom protektivnošću.

4.13. ISPITIVANJE TOKSIČNOSTI *IN VIVO* NA MODELU ZEBRICE

U ovom radu, zebriće su korišćene kao animalni model za procenu *in vivo* toksičnosti nanokompozita i poređenje sa doksorubicinom i fulerenolom ispitivanjem mortaliteta, morfoloških abnormalnosti i srčane funkcije tretiranih embriona. U četvorodnevnom ispitivanju, testirane supstance su ispoljile različit dozno- i vremenski-zavisni toksični efekat (Slike 3.52.-3.55.).

Zbog taloženja u medijumu pri ispitivanju najviših koncentracija FNP i FNP/DOX (92 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ računato na DOX), ova koncentracija nije uzeta u razmatranje.

Uticao FNP

FNP nije pokazao nikakve sporedne neželjene efekte na preživljavanje ili razvoj embriona zebrića (Tabela P9) ni u jednoj od nižih ispitanih doza, izuzev 92 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, računato na DOX). Na osnovu ovih rezultata se može zaključiti da FNP u primenjenim dozama nije toksičan, sa izuzetkom koncentracije od 92 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (računato na DOX).

Uticao DOX i FNP/DOX

U slučaju tretmana DOX i FNP/DOX, mortalitet embriona zebrića je porastao sa povećanjem koncentracije supstanci (Slika 3.53.), pri čemu postoje razlike u ukupnoj toksičnosti između ova dva tretmana (Slika 3.54.). Pri koncentraciji $\leq 4,6 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ nijedan od ova dva tretmana nije pokazao znake toksičnosti na embrionima zebrića, dok je pri koncentraciji 9,2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ DOX ispoljio značajno veću toksičnost u poređenju sa FNP/DOX (Slika 3.54.), na osnovu evaluacije celokupnog letalnog i teratogenog efekta. Na slici 3.55. se može videti da je u tretmanu sa nanokompozitom (46 ili 92 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) stopa preživljavanja embriona viša u poređenju sa tretmanom sa DOX. Dobijene LC_{50} vrednosti od 115,86 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ za FNP/DOX i 46,25 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ za DOX, jasno ukazuju da je preživljavanje embriona zebrića bilo 2,5 puta veće u slučaju primene nanokompozita, na osnovu čega se može zaključiti da nanokompozit u velikoj meri smanjuje letalni efekat uzrokovan DOX-om.

Pored značajnih razlika u letalnom ishodu, tokom eksperimenta su zapaženi i različiti dozno- i vremenski-zavisni teratogeni odgovori, naročito na kardiovaskularnom nivou (Slike 3.52. i 3.55.).

Za razliku od tretmana DOX, koji je pri dozi od 9,2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ indukovao promene u kardiovaskularnom sistemu nakon 48 hpf, sa većinom embriona koji su razvili perikardijalni edem već pri koncentraciji od 46 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, kardiotoksičnost FNP/DOX u ovom stadijumu je

primećena tek pri koncentraciji $92 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (računato na DOX). Ono što je posebno bitno istaći je da je perikardijalni edem kod embriona 96 hpf izazvan primenom nanokompozita FNP/DOX koncentracije $46 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ znatno manje izražen nego u slučaju primene samog DOX u duplo višoj koncentraciji.

Ranije izražena i veća karditoksičnost u DOX-tretiranim embrionima je primećena i praćenjem srčanih otkucaja, koji su bili značajno sporiji, kao i lošijom cirkulacijom, što je rezultovalo sporijim rastom i bržim letalnim efektom (Slika 3.52.).

Oba tretmana (DOX i FNP/DOX) pri koncentracijama 46 i $92 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ su doveli do usporavanja srčanog ritma nakon 96-časovnog izlaganja, pri čemu nanokompozit to čini u manjoj meri.

Pri koncentraciji $92 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ DOX sprečava kaudalnu cirkulaciju kod svih embriona i dovodi do akumulacije crvenih krvnih zrnaca u perikardijalnu kesu, verovatno usled veoma slabe kontraktilnosti srca, dok je pri koncentraciji $46 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ cirkulacija jedva vidljiva. Sa druge strane, veća učestalost kontrakcija srca i brža cirkulacija kroz srce su bili jasno uočljivi kod embriona tretiranih nanokompozitom FNP/DOX.

Pored izraženih kardiovaskularnih efekata, tretirani embrioni zebrića su pokazali i dozno-zavisne skeletne promene, koji su najvidljiviji kod embriona tretiranih DOX-om (Tabele P8-P11). Doze DOX i FNP/DOX od $92 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ dovode do smanjenja veličine embriona, deformisane glave sa malformacijom očiju, malformiranom notohordom i skoliozom. Dezintegracija mišića, praćena smanjenom kaudalnom cirkulacijom, je posebno bila uočljiva pri tretmanu $92 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ DOX, u značajno većoj meri nego pri tretmanu nanokompozitom FNP/DOX.

Embrioni zebrića su poslednjih nekoliko godina veoma često korišćeni kao pouzdan *in vivo* model za procenu bezbednosti različitih antikanceranih nanosistema (Harper i dr., 2011; Ma & Mumper, 2013). Stvaranje velikog broja embriona i brzi rani embrionalni razvoj čine zebriće posebno pogodnim modelom za toksikološke i prekliničke studije (Sipes, Padilla, & Knudsen, 2011).

U našem istraživanju (Jović i dr., 2016), embrioni tretirani 46 i $92 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ FNP/DOX nanokompozitom su imali značajno veću stopu preživljavanja i manje ometanje

kardiovaskularnih funkcija nego embrioni tretirani istim koncentracijama samog DOX, što ukazuje da je ukupna toksičnost nanokompozita u poređenju sa DOX manja.

Toksični efekti doksorubicina i fulerenola na embrionima zebrića su prethodno ispitivani od strane nekoliko grupa (Han, Zhang, Qian, & Hu, 2015; Usenko, Harper, & Tanguay, 2007). Kardiotoksičnost je jedan od glavnih sporednih neželjenih efekata dugotrajne terapijske primene doksorubicina (Han i dr., 2015), a perikardijalni edem jedan je od glavnih štetnih efekata kod tretiranih embriona zebrića, što je potvrđeno i rezultatima našeg istraživanja. U poređenju sa edemom perikarda izazvanim doksorubicinom, edem izazvan nanokompozitom je značajno manje izražen, što potvrđuje manju kardiotoksičnost nanokompozita FNP/DOX od samog doksorubicina, što je jedan od glavnih izazova u onkološkoj praksi kada se primenjuje terapija doksorubicinom.

5. ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji je predstavljena sinteza novog nekovalentnog nanokompozita fulerenol/doksorubicin koji pokazuje značajnu biološku aktivnost-uporedivu ili bolju od samog leka doksorubicina, uz smanjenje neželjenih sporednih efekata do kojih primena leka dovodi, na prvom mestu kardiotsičnosti, a što je ograničavajući faktor pri kliničkoj primeni doksorubicina.

Nanočestice fulerenola i nanokompozit fulerenol/doksorubicin su okarakterisani brojnim metodama prateći dva osnovna pristupa: molekulske-spektroskopske metode i metode nanokarakterizacije.

FNP kao molekul je okarakterisan XPS i MS metodama karakterizacije. Utvrđeno je da fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ postoji kao polianjonski molekul.

Dinamičkim rasejajnem čestica merene su veličine i naelektrisanje čestica u vodenim rastvorima FNP, gde rezultati ukazuju na izostanak uticaja promene pH sredine (5,28-8,70) na samoorganizaciju čestica fulerenola koje su u najvećem broju dijametra između 5-6 nm.

Rezultati ispitivanja volumetrijskih i transportnih osobina fulerenolskih nanočestica ukazuju na kosmotropizam, odnosno na „structure-making” svojstva FNP, kao i na specifičnosti samoorganizacije molekula fulerenola u zavisnosti od koncentracije, kao i od temperature. Različito ponašanje FNP na temperaturama ispod i iznad 309,15 K ukazuje na razliku u strukturnoj organizaciji FNP, što je od velikog značaja posebno ako se ima uvidu prosečna humana telesna temperatura (309-310 K).

Veličina čestica u rastvorima FNP, kao i njihova topografija okarakterisana je mikroskopijom atomskih sila gde su u najvećem broju potvrđene samoorganizacione strukture fulerenola veličine oko 80 nm, koje se sastoje od manjih čestica veličina 30 i 50 nm, a čiju polarnost potvrđuje akumulacija na terasama HOPG.

Sa druge strane, merenja transmisiona elektronske mikroskopije uzoraka FNP ukazuju na postojanje homogenog uzorka veličine čestica oko 2 nm.

Osnovni cilj fizičko-hemijskih ispitivanja je bila detekcija postojanja nekovalentnog nanokompozita koji ostvaruju doksorubicin i fulerenolske nanočestice u vodenom rastvoru.

MS rezultati ukazuju na specifične nekovalentne interakcije kako između FNP i doksorubicina, tako i između dimera doksorubicina. Praćenjem koncentracija DOX u uzorcima nanokompozita FNP/DOX potvrđeno je da ne dolazi do hemijske promene doksorubicina, odnosno do promene koncentracije doksorubicina u nanokompozitu tokom 48h od pravljenja uzorka.

NMR studija nanokompozita pruža detaljniji uvid u angažovanje doksorubicina u interakcijama unutar nanokompozita. Spektralni podaci ukazuju na postojanje samoagregacije doksorubicina, zahvaljujući angažovanju vodoničnih veza i π -interakcija, ali i na delove molekula doksorubicina koji se smatraju odgovornim za građenje nekovalentnih interakcija sa udruženim nanočesticama fulerenola.

Ramanski spektri vodenih rastvora nanokompozita FNP/DOX različitih moljskih odnosa dveju komponenata daju uvid u interakcije između fulerenolskih nanočestica i doksorubicina u nanokompozitu FNP/DOX praćene promenama na nivou π - π interakcija, kao i parcijalnom reorganizacijom intra i intermolekulskih vodoničnih veza. Ovo je posebno istaknuto u uzorku nanokompozita FNP/DOX sa odnosom komponenata koji je primarni predmet istraživanja ove doktorske disertacije.

U cilju proučavanja mogućih nekovalentnih interakcija između doksorubicina i fulerenola izvršeno je i UV/VIS spektroskopsko ispitivanje vodenih rastvora nanokompozita FNP/DOX sa različitim odnosima ove dve komponente, gde su sa povećanjem koncentracije fulerenola primećene hipohromne promene apsorpcionog maksimuma sa blago batohromnim pomerajem, što je potvrda nastajanja nekovalentnog nanokompozita FNP/DOX.

Spektrofluorometrijsko ispitivanje vodenih rastvora različitog odnosa koncentracija doksorubicina i fulerenola pokazuje da sa porastom koncentracije fulerenola u nanokompozitu FNP/DOX dolazi do smanjenja intenziteta signala koji potiče DOX, i pojave novog maksimuma, što se može objasniti angažovanjem doksorubicina u građenju nanokompozita. Pored angažovanja u nanokompozitu, promena intenziteta maksimuma

doksorubicina može ukazati i na građenje dimera doksorubicina. Potencijalna dimerizacija bi mogla biti objašnjena prisustvom polianjonskih fulerenolskih nanočestica, koje kao takve mogu favorizovati π - π interakcije između molekula doksorubicina.

Dinamičkim rasejajnom čestica merene su veličine i naelektrisanje čestica u vodenim rastvorima nanokompozita FNP/DOX različite koncentracije FNP, gde rezultati ukazuju na prisustvo najvećeg broja čestica veličine 50-100 nm, sa izuzetkom nanokompozita sa najveće koncentracije FNP, gde je veličina najvećeg broja čestica bila 400-500 nm.

Sa dodatkom DOX rastvoru FNP dolazi do promene zeta potencijala ka pozitivnijim vrednostima, što ukazuje na građenje nanokompozita sa elektrostatičkim privlačnim interakcijama u osnovi. Blago pomeranje raspodele veličine čestica nanokompozita merenom u ćelijskom medijumu ka nižim vrednostima u odnosu na sam medijum se može objasniti stabilizacijom čestica prisustvom proteina koji se nalaze u medijumu.

Veličina čestica u rastvorima nanokompozita FNP/DOX, kao i njihova topografija okarakterisana je i mikroskopijom atomskih sila, koja ukazuje na postojanje pravilnih sfernih čestica nanokompozita. Posmatrana raspodela čestica se u odnosu na istu u rastvoru fulerenola razlikuje i formiranje ovakvih struktura se ne može pripisati samom DOX ili FNP, te bi se moglo zaključiti da DOX kao pozitivno naelektrisani molekul pri približno neutralnoj pH vrednosti medijuma gradi interakcije sa polianjonskim FNP, smanjujući time elektrostatičke repulzije među njima.

Praćenjem starenja uzorka FNP/DOX dolazi se do zaključka da se čestice veličine 30-40 nm samoudružuju u nanovlakna mikronskih dužina, verovatno uzajamnim privlačnim polarnim interakcijama. Promene u morfologiji uzorka nanokompozita FNP/DOX u poređenju sa FNP česticama ukazuju na promene u organizaciji čestica fulerenola u prisustvu doksorubicina.

Poređenjem TEM rezultata homogenog uzorka FNP sa česticama FNP/DOX nanokompozita, primećuju se razlike po pitanju veličine i oblika agregata. U uzorku nanokompozita se manje čestice udružuju, te grade aglomerate dijametra 5-7 nm, što bi moglo ukazivati na postojanje interakcija između FNP i DOX, ali i na aglomeraciju samih molekula fulerenola u prisustvu doksorubicina.

Rezultati karakterizacije jasno i nedvosmisleno ukazuju na postojanje nekovalentnih interakcija unutar nanokompozita, što dalje utiče na organizaciju i udruživanje čestica, a što uslovljava i drugačiju biološku aktivnost takvog sistema u odnosu na aktivnost pojedinačnih komponenata.

Rezultati bioloških ispitivanja na *in vitro* modelu na jednoj zdravoj (MRC-5, humani fibroblasti pluća) i četiri tumorske ćelijske linije (MDA MB-231, humani karcinom dojke ER-; MCF-7, humani karcinom dojke ER+; Hs-294 T, humani melanom i U-251, humani glioblastom) tokom 24-, 48- i 72-časovnog tretmana ukazuju na značajnu antiproliferativnu aktivnost nanokompozita FNP/DOX u koncentracionom opsegu 0,001-10 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (računato na DOX). Rang EC_{50} vrednosti za FNP/DOX je bio 0,04-18,65 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$, dok su EC_{50} vrednosti za sam DOX bile u opsegu 0,05-10 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$.

Biološka ispitivanja na *in vivo* modelu zebrića u opsegu koncentracija 2,3-920 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ potvrđuju smanjenje toksičnosti, primarno kardiotoksičnosti, nanokompozita FNP/DOX u odnosu na sam lek DOX. FNP u primenjenim dozama nije toksičan, sa izuzetkom koncentracije od 92 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ (računato na DOX). Pri koncentraciji 9,2 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ DOX je ispoljio značajno veću toksičnost u poređenju sa FNP/DOX. Pri tretmanu nanokompozitom (46 ili 92 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) stopa preživljavanja embriona je bila viša u poređenju sa tretmanom sa DOX. Dobijene LC_{50} vrednosti od 115,86 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ za FNP/DOX i 46,25 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ za DOX, jasno ukazuju da je preživljavanje embriona zebrića bilo 2,5 puta veće u slučaju primene nanokompozita, na osnovu čega se može zaključiti da nanokompozit u velikoj meri smanjuje letalni efekat uzrokovan DOX-om. Perikardijalni edem kod embriona 96 hpf izazvan primenom nanokompozita FNP/DOX koncentracije 46 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ je bio znatno manje izražen nego u slučaju primene samog DOX u duplo višoj koncentraciji. Oba tretmana (DOX i FNP/DOX) pri koncentracijama 46 i 92 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$ su doveli do usporavanja srčanog ritma nakon 96-časovnog izlaganja, pri čemu nanokompozit u manjoj meri.

Računske simulacije, mikroskopski i spektroskopski podaci, kao i ohrabrujući rezultati *in vitro* i *in vivo* studija ukazuju na to da nekovalentne interakcije između fulerenola i doksorubicina mogu biti ključni korak u stvaranju sinergističkog sistema za dostavu leka u biološki sistem. Multipotentnost fulerenola kao nanonosača lekova i nespecifičnost strukture doksorubicina ukazuju na to da bi fulerenol mogao na sličan način vezati i druge

antineoplastike, što daje prostora za unapređenje antitumorskih osobina lekova posredstvom istovremene administracije leka.

Dalja usavršavanja ovog sistema po pitanju uniformnosti nanočestica, pravovremenog oslobađanja leka iz nanokompozita, fizičko-hemijsko ispitivanje i nanokarakterizacija, kao i ispitivanje na *in vitro* i *in vivo* modelima usavršenog sistema u nižim koncentracionim opsezima i sa različitim antineoplasticima su svakako potreba i materijal za buduća istraživanja nekovalentnih nanokompozita fulerenolskih nanočestica kao multipotentnog nosača različitih lekova.

6. LITERATURA

- Álvarez-Cedrn, L., Sayalero, M. L., & Lanao, J. M. (1999). High-performance liquid chromatographic validated assay of doxorubicin in rat plasma and tissues. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 721(2), 271–278. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00475-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00475-7)
- Anderson, A. B., Gergen, J., & Arriaga, E. A. (2002). Detection of doxorubicin and metabolites in cell extracts and in single cells by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 769(1), 97–106. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(01\)00633-X](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(01)00633-X)
- Ang, C. Y., Tan, S. Y., Wang, X., Zhang, Q., Khan, M., Bai, L., Zhao, Y. (2014). Supramolecular nanoparticle carriers self-assembled from cyclodextrin- and adamantane-functionalized polyacrylates for tumor-targeted drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(13), 1879. <https://doi.org/10.1039/c3tb21325k>
- Advani, S., Friedman, M. A., Henderson, I. C., Levy, L. M., Pavlidis, N., Tattersall, M. H. N., Stjernsward, J. (1994). Essential drugs for cancer chemotherapy. *Bulletin of the World Health Organization*, 72(5).
- Agrawal, P., Barthwal, S. K., & Barthwal, R. (2009). Studies on self-aggregation of anthracycline drugs by restrained molecular dynamics approach using nuclear magnetic resonance spectroscopy supported by absorption, fluorescence, diffusion ordered spectroscopy and mass spectrometry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(4), 1437–1451. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.09.037>
- Ai, J., Biazar, E., Jafarpour, M., Montazeri, M., Majdi, A., Aminifard, S., Rad, H. G. (2011). Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *International journal of nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S16603>
- Albanese, A., Tang, P. S., & Chan, W. C. W. (2012). The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 14, 1–16. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124>
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L. K., & Farokhzad, O. C. (2008). Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *U Molecular Pharmaceutics* (Sv. 5, str. 505–515). <https://doi.org/10.1021/mp800051m>
- Ali, S. S., Hardt, J. I., & Dugan, L. L. (2008). SOD Activity of carboxyfullerenes predicts their neuroprotective efficacy: a structure-activity study. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4(4), 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.05.003>
- Alphandéry, E., Grand-Dewyse, P., Lefèvre, R., Mandawala, C., & Durand-Dubief, M. (2015). Cancer therapy using nanoformulated substances: scientific, regulatory and financial aspects. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 15(10), 1233–1255. <https://doi.org/10.1586/14737140.2015.1086647>
- Anderson, R., & Barron, A. R. (2005). Reaction of hydroxyfullerene with metal salts: A route to remediation and immobilization. *Journal of the American Chemical Society*, 127(30), 10458–10459. <https://doi.org/10.1021/ja051659d>
- Andreopoulou, E., Gaiotti, D., Kim, E., Downey, Mirchandani, D., Hamilton, Muggia, F. (2007). Pegylated liposomal doxorubicin HCL (PLD; Caelyx/Doxil): experience with long-term maintenance in responding patients with recurrent epithelial ovarian cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 18(4), 716–21. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdl484>
- Arrais, A., & Diana, E. (2003). Highly Water Soluble C60 Derivatives: A New Synthesis. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 11(1), 35–46. <https://doi.org/10.1081/FST-120018667>
- Assemi, S., Tadjiki, S., Donose, B. C., Nguyen, A. V., & Miller, J. D. (2010). Aggregation of fullerol C60(OH)24 nanoparticles as revealed using flow field-flow fractionation and atomic force microscopy. *Langmuir*, 26(20), 16063–16070. <https://doi.org/10.1021/la102942b>
- Balls, M., & Bridges, J. W. (1984). The FRAME research program on in vitro toxicology. *Acute Toxicology Testing: Alternatives Approaches*. Mary Ann Liebert, New York, 61–80.
- Banerjee, R. (2001). Liposomes: Applications in Medicine. *Journal of Biomaterials Applications*, 16(1), 3–21. <https://doi.org/10.1106/RA7U-1V9C-RV7C-8QXL>
- Banks, J. L., Beard, H. S., Cao, Y., Cho, A. E., Damm, W., Farid, R., Levy, R. M. (2005). Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). *Journal of Computational Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcc.20292>
- Barenholz, Y. (2012). Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>
- Bates, D. O., Hillman, N. J., Williams, B., Neal, C. R., & Pocock, T. M. (2002). Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Journal of Anatomy*. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00066.x>
- Batist, G., Ramakrishnan, G., Rao, C. S., Chandrasekharan, A., Gutheil, J., Guthrie, T., Lee, L. W. (2001). Reduced cardiotoxicity and preserved antitumor efficacy of liposome-encapsulated doxorubicin and

- cyclophosphamide compared with conventional doxorubicin and cyclophosphamide in a randomized, multicenter trial of metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 19(5), 1444–1454. <https://doi.org/10.1200/jco.2001.19.5.1444>
- Becke, A. D. (1993). Density- functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics*, 98(7), 5648–5652. <https://doi.org/10.1063/1.464913>
- Bertrand, N., & Leroux, J. C. (2012). The journey of a drug-carrier in the body: An anatomico-physiological perspective. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.098>
- Bihari, P., Vippola, M., Schultes, S., Praetner, M., Khandoga, A. G., Reichel, C. A., Krombach, F. (2008). Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. *Particle and Fibre Toxicology*, 5, 14. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-5-14>
- Binaschi, M., Bigioni, M., Cipollone, a, Rossi, C., Goso, C., Maggi, C. a, Animati, F. (2001). Anthracyclines: selected new developments. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents*, 1(2), 113–130. <https://doi.org/10.2174/1568011013354723>
- Binaschi, M., Farinosi, R., Borgnetto, M. E., & Capranico, G. (2000). In vivo site specificity and human isoenzyme selectivity of two topoisomerase II-poisoning anthracyclines. *Cancer Research*, 60(14), 3770–3776.
- Blazkova, I., Viet Nguyen, H., Kominkova, M., Konecna, R., Chudobova, D., Krejcova, L., Kizek, R. (2014). Fullerene as a transporter for doxorubicin investigated by analytical methods and in vivo imaging. *Electrophoresis*, 35(7), 1040–1049. <https://doi.org/10.1002/elps.201300393>
- Boers-Sonderen, M. J., Van Herpen, C. M. L., Van Der Graaf, W. T. A., Desar, I. M. E., Van Der Logt, M. G. W. A., De Beer, Y. M., Van Erp, N. P. (2014). Correlation of toxicity and efficacy with pharmacokinetics (PK) of pegylated liposomal doxorubicin (PLD) (Caelyx®). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 74(3), 457–463. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2514-9>
- Bogdanović, G., & Djordjević, A. (2016). Carbon nanomaterials: Biologically active fullerene derivatives. *Srpski Arhiv za Celokupno Lekarstvo*, 144(3–4). <https://doi.org/10.2298/SARH1604222B>
- Bogdanović, V., Stankov, K., Icević, I., Zikic, D., Nikolić, A., Solajić, S., Bogdanović, G. (2008). Fullerol C60(OH)24 effects on antioxidative enzymes activity in irradiated human erythroleukemia cell line. *Journal of radiation research*, 49(3), 321–327. <https://doi.org/10.1269/jrr.07092>
- Borenfreund, E., & Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24(2–3), 119–124. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3)
- Borišev, M., Borišev, I., Župunski, M., Arsenov, D., Pajević, S., Čurčić, Ž., Djordjevic, A. (2016). Drought impact is alleviated in sugar beets (*Beta vulgaris* L.) by foliar application of fullerol nanoparticles. *PLoS ONE*, 11(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166248>
- Bouma, J., Beijnen, J. H., Bult, A., & Underberg, W. J. M. (1986). Anthracycline antitumour agents - A review of physicochemical, analytical and stability properties. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*. <https://doi.org/10.1007/BF02086146>
- Boyd, P. D. W., & Reed, C. A. (2005). Fullerene–Porphyrin Constructs. *Accounts of Chemical Research*, 38(4), 235–242. <https://doi.org/10.1021/ar040168f>
- Brant, J. A., Labille, J., Robichaud, C. O., & Wiesner, M. (2007). Fullerol cluster formation in aqueous solutions: Implications for environmental release. *Journal of Colloid and Interface Science*, 314(1), 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.05.020>
- Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P. (2012). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.006>
- Buford, M. C., Hamilton, R. F. J., & Holian, A. (2007). A comparison of dispersing media for various engineered carbon nanoparticles. *Particle and fibre toxicology*, 4(Cvd), 6. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-4-6>
- Buonocore, G., Perrone, S., & Bracci, R. (2001). Free radicals and brain damage in the newborn. *U Biology of the Neonate* (Sv. 79, str. 180–186). <https://doi.org/10.1159/000047088>
- Cabral, H., Matsumoto, Y., Mizuno, K., Chen, Q., Murakami, M., Kimura, M., Kataoka, K. (2011). Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nature Nanotechnology*, 6(12), 815–823. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.166>
- Cagel, M., Grotz, E., Bernabeu, E., Moretton, M. A., & Chiappetta, D. A. (2017). Doxorubicin: nanotechnological overviews from bench to bedside. *Drug Discovery Today*. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.11.005>
- Cai, X., Hao, J., Zhang, X., Yu, B., Ren, J., Luo, C., Liu, J. (2010). The polyhydroxylated fullerene derivative C60(OH)24 protects mice from ionizing-radiation-induced immune and mitochondrial dysfunction. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 243(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.11.009>
- Cai, X., Jia, H., Liu, Z., Hou, B., Luo, C., Feng, Z., Liu, J. (2008). Polyhydroxylated fullerene derivative C60(OH)24 prevents mitochondrial dysfunction and oxidative damage in an MPP+induced cellular model of Parkinson's disease. *Journal of neuroscience research*, 86(16), 3622–3634.

- Calissano, P., Matrone, C., & Amadoro, G. (2009). Apoptosis and in vitro Alzheimer disease neuronal models. *Communicative and Integrative Biology*. <https://doi.org/10.4161/cib.7704>
- Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S., & Moreira, P. I. (2009). Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*, *16*(25), 3267–3285. <https://doi.org/10.2174/092986709788803312>
- Carvalho, F. S., Burgeiro, A., Garcia, R., Moreno, A. J., Carvalho, R. A., & Oliveira, P. J. (2014). Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy. *Medicinal Research Reviews*, *34*(1), 106–135. <https://doi.org/10.1002/med.21280>
- Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggard, T., Thulin, E., Nilsson, H., Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(7), 2050–2055. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608582104>
- Chan, S., Davidson, N., Juozaityte, E., Erdkamp, F., Pluzanska, A., Azarnia, N., & Lee, L. W. (2004). Phase III trial of liposomal doxorubicin and cyclophosphamide compared with epirubicin and cyclophosphamide as first-line therapy for metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh393>
- Chen, F., Chen, H., Duan, X., Jia, J., & Kong, J. (2016). Molecularly imprinted polymers synthesized using reduction-cleavable hyperbranched polymers for doxorubicin hydrochloride with enhanced loading properties and controlled release. *Journal of Materials Science*, *51*(20), 9367–9383. doi:10.1007/s10853-016-0183-2
- Chari, R. V. J., Miller, M. L., & Widdison, W. C. (2014). Antibody-drug conjugates: An emerging concept in cancer therapy. *Angewandte Chemie - International Edition*. <https://doi.org/10.1002/anie.201307628>
- Chaisit, T., Siripong, P., & Jianmongkol, S. (2017). Rhinacanthin-C enhances doxorubicin cytotoxicity via inhibiting the functions of P-glycoprotein and MRP2 in breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, *795*, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.12.002>
- Chaudhuri, P., Paraskar, A., Soni, S., Mashelkar, R. A., & Sengupta, S. (2009). Fullerenol-cytotoxic conjugates for cancer chemotherapy. *ACS Nano*, *3*(9), 2505–2514. <https://doi.org/10.1021/nn900318y>
- Chiang, L. Y., Bhonsle, J. B., Wang, L., Shu, S. F., & Chang, T. M. (1996). Efficient one-flask synthesis of water-soluble [60] fullerenols. *Tetrahedron*, *52*(14), 4963–4972. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(96\)00104-4](https://doi.org/10.1016/0040-4020(96)00104-4)
- Chiang, L. Y., Lee, Y. W., & Kuo, C.-S. (1995). Polyhydroxylated C60 Cross-Linked Polyurethanes. *Macromolecules*, *28*, 7574–7576.
- Chiang, L. Y., Swirczewski, J. W., Hsu, C. S., Chowdhury, S. K., Cameron, S., Creegan, K., Smalley, R. E. (1992). Multi-hydroxy additions onto C60 fullerene molecules. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, *62*(24), 1791. <https://doi.org/10.1039/c39920001791>
- Chiang, L. Y., Upasani, R. B., & Swirczewski, J. W. (1992). Versatile Nitronium Chemistry for C60 Fullerene Functionalization. *Journal of the American Chemical Society*, *114*(26), 10154–10157. <https://doi.org/10.1021/ja00052a010>
- Chiang, L. Y., Upasani, R. B., Swirczewski, J. W., & Soled, S. (1993). Evidence of Hemiketals Incorporated in the Structure of Fullerenols Derived from Aqueous Acid Chemistry. *Journal of the American Chemical Society*, *115*(13), 5453–5457. <https://doi.org/10.1021/ja00066a014>
- Chiang, L. Y., Wang, L. Y., Swirczewski, J. W., Soled, S., & Cameron, S. (1994). Efficient Synthesis of Polyhydroxylated Fullerene Derivatives via Hydrolysis of Polycyclosulfated Precursors. *Journal of Organic Chemistry*, *59*(14), 3960–3968. <https://doi.org/10.1021/jo00093a030>
- Chiang, L. Y., Wang, L. Y., Tseng, S. M., Wu, J. S., & Hsieh, K. H. (1995). Utilization of polyhydroxylated C60 as a molecular core for the synthesis of star-shaped polymers. *Synthetic Metals*, *70*(1–3), 1477–1480. [https://doi.org/10.1016/0379-6779\(94\)02925-O](https://doi.org/10.1016/0379-6779(94)02925-O)
- Chithrani, B. D., & Chan, W. C. (2007). Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *TL - 7. Nano letters*, *7 VN-re*(6), 1542–1550. <https://doi.org/10.1021/nl070363y>
- Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., & Chan, W. C. W. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters*, *6*(4), 662–668. <https://doi.org/10.1021/nl052396o>
- Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta Potential Measurement. U *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery* (Sv. 697, str. 63–70). https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6
- Četojević-Simin Dragana, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, 2009.
- Dai, X., Yue, Z., Eccleston, M. E., Swartling, J., Slater, N. K. H., & Kaminski, C. F. (2008). Fluorescence intensity and lifetime imaging of free and micellar-encapsulated doxorubicin in living cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, *4*(1), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.12.002>

- Dausend, J., Musyanovych, A., Dass, M., Walther, P., Schrezenmeier, H., Landfester, K., & Mailänder, V. (2008). Uptake mechanism of oppositely charged fluorescent nanoparticles in HeLa cells. *Macromolecular Bioscience*, 8(12), 1135–1143. <https://doi.org/10.1002/mabi.200800123>
- Dawid, A., Górny, K., & Gburski, Z. (2017). Water Solvent Effect on Infrared and Raman Spectra of C60 (OH) 24 Fullerenol Isomers: DFT Study. *The Journal of Physical Chemistry C*, 121(4), 2303–2315.
- Dawidczyk, C. M., Kim, C., Park, J. H., Russell, L. M., Lee, K. H., Pomper, M. G., & Searson, P. C. (2014). State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines. *Journal of Controlled Release*, 187, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.036>
- Dawson, K. a, Salvati, A., & Lynch, I. (2009). Nanotoxicology: nanoparticles reconstruct lipids. *Nature nanotechnology*, 4(February), 84–85. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.426>
- Decker, T., & Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 115(1), 61–69. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(88\)90310-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(88)90310-9)
- Deguchi, S., Yamazaki, T., Mukai, S. A., Usami, R., & Horikoshi, K. (2007). Stabilization of C60 nanoparticles by protein adsorption and its implications for toxicity studies. *Chemical Research in Toxicology*, 20(6), 854–858. <https://doi.org/10.1021/tx6003198>
- Dellian, M., Yuan, F., Trubetskoy, V. S., Torchilin, V. P., & Jain, R. K. (2000). Vascular permeability in a human tumour xenograft: molecular charge dependence. *British Journal of Cancer*, 82(9), 1513–1518. <https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.1171>
- Djordjević, A., Ajdinović, B., Dopudja, M., Trajković, S., Milovanović, Z., Maksin, T., Cvetićanin, J. (2011). Scintigraphy of the domestic dog using [99mTc(CO)3(H2O)3]-C60(OH)22-24. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6(1), 99–106.
- Djordjevic, A., Canadanovic-Brunet, J. M., Vojinovic-Miloradov, M., & Bogdanovic, G. (2004). Antioxidant properties and hypothetic radical mechanism of fullerenol C60(OH)24. *Oxidation Communications*, 27(4), 806–812.
- Djordjevic, A., Injac, R., Jovic, D., Mrdjanovic, J., & Seke, M. (2014). Bioimpact of Carbon Nanomaterials. U *Advanced Carbon Materials and Technology* (str. 193–271). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118895399.ch6>
- Djordjevic, A., Srdjenovic, B., Seke, M., Petrovic, D., Injac, R., & Mrdjanovic, J. (2015). Review of synthesis and antioxidant potential of fullerenol nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/567073>
- Djordjević, A., Vojinović-Miloradov, M., Petranović, N., Devečerski, A., Lazar, D., & Ribar, B. (1998). Catalytic Preparation and Characterization of C60Br24. *Fullerene Science and Technology*, 6(4), 689–694. <https://doi.org/10.1080/10641229809350229>
- Dobrovolskaia, M., Aggarwal, P., Hall, J. B., & Mcneil, S. E. (2009). Preclinical studies to understand NP interaction with the immune system and its potential effects on NP biodistribution. *Molecular pharmaceuticals*, 5(4), 487–495. <https://doi.org/10.1021/mp800032f>.Preclinical
- Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 857–902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>
- Dong, J., Wang, K., Sun, L., Sun, B., Yang, M., Chen, H., Dong, L. (2018). Application of graphene quantum dots for simultaneous fluorescence imaging and tumor-targeted drug delivery. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 256, 616–623. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.200>
- Doroshov, J. H. (1986). Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. *Medical Sciences*, 83, 4514–4518. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.12.4514>
- Dragunow, M., Faull, R. L., Lawlor, P., Beilharz, E. J., Singleton, K., Walker, E. B., & Mee, E. (1995). In situ evidence for DNA fragmentation in Huntington's disease striatum and Alzheimer's disease temporal lobes. *Neuroreport*, 6(0959–4965), 1053–1057.
- Dreher, M. R., Liu, W., Michelich, C. R., Dewhirst, M. W., Yuan, F., & Chilkoti, A. (2006). Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(5), 335–344. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj070>
- Dugan, L. L., Gabrielsen, J. K., Yu, S. P., Lin, T.-S., & Choi, D. W. (1996). Buckminsterfullerenol Free Radical Scavengers Reduce Excitotoxic and Apoptotic Death of Cultured Cortical Neurons. *Neurobiology of Disease*, 3(2), 129–135. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1996.0013>
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., & Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, 103(19), 8577–8593. <https://doi.org/10.1063/1.470117>
- Evstigneev, M. P. (2014). Hetero-association of aromatic molecules in aqueous solution. *International Reviews in Physical Chemistry*, 33(2), 229–273. <https://doi.org/10.1080/0144235X.2014.926151>

- Evstigneev, M. P., Buchelnikov, A. S., Voronin, D. P., Rubin, Y. V., Belous, L. F., Prylutsky, Y. I., & Ritter, U. (2013). Complexation of C60 fullerene with aromatic drugs. *ChemPhysChem*, 14(3), 568–578. <https://doi.org/10.1002/cphc.201200938>
- Evstigneev, M. P., Khomich, V. V., & Davies, D. B. (2006). Self-association of daunomycin antibiotic in various buffer solutions. *Russian journal of physical chemistry*, 80(5), 741–746.
- Fahn, S., & Cohen, G. (1992). The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: Evidence supporting it. *Annals of Neurology*, 32(6), 804–812. <https://doi.org/10.1002/ana.410320616>
- Fan, J., Fang, G., Zeng, F., Wang, X., & Wu, S. (2013). Water-dispersible fullerene aggregates as a targeted anticancer prodrug with both chemo- and photodynamic therapeutic actions. *Small*, 9(4), 613–621. <https://doi.org/10.1002/sml.201201456>
- Fan, Y., & Zhang, Q. (2013). Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.010>
- Fang, J., Nakamura, H., & Iyer, A. K. (2007). Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *Journal of Drug Targeting*, 15(7–8), 475–486. <https://doi.org/10.1080/10611860701498286>
- Fang, X. Bin, Zhang, J. M., Xie, X., Liu, D., He, C. W., Wan, J. B., & Chen, M. W. (2016). PH-sensitive micelles based on acid-labile pluronic F68-curcumin conjugates for improved tumor intracellular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 502(1–2), 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.029>
- Fasol, U., Frost, A., Büchert, M., Arends, J., Fiedler, U., Scharr, D., Mross, K. (2012). Vascular and pharmacokinetic effects of EndoTAG-1 in patients with advanced cancer and liver metastasis. *Annals of Oncology*, 23(4), 1030–1036. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr300>
- Fenoglio, I., Fubini, B., Ghibaudi, E. M., & Turci, F. (2011). Multiple aspects of the interaction of biomacromolecules with inorganic surfaces. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.08.001>
- Fiallo, M. M., Tayeb, H., Suarato, A., & Garnier-Suillerot, A. (1998). Circular Dichroism Studies on Anthracycline Antitumor Compounds. Relationship between the Molecular Structure and the Spectroscopic Data. *J. Pharm. Sci.*, 87(8), 967–975. <https://doi.org/10.1021/js9704361>
- Firer M.A., G. G. (2012). Targeted drug delivery for cancer therapy: The other side of antibodies. *Journal of Hematology and Oncology*, 5(1), no pagination. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-5-70>
- Florence, A. T. (2012). „Targeting“ nanoparticles: The constraints of physical laws and physical barriers. *Journal of Controlled Release*, 164(2), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.022>
- Fluri, F., Grünstein, D., Cam, E., Ungethuen, U., Hatz, F., Schäfer, J., Seeberger, P. (2015). Fullerenols and glucosamine fullerenes reduce infarct volume and cerebral inflammation after ischemic stroke in normotensive and hypertensive rats. *Experimental Neurology*, 265, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.01.005>
- Foucaud, L., Wilson, M. R., Brown, D. M., & Stone, V. (2007). Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media. *Toxicology Letters*, 174(1–3), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.08.001>
- Friedrich, D., Henkel, K., Richter, M., & Schmeißer, D. (2011). Fullerenol as Probed by Synchrotron X-ray Photoemission and Absorption Spectroscopy. *BioNanoScience*, 1(4), 218–223. <https://doi.org/10.1007/s12668-011-0025-2>
- Fubini, B., Ghiazza, M., & Fenoglio, I. (2010). Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. *Nanotoxicology*, 4(4), 347–363. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.509519>
- Gabizon, a, Shmeeda, H., & Barenholz, Y. (2003). Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin.Pharmacokinet.*, 42(5), 419–436. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342050-00002>
- Galluzzi, L., Vacchelli, E., Fridman, W. H., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Tartour, E., Kroemer, G. (2012). Trial Watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology*, 1(1), 28–37. <https://doi.org/10.4161/onci.1.1.17938>
- Gao, Y., Chen, Y., Ji, X., He, X., Yin, Q., Zhang, Z., Li, Y. (2011). Controlled intracellular release of doxorubicin in multidrug-resistant cancer cells by tuning the shell-pore sizes of mesoporous silica nanoparticles. *ACS Nano*, 5(12), 9788–9798. <https://doi.org/10.1021/nn2033105>
- Gewirtz, D. A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00307-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00307-4)
- Giri, S. N., Al-Bayati, M. A., Du, X., Schelegle, E., Mohr, F. C., & Margolin, S. B. (2004). Amelioration of doxorubicin-induced cardiac and renal toxicity by pirfenidone in rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 53(2), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s00280-003-0703-z>
- Goldberg, S. N., Kamel, I. R., Kruskal, J. B., Reynolds, K., Monsky, W. L., Stuart, K. E., Raptopoulos, V. (2002). Radiofrequency ablation of hepatic tumors: Increased tumor destruction with adjuvant liposomal

- doxorubicin therapy. *American Journal of Roentgenology*, 179(1), 93–101. <https://doi.org/10.2214/ajr.179.1.1790093>
- Goren, D., Horowitz, A. T., Tzemach, D., Tarshish, M., Zalipsky, S., & Gabizon, A. (2000). Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. *Clinical Cancer Research*, 6(5), 1949–1957. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.3.637>
- Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2(1), 48–58. <https://doi.org/10.1038/nrc706>
- Gratton, S. E. A., Ropp, P. A., Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E., & DeSimone, J. M. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(33), 11613–11618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801763105>
- Grebowski, J., Kazmierska, P., & Krokosz, A. (2013). Fullerenols as a new therapeutic approach in nanomedicine. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2013/751913>
- Grebowski, J., & Krokosz, A. (2010). [Fullerenes in radiobiology]. *Postepy biochemii*, 56(4), 456–462. Preuzeto od <http://europepmc.org/abstract/MED/21473050>
- Grebowski, J., & Krokosz, A. (2015). The effect of highly hydroxylated fullereneol C60(OH)36 on human erythrocyte membrane organization. *Journal of Spectroscopy*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/825914>
- Grebowski, J., Krokosz, A., & Puchala, M. (2013). Membrane fluidity and activity of membrane ATPases in human erythrocytes under the influence of polyhydroxylated fullerene. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(2), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.09.008>
- Greene, R. F., Collins, J. M., Jenkins, J. F., Speyer, J. L., & Myers, C. E. (1983). Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols. *Cancer research*, 43(7), 3417–21. Preuzeto od <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6850648>
- Gruszecki, W. I., Kulik, A. J., Janik, E., Bednarska, J., Luchowski, R., Grudzinski, W., & Dietler, G. (2015). Nanoscale resolution in infrared imaging of protein-containing lipid membranes. *Nanoscale*, 7(35), 14659–62. <https://doi.org/10.1039/c5nr03090k>
- Guo, Z., Mohanty, U., Noehre, J., Sawyer, T. K., Sherman, W., & Krilov, G. (2010). Probing the alpha-helical structural stability of stapled p53 peptides: Molecular dynamics simulations and analysis. *Chemical Biology and Drug Design*, 75(4), 348–359. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2010.00951.x>
- Gustafson, D. L., Rastatter, J. C., Colombo, T., & Long, M. E. (2002). Doxorubicin pharmacokinetics: Macromolecule binding, metabolism, and excretion in the context of a physiologic model. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91(6), 1488–1501. <https://doi.org/10.1002/jps.10161>
- Hajian, R., Shams, N., & Mohagheghian, M. (2009). Study on the interaction between doxorubicin and deoxyribonucleic acid with the use of methylene blue as a probe. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(8), 1399–1405.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Oxford University Press.
- Han, Y., Zhang, J., Qian, J., & Hu, C. (2015). Cardiotoxicity evaluation of anthracyclines in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Applied Toxicology*, 35(3), 241–252.
- Handbook Of Analytical Methods For Materials*. (2010). Materials Evaluation and Engineering, Inc.
- Haran, G., Cohen, R., Bar, L. K., & Barenholz, Y. (1993). Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *BBA - Biomembranes*, 1151(2), 201–215. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(93\)90105-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(93)90105-9)
- Harper, S. L., Carriere, J. L., Miller, J. M., Hutchison, J. E., Maddux, B. L. S., & Tanguay, R. L. (2011). Systematic evaluation of nanomaterial toxicity: Utility of standardized materials and rapid assays. *ACS Nano*, 5(6), 4688–4697. <https://doi.org/10.1021/nn200546k>
- Harris, L., Batist, G., Belt, R., Rovira, D., Navari, R., Azarnia, N., Taylor, H. (2002). Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. *Cancer*, 94(1), 25–36. <https://doi.org/10.1002/cncr.10201>
- He, C., Hu, Y., Yin, L., Tang, C., & Yin, C. (2010). Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*, 31(13), 3657–3666. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.065>
- Hepler, L. G. (1969). Thermal expansion and structure in water and aqueous solutions. *Canadian Journal of Chemistry*, 47(24), 4613–4617.
- Hillig, K. W., & Morris, M. D. (1976). Pre-resonance Raman spectra of adriamycin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71(4), 1228–1233. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(76\)90785-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90785-3)
- Hirsch, A. (1999). Principles of Fullerene Reactivity BT - Fullerenes and Related Structures. U A. Hirsch (Ur.) (str. 1–65). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-68117-5_1
- Hobbs, S. K., Monsky, W. L., Yuan, F., Roberts, W. G., Griffith, L., Torchilin, V. P., & Jain, R. K. (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4607–4612. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4607>
- Hodkiewicz, J., & Scientific, T. F. (bez dat.). The Importance of Tight Laser Power Control When Working with Carbon Nanomaterials, 60.
- Hoekman, K., Van der Vijgh, W. J. F., & Vermorcken, J. B. (1999). Clinical and preclinical modulation of chemotherapy-induced toxicity in patients with cancer. *Drugs*, 57(2), 133–155. <https://doi.org/10.2165/00003495-199957020-00002>
- Hong, R. L., & Tseng, Y. L. (2001). Phase I and pharmacokinetic study of a stable, polyethylene-glycolated liposomal doxorubicin in patients with solid tumors: The relation between pharmacokinetic property and toxicity. *Cancer*, 91(9), 1826–1833. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20010501\)91:9<1826::AID-CNCR1203>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010501)91:9<1826::AID-CNCR1203>3.0.CO;2-J)
- Hopewell, J. W., Duncan, R., Wilding, D., & Chakrabarti, K. (2001). Preclinical evaluation of the cardiotoxicity of PK2: A novel HPMA copolymer–doxorubicin–galactosamine conjugate antitumour agent. *Human & Experimental Toxicology*, 20(9), 461–470. <https://doi.org/10.1191/096032701682693017>
- Hou, M., Chrysis, D., Nurmio, M., Parvinen, M., Eksborg, S., Söder, O., & Jahnukainen, K. (2005). Doxorubicin induces apoptosis in germ line stem cells in the immature rat testis and amifostine cannot protect against this cytotoxicity. *Cancer Research*, 65(21), 9999–10005. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2004>
- Huo, S., Ma, H., Huang, K., Liu, J., Wei, T., Jin, S., Liang, X. J. (2013). Superior penetration and retention behavior of 50 nm gold nanoparticles in tumors. *Cancer Research*, 73(1), 319–330. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2071>
- Husebo, L. O., Sitharaman, B., Furukawa, K., Kato, T., & Wilson, L. J. (2004). Fullerenols revisited as stable radical anions. *Journal of the American Chemical Society*, 126(38), 12055–12064. <https://doi.org/10.1021/ja047593o>
- Ičević, I. Đ., Vukmirović, S. N., Srđenović, B. U., Sudi, J. J., Đorđević, A. N., Injac, R. M., & Vasović, V. M. (2011). Protective effects of orally applied fullereneol nanoparticles in rats after a single dose of doxorubicin. *Hemijska industrija*, 65(3), 329–337.
- Ichikawa, Y., Ghanefar, M., Bayeva, M., Wu, R., Khechaduri, A., Naga Prasad, S. V., Ardehali, H. (2014). Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *Journal of Clinical Investigation*, 124(2), 617–630. <https://doi.org/10.1172/JCI12931>
- Immordino, M. L., Dosio, F., & Cattel, L. (2006). Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.1023/A:1020134521778>
- Indeglia, P. A., Georgieva, A., Krishna, V. B., & Bonzongo, J. C. J. (2014). Physicochemical characterization of fullereneol and fullereneol synthesis by-products prepared in alkaline media. *Journal of Nanoparticle Research*, 16(9). <https://doi.org/10.1007/s11051-014-2599-4>
- Injac, R., & Boskovic, M. (2008). Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fullereneol C60 (OH) 24 via suppression of oxidative stress. *Pharmacological Reports*, 60(5), 742–9. Preuzeto od http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066422%5Cnhttp://www.if-pan.krakow.pl/pjp/pdf/2008/5_742.pdf
- Injac, R., Boskovic, M., Perse, M., Koprivec-Furlan, E., Cerar, A., Djordjevic, A., & Strukelj, B. (2008). Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasms can be successfully treated With fullereneol C60(OH)24 via suppression of oxidative stress. *Pharmacological Reports*, 60(5), 742–749.
- Injac, R., Perse, M., Boskovic, M., Djordjevic-Milic, V., Djordjevic, A., Hvala, A., Strukelj, B. (2008). Cardioprotective effects of fullereneol C(60)(OH)(24) on a single dose doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats with malignant neoplasm. *Technol Cancer Res Treat*, 7(1), 15–25. Preuzeto od <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18198920>
- Injac, R., Perse, M., Cerne, M., Potocnik, N., Radic, N., Govedarica, B., Strukelj, B. (2009). Protective effects of fullereneol C60(OH)24 against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer. *Biomaterials*, 30(6), 1184–1196. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.060>
- Injac, R., Perse, M., Obermajer, N., Djordjevic-Milic, V., Prijatelj, M., Djordjevic, A., Strukelj, B. (2008). Potential hepatoprotective effects of fullereneol C60(OH)24 in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas. *Biomaterials*, 29(24–25), 3451–3460. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.048>
- Injac, R., Radic, N., Govedarica, B., Perse, M., Cerar, A., Djordjevic, A., & Strukelj, B. (2009). Acute doxorubicin pulmototoxicity in rats with malignant neoplasm is effectively treated with fullereneol C60(OH)24 through inhibition of oxidative stress. *Pharmacological Reports*, 61(2), 335–342. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70041-6](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70041-6)
- Isakovic, A., Markovic, Z., Todorovic-Marcovic, B., Nikolic, N., Vranjes-Djuric, S., Mirkovic, M., Trajkovic, V. (2006). Distinct cytotoxic mechanisms of pristine versus hydroxylated fullerene. *Toxicological*

- Sciences*, 91(1), 173–183. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj127>
- Jain, K., Mehra, N. K., & Jain, N. K. (2014). Potentials and emerging trends in nanopharmacology. *Current opinion in pharmacology*, 15, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.01.006>
- Jain, R. K. (1987). Transport of molecules across tumor vasculature. *CANCER AND METASTASIS REVIEW*, 6(4), 559–593. <https://doi.org/10.1007/BF00047468>
- Jain, R. K. (1998). The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nature medicine*, 4(6), 655–657. <https://doi.org/10.1038/nm0698-655>
- Jain, R. K., & Stylianopoulos, T. (2010). Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7(11), 653–664. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.139>
- Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90131-2](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90131-2)
- Jiang, L., Gao, Z.-m., Ye, L., Zhang, A.-y., & Feng, Z.-g. (2013b). A tumor-targeting nano doxorubicin delivery system built from amphiphilic polyrotaxane-based block copolymers. *Polymer*, 54(19), 5188–5198. [doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2013.07.044](http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2013.07.044)
- Jiang, W., Kim, B. Y. S., Rutka, J. T., & Chan, W. C. W. (2008). Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotechnology*, 3(3), 145–150. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.30>
- Jiao, F., Liu, Y., Qu, Y., Li, W., Zhou, G., Ge, C., Chen, C. (2010). Studies on anti-tumor and antimetastatic activities of fullerene in a mouse breast cancer model. *Carbon*, 48(8), 2231–2243. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2010.02.032>
- Jin, H., Heller, D. A., Sharma, R., & Strano, M. S. (2009). Size-dependent cellular uptake and expulsion of single-walled carbon nanotubes: Single particle tracking and a generic uptake model for nanoparticles. *ACS Nano*, 3(1), 149–158. <https://doi.org/10.1021/nn800532m>
- Johnson-Lyles, D. N., Peifley, K., Lockett, S., Neun, B. W., Hansen, M., Clogston, J., McNeil, S. E. (2010). Fullerene cytotoxicity in kidney cells is associated with cytoskeleton disruption, autophagic vacuole accumulation, and mitochondrial dysfunction. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 248(3), 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.08.008>
- Jondeau, A., Dahbi, L., Bani-Estivals, M.-H., & Chagnon, M.-C. (2006). Evaluation of the sensitivity of three sublethal cytotoxicity assays in human HepG2 cell line using water contaminants. *Toxicology*, 226(2), 218–228. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.07.007>
- Jones, G., & Dole, M. (1929). The viscosity of aqueous solutions of strong electrolytes with special reference to barium chloride. *Journal of the American Chemical Society*, 51(10), 2950–2964.
- Jović, D. S., Seke, M. N., Djordjevic, A. N., Mrđanović, J. Ž., Aleksić, L. D., Bogdanović, G. M., Plavec, J. (2016). Fullerene nanoparticles as a new delivery system for doxorubicin. *RSC Adv.*, 6(45), 38563–38578. <https://doi.org/10.1039/C6RA03879D>
- Julyan, P. J., Seymour, L. W., Ferry, D. R., Daryani, S., Boivin, C. M., Doran, J., Kerr, D. J. (1999). Preliminary clinical study of the distribution of HPMA copolymers bearing doxorubicin and galactosamine. *Journal of Controlled Release*, 57(3), 281–290. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00124-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00124-2)
- Kamata, J. P., Devasagayama, T. P. A., Priyadarsinib, K. I., & Mohan, H. (2000). Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications. *Toxicology*, 155(1–3), 55–61.
- Kaneda, Y., Tsutsumi, Y., Yoshioka, Y., Kamada, H., Yamamoto, Y., Kodaira, H., Mayumi, T. (2004). The use of PVP as a polymeric carrier to improve the plasma half-life of drugs. *Biomaterials*, 25(16), 3259–3266. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.003>
- Karagoz, B., Esser, L., Duong, H. T., Basuki, J. S., Boyer, C., & Davis, T. P. (2014). Polymerization-Induced Self-Assembly (PISA) – control over the morphology of nanoparticles for drug delivery applications. *Polym. Chem.*, 5, 350–355. <https://doi.org/10.1039/C3PY01306E>
- Kato, S., Aoshima, H., Saitoh, Y., & Miwa, N. (2009). Highly hydroxylated or γ -cyclodextrin-bicapped water-soluble derivative of fullerene: The antioxidant ability assessed by electron spin resonance method and β -carotene bleaching assay. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19(18), 5293–5296. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.07.149>
- Kaushik, D., & Bansal, G. (2015). Four new degradation products of doxorubicin: An application of forced degradation study and hyphenated chromatographic techniques. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(5), 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.05.003>
- Kay, R. L., & Evans, D. F. (1966). The effect of solvent structure on the mobility of symmetrical ions in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry*, 70(7), 2325–2335.
- Kim, J. E., & Lee, M. (2003). Fullerene inhibits beta -amyloid peptide aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303(2), 576–579. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)00393-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)00393-0)
- Kipp, J. E. (2004). The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble

- drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.07.019>
- Kiyomiya, K. I., Matsuo, S., & Kurebe, M. (2001). Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: The mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer Research*, *61*(6), 2467–2471.
- Kjeldgaard N.O., 1963. Dynamics of bacterial growth, Thesis. University of Copenhagen
- Knezevic, N., T, N. C. K. D., T, S. M., T, D. J., Lazarevic, S., T, J. M., & Djordjevic, A. (2015). Fullerene-Capped Porous Silica Nanoparticles for pH-Responsive Drug Delivery. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2015, Article ID 567350. <https://doi.org/10.1155/2015/567350>
- Knežević, N. Ž., Trewyn, B. G., & Lin, V. S. Y. (2011). Light- and pH-responsive release of doxorubicin from a mesoporous silica-based nanocarrier. *Chemistry - A European Journal*, *17*(12), 3338–3342. <https://doi.org/10.1002/chem.201002960>
- Knežević N., Mrđanović J., Borišev I., Milenković S., Janačković Đ., Cunin F., & Djordjevic A. (2016). Hydroxylated fullerene-capped, vinblastine-loaded folic acid-functionalized mesoporous silica nanoparticles for targeted anticancer therapy. *RSC Advances*. *6*, 7061-7065
- Knežević N. Z., Kaludrović G. N. (2017). Silicon-based nanotheranostics. *Nanoscale*, *9*, 12821-12829
- Kojić, V., Jakimov, D., Bogdanović, G., & Djordjević, A. (2005). Effects of fullerene C60 (OH) 24 on cytotoxicity induced by antitumor drugs on human breast carcinoma cell lines. U *Materials Science Forum* (Sv. 494, str. 543–548). Trans Tech Publ.
- Kokubo, K., Matsubayashi, K., Tategaki, H., Takada, H., & Oshima, T. (2008). Facile synthesis of highly water-soluble fullerenes more than half-covered by hydroxyl groups. *ACS Nano*, *2*(2), 327–333. <https://doi.org/10.1021/nm700151z>
- Kokubo, K., Shirakawa, S., Kobayashi, N., Aoshima, H., & Oshima, T. (2011). Facile and scalable synthesis of a highly hydroxylated water-soluble fullerene as a single nanoparticle. *Nano Research*, *4*(2), 204–215. <https://doi.org/10.1007/s12274-010-0071-z>
- Koo, O. M., Rubinstein, I., & Onyuksel, H. (2005). Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.06.004>
- Koren, R. (1980). The relevance of the state of growth and transformation of cells to their patterns of metabolite uptake. *International review of cytology*, *68*, 127–172.
- Koukourakis, M. I., Koukouraki, S., Fezoulidis, I., Kelekis, N., Kyrias, G., Archimandritis, S., & Karkavitsas, N. (2000). High intratumoural accumulation of stealth liposomal doxorubicin (Caelyx) in glioblastomas and in metastatic brain tumours. *British journal of cancer*, *83*(10), 1281–6. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1459>
- Krantz, A. (1997). Red cell-mediated therapy: opportunities and challenges. *Blood cells, molecules & diseases*, *23*(1), 58–68. <https://doi.org/10.1006/bcmd.1997.0119>
- Kreuter, J. (1994). Drug targeting with nanoparticles. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, *19*(3), 253–256. <https://doi.org/10.1007/BF03188928>
- Kumar, S. A., Peter, Y. A., & Nadeau, J. (2009). Biosynthesis, separation and conjugation of gold nanoparticles to doxorubicin for cellular uptake and toxicity. U *Bioengineering, Proceedings of the Northeast Conference*. <https://doi.org/10.1109/NEBC.2009.4967628>
- Kumar, V. A., Taylor, N. L., Shi, S., Wang, B. K., Jalan, A. A., Kang, M. K., Hartgerink, J. D. (2015). Highly angiogenic peptide nanofibers. *ACS Nano*, *9*(1), 860–868. <https://doi.org/10.1021/nm506544b>
- La Ferla, B., Airoldi, C., Zona, C., Orsato, A., Cardona, F., Merlo, S., Nicotra, F. (2011). Natural glycoconjugates with antitumor activity. *Nat. Prod. Rep.*, *28*(3), 630–648. <https://doi.org/10.1039/C0NP00055H>
- Lage, H., Helmbach, H., Dietel, M., & Schandendorf, D. (2000). Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance. *British journal of cancer*, *82*(2), 488–491. <https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.0947>
- Lai, H. S., Chen, W. J., & Chiang, L. Y. (2000). Free radical scavenging activity of fullerene on the ischemia-reperfusion intestine in dogs. *World journal of surgery*, *24*(4), 450–4. <https://doi.org/10.1007/s002689910071>
- Lai, H. S., Chen, Y., Chen, W. J., Chang, K. J., & Chiang, L. Y. (2000). Free radical scavenging activity of fullerene on grafts after small bowel transplantation in dogs. U *Transplantation Proceedings* (Sv. 32, str. 1272–1274). [https://doi.org/10.1016/S0041-1345\(00\)01220-3](https://doi.org/10.1016/S0041-1345(00)01220-3)
- Laplante, S. R., Carson, R., Gillard, J., Aubry, N., Coulombe, R., Bordeleau, S., Beaulieu, P. L. (2013). Compound aggregation in drug discovery: Implementing a practical NMR assay for medicinal chemists. *Journal of Medicinal Chemistry*, *56*(12), 5142–5150. <https://doi.org/10.1021/jm400535b>
- Lasic, D. D., Frederik, P. M., Stuart, M. C. A., Barenholz, Y., & McIntosh, T. J. (1992). Gelation of liposome interior A novel method for drug encapsulation. *FEBS Letters*, *312*(2–3), 255–258. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80947-F](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80947-F)
- Laurent, S., Burtea, C., Thirifays, C., Häfeli, U. O., & Mahmoudi, M. (2012). Crucial ignored parameters on

- nanotoxicology: The importance of toxicity assay modifications and „cell vision“. *PLoS ONE*, 7(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029997>
- Lee, C. M., Huang, S. T., Huang, S. H., Lin, H. W., Tsai, H. P., Wu, J. Y., Chen, C. T. (2011). C60 fullerene-pentoxifylline dyad nanoparticles enhance autophagy to avoid cytotoxic effects caused by the ??-amyloid peptide. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7(1), 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.06.009>
- Lee, H., Fonge, H., Hoang, B., Reilly, R. M., & Allen, C. (2010). The effects of particle size and molecular targeting on the intratumoral and subcellular distribution of polymeric nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics*, 7(4), 1195–1208. <https://doi.org/10.1021/mp100038h>
- Li, J., Takeuchi, A., Ozawa, M., Li, X., Saigo, K., & Kitazawa, K. (1993). C60 fullerol formation catalysed by quaternary ammonium hydroxides. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (1784), 1784. <https://doi.org/10.1039/c39930001784>
- Liao, L. B., Zhou, H. Y., & Xiao, X. M. (2005). Spectroscopic and viscosity study of doxorubicin interaction with DNA. *Journal of Molecular Structure*, 749(1–3), 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2005.04.007>
- Licata, S., Saponiero, A., Mordente, A., & Minotti, G. (2000). Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: Role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chemical Research in Toxicology*, 13(5), 414–420. <https://doi.org/10.1021/tx000013q>
- Lin, P. C., Lin, S., Wang, P. C., & Sridhar, R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 32(4), 711–726. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.006>
- Lindman, S., Lynch, I., Thulin, E., Nilsson, H., Dawson, K. A., & Linse, S. (2007). Systematic investigation of the thermodynamics of HSA adsorption to N-iso-propylacrylamide/N-tert-butylacrylamide copolymer nanoparticles. Effects of particle size and hydrophobicity. *Nano Letters*, 7(4), 914–920. <https://doi.org/10.1021/nl062743+>
- Lipshultz, S. E., Rifai, N., Dalton, V. M., Levy, D. E., Silverman, L. B., Lipsitz, S. R., Sallan, S. E. (2004). The Effect of Dexrazoxane on Myocardial Injury in Doxorubicin-Treated Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 351(2), 145–153. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035153>
- Liu, J. H., Cao, L., Luo, P. G., Yang, S. T., Lu, F., Wang, H., Sun, Y. P. (2010). Fullerene-conjugated doxorubicin in cells. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2(5), 1384–1389. <https://doi.org/10.1021/am100037y>
- Liu, Y., Chen, C., Qian, P., Lu, X., Sun, B., Zhang, X., Chen, Z. (2015). Gd-metallofullerenol nanomaterial as non-toxic breast cancer stem cell-specific inhibitor. *Nature communications*, 6.
- Liu, Y., Wang, Z., & Wang, X. (2015). AFM-based study of fullereneol (C 60 (OH) 24)-induced changes of elasticity in living SMCC-7721 cells. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 45, 65–74.
- Löhr, J. M., Haas, S. L., Bechstein, W.-O., Bodoky, G., Cwiertka, K., Fischbach, W., Lutz, M. P. (2012). Cationic liposomal paclitaxel plus gemcitabine or gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a randomized controlled phase II trial. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 23(5), 1214–22. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr379>
- Longmire, M., Choyke, P. L., & Kobayashi, H. (2008). Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats. *Nanomedicine (London, England)*, 3(5), 703–17. <https://doi.org/10.2217/17435889.3.5.703>
- Lotharius, J., Dugan, L. L., & O'Malley, K. L. (1999). Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(4), 1284–1293.
- Lu, F., Haque, S. A., Yang, S.-T., Luo, P. G., Gu, L., Kitaygorodskiy, A., Sun, Y.-P. (2009). Aqueous compatible fullerene-doxorubicin conjugates. *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces*, 113(41), 17768.
- Lu, F., Wu, S. H., Hung, Y., & Mou, C. Y. (2009). Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small*, 5(12), 1408–1413. <https://doi.org/10.1002/sml.200900005>
- Lynch, I., & Dawson, K. A. (2008). Protein-nanoparticle interactions. *Nano Today*. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(08\)70014-8](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(08)70014-8)
- Lynch, I., Salvati, A., & Dawson, K. A. (2009). Protein-nanoparticle interactions: What does the cell see? *Nature Nanotechnology*, 4(9), 546–547. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.248>
- Ma, P., & Mumper, R. J. (2013). Anthracycline nano-delivery systems to overcome multiple drug resistance: A comprehensive review. *Nano Today*, 8(3), 313–331. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2013.04.006>
- Ma, W., Cheetham, A. G., & Cui, H. (2016). Building nanostructures with drugs. *Nano Today*, 11(1), 13–30.
- Ma, W., Wang, J., Guo, Q., & Tu, P. (2015). Simultaneous determination of doxorubicin and curcumin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and*

- Biomedical Analysis*, 111, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.04.007>
- Ma, X., Zhao, Y., & Liang, X. J. (2011). Theranostic nanoparticles engineered for clinic and pharmaceutics. *Accounts of Chemical Research*, 44(10), 1114–1122. <https://doi.org/10.1021/ar2000056>
- Maeda, H., Nakamura, H., & Fang, J. (2013). The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.002>
- Mahmoudi, M., Laurent, S., Shokrgozar, M. A., & Hosseinkhani, M. (2011). Toxicity evaluations of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Cell „vision“ versus physicochemical properties of nanoparticles. *ACS Nano*, 5(9), 7263–7276. <https://doi.org/10.1021/nn2021088>
- Maksin, T., Djokic, D., Jankovic, D., Djordjevic, A., & Neskovic, O. (2007). Comparison of some physico-chemical parameters and biological behaviour of fullereneol labelled with technetium-99m. *J Optoelectro Adv Mater*, 9(8), 2571–2577.
- Mandzy, N., Grulke, E., & Druffel, T. (2005). Breakage of TiO₂ agglomerates in electrostatically stabilized aqueous dispersions. *Powder Technology*, 160(2), 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2005.08.020>
- Manet, I., Manoli, F., Zambelli, B., Andreano, G., Masi, A., Cellai, L., & Monti, S. (2011). Affinity of the anthracycline antitumor drugs Doxorubicin and Sabarubicin for human telomeric G-quadruplex structures. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13(2), 540–551. <https://doi.org/10.1039/C0CP00898B>
- Marano, F., Hussain, S., Rodrigues-Lima, F., Baeza-Squiban, A., & Boland, S. (2011). Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Archives of Toxicology*, 85(7), 733–741. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0546-4>
- March J. (1992). *Advanced organic chemistry* (4 th). New York: John Wiley & Sons Inc.
- Marcus, Y. (2009). Effect of ions on the structure of water: Structure making and breaking. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/cr8003828>
- Mayor, S., & Pagano, R. E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(8), 603–612. <https://doi.org/10.1038/nrm2216>
- Menozzi, M., Valentini, L., Vannini, E., & Arcamone, F. (1984). Self-association of doxorubicin and related compounds in aqueous solution. *J. Pharm. Sci.*, 73(Copyright (C) 2013 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.), 766–770. <https://doi.org/10.1002/jps.2600730615>
- Meyer, E., Amer et al., & Meyer, E. (1992). Atomic force microscopy. *Prog. Surf. Sci.*, 41(1), 3–49. [https://doi.org/10.1016/0079-6816\(92\)90009-7](https://doi.org/10.1016/0079-6816(92)90009-7)
- Minotti, G. (2004). Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185–229. <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6>
- Minotti, G., Cairo, G., & Monti, E. (1999). Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(2), 199–212.
- Minotti, G., Recalcatti, S., Mordente, A., Liberi, G., Calafiore, A. M., Mancuso, C., Cairo, G. (1998). The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(7), 541–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9576481>
- Mirkov, S. M., Djordjevic, A. N., Andric, N. L., Andric, S. A., Kostic, T. S., Bogdanovic, G. M., Kovacevic, R. Z. (2004). Nitric oxide-scavenging activity of polyhydroxylated fullereneol, C₆₀(OH)₂₄. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 11(2), 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2004.08.003>
- Mrđanovic, Ž. J., Šolajic, S. V., Bogdanović, V. V., Djordjevic, A. N., Bogdanović, G. M., Injac, R. D., & Rakočević, Z. L. J. (2012). Effects of fullereneol nano particles C₆₀(OH)₂₄ on micronuclei and chromosomal aberrations' frequency in peripheral blood lymphocytes. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(2), 673–686.
- Mrđanović, J., Šolajić, S., Bogdanović, V., Stankov, K., Bogdanović, G., & Djordjevic, A. (2009). Effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ on the frequency of micronuclei and chromosome aberrations in CHO-K1 cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 680(1–2), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.08.008>
- Mross, K., Niemann, B., Massing, U., Drevs, J., Unger, C., Bhamra, R., & Swenson, C. E. (2004). Pharmacokinetics of liposomal doxorubicin (TLC-D99; Myocet) in patients with solid tumors: An open-label, single-dose study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 54(6), 514–524. <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0825-y>
- Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A. M., Schlager, J. J., & Hussain, S. M. (2008). Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological Sciences*, 101(2), 239–253. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm240>
- Muthu, M., & Feng, S. (2010). Nanopharmacology of liposomes developed for cancer therapy Editorial. *Nanomedicine*, 5(7), 1017–1019. <https://doi.org/10.2217/nmm.10.75>

- Nakanishi, T., Fukushima, S., Okamoto, K., Suzuki, M., Matsumura, Y., Yokoyama, M., Kataoka, K. (2001). Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. U *Journal of Controlled Release* (Sv. 74, str. 295–302). [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00341-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00341-8)
- Nichols, G., Byard, S., Bloxham, M. J., Botterill, J., Dawson, N. J., Dennis, A., Sherwood, J. D. (2002). A review of the terms agglomerate and aggregate with a recommendation for nomenclature used in powder and particle characterization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1002/jps.10191>
- Niedernhofer, L. J., Daniels, J. S., Rouzer, C. A., Greene, R. E., & Marnett, L. J. (2003). Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31426–31433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212549200>
- Nielsen, G. D., Roursgaard, M., Jensen, K. A., Poulsen, S. S., & Larsen, S. T. (2008). In vivo biology and toxicology of fullerenes and their derivatives. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00266.x>
- Noguchi, Y., Wu, J., Duncan, R., Strohalm, J., Ulbrich, K., Akaike, T., & Maeda, H. (1998). Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Japanese journal of cancer research : Gann*, 89(3), 307–314. <https://doi.org/S0910505097868561> [pii]
- Nomura, T., Koreeda, N., Yamashita, F., Takakura, Y., & Hashida, M. (1998). Effect of particle size and charge on the disposition of lipid carriers after intratumoral injection into tissue-isolated tumors. *Pharmaceutical Research*, 15(1), 128–132. <https://doi.org/10.1023/A:1011921324952>
- Nomura, T., Saikawa, A., Morita, S., Sakaeda, T., Yamashita, F., Honda, K., Hashida, M. (1998). Pharmacokinetic characteristics and therapeutic effects of mitomycin C-dextran conjugates after intratumoural injection. *Journal of Controlled Release*, 52(3), 239–252. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00185-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00185-5)
- Northfelt, D. W. et al. (1998). Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, irinotecan, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: results of a randomized phase III clinical trial. *J. Clin. Oncol*, 16(2445–2451).
- O'Brien, M. E. R., Wigler, N., Inbar, M., Rosso, R., Grischke, E., Santoro, A., Tendler, C. (2004). Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil®) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*, 15(3), 440–449. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh097>
- O'Malley, P. (2010). Nanopharmacology: For the Future-Think Small. *Clinical Nurse Specialist*, 24(3). Preuzeto od http://journals.lww.com/cns-journal/Fulltext/2010/05000/Nanopharmacology__For_the_Future_Think_Small.4.aspx
- Octavia, Y., Tocchetti, C. G., Gabrielson, K. L., Janssens, S., Crijns, H. J., & Moens, A. L. (2012). Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.03.006>
- Onsager, L., & Fuoss, R. M. (1932). Irreversible processes in electrolytes. Diffusion, conductance and viscous flow in arbitrary mixtures of strong electrolytes. *The Journal of Physical Chemistry*, 36(11), 2689–2778.
- Oliveira-Brett, A. M., Piedade, J. A. P., & Chiorcea, A. M. (2002). Anodic voltammetry and AFM imaging of picomoles of adriamycin adsorbed onto carbon surfaces. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 538–539, 267–276. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(02\)00944-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(02)00944-0)
- Padera, T. P., Stoll, B. R., Tooredman, J. B., Capen, D., Tomaso, E. di, & Jain, R. K. (2004). Pathology: Cancer cells compress intratumour vessels. *Nature*, 427(6976), 695–695. <https://doi.org/10.1038/427695a>
- Panchuk, R. R., Prylutska, S. V., Chumak, V. V., Skorokhyd, N. R., Lehka, L. V., Evstigneev, M. P., Stoika, R. S. (2015). Application of C60 fullerene-doxorubicin complex for tumor cell treatment in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(7), 1139–1152. <https://doi.org/10.1166/jbn.2015.2058>
- Paulos, C. M., Reddy, J. a, Leamon, C. P., Turk, M. J., & Low, P. S. (2004). Ligand binding and kinetics of folate receptor recycling in vivo: impact on receptor-mediated drug delivery. *Molecular pharmacology*, 66(6), 1406–1414. <https://doi.org/10.1124/mol.104.003723>
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature nanotechnology*, 2(12), 751–760.
- Petrovic D., Seke M., Srdjenovic B., & Djordjevic A. (2015). Applications of anti/pro-oxidant fullerenes in nanomedicine along with fullerenes influence on immune system. *Journal of Nanomaterials*, ID 565638
- Piątek, A., Dawid, A., & Gburski, Z. (2011). The properties of small fullerene cluster (C60(OH)24)7: computer simulation. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, 79(4), 819–23. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.08.059>
- Pickering, K. D., & Wiesner, M. R. (2005). Fullerene-sensitized production of reactive oxygen species in aqueous solution. *Environmental science & technology*, 39(5), 1359–1365. <https://doi.org/10.1021/es048940x>
- Podolski, I. Y., Podlubnaya, Z. A., Kosenko, E. A., Mugantseva, E. A., Makarova, E. G., Marsagishvili, L. G., Klochkov, V. K. (2007). Effects of Hydrated Forms of C60 Fullerene on Amyloid Peptide Fibrillation In Vitro and Performance of the Cognitive Task. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7(4–1), 1479–1485. <https://doi.org/10.1166/jnn.2007.330>

- Poon, R. T. P., & Borys, N. (2009). Lyso-thermosensitive liposomal doxorubicin: a novel approach to enhance efficacy of thermal ablation of liver cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 10(February 2009), 333–343. <https://doi.org/10.1517/14656560802677874>
- Pouponneau, P., Soulez, G., Beaudoin, G., Leroux, J. C., & Martel, S. (2014). MR imaging of therapeutic magnetic microcarriers guided by magnetic resonance navigation for targeted liver chemoembolization. *CardioVascular and Interventional Radiology*, 37(3), 784–790. <https://doi.org/10.1007/s00270-013-0770-4>
- Prahalathan, C., Selvakumar, E., & Varalakshmi, P. (2005). Protective effect of lipoic acid on adriamycin-induced testicular toxicity. *Clinica Chimica Acta*, 360(1–2), 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2005.04.025>
- Prylutska, S., Grynyuk, I., Matyshevska, O., Prylutsky, Y., Evstigneev, M., Scharff, P., & Ritter, U. (2014). C60 Fullerene as Synergistic Agent in Tumor-Inhibitory Doxorubicin Treatment. *Drugs in R and D*, 14(4), 333–340. <https://doi.org/10.1007/s40268-014-0074-4>
- Prylutsky, Y. I., Evstigneev, M. P., Cherepanov, V. V., Kyzyma, O. A., Bulavin, L. A., Davidenko, N. A., & Scharff, P. (2015). Structural organization of C60 fullerene, doxorubicin, and their complex in physiological solution as promising antitumor agents. *Journal of Nanoparticle Research*, 17(1). <https://doi.org/10.1007/s11051-015-2867-y>
- Prylutsky, Y. I., Evstigneev, M. P., Pashkova, I. S., Wyrzykowski, D., Woziwodzka, A., Goluński, G., Ritter, U. (2014). Characterization of C 60 fullerene complexation with antibiotic doxorubicin. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(42), 23164–23172.
- Qiu, Y., Liu, Y., Wang, L., Xu, L., Bai, R., Ji, Y., Chen, C. (2010). Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials*, 31(30), 7606–7619. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.06.051>
- Rahman, A. M., Yusuf, S. W., & Ewer, M. S. (2007). Anthracycline-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation. *International Journal of Nanomedicine*.
- Ramya, A. N., Joseph, M. M., Maniganda, S., Karunakaran, V., Sreelekha, T. T., & Maiti, K. K. (2017). Emergence of Gold-Mesoporous Silica Hybrid Nanotheranostics: Dox-Encoded, Folate Targeted Chemotherapy with Modulation of SERS Fingerprinting for Apoptosis Toward Tumor Eradication. *Small*, 13(31). <https://doi.org/10.1002/sml.201700819>
- Rauch, J., Kolch, W., Laurent, S., & Mahmoudi, M. (2013). Big signals from small particles: Regulation of cell signaling pathways by nanoparticles. *Chemical Reviews*. <https://doi.org/10.1021/cr3002627>
- Rebbaa, A., Zheng, X., Chou, P. M., & Mirkin, B. L. (2003). Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene*, 22(18), 2805–2811. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206366>
- Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S., & Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochemical Journal*, 377(1), 159–169. <https://doi.org/10.1042/bj20031253>
- Resnik, D. B., & Tinkle, S. S. (2007). Ethics in nanomedicine. *Nanomedicine*, 2(3), 345–350. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.3.345>
- Richardson, D. R. (2005). Molecular Pharmacology of the Interaction of Anthracyclines with Iron. *Molecular Pharmacology*. <https://doi.org/10.1124/mol.105.013383>
- Rosu, F., Pirotte, S., Pauw, E. De, & Gabelica, V. (2006). Positive and negative ion mode ESI-MS and MS/MS for studying drug-DNA complexes. *International Journal of Mass Spectrometry*, 253(3), 156–171. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2005.11.027>
- Saathoff, J. G., Inman, A. O., Xia, X. R., Riviere, J. E., & Monteiro-Riviere, N. A. (2011). In vitro toxicity assessment of three hydroxylated fullerenes in human skin cells. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 25(8), 2105–2112. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.09.013>
- Sager, T. M., Porter, D. W., Robinson, V. A., Lindsley, W. G., Schwegler-Berry, D. E., & Castranova, V. (2007). Improved method to disperse nanoparticles for in vitro and in vivo investigation of toxicity. *Nanotoxicology*, 1(2), 118–129. <https://doi.org/10.1080/17435390701381596>
- Samorì, B., Rossi, A., Pellerano, I. D., Marconi, G., Valentini, L., Gioia, B., & Vigevani, A. (1987). Interactions between drugs and nucleic acids. Part I. Dichroic studies of doxorubicin, daunorubicin, and their basic chromophore, quinizarin. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (10), 1419–1426.
- Santos, N. C., Figueira-Coelho, J., Martins-Silva, J., & Saldanha, C. (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: Pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00002-9)
- Sanvicens, N., & Marco, M.-P. (2008). *Sanvicens, N and Marco, MP. Multifunctional nanoparticles-properties and prospects for their use in human medicine. Trends Biotechnol 26: 425-433. Trends in biotechnology (Sv. 26)*. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.005>
- Sayes, C. M., Fortner, J. D., Guo, W., Lyon, D., Boyd, A. M., Ausman, K. D., Colvin, V. L. (2004). The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Letters*, 4(10), 1881–1887.

- <https://doi.org/10.1021/nl0489586>
- Schmitt, C. A., & Lowe, S. W. (2002). Apoptosis and chemoresistance in transgenic cancer models. *Journal of Molecular Medicine*, 80(3), 137–146. <https://doi.org/10.1007/s00109-001-0293-3>
- Schmitt-Sody, M., Strieth, S., Krasnici, S., Sauer, B., Schulze, B., Teifel, M., Dellian, M. (2003). Neovascular targeting therapy: Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes improves antitumoral efficacy. *Clinical Cancer Research*, 9(6), 2335–2341.
- Schneider, N. S., Darwish, A. D., Kroto, H. W., Taylor, R., & Walton, D. R. M. (1994). Formation of Fullerenols Via Hydroboration of Fullerene-C₆₀. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, (4), 463–464. <https://doi.org/10.1039/C39940000463>
- Scott, A. M., Allison, J. P., & Wolchok, J. D. (2012). Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer immunity*. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70006-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70006-2)
- Seke, M., Petrovic, D., Djordjevic, A., Jovic, D., Borovic, M. L., Kanacki, Z., & Jankovic, M. (2016). Fulleranol/doxorubicin nanocomposite mitigates acute oxidative stress and modulates apoptosis in myocardial tissue. *Nanotechnology*, 27(48), 485101.
- Semenov, K. N., Charykov, N. A., & Keskinov, V. N. (2011). Fulleranol synthesis and identification. properties of the fulleranol water solutions. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 56(2), 230–239. <https://doi.org/10.1021/je100755v>
- Semenov, K. N., Charykov, N. A., Postnov, V. N., Sharoyko, V. V., Vorotyntsev, I. V., Galagudza, M. M., & Murin, I. V. (2016). Fullerenols: Physicochemical properties and applications. *Progress in Solid State Chemistry*, 44(2), 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2016.04.002>
- Semenov, K. N., Letenko, D. G., Charykov, N. A., Nikitin, V. A., Matuzenko, M. Y., Keskinov, V. A., Kopyrin, A. A. (2010). Synthesis and identification of fulleranol prepared by the direct oxidation route. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 83(12), 2076–2080. <https://doi.org/10.1134/S1070427210120025>
- Semenov, K. N., Letenko, D. G., Charykov, N. , Nikitin, V. , Matuzenko, M. Y., Keskinov, V. , Kopyrin, A. (2011). Synthesis and identification of fulleranol prepared by the direct oxidation route. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 83(12), 2076–2080. <https://doi.org/10.1134/S1070427210120025>
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell*, 88(5), 593–602. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81902-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81902-9)
- Seymour, L. W., Ferry, D. R., Anderson, D., Hesselwood, S., Julyan, P. J., Poyner, R., Kerr, D. J. (2002). Hepatic drug targeting: Phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin. *Journal of Clinical Oncology*, 20(6), 1668–1676. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.6.1668>
- Shivakumar, D., Williams, J., Wu, Y., Damm, W., Shelley, J., & Sherman, W. (2010). Prediction of Absolute Solvation Free Energies using Molecular Dynamics Free Energy Perturbation and the OPLS Force Field. *J Chem Theory Comput*, 6(5), 1509–1519. <https://doi.org/10.1021/ct900587b>
- Silion, M., Dascalu, A., Pinteala, M., Simionescu, B. C., & Ungurenasu, C. (2013). A study on electrospray mass spectrometry of fulleranol C₆₀(OH)₂₄. *Beilstein journal of organic chemistry*, 9, 1285–95. <https://doi.org/10.3762/bjoc.9.145>
- Šimůnek, T., Štěrba, M., Popelová, O., Adamcová, M., Hrdina, R., & Gerši, V. (2009). Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *U Pharmacological Reports (Sv. 61, str. 154–171)*. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70018-0](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70018-0)
- Singal, P. K., Li, T., Kumar, D., Danelisen, I., & Iliskovic, N. (2000). Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Molecular and cellular biochemistry*, 207(1–2), 77–86. <https://doi.org/10.1023/A:1007094214460>
- Singh, R., & Goswami, T. (2007). Highly luminescent multifunctional hemi-ortho ester derivatives of fulleranol. *Synthetic Metals*, 157(22–23), 951–955. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2007.09.006>
- Sipes, N. S., Padilla, S., & Knudsen, T. B. (2011). Zebrafish: as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews*, 93(3), 256–67. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20214>
- Skamrova, G. B., Laponogov, I., Buchelnikov, A. S., Shckorbatov, Y. G., Prylutska, S. V., Ritter, U., Evstigneev, M. P. (2014). Interceptor effect of c60 fullerene on the in vitro action of aromatic drug molecules. *European Biophysics Journal*, 43(6–7), 265–276. <https://doi.org/10.1007/s00249-014-0960-2>
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107–1112.
- Slavic, M., Djordjevic, A., Radojicic, R., Milovanovic, S., Orescanin-Dusic, Z., Rakocevic, Z., Blagojevic, D. (2013). Fulleranol C₆₀(OH)₂₄ nanoparticles decrease relaxing effects of dimethyl sulfoxide on rat uterus spontaneous contraction. *Journal of Nanoparticle Research*, 15(5). <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1650-1>
- Srdjenovic, B., Milic-Torres, V., Grujic, N., Stankov, K., Djordjevic, A., & Vasovic, V. (2010). Antioxidant

- properties of fullereneol C60(OH)24 in rat kidneys, testes, and lungs treated with doxorubicin. *Toxicology mechanisms and methods*, 20(6), 298–305. <https://doi.org/10.3109/15376516.2010.485622>
- Stewart, S., Jablonowski, H., Goebel, F. D., Arasteh, K., Spittle, M., Rios, A., Dezube, B. J. (1998). Randomized comparative trial of pegylated liposomal doxorubicin versus bleomycin and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. International Pegylated Liposomal Doxorubicin Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, 16(2), 683–691. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.2.683>
- Strekal, N., German, A., Gachko, G., Maskevich, A., & Maskevich, S. (2001). The study of the doxorubicin adsorbed onto chemically modified silver films by surface-enhanced spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 563–564, 183–191. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(01\)00512-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(01)00512-9)
- Strieth, S., Eichhorn, M. E., Sauer, B., Schulze, B., Teifel, M., Michaelis, U., & Dellian, M. (2004). Neovascular targeting chemotherapy: Encapsulation of paclitaxel in cationic liposomes impairs functional tumor microvasculature. *International Journal of Cancer*, 110(1), 117–124. <https://doi.org/10.1002/ijc.20083>
- Su, Y., Xu, J. ying, Shen, P., Li, J., Wang, L., Li, Q., Huang, Q. (2010). Cellular uptake and cytotoxic evaluation of fullereneol in different cell lines. *Toxicology*, 269(2–3), 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.11.015>
- Sutton, D., Nasongkla, N., Blanco, E., & Gao, J. (2007). Functionalized micellar systems for cancer targeted drug delivery. *Pharmaceutical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9223-y>
- Swartz, M. A. (2001). The physiology of the lymphatic system. *Advanced Drug Delivery Reviews*. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00150-8)
- Swenson, C. E., Haemmerich, D., Maul, D. H., Knox, B., Ehrhart, N., & Reed, R. A. (2015). Increased duration of heating boosts local drug deposition during radiofrequency ablation in combination with thermally sensitive liposomes (ThermoDox) in a porcine model. *PLoS ONE*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139752>
- Szafranec, E., Majzner, K., Farhane, Z., Byrne, H. J., Lukawska, M., Oszczapowicz, I., Baranska, M. (2016). Spectroscopic studies of anthracyclines: Structural characterization and in vitro tracking. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 169, 152–160.
- Szebeni, J., & Barenholz, Y. C. (2012). Complement activation, immunogenicity, and immune suppression as potential side effects of liposomes. *Harnessing biomaterials for Nanomedicine: Preparation, toxicity and applications*, 309–333. <https://doi.org/10.4032/9789814364270>
- Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>
- Takaya, Y., Michihata, M., Hayashi, T., Murai, R., & Kano, K. (2013). Surface analysis of the chemical polishing process using a fullereneol slurry by Raman spectroscopy under surface plasmon excitation. *CIRP Annals - Manufacturing Technology*, 62(1), 571–574. <https://doi.org/10.1016/j.cirp.2013.03.019>
- Tarasenko, N., Cutts, S. M., Phillips, D. R., Berkovitch-Luria, G., Bardugo-Nissim, E., Weitman, M., Rephaeli, A. (2014). A novel valproic acid prodrug as an anticancer agent that enhances doxorubicin anticancer activity and protects normal cells against its toxicity in vitro and in vivo. *Biochemical Pharmacology*, 88(2), 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.023>
- Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L., Halligan, B. D., & Liu, L. F. (1984). Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science (New York, N.Y.)*, 226(4673), 466–8. <https://doi.org/10.1126/science.6093249>
- Thorn, Caroline; Oshiro, Connie; Marsh, Sharon; Hernandez-Boussard, Tina; McLeod, Howard; Klein, Teri; Altman, R. (2010). „Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects“. *Pharmacogenetics and genomics*, 53. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32833ffb56>
- Tishevskaya, N. V., Zakharov, Y. M., Golubotovskii, E. V., Kolesnikov, O. L., Trofimova, N. V., Arkhipenko, Y. V., & Sazontova, T. G. (2014). Effects of fullereneol C60(OH)24 on erythropoiesis in vitro. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 157(1), 49–51. <https://doi.org/10.1007/s10517-014-2489-x>
- Tokarska-Schlattner, M., Dolder, M., Gerber, I., Speer, O., Wallimann, T., & Schlattner, U. (2007). Reduced creatine-stimulated respiration in doxorubicin challenged mitochondria: Particular sensitivity of the heart. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767(11), 1276–1284. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.08.006>
- Torchilin, V. P. (2001). Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00299-1](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00299-1)
- Torchilin, V. P. (2002). PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(2), 235–252. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00019-4)
- Torres, V. M., Srdjenovic, B., Jacevic, V., Simic, V. D., Djordjevic, A., & Simplicio, A. L. (2010). Fullereneol C60(OH)24 prevents doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats. *Pharmacological Reports*, 62(4), 707–718. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70328-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70328-5)
- Traganos, F., Kapuscinski, J., & Darzynkiewicz, Z. (1991). Caffeine Modulates the Effects of DNA-

- intercalating Drugs in Vitro: A Flow Cytometric and Spectrophotometric Analysis of Caffeine Interaction with Novantrone, Doxorubicin, Ellipticine, and the Doxorubicin Analogue AD198. *Cancer Research*, 51(14), 3682–3689.
- Trajkovic, S., Dobric, S., Djordjevic, A., Dragojevic-Simic, V., & Milovanovic, Z. (2005). Radioprotective efficiency of fullereneol in irradiated mice. *Current Research in Advanced Materials and Processes*, 494, 549–554. <https://doi.org/10.4028/0-87849-971-7.549>
- Trajković, S., Dobrić, S., Jačević, V., Dragojević-Simić, V., Milovanović, Z., & Dordević, A. (2007). Tissue-protective effects of fullereneol C60(OH)24 and amifostine in irradiated rats. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58(1), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.01.005>
- Trent, A., Marullo, R., Lin, B., Black, M., & Tirrell, M. (2011). Structural properties of soluble peptide amphiphile micelles. *Soft Matter*, 7(20), 9572. <https://doi.org/10.1039/c1sm05862b>
- Tung, V. C., Huang, J. H., Tevis, I., Kim, F., Kim, J., Chu, C. W., Huang, J. (2011). Surfactant-free water-processable photoconductive all-carbon composite. *Journal of the American Chemical Society*, 133(13), 4940–4947. <https://doi.org/10.1021/ja1103734>
- Ueno, H., Yamakura, S., Arastoo, R. S., Oshima, T., & Kokubo, K. (2014). Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullereneols using β -Carotene bleaching assay. *Journal of Nanomaterials*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/802596>
- Unezaki, S., Maruyama, K., Hosoda, J.-I., Nagae, I., Koyanagi, Y., Nakata, M., Tsuchiya, S. (1996). Direct measurement of the extravasation of polyethyleneglycol-coated liposomes into solid tumor tissue by in vivo fluorescence microscopy. *International Journal of Pharmaceutics*, 144(1), 11–17. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(96\)04674-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04674-1)
- Upadhyay, K. K., Bhatt, A. N., Mishra, A. K., Dwarakanath, B. S., Jain, S., Schatz, C., Jain, A. K. (2010). The intracellular drug delivery and anti tumor activity of doxorubicin loaded poly (γ -benzyl l-glutamate)-b-hyaluronan polymersomes. *Biomaterials*, 31(10), 2882–2892.
- Usenko, C. Y., Harper, S. L., & Tanguay, R. L. (2007). In vivo evaluation of carbon fullerene toxicity using embryonic zebrafish. *Carbon*, 45(9), 1891–1898.
- Valentin-Severin, I., Laignelet, L., Lhuguenot, J. C., & Chagnon, M. C. (2002). Uridine uptake inhibition assay: An automated micromethod for the screening of cytotoxicity. *Toxicology*, 171(2–3), 207–213. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00587-X](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00587-X)
- Van Gunsteren, W. F., & Hermans, J. (1999). Herman berendsen: Researcher, teacher, scholar, colleague, skipper. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 36(4), 381–382. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19990901\)36:4<381::AID-PROT1>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19990901)36:4<381::AID-PROT1>3.0.CO;2-U)
- Vasey, P. A., Kaye, S. B., Morrison, R., Twelves, C., Wilson, P., Duncan, R., Cassidy, J. (1999). Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents-drug-polymer conjugates. Cancer Research Campaign Phase I/III Committee. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 5(1), 83–94. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-1441>
- Vajdle, O., Zbiljić, J., Tasić, B., Jović, D., Guzsvány, V., & Djordjevic, A. (2014). Voltammetric behavior of doxorubicin at a renewable silver-amalgam film electrode and its determination in human urine. *Electrochimica Acta*, 132, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2014.03.124>
- Vaz, R. V., Gomes, J. R. B., & Silva, C. M. (2016). Molecular dynamics simulation of diffusion coefficients and structural properties of ketones in supercritical CO₂ at infinite dilution. *Journal of Supercritical Fluids*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.07.025>
- Venkatesan, N., Punithavathi, D., & Arumugam, V. (2000). Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. *British Journal of Pharmacology*, 129, 231–234. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703067>
- Veronese, F. M., Schiavon, O., Pasut, G., Mendichi, R., Andersson, L., Tsirk, A., Duncan, R. (2005). PEG-doxorubicin conjugates: Influence of polymer structure on drug release, in vitro cytotoxicity, biodistribution, and antitumor activity. *Bioconjugate Chemistry*, 16(4), 775–784. <https://doi.org/10.1021/bc040241m>
- Vertegel, A. A., Siegel, R. W., & Dordick, J. S. (2004). Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. *Langmuir*, 20(16), 6800–6807. <https://doi.org/10.1021/la0497200>
- Vileno, B., Marcoux, P. R., Lekka, M., Sienkiewicz, A., Fehér, T., & Forró, L. (2006). Spectroscopic and photophysical properties of a highly derivatized C 60 fullerol. *Advanced Functional Materials*, 16(1), 120–128. <https://doi.org/10.1002/adfm.200500425>
- von Holst, H., Knochenhauer, E., Blomgren, H., Collins, V. P., Ehn, L., Lindquist, M., Peterson, C. (1990). Uptake of Adriamycin in tumour and surrounding brain tissue in patients with malignant gliomas. *Acta Neurochirurgica*, 104(1–2), 13–16. <https://doi.org/10.1007/BF01842886>
- Vraneš, M., Armaković, S., Tot, A., Papović, S., Zec, N., Armaković, S., Gadžurić, S. (2016). Structuring of water in the new generation ionic liquid - Comparative experimental and theoretical study. *Journal of*

- Chemical Thermodynamics*, 93. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2015.10.001>
- Vranes, M., Borisev, I., Tot, A., Armakovic, S., Armakovic, S., Jovic, D., Djordjevic, A. (2017). Self-assembling, reactivity and molecular dynamics of fullerene nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 19(1), 135–144. <https://doi.org/10.1039/C6CP06847B>
- Vraneš, M., Tot, A., Papović, S., Zec, N., Dožić, S., & Gadžurić, S. (2015). Ideal and non-ideal behaviour of {1-butyl-1-methylpyrrolydinium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide + γ -butyrolactone} binary mixtures. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 81, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2014.10.002>
- Wang, A. Z., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2012). Nanoparticle delivery of cancer drugs. *Annu. Rev. Med.*, 63, 185–198. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-040210-162544>
- Wang, F. F., Li, N., Tian, D., Xia, G. F., & Xiao, N. (2010). Efficient synthesis of fullerene in anion form for the preparation of electrodeposited films. *ACS Nano*, 4(10), 5565–5572. <https://doi.org/10.1021/nn100485g>
- Wang, F. F., Wang, C., Liu, R. Q., Tian, D., & Li, N. (2012). Experimental study on the preparation of Ag nanoparticle doped fullerene for lithium ion battery application. *Journal of Physical Chemistry C*, 116(19), 10461–10467. <https://doi.org/10.1021/jp210972s>
- Wang, S., He, P., Zhang, J., Jiang, H., & Zhu, S. (2005). Novel and Efficient Synthesis of Water Soluble [60]Fullerene by Solvent Free Reaction. *Synthetic Communications*, 35(13), 1803–1808. <https://doi.org/10.1081/SCC-200063958>
- Wang, Z., Lu, Z., Zhao, Y., & Gao, X. (2015). Oxidation-induced water-solubilization and chemical functionalization of fullerenes C₆₀{,} Gd@C₆₀ and Gd@C₈₂: atomistic insights into the formation mechanisms and structures of fullerenols synthesized by different methods. *Nanoscale*, 7(7), 2914–2925. <https://doi.org/10.1039/C4NR06633B>
- Wang, Z., Wang, S., Lu, Z., & Gao, X. (2015). Syntheses, Structures and Antioxidant Activities of Fullerenols: Knowledge Learned at the Atomistic Level. *Journal of Cluster Science*. <https://doi.org/10.1007/s10876-015-0855-0>
- Weiss, R. B. (1992). The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Seminars in oncology*, 19(6), 670–686. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:009377549290036Z>
- Whitehead, K. A., Langer, R., & Anderson, D. G. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(2), 129–138. <https://doi.org/10.1038/nrd2742>
- Wick, P., Manser, P., Limbach, L. K., Dettlaff-Weglikowska, U., Krumeich, F., Roth, S., Bruinink, A. (2007). The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicology Letters*, 168(2), 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.08.019>
- Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., & Huwyler, J. (2015). Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.030>
- Wilczewska, A., Niemirowicz, K., Markiewicz, K., & Car, H. (2012). [Review] Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 64(5), 1864–1882. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70901-5)
- Wisher, D. (2012). Martindale: The Complete Drug Reference. 37th ed. *Journal of the Medical Library Association : JMLA*, 100(1), 75–76. <https://doi.org/10.3163/1536-5050.100.1.018>
- Wong, C., Stylianopoulos, T., Cui, J., Martin, J., Chauhan, V. P., Jiang, W., Fukumura, D. (2011). Multistage nanoparticle delivery system for deep penetration into tumor tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2426–2431. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018382108>
- Woźniwodzka, A., Gołński, G., Wyrzykowski, D., Kaźmierkiewicz, R., & Piosik, J. (2013). Caffeine and other methylxanthines as interceptors of food-borne aromatic mutagens: Inhibition of Trp-P-1 and Trp-P-2 mutagenic activity. *Chemical Research in Toxicology*, 26(11), 1660–1673. <https://doi.org/10.1021/tx4002513>
- Xiang, K., Dou, Z., Li, Y., Xu, Y., Zhu, J., Yang, S., Liu, Y. (2012). Cytotoxicity and TNF- α secretion in RAW264.7 macrophages exposed to different fullerene derivatives. *J Nanosci Nanotechnol*, 12(3), 2169–2178. <https://doi.org/10.1166/jnn.2011.5681>
- Xie, R., Wang, Z., Yu, H., Fan, Z., Yuan, F., Li, Y., Fan, H. (2016). Highly Water-soluble and Surface Charge-tunable Fluorescent Fullerene Nanoparticles: Facile Fabrication and Cellular Imaging. *Electrochimica Acta*, 201, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.03.198>
- Xing, G., Zhang, J., Zhao, Y., Tang, J., Zhang, B., Gao, X., Su, R. (2004). Influences of Structural Properties on Stability of Fullerenols.pdf, (c), 11473–11479.
- Xu, J. Y., Kaiyu, H., Li, S. X., Cheng, J. S., Xu, G. T., Lib, W. X., & Li, Q. N. (2009). Pulmonary responses to polyhydroxylated fullerenols, C₆₀(OH)_x. *Journal of Applied Toxicology*, 29(7), 578–584. <https://doi.org/10.1002/jat.1442>
- Xu, J. Y., Su, Y. Y., Cheng, J. S., Li, S. X., Liu, R., Li, W. X., Li, Q. N. (2010). Protective effects of fullerene on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Carbon*, 48(5), 1388–1396. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.12.029>

- Yang, X., Zhang, X., Liu, Z., Ma, Y., Huang, Y., & Chen, Y. (2008). High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide. *Journal of Physical Chemistry C*, 112(45), 17554–17558. <https://doi.org/10.1021/jp806751k>
- Ye, S., Chen, M., Jiang, Y., Chen, M., Zhou, T., Wang, Y., Ren, L. (2014). Polyhydroxylated fullerene attenuates oxidative stress-induced apoptosis via a fortifying Nrf2-regulated cellular antioxidant defence system. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 2073–2087. <https://doi.org/10.2147/IJN.S56973>
- Yeh, Y. C., Lai, H. C., Ting, C. T., Lee, W. L., Wang, L. C., Wang, K. Y., Liu, T. J. (2007). Protection by doxycycline against doxorubicin-induced oxidative stress and apoptosis in mouse testes. *Biochemical Pharmacology*, 74(7), 969–980. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.031>
- Yen, H.-J., Hsu, S., & Tsai, C.-L. (2009). Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes. *Small*, 5(13), 1553–1561. <https://doi.org/10.1002/sml.200900126>
- Yi, L. L., Kerrigan, J. E., Lin, C. P., Azarova, A. M., Tsai, Y. C., Ban, Y., & Liu, L. F. (2007). Topoisomerase II β -mediated DNA double-strand breaks: Implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Research*, 67(18), 8839–8846. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1649>
- Yokoyama, M. (2005). Drug targeting with nano-sized carrier systems. *Journal of Artificial Organs*, 8(2), 77–84. <https://doi.org/10.1007/s10047-005-0285-0>
- Yousefpoor, P., Atyabi, F., Vasheghani-Farahani, E., Movahedi, A. A., & Dinarvand, R. (2011). Targeted delivery of doxorubicin-utilizing chitosan nanoparticles surface-functionalized with anti-Her2 trastuzumab. *Int J Nanomedicine*, 6, 1977-1990. doi:10.2147/ijn.s21523
- Yuan, F., Dellian, M., Fukumura, D., Leunig, M., Berk, D. A., Jain, R. K., & Torchilin, V. P. (1995). Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence and Cutoff Size. *Cancer Research*, 55(17), 3752–3756. <https://doi.org/10.1038/nature02924>
- Yu, P., Yu, H., Guo, C., Cui, Z., Chen, X., Yin, Q., Li, Y. (2015). Reversal of doxorubicin resistance in breast cancer by mitochondria-targeted pH-responsive micelles. *Acta Biomater*, 14, 115-124. doi:10.1016/j.actbio.2014.12.001
- Zhang, G., Liu, Y., Liang, D., Gan, L., & Li, Y. (2010). Facile synthesis of isomerically pure fullereneols and formation of spherical aggregates from C60(OH)8. *Angewandte Chemie - International Edition*, 49(31), 5293–5295. <https://doi.org/10.1002/anie.201001280>
- Zhang, J.-M., Yang, W., He, P., & Zhu, S.-Z. (2004). Efficient and convenient preparation of water-soluble fullereneol. *Chinese Journal of Chemistry*, 22(9 SPEC.ISS.), 1008–1011. <https://doi.org/10.1002/cjoc.20040220926>
- Zhang, L., Chan, J. M., Gu, F. X., Rhee, J., Wang, A. Z., Radovic-moreno, A. F., Farokhzad, O. C. (2008). Self-Assembled Lipid Polymer Hybrid Nanoparticles: A Robust Drug Delivery Platform. *ACS nano*, 2(8), 1696–1702. <https://doi.org/10.1021/nn800275r>
- Zhang, P., Pan, H., Liu, D., Guo, Z.-X., Zhang, F., & Zhu, D. (2003). Effective Mechanochemical Synthesis of [60]Fullerols. *Synthetic Communications*, 33(14), 2469–2474. <https://doi.org/10.1081/SCC-120021836>
- Zhang, Z., Sun, Q., Zhong, J., Yang, Q., Li, H., Cheng, D., Shuai, X. (2014). Magnetic resonance imaging-visible and pH-sensitive polymeric micelles for tumor targeted drug delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10(2), 216–226. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1729>
- Zhao, B., Bilski, P. J., He, Y. Y., Feng, L., & Chignell, C. F. (2008). Photo-induced reactive oxygen species generation by different water-soluble fullerenes (C60) and their cytotoxicity in human keratinocytes. *Photochemistry and Photobiology*, 84(5), 1215–1223. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00333.x>
- Zhao, B., He, Y. Y., Chignell, C. F., Yin, J. J., Andley, U., & Roberts, J. E. (2009). Difference in phototoxicity of cyclodextrin complexed fullerene [(γ -CyD)2/C60] and its aggregated derivatives toward human lens epithelial cells. *Chemical Research in Toxicology*, 22(4), 660–667. <https://doi.org/10.1021/tx800478u>
- Zhao, H. (2006). Are ionic liquids kosmotropic or chaotropic? An evaluation of available thermodynamic parameters for quantifying the ion kosmotropicity of ionic liquids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/jctb.1449>
- Zhao, Q., Li, Y., Xu, J., Liu, R., & Li, W. (2005). Radioprotection by fullereneols of *Stylynychia mytilus* exposed to γ -rays. *International Journal of Radiation Biology*, 81(2), 169–175. <https://doi.org/10.1080/09553000400029536>
- Zou, A., Huo, M., Zhang, Y., Zhou, J., Yin, X., Yao, C., Zhang, Q. (2012). Octreotide-modified N-octyl-O, N-carboxymethyl chitosan micelles as potential carriers for targeted antitumor drug delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 101(2), 627–640.

Prilog

Tabela P1. Gustina (d), prividna molarna zapremina (V_Φ), i parcijalna molarna zapremina (V_i) sistema {fulerenol (2) + voda (1)} na različitim temperaturama i molalitetima fulerenola (m) pri pritisku $p = 0,1$ MPa. Preuzeto uz izmene iz: (Vranes i dr., 2017)

m [mol/kg]	d [g/cm ³]	V_1 [cm ³ /mol]	V_2 [cm ³ /mol]	V_Φ [cm ³ /mol]
$T = 293,15$ K				
0,00000 ^a	0,99821			
0,00088	0,99868	18,032	592,36	596,35
0,00283	0,99974	18,033	578,25	585,73
0,00363	1,00018	18,033	574,64	583,11
0,00447	1,00065	18,033	569,85	579,21
0,00692	1,00201	18,034	562,71	574,21
0,00897	1,00317	18,035	556,13	568,94
0,01065	1,00411	18,036	553,24	566,88
0,01311	1,00552	18,037	546,89	561,91
$T = 295,15$ K				
0,00000 ^a	0,99777			
0,00088	0,99823	18,040	597,38	601,83
0,00283	0,99929	18,041	580,60	589,08
0,00363	0,99973	18,041	576,05	585,65
0,00447	1,00019	18,041	572,82	583,49
0,00692	1,00155	18,042	563,72	576,89
0,00897	1,00270	18,043	557,32	572,09
0,01065	1,00365	18,044	552,76	568,66
0,01311	1,00507	18,046	545,03	562,45
$T = 298,15$ K				
0,00000 ^a	0,99705			
0,00088	0,99751	18,053	602,36	607,20
0,00283	0,99856	18,054	582,84	592,28
0,00363	0,99899	18,054	580,09	590,85
0,00447	0,99946	18,054	573,41	585,39
0,00692	1,00082	18,056	563,09	577,94
0,00897	1,00196	18,057	557,18	573,95
0,01065	1,00291	18,058	552,05	569,89
0,01311	1,00433	18,059	543,67	563,60
$T = 303,15$ K				
0,00000 ^a	0,99565			
0,00088	0,99609	18,079	622,38	629,45
0,00283	0,99711	18,080	595,55	609,50

0,00363	0,99754	18,080	588,19	604,11
0,00447	0,99799	18,080	582,76	600,56
0,00692	0,99933	18,082	568,16	590,39
0,00897	1,00048	18,084	557,00	582,26
0,01065	1,00143	18,085	549,61	577,02
0,01311	1,00285	18,087	538,69	569,00
$T = 309,15 \text{ K}$				
0,00000 ^a	0,99369			
0,00088	0,99409	18,115	661,17	674,91
0,00283	0,99504	18,116	622,13	648,24
0,00363	0,99545	18,117	609,94	639,73
0,00447	0,99590	18,117	596,08	629,30
0,00692	0,99723	18,120	568,51	610,05
0,00897	0,99838	18,123	549,84	597,17
0,01065	0,99933	18,125	537,85	589,36
0,01311	1,00080	18,130	517,79	574,86
$T = 310,15 \text{ K}$				
0,00000 ^a	0,99333			
0,00088	0,99372	18,121	670,79	686,16
0,00283	0,99464	18,123	633,09	662,55
0,00363	0,99504	18,123	620,08	653,68
0,00447	0,99550	18,124	600,90	638,31
0,00692	0,99682	18,127	570,52	617,27
0,00897	0,99795	18,130	551,68	604,99
0,01065	0,99892	18,133	535,99	593,98
0,01311	1,00041	18,138	512,74	577,01
$T = 313,15 \text{ K}$				
0,00000 ^a	0,99222			
0,00088	0,99254	18,142	739,42	766,94
0,00283	0,99338	18,144	665,69	716,55
0,00363	0,99378	18,145	637,95	695,70
0,00447	0,99419	18,147	619,57	683,83
0,00692	0,99548	18,152	570,89	650,72
0,00897	0,99665	18,157	535,12	626,23
0,01065	0,99765	18,162	509,70	608,85
0,01311	0,99918	18,169	475,89	585,80

Tabela P2. Viskoznost (η) sistema {fulerenol+ voda} kao funkcija molalитета fulerenola (m) u temperaturnom opsegu (293,15 – 313,15) K i pritisku $p = 0,1$ MPa. Preuzeto uz izmene iz:

(Vranes i dr., 2017)

m [mol/kg]	T [K]					
	293,15	298,15	303,15	309,15	310,15	313,15
	η [mPa·s]					
0,00000 ^a	1,003	0,890	0,797	0,719	0,691	0,653
0,00450	1,236	1,112	1,057	0,974	0,970	0,960
0,00523	1,248	1,124	1,071	0,989	0,986	0,972
0,00680	1,269	1,144	1,090	1,010	1,006	0,990
0,01150	1,315	1,192	1,137	1,050	1,043	1,020
0,01450	1,332	1,205	1,165	1,073	1,066	1,033
0,01724	1,347	1,222	1,180	1,091	1,081	1,044
0,02500	1,373	1,256	1,214	1,130	1,113	1,056
0,03724	1,404	1,301	1,269	1,159	1,140	1,074

Tabela P3. Električna provodljivost sistema {fulerenol + voda} kao funkcija molalитета fulerenola u temperaturnom opsegu (293,15 - 313,15) K i pritisku $p = 0,1$ MPa. Preuzeto uz

izmene iz: (Vranes i dr., 2017)

m [mol/kg]	T [K]					
	293,15	298,15	303,15	309,15	310,15	313,15
	κ [mS/cm]					
0,00098	0,046	0,054	0,060	0,070	0,077	0,082
0,00150	0,068	0,079	0,089	0,104	0,113	0,121
0,00295	0,127	0,148	0,167	0,193	0,206	0,218
0,00537	0,215	0,252	0,284	0,328	0,345	0,357
0,01046	0,391	0,457	0,521	0,595	0,623	0,649
0,01927	0,682	0,784	0,890	1,021	1,060	1,117
0,02645	0,896	1,030	1,162	1,326	1,382	1,453
0,03431	1,107	1,268	1,434	1,609	1,684	1,805
0,04122	1,291	1,469	1,660	1,855	1,950	2,103
0,04894	1,507	1,698	1,918	2,131	2,223	2,423

Tabela P4. Parametri Mejsonove jednačine za sistem {fulerenol + voda} u temperaturnom opsegu (293,15 - 313,15) K sa prikazanom devijacijom (σ) i regresionim koeficijentom (R^2).

Preuzeto uz izmene iz: (Vranes i dr., 2017)

T [K]	V_{ϕ}^0 [cm ³ /mol]	S_v [√cm ⁹ /mol ³]	R^2
293,15	607,31	-401,07	0,9993
295,15	613,73	-446,79	0,9991
298,15	620,33	-499,82	0,9992
303,15	647,76	-696,28	0,9994
309,15	710,38	-1104,42	0,9991
310,15	728,92	-1324,20	0,9992
313,15	828,41	-2148,10	0,9989

Tabela P5. Parametri fitovanja Džons-Dolove jednačine za viskoznost sistema {fulerenol+ voda} pri temperaturama (293,15 - 313,15) K sa predstavljenim devijacijama (σ) i regresionim koeficijentom (R^2). Preuzeto uz izmene iz: (Vranes i dr., 2017)

T [K]	A [√dm ³ /mol]	B [dm ³ /mol ⁻¹]	R^2
293,15	4,166	-11,36	0,9991
298,15	4,414	-11,60	0,9993
303,15	6,085	-19,05	0,9989
309,15	7,240	-23,51	0,9986
310,15	7,655	-24,90	0,9984
313,15	8,797	-29,80	0,9977

Tabela P6. Električna provodljivost binarnog sistema {fulerenol + voda} kao funkcija molalnosti fulerenola u temperaturnom opsegu (293,15 - 313,15) K i pritisku $p = 0,1$ MPa.

Preuzeto uz izmene iz: (Vranes i dr., 2017)

m [mol/kg]	T [K]					
	293,15	298,15	303,15	309,15	310,15	313,15
	κ [mS/cm]					
0,00098	0,046	0,054	0,060	0,070	0,077	0,082
0,00150	0,068	0,079	0,089	0,104	0,113	0,121
0,00295	0,127	0,148	0,167	0,193	0,206	0,218
0,00537	0,215	0,252	0,284	0,328	0,345	0,357
0,01046	0,391	0,457	0,521	0,595	0,623	0,649
0,01927	0,682	0,784	0,890	1,021	1,060	1,117
0,02645	0,896	1,030	1,162	1,326	1,382	1,453
0,03431	1,107	1,268	1,434	1,609	1,684	1,805
0,04122	1,291	1,469	1,660	1,855	1,950	2,103
0,04894	1,507	1,698	1,918	2,131	2,223	2,423

Tabela P7. Molarna provodljivost binarnog sistema {fulerenol + voda} kao funkcija molalnosti fulerenola u temperaturnom opsegu (293,15 - 313,15) K i pritisku $p = 0,1$ MPa.

Preuzeto uz izmene iz: (Vranes i dr., 2017)

m [mol/kg]	T [K]					
	293,15	298,15	303,15	309,15	310,15	313,15
	Λ [S·cm ² /mol]					
0,00000	54,08	62,82	70,62	82,27	92,36	101,41
0,00098	48,87	57,19	64,34	74,70	81,88	88,10
0,00150	47,30	54,98	62,02	72,06	78,62	84,09
0,00295	44,83	52,12	58,96	68,14	72,80	77,15
0,00537	41,60	48,89	55,21	63,83	67,15	69,51
0,01046	38,95	45,62	52,12	59,61	62,43	65,10
0,01927	37,12	42,71	48,57	55,83	57,95	61,20
0,02645	35,64	41,02	46,37	53,02	55,27	58,21
0,03431	34,10	39,12	44,29	49,80	52,15	55,98
0,04122	33,24	37,86	42,84	47,97	50,45	54,48
0,04894	32,80	37,00	41,88	46,62	48,64	53,09

^a vrednosti dobijene primenom jednačine $\Lambda = \kappa/c$

UPLC/TUV

Kvantifikacija DOX u nanokompozitu FNP/DOX u različitim vremenskim intervalima

Rezultati eksperimenta su na narednim stranicama priloženi po sledećem redosledu:

- Kalibraciona kriva za DOX ($\lambda = 215$ nm)
- Rezultati kvantifikacije DOX u vremenskim intervalima: 0h, 24h, 48h (215 nm)
- Kalibraciona kriva za DOX ($\lambda = 476$ nm)
- Rezultati kvantifikacije DOX u vremenskim intervalima: 0h, 24h, 48h (476 nm)

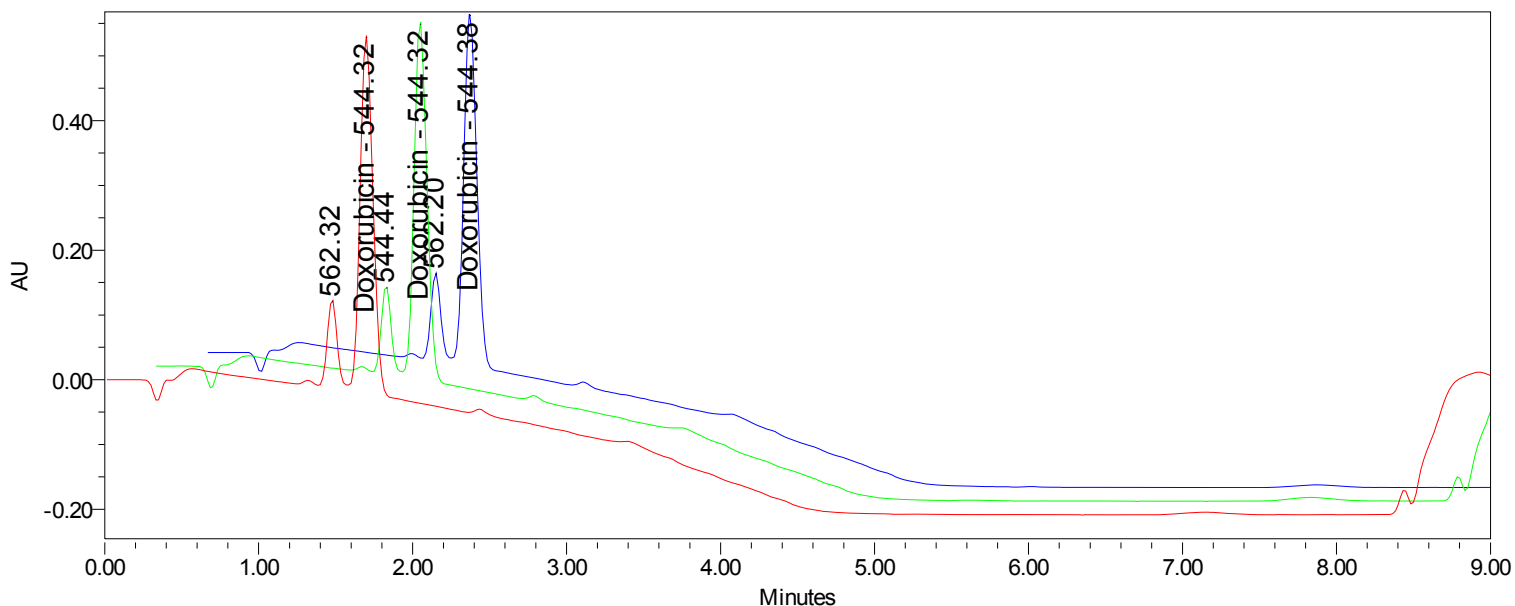
SAMPLE INFORMATION

Sample Name: Doxyrub 48, Doxyrub 24, Acquired By: System
 Sample Type: Unknown Sample Set Name: doxyrub QDA 24h sm, doxyrub
 Vial: 2:C,8, 2:C,7 Acq. Method Set: QDA doxorubicin Grad
 Injection #: 1, 2, 3 Processing Method: Doxorubicin
 Injection Volume: 1.00 ul Channel Name: ACQUITY TUV ChA
 Run Time: 9.0 Minutes Proc. Chnl. Descr.: ACQUITY TUV ChA 215nm

Date Acquired: 10/6/2014 4:05:34 PM CEST, 10/6/2014 4:15:31 PM CEST, 10/6/2014 4:25:28 PM
 Date Processed: 10/13/2014 12:33:27 PM CEST, 10/13/2014 12:33:28 PM CEST, 10/13/2014 12:33:29

Vreme 0h
Name: Doxorubicin

	Sample Name	Vial	Inj	Channel	Name	RT	Area	Height	Amount	Concentration	Units
1	Doxyrub 0	2:C,8	3	ACQUITY TUV ChA	Doxorubicin	1.699	3225645	548782	0.898	0.898	mg/mL
2	Doxyrub 0	2:C,8	1	ACQUITY TUV ChA	Doxorubicin	1.715	3229508	549468	0.899	0.899	mg/mL
3	Doxyrub 0	2:C,8	2	ACQUITY TUV ChA	Doxorubicin	1.703	3194549	544922	0.889	0.889	mg/mL
Mean						1.705	3216567.437	547724.058	0.90	0.90	
Std. Dev.						0.008	19165.950	2450.918	0.01	0.01	
% RSD						0.5	0.6	0.4	0.6	0.6	



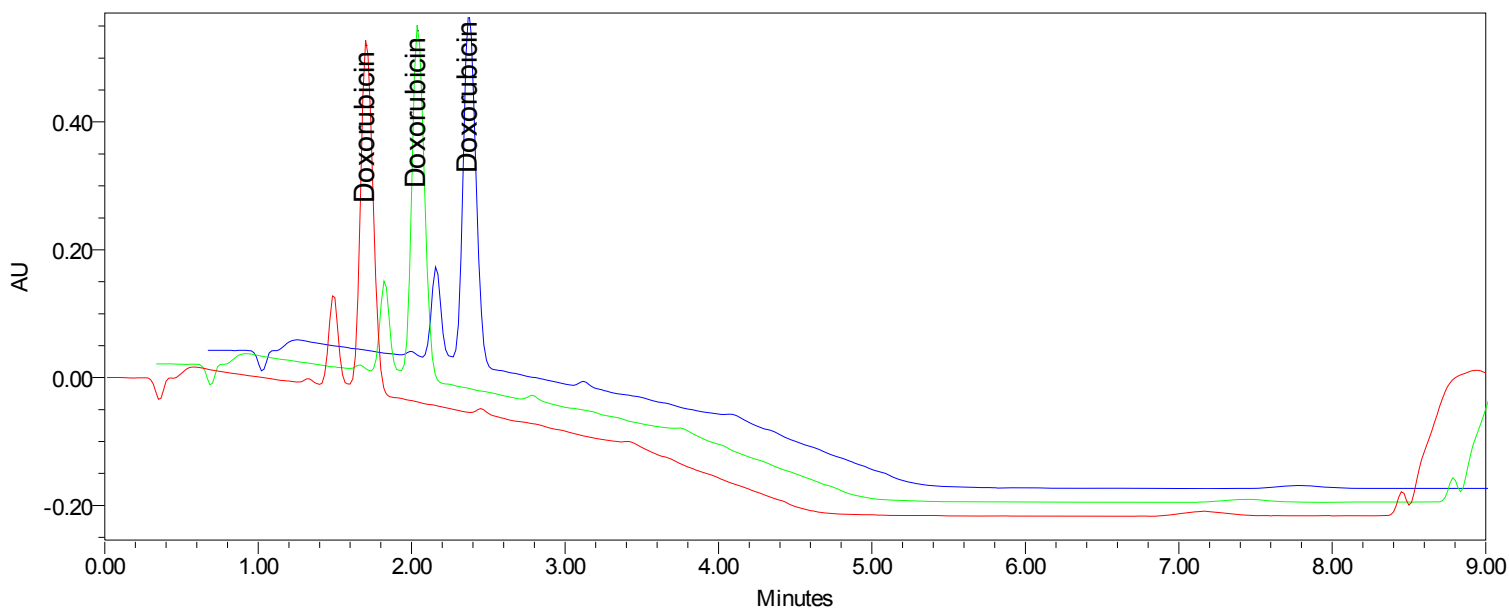
— SampleName: Doxyrub 0; Vial: 2:C,8; Injection: 3; Channel: ACQUITY TUV ChA; Date
 Acquired: 10/6/2014 4:25:28 PM CEST

— SampleName: Doxyrub 0; Vial: 2:C,8; Injection: 1; Channel: ACQUITY TUV ChA; Date
 Acquired: 10/6/2014 4:05:34 PM CEST

— SampleName: Doxyrub 0; Vial: 2:C,8; Injection: 2; Channel: ACQUITY TUV ChA; Date
 Acquired: 10/6/2014 4:15:31 PM CEST

Vreme 24h
Name: Doxorubicin

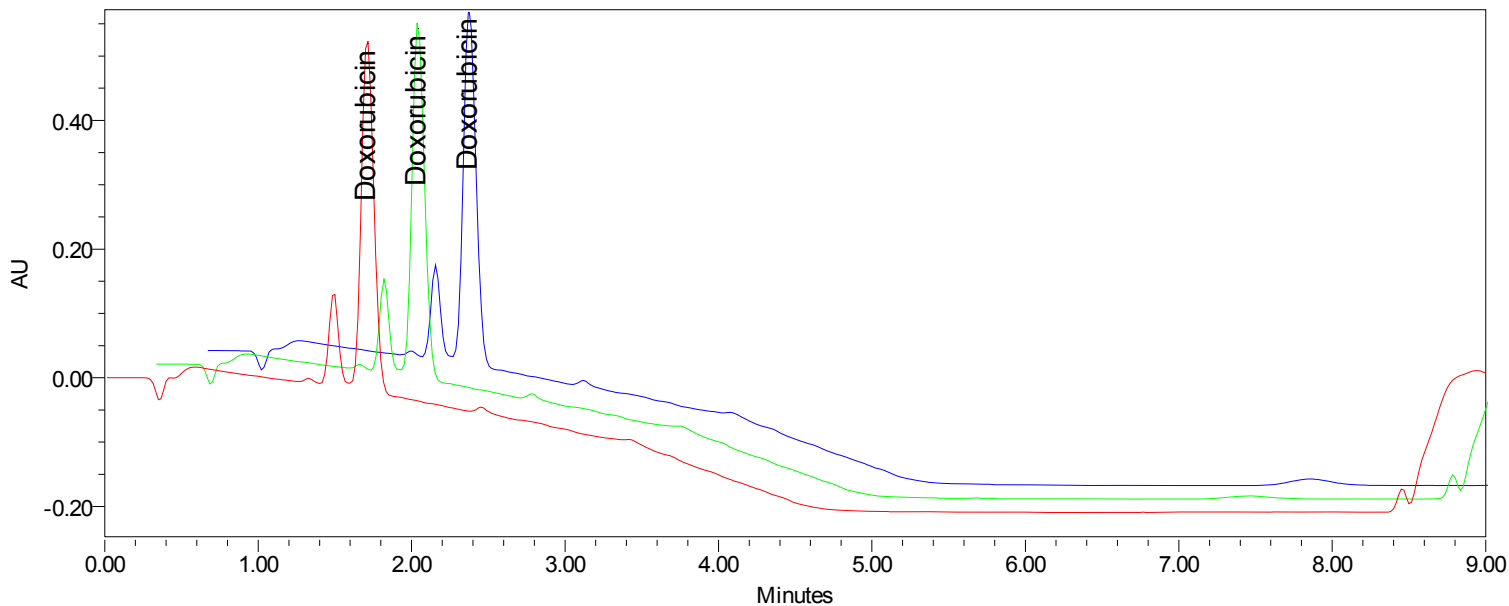
	Sample Name	Vial	Inj	Channel	Name	RT	Area	Height	Amount	Concentration	Units
1	Doxyrub 24	2:C,8	1	ACQUITY TUV ChA	Doxorubicin	1.706	3147056	550921	0.876	0.876	mg/mL
2	Doxyrub 24	2:C,8	2	ACQUITY TUV ChA	Doxorubicin	1.704	3151605	552769	0.877	0.877	mg/mL
3	Doxyrub 24	2:C,8	3	ACQUITY TUV ChA	Doxorubicin	1.705	3146871	551464	0.876	0.876	mg/mL
Mean						1.705	3148510.813	551717.934	0.88	0.88	
Std. Dev.						0.001	2681.397	949.814	0.00	0.00	
% RSD						0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	



— SampleName: Doxyrub 24; Vial: 2:C,8; Injection: 1; Channel: ACQUITY TUV ChA; Date
 Acquired: 10/7/2014 3:22:09 PM CEST
— SampleName: Doxyrub 24; Vial: 2:C,8; Injection: 3; Channel: ACQUITY TUV ChA; Date
 Acquired: 10/7/2014 3:42:03 PM CEST
— SampleName: Doxyrub 24; Vial: 2:C,8; Injection: 2; Channel: ACQUITY TUV ChA; Date
 Acquired: 10/7/2014 3:32:06 PM CEST

Vreme 48h
Name: Doxorubicin

	Sample Name	Vial	Inj	Channel	Name	RT	Area	Height	Amount	Concentration	Units
1	Doxyrub 48	2:C,7	1	ACQUITY TUV ChA	Doxorubicin	1.712	3127622	543907	0.870	0.870	mg/mL
2	Doxyrub 48	2:C,7	3	ACQUITY TUV ChA	Doxorubicin	1.705	3148201	550831	0.876	0.876	mg/mL
3	Doxyrub 48	2:C,7	2	ACQUITY TUV ChA	Doxorubicin	1.704	3166002	554309	0.881	0.881	mg/mL
Mean						1.707	3147274.662	549682.161	0.88	0.88	
Std. Dev.						0.004	19206.603	5295.337	0.01	0.01	
% RSD						0.2	0.6	1.0	0.6	0.6	



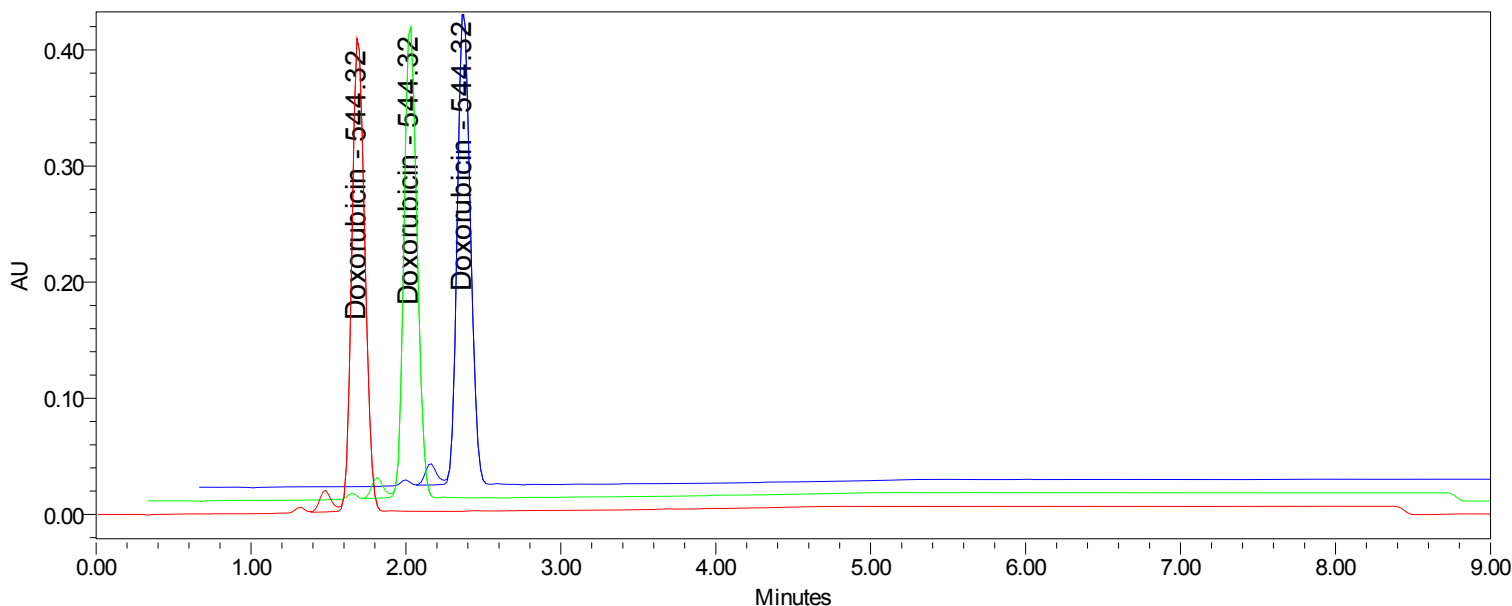
— SampleName: Doxyrub 48; Vial: 2:C,7; Injection: 1; Channel: ACQUITY TUV ChA; Date
 Acquired: 10/8/2014 4:03:50 PM CEST
— SampleName: Doxyrub 48; Vial: 2:C,7; Injection: 3; Channel: ACQUITY TUV ChA; Date
 Acquired: 10/8/2014 4:23:41 PM CEST
— SampleName: Doxyrub 48; Vial: 2:C,7; Injection: 2; Channel: ACQUITY TUV ChA; Date
 Acquired: 10/8/2014 4:13:46 PM CEST

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Doxyrub 48, Doxyrub 24,	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	doxyrub QDA 24h sm, doxyrub
Vial:	2:C,8, 2:C,7	Acq. Method Set:	QDA doxorubicin Grad
Injection #:	1, 2, 3	Processing Method:	Doxorubicin 476nm
Injection Volume:	1.00 ul	Channel Name:	ACQUITY TUV ChB
Run Time:	9.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	ACQUITY TUV ChB 476nm
Date Acquired:	10/6/2014 4:05:34 PM CEST, 10/6/2014 4:15:31 PM CEST, 10/6/2014 4:25:28 PM		
Date Processed:	10/13/2014 12:34:05 PM CEST, 10/13/2014 12:34:06 PM CEST, 10/13/2014 1:44:03		

**Vreme 0h
Name: Doxorubicin**

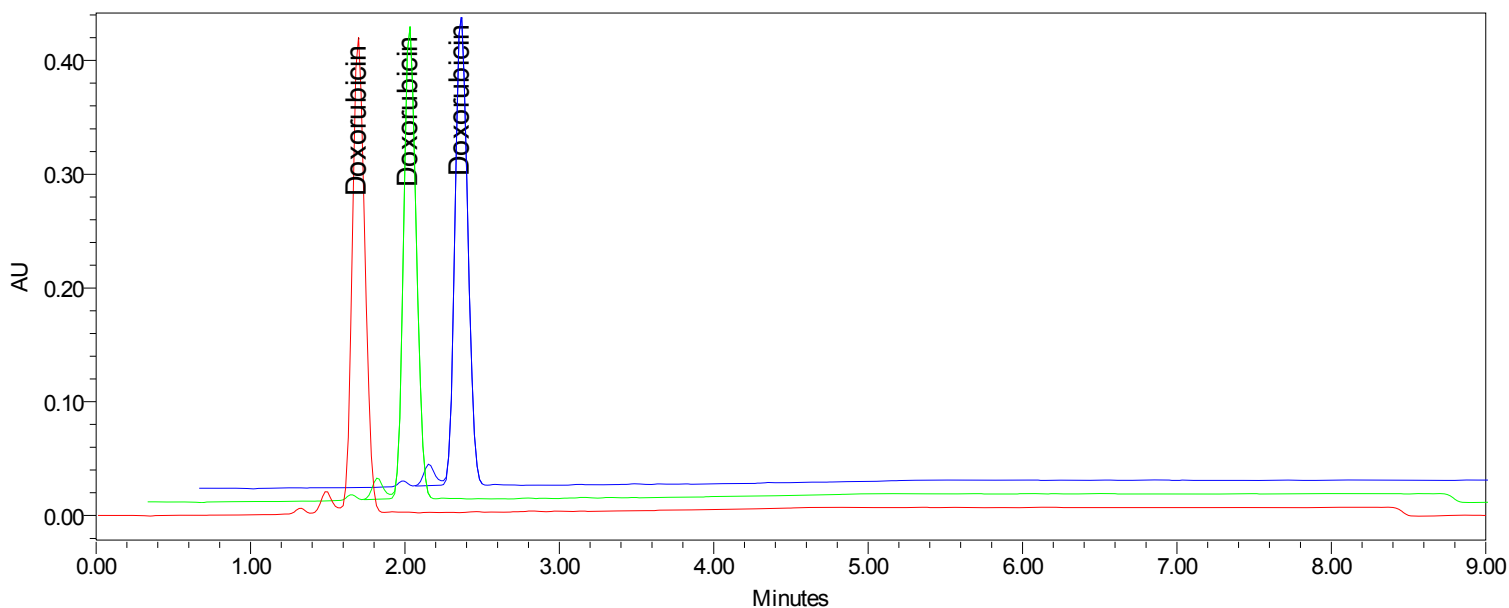
	Sample Name	Vial	Inj	Channel	Name	RT	Area	Height	Amount	Concentration	Units
1	Doxyrub 0	2:C,8	3	ACQUITY TUV ChB	Doxorubicin	1.690	2378806	408275	0.881	0.881	ug
2	Doxyrub 0	2:C,8	2	ACQUITY TUV ChB	Doxorubicin	1.695	2374263	404825	0.880	0.880	ug
3	Doxyrub 0	2:C,8	1	ACQUITY TUV ChB	Doxorubicin	1.706	2388729	409717	0.885	0.885	ug
Mean						1.697	2380599.158	407605.784	0.88	0.88	
Std. Dev.						0.008	7397.845	2514.130	0.00	0.00	
% RSD						0.5	0.3	0.6	0.3	0.3	



—	SampleName: Doxyrub 0; Vial: 2:C,8; Injection: 3; Channel: ACQUITY TUV ChB; Date
	Acquired: 10/6/2014 4:25:28 PM CEST
—	SampleName: Doxyrub 0; Vial: 2:C,8; Injection: 2; Channel: ACQUITY TUV ChB; Date
	Acquired: 10/6/2014 4:15:31 PM CEST
—	SampleName: Doxyrub 0; Vial: 2:C,8; Injection: 1; Channel: ACQUITY TUV ChB; Date
	Acquired: 10/6/2014 4:05:34 PM CEST

Vreme 24h
Name: Doxorubicin

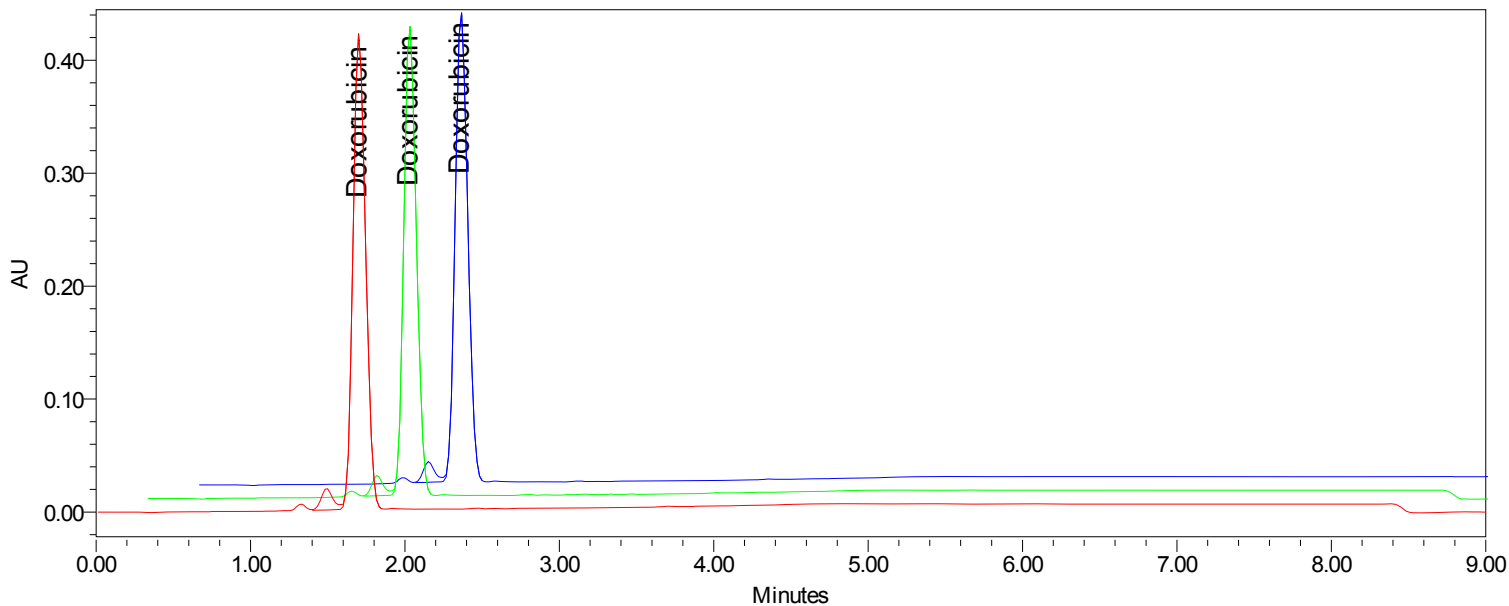
	Sample Name	Vial	Inj	Channel	Name	RT	Area	Height	Amount	Concentration	Units
1	Doxyrub 24	2:C,8	1	ACQUITY TUV ChB	Doxorubicin	1.699	2306117	410151	0.853	0.853	ug
2	Doxyrub 24	2:C,8	3	ACQUITY TUV ChB	Doxorubicin	1.698	2341023	411333	0.867	0.867	ug
3	Doxyrub 24	2:C,8	2	ACQUITY TUV ChB	Doxorubicin	1.697	2343315	410698	0.868	0.868	ug
Mean						1.698	2330151.872	410727.168	0.86	0.86	
Std. Dev.						0.001	20846.382	591.226	0.01	0.01	
% RSD						0.1	0.9	0.1	0.9	0.9	



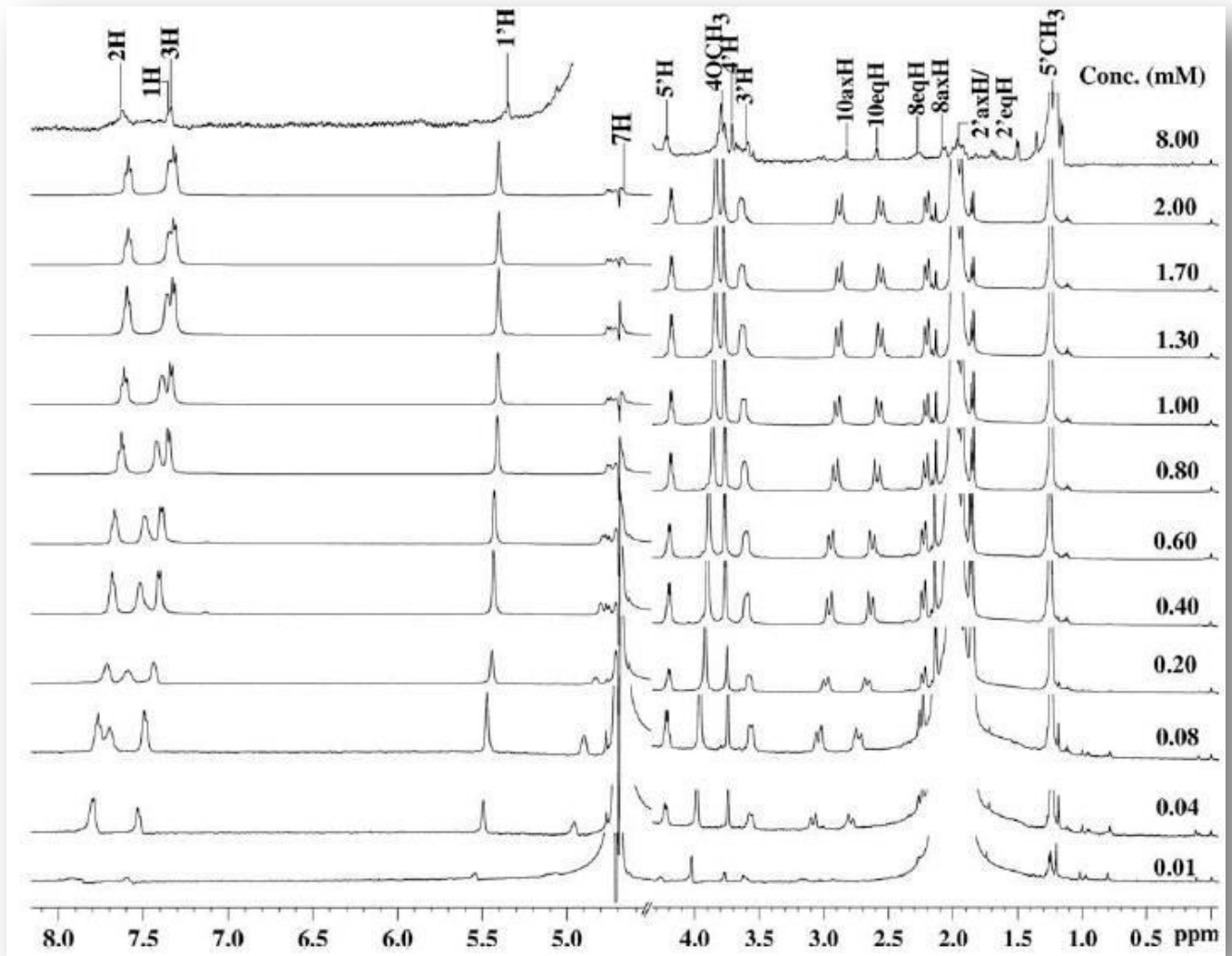
— SampleName: Doxyrub 24; Vial: 2:C,8; Injection: 1; Channel: ACQUITY TUV ChB; Date
 Acquired: 10/7/2014 3:22:09 PM CEST
— SampleName: Doxyrub 24; Vial: 2:C,8; Injection: 3; Channel: ACQUITY TUV ChB; Date
 Acquired: 10/7/2014 3:42:03 PM CEST
— SampleName: Doxyrub 24; Vial: 2:C,8; Injection: 2; Channel: ACQUITY TUV ChB; Date
 Acquired: 10/7/2014 3:32:06 PM CEST

Vreme 48h
Name: Doxorubicin

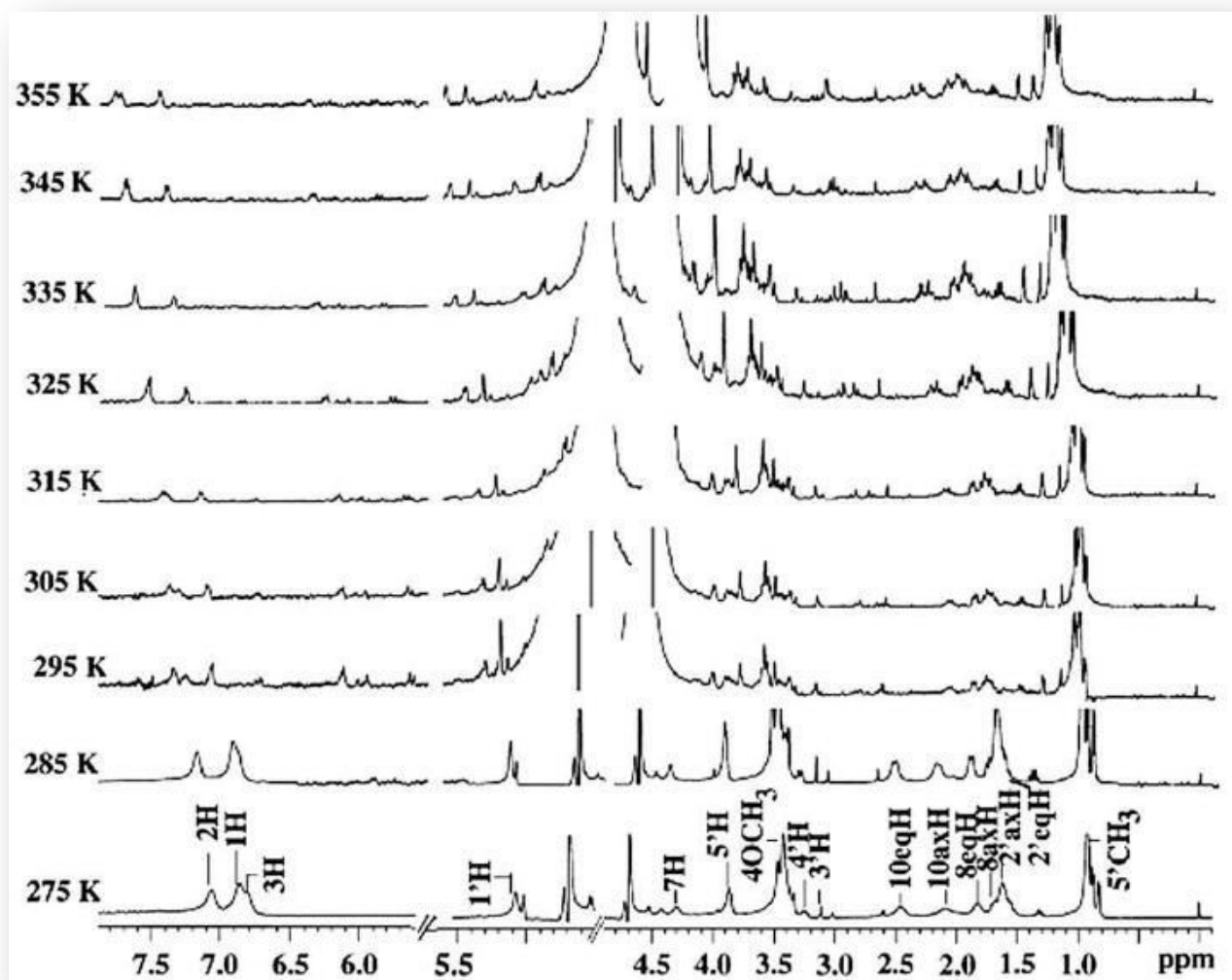
	Sample Name	Vial	Inj	Channel	Name	RT	Area	Height	Amount	Concentration	Units
1	Doxyrub 48	2:C,7	1	ACQUITY TUV ChB	Doxorubicin	1.703	2373780	417461	0.879	0.879	ug
2	Doxyrub 48	2:C,7	3	ACQUITY TUV ChB	Doxorubicin	1.699	2333684	411068	0.864	0.864	ug
3	Doxyrub 48	2:C,7	2	ACQUITY TUV ChB	Doxorubicin	1.698	2346280	411857	0.869	0.869	ug
Mean						1.700	2351247.869	413462.164	0.87	0.87	
Std. Dev.						0.003	20504.402	3485.604	0.01	0.01	
% RSD						0.2	0.9	0.8	0.9	0.9	



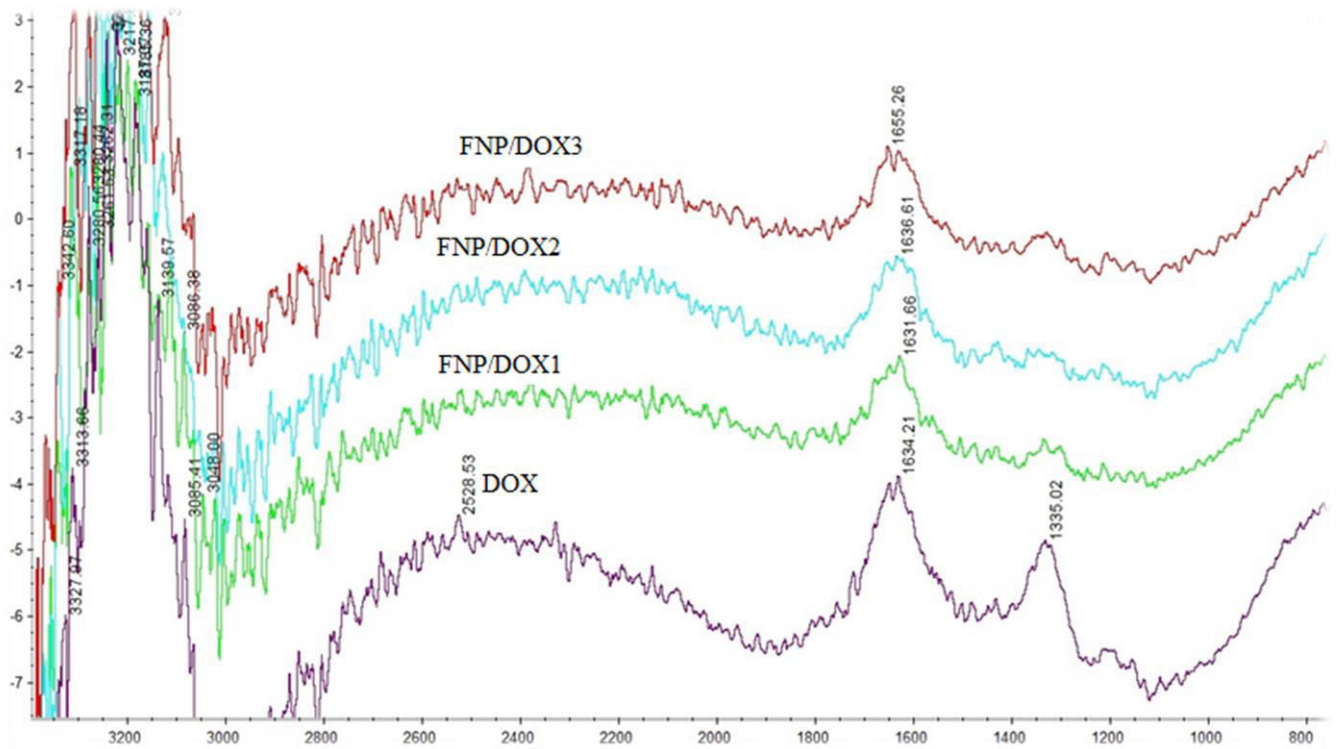
— SampleName: Doxyrub 48; Vial: 2:C,7; Injection: 1; Channel: ACQUITY TUV ChB; Date
 Acquired: 10/8/2014 4:03:50 PM CEST
— SampleName: Doxyrub 48; Vial: 2:C,7; Injection: 3; Channel: ACQUITY TUV ChB; Date
 Acquired: 10/8/2014 4:23:41 PM CEST
— SampleName: Doxyrub 48; Vial: 2:C,7; Injection: 2; Channel: ACQUITY TUV ChB; Date
 Acquired: 10/8/2014 4:13:46 PM CEST



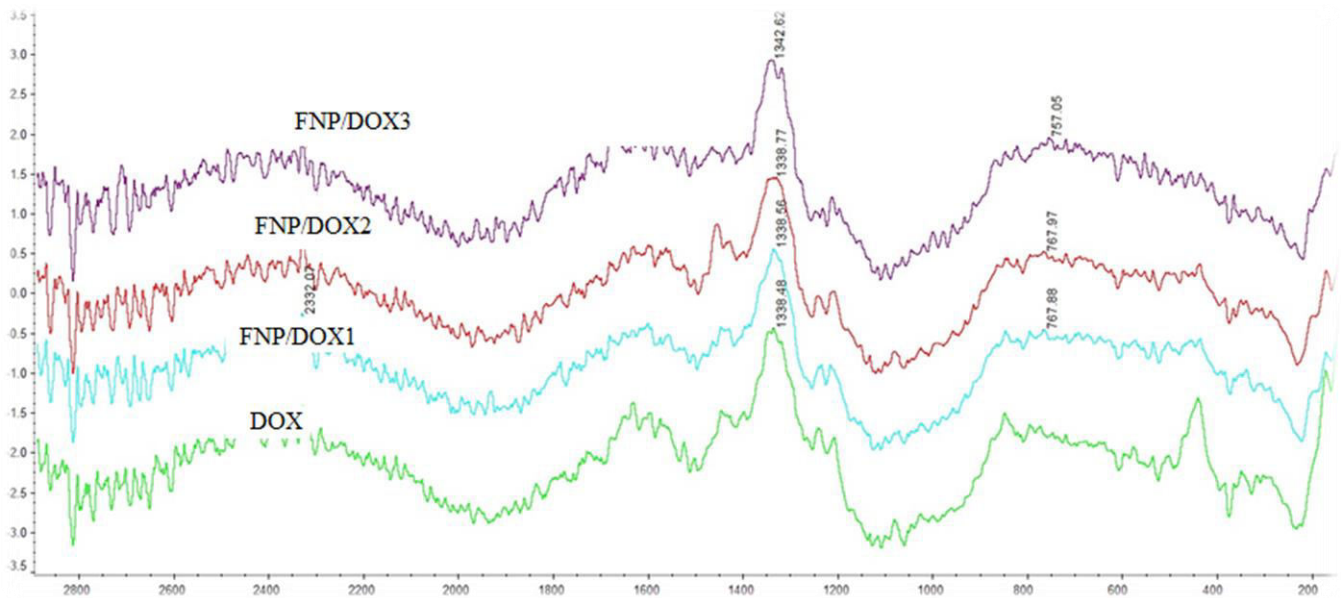
Slika P5. ¹H NMR spektar komercijalnog leka Adriamycin-a (aktivna komponenta doksorubicin) u D₂O koncentracije (0,01-8 mmol/dm³) na temperaturi 298 K. Preuzeto uz izmene iz (Agrawal, Barthwal, & Barthwal, 2009)



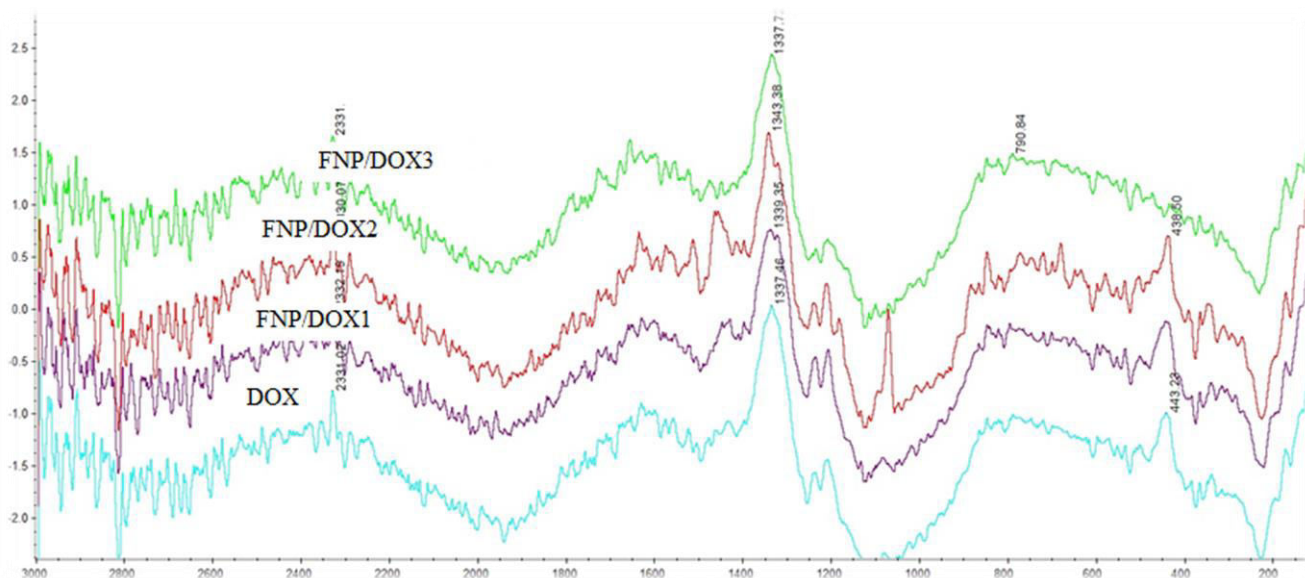
Slika P6. ¹H NMR spektar komercijalnog leka Adriamycin-a (aktivna komponenta doksorubicin) u D₂O koncentracije 8 mmol/dm³ na temperaturama 275-355 K. Preuzeto uz izmene iz (Agrawal i dr., 2009)



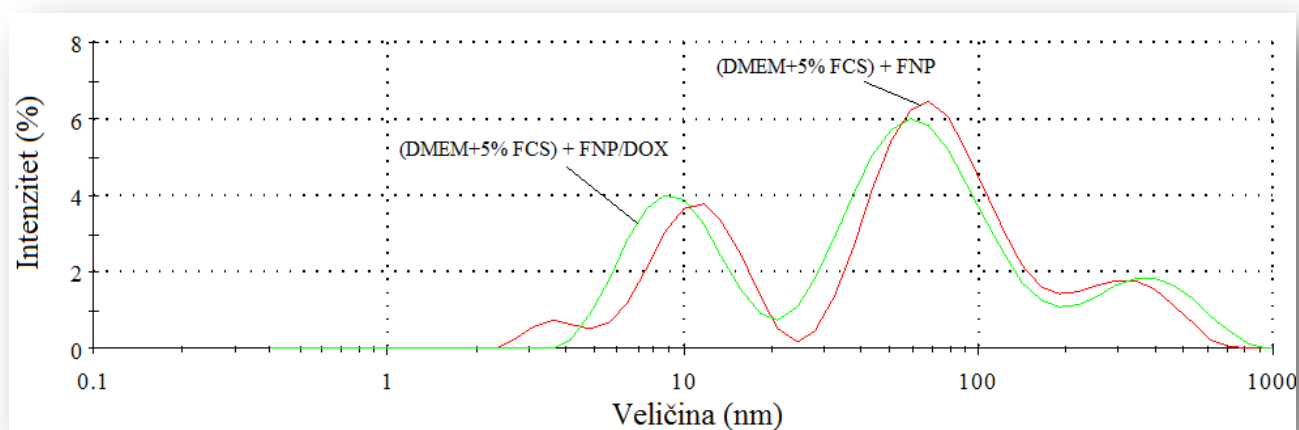
Slika P7. Ramanski spektri $\text{DOX}_{(aq)}$ i nanokompozita $\text{FNP/DOX}_{(aq)}$



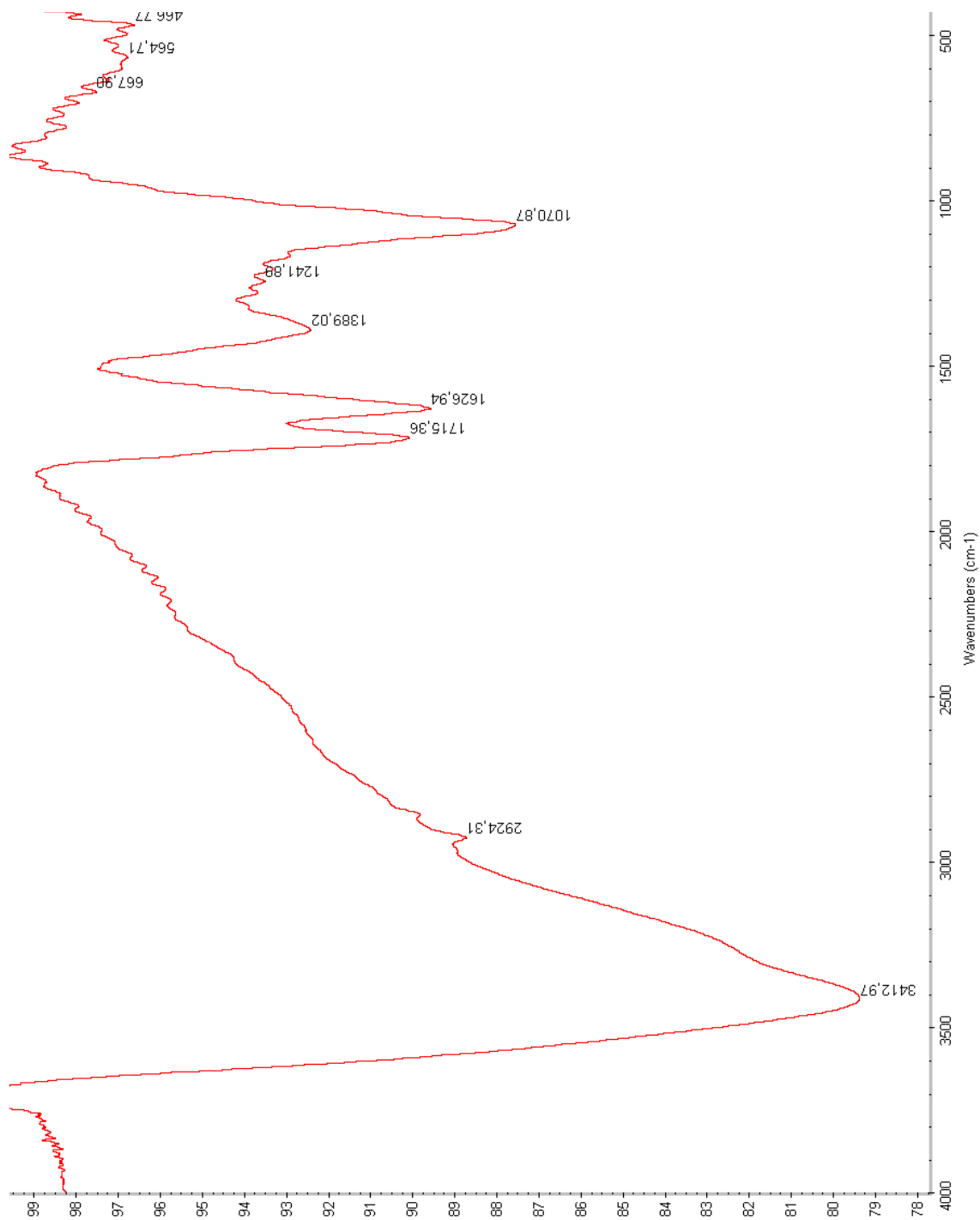
Slika P8. Ramanski spektri $\text{DOX}_{(aq)}$ i nanokompozita $\text{FNP/DOX}_{(aq)}$ nakon 3h sušenja na zlatnoj pločici



Slika P9. Ramanski spektri $\text{DOX}_{(aq)}$ i nanokompozita $\text{FNP/DOX}_{(aq)}$ nakon 24h sušenja na zlatnoj pločici



Slika P10. Raspodela veličine čestica FNP i nanokompozita FNP/DOX po intenzitetu u ćelijskom medijumu DMEM+5% FCS



Slika P11. FTIR spektar praha fulerenola C₆₀(OH)₂₄

Tabela P8. Letalnost i teratogenost na embrionima zebrica (*Danio rerio*) tokom različitog vremenskog perioda tretmana. Preuzeto uz izmene iz (Jović i dr., 2016)

Kategorija	Razvojne smetnje	Vreme izlaganja (hpf)			
		24	48	72	96
Letalnost	Koagulacija jaja ^a	●	●	●	●
	Odsustvo formiranja somita	●	●	●	●
	Odsustvo odvajanja repa	●	●	●	●
	Odsustvo srčanog ritma		●	●	●
Teratogenost	Malformacija glave	●	●	●	●
	Malformacija očiju ^b	●	●	●	●
	Malformacija sakula/otolita ^c	●	●	●	●
	Malformacija notohorde	●	●	●	●
	Malformacija repa ^d	●	●	●	●
	Skolioza	●	●	●	●
	Frekvencija srčanog ritma		●	●	●
	Cirkulacija		●	●	●
	Perikardijalni edem	●	●	●	●
	Edem žumancetne kese	●	●	●	●
	Deformacija žumancetne kese	●	●	●	●
	Retardacija rasta ^e	●	●	●	●

^a Odsustvo jasne strukture organa

^b Malformacija očiju kao retardacija u razvoju očiju i abnormalnosti u veličini i obliku

^c Potpuno odsustvo ili prisustvo jednog ili više od sva otolita po sakuli, kao i smanjenje ili uvećanje otolita i/ili sakula

^d Malformacija repa kao uvijenost, uvrtnje ili skraćenje u odnosu na kontrolu optičkim upoređivanjem

^e Retardacija rasta u poređenju sa kontrolom u vidu veličine (pre izleganja, 24 hpf i 48 hpf) ili dužine tela optičkim upoređivanjem primenom invertnog mikroskopa (CKX41; Olympus, Tokyo, Japan)

Tabela P9. Abnormalnosti morfoloških karakteristika kod zebrića nakon izlaganja fulerenolskim nanočesticama (FNP) izraženo u procentima.

Preuzeto uz izmene iz (Jović i dr., 2016)

FNP	Normalni embrioni ^a	Mrtvi embrioni ^a	Teratogeni embrioni ^a	Retardacija rasta ^b	Notohorda ^b	Oči ^b	Otolite ^b	Somite ^b	Odvojenost repa ^b	Perikardijalni edem ^b	Žumancetni edem ^b	Srčani ritam ^b	Cirkulacija ^b	Izleganje ^b	Glava ^c	Skolioza ^c	Rep ^c
24 hpf																	
920 μM	69,8	24,5	5,7	2,5	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0	0,0	2,5						
92 μM	77,6	19,7	2,6	0,0	0,0	0,0	1,6	0,0	1,6	0,0	0,0						
46 μM	75,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
9,2 μM	75,5	24,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
4,6 μM	76,9	23,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
2,3 μM	92,3	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
48 hpf																	
920 μM	67,9	26,4	5,7	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	51,3	0,0	0,0	5,0
92 μM	76,3	21,1	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	40,0	0,0	0,0	0,0
46 μM	75,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	66,7	0,0	0,0	0,0
9,2 μM	75,5	24,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	70,3	0,0	0,0	0,0
4,6 μM	76,9	23,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
2,3 μM	92,3	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
72 hpf																	
920 μM	66,0	28,3	5,7	5,3	2,6	0,0	0,0	0,0	0,0	2,6	2,6	0,0	2,6	92,1	2,9	8,6	5,7
92 μM	72,4	21,1	6,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	1,7	1,7	3,4	96,7	0,0	1,7	1,7
46 μM	72,9	25,0	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	94,4	0,0	2,9	0,0
9,2 μM	75,5	24,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	94,7	0,0	0,0	0,0
4,6 μM	76,9	23,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
2,3 μM	92,3	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0

96 hpf																	
920 μM	32,1	30,2	37,7	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	54,1	0,0
92 μM	67,1	23,7	9,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	1,7	0,0	0,0	98,3	0,0	8,8	0,0
46 μM	72,9	25,0	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	2,8	0,0
9,2 μM	75,5	24,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
4,6 μM	73,1	26,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
2,3 μM	92,3	7,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0

Skraćenice: (hpf) sati nakon fertilizacije

$\mu\text{M} = \mu\text{mol}/\text{dm}^3$

^a Procenat morataliteta i teratogenosti računato po broju svih jaja

^b Procenat teratogenosti računato po živim embrionima u vreme procene

^c Procenat teratogenosti na osnovu svih izlegnutih embriona u vreme procene

Tabela P10. Abnormalnosti morfoloških karakteristika kod zebrica nakon izlaganja doksorubicinu (DOX) izraženo u procentima. Preuzeto uz izmene iz (Jović i dr., 2016)

DOX	Normalni embrioni ^a	Mrtvi embrioni ^a	Teratogeni embrioni ^a	Retardacija rasta ^b	Notohorda ^b	Oči ^b	Otolite ^b	Somite ^b	Odvojenost repa ^b	Perikardijalni edem ^b	Žumancetni edem ^b	Srčani ritam ^b	Cirkulacija ^b	Izleganje ^b	Glava ^c	Skolioza ^c	Rep ^c
24 hpf																	
920 μM	74,0	26,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
92 μM	74,7	25,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
46 μM	77,1	22,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
9,2 μM	81,3	18,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
4,6 μM	87,5	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
2,3 μM	87,5	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
48 hpf																	
920 μM	0,0	34,0	66,0	0,0	69,7	0,0	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	6,1	100,0	100,0	100,0
92 μM	70,7	25,3	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	1,8	1,8	1,8	50,9	0,0	7,1	3,6
46 μM	77,1	22,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	78,4	0,0	0,0	0,0
9,2 μM	81,3	18,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	64,1	0,0	0,0	0,0
4,6 μM	87,5	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	38,1	0,0	0,0	0,0
2,3 μM	87,5	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	28,6	0,0	0,0	0,0
72 hpf																	
920 μM	0,0	56,0	44,0	9,1	100,0	0,0	90,9	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	81,8	100,0	100,0	100,0
92 μM	68,0	25,3	6,7	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	5,5	5,5	5,5	5,5	98,2	0,0	5,6	0,0
46 μM	75,0	22,9	2,1	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	2,7	0,0	0,0	2,7	100,0	0,0	0,0	0,0
9,2 μM	81,3	18,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
4,6 μM	87,5	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
2,3 μM	87,5	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0

96 hpf																	
920 μM	0,0	96,0	4,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
92 μM	69,3	26,7	4,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	1,8	1,8	1,8	100,0	0,0	3,6	0,0
46 μM	75,0	22,9	2,1	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	2,7	0,0	0,0	2,7	100,0	0,0	2,7	0,0
9,2 μM	81,3	18,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
4,6 μM	87,5	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
2,3 μM	87,5	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0

Skraćenice: (hpf) sati nakon fertilizacije

$\mu\text{M} = \mu\text{mol}/\text{dm}^3$

^a Procenat morataliteta i teratogenosti računato po broju svih jaja

^b Procenat teratogenosti računato po živim embrionima u vreme procene

^c Procenat teratogenosti na osnovu svih izlegnutih embriona u vreme procene

Tabela P11. Abnormalnosti morfoloških karakteristika kod zebrica nakon izlaganja fulerenol/dokсорubicin nanokompozitu (FNP/DOX) izraženo u procentima. Preuzeto uz izmene iz (Jović i dr., 2016)

FNP/DOX	Normalni embrioni ^a	Mrtvi embrioni ^a	Teratogeni embrioni ^a	Retardacija rasta ^b	Notohorda ^b	Oči ^b	Otolite ^b	Somite ^b	Odvojenost repa ^b	Perikardialni edem ^b	Žumancetni edem ^b	Srčani ritam ^b	Cirkulacija ^b	Izleganje ^b	Glava ^c	Skolioza ^c	Rep ^c
24 hpf																	
920 μM	54,2	27,1	18,8	0,0	0,0	0,0	17,1	0,0	0,0	2,9	5,7						
92 μM	64,0	32,0	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0						
46 μM	68,8	31,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
9,2 μM	79,2	20,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
4,6 μM	84,0	16,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
2,3 μM	83,3	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						
48 hpf																	
920 μM	0,0	31,3	68,8	0,0	0,0	0,0	18,2	0,0	0,0	42,4	36,4	93,9	42,4	33,3	0,0	45,5	9,1
92 μM	61,3	32,0	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	60,8	0,0	3,2	6,5
46 μM	68,8	31,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	72,7	0,0	0,0	0,0
9,2 μM	79,2	20,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	92,1	0,0	0,0	0,0
4,6 μM	84,0	16,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	38,1	0,0	0,0	0,0
2,3 μM	83,3	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0
72 hpf																	
920 μM	0,0	33,3	66,7	0,0	100,0	0,0	78,1	0,0	0,0	93,8	93,8	93,8	100,0	93,8	36,7	36,7	36,7
92 μM	60,0	33,3	6,7	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	4,0	4,0	4,0	94,0	2,1	4,3	2,1
46 μM	68,8	31,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	3,0	3,0
9,2 μM	79,2	20,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	97,4	0,0	0,0	0,0
4,6 μM	84,0	16,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
2,3 μM	83,3	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0

96 hpf																	
920 μM	0,0	68,8	31,3	0,0	86,7	0,0	86,7	0,0	0,0	93,3	93,3	86,7	93,3	93,3	100,0	85,7	78,6
92 μM	53,3	34,7	12,0	0,0	4,1	0,0	0,0	0,0	0,0	4,1	6,1	0,0	4,1	98,0	4,2	14,6	2,1
46 μM	66,7	31,3	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	3,0	3,0
9,2 μM	79,2	20,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	97,4	0,0	0,0	0,0
4,6 μM	84,0	16,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
2,3 μM	83,3	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0

Skraćenice: (hpf) sati nakon fertilizacije

$\mu\text{M} = \mu\text{mol}/\text{dm}^3$

^a Procenat morataliteta i teratogenosti računato po broju svih jaja

^b Procenat teratogenosti računato po živim embrionima u vreme procene

^c Procenat teratogenosti na osnovu svih izlegnutih embriona u vreme procene

Biografija sa bibliografijom



Danica Jović (rođena Radmanovac) je rođena u Vršcu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Nakon završenih osnovnih studija biohemije na Departmanu za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine na PMF-UNS (2005.-2009.) upisuje master studije biohemije na istom Departmanu i stiče titulu master biohemičar 2010. godine. Tokom studiranja je boravila u Gracu (Pharmazeutische Verfahrenstechnik und Partikeltechnik, jul/avgust 2008. god.) i Minhenu (Ludwig-Maximilians-Universität München, jul/avgust 2010. godina), gde je učestvovala u programima razmene studenata u okviru letnjih istraživačkih programa. Pored toga, učestvovala je u popularizaciji nauke u okviru FameLab takmičenja 2009. godine. Bila je stipendista Fonda za mlade talente, Fondacije Hemofarm, dobitnik Eurobank EFG stipendije, kao i stipendije Đoka Sterija Popović. Pored toga, 2010. godine je nagrađena Specijalnim priznanjem od strane SHD. Dobitnik je nagrade za postignut uspeh tokom osnovnih studija koju dodeljuje Univerzitet u Novom Sadu.

Doktorske akademske studije hemije na PMF, UNS je upisala 2010. godine. Od 2011. godine je uključena u naučno-istraživački projekat III 45005 pod nazivom "Funkcionalni, funkcionalizovani i usavršeni nanomaterijali". Aktivno učestvuje u različitim istraživačkim oblastima hemijske sinteze i fizičko-hemijske karakterizacije novih nanoformulacija antineoplastika i drugih biološki aktivnih jedinjenja, kao i u biološkim testiranjima na različitim *in vitro* i *in vivo* modelima. Od 2010. godine je angažovana u izvođenju dela nastave na Prirodno-matematičkom fakultetu iz predmeta Hemija za studente sledećih smerova: ekologija, dvopredmetna nastava biologija-geografija, fizika, analitičar zaštite životne sredine. Aktivno je učestvovala u pripremi eksperimentalnih vežbi i teorijskih osnova savremenih nanokarakterizacija na predmetu Hemija fulerena.

Posедуje sertifikat o poznavanju engleskog jezika: Certificate of Proficiency in English i nemačkog jezika nivoa A_{2/1}.

Član je SHD.

Majka švrće Mile i saputnik Branislava u roditeljstvu i dvojnini.

Novi Sad, 13.12.2017.

Danica Jović

Pomoćni udžbenik i praktikum

1. Neorganska jedinjenja u atmosferi, hidrosferi i pedosferi, Aleksandar Đorđević, Ivana Borišev, **Danica Jović**, UNS, PMF, ISBN 978-86-7031-413-9, Novi Sad, 2016
2. Praktikum iz hemije, Aleksandar Đorđević, **Danica Jović**, Izdavač: Aleksandar Đorđević, ISBN 978-86-918427-0-3 Novi Sad, 2015

Poglavlje u knjizi

1. Advanced carbon materials and technology (Advanced Materials Book Series) Editors: Ashutosh Tiwari & S.K. Shukla ;WILEY-Scrivener Publishing, USA, Year of Publication 2013, Chapter 6 , Bioimpact of carbon nanomaterials, Aleksandar Djordjevic, Rade Injac, **Danica Jović**, Jasminka Mrđanović, Mariana Seke M13

Originalni naučni radovi

1. Djordjevic Aleksandar, Ignjatovic Nenad, Seke Mariana, **Jović Danica**, Uskokovic Dragan, Rakocevic Zlatko, Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite/Fullerenol Nanocomposites, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 15 (2015) 1538-1542, M23
2. Vajdle Olga, Zbiljić Jasmina, Tasić Bojan, **Jović Danica**, Valéria Guzsány, Djordjevic Aleksandar, Voltammetric behavior of doxorubicin at a renewable silver-amalgam film electrode and its determination in human urine, *Electrochimica Acta* 132 (2014) 49-57, M21
3. Branislava U. Srdjenovic, Marija N. Slavić, Karmen M. Stankov, Nebojša V. Kladar, **Danica S. Jović**, Mariana N. Seke, Višnja V. Bogdanović, Size distribution of fullerenol nanoparticles in cell culture medium and their influence on antioxidative enzymes in Chinese hamster ovary cells, *Hemijska industrija* 69 (2015) 425-431, M23
4. Nikola Ž. Knežević, Sanja Milenković, **Danica Jović**, Slavica Lazarevic, Jasminka Mrđjanović, and Aleksandar Djordjevic, Fullerenol-capped porous silica nanoparticles for pH-responsive drug delivery, *Advances in Materials Science and Engineering* (2015), <http://dx.doi.org/10.1155/2015/567350>, M23
5. **Danica S. Jović**, Mariana N. Seke, Aleksandar N. Djordjevic, Jasminka Ž. Mrđanović, Lidija D. Aleksić, Gordana M. Bogdanović, Aleksandar B. Pavić, Janez Plavec, Fullerenol nanoparticles as a new delivery system for doxorubicin, *RSC Advances* 6 (2016) 38563–38578, M21
6. Slađana Davidović, Miona Miljković, Vesna Lazić, **Danica Jović**, Bojan Jokić, Suzana Dimitrijević, Maja Radetić, Impregnation of cotton fabric with silver nanoparticles synthesized by dextran isolated from bacterial species *Leuconostoc mesenteroides* T3, *Carbohydrate Polymers* 131 (2015) 331–336, M21a
7. Nikola Unković, Milica Ljaljević Grbić, Miloš Stupar, Jelena Vukojević, Vesna Janković, **Danica Jović**, and Aleksandar Djordjević, Aspergilli response to benzalkonium chloride and novel-synthesized fullerenol/benzalkonium chloride nanocomposite, *Scientific World Journal* (2015) <http://dx.doi.org/10.1155/2015/109262>

8. Jacevic Vesna, **Jovic Danica**, Kuca Kamil, Dragojevic-Simic Viktorija, Dobric Silva, Trajkovic Sanja, Borisev Ivana, Segrt Zoran, Milovanovic Zoran, Bokonjic Dubravko, Djordjevic Aleksandar, Effects of fullereneol nanoparticles and amifostine on radiation-induced tissue damages: histopathological analysis, *Journal of Applied Biomedicine* 14 (2016) 285-297, M23

9. Seke Mariana, Petrovic Danijela, Djordjevic Aleksandar, **Jovic Danica**, Labudovic-Borovic Milica, Kanacki Zdenko, Jankovic Milan, Fullereneol/doxorubicin nanocomposite mitigates acute oxidative stress and modulates apoptosis in myocardial tissue, *Nanotechnology* 27 (2016) 485101, M21

10. Vraneš Milan, Borišev Ivana, Tot Aleksandar, Armaković Stevan., Armaković Sanja, **Jović Danica**, Gadžurić Slobodan, Djordjevic Aleksandar, Self-assembling, reactivity and molecular dynamics of fullereneol nanoparticles, *Physical chemistry chemical physics* 19 (2017) 135-144, M21

11. Mariana Seke, Milica Markelic, Arian Morina, **Danica Jovic**, Aleksandra Korac, Dragana Milicic, Aleksandar Djordjevic, Synergistic mitotoxicity of chloromethanes and fullerene C₆₀ nanoaggregates in *Daphnia magna* midgut epithelial cells, *Protoplasma* 254 (2017) 1607-1616, M22

Objavljeni izvodi radova sa nacionalnih simpozijuma

1. Aleksandar Djordjevic, Nenad Ignjatović, Gordana Bogdanović, Mariana Seke, Dragan Uskoković, **Danica Jović**, Zlatko Rakočević, „Cell adhesion of mouse fibroblasts to the surface of a novel hydroxyapatite/fullereneol nanocomposite“, *Prva konferencija mladih hemičara Srbije*, Beograd, 2012, Izvodi radova str. 95

Objavljeni izvodi radova sa međunarodnih simpozijuma

1. **Danica Radmanovac**, Aleksandar Djordjević, Alenka Mertelj, Mariana Seke, Rade Injac, Ivana Ičević, „Distribution of nanoparticles of fullereneol in human serum in presence of Doxorubicin“, *Ninth Young Researchers Conference - Materials Sciences and Engineering*, Belgrade, 2010, Program and the Book of Abstracts, p. 16

2. **Danica Radmanovac**, Zsigmond Papp, Valéria Guzsány, Ivana Ičević, Aleksandar Đorđević, „Voltammetric detection of doxorubicin, *18th Young Investigators Seminar on Analytical Chemistry*“, Novi Sad, 2011, The Book of Abstracts, p. 25

3. **Danica Radmanovac**, Valéria Guzsány, Zsigmond Papp, Ivana Ičević, Aleksandar Đorđević, „Voltametric determination of doxorubicin on glassy carbon and fullereneol nanoparticles modified glassy carbon electrodes“, *European Conference on Analytical Chemistry, (Euroanalysis 16)*, Belgrade, Serbia, 2011, The Book of Abstracts, p. 221

4. **Danica Radmanovac**, Aleksandar Đorđević, Alenka Mertelj, Zlatko Rakočević, Mariana Seke, Ivana Ičević, Rade Injac, „Distribution of fullereneol nanoparticles in human serum“, *European Conference on Analytical Chemistry, (Euroanalysis 16)*, Belgrade, Serbia, 2011, The Book of Abstracts, p. 558

5. **Danica Jović**, Valéria Guzsivány, Aleksandar Đorđević, Zsigmond Papp, Ivana Ičević, „Adsorptive stripping voltammetric determination of trace levels of doxorubicin in selected real samples“, *Tenth Young Researchers Conference Material Sciences and Engineering*, Belgrade, Serbia, 2011, The Book of Abstracts, p. 25
6. Nikola Unković, Miloš Stupar, Milica Ljaljević Grbić, Jelena Vukojević, Marina Seke, **Danica Jović**, Aleksandar Djordjević, „Effects of fullereneol nano particles C₆₀(OH)₂₄ on filamentous fungus *Aspergillus niger* Tiegh“, *Joint Event of the 11th Young Researchers' Conference: Materials Science and Engineering and the 1st European Early Stage Researches' Conference on Hydrogen Storage*, Belgrade, 2012, Program and the Book of Abstracts, p. 43
7. Bojan Tasić, Jasmina Zbiljić, Olga Vajdle, **Danica Jović**, Valéria Guzsivány, Aleksandar Đorđević, „Voltammetric determination of doxorubicin by renewable silver-amalgam film electrode“, *Joint Event of the 11th Young Researchers' Conference: Materials Science and Engineering and the 1st European Early Stage Researches' Conference on Hydrogen Storage*, Belgrade, 2012, Program and the Book of Abstracts, p. 52
8. Olga Vajdle, Jasmina Zbiljić, Bojan Tasić, **Danica Jović**, Valéria Guzsivány, Aleksandar Đorđević, Voltammetric determination of trace level of doxorubicin in a real sample by renewable silver-amalgam film electrode, *20th Young Investigators' Seminar on Analytical Chemistry*, Maribor, Slovenia, 2013, Book of abstracts, p. 34
9. Marija Slavic, **Danica Jovic**, Danijela Petrovic, Ana Mijuskovic, Zorana Orescanin-Dusic, Aleksandra Nikoli-Kokic, Mariana Seke, „Pharmacological effect of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ nanoparticles on isolated smooth muscle“, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Belgrade, 2013, ID 8626822, LC P01, p. 2
10. Dubravka Milanov, Gordana Kozoderović, Mariana Seke, **Danica Jović**, Danijela Petrović, Aleksandar Djordjevic, „Impact of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ nanoparticles on growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*“, *8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries*, Belgrade, 2013, ID 8662922, LC P02, p. 3
11. Nikola Unković, Miloš Stupar, **Danica Jović**, Mariana Seke, Milica Ljaljević Grbić, Jelena Vukojević, Aleksandar Djordjevic, Effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ nanoparticles bound biocide on toxigenic molds from wall painting, *XVI International Biodeterioration and Biodegradation Symposium*, Lodz, Poland, 2014, Abstract Book p. 76.
12. Sanja Milenković, Nikola Knežević, Aleksandar Djordjevic, **Danica Jović**, Ivana Borišev, Mesoporous silica nanoparticles and their application in drug delivery, *Thirteenth Young Researchers Conference – Materials Science and Engineering*, Belgrade, 2014, Book of Abstracts p. 1.
13. Igor Medić, Aleksandar Djordjevic, Ivana Borišev, **Danica Jović**, Fullerene C₆₀ dimer oxides *Thirteenth Young Researchers Conference – Materials Science and Engineering*, Belgrade, 2014, Book of Abstracts p. 16.
14. Ivana Borišev, Igor Medić, Daniela Šojić, Biljana Abramović, Marina Lazarević, Marina Delić, **Danica Jović**, Vladimir Srdić, Aleksandar Djordjević, Synthesis, Characterisation and Photocatalytic Properties of Two Novel Nanocomposites: TiO₂ Hombikat with Fullerene

nC₆₀ and with Fullerenol C₆₀(OH)₂₄ Nanoparticles, *17th Annual Conference-YUCOMAT*, Herceg Novi, 2015, Book of Abstracts p. 80.

15. Seke Mariana, Petrovic Danijela, Labudovic-Borovic Milica, **Jovic Danica**, Srdjenovic Branislava, Kanacki Zdenko, Zikic Dragan, Djordjevic Aleksandar, Effects of a fullerenol/doxorubicin nanocomposite on the heart tissue of healthy rats (Meeting Abstract), *40th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies (FEBS) - The Biochemical Basis of Life*, Berlin, 2015, 282 p. 242

16. Seke Mariana, Petrovic Danijela, Jovic Danica, Labudovic-Borovic Milica, Kanacki Zdenko, Zikic Dragan, Djordjevic Aleksandar, Effects of a novel fullerenol-doxorubicin nanocomposite on the liver of healthy rats, *Belgrade International Molecular Life Science Conference for Students*, Belgrade, 2016

17. Seke Mariana, Petrovic Danijela, Labudovic-Borovic Milica, **Jovic Danica**, Borisev Ivana, Kanacki Zdenko, Zikic Dragan, Djordjevic Aleksandar, Fullerenol/iron nanocomposite modulates doxorubicin-induced cardiotoxicity (Meeting Abstract), *Annals of oncology*, 2017, 28, 5

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Danica Jović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Aleksandar Đorđević, redovni profesor
Naslov rada: NR	Sinteza, karakterizacija i biološka ispitivanja fulerenol/dokсорubicin nanokompozita
Jezik publikacije: JP	srpski
Jezik izvoda: JI	srp./eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina, Novi Sad
Godina: GO	2017
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Trg Dositeja Obradovića 3

Fizički opis rada: FO	(7 poglavlja/ 222 stranica/ 16 tabela/ 82 slike, od toga 56 grafikona/ 375 referenci/24 priloga)
Naučna oblast: NO	Hemija
Naučna disciplina: ND	Multidisciplinarna
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Fulerenol, nanokompozit, antineoplastici, doksorubicin, biološki efekti
UDK	
Čuva se: ČU	PMF, UNS, Biblioteka, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine, Trg Dositeja Obradovića 3
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	<p>U radu je predstavljena sinteza i karakterizacija novog fulerenol/doksorubicin nanokompozita, sintetisanog sa ciljem dobijanja potencijalne nove nanoformulacije postojećeg antineoplastika doksorubicina, koja bi pokazala veću biološku aktivnost uz smanjenje neželjenih sporednih efekata koje sam lek izaziva, na prvom mestu kardiotoksičnosti.</p> <p>Nanokompozit fulerenol/doksorubicin je okarakterisan brojnim metodama prateći dva osnovna eksperimentalna pristupa: molekulsko-spektroskopske metode (XPS, denzitometrija i transportne osobine, NMR, UPLC, Ramanska i UV-spektroskopija, SFM) i metode nanokarakterizacije (DLS, AFM, TEM), kao i računске simulacije (RDF). Osnovni cilj ispitivanja je bila detekcija postojanja nekovalentnog nanokompozita koji ostvaruju doksorubicin i fulerenolske nanočestice u vodenom rastvoru. Rezultati karakterizacije jasno i nedvosmisleno ukazuju na postojanje nekovalentnih interakcija unutar nanokompozita, što dalje utiče na organizaciju i udruživanje čestica, a što uslovljava i drugačiju biološku aktivnost takvog sistema u odnosu na pojedinačne komponente. Rezultati bioloških ispitivanja na <i>in vitro</i> modelu različitih tumorskih ćelijskih linija pokazuju značajan antiproliferativni efekat nanokompozita, kao i selektivnost prema tumorskim u odnosu na zdravu ćelijsku liniju. Eksperimenti na <i>in vivo</i> modelu zebrića potvrđuju smanjenje toksičnosti nanokompozita u poređenju sa lekom, primarno kardiotoksičnosti. Računske simulacije,</p>

	<p>mikroskopski i spektroskopski podaci, kao i rezultati <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> studija ukazuju na to da nekovalentne interakcije između fulerenola i doksorubicina mogu biti ključni korak u stvaranju sinergističkog sistema za dostavu leka u biološki sistem.</p> <p>Multipotentnost fulerenola kao nanonosača lekova i nespecifičnost strukture doksorubicina kao leka, ukazuje na to da bi fulerenol mogao biti efikasan nanonosač i drugih antineoplastika, što daje prostora za unapređenje antitumorskih osobina lekova posredstvom istovremene administracije leka.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	13.07.2017.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>predsednik: dr Đendi Vaštag, redovni profesor PMF/UNS</p> <p>član (mentor): dr Aleksandar Đorđević, redovni profesor PMF/UNS</p> <p>član: dr Milan Vraneš, vanredni profesor PMF/UNS</p> <p>član: dr Vladimir Srdić, redovni profesor TF/UNS</p> <p>član: dr Nikola Knežević, viši naučni saradnik, TMF/BU</p> <p>član: dr Jasminka Mrđanović, naučni saradnik, Institut za onkologiju Vojvodine, Sremska Kamenica</p>

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES**

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D. Thesis
Author: AU	Danica Jović
Mentor: MN	Aleksandar Đorđević, PhD, full professor
Title: TI	Synthesis, characterisation and biological activity investigation of fullereneol/doxorubicin nanocomposite
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English/Serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina, Novi Sad
Publication year: PY	2017
Publisher: PU	Autor's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Faculty of Sciences, Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Trg Dositeja Obradovica 3

Physical description: PD	7 chapters/ 222 pages/16 tables/ 82 figures (56 of which present charts)/ 375 references/ 24 appendices
Scientific field SF	Chemistry
Scientific discipline SD	Multidisciplinary
Subject, Key words SKW	Fullerenol, nanocomposite, antineoplastics, doxorubicin, biological effects
UC	
Holding data: HD	Novi Sad, Faculty of Sciences, Library of Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection, Trg Dositeja Obradovica 3
Note: N	None
Abstract: AB	<p>The focus of this thesis was the synthesis and characterization of a novel fullerenol/doxorubicin nanocomposite, with the aim to obtain a potential nanoformulation of antineoplastic drug doxorubicin, which would express greater biological activity and lower level of adverse effects than the drug itself, in the first place cardiotoxicity.</p> <p>Nanocomposite fullerenol/doxorubicin was characterized by means of numerous methods following two main experimental approaches: molecular-spectroscopic methods (XPS, densitometry and transport properties, NMR, UPLC, Raman and UV spectroscopy, SFM) and methods of nanocharacterisation (DLS, AFM, TEM), as well as computer simulations (RDF). The goal of characterization was detection of non-covalent interactions within nanocomposite that are established between fullerenol nanoparticles and doxorubicin in aqueous solution. The results clearly indicate the existence of non-covalent interactions within nanocomposite that affect the organization and assembling of the particles, which further exhibit different biological activity of such a system in comparison to components themselves. Results of biological activity on <i>in vitro</i> model of different tumor cell lines show significant antiproliferative effect of nanocomposite, as well as selectivity towards tumor cell lines. Experiments conducted on <i>in vivo</i> zebrafish model confirm the lowering of</p>

	<p>the adverse effects of the drug, especially cardiotoxicity, in case when nanocomposite was applied. Computer simulations, microscopic and spectroscopic results combined with encouraging <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> results point out that non-covalent interactions between fullerene nanoparticles and doxorubicin may present the key role in formation of a synergistic system for nanodrug delivery into biological system. Multipotential of fullerene nanoparticles as a nanocarrier and non-specific structure of doxorubicin as a drug imply that fullerene may serve as an efficient nanocarrier of numerous other antineoplastics, which further allows the improvement of antitumor properties of drugs with simultaneous drug administration.</p>
<p>Accepted on Scientific Board on: AS</p>	<p>13th July 2017</p>
<p>Defended: DE</p>	
<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<p>president: PhD Gyöngyi Vastag, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad member (mentor): PhD Aleksandar Đorđević, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad member: PhD Milan Vraneš, Associate Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad member: PhD Vladimir Srdić, Full Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad member: PhD Nikola Knežević, Senior Research Associate, Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade member: PhD Jasminka Mrđanović, Assistant Research Professor, Oncology Institute of Vojvodina, Sremska Kamenica</p>