



UNIVERZITET U NOVOM SADU

MEDICINSKI FAKULTET



**SINTEZA I KARAKTERIZACIJA
RADIOFARMACEUTIKA NA BAZI
SUPERPARAMAGNETNIH
NANOČESTICA I EFEKAT DUALNE
TERAPIJE NA
EKSPERIMENTALNOM MODELU
ADENOKARCINOMA KOLONA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Jasna Mihailović

Dr Marija Mirković, viši naučni saradnik

Kandidat:

Aljoša Stanković

Novi Sad, 2021. godine

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА¹

Врста рада:	Докторска дисертација
Име и презиме аутора:	Аљоша Станковић
Ментор (титула, име, презиме, звање, институција)	Проф. др Јасна Михаиловић, редовни професор, Медицински факултет Нови Сад, Универзитет у Новом Саду Др Марија Мирковић, виши научни сарадник, Институт за нуклеарне науке „Винча“, Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београду
Наслов рада:	Синтеза и карактеризација радиофармацеутика на бази суперпарамагнетних наночестица и ефекат дуалне терапије на експерименталном моделу аденокарцинома колона
Језик публикације (писмо):	Српски (латиница)
Физички опис рада:	Унети број: Страница 142 Поглавља 8 Референци 300 Табела 16 Слика 39 Графикона 11 Прилога 5
Научна област:	Фармација
Ужа научна област (научна дисциплина):	Радиофармација
Кључне речи / предметна одредница:	радиофармацеутици; радиоизотопи; радиоизотопи јода; индукована хипертермија; магнетна поља; магнетне наночестице на бази оксида гвожђа; моноклонска антитела; неоплазме колона; аденокарцином; експеримент на животињама
Резиме на језику рада:	Радионуклидна терапија (РТ) представља селективну испоруку зрачења туморском ткиву, примјеном једног или више радиоизотопа (α , β , Ожеов електрон емитера) у саставу радиофармацеутика, чиме се инхибира раст туморских ћелија. Због недовољно дугог задржавања радионуклида и хипоксичних услова унутар тумора, РТ има своја ограничења у смислу ефикасности и поштеде околног здравог ткива. Напредак у наномедицини је довео до развоја наноматеријала, који би требало ријеше тај проблем. Суперпарамагнетне наночестице (СМНЧ) на бази магнетита (Fe_3O_4) и магхемита ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), показале су значајну предност у односу на друге наноматеријале због своје хемијске стабилности, ниске токсичности, повољних магнетних особина (висока магнетна сатурација) и ниске цијене производње. СМНЧ су нашле своју примјену као контрастни агенси за

¹ Аутор докторске дисертације потписао је и приложио следеће Обрасце:

5б – Изјава о ауторству;

5в – Изјава о истоветности штампане и електронске верзије и о личним подацима;

5г – Изјава о коришћењу.

Ове Изјаве се чувају на факултету у штампаном и електронском облику и не кориче се са тезом.

	<p>магнетну резонанцу, као носачи различитих лијекова као и у локалној терапији магнетном хипертермијом (МХТ). Магнетна хипертермија представља ослобађање топлоте од стране различитих медијатора под утицајем спољашњег наизмјеничног магнетог поља (СМП). Ова метода је показала велики потенцијал у терапији тешко доступних тумора и доказано повећава ефикасност РТ. Облагање СМНЧ одговарајућом облогом повећава колоидну стабилност, омогућава везивање радионуклида за различите функционалне групе на површини СМНЧ и обезбјеђује <i>in vivo</i> стабилност. Везивањем радионуклида за СМНЧ добија се мултифункционални терапијски агенс који комбинованим ефектом хипертермије и радионуклидне терапије може имати већи потенцијал у терапији малигнух тумора.</p> <p>Циљ овог истраживања је синтеза и облагање СМНЧ, испитивање могућности употребе обложених СМНЧ у МХТ, затим оптимизација услова обиљежавања моноклонског антителијела СС49 (СС49 мАт) са ¹³¹I као и испитивање услова коњугације ¹³¹I-СС49 мАт са обложеним СМНЧ. Такође циљ је и испитивање биодистрибуције, ретенције и ефекта дуалне терапије потенцијалног радиофармацеутика ¹³¹I-СС49-СМНЧ у <i>in vivo</i> условима.</p> <p>СМНЧ су синтетисане методом таложења из раствора (метода копреципитације) и солвотермалном методом у полиолима (полиол методом). Једињења мезо-2,3-димеркаптосукцинска киселина (ДМСА) и аминосилан (АПТЕС) коришћена су за облагање СМНЧ. Карактеризација необложених и обложених СМНЧ је урађена помоћу електронске микроскопије, рендгенске дифракције на праху, Фуријеове трансформационе инфрацрвене спектроскопије, SQUID магнетометрије, динамичког расејања свјетлости. Карактеризацијом обложених СМНЧ утврђен је утицај функционалних група (карбоксилне и аминок) на модификацију површине СМНЧ-а, а одређивањем специфичне апсорпције СМНЧ-а је испитана њихова потенцијална примјена у магнетној хипертермији. Обложене СМНЧ које су имале већу вриједност специфичне апсорпције су се даље користиле у коњугацији са обиљеженим антителијелом. За обиљежавања СС49 мАт са ¹³¹I коришћена је метода са хлорамином-Т, док је карбодиимидна метода коришћена за коњугацију ¹³¹I-СС49 мАт са обложеним СМНЧ. <i>In vitro</i> стабилност ¹³¹I-СС49-СМНЧ је испитана у физиолошком раствору и хуманом серуму одређивањем радиохемијске чистоће користећи танкослојну хроматографију.</p> <p>Резултати биодистрибуције, ретенције и терапијског ефекта ¹³¹I-СС49-СМНЧ, добијени су испитивањима на имунодефицијентним (NOD-SCID) мишевима којима су субкутано ињектоване LS174Т ћелије канцера, ћелијска линија хуманог аденокарцинома колона. Биодистрибуција и ретенција су праћене у одређеним временским интервалима помоћу BRUKER®In-Vivo Xtreme II уређаја и мјерењем расподеле радиоактивности по органима. Ефекат хипертермије, радионуклидне терапије и њиховог дуалног дејства су испитани израчунавањем запремине тумора сваки други дан након интратуморског ињектовања ¹³¹I-СС49-СМНЧ. Патохистолошка испитивања су урађена у циљу одређивања токсичности и терапијског ефекта ¹³¹I-СС49-СМНЧ. Добијени резултати испитивања <i>in vitro</i> стабилности заједно са резултатима биодистрибуције, ретенције и терапијског ефекта ¹³¹I-СС49-СМНЧ упућују на закључак да је коришћење ¹³¹I-СС49-СМНЧ у дуалној радионуклидно-хипертермијској терапији обећавајући приступ за ефикасно лијечење карцинома.</p>
<p>Датум прихватања теме од стране надлежног већа:</p>	<p>26.11.2019.</p>

Датум одбране: (Попуњава одговарајућа служба)	
Чланови комисије: (титула, име, презиме, звање, институција)	Председник: Члан: Члан: Члан:
Напомена:	

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF MEDICINE NOVI SAD**

KEY WORD DOCUMENTATION²

Document type:	Doctoral dissertation
Author:	Aljoša Stanković
Supervisor (title, first name, last name, position, institution)	Full Professor Jasna Mihailović, MD, PhD, Faculty of Medicine Novi Sad, University of Novi Sad Senior Research Associate Marija Mirković, PhD, Vinča Institute of Nuclear Sciences, National Institute of the Republic of Serbia, University of Belgrade
Thesis title:	Synthesis and characterization of radiopharmaceutical based on superparamagnetic nanoparticles and the effect of dual therapy on an experimental model of colon adenocarcinoma
Language of text (script):	Serbian language (latin script)
Physical description:	Number of: Pages 142 Chapters 8 References 300 Tables 16 Illustrations 39 Graphs 11 Appendices 5
Scientific field:	Pharmacy
Scientific subfield (scientific discipline):	Radiopharmacy
Subject, Key words:	Radiopharmaceuticals; Radioisotopes; Iodine Radioisotopes; Hyperthermia, Induced; Magnetic Fields; Magnetic Iron Oxide Nanoparticles; Antibodies, Monoclonal; Colonic Neoplasms; Adenocarcinoma; Animal Experimentation
Abstract in English language:	Radionuclide therapy (RT) represents the selective delivery of radiation to tumor tissue, using one or more radioisotopes (α , β and Auger electron emitters) in the form of radiopharmaceuticals, thereby inhibiting the growth of tumor cells. Due to insufficient retention of radionuclides and hypoxic conditions inside the tumor, RT has its limitations in terms of efficiency and sparing of the surrounding healthy tissue. Advancement in nanomedicine has led to the development of nanomaterials, which should solve the problem. Superparamagnetic nanoparticles (SPMN) based on magnetite (Fe_3O_4) and maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) have shown a significant advantage over other nanomaterials because of their chemical stability, low toxicity, favorable magnetic properties (high magnetic saturation) and low production cost. SPMN have found their application as magnetic resonance contrast agents, as drug carriers as well as in local magnetic hyperthermia therapy (MHT). Magnetic hyperthermia represents the release of heat by various mediators under the influence of an external alternating magnetic field (AMF). This method has

² The author of doctoral dissertation has signed the following Statements:

5б – Statement on the authority,

5в – Statement that the printed and e-version of doctoral dissertation are identical and about personal data,

5г – Statement on copyright licenses.

The paper and e-versions of Statements are held at the faculty and are not included into the printed thesis.

	<p>shown great potential in the treatment of hard-to-reach tumors and has been proven to increase the effectiveness of RT. The proper coating of the SPMN increases their colloidal stability, facilitates the binding of radionuclides to different functional groups on the SPMN surface and provides <i>in vivo</i> stability. Binding radionuclides to SPMN a multifunctional therapeutic agent is obtained, which with the combined effect of hyperthermia and radionuclide therapy, can have a great potential in the treatment of malignant tumors.</p> <p>The aim of this study is to synthesize and coat SPMN, to examine the possibilities of using coated SPMN in MHT, then to optimize the labeling conditions of monoclonal antibody CC49 (CC49 mAb) with ¹³¹I and to examine the conditions of conjugation of ¹³¹I-CC49 mAb with coated SPMN. Also, the aim is to investigate the biodistribution, retention and effect of dual therapy of the potential ¹³¹I-CC49-SPMN radiopharmaceutical <i>in vivo</i>.</p> <p>SPMN were synthesized using coprecipitation method from solution (coprecipitation method) and solvothermal method in polyols (polyol method). Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) and aminosilane (APTES) were used to coat SPMN. Characterization of uncoated and coated SPMN was performed using electron microscopy, X-ray powder diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, SQUID magnetometry and dynamic light scattering. Characterization of functionalized SPMN determined the influence of functional groups (carboxylic and amino) on the SPMN surface modification, while specific absorption determination investigated their potential use in magnetic hyperthermia. Coated SPMN that had a higher specific absorption value were further used in conjugation with the radiolabeled antibody. Labeling of CC49 mAb with ¹³¹I was performed using chloramine-T method, while the carbodiimide method was used for the conjugation of ¹³¹I-CC49 mAb with coated SPMN. The <i>in vitro</i> stability of ¹³¹I-CC49-SPMN was examined in saline and human serum by determination of radiochemical purity using thin layer chromatography.</p> <p>Data regarding the biodistribution, retention, and therapeutic effect of ¹³¹I-CC49-SPMN were obtained from studies in immunodeficient (NOD-SCID) mice injected subcutaneously with LS174T cancer cells, human colon adenocarcinoma cell line. Biodistribution and retention data were obtained at defined time intervals using a BRUKER®In-Vivo Xtreme II device and by measuring radioactivity distribution per organ. The effect of hyperthermia, radionuclide therapy, and their combined effects was examined by calculating tumor volume every other day after intratumoral injection of ¹³¹I-CC49-SPMN. Pathohistological studies were performed in order to determine toxicity and the therapeutic effect of ¹³¹I-CC49-SPMN.</p> <p>The obtained <i>in vitro</i> stability results together with the results of biodistribution, retention and therapeutic effect of ¹³¹I-CC49-SPMN refer to a conclusion that the use of ¹³¹I-CC49-SPMN in dual radionuclide-hyperthermic therapy is a promising approach for effective cancer treatment.</p>
Accepted on Scientific Board on:	26.11.2019.
Defended: (Filled by the faculty service)	
Thesis Defend Board: (title, first name, last name, position, institution)	President: Member: Member: Member: Member:
Note:	

Zahvalnica

Iskoristio bih priliku da se zahvalim svima koji su dali svoj doprinos u izradi moje doktorske disertacije.

Svojoj mentorki prof. dr Jasni Mihailović, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta, zahvaljujem se na ukazanom povjerenju, svesrdnoj i ljudskoj pomoći i entuzijazmu da bude mentor multidisciplinarnog istraživanja.

Neizmjernu zahvalnost dugujem svojoj mentorki dr Mariji Mirković, višem naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, na nevjerovatnoj energiji, trudu, razumijevanju, dragocjenim savjetima i idejama kojima su me vodili kroz izradu ove doktorske disertacije. Veliko hvala na neizmjernoj prijateljskoj pomoći i ogromnoj svakodnevnoj požrtvovanosti tokom izvođenja eksperimenata, pisanja naučnog rada i teze.

Dr Željku Prijoviću, naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, iskazujem zahvalnost na neiscrpnom i nesebičnom prenošenju kako stručnog tako i životnog znanja tokom ove saradnje. Hvala na entuzijazmu, upornosti i istrajnosti da sprovedemo sve eksperimente prikazane u okviru ove teze, i na pregršt smjernica tokom izrade eksperimentalnog rada i pisanja.

Posebno se zahvaljujem dr Drini Janković, naučnom savjetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, ne nesebičnoj pomoći u svim fazama oblikovanja doktorske disertacije, kao i na strpljenju za mnogobrojne diskusije i za pronalaženje rješenja za svaki izazov koji se našao tokom realizacije ove disertacije Zahvalan sam joj na prenesenom znanju, velikim i malim savjetima, kako o nauci i pedagoškom radu, tako i o životu.

Zahvaljujem se dr Sanji Vranješ Đurić, rukovodiocu Laboratorije za radioizotope Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici da se u Laboratoriji za radioizotope ekperimentalno uradi najveći dio disertacije. Hvala joj na zalaganju prilikom nabavke potrebnih hemikalija i materijala, na interesovanju koje je pokazala za rezultate ove teze, kao i svim sugestijama koje su doprinjele poboljšanju njenog kvaliteta.

Želim da se zahvalim dr Magdaleni Radović na savjetima i sugestijama tokom sinteze i oblaganja superparamagnetnih nanočestica i dr Zorani Milanović na stručnoj pomoći tokom eksperimenata na oglednim životinjama i vrlo korisnim komentarima tokom pisanja naučnog rada. Svim zaposlenima u Laboratoriji za radioisotope i Spoljnotrgovinskom prometu Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ hvala na kolegijalnosti, pomoći i podršci. Zahvaljujem se za druženje koje je u pojedinim momentima tokom izrade ovog rada bilo posebno dragocjeno. Vrijeme provedeno na institutu imalo je veliki uticaj u mom napredovanju kao naučnog radnika i „utabalo“ je put mog daljeg bavljenja naukom u budućnosti.

Milošu Ognjanoviću, istraživaču-saradniku u Laboratoriji za teorijsku fiziku i fiziku kondenzovane materije, želim da se posebno zahvalim na svim korisnim savjetima i nesebičnoj pomoći tokom fizičko-hemijske karakterizacije superparamagnetnih nanočestica i implementacije rezultata u naučni rad i disertaciju.

Dr Ivani Grković, naučnom saradniku iz Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju, sam posebno zahvalan za praktične savjete tokom bojenja patohistoloških preparata, dok ostalim kolegama iz ove laboratorije veliko hvala na svim međulaboratorijskim pozajmnicama.

Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Zvezdani Rajkovači, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta u Banjaluci, na riječima motivacije i razumijevanju problema koje samo jedan doktorand može da ima.

Dr Milici Mijović, vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Prištini-Kosovskoj Mitrovici, posebno se zahvaljujem na prenošenju znanja u interpretaciji patohistoloških ispitivanja, na optimizmu kojim zrači i na korisnim sugestijama tokom pisanja naučnog rada i disertacije.

Želim posebno da se zahvalim svojoj prijateljici i kolegici dr Tamari Gojković, asistentu na Katedri za biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, na pomoći da dobijeni rezultati budu statistički obrađeni.

Hvala puno mojoj Jeleni, što je bila strpljiva i uvijek tu uz mene da me sasluša, utješi i oraspoloži.

I na kraju, najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, roditeljima Emiri i Predragu, bratu Saši i baki Ani na razumijevanju, podršci i ljubavi koju mi bezgranično pružaju tokom čitavog mog školovanja. Hvala vam što vjerujete u mene i što me uvijek podsjećate da se svaki trud, kad tad, isplati. Vi ste najviše zaslužni što sam danas ovakva osoba i uvijek će te biti moj izvor motivacije i sreće.

Aljoša Stanković

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	4
2.1. Nanomedicina	4
2.2. Radionuklidna terapija	5
2.2.1. Prednosti i nedostaci radionuklidne terapije	7
2.2.2. Radioimunoterapija i selektivna unutrašnja radioterapija	12
2.3. Hipertermija	15
2.4. Magnetna hipertermija	16
2.4.1. Osobine i podjela magnetnih materijala	18
2.4.2. Superparamagnetizam i mehanizam nastajanja magnetne hipertermije.....	21
2.4.3. Superparamagnetne nanočestice.....	23
2.4.4. Sinergizam hipertermije i jonizujućeg zračenja	26
2.4.5. Klinička upotreba magnetne hipertermije i radioterapije.....	27
2.5. Primjena radionuklida sa SMNČ	30
2.6. Obilježavanje SMNČ radionuklidima.....	34
2.7. Razvoj nanomedicinskog preparata	36
2.7.1. Fizičko-hemijska karakterizacija SMNČ obilježenih radionuklidom	36
2.7.2. Biokompatibilnost i nanotoksikologija SMNČ obilježenih radionuklidom.....	37
2.7.3. Farmakokinetička i farmakodinamička ispitivanja SMNČ obilježenih radionuklidom.....	37
3. CILJEVI I RADNE HIPOTEZE.....	39
3.1. Ciljevi istraživanja	39
3.2. Radne hipoteze istraživanja	39
4. EKSPERIMENTALNI DIO	40
4.1. Sinteza superparamagnetnih nanočestica.....	43
4.1.1. Sinteza Fe ₃ O ₄ SMNČ.....	43
4.1.1.1. Sinteza SMNČ-a taloženjem iz rastvora (metoda koprecipitacije)	43

4.1.1.2. Sinteza SMNČ-a solvotermalnom metodom u poliolima (poliol metoda).....	44
4.1.2. Oblaganje sintetisanih SMNČ silanolnim grupama – APTES-SMNČ	45
4.1.3. Oblaganje sintetisanih SMNČ karboksilnim grupama – DMSA-SMNČ.....	46
4.2. Uređaji i metode za fizičko-hemijsku karakterizaciju SMNČ.....	46
4.2.1. Elektronska mikroskopija.....	46
4.2.2. Magnetna mjerenja	46
4.2.3. Rendgenska difrakcija na prahu (XRPD).....	47
4.2.4. Dinamičko rasejanje svjetlosti (DLS) i zeta (ζ) potencijal.....	47
4.2.5. Furijeova transformaciona infracrvena spektroskopija (FT-IR)	48
4.2.6. Mjerenja specifične apsorpcije.....	48
4.3. Optimizacija uslova obilježavanja CC49 monoklonskog antitijela sa ^{131}I	50
4.3.1. Obilježavanje humanog/goveđeg serum albumina sa ^{131}I	50
4.3.2. Obilježavanje nespecifičnog antitijela sa ^{131}I	52
4.3.3. Uticaj aktivnosti joda-131 na RCP obilježenog nespecifičnog antitijela	54
4.3.4. Ispitivanje cjelovitosti strukture radioobilježenog antitijela	54
4.4. Obilježavanje CC49 monoklonskog antitijela sa ^{131}I	57
4.4.1. Kvantifikacija ^{131}I -CC49 mAt.....	57
4.4.2. Ispitivanje imunoreaktivnosti ^{131}I -CC49 mAt.....	58
4.5. Konjugacija ^{131}I -CC49 mAt sa SMNČ	59
4.5.1. Postupak konjugacije ^{131}I -CC49 mAt sa obloženim SMNČ	59
4.5.2. Određivanje efikasnosti konjugacije ^{131}I -CC49 sa obloženim SMNČ.....	60
4.5.3. Određivanje <i>in vitro</i> stabilnosti ^{131}I -CC49-SMNČ	60
4.6. Tumorski ksenografti	61
4.7. Ispitivanje biološke raspodjele i retencije ^{131}I -CC49-SMNČ.....	62
4.8. Ispitivanje terapijskog efekta ^{131}I -CC49-SMNČ	63
4.9. Patohistološka ispitivanja.....	65
4.10. Statistička obrada podataka	66

5. REZULTATI I DISKUSIJA	67
5.1. Sinteza i karakterizacija SMNČ na bazi Fe ₃ O ₄	67
5.1.1. Karakterizacija TEM metodom	68
5.1.2. Magnetne osobine SMNČ	69
5.2. Karakterizacija obloženih SMNČ-a.....	71
5.2.1. Karakterizacija XRPD metodom.....	71
5.2.2. Karakterizacija DLS metodom i određivanje zeta (ζ) potencijala.....	72
5.2.3. Karakterizacija FT-IR metodom	74
5.2.4. Mjerenja specifične brzine apsorpcije (magnetna hipertermija)	78
5.3. Optimizacija uslova obilježavanja CC49 monoklonskog antitijela sa ¹³¹ I	81
5.3.1. Obilježavanje humanog/goveđeg serum albumina sa ¹³¹ I.....	81
5.3.2. Obilježavanje nespecifičnog antitijela sa ¹³¹ I.....	82
5.3.3. Uticaj dodate aktivnosti joda-131 na RCP obilježenog nespecifičnog antitijela .	84
5.4. Obilježavanje CC49 monoklonskog antitijela sa ¹³¹ I	87
5.4.1. Kvantifikacija ¹³¹ I-CC49 mAt.....	88
5.4.2. Ispitivanje imunoreaktivnosti ¹³¹ I-CC49 mAt.....	90
5.5. Konjugacija ¹³¹ I-CC49 mAt sa APTES-SMNČ.....	91
5.5.1. Efikasnosti konjugacije ¹³¹ I-CC49 sa APTES-SMNČ	91
5.5.2. <i>In vitro</i> stabilnost ¹³¹ I-CC49-SMNČ	97
5.6. Ispitivanje biodistribucije i retencije.....	98
5.6.1. Biodistribucija ¹³¹ I-CC49-SMNČ.....	98
5.6.2. Ispitivanje retencije ¹³¹ I-CC49-SMNČ.....	103
5.7. Terapijski efekat ¹³¹ I-CC49-SMNČ.....	108
5.8. Patohistološka analiza.....	115
6. ZAKLJUČAK.....	120
7. LITERATURA	122
8. PRILOG	136

LISTA SKRAĆENICA

ABTS	2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolin-6 sulfonska kiselina) diamonijum so
ADCC	ćelijska citotoksičnost zavisna od antitijela (engl. <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>)
APS	amonijum persulfat
APTES	(3-aminopropil)trietoksisilan
ATR	atenuirana totalna refleksija
BSA	goveđi serum albumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
CC49 mAt	anti-TAG 72 humano monoklonsko antitijelo (IgG1)
CDC	citotoksičnost zavisna od komplementa (engl. <i>complement-dependent cytotoxicity</i>)
CEA	karcinoembrionski antigen (engl. <i>carcino embrionic antigen</i>)
CT	kompjuterska tomografija (engl. <i>computed tomography</i>)
DEG	dietilenglikol
DLS	Dinamičko rasejanje svijetlosti (engl. <i>dynamic light scattering</i>)
DMSA	mezo-2,3-dimerkaptosukcinska kiselina (engl. <i>dimercaptosuccinic acid</i>)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
DOTA	dodekan tetrasirćetna kiselina (engl. <i>dodecane tetraacetic acid</i>)
DTT	ditiotreitol
EDC	1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] karbodiimidhidrohlorid
EDTMP	etilen diamin tetrametilen fosfonat (engl. <i>ethylene diamine tetramethylene phosphonate</i>)
ELISA	imunoenzimski test (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EMA	Evropska agencija za lijekove(engl. <i>European Medicines Agency</i>)
EPR	efekat povećane propustljivosti i zadržavanja
EU	Evropska unija
FDA	Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. <i>Food and Drug Administration</i>)
FT-IR	Furijeova transformaciona infracrvena spektroskopija (engl. <i>Fourier transform infrared</i>)
Hbe7 mAt	anti-Hep B eAg mišije monoklonsko antitijelo (IgG1)
HCC	hepatocelularni karcinom (engl. <i>hepatocellular carcinoma</i>)
HE	hematoksilin/eozin
Hep B eAg	e antigen hepatitisa B
HL-T	hloramin – T
HPLC	visokoeffikasna tečna hromatografija pod visokim pritiskom (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP	peroksidaza iz korijena hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
HSA	humani serum albumin

HT	hipertermija
Ig	imunoglobulin
IHH	imunohistohemija
IL-10	interleukin 10
IL-6	interleukin 6
IR	infracrvena/o (engl. <i>infrared</i>)
LD ₅₀	srednja smrtonosna doza supstance ili količina supstance koja je potrebna za letalan ishod kod 50% date populacije ispitanika (engl. <i>Median Lethal Dose</i>)
LET	linearni transfer energije (engl. <i>linear energy transfer</i>)
LSD test	test najmanje značajne razlike (engl. <i>Least Significant Difference post hoc test</i>)
mAt	monoklonsko antitijelo
MHT	magnetna hipertermija
MIBG	meta-jodbenzil gvanidin (engl. <i>meta-iodobenzylguanidine</i>)
MRI	magnetna rezonanca (engl. <i>magnetic resonance imaging</i>)
M _s	magnetna saturacija
MWCO	najniža vrijednost molekulske mase jedinjenja koja ostaje na membrani prilikom dijalize (engl. <i>molecular weight cut-off</i>)
NMDEA	N-metildietanolamin
NOD	negojazni dijabetični (engl. <i>non-obese diabetic</i>)
OD	optička gustina (engl. <i>optical density</i>)
PBS	fiziološki rastvor puferisan fosfatom (engl. <i>phosphate saline buffer</i>)
PBST	0,05% (v/v) Tween [®] 20 u fiziološkom rastvoru puferisanim fosfatom (engl. <i>phosphate buffered saline with Tween[®] 20</i>)
PEG	polietilen glikol
PET	pozitron emisiona tomografija (engl. <i>positron emission tomography</i>)
PP	prusko plavo
PTX	paklitaksel
RCP	radiohemijska čistoća (engl. <i>radiochemical purity</i>)
RES	retikuloendotelni sistem
RIT	radioimunoterapija
RNK	ribonukleinska kiselina
ROS	reaktivna kiseonična vrsta (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
RPMI-1640 medijum	medijum za kultivaciju tumorskih ćelijskih kultura (od engl. <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>)
RT	radionuklidna terapija
scFv	fragment koji se sastoji od po jednog dijela teškog i lakog lanca hipervarijabilne regije Fab fragmenta antitijela (engl. <i>single-chain variable fragment</i>)
SAD	Sjedinjene Američke Države
SCID	teška kombinovana imunodeficijencija (engl. <i>severe combined immunodeficiency</i>)

SD	standardna devijacija
SE	standardna greška (engl. <i>standard error of the mean</i>)
siRNK	mala interferirajuća ribonukleinska kiselina (engl. <i>small interfering RNA</i>)
SIRT	selektivna unutrašnja radioterapija (engl. <i>selective internal radiation therapy</i>)
SMP	spoljašnje naizmjenično magnetno polje
SMNČ	superparamagnetne nanočestice
SPA	specifična apsorpcija (engl. <i>specific power adsorption</i>)
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. <i>solid phase extraction</i>)
SPECT	jednofotonska emisiona kompjuterska tomografija (engl. <i>single photon emission computed tomography</i>)
SDS	natrijum-do-decilsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SDS-PAGE	poliakrilamid gel elektroforeza u prisustvu deterdženta natrijum-do-decilsulfata (engl. <i>sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
TAG-72	tumorski glikoprotein 72 (engl. <i>tumor-associated glycoprotein 72</i>)
TEMED	tetrametiletildiamin
TLC	tankoslojna hromatografija (engl. <i>thin layer chromatography</i>)
TLC silika-gel	aluminijumske trake na koje je nanet silika-gel (Kieselgel 60) za tankoslojnu hromatografiju
TVIR	stopa inhibicije tumorske zapremine (engl. <i>tumor volume inhibitory rate</i>)
XRPD	difrakcija X-zraka na prahu (engl. <i>X-ray powder diffraction</i>)

1. UVOD

Posljednjih 20 godina napredak u nanomedicini je doveo do razvoja novih nanostrukturnih materijala, čijom je upotrebom u izradi farmaceutskih oblika, omogućeno da lijekovite supstance sa nepovoljnijim farmakokinetičkim profilom budu distribuisane do mjesta djelovanja u količini koja će izazvati željeni farmakološki odgovor. Upotreba lijekova u obliku nanoformulacija je dovela do smanjenja primjenjene doze lijeka, bolje komplijanse pacijenata i smanjenja broja neželjenih reakcija (1).

Radionuklidna terapija (RT) predstavlja selektivnu isporuku zračenja tumorskom tkivu, primjenom jednog ili više radioizotopa (α , β , Ožeo elektron emitera) u sastavu radiofarmaceutika, čime inhibira rast tumorskih ćelija sa minimalnim toksičnim efektima na okolno zdravo tkivo. Prva primjena u onkologiji je bila četrdesetih godina prošloga vijeka, kada se radiokativni jod (^{131}I) počeo koristiti u liječenju tumora štitaste žlijezde (2,3). RT se pokazala vrlo efikasnom u terapiji hematoloških maligniteta (4), dok su lošiji rezultati ostvareni u terapiji teško dostupnih solidnih tumora. Razlog tome su hipoksični uslovi unutar tumora koji pojačavaju rezistenciju tumorskih ćelija na zračenje (5). Magnetna hipertermija (MHT) koja predstavlja oslobađanje toplote od strane različitih medijatora pod uticajem spoljašnjeg naizmjeničnog magnetog polja (SMP) određene jačine i frekvencije, je metoda koja dokazano povećava efikasnost RT (6).

Superparamagnetne nanočestice (SMNČ) na bazi gvožđe(II) i gvožđe(III) oksida, magnetit (Fe_3O_4) i maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), pokazale su značajnu prednost u odnosu na druge nanočestice u MHT zbog svoje hemijske stabilnosti, niske toksičnosti, povoljnih magnetnih osobina (visoka magnetna saturacija) i niske cijene proizvodnje (7,8).

Vezivanjem radionuklida za različite funkcionalne grupe na površini obloženih, biokompatibilnih SMNČ dobija se multifunkcionalni terapijski agens koji kombinovanim efektom hipertermije i radionuklidne terapije može imati veći potencijal u terapiji malignih tumora (9).

Istraživanja u okviru doktorske disertacije se sastoje iz tri dijela. U prvom dijelu je rađena sinteza i karakterizacija neobloženih i obloženih SMNČ. SMNČ na bazi oksida gvožđa

su sintetisane pomoću dvije metode: taloženjem iz rastvora (metoda koprecipitacije) i solvotermalnom metodom u poliolima (poliol metoda).

Površinska modifikacija SMNČ-a je urađena u cilju stabilizacije koloidne suspenzije i sprečavanja stvaranja aglomerata, kontrole veličine čestica, povećanja rastvorljivosti u fiziološkim uslovima i smanjenja toksičnosti. Pošto se sve češće za obloge SMNČ-a koriste hemijska jedinjenja koja se obilježena sa ^{99m}Tc primenjuju kao radiofarmaceutici u dijagnostičkim procedurama u nuklearnoj medicini, SMNČ su obložene mezo-2,3-dimerkaptosukcinskom kiselinom (DMSA) (10). Nakon oblaganja SMNČ ovim jedinjenjem, na površini SMNČ-a prisutan je veliki broj karboksilnih grupa ($-\text{COOH}$) koje se mogu koristiti za vezivanje radionuklida. Takođe, oblaganje je urađeno i vezivanjem aminosilana (APTES) za SMNČ, čime je na površini dobijen veliki broj slobodnih amino grupa ($-\text{NH}_2$) koje se isto mogu koristiti kao donori elektrona za vezivanje (11). Karakterizacija sintetisanih neobloženih i obloženih SMNČ je izvedena različitim metodama kojima je utvrđen uticaj modifikacije površine SMNČ-a na veličinu čestica, morfologiju, površinsko naelektrisanje i magnetne osobine.

Drugi dio obuhvata optimizaciju uslova obilježavanja monoklonskog CC49 antitijela (CC49 mAt) terapijskim radionuklidom ^{131}I i konjugaciju obilježenog CC49 mAt sa obloženim SMNČ. Nakon obilježavanja radionuklidom ^{131}I koji emituje β zračenje energije 606 keV i γ -zračenje energije 364 keV, omogućeno je ne samo primjeniti obilježene SMNČ u terapiji već i efikasno pratiti biodistribuciju obilježenih SMNČ. Optimizacija uslova obilježavanja metodom sa hloraminom-T (HL-T) je izvedena korišćenjem proteina i nespecifičnog monoklonskog antitijela i određivanjem parametara koji obezbjeđuju visoku radiohemijsku čistoću. Radiohemijska čistoća je ispitivana primjenom tankoslojne hromatografije (TLC) gdje je kao stacionarna faza korišćena aluminijska folija na koju je nanesen silikagel (TLC silika-gel), a kao mobilna faza 85% metanol. Nakon optimizacije, korištenjem oksidacionog agensa HL-T izvršeno je obilježavanje CC49 mAt sa ^{131}I . Prečišćavanje rastvora obilježenog antitijela od viška reaktivnih $^{131}\text{I}^+$ je urađeno korištenjem gel filtracione kolone napunjene Sephadex[®] G-25. Očuvanje integriteta antitijela nakon obilježavanja i prečišćavanja se ispitalo upotrebom elektroforeze na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) (12). Konjugacija obloženih SMNČ sa obilježenim antitijelom je izvršena upotrebom reagensa 1-etil-3-(dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC) u blago kiseljoj sredini.

Neophodno je da sintetisani kompleks $^{131}\text{I-CC49-SMN}\check{\text{C}}$ kao potencijalni radiofarmaceutik bude stabilan u toku vremena u kome se postiže terapijski efekat. Pošto radionuklid ^{131}I ima vrijeme poluraspada od 8 dana, *in vitro* stabilnost $^{131}\text{I-CC49-SMN}\check{\text{C}}$ je ispitana u fiziološkom rastvoru i humanom serumu tokom 8 dana određivanjem njegove radiohemijske čistoće koristeći tankoslojnu hromatografiju. Ispitivane su različite mobilne faze (85% metanol, fiziološki rastvor i aceton) i stacionarne faze (silika gel i celuloza), a kombinacijom 85% metanola kao mobilne faze i TLC silika-gel traka kao stacionarne faze su dobijeni najpouzdaniji i najreproduktivniji rezultati.

U trećem dijelu doktorske disertacije obuhvaćena su ispitivanja biodistribucije i retencije, kao i terapijskog efekta $^{131}\text{I-CC49-SMN}\check{\text{C}}$. Podaci vezani za *in vivo* stabilnost i specifičnost $^{131}\text{I-CC49-SMN}\check{\text{C}}$ dobijeni su praćenjem biološke raspodjele i retencije na imunodeficientnim (NOD-SCID) miševima kojima su subkutano bile injektovane LS174T ćelije kancera, koje predstavljaju ćelijsku liniju humanog adenokarcinoma kolona. Suspenzija $^{131}\text{I-CC49-SMN}\check{\text{C}}$ je intravenski injektovana miševima za ispitivanje biodistribucije, a intratumorski miševima za ispitivanje retencije. Biodistribucija i retencija su praćene u tačno određenim vremenskim intervalima u ketaminom/ksilazinom anesteziranim životinjama pomoću BRUKER[®]In-Vivo Xtreme 2 uređaja. Biodistribucija i retencija su određene i mjerenjem radioaktivnosti u uzorku krvi (uzetom graduisanom kapilarom) i organima od interesa nakon žrtvovanja životinja metodom cervikalne dislokacije, u tim istim vremenskim intervalima.

Efekat hipertermije, radionuklidne terapije i njihovog kombinovanog dejstva je ispitan primjenom $^{131}\text{I-CC49-SMN}\check{\text{C}}$ na tumor nosivim NOD-SCID miševima izračunavanjem zapremine tumora svaki drugi dan nakon intratumorskog injektovanja. Takođe, sprovedena su i patohistološka ispitivanja na presjecima organa od interesa i tumora u cilju određivanja toksičnosti i potvrde terapijskog efekta $^{131}\text{I-CC49-SMN}\check{\text{C}}$.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Nanomedicina

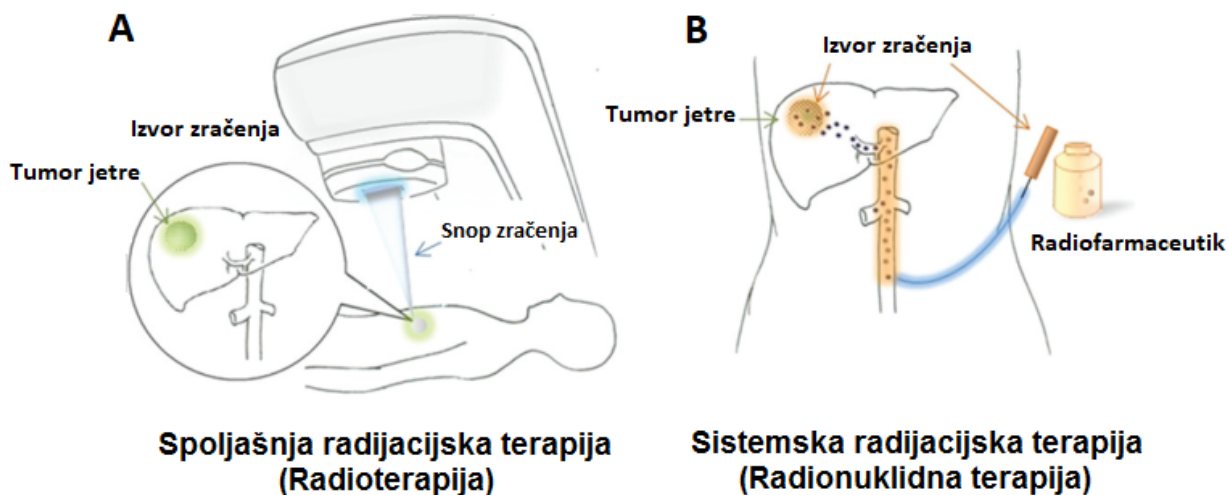
Nanomedicina predstavlja upotrebu nanotehnologije u medicinske svrhe koristeći nanomaterijale za dijagnozu, praćenje, kontrolu, prevenciju i liječenje bolesti (13). Nanomaterijali se definišu kao prirodni ili vještački materijali, koji sadrže slobodne ili aglomerirane čestice, pri čemu su dimenzije za više od 50% čestica u rasponu od 1-100 nm. U posljednje vreme upotreba nanotehnologije u razvoju novih lijekova je od velikog interesa u svijetu, jer nudi nova i inovativna rješenja za već postojeće i buduće medicinske izazove (14). Nanomaterijali kao što su nanočestice, lipozomi, dendrimeri, micle, nanokristali, nanoemulzije, polimersko-proteinski konjugati i nanokompleksi se sve više primjenjuju u oblasti formulacije lijekovitih oblika u cilju poboljšanja njihovog dijagnostičkog i terapijskog efekta (15,16).

Korištenjem nanomaterijala u izradi farmaceutskih oblika, lijekovitim supstancama sa nepovoljnijim farmakokinetičkim profilom je omogućeno da budu distribuisane do mjesta djelovanja u količini koja će izazvati željeni farmakološki odgovor. Korištenje lijekova u nanoformulacijama je dovelo do smanjenja primjenjene doze lijeka, bolje komplijanse pacijenata i smanjenja broja neželjenih reakcija (1). U 2014. godini registrovane su nanoformulacije 43 lijeka (najviše citostatika) vrijednosti 20 milijardi dolara (17). Bez obzira što je među njima najmanji broj nanočestica na bazi neorganskih materijala (zlato, srebro, gvožđe oksid i silika), ova vrsta nanočestica je pokazala dobru biokompatibilnost zbog velikog potencijala u funkcionalizaciji njihovih površina. Osim lijekova za funkcionalizaciju površina nanočestica mogu se koristiti i drugi agensi (radionuklidi, antitijela i dr.) koji mogu značajno poboljšati njihovo biološko ponašanje u organizmu.

2.2. Radionuklidna terapija

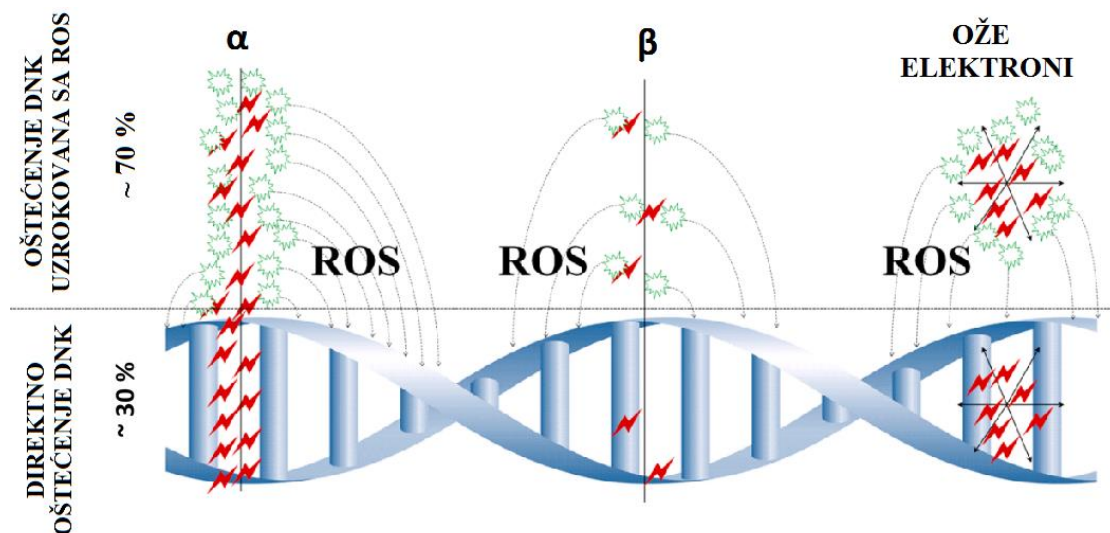
Radionuklidna terapija (RT) se zasniva na isporuci terapijskih doza radioaktivnog zračenja bolesnom tkivu sa minimalnim toksičnim efektima na okolno zdravo tkivo, pomoću specifičnih liganada kao što su antitijela, fragmenti antitijela, peptidi i niskomolekularni ligandi vezani za odgovarajući radionuklid. Ligand obilježen radionuklidom koji nosi citotoksičnu količinu zračenja emitujući α , β i Ože (Auger) čestice predstavlja radiofarmaceutik (3). U RT-u terapijski radiofarmaceutik unet parenteralno ili oralno ispoljava svoje dejstvo na molekularnom nivou zahvaljujući receptorima, enzimima ili antigenima na toj molekuli za koju je on specifičan. Nosilac specifičnosti radiofarmaceutika da se vezuje za odgovarajuće receptore na tumorskoj ćeliji je ligand, a u dosta slučajeva i sam radionuklid koji je i ujedno nosilac terapijskog efekta. RT se razlikuje od tradicionalne radioterapije (spoljašnje zračenje X zracima/braheterapija) u istom smislu kao terapija lijekovima od hirurškog tretmana. Za razliku od hirurgije i radioterapije, čiji zahvati su usmjereni na specifičnu stranu organa ili na veću ćelijsku grupu/dio tkiva, prema riječima *Paul Ehrlich*-a, princip RT je princip „magičnog metka“, koji nalazi svoju specifičnu metu i donosi radionuklid koji inhibira njenu funkciju i uništava je (slika 1) (2).

Potreba za liječenjem minimalnih ostataka i mirkometastaza tumorskih ćelija je sve veća, jer su hirurgija i radioterapija slabo efikasne kada dođe do diseminacije tumora. Takođe, primjena hemioterapije kod pojedinih vrsta karcinoma i dalje nije dovoljno efikasna a dodatno ograničenje u upotrebi predstavljaju i neželjeni efekti, bez obzira na veliki razvoj u drugoj polovini 20 vijeka. Za razliku od sistemske hemioterapije, cilj RT je selektivna isporuka zračenja ćeliji karcinoma u količini da izaziva minimalnu toksičnost u okolnom zdravom tkivu (18).



Slika 1. A. Ilustracija radioterapije. B. Ilustracija radionuklidne terapije (19).

Ozračene ćelije primaju veliku energiju u obliku fotona i/ili naelektrisanih čestica, što može dovesti do makromolekulskih oštećenja ćelije. Primarna meta zračenja predstavlja DNK molekula, koju zračenje oštećuje direktnim kidanjem veze ili indirektno stvaranjem reaktivnih kiseoničnih/azotnih vrsta (ROS) ili slobodnih radikala (slika 2).



Slika 2. Efekat zračenja na DNK ćelije (20).

Kako u najvećem procentu ćeliju čini voda, 70% oštećenja DNK je indirektno oštećenje a najčešći uzročnik su hidroksilni joni (OH^\cdot). Slobodni radikali, kao i zračenje uzrokuju

oštećenja DNK lanaca (21,22), što dovodi ne samo do apoptoze, nego i do programirane nekroze (23).

U kolikom je porastu upotreba RT-a govori podatak da se u 2% evropske i američke populacije primjenjuju procedure nuklearne medicine, a od toga 10% su procedure RT-a (1 000 000 procedura u Evropi godišnje). Pretpostavlja se da će u Australiji polovina stanovništva biti izložena nuklearnom zračenju u terapijske svrhe (24).

2.2.1. Prednosti i nedostaci radionuklidne terapije

Osnova uspješne radionuklidne terapije je u selektivnom koncentrisanju i produženoj retenciji radiofarmaceutika unutar tumora. Odgovor tumora na terapiju zavisi od mnogih faktora kao što su: kumulativna doza isporučena tumoru, penetracija zračenja i osjetljivost tumora na zračenje. Efekat radijacije je maksimalan kada je cijela doza zračenja absorbovana u tumoru. U praksi se ovo često ne dešava, zbog bioloških gubitaka.

Podobnost pojedinačnog radionuklida za određenu vrstu tumora, zavisi od njegovih hemijskih i fizičkih osobina, načina i cijene proizvodnje, specifične aktivnosti, radionuklidne čistoće kao i njegovog biološkog ponašanja (mogućnost oslobađanja iz kompleksa *in vivo*). Trenutno se u kliničkim i prekliničkim RT istraživanjima koristi 13 β -emitujućih radionuklida (^{177}Lu , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{67}Cu , ^{149}Pm , ^{199}Au , ^{77}Br , ^{153}Sm , ^{105}Rh , ^{89}Sr , ^{90}Y i ^{131}I) i 4 α -emitujuća radionuklida (^{213}Bi , ^{223}Ra , ^{225}Ac i ^{211}At) (25,26).

U tabeli 1 su prikazani najčešće korišćeni terapijski radionuklidi sa vrstama zračenja i maksimalnim dometom u tkivu (20).

Tabela 1. Najzastupljeniji terapijski radionuklidi u kliničkoj praksi.

Radionuklid	Vrsta zračenja (keV)	Maksimalni domet u tkivu	Vrijeme poluraspada ($T_{1/2}$)	Dobijanje
^{131}I	β (606) γ (364)	2,5-3 mm	8,04 dana	^{130}Te (n, γ , β^-) ^{131}I ^{235}U (n,fisija)
^{90}Y	β (2280)	12 mm	64 h	$^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ generator ^{89}Y (n, γ) ^{90}Y
^{177}Lu	β (500) γ (113,208)	1,5 mm	2,7 dana	^{176}Yb (n, γ , β^-) ^{177}Lu ^{176}Lu (n, γ) ^{177}Lu
^{153}Sm	β (807) γ (103)	3 mm	46,3 h	^{152}Sm (n, γ) ^{153}Sm
^{89}Sr	β (1463)	8 mm	50,5 dana	^{88}Sr (n, γ) ^{89}Sr ^{89}Y (n, p) ^{89}Sr
^{186}Re	β (1070) γ (137)	3,6 mm	3,72 dana	^{185}Re (n, γ) ^{186}Re
^{188}Re	β (2120) γ (155)	11 mm	17 h	$^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generator
^{211}At	α (6800)	80 μm	7,2 h	^{209}Bi (α ,2n) ^{211}At
^{213}Bi	α (8300)	84 μm	46 min	$^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ generator
^{225}Ac	α (6000-8000)	60~90 μm	10 dana	^{226}Ra (p,2n) ^{225}Ac
^{64}Cu	Ože elektron	2~500 nm	64 h	^{64}Ni (p,n) ^{64}Cu

Radionuklidi koji emituju α ili β čestice visokih energija su više podobni za terapije solidnijih (glomaznijih) tumora dok emiteri Ože elektrona, zbog svoje visoke citotoksičnosti a kratkog dometa, mogu više doprineti kod eradikacije malih tumora ili malih grupica karcinomskih ćelija. Međutim, emiteri Ože elektrona moraju biti blizu DNK da bi ispoljili svoj efekat, što se može desiti jedino ako je biodistribucija radiofarmaceutika u blizini DNK (27). Ukoliko radionuklid emituje i γ zračenje, postoji mogućnost praćenja farmakokinetičkih parametara, izračunavanja dozimetrije i praćenja efekta terapije. Radionuklidi koji imaju takvu mogućnost su ^{131}I i ^{177}Lu , koji su zajedno sa ^{90}Y najviše izučavani β emiteri. Zbog energije zračenja od 0,5 MeV i penetracije u tkivu koja je ≤ 2 mm, ^{177}Lu dobija sve veću pažnju, jer energija ostaje u tumoru više nego u okolnom zdravom tkivu. Za razliku od ^{90}Y koji posjeduje veću energiju, čiji domet čestica je 12 mm, ^{177}Lu se može koristiti za terapiju manjih tumora.

Njegova sličnost sa ^{90}Y je u radiohemiji obilježavanja antitijela, jer su mu neophodni helatori, dok ^{131}I stvara direktnu ugljenik - jod vezu.

Sve veće interesovanje je za upotrebu α -emitera zbog isporuke velike količine energije okolnim molekulama u uskom radijusa (ca. 100 μm , nekoliko ćelijskih prečnika). Zbog visokog transfera energije (LET) moguća je selektivna i lokalizovana citotoksičnost sa poštedom okolnog tkiva. Šta više, efekat α -čestica je nezavisan od ciklusa ćelija i lokalne koncentracije kiseonika (28).

Iz svega navedenog zaključci su da RT ima veliku prednost u odnosu na radioterapiju spoljašnjim zračenjem u terapiji: rezidualnih mikrostatskih lezija, rezidualnih tumorskih ostataka nakon hiruške intervencije, hematoloških maligniteta (4,29).

Međutim, danas postoji velika potreba za terapijom solidnih inoperabilnih tumora, gdje je radionuklidna terapija pokazala ograničenja. Odgovori solidnih tumora na RT su veoma niski, a razlog tome su hipoksični uslovi koji vladaju unutar tumora.

Kao što je već rečeno, primarna meta zračenja je DNK molekula, koju zračenje oštećuje direktnim kidanjem veze i u većem procentu indirektno stvaranjem ROS-a ili slobodnih radikala. ROS reagujući sa DNK molekulom, kidaju njene veze i stvaraju dvije nove nestabilne molekule koje se, ukoliko je kiseonik odsutan, ponovo spajaju i DNK biva reparirana a ROS se neutrališu vodonikom iz okoline. Međutim, u prisustvu kiseonika stvaraju se nove ROS i reakcije prekida veze DNK molekule se nastavlja. Jednostruki prekid veze se može reparirati, dok je dupli prekid veze nepopravljiv, što dovodi do smrti ćelije (30).

Pošto tumori rastu brže nego okolno tkivo, oni razvijaju svoju sopstvenu vaskulaturu, koja je funkcionalno i morfološki primitivna. Nemogućnost isporuke kiseonika i hranljivih sastojaka do svake ćelije u tumoru dovodi do stvaranja hipoksičnih regiona u tumoru, koji su radiorezistenti zbog nemogućnosti stvaranja ROS (31). Nekada je potrebno tri puta veća doza zračenja da bi izazvalo isti stepen oštećenja u hipoksičnim ćelijama u odnosu na ćelije normalno snabdjevene kiseonikom (32). Ukoliko je koncentracija kiseonika manja od 0,02%, smanjena je osjetljivost ćelija na jonizujuće zračenje (33). Čak i blaga hipoksija stvara određen nivo rezistencije (34).

Veliki problem predstavlja što terapijski radiofarmaceutici ne penetriraju u tumor više od tri do pet ćelijskih prečnika od krvnog suda, što rezultuje u nedostatku zračenja na udaljenije tumorske ćelije. I pored prednosti RT-a, strategije ciljanja tumora su često ograničene nedovoljnom isporukom radionuklida u tumorsko tkivo zbog nekada relativno niske i heterogene ekspresije receptora na površini ćelija (35).

Iako postoji mogućnost vještačke proizvodnje do 3800 izotopa, danas manje od 50 ima kliničku upotrebu (36). Najviše klinički korišćeni terapijski radiofarmaceutici su dati u tabeli 2.

Tabela 2. Najzastupljeniji terapijski radiofarmaceutici za kliničku upotrebu.

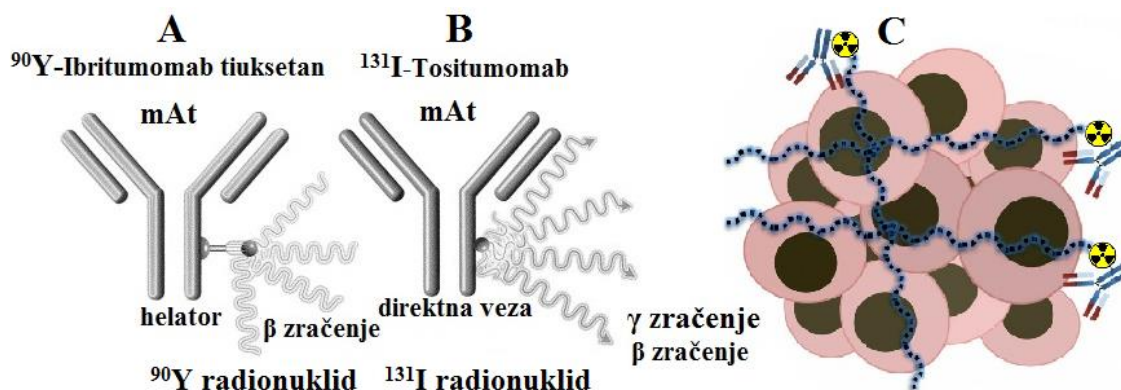
Radiofarmaceutik	Mehanizam djelovanja	Indikacija
Na^{131}I	Sinteza tiroidnih hormona	Diferencijalni karcinom štitaste žlijezde
^{131}I -MIBG	Aktivni transport u neuroendokrine ćelije	Neuroblastom Feohromocitom Paragangliom Medularni karcinom štitaste žlijezde
^{131}I -Tositumomab	CD 20 antigen na B-limfocitima	Non-Hodžkin limfom
^{90}Y -Ibritumomab tiuksetan	CD 20 antigen na B-limfocitima	Non-Hodžkin limfom
^{131}I -Lipiodol	Intravaskularna lokalizacija	Hepatocelularni karcinom Metastaze karcinoma jetre
^{90}Y -mikrosfere	Intravaskularna lokalizacija	Hepatocelularni karcinom Metastaze na jetri
$^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA peptidi	Somatostatinski receptor	Neuroendokrini tumori
^{177}Lu -PSMA-617 ^{90}Y -PSMA-617	Specifični prostatični membranski antigen	Karcinom prostate
^{90}Y -citrat koloid, ^{186}Re -heptasulfid koloid, ^{169}Er -citrat	Intraartikularna aplikacija	Radiosinovijektomija
$^{89}\text{SrCl}_2$	Analog kalcijuma	Palijativna terapija bolova uzrokovana metastazama u kostima
^{153}Sm -EDTMP	Hemoadsorpcija	Palijativna terapija bolova uzrokovana metastazama u kostima
$^{223}\text{RaCl}_2$	Analog kalcijuma	Karcinom prostate sa metastazama u kostima

Od prikazanih terapijskih radiofarmaceutika najviše se upotrebljava radiokativni jod (^{131}I) koji je i prvi radionuklid korišten u RT-u. Njegova upotreba datira još od 1947. godine i danas je u obliku Na^{131}I nezamjenljiv u terapiji hiperfunkcije i diferencijalnog karcinoma štitaste žlijezde. Kao kateholamisnki analog, meta- (^{131}I) jodobenzilguanidin (^{131}I -MIBG), koristi se u terapiji neuroendokrinih tumora. Takođe, njegova upotreba je zastupljena u još dva vida RT-a: radioimunoterapiji (RIT) i selektivnoj unutrašnjoj radioterapiji (SIRT).

2.2.2. Radioimunoterapija i selektivna unutrašnja radioterapija

Radioimunoterapija (RIT), kao jedan oblik RT-a, ima takođe dugogodišnju upotrebu (30 godina) u terapiji tumora. Princip RIT-a je korišćenje antitijela kao nosača letalne radijacijske doze β zračenja.

Antitijela (imunoglobulini) su glikoproteini (82-96% proteini, 4-18% ugljeni hidrati) prisutni na površini B limfocita, u plazmi, međucelijskoj tečnosti i sekretima egzokrinih žlijezda. Antitijela su nosioci humoralne imunosti i kroz mehanizam ćelijske citotoksičnosti zavisne od antitijela (ADCC) i citotoksičnosti zavisne od komplementa (CDC), dovode do destrukcije antigena. Trenutno je na tržištu Evropske unije (EU) i Sjedinjenih Američkih Država (SAD) više od 30 antitijela odobrenih od strane Evropske agencije za lijekove (EMA) i Agencije za hranu i lekove (FDA), dok je oko 350 antitijela u različitim fazama kliničkih studija. Najviše antitijela na tržištu se koriste u terapiji kancera (37). Osnovna subjedinica svih antitijela se sastoji od dva identična duža polipeptidna lanca (teški lanci, H) i dva međusobno identična kraća polipeptidna lanca (laki lanci, L). Laki lanci su sastavljeni od oko 220 aminokiselina, a teški od oko 440 aminokiselina i sva 4 lanca su povezana disulfidnim vezama u četvoročlanu jedinicu u obliku slova Y. Enzimskom digestijom izdvojeni su i okarakterisani Fab (N-terminalni) fragmenti kao mjesto specifične reakcije sa antigenom i Fc (C-terminalni) fragmenti koji učestvuju u sekundarnim funkcijama molekula (vezivanje komplementa, makrofaga i dr.). U RIT-i se koristi klasa G antitijela (IgG), koja je i najzastupljenija klasa antitijela u organizmu kod ljudi, dok je IgG1 potklasa najefikasnija u aktivaciji oba navedena efektorska mehanizma (ADCC i CDC) što je čini najprikladnijom za korišćenje u terapiji tumora (38). Kako bi se očuvala imunogenost antitijela na Fab fragmentu, terapijski radionuklid se konjuguje na Fc fragment antitijela. Antitijela obilježena radionuklidima na Fc fragmentu reaguju Fab fragmentom sa antigenom na tumorskim ćelijama i dvostrukim mehanizmom dovodi do smrti ćelija. Mehanizam citotoksičnog dejstva RIT, osim apoptoze ćelije zbog izlaganja β zračenju, se sastoji i u efektu imunog odgovora organizma kroz ADCC i CDC mehanizam (39). Velika prednost RIT-a i β emitera je tzv. efekat unakrsne vatre („*crossfire*“ efekat), gdje visoko-energetske β čestice emitovane sa antitijela dosežu i reaguju direktno sa tumorskim ćelijama za koje se antitijelo nije vezalo (slika 3) (40).

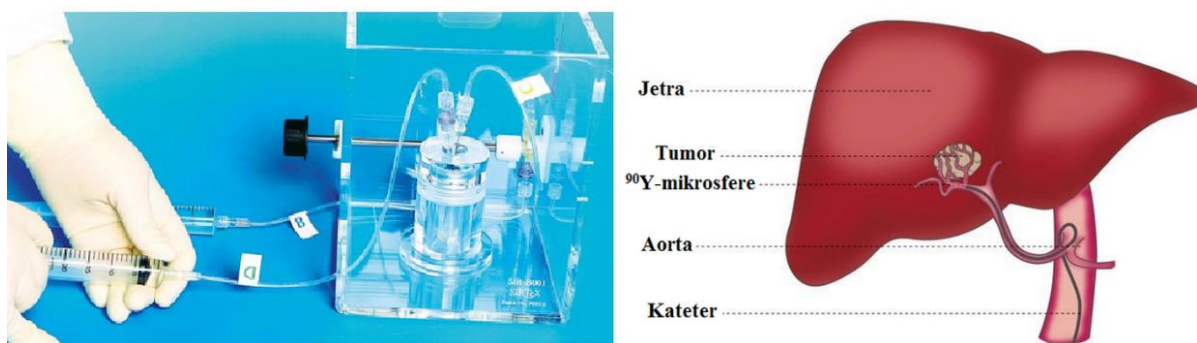


Slika 3. A. i B. Strukture radiofarmaceutika Zevalin®-a i Bexxar®-a. C. Princip efekta unakrsne vatre ("crossfire effect") (40,41).

Efekat je vrlo značaj kod teško dostupnih tumora kao i tumora koji nemaju odgovarajuće antigene (42). ^{90}Y -Ibritumomab tiuksetan (Zevalin®, Spectrum Pharmaceuticals, Inc.) je prvo radioobilježeno anti-CD 20 IgG1 antitijelo koje je dobilo dozvolu za promet 2002. godine od FDA za RIT relapsiranog ili rezistentnog nisko-stepenog folikularnog Non-Hodžkin limfoma (NHL). Godinu dana poslije, dozvolu je dobio i ^{131}I -Tositumomab (Bexxar®, GlaxoSmithKline) također radioobilježeno IgG antitijelo za liječenje NHL. 2009. godine Zevalin® je indikovano i kod netretiranog folikularnog NHL-a, koji je pokazao djelimični ili potpuni odgovor na rituksimab. Zbog nemogućnosti uvoza radiofarmaceutika Zevalin® i Bexxar® u Australiju, profesor *Harvey Turner* i saradnici su obilježili jodom-131 monoklonsko anti-CD 20 antitijelo rituksimab (MabThera®, Roche), koje je bilo prvo monoklonsko antitijelo odobreno za imunoterapiju NHL. Obilježavanje rituksimaba, je urađeno u poluatomatskom modulu za sintezu u bolničkim uslovima, što je bitno uticalo na cijenu RIT. Bez obzira na obećavajuće rezultate RIT sa ^{131}I -Ritksimabom tokom faze 2 kliničkih istraživanja, legislativa u pojedinim državama je ograničila rutinski kliničku upotrebu ovog obilježenog antitijela (43,44). Takođe, druga monoklonska antitijela (trastuzumab, bevacizumab, cetuksimab i dr.) su obilježavana sa terapijskim radionuklidima. Osim β-emitujućih radionuklida, zastupljeni su bili i emiteri α zračenja (^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac , ^{223}Ra) (45). Međutim njihova upotreba je bila ograničena na prvu i drugu fazu kliničkih istraživanja tako da su Zevalin® i Bexxar® ostali jedini registrovani radiofarmaceutici za RIT. Bez obzira na dokazanu efikasnost RIT, ovaj vid terapije nije široko prihvaćen u hematoonkološkoj zajednici, a rezultat toge je povlačenje Bexxar®-a sa tržišta 2014. godine zbog ekonomski neisplative proizvodnje (5,46).

Stoga, terapije radioaktivnim jodom i Zevalin[®]-om su najčešće korištene RT i RIT u nukleranoj medicini (47).

Princip SIRT-a se zasniva na intrahepatičkoj administraciji β -terapijskih radiofarmaceutika, koji se lokalizuju u tumoru embolizacijom arteriola. Beta zračenje isporučuje letalnu dozu tumorskim ćelijama poštedejuću okolno parenhimsko tkivo, jer većina jetrenog parenhima je opskrbljena krvlju putem portalne vene (slika 4) (48).



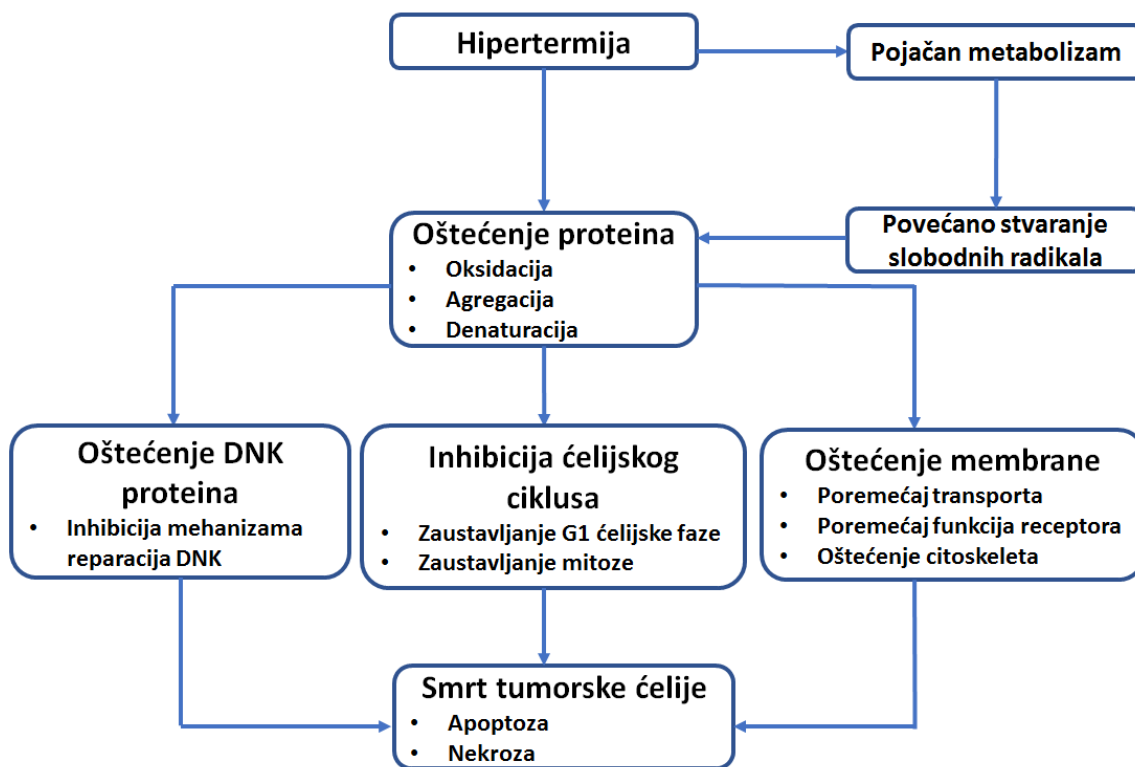
Slika 4. Prikaz principa selektivne unutrašnje radioterapije (SIRT) (48).

¹³¹I-Lipiodol (Lipiodis[®], CIS Bio International) je bio prvi terapeutik za neoperativni hepatocelularni karcinom (HCC). Predstavlja jodirani etil-estar masne kiseline prisutne u ulju sjemena maka, koje se prije koristilo kao kontrastno sredstvo. U studijama nisu dobijeni značajni rezultati jer su potrebna opsežnija ispitivanja i duže praćenje pacijenata (49). Danas, glavni predstavnici SIRT-a su mikrosfere obilježene ⁹⁰Y: smolaste SIR-Spheres[®] (Sirtex Medical, Australija) i staklene TheraSpheres[®] (MDS Nordion, Kanada). SIR-Spheres[®] su indikovane za terapiju neoperativnih jetrenih metastaza od primarnog karcinoma kolona, a TheraSpheres[®] za terapiju neoperativnog HCC. Sa terapijom sinovijektomije, SIRT predstavlja lokalni pristup radionuklidne terapije (50).

2.3. Hipertermija

Termin **hipertermija** (grč. *hyper* – podići, *thermia* – toplota) (HT) obično predstavlja zagrijavanje ćelija i tkiva jedan ili više sati, na temperaturi između 40 °C i 45 °C (51,52). Još je otac medicine, Hipokrat opisao ulogu toplote u medicini: „Bolesti koje se ne liječe lijekovima, liječe se nožem. One koje se ne mogu liječiti nožem, liječe se vatrom. One koje se ne liječe vatrom su neizlječive“ (53). Prvi put primjena toplote u onkologiji se spominje u *Hirurškim Papirusima* Edwina Smitha (oko 300-2500 p.n.e.), gdje se spominje savjet ljekara da se tumor dojke kauterizuje pomoću „vatrene štapa“ (54). Njemački ljekar W. Busch je opisao slučaj pacijenta sa sarkomom, čiji je tumor regresirao uslijed visoke tjelesne temperature uzrokovane erizipelom („crveni vjetar“) (55).

Termin blaga hipertermija predstavlja zagrijavanje do 42 °C, a ekstremna hipertermija se koristi za više temperature (56). Na višim temperaturama, sama toplota izaziva denaturaciju proteina (57), oštećenje skeleta ćelije (58,59), onesposobljavanje mehanizama reparacije DNK (60–62), promjene u propustljivosti membrane (63,64) kao i odgovor imunog sistema (slika 5) (65–67).



Slika 5. Efekat hipertermije na ćeliju.

Takođe, blaga hipertermija pojačava protok krvi u tumoru i vaskularnu permeabilnost i time poboljšava zasićenost tumorskih ćelija kiseonikom i hranljivim materijama. Povećana perfuzija započinje nekoliko minuta nakon zagrijavanja i može trajati satima. Temperature iznad 42 °C mogu dovesti do kolabiranja krvnih sudova, apoptoze i nekroze ćelije (57,68). Takođe, visoke temperature mogu izazvati koagulaciju, čime bi prenos toplote bio onemogućen a samim tim bi se stvorili uslovi i za formiranje novih hipoksičnih regiona, čime bi se otpor ka zračenju povećao (69). Kod ćelija kod kojih je umjerena hipertermija donijela subletalnu dozu, smanjuje se upotreba kiseonika, prevođenjem njihovog metabolizma ka glikolitičkom putu. Time se povećava količina kiseonika koja se može odvesti u hipoksične regione (70,71). Tumorske ćelije su više termosenzitivne na efekte hipertermije nego zdrave ćelije zbog kiselog okruženja koji vlada u njima. Svaka ćelija ima svoju prelomnu tačku osjetljivosti ka toploti, gdje se iznad te tačke stopa smrtnosti ćelija povećava duplo sa povećanjem temperature za 1 °C. Prelomna tačka za humane ćelije je 43,5 °C a za životinjske 43 °C (72). Efekat hipertermije je različit u različitim tkivima, ali se može smatrati da hipertermija samostalno izaziva malu do umjerenu citotoksičnost, što nije slučaj kada se koristi u kombinaciji sa drugim terapijskim metodama, kao što su hemioterapija ili radijacija (73,74).

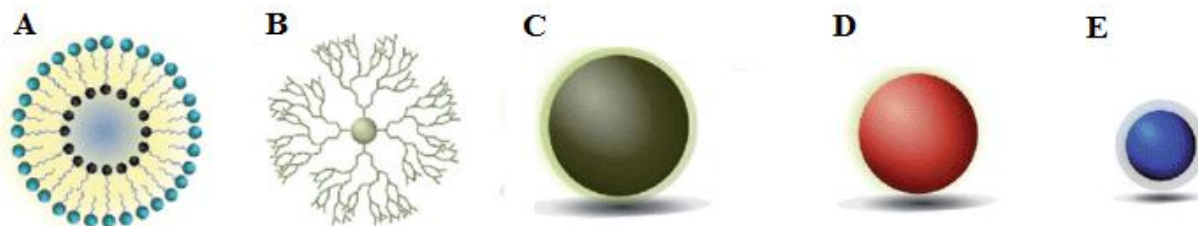
2.4. Magnetna hipertermija

Magnetna hipertermija (MHT) predstavlja oslobađanje toplote od strane različitih medijatora pod uticajem spoljašnjeg naizmjeničnog magnetog polja (SMP) određene jačine i frekvencije (75), gdje dolazi do postizanja temperature između 42 °C i 46 °C unutar tumorskog tkiva uslijed čega dolazi do odumiranja ćelija karcinoma, dok ćelije zdravog tkiva nisu osjetljive prema postignutim temperaturama (76). Različite tehnike indukuju HT, kao što su radiotalasi, ultrazvuk, mikrotalasi, infracrvena radijacija i svaka od ovih metoda ima svoje nedostatke kao što su:

- a) zagrijavanje okolnog zdravog tkiva rezultujući opekotinama, plikovima i neugodnosti pacijenta;
- b) ograničeno prodiranje toplote u tkiva;
- c) nedovoljna doza toplote na ciljnom mjestu (77).

U odnosu na HT, koja se takođe indukuje primjenom elektromagnetnih talasa iz električnog uređaja, najveća prednost MHT je u njenoj selektivnosti zbog prirodne propustljivosti (skoro 1) ljudskog organizma prema magnetnom polju. Pod uticajem promjenljivog magnetnog polja zagrijava se isključivo regija tijela gdje se nalazi tumor, dok zdravo tkivo biva pošteđeno.

Na početku, medijatori toplote su bile elektro-konduktivne ili feromagnetne igle/zrna koja su se stavljala u tumore (7). Napredak u razvoju nanostrukturnih materijala, sa veličinom uporedivoj sa biološkim entitetima (ćelije, proteini, geni i sl.), dali su veliki doprinos u razvoju MHT. Predstavnicima 0 dimenzionalnih nanočestica, kojima su sve tri dimenzije ispod 100 nm, su CdSe nanočestice tzv. „kvantne tačkice”, fotosenzitivne zlatne nanočestice, nanočestice na bazi polimera (lipozomi), dendrimeri i magnetne nanočestice (slika 6) (78,79).



Slika 6. Predstavnicima 0D nanočestica. Organske nanočestice: A. Lipozomi, B. Dendrimeri. Neorganske nanočestice: C. $Fe_3O_4/\gamma-Fe_2O_3$ (magnetne) nanočestice, D. Au nanočestice, E. CdSe nanočestice „kvantne čestice” (78,79).

MHT se takođe može nazvati i magnetna nanofluidna hipertermija, jer se magnetne nanočestice ili fluidi koriste u obliku stabilnih koloidnih suspenzija u vodi ili ugljenohidratnom fluidu (80). Metode sinteze magnetnih nanočestica sa svojim prednostima i nedostacima date su u tabeli 3.

Tabela 3. Pregled metoda sinteza magnetnih nanočestica (81).

Metoda sinteze	Vrijeme sinteze	Rastvarač	Prinos sinteze	Prednosti	Nedostaci
Koprecipitacija	Minuti	Voda	Visok	Jednostavnost i niska cijena	Teško kontrolisanje veličine čestica
Termalna dekompozicija	Sati-dani	Organski rastvarači	Visok	Uzana distribucija i dobra kontrola veličine čestica	Vrlo toksični surfaktanti i ostaci prekursora
Mikroemulzija	Sati	Organski rastvarači	Visok	Dobro iskristalisane nanočestice	Neekološka i ekonomski neisplativa metoda
Solvotermalna metoda	Sati	Organski rastvarači	Srednji	Relativno dobro kontrolisana veličina čestica	Velika potrošnja energije
Sprej piroliza	Sekundi	Voda i isparljivi rastvarači	Visok	Velika čistoća nanočestica	Teško kontrolisanje veličine čestica
Laser piroliza	Milisekundi	Gasovi	Visok	Uzana distribucija i dobra kontrola veličine čestica	Nemogućnost povećanja veličine čestica

2.4.1. Osobine i podjela magnetnih materijala

Svi materijali u određenom stepenu posjeduju magnetna svojstva i intereaguju sa spoljašnjim magnetnim poljem. Kada se materijal unese u magnetno polje dolazi do nastajanja magnetnog momenta (vektorski zbir orbitalnih i spinskih magnetnih momenata atoma), koji se izražava po jedinici zapremine tog materijala i naziva se magnetizacija (M). Magnetna susceptibilnost – χ predstavlja odnos magnetizacije i jačine spoljašnjeg magnetnog polja (H). Izučavajući zavisnost magnetizacije od spoljašnjeg magnetnog polja – $M(H)$ ili od temperature – $M(T)$, magnetni materijali su klasifikovani prema susceptibilnosti (osjetljivosti) u magnetnom polju na:

- a) slabe magnetike (dijamagnetici i paramagnetici) kod kojih na postoji spontana uredenost magnetnih momenata;

- b) jake magnetike (fero-, antifero- i ferimagnetični) kod kojih postoji spontana uređenost magnetnih momenata (bez prisustva magnetnog polja).

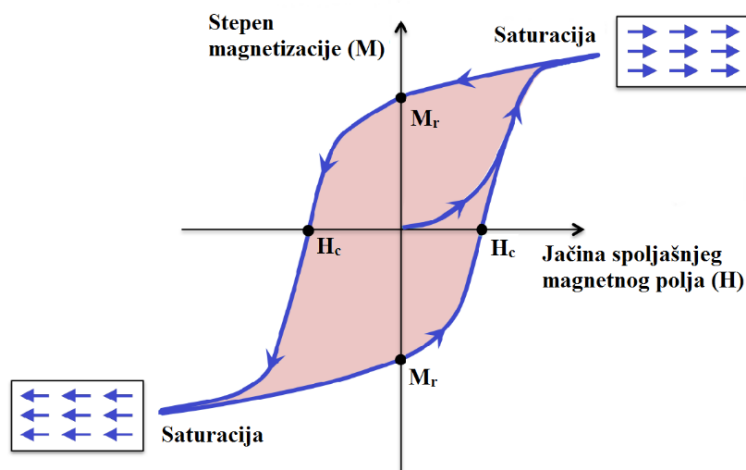
Dijamagnetnici ne pokazuju magnetni moment sve dok ne dođu u SMP. Usljed djelovanja SMP na orbitalno kretanje elektrona u atomu, dolazi do indukovanja magnetnog momenta koji se orijentiše suprotno u odnosu na pravac SMP. Dijamagnetni materijali imaju negativnu susceptibilnost. Dijamagnetizam je univerzalna osobina supstanci, jer se indukovani magnetni moment pojavljuje kod svih supstanci bez obzira na magnetno uređenje.

Paramagnetici su građeni od atoma koji sadrže nesparene elektrone, tj. od atoma koji imaju stalni magnetni dipolni moment. Zbog termičkog kretanja atoma, orijentacija magnetnih momenata atoma paramagnetičara ukoliko se ne nalaze u SMP, je haotična. U SMP magnetni momenti se orijentišu u pravcu SMP, pa je magnetna susceptibilnost mala i pozitivna. Pošto stepen njihove orijentacije zavisi od temperature, magnetna susceptibilnost je funkcija temperature. Po prestanku djelovanja SMP, uređenost magnetnih momenata prestaje i postaje haotična (82–84).

Feromagnetici posjeduju stalni magnetni dipolni moment i za njih je karakteristična spontana magnetizacija (uređenost magnetnih dipolnih momenata atoma van spoljašnjeg magnetnog polja ispod karakteristične temperature) koja je najveća na niskim temperaturama. Povišavajući temperaturu, dipolni momenti odstupaju od paralelne orijentacije i dolazi do slabljenja spontane magnetizacije. Kada temperatura feromagnetičara dostigne ili prevaziđe *Curie*-jevu temperaturu (T_c), feromagnetičar gubi svoju magnetizaciju i postaje paramagnetičar. Iznad *Curie*-jeve temperature dominira termičko kretanje koje uzrokuje proizvoljnu orijentaciju momenata, dok ispod *Curie*-jeve temperature magnetni momenti su orijentisani. Feromagnetici pokazuju veliku i pozitivnu susceptibilnost u magnetnom polju. Kada se kod dijamagnetičara i paramagnetičara ukloni SMP, magnetne osobine ne ostaju, dok kod feromagnetičara ove osobine ostaju (85).

Feromagnetni materijali su podijeljeni na oblasti homogene magnetizacije (domene) gdje unutar jednog domena svi dipolni momenti su usmjereni prema jednom pravcu, a međusobno su razdvojeni granicama domena tzv. domenskim zidovima (*Bloch*-ovim zidovima). Tokom procesa magnetizacije feromagnetičara pod uticajem SMP na temperaturi nižoj od *Curie*-jeve, dolazi do promjene orijentacije i veličine domena a magnetizacija se odvija u nekoliko faza. U prvoj fazi pri slabom magnetnom polju, dolazi do povećanja onih

magnetnih domena čiji rezultujući magnetni moment pravi najmanji ugao sa SMP. U drugoj fazi, koja se odvija pri jačim poljima, dolazi do rotacije magnetnih momenata domena u smjeru SMP. U trenutku kada se vektori magnetnih momenata svih domena orijentišu u pravcu SMP, magnetizacija M dostiže svoju maksimalnu (saturacionu) vrijednost (M_s). Ukoliko se isključi SMP, magnetizacija neće postići vrijednost nula, već će imati neku konačnu vrijednost i to je remanentna magnetizacija (M_r). Primjenom polja u suprotnom smjeru (H_c , koercitivno polje) magnetizacija pada na nulu, a daljim povećavanjem takvog polja doći će do postizanja maksimuma magnetizacije ali u suprotnom smjeru. Ponovnim smanjivanjem SMP do vrijednosti nula i njegovim povećanjem u suprotnom smjeru, magnetizacija materijala će ići slično praveći histerezisnu petlju (slika 7).



Slika 7. Histerezisna petlja (85).

Ferimagnetnici imaju magnetne momente koji su antiparalelni i različitih vrijednosti i zbog toga ovakvi materijali raspolažu spontanom magnetizacijom. Pod dejstvom SMP ferimagnetici se ponašaju kao feromagnetici, i iznad *Curie*-jeve temperature narušava se spontana uređenost magnetnih momenata.

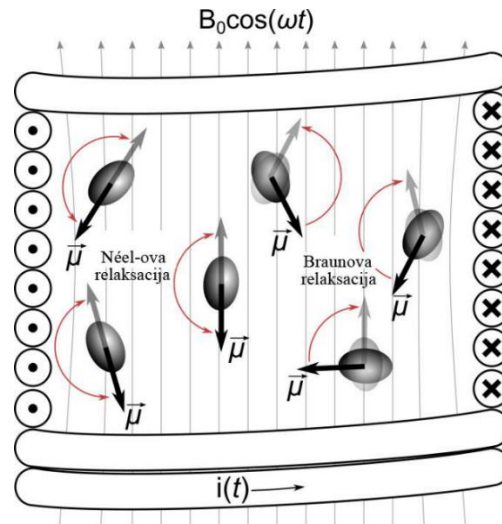
Antiferomagnetici su materijali kod kojih uzajamno dejstvo između atoma sa permanentnim magnetnim momentima je takvo da se magnetni momenti susjednih atoma (spinovi) imaju antiparalelnu raspodjelu i da su jednaki po intenzitetu tako da je rezultujući magnetni moment jednak nuli. Kao i kod feromagneta, pomenuta magnetna uređenost postoji u nekom temperaturnom intervalu i narušava se iznad neke kritične temperature. Ta

temperatura se naziva antiferomagnetna *Curie*-jeve tačka ili *Néel*-ova temperatura (T_N) iznad koje antiferomagnetici dobijaju paramagnetne osobine (86).

2.4.2. Superparamagnetizam i mehanizam nastajanja magnetne hipertermije

Superparamagnetizam je vrsta magnetizma koji se pojavljuje kod feromagnetnih i ferimagnetnih nanočestičnih magnetnih materijala na temperaturama ispod *Curie*-jeve ili *Néel*-ove temperature, gdje se materijal ponaša slično kao paramagnetik, osim što umesto magnetnog momenta svakog individualnog atoma, magnetni moment cijele nanočestice teži da se orijentiše u pravcu SMP-a. Ove nanočestice su jednodomenske što predstavlja da se ukupni magnetni momenat tih nanočestica posmatra kao jedan magnetni momenat sastavljen od svih pojedinačnih magnetnih momenata atoma koji formiraju nanočestice (87). Kod feromagnetnih nanočestica, unutar svakog domena magnetni momenat ima specifičnu orijentaciju i pri uticaju SMP domeni koji se nalaze u pravcu polja rastu na račun ostalih. Ova pojava nije reverzibilna i dovodi do pojave histerezisa. Zbog toga feromagnetni materijali u SMP stvaraju toplotu uslijed histerezisnih gubitaka, nastalih zbog pomjeranja magnetnih domena.

Kod superparamagnetnih materijala koji se najčešće koriste u medicini nema histerezisnih gubitaka i postoje dva mehanizma za stvaranje toplote, a to su *Neel*-ovi i *Brown*-ovi gubici. Svaka nanočestica u superparamagnetom materijalu sastoji se iz jednog domena i zbog toga će imati konstantan magnetni moment, čija je orijentacija u odsustvu SMP određena kristalnom anizotropijom čestice. Ukoliko SMP obezbijedi dovoljno energije da pomjeri magnetni moment iz preferirane orijentacije, dolazi do relaksacije magnetnih momenata do položaja duž primjenjenog polja tokom čega se oslobađa termalna energija u okolinu. Promjenom smjera SMP doći će do ponovne relaksacije i oslobađanja toplote (88). Relaksacija se može desiti fizičkom rotacijom samih čestica (*Brown*-ova relaksacija) ili rotacijom spregnutih atomskih magnetnih momenata unutar svake čestice (*Neel*-ova relaksacija) (slika 8). Oba mehanizma dovode do faznog zaostajanja između SMP i smjera magnetnog polja, zbog čega se dešavaju termalni gubici (89).



Slika 8. Mehanizmi konverzije magnetne energije u toplotu (89).

Svaki od ovih mehanizama je okarakterisan vremenom relaksacije koja su prikazana sledećim formulama:

$$\text{a) } \textit{Neel-ovo} \text{ vrijeme relaksacije } (\tau_N): \tau_N = \tau_0 e^{\frac{KV_M}{kT}} \quad (1)$$

$$\text{b) } \textit{Brown-ovo} \text{ vrijeme relaksacije } (\tau_B): \tau_B = \frac{3\eta V_H}{kT} \quad (2)$$

c) Efektivno vrijeme relaksacije kada se oba procesa dešavaju u isto vrijeme (τ):

$$\tau = \frac{\tau_B \tau_N}{\tau_B + \tau_N} \quad (3)$$

, gdje je $\tau_0 = 10^{-9}$ s, K – konstanta anizotropije, V_M – zapremina čestice, k - *Boltzman*-ova konstanta, T – temperatura, η – koeficijent viskoznosti, V_H – hidrodinamička zapremina čestice (zapremina čestice sa oblogom).

Neel-ovo vrijeme relaksacije zavisi od energije anizotropije koja predstavlja energiju koja je potrebna za promijenu pravca magnetnog momenta nanočestice iz svog preferiranog položaja. Dok *Brown*-ovo vrijeme relaksacije zavisi od hidrodinamičkih osobina fluida. Energija anizotropije jednodomenske čestice, zavisi od osobina materijala i od veličine nanočestica (90). Uvijek postoji mogućnost da se oba mehanizma stvaranja toplote pojave u isto vrijeme, a koji mehanizam će biti dominantan zavisi čije je vrijeme relaksacije kraće (89). Ova dva mehanizma relaksacije su relevantni mehanizmi zagrijavanja superparamagnetnih nanočestica (SMNČ) na bazi oksida gvožđa. *Brown*-ov mehanizam je značajan za SMNČ veće od 20 nm, a *Neel*-ov mehanizam za SMNČ manje od 20 nm (91).

Mogućnost stvaranja toplote magnetnog materijala pod uticajem magnetnog polja se mjeri vrijednostima specifične brzine apsorpcije (SPA), koja predstavlja količinu elektromagnetne energije po jedinici mase nanočestice koja se konvertuje u toplotu. SPA vrijednost je zavisna od ukupnog vremena relaksacije (τ) i direktno je proporcionalna saturacionoj magnetizaciji M_s i konstanti anizotropije (K), a obrnuto je proporcionalna distribuciji veličine čestica:

$$SPA (W/g) = f \frac{\pi \mu_0^2 H^2 M_s^2 V}{3k_B T} \frac{2\pi f \tau}{1+(2\pi f \tau)^2} \quad (4)$$

Za svaku frekvenciju magnetnog polja, postoji „idealna” veličina nanočestica, koja će omogućiti maksimalnu SPA vrijednost uz uslov da je uska raspodjela veličine nanočestica. Velika SPA vrijednost dovodi do kraćeg vremena izlaganja organizma SMP, a tokom kliničke primjene nanočestica do kontrole predaje toplote samo oboljelom području. Pošto nije jednostavno teorijski odrediti SPA vrijednost zbog velikog broja parametara koji na nju utiču (amplituda i frekvencija SMP, veličina, raspodjela veličine, oblik, hemijski sastav i kristalna struktura nanočestice i dr.), eksperimentalna određivanja su izuzetno bitna (92).

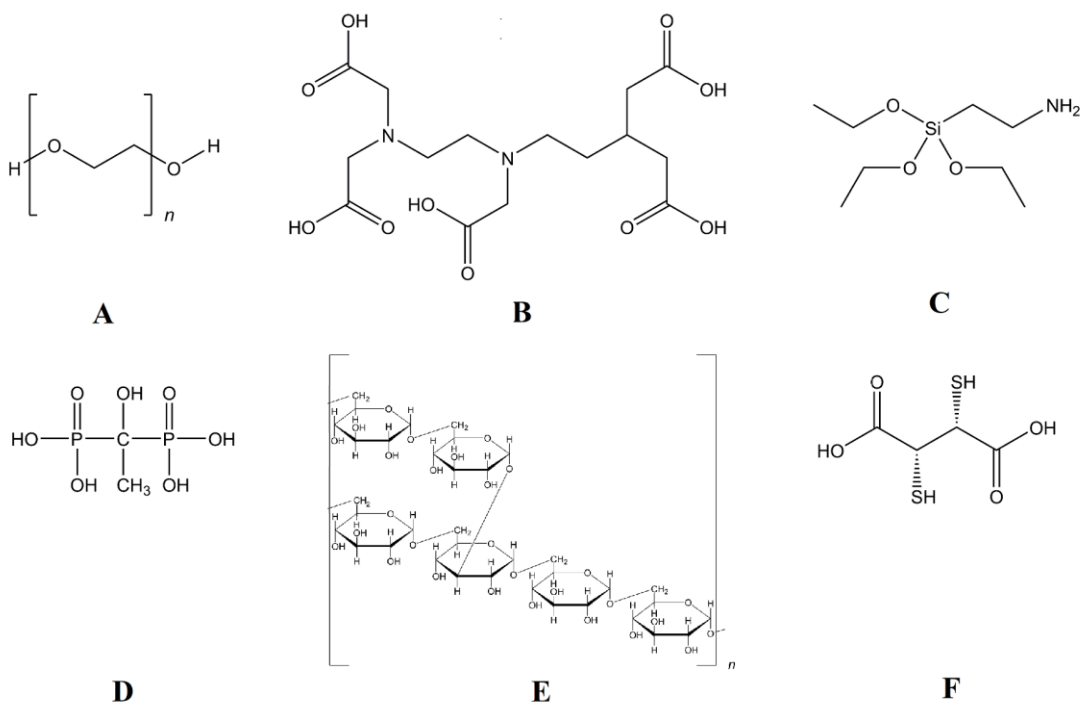
2.4.3. Superparamagnetne nanočestice

U medicini najčešće se primjenjuju superparamagnetne nanočestice (SMNČ) suspendovane u vodi tj. u obliku ferrofluida. Glavni kriterijum kod selekcije i sinteze različitih SMNČ je mogućnost stvaranja velike toplote, koja isključivo zavisi od njihovih magnetnih (M_s) i biofizičkih osobina (npr. toksičnost, koloidna stabilnost, SPA vrijednost) u fiziološkim uslovima. Efikasnost SMNČ da absorbuju energiju magnetnog polja zavisi od veličine, distribucije veličine i magnetne anizotropije, kao i od amplitude i frekvencije magnetnog polja. Uska raspodijela veličine SMNČ će minimalizovati količinu ferrofluida neophodnu za terapijski tretman određene zapremine tumora, jer će omogućiti da SPA vrijednost dostigne svoj maksimum (93).

Među do sada ispitanim magnetnim nanočesticama, superparamagnetne nanočestice na bazi gvožđe(II) i gvožđe(III) oksida, magnetita (Fe_3O_4) i maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$), pokazale su značajnu prednost u odnosu na druge nanočestice zbog svoje hemijske stabilnosti, niske

toksičnosti (gvožđe se može iskoristiti kroz metaboličke puteve), povoljnih magnetnih osobina (visoka M_s) i niske cijene proizvodnje (8,94).

SMNČ su našle svoju primjenu kao kontrasti za magnetnu rezonancu (95), kao nosači različitih citotoksičnih i antibiotskih lijekova (96,97), u terapiji magnetnom hipertermijom (98), kao nosioci gena (99), prečišćivači proteina (100), za obilježavanje ćelija (101). Magnetit (Fe_3O_4) i maghemit ($\gamma-Fe_2O_3$) su jedini magnetni materijali odobreni od strane FDA za primjenu u liječenju deficijencije gvožđa i magnetnu rezonancu. Primjena SMNČ u medicini zahtjeva osim visoke magnetizacije i stabilnost koloidne suspenzije (102). Pažnja se mora obratiti na slijedeće nedostatke SMNČ: brzu aglomeraciju i hemijsku reaktivnost sa velikom površinskom energijom koja dovodi do oksidacije SMNČ u tumorskom okruženju i gubitku magnetizma, kao i do nemogućnosti dolaska do ciljanog tkiva (103). Modifikacija površine sa polimernim, nepolimernim, organskim ili neorganskim surfaktantima dovodi do stabilizacije koloidne suspenzije i sprečavanja stvaranja aglomerata neobloženih nanočestica, povećanja rastvorljivosti SMNČ u fiziološkim uslovima, smanjenja toksičnosti i kontrole veličine čestica radi dejstva u određenim organima. Različita jedinjenja, kao što su silani (104), fosfati i fosfonati (105), hidrofilni polimeri (polietilen glikol - PEG i polietilen oksid - PEO) (106), albumin (107), dekstran (9) i sl. se koriste za njihovu stabilizaciju a sama vrsta obloge utiče i na eliminaciju SMNČ (slika 9).



Slika 9. Jedinjenja koja se najčešće koriste kao obloge SMNČ. A. PEG-600, B. DTPA, C. APTES, D. HEDP, E. Dekstran, F. DMSA.

Date intravenski, SMNČ se primarno eliminišu iz krvi putem ćelija retikuloendotelnog sistema (RES-a) i odlazu u RES organima (jetra i slezina), a poluvrijeme eliminacije se kreće između 1 h i 24-36 h (108). SMNČ koje su obložene PEG-om su pokazale manju opsonizaciju i odlaganje u organima RES-a nego SMNČ obložene dekstranima (109). Sve češće za obloge SMNČ-a se koriste hemijska jedinjenja koja se obilježena sa ^{99m}Tc primjenjuju kao radiofarmaceutici u dijagnostičkim procedurama, kao što su mezo-2,3-dimerkaptosukcinska kiselina (DMSA) (110), dietilentriaminepentasilatna kiselina (DTPA) (111) i 2,3-dikarboksipropan-1,1-difosfonska kiselina (DPD) (112). Slobodne funkcionalne grupe prisutne na površini SMNČ-a nakon oblaganja omogućavaju vezivanje različitih agenasa za SMNČ (9). U disertaciji kao obloge SMNČ su se koristili aminosilani i DMSA. Oblaganjem SMNČ sa DMSA na površini SMNČ je prisutan veliki broj karboksilnih grupa (-COOH), koje se mogu koristiti za vezivanje radionuklida, helatnih agenasa ili antitijela. Takođe, kao obloga je korišten i (3-aminopropil)trietoksisilan (APTES), nakon čijeg vezivanja je prisutan veliki broj slobodnih amino grupa (-NH₂) koje se isto mogu koristiti kao donori elektrona za vezivanje (11).

2.4.4. Sinergizam hipertermije i jonizujućeg zračenja

Još 60-ih godina prošloga vijeka, u *in vitro* eksperimentima je dokazano da hipertermija tj. zagrijavanje tumora pojačava citotoksični efekat jonizujućeg zračenja, što je prikazano u mnogim revijalnim radovima (51,113–115). Sinergizam se ogleda u sljedećem:

- a) Toplotni efekat hipertermije povećava osjetljivost hipoksičnih tumorskih ćelija, na jonizujuće zračenje (116–120).
- b) Tokom S-faze ćelijskog ciklusa, tumorske ćelije su otporne na zračenje ali su vrlo osjetljive na toplotu. Razlog njihove radiorezistencije je mogućnost zaustavljanja daljeg ciklusa u S-fazi dok se ne popravi subletalno radijacijsko oštećenje DNK molekule (121–123).
- c) Nizak pH u tumorskom tkivu i nedostatak hranljivih materija smanjuje osjetljivost prema zračenju a povećava prema hipertermiji. Dalje zagrijavanje ćelija tumora uzrokuje pretjeranu acidifikaciju što dovodi do smrti ćelija tumora (apoptoze) (124–127).
- d) Dejstvo toplote indukuje proizvodnju „proteina toplotnog stresa” na površini tretiranih ćelija, što čini da imuni sistem, inicijalno „neprepoznatljive” ćelije tumora, prepozna i započne borbu protiv njih (128).
- e) Abnormalna vaskulatura i slab protok krvi u hipoksičnim regionima unutar tumora zadržavaju toplotu i sprečavaju njeno rasipanje na okolno zdravo tkivo (129–132).
- f) Jonizujuće zračenje oštećuje DNK, dok hipertermija inhibira proteine odgovorne za reparaciju DNK molekula.

U temperaturnom intervalu umjerene hipertermije 41 °C – 43 °C oštećenja normalnog tkiva su reverzibilna dok se tumorske ćelije ireverzibilno oštećuju, zbog čega se najčešće umjerena hipertermija kombinuje sa radio- ili hemioterapijom (116).

Pojedine kliničke studije, uključujući Faze 2 i 3, su potvrdile da primjena HT značajno poboljšava terapijske ishode kada se kombinuje sa radioterapijom. Na primer, kompletna uspješnost terapije kada se primjenjivala HT sa RT u odnosu samo na RT se povećala sa 38,1% na 60,2% kod lokalnog rekurentnog karcinoma dojke (133), sa 39,6% na 62,5% kod karcinoma glave i vrata (134), kao i sa 48-58% na 72-83% kod primarnog cervikalnog karcinoma (74).

Međutim, uprkos ohrabrujućim rezultatima pojedinih kliničkih studija, kao i mogućnosti primjene hipertermije na različitim mjestima (lokalno, regionalno, primjena na

cijelom tijelu) i raznovrsnosti uređaja za stvaranje toplote (mikrotalasi, radiofrekvencija, ultrazvuk, infracrveno, implantati, laser, perfuzione tehnike i sl.), HT nije našla kliničku primjenu, osim u Holandiji (135).

Najveći problem predstavlja poteškoća adekvatnog zagrijavanja tumora, naročito onih koji su duboko pozicionirani (51,136), što je prikazano u jednoj kliničkoj studiji gdje intersticijalna terapija nije dala značajne rezultate sa ili bez HT (137).

Takođe, bitno je da se određena doza toplote prenese u tumor, ali sa poštedom okolnog tkiva. To je teško izvodljivo, naročito kada toplota potiče iz spoljašnjeg izvora, jer tada efekat provođenja i rasipanja toplote dovodi do neravnomjerne distribucije toplote u tumoru, čak i do pregrijavanja u regijama dubokih tumora (138). Komplikaciju predstavlja i nesigurnost u mjerenju isporučene toplote u tumoru i okolnom tkivu. U većini slučajeva radi se korištenjem sonde, što je invazivna tehnika, dok snimanje pomoću magnetne rezonance ili infracrveno mjerenje zahtjeva specifičnu i skupu opremu (139).

2.4.5. Klinička upotreba magnetne hipertermije i radioterapije

Nakon dobrih rezultata efikasnosti SMNČ u prekliničkim studijama, koje su pokazale spori klirens SMNČ iz tumora i mogućnost primjene nekoliko tretmana nakon jedne fluidne injekcije, sprovedene su kliničke studije magnetne hipertermije (140–142). Pilot studija je sprovedena 2005. godine u terapiji karcinoma prostate koristeći prvi put aplikator magnetnog polja za cijelo tijelo (MFH[®]300F, MagForce Nanotechnologies AG, Njemačka) u Univerzitetnoj bolnici Charite u Berlinu (slika 10). Suspenzija SMNČ na bazi Fe₃O₄ je injektovana u prostatu pomoću ultrazvučnog i fluoroskopskog navođenja pacijentima kojima su prethodno zračeni lokalni recidivi karcinoma prostate. MHT je bila izvodljiva i pacijenti su se dobro osjećali tokom primjene ove vrste terapije (143).

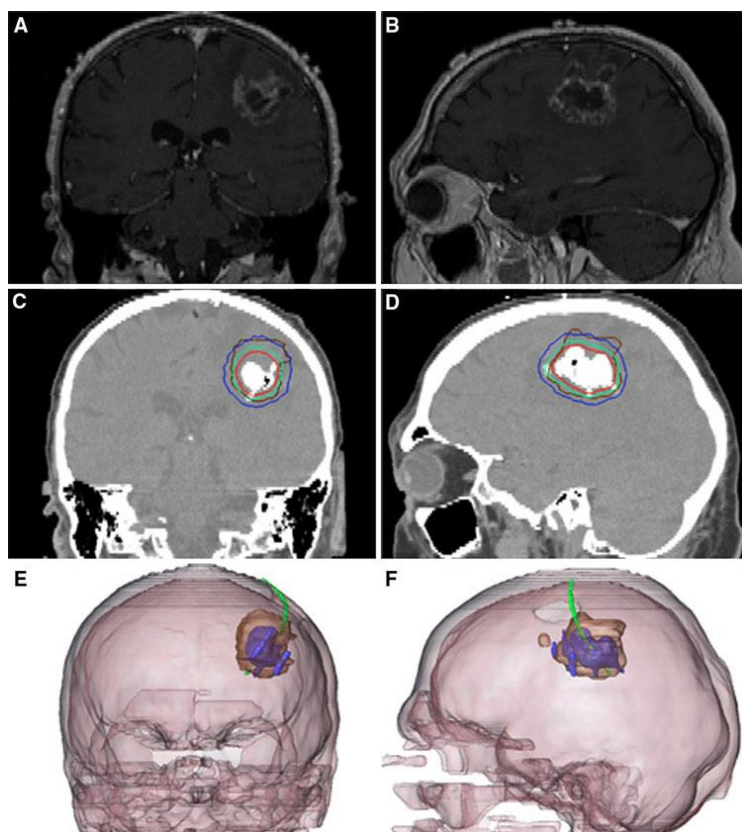


Slika 10. Aplikator magnetnog polja (MFH[®]300F) u Univerzitetnoj bolnici Charite u Berlinu (144).

Kasnije su *Wust* i saradnici u istoj bolnici ispitali MHT na 22 pacijenta koji su bolovali od različitih vrsta rekurentnih tumora (karcinom prostate, jajnika, cerviksa, sarkoma, rektuma) i u zavisnosti od regiona tretiranja, jačina magnetnog polja je varirala od 2 do 18 kA/m. Postignute SPA vrijednosti su bile 60-380 W/kg i oko 86% tumora je bilo zagrijano na oko 40 °C. Autori su smatrali da bi se pokrivenost od 98% desila povećanjem jačine magnetnog polja. Sve procedure su prošle bez neželjenih događaja a većina pacijenata je prijavila subjektivan osjećaj toplote koji nije uticao na tretman (145).

Nakon obećavajućih rezultata upotrebe kombinacije magnetne hipertermije i radioterapije u pretkliničkim studijama (142,146,147), grupa *Maier-Hauff*-a je prva ispitala efikasnost i težinu podnošenja terapije od strane pacijenata gdje je MHT bila kombinovana sa RT i primjenjena na rekurentnom multiformnom glioblastomu. Suspenzija od 5 mL SMNČ obloženih aminosilanima veličine 15 nm (koncentracija gvožđa: 112 mg/mL) je direktno injektovana u tumor. Pacijenti su tretirani magnetnom hipertermijom 4-10 puta na MFH[®]300F magnetnom aplikatoru (frekvencija magnetnog polja je bila 100 kHz i jačina 2.5–18 kA/m) i primili su dozu zračenja od 16-70 Gy (srednja vrijednost 30 Gy). Maksimalne postignute temperature u tumorima, praćene pomoću intratumorski ugrađene sonde, su se kretale između 42,4 °C i 49,5 °C (srednja vrijednost 44,6 °C). (148). Nakon toga je sprovedena 2. faza kliničke studije čiji je krajnji cilj bila procijena srednjeg preživljavanja pacijenata. Intratumorski je

injektovana suspenzija SMNČ obloženih aminosilanima zaštićenog naziva NanoTherm® AS1 (MagForce Nanotechnologies) (slika 11). NanoTherm® AS1 je jedini nanotehnološki preparat na bazi SMNČ koji je registrovan u Evropi za terapiju multiformog glioblastoma, a od jula 2018. godine sprovode se klinička istraživanja sa ovim preparatom u terapiji karcinoma prostate.



Slika 11. Primjena SMNČ (NanoTherm® AS1) u terapiji glioblastoma multiforme. A i B. MRI snimak mozga prije tretmana. C i D. CT snimak nakon injektovanja SMNČ (regija bijele boje). Izotermalna linije pokazuju izračunatu temperaturu tretmana između 40 °C (plava linija) i 50 °C (crvena linija). E i F. 3D rekonstrukcija MRI i CT-a pokazuje tumor (smeđa masa), SMNČ (plava masa) i sonda za mjerenje temperature (zelena linija) (149).

Pacijenti su tretirani magnetnom hipertermijom 2 puta sedmično u magnetnom polju frekvencije 100 kHz i zračeni 5 puta sedmično sa dozom zračenja od 2 Gy (ukupna doza zračenja 30 Gy). Pacijenti su dobro podnijeli primjenjene procedure, a srednje preživljavanje kod 59 pacijenata nakon dijagnoze prvog recidiva je bilo 13,4 mjeseca što je više u odnosu na prosječno preživljavanje od 6 mjeseci kod ovakvih pacijenata. Kod pacijenata koji su imali dijagnostifikovan primarni glioblastom, prosječno preživljavanje je bilo 14,6 mjeseci, ali nakon terapije sa magnetnom hipertermijom i radioterapijom prosječno preživljavanje je bilo

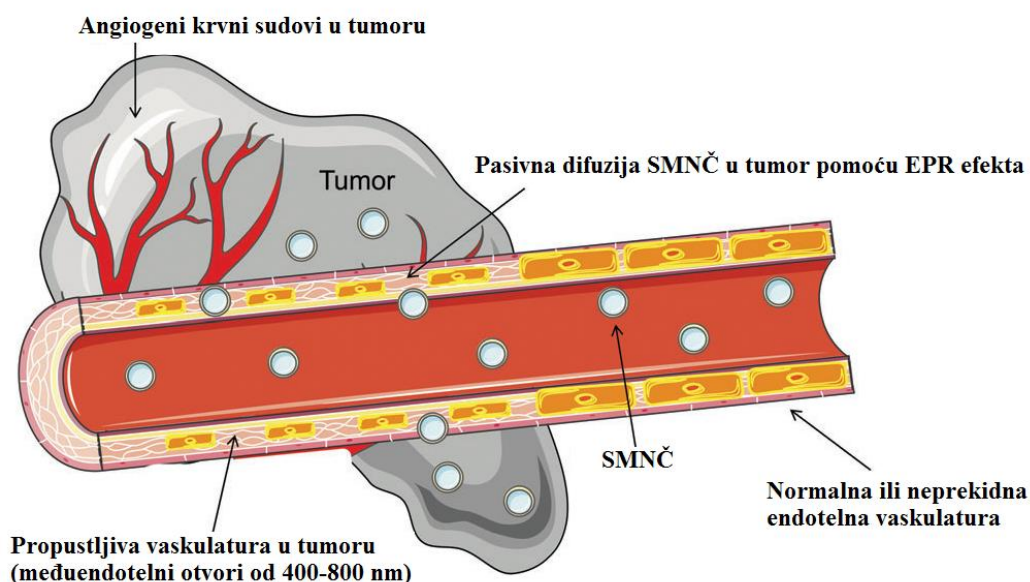
23,2 mjeseca. Patološka analiza je pokazala da su SMNČ bile rasprostranjene samo u okvirima tumorske mase i bile su lokalizovane unutar makrofaga (149–151).

Bez obzira na veliki napredak i odlične rezultate dobijene u prethodnim istraživanjima, rutinska klinička primjena MHT (kao monoterapija ili u kombinaciji sa radioterapijom) ima svoja ograničenja, kao nedovoljno oslobađanje energije u metastazama. *Herg* i saradnici su utvrdili da bi se temperatura u metastatkom tkivu od 3 mm povećala za 5 K, neophodno je SPA vrijednosti od 10 kW/g, što je iznad do sada objavljenih SPA vrijednosti (10-1700 W/g) (152). U kliničkoj upotrebi magnetne hipertermije treba imati u vidu i fiziološka ograničenja. Usljed vrtložnih struja, magnetno polje visoke frekvencije može izazvati lokalno zagrijavanje u dijelu tkiva u kome se ne nalaze magnetne čestice. Klinička upotreba SMNČ, čije SPA vrijednosti dobijene u naizmjeničnom magnetnom polju čiji proizvod Hf prekoračuje *Brezović-ev* limit ($4,85 \cdot 10^8$ A/m·s), je zanemarena. Primjena MHT ima i tehnička ograničenja, jer parametri magnetnog polja moraju biti precizno određeni kako bi se optimizovala efikasnost zagrijavanja SMNČ i očuvalo zdravo tkivo, kao i udobnost pacijenata tokom primjene (88).

2.5. Primjena radionuklida sa SMNČ

Klinički potvrđen efekat hipetermije indukovanoj SMNČ, kao i povoljne fizičko-hemijske karakteristike SMNČ (male dimenzije, velika specifična površina, netoksičnost, hemijska stabilnost, cijena), otvorili su mogućnost za stvaranjem multifunkcionalnog radiofarmaceutika, vezivanjem radionuklida za SMNČ. Bez obzira što su SMNČ pokazale veliku rezoluciju kao kontrasti za MRI, senzitivnost akvizicije je bila ograničena (153–155). Obilježavanje SMNČ sa radionuklidima otvara mogućnost njihove upotrebe kao dualnih ili multimodalnih agenasa koji bi mogli imati upotrebu u hibridnim molekularnim tehnologijama kao što su PET/MRI i SPECT/MRI. SMNČ bi djelovale kao MRI kontrasti, dok bi obilježavanje sa radionuklidima omogućilo snimanje sa PET i SPECT, kao veoma osjetljivim metodama. Hibridne tehnologije PET/MRI i SPECT/MRI sinergizmom doprinose neinvazivnom, osjetljivom snimanju sa visokom rezolucijom koje je neophodno za ranu detekciju karcinoma (78). U prilog korišćenja SMNČ kao dualnih agenasa, ide komercijalna dostupnost PET/MRI uređaja za kliničko i SPECT/MRI uređaja za prekliničko snimanje. Svoju multimodalnost, kao i mogućnost korišćenja u terapiji, SMNČ ostvaruju pomoću pasivnog i/ili

aktivnog ciljanja tumora. Pasivno ciljanje tumora se zasniva na tzv. efektu povećane propustljivosti i zadržavanja (EPR efekat), gdje zbog velikog broja haotičnih i veoma propustljivih krvnih sudova tumora (otvori 400-800 nm), SMNČ lako ulaze u tumorsko tkivo i posljedično ostaju zbog nedostatka limfne drenaže (slika 12). Šta više, njihova efikasna imobilizacija se može postići pomoću spoljašnjeg magentnog polja. U tom slučaju, djelovanje Kupferovih ćelija RES-a otežava ciljanje tumorskog tkiva. EPR efekat ima svoja ograničenja, jer isključivo zavisi od veličine i naelektrisanja SMNČ. Pasivno ciljanje se može smatrati „nespecifičnim“ ciljanjem, jer će isporuka radionuklida zavistiti od poroznosti vaskulatura, koje mogu biti porozne i u drugim tkivima, ne samo u tumorima. Da bi zaobišli navedena ograničenja koristi se strategija aktivnog ciljanja (156).

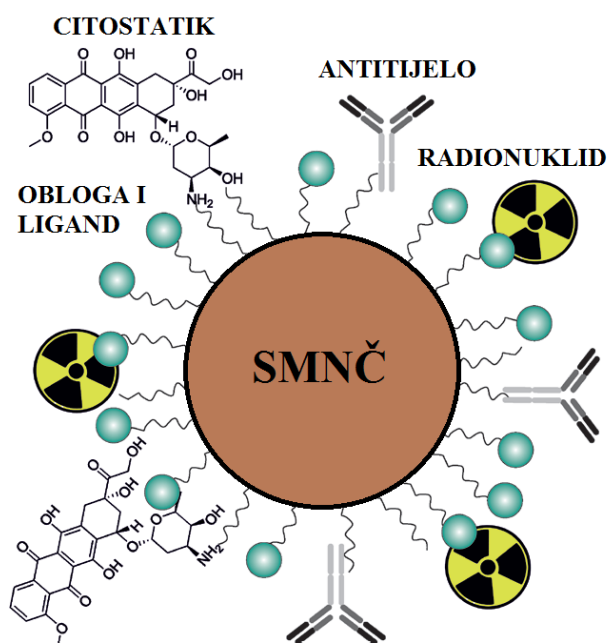


Slika 12. Pasivno ciljanje tumora pomoću EPR efekta (157).

Za aktivno ciljanje SMNČ na svojoj površini imaju odgovarajuće biomarkere (npr. antitijela, peptide, proteine, nukleinske kiseline i dr.) koji su specifični za odgovarajuće vrste (npr. antigene) prisutne na površini ili u tumoru (158–161). Konjugacija antitijela sa SMNČ daje mogućnost da se SMNČ vežu za specifične receptore na tumorskim ćelijama, da dođe do penetracije, povećanja retencije i krajnjeg ispoljavanja terapijskog efekta. Antitijela moraju biti kovalentno vezana za SMNČ, jer fizička adsorpcija koja zavisi od nekovalentnih interakcija pojedinih grupa nije stabilna i može dovesti do otpuštanja antitijela sa površine SMNČ. Vrlo

je bitno da tokom konjugacije sa SMNČ, Fc region antitijela ne ostane izložen cirkulaciji. U tom slučaju, receptori makrofaga za Fc region će reagovati i doći će do nakupljanja SMNČ u jetri i slezini (162).

Od SPECT radionuklida za obeležavanja SMNČ najviše je korišten ^{99m}Tc zbog njegove dostupnosti ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generator). Mnoga ispitivanja su pokazala da ^{99m}Tc -SMNČ nakon *in vivo* administracije prikazuju precizne puteve biodistribucije i ekskrecije radioaktivnosti (163). PEG-om obložene SMNČ obilježene sa ^{125}I -3H11 antigastričnim antitijelom pokazale su isto dobru SPECT i MRI vizualizaciju tumora na ksenograftima (164). Od radionuklida pozitronskog zračenja za obilježavanje SMNČ najčešće su korišteni ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{89}Zr , ^{18}F , ^{11}C (165–169). Osim dualnog snimanja, SMNČ mogu biti i nosači različitih citostatika, koji ulaskom u tumore otpuštaju lijekove i pojačavaju citotoksični efekat hipertermijom. *Zolata* i saradnici su razvili multifunkcionalne SMNČ, na koje su „nakačili“ trastuzumab (antitijelo specifično za HER2 receptore karcinoma dojke), citostatik doksorubicin i ^{111}In . SPECT i MRI vizualizacija je pokazala uspješno nakupljanje SMNČ u tumoru aktivnim i pasivnim mehanizmom ciljanja zahvaljujući EPR efektu i antitijelu, a studije primjene trostruke terapije su pokazale efikasnost hipertermije, citostatske i imunoterapije na ksenograftu tumora dojke (slika 13) (170,171).



Slika 13. Multifunkcionalnost SMNČ (172).

Pored dijagnostičkih radionuklida, i terapijski radionuklidi su korišteni za obilježavanje SMNČ i dobijanje multifunkcionalnih agensa sa ciljem da se kombinovanim efektom hipertermije i radionuklidne terapije ostvari veći potencijal u terapiji malignih tumora.

Pri izboru terapijskog radionuklida za obilježavanje SMNČ treba obratiti pažnju na slijedeće faktore: vrsta i energija čestica i/ili fotona koju emituju, vrijeme poluraspada, fizičko-hemijske osobine radionuklida i tehnika obilježavanja, a ne smije se zanemariti ni cijena i dostupnost radionuklida.

Kao što je prethodno rečeno, u radionuklidnoj terapiji je neophodno koncentrisanje terapijskog radioizotopa u tumorskom tkivu i dovoljno jaka energija koja će prouzrokovati razaranje tumorskih ćelija u što kraćem vremenskom periodu, sa što manjim štetnim posljedicama po okolno zdravo tkivo. Zato su α i β emiteri najbolji kandidati za obilježavanje SMNČ, jer emituju čestice sa jakom energijom i malim dometom (visok LET) i time postižu prenos energije malignim ćelijama sa minimalnim ozračivanjem zdravog tkiva. Energija čestica treba biti i u skladu sa biodistribucijom SMNČ u svim tkivima. Ukoliko je energija čestica mala, a biodistribucija SMNČ nehomogena, ozračivanje tumorskog tkiva biće nepotpuno. U slučaju da je domet čestica veći od samog tumorskog tkiva, ozračivanje zdravog tkiva će biti znatno u odnosu na tumorsko tkivo. Vrijeme poluraspada radionuklida mora biti dovoljno dugo da bi omogućilo proizvodnju, obilježavanje i terapijski tretman SMNČ, ali i dovoljno kratko radi smanjenja radiotoksičnosti na zdrava tkiva. Ako je poluvrijeme raspada suviše kratko, a lokalizacija obilježenih SMNČ spora, postoji mogućnost da se radionuklid raspadne prije nego dođe do ciljanog tkiva. U tom slučaju, najveći dio zračenja će djelovati na okolna tkiva.

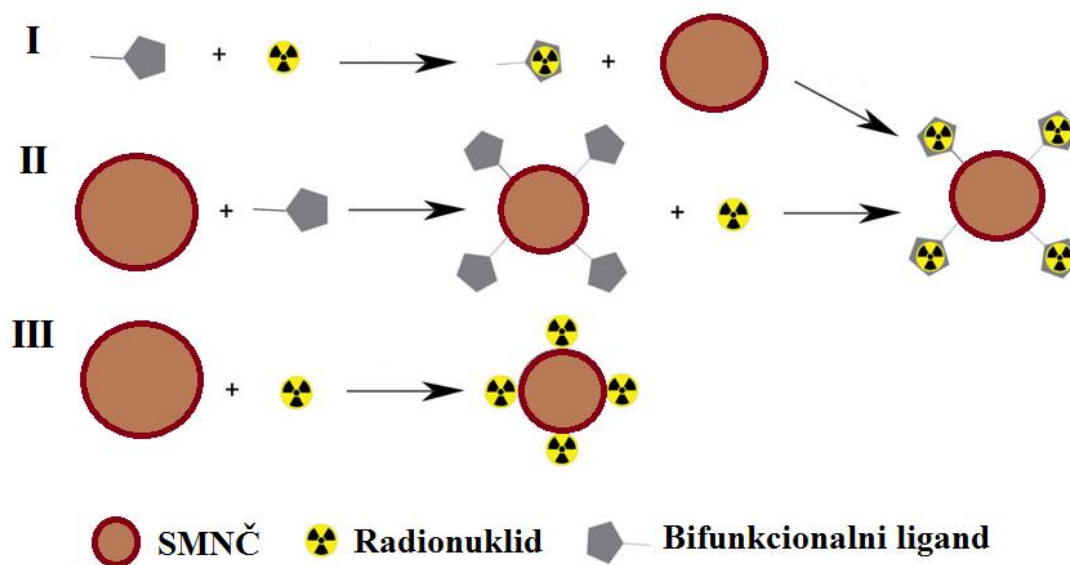
Sa druge strane, ako je poluvrijeme raspada suviše dugo, povećaće se primljena radijaciona doza u tumorskom i u zdravom tkivu. Takođe, pri izboru SMNČ-a i radionuklida treba voditi računa koja SMNČ će poboljšati farmakokinetiku i distribuciju radionuklida i time pojačati zajednički terapijski efekat. Relativno velika veličina i molekulska masa SMNČ produžuje retenciju i usporava klirens radioizotopa iz organizma, što dovodi do poboljšanja aktivnog ciljanja tumorskih ćelija kao i isporučivanja optimalne radijacijske doze. Najpoželjnija veličina SMNČ je do 100 nm, kako bi stigle u tumorske ćelije zaobilazeći sinusoid slezine i fenestre jetrenih Kupferovih ćelija (150-200 nm) (19,173).

Dodatni značaj pri obilježavanju SMNČ daju radionuklidi, koji osim terapijskog zračenja, su izvori γ ili pozitronskog zračenja, jer pružaju mogućnost praćenja terapije nakon

injektovanja pomoću SPECT i PET tehnologija. Obilježavanje radionuklidima kao što su ^{177}Lu ili ^{131}I , koju emituju propratno γ zračenje, moguće je osim terapijskog efekta pratiti i biodistribuciju obilježenog jedinjenja. Zbog emisije β zračenja od 606 keV i posljedičnim maksimalnim dometom od ~ 3 mm u tkivu, ^{131}I je izabran kao najpodgodniji radionuklid za obilježavanje SMNČ u disertaciji. Poluvrijeme raspada radionuklida ^{131}I od 8 dana daje mogućnost za ispoljavanje maksimalnog terapijskog efekta obilježenih SMNČ i monitoringa biodistribucije i retencije u tumoru. Takođe, treba napomenuti njegovu dugotrajnu primjenu u nuklearnoj medicini, relativno laku dostupnost i nisku cijenu (174).

2.6. Obilježavanje SMNČ radionuklidima

Metoda obilježavanja SMNČ radionuklidom mora biti optimizovana, jer je neophodno da nakon obilježavanja, SMNČ budu *in vitro* i *in vivo* stabilne. Ukoliko su kompleksi nedovoljno stabilni radionuklidi se oslobađaju i deponuju na neželjenim mjestima, što može dovesti do neuspjeha terapije. Postoje tri tehnike za obilježavanje SMNČ (slika 14).



Slika 14. Mogući načini obilježavanja SMNČ sa radionuklidom.

Prvi pristup je korištenje bifunkcionalnog liganda koji sa jedne strane ima helator za kompleksiranje radionuklida, a sa druge strane ima aktivno mjesto za vezivanje za površinu

SMNČ. Korištenjem te tehnike, prvo se obilježi ligand koji kasnije stvara hemijsku vezu sa SMNČ. Ovom metodom se stvara jaka veza između radionuklida i SMNČ i dobijaju se stabilni kompleksi (175). Drugi pristup je stvaranje kovalente veze između liganda i SMNČ sa naknadnim obilježavanjem radionuklidom. Ove dvije tehnike se primjenjuju kod obilježavanja SMNČ sa trovalentnim metalima, kao što su ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{153}Sm , ^{213}Bi , ^{149}Tb . Kao ligandi koji stvaraju stabilne veze sa metalima koriste se etilendiaminotetrasirćetna kiselina (EDTA), dietilentriaminotetrasirćetna kiselina (DTPA), 1,4,7,10-tetrazociklododekantetrasirćetna kiselina (DOTA) (176–178) i njihovi modifikovani derivati. Treći način je inkorporacija radionuklida u samo jezgro SMNČ tokom njihove sinteze kao što je sinteza radioaktivnih ^{198}Au -SMNČ, koje se dobije iradijacijom stabilnog Au tokom sinteze (78,154).

Obilježavanje SMNČ radioizotopima joda, se zasniva na reakciji elektrofilne supstitucije sa aminokiselinskim ostacima peptidnih vrsta i naknadnim stvaranjem amidne veze sa funkcionalnim grupama na površini SMNČ. Do sada su samo *Chen* i saradnici obilježili sa ^{131}I SMNČ obložene dekstranom, prethodnim vezivanjem ^{131}I za RNK molekulu ili antitijelo i ispitali njihov terapijski efekat radionuklidne terapije i hipertermije na modelu hepatocelularnog karcinoma (179,180).

U doktorskoj disertaciji za vezivanje ^{131}I za obložene SMNČ korišteno je CC49 antitijelo koje predstavlja drugu generaciju mišijeg IGG₁ monoklonskog antitijela (mAt), koji reaguje sa disahardininim sijalnim Tn epitopom na ekstracelularnom antigenu (*tumor-associated glycoprotein-72* ili TAG-72) (181–183). TAG-72 je izražen na ~85% humanih adenokarcinoma kao što su karcinomi kolona, ovarijuma, pankreasa, dojki, prostate i pluća nemalih ćelija (184–189). CC49 mAt obilježeno sa ^{177}Lu i ^{131}I je pokazalo odlične rezultate u ciljanju tumora u ispitivanjima sprovedenim na tumor indukovanim miševima i na ljudima (190–195).

2.7. Razvoj nanomedicinskog preparata

Korištenje nanotehnologije za razvoj potencijalnih liganada i primjena kombinovanog efekta magnetne hipertermije i radionuklidnog zračenja je aktuelna tema mnogih istraživanja i u budućnosti bi moglo predstavljati efikasan terapijski pristup. Razvoj bilo kojeg farmaceutskog preparata, pa i nanomedicinskog preparata je izuzetno izazovan i sastoji se iz nekoliko faza: fizičko-hemijske karakterizacije, evaluacije biokompatibilnosti i nanotoksikologije, procjene farmakokinetike i farmakodinamike, kao i kontrole procesa i reproducibilnosti proizvodnje (79).

2.7.1. Fizičko-hemijska karakterizacija SMNČ obilježenih radionuklidom

Fizičko-hemijska karakterizacija je prvi korak ka razumjevanju ponašanja lijeka u ljudskom organizmu, kao i pokazatelj za procjenu sigurnosti. Ne postoji konačna lista niti konačan broj parametara za karakterizaciju koji bi trebalo ispitati. Međutim, slijedeće fizičko-hemijske karakteristike bi mogle poslužiti kao početna tačka karakterizacije: veličina, oblik i distribucija veličina čestica, agregacija i aglomeracija čestica, kristalna struktura, hemijski sastav, hemija i naelektrisanje površine čestica, zeta potencijal (196,197). Za neobložene i obložene SMNČ neophodno je odrediti i vrijednosti magnetizacije (M_s) i SPA. Nakon obilježavanja SMNČ radionuklidom, radiohemijska čistoća je parametar koji se mora odrediti prije *in vitro* i *in vivo* istraživanja.

Radiohemijska čistoća (RCP) se definiše kao odnos radioaktivnosti ispitivanog radionuklida prisutnog u deklarisanom hemijskom obliku u uzorku, i ukupne radioaktivnosti tog radionuklida u uzorku (izražava se u procentima). Uobičajeno je da RCP obilježenih SMNČ treba da bude veća od 90%. Metode za ispitivanje RCP moraju da budu brze i jednostavne kao što su npr: tankoslojna hromatografija (TLC), hromatografija na hartiji, visokoefikasna tečna hromatografija pod visokim pritiskom (HPLC), elektroforeza na papiru i natrijum dodecil sulfat poliakrilamid gel (SDS-PAGE) elektroforeza. TLC je najjednostavnija i veoma brza analitička metoda za ispitivanje radiohemijske čistoće. Karakteristično je da nema visoku rezoluciju i osetljivost kao HPLC, ali ipak omogućava da se cijelokupna radioaktivnost naneta na traku, a razdvojena u okviru različitih frakcija, detektuje. Ova metoda daje mogućnost veoma brzog i lakog razdvajanja nevezanog radionuklida od obilježenih SMNČ-a.

Ispitivanjem RCP obilježenog jedinjenja u toku vremena inkubacijom na 37 °C u fiziološkom rastvoru ili humanom serumu, moguće je pratiti *in vitro* stabilnost SMNČ-a obilježenih radionuklidom. Visoka RCP u toku dužeg vremenskog perioda pokazuje da je jedinjenje nepromenjenih fizičko-hemijskih osobina i da je primenljiva za dalja *in vivo* ispitivanja i kasniju kliničku upotrebu.

2.7.2. Biokompatibilnost i nanotoksikologija SMNČ obilježenih radionuklidom

Biokompatibilnost se definiše kao sposobnost neizazivanja neželjene reakcije organizma (198). Biokompatibilnost je opisni pojam koji se odnosi na biološku prihvatljivost materijala korištenih u medicini na mjestu primjene tj. izostanak značajne interakcije između materijala i okolnog tkiva. Pretkliničko ispitivanje biokompatibilnosti i nanotoksikologije se sprovodi kroz specifična *in vitro* i *in vivo* istraživanja. *In vitro* istraživanja se koriste za ispitivanje citotoksičnosti, koje se sprovodi na ćelijskim linijama, primarno na ćelijama tkiva od značaja ili miješanim ćelijskim kulturama. Bez obzira što su navedena ispitivanja jeftina i daju korisne informacije o viabilnosti ćelija, ova istraživanja imaju veliki nedostatak koji se ogleda u teškoći reprodukcije odnosa između nanomaterijala i ćelije, tkiva, organa u ljudskom organizmu. *In vitro* ispitivanja ne mogu predvidjeti patofiziološki odgovor organizma kada se izloži dejstvu SMNČ. S toga, *in vivo* ispitivanja farmakokinetike i farmakodinamike daju relevantnije podatke o biokompatibilnosti i toksikologiji nanočestica (199,200).

2.7.3. Farmakokinetička i farmakodinamička ispitivanja SMNČ obilježenih radionuklidom

Farmakokinetička ispitivanja predstavljaju ispitivanja apsorpcije, biodistribucije, metabolizma i eliminacije nanomaterijala nakon unošenja u organizam. U većini slučajeva, farmakokinetička ispitivanja SMNČ obilježenih radionuklidom se odnose na ispitivanja biodistribucije, čiji način sprovođenja zavisi od načina aplikacije SMNČ (201). Nakon dokazivanja zadovoljavajuće RCP obilježenih SMNČ, kao važnog uslova za njihovu akumulaciju u ciljanom organu sa minimalnim nakupljanjem u organima karakterističnim za radiohemijske nečistoće, i potvrde njihove *in vitro* stabilnosti, pristupa se *in vivo* ispitivanjima. U toku *in vivo* ispitivanja dobijaju se informacije o biološkom ponašanju obilježenih SMNČ u

toku maksimalnog vremenskog intervala nakon injektovanja u eksperimentalne životinje, koje su najčešće zdravi pacovi i/ili miševi, zdravi ili sa indukovanim tumorima. U ispitivanjima biodistribucije obilježenih SMNČ, akumulacija SMNČ u organima od značaja i tumorima se izražava kao procenat injektirane doze po gramu tkiva ili procenat injektirane doze po organu. U farmakodinamička ispitivanja spadaju ispitivanja terapijskog i toksikološkog efekta obilježenih SMNČ na organizam, koje se izvodi mjerenjem dimenzija tumora i masa eksperimentalnih životinja u tačno određenim vremenskim tačkama. Patohistološkim ispitivanjem organa i tumora može se dobiti makroskopska i mikroskopska potvrda prisustva i terapijskog/toksičnog efekta SMNČ obilježenih radionuklidom.

3. CILJEVI I RADNE HIPOTEZE

3.1. Ciljevi istraživanja

1. Sinteza biokompatibilnih SMNČ i ispitivanje uslova za oblaganje sintetisanih SMNČ APTES-om i DMSA-om.
2. Određivanje specifične apsorpcije obloženih SMNČ-a i ispitivanje mogućnosti njihove primjene u magnetnoj hipertermiji.
3. Ispitivanje uslova obilježavanja obloženih SMNČ jodom-131 indirektnom metodom, tj. ispitivanje efikasnosti konjugacije jodom-131 obilježenog monoklonskog antitijela CC49 sa obloženim SMNČ.
4. Ispitivanje biološkog ponašanja i efekta dualne terapije radioobilježenih SMNČ na eksperimentalnom životinjskom modelu (NOD-SCID miševi sa indukovanim adenokarcinomom kolona).

3.2. Radne hipoteze istraživanja

1. Primjenom odgovarajuće metode sinteze SMNČ i njihovim oblaganjem APTES-om i DMSA-om dobijaju se stabilne i biokompatibilne SMNČ.
2. Sintetisane obložene SMNČ posjeduju osobine koje im omogućuju primjenu u magnetnoj hipertermiji.
3. Vezivanjem ^{131}I za SMNČ indirektno preko monoklonskog antitijela dobijaju se obilježene SMNČ stabilne *in vitro* i *in vivo*.
4. Obilježene SMNČ, kada se primjene na eksperimentalnom životinjskom modelu sa indukovanim adenokarcinomom kolona, ispoljavaju antitumorni efekat putem dualne radionuklidno-hipertermijske terapije tumora.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio doktorske disertacije je urađen u Centru izuzetnih vrijednosti Laboratorije za radioizotope i Laboratorije za teorijsku fiziku i fiziku kondenzovane materije Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Reagensi korišćeni za sintezu i oblaganje SMNČ-a, kao i njihovu konjugaciju sa radioobilježenim antitijelom su komercijalni proizvodi odgovarajuće čistoće.

Reagensi:

- Gvožđe(II) sulfatheptahidrat, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich
- Gvožđe(III) hloridheksahidrat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Fluka
- Gvožđe(II) hloridtetrahidrat, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Fluka
- Amonijumhidroksid 25%, Zorka Pharma Hemija
- Natrijumhidroksid, NaOH, Sigma-Aldrich
- Dietilenglikol (DEG), Sigma-Aldrich
- N-Metildietanolamin (NMDEA), Sigma-Aldrich
- Azotna kiselina, HNO_3 , Sigma-Aldrich
- Fosforna kiselina, H_3PO_4 , Zorka Pharma Hemija
- Etanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, Merck
- Metanol, CH_3OH , Merck
- Etilacetat, $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, Merck
- Gvožđe(III) nitrat nonahidrat, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, Merck
- (3-aminopropil)trietoksilan, Sigma-Aldrich
- Dimerkaptosukcinska kiselina, Sigma-Aldrich
- Dimetilsulfoksid (DMSO), $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, Sigma-Aldrich
- 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] karbodiimidhidrohlorid, Sigma-Aldrich
- N-hloro-p-toluensulfonamid, Hloramin-T, Sigma-Aldrich
- 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolin-6 sulfonska kiselina) diamonijum so (ABTS), Sigma-Aldrich
- Akrilamid, $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$, Sigma-Aldrich
- N,N'-Metilenbis(akrilamid), bis akrilamid, Sigma-Aldrich
- Tris-HCl pufer, Sigma-Aldrich
- 2-Amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol, Tris baza, Sigma-Aldrich

- Natrijumdodecilsulfat (SDS), $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$, Sigma-Aldrich
- Tetrametiletilendiamin (TEMED), Sigma-Aldrich
- Tween[®] 20, Sigma-Aldrich
- Amonijumpersulfat (APS), Sigma-Aldrich
- Bromfenol plavo, Thermo Fisher Scientific
- Ditiotreititol (DTT), Sigma-Aldrich
- Glicin, $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$, Sigma-Aldrich
- Glicerol 99%, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$, Zorka Pharma Hemija
- Destilovana voda
- Ultračista (Milli Q) voda
- Anti-TAG 72 humano monoklonsko antitijelo (IgG1), Abcam
- Anti-Hep B eAg mišije monoklonsko antitijelo (IgG1), Santa Cruz Biotechnology
- Anti-humano kozije antitijelo konjugovano sa peroksidazom hrena (HRP) za ELISA tehnike, Abcam
- Tumorska ćelijska linija LS174T (ATCC[®] CL-188[™]), American Type Culture Collection
- RPMI-1640 medijum, Merck
- Na^{131}I (29,64 GBq/cm³ u 0,05 M karbonatnom puferu), Polatom
- Koncentrovana hlorovodonična kiselina, HCl, Merck
- Sephadex[®] G-25, Upsala
- Humani serum albumin 20% - „Zavod za transfuziju krvi” Beograd
- Fiziološki rastvor (0,9% NaCl)

Potrošni materijal:

- Whatman No. 1 trake, Merck
- TLC silika-gel trake Kieselgel 60 (Merck, Nemačka)
- Crijeva za dijalizu (MWCO - 12kDa), prečnika 15 mm, širine 23 mm, Sigma-Aldrich
- Mikrotitar pločice sa 96 bunarčića, Thermo Scientific[™] Nunc
- Polarizovane mikroskopske pločice (Superfrost Plus, Thermo Scientific)

Aparati:

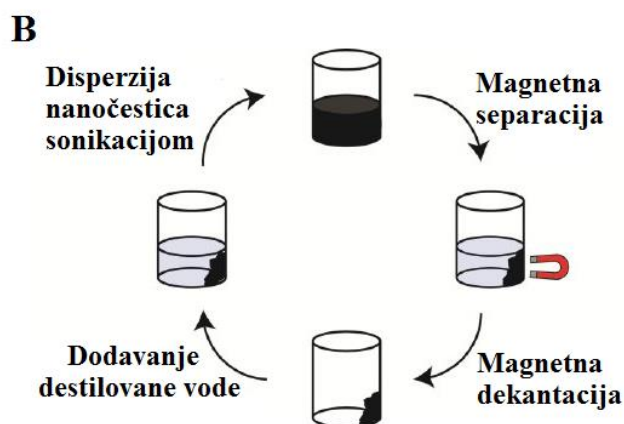
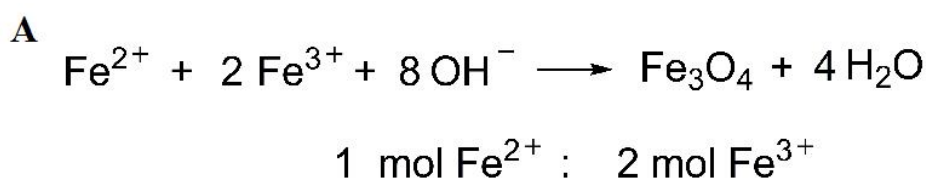
- Centifuga Beckman Avanti J-20, Beckman Coulter Life Sciences, SAD
- Aparat za elektroforezu Hoefer®SE250, Heofer Inc, SAD
- NaI (Tl) gama brojač, Wizard 2480, Perkin Elmer, SAD
- Doze kalibrator, Capintec CRC-15 beta, SAD
- UV-VIS spektrofotometar, Molecular devices Spectra MAX 250, Marshall Scientific, SAD
- DM 100 uređaj, nB nanoScale Biomagnetic, Španija
- BRUKER® In-Vivo Xtreme II uređaj, Bruker, SAD
- JEOL-JEM-1010 transmisioni elektronski mikroskop, JEOL, Japan
- SmartLab® X-ray difraktometar visoke rezolucije, Rigaku, Japan
- Zetasizer Nano – ZS90 uređaj, Malvern Instruments Ltd, Velika Britanija
- Nicolet iS50 FT-IR spektrofotometar, Thermo Fisher Scientific, SAD
- Quantum Design VersaLab™ VSM5XL magnetometar, Quantum Design, SAD
- Kriotom, Kedi Instrumental Equipment, Kina
- Leica DM LS2 mikroskop, Leica Microsystems, Njemačka
- Canon PowerShot S70 kamera, Canon, SAD
- Pećnica UN55, Memmert, Njemačka

4.1. Sinteza superparamagnetnih nanočestica

4.1.1. Sinteza Fe₃O₄ SMNČ

4.1.1.1. Sinteza SMNČ-a taloženjem iz rastvora (metoda koprecipitacije)

SMNČ su sintetisane metodom taloženja iz rastvora koju je razvio *Massart* (202). Dodatkom baze u vodeni rastvor Fe²⁺ i Fe³⁺ soli u molskom odnosu 1:2, dolazi do taloženja magnetita (slika 15 A).



Slika 15. A. Prikaz hemijske reakcije sinteze Fe₃O₄, B. Prečišćavanje suspenzije magnetnom dekantacijom (203).

Pripremljeni vodeni rastvori 0,15 M FeSO₄·7H₂O (0,625 g/15 mL H₂O) i 0,30 M FeCl₃·6H₂O (1,216 g/15 mL H₂O) su preneseni u stakleni balon i zagrijavani do 50 °C uz konstantno miješanje. Kada se postigne željena temperatura, u balon se dodaje 20 - 25 mL 25% NH₄OH do postizanja pH = 10 - 11 i nastavi se sa konstantnim mješanjem još 1 sat na istoj temperaturi. Nakon formiranja crnog taloga SMNČ-a, stakleni balon se postavlja na spoljašnji magnet kako bi se magnetne čestice u potpunosti istaložile. Tečna komponenta (supernatant),

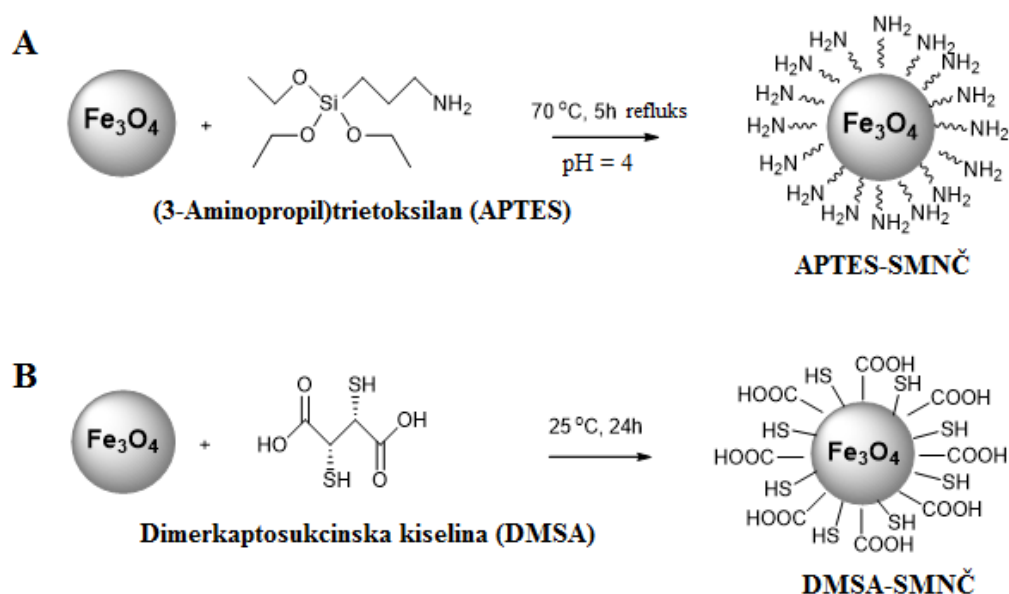
koju čini rastvor sa jonima početnih komponenata koji nisu učestvovali u reakciji koprecipitacije, se dekantuje dok se talog drži na dnu pomoću magneta (magnetna dekantacija). Poslije odlivanja supernatanta i uklanjanja spoljašnjeg magneta, talog se resuspenduje u destilovanoj vodi. Procedura taloženja, dekantovanja i resuspendovanja se ponavlja sve dok se ne postigne pH ~ 7 (slika 15 B). Nakon toga, SMNČ-a se disperguju u 10 mL ultračiste (Milli Q) vode.

4.1.1.2. Sinteza SMNČ-a solvotermalnom metodom u poliolima (poliol metoda)

SMNČ su sintetisane i solvotermalnom metodom taloženja opisanoj u literaturi (204) sa neznatnim modifikacijama. U 80 mL pripremljene tečne smješe poliola NMDEA i DEG-a (1:1, v/v), se doda 2,162 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ i 0,796 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ i smješa se miješa 1 sat na sobnoj temperaturi. Posebno se rastvori 0,64 g NaOH (16 mM) u 40 mL tečne smješe poliola NMDEA i DEG-a (1:1, v/v) na povišenoj temperaturi i dodaje se prethodno pripremljenoj smješi gvožđe hlorida. Dobijena smješa se mješa na magnetnoj mješalici naredna 3 sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga, smješa se prebaci u teflonsku kivetu zapremine od 150 mL i stavi u pećnicu (Memmert UN55, Njemačka) na 220 °C tokom 12 sati. Poslije hlađenja do sobne temeprature i nakon magnetne dekantacije, formirani talog se ispira 3-4 puta smješom etanola/etilacetata (50/50, v/v) radi uklanjanja organskih i neorganskih nečistoća. Nakon ispiranja, u talog se dodaje 30 mL 10% HNO_3 i smješa se stavlja u ultrazvučno kupatilo tokom 10 minuta u cilju redukcije površinskih nedostataka (novonastalih hidroksida gvožđa). Nakon ponovnog taloženja pomoću stalnog magneta, višak kiseline se odliva (dekantuje). U cilju potpune oksidacije i ponovnog rasta nanočestica, u dobijeni talog se dodaje 20 mL 1,5 M vodenog rastvora $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, talog se resuspenduje i prebacuje u dvogrli balon i smješa se mješa mehaničkom mešalicom na 80 °C narednih 45 minuta. Poslije hlađenja do sobne temperature, taloženja i dekantacije supernatanta, talog se još jednom tretira sa 30 mL 10% HNO_3 u ultrazvučnom kupatilu tokom 15 minuta. Nakon dekantacije viška kiseline, dobijene SMNČ se ispiraju naizmjenično po 2 puta sa acetonom i dietileterom kako bi se uklonili kiselinški ostaci. Nakon toga, SMNČ se ispiraju nekoliko puta sa po 20 mL destilovane vode metodom magnetne dekantacije, a zatim se disperguju u 10 mL ultračiste (mili Q) vode (205).

4.1.2. Oblaganje sintetisanih SMNČ silanolnim grupama – APTES-SMNČ

Rastvor silanskog polimera se priprema na taj način što se u 24,5 mL destilovane vode doda 0,5 mL APTES-a a zatim se ukapava glacijalna sirćetna kiselina, koja ima ulogu katalizatora, do postizanja pH vrijednosti ~ 4. Rastvor se zatim ostavi 2 sata na sobnoj temperaturi da bi se APTES polimerizovao. Nakon toga po 10 mL rastvora dobijenog polimerizovanog APTES-a, se dodaje u po jednu polovinu suspenzije ferofluida (~150-350 mg) koji su sintetisani i metodom koprecipitacije i polirol metodom, a koji se nalaze u troglim balonima od 250 mL, uronjenim u vodeno kupatilo, opremljenim refluks kondenzatorom i termometrom. Smješe se zatim zagrijavaju tokom 5 sati na temperaturi od 70 °C uz mehaničko miješanje od ~200 o/min. Posle hlađenja do sobne temperature, suspenzije se unesu u crijeva za dijalizu (MWCO - 12kDa) i stave na dijalizu naspram destilovane vode preko noći na sobnoj temperaturi uz miješanje do postizanja pH vrijednosti suspenzija između 7 i 8 (slika 16 A) (11,206).



Slika 16. Oblaganje SMNČ. A. APTES-SMNČ, B. DMSA-SMNČ.

4.1.3. Oblaganje sintetisanih SMNČ karboksilnim grupama – DMSA-SMNČ

Za funkcionalizaciju DMSA-om, u drugu polovinu suspenzija ferofluida SMNČ (~150-350 mg) koji su sintetisani i metodom koprecipitacije i poliol metodom, a koje se nalaze u erlenmajerima od 50 mL, dodato je po 10 mL 0,8 M rastvora DMSA u DMSO (pH vrijednost 6). Suspenzije se zatim mješaju na laboratorijskom šejkeru na sobnoj temperaturi u toku 24 sata. Nakon toga suspenzija se unese u crijevo za dijalizu (MVCO - 12kDa) i stavi na dijalizu naspram destilovane vode preko noći na sobnoj temperaturi uz miješanje do postizanja pH suspenzija između 7 i 8 (slika 16 B) (207–209).

4.2. Uređaji i metode za fizičko-hemijsku karakterizaciju SMNČ

4.2.1. Elektronska mikroskopija

Veličina neobloženih SMNČ, distribucija po veličinama i morfologija određene su pomoću transmisiona elektronske mikroskopije (TEM) na JEOL-JEM 1010 (JEOL, Japan) mikroskopu sa ubrzavajućim naponom od 100 kV. Razblaženi uzorci suspenzija SMNČ-a sintetisanih metodom koprecipitacije i poliol metodom, u vidu kapljica su nanošeni na bakarne nosače obložene ugljenikom i nakon toga su ostavljeni na sobnoj temperaturi da rastvarač ispari. Slike su obrađene pomoću *Image J* softvera u manuelnom modu. Veličina nanočestica (d_{TEM}) je određena mjerenjem najdužeg unutrašnjeg prečnika najmanje 100 nanočestica. Nakon toga, rezultati mjerenja su unjeti u normalizovanu logaritamsku funkciju (5) u Origin[®]Pro (verzija 8.5) programu:

$$y = y_0 + \frac{A}{\sqrt{2\pi\omega x}} \exp \frac{-\left[\ln \frac{x}{x_c}\right]^2}{2\omega^2} \quad (5)$$

kako bi se odredila aritmetička sredina \pm standardna devijacija i indeks polidisperziteta (PdI%).

4.2.2. Magnetna mjerenja

Magnetna svojstva neobloženih SMNČ su ispitivana korišćenjem Quantum Design VersaLab[™] VSM5XL magnetometra (magnetno polje $H_{\max} = 5$ T). Uzorci su homogenizovani

i upakovani u želatinske kapsule (ca. 50 mg). Krive promjene magnetizacije u odnosu na jačinu magnetnog polja su snimljene pri konstantnoj temperaturi od 250 K, i jačinama magnetnog polja između -5 T i 5 T. Magnetizacija zasićenja je određena jednačinom:

$$M = M_s \left(1 - \frac{a}{H} - \frac{b}{H^2} \right) \quad (6)$$

gdje je H jačina magnetnog polja, i H teži ∞ (210).

4.2.3. Rendgenska difrakcija na prahu (XRPD)

Kristalna struktura sintetisanih neobloženih i obloženih SMNČ APTES-om i DMSA-om je određena difrakcijom X-zraka na prahu (XRPD) pomoću SmartLab[®] X-ray difraktometra visoke rezolucije (Rigaku, Japan). Kao izvor X-zraka korišćena je rendgenska cev sa bakarnom anodom (CuK α), sa naponom od 40 kV i strujom od 30 mA. Uzorak je pripremljen nanošenjem i ravnanjem suhog praha na silikonskom podmetaču sa nultom pozadinom, dok je difrakciona mapa snimljena u intervalu $10^\circ \leq 2\theta \leq 70^\circ$, sa korakom $0,06^\circ$ i ekspozicijom 15 s po koraku. Prosječna veličina kristalita (d_{XRD}) je određena pomoću Scherrer-ove jednačine (7):

$$d_{XRD} = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (7)$$

gdje je K konstanta čija se vrijednost kreće između 0,9 i 1 i zavisi od mjernog uređaja, λ je talasna dužina zračenja, β je širina na polovini visine, a θ je Bragov ugao. Vrijednosti d_{XRD} su izračunate kao prosjek najintenzivnijih refleksija.

4.2.4. Dinamičko rasejanje svjetlosti (DLS) i zeta (ζ) potencijal

Veličina čestica je određena metodom DLS na uređaju Zetasizer Nano - ZS90 (Malvern Instruments Ltd, Velika Britanija) sa 4 mW He-Ne laserskim izvorom svjetlosti ($\lambda = 633$ nm). Emitovana svjetlost interaguje sa česticama koje su u stalnom kretanju zahvaljujući Brownovom efektu, što dovodi do rasipanja svjetlosti sa čestica u svim pravcima. Detektor koji detektuje fluktuacije intenziteta rasute svjetlosti se nalazio pod uglom od 90° u odnosu na

pravac upadne svjetlosti. Uzorci obloženih SMNČ su razblaženi bidestilovanom vodom do koncentracije 0,1 g/L, zatim su mjereni u odgovarajućim kvarcnim kivetama. Nakon toga se izračunava translacioni difuzioni koeficijent, a zatim se primjenom *Stokes-Einstein*-ove jednačine određuje hidrodinamički dijametar (8):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (8)$$

gdje je D – koeficijent difuzije, k – *Boltzman*-ova konstanta, T – temperatura, η – viskoznost medijuma, R_H – hidrodinamički radijus sfernih čestica.

Zetasizer Nano – ZS 90 uređaj mjeri i ζ -potencijal, koji karakteriše naelektrisanje na površini SMNČ-a, primjenom interakcije svjetlosti lasera i čestica koje su elektroforetski pokretne. Mjerni opseg instrumenta je od 6 nm do 6 μ m. Zeta potencijal čestica je određen u odgovarajućim kivetama (DTS 1070) na $25,0 \pm 0,1$ °C u fiziološkom pH. Urađeno je po deset mjerenja za svaki uzorak, na sobnoj temperaturi.

4.2.5. Furijeova transformaciona infracrvena spektroskopija (FT-IR)

Analiza hemijskih veza i hemijskih grupa neobloženih i obloženih SMNČ je rađena metodom FT-IR na sobnoj temperaturi na Nicolet iS50 FT-IR spektrofotometru (Thermo Fisher Scientific, SAD). Za analizu su korišćeni prahovi uzoraka koji su stavljeni na dijamantsku ploču u Smart iTR modulu za atenuiranu totalnu refleksiju (ATR) i spektrofotometrijska analiza je rađena u spektralnom opsegu od 4000 cm^{-1} do 400 cm^{-1} i rezolucijom od 4 cm^{-1} . Za analizu su korišćeni prahovi SMNČ sušeni na 50 °C tokom 24 h.

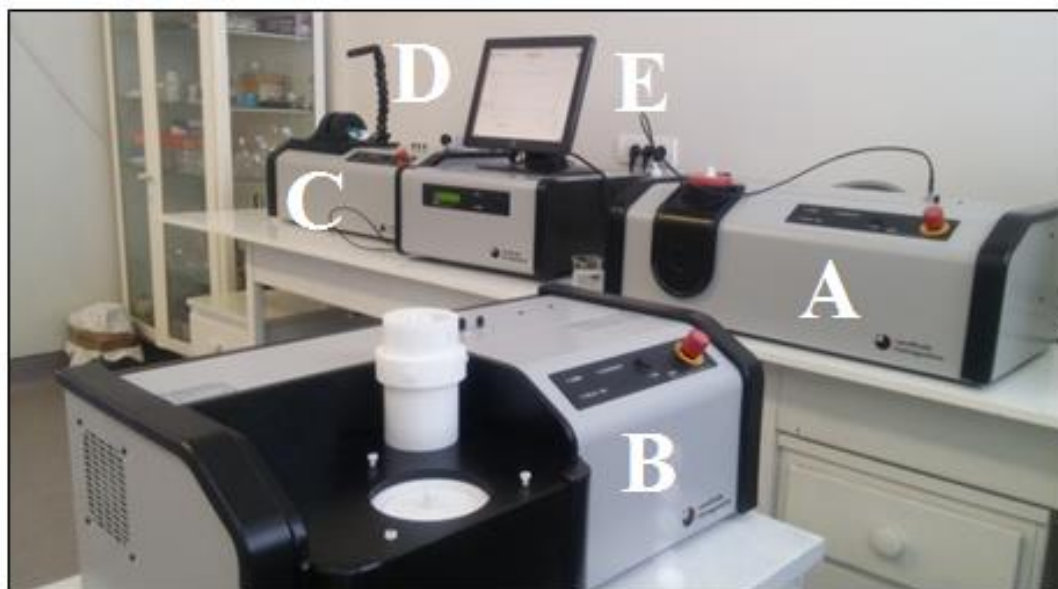
4.2.6. Mjerenja specifične apsorpcije

Specifična apsorpcija (SPA) a time i sposobnost zagrijavanja obloženih SMNČ primjenom promjenljivog magnetnog polja na određenoj frekvenciji ispitivana je pomoću uređaja DM 100 serije (nB nanoScale Biomagnetic, Saragosa, Španija). Uređaj se sastoji od aplikatora koji generišu magnetno polje i odgovarajućih senzora koji detektuju promjene temperature tokom ispitivanja. U zavisnosti od željenog eksperimenta primjenjuje se određeni aplikator DM100 serije:

DM1 – namjenjen kalorimetrijskim ispitivanjima magnetnih nanočestica u fluidima;

DM2 – namjenjen je ispitivanjima magnetnih nanočestica u kulturi ćelija *in vitro*;

DM3 – aplikator za *in vivo* eksperimente na malim laboratorijskim životinjama (slika 17).



Slika 17. Aplikator DM 100 (nB nanoScale Biomagnetic). A. DM1 aplikator za kalorimetrijska ispitivanja magnetnih nanočestica u fluidima. B. DM2 aplikator za ispitivanja u kulturi ćelija. C. DM3 aplikator za *in vivo* eksperimente na malim laboratorijskim životinjama. D. IR kamera (IR1 Thermal Image System). E. Računar za kontrolu sistema.

Za određivanje efikasnosti zagrijavanja obloženih i neobloženih SMNČ korišćen je DM1 aplikator. DM1 aplikator je opremljen senzorom u obliku sonde sa optičkim vlaknom. Senzor je specifično dizajniran za mjerenja temperature magnetnih koloidnih uzoraka. Raspon mjerenja senzora je od $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ sa preciznošću od $\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. DM1 radi u sedam različitih režima frekvencija i sa jačinom magnetnog polja do 300 Gauss (23,850 kA/m) (tabela 4) (211).

Tabela 4. Režimi rada DM1 aplikatora (211).

Režim	Početna frekvencija (kHz)	Korekcija frekvencije (%)	Min B (Gauss)	Maks B (Gauss)	Korekcija polja (%)
1	252	<1%	48	300	<2%
2	323	<1%	48	300	<2%
3	397	<1%	48	300	<2%
4	472	<1%	48	300	<2%
5	577	<1%	48	300	<2%
6	728	<1%	48	252	<2%

SPA vrijednost je određena mjerenjem porasta temperature u 1 mL dispergovanog uzorka (5 mg/mL) na jačini magnetnog polja od 15.9 kA/m i frekvenciji od 252 kHz u vremenu od 3 minuta. U cilju sprečavanja isparavanja uzorka i koloidne destabilizacije, temperatura u uzorku nije prelazila 65 °C.

SPA vrijednost (izražena u W/g nanočestica) je izračunata pomoću jednačine:

$$SPA \text{ (W/g)} = c_{NP} + \frac{\rho_1}{\rho_{NP}} c_1 \left(\frac{dT}{dt} \right)_{max} \quad (9)$$

gdje je ρ_{NP} gustina nanočestice u koloidnom rastvoru, ρ_1 gustina tečnosti u koloidnom rastvoru, $\left(\frac{dT}{dt} \right)_{max}$ maksimalni temperaturni gradijent, a c_{NP} i c_1 specifični toplotni kapacitet nanočestice i vode, redom.

Korišćenjem SPA vrijednosti izračunat je i ILP (Intrinsic Loss Power) parametar, koji se koristi kao nezavisni parametar unutrašnje efikasnosti SMNČ da pretvaraju elektromagnetnu energiju u toplotnu energiju. ILP je izračunat pomoću jednačine:

$$ILP \text{ (nHm}^2/\text{kg)} = \frac{SPA}{H^2 f} \quad (10)$$

gdje je f frekvencija (Hz) i H jačina (A/m) primjenjenog magnetnog polja.

4.3. Optimizacija uslova obilježavanja CC49 monoklonskog antitijela sa ¹³¹I

4.3.1. Obilježavanje humanog/goveđeg serum albumina sa ¹³¹I

S obzirom da su monoklonska antitijela izuzetno skupa, optimizaciji uslova za obilježavanje monoklonskog antitijela CC49 sa ¹³¹I, prethodilo je ispitivanje optimalnih uslova obilježavanja finansijski pristupačnijih proteina sa ¹³¹I, kao što su humani (HSA) ili goveđi serum albumin (BSA). Proteini su obilježavani jodom-131 metodom u kojoj se koristi hloramin-T (HL-T). Rastvori proteina, HL-T i Na₂S₂O₅ su pripremljeni u 0,05 M fosfatnom puferu (pH~7,4). U mikrotubi od 500 µL se prvo doda rastvor proteina i rastvor Na¹³¹I (100 µCi /20 µL) u 0,05 M karbonatnom puferu (pH~7,4). Nakon toga u mikrotubu se dodaje rastvor

HL-T i smješa se miješa na Vorteksu po 30-60 sekundi. Zatim se reakcija obilježavanja proteina jodom-131 zaustavlja dodatkom rastvora redukcionog sredstva - natrijum-metabisulfita (10 mg/mL) u masi za ~30% većoj od prethodno dodanog HL-T. Ispitivani odnosi koncentracija HSA/BSA i hloramina-T, kao i njihovi maseni odnosi prikazani su u tabeli 5. Optimizacija uslova obilježavanja uključuje mijenjanje parametara (koncentracije HSA/BSA i hloramina-T, kao i njihovih masenih odnosa) i određivanje parametara koji obezbjeđuju visoku radiohemijsku čistoću obilježenih proteina.

Tabela 5. Ispitivane koncentracije HSA/BSA i hloramina-T, kao i njihovi maseni odnosi.

Koncentracija HSA/BSA	Koncentracija hloramina-T	Maseni odnos	Radioaktivna koncentracija Na ¹³¹ I	Koncentracija Na ₂ S ₂ O ₅
100 µg/25 µL	100 µg/10 µL	1:1 (212)		130 µg/13 µL
100 µg/25 µL	180 µg/18 µL	1:1,8 (12)	100 µCi /20 µL	240 µg/24 µL
100 µg/25 µL	300 µg/30 µL	1:3 (213)		400 µg/40 µL
200 µg/50 µL	100 µg/10 µL	2:1 (214)		130 µg/13 µL

Ispitivanje radiohemijske čistoće (RCP): Radiohemijska čistoća jodom-131 obilježenih proteina HSA/BSA je ispitivana primjenom radiohromatografske metode tj. tankoslojne hromatografije. Kao stacionarna faza korišćene su komercijalne aluminijumske trake na koje je nanet silika-gel (TLC silika-gel) dužine 15 cm i širine 2 cm, a kao mobilna faza 85% metanol. Na 2 cm od donje ivice trake, se nanosi 0,01 mL ispitivanog uzorka i traka se stavlja u hromatografske kade zasićene mobilnom fazom, u kojima se nalazi mobilna faza visine od 0,5-1 cm. Hromatogram je razvijan na sobnoj temperaturi. Nakon razvijanja, TLC silika-gel traka se suši na vazduhu i sječe na podeoke dužine 1 cm. Raspodjela radioaktivnosti duž trake se određuje mjerenjem radioaktivnosti svakog podeoka u NaI (TI) gama brojaču. Radioaktivnost svakog podeoka se računa u odnosu na ukupnu radioaktivnost trake i izražava u procentima. Pod ovim uslovima, slobodni joni ¹³¹I se kreću zajedno sa frontom mobilne faze (Rf = 0,9-1), dok obilježeni proteini ostaju na startu (Rf = 0,0-0,1). Rf vrednost (retencioni faktor ili faktor zadržavanja) definiše se kao odnos pređenog puta komponente i pređenog puta rastvarača i karakteristična je za svaku komponentu u definisanom hromatografskom sistemu i služi za identifikaciju komponente u analiziranoj smeši.

4.3.2. Obilježavanje nespecifičnog antitijela sa ^{131}I

Nakon određivanja masenih odnosa HSA/BSA i hloramina T koji daju najveći prinos i visoku radiohemijsku čistoću ovih obilježenih proteina, isti maseni odnosi nespecifičnog anti-Hep B e Ag mišijeg monoklonskog antitijela (Hbe7 mAt) i HL-T (1:1,8 i 1:3) su korišćeni kod ispitivanja optimalnih uslova za obilježavanja jodom-131 ovog nespecifičnog monoklonskog antitijela. Kako je uočeno da redukciono sredstvo, natrijum metabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), pri zaustavljanju reakcije obilježavanja antitijela uzrokuje gubitak bioloških i imunoloških osobina antitijela vjerovatno putem kidanja disulfidnih veza između lakih i teških lanaca, ispitivani su i drugi načini zaustavljanja reakcije obilježavanja. U literaturi je navedena mogućnost korišćenja cisteina kao redukcionog sredstva (215) ili prečišćavanje reakcione smješe nakon dodavanja HL-T korišćenjem gel-filtracione hromatografije (Sephadex[®] G-25 u koloni), a bez dodavanja redukcionog sredstva (12,213,216). U tabeli 6 su prikazani reakcioni uslovi za obilježavanje nespecifičnog Hbe7 mAt, kao i koncentracije cisteina koje su korišćene u ispitivanjima.

Tabela 6. Uslovi obilježavanja nespecifičnog Hbe7 mAt sa ^{131}I .

Metoda	Koncentracija antitijela	Koncentracija HL-T	Radioaktivna koncentracija Na^{131}I	Koncentracija cisteina
Cistein	100 μg / 100 μL	180 μg / 18 μL	100 μCi / 20 μL	720 μg / 72 μL
		300 μg / 30 μL		1200 μg / 1200 μL
Sephadex [®] G-25	100 μg / 100 μL	180 μg / 18 μL	100 μCi / 20 μL	-
		300 μg / 30 μL		-

Automatskom pipetom je uzeto 35 μL osnovnog rastvora antitijela (100 μg) i razblaženo sa 0,05 M fosfatnim puferom (pH~7,4) do 100 μL . Rastvoru antitijela u mikrotubi su dodani rastvor Na^{131}I (100 μCi / 20 μL) u 0,05 M karbonatnom puferu (pH~7,4) i rastvor HL-T u 0,05 M fosfatnom puferu u koncentracijama navedenim u Tabeli 8. Nakon miješanja na Vorteksu, u trajanju od 30-60 sekundi, dodan je rastvor cisteina (10 mg/mL) u 0,05 M fosfatnom puferu kako bi se zaustavila reakcija obilježavanja. U uzorcima u kojima je ispitivano korišćenje gel-filtracione hromatografije uzorci su nakon 30-60 sekundi po dodavanju HL-T naneti na kolonu napunjenu Sephadex[®]-om G-25.

Gel-filtraciona hromatografija se zasniva na principu razdvajanja komponenata na koloni poroznog materijala putem „molekulskog sijanja”. Kolona (0,9 x 10 cm) je napunjena gelom na bazi umreženih polisaharida kao što je dekstran (Sephadex[®] G-25) u masi od 20 mg (rastvoren u fosfatnom puferu pH 7.4). Postupak ispitivanja se sastoji u nanošenju ispitivane smješe u zapremini od ~150 µL na vrh stuba gela (dužine 8 cm) koji je prethodno uravnotežen fosfatnim puferom (pH 7.4). Eluiranje frakcija vrši se istim puferom u zapremini od 2 mL (slika 18). Sakupljane su frakcije od po 5 kapi. Radioaktivnost frakcija je mjerena u gama brojaču (Wizard 2480, Perkin Elmer). Frakcije sa najvećom aktivnosti su spojene i izračunat je procenat prinosa radioobilježavanja primjenom sljedeće formule:

$$\text{Prinos radioobilježavanja (\%)} = \frac{\text{radiaktivnost u spojenim frakcijama (MBq)}}{\text{ukupna radioaktivnost naneta na kolonu (MBq)}} \times 100 \quad (11)$$



Slika 18. Gel-filtraciona hromatografija (kolona napunjena Sephadex[®] G-25)

U svim ispitivanim uzorcima (tabela 6) određena je RCP jodom-131 obilježenog nespecifičnog Hbe7 mAt korišćenjem TLC metode (mobilna faza 85% metanol, stacionarna faza TLC silika-gel traka). Uzorci sa najvećom RCP su uzeti za ispitivanje *in vitro* stabilnosti

jodom-131 obilježenog Hbe7 mAt. *In vitro* stabilnost je praćena određivanjem RCP uzoraka koji su ćuvani na sobnoj temperaturi tokom 24 i 48 h koristeći gore navedene hromatografske uslove.

4.3.3. Uticaj aktivnosti joda-131 na RCP obilježenog nespecifićnog antitijela

Nakon određivanja metode obilježavanja koja obezbjeđuje dobijanje visokog prinosa radioobilježavanja sa visokom RCP jodom-131 obilježenog nespecifićnog Hbe7 mAt, ispitivan je uticaj dodate aktivnosti ^{131}I na prinos i RCP obilježenog mAt. U mikrotube sa 18 μL rastvora nespecifićnog mAt (50 μg nespecifićnog mAt u 0,05 M fosfatnom puferu pH~7,4) dodati su rastvori Na^{131}I aktivnosti: 1,85 MBq (50 μCi) i 3,7 MBq (100 μCi) u 0,05 M karbonatnom puferu (pH~7,4). Zatim je dodat rastvor HL-T (180 μg /18 μL u 0,05 M fosfatnom puferu). Nakon miješanja na Vorteksu, u trajanju od 30-60 sekundi, uzorci su naneti na kolonu napunjenu Sephadex[®]-om G-25. Prinos radioobilježavanja, kao i RCP ispitani su gore navedenim metodama.

4.3.4. Ispitivanje cjelovitosti strukture radioobilježenog antitijela

Nakon obilježavanja Hbe7 mAt sa ^{131}I , cjelovitost proteinske strukture antitijela je ispitana elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisustvu natrijum-dodecil sulfata (SDS-PAGE) po proceduri koju je razvio *Leammli* (aparatus za elektroforezu Hoefers[®] SE250, HoefersInc.) (217). Za ispitivanje cijelovitosti Hbe7 mAt korišćen je 10% poliakrilamidni gel. Gel dimenzija 80x75x0,75 mm, pripremljen je između staklene i keramićke ploće u uspravnom položaju (stakleni sendvić). Prvo se formira gel za razdvajanje („*Separating gel*”) (tabela 7) u zapremini od 10 mL a zatim se povrhu njega nanese ~ 2 mL izopropanola kako bi sprećio isušivanje gela za razdvajanje. Nakon polimerizacije gela za razdvajanje u trajanju od 30 minuta, rastvor izopropanola se odlije, površina gela se ispere sa puferom za elektroforezu („*Electrophoresis buffer*”) (tabela 10), a zatim se povrhu njega nanese 2 mL rastvora gela za koncentrovanje („*Stacking gel*”) (tabela 8). U izliveni gel postavlja se plastićna razmaknica („ćešalj”) od 0,75 ili 1,5 mm radi oblikovanja jamica za nanošenje uzoraka. Nakon polimerizacije gela za koncentrovanje u trajanju od 30 minuta, izvuće se plastićna razmaknica i površina gela se ispere puferom za elektroforezu (218). Pufer za elektroforezu se nalije do

vrha staklenog sendviča tako da ispuni i jamice nastojeći da ne zaostanu mjehurići vazduha. Prije nanošenja na gel, uzorci se rastvaraju u puferu za pripremu uzoraka („*Sample buffer*”, tabela 9) u odnosu 1:1 i zagrijavaju se 5-30 minuta na 100 °C u vodenom kupatilu. S obzirom da se ispituju uzorci sa disulfidnim vezama, kao redukciono sredstvo pufer za pripremu uzoraka sadrži DTT ili 2-ME u svom sastavu. Nakon zagrijavanja uzorci se hlade, kratko centrifugiraju pri maksimalnoj brzini (oko 30 s), pa se mikrošpricom nanose u jamice gela. Elektroforeza se provodi u puferu za elektroforezu, pri stalnom naponu struje od 130 V do 150 V za koncentrovanje uzorka u gelu, dok je razdvajanje u gelu provođeno uz stalni napon od 180 V do 200 V i jačinu struje od oko 20 mA. Tok elektroforeze se prati kretanjem boje brom-fenol plavog. Kada boja stigne do 0,5 cm od kraja gela aparat se isključuje, gel se vadi iz staklenog sendviča, prenosi u odgovarajući sud i ispira vodom. Da bi se proteini u gelu fiksirali i obojili, gel se potapa u rastvor za fiksiranje (45% (v/v) metanola, 10% (v/v) glacijalne sirćetne kiseline i 0,125% (w/v) Coomassie brilliant blue[®] R25 boje u destilovanoj vodi) u trajanju od 30 minuta. U cilju uklanjanja viška boje i radi jasnije detekcije proteinskih traka, gel je ostavljen tokom noći u rastvoru za obezbojavanje (12,5% (v/v) izopropanola i 10% (v/v) glacijalne sirćetne kiseline).

Kao proteinski marker za određivanje molekulske mase antitijela/proteina i njihovih frakcija, korišćen je BlueStar Prestained Protein Marker[®] (NIPPON Genetics). Ukoliko proteinske trake sadrže manju masu proteina (0,1-0,05 µg) i ne mogu biti detektovani standardnim bojenjem sa Coomassie brilliant blue[®] R25, gel je bojen srebro nitratom (0,1% w/v AgNO₃ u vodi) prema metodi koju su razvili *Hempelmann* i *Kaminski* (219,220). Raspodela radioaktivnosti je detektovana na gelu ručnim razvijanjem rendgen filma u mračnoj komori i/ili snimanjem gela u BRUKER[®] In-Vivo Xtreme 2 uređaju (Bruker, SAD).

Tabela 7. Sastav gela za razdvajanje („*Separating gel*”).

Zapremina gela	10 mL
Procenat akrilamida	10%
H ₂ O	3.8 mL
30% akrilamid/0.8% bis-akrilamid	3.4 mL
1.5 M Tris, pH 8.8	2.6 mL
10% SDS	100 µL
10% APS	100 µL
TEMED	10 µL

Tabela 8. *Sastav gela za koncentrovanje („Stacking gel”).*

Zapremina gela	5 mL
H ₂ O	2.975 mL
30% akrilamid/0.8% bis-akrilamid	0.67 mL
0.5 M Tris, pH 6.8	1.25 mL
10% SDS	50 µL
10% APS	50 µL
TEMED	5 µL

Tabela 9. *Sastav pufera za pripremu uzoraka („Sample buffer”).*

Zapremina koncentrovanog (2X) pufera	10 mL
4X Tris*Cl/SDS, pH 6.8 (0.5 M)	2 mL
20% SDS/SDS	2 mL/0,4 g
Glicerol	2 mL
200 mM DTT*	0,3 g
Bromfenol plavo	1 mg
H ₂ O	ad 10 mL

*Dodaje se ako se pravi pufer za uzorke sa cisteinom

Tabela 10. *Sastav pufera za elektroforezu („Electrophoresis buffer”).*

Zapremina koncentrovanog (5X) pufera	1000 mL
Tris baza	15,1 g
Tris*Cl	19,62 g
Glicin	94 g
SDS	5 g
H ₂ O	ad 1000 mL

4.4. Obilježavanje CC49 monoklonskog antitijela sa ^{131}I

Nakon optimizacije uslova obilježavanja HSA/BSA i nespecifičnog Hbe7 mAt, CC49 mAt je obilježeno sa ^{131}I pod istim optimizovanim uslovima (tabela 11). Da bi se ispitaio uticaj radioaktivnosti na RCP obilježenog CC49 mAt, u rastvore CC49 mAt su dodati rastvori joda-131 aktivnosti oko 22.57 MBq (610 μCi) i 370 MBq (10 mCi). Nakon obilježavanja, reakcione smješe su prečišćene korišćenjem Sephadex[®] G-25 u koloni i frakcije svake od njih, sa najvećom radioaktivnošću su spojene u jedan rastvor. RCP rastvora određena je korišćenjem prethodno opisane TLC metode.

Tabela 11. Protokol obilježavanja CC49 mAt sa ^{131}I .

Reagensi	Reakciona smješa 1 (R1)	Reakciona smješa 2 (R2)
CC49 mAt (2,9 mg/mL)	700 μg /240 μL	860 μg /250 μL
Na^{131}I	22.57 MBq /180 μL	370 MBq /200 μL
Hloramin-T	2100 μg /210 μL	2400 μg /240 μL

4.4.1. Kvantifikacija ^{131}I -CC49 mAt

Koncentracija CC49 mAt, nakon obilježavanja i prečišćavanja kroz kolonu napunjenu Sephadex[®]-om G-25, je određena metodom po *Bradford*-u (221,222). Za konstruisanje kalibracione krive je korišćen rastvor HSA koncentracije 0.1 mg/mL, razblažen vodom do finalne koncentracije od 0,02 mg/mL (8 razblaženja). Uzorci CC49 mAt, prije i poslije obilježavanja jodom-131, su razblaženi 4 puta. Uzorci poslije obilježavanja jodom-131 pripremljeni su tako što se 50 μL rastvora R1 i R2 prenese u mikrotubu i doda se 150 μL bidestilovane vode (pH = 6-7). U bunarčice (mikrotitar pločice sa 96 bunarčica, Thermo Scientific[™] Nunc, SAD) se doda ili po 50 μL uzoraka rastvora HSA različitih koncentracija ili po 50 μL uzoraka CC49 mAt nakon razblaženja. Nakon toga, u bunarčice sa uzorcima rastvora HSA i CC49 mAt se doda po 50 μL 2,5 puta razblaženog *Bradford*-ovog reagensa (0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue[®] G-250 boje, 23,5% (v/v) metanol i 50% (v/v) fosforna kiselina). Nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku, apsorbcija uzoraka se

očitava na 595 nm na UV-VIS spektrofotometru (Molecular devices Spectra MAX 250). Test je rađen u triplicatu, a kao slijepa proba korišćen je 2,5 puta razblaženi *Bradford*-ov reagens.

Na osnovu očitanih apsorbancija za odgovarajući standardni rastvor HSA, konstruisana je kalibraciona kriva. Vrijednosti za koncentraciju CC49 mAt u uzorcima prije i poslije obilježavanja su izračunate iz jednačine prave: Apsorbancija = f (koncentracija proteina ($\mu\text{g/ml}$)), dobijene metodom linearne regresione analize. Rezultati apsorbanci standardnih rastvora HSA su izraženi kao srednja vrijednost tri mjerenja \pm standardna devijacija.

4.4.2. Ispitivanje imunoreaktivnosti ^{131}I -CC49 mAt

Imunoreaktivnost CC49 mAt u uzorcima prije i poslije obilježavanja sa ^{131}I je ispitana indirektnim imunoenzimskim testom (ELISA). Goveđi mucin podjezičnih žlijezda je zbog strukturne sličnosti sa tumorskim glikoproteinom 72(TAG-72) korišćen kao antigen.

Priprema bunarčića na mikrotitarskim pločicama (Thermo Scientific™ Nunc, SAD), za izvođenje ELISA testa je izvedena rastvorom mucina ($20 \mu\text{g/ml}$) u 0.1 M karbonatnom/bikarbonatnom puferu ($0,76\%$ (w/v) NaHCO_3 , $0,095\%$ (w/v) Na_2CO_3 , pH 8,6) u zapremini od $50 \mu\text{L}$ /bunarčiću. Nakon inkubiranja preko noći na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$, mikrotitarske pločice su ispirane nekoliko puta sa $0,01 \text{ M}$ PBST puferom ($0,05\%$ Tween® 20 u fiziološkom rastvoru puferisanim fosfatom (v/v), pH 7,4), i potom sušene u laminarnoj komori 30 minuta. Da bi se sprečilo nespecifično vezivanje proteina u narednim postupcima ovog testa, slobodna površina bunarčića je blokirana dodatkom $200 \mu\text{L}$ 5% (w/v) obranog mlijeka u prahu rastvorenog u $0,01 \text{ M}$ fiziološkom rastvoru puferisanim fosfatom (PBS) ($0,85\%$ (w/v) NaCl , $0,14\%$ (w/v) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $0,08\%$ (w/v) KCl , $0,02\%$ (w/v) KH_2PO_4 , pH 7,4) na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ u toku 4 sata. Nakon toga, rastvor za blokiranje je uklonjen iz bunarčića i u njih su dodate jednake zapremine (po $50 \mu\text{L}$) različitih razblaženja CC49 mAt i ^{131}I -CC49 mAt.

Za ispitivanja su korištena serijska razblaženja počevši od koncentracije $1 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ (serija od 12 razblaženja 1:1). Nakon inkubacije od 2 sata na sobnoj temperaturi tokom koje dolazi do vezivanja antitijela za antigen, sve nevezane materije su uklanjane ispiranjem tri puta PBST rastvorom, a zatim još tri puta rastvorom PBS. Kao sekundarno antitijelo je korišćeno kozije antitijelo protiv humanog antitijela obilježeno peroksidazom hrena (HRP) koncentracije 1 mg/mL . Prije dodavanja, rastvor sekundarnog antitijela je razrijeđen $1/3000$ sa $0,01 \text{ M}$ PBST

puferom koji sadrži 0,05% BSA. U bunarčice su dodate jednake zapremine razblaženog rastvora sekundarnog antitijela (po 50 μL) i pločice su inkubirane na 25 °C u toku 1,5 sat. Tokom tog vremena, sekundarno antitijelo se veže svojim antigen-vezujućim mjestom za Fab region neobilježenog ili obilježenog CC49 mAt, a koji je vezan za antigen mucin.

Nakon inkubacije, pločice se ispiraju tri puta 0,01 M PBST puferom, a zatim još tri puta 0,01 M PBS puferom. Nakon ispiranja, u bunarčice se dodaje po 100 μL supstrata ABTS-a sa H_2O_2 (neposredno prije upotrebe 11 μL 30% H_2O_2 se doda u 11 mL prethodno pripremljenog 1 mM ABTS-a u 70 mM citratnom puferu, pH 4,2) i pločica se ostavlja u mraku na sobnoj temperaturi u toku 20 minuta zbog odvijanja enzimske hromogene reakcije između HRP i ABTS. Apsorbancija se očitava neposredno poslije toga na 405 nm na mikrotitarskom spektrofotometru (Spectra MAX 250, Molecular Devices, SAD). Sva mjerenja su rađena u duplikatu a rezultujuća apsorbancija je srednja vrijednost mjerenja (10,223).

4.5. Konjugacija ^{131}I -CC49 mAt sa SMNČ

4.5.1. Postupak konjugacije ^{131}I -CC49 mAt sa obloženim SMNČ

Karbodiimidna metoda sa reagensom 1-etil-3-(dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) je korišćena u reakciji konjugacije obilježenih ^{131}I -CC49 mAt-a sa obloženim SMNČ. SMNČ obložene APTES-om (~ 25 mg) se ispiraju dva puta sa po 1 mL 0,1 M pufera (2-(N-marfolino)etansulfonske kiseline (MES pufer) metodom magnetne dekantacije. Nakon drugog ispiranja, talogu obloženih SMNČ se dodaje 60 mg EDC-a (masa EDC-a je nezavisna od mase obloženih SMNČ) rastvorenog u 1,5 mL 0,1 M MES pufera neposredno prije dodavanja. Kako bi odredili optimalan odnos masa mAt i SMNČ kao i uticaj dodate aktivnosti joda-131 na efikasnost konjugacije SMNČ, u rastvor R1 (16,058 MBq/ 311,5 μg ^{131}I -CC49 mAt/ 1140 μL) je dodato 16 mg/1 mL APTES-SMNČ, a u rastvor R2 (222 MBq/ 480 μg ^{131}I -CC49 mAt/ 1670 μL) je dodato 6 mg/375 μL APTES-SMNČ. Obe smješe su mješane 2 sata na sobnoj temperaturi.

4.5.2. Određivanje efikasnosti konjugacije $^{131}\text{I-CC49}$ sa obloženim SMNČ

Nakon 2 sata konjugacije $^{131}\text{I-CC49}$ mAt sa SMNČ obloženih APTES-om, dobijeni konjugat $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ je prečišćen metodom magnetne dekantacije. Radioaktivnosti supernatanta ($^{131}\text{I-CC49}$ mAt) i taloga ($^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$) su mjerene u NaI (TI) gama brojaču (Wizard 2480, Perkin Elmer) i izračunata je efikasnost konjugacije $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ korišćenjem formule:

$$\text{Efikasnost konjugacije (\%)} = \frac{\text{radioaktivnost taloga}}{\text{radioaktivnost taloga} + \text{radioaktivnost supernatanta}} \times 100\% \quad (12)$$

Konjugacija $^{131}\text{I-CC49}$ mAt sa obloženim SMNČ, kao i očuvanje proteinske strukture konjugovanog antitijela je ispitana prethodno opisanom SDS-PAGE metodom.

4.5.3. Određivanje *in vitro* stabilnosti $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$

In vitro stabilnost CC49-SMNČ obilježenih jodom-131 se prati inkubiranjem 0,2 mL suspenzije $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ u 2 mL fiziološkog rastvora (pH=7,4) odnosno u 2 mL humanog seruma na 37 °C tokom 8 dana. Ispitivanje *in vitro* stabilnosti $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ se vrši određivanjem radiohemijske čistoće $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ tankoslojnom hromatografijom, pri čemu su ispitivane različite mobilne faze: 85% metanol, fiziološki rastvor i aceton, kao i stacionarne faze: silika gel i celuloza, u cilju pronalaženja kombinacije koja daje najreproduktivnije rezultate.

4.6. Tumorski ksenografti

U eksperimentima su korišćeni NOD-SCID miševi (starosti 8-10 sedmica, mase od 22-25 g, oba pola) uzgajani u vivarijumu Laboratorije za radioizotope, Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, pod posebnim laboratorijskim uslovima. Miševi su držani u kontrolisanim uslovima u P/N ventiliranom IVC sistemu kaveza (Allentown, SAD) sa slobodnim pristupom hrani i vodi (*ad libitum*). Kavezi su bili smješteni u prostoriji u kojoj se održava temperatura od 25 ± 2 °C, relativna vlažnost od 45 do 50% i 12/12-časovni ciklus svjetlo/tama. Miševi su hranjeni komercijalnom peletiranom hranom i vodom zakišeljnom sa HCl do pH 2.8. Hrana, voda i prostirka sterilizirani su prije upotrebe. Etički odbor Instituta za nuklearne nauke „Vinča” odobrio je eksperimente na miševima (u skladu s nacionalnim zakonom o dobrobiti životinja i Direktivom EU 2010/63/EU) prema dozvoli od Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (dozvola br. 323-07-04725 / 2018-05).

Ksenograft adenokarcinoma kolona je indukovao subkutanom injekcijom 1×10^6 ćelija humane tumorske linije LS174T (ATCC® CL-188™), suspendovanih u 100 μ L RPMI-1640 medijuma za kulturu tkiva, u obrijani bok NOD-SCID miševa oba pola. Dimenzije tumora su mjerene svaki drugi dan pomoću kljunastog pomičnog mjerila (nonijusa), a zapremina tumora je računata prema formuli (224):

$$V(\text{mm}^3) = \frac{\text{dužina (mm)} \times \text{širina (mm)} \times \text{visina (mm)}}{2} \quad (13)$$

Osmog dana, kada su tumori dostigli željenu zapreminu ($\sim 125 \pm 75 \text{ mm}^3$), miševi su bili uključeni u eksperiment.

4.7. Ispitivanje biološke raspodjele i retencije $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$

In vivo stabilnost $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ odn. biološka raspodijela (biodistribucija) i retencija su ispitivane na tumor indukovanim NOD-SCID miševima. U ovim i narednim ispitivanjima, korištene su APTES-SMNČ konjugovane sa $^{131}\text{I-CC49}$. Suspenzija $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ (370 kBq/0,5 mg $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ /0,05 mL) je intravenski injektovana u repnu venu grupi miševa za ispitivanje biodistribucije a intratumorski grupi miševa za ispitivanje retencije. Za ispitivanje i biodistribucije i retencije koristila su se po tri ista tumor indukovana NOD-SCID miša za svaki vremenski interval.

Nakon 15 minuta, 1 sat, 2, 6 i 24 sata od intravenskog injektovanja $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ miševi su uvođeni u anesteziju intraperitonealnom injekcijom ketamina (90 mg/kg)/ksilazina (10 mg/kg) i snimani BRUKER[®]In-Vivo Extreme II uređajem, koji daje mogućnost detekcije radioaktivnosti i anatomske lokalizacije upotrebom X-zraka (slika 19). Takođe su miševi uvođeni u anesteziju i snimani BRUKER[®]In-Vivo Extreme II uređajem nakon 6, 24, 48, 96 i 192 sata od intratumorskog injektovanja $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$.



Slika 19. BRUKER[®] In-Vivo Extreme II uređaj.

Nakon snimanja, miševi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom i radioaktivnost u uzorcima krvi (uzetim graduisanim kapilarama), kao i u organima od interesa (srce, pluća, jetra, slezina, bubrezi, tanko i debelo crevo i tumor) je mjerena u NaI (TI) gama brojaču (PerkinElmer 2480 WIZARD counter). Radioaktivnost u krvi i organima je mjerena u odnosu na standard koji predstavlja aktivnost one zapremine (0,05 mL) konjugata $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ koja je bila injektovana svakoj životinji. Iz odnosa injektovane (radioaktivnost standarda) i izmjerene radioaktivnosti organa izračunata je raspodjela radioaktivnosti u organima i krvi i izražena kao % injektovane doze (ID)/organ.

4.8. Ispitivanje terapijskog efekta $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$

Za ispitivanje efekta hipertermije i radionuklidne terapije korišćene su 3 grupe od po 8, kao i 2 kontrolne grupe od po 7 NOD-SCID miševa sa indukovanim tumorima:

Kontrola 1 - negativna kontrola, intratumorski je injektovano 0,05 mL fiziološkog rastvora, bez izlaganja miševa naizmeničnom magnetnom polju odnosno bez indukcije hipertermije.

Kontrola 2 - intratumorski su injektovane samo SMNČ obložene APTES-om (0.5 mg/0,05 mL), bez izlaganja miševa naizmeničnom magnetnom polju odnosno bez indukcije hipertermije.

Grupa MHT - intratumorski su injektovane samo SMNČ obložene APTES-om konjugovane sa neobilježenim CC49 mAt (0,5 mg/0,05 mL) da bi se ispitaio efekat magnetne hipertermije na veličinu tumora. U uređaju DM100 serije nB nanoScale Biomagnetic, u dijelu DM3 namjenjenom za *in vivo* ispitivanja na eksperimentalnim životinjama, miševi su bili izlagani 30 minuta magnetnom polju ($H_0 = 15,9 \text{ kA/m}$, pod rezonantnom frekvencijom od 252 kHz) svaki drugi dan u toku 14 dana.

Grupa RT - intratumorski je injektovan konjugat $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ (5,55 MBq/0,5 mg $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ /0,05 mL) da bi se ispitaio efekat radionuklidne terapije na veličinu tumora.

Grupa MHT+RT - intratumorski je injektovan konjugat $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ (5,55 MBq/0,5 mg $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ /0,05 mL) i miševi su bili izlagani naizmeničnom magnetnom

polju ($H_0 = 15,9$ kA/m, pod rezonantnom frekvencijom od 252 kHz) u uređaju DM100 serije nB nanoScale Biomagnetic, u dijelu DM3 namjenjenom za *in vivo* ispitivanja na eksperimentalnim životinjama svaki drugi dan u toku 14 dana, da bi se ispitaio efekat kombinovane terapije (radionuklidne terapije i magnetne hipertermije).

Efekat svake terapije pojedinačno je bio određen mjerenjem sve tri dimenzije tumora nonijusom i izračunavanjem zapremine tumora (korišćenjem formule 7) svaki drugi dan nakon intratumorskog injektovanja. Eksperiment je trajao 14 dana i nakon toga miševi su žrtvovani metodom cerviklane dislokacije. Miševi kod kojih su tumori prerasli etički dozvoljenu zapreminu (2000 mm^3) su žrtvovani i pre kraja eksperimenta. Takođe, izračunat je i procenat inhibicije tumorske zapremine (TVIR) nakon svakog terapijskog postupka (indikator terapijskog efekta), prema formuli (225):

$$\text{TVIR}(\%) = [1 - (V_{tk} - V_{tp}) / (V_{kk} - V_{kp})] \times 100\% \quad (14)$$

gdje je: V_{tk} - prosječna vrijednost zapremine tumora na kraju terapije, V_{tp} - prosječna vrijednost zapremine tumora na početku terapije, V_{kk} - prosječna vrijednost zapremine tumora kontrolne grupe na kraju terapije, V_{kp} - prosječna vrijednost zapremine tumora kontrolne grupe na početku terapije.

U cilju određivanja toksikološkog profila injektovanog konjugata, mjerene su mase miševa svaki drugi dan i gubitak od 20% u odnosu na početnu masu se smatrao toksičnim efektom konjugata.

4.9. Patohistološka ispitivanja

Četvrtog dana od injektovanja $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$, po jedan miš iz RT i MHT+RT grupe je nakon anestezije, snimljen BRUKER[®] In-Vivo Xtreme II uređajem. Nakon snimanja, miševi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom i izmjerena je radioaktivnost krvi kao i organa od interesa (srce, pluća, jetra, slezina, bubrezi, tanko i debelo crevo, i tumor). Nakon mjerenja radioaktivnosti, organi i tumori su zamrznuti i korišćeni za patohistološka ispitivanja. Za patohistološka ispitivanja su korišćeni i organi i tumori od po jednog miša iz obe kontrolne i MHT grupe, koji su takođe žrtvovani istog dana kao miševi iz RT i MHT+RT grupa.

Tokom autopsije, organi od interesa (mozak, srce, jetra, pluća i bubrezi) su makroskopski pregledani, da bi se ispitalo da li postoje vidljive promjene na njima a posebno je obraćena pažnja na prisustvo metastaza. Organi i tumori nakon izolovanja su zamrznuti u Tissue-Tek[®] O.C.T medijumu i čuvani na temperaturi od $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za patohistološka ispitivanja organi su rezani kriotomom na presjeke debljine $6\text{ }\mu\text{m}$ (Kedi Instrumental Equipment, Kina). Presjeci tkiva su postavljani na polarizovane mikroskopske pločice (Superfrost Plus, Thermo Scientific) i bojeni su standardnom hematoksilin/eozin (HE) metodom za vizuelizaciju ćelija (226,227).

Presjeci tkiva su kvalitativno interpretirani prema morfologiji i stepenu diferencijacije tumora, kao i na prisustvo metastaza u ispitivanim organima. Patohistološki preparati tumorskog tkiva su interpretirani prema semikvantitavnoj analizi baziranoj na stepenu nekroze i fibroze u odnosu na zapreminu tumora (diskretna - ako je $<1/3$ od ukupne zapremine tumora; umjerena - ako je od $1/3$ do $2/3$ od ukupne zapremine tumora; obilna - ako je $>2/3$ od ukupne zapremine tumora).

Vizuelizacija $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ u tumorskom tkivu je prikazana i kvalitativno evaluirana bojenjem sa pruskim plavim (PP) (228). Za dokazivanje intaktnog CC49 mAt korišćena je indirektna imunohistohemijska metoda (IHH) pomoću sekundarnog kozijeg antitijela protiv humanog antitijela obilježenog sa HRP u razblaženju od 1:200 (229).

Svi HE, PP and IHH mikroskopski presjeci su pregledani na Leica DM LS2 mikroskopu (Leica Microsystems, Njemačka) od strane dva nezavisna iskusna patologa koji nisu bili upoznati sa podacima iz eksperimenta. Originalne mikrofotografije uslikane su pomoću Canon PowerShot S70 kamere (uvećanja 200x i 400x).

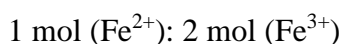
4.10. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka su korišćeni programi MedCalc[®] i IBM[®] SPSS[®] Statistics (verzija 25). Za ispitivanje statistički značajne razlike među dobijenim rezultatima kontrolnih i terapijskih grupa korišćena je univarijantna analiza varijanse (ANOVA). Da bi se utvrdilo postojanje statističke značajnosti između pojedinih grupa, primjenjen je post-hoc test najmanje značajne razlike (*Least Significant Difference (LSD) post hoc test*). Vrijednost p koja je $\leq 0,05$ je smatrana statistički značajnom. Za grafičku obradu podataka korišćeni su softverski paketi Microsoft Excel 2016 i Origin[®]Pro (verzija 8.5). Podaci su prikazani kao aritmetička sredina (\bar{x}) \pm standardna devijacija (SD) i aritmetička sredina \pm standardna greška (SE) i prikazani su tabelarno i grafički.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Sinteza i karakterizacija SMNČ na bazi Fe₃O₄

Količine FeCl₃·6H₂O, FeSO₄·7H₂O i FeCl₂·4H₂O koje su potrebne za sintezu magnetita (Fe₃O₄), metodom taloženja (koprecipitacije) ili poliol metodom, teorijski su izračunate korišćenjem prikazanih hemijskih jednačina. Sinteza magnetita se može prikazati hemijskom jednačinom:



Količine početnih komponenti u sintezi magnetita metodom taloženja su iznosile:

$$FeCl_3 \cdot 6H_2O: \quad 1,216 \text{ g} / 270,30 \text{ g/mol} = 0,0044 \text{ mol}$$

$$FeSO_4 \cdot 7H_2O: \quad 0,625 \text{ g} / 278,02 \text{ g/mol} = 0,0022 \text{ mol}$$

Prema hemijskoj jednačini teorijska masa sintetisanog magnetita je:

$$Fe_3O_4: \quad 0,0022 \text{ mol} \times 231,55 \text{ g/mol} = 0,509 \text{ g } (\sim 510 \text{ mg})$$

Metodom taloženja sintetisano je 340 mg/100 mL Fe₃O₄ SMNČ, što u odnosu na teorijski izračunatu masu sintetisanog magnetita, iznosi ~ 67%. Velika prednost ove metode je nastajanje SMNČ u visokom prinosu, što potvrđuju dobijeni rezultati koji su u skladu sa literaturnim podacima (138).

Količine početnih komponenti u sintezi magnetita poliol metodom su bile:

$$FeCl_3 \cdot 6H_2O: \quad 2,162 \text{ g} / 270,30 \text{ g/mol} = 0,008 \text{ mol}$$

$$FeCl_2 \cdot 4H_2O: \quad 0,796 \text{ g} / 198,83 \text{ g/mol} = 0,004 \text{ mol}$$

Očekivana teorijska masa sintetisanog magnetita poliol metodom je:

$$Fe_3O_4: \quad 0,004 \text{ mol} \times 231,55 \text{ g/mol} = 0,926 \text{ g } (\sim 930 \text{ mg})$$

Poliol metodom sintetisano je 300 mg/100 mL Fe₃O₄ SMNČ, što predstavlja nizak prinos (~ 32%) proizvoda.

Zbog zahtjevnijih uslova za sintezu SMNČ polioliol metodom (visoka potrošnja energije, visoka temperatura, veći broj složenih koraka sinteze koji se teže kontrolišu) i uslijed velikog broja ispiranja nakon sinteze i tretmana sa HNO₃, prinos neobloženih SMNČ nakon sinteze ovom metodom je očekivano manji u odnosu na metodu koprecipitacije (76).

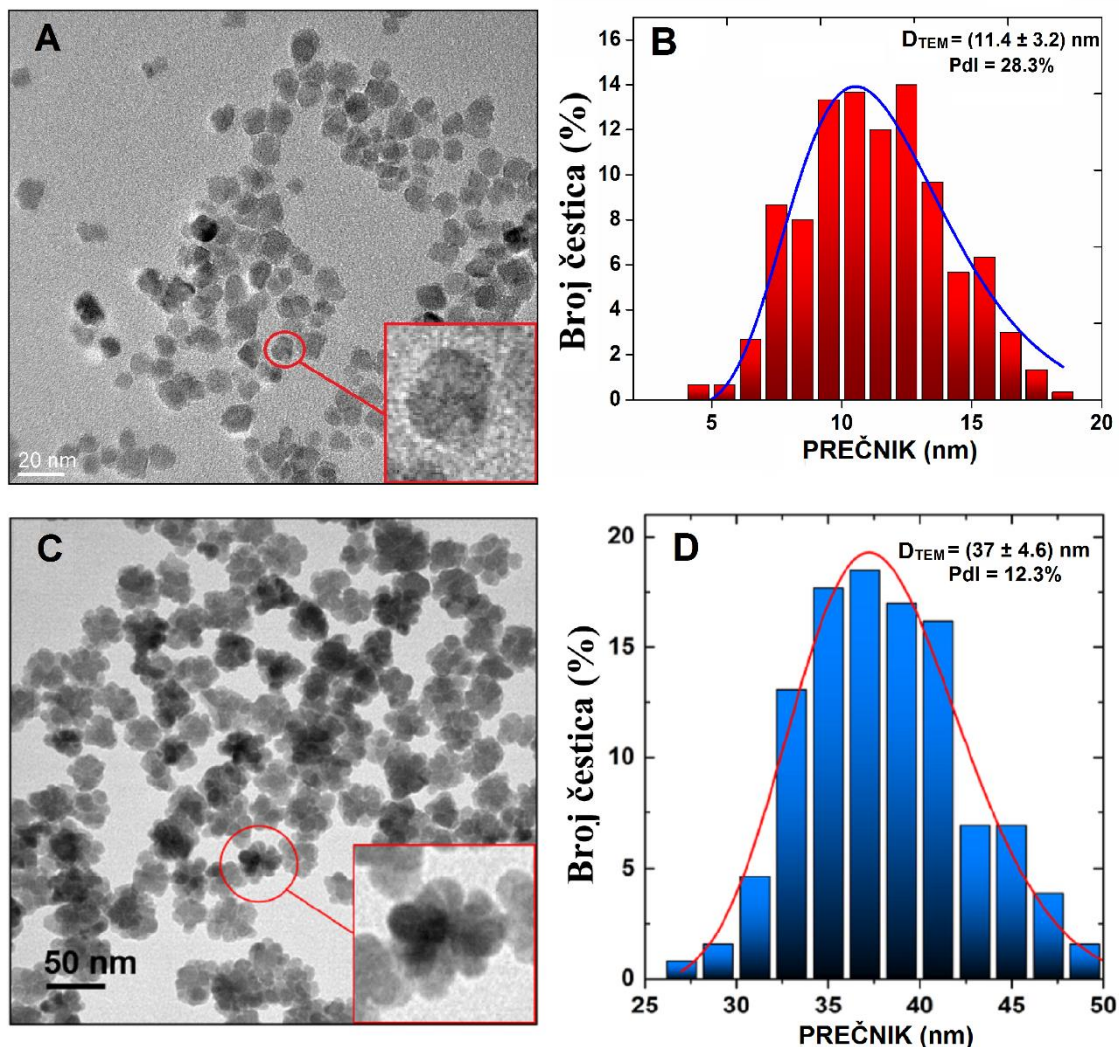
5.1.1. Karakterizacija TEM metodom

Nakon sinteze, oblik (morfologija) i veličina neobloženih SMNČ ispitana je transmisionom elektronskom mikroskopijom (TEM). TEM mikrograf SMNČ dobijenih metodom koprecipitacije pokazuje da su sintetisane nanočestice sfernog oblika („*pseudosphere*”) sa prosječnim prečnikom od $11,4 \pm 3,2$ nm i PdI od 28,3% (slika 20, A i B). Za razliku od SMNČ sintetisanih polioliol metodom, ove nanočestice pokazuju veći afinitet ka aglomeraciji.

SMNČ sintetisane polioliol metodom su cvijetnog oblika („*flower structure*”), sa prosječnim prečnikom od $37,8 \pm 4,6$ nm i PdI od 12,3% (slika 20, C i D). Na TEM mikrografiji može se uočiti da su ove nanočestice aglomerati cvijetne morfologije, sastavljeni od pojedinačnih čestica sfernog oblika sa prosječnim prečnikom od $13,7 \pm 2,5$ nm. Nađena veličina čestica je slična prosječnoj veličini kristalita koja je izračunata primjenom jednačine (5). Ove nanočestice dispergovane u vodi stvaraju stabilan vodeni ferofluid i ne dolazi do njihove aglomeracije.

Poređenjem nanočestica sintetisanih ovim metodama, zaključuje se da se metodom koprecipitacije dobija veći prinos SMNČ manjeg prečnika, kao i da nanočestice pokazuju veći procenat neuniformnosti u veličini (veći PdI) i veću težnju ka aglomeraciji. Bez obzira što je glavna prednost metode taloženja jednostavan i jeftin način sinteze magnetita, njen najveći nedostatak je nemogućnost kontrole svih parametara tokom sinteze, jer veličina i distribucija čestica po veličini zavise od faktora kao što su: pH rastvora, brzine mješanja i temperature. SMNČ sintetisane polioliol metodom su pokazale veću uniformnost čestica što je posljedica bolje kontrole parametara tokom sinteze. Takođe, viša temperatura reakcije (220 °C) i prisustvo

poliola kao disperzionog sredstva, za razliku od vode u metodi koprecipitacije, onemogućava slepljivanje pojedinačnih čestica u veće aglomerate (76,138,205).



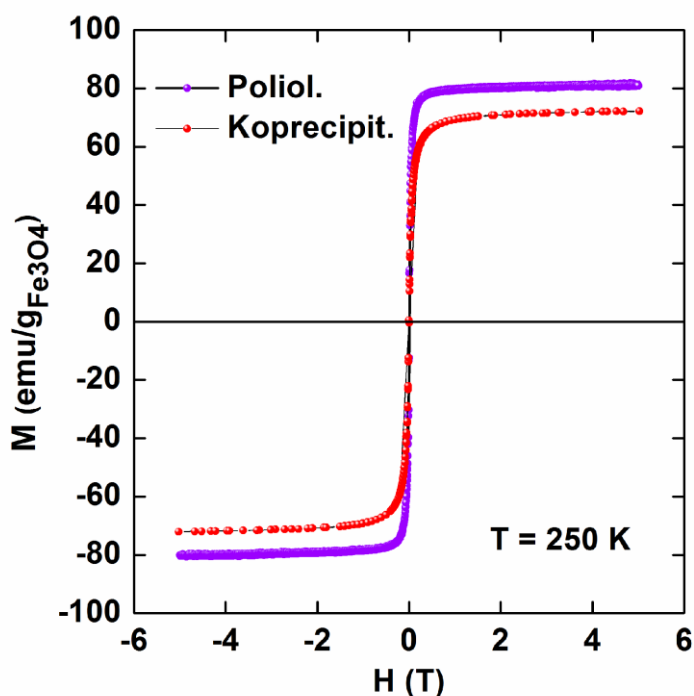
Slika 20. TEM mikrografije neobloženih SMNČ-a. A i B. Sferični oblik čestica sintetisanih metodom koprecipitacije sa distribucijom čestica po veličini SMNČ-a. C i D. Cvijetni oblik čestica sintetisanih poliol metodom sa distribucijom čestica po veličini SMNČ.

5.1.2. Magnetne osobine SMNČ

Izotermalna mjerenja magnetizacije neobloženih SMNČ su urađena pri konstantnoj temperaturi od 250 K u magnetnom polju do ± 5 T. Saturaciona magnetizacija određena je koristeći jednačinu (2). Dobijena vrijednost saturacione magnetizacije neobloženih SMNČ sintetisanih poliol metodom je 80 emu/g^{-1} , koliko iznosi i vrijednost čistog maghemita

(204,230). Vrijednost saturacione magnetizacije SMNČ sintetisanih metodom koprecipitacije je 70 emu/g^{-1} .

Kriva magnetizacije (grafikon 1) prolazi kroz početak magnetizacionog grafika (kada je $M_s = 0$, a i vrijednost $H_c = 0$), prikazujući superparamagnetne osobine nanočestica sintetisanih navedenim metodama. Veća vrijednost saturacione magnetizacije SMNČ sintetisanih poliol metodom u odnosu na koprecipitaciju je najvjerojatnije zbog njihove veće veličine i kao posljedica tretmana uzorka sa 10% HNO_3 i $0,02 \text{ M Fe(NO}_3)_3$.



Grafikon 1. Histerezisne krive neobloženih SMNČ dobijenih metodom koprecipitacije i poliol metodom.

Površina nanočestičnih materijala ima veoma značajan efekat na njihove magnetne osobine. Magnetni joni na površini Fe_3O_4 SMNČ slabije intereaguju međusobno i stvaraju manje nezasićenih i koordinacionih veza, u odnosu na jone koji se nalaze u jezgru (*in bulk*), uslijed čega dolazi do nepotpune orijentacije njihovih magnetnih momenata u smjeru primjenjenog spoljašnjeg magnetnog polja. Što je nanočestica manjeg prečnika, veći je odnos broja površinskih atoma i zapremine, tako da će saturaciona magnetizacija biti niža (231,232).

Tretiranjem taloga SMNČ tokom sinteze poliol metodom sa 10% HNO₃ i 0,02 M Fe(NO₃)₃, dio Fe³⁺ jona iz soli se rekristališe na površini nanočestica i time dolazi do reorganizacije površine nanočestica i povećanja kristalnosti SMNČ, što za posljedicu ima poboljšanje magnetnih osobina. Pošto SMNČ dobijene metodom koprecipitacije nisu tretirane kiselinom i solima Fe, joni Fe na površini su bili u većem stepenu nekoordinisani i zbog toga je vjerovatno njihova saturaciona magnetizacija manja. Dobijeni rezultati su u skladu sa vrijednostima magnetizacija SMNČ prije i poslije tretmana sa kiselinom i solima Fe, koje su izmjerili *Costo* i saradnici (205,233).

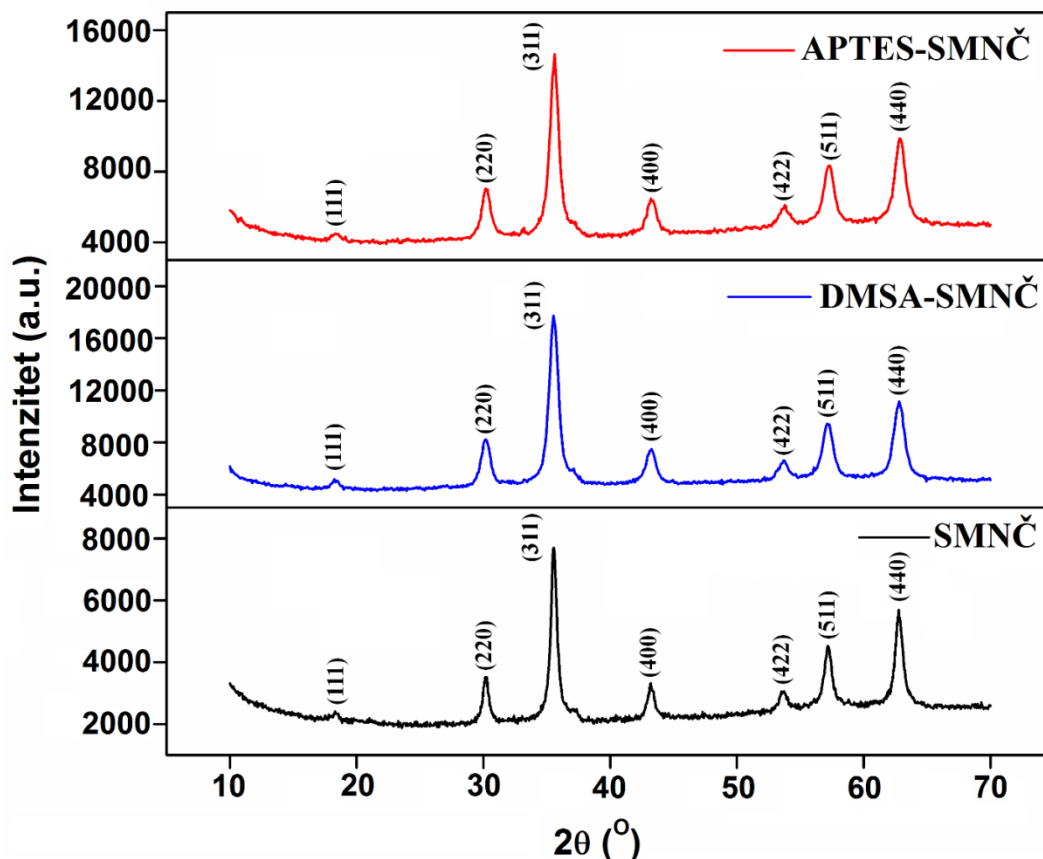
U istraživanjima uticaja veličine i distribucije veličine čestica, dokazano je da neujednačena distribucija veličine čestica (veća vrijednost PDI) negativno utiče na magnetna svojstva zbog statistike čestične orijentacije. Ovo je vjerovatno dodatni razlog boljih magnetnih osobina SMNČ dobijenih poliol metodom, pošto je njihova distribucija veličine čestica uniformnija (manji PDI) (233–235).

Zbog boljih fizičkih i magnetnih osobina koje direktno utiču na SPA vrijednost nanočestica, dalja ispitivanja su izvođena sa obloženim SMNČ koje su prethodno sintetisane poliol metodom.

5.2. Karakterizacija obloženih SMNČ-a

5.2.1. Karakterizacija XRPD metodom

Metodom difrakcije X-zraka na prahu ispitana je kristalna struktura neobloženih i obloženih SMNČ. Odgovarajući difraktogrami za neobložene SMNČ, kao i za obložene APTES-SMNČ i DMSA-SMNČ su prikazani na slici 21. Analizom difraktograma za tri uzorka uočene su karakteristične refleksije spinelne strukture: (111), (220), (440) i (311), koje se nedvosmisleno podudaraju sa feritnom spinelnom strukturom koja se pripisuje magnetitu (Fe₃O₄) (JCPDS # 19-0629), ali i maghemitu (γ-Fe₂O₃) (JCPDS # 110614). Međutim, poznato je da je teško uočiti razliku između faza magnetita (prostorna grupa *Fd-3m*) i maghemita (prostorna grupa *P4₃32*) u uzorku.



Slika 21. Difraktogrami neobloženih i obloženih SMNČ.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja kristalne strukture SMNČ XRPD metodom, kao i literaturnih podataka može se zaključiti da su sintetisane SMNČ najvjerojatnije mješavina dvije faze, magnetita i maghemita (232). Srednja veličina kristalita, izračunata pomoću karakteristika najintenzivnije (311) refleksije na $2\theta \sim 36^\circ$ upotrebom jednačine (2), je iznosila 12.2 nm, što je u skladu sa prosječnim prečnikom (D_{TEM}) pojedinačne nanočestice izračunate TEM metodom $13,7 \pm 2,5$ nm.

5.2.2. Karakterizacija DLS metodom i određivanje zeta (ζ) potencijala

DLS metodom je određena veličina neobloženih i obloženih SMNČ, kao i raspodjela veličina po broju nanočestica. Srednja vrijednost prečnika nanočestica koji se dobija DLS mjerenjima, D_{H} , predstavlja hidrodinamički prečnik sfere (tj. prečnik čestice sa hidratacionim omotačem) koji ima istu zapreminu kao čestica i predstavlja srednju vrijednost prečnika svih mjerenih čestica. Vrijednost hidrodinamičkog prečnika za neobložene SMNČ iznosi $46 \pm 3,8$ nm, kao što je prikazano u tabeli 12. Poređenje rezultata dobijenih TEM i DLS mjerenjima je

pokazalo da su veličine čestica dobijene TEM mjerenjima bile manje od istih dobijenih DLS mjerenjima, pošto se kod mjerenja veličine čestice DLS metodom uzima u obzir i dodati rastvarač ili stabilizator koji se kreće zajedno sa česticom. Osim toga, potrebno je naglasiti da DLS metodom dobijamo informacije koje se odnose na veličinu aglomerata pre nego na prečnik individualne nanočestice, dok se kod TEM-a mjeri vrijednost zasnovana na distribuciji pojedinačnih prečnika čestica.

Da bi se ispitao uticaj obloge na vrijednost hidrodinamičkog prečnika SMNČ, izvršena su DLS mjerenja i u prisustvu APTES-a i DMS-a. Srednje vrijednosti prečnika nanočestica dobijenih DLS mjerenjima iznose $105 \pm 2,3$ nm i $140 \pm 6,5$ nm za APTES-SMNČ i DMSA-SMNČ (tabela 12). Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da su veličine obloženih SMNČ, u oba slučaja, značajno veće od veličine neobloženih SMNČ. Ovo je u skladu sa očekivanjima, jer se pri oblaganju SMNČ uvećava hidrodinamički prečnik ovih nanočestica. Poredeći veličine SMNČ obloženih APTES-om i DMS-om, može se vidjeti da je hidrodinamički prečnik SMNČ obloženih DMS-om značajno veći od SMNČ obloženih APTES-om. Pretpostavljamo da je ova razlika posljedica slabe funkcionalizacije površine SMNČ sa DMSA, što dovodi do stvaranja -S-S- veza između susjednih DMSA-SMNČ i samim tim do povećanja stepena aglomeracije, što uzrokuje povećanje hidrodinamičkog prečnika DMSA-SMNČ (208). Sa druge strane, pretpostavlja se da priprema silanskog polimera u kiselom medijumu (pH=4) prije oblaganja, uzrokuje zadovoljavajuću funkcionalizaciju SMNČ APTES-om, a veliki broj slobodnih -NH₂ grupa dovodi do međusobnog odbijanja čestica i manjeg hidrodinamičkog prečnika (206).

Tabela 12. Uporedni prikaz hidrodinamičkih prečnika i ζ -potencijala neobloženih i obloženih SMNČ ($\bar{x} \pm SD$).

Metoda	Neobložene SMNČ	APTES-SMNČ	DMSA-SMNČ
TEM	$37,8 \pm 4,6$ nm	-	-
DLS	$46 \pm 3,8$ nm	$105 \pm 2,3$ nm	$140 \pm 6,5$ nm
ζ -potencijal (pH=7)	$+12,5 \pm 0,5$ mV	$+26 \pm 0,6$ mV	$-35,1 \pm 0,8$ mV

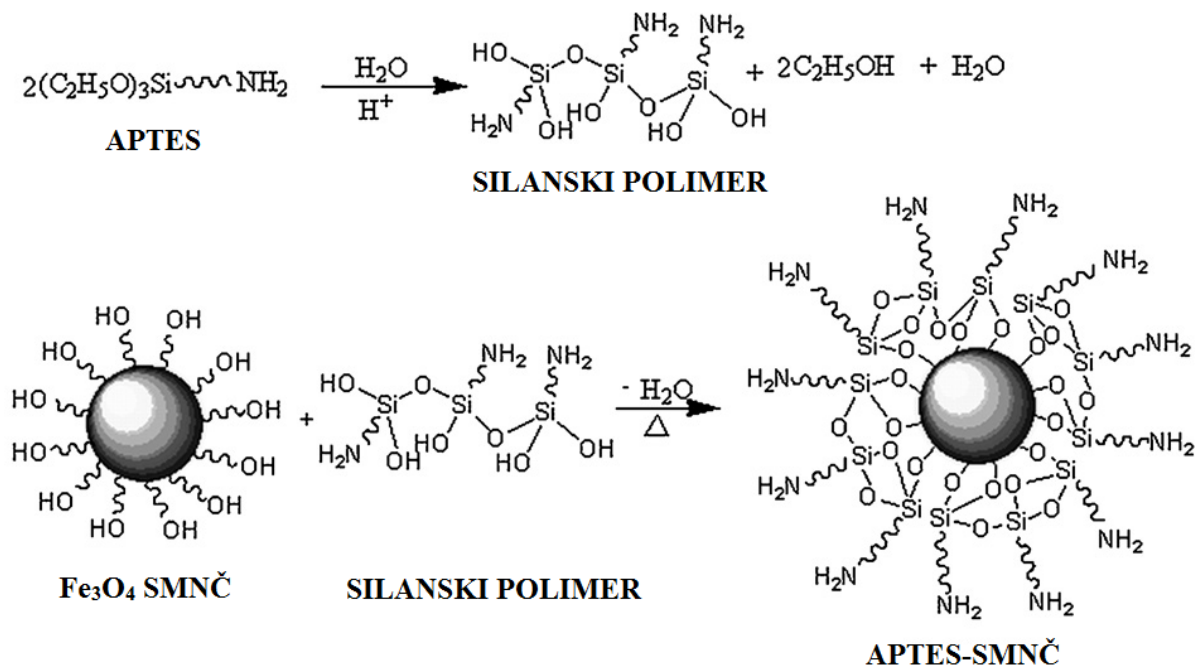
Mjerenjem ζ -potencijala vodenih suspenzija neobloženih i obloženih SMNČ na pH=7, određeno je površinsko naelektrisanje SMNČ. Promjena površinskog naelektrisanja

neobloženih SMNČ u vodenoj sredini prilikom promjene pH se može objasniti protonovanjem i deprotonovanjem hidroksilnih grupa na površini (Fe-OH). Uslijed deprotonovanja Fe-OH i nastajanja Fe-O⁻, SMNČ pokazuju negativno naelektrisanje u baznoj sredini. U kiseloj sredini, SMNČ pokazuju pozitivno naelektrisanje uslijed protonovanja hidroksilne grupe Fe-OH₂⁺.

Negativna vrijednost ζ-potencijala za DMSA-SMNČ u odnosu na neobložene SMNČ i APTES-SMNČ je posljedica prisustva većeg broja karboksilnih i tiolnih funkcionalnih grupa na njihovoj površini.

5.2.3. Karakterizacija FT-IR metodom

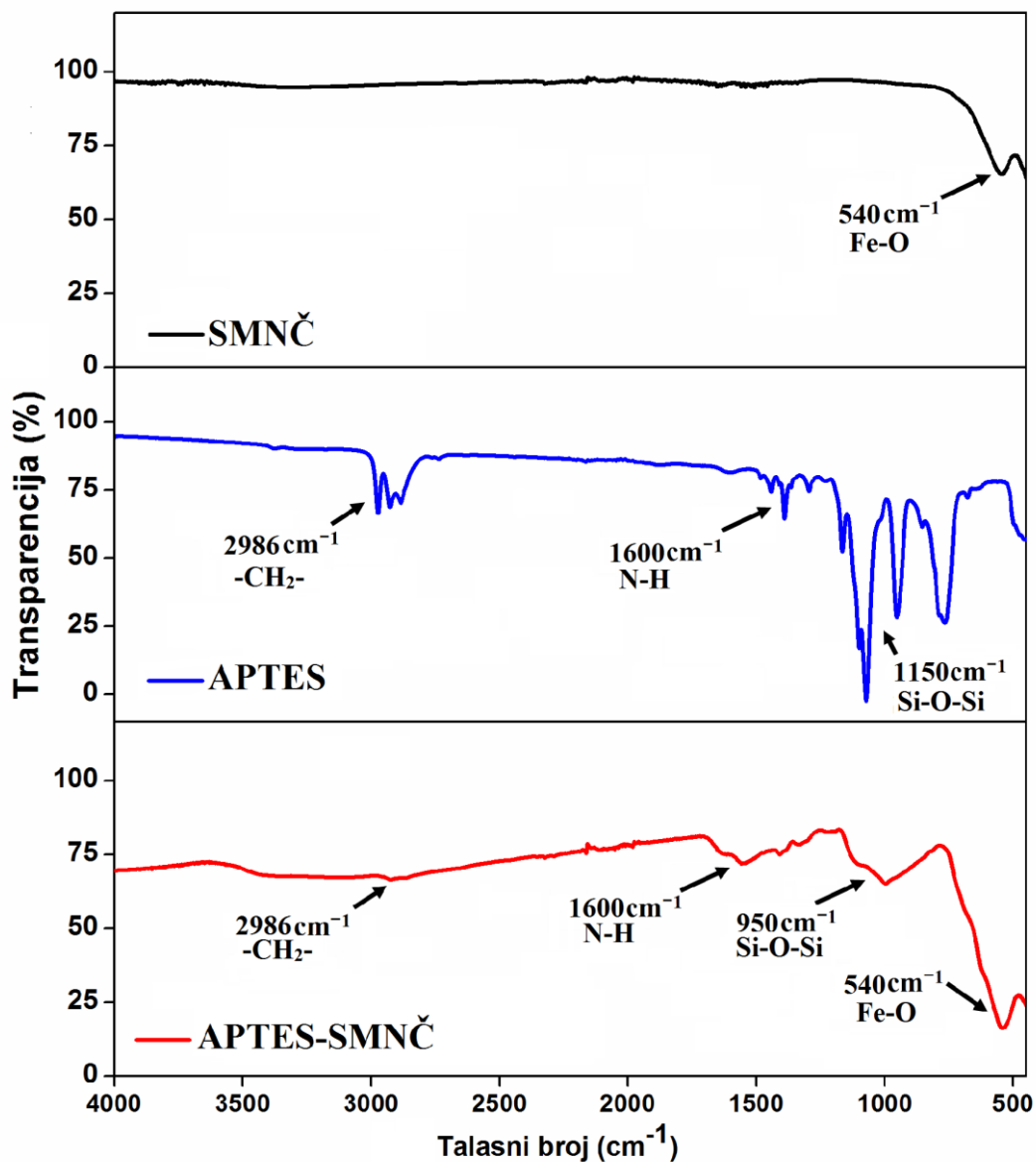
Da bi se ispitala uspješnost oblaganja površine SMNČ sa APTES-om i DMSA, kao i za bolje razumjevanje interakcije različitih jedinjenja i SMNČ, FT-IR spektri neobloženih SMNČ, jedinjenja za oblaganje, kao i obloženih SMNČ su snimani i međusobno upoređivani. Tokom 2 sata kisele hidrolize APTES-a, koja prethodi oblaganju SMNČ, dolazi do protonovanja alkoksidnih grupa i stvaraju se reaktivne silanolne grupe (Si-O-H), koje se zatim kondenzuju sa drugim silanolnim grupama susjednih molekula i kroz stvaranje siloksanskih veza (Si-O-Si) dobija se silanski polimer uz izdvajanje alkohola i vode. Tokom reakcije oblaganja SMNČ APTES-om dolazi do polikondenzacije hidroksilnih grupa silanskog polimera sa hidroksilnim grupama SMNČ i stvara se Fe-O-Si veza između SMNČ i silanskog polimera (slika 22).



Slika 22. Reakcija oblaganja SMNČ sa APTES-om (206).

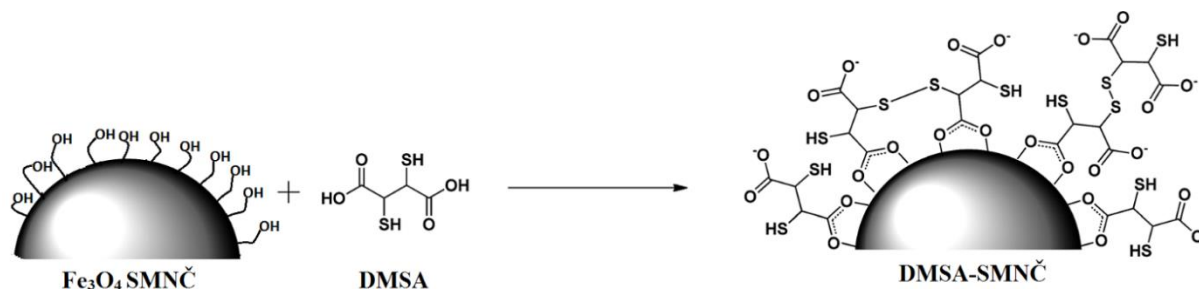
Na slici 23 su prikazani ATR FT-IR spektri neobloženih SMNČ, APTES-SMNČ i APTES-a. Traka na 1150 cm^{-1} u spektru APTES-a, koja pripada Si-O-H i Si-O-Si istežućem regionu, je pomjerena na 950 cm^{-1} u spektru APTES-SMNČ, što ukazuje na uspješnost reakcije amino-funkcionalizacije SMNČ (236,237).

Prisustvo Fe-O-Si veze se ne može vidjeti na FT-IR spektru, jer se traka koja pripada Fe-O-Si vezi pojavljuje na oko 584 cm^{-1} i preklapa se sa trakom na 540 cm^{-1} koja se javlja u spektrima Fe_3O_4 SMNČ i APTES-SMNČ i koja pripada Fe-O istežućoj vibraciji. (206). Široka traka na 2986 cm^{-1} u spektru APTES-a i APTES-SMNČ koja odgovara istežućoj vibraciji -CH₂- veza potvrđuje prisustvo propil grupa APTES-a na površini SMNČ. Traka na 1600 cm^{-1} potiče od N-H istežućih vibracija slobodnih amino grupa na APTES-SMNČ (238,239).



Slika 23. FT-IR spektri neobloženih SMNČ, APTES i APTES-SMNČ.

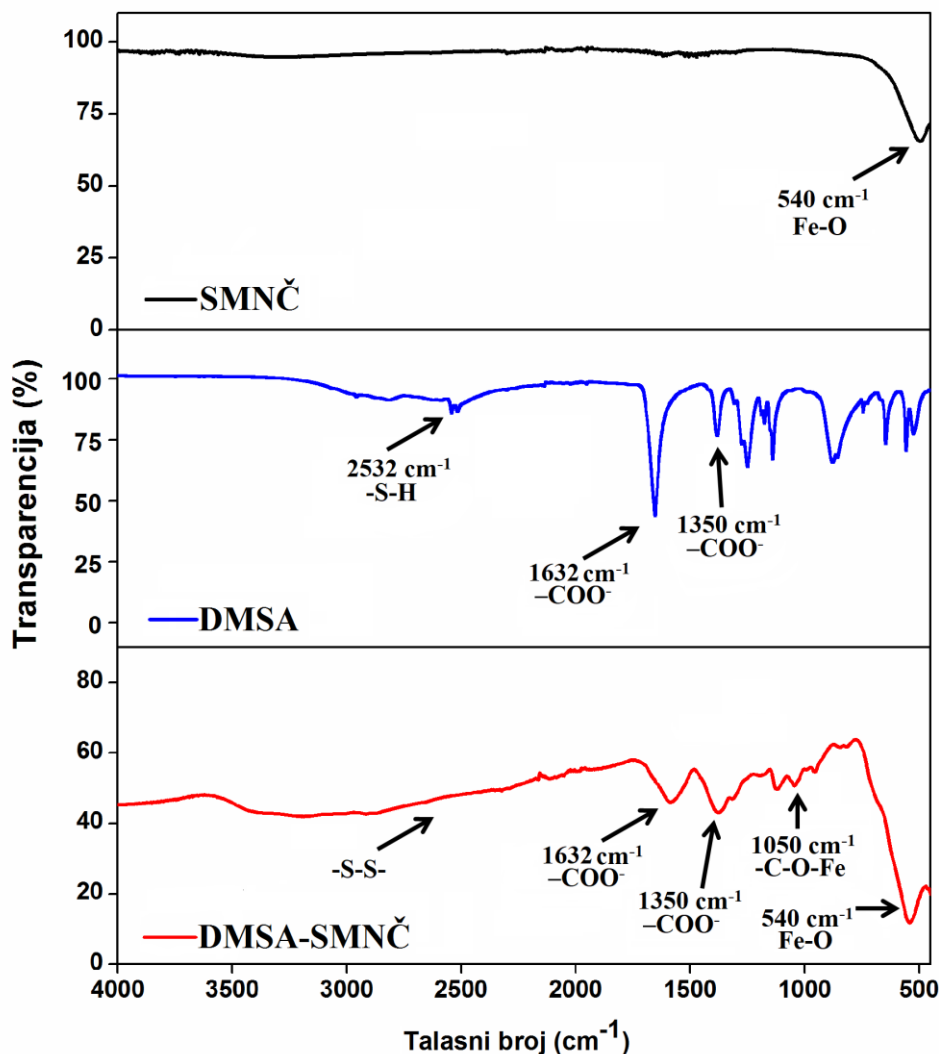
Tokom oblaganja SMNČ sa DMSA, dolazi do interakcije -OH grupa DMSA i SMNČ i stvaranja polarnih Fe-O-C veza uz izdvajanje molekula vode. Takođe, slobodne -SH grupe DMSA međusobno reaguju i stvaraju disulfidne -S-S- veze u omotaču (slika 24).



Slika 24. Oblaganje SMNČ sa DMSA (240).

Na slici 25 su prikazani ATR FT-IR spektri neobloženih SMNČ, DMSA i DMSA-SMNČ. Karakteristični pikovi koji potiču od istežanja C-O-Fe veze prisutni u DMSA-SMNČ spektru na 1050 cm^{-1} potvrđuju da se molekuli DMSA vezuju za površinu SMNČ (207).

Takođe potvrda oblaganja SMNČ sa DMSA predstavljaju i trake na 1632 i 1350 cm^{-1} koje se odnose na simetrično i asimetrično istežanje karboksilnih $-\text{COO}^-$ grupa na površini DMSA-SMNČ. Široka traka na 2532 cm^{-1} u spektru DMSA-a odgovara istežućoj vibraciji S-H veze u tiolnoj grupi. Razlog njenog odsustva u spektru DMSA-SMNČ je oksidacija -SH grupa u disulfidne -S-S- grupe koje apsorbuju u nižoj IR oblasti tako da bi se njihovo prisustvo dokazalo Ramanovom spektroskopijom (241). Traka na 540 cm^{-1} koja se javlja u spektrima SMNČ i DMSA-SMNČ pripada Fe-O istežućoj vibraciji.



Slika 25. FT-IR spektri neobloženih SMNČ, DMSA i DMSA-SMNČ.

5.2.4. Mjerenja specifične brzine apsorpcije (magnetna hipertermija)

Kako bi se ispitala mogućnost upotrebe nanočestica u magnetnoj hipertermiji, efikasnost zagrijavanja obloženih SMNČ je određena mjerenjem specifične apsorpcije – SPA u naizmeničnom magnetnom polju jačine $H=15,9$ kA/m i frekvencije $f=252$ kHz. Određivanjem nagiba ($\Delta T/\Delta t$) sa krivih, promjena temperature ferofluida sa vremenom, i primjenom jednačina (5) i (6) izračunate su SPA i ILP vrijednosti za obložene SMNČ. SPA i ILP vrijednosti za ispitivane obložene SMNČ kao i za komercijalno dostupne Nanotherm[®] (MagForce, Njemačka) su prikazane u tabeli 13. Za neobložene SMNČ nije određena SPA vrijednost zbog nestabilnosti uzoraka u vodenoj sredini.

Tabela 13. SPA i ILP vrijednosti obloženih i komercijalno dostupnih SMNČ.

SMNČ	H (kA·m ⁻¹)	f (kHz)	SPA (W/g)	ILP (nHm ² /kg)
APTES-SMNČ	15,9	252	123	1,93
DMSA-SMNČ	15,9	252	110	1,72
Nanotherm [®]	3-8	100	0,006-0,718	0,121

Brezović i saradnici (242) su utvrdili da gornje granice dozvoljenih frekvencija i jačina spoljašnjeg magnetnog polja, koje se mogu primjeniti na ljudima, iznose od 50 kHz do 1 MHz za frekvenciju i < 15 kA/m za jačinu magnetnog polja. Eksperimentalno izračunata maksimalna dozvoljena vrijednost za proizvod $H \cdot f$ koji se može primjeniti na ljudima iznosi $4,85 \cdot 10^8$ A/m·s (242,243), dok je kasnije ustanovljen i *Herg*-tov limit od $5 \cdot 10^9$ A/m·s (244). Tokom upotrebe Nanotherm[®] čestica u kliničkim studijama, frekvencija je bila podešena na 100 kHz dok je jačina magnetnog polja varirala u zavisnosti od tretirane regije (3–6 kA/m za karlicu, do 7.5 kA/m za vrat i toraks i >10 kA/m za glavu), a dobijene SPA vrijednosti su iznosile od 60–380 W/kg u ciljnom tkivu. Smatra se da primjenjeno spoljašnje magnetno polje sa ovim vrednostima H i f izaziva zagrijavanje i temperaturu veću od 40 °C u prosjeku kod 86% tretiranih tumora. Upotrebom termometarskog katetera izmjerena je prosječna temperatura u tumoru od 51,2 °C (149,245,246).

Upoređujući dobijene SPA vrijednosti obloženih SMNČ sa publikovanim SPA vrijednostima za SMNČ na bazi gvožđa (koje se kreću u intervalu od 10–300 W/g), obložene SMNČ imaju obećavajuću efikasnost zagrijavanja pod uticajem spoljašnjeg magnetnog polja, pa se mogu koristiti u daljim *in vitro/in vivo* testovima magnetne hipertermije. Naravno, u literaturi se mogu naći i primjeri ekstremnih izuzetaka sa izuzetno visokim SPA vrijednostima kao npr. bakterijske magnetozone veličine 35 nm, čija SPA vrijednost je 960 W/g na 410 kHz i 10 kA/m (247) ili γ -Fe₂O₃ od 16 nm sa SPA vrijednosti od 1650 W/g na 700 kHz i 24,8 kA/m (248,249). Veliki broj istraživanja prikazuje izmjerene SPA vrijednosti u naizmjeničnom magnetnom polju čiji je proizvod $H \cdot f$ mnogo veći od dozvoljene granice, ali način primjene tih SPA vrijednosti u kliničkoj praksi još nije pronađen. Međutim, zbog prekoračenja Brezović-evog limita, njihova klinička upotreba je zanemarena. Bez obzira na mogućnost eksperimentalnog određivanja SPA vrijednosti, postoje i ograničenja u njegovoj procjeni na efikasnost MHT. Apsorbovana energija tokom izlaganja spoljašnjem magnetnom polju zavisi isključivo od parametara magnetnog polja, i ta zavisnost se ne može lako isključiti ili umanjiti

(250,251). Stoga, različite SPA vrijednosti, koje se mogu dobiti na različitim frekvencijama i jačinama magnetnog polja, ne mogu se porediti jedna sa drugom jer do sada nisu određeni standardi za poređenja SPA vrijednosti (7).

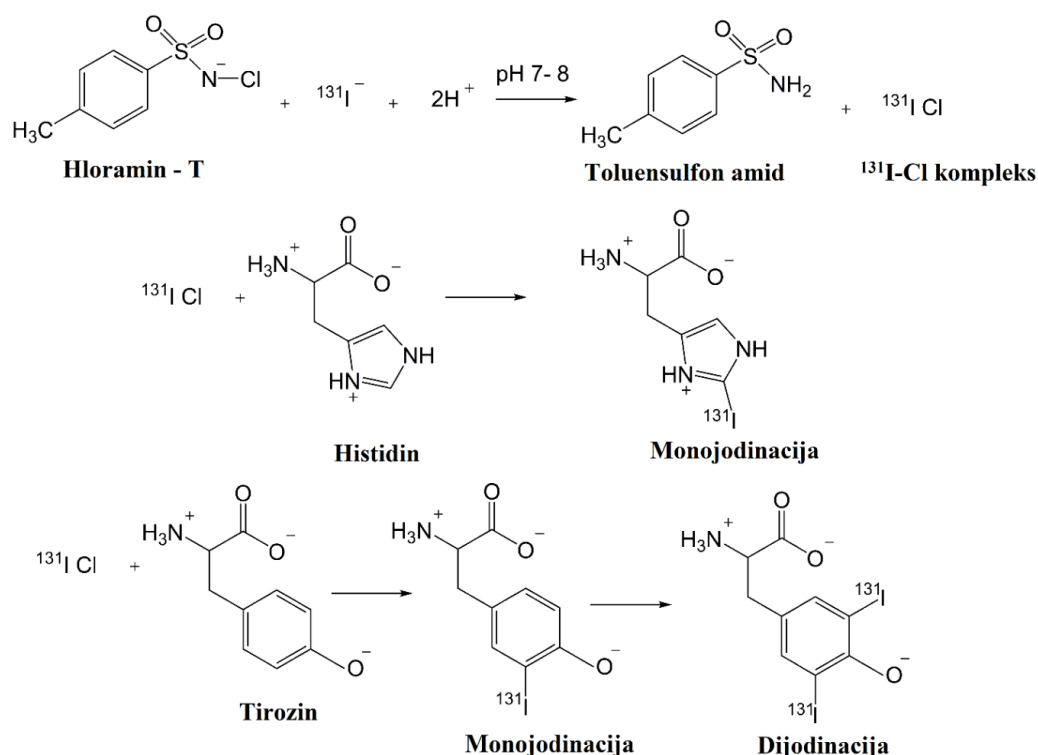
U kliničkoj upotrebi magnetne hipertermije treba imati u vidu i fiziološka ograničenja. Magnetno polje visoke frekvencije može izazvati lokalno zagrijavanje u dijelu tkiva u kome se ne nalaze magnetne čestice usled vrtložnih struja. Osim kliničkih ograničenja treba imati u vidu i tehnička ograničenja, jer parametri magnetnog polja moraju biti precizno određeni kako bi se optimizovala efikasnost zagrijavanja SMNČ i očuvalo zdravo tkivo, kao i udobnost pacijenata tokom primjene (88).

Manje vrijednosti SPA i ILP koje su dobijene za DMSA-SMNČ u odnosu na APTES-SMNČ su najvjerojatnije posljedica većeg hidrodinamičkog prečnika DMSA-SMNČ ($140 \pm 6,5$ nm) u odnosu na APTES-SMNČ ($105 \pm 2,3$ nm) kao i smanjene stabilnosti DMSA-SMNČ (233,252). Zbog veće efikasnosti zagrijavanja i boljih fizičko-hemijskih karakteristika opisanih u prethodnim poglavljima, dalja istraživanja su rađena sa APTES-SMNČ.

5.3. Optimizacija uslova obilježavanja CC49 monoklonskog antitijela sa ^{131}I

5.3.1. Obilježavanje humanog/goveđeg serum albumina sa ^{131}I

Za obilježavanje humanog (HSA) i goveđeg serum albumina (BSA) sa ^{131}I korišćena je metoda sa hloraminom-T. Hloramin-T oksiduje $^{131}\text{I}^-$ u reaktivnije oblike: I^0 ili I^+ . U vodenoj sredini, na pH između 7 i 8, hloramin-T hidrolizuje i oslobađa hipohloritni anjon (ClO^-), koji se veže za $^{131}\text{I}^-$ i formira $^{131}\text{I}-\text{Cl}$ kompleks. Oksidovani ^{131}I se elektrofilnom supstitucijom ugrađuje u fenolni prsten tirozinskog i/ili histidinskog ostatka u molekulu proteina/antitijela (slika 26). Reakcija obilježavanja se zaustavlja dodatkom redukcionog sredstva natrijum-metabisulfita ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) (212,253–255).



Slika 26. Reakcija jodiranja (212).

U literaturi su opisani maseni odnosi hloramina-T i proteina koji omogućuju, nakon dodatka ^{131}I , dobijanje obilježenog proteina visoke radiohemijske čistoće. Tokom optimizacije

uslova obilježavanja HSA i BSA sa ^{131}I *in situ*, ispitani su najčešće navedeni maseni odnosi. RCP obilježenih HSA i BSA određena je primjenom TLC metode (stacionarna faza: silika-gel, mobilna faza: 85% metanol). U tabeli 14 prikazane su vrijednosti RCP obilježenih ^{131}I -HSA i ^{131}I -BSA, kao i maseni odnosi HL-T i HSA/BSA.

Tabela 14. Optimizacija uslova obilježavanja HSA i BSA sa ^{131}I

Protein	Maseni odnos protein:HL-T	RCP (%)
BSA	1:1	48,78
	1:1,8	77,66
	1:3	76,45
	2:1	63,76
HSA	1:1	30,55
	1:1,8	56,85
	1:3	98,58
	2:1	84,17

Iz rezultata prikazanih u tabeli 14 može se zaključiti da se BSA u najvećem procentu obilježava sa ^{131}I pri masenom odnosu BSA : HL-T od 1 : 1,8 (77,66%), dok se HSA obilježava pri masenom odnosu HSA : HL-T od 1:3 (98,58%). Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima za jodiranje proteina metodom sa hloraminom-T (12,254).

5.3.2. Obilježavanje nespecifičnog antitijela sa ^{131}I

Jod kao supstituent je premali da bi izazvao značajne konformacione promjene strukture antitijela. Nasuprot tome, postupak obilježavanja korišćenjem oksidacionih sredstava kao i dodavanje redukcionih sredstava za zaustavljanje reakcije obilježavanja mogu uticati na biološke i imunološke osobine antitijela. U zavisnosti od uslova obilježavanja, a prema literaturnim podacima, može doći do konformacionih promjena u mAt usled promjene funkcionalnih grupa ili kidanja disulfidnih veza. Shodno tome, reakcije obilježavanja moraju biti prilagođene pojedinačnim antitijelima, sa ciljem da se očuva funkcionalni integritet antitijela.

Zbog lakoće rukovanja i efikasnosti, metoda sa hloraminom-T je i dalje široko korišćeni postupak radioaktivnog jodiranja i predstavlja efikasan način za obilježavanje raznih proteina i peptida kao što su albumini, globulini, neuropeptidi i hemokini. Kako redukujuće sredstvo, natrijum metabisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), koje se koristi za zaustavljanje reakcije radioobilježavanja proteina, dovodi do kidanja disulfidnih veza između lakih i teških lanaca antitijela, ispitane su druge metode zaustavljanja reakcije obilježavanja antitijela sa ciljem da se očuva struktura antitijela:

1. metoda sa cisteinom kao redukujućim sredstvom,
2. metoda prečišćavanja korišćenjem gel-filtracione hromatografije na koloni napunjenoj Sephadex[®]-om G-25

Kako su maksimalni prinosi obilježavanja HSA i BSA sa ^{131}I dobijeni pri 1:1,8 i 1:3 masenim odnosima proteina i hloramina-T, pri radioobilježavanju nespecifičnog Hbe7 mAt sa ^{131}I su ispitani ovi maseni odnosi. Dobijeni rezultati RCP (%) radiobilježenog nespecifičnog monoklonskog antitijela Hbe7 mAt jodom-131 su prikazani u tabeli 15.

Tabela 15. RCP (%) ^{131}I -obilježenog Hbe7 mAt.

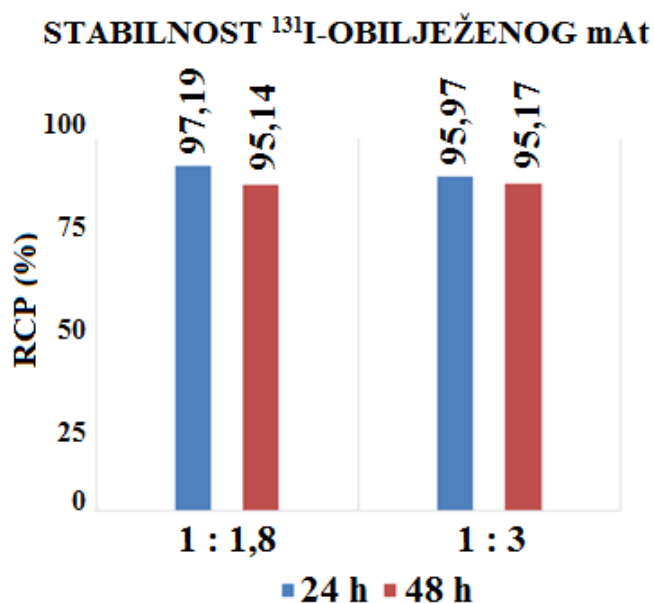
Metoda	Maseni odnos mAt:HL-T	RCP (%)	Prinos radioobilježavanja (%)
Cistein	1:1,8	89,90	-
	1:3	96,20	-
Sephadex [®] G-25*	1:1,8	100*	55
	1:3	100*	60

* RCP vrijednosti kod gel-filtracione hromatografije odnose se na RCP rastvora (~350 μL) koji čine spojene frakcije sa najvećom aktivnosti koje su eluirane sa kolone

Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da je dobijena radiohemijska čistoća obilježenog nespecifičnog Hbe7 mAt jodom-131 veoma visoka pri oba masena odnosa mAt : HL-T, bez obzira na metodu zaustavljanja reakcije obilježavanja.

In vitro stabilnost radioobilježenog nespecifičnog Hbe7 mAt pri oba masena odnosa mAt : HL-T i nakon prečišćavanja na koloni napunjenoj Sephadex[®] G-25 praćena je u toku 24 i 48 sata od trenutka obilježavanja određivanjem radiohemijske čistoće rastvora koji čine

spojene frakcije sa najvećom aktivnosti koje su eluirane sa kolone, TLC radiohromatografskom metodom (grafikon 2). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je radioobilježeno nespecifično mAt veoma stabilno (>95%) i nakon 24 i 48 sata od obilježavanja.



Grafikon 2. Ispitivanje *in vitro* stabilnosti ¹³¹I obilježenog nespecifičnog Hbe7 mAt pri molskim odnosima 1:1,8 i 1:3 nakon prečišćavanja na koloni napunjenoj Sephadex® G-25.

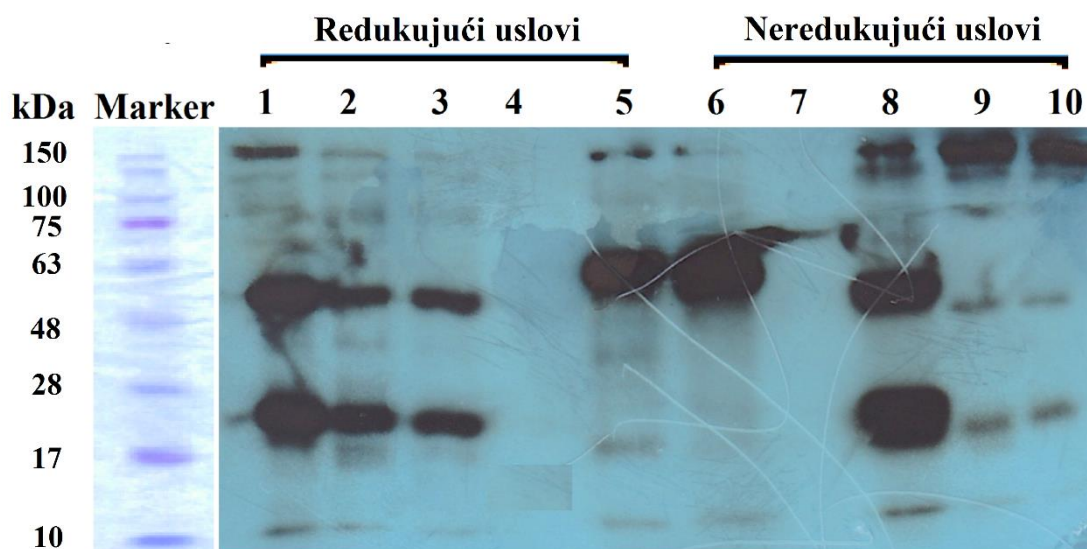
Iako je pri oba molska odnosa mAt : HL-T dobijena visoka vrijednost RCP-a jodom-¹³¹I obilježenog nespecifičnog mAt, u daljim eksperimentima je korišćen odnos 1:3.

5.3.3. Uticaj dodate aktivnosti joda-131 na RCP obilježenog nespecifičnog antitijela

Tokom optimizacije uslova obilježavanja nespecifičnog mAt sa ¹³¹I, ispitan je i uticaj dodate aktivnosti ¹³¹I na RCP obilježenog nespecifičnog mAt. 50 µg nespecifičnog Hbe7 mAt obilježavano je sa 1,85 MBq (50 µCi) i 3,7 MBq (100 µCi) rastvora Na¹³¹I pri masenom odnosu mAt i HL-T od 1:3 i nakon obilježavanja je prečišćeno na koloni napunjenoj Sephadex®G-25. RCP obilježenog mAt i sa dodatom aktivnošću od 1,85 MBq (50 µCi) i sa 3,7 MBq (100 µCi) rastvora Na¹³¹I je bila iznad 97%, tako da se u daljim eksperimentima koristila aktivnost od 0,074 MBq ¹³¹I po µg mAt.

Prinos obilježavanja nespecifičnog Hbe7 mAt jodom-131 je određen kao odnos aktivnosti rastvora koji čine spojene frakcije sa najvećom aktivnosti koje su eluirane sa kolone napunjene Sephadex®-om G-25 i aktivnosti koja je naneta na kolonu. Rezultati određivanja prinosa radioobilježavanja, koristeći jednačinu (11), su pokazali da je dobijen prinos od 55% i 60% za odnose 1:1.8 i 1:3, redom (tabela 15). Takođe, slični rezultati su dobijeni i tokom obilježavanja 50 µg ovog nespecifičnog mAt sa 1,85 MBq i 3,7 MBq Na¹³¹I (0,962 MBq/1,85 MBq i 1,87 MBq/3,7 MBq). Dobijeni rezultati prinosa radioobilježavanja su u skladu sa literaturnim podacima, gdje je prosječan prinos radioobilježavanja oko 60% (12,164,216).

Ispitivanje cjelovitosti strukture radioobilježenog antitijela: Nakon radioobilježavanja Hbe7 mAt i nakon zaustavljanja reakcije obilježavanja antitijela primjenom metode sa cisteinom ili metode prečišćavanja korišćenjem gel-filtracione hromatografije na koloni napunjenoj Sephadex®-om G-25 ispitana je cjelovitost strukture radioobilježenog antitijela pomoću SDS-PAGE elektroforeze. SDS-PAGE je vrsta zonske vertikalne jednodimenzionalne elektroforeze, u kojoj se razdvajanje i identifikacija proteina iz smješe isključivo vrši na osnovu razlike njihovih molekulskih masa. Natrijum-dodecilsulfat (SDS) je anjonski reagens, koji se nalazi u višku u odnosu na uzorak, i oblaže sve proteine negativnim naelektrisanjem. Time je omogućeno da se svi proteini kreću prema anodi, pri čemu se brzina pokretljivosti smanjuje sa povećanjem molekulske mase. Njihovo određivanje je zasnovano isključivo na razlici njihovih molekulskih masa (256). Poliakrilamidni gel nastaje polimerizacijom monomera akrilamida, a dodatkom komonomera N,N'-metilenbisakrilamida (bis-akrilamid), gel dobija mrežastu strukturu. Procenat akrilamida u poliakrilamidnom gelu zavisi od molekulske mase ispitivanog jedinjenja. Rezultati SDS-PAGE analize pod redukujućim i neredukujućim uslovima su prikazani na slici 27.



Slika 27. RTG film SDS-PAGE gela. **Redukujući uslovi:** 1. Metoda sa cisteinom kao redukujućim sredstvom ($mAt : HL-T = 1:3$), 2. Metoda prečišćavanja na koloni napunjenoj Sephadex[®] G25 ($mAt : HL-T = 1:3$), 3. Metoda prečišćavanja na koloni napunjenoj Sephadex[®] G25 ($mAt : HL-T = 1:1.8$), 4. Neobilježeno nespecifično mAt , 5. ^{131}I -HSA. **Neredukujući uslovi:** 6. ^{131}I -HSA, 7. Neobilježeno nespecifično mAt , 8. Metoda sa cisteinom kao redukujućim sredstvom ($mAt : HL-T = 1:3$), 9. Metoda prečišćavanja na koloni napunjenoj Sephadex[®] G25 ($mAt : HL-T = 1:3$), 10. Metoda prečišćavanja na koloni napunjenoj Sephadex[®] G25 ($mAt : HL-T = 1:1.8$).

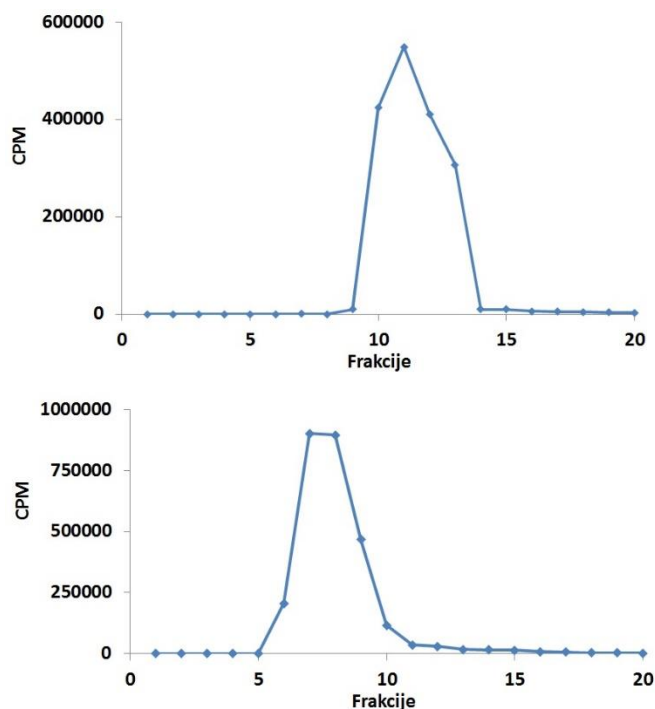
Kao proteinski marker, korišćen je BlueStar Prestained Protein Marker[®] (NIPPON Genetics), radi približnije provjere molekulskih masa izolovanih proteina. Uzorci ^{131}I -HSA, kod kojih je obilježavanje HSA jodom-131 vršeno pri masenom odnosu HSA : HL-T od 1:3, korišćeni su kao kontrola. Na slici 27 mogu se vidjeti dominantne trake koje odgovaraju pokretljivosti proteina od približno 66 kDa (linije 5 i 6), što odgovara literaturnim podacima za HSA. U liniji 8 se mogu vidjeti dvije trake koje po pokretljivosti odgovaraju proteinima od ~25 kDa i ~50 kDa. Odnosno SDS-PAGE pod neredukujućim uslovima (bez dodavanja DTT-a u pufer za uzorke) pokazuje da je došlo do kidanja disulfidnih veza između lakih i teških lanaca Hbe7 mAt kada se kao redukciono sredstvo koristi cistein, što se primjećuje u odvajanju lakih (~25 kDa) i teških lanaca (~50 kDa). Takođe, laki i teški lanci mAt su prisutni i pod redukujućim uslovima (linija 1). SDS-PAGE pod redukujućim uslovima takođe pokazuje da je došlo do kidanja disulfidnih veza između lakih i teških lanaca Hbe7 mAt nakon prečišćavanja na koloni napunjenoj Sephadex[®]-om G25 (linije 2 i 3). Međutim pod neredukujućim uslovima, u linijama 9 i 10 uočavaju se dominantne mAt trake, što potvrđuje da je antitijelo sačuvalo

cjelovitost svoje proteinske strukture nakon prečišćavanja na koloni napunjenoj Sephadex[®] G25. Kao negativna kontrola je korišćeno neobilježeno nespecifično Hbe7 mAt (linije 4 i 7).

5.4. Obilježavanje CC49 monoklonskog antitijela sa ¹³¹I

Nakon optimizacije uslova obilježavanja nespecifičnog Hbe7 mAt jodom-131 i potvrde da je antitijelo sačuvalo cjelovitost svoje proteinske strukture kada se kao metoda zaustavljanja reakcije obilježavanja antitijela koristi prečišćavanje na koloni napunjenoj Sephadex[®] G25, specifično CC49 monoklonsko antitijelo je obilježeno sa ¹³¹I pod istim uslovima (specifično mAt:HL-T=1:3, dodata aktivnost joda-131 je bila 0,074 MBq/μg mAt, a kao metoda prečišćavanja od reaktivnih vrsta (HL-T, slobodni ¹³¹I) se koristila gel-filtraciona hromatografija na koloni napunjenoj Sephadex[®]-om G-25).

U cilju praćenja uticaja dodate aktivnosti na RCP obilježenog antitijela, u rastvor CC49 mAt su dodate različite aktivnosti ¹³¹I (22,57 MBq i 370 MBq) prema prethodno optimizovanim uslovima obilježavanja. Nakon prečišćavanja obilježenog ¹³¹I-CC49 mAt na Sephadex[®] G-25 koloni putem „molekulskog sijanja” (brzina protoka 0,4 mL/min), aktivnosti eluiranih frakcija su mjerene na gama brojaču i dobijeni rezultati su prikazani na grafikonu 3. Nakon mjerenja radioaktivnosti, RCP obilježenog antitijela je određena iz rastvora koji čine spojene frakcije sa najvećom aktivnosti koje su eluirane sa kolone (spojene frakcije izmjerene na Capintec CRC-15 beta doze kalibratoru). Na ovaj način dobijena su dva rastvora: R1 (16,06 MBq (434 μCi) u 1440 μL) i R2 (222 MBq (6 mCi)/1670 μL). RCP obilježenog ¹³¹I-CC49 mAt iz R1 je iznosila 98,82% a iz R2 99,94%. Dobijeni rezultati pokazuju da dodate aktivnosti ne utiču na RCP obilježenog antitijela tj. da je količina mAt u rastvoru dovoljna da veže svu dodatnu radioaktivnost. Dobijeni prinos radioobilježavanja u oba rastvora (71% za R1 i 60% za R2) je u skladu sa rezultatima prethodno optimizovanih ispitivanja.



Grafikon 3. Prečišćavanje obilježenog ^{131}I -CC49 mAt gel filtracijom na koloni napunjenoj Sephadex[®] G-25. A. Profil obilježenog CC49 mAt sa ^{131}I aktivnosti 22,5 MBq (610 μCi), B. Profil obilježenog CC49 mAt sa ^{131}I aktivnosti 370 MBq (10 mCi).

5.4.1. Kvantifikacija ^{131}I -CC49 mAt

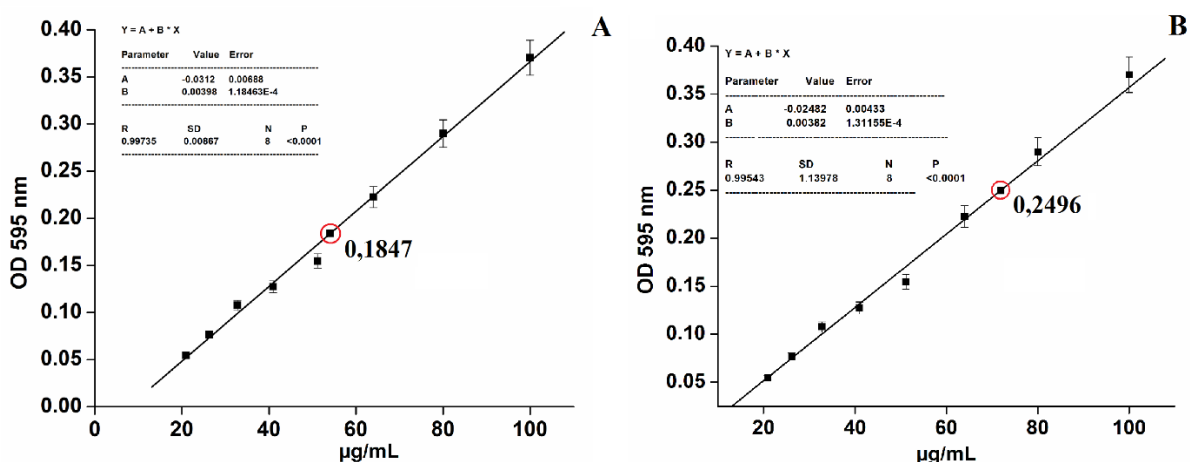
Nakon prečišćavanja ^{131}I -CC49 mAt na Sephadex[®] G-25 koloni, određena je koncentracija obilježenog mAt u oba rastvora (R1 i R2) Bradford-ovom metodom. Bradford-ova metoda je najčešće korišćena metoda za određivanje koncentracije proteina zbog relativno brzog i lakog izvođenja, kao i relativne senzitivnosti (5 μg proteina/mL ispitivane zapremine). Ova metoda se bazira na reakciji proteina sa bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 u kiselom medijumu. Boja se na proteine veže hidrofobnim interakcijama i jonskim vezama što stabilizuje boju u anjonskom obliku i dovodi do vidljive promjene boje iz crvene u plavu. Pri tome se vrijednost apsorpcijskog maksimuma boje pomjera sa 465 nm na 595 nm što se prati spektrofotometrijski. Boja je postojana relativno dugo (1 sat), a intenzitet apsorbanse se može očitati na 595 nm već nakon 2 minuta. Kompleks ima veoma visok ekstinkcioni koeficijent, što doprinosi velikoj senzitivnosti testa (221,257).

Kao standard korišćen je humani serum albumin (HSA), u opsegu koncentracija od 20 do 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Iz apsorbanacija standardnih rastvora HSA ($\bar{x} \pm \text{SD}$) dobijena je jednačina kalibracione krive iz koje je na osnovu izmjerene apsorbanse ispitivanog uzoraka određena

koncentracija obilježenog CC49 mAt (grafikon 4, A i B). Apsorbancija je mjerena na talasnoj dužini od 595 nm. Rezultat je izražen kao srednja vrijednost tri mjerenja.

Izmjerena apsorbancija četiri puta razblaženog rastvora R1 iznosila je 0,1847 što odgovara koncentraciji CC49 mAt od 54,07 $\mu\text{g/mL}$ odnosno koncentraciji od 216,28 $\mu\text{g/mL}$ (preračunata ukupna koncentracija CC49 mAt u nerazblaženom rastvoru R1). Kako je ukupna zapremina R1 (ukupna zapremina spojenih frakcija eluiranih sa kolone) iznosila 1440 μL , to znači da je 311,5 μg CC49 mAt obilježeno ^{131}I . Dobijeni rezultati pokazuju da je prinos obilježavanja CC49 mAt jodom-131 bio 44,5%, jer je 700 μg bila početna masa CC49 mAt. Radioaktivnost obilježenog CC49 mAt je iznosila 16,058 MBq (434 μCi).

Apsorbancija četiri puta razblaženog rastvora R2 iznosila je 0,2496 što odgovara koncentraciji CC49 mAt od 71,85 $\mu\text{g/mL}$ odnosno koncentraciji od 287,4 $\mu\text{g/mL}$ (preračunata koncentracija CC49 mAt u nerazblaženom rastvoru). Kako je 1670 μL bila ukupna zapremina rastvora R2, to znači da je obilježeno 480 μg CC49 mAt, što predstavlja 55% početne mase CC49 mAt tj. mase sa kojom je početo obilježavanje sa ^{131}I u R2 (860 μg). Radioaktivnosti obilježenog CC49 mAt je iznosila 222 MBq. Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da je metoda prečišćavanja primjenom gel-filtracione hromatografije na koloni napunjenoj Sephadex[®]-om G-25 pogodna za uklanjanjanje neizreagovalog HL-T i ^{131}I ali dovodi do velikih gubitaka antitijela.

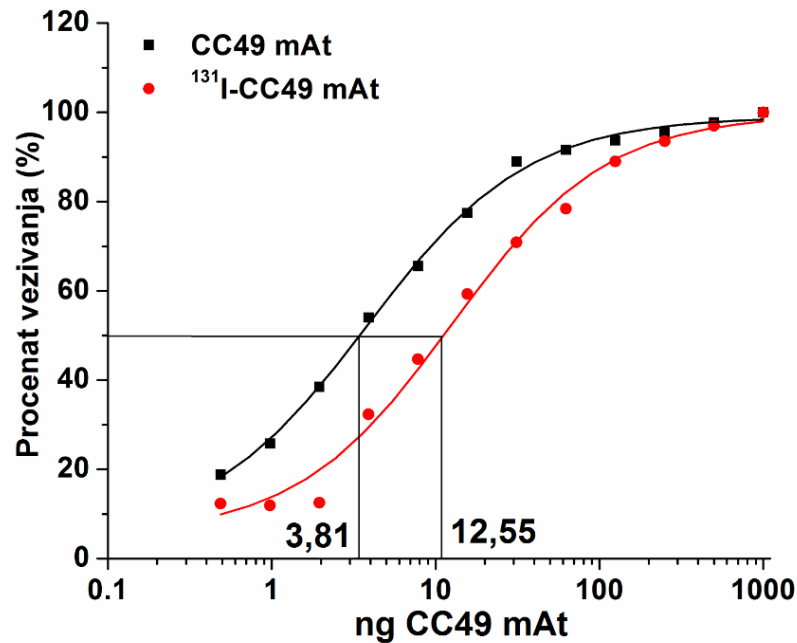


Grafikon 4. Određivanje koncentracije obilježenog ^{131}I -CC49 mAt Bradford-ovom metodom. A. Obilježavanje CC49 mAt sa ^{131}I aktivnosti 22,5 MBq (610 μCi), B. Obilježavanje CC49 mAt sa ^{131}I aktivnosti 370 MBq (10 mCi).

5.4.2. Ispitivanje imunoreaktivnosti ^{131}I -CC49 mAt

Imunoreaktivnost predstavlja sposobnost antitijela da veže antigen i formira antigen-antitijelo kompleks. Za radioobilježavanje antitijela, kao obilježivač bi trebao da se koristi radionuklid koji može da se ugradi u antitijelo, a da pri tome ne utiče na njegovu imunoreaktivnost. Radiojodiranje proteina odnosno antitijela je u osnovi hemijska supstitucija vodonikovih atoma jodom u tirozinskim grupama, mada pod nekim uslovima jod može reagovati sa histidinom i triptofanom, kao i sa sulfhidrilnim grupama. Biološke osobine jodiranih antitijela zavise od stepena i načina jodiranja. Opšte je prihvaćeno da se ne mijenja biološki integritet antitijela ako se prosječno ugradi po 1 atom joda po molekulu antitijela. Takođe se moraju optimizovati uslovi radioobilježavanja jodom, jer dugo izlaganje antitijela oksidacionom sredstvu (HL-T) dovodi do oksidacije tirozinskih grupa što prouzrokuje promjene u biološkom ponašanju obilježenog antitijela (gubitak imunoreaktivnosti).

Nakon radioobilježavanja CC49 mAt sa ^{131}I pod optimizovanim uslovima, indirektnom ELISA metodom ispitana je njegova imunoreaktivnost tj. u kojem stepenu je radioobilježeno CC49 mAt očuvalo afinitet vezivanja za antigen (goveđi mucin podjezičnih žlijezda). Imunoreaktivnost neobilježenog CC49 mAt je korišćena za poređenje, tj. kao kontrola. Dobijeni rezultati su prikazani na grafikonu 5. Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da postoji razlika između afiniteta vezivanja neobilježenog CC49 mAt i ^{131}I -CC49 mAt za antigen. Neobilježeno CC49 mAt ima skoro četiri puta manju vrijednost koncentracije poluvezivanja (*engl. half binding point*) (3,81 ng) od vrijednosti ^{131}I -CC49 mAt (12,55 ng). U skladu sa literaturnim podacima, smatra se da ova razlika nije značajna tj. da obilježavanje ne utiče značajno na afinitet vezivanja mAt za antigen (164,258).

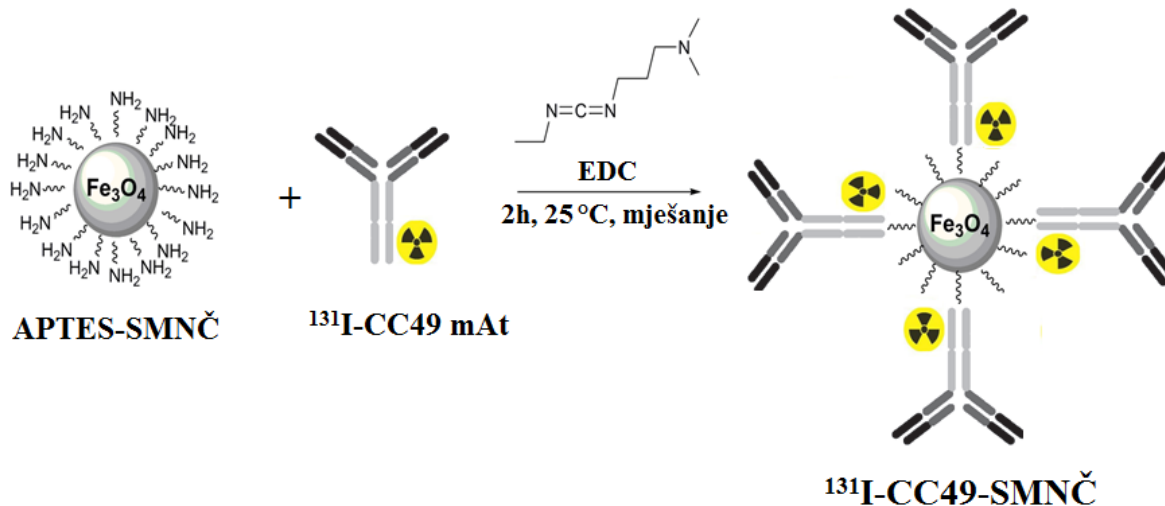


Grafikon 5. Imunoreaktivnost CC49 mAt i ¹³¹I-CC49 mAt

5.5. Konjugacija ¹³¹I-CC49 mAt sa APTES-SMNČ

5.5.1. Efikasnosti konjugacije ¹³¹I-CC49 sa APTES-SMNČ

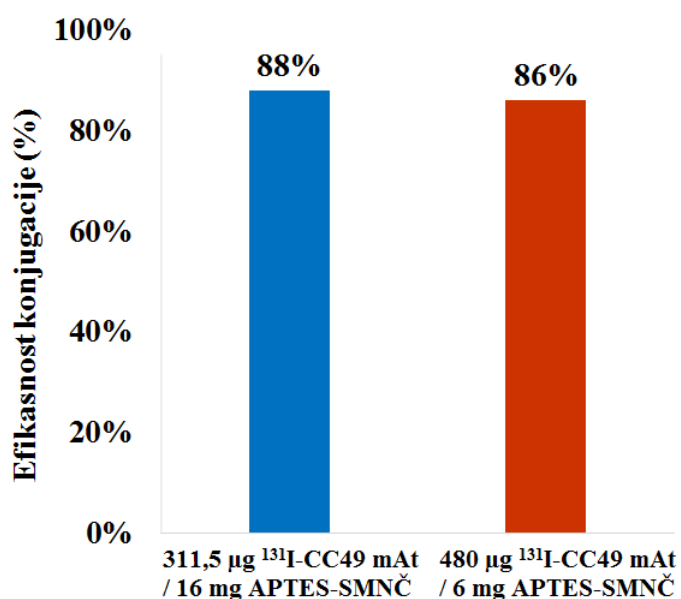
Stvaranjem intermedijarnog estra (O-acilizouree) u blago kiseloj sredini (pH 5,5-6,0), EDC aktivira karboksilne grupe na površini antitijela koje zatim reaguju sa primarnim amino grupama na površini obloženih SMNČ i dolazi do građenja kovalentne veze između obloženih SMNČ i antitijela (slika 28). EDC aktivira karboksilne grupe na površini Fc fragmenta ¹³¹I-CC49 mAt (C-terminalni kraj antitijela) koje sa primarnim amino grupama APTES-SMNČ grade kovalentne -CO-NH- veze i takvom orijentacijom kovalentne veze ostaju slobodni Fab fragmenti mAt (N-terminalni dio antitijela) koji su neophodni za prepoznavanje antigena (10).



Slika 28. Reakcija konjugacije ^{131}I -CC49 mAb sa SMNČ.

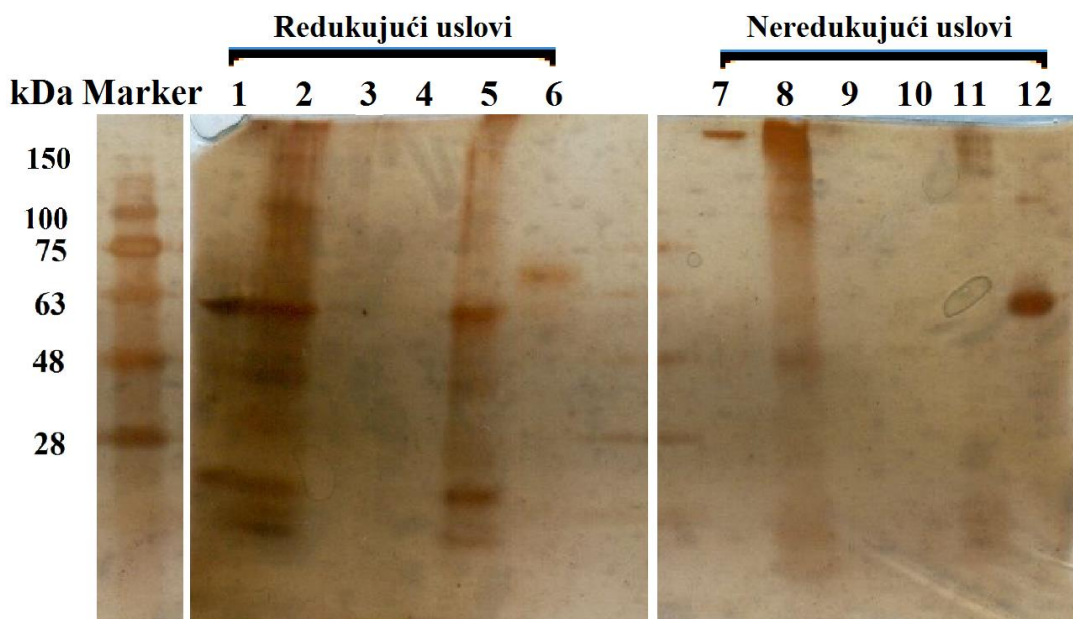
U literaturi su opisani različiti maseni odnosi obilježenih mAb i SMNČ koji su konjugovani pomoću EDC-a, počevši od 100 μg mAb na 50 mg SMNČ, do 1 mg mAb na 2 mg SMNČ. Opisana antitijela su obilježena različitim radionuklidima (^{125}I , ^{111}In , ^{68}Ga i dr.) različitih aktivnosti (3,7 MBq - 185 MBq) prije konjugacije sa SMNČ (164,219,259,260).

Rezultati ispitivanja uticaja masenih odnosa mAb i APTES-SMNČ, kao i dodatke aktivnosti na efikasnost konjugacije prikazani su na grafikonu 6. Pri optimizovanim uslovima, efikasnost konjugacije iznosi 86% i 88% pri konjugaciji 311,5 μg ^{131}I -CC49 mAb sa 16 mg APTES-SMNČ i 480 μg ^{131}I -CC49 mAb sa 6 mg APTES-SMNČ, redno. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da efikasnost konjugacije ne zavisi od mase APTES-SMNČ, jer je broj slobodnih amino grupa na površini ispitivanih masa APTES-SMNČ dovoljno veliki da mogu da se konjuguju u velikom procentu sa ispitivanim masama ^{131}I -CC49 mAb. Rezultati takođe pokazuju da dodatak različitih aktivnosti ^{131}I -CC49 mAb (16,058 MBq i 222 MBq) nema uticaja na efikasnost konjugacije. Ovi rezultati su u saglasnosti sa literarnim podacima (8,250,261).



Grafikon 6. Efikasnost konjugacije ¹³¹I-CC49 za APTES-SMNČ.

Nakon ispitivanja efikasnosti konjugacije dalje je u cilju ispitivanja jačine kovalentne veze između ¹³¹I-CC49 i APTES-SMNČ, kao i očuvanosti proteinske strukture mAt, korišćena SDS-PAG elektroforeza. Rezultati SDS-PAGE pod redukujućim i neredukujućim uslovima su prikazani na slici 29. Ispitivani su uzorci neobilježenog CC49 mAt, obilježenog CC49 mAt jodom-131 aktivnosti 16,058 MBq, kao i uzorak nakon konjugacije 311,5 µg ¹³¹I-CC49 mAt (aktivnosti 16,058 MBq) sa 16 mg APTES-SMNČ. SDS-PAGE gel je bojen sa AgNO₃ da bi se odredila vrsta i jačina hemijske veze između ¹³¹I-CC49 i APTES-SMNČ.

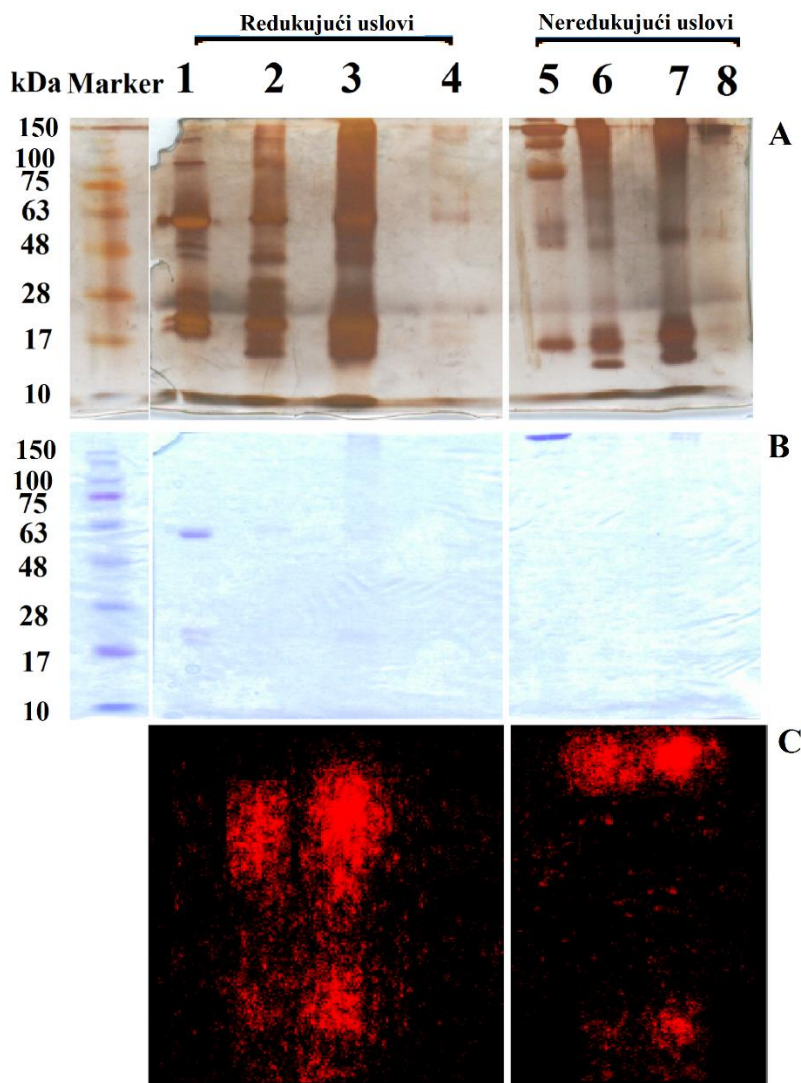


Slika 29. SDS-PAGE uzoraka nakon bojenja sa AgNO_3 . **Redukujući uslovi (dodatak DTT-a):** 1. CC49 mAt, 2. ^{131}I -CC49-SMNČ, 3. Frakcije bez radioaktivnosti nakon prečišćavanja ^{131}I -CC49 mAt na koloni napunjenoj Sephadex[®]-om G25, koje su spojene nakon prečišćavanja ^{131}I -CC49 mAt, 4. Supernatant (nakon magnetne dekantacije ^{131}I -CC49-SMNČ), 5. ^{131}I -CC49 mAt, 6. ^{131}I -HSA. **Neredukujući uslovi:** 7. CC49 mAt, 8. ^{131}I -CC49-SMNČ, 9. Frakcije bez radioaktivnosti nakon prečišćavanja ^{131}I -CC49 mAt na koloni napunjenoj Sephadex[®]-om G25, koje su spojene nakon prečišćavanja ^{131}I -CC49 mAt, 10. Supernatant (nakon magnetne dekantacije ^{131}I -CC49-SMNČ), 11. ^{131}I -CC49 mAt, 12. ^{131}I -HSA.

Pri redukujućim uslovima, trake na ~25 i ~50 kDa odgovaraju lakom i teškom lancu CC49 mAt (linije 1 i 5). Ovi rezultati pokazuju da, pri redukujućim uslovima, dolazi do kidanja disulfidnih veza između lakih i teških lanaca CC49 mAt. Kako se na liniji 2 takođe uočavaju dvije proteinske trake od ~25 i ~50 kDa, smatra se da dolazi do kidanja disulfidnih veza između lakih i teških lanaca CC49 mAt obilježenog sa ^{131}I vezanog za površinu APTES-SMNČ-a. U neredukujućim uslovima, proteinska traka na ~150 kDa (linije 7, 8 i 11) odgovara intaktnom CC49 mAt odnosno potvrđuje da je funkcionalni integritet antitijela očuvan. Prisustvo proteinske trake na ~150 kDa na liniji 8 potvrđuje da je došlo do konjugacije ^{131}I -CC49 mAt sa APTES-SMNČ, kao i da je funkcionalni integritet ^{131}I -CC49 mAt očuvan tokom konjugacije. Na linijama 3, 4, 9 i 10 nije uočeno prisustvo ni jedne proteinske trake. Ovi rezultati potvrđuju efikasnost obilježavanja CC49 mAt jodom-131 kao i njegovu konjugaciju sa APTES-SMNČ. ^{131}I -HSA je korišćen kao kontrola. Na linijama 6 i 12 uočava se dominantna

traka koja odgovara pokretljivosti proteina od približno 66 kDa što odgovara literaturnim podacima za HSA.

Na slici 30 je prikazan SDS-PAGE gel nakon bojenja sa AgNO_3 i sa Coomasie Brilliant Blue[®]R-250 a takođe je gel snimljen BRUKER[®] In-Vivo Xtreme II uređajem u cilju detekcije raspodjele radioaktivnosti na njemu. Na slici 30 A, prikazani su rezultati SDS-PAGE elektroforeze ispitivanih uzoraka nakon bojenja sa AgNO_3 . Da bi se ispitaio uticaj aktivnosti ^{131}I i mase $^{131}\text{I-CC49}$ mAt na jačinu kovalentne veze između $^{131}\text{I-CC49}$ i APTES-SMNČ kao i na očuvanost proteinske strukture mAt tokom konjugacije, ispitan je uzorak CC49 mAt obilježen, pod optimizovanim uslovima, jodom-131 aktivnosti 222 MBq, kao i uzorak nakon konjugacije 480 μg $^{131}\text{I-CC49}$ mAt sa 6 mg APTES-SMNČ. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa rezultatima prikazanim na slici 29. Ovi rezultati potvrđuju uspješnost konjugacije $^{131}\text{I-CC49}$ mAt za APTES-SMNČ bez obzira na povećanje količine mAt i aktivnosti rastvora Na^{131}I . Proteinske trake na linijama 1 i 5 koje odgovaraju CC49 mAt, su jedine vidljive na gelu koji je obojen Coomasie Brilliant Blue[®] (slika 30, B), jer senzitivnost ove metode je dosta manja (~ 100 ng) u odnosu na metodu bojenja gela sa AgNO_3 (~ 10 ng). Na gelu se uočava samo neobilježeno CC49 mAt, jer je nanešeno u značajno većoj masi (~130 ng) nego što je masa CC49 mAt u $^{131}\text{I-CC49}$ mAt (~40 ng). Na linijama 4 i 8 na slici 30 A, uočavaju se proteinske trake koje odgovaraju CC49 mAt što znači da se u supernatantu, nakon magnetne dekantacije $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$, nalazi nekonjugovano obilježeno $^{131}\text{I-CC49}$ mAt. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima ispitivanja efikasnosti konjugacije, jer oko 12% $^{131}\text{I-CC49}$ mAt se ne konjuguje sa APTES-SMNČ. Upoređujući ove rezultate za supernatant sa rezultatima prikazanim na slici 29, gdje nije uočeno prisustvo nekonjugovanog $^{131}\text{I-CC49}$ mAt, možemo zaključiti da osjetljivost metode bojenja sa AgNO_3 zavisi od mase CC49 mAt u uzorku. Nemogućnost detekcije slobodnog $^{131}\text{I-CC49}$ mAt je vjerovatno posljedica male količine $^{131}\text{I-CC49}$ mAt u uzorku.



Slika 30. SDS PAGE gel nakon: A. bojenja sa AgNO_3 . B. bojenja sa Coomassie Brilliant Blue[®]. C. Snimak sa BRUKER[®] In-Vivo Xtreme II uređaja. **Redukujući uslovi:** 1. CC49 mAt, 2. ¹³¹I-CC49 mAt 3. ¹³¹I-CC49-SMNC, 4. Supernatant (nakon magnetne dekantacije ¹³¹I-CC49-SMNC). **Neredukujući uslovi:** 5. CC49 mAt, 6. ¹³¹I-CC49 mAt, 7. ¹³¹I-CC49-SMNC, 8. Supernatant (nakon magnetne dekantacije ¹³¹I-CC49-SMNC).

Rezultati prikazani na slici 30 C (linije 2, 3, 6 i 7), pokazuju da postoji poklapanje detektovane radioaktivnosti sa linijama 2, 3, 6 i 7 prikazanim na gelu obojenim srebro-nitratom (slika 30 A) pri redukujućim i neredukujućim uslovima. Pri redukujućim uslovima, uočava se da detektovane radioaktivnosti na liniji 2 odgovaraju pokretljivosti proteina od ~25 i ~50 kDa, što ukazuje da dolazi do kidanja disulfidnih veza između lakih i teških lanaca ¹³¹I obilježenog CC49 mAt, odnosno takođe ukazuje da se jod-131 vezuje i za tirozinske i histidinske rezidue u lakim i teškim lancima antitijela. Kako se na liniji 3 takođe uočava da detektovane radioaktivnosti odgovaraju proteinskim trakama od ~25 i ~50 kDa, smatra se da dolazi i do

kidanja disulfidnih veza između lakih i teških lanaca ^{131}I obilježenog CC49 mAt vezanog za površinu APTES-SMNČ-a. Pod neredukujućim uslovima, na liniji 6, detektovana radioaktivnost odgovara proteinskoj traci na ~ 150 kDa odnosno potvrđuje da je funkcionalni integritet antitijela očuvan. Detektovana radioaktivnost na liniji 7 koja odgovara proteinskoj traci na ~ 150 kDa, potvrđuje i da je došlo do konjugacije ^{131}I -CC49 mAt sa APTES-SMNČ kovalentnim vezivanjem, kao i da je očuvan funkcionalni integritet ^{131}I -CC49 mAt tokom konjugacije. U supernatantu (nakon magnetne dekantacije ^{131}I -CC49-SMNČ) nije uočeno prisustvo radioaktivnosti (linije 4 i 8).

5.5.2. *In vitro* stabilnost ^{131}I -CC49-SMNČ

Uticaj odnosa masa mAt i SMNČ kao i dodate aktivnosti na *in vitro* stabilnost ^{131}I -CC49-SMNČ, ispitivana je u fiziološkom rastvoru i humanom serumu na 37°C u toku 8 dana od trenutka obilježavanja, određivanjem radiohemijske čistoće TLC metodom. Pri određivanju radiohemijske čistoće, jod-131 se javlja kao jedini radioaktivni produkt degradacije. Tokom određivanja RCP, kombinacijom 85% metanola kao mobilne faze i silika gel trake kao stacionarne faze su dobijeni najpouzdaniji i najreproduktivniji rezultati, što ukazuje da je to metoda izbora za kontrolu kvaliteta jodom-131 obilježenog CC49 mAt, kao i ^{131}I -CC49-SMNČ. Kako je RCP ispitivanih uzoraka bila $> 90\%$ u toku od 8 dana od obilježavanja i u fiziološkom rastvoru i u humanom serumu, to znači da ni mase mAt i SMNČ kao ni dodate radioaktivnosti nemaju značajan uticaj na vezu između ^{131}I i CC49 mAt, kao i na vezu ^{131}I -CC49 mAt i SMNČ (164,219,260).

5.6. Ispitivanje biodistribucije i retencije

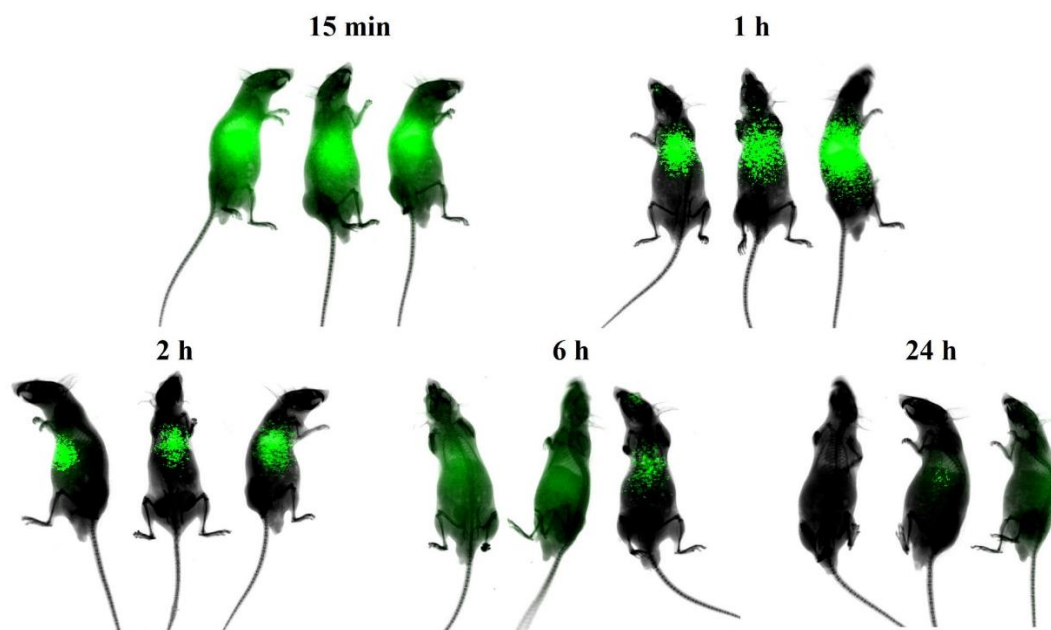
5.6.1. Biodistribucija $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$

Ispitivanje biodistribucije $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ na eksperimentalnim životinjskim modelima vrši se u cilju praćenja njihovog biološkog ponašanja i *in vivo* stabilnosti nakon intravenskog injektovanja. Biološko ponašanje, kao i *in vivo* stabilnost zavise od hemijskog sastava, morfologije, veličine, hidrofobnosti/hidrofilnosti i površinskog naelektrisanja SMNČ. Da bi se SMNČ mogle primjenjivati u biomedicini, osim toga što treba da imaju visoke vrijednosti magnetizacije, moraju da budu u obliku stabilnih čestica na fiziološkom pH (102). Smatra se da oblaganje SMNČ odgovarajućom oblogom osim što pomaže da se ograniči rast magnetnih čestica jezgra i dovodi do stabilizacije SMNČ u nosećem fluidu, obezbjeđuje i sterno ometanje za njihovu opsonizaciju u cirkulaciji i uklanjanje od strane retikulo-endotelnog sistema a samim tim i produžuje vrijeme zadržavanja SMNČ u cirkulaciji. Sterno ometanje za opsonizaciju SMNČ i njihovo produženo prisustvo u cirkulaciji nakon oblaganja omogućuje njihov prolazak na mjesta gdje su krvni sudovi propustljiviji (npr. u regiji tumora). Prema literaturnim podacima, adsorpcija proteina (opsonizacija) se povećava pri povećanju veličine nanočestica, površinskog naelektrisanja i hidrofobnosti (262). Proteini koji se adsorbuju na površinu SMNČ su tzv. opsonini (uglavnom, imunoglobulini i komponente komplemента, kao što su C3, C4 i C5), koji pospješuju ili favorizuju fagocite. Ako su opsonini dovoljno blizu površine čestice, tada međusobne interakcije uključuju van der Waal-ove, elektrostatičke i hidrofilno/hidrofobne sile. Te sile su odgovorne za vezivanje opsonina na površinu čestice. Po pravilu, opsonizacija hidrofobnih čestica dešava se mnogo brže nego hidrofилnih, jer proteini seruma krvi se mnogo lakše adsorbuju na hidrofobnu površinu.

Kako se interakcija SMNČ sa proteinima plazme mijenja u zavisnosti od fizičkih i hemijskih osobina nanočestica (veličina, površinsko naelektrisanje, morfologija, hidrofilnost itd), neophodno je bilo ispitati uticaj površinske modifikacije SMNČ hidrofilnim APTES-om i konjugacije sa $^{131}\text{I-CC49}$ mAt na *in vivo* stabilnost koloidnih čestica u krvi i njihovu aglomeraciju, kao i kako modifikacija utiče na biološku raspodjelu po organima eksperimentalnih životinja. Veličina čestica ima veoma veliki uticaj na biološko ponašanje (263). Ukoliko su čestice veće od 10 μm , nakon intravenskog injektovanja, nakupljaju se u plućnim kapilarama, čestice od 0,2 do 3 μm se najviše nakupljaju u jetri i slezini, dok čestice manje od 30 nm imaju tendenciju nakupljanja u kostnoj srži (264–266). Kako je na površini

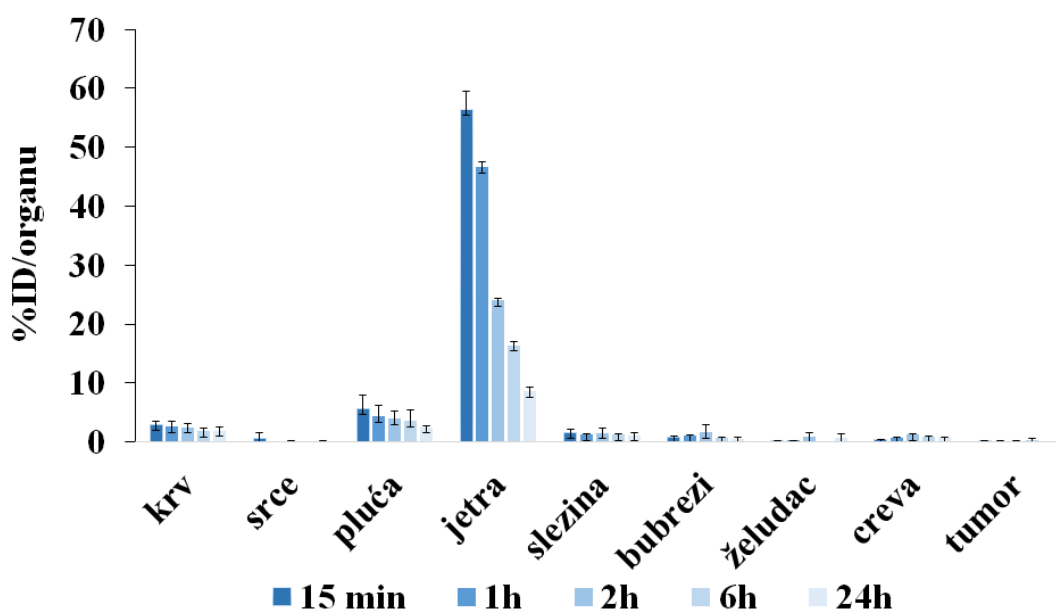
SMNČ manjeg dijametra adsorpcija proteina manja, a samim tim smanjena reakcija RES-a a produženo vreme SMNČ u cirkulaciji, u ovim istraživanjima smo koristili SMNČ obložene APTES-om, čiji je hidrodinamički prečnik oko 100 nm. Hidrofobne i naelektrisane SMNČ imaju tendenciju da vežu veći broj proteina (IgG, albumine, apoliproteine, fibrinogen), pa su podložnije procesu opsonizacije i imaju kraće vreme zadržavanja u cirkulaciji, dok čestice sa hidrofilnom površinom vezuju samo albumine (267). Smatra se da veće naelektrisanje površine obloge dovodi do većeg vezivanja proteina iz plazme. Pozitivno naelektrisane SMNČ generalno podležu brže fagocitozi od strane RES-a nego neutralne, ili negativno naelektrisane, jer vežu proteine koji imaju izoelektrične tačke manje od 5.5, kao što je albumin (268). U ovim istraživanjima su korišćene hidrofilne SMNČ obložene APTES-om, čije je ukupno površinsko naelektrisanje iznosilo +26 mV.

Scintigrafski imidžing (scintigrafija) se koristi za dobijanje ne samo vizuelne i kvalitativne već i kvantitativne informacije o fiziološkoj aktivnosti organa *in vivo*. Takođe, scintigrafija se koristi i za praćenje biološke raspodjele radiofarmaceutika po organima oglednih životinja. Na slici 31 prikazani su snimci NOD-SCID miševa nakon snimanja BRUKER® In-Vivo Xtreme II uređajem, u vremenskim intervalima od 15 minuta, 1, 2, 6 i 24 h nakon i.v. aplikacije ^{131}I -CC49-SMNČ (370 kBq/0,5 mg ^{131}I -CC49-SMNČ/0,05 mL).



Slika 31. Snimci NOD-SCID miševa snimljeni BRUKER® In-Vivo Xtreme II uređajem u različitim vremenskim intervalima nakon i.v. aplikacije ^{131}I -CC49-SMNČ.

Na dobijenim snimcima intenzitet radioaktivnosti organa je najveći u oblasti jetre i pluća tj. najveće nakupljanje $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ je u ovim organima. Snimci takođe ne pokazuju nakupljanje $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ u tumorima nakon i.v. injektovanja. U cilju dobijanja detaljnijih informacija o biodistribuciji $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$, nakon snimanja u svakom vremenskom intervalu, NOD-SCID miševi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom i radioaktivnost organa je mjerena u NaI (Tl) gama brojaču (grafikon 7). Iz rezultata prikazanih na grafikonu se može vidjeti da se $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ nakon i.v. injektovanja vrlo brzo uklanja iz cirkulacije. Nakon 15 minuta u cirkulaciji ostaje manje od 3%.



Grafikon 7. Biodistribucija $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ nakon i.v. primjene ($\bar{x} \pm \text{SD}$).

Najveće nakupljanje obilježenih nanočestica je u jetri 15 minuta nakon i.v. injektovanja ($56,39 \pm 3,15\%$ ID/organu), a zatim vremenom aktivnost u jetri opada uslijed metabolizma nanočestica i eliminacije (24 h, $8,62 \pm 2,56\%$ ID/organu). Ovo se može objasniti fizičko-hemijskim karakteristikama SMNČ i opsonizacijom, jer $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ veoma brzo podliježu fagocitozi od strane RES-a jetre. Nakupljanje u plućima u prvih 15 minuta nakon i.v. injektovanja iznosi je $5,6 \pm 2,36\%$ ID/organu, a nakon 24 h $2,5 \pm 2,36\%$ ID/organu, što se može objasniti aglomeracijom čestica u mikrometarske aglomerate, u određenom procentu, u krvotoku odmah nakon i.v. injektovanja čestica. Nakon dolaska u pluća mikrometarski aglomerati se zadržavaju u prekapilarima i kapilarima bazena plućne arterije, pošto zbog veličine ($\geq 8 \mu\text{m}$) ne mogu da prođu kroz njih. Prisustvo $^{131}\text{I-CC49}$ mAt i pojedinih slobodnih

APTES grupa (-NH₂) na površini SMNČ u najvećem procentu spriječava njihovu aglomeraciju u krvotoku, ali, kako rezultati pokazuju, ipak dolazi do stvaranja mikrometarskih čestica u krvi i nakupljanja u plućima (266,269). Dobijeni rezultati pokazuju da formirani aglomerati nisu stabilni jer usled povećanog pritiska krvi u kapilarima dolazi do njihove degradacije u sitnije aglomerate sposobne da prođu kroz lumen kapilara i zato dolazi do opadanja radioaktivnosti u plućima sa vremenom.

U tabeli 16 su prikazani rezultati biodistribucije ¹³¹I-CC49-SMNČ u jetri, plućima i krvi tj. u organima sa najvećim nakupljanjem ¹³¹I-CC49-SMNČ nakon i.v. primjene.

Tabela 16. Biodistribucija ¹³¹I-CC49-SMNČ u organima od interesa nakon i.v. primjene.

Organ	%ID/organu ($\bar{x} \pm SD$).				
	Vrijeme				
	15 min	1h	2 h	6 h	24 h
krv	2,89±0,66	2,65±0,83	2,51±0,56	1,76±0,63	1,91±0,66
pluća	5,6±2,36	4,3±1,89	4,02±5,45	3,5±2,39	2,5±2,36
jetra	56,39±3,15	46,63±0,85	24,05±0,33	16,39±0,65	8,62±2,56

Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da funkcionalizacija površine SMNČ APTES-om i konjugacija sa ¹³¹I-CC49 mAt u velikom procentu (> 90 %) poboljšavaju hidrofilnost površine čestica i sprečavaju njihovu aglomeraciju u cirkulaciji. Bez obzira na konjugaciju APTES-SMNČ sa ¹³¹I-CC49 mAt, gdje je očuvana imunoreaktivnost mAt, nije došlo do željene reakcije sa TAG-72 antigenima na površini adenokarcinoma kolona. Rezultati pokazuju neznatno nakupljanje ¹³¹I-CC49-SMNČ u tumoru (<0,5 % ID/organu).

Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima. *Shao* i saradnici su prikazali rezultate konjugacije APTES-SMNČ sa antitijelom na mezotelin (veličina SMNČ-a ~100-130 nm) i nakon i.v. aplikacije u NOD-SCID miševima sa subkutano implantiranim karcinomom pankreasa, najveće nakupljanje je uočeno u jetri (250 µg/g tkiva) nakon 3,5 h ali sa, po autorima, zadovoljavajućim nakupljanjem i u tumoru (100 µg/g tumora) (270). *Shanehsazzadeh* i saradnici su ispitivali biodistribuciju komercijalnih SMNČ preparata (Nanomag[®]-Crosslinked, Micromod Partikeltechnologie GmbH, Njemačka) konjugovanim sa ^{99m}Tc obilježenim C595 mAt u cilju *in vivo* detekcije MUC1 antigena koji je eksprimiran u velikom procentu na ćelijama karcinoma dojke. Nakon i.v. aplikacije BALB/c miševima

ženskog pola, najveće nakupljanje je bilo u jetri i slezini ($\geq 80\%$ ID/g) i po njihovim riječima, razočaravajuće, u tumorskom tkivu ($<1\%$ ID/g). Smatrali su da je oblaganje nanočestica proteinima plazme i stvaranja proteinske krune jedan od razloga za izuzetno malo nakupljanje u tumoru. Kao drugi razlog su naveli, da proteini odgovorni za stvaranje proteinske krune („corona protein“) prekrivaju i specifična mjesta na receptorima MUC1 antigena (271). U periodu od 2005-2015 sprovedena su 232 istraživanja biodistribucije nanočestica nakon i.v. injektovanja i analizom je potvrđeno da manje od 1% od ukupno injektovane doze (%ID) se nakuplja u tumoru (medijana 0,7%). Adsorpcija proteina krvne plazme na nanočestice (opsonizacija), prepoznavanje i preuzimanje nanočestica od strane RES-a predstavlja problem u svim ispitivanjima biodistribucije nakon i.v. primjene. U sastav proteinske krune ulaze različiti opsonini, joni i serumski proteini koji stvaraju novi biološki identitet nanočestica i tako određuju njihovo biološko ponašanje u organizmu. Za svaku formulaciju nanočestica postoji jedinstven sastav proteinske krune a među 125 identifikovanih proteina plazme, najzastupljeniji u proteinskoj kruni su: protein komplementa C3b, IgG i IgM antitijela, lektin, fikolin, pentraksin, albumin, antitrombin-III, apolipoproteini A-I, A-IV, B-100, C-II, C-III, klasterin, fibrinogen, haptoglobin, hemoglobin, laki lanci imunoglobulina (Ig), gama lanac Ig, manoza-vezujući protein C, paraoksinaza-1 i transferin (272,273). Takođe je primjećeno, da je veći procenat nakupljanja u tumoru kada su nanočestice neorganskog porijekla u odnosu na nanočestice organskog porijekla (0,8% u odnosu na 0,6% ID). Nanočestice hidrodinamičkog prečnika manjeg od 100 nm su pokazale bolju distribuciju u odnosu na nanočestice većeg dijametra (0,7% u odnosu na 0,6% ID). Obložene nanočestice čiji je zeta potencijal neutralan (-10 do +10 mV) pokazale su veći procenat nakupljanja u odnosu na nanočestice sa pozitivnim (>10 mV) i negativnim (<-10 mV) zeta potencijalom (0,7% u odnosu na 0,6% i 0,5% ID) (274).

Rezultati ispitivanja biodistribucije $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ nakon i.v. injektiranja su u skladu sa dosadašnjim ispitivanjima biodistribucije ostalih nanočestica konjugovanih sa antitijelima. Pretpostavlja se da nakon i.v. primjene $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ dolazi do opsonizacije i stvaranja proteinske krune u kojoj su zastupljeni proteini sistema komplementa, što je uzrokovalo brzo prepoznavanje i fagocitozu $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ od strane RES-a jetre (275). Takođe, prepoznavanju $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ od strane RES-a doprinjeli su i veličina čestica ($105 \pm 2,3$ nm), kao i površinsko naelektrisanje ($+26 \pm 0,6$ mV). Zbog svega navedenog, procenat nakupljanja $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ u tumorskom tkivu ($<0,5$ %ID/organu) nakon i.v. injektiranja nije dovoljan da bi radionuklid (^{131}I) i magnetna hipeteremija mogli ispoljiti terapijski efekat.

U literaturi kao jedan od načina da se poboljša biodistribucija SMNČ se navodi korišćenje aptamera, polinukleotida kao što su RNK ili jednolančana DNK. Oni djeluju na isti način kao i mAt na antigene, samo preko vodoničnih veza i van der Valsovih interakcija. U budućnosti aptameri bi mogli zamjeniti mAt zbog njihove termostabilnosti, *in vitro* sinteze i veće senzitivnosti i specifičnosti u odnosu na mAt (276,277). Istraživanja su pokazala da bi se korišćenjem jednolančanog Fv fragmenta (scFv - fragment koji se sastoji od po jednog dijela teškog i lakog lanca hipervarijabilne regije Fab fragmenta) umjesto cijelog mAt, mogao izbjeći imuni odgovor organizma, zbog nedostatka Fc fragmenta za koji se vezuju makrofage (278).

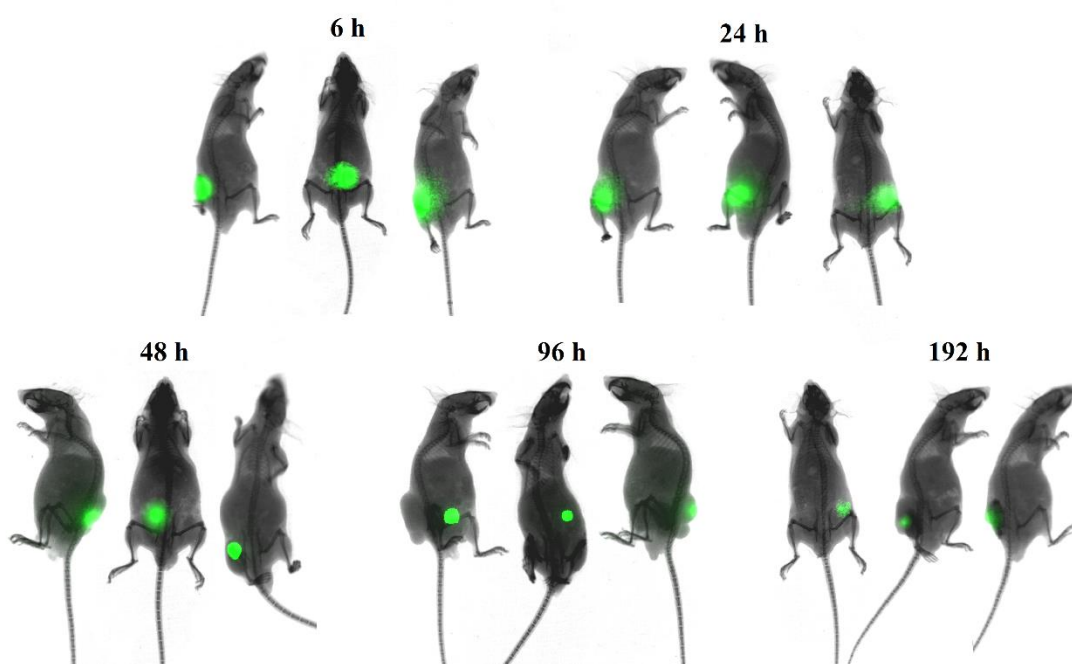
5.6.2. Ispitivanje retencije ¹³¹I-CC49-SMNČ

Radionuklidna terapija je metod liječenja benignih i malignih bolesti zasnovan na primjeni jonizujućeg zračenja. Princip primjene se zasniva na selektivnoj depoziciji doza jonizujućeg zračenja u tumoru ili organu koji se tretira. U zavisnosti od fizičkih osobina radionuklida i vrste molekula-nosača, radioaktivnost se nakuplja u određenim organima i tumoru. Veoma je važno da se postigne visoka specifičnost vezivanja radionuklida za tumorsko tkivo, kako bi ozračivanje okolnih, netumorskih tkiva bilo svedeno na minimum.

Savremena imunoterapija malignih tumora obuhvata primjenu antitumorskih monoklonskih antitijela koje prepoznaju tumorske antigene i uništavaju tumorske ćelije. Polazeći od svojstva malignih tumorskih ćelija da eksprimuju različite antigene na svojoj površini, osnovni preduslov terapije primjenom antitijela je da se identifikuju tumor specifični antigeni, kojih nema na netumorskim ćelijama, ili da se utvrde tumor asocirani antigeni koji se nalaze i u zdravom tkivu iz kog tumor vodi porijeklo, ali u tumoru se ekspimiraju u znatno većem broju u odnosu na zdravo tkivo. Antitijela na tumorske antigene se proizvode imunizacijom eksperimentalnih životinja tim antigenom. Monoklonska antitijela su monospecifična antitijela koja su međusobno identična, jer su napravljena iz pojedinačnog klona B-limfocita tj. plazma ćelije. To je u kontrastu sa poliklonskim antitijelima, koja se formiraju iz nekoliko različitih ćelijskih linija B-limfocita i manje su specifična od monoklonskih. Monoklonska antitijela imaju monovalentni afinitet, u smislu da imaju identične paratope koji se vezuju za pojedinačni epitop pojedinačnog antigena. Za skoro svaki antigen je moguće proizvesti monoklonska antitijela koja se specifično vezuju za njega (279). Da bi radioobilježeno antitijelo moglo da se koristi u radioimunoterapiji, radioizotop mora da

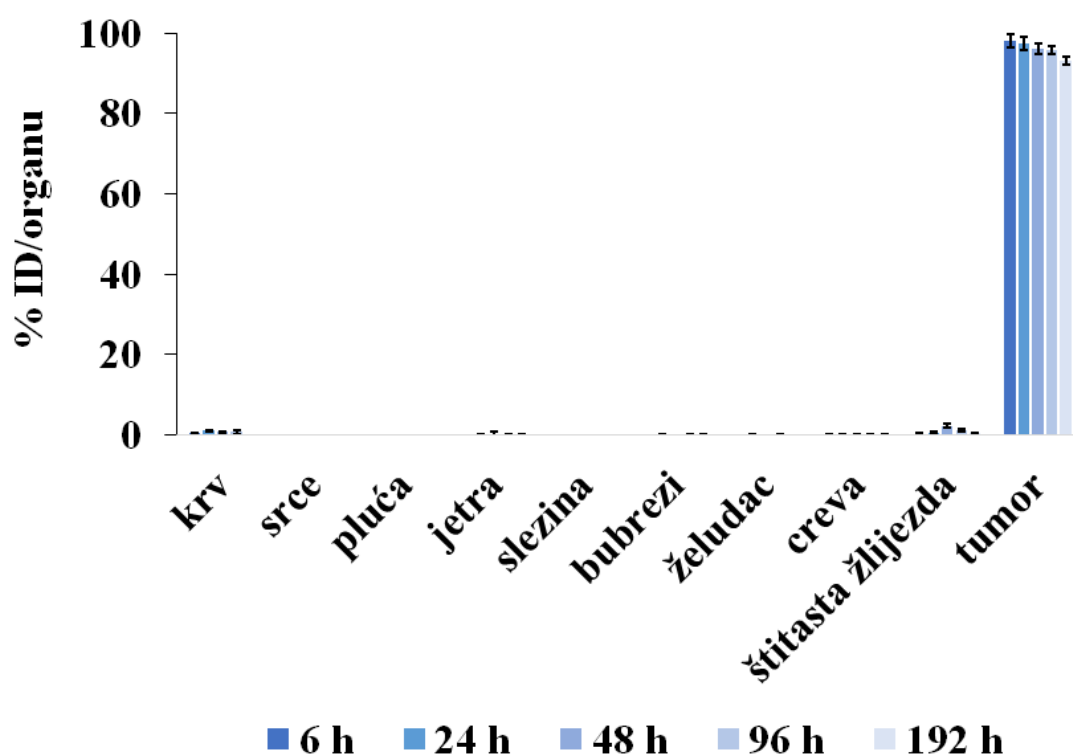
se veže za njega na takav način da se ne izmjeni njegova imunoreaktivnost da reaguje sa odgovarajućim antigenom. Zbog svega navedenog, cilj ove doktorske disertacije je bio da se za obložene SMNČ konjuguje CC49 mAt obilježeno jodom-131 koje bi nakon intravenske aplikacije prepoznalo TAG-72 eksprimirane antigene na ćelijama humane tumorske linije LS174T adenokarcinoma kolona i vezujući se za njih omogućili bi uništavanje tumorskog tkiva bilo radijacijom, bilo hipertermijom ili njihovim kombinovanim dejstvom. Međutim, rezultati intravenskog injektovanja $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ su pokazali da je njihovo nakupljanje uglavnom u jetri uslijed fagocitoze od strane RES-a. Takođe se smatra da do tumora dolazi relativno mala frakcija udarnog volumena srca (ukupna tumorska masa je mnogo manja od telesne mase), pa samim tim i mala količina obilježenih SMNČ. Da bi se postigla terapijska doza obilježenih SMNČ u tumorskom tkivu, a da bi se izbjeglo ozračivanje organa koji su od interesa (jetra, pluća), u daljim eksperimentima su $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ i.t. injektovane eksperimentalnom životinjskom modelu. Prema literaturnim podacima, SMNČ se već klinički primjenjuju u terapiji glioblastoma i kancera prostate putem intratumorske injekcije (149,280).

Da bi se ispitala retencija $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ u tumorskom tkivu, NOD-SCID miševima sa indukovanim adenokarcinomom kolona je i.t. injektovano $370\text{ kBq}/0,5\text{ mg }^{131}\text{I-CC49-SMNČ}/0,05\text{ mL}$ suspenzije. Na slici 32 su prikazani snimci NOD-SCID miševa nakon snimanja BRUKER® In-Vivo Xtreme II uređajem, u vremenskim intervalima 6, 24, 48, 96 i 192 h nakon i.t. primjene $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$.



Slika 32. Snimci NOD-SCID miševa, snimljeni BRUKER® In-Vivo Xtreme II uređajem u različitim vremenskim intervalima nakon i.t. aplikacije $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$.

Iz dobijenih snimaka se može zaključiti da se sva radioaktivnost nalazi na mjestu injektovanja tj. u tumorima i nakon 8 dana od i.t. injektovanja. Na svim prikazanim snimcima se ne uočava prisustvo radioaktivnosti u ostalim organima (slika 32). Svi NOD-SCID miševi su nakon snimanja žrtvovani i dobijeni rezultati su prikazani na grafikonu 8. Rezultati pokazuju skoro potpunu retenciju konjugata u tumoru i nakon 192 h od i.t. primjene ($93,02 \pm 0,96$ % ID/organu), ukazujući na zadovoljavajuću *in vivo* stabilnost $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$. Dobijeni rezultati izmjerenih radioaktivnosti po organima nakon žrtvovanja su u saglasnosti sa snimcima miševa prikazanim na slici 32.

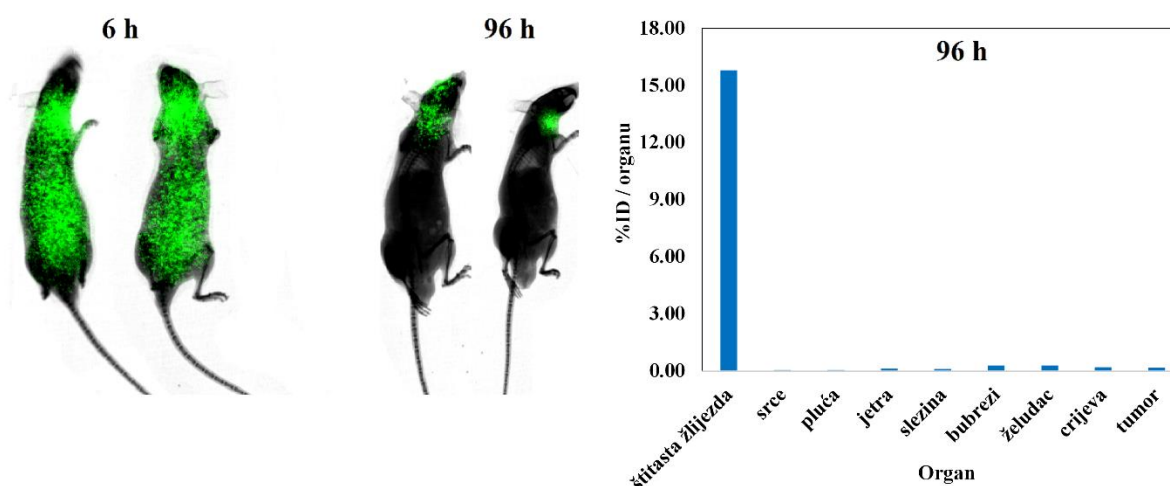


Grafikon 8. Biodistribucija $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ nakon i.t. primjene ($\bar{x} \pm SD$).

Takođe, dokaz njihove retencije u tumoru je i izuzeno mali procenat radioaktivnosti u štitastoj žlijezdi od $0,2 \pm 0,11$ % ID/organu nakon 6 h do $2,30 \pm 0,56$ % ID/organu nakon 48 h. Nakon 96 h aktivnost opada uslijed eliminacije ^{131}I iz organizma ($1,20 \pm 0,23$ % ID/organu) i 8. dana aktivnost u štitastoj žlijezdi je iznosila $0,5 \pm 0,16$ % ID/organu.

Kako bi pokazali da biološko ponašanje odnosno retencija $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ u tumoru zavisi od veličine injektovanih čestica i monoklonskog antitijela, rastvor Na^{131}I ($50 \mu\text{Ci}/0,05 \text{ mL}$) je takođe i.t. injektovan u NOD-SCID miševima sa indukovanim tumorima. Miševi su

snimani BRUKER® In-Vivo Xtreme II uređajem, nakon 6 h i 96 h od i.t. aplikacije i dobijeni snimci su prikazani na slici 33. Kao što se može vidjeti iz dobijenih snimaka, već nakon 6 h od i.t. primjene, radioaktivnost je detektovana u cijeloj životinji, dok je nakon 96 h radioaktivnost detektovana samo u štitastoj žlijezdi (ciljnom organu), što je u saglasnosti sa farmakokinetikom Na^{131}I . Nakon 96 h, miševi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom, i izmjerena je radioaktivnost organa na gama brojaču. Rezultati su pokazali da je najveće nakupljanje radioaktivnog joda u štitastoj žlijezdi nakon 96 h ($15,26 \pm 3,69$ % ID/organu), dok se ostatak radioaktivnosti eliminiše iz organizma putem bubrega i crijeva. Na^{131}I nakon i.t. aplikacije se zbog male veličine molekula zadržava veoma kratko vrijeme u tumoru. Zbog toga vezivanjem joda-131 za antitijelo i njihovom konjugacijom sa APTES-SMNC, stvara se radiofarmaceutik, koji će se zbog svoje veličine i reakcije vezivanja CC49 mAb sa TAG-72 antigenima, dovoljno dugo zadržati u tumorskom tkivu adenokarcinoma kolona i omogućiti jodu-131 da ispolji svoj terapijski efekat.



Slika 33. Snimci NOD-SCID miševa, snimljeni BRUKER® In-Vivo Xtreme 2 uređajem u različitim vremenskim intervalima od 6 i 96 h nakon i.t. aplikacije Na^{131}I i rezultati biodistribucije po organima.

Literaturni podaci o istraživanjima biodistribucije i retencije nanočestica obilježenih ^{131}I su pokazali oprečne dobijene rezultate. Kod ispitivanja biodistribucije jodom-131 obilježenog citostatika paklitaksela (PTX) korišćenjem HSA kao bifunkcionalnog helatora (prečnik ^{131}I -HSA-PTX kompleksa ~ 100 nm) na tumorskom ksenograftu dojke na NOD-SCID miševima, najveće nakupljanje bilo u plućima 24 h nakon i.v. primjene. Razlog manjeg

nakupljanja ^{131}I -HSA-PTX u jetri i slezini je posljedica disocijacije ovih ^{131}I -HSA-PTX nanočestica nakon preuzimanja od strane makrofaga i metabolizma HSA unutar njih. Nakon 72 h, većina ^{131}I -HSA-PTX nanočestica je eliminisana iz ostalih organa, dok su se ^{131}I -HSA-PTX nanočestice jedino zadržale u tumoru ($<5\%$ ID/g) zahvaljujući EPR efektu (281).

U ispitivanjima retencije lipozoma kao nanočestica u ksenograft modelu nemikrocelularnog karcinoma pluća, gdje je ^{131}I vezan za liposome preko aminokiselinske sekvence arginin-glicin-aspartat (RGD sekvenca; ~ 100 - 125 nm), najveća retencija obilježenih čestica je bila u tumoru nakon 24 h ($39,49 \pm 6,06\%$ ID/g) nakon i.t. primjene, dok je nakon 72 h bilo samo $6,97 \pm 1,43\%$ ID/g. U ostalim organima, nakupljanje je bilo ispod 2% ID/g (282). Li i saradnici su u ispitivanjima biodistribucije lipozoma, gdje se koristio kao ligand BSA-poli(ϵ -kapolakton) obilježen jodom-131 (~ 130 - 180 nm), koristeći isti ksenograft model, dobili da je nakupljanje u tumorskom tkivu bilo $15,96 \pm 1,01\%$ ID/g 24 h nakon i.v. aplikacije. Autori su smatrali da je zadržavanje kompleksa u RES-u nezanemarljivo, naročito ako se zna da je masa jetre po pravilu veća od mase tumora, tako da $\%$ ID/g nije najbolji indikator distribucije. Štaviše, oni su smatrali da bez obzira što je i.v. primjena jednostavnija metoda, biodistribucija nanočestica u organima RES-a bitno utiče na terapijski efekat *in vivo*, kao i na prekomijerno ozračivanje organa koji nisu od interesa za terapiju i zbog toga prednost daju i.t. primjeni (283).

Takođe, u studijama gdje su korišćene srebrne nanočestice obilježene ^{131}I (~ 21 nm), nakupljanje u tumoru kod ksenograft modela sarkoma je bilo $35,43 \pm 1,12\%$ ID/g nakon 60 minuta od i.v. primjene i $63,8 \pm 1,3\%$ ID/g nakon 15 minuta od i.t. primjene. Ovi rezultati su pokazali da su injektovane srebrne nanočestice nestabilne *in vivo*, jer nakon 2 h od i.t. primjene radioaktivnost u sarkomu je iznosila $36,23 \pm 0,99\%$ ID/g. Značajno nakupljanje je bilo i u jetri (284). U odnosu na rezultate našeg ispitivanja, retencija u tumoru ovih nanočestica je značajno manja i razlog tome je prečnik nanočestica (~ 21 nm) zbog kojeg se brže eliminišu iz tumorskog tkiva.

Iz svega navedenog se može zaključiti da će nanočestice nakon i.v. injekcije bez obzira na svoju veličinu i oblogu, biti prepoznate od strane RES-a i uklonjene iz cirkulacije, dok je nakupljanje u tumorskom tkivu veoma malo ($<1\%$). Veličina nanočestica je važan parametar koji utiče na retenciju SMNČ nakon i.t. aplikacije, jer što su veće nanočestice njihova retencija u tumoru je veća. Iako i.t. aplikacija omogućava veću retenciju i veću akumulaciju nanočestica u tumoru, njen nedostatak predstavlja invazivnost i nemogućnost tretiranja duboko smještenih tumora. Osim veličinom kao faktorom bitnim za retenciju, prisustvo ^{131}I -CC49 mAt na površini

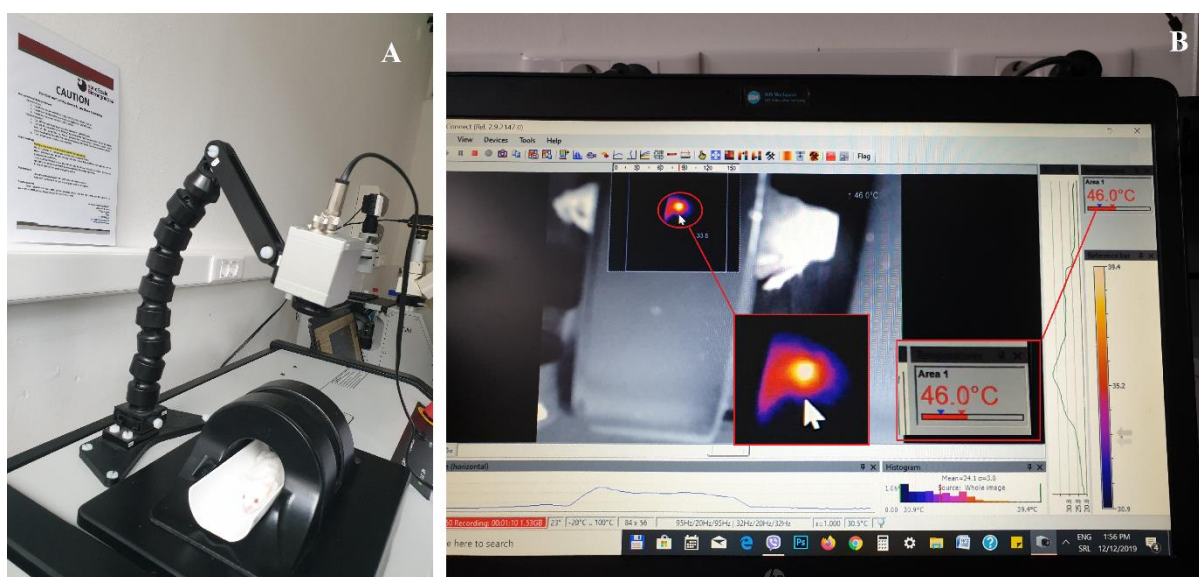
APTES-SMNČ povećava retenciju unutar adenokarcinoma kolona zbog specifične reakcije mAt sa TAG-72 na površini tumorskih ćelija. Uslijed toga, retencija konjugata u tumoru je dovoljno duga da mogu i magnetne nanočestice i radionuklid da ispolje svoj terapijski potencijal. Za ispitivanje terapijskog efekta $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ korišćen je i.t. način primjene.

5.7. Terapijski efekat $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$

Pojedinačni efekti magnetne hipertermije i efekti radionuklidne terapije, kao i efekat kombinovane terapije (magnetne hipertermije i radionuklidne terapije) $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ na veličinu tumora su ispitivani nakon i.t. aplikacije (5.55 MBq/0.5 mg $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ /0,05 mL) u NOD-SCID miševima sa indukovanim tumorima i dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima dobijenim u kontrolnim grupama. U slučaju magnetnih nanočestica primjena oscilatornog spoljašnjeg magnetnog polja (SMP) uzrokuje vibracije magnetiziranih čestica, koje svoju magnetnu energiju uslijed sila trenja transformišu u toplotnu energiju, uslovljavajući tako porast temperature (između 42 °C i 46 °C) unutar tkiva u kojima su koncentrisane. Kako temperatura zagrijavanja magnetnih nanočestica u tumorskom tkivu zavisi od jačine SMP, frekvencije oscilacija i kapaciteta rashlađivanja krvi koja prolazi kroz tumor, APTES-SMNČ, korišćene u ovom radu, su dizajnirane tako da imaju prosečnu veličinu od $105 \pm 2,3$ nm, veliku efikasnost grijanja (tj. visoke vrijednosti SPA od 123 W/g) i sposobne su da održe temperaturu u tumorskom tkivu iznad 42 °C u toku 30 minuta ili duže, sve dok ne dođe do ćelijske nekroze. Nakon i.t. aplikacije APTES-SMNČ konjugovanih sa neobilježenim CC49 mAt (Grupa MHT - 0.5 mg CC49-SMNČ/0,05 mL), kao i obilježenim $^{131}\text{I-CC49}$ (Grupa MHT+RT - 5.55 MBq/0.5 mg $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ /0,05 mL), miševi su izlagani dejstvu spoljašnjeg magnetnog polja (252 kHz, 15,9 kA/m), 30 minuta svaki drugi dan u toku 14 dana. Porast temperature unutar tumora je mjeren infracrvenom kamerom (IR1 Thermal Image System, slika 34). Kao što je prikazano na slici, temperatura u tkivu tumora je porasla na 46 °C u toku prvih 5 minuta izlaganja spoljašnjem magnetnom polju. Ovi rezultati pokazuju da tkivo tumora u koje su direktno injektovane i neobilježene i obilježene SMNČ može biti zagrijano izlaganjem SMP, a stepen zagrijanosti može se kontrolisati podešavanjem jačine SMP. Takođe ovi rezultati pokazuju da konjugacija APTES-SMNČ sa $^{131}\text{I-CC49}$ nije dovela do gubitka sposobnosti zagrijavanja samih APTES-SMNČ. Koristeći ovako dizajnirane APTES-SMNČ u kombinaciji

sa odgovarajućim magnetnim poljem, male mase ovih nanočestica (0,5 mg) mogu da dovedu do povećanja temperature u tumorskom tkivu i do ćelijske nekroze.

Mehanizmi koji djeluju tokom hipertermije povezani su sa uticajem toplotnog stresa na ćelijskom i molekularnom nivou. Prema literaturnim podacima (57,68) ovi citotoksični procesi počinju na temperaturi iznad 43 °C kao rezultat denaturacije proteina. Dokazano je da su ćelije tumora značajno osjetljivije na ovaj efekat u odnosu na zdrave ćelije.

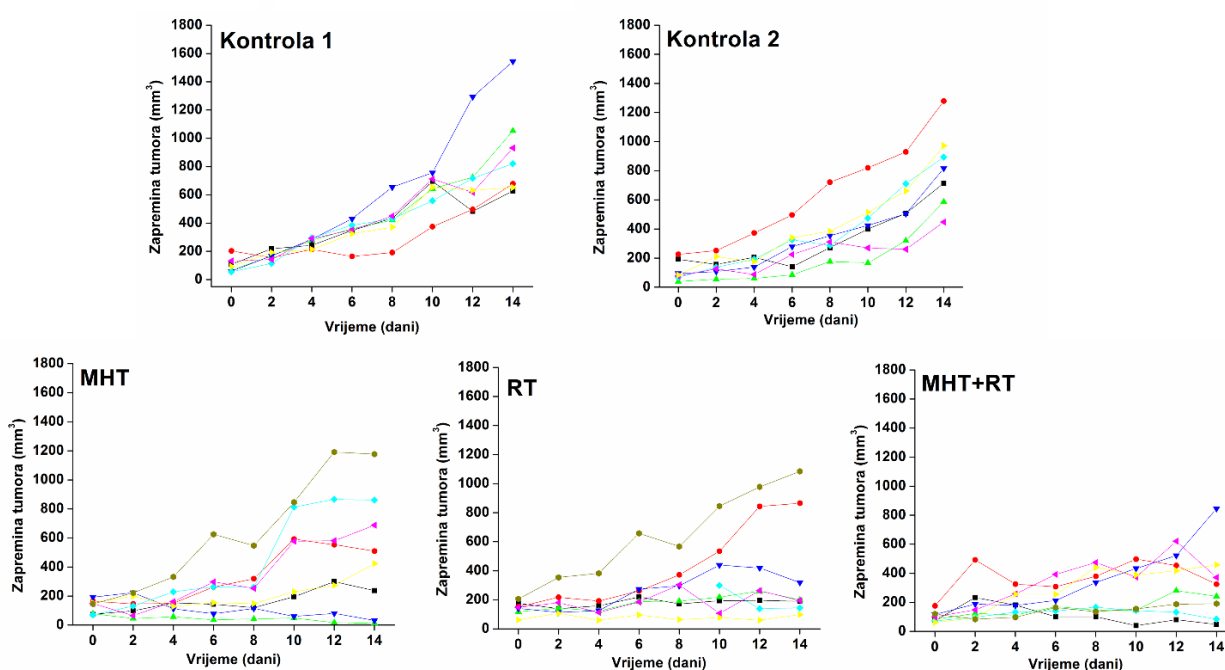


Slika 34. Mjerenje temperature unutar tumora nakon i.t. aplikacije CC49-SMNČ ili $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ pomoću DM3 aplikatora. A. Prikaz IR kamere. B. Snimak napravljen sa IR kamerom u normalnom položaju u odnosu na miša.

Efekat više puta primjenjene hipertermije na NOD-SCID miševima sa indukovanim adenokarcinomom kolona nakon i.t. injektovanja APTES-SMNČ konjugovanih sa CC49 antitijelom (Grupa MHT) je praćen mjerenjem rasta tumora svaki drugi dan i poređenjem dobijenih vrednosti sa rastom tumora u kontrolnim grupama. Tumori u obe kontrolne grupe su rasli progresivno i dostigli su zapreminu u prosjeku od $\sim 800\text{-}900\text{ mm}^3$ 14. dana od i.t. aplikacije fiziološkog rastvora ili neobilježenih APTES-SMNČ (grafikon 9). Iako rast tumora u obe kontrolne grupe nije bio ravnomjeran, uočeno je da su svi tumori bili veći od 400 mm^3 . Rezultati takođe pokazuju da nije bilo razlike u brzini rasta između ove dvije grupe, što ukazuje da APTES-SMNČ nemaju antitumorski efekat. U MHT grupi, 4 od 8 tumora bili su manji od

400 mm³ nakon 14. dana, dok 2/8 su potpuno regresirali, što ukazuje na antitumorski efekat hipertermije primjenjene više puta.

Bolji rezultati su dobijeni u RT grupi (5.55 MBq/0.5 mg ¹³¹I-CC49-SMNČ/0,05 mL), gdje je 6/8 tumora bilo manje od 400 mm³ a 2/8 su potpuno regresirali 14. dana od i.t. aplikacije ¹³¹I-CC49-SMNČ. Najbolji rezultati su dobijeni u MHT+RT grupi (5.55 MBq/0.5 mg ¹³¹I-CC49-SMNČ/0,05 mL), gdje je 7/8 tumora bilo manje od 400 mm³ sa jednim tumorom koji je potpuno regresirao.

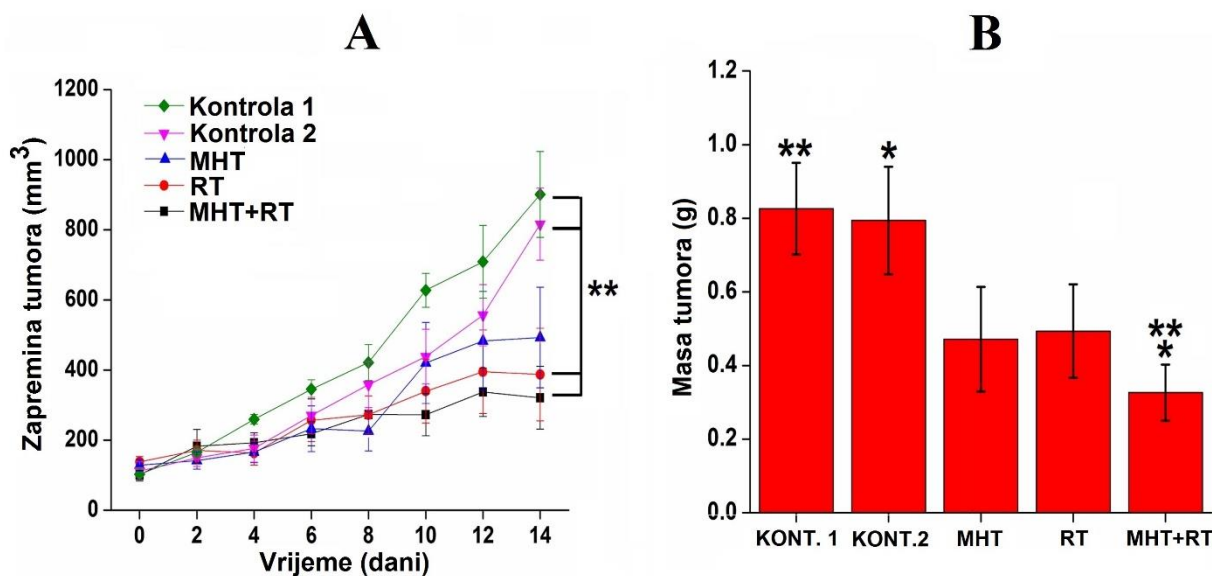


Grafikon 9. Prikaz pojedinačnog rasta svakog tumora u svim ispitivanim grupama u toku 14 dana.

Šta više, oblik krivih rasta tumora pokazuje stalnu supresiju rasta svih tumora u MHT+RT grupi, pokazujući superiorni antitumorski efekat kombinovane terapije nad hipertermijom i radionuklidnom terapijom pojedinačno. Razlike u zapremini tumora između RT i MHT+RT u odnosu na obe kontrolne grupe se uočavaju već nakon 4. dana a statistički značajno se razlikuju nakon 14. dana ($p < 0,01$) (grafikon 10, A).

Iako nakon 14. dana, svi tumori iz kontrolnih grupa nisu prešli etički dozvoljenu zapreminu (~ 2000 mm³), a uzimajući u obzir vrijeme poluraspada ¹³¹I od 8 dana, eksperiment je zaustavljen i svi miševi su žrtvovani metodom cerviklane dislokacije. Na grafikonu 10 A,

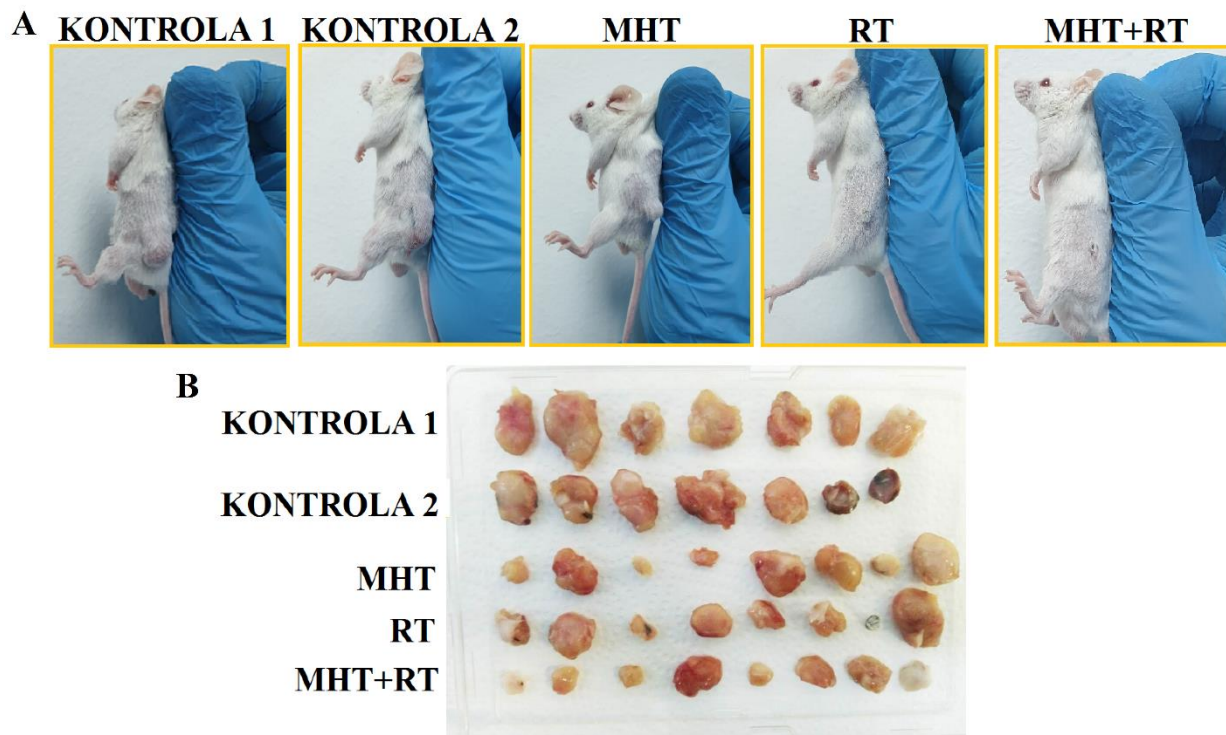
prikazani su rezultati veličina tumora izraženih kao zapremina tumora (aritmetička sredina svih zapremina tumora iste grupe sa standardnom greškom). Iz grafikona se može vidjeti da je dualna terapija pokazala najveći terapijski efekat. Izvađeni tumori su izmjereni i srednje vrijednosti njihovih masa sa standardnom greškom su prikazane na grafikonu 10 B.



Grafikon 10. A. Krive rasta tumora u svakoj od 5 grupa u toku 14 dana. B. Mase tumora 14. dana od početka eksperimenta u svakoj od 5 grupa ($\bar{x} \pm SE$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$).

Kao što se može videti iz prikazanih rezultata, u odnosu na obe kontrolne grupe i dualna i radionuklidna terapija su pokazale statistički značajan efekat terapije ($p < 0,01$). Ali, statistički značajno manje mase tumora su izmjerene samo u grupi MHT+RT u odnosu na Kontrolu 1 ($p < 0,01$) i Kontrolu 2 ($p < 0,05$). U odnosu na RT, kombinacija obe terapije je vjerovatno dovela do veće nekroze tumorskog tkiva, što je uticalo na manju masu tumora. Veći terapijski efekat MHT+RT u odnosu na ostale primjenjene metode se mogao vidjeti i golim okom na pojedinim miševima (slika 35, A). Takođe, nakon vađenja tumora i međusobnim poređenjem, kako je prikazano na slici 35 B, primjećuje se da su tumori najmanje veličine u MHT+RT grupi. U MHT+RT grupi se nalaze i tumori koji nisu regresirali, a razlog tome se može pripisati tehnici intratumorskog injektovanja, koja uvijek nosi određeni rizik injektovanja čestica van tumorskog tkiva, u blizinu krvnog suda i neravnomjerne raspodjele čestica u tkivu tumora

(282). Kao posljedica neravnomjerne raspodjele, samo jedan dio tumora je bio izložen terapijskom efektu, dok je ostatak tumora nesmetano rastao.



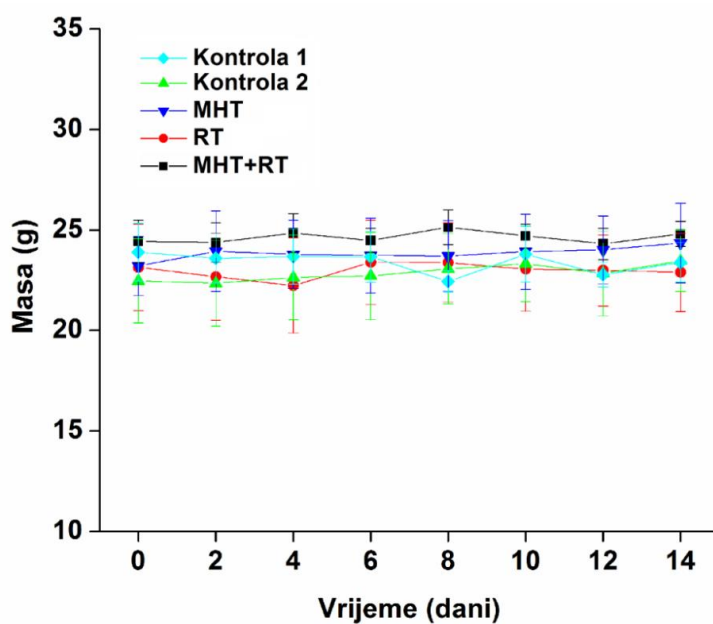
Slika 35. Uporedni prikaz efekta terapije. **A.** Slike miševa 14. dan od početka terapije. **B.** Snimci izvađenih tumora.

Korišćenjem jednačine 14, izračunati su procenti inhibicije tumorske zapremine (TVIR). TVIR je takođe jedan od pokazatelja efekata ispitivanih terapijskih pristupa. TVIR vrijednosti MHT, RT i MHT+RT grupa u odnosu na Kontrolu 1 su bile 54,38%, 68,77%, 73,00% dok za Kontrolu 2 su bile 48,31%, 64,62% i 69,41%. Ovi rezultati takođe pokazuju da je kombinacija obe terapije (MHT+RT) uzrokovala najveću inhibiciju tumorskog rasta u odnosu na pojedinačne MHT i RT.

Dobijeni rezultati su u skladu sa istraživanjima koja su sprovedena od strane *Chena* i saradnika. Prilikom i.t. primjene SMNČ konjugovanih sa ^{131}I -Sc-7269 mAt u dozi od 7.4 MBq/0,1 mL, najveći stepen inhibicije rasta tumora je dobijen kombinovanom terapijom hipertermije i radionuklidne terapije, bez toksičnog efekta (179). U drugoj studiji, terapija hepatocelularnog karcinoma na BALB/c nude miševima, gdje je umjesto Sc-7269 mAt, siRNK obilježena jodom-131 i konjugovana za SMNČ, nakon i.v. primjene RT i MHT u kombinaciji

su dovele do statistički značajne inhibicije ($p < 0,05$) rasta tumora u odnosu na kontrolnu grupu. Pretpostavlja se da je razlog manje statističke značajnosti kao i manjeg procenta stepena inhibicije rasta tumora (49,80%) u tom istraživanju u odnosu na naše istraživanje ($p < 0,01$, TVIR: 73,00 % i 69,41 %), vjerovatno manja doza primjenjenog ^{131}I (3,7 MBq u odnosu na 5,55 MBq). Autori su takođe potvrdili da iako je tumorsko tkivo bilo izloženo magnetnom polju jačine 638,16 kA/m u toku 12 h, efekat terapije je najviše zavisio od radioaktivnosti kompleksa (180). U radu sa ^{131}I -obilježenim citostatikom paklitakselom preko HSA helatora, koje su i.v. injektovane svaki 4. dan od početka terapije, sinergizam radionuklidne (7,4 MBq) i citostatske terapije je doveo do statistički značajne inhibicije rasta tumora ($p < 0,01$) u odnosu na kontrolne grupe i radionuklidnu terapiju nakon i.v primjene (281). Istraživanja sa lipozomima su pokazala statistički značajnu inhibiciju rasta tumora ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolne grupe kada su i.t. primjenjene doze ^{131}I od 111 MBq i 74 MBq. Takođe, istraživanja su pokazala da antitumorski efekat ^{131}I -obilježenog kompleksa se smanjuje sa vremenom zbog opadanja aktivnosti ^{131}I i smatrali su da bi se bolji rezultati mogli dobiti primjenom radionuklida veće energije beta čestica (282,283).

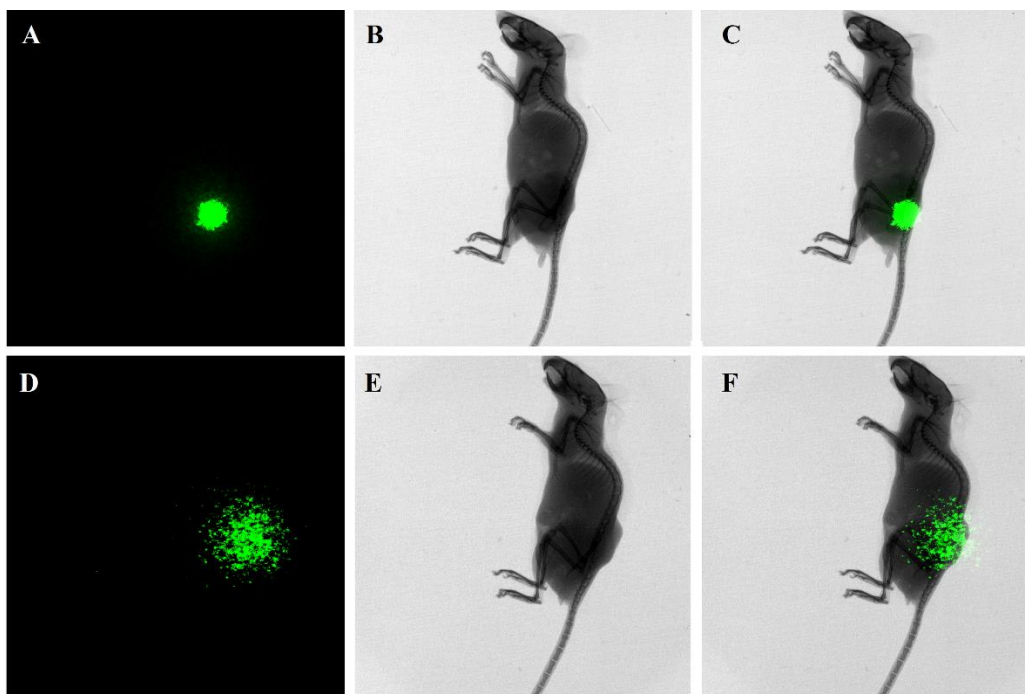
Da bi se ispitala toksičnost primjenjenih ^{131}I -CC49-SMNČ, tjelesna masa svih miševa je mjerena svaki drugi dan. Dobijeni rezultati pokazuju da je prosječan gubitak mase bio manji od 4%, što je dosta manje od 20% koji se uzima kao prihvatljiv kriterijum sistemske toksičnosti, što znači da ove čestice ne ispoljavaju toksične efekte (grafikon 11).



Grafikon 11. Tjelesne mase miševa u toku 14 dana ($\bar{x} \pm SD$).

Prikazani rezultati su u skladu sa literaturnim podacima za SMNČ, jer je u prethodnim toksikološkim istraživanjima ustanovljeno da doza SMNČ na bazi Fe_3O_4 od 3150 mg/kg nakon i.t. primjene u miša ne dovodi do neželjenih reakcija a LD_{50} je 4410 mg/kg (285). Pošto je prosječna masa miševa 25 g, maksimalna doza SMNČ koja se može primjeniti iznosi 78 mg. Ova masa je mnogo puta veća od primjenjene mase SMNČ u ovom ispitivanju (0,5 mg/mišu). Šta više, u kliničkoj upotrebi SMNČ za terapiju glioblastoma, koncentracija SMNČ koja se injektuje u tumorsku leziju je 6 mg SMNČ/mL lezije tj. $750 \mu\text{g}/125 \text{ cm}^3$ (149). Kako je u našim ispitivanjima primjenjena mnogo manja masa SMNČ po mišu i po zapremini tumora ($500 \mu\text{g}/125 \text{ cm}^3$), nisu određivani hematološki i jetreni parametri (PV, aPTV, TV, ALT, AST) kao parametri toksičnosti primjenjenog konjugata (285). Netoksičnost ^{131}I obilježenih SMNČ je pokazala i prethodno navedena studija *Chena* i saradnika (179).

Da bi ispitali *in vivo* stabilnost ^{131}I -CC49-SMNČ u tumorima, četvrtog dana od injektovanja radioobilježenih čestica, po jedan miš iz RT i MHT+RT grupe su uvedeni u anesteziju intraperitonealnom injekcijom ketamina (90 mg/kg)/ksilazina (10 mg/kg) i snimljeni BRUKER® In-Vivo Xtreme II uređajem (slika 36).



Slika 36. Snimci NOD-SCID miševa iz RT i MHT+RT grupa, snimljeni BRUKER® In-Vivo Xtreme II uređajem 4. dana nakon i.t. aplikacije ^{131}I -CC49-SMNČ. **Gornji red:** RT grupa. **Donji red:** MHT+RT grupa. A i D. Snimak raspodjele radioaktivnosti u mišu. B i E. Rendgen snimak miša. C i F. Preklapanje rendgen snimka i snimka raspodjele radioaktivnosti.

Na snimku se može vidjeti da je sva injektovana radioaktivnost i dalje prisutna na mestu injektiranja tj. u tumoru, što je i potvrđeno i mjerenjem radioaktivnosti organa od interesa i tumora nakon žrtvovanja ovih miševa cervikalnom dislokacijom. Izmerena radioaktivnost u tumoru je bila ≥ 95 % ID/organu, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima retencije konjugata nakon 96 h ($95,70 \pm 1,02$ % ID/organu). Ovi tumori zajedno sa tumorima od po jednog miša iz preostalih grupa su korišćeni u patohistološkim ispitivanjima, kako bi se ispitale promjene na ćelijskom nivou.

5.8. Patohistološka analiza

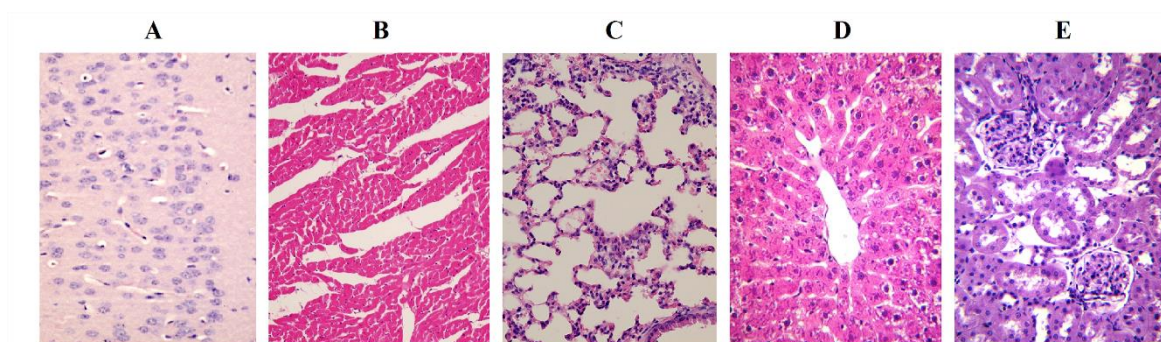
Adenokarcinom kolona ili rektuma u humanoj populaciji čini 95% svih kolorektalnih karcinoma koji su porijekla žljezdanog epitela sluzokože. Javlja se uglavnom posle 60. godine života, u manje od 20% slučajeva nastaje prije 50-te godine, a samo 2–8% prije 40-te godine života. Prema izvještaju Instituta za zaštitu zdravlja Srbije „Dr Milan Jovanović Batut”, u Srbiji je incidencija kolorektalnog karcinoma, kao i stopa smrtnosti, u stalnom porastu i trenutno zauzima drugo mjesto kod muškaraca i treće mjesto kod žena (286,287).

Ksenograft modeli miševa usko oponašaju humane tumore pomažući u razvoju inovativnih terapija za karcinom. LS174T ćelijska linija je izolovana iz kolorektalnog adenokarcinoma stadijuma B po *Dukesu* od 58-godišnje pacijentice kavkaske nacionalnosti. LS174T ćelije su pozitivne na ekspresiju različitih onkogeni, uključujući c-mic, N-mic, H-ras, N-ras, Mib i fos i zbog toga su često korišćene za biomedicinska istraživanja koja se odnose na karcinom debelog creva. Takođe, ćelijska linija LS174T posjeduje obilje mikrovila i vakuola i proizvodi karcinoembrionski antigen (CEA), interleukin 10 (IL-10), interleukin 6 (IL-6) i mucin. LS174T ćelije se koriste za *in vitro* i ksenograft proučavanja ekspresije mucina u kolorektalnom karcinomu, jer je poznato da mucinozni adenokarcinom kolona predstavlja uznapredovali stadijum bolesti i lošiju prognozu za pacijenta (288,289).

Ekstracelularni antigen TAG-72 je izražen na ~85% humanih adenokarcinoma kao što su kanceri kolona, ovarijuma, pankreasa, dojki, prostate i nemikrocelularnog karcinoma pluća (184–186,188,189,290). U miševima ksenograftima humanog adenokarcinoma kolona koji su imali eksprimiran TAG-72, anti-TAG 72 monoklonska antitijela (CC11, CC30, CC46, CC49, CC83 i CC92) su se nakupljala 18 puta više u LS174T tumorima nego u normalnom tkivu

(182). Zou i saradnici su koristili LS174T ćelije kako bi razvili novu tehniku scintigrafije tumora pomoću ^{124}I -obilježenog humaniziranog CC49 monoklonskog antitijela izbrisanog CH2 domena (HuCC49deltaCH2). Ispitivanje je prikazalo specifično nakupljanje HuCC49deltaCH2 unutar tumora i zaključeno je da ova anti-TAG 72 CC49 monoklonska antitijela ukoliko su obilježena nekim dijagnostičkim radionuklidom, mogu imati potencijal za buduće kliničke studije i za pre-, intra- i postoperativno PET snimanje pacijenata (291).

U cilju boljeg razumjevanja efekata primjenjene kombinovane terapije u ovoj studiji, posebna pažnja posvećena je patohistološkoj analizi organa od interesa, kao i tumorskog tkiva. U tu svrhu, nakon žrtvovanja životinja, organi su najpre makroskopski pregledani, posebno na prisustvo metastaza vidljivih golim okom. One nisu notirane ni makroskopskom pretragom, ni na naknadno pregledanim patohistološkim preparatima bojenim HE standardnom metodom. Naime, pregledani organi: mozak, srce, pluća, jetra i bubrezi su pokazali uobičajene morfološke karakteristike bez prisustva mikroskopskih metastatskih depozita porijekla ispitivanog tumora (slika 37).



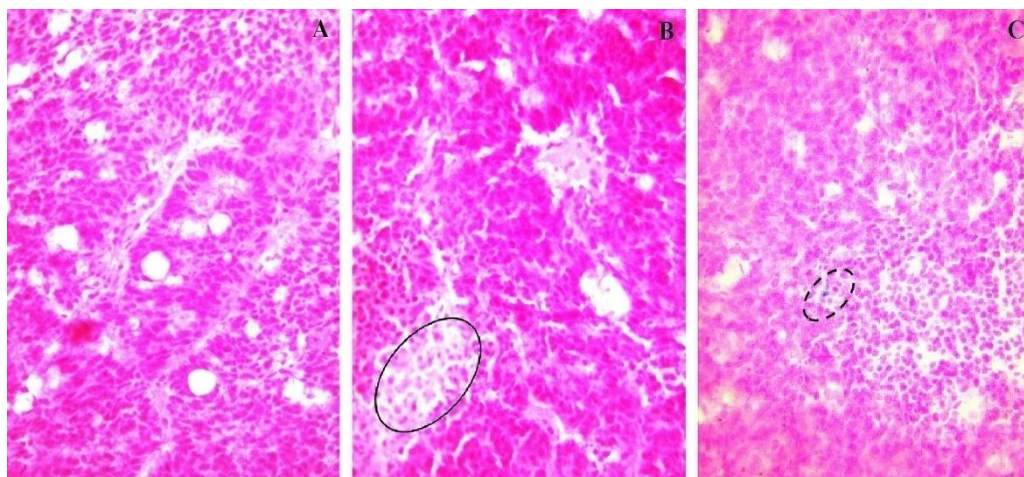
Slika 37. Fotomikrografi organa od interesa iz RT i MHT+RT grupe, H/E bojenje (400x). A. Mozak. B. Srce. C. Pluća. D. Jetra. E. Bubrezi.

Takahashi i saradnici su koristili istu ćelijsku liniju u ekperimentalnom modelu i nisu bili našli metastaze (61), dok Zigmund i saradnici su koristeći sličnu tehniku, uspjeli da razviju tumor u 95% životinja, bez metastaza (292). Bhullar i saradnici su našli metastaze u regionalnim limfnim žlijezdama i u udaljenim organima u trećini ekperimentalnih miševa (293). Teoretski, metastaze u limfnim nodusima se u humanoju populaciji nalaze samo kod solidnih tumora koji su veći od 4 ml ili oko 1 cm^3 (294). Takođe, tumor $\geq 5\text{ cm}$ predstavlja nezavisan prognostički faktor za lokalni metastatski potencijal u humanoju kolorektalnom karcinomu (295). Shodno navedenim podacima, a uzimajući u obzir animalni model, nameće

se zaključak da veličina tumora nije bila dovoljna za metastatski potencijal, odnosno da trajanje eksperimenta od 22-24 dana, nije vremenski dovoljno da tumor dostigne zapreminu od koje zavisi metastaziranje kako u regionalne limfne čvorove, tako i hematogenim putem u udaljene organe, kao što su jetra, pluća i mozak, koji su ciljni organi za metastaze ispitivanog tumora. Čelijska linija LS174T ima slab metastatski potencijal u eksperimentalnom modelu, jer mnoge studije pokušavaju da izoluju potencijalno visoko metastatsku LS174T liniju *in vivo* selekcionim modelom (296). Novija istraživanja stavljaju akcenat na okruženje u kome se ksenograft nalazi, jer čelijska kultura nije adekvatan model interakcije primarnih tumorskih ćelija sa tkivom iz okruženja. Proces kolonizacije organa metastatskim ćelijama karcinoma (hipoteza „seme i zemlja“, od engleski „*seed and soil hypothesis*“) i aktiviranje adaptivnog i urođenog imunog sistema tokom tumorogeneze, čini se da posjeduju presudnu ulogu u metastatskom potencijalu (297–299).

Takođe, patohistološkim ispitivanjem nisu uočene nikakve patološke promjene, što potvrđuje netoksičnost primjenjenog konjugata $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$.

LS174T tumorski ksenograft je kolorektalni adenokarcinom stadijuma B po *Dukes-u* koji je umjereno do slabo diferentovan tumor. Građen je pretežno od malignih kolorektalnih tumorskih ćelija koje formiraju trake, ređe se nalaze pojedinačne ćelije, kao i žljezdane tumorske strukture sa heterogenom distribucijom krvnih sudova, kao što se vidi na uzorcima kontrolnih tumorskih tkiva (Kontrola 1 i 2) (slika 38). Na uzorcima tumora Kontrole 2 može se vidjeti diskretna nekroza kao i prisustvo APTES-SMNČ.

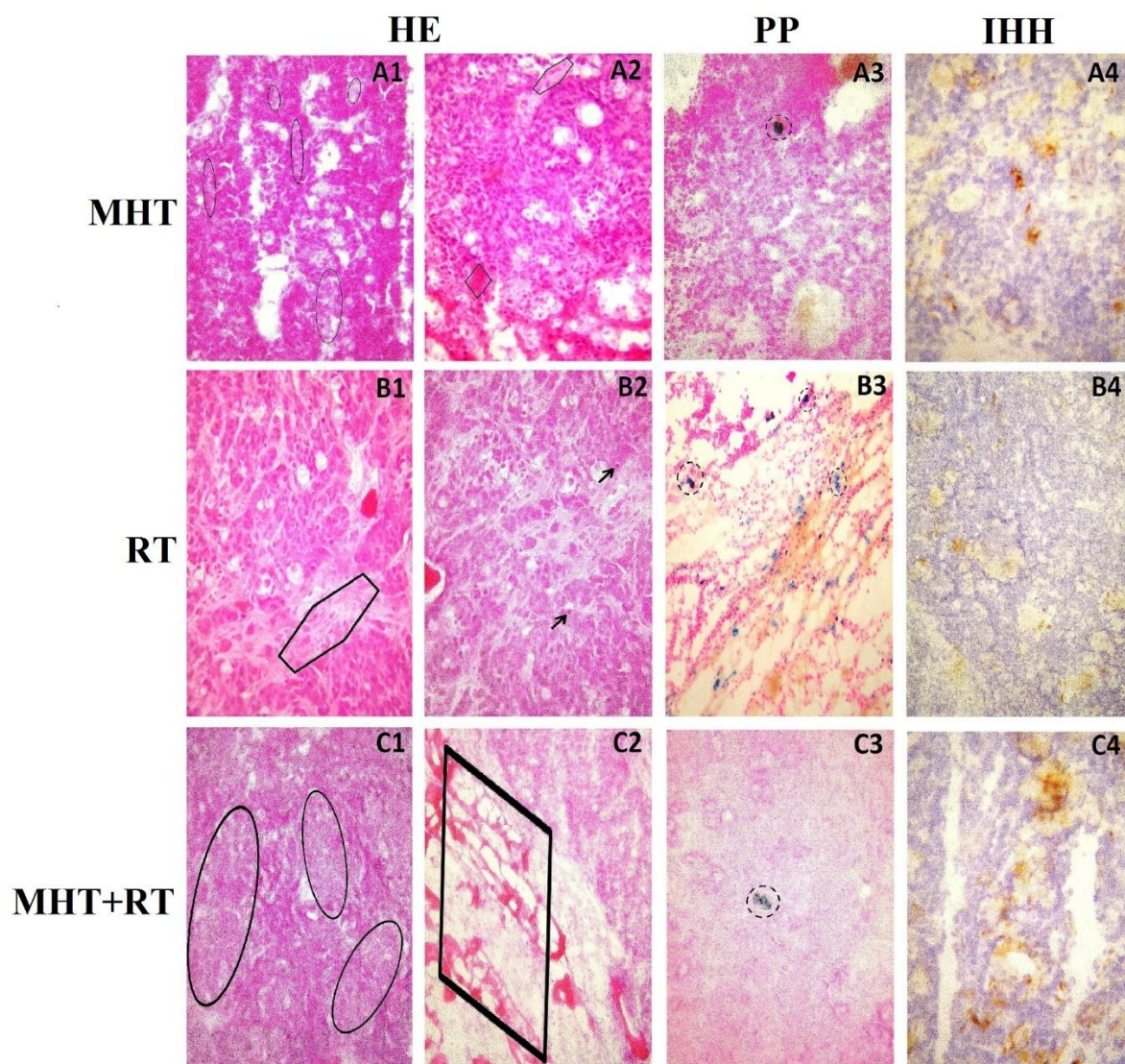


Slika 38. Fotomikrografi LS174T tumora kontrolnih grupa, HE bojenje (400x).
 A. Blagi do slabo diferentovani tumor u Kontrolnoj grupi 1. B. Diskretna nekroza u Kontrolnoj grupi 2 (označena krugom). C. Magnetne nanočestice (označena isprekidanom linijom) u Kontrolnoj grupi 2 (PP bojenje, 200x).

Na uzorcima LS174T tumora tretiranih grupa uočena je umjerena nekroza kod životinja koje su tretirane samo hipertermijom (slika 39 A1) sa rupturama krvnih sudova, hemoragijom i diskretnom fibrozom (slika 39 A2). Umjerena fibroza (slika 39 B1) i apoptična tijela (slika 39 B2), kao i hemoragija, su nađene u tumorima životinja, koje su tretirane radioterapijom (RT). Obilna nekroza (slika 39 C1) i hemoragija (slika 39 C2) su nađene u tumorima životinja na koje je primjenjena dualna terapija. Stoga, najveće oštećenje tumora i najveći stepen tumorske nekroze je postignut u MHT+RT grupi, što protvrđuje veliki terapijski potencijal primjenjenog konjugata $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$.

Mnoga istraživanja, koja su koristila patohistološku analizu tumorskih tkiva, su došla do sličnih rezultata tj. najveći stepen oštećenja tumora i apoptoze tumorskih ćelija bio je u tumorima gdje je primjenjena kombinacija hipertermije i nekog drugog oblika terapije (radioterapije, hemioterapije, fototermalne terapije) (281,300).

Bojenjem tumorskog tkiva sa pruskim plavim detektuju se SMNČ (plave mrlje na slici 39 A3, B3, C3), što je pokazatelj retencije $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ u tumorskom tkivu. Metoda bojenja tumorskog tkiva sa PP se pokazala kao veoma jednostavna i senzitivna metoda za dokazivanje prisustva SMNČ u tumorskom tkivu u većini drugih istraživanja sa SMNČ (228). Imunohistohemijsko bojenje je dokazalo prisustvo CC49 mAt u tumorima grupa u kojima je bio injektovan $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ (grupe RT i MHT+RT), kao i u tumorima grupe gdje su injektovane samo obložene SMNČ konjugovane sa neobilježenim CC49 mAt (grupa MHT) (slika 39 A4, B4, C4).



Slika 39. Fotomikrografi LS174T tumora tretiranih grupa (400x). **A1.** Umjerena nekroza (krugovi). **A2.** Hemoragija (paralelogram) i diskretna fibroza (heksagon). **A3.** Magnetne nanočestice (isprekidana linija). **A4.** CC49 mAt lociran u citoplazmi i na ćelijskoj membrani malignih ćelija (smeđa boja). **B1.** Obilna fibroza (heksagon). **B2.** Apoptična tijela (strelice). **B3.** Magnetne nanočestice (isprekidane linije). **B4.** CC49 mAt lociran u citoplazmi i na ćelijskoj membrani malignih ćelija (smeđa boja). **C1.** Obilna nekroza (krugovi). **C2.** Hemoragija (paralelogram). **C3.** Magnetne nanočestice (isprekidana linija). **C4.** CC49 mAt lociran u citoplazmi i na ćelijskoj membrani malignih ćelija (smeđa boja).

6. ZAKLJUČAK

- SMNČ na bazi Fe_3O_4 su sintetisane metodom koprecipitacije i poliol metodom sa prinosom od ~ 70 % i ~32%, redom, u cilju dobijanja SMNČ-a određenog oblika, morfologije i magnetnih osobina. Nanočestice dobijene poliol metodom su bile ujednačenih veličina, dobro dispergovane u vodi stvarajući stabilan vodeni ferrofluid bez aglomeracije, sa boljim magnetnim osobinama u odnosu na nanočestice sintetisane metodom koprecipitacije ($M_s=80 \text{ emu/g}^{-1}$ u odnosu na 70 emu/g^{-1}).
- Oblaganjem SMNČ APTES-om i DMSA dobijene su biokompatibilne i stabilne suspenzije – ferrofluidi sa velikim brojem funkcionalnih grupa ($-\text{NH}_2$ i $-\text{COOH}$) na površini. FT-IR spektroskopija je potvrdila oblaganje tj. funkcionalizaciju površine SMNČ APTES-om i DMSA.
- Primjenom magnetnog polja jačine 15.9 kA/m i frekvencije od 252 kHz određena je SPA vrijednost obloženih SMNČ, kao mjerilo sposobnosti zagrijavanja. APTES-SMNČ imaju bolju SPA vrijednost (123 W/g) u odnosu na DMSA-SMNČ (110 W/g) što je razlog zašto su se samo one koristile u nastavku istraživanja. Bez obzira na upotrijebljenu veću frekvenciju magnetnog polja u odnosu na kliničku upotrebu (100 kHz), SPA vrijednost APTES-SMNČ je uporediva sa komercijalnim SMNČ.
- Optimizacijom uslova obilježavanja HSA, BSA i nespecifičnog antitijela Hbe7 mAt radionuklidom ^{131}I , utvrđeno je da korišćenjem hloramina-T u 3 puta većoj masi u odnosu na protein/antitijelo i Sephadex[®]-a G-25 kao metode prečišćavanja obilježenog proteina/antitijela dobija se prinos radioobilježavanja ~60% sa visokim vrijednostima radiohemijske čistoće ($> 98 \%$).
- Korišćenjem Bradfordovog testa i indirektna ELISA metode nakon optimizovanog obilježavanja CC49 mAt i prečišćavanja korišćenjem Sephadex[®]-a G-25, utvrđeno je da je ukupno obilježeno $311,5 \mu\text{g}$ od $700 \mu\text{g}$ CC49 mAt u rastvoru R1 ($16,058 \text{ MBq} / 1140 \mu\text{L}$) i $480 \mu\text{g}$ od $860 \mu\text{g}$ CC49 mAt u rastvoru R2 ($222 \text{ MBq} / 1670 \mu\text{L}$) i da je ^{131}I -CC49 mAt zadržao ~25% svoje imunoreaktivnosti.
- Prinos konjugacije ^{131}I -CC49 mAt-a sa APTES-SMNČ karbodiimidnom metodom je iznosio ~86% za rastvor R1 i 88% za rastvor R2. SDS-PAGE metoda je dokazala vezu između karboksilnih grupa ^{131}I -CC49 mAt-a sa amino grupama na površini APTES-SMNČ. *In vitro* stabilnost ^{131}I -CC49-SMNČ ispitana je u fiziološkom rastvoru i humanom

serumu na sobnoj temperaturi i do 8. dana od obilježavanja radiohemijska čistoća bila je > 90%.

- Ispitivanje biodistribucije nakon i.v. injektovanja $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ (370 kBq/0,5 mg $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ /0,05 mL po mišu) NOD-SCID miševima sa indukovanim tumorima je pokazalo da se ove obilježene čestice veoma brzo uklanjaju iz krvi i nakupljaju u jetri ($56.39 \pm 3.15\%$ ID/organu nakon 15 minuta) dok je nakupljanje u tumoru < 0,56% ID/organu nakon 24 h. Razlog tome je adsorbovanje serumskih proteina (stvaranje proteinske krune) i opsonina što dovodi do prepoznavanja i fagocitoze $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ od strane Kupferovih ćelija.
- Ispitivanje retencije nakon i.t. aplikacije $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ (370 kBq/0,5 mg $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ /0,05 mL po mišu) je pokazalo da se konjugacijom $^{131}\text{I-CC49}$ mAt sa APTES-SMNČ, stvara radiofarmaceutik, koji se svojom veličinom (>100 nm) i interakcijom CC49 mAt sa TAG-72 antigenima na adenokarcinomu kolona, dovoljno dugo zadržava u tumorskom tkivu da magnetne nanočestice i radionuklid mogu da ispolje svoj terapijski potencijal. Nedostatak i.t. injektovanja predstavljaju invazivnost metode i nemogućnost pristupa duboko smještenim tumorima.
- Ispitivanje terapijskog efekta nakon i.t. primjene $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ (5,55 MBq/0,5 mg/0,05 mL) je pokazalo da su radionuklidna terapija (RT) i dualna terapija (MHT+RT) statistički značajno ($p < 0,01$) inhibisale rast, dok su statistički značajno manje mase tumora izmjerene samo u grupi MHT+RT u odnosu na obe kontrolne grupe.
- Određivanje inhibicije tumorske zapremine (TVIR) je pokazalo da je dualna terapija (MHT+RT) konjugata $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$ ispoljila najveću inhibiciju tumorskog rasta u odnosu na pojedinačne MHT i RT.
- Poređenjem sa rezultatima drugih istraživanja, ^{131}I je zbog niske energije zračenja pogodan radionuklid za terapiju tumora manje zapremine (do 80 cm³), dok su za tumore sa većom zapreminom neophodni radionuklidi većih energija zračenja (npr. ^{90}Y , ^{186}Re , ^{225}Ac i dr.).
- Manja odstupanja u tjelesnoj masi od 20% kod mjerenih miševa ukazuje na bezbjedan toksikološki profil $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$, što je i potvrđeno mikroskopskim pregledom organa od interesa (srce, pluća, jetra, mozak, bubrezi).
- Patohistološka ispitivanja tumora su pokazala da je najveće oštećenje tumora i najveći stepen tumorske nekroze postignut u MHT+RT grupi, što protvđuje veliki terapijski potencijal primjenjenog konjugata $^{131}\text{I-CC49-SMNČ}$.

7. LITERATURA

1. Han HJ, Ekweremadu C, Patel N. Advanced drug delivery system with nanomaterials for personalised medicine to treat breast cancer. Vol. 52, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Editions de Sante; 2019. p. 1051–60.
2. Goldsmith SJ. Targeted Radionuclide Therapy: A Historical and Personal Review. *Semin Nucl Med*. 2020;50(1):87–97.
3. Malcolm J, Falzone N, Lee BQ, Vallis KA. Targeted radionuclide therapy: New advances for improvement of patient management and response. *Cancers (Basel)*. 2019;11(2).
4. Fleuren EDG, Versleijen-jonkers YMH, Heskamp S, Herpen CML Van, Oyen WJG, Graaf WTA Van Der, et al. ScienceDirect Theranostic applications of antibodies in oncology. *Mol Oncol*. 2014;8(4):799–812.
5. Kawashima H. Radioimmunotherapy: A Specific Treatment Protocol for Cancer by Cytotoxic Radioisotopes Conjugated to Antibodies. *Sci World J*. 2014;2014:1–11.
6. Wu M, Huang S. Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis, drug delivery and treatment (Review). *Mol Clin Oncol*. 2017;7(5):738–46.
7. Spirou S, Basini M, Lascialfari A, Sangregorio C, Innocenti C. Magnetic Hyperthermia and Radiation Therapy: Radiobiological Principles and Current Practice †. *Nanomaterials*. 2018;8(6):401.
8. Raffa V, Cristina Riggio MP, Calatayud C, Hoskins J, Pinkernelle B, Goya TE, et al. Poly-L-lysine-coated magnetic nanoparticles as intracellular actuators for neural guidance. *Int J Nanomedicine*. 2012 Jun;7:3155.
9. Khmara I, Koneracka M, Kubovcikova M, Zavisova V, Antal I, Csach K, et al. Preparation of poly-L-lysine functionalized magnetic nanoparticles and their influence on viability of cancer cells. *J Magn Magn Mater*. 2017;427(November):114–21.
10. Zhang S, Bian Z, Gu C, Zhang Y, He S, Gu N, et al. Preparation of anti-human cardiac troponin I immunomagnetic nanoparticles and biological activity assays. Vol. 55, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007. p. 143–8.
11. Liu Y, Li Y, Li XM, He T. Kinetics of (3-aminopropyl)triethoxysilane (aPTES) silanization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Langmuir*. 2013;29(49):15275–82.
12. Yu MM, Wang RF, Yan P, Zhang CL, Liu M, Cui YG. Design, synthesis and iodination of an Arg-Arg-Leu peptide for potential use as an imaging agent for human prostate carcinoma. *J Label Compd Radiopharm*. 2008;51(11):374–8.
13. Tinkle S, Mcneil SE, Mühlebach S, Bawa R, Borchard G, Barenholz YC, et al. Nanomedicines: Addressing the scientific and regulatory gap. *Ann N Y Acad Sci*. 2014 Apr;1313(1):35–56.
14. Pita R, Ehmann F, Papaluca M. Nanomedicines in the EU-Regulatory Overview. *AAPS J*. 2016 Nov 1;18(6):1576–82.
15. Hafner A, Lovrić J, Lakoš GP, Pepić I. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *Int J Nanomedicine*. 2014 Feb 19;9(1):1005–23.
16. Choi YH, Han HK. Nanomedicines: current status and future perspectives in aspect of drug delivery and pharmacokinetics. Vol. 48, *Journal of Pharmaceutical Investigation*. Springer Netherlands; 2018. p. 43–60.
17. Weissig V, Pettinger TK, Murdock N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. Vol. 9, *International journal of nanomedicine*. *Int J Nanomedicine*; 2014. p. 4357–73.
18. Ersahin D, Doddamane I, Cheng D. Targeted radionuclide therapy. *Cancers (Basel)*. 2011;3(4):3838–55.
19. Zhang L, Chen H, Wang L, Liu T, Yeh J, Lu G, et al. Delivery of therapeutic radioisotopes using nanoparticle platforms: Potential benefit in systemic radiation therapy. *Nanotechnol Sci Appl*. 2010;3(1):159–70.
20. Gudkov S V., Shilyagina NY, Vodeneev VA, Zvyagin A V., Nanoparticles M, Kawashima H, et al. Update on radionuclide therapy in oncology. *Biomark Cancer*. 2016;14(1):BIC.S31804.
21. Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. Vol. 8, *Nature*

- Reviews Cancer. 2008. p. 967–75.
22. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: Significance and impact on clinical outcome. Vol. 26, Cancer and Metastasis Reviews. 2007. p. 225–39.
 23. Cabon L, Galán-Malo P, Bouharrou A, Delavallée L, Brunelle-Navas MN, Lorenzo HK, et al. BID regulates AIF-mediated caspase-independent necroptosis by promoting BAX activation. *Cell Death Differ.* 2012 Feb;19(2):245–56.
 24. Nitipir C, Niculae D, Orlov C, Barbu MA, Popescu B, Popa AM, et al. Update on radionuclide therapy in oncology. *Oncol Lett.* 2017;14(6):7011–5.
 25. Harris TJ, Kalen JD, Hall J. Report of Meeting Held to Discuss Existing and Future Radionuclide Requirements for the National Cancer Institute. 2008.
 26. Sabongi JG, Gonçalves MCP, Alves CDC, Alves J, Scapulatempo-Neto C, Moriguchi SM. Lutetium 177-DOTA-TATE therapy for esthesioneuroblastoma: A case report. *Exp Ther Med.* 2016 Nov 1;12(5):3078–82.
 27. Howell RW. The latest meeting, the 6th International Symposium on Physical, Molecular, Cellular, and Medical Aspects of Auger Processes, was held 5-6. *Int J Radiat Biol.* 2008;84:959–75.
 28. Claesson AK, Stenerlöv B, Jacobsson L, Elmroth K. Relative Biological Effectiveness of the α -Particle Emitter 211 At for Double-Strand Break Induction in Human Fibroblasts. *Radiat Res.* 2007 Mar 1;167(3):312–8.
 29. Sautter-Bihl ML, Herbold G, Bihl H. Minimal residual disease: a target for radioimmunotherapy with 131I-labeled monoclonal antibodies? Some dosimetric considerations. *Recent Results Cancer Res.* 1996;141:67–75.
 30. Held KD. Basic Clinical Radiobiology. *Int J Radiat Biol.* 2010;86(11):996–996.
 31. Brown JM, Giaccia AJ. The unique physiology of solid tumors: Opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res.* 1998 Apr 1;58(7):1408–16.
 32. Horsman MR, Wouters BG, Joiner MC, Overgaard J. The oxygen effect and fractionated radiotherapy. In: Joiner M, van der Kogel A, editors. *Basic Clinical Radiobiology*. 4th ed. London: Hodder Arnold; 2009. p. 207–16.
 33. Wouters BG, Skarsgard LD. Low-dose radiation sensitivity and induced radioresistance to cell killing in HT-29 cells is distinct from the “adaptive response” and cannot be explained by a subpopulation of sensitive cells. *Radiat Res.* 1997 Nov;148(5):435–42.
 34. Trédan O, Galmarini CM, Patel K, Tannock IF. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Oct 3;99(19):1441–54.
 35. Knapp FF (Russ), Dash A. *Radiopharmaceuticals for Therapy*. 1st ed. Mumbai: Springer India; 2016. 3–21 p.
 36. Willowson KP. Production of radionuclides for clinical nuclear medicine. Vol. 40, *European Journal of Physics*. Institute of Physics Publishing; 2019. p. 043001.
 37. Reichert JM. Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs.* 2012 May;4(3):413–5.
 38. Stojić-Vukanić Z, Arsenović-Ranin N, Milenković M, Bufan B. Razvoj monoklonskih antitela za terapijsku primenu: Od mišjih do humanih. *Arh Farm (Belgr).* 2012;62(6):562–75.
 39. Macklis R, Burdick MJ. Update on the rational use of tositumomab and iodine-131 tositumomab radioimmunotherapy for the treatment of non-Hodgkin’s lymphoma. *Onco Targets Ther.* 2009 Aug;2:229.
 40. Read ED, Eu P, Little PJ, Piva TJ. The status of radioimmunotherapy in CD20+ non-Hodgkin’s lymphoma. Vol. 10, *Targeted Oncology*. Springer-Verlag France; 2015. p. 15–26.
 41. Riley MB, Byar K. The rationale for and background of radioimmunotherapy: An emerging therapy for B-cell non-hodgkin’s lymphoma. *Semin Oncol Nurs.* 2004 Feb 1;20(SUPPL. 1):1–7.
 42. Kowalsky RJ, Falen SW. *Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine*. Third edit. Landis NT, editor. Washington: American Pharmacist Association; 2011.
 43. Turner JH, Martindale AA, Boucek J, Claringbold PG, Leahy MF. 131I-anti CD20 radioimmunotherapy of relapsed or refractory non-Hodgkins lymphoma: A phase II clinical trial of a nonmyeloablative dose regimen of chimeric rituximab radiolabeled in a hospital. *Cancer Biother Radiopharm.* 2003;18(4):513–24.
 44. Leahy MF, Turner JH. Radioimmunotherapy of relapsed indolent non-Hodgkin lymphoma with

- 131I-rituximab in routine clinical practice: 10-year single-institution experience of 142 consecutive patients. *Blood*. 2011 Jan 6;117(1):45–52.
45. Zaheer J, Kim H, Lee YJ, Kim JS, Lim SM, Sachpekidis C, et al. 90 Y-ibritumomab tiuxetan: A nearly forgotten opportunity. *Cancer Biother Radiopharm*. 2019;18(4):7597–609.
 46. Sachpekidis C, Jackson DB, Soldatos TG. Radioimmunotherapy in non-hodgkin's lymphoma: Retrospective adverse event profiling of zevalin and bexxar. *Pharmaceuticals*. 2019 Dec 1;12(4).
 47. Zukotynski K, Jadvar H, Capala J, Fahey F. Targeted Radionuclide Therapy: Practical Applications and Future Prospects: Supplementary Issue: Biomarkers and their Essential Role in the Development of Personalised Therapies (A). *Biomark Cancer*. 2016;8s2(1):BIC.S31804.
 48. Picarde Bsn L. Nursing considerations in Selective Internal Radiation Therapy.
 49. Boucher E, Corbinais S, Rolland Y, Bourguet P, Guyader D, Boudjema K, et al. Adjuvant Intra-arterial Injection of Iodine-131-Labeled Lipiodol after Resection of Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*. 2003 Nov;38(5):1237–41.
 50. Murthy R, Kamat P, Nunez R, Madoff DC, Gupta S, Salem R, et al. Yttrium-90 Microsphere Radioembolotherapy of Hepatic Metastatic Neuroendocrine Carcinomas after Hepatic Arterial Embolization. *J Vasc Interv Radiol*. 2008 Jan;19(1):145–51.
 51. Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia. Vol. 43, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2002. p. 33–56.
 52. van der Zee J. Heating the patient: A promising approach? *Ann Oncol*. 2002;13(8):1173–84.
 53. Page TE, Capps E, Rouse WH., Post LA, Wermington EH. *Hippocrates Vol iv, Heracleitus on the Universe*. London: William Heinemann LTD; 1959. Volume 150.
 54. Breasted JH. *The Edwin Smith Surgical Papyrus, Volume 1: Hieroglyphic Transliteration, Translation, and Commentary* . Vol. 3. Chicago: The Univeristy of Chicago Press; 1930.
 55. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. *Clin Orthop Relat Res*. 1991;(262):3–11.
 56. Januszewski A, Stebbing J. Hyperthermia in cancer: Is it coming of age?. Vol. 15, *The Lancet Oncology*. Lancet Publishing Group; 2014. p. 565–6.
 57. Lepock JR. Cellular effects of hyperthermia: Relevance to the minimum dose for thermal damage. In: *International Journal of Hyperthermia*. 2003. p. 252–66.
 58. Coss RA, Linnemans WAM. The effects of hyperthermia on the cytoskeleton: A review. *Int J Hyperth*. 1996;12(2):173–96.
 59. Huang SH, Yang KJ, Wu JC, Chang KJ, Wang SM. Effects of hyperthermia on the cytoskeleton and focal adhesion proteins in a human thyroid carcinoma cell line. *J Cell Biochem*. 1999 Nov 1;75(2):327–37.
 60. Raaphorst GP, Ng CE, Yang DP. Thermal radiosensitization and repair inhibition in human melanoma cells: A comparison of survival and DNA double strand breaks. *Int J Hyperth*. 1999 Jan;15(1):17–27.
 61. Takahashi T, Morotomi M, Nomoto K. A novel mouse model of rectal cancer established by orthotopic implantation of colon cancer cells. *Cancer Sci*. 2004 Jun;95(6):514–9.
 62. Oei AL, Vriend LEM, Crezee J, Franken NAP, Krawczyk PM. Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: One treatment to inhibit them all. *Radiat Oncol*. 2015 Aug 7;10(1):165.
 63. Ruifrok AC, Kanon B, Konings AW. Heat-induced K⁺ loss, trypan blue uptake, and cell lysis in different cell lines: effect of serum. *Radiat Res*. 1987 Feb;109(2):303–9.
 64. Bates DA, Mackillop WJ. The effect of hyperthermia on the sodium-potassium pump in Chinese hamster ovary cells. *Radiat Res*. 1985 Sep;103(3):441–51.
 65. Dieing A, Ahlers O, Hildebrandt B, Kerner T, Tamm I, Possinger K, et al. The effect of induced hyperthermia on the immune system. Vol. 162, *Progress in Brain Research*. 2007. p. 137–52.
 66. Evans SS, Repasky EA, Fisher DT. Fever and the thermal regulation of immunity: The immune system feels the heat. Vol. 15, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 335–49.
 67. Yagawa Y, Tanigawa K, Kobayashi Y, Yamamoto M. Cancer immunity and therapy using hyperthermia with immunotherapy, radiotherapy, chemotherapy, and surgery. *J Cancer Metastasis Treat*. 2017 Oct 31;3(10):218.
 68. Lüdemann L, Sreenivasa G, Amthauer H, Michel R, Gellermann J, Wust P. Use of H215O-PET

- for investigating perfusion changes in pelvic tumors due to regional hyperthermia. *Int J Hypertherm*. 2009;25(4):299–308.
69. Page RL, Thrall DE, Dewhirst MW, Meyer RE. Whole-Body Hyperthermia: Rationale and Potential Use for Cancer Treatment. Vol. 1, *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 1987. p. 110–20.
 70. Griffin RJ, Corry PM. Commentary on classic paper in hyperthermic oncology “Tumour oxygenation is increased by hyperthermia at mild temperatures” by CW Song et al., 1996. Vol. 25, *International Journal of Hyperthermia*. 2009. p. 96–8.
 71. Moon EJ, Sonveaux P, Porporato PE, Danhier P, Gallez B, Batinic-Haberle I, et al. NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) via the ERK pathway after hyperthermia treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 23;107(47):20477–82.
 72. Roizin-Towle L, Pirro JP. The response of human and rodent cells to hyperthermia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1991 Apr;20(4):751–6.
 73. De Haas-Kock DFM, Buijssen J, Pijls-Johannesma M, Lutgens L, Lammering G, Van Mastrigt GAPG, et al. Concomitant hyperthermia and radiation therapy for treating locally advanced rectal cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2009. p. CD006269.
 74. Lutgens L, van der Zee J, Pijls-Johannesma M, De Haas-Kock DF, Buijssen J, van Mastrigt GA, et al. Combined use of hyperthermia and radiation therapy for treating locally advanced cervix carcinoma. Vol. 2010, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2010.
 75. Dutz S, Hergt R. Magnetic particle hyperthermia - A promising tumour therapy? *Nanotechnology*. 2014;25(45):1–28.
 76. Costo RC. Synthesis and characterisation of ultrasmall iron oxide magnetic colloids for biomedical applications. *Universidad autonoma de Madrid*; 2010.
 77. Kumar CSSR, Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. Vol. 63, *Advanced Drug Delivery Reviews*. *Adv Drug Deliv Rev*; 2011. p. 789–808.
 78. Farzin L, Sheibani S, Moassesi ME, Shamsipur M. An overview of nanoscale radionuclides and radiolabeled nanomaterials commonly used for nuclear molecular imaging and therapeutic functions. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2019;107(1):251–85.
 79. Soares S, Sousa J, Pais A, Vitorino C. Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. *Front Chem*. 2018 Aug 20;6(AUG):360.
 80. Thorat ND, Patil RM, Khot VM, Salunkhe AB, Prasad AI, Barick KC, et al. Highly water-dispersible surface-functionalized LSMO nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia application. *New J Chem*. 2013 Sep 12;37(9):2733–42.
 81. Dadfar SM, Roemhild K, Drude NI, von Stillfried S, Knüchel R, Kiessling F, et al. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019;138:302–25.
 82. O’Handley RC. *Modern Magnetic Materials: Principles and Applications*. First. New York: Wiley and Sons; 200AD.
 83. Petrović D, Lukić S. *Eksperimentalna fizika kondenzovane materije*. Univerzitet u Novom Sadu. Novi Sad. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu; 2000.
 84. Kittel C. *Uvod u fiziku čvrstog stanja*. Beograd: Savremena administracija; 1970.
 85. Čitaković N. *Sinteza, morfologija, mikrostruktura i magnetne osobine nanočestičnog hematita*. Univerzitet u Beogradu; 2012.
 86. Caizer C, Hrianca I. Dynamic magnetization of γ -Fe₂O₃ nanoparticles isolated in an SiO₂ amorphous matrix. *Eur Phys J B*. 2003;31(3):391–400.
 87. Benz M. *Superparamagnetism: Theory and Applications-Discussion of Two Papers on Magnetic Nanoparticles*. 2012.
 88. Deatsch AE, Evans BA. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. Vol. 354, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. North-Holland; 2014. p. 163–72.
 89. Kolhatkar AG, Jamison AC, Litvinov D, Willson RC, Lee TR. Tuning the magnetic properties of nanoparticles. Vol. 14, *International Journal of Molecular Sciences*. *Int J Mol Sci*; 2013. p.

- 15977–6009.
90. Bedanta S, Kleemann W. Supermagnetism. *J Phys D Appl Phys*. 2009 Dec 5;42(1):013001.
 91. Lima E, Torres TE, Rossi LM, Rechenberg HR, Berquo TS, Ibarra A, et al. Size dependence of the magnetic relaxation and specific power absorption in iron oxide nanoparticles. *J Nanoparticle Res*. 2013 May 1;15(5):1–11.
 92. Goya G, Grazu V, Ibarra M. Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy. *Curr Nanosci*. 2008 Feb 1;4(1):1–16.
 93. Radović M, Calatayud MP, Goya GF, Ibarra MR, Antić B, Spasojević V, et al. Preparation and in vivo evaluation of multifunctional ⁹⁰Y-labeled magnetic nanoparticles designed for cancer therapy. *J Biomed Mater Res A*. 2015 Jan;103(1):126–34.
 94. Tartaj P, Del Puerto Morales M, Veintemillas-Verdaguer S, González-Carreño T, Carreño C, Serna CJ. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. Vol. 36, *J. Phys. D: Appl. Phys*. 2003.
 95. Waddington DEJ, Boele T, Maschmeyer R, Kuncic Z, Rosen MS. High-sensitivity in vivo contrast for ultra-low field magnetic resonance imaging using superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Sci Adv*. 2020 Jul 1;6(29):998–1015.
 96. Estelrich J, Escribano E, Queralt J, Busquets MA. Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. Vol. 16, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2015. p. 8070–101.
 97. Ding Y, Shen SZ, Sun H, Sun K, Liu F, Qi Y, et al. Design and construction of polymerized-chitosan coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and its application for hydrophobic drug delivery. *Mater Sci Eng C*. 2015 Mar 1;48:487–98.
 98. Blanco-Andujar C, Walter A, Cotin G, Bordeianu C, Mertz D, Felder-Flesch D, et al. Design of iron oxide-based nanoparticles for MRI and magnetic hyperthermia. Vol. 11, *Nanomedicine*. Future Medicine Ltd.; 2016. p. 1889–910.
 99. Mykhaylyk O, Sobisch T, Almstätter I, Sanchez-Antequera Y, Brandt S, Anton M, et al. Silica-iron oxide magnetic nanoparticles modified for gene delivery: A search for optimum and quantitative criteria. *Pharm Res*. 2012 May;29(5):1344–65.
 100. Okoli C, Fornara A, Qin J, Toprak MS, Dalhammar G, Muhammed M, et al. Characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles and its application in protein purification. *J Nanosci Nanotechnol*. 2011 Nov;11(11):10201–6.
 101. Wang X, Wei F, Liu A, Wang L, Wang JC, Ren L, et al. Cancer stem cell labeling using poly(l-lysine)-modified iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2012 May;33(14):3719–32.
 102. Laurent S, Mahmoudi M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Promises for diagnosis and treatment of cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2011;2(4):367–90.
 103. Mohammadi A, Barikani M, Barmar M. Synthesis and investigation of thermal and mechanical properties of in situ prepared biocompatible Fe₃O₄/polyurethane elastomer nanocomposites Preparation and Characterization of elastomer structures based on polyurethane-carboxylated polysaccharides with the ability to form hydrogels View project Tissue Engineering View project.;
 104. Lalatonne Y, Paris C, Serfaty JM, Weinmann P, Lecouvey M, Motte L. Bis-phosphonates-ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: A platform towards diagnosis and therapy. *Chem Commun*. 2008;(22):2553–5.
 105. Gupta AK, Wells S. Surface-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2004;3(1):66–73.
 106. Peng ZG, Hidajat K, Uddin MS. Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles. *J Colloid Interface Sci*. 2004 Mar 15;271(2):277–83.
 107. Rasaneh S, Dadras MR. The possibility of using magnetic nanoparticles to increase the therapeutic efficiency of Herceptin antibody. *Biomed Tech*. 2015;60(5):485–90.
 108. Corot C, Robert P, Idée JM, Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. Vol. 58, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006. p. 1471–504.
 109. Jain TK, Reddy MK, Morales MA, Leslie-Pelecky DL, Labhasetwar V. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Mol Pharm*. 2008 Mar;5(2):316–27.

110. Song LN, Gu N, Zhang Y. A moderate method for preparation DMSA coated Fe₃O₄ nanoparticles. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng.* 2017 Jan;164(1):012026.
111. Hughes DL, Afsar A, Harwood LM, Jiang T, Laventine DM, Shaw LJ, et al. Adsorption of Pb and Zn from binary metal solutions and in the presence of dissolved organic carbon by DTPA-functionalised, silica-coated magnetic nanoparticles. *Chemosphere.* 2017 Sep;183:519–27.
112. Tsoukalas C, Psimadas D, Kastis GA, Koutoulidis V, Harris AL, Paravatou-Petsotas M, et al. A Novel Metal-Based Imaging Probe for Targeted Dual-Modality SPECT/MR Imaging of Angiogenesis. *Front Chem.* 2018;6(June):1–15.
113. Overgaard J. The heat is (still) on - The past and future of hyperthermic radiation oncology. *Radiother Oncol.* 2013;109(2):185–7.
114. Franken NAP, Oei AL, Kok HP, Rodermond HM, Sminia P, Crezee J, et al. Cell survival and radiosensitisation: Modulation of the linear and quadratic parameters of the LQ model (Review). *Int J Oncol.* 2013 May;42(5):1501–15.
115. Kok HP, Crezee J, Franken NAP, Stalpers LJA, Barendsen GW, Bel A. Quantifying the combined effect of radiation therapy and hyperthermia in terms of equivalent dose distributions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014 Mar 1;88(3):739–45.
116. Jordan A, Scholz R, Wust P, Fa H, Felix R. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *J Magn Magn Mater.* 1999;201:413–9.
117. Rao W, Deng Z-S, Liu J. A Review of Hyperthermia Combined With Radiotherapy/Chemotherapy on Malignant Tumors. *Crit Rev Biomed Eng.* 2010;38(1):101–16.
118. Suit HD, Gerweck LE. Potential for hyperthermia and radiation therapy. *Cancer Res.* 1979 Jun;39(6 Pt 2):2290–8.
119. Gerweck LE, Nygaard TG, Burlett M. Response of Cells to Hyperthermia under Acute and Chronic Hypoxic. *Cancer Res.* 1979 Mar 1;39(3):966–72.
120. Nielsen OS. Effect of fractionated hyperthermia on hypoxic cells in vitro. *Int J Radiat Biol.* 1981;39(1):73–82.
121. Coss RA, Dewey WC, Bamburg JR. Effects of hyperthermia on dividing Chinese hamster ovary cells and on microtubules in vitro. *Cancer Res.* 1982 Mar;42(3):1059–71.
122. Kim SH, Kim JH, Hahn EW. The Enhanced Killing of Irradiated HeLa Cells in Synchronous Culture by Hyperthermia. *Radiat Res.* 1976 May;66(2):337.
123. Vidair CA, Dewey WC. Two distinct modes of hyperthermic cell death. *Radiat Res.* 1988 Oct;116(1):157–71.
124. Kim JH, Kim SH, Dutta P, Pinto J. Preferential killing of glucose-depleted hela cells by menadione and hyperthermia. *Int J Hyperth.* 1992;8(1):139–46.
125. Koutcher JA, Barnett D, Kornblith AB, Cowburn D, Brady TJ, Gerweck LE. Relationship of changes in pH and energy status to hypoxic cell fraction and hyperthermia sensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1990 Jun;18(6):1429–35.
126. Wahl ML, Bobyock SB, Leeper DB, Owen CS. Effects of 42 degrees C hyperthermia on intracellular pH in ovarian carcinoma cells during acute or chronic exposure to low extracellular pH. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997 Aug 1;39(1):205–12.
127. Liu FF, Diep K, Hill RP. The relationship between thermosensitivity and intracellular pH in cells deficient in Na⁺/H⁺ antiport function. *Radiother Oncol.* 1996 Jul 1;40(1):75–83.
128. I.P. Soares P, M.M. Ferreira I, A.G.B.N. Igreja R, M.M. Novo C, P.M.R. Borges J. Application of Hyperthermia for Cancer Treatment: Recent Patents Review. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2012;7(1):64–73.
129. Vaupel P, Horsman MR. Editorial: Tumour perfusion and associated physiology: Characterization and significance for hyperthermia. Vol. 26, *International Journal of Hyperthermia.* 2010. p. 209–10.
130. Vaupel PW, Kelleher DK. Pathophysiological and vascular characteristics of tumours and their importance for hyperthermia: Heterogeneity is the key issue. *Int J Hyperth.* 2010;26(3):211–23.
131. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review. *Cancer Res.* 1989 Dec 1;49(23):6449–65.
132. Song CW. Effect of local hyperthermia on blood flow and microenvironment: A review. *Cancer Res.* 1984;44(10 SUPPL.).

133. Datta NR, Puric E, Klingbiel D, Gomez S, Bodis S. Hyperthermia and Radiation Therapy in Locoregional Recurrent Breast Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2016 Apr 1;94(5):1073–87.
134. Datta NR, Rogers S, Ordóñez SG, Puric E, Bodis S. Hyperthermia and radiotherapy in the management of head and neck cancers: A systematic review and meta-analysis. *Int J Hyperth.* 2016 Jan 2;32(1):31–40.
135. Tittsworth WL, Murad GJA, Hoh BL, Rahman M. Fighting fire with fire: The revival of thermotherapy for gliomas. Vol. 34, *Anticancer Research. International Institute of Anticancer Research*; 2014. p. 565–74.
136. Chicheł A, Skowronek J, Kubaszewska M, Kanikowski M. Hyperthermia - Description of a method and a review of clinical applications. Vol. 12, *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy. Great Poland Cancer Center*; 2007. p. 267–75.
137. Emami B, Scott C, Perez CA, Asbell S, Swift P, Grigsby P, et al. Phase III study of interstitial thermoradiotherapy compared with interstitial radiotherapy alone in the treatment of recurrent or persistent human tumors. A prospectively controlled randomized study by the Radiation Therapy Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996 Mar 15;34(5):1097–104.
138. Hedayatnasab Z, Abnisa F, Daud WMAW. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Mater Des.* 2017 Jun 5;123:174–96.
139. MacFall JR, Soher BJ. From the RSNA refresher courses: MR imaging in hyperthermia. Vol. 27, *Radiographics.* 2007. p. 1809–18.
140. Johannsen M, Jordan A, Scholz R, Koch M, Lein M, Deger S, et al. Evaluation of magnetic fluid hyperthermia in a standard rat model of prostate cancer. *J Endourol.* 2004 Jun;18(5):495–500.
141. Johannsen M, Thiesen B, Jordan A, Taymoorian K, Gneveckow U, Waldöfner N, et al. Magnetic fluid hyperthermia (MFH) reduces prostate cancer growth in the orthotopic Dunning R3327 rat model. *Prostate.* 2005 Aug 1;64(3):283–92.
142. Johannsen M, Thiesen B, Gneveckow U, Taymoorian K, Waldöfner N, Scholz R, et al. Thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external radiation in an orthotopic rat model of prostate cancer. *Prostate.* 2006 Jan 1;66(1):97–104.
143. Johannsen M, Gneveckow U, Eckelt L, Feussner A, Waldöfner N, Scholz R, et al. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: Presentation of a new interstitial technique. *Int J Hyperth.* 2005 Nov;21(7):637–47.
144. Thiesen B, Jordan A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int J Hyperth.* 2008;24(6):467–74.
145. Wust >Peter, Gneveckow U, Wust >Peter, Gneveckow U, Johannsen M, Böhmer D, et al. Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy – feasibility, tolerance and achieved temperatures. *Int J Hyperth.* 2006 Jan 9;22(8):673–85.
146. Attaluri A, Kandala SK, Wabler M, Zhou H, Cornejo C, Armour M, et al. Magnetic nanoparticle hyperthermia enhances radiation therapy: A study in mouse models of human prostate cancer. *Int J Hyperth.* 2015 Jun 1;31(4):359–74.
147. Kunjachan S, Detappe A, Kumar R, Ireland T, Cameron L, Biancur DE, et al. Nanoparticle Mediated Tumor Vascular Disruption: A Novel Strategy in Radiation Therapy. *Nano Lett.* 2015 Nov 11;15(11):7488–96.
148. Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, Gneveckow U, Wust P, Thiesen B, et al. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: Results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2007 Jan;81(1):53–60.
149. Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2011 Jun;103(2):317–24.
150. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009 May 1;10(5):459–66.
151. Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy

- plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987–96.
152. Hergt R, Dutz S. Magnetic particle hyperthermia-biophysical limitations of a visionary tumour therapy. *J Magn Magn Mater.* 2007 Apr 1;311(1 SPEC. ISS.):187–92.
153. Kim S, Chae MK, Yim MS, Jeong IH, Cho J, Lee C, et al. Hybrid PET/MR imaging of tumors using an oleanolic acid-conjugated nanoparticle. *Biomaterials.* 2013 Nov 8;34(33):8114–21.
154. Felber M, Alberto R. ^{99m}Tc radiolabelling of Fe₃O₄-Au core-shell and Au-Fe₃O₄ dumbbell-like nanoparticles. *Nanoscale.* 2015 Apr 21;7(15):6653–60.
155. Wabler M, Zhu W, Hedayati M, Attaluri A, Zhou H, Mihalic J, et al. Magnetic resonance imaging contrast of iron oxide nanoparticles developed for hyperthermia is dominated by iron content. *Int J Hyperth.* 2014 May;30(3):192–200.
156. Bae YH, Park K. Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. Vol. 153, *Journal of Controlled Release.* Elsevier B.V.; 2011. p. 198–205.
157. Lee Y, Thompson DH. Stimuli-responsive liposomes for drug delivery. Vol. 9, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology.* Wiley-Blackwell; 2017.
158. Gindy ME, Prud'homme RK. Multifunctional nanoparticles for imaging, delivery and targeting in cancer therapy. Vol. 6, *Expert Opinion on Drug Delivery.* 2009. p. 865–78.
159. Wang MD, Shin DM, Simons JW, Nie S. Nanotechnology for targeted cancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2007 Jun;7(6):833–7.
160. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. Vol. 56, *Advanced Drug Delivery Reviews.* Elsevier; 2004. p. 1649–59.
161. Van Vlerken LE, Vyas TK, Amiji MM. Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. *Pharm Res.* 2007 Aug;24(8):1405–14.
162. Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. Vol. 2, *Nature Reviews Cancer.* 2002. p. 750–63.
163. Madru R, Kjellman P, Olsson F, Wingårdh K, Ingvar C, Ståhlberg F, et al. ^{99m}Tc-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles for multimodality SPECT/MRI of sentinel lymph nodes. *J Nucl Med.* 2012 Mar 1;53(3):459–63.
164. Liu S, Jia B, Qiao R, Yang Z, Yu Z, Liu Z, et al. A novel type of dual-modality molecular probe for MR and nuclear imaging of tumor: Preparation, characterization and in vivo application. *Mol Pharm.* 2009;6(4):1074–82.
165. Jarrett BR, Gustafsson B, Kukis DL, Louie AY. Synthesis of ⁶⁴Cu-labeled magnetic nanoparticles for multimodal imaging. *Bioconjug Chem.* 2008 Jul;19(7):1496–504.
166. Madru R, Tran TA, Axelsson J, Ingvar C, Bibic A, Ståhlberg F, et al. (68)Ga-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for multi-modality PET/MR/Cherenkov luminescence imaging of sentinel lymph nodes. *Am J Nucl Med Mol Imaging.* 2013;4(1):60–9.
167. Boros E, Bowen AM, Josephson L, Vasdev N, Holland JP. Chelate-free metal ion binding and heat-induced radiolabeling of iron oxide nanoparticles. *Chem Sci.* 2015 Jan 1;6(1):225–36.
168. Devaraj NK, Keliher EJ, Thurber GM, Nahrendorf M, Weissleder R. ¹⁸F labeled nanoparticles for in Vivo PET-CT imaging. *Bioconjug Chem.* 2009 Feb;20(2):397–401.
169. Sharma R, Xu Y, Kim SW, Schueller MJ, Alexoff D, Smith SD, et al. Carbon-11 radiolabeling of iron-oxide nanoparticles for dual-modality PET/MR imaging. *Nanoscale.* 2013 Aug 21;5(16):7476–83.
170. Zolata H, Afarideh H, Davani FA. Triple Therapy of HER2+ Cancer Using Radiolabeled Multifunctional Iron Oxide Nanoparticles and Alternating Magnetic Field. *Cancer Biother Radiopharm.* 2016;31(9):324–9.
171. Wang H, Kumar R, Nagesha D, Duclos RI, Sridhar S, Gatley SJ. Integrity of ¹¹¹In-radiolabeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the mouse. *Nucl Med Biol.* 2015 Jan 1;42(1):65–70.
172. Same S, Aghanejad A, Nakhjavani SA, Barar J, Omidi Y. Radiolabeled theranostics: Magnetic and gold nanoparticles. *BioImpacts.* 2016;6(3):169–81.
173. Zhang C, Hsu P, Wang D, Zhang W, Zhang C, Guo S, et al. Superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles labeled endothelial progenitor cells (EPCs) administration inhibited heterotopic ossification in rats. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2019 Oct 1;21:102078.

174. Juweid ME, Tulchinsky M, Mismar A, Momani M, Zayed AA, Al Hawari H, et al. Contemporary considerations in adjuvant radioiodine treatment of adults with differentiated thyroid cancer. *Int J Cancer*. 2020 Nov 9;147(9):2345–54.
175. Gansow OA. Newer approaches to the radiolabeling of monoclonal antibodies by use of metal chelates. *Int J Radiat Appl Instrumentation*. 1991 Jan 1;18(4):369–81.
176. Sundberg MW, Meares CF, Goodwin DA, Diamanti CI. Selective Binding of Metal Ions to Macromolecules Using Bifunctional Analogs of EDTA. *J Med Chem*. 1974 Dec 1;17(12):1304–7.
177. Lahooti A, Sarkar S, Saligheh Rad H, Gholami A, Nosrati S, Muller RN, et al. PEGylated superparamagnetic iron oxide nanoparticles labeled with ⁶⁸Ga as a PET/MRI contrast agent: a biodistribution study. *J Radioanal Nucl Chem*. 2017;311(1).
178. Arora G, Dubey P, Shukla J, Ghosh S, Bandopadhyaya G. Evaluation of cytotoxic and tumor targeting capability of ¹⁷⁷Lu-DOTATATE-nanoparticles: a trailblazing strategy in peptide receptor radionuclide therapy. *Ann Nucl Med*. 2016 Jun 1;30(5):334–45.
179. Chen J, Wu H, Han D, Xie C. Using anti-VEGF McAb and magnetic nanoparticles as double-targeting vector for the radioimmunotherapy of liver cancer. *Cancer Lett*. 2006;231(2):169–75.
180. Chen J, Zhu S, Tong L, Li J, Chen F, Han Y, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles mediated ¹³¹I-hVEGF siRNA inhibits hepatocellular carcinoma tumor growth in nude mice. *BMC Cancer*. 2014;14(1):1–8.
181. Muraro R, Kuroki M, Wunderlich D, Poole DJ, Colcher D, Thor A, et al. Generation and characterization of B72.3 second generation monoclonal antibodies reactive with the tumor-associated glycoprotein 72 antigen. *Cancer Res*. 1988 Aug 15;48(16):4588–96.
182. Colcher D, Minelli MF, Roselli M, Muraro R, Simpson-Milenic D, Schlom J. Radioimmunolocalization of Human Carcinoma Xenografts with B72.3 Second Generation Monoclonal Antibodies. *Cancer Res*. 1988;48(16).
183. Xu M, Real FX, Welt S, Schüssler MH, Oettgen HF, Old LJ. Expression of tag-72 in normal colon, transitional mucosa, and colon cancer. *Int J Cancer*. 1989 Dec 15;44(6):985–9.
184. Battista P, Muraro R, Mammarella S, Curia MC, Colasante A, Rosini S, et al. Complementary Reactivities of Anti-Carcinoembryonic Antigen and Antitumor-associated Glycoprotein 72 Monoclonal Antibodies in Lung Carcinomas I. Vol. 50, *CANCER RESEARCH*. 1990.
185. Lyubsky S, Madariaga J, Lozowski M, Mishriki Y, Schuss A, Chao S, et al. A Tumor-Associated Antigen in Carcinoma of the Pancreas Defined by Monoclonal Antibody B72.3. *Am J Clin Pathol*. 1988 Feb 1;89(2):160–7.
186. Mazur MT, Shultz JJ. Prostatic adenocarcinoma. Evaluation of immunoreactivity to monoclonal antibody B72.3. *Am J Clin Pathol*. 1990 Apr;93(4):466–70.
187. Nuti M, Mottolese M, Viora M, Donnorso RP, Schlom J, Natali PG. Use of monoclonal antibodies to human breast-tumor-associated antigens in fine-needle aspirate cytology. *Int J Cancer*. 1986 Apr 15;37(4):493–8.
188. Ohuchi N, Thor A, Nose M, Fujita J, Kyogoku M, Schlom J. Tumor-associated glycoprotein (TAG-72) detected in adenocarcinomas and benign lesions of the stomach. *Int J Cancer*. 1986 Nov 15;38(5):643–50.
189. Stramignoni D, Bowen R, Atkinson BF, Schlom J. Differential reactivity of monoclonal antibodies with human colon adenocarcinomas and adenomas. *Int J Cancer*. 1983 May 15;31(5):543–52.
190. Schlom J, Eggenberger D, Colcher D, Molinolo A, Houchens D, Miller LS, et al. Therapeutic Advantage of High-Affinity Anticarcinoma Radioimmunoconjugates. Vol. 52, *CANCER RESEARCH*. 1992.
191. Alvarez RD, Partridge EE, Khazaeli MB, Plott G, Austin M, Kilgore L, et al. Intraperitoneal radioimmunotherapy of ovarian cancer with ¹⁷⁷Lu- CC49: A phase I/II study. *Gynecol Oncol*. 1997 Apr;65(1):94–101. A
192. Divgi CR, Scott AM, Dantis L, Capitelli P, Siler K, Hilton S, et al. Phase I radioimmunotherapy trial with iodine-¹³¹-CC49 in metastatic colon carcinoma. *J Nucl Med*. 1995 Apr;36(4):586–92.
193. Tempero M, Lechner P, Dalrymple G, Harrison K, Augustine S, Schlam J, et al. High-dose therapy with iodine-¹³¹-labeled monoclonal antibody CC49 in patients with gastrointestinal

- cancers: a phase I trial. *J Clin Oncol*. 1997 Apr 1;15(4):1518–28.
194. Mulligan T, Carrasquillo JA, Chung Y, Milenic DE, Schlom J, Feuerstein I, et al. Phase I Study of Intravenous ¹⁷⁷Lu-labeled CC49 Murine Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 1995 Aug 1;1(12):1447–54.
 195. Murray JL, Macey DJ, Kasi LP, Rieger P, Cunningham J, Bhadkamkar V, et al. Phase II radioimmunotherapy trial with ¹³¹I-CC49 in colorectal cancer. *Cancer*. 1994 Feb 1;73(3 Suppl):1057–66.
 196. McCall MJ, Coleman VA, Herrmann J, Kirby JK, Gardner IR, Brent PJ, et al. A tiered approach. Vol. 8, *Nature Nanotechnology*. Nature Publishing Group; 2013. p. 307–8.
 197. Lin PC, Lin S, Wang PC, Sridhar R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. Vol. 32, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2014. p. 711–26.
 198. Keck CM, Müller RH. Nanotoxicological classification system (NCS) - A guide for the risk-benefit assessment of nanoparticulate drug delivery systems. Vol. 84, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier; 2013. p. 445–8.
 199. Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. Vol. 72, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Elsevier; 2009. p. 370–7.
 200. Fadeel B, Alenius H, Savolainen K. *Nanotoxicology*. Vol. 313, *Toxicology*. Elsevier; 2013. p. 1–2.
 201. Choi YH, Han H-K. Nanomedicines: current status and future perspectives in aspect of drug delivery and pharmacokinetics. *J Pharm Investig*. 2018 Jan 28;48(1):43–60.
 202. Massart R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. Vol. 17, *IEEE Transactions on Magnetics*. 1981. p. 1247–8.
 203. Hofer CJ. Electronic Supplementary Information for Stable dispersions of azide functionalized ferromagnetic metal nanoparticles. 2014;(November 2015).
 204. Hugounenq P, Levy M, Alloyeau D, Lartigue L, Dubois E, Cabuil V, et al. Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers for Highly Efficient Magnetic Hyperthermia. *J Phys Chem C*. 2012 Jul 26;116(29):15702–12.
 205. Costo R, Bello V, Robic C, Port M, Marco JF, Puerto Morales M, et al. Ultrasmall iron oxide nanoparticles for biomedical applications: Improving the colloidal and magnetic properties. *Langmuir*. 2012;28(1):178–85.
 206. Feng B, Hong RY, Wang LS, Guo L, Li HZ, Ding J, et al. Synthesis of Fe₃O₄/APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2008;328(1–3):52–9.
 207. Cha YJ, Kim MJ, Choa YH, Kim J, Nam B, Lee J, et al. Synthesis and characterizations of surface-coated superparamagnetic magnetite nanoparticles. In: *IEEE Transactions on Magnetics*. 2010. p. 443–6.
 208. Ruiz A, Morais PC, Bentes de Azevedo R, Lacava ZGM, Villanueva A, del Puerto Morales M. Magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid: development, characterization, and application in biomedicine. Vol. 16, *Journal of Nanoparticle Research*. Kluwer Academic Publishers; 2014. p. 1–20.
 209. Fauconnier N, Pons JN, Roger J, Bee A. Thiolation of maghemite nanoparticles by dimercaptosuccinic acid. *J Colloid Interface Sci*. 1997 Oct 15;194(2):427–33.
 210. Morrish AH, IEEE Magnetics Society. *The physical principles of magnetism*. IEEE Press; 2001. 680 p.
 211. DM 100 Series - nB nanoScale Biomagnetics.
 212. Hermanson GT. Isotopic Labeling Techniques. *Bioconjugate Tech*. 2013;507–34.
 213. Chapman RS. Radiolabelling for immunoassay. In 1998. p. 39–55.
 214. Chen L, Wang L, Yan J, Ma C, Lu J, Chen G, et al. ¹³¹I-labeled monoclonal antibody targeting neuropilin receptor type-2 for tumor SPECT imaging. *Int J Oncol*. 2017 Feb 1;50(2):649–59.
 215. Chard T. Radioimmunoassay. In: *Immunoassay*. Elsevier; 1996. p. 269–85.
 216. Shamsaei M. Synthesis and biodistribution study of a chlorotoxin derivative peptide labeled with ¹³¹I-iodine for tumor therapy. *Iran J Radiat Res*. 2011;8(4):243–8.
 217. He F. Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-Protocol*. 2011;1(11).
 218. Jozić NJ. Biokemijska i strukturna karakterizacija dipeptidil-peptidaze III iz kvasca

- Saccharomyces cerevisiae. Sveučilište u Zagrebu; 2011.
219. Natarajan A, Xiong C-Y, Gruettner C, DeNardo GL, DeNardo SJ. Development of Multivalent Radioimmunonanoparticles for Cancer Imaging and Therapy. *Cancer Biother Radiopharm.* 2008;23(1):82–91.
 220. Hempelmann E, Kaminsky R. Long term stability of colors after silver staining. *Electrophoresis.* 1986;7(10):481–481.
 221. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May;72(1–2):248–54.
 222. Kruger NJ. The Bradford Method for Protein Quantitation. In: *Basic Protein and Peptide Protocols.* New Jersey: Humana Press;. p. 9–16.
 223. Lin A V. Indirect ELISA. Vol. 1318, *Methods in Molecular Biology.* 2015. 51–59 p.
 224. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989;24(3):148–54.
 225. Zolata H, Abbasi Davani F, Afarideh H. Synthesis, characterization and theranostic evaluation of Indium-111 labeled multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Nucl Med Biol.* 2015 Feb;42(2):164–70.
 226. Luna L. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology.* 3rd ed. New York: Blakiston Division McGraw-Hill; 1968.
 227. Henwood AF. Hematoxylin and eosin staining of mucins of the gastrointestinal tract. *J Histotechnol.* 2017 Jan 2;40(1):21–4.
 228. Shakeri-Zadeh A, Khoee S, Shiran MB, Sharifi AM, Khoei S. Synergistic effects of magnetic drug targeting using a newly developed nanocapsule and tumor irradiation by ultrasound on CT26 tumors in BALB/c mice. *J Mater Chem B.* 2015 Mar 7;3(9):1879–87.
 229. Chen J, Zhu S, Tong L, Li J, Chen F, Han Y, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles mediated 131I-hVEGF siRNA inhibits hepatocellular carcinoma tumor growth in nude mice. *BMC Cancer.* 2014;14(1):1–8.
 230. Roduner E. Size matters: Why nanomaterials are different. *Chem Soc Rev.* 2006 Jun 22;35(7):583–92.
 231. Radović M. Magnetne nanočestice na bazi Fe₃O₄ obeležene radioaktivnim itrijumom za moguću primenu u hipertermijsko-radionuklidnoj terapiji tumora. Univerzitet u Beogradu; 2017.
 232. Gavilán H, Sánchez EH, Brollo MEF, Asín L, Moerner KK, Frandsen C, et al. Formation Mechanism of Maghemite Nanoflowers Synthesized by a Polyol-Mediated Process. *ACS Omega.* 2017 Oct 31;2(10):7172–84.
 233. Gonzalez-Fernandez MA, Torres TE, Andrés-Vergés M, Costo R, de la Presa P, Serna CJ, et al. Magnetic nanoparticles for power absorption: Optimizing size, shape and magnetic properties. *J Solid State Chem.* 2009 Oct 1;182(10):2779–84.
 234. Müller R, Dutz S, Neeb A, Cato ACB, Zeisberger M. Magnetic heating effect of nanoparticles with different sizes and size distributions. *J Magn Magn Mater.* 2013 Feb 1;328:80–5.
 235. Morales MP, Veintemillas-Verdaguer S, Montero MI, Serna CJ, Roig A, Casas LI, et al. Surface and internal spin canting in γ -Fe₂O₃ nanoparticles. *Chem Mater.* 1999;11(11):3058–64.
 236. Cao H, He J, Deng L, Gao X. Fabrication of cyclodextrin-functionalized superparamagnetic Fe₃O₄/amino-silane core-shell nanoparticles via layer-by-layer method. *Appl Surf Sci.* 2009 Jun 30;255(18):7974–80.
 237. Sodipo BK, Aziz AA. A sonochemical approach to the direct surface functionalization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with (3-aminopropyl)triethoxysilane. Vol. 5, *Beilstein Journal of Nanotechnology.* Beilstein-Institut Zur Forderung der Chemischen Wissenschaften; 2014. p. 1472–6.
 238. Chen JP, Yang PC, Ma YH, Tu SJ, Lu YJ, Kumar S, et al. Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *RSC Adv.* 2014;4(3 PART A):681–90.
 239. Majoul N, Aouida S, Bessaïs B. Progress of porous silicon APTES-functionalization by FTIR investigations. *Appl Surf Sci.* 2015 Mar 15;331:388–91.
 240. Galli M, Guerrini A, Cauteruccio S, Thakare P, Dova D, Orsini F, et al. Superparamagnetic iron

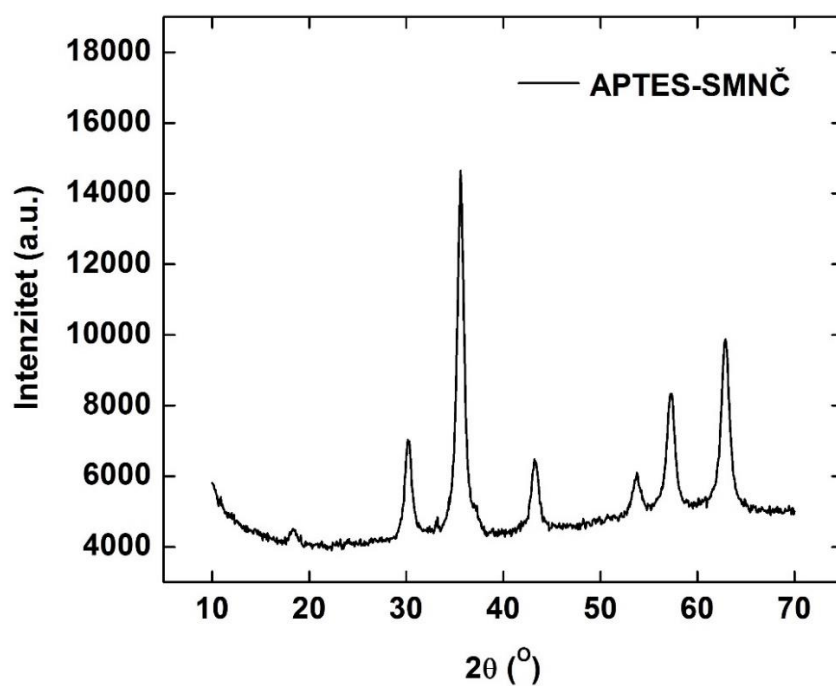
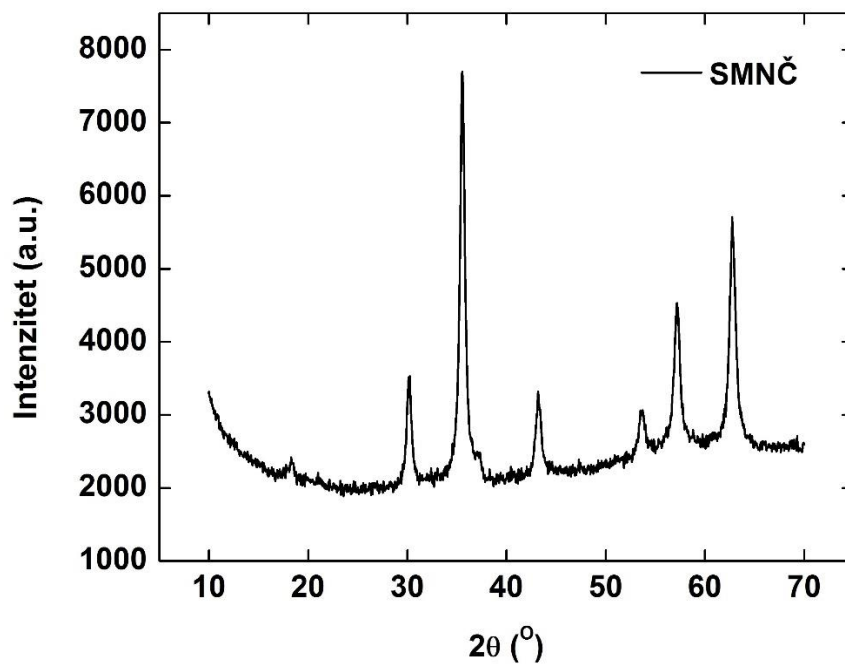
- oxide nanoparticles functionalized by peptide nucleic acids. *RSC Adv.* 2017 Mar 9;7(25):15500–12.
241. Chen ZP, Zhang Y, Zhang S, Xia JG, Liu JW, Xu K, et al. Preparation and characterization of water-soluble monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles via surface double-exchange with DMSA. Vol. 316, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2008. p. 210–6.
242. Brezovich IA, Meredith RF. Practical aspects of ferromagnetic thermoseed hyperthermia. *Radiol Clin North Am.* 1989 May;27(3):589–602.
243. Atkinson WJ, Brezovich IA, Chakraborty DP. Usable Frequencies in Hyperthermia with Thermal Seeds. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1984;BME-31(1):70–5.
244. Kandasamy G, Sudame A, Bhati P, Chakrabarty A, Maity D. Systematic investigations on heating effects of carboxyl-amine functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) based ferrofluids for in vitro cancer hyperthermia therapy. *J Mol Liq.* 2018 Apr 15;256:224–37.
245. Johannsen M, Gneveckow U, Thiesen B, Taymoorian K, Cho CH, Waldöfner N, et al. Thermo-therapy of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Feasibility, Imaging, and Three-Dimensional Temperature Distribution. *Eur Urol.* 2007 Dec;52(6):1653–62.
246. Wust P, Gneveckow U, Johannsen M, Böhmer D, Henkel T, Kahmann F, et al. Magnetic nanoparticles for interstitial thermo-therapy - Feasibility, tolerance and achieved temperatures. *Int J Hyperth.* 2006 Jan 9;22(8):673–85.
247. Hergt R, Hiergeist R, Zeisberger M, Schüler D, Heyen U, Hilger I, et al. Magnetic properties of bacterial magnetosomes as potential diagnostic and therapeutic tools. In: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. North-Holland; 2005. p. 80–6.
248. Fortin JP, Wilhelm C, Servais J, Ménager C, Bacri JC, Gazeau F. Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *J Am Chem Soc.* 2007 Mar 7;129(9):2628–35.
249. Das P, Colombo M, Prospero D. Recent advances in magnetic fluid hyperthermia for cancer therapy. Vol. 174, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Elsevier B.V.; 2019. p. 42–55.
250. Kallumadil M, Tada M, Nakagawa T, Abe M, Southern P, Pankhurst QA. Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia. *J Magn Magn Mater.* 2009 May 1;321(10):1509–13.
251. Ortega D, Pankhurst QA. Magnetic hyperthermia. In 2012. p. 60–88.
252. Gavilán H, Sánchez EH, Brollo MEF, Asín L, Moerner KK, Frandsen C, et al. Formation Mechanism of Maghemite Nanoflowers Synthesized by a Polyol-Mediated Process. *ACS Omega.* 2017 Oct 31;2(10):7172–84.
253. Eisenhut M, Chemistry R. *Handbook of Nuclear Chemistry*. Handbook of Nuclear Chemistry. 2011.
254. Mock B, Zheng Q. *Radiopharmaceutical chemistry : Iodination techniques* . 2014;(September).
255. Cosofret VV. *Membrane Electrodes in Drug-Substances Analysis*. Membrane Electrodes in Drug-Substances Analysis. Elsevier; 1982.
256. Medenica M, Pejić N. *Elektroforeza. U: Instrumentalne metode*. Prvo izdanje Beograd: Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet; 2018. p. 625–45.
257. Ernst O, Zor T. Linearization of the Bradford protein assay. *J Vis Exp.* 2010 Apr 12;(38).
258. Slinkin MA, Klibanov AL, Torchilin VP. Terminal-Modified Polylysine-Based Chelating Polymers: Highly Efficient Coupling to Antibody with Minimal Loss in Immunoreactivity. *Bioconjug Chem.* 1991 Sep 1;2(5):342–8.
259. DeNardo SJ, DeNardo GL, Miers LA, Natarajan A, Foreman AR, Gruettner C, et al. Development of tumor targeting bioprobes (111In-chimeric L6 monoclonal antibody nanoparticles) for alternating magnetic field cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2005;11(19 II):7087–93.
260. Natarajan A, Gruettner C, Ivkov R, Denardo GL, Mirick G, Yuan A, et al. NanoFerrite particle based radioimmunonanoparticles: Binding affinity and in vivo pharmacokinetics. *Bioconjug Chem.* 2008;19(6):1211–8.
261. Chemicell GmbH. *Covalent Coupling Procedure on SiMAG-Amine by Carbodiimide Method*.
262. Jokanović VR. *Terapeutici i lečenje kancera. U: Nanomedicina - najveći izazov 21 veka*.

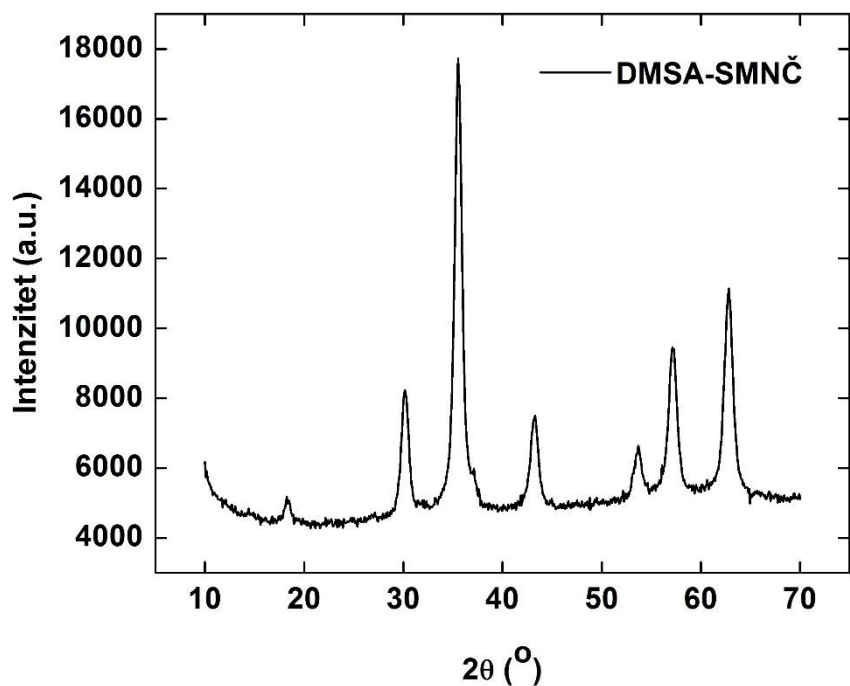
- Beograd: DATA STATUs; 2012. p. 721–56.
263. Tan J, Saltzman WM. Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure. *Biomaterials*. 2004 Aug;25(17):3593–601.
264. Janković D, Maksin T, Djokić D, Milonjić S, Nikolić N, Mirković M, et al. Particle size analysis: ⁹⁰Y and ^{99m}Tc-labelled colloids. *J Microsc*. 2008 Dec 1;232(3):601–4.
265. Jurisson S, Berning D, Jia W, Ma D. Coordination Compounds in Nuclear Medicine. *Chem Rev*. 1993;93(3):1137–56.
266. Shanehsazzadeh S, Oghabian MA, Daha FJ, Amanlou M, Allen BJ, Delgado A, et al. Biodistribution of ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles in BALB mice. *Nanomaterials*. 2000;10(2):93–102.
267. Chouly C, Pouliquen D, Lucet I, Jeune JJ, Jallet P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: Effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J Microencapsul*. 1996;13(3):245–55.
268. Vanlić-Razumenić N. *Radiofarmaceutici Sinteza, osobine i primena*. Prvo izdanje Beograd: Velarta; 1998.
269. Shanehsazzadeh S, Oghabian MA, Daha FJ, Amanlou M, Allen BJ. Biodistribution of ultra small superparamagnetic iron oxide nanoparticles in BALB mice. *J Radioanal Nucl Chem*. 2013 Feb;295(2):1517–23.
270. Liu F, Le W, Mei T, Wang T, Chen L, Lei Y, et al. In vitro and in vivo targeting imaging of pancreatic cancer using a Fe₃O₄@SiO₂ nanoprobe modified with anti-mesothelin antibody. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:2195–207.
271. Shanehsazzadeh S, Gruettner C, Lahooti A, Mahmoudi M, Allen BJ, Ghavami M, et al. Monoclonal antibody conjugated magnetic nanoparticles could target MUC-1-positive cells in vitro but not in vivo. *Contrast Media Mol Imaging*. 2015;10(3):225–36.
272. Walkey CD, Chan WCW. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem Soc Rev*. 2012 Mar 12;41(7):2780–99.
273. Thau L, Mahajan K. *Physiology, Opsonization*. StatPearls. StatPearls Publishing; 2019.
274. Wilhelm S, Tavares AJ, Dai Q, Ohta S, Audet J, Dvorak HF, et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat Rev Mater*. 2016;1.
275. Allegreti N, Andreis I, Čulo F, Marušić M, Taradi M. *IMUNOLOGIJA*. Drugo izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 1987.
276. Tutkun L, Gunaydin E, Turk M, Kutsal T. Anti-epidermal growth factor receptor aptamer and antibody conjugated SPIONs targeted to breast cancer cells: A comparative approach. *J Nanosci Nanotechnol*. 2017 Mar 1;17(3):1681–97.
277. Song KM, Lee S, Ban C. Aptamers and their biological applications. Vol. 12, *Sensors*. Sensors (Basel); 2012. p. 612–31.
278. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. Vol. 23, *Nature Biotechnology*. *Nat Biotechnol*; 2005 . p. 1126–36.
279. Stojić-Vukanić Z, Arsenović-Ranin N, Milenković M, Bufan B. *Razvoj monoklonskih antitela za terapijsku primenu: od mišjih do humanih*. Vol. 62, *Arh.farm*. 2012.
280. Johannsen M, Thiesen B, Wust P, Jordan A. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. *Int J Hyperth*. 2010 Dec;26(8):790–5.
281. Tian L, Chen Q, Yi X, Wang G, Chen J, Ning P, et al. Radionuclide I-131 Labeled Albumin-Paclitaxel Nanoparticles for Synergistic Combined Chemo-radioisotope Therapy of Cancer. *Theranostics*. 2017;7(3):614–23.
282. Ming H, Fang L, Gao J, Li C, Ji Y, Shen Y, et al. Antitumor effect of nanoparticle 131 I-labeled arginine-glycine-aspartate-bovine serum albumin-polycaprolactone in lung cancer. *Am J Roentgenol*. 2017;208(5):1116–26.
283. Li W, Liu Z, Li C, Li N, Fang L, Chang J, et al. Radionuclide therapy using 131I-labeled anti-epidermal growth factor receptor-targeted nanoparticles suppresses cancer cell growth caused by EGFR overexpression. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142(3):619–32.
284. Sakr TM, Khowessah OM, Motaleb MA, Abd El-Bary A, El-Kolaly MT, Swidan MM. I-131 doping of silver nanoparticles platform for tumor theranosis guided drug delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2018 Sep 15;122:239–45.
285. Reddy LH, Arias JL, Nicolas J, Couvreur P. Magnetic nanoparticles: Design and

- characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. Vol. 112, Chemical Reviews. American Chemical Society; 2012. p. 5818–78.
286. Institut za javno zdravlje “Dr Milan Jovanović Batut.” Maligni tumori u Republici Srbiji. Beograd; 2018.
287. Antić Klinički centar Kragujevac V, Antić Centar za gastroenterologiju V, centar K, Antic V. Varijacije incidence kolorektalnog karcinoma u okruzima u Srbiji/Colorectal cancer incidence variation in Serbia districts. *Med Čas / Med J.* 2010;48(1):48–53.
288. Schwartz B, Bresalier RS, Kim YS. The role of mucin in colon-cancer metastasis. *Int J Cancer.* 1992;52(1):60–5.
289. LS174T Xenograft Model | Altogen Labs.
290. Nuti M, Mottolese M, Viora M, Donnorso RP, Schlom J, Natali PG. Use of monoclonal antibodies to human breast-tumor-associated antigens in fine-needle aspirate cytology. *Int J Cancer.* 1986 Apr 15;37(4):493–8.
291. Zou P, Povoski SP, Hall NC, Carlton MM, Hinkle GH, Xu RX, et al. 124I-HuCC49deltaCH2 for TAG-72 antigen-directed positron emission tomography (PET) imaging of LS174T colon adenocarcinoma tumor implants in xenograft mice: preliminary results. *World J Surg Oncol.* 2010 Aug 6;8:65.
292. Zigmund E, Halpern Z, Elinav E, Brazowski E, Jung S, Varol C. Utilization of murine colonoscopy for orthotopic implantation of colorectal cancer. *PLoS One.* 2011;6(12).
293. Bhullar JS, Subhas G, Silberberg B, Tilak J, Andrus L, Decker M, et al. A novel nonoperative orthotopic colorectal cancer murine model using electrocoagulation. *J Am Coll Surg.* 2011 Jul;213(1):54–60.
294. Polascik TJ, Villers A, Wheeler TM, Bostwick DG, Montironi R, Nevoux P, et al. Pathologic basis for focal therapy: Understanding cancer grade, volume, and spatial location. In: *Imaging and Focal Therapy of Early Prostate Cancer.* Humana Press Inc.; 2013. p. 53–71.
295. Chen CH, Hsieh MC, Hsiao PK, Lin EK, Lu YJ, Wu SY. A critical reappraisal for the value of tumor size as a prognostic variable in rectal adenocarcinoma. *J Cancer.* 2017;8(10):1927–34.
296. Morikawa K, Walker SM, Nakajima M, Pathak S, Jessup JM, Fidler IJ. Influence of Organ Environment on the Growth, Selection, and Metastasis of Human Colon Carcinoma Cells in Nude Mice. *Cancer Res.* 1988;48(23).
297. Ernst M, Ramsay RG. Colorectal cancer mouse models: Integrating inflammation and the stroma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27(1):39–50.
298. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: The “seed and soil” hypothesis revisited. Vol. 3, *Nature Reviews Cancer.* *Nat Rev Cancer;* 2003. p. 453–8.
299. Medema JP, Vermeulen L. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer. Vol. 474, *Nature.* *Nature;* 2011. p. 318–26.
300. Zhong D, Zhao J, Li Y, Qiao Y, Wei Q, He J, et al. Photonic/magnetic hyperthermia-synergistic nanocatalytic cancer therapy enabled by zero-valence iron nanocatalysts. *Biomaterials.* 2019;219(March):119374.

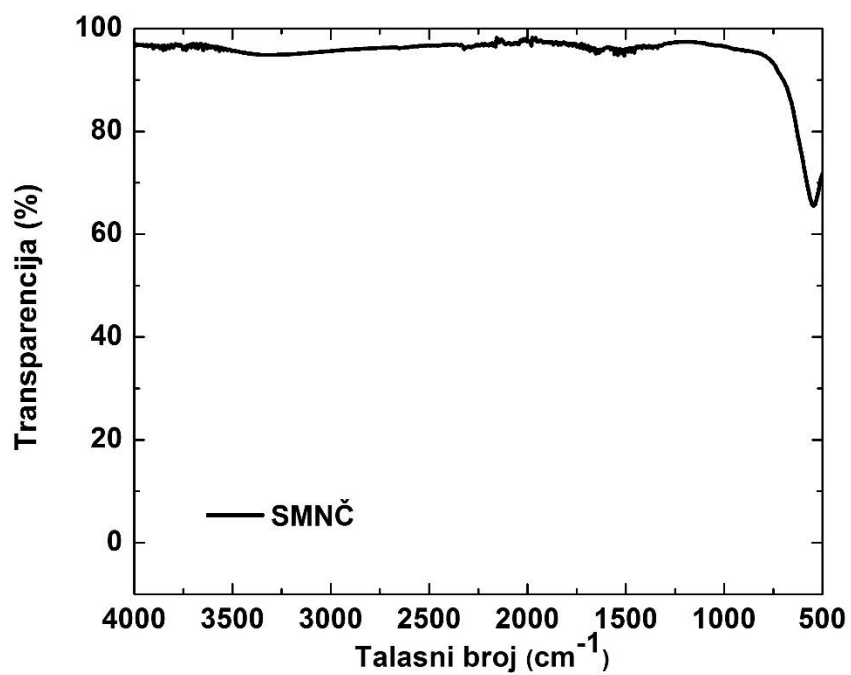
8. PRILOG

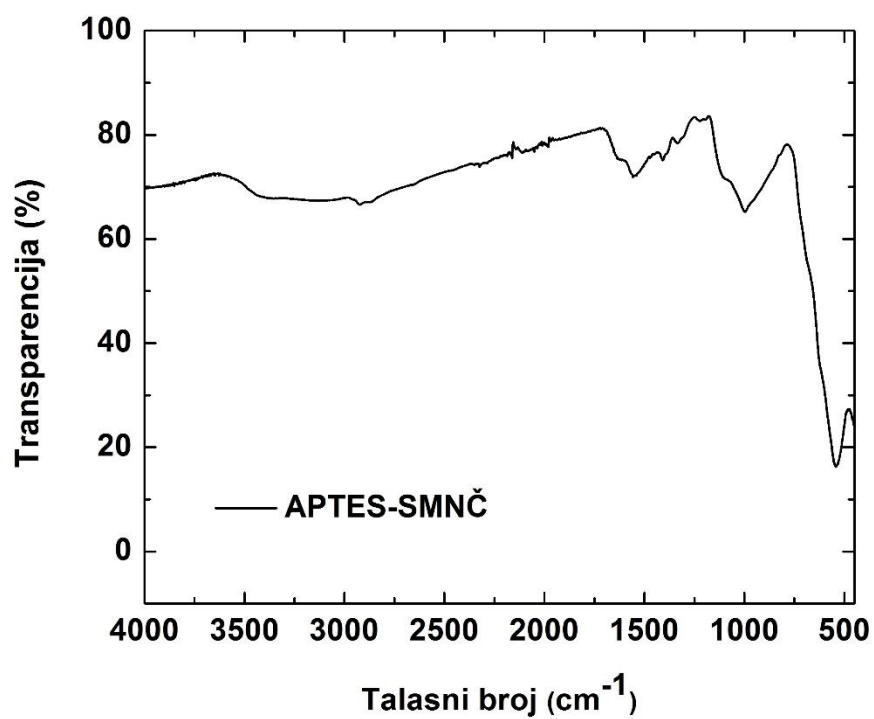
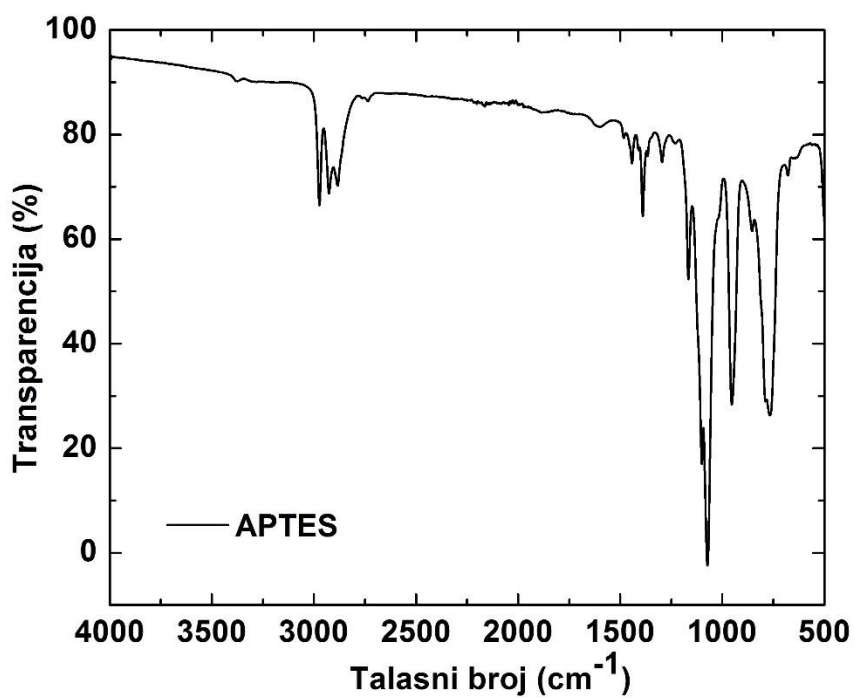
Prilog 1. Pojedinačni difraktogrami neobloženih i obloženih SMNČ

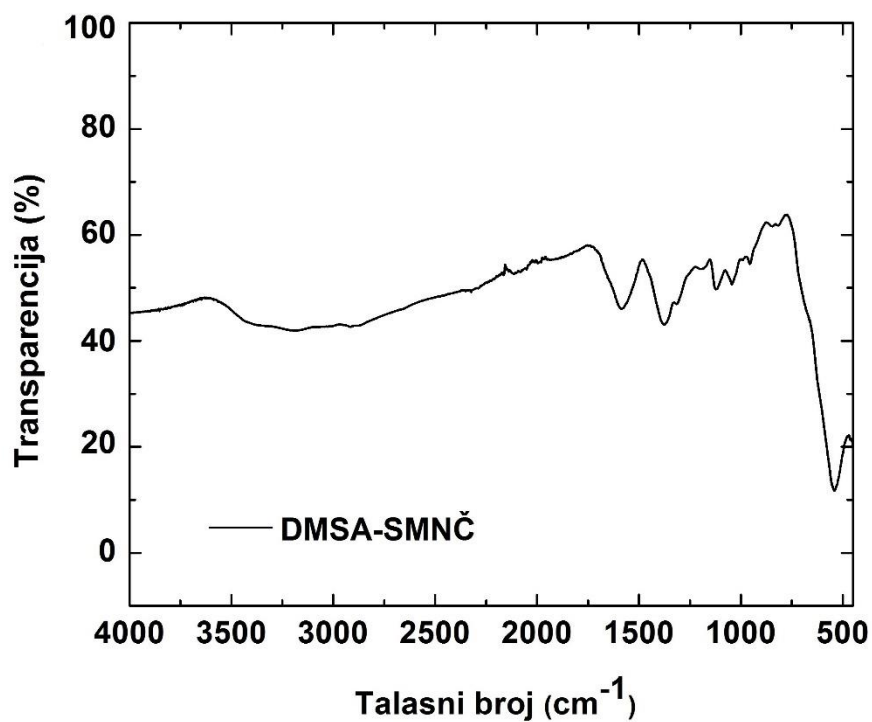
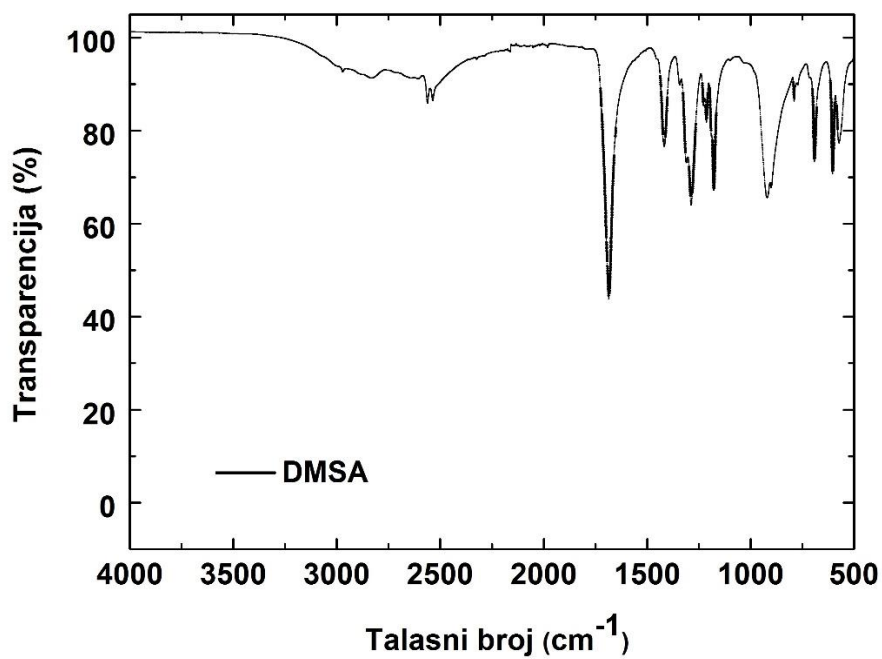




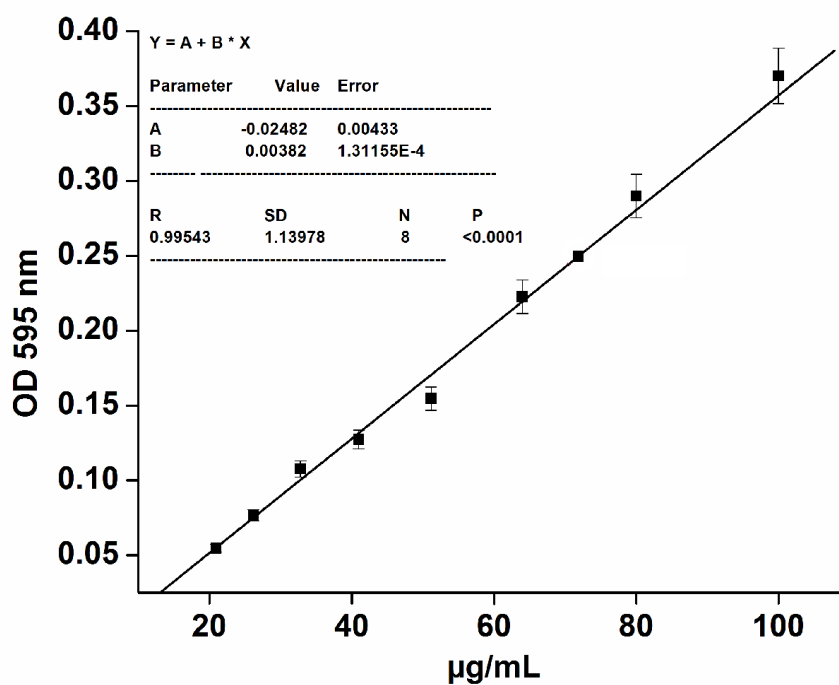
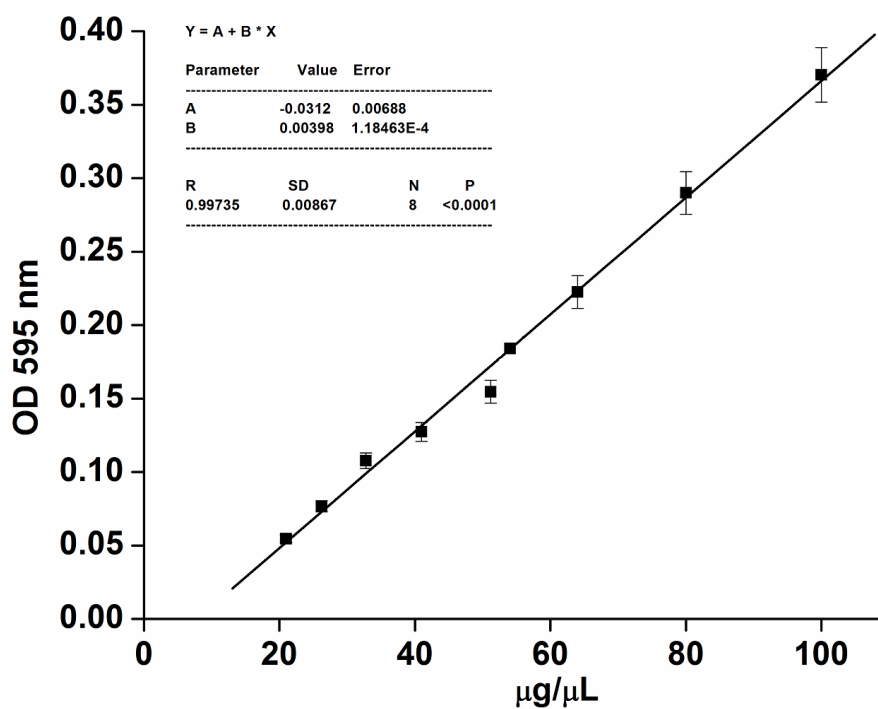
Prilog 2. Pojedinačni FT-IR spektri neobloženih SMNČ, APTES, DMSA, APTES-SMNČ, DMSA-SMNČ



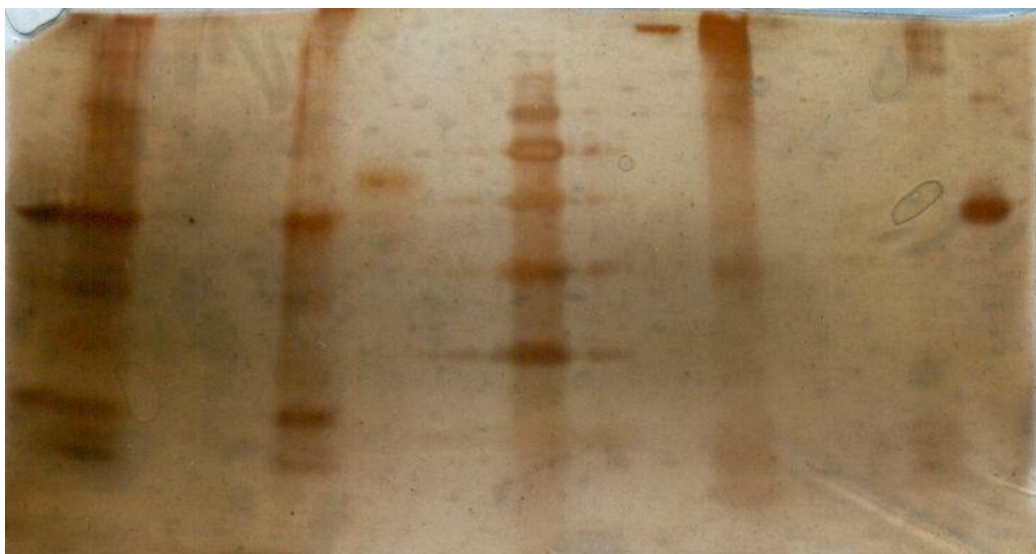




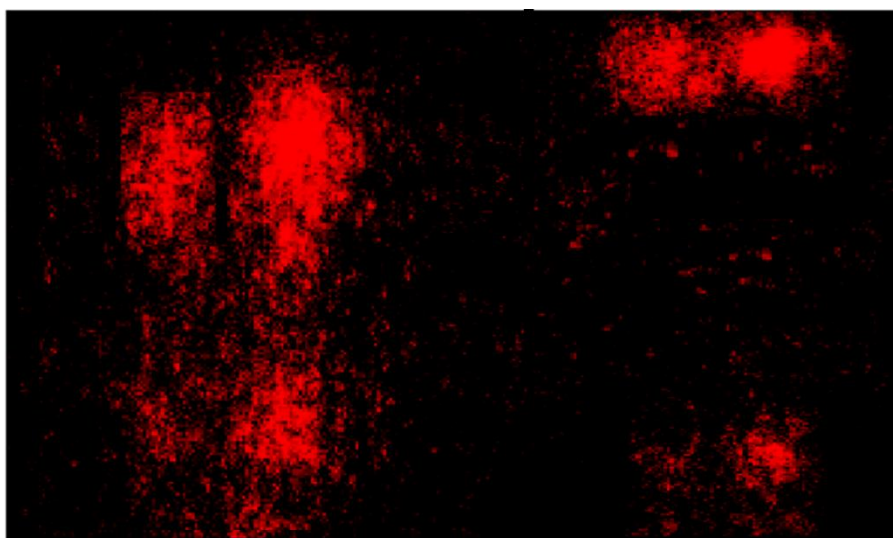
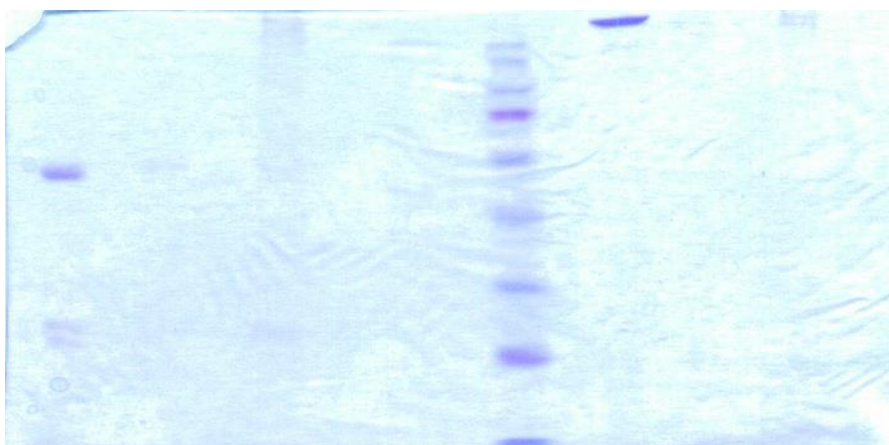
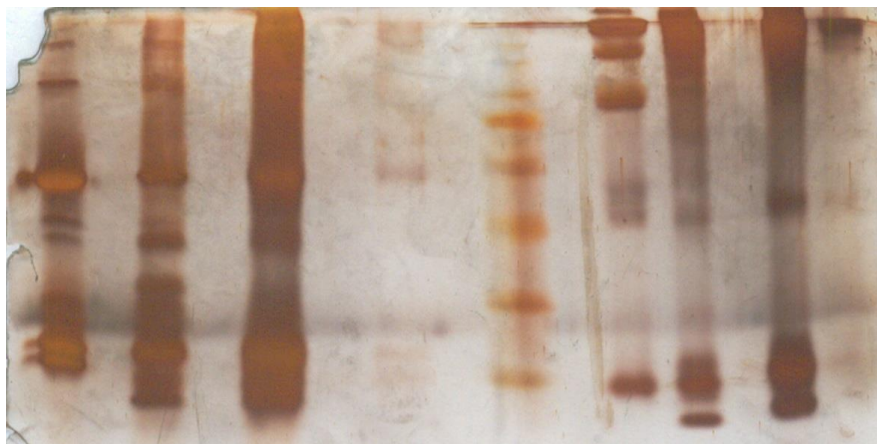
Prilog 3. Kalibracione krive izrađene pomoću standardnih rastvora HSA



Prilog 4. SDS-PAGE gel nakon bojenja sa AgNO_3 (ispitivani uzorci navedeni na slici 29).



Prilog 5. SDS-PAGE gel nakon bojenja sa AgNO_3 , Coomassie Brilliant Blue® R-250 i nakon snimanja na BRUKER® In-Vivo Xtreme II uređaju (ispitivani uzorci navedeni na slici 30).



План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Синтеза и карактеризација радиофармацеутика на бази суперпарамагнетних наночестица и ефекат дуалне терапије на експерименталном моделу аденокарцинома колона
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Центар изузетних вредности Лабораторије за радиоизотопе и Лабораторије за теоријску физику и физику кондензоване материје, Институт за нуклеарне науке „Винча”, Институт од националног значаја за Републику Србију, Универзитет у Београд б) Медицински факултет Нови Сад Универзитета у Новом Саду
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Докторске академске студије Клиничка истраживања
1. Опис података
<i>1.1 Врста студије</i> <i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> Докторска дисертација
<i>1.2 Врсте података</i> <u>а) квантитативни</u> <u>б) квалитативни</u>
<i>1.3. Начин прикупљања података</i> а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту _____ г) административни подаци: навести врсту _____ д) узорци ткива: пресеци ткива криотомом (криопресјеци) мозга, срца, јетре, плућа, бубрега мишева соја NOD-SCID; криопресјеци ткива ксенографта аденокарцинома колона индукованог ћелијама хумане туморске линије LS174T (ATCC® CL-188™) ђ) снимци, фотографије: фотографија апликатора DM 100 (nB nanoScale Biomagnetic); фотографија гел-филтрационе хроматографије; фотографија уређаја BRUKER® In-Vivo Extreme II; фотографија РТГ филма SDS-PAGE гела; фотографије SDS-PAGE гела након бојења са AgNO ₃ и са бојом Coomassie Brilliant Blue®; снимак SDS-PAGE гела са BRUKER® In-Vivo Extreme II уређаја; снимци NOD-SCID мишева снимљени BRUKER® In-Vivo Xtreme II уређајем; снимци мјерења температуре унутар тумора помоћу ДМ3 апликатора и инфрацрвене камере; фотографије мишева 14. дан од почетка терапије; фотографија извађених тумора; фотомикрографи патохистолошких препарата ткива мозга, срца, јетре, плућа, бубрега мишева соја NOD-SCID бојених стандардном хематоксилин/еозин методом;

фотомикрографи патохистолошког препарата ткива ксенографта аденокарцинома колона бојених стандардном хематоксилин/еозин методом, бојених методом са пруским плавим и након индиректне имунохистохемијске методе

е) текст: **литература**

ж) мапа, навести врсту _____

з) остало: **лабораторијска експериментална испитивања**

1.3 Формат података, употребљене скале, количина података

Табеле (16), графикони (11), слике (39)

а) Еxcel фајл, датотека **.xls, .xlsx**

б) SPSS фајл, датотека **.sav**

в) PDF фајл, датотека **.pdf**

г) Текст фајл, датотека **.docx**

д) JPG фајл, датотека **.jpg, .jpeg, .tif**

е) Остало, датотека: **.opj, .bip, .mcl, .dts**

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

а) број варијабли: **велики број**

б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.): **велики број (више од 100 мјерења)**

1.3.3. Поновљена мерења

а) да

б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

а) временски размак између поновљених мера је: **недеља дана**

б) варијабле које се више пута мере односе се на: **степен некрозе и фиброзе у односу на запремину тумора**

в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као: **procena efekta terapije patolog 1. docx; procena efekta terapije patolog 2. docx**

Напомене: _____

Да ли формати и софтвер омогућавају дељење и дугорочну валидност података?

а) Да

б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

а) експеримент, навести тип: **синтеза суперпарамагнетних наночестица методом копреципитације и солвотермалном методом у полиолима; трансмисиона електронска микроскопија (TEM); дифракција X-зрака на праху (XRPD); метода динамичког расејања свјетлости (DLS); Фуријеова трансформациона инфрацрвена спектроскопија (FT-IR); танкослојна хроматографија (TLC); гел-филтрациона хроматографија; обиљежавање протеина/антитијела са радионуклидом ¹³¹I методом са хлорамином-Т; електрофореза на полиакриламидном гелу у присуству натријум-додецил сулфата (SDS-PAGE); квантификација протеина/антитијела методом по *Bradford*-у; индиректни имуноензимски тест (ELISA), техника развијања радиографских (РТГ) снимака; лабораторијски експерименти на огледним животињама; патохистолошка анализа узорака ткива мозга, срца, плућа, јетре, бубрега и туморског ксенографта**

б) корелационо истраживање, навести тип _____

ц) анализа текста, **прикупљање података из доступне научне литературе**

д) остало, навести шта _____

2.1.2 Навести врсте мерних инструмената или стандарде података специфичних за одређену научну дисциплину (ако постоје).

Трансмисионим електронски микроскоп JEOL-JEM-1010 (JEOL, Јапан); дифрактометар високе резолуције SmartLab® X-ray (Rigaku, Јапан); Zetasizer Nano – ZS90 уређај (Malvern Instruments Ltd, Велика Британија); ФТ-ИР спектрофотометар Nicolet iS50 (Thermo Fisher Scientific, САД); магнетометар Quantum Design VersaLab™ VSM5XL (Quantum Design, САД); уређај DM 100 (nV nanoScale Biomagnetic, Шпанија) за испитивање специфичне апсорпције; апарат Hofer® SE250 (Hofer Inc, САД) за SDS-PAGE; гама бројач Wizard 2480 NaI(Tl) (Perkin Elmer, САД) и дозе калибратор CRC-15 beta (Capintec, САД); UV-VIS спектрофотометар Molecular devices Spectra MAX 250 (Marshall Scientific, САД); уређај BRUKER® In-Vivo Xtreme II (Bruker, САД); криотом Kedi (Kedi Instrumental Equipment, Кина); микроскоп Leica DM LS2 (Leica Microsystems, Њемачка); камера PowerShot S70 камера; друга лабораторијска опрема

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

а) Да ли матрица садржи недостајуће податке? Да Не

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

- а) Колики је број недостајућих података? _____
 - б) Да ли се кориснику матрице препоручује замена недостајућих података? Да Не
 - в) Ако је одговор да, навести сугестије за третман замене недостајућих података
-

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података контролисан је статистичком обрадом добијених резултата, коришћењем реплика при сваком лабораторијском експерименту са огледним животињама и компарацијом добијених података са доступним подацима у научној литератури.

2.2.3. На који начин је извршена контрола уноса података у матрицу?

Контрола уноса податка у матрицу изведена је прегледом протокола експерименталног рада, директним и искључивим преузимањем података са инструмената на којима је вршена анализа.

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

3.1.1. Подаци ће бити депоновани у Заједнички портал свих докторских дисертација и извештаја о њиховој ојени на Универзитетима у Србији (NaRDUS) и репозиторијуму докторских дисертација Универзитета у Новом Саду (CRIS).

3.1.2. URL адреса <https://nardus.mpn.gov.rs/>; <https://cris.uns.ac.rs/searchDissertations.jsf>

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

- а) Да
- б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____
- в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

3.1.5. Подаци неће бити депоновани у репозиторијум, али ће бити чувани.

Образложење

Докторска дисертација ће бити депонована у Заједнички портал свих докторских дисертација и извјештаја о њиховој оцјени на Универзитетима у Србији (NaRDUS) и у репозиторијум докторских дисертација Универзитета у Новом Саду (CRIS).

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

3.2.1. Навести метаподатке на основу којих су подаци депоновани у репозиторијум.

Ако је потребно, навести методе које се користе за преузимање података, аналитичке и процедуралне информације, њихово кодирање, детаљне описе варијабли, записа итд.

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

3.3.1. До ког периода ће подаци бити чувани у репозиторијуму? **Трајно**

3.3.2. Да ли ће подаци бити депоновани под шифром? Да **Не**

3.3.3. Да ли ће шифра бити доступна одређеном кругу истраживача? Да **Не**

3.3.4. Да ли се подаци морају уклонити из отвореног приступа после извесног времена?

Да **Не**

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

Овај одељак МОРА бити попуњен ако ваши подаци укључују личне податке који се односе на учеснике у истраживању. За друга истраживања треба такође размотрити заштиту и сигурност података.

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

Истраживачи који спроводе испитивања с људима морају да се придржавају Закона о заштити података о личности (https://www.paragraf.rs/propisi/zakon_o_zastiti_podataka_o_licnosti.html) и одговарајућег институционалног кодекса о академском интегритету.

4.1.2. Да ли је истраживање одобрено од стране етичке комисије? **Да** Не

Ако је одговор Да, навести датум и назив етичке комисије која је одобрила истраживање

Експерименти су укључивали рад на огледним животињама, тако да је истраживање одобрено од стране Етичке комисије за рад са огледним животињама Института за нуклеарне науке „Винча“ у Београду 20.12.2018. године, према дозволи од Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије (дозвола бр. 323-07-04725 / 2018-05).

4.1.2. Да ли подаци укључују личне податке учесника у истраживању? Да **Не**

Ако је одговор да, наведите на који начин сте осигурали поверљивост и сигурност информација везаних за испитанике:

- а) Подаци нису у отвореном приступу
- б) Подаци су анонимизирани
- ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести под којим условима могу да их користе:

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

5.4. Навести лиценцу под којом ће прикупљени подаци бити архивирани.

Ауторство – некомерцијално - без прерале (CC BY-NC-ND 4.0)

6. Улоге и одговорност

6.1. Навести име и презиме и мејл адресу власника (аутора) података

Аљоша Станковић, aliosa.stankovic@gmail.com

6.2. Навести име и презиме и мејл адресу особе која одржава матрицу с подацима

Аљоша Станковић, aliosa.stankovic@gmail.com

6.3. Навести име и презиме и мејл адресу особе која омогућује приступ подацима другим истраживачима

Аљоша Станковић, aliosa.stankovic@gmail.com