

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET ZA FIZIČKU HEMIJU

Ana I. Vesković

**PRIMENA ELEKTRONSKE
PARAMAGNETNE REZONANCIJE ZA
PROUČAVANJE ALBUMINSKIH
HIDROGELOVA ZA KONTROLISANU
ISPORUKU ANTIKANCERSKIH LEKOVA
I DETEKCIJU VIJABILNOSTI ĆELIJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

Ana I. Vesković

**ALBUMIN HYDROGELS FOR
CONTROLLED DELIVERY OF
ANTICANCER DRUGS AND CELL
VIABILITY ASSESSMENT STUDIED BY
ELECTRON PARAMAGNETIC
RESONANCE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023

Mentor:

dr Ana Popović Bijelić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju

Članovi komisije:

dr Dragomir Stanisavljev, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju

dr Bojana Nedić Vasiljević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu, Fakultet za fizičku hemiju

dr Ivan Spasojević, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za multidisciplinarna istraživanja

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je proistekla iz rada na PROMIS projektu br. 6062285 „Proteinski hidrogel za teranostiku kancera – PHYCAT“, finansiranog od strane Fonda za nauku Republike Srbije, pod rukovodstvom dr Ane Popović Bijelić, vanrednog profesora Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu.

Istraživanja su rađena u EPR laboratoriji Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu. Sinteza citotoksičnog liganda koji je korišćen u studiji je izvršena u okviru grupe prof. dr Vladimira B. Ariona sa Instituta za neorgansku hemiju Univerziteta u Beču, Austrija, dok je citotoksičnost ovog liganda ispitana u laboratoriji prof. dr Éve A. Enyedy sa Univerziteta u Segedinu, Mađarska.

Najveću zahvalnost za uspešan završetak doktorske disertacije dugujem svojoj dragoj mentorki, vanrednoj profesorki dr Ani Popović Bijelić, koja je ponela ogroman teret na trnovitom putu realizacije ove teze. Bez njenog zalaganja, razumevanja i pune podrške, ne bih uspela.

Članovima Komisije, profesoru dr Dragomiru Stanisavljevu, vanrednoj profesorki dr Bojani Nedić Vasiljević i dr Ivanu Spasojeviću, naučnom savetniku, iskreno se zahvaljujem na svim korisnim savetima kojima su doprineli da ova disertacija bude upotpunjena.

Prof. dr Vladimiru Arionu se zahvaljujem na jedinjenju ustupljenom za potrebe eksperimenata disertacije. Zahvaljujem se prof. dr Évi Enyedy i dr Gabrielli Spengler na ispitivanju njegove citotoksičnosti.

Kolegama iz EPR laboratorije, zahvalna sam na uspešnoj višegodišnjoj saradnji. Posebno se zahvaljujem dr Đuri Nakaradi na ličnom doprinosu zajedničkim istraživanjima.

Bratu Dušanu Belči se zahvaljujem na pomoći oko obrade slika.

Veliko hvala celoj porodici i prijateljima, bez kojih završetak ove teze ne bi bio moguć.

Naslov doktorske disertacije: Primena elektronske paramagnetne rezonancije za proučavanje albuminskih hidrogelova za kontrolisanu isporuku antikancerskih lekova i detekciju vijabilnosti ćelija

SAŽETAK

U cilju smanjenja neželjenih dejstava i obezbeđivanja optimalne biodistribucije lekova, te ciljane terapije, mnoga istraživanja fokusirana su na alternativne načine za njihovu isporuku. Među brojnim platformama za inkapsulaciju lekova, hidrogelovi na bazi prirodnih polimera su posebno atraktivni kao nosači, pre svega zahvaljujući svojoj biokompatibilnosti i biorazgradivosti. Serumski albumin je dobro poznat po sposobnosti za vezivanje velikog broja endogenih i egzogenih supstancija, što je u ovoj studiji bio osnov za razvoj proteinskog hidrogela koji bi služio kao pogodan rezervoar citotoksičnog indolo[3,2-*d*]benzazepinskog liganda.

Prepoznajući udeo vode u hidrogelu kao važnu karakteristiku za otpuštanje agenasa iz polimerne matrice, elektronska paramagnetna rezonancija (EPR), kao izuzetno osetljiva spektroskopska tehnika, iskorišćena je za razvoj nove metodologije za određivanje sadržaja vode u hidrogelu. Pokazano je da EPR aktivna spinska proba 3-karbamoil-proksil (3CP), koja ne interaguje sa proteinskom matricom, već je lokalizovana isključivo u vodenoj fazi, može da se koristi kao pouzdan indikator ukupne količine vode u hidrogelu. Utvrđeno je da između EPR spektralnih parametara 3CP-a i odnosa masa vode i suvog polimera postoji korelacija, koja je uspostavljena na albuminskim hidrogelovima, a potvrđena na hidrogelovima na bazi drugih biomolekula. Pokazano je da je EPR imidžingom moguće vizuelno pratiti difundovanje probe kroz polimernu matricu gela, otvarajući time mogućnost za primenu ove tehnike i za praćenje oslobađanja lekova i degradacije hidrogela.

U narednoj fazi istraživanja EPR tehnika se pokazala izuzetno korisnom u *in vitro* ispitivanju vezivanja i oslobađanja spinski obeleženog jedinjenja iz klase indolo[3,2-*d*]benzazepina (**HL**), koji se odlikuje značajnom antikancerskom aktivnosti. Takođe je EPR protokol uspešno primenjen na hidrogelovima obeleženim probom 3CP, odnosno 5-doksil-stearatom (5-DS), u cilju izučavanja procesa difuzije, odnosno degradacije polimerne matrice, pružajući uvid u narušavanje interakcija na molekularskom nivou. S druge strane je potvrđen potencijal termalno-indukovanog hidrogela na bazi humanog serumskog albumina (HSA) da služi kao depo antikancerskih agenasa s odloženim oslobađanjem, sposoban da tokom 11 dana dijalize zadrži čak 60% citotoksičnog liganda **HL**, te i da je pogodniji nosač u odnosu na rastvor HSA, iz kog se 100% liganda otpusti u roku od 8 dana. Odsustvo citotoksične aktivnosti tokom 3 dana inkubacije **HL**/HSA hidrogela sa Colo-205 kancerskim ćelijama (adenokarcinom debelog creva) sugeriše da bi se odloženo oslobađanje citotoksičnog liganda moglo postići i u *in vivo* uslovima.

Najzad, dijagnostički aspekt multifunkcionalnog proteinskog hidrogela ogleda se u potvrđenoj osetljivosti albuminskog hidrogela obeleženog spinskom probom 3CP na ćelijski redoks metabolizam. Kao inicijalna faza u razvoju prototipa hidrogela koji bi bio namenjen za praćenje odgovora na terapiju, hidrogel je u tom pogledu ispitan u *Saccharomyces cerevisiae*, koji je korišćen kao model sistem. U ovoj studiji je pokazana mogućnost da spinski obeležen albuminski hidrogel služi kao indikator redoks okruženja, kroz smanjenje intenziteta EPR signala nitroksidne probe zavisno od broja prisutnih vitalnih ćelija u sistemu. U narednoj fazi istraživanja se očekuje da rezultati budu potvrđeni na eksperimentalnim animalnim modelima.

Na osnovu sveukupnih rezultata, zaključuje se da bi ova studija mogla otvoriti vrata potencijalnoj primeni *in vivo* EPR molekularnog imidžinga u sprezi sa spinski obeleženim albuminskim hidrogelom, koji bi imao ulogu ne samo rezervoara antikancerskih lekova, već bi se koristio i za praćenje efekata lekova na okolna tkiva u prekliničkim istraživanjima, te bi se otišlo i korak bliže integrisanju dijagnostike i terapije.

Ključne reči: EPR spektroskopija i imidžing, spinsko obeležavanje, serumski albumin, hidrogel, isporuka lekova, kancer

Naučna oblast: Fizička hemija

Uža naučna oblast: Biofizička hemija

Title of doctoral dissertation: Albumin hydrogels for controlled delivery of anticancer drugs and cell viability assessment studied by electron paramagnetic resonance

ABSTRACT

Many studies have focused on alternative ways for drug delivery to reduce side effects and to ensure optimal biodistribution and targeted therapy. Among various platforms for drug encapsulation, hydrogels based on natural polymers are attractive carriers, primarily due to their biocompatibility and biodegradability. Serum albumin is well known for its ability to bind a variety of endogenous and exogenous substances, which, in this study, was the foundation for the development of a protein hydrogel that is a suitable reservoir of the cytotoxic indolo[3,2-*d*]benzazepine ligand.

Considering the importance of the water amount in the hydrogel for the active agent release from the polymeric matrix, electron paramagnetic resonance (EPR), as an extremely sensitive spectroscopic technique, was used to develop a new methodology for hydrogel water content determination. It was shown that the EPR active spin probe 3-carbamoyl-proxyl (3CP), which does not interact with the protein matrix and is entirely localized in the aqueous phase, can be used as a reliable indicator of the total hydrogel water content. A functional correlation between 3CP EPR spectral parameters and the mass ratio of water to dry polymer was established on albumin hydrogels and confirmed on hydrogels based on other biomolecules. It was shown that it is possible to visualize the diffusion of the sample through the gel polymer matrix by EPR imaging, opening the possibility for the application of this technique for the monitoring of drug release and hydrogel degradation.

In the subsequent research phase, the EPR technique has proved to be extremely useful in investigating the binding and release of a spin-labeled indolo[3,2-*d*]benzazepine ligand (**HL**) which displays significant anticancer activity. The EPR protocol was also successfully applied on hydrogels labeled with probes 3CP and 5-doxyl-stearate (5-DS), to study the diffusion and polymer matrix degradation processes, providing insight into the disruption of interactions at the molecular level. In addition, it was confirmed that the human serum albumin (HSA) hydrogel has the potential to serve as an anticancer drug depot with delayed release, capable of retaining even 60% of the cytotoxic **HL** during 11 days of dialysis and that it is a more suitable carrier compared to HSA solution, from which 100% of the ligand is released within 8 days. The absence of cytotoxic activity during three days of **HL**/HSA hydrogel incubation with Colo-205 cancer cells (colon adenocarcinoma) suggests that it is possible to achieve the delayed release of the cytotoxic ligand under *in vivo* conditions.

Finally, the diagnostic aspect of the multifunctional protein hydrogel is reflected through the observed sensitivity of the albumin hydrogel labeled with the spin probe 3CP to the cellular redox metabolism. As an initial phase in the development of a hydrogel prototype intended for monitoring the drug treatment response, the hydrogel was tested in the *Saccharomyces cerevisiae*, used as a model system. In this study, the possibility of the spin-labeled albumin hydrogel to serve as an indicator of the redox environment was demonstrated through the reduction of the EPR signal of the nitroxide probe, dependent on the number of vital cells present in the system. It is expected that this observation will be confirmed on experimental animal models in future experiments.

Overall, it can be concluded that this study allows for the potential application of *in vivo* EPR molecular imaging in conjunction with the spin-labeled albumin hydrogel, which would act as an anticancer drug depot-anchoring hydrogel, also allowing for the monitoring of drug effects on surrounding tissues, thus contributing to the integration of diagnostics and therapy.

Key words: EPR spectroscopy and imaging, spin-labeling, serum albumin, hydrogel, drug delivery, cancer

Scientific field: Physical chemistry

Scientific subfield: Biophysical chemistry

SKRAĆENICE

16-DS – 16-doksil-stearat

3CP – spinska proba 3-karbamoil-2,2,5,5-tetrametilpirolidin-1-oksil

3CxP – spinska proba 3-karboksi-2,2,5,5-tetrametilpirolidin-1-oksil

5-DS – 5-doksil-stearat

AFM – mikroskopija atomskih sila (od eng. *atomic force microscopy*)

BSA – goveđi serumski albumin (od eng. *bovine serum albumin*)

CDK – ciklin-zavisna kinaza (od eng. *cyclin-dependent kinase*)

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DSC – diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (od eng. *differential scanning calorimetry*)

EPR – elektronska paramagnetna rezonancija

EPRI – EPR imidžing

ESEM – ambijentalna skenirajuća elektronska mikroskopija (od eng. *environmental scanning electron microscopy*)

FCS – fluorescentna korelaciona spektroskopija (od eng. *fluorescence correlation spectroscopy*)

HL – modifikovani paulonski ligand (izveden iz 7,12-dihidroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-ona) spinski obeležen slobodnim radikalom TEMPO

HSA – humani serumski albumin

MK – masna kiselina

MT – mikrotalasno zračenje

NMR – nuklearna magnetna rezonancija

PEG – poli(etilen-glikol)

RNR – ribonukleotid reduktaza

ROS – reaktivne kiseonične vrste (od eng. *reactive oxygen species*)

SA – serumski albumin

SANS – rasejanje neutrona na malim uglovima (od eng. – *small angle neutron scattering*)

SAXS – rasejanje X-zraka na malim uglovima (od eng. – *small angle X-ray scattering*)

SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija

TEM – transmisiona elektronska mikroskopija

TEMPO – spinska proba 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Hidrogelovi.....	3
2.1.1. Klasifikacija hidrogelova.....	3
2.1.2. Karakterizacija hidrogelova za primenu u isporuci lekova	7
2.2. Elektronska paramagnetna rezonancija.....	14
2.2.1. Osnovni principi EPR spektroskopije.....	14
2.2.2. Spinske probe i obeleživači	26
2.2.3. EPR imidžing.....	31
2.3. Kancer	33
2.3.1. Imidžing metode u onkologiji.....	33
2.3.2. Konvencionalna antikancerska terapija	34
2.3.3. Pauloni kao potencijalni antikancerski lekovi	35
2.3.4. Alternativni načini isporuke antikancerskih agenasa	36
2.4. Serumski albumin.....	38
2.4.1. Struktura serumskog albumina	39
3. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA	44
4. MATERIJALI I METODE	46
4.1. EPR spektroskopija i imidžing.....	46
4.2. Hemikalije	46
4.3. Određivanje sadržaja vode u BSA hidrogelovima	47
4.3.1. Priprema EPR spinski obeleženih BSA hidrogelova.....	47
4.3.2. Procena optimalne koncentracije spinske probe.....	47
4.3.3. Korelisanje EPR spektralnih parametara sa količinom vode u spinski obeleženim BSA hidrogelovima	48
4.3.4. Provera EPR metodologije za određivanje sadržaja vode na hidrogelovima većih dimenzija	48
4.4. Izučavanje HSA hidrogelova kao nosača antikancerskih jedinjenja.....	49
4.4.1. Ispitivanje vezivanja i otpuštanja liganda HL iz HSA rastvora i hidrogela.....	49
4.4.2. 5-DS/HSA i 3CP/HSA spinski obeleženi hidrogelovi	50
4.4.3. Ispitivanje <i>in vitro</i> citotoksičnosti liganda HL i HL /HSA hidrogelova.....	50
4.5. Ispitivanje osetljivosti spinski obeleženih hidrogelova za procenu vijabilnosti ćelija primenom EPR spektroskopije i imidžinga	51
5. REZULTATI I DISKUSIJA	52
5.1. EPR metodologija za određivanje sadržaja vode u hidrogelu.....	52

5.1.1. EPR spektri spinskih proba u BSA rastvoru.....	52
5.1.2. EPR spektri spinskih proba u BSA hidrogelu	56
5.1.3. Uticaj koncentracije spinske probe 3CP na rotaciono korelaciono vreme	59
5.1.4. Korelisanje EPR spektralnih parametara sa količinom vode u spinski obeleženim BSA hidrogelovima.....	60
5.1.5. Optimizacija protokola za određivanje sadržaja vode u hidrogelovima većih dimenzija – provera nove metodologije	65
5.2. Izučavanje HSA hidrogelova kao nosača antikancerskih jedinjenja.....	68
5.2.1. Ispitivanje vezivanja i otpuštanja liganda HL iz HSA rastvora/hidrogela	68
5.2.2. Degradacija proteinske matrice HSA hidrogela	74
5.2.3. Difuzija malog liganda iz HSA hidrogela	75
5.2.4. <i>In vitro</i> citotoksičnost liganda HL i HL /HSA hidrogela	77
5.2.5. EPR imidžing spinski obeleženih HSA hidrogelova.....	77
5.3. Spinski obeleženi hidrogelovi za procenu vijabilnosti ćelija primenom EPR spektroskopije i imidžinga.....	79
6. ZAKLJUČAK	82
7. LITERATURA	84
BIOGRAFIJA AUTORA.....	97
Izjava o autorstvu.....	98
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada.....	99
Izjava o korišćenju	100

1. UVOD

Razvoj polimernih sistema za dostavu lekova kao alternativa konvencionalnim formulacijama u cilju poboljšanja bioraspodivnosti i ciljane isporuke, poslednjih nekoliko decenija je u stalnom porastu. Za tu primenu su hidrogelovi posebno atraktivni s obzirom na to da je tokom procesa proizvodnje moguće fino podešavati njihova svojstva. U pogledu biokompatibilnosti, naročito su pogodni hidrogelovi na bazi prirodnih polimera, obezbeđujući bezbednu implantaciju/injektovanje, oslobađanje i biodegradaciju [1,2].

Sinteza gelova za isporuku se najčešće vrši u prisustvu aktivnog jedinjenja, koje se oslobađa iz polimerne matrice tokom procesa bubrenja. Otpuštanje supstancije iz gel-matrice je pretežno determinisano interakcijama između vode, polimera i aktivnog molekula, dok količina vode unutar pora određuje sveukupnu kinetiku difuzije kroz matricu gela [3,4]. Zbog neosporne važnosti za kontrolisanu dostavu, a s druge strane, nepostojanja standardizovanog testa za određivanje ove karakteristike hidrogela, nameće se potreba za razvojem metode za jednostavno i pouzdano utvrđivanje količine vode u hidrogelu. U okviru ove studije dizajnirana je nova metodologija zasnovana na izuzetno osetljivoj spektroskopskoj tehnici, elektronskoj paramagnetnoj rezonanciji (EPR), uz odabir adekvatne EPR aktivne spinske probe kao indikatora. Metod je razvijan na hidrogelovima na bazi serumskog albumina (SA), ne samo zbog njihove jednostavne sinteze, već i da bi se imanentno svojstvo albumina da vezuje različite endogene i egzogene supstance [5] iskoristilo za dizajn nosača antikancerskog leka.

Inkapsulacija lekova unutar polimernih matrica posebno dobija na značaju u studijama usmerenim protiv kancera, imajući u vidu poboljšanje farmakokinetike, farmakodinamike, cijane isporuke i redukovane hemotoksičnosti, naspram direktne administracije antitumorskih agenasa [6]. Poznato je da je konvencionalna hemioterapija praćena nizom neželjenih reakcija zbog neselektivnog dejstva citostatika. Osim toga, većina antikancerskih lekova je hidrofobna što otežava njihovu isporuku do unutarćelijskih meta [7]. U tom smislu, razvoj nosača na bazi albumina predstavlja pogodnost jer SA poseduje brojna mesta za vezivanje liganada, te sa visokim afinitetom vezuje masne kiseline (MK), bilirubin, slobodne jone metala i širok spektar hidrofobnih lekova, povećavajući rastvorljivost slabo rastvornih jedinjenja i produžavajući *in vivo* vreme poluživota agenasa koji se inače brzo eliminišu iz organizma [5]. Specifično nagomilavanje makromolekula, te albumina u malignom tkivu zbog narušene vaskulature tumora, predstavlja još jedan povoljan aspekt u razvoju albuminskih sistema za ciljanu isporuku u tumorsko tkivo [8]. Dodatni podsticaj leži u činjenici da je formulacija antikancerskog leka paklitaksela vezanog za albuminske nanočestice već odobrena za kliničku upotrebu [9].

U cilju smanjenja neželjenih dejstava, brojna istraživanja su pored pronalaženja alternativnih načina za isporuku, fokusirana i na inovativne lekove koji ne ciljaju dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) [10]. U tom pogledu, indolo[3,2-*d*]benzazepini (pauloni) se ističu kao potencijalni antikancerski lekovi imajući u vidu njihovo inhibitorno dejstvo na enzime ključne za regulaciju životnog ciklusa ćelije [11].

Citotoksično jedinjenje korišćeno u ovoj studiji je modifikovani paulonski ligand, za koji je kovalentno vezana spinska proba, tako da bi se njegovo vezivanje i otpuštanje moglo proučavati EPR spektroskopijom. Premda ova tehnika nije naišla na široku primenu u te svrhe, nedavno se pokazala efikasnom u ispitivanju kontrolisanog oslobađanja spinski obeležene kumarin-3-karboksilne kiseline i varfarina iz hidrogela na bazi goveđeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumin*, BSA) [12]. EPR tehnika je pri izradi ove teze odabrana zbog brojnih pogodnosti koje nudi naspram standardno korišćenih metoda. Nanomolarna granica detekcije, mogućnost ispitivanja veoma male zapremine uzorka, kao i osetljivost na konformacione promene proteina, samo su neke od prednosti [13].

Osim toga, EPR se u sprezi sa odgovarajućim spinskim probama može koristiti za procenu redoks statusa tkiva [14]. U aktuelnoj studiji ovakav potencijal EPR spektroskopije, te imidžinga

iskorišćen je da se ispita mogućnost primene hidrogelova u koje je inkorporirana spinska proba, za posmatranje redoks okruženja. Poznato je da su kvasci veoma pogodni model sistemi za proučavanje metabolizma mitohondrija koji odgovara onom kod viših organizama [15], tako da je osetljivost spinski obeleženih hidrogelova na vijabilnost ćelija ispitana u *Saccharomyces cerevisiae*. Metoda za vizuelno praćenje ćelijskog metabolizma je preko potrebna imajući u vidu da je narušen redoks balans usko povezan sa brojnim patološkim stanjima, poput neurodegenerativnih i malignih oboljenja [14,16].

Najzad, u nadolazećoj eri personalizovanog tretmana kancera teži se ka integraciji dijagnostike i terapije. Do tada moraju biti zadovoljeni zahtevi koji se tiču identifikacije novih biomarkera radi unapređenja molekularne dijagnostike, imidžing proba i tehnika za rano otkrivanje raka, terapije vođene molekularnim imidžingom, te razvoja platformi koje objedinjuju imidžing i terapijsku komponentu [17].

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Hidrogelovi

Hidrogelovi su polimerni materijali koji od nedavno predstavljaju predmet interesovanja mnogih medicinskih i farmaceutskih istraživanja. Sastoje se od umrežene trodimenzionalne matrice sposobne za apsorpciju veoma velike količine vode [18]. Izrazito bubrenje u vodenoj sredini rezultat je postojanja polarnih funkcionalnih grupa zakačenih za glavni lanac, poput hidroksilnih, karboksilnih i amino grupa, dok je za nerastvorljivost hidrogelova zaslužna njihova mrežna struktura [19]. Usled visokog stepena poroznosti, te znatnog sadržaja vode, hidrogelovi se odlikuju izrazitom biokompatibilnošću oponašajući biološka tkiva [20]. Ove jedinstvene karakteristike hidrogelova pružaju mogućnost za njihovu široku primenu u biomedicini uključujući tretiranje rana [21,22], inženjering tkiva [23,24] i kontrolisanu isporuku lekova [25,26].

2.1.1. Klasifikacija hidrogelova

Hidrogelovi se prema poreklu polimera mogu klasifikovati kao hidrogelovi na bazi prirodnih polimera, hidrogelovi na bazi sintetičkih polimera i kombinovani hidrogelovi. Prvu grupu prvenstveno čine proteinski i hidrogelovi na bazi polisaharida. U drugu grupu spadaju hidrogelovi izvedeni iz polimera kao što su poli(vinil-alkohol), poli(vinil-pirolidon), poli(laktična kiselina), poli(etilen-glikol) (PEG), poli(2-hidroksietil metakrilat), poli(akrilna kiselina) i njeni derivati. Sintetički polimeri mogu biti proizvedeni tako da poseduju dugolančanu strukturu, te veliku molekulsku masu. Predstavljaju atraktivan materijal za kontrolisanu sintezu hidrogelova tačno određenih fizičkih i hemijskih karakteristika. Ipak, manja biološka aktivnost hidrogelova zasnovanih na sintetičkim polimerima predstavlja nedostatak u odnosu na one prirodnog porekla. S druge strane, u cilju poboljšanja mehaničkih svojstava hidrogelova prirodni polimeri se neretko kombinuju sa sintetičkim polimerima [27].

Prema sastavu se razlikuju homopolimerni hidrogelovi, kod kojih je polimerni lanac mreže izgrađen od jedne vrste ponavljajućeg monomera, kopolimerni ili multipolimerni hidrogelovi, izvedeni iz dve, odnosno više različitih monomera. Osim toga, postoje i tzv. interpenetrirajuće mreže koje se sastoje iz zasebnih polimernih mreža koje nisu kovalentno povezane, već fizički isprepletane [28].

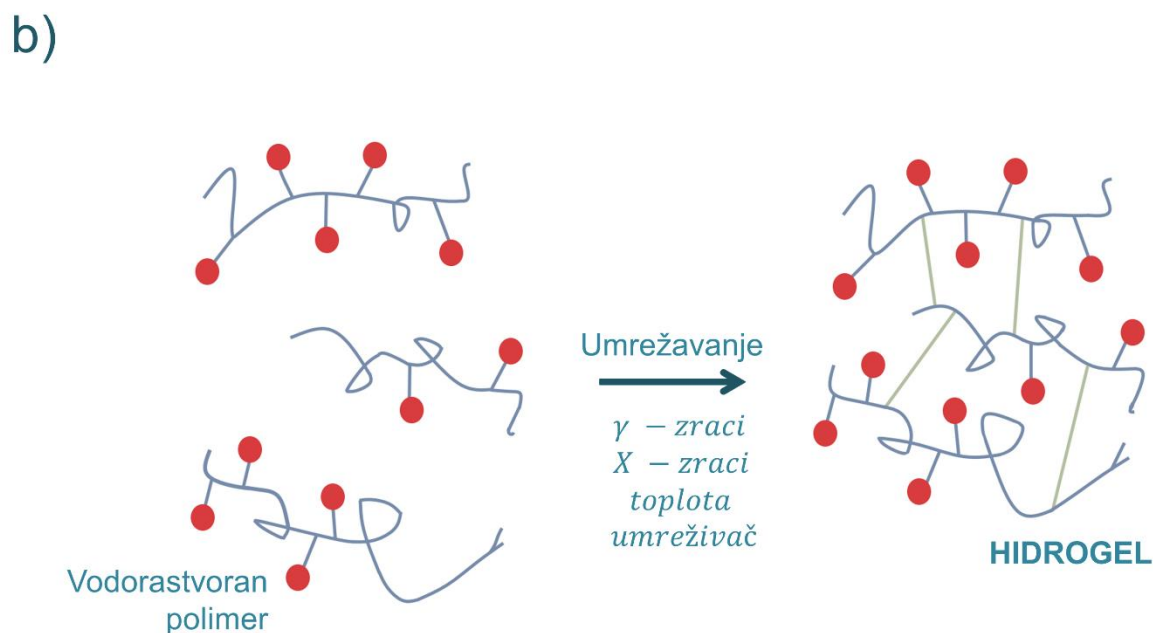
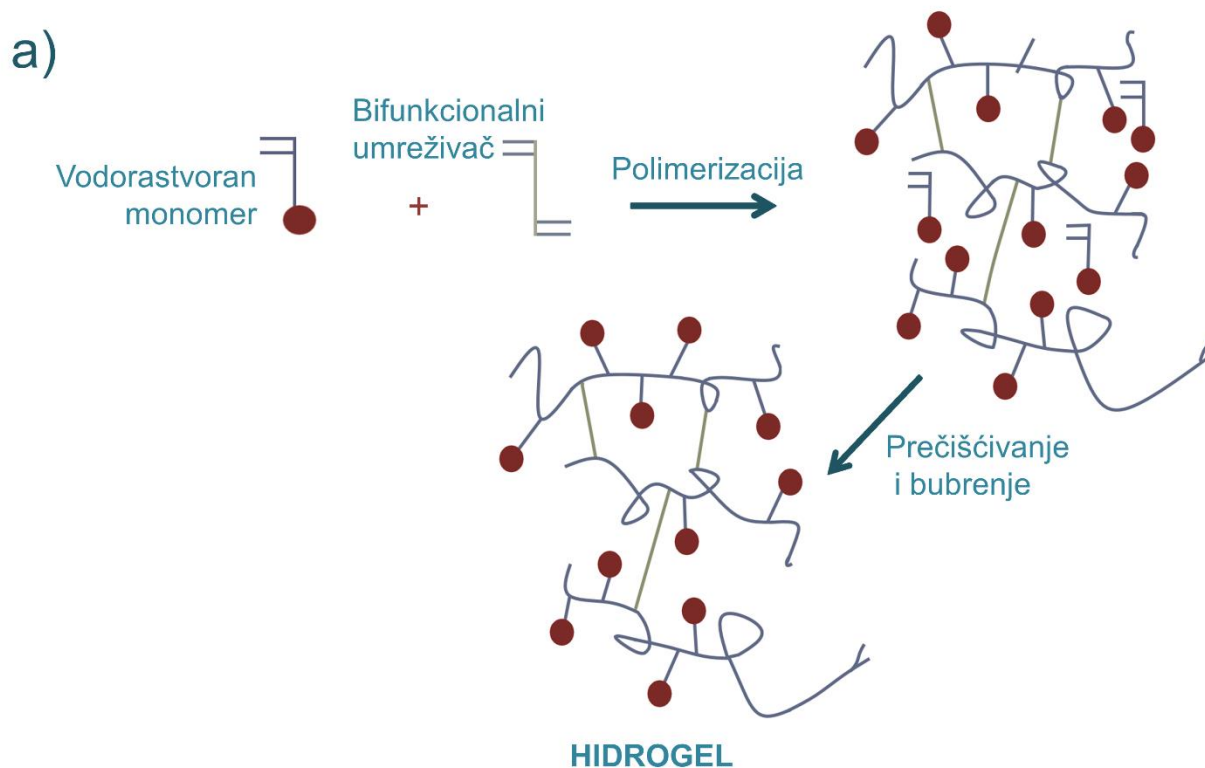
Na osnovu strukture, hidrogelovi mogu biti amorfni, kristalni ili semikristalni. Amorfne hidrogelove na molekulskom nivou čine nasumične mreže. Kristalni hidrogelovi predstavljaju čvrsto upakovane polimerne mreže određenog reda kristalizacije. Semikristalni hidrogelovi sadrže i amorfne i kristalne regione i najpre su dobijeni hemijskim umrežavanjem. Nakon toga su fizički umreženi semikristalni hidrogelovi počeli da se pripremaju postupkom micelarne polimerizacije. Odlikuju se reverzibilnošću, te brzim prelaskom iz čvrstog u tečno stanje i obrnuto, pa su zbog mogućnosti injektovanja i pamćenja oblika našli širu primenu kao medicinski uređaji za implantaciju [29].

2.1.1.1. Sinteza hidrogelova

Hidrogelovi se prema načinu sinteze mogu podeliti na reverzibilno, fizički umrežene gelove, i trajne, kovalentnim vezama, hemijski umrežene gelove. Takođe postoje i hibridni gelovi kod kojih je zastupljeno i fizičko i hemijsko povezivanje [30,31]. Ukoliko je umrežavanje između polimernih lanaca rezultat nekovalentnih veza poput jonskih, van der Valsovih, vodoničnih i hidrofobnih interakcija, posredi su fizički umreženi gelovi. Ovakvi hidrogelovi pružaju reverzibilan odgovor na

promene u okruženju zbog toga što sekundarne veze između polimernih lanaca nisu naročito jake. U odnosu na hemijske, nižeg su stepena uređenosti, krhkiji su, te mehanički slabi pri izlaganju spoljašnjim uticajima i obično se rastvaraju u organskim rastvaračima [27]. Premda fizičko umrežavanje nije permanento po prirodi, dovoljno je jako da obezbedi nerastvorljivost hidrogelova u vodenoj sredini [32].

Hemijski hidrogelovi se mogu dobiti postupkom trodimenzionalne polimerizacije (slika 1.a), koji podrazumeva polimerizaciju hidrofilnog monomera u prisustvu agensa za umrežavanje, ili direktnim umrežavanjem vodorastvornih polimera (slika 1.b).



Slika 1. Sinteza hidrogelova a) trodimenzionalnom polimerizacijom; b) direktnim umrežavanjem polimera (prilagođeno iz [20]).

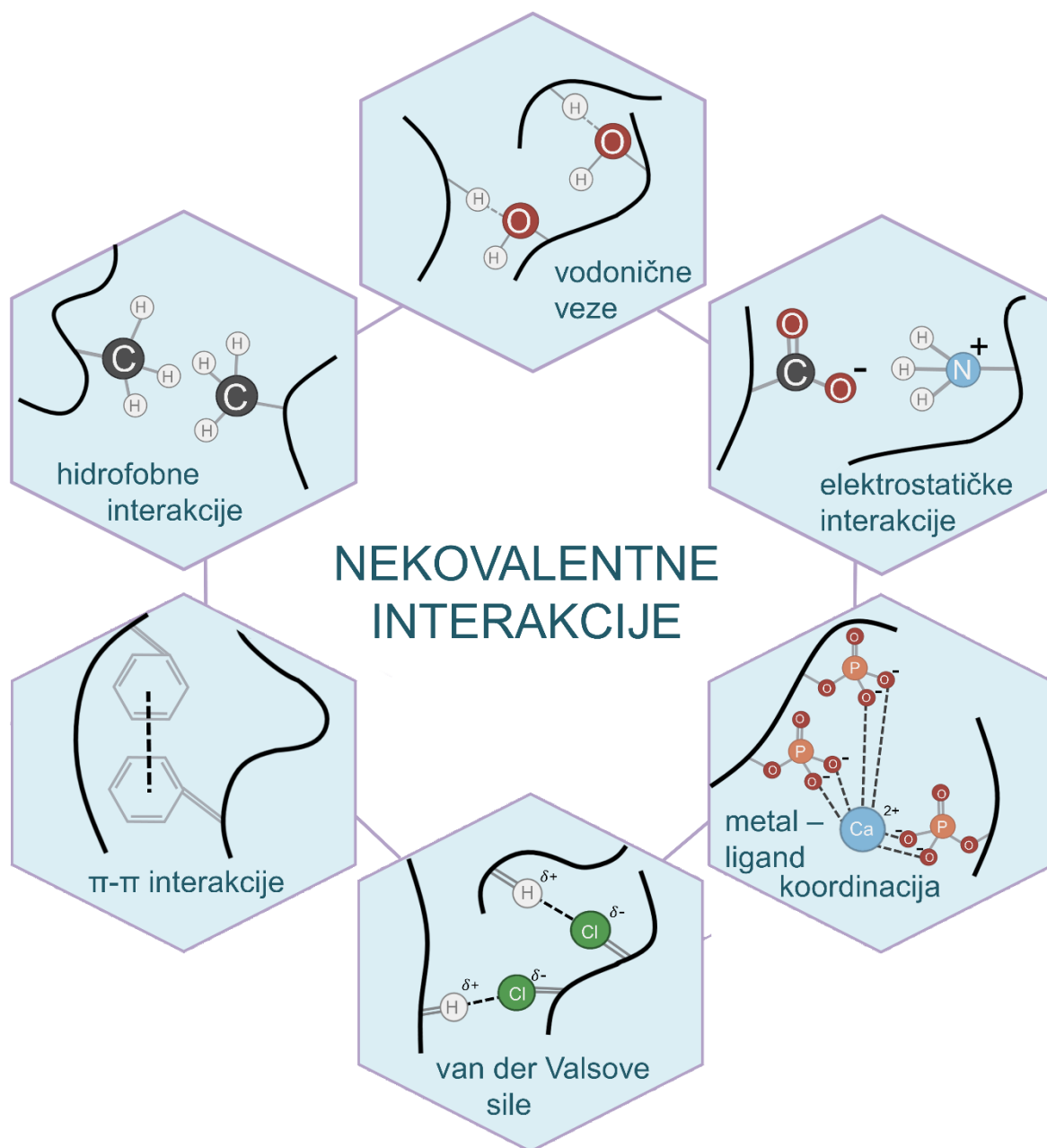
Polimerizacija najčešće započinje formiranjem radikalskog aktivnog centra, za šta se kao inicijatori koriste benzoil peroksid, 2,2'-azo-bis(izobutironitril), kalijum persulfat, amonijum persulfat, premda može biti inicirana i dejstvom ultraljubičastog zračenja, kao i visokoenergetskog rendgenskog zračenja, γ -zračenja ili snopa elektrona [20,27]. Lančana radikalska polimerizacija se odigrava kroz faze inicijacije, propagacije i terminacije. Po generisanju radikalskog centra u fazi inicijacije, tokom propagacije se monomeri dodaju na aktivni centar poput karika lanca, sve do prekida rasta lanca u reakciji terminacije [32]. Jedinjenja koja poseduju dvostruke C=C veze su pogodni prekursori za sintezu hidrogelova, pa se tako vinilni monomeri obično koriste za dobijanje polimernih gelova jednostavnom metodom radikalske polimerizacije, pri čemu se kao agensi za umrežavanje upotrebljavaju supstance poput N,N'-metilenbis(akrilamida) i etilen-glikol dimetakrilata [27,33]. Česta je pojava da se trodimenzionalnom polimerizacijom dobiju materijali koji sadrže značajnu količinu zaostalog monomera, te je neophodno izvršiti prečišćavanje zbog toksičnosti neizreagovanih monomera koji se mogu kontinualno ispuštati iz hidrogelova [20].

Direktno umrežavanje polimernih lanaca zahteva upotrebu monofunkcionalnih ili bifunkcionalnih agenasa poput formaldehida, glutaraldehida, genipina, premda se biokompatibilnost pomenutih jedinjenja dovodi u pitanje [27,34]. Kako bi se izbeglo uvođenje agenasa za umrežavanje, polimeri se mogu funkcionalizovati odgovarajućim funkcionalnim grupama radi daljeg formiranja hidrogelova *in situ* kroz neku od klasičnih metoda, koje uključuju Dils-Alderovu reakciju, mehanizam nastanka Šifove baze, Majklovu adiciju [27,35]. Pomenuti reakcioni procesi pripadaju domenu tzv. „klik hemije“, te obezbeđuju specifičnost, selektivnost, visok prinos pri blagim reakcionim uslovima uz redukciju nusprodukata [35]. Uprkos navedenim pogodnostima, sinteza hidrogelova izvodi se u više koraka, zahteva prečišćavanje, a postupak funkcionalizacije reaktivnim grupama može učiniti polimer citotoksičnim [27].

Jedan od načina da se izbegne dugotrajan proces prečišćavanja i upotreba toksičnih reagenasa (inicijatora i agenasa za umrežavanje) je radijaciona polimerizacija, koja omogućava umrežavanje i sterilizaciju materijala u jednom koraku [20,32,34]. Radijaciona polimerizacija podrazumeva upotrebu visokoenergetskog zračenja, prvenstveno γ -zračenja ili snopa elektrona, za umrežavanje vodorastvornih monomera ili pak povezivanje krajeva polimernih lanaca. Hidroksilni radikali nastali radiolizom vode iniciraju radikalsku polimerizaciju vinilnih monomera uz formiranje hidrogela po dostizanju kritične tačke geliranja, ili stupaju u interakciju sa polimernim lancima formirajući makroradikale, koji kroz inter- i intra-molekulske veze najzad daju kovalentno povezanu mrežu hidrogela [32,34]. Ipak, treba imati u vidu da se ova metoda ne može efikasno primeniti za sintezu hidrogelova na bazi prirodnih polimera s obzirom na to da će pod dejstvom zračenja pre doći do kidanja polimernih lanaca nego do formiranja gela dobro definisane mrežne strukture [34].

Stoga se prirodni polimeri češće podvrgavaju postupcima fizičkog umrežavanja, koje se ostvaruje kroz supramolekulske interakcije, vodonične veze, hidrofobne interakcije, van der Valsove sile, elektrostatičke interakcije, π - π interakcije, koordinaciju metal-ligand (slika 2) [36]. Osim što se na ovaj način zaobilazi upotreba toksičnih inicijatora i umreživača, kao potencijalna prednost supramolekulskih hidrogelova, pre svega za primenu u isporuci lekova, izdvaja se njihova sposobnost reverzibilnih promena stanja kao odgovor na spoljne stimulse, kao što su temperatura, jonska jačina, pH, mehanički stres ili svetlost [37].

Uspostavljanje jonskih/elektrostatičkih interakcija jedan je od osnovnih načina reverzibilnog povezivanja naelektrisanih makromolekula. Tako se dodatkom dvovalentnih jona kao što su Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} prekursorskom rastvoru, postiže umrežavanje anjonskog polisaharida alginata [35]. Hidrogelovi se mogu dobiti i formiranjem polielektrolitnih kompleksa kroz elektrostatičke interakcije između protonovanih amino grupa hitozana i negativno naelektrisanih grupa anjonskih polielektrolita poput pektina, hondroitin sulfata, hijaluronske kiseline. U ovom slučaju je pH vrednost rastvora najvažniji faktor koji utiče na reakciju umrežavanja, te određuje gustinu umreženja i poroznost hidrogela [38]. Ipak, proces geliranja prirodnih hidrogelova je obično diktiran promenama temperature [39].



Slika 2. Prikaz supramolekulskih (nekovalentnih) interakcija koje učestvuju u formiranju hidrogelova.

Mnogi globularni proteini imaju sposobnost da formiraju gelove, bilo podvrgavani tretmanima zagrevanja ili hlađenja [40]. Kod ovakvih postupaka preduslov za formiranje gela jeste da pri datoj temperaturi dolazi do denaturacije proteina [41]. Naime, u određenim uslovima nativni proteini trpe konformacione promene kada dolazi do delimičnog odvijanja ili potpunog narušavanja strukture, što može rezultovati njihovom agregacijom i eventualno geliranjem iznad kritične proteinske koncentracije. Agregacija proteina je složen proces koji podrazumeva delimično odvijanje proteina do uspostavljanja stanja tzv. topljene globule ili drugih intermedijernih stanja, koja zavise od faktora sredine, mogu obrazovati amorfne agregate i fibrile. U zavisnosti od koncentracije proteina, pH i temperature, ove forme mogu izgrađivati proteinske hidrogelove [40].

Za dobijanje albuminskih hidrogelova se najčešće primenjuje metoda termalne sinteze, koja podrazumeva zagrevanje prekursorskih rastvora albumina preko 65 °C, temperature pri kojoj započinje njegova denaturacija [42]. Povećanje temperature izaziva konformacione promene proteina

uz odvijanje segmenata polipeptidnog lanca, što je dalje praćeno protein–protein interakcijama i rezultujućom agregacijom albumina [40,41]. Tokom prve faze geliranja, povezane sa denaturacijom, protein prelazi iz native forme u progel stanje, pri čemu funkcionalne grupe uključene u intramolekulske vodonične veze i elektrostatičke interakcije, postaju dostupne za intermolekulske povezivanje. Posebno je izlaganje hidrofobnih grupa značajno jer dovodi do uspostavljanja hidrofobnih interakcija neophodnih za agregaciju i umrežavanje [41]. Određene promene koje se dešavaju na nivou sekundarne strukture proteina, te mehanizmi izgrađivanja mreže iz pojedinačnih molekula diktiraju kakva će biti tekstura gela. Tokom zagrevanja albumina dolazi do konverzije iz α -heliksa u antiparalelne intermolekulske β -ploče uz obrazovanje supramolekulskih agregata [40,41]. Pokazano je da sa porastom temperature preko 65 °C, raste i stepen odvijanja polipeptida i agregacije. S druge strane, temperaturu denaturacije moguće je sniziti dodatkom jona ili redoks reagenasa, ili promenom pH vrednosti [42].

Metoda pH sinteze se takođe primenjuje za pripremu albuminskih hidrogelova. Uobičajeni postupak podrazumeva značajno snižavanje pH vrednosti, što je praćeno inkubiranjem na 37 °C. Pri tome albumin prelazi iz neutralne izoforme N u F-izofornu, uz izlaganje hidrofobnih regiona proteina rastvaraču, te uspostavljanje hidrofobnih interakcija ključnih za samoorganizovanje u mrežnu strukturu hidrogela. Pored jednostavne sinteze, treba imati u vidu da je neizostavan korak pre implantacije u živi organizam neutralizacija pH-indukovanih hidrogelova [42,43]. U pojedinim studijama su kombinovane pH i termalna sinteza, pri čemu je utvrđeno da SA može gelirati u širokom opsegu pH i temperature [44,45].

Albuminski hidrogelovi se mogu dobiti i metodom hemijskog umrežavanja. Dodatkom redukujućeg agensa u prekursorski rastvor albumina dolazi do raskidanja intramolekulskih disulfidnih mostova, da bi re-oksidacija slobodnih tiolnih grupa dovela do uspostavljanja intermolekulskih S–S veza i formiranja polimerne mreže [46,47]. Hidrogelovi na bazi albumina se još mogu dobiti korišćenjem umreživača poput epihlorohidrina [48] i glutaraldehida [49]. Iako ovi reagensi omogućavaju umrežavanje i doprinose stabilnosti hidrogela, njihova toksičnost je veoma zabrinjavajuća [46]. Čest je i postupak kopolimerizacije albumina sa PEG-om [50]. Radi formiranja PEG–albumin kompleksa neophodna je aktivacija PEG-a pomoću jedinjenja kao što je 4-nitrofenil-hloroformat, ili funkcionalizacija PEG molekula koja obezbeđuje da se specifično ciljaju određena mesta u proteinu. Ipak, klinička primena PEG–albumin hidrogelova je limitirana problemom imunogenosti. Premda je poznato da je sam albumin slabo imunogen, sve je više dokaza da PEG nije bioinertan. Naime, upotreba PEG-a je u izvesnim slučajevima povezana sa smanjenom efikasnošću leka, blagim do umerenim imunološkim reakcijama i neželjenim dejstvima [42,51].

Na osnovu svega navedenog, u pogledu biokompatibilnosti, termalno-indukovani hidrogelovi se mogu smatrati najpouzdanijim za primenu u isporuci lekova, što je jedan od razloga izbora metode termalne sinteze u razvoju nosača antikancerskog leka u ovoj studiji.

2.1.2. Karakterizacija hidrogelova za primenu u isporuci lekova

Poroznost je važna karakteristika hidrogelova koja se može fino podesiti preko kontrole gustine umreženja. Upravo zahvaljujući poroznoj strukturi, hidrogelovi predstavljaju pogodnu matricu u koju je moguće uvesti lek, koji se potom kroz različite mehanizme može i otpustiti. Prednost primene hidrogelova u isporuci lekova leži u mogućnosti produženog oslobađanja, te održavanja visoke lokalne koncentracije aktivne supstancije duži vremenski period [20]. Lek inkorporiran unutar matrice hidrogela tokom sinteze, što je najčešće slučaj, postepeno se oslobađa u okolni medijum kako hidrogel apsorbuje vodu tokom procesa bubrenja [52]. Otpuštanje leka iz hidrogela može biti ostvareno kroz hemijski kontrolisan proces koji podrazumeva kidanje polimernih lanaca usled hidrolitičke ili enzimske degradacije, mehanizam kontrolisan difuzijom, koji preovladava kada je proces bubrenja brži od difuzije molekula, ili mehanizam kontrolisan bubrenjem, dominantan u slučaju

kada molekul difunduje iz hidrogela brže no što hidrogel bubri [20,53]. Izuzetno, lek može biti oslobođen i kao rezultat odgovora na promene u okruženju [15].

Proces difuzije je prevashodno regulisan dimenzijama pora u matrici hidrogela, što odgovara međuprostoru između polimernih lanaca koji ispunjava voda [4,53]. Kao mera veličine pora se koristi tzv. prosečna korelaciona dužina lanca u nabubrelom stanju ravnoteže ξ , definisana kao linearno rastojanje između dva susedna čvora mreže [54]. Kada su pore hidrogela veće od dimenzija leka, mali molekuli leka slobodno migriraju kroz mrežu hidrogela, te je proces otpuštanja diktiran nesmetanom difuzijom molekula. U ovom slučaju naime, difuzioni koeficijent zavisi od hidrodinamičkog radijusa molekula r i viskoznosti rastvora η , prema Stoks-Ajnštajnovoj relaciji [4,55]:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}, \quad (1)$$

u kojoj je k_B Bolcmanova konstanta, a T apsolutna temperatura.

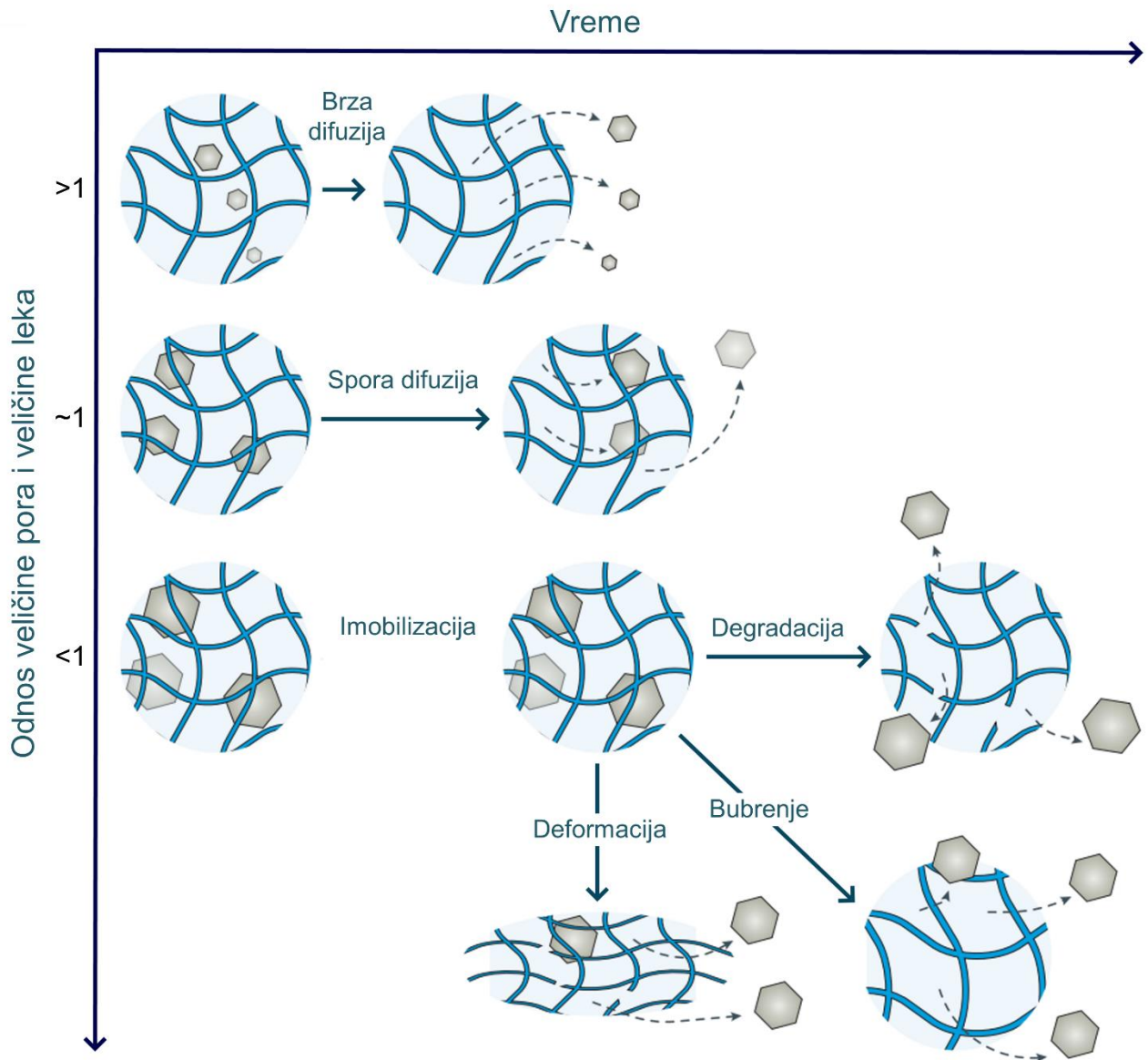
Kada su veličine pora i molekula leka uporedive, do izražaja dolazi uticaj sternih smetnji na difuziju leka, te polimerni lanci trenjem otežavaju difuziju molekula. Povećanjem koncentracije polimera ili umreživača, ukoliko se koristi, može se postići smanjenje dimenzija pora, a sveukupni rezultat je sporija difuzija, te produženo oslobađanje leka.

U slučaju ekstremno malih pora ili pak izuzetno velikih molekula lekova, dolazi do značajne imobilizacije leka unutar polimerne mreže. Lek ostaje fizički zarobljen unutar matrice sve dok se pore ne prošire tokom procesa bubrenja, degradacije ili mehaničke deformacije mreže. Kako hidrogel bubri, tako se pore šire sve do uspostavljanja ravnoteže između osmotskih sila odgovornih za apsorpciju vode i elastičnih sila koje se suprotstavljaju deformaciji polimernih lanaca. Bubrenje može biti potpomognuto i različitim stimulansima, te zavisi od temperature, pH vrednosti i jonske jačine rastvora, prisustva glukoze, dejstva svetlosti ili električnog polja.

Postoji mogućnost da se lek iz polimerne matrice oslobodi tokom degradacije hidrogela, bilo da se proces dešava duž glavnog lanca ili poprečnih veza. Obično je narušavanje mrežne strukture podstaknuto hidrolizom ili dejstvom enzima.

Mreža takođe može biti proširena usled delovanja ultrazvuka, magnetnog polja ili čisto mehaničkom deformacijom, te na taj način lek biti oslobođen iz hidrogela.

Kontrolisano otpuštanje moguće je postići dizajniranjem sistema za isporuku tako da se između polimernog nosača i leka uspostavlja interakcije, bilo kovalentne veze ili sekundarne interakcije poput elektrostatičkih i hidrofobnih. Ovaj princip se primenjuje u cilju usporavanja otpuštanja malih molekula koji bi inače mogli brzo difundovati iz polimerne mreže. Zavisno od jačine interakcija može se podesiti i da oslobađanje leka bude odloženo sve do degradacije hidrogela [4].



Slika 3. Prikaz procesa oslobađanja leka određenog veličinom pora hidrogela (prilagođeno iz [4]).

Postoje tri fundamentalne teorije na osnovu kojih se struktura polimerne mreže koja bubri korelira sa njenim fizičkim svojstvima. Teorija gumolike elastičnosti strukturu povezuje sa krutosti hidrogela, teorija ravnotežnog bubrenja, sa bubrenjem u rastvaraču, a teorija o veličini pora, sa difuzivnošću rastvorka [55].

Prema teoriji gumolike elastičnosti, krutost polimerne mreže proističe iz smanjenja entropije pri širenju namotanih polimernih lanaca u mreži, te redukovanja broja dostupnih konformacija. Prema jednačini 2. moduo smicanja se može proceniti na osnovu broja polimernih lanaca u proizvoljnoj mreži pod bilo kojom vrstom deformacije, ali praktična primena na hidrogelove zahteva korekcije uzimajući u obzir bubrenje, nesavršenosti mreže i funkcionalnost čvorova mreže s obzirom na to da nisu sve mreže tetrafunkcionalne.

$$G = \nu RT \quad (2)$$

U jednačini 2, G je moduo smicanja polimerne mreže, v broj polimernih lanaca u mreži, R idealna gasna konstanta, a T apsolutna temperatura.

Teorijom ravnotežnog bubrenja procenjuje se količina rastvarača sadržana u nabubreloj polimernoj matrici na osnovu nezavisnih doprinosa slobodne energije. Flori-Rehnerova jednačina (jednačina 3) predstavlja prvi kvalitativni model ove teorije, baziran na poređenju entropijskog doprinosa mešanja polimera i rastvarača sa elastičnom energijom koja proizilazi iz bubrenja polimerne mreže u rastvaraču.

$$\frac{1}{\overline{M}_C} = \frac{2}{\overline{M}_n} = \frac{\ln(1 - \varphi_s) + \varphi_s + \chi\varphi_s^2}{V_1\rho_D \left(\varphi_s^{\frac{1}{3}} - \frac{\varphi_s}{2} \right)} \quad (3)$$

U jednačini 3, \overline{M}_C je srednja molekulska masa između čvorova mreže, odnosno \overline{M}_n srednja molekulska masa neumreženog polimera, φ_s je zapreminski udeo polimera u ravnotežnom nabubrelom stanju, χ polimer–rastvarač parametar interakcije, V_1 molarna zapremina rastvarača, ρ_D gustina suve polimerne matrice.

Izvesna poboljšanja u okviru teorije gumolike elastičnosti postignuta su uzimanjem u obzir uticaja zapleta i funkcionalnosti tačaka umreženja, kao i defekata mreže, uz kombinovanje sa teorijom ravnotežnog bubrenja uključujući elastične deformacije usled bubrenja iz relaksiranog stanja do ravnotežnog nabubrelog stanja. Prema korigovanom modelu, izraženom jednačinom 4, moduo smicanja se može proceniti na osnovu podataka o bubrenju hidrogela i poznavanjem strukturnih parametara.

$$G = RT \left(1 - \frac{2}{f} \right) (1 - \gamma) \frac{\rho_D}{\overline{M}_C} \varphi_r^{\frac{2}{3}} \varphi_s^{\frac{1}{3}} \quad (4)$$

U jednačini 4 se f odnosi na funkcionalnost čvorova mreže, γ na učestalost defekata na krajevima polimernih lanaca, dok φ_r odgovara zapreminskom udelu polimera u relaksiranom stanju [28,55].

Što se tiče revizije teorije ravnotežnog bubrenja, uzima se u obzir uticaj prisustva rastvarača na promenu elastičnog hemijskog potencijala, te postojanje relaksiranog stanja pre bubrenja, korekcija parametra interakcije između polimera i rastvarača, koja uključuje i uticaj zapreminskog udela polimera i razliku između polimerne mreže i neumreženih polimernih lanaca. Kada se još uključi i dodatni član hemijskog potencijala koji potiče od jonskih interakcija, dolazi se do poboljšanog modela ove teorija, izraženog jednačinom 5.

$$\frac{1}{\overline{M}_C} = \frac{\ln(1 - \varphi_s) + \varphi_s + \chi\varphi_s^2 - 2V_1 \left[I^2 + \left(\frac{i\varphi_s\rho_D}{2M_r} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}} + 2V_1 I}{-1 * \left(1 - \frac{2}{f} \right) (1 - \gamma) V_1 \rho_D \varphi_r^{\frac{2}{3}} \varphi_s^{\frac{1}{3}}} \quad (5)$$

U gornjoj relaciji se I odnosi na jonsku jačinu rastvora, i na stepen jonizacije, a M_r na molekulsku masu ponavljajuće jedinice polimera [28,55,56].

Primenom teorije veličine pora, stukturna svojstva nabubrele polimerne matrice se koriste za utvrđivanje smanjenja koeficijenata difuzije unutar hidrogela. U skladu sa zapreminskim udelom

polimera je difuzivnost rastvorka u hidrogelu smanjena, ukazujući na mogućnost sudara sa polimernim lancem, te da li je rastojanje između dve tačke umreženja dovoljno veliko za prolazak rastvorka kroz pore mreže. Pojedini konkurentski modeli teorije veličine pora, međutim, ističu različite aspekte interakcija između rastvorka, rastvarača i polimerne matrice, dovodeći do oprečnih procena difuzivnosti rastvorka. Odstupanja su još više izražena merenjem difuzije rastvorka u hidrogelovima različitim eksperimentalnim tehnikama.

Za merenje efektivne difuzivnosti rastvorka u hidrogelu se koriste napredne tehnike fluorescentne mikroskopije, metoda fluorescentnog oporavka nakon fotoizbeljivanja (eng. *fluorescence recovery after photobleaching*, FRAP) i fluorescentna korelaciona spektroskopija (eng. *fluorescence correlation spectroscopy*, FCS). FRAP eksperiment podrazumeva fotoizbeljivanje dela uzorka jakim laserom, te merenje oporavka fluorescencije unutar datog regiona kroz Braunovsko kretanje neizbeljenih fluorescentnih molekula probe u ciljnu oblast. FCS koreliše koeficijente difuzije sa vremenom zadržavanja fluorescentnih čestica koje se kreću kroz malu, ozračenu zapreminu, pa iako manje rasprostranjena u odnosu na FRAP, osetljivija je na mikroheterogenosti u strukturi hidrogela [55,57].

Uprkos tome što je veličina pora ključni strukturni parametar hidrogelova–nosača lekova, koji diktira vreme zadržavanja molekula unutar hidrogela [54], do danas praktično nijedna tehnika ne pruža mogućnost direktnog merenja veličine pora bez uklanjanja rastvarača iz sistema. Najdostupniji metod za procenu ove veličine je baziran na interpretaciji rezultata dobijenih u eksperimentima bubrenja, uključujući primenu tzv. Kenal-Pepasove jednačine [58]:

$$\xi = \varphi_s^{-\frac{1}{3}} \left(l^2 C_n \frac{2\overline{M}_c}{M_r} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (6)$$

u kojoj je l dužina C–C veze u polimernom lancu, C_n karakteristični odnos specifičan za polimerni lanac od n ponavljajućih jedinica. U unapređenoj verziji ove relacije uzima se u obzir funkcionalnost čvorova mreže i korekcija za nevinilne polimere tako što se C_n zamenjuje se C_∞ , koje se odnosi na dovoljno dugački polimerni lanac, a umesto l se javlja usrednjena dužina veze po ponavljajućoj jedinici, \bar{l} , dok se 2 zamenjuje faktorom veze λ (jednačina 7):

$$\xi = \varphi^{-\frac{1}{3}} \left(\left(1 - \frac{2}{f} \right) \bar{l}^2 C_\infty \frac{\lambda \overline{M}_c}{M_r} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (7)$$

Procena parametara mreže na osnovu pomenutih hipoteza uključuje brojne pretpostavke i generalizacije, pa je njena primenljivost, pre svega na hidrogelove na bazi biopolimera, upitna.

2.1.2.1. Ispitivanje morfoloških karakteristika hidrogelova

Za ispitivanje morfoloških karakteristika supramolekulskih hidrogelova zasnovanih na nekovalentnim interakcijama, ali i hidrogelova uopšte, primenjuju se različite difrakcione i mikroskopske tehnike [59]. Metodama rasejanja X-zraka (eng. *small angle X-ray scattering*, SAXS) ili neutrona na malim uglovima (eng. *small angle neutron scattering*, SANS) posredno je moguće dobiti informacije o strukturnim karakteristikama na skali 1–1000 nm, pri čemu je SANS pogodniji

u odnosu na SAXS za analizu mekih hidrogelova zbog potencijalnih oštećenja izazvanih zračenjem. Glavna prednost ovih tehnika ogleda se u tome što se hidrogelovi mogu ispitivati u nabubrelom stanju bez potrebe za uklanjanjem vode, kao i u prikupljanju rezultata iz velike zapremine uzorka dajući dobru statistiku, dok je nedostatak neophodnost opširnog modelovanja podataka koje zahteva izvesno predznanje ili pretpostavke o strukturi hidrogela [60].

Elektronskom mikroskopijom se može direktno analizirati struktura hidrogelova sa veoma dobrom prostornom rezolucijom, do 2 nm kod skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM), odnosno 0,2 nm kod transmisiona elektronske mikroskopije (TEM). Dubina SEM snimanja ide i do nekoliko mikrometara, dok je za TEM neophodno da uzorak bude veoma tanak, debljine do 100 nm [60]. Ipak, priprema ovako tankih uzoraka bez pojave artefakata je praktično nemoguća što ograničava primenu TEM-a u ispitivanju hidrogelova [61].

SEM je najrasprostranjenija metoda za karakterizaciju mikroarhitekture hidrogela. SEM slike se koriste za procenu veličine pora, distribucije pora, procenta poroznosti, kao i debljine i orijentacije mrežnih vlakana [62]. Ipak, standardni SEM eksperiment se izvodi pod visokim vakuumom i potrebno je da uzorak bude suv, te priprema hidrogela za snimanje podrazumeva proces liofilizacije, koji može uticati na njegova morfološka svojstva [61,62], što je i pokazala studija u kojoj je prosečna veličina pora matrica na bazi kolagena i hijaluronske kiseline varirala od 230 nm, preko 80 nm, do 40 nm, zavisno od toga da li je temperatura zamrzavanja pri sušenju iznosila $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, redom [63]. Očuvanje bioloških struktura u izvesnoj meri postiže se brzim zamrzavanjem uzorka. Metodom vitrifikacije hidrogelova u tečnom azotu ili tečnom etanu sprečava se formiranje kristala vode, uz dobijanje staklastih struktura [62,64]. Premda se snimanjem na kriogenim temperaturama (obično ispod $-145\text{ }^{\circ}\text{C}$) mogu dobiti pouzdaniji rezultati u pogledu dimenzija pora i poroznosti u odnosu na konvencionalno SEM snimanje, izvesna ograničenja krio-SEM-a proističu iz faze pripreme uzorka. Naime, uspešnost procesa vitrifikacije zavisi od brzine zamrzavanja i kod uzoraka debljih od $10\text{ }\mu\text{m}$ je teško dostižna. Pri lošoj krio-fiksaciji stvaraju se heksagonalni kristali leda pri čemu dolazi do narušavanja strukture polimerne mreže [61,62]. Tehnika ambijentalne skenirajuće elektronske mikroskopije (eng. *environmental scanning electron microscopy*, ESEM) omogućava vizualizaciju morfologije hidrogelova u nativnom stanju, uz izbegavanje koraka zamrzavanja, pa je u tom smislu ovaj metod snimanja pogodniji za analizu bioloških uzoraka koji sadrže vodu. Nedostatak je lošija rezolucija u odnosu na klasično snimanje, kao i gotovo neizbežna kondenzacija na površini uzorka koja ometa vizualizaciju. Osim toga, vidno polje je ograničeno na svega $500\text{ }\mu\text{m} \times 500\text{ }\mu\text{m}$, tako da se može dobiti slika samo male površine hidrogela [62,65].

Što se ostalih mikroskopskih tehnika tiče, primena konfokalne mikroskopije u karakterizaciji hidrogelova je limitirana lošom prostornom rezolucijom ($> 1\text{ }\mu\text{m}$), premda se u kombinaciji sa praćenjem transporta fluorescentnih proba unutar hidrogela, indirektno može proceniti veličina pora [4]. Ograničena primena mikroskopije atomskih sila (eng. *atomic force microscopy*, AFM) uglavnom proističe iz hrapavosti površine hidrogelova i mekoće materijala, koji sami mogu biti modifikovani ili pak uništeni oštrim vrhom sonde, posebno u kontaktnom režimu. Najčešće je potrebno preliminarno poznavanje topografije uzorka i njegovih mehaničkih svojstava kako bi se podesili adekvatni parametri merenja i izabrao optimalni vrh sonde [66].

Najzad, može se zaključiti da nijedna tehnika ne obezbeđuje dovoljno informacija za kompletnu karakterizaciju morfoloških karakteristika hidrogelova u pogledu veličine i distribucije pora. Iako elektronska mikroskopija pruža izvestan uvid u morfološka svojstva gelova, treba imati u vidu da se dobijeni podaci odnose samo na malu lokalizovanu regiju [60]. Stoga se u slučaju neizbežnih heterogenosti u strukturi mreže, pre svega kod hidrogelova dobijenih fizičkim umrežavanjem, ne može dobiti celokupna slika o mrežnoj strukturi, te poroznosti hidrogela.

U tom smislu, određivanje količine vode unutar pora gela pre nego veličine samih pora bi se moglo smatrati pogodnijim. Voda koja ispunjava pore hidrogela, određujući kinetiku difuzije aktivne supstancije, ključna je za kontrolisanu isporuku lekova [3]. Uprkos važnosti ove karakteristike hidrogelova, među brojnim publikacijama na temu njihove sinteze, karakterizacije i aplikacije, svega

nekolicina se dotiče metoda za određivanje ukupnog sadržaja vode u gelu. Nuklearna magnetna rezonantna (NMR) spektroskopija [67,68] i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (eng. *differential scanning calorimetry*, DSC) [69,70] uobičajeno se koriste za analizu vezane i nevezane vode u hidrogelu, dok je gravimetrijska analiza i dalje neprevaziđena tehnika u pogledu procene ukupne količine vode [71,72]. Protonskom NMR spektroskopijom mogu se razlikovati slobodna voda, okarakterisana dugačkim vremenom relaksacije, i vezana voda, s kraćim vremenom relaksacije, oba doprinoseći ukupnoj brzini relaksacije zavisno od količine vode u ova dva stanja [73]. Kod DSC eksperimenata, polazeći od pretpostavke da čvrsto vezana voda ne može biti zamrznuta, udeo vode koja mrzne, uključujući slobodnu i slabo vezanu vodu, određuje se iz entalpija topljenja, dok se količina vode jako vezane za molekule polimera preko vodonične veze, dobija iz razlike izmerenog – ukupnog i izračunatog sadržaja slobodne vode [74].

Neizostavni deo ovakvih studija o hidrogelovima predstavlja ispitivanje njihovog ponašanja prilikom bubrenja, što podrazumeva praćenje porasta mase hidrogela tokom procesa upijanja vode/rastvarača i određivanje sadržaja vode u gelu po dostizanju ravnoteže [75,76].

$$\text{Stepen bubrenja (\%)} = \frac{m - m_0}{m_0} \cdot 100 \quad (8)$$

U jednačini 8 je m masa nabubrelog gela, a m_0 masa suvog gela. Ipak, postupak gravimetrijskog merenja mase gela pre i posle bubrenja može biti nepraktičan i potencijalno uneti veliku grešku u rezultat zavisno od udela vode i veličine uzroka [77]. Ukupnu količinu vode u hidrogelu je moguće odrediti i primenom termogravimetrijske analize (TGA), međutim eksperiment podrazumeva praćenje gubitka mase sa porastom temperature, tako da je zagrevanje uzorka neophodno [78]. Alternativni pristupi usmereni su na praćenje promena indukovanih u medijumu za bubrenje umesto u hidrogelu, pri čemu se bubrenje ne odigrava u čistoj vodi već u razblaženom vodenom rastvoru odgovarajuće supstancije. U jednom od postupaka u kom se koristi *Blue Dextran* princip je u merenju porasta apsorbancije rastvora kako hidrogel upija vodu iz okolnog medijuma, dok se koncentracija datog jedinjenja, koje ne ulazi u pore hidrogela, u rastvoru povećava [77]. Ipak, ovakve metode nisu ušle u široku primenu.

Otuda potreba za uvođenjem nove, jednostavne i pouzdane metode za utvrđivanje celokupnog sadržaja vode u hidrogelu. U ovom radu je za te potrebe razvijan novi pristup baziran na EPR spektroskopiji u sprezi sa adekvatnom spinskom probom kao indikatorom.

2.2. Elektronska paramagnetna rezonancija

Otkriće fenomena elektronske paramagnetne rezonancije pripisuje se sovjetskom fizičaru Jevgeniju Konstantinoviču Zavojskom. Podstaknut eksperimentima Gortera o paramagnetnoj relaksaciji u čvrstim solima, koji je takođe pokušavao da odredi i nuklearne magnetne momente, Zavojski je pokrenuo sopstveno istraživanje isprva usmereno na nuklearnu magnetnu rezonanciju. Premda je dobio obećavajuće rezultate, Drugi svetski rat ga je omeo u nastavku studije. Dve godine kasnije Zavojski je uspeo da ponovo započne sopstveni istraživački rad, te je 1944. godine uspešno detektovao EPR spektar u kristalohidratima paramagnetnih soli $MnSO_4 \cdot nH_2O$ i $CuSO_4 \cdot nH_2O$ na Kazanjskom državnom univerzitetu, SSSR [79,80]. Iako su prvobitno njegovi rezultati izazvali sumnje kod sovjetskih naučnika, otkriće Zavojskog se ubrzo pokazalo kao revolucionarno, a on proglašen „ocem“ EPR spektroskopije [80,81].

Počev od razvoja EPR-a u domenu fizike na osnovu izučavanja paramagnetnih metala i njihovih kompleksa, stiglo se do studija o metaloproteinima, koje su predstavljale pravi izazov u ranim godinama rada sa konvencionalnim uređajima. Procvat EPR-a u oblasti biomedicine započet je uvođenjem tehnike spinskog obeležavanja pre nešto više od 50 godina. Od primena u ispitivanju proteina, membrana i nukleinskih kiselina, preko *in vitro* studija na ćelijama, do *in vivo* studija na malim životinjama, a danas čak i na ljudima, EPR je postepeno prepoznat kao moćna tehnika za izučavanje biomakromolekula i njihovih interakcija, biologije slobodnih radikala, a najzad čak i njegov dijagnostički potencijal [81].

2.2.1. Osnovni principi EPR spektroskopije

Magnetizam je rezultat kretanja naelektrisanih čestica. Kao što makroskopski gledano protok struje kroz provodnik indukuje magnetno polje normalno na ravan provodnika, na mikroskopskom nivou, negativno naelektrisana čestica u kretanju generiše magnetni moment $\vec{\mu}$, antiparalelan vektoru ugaonog momenta \vec{I} (slika 4.a). Premda slobodni elektroni ne kruže, poseduju sopstveni mehanički moment, tzv. spin \vec{s} , i njemu pridruženi spinski magnetni moment $\vec{\mu}_s$:

$$\vec{\mu}_s = -g_e \mu_B \vec{s} \quad (9)$$

U jednačini 9, g_e predstavlja g-faktor slobodnog elektrona (2,0023193), a μ_B Borov magneton ($9,27 \cdot 10^{-24}$ J/T) [82]. Spinski ugaoni moment, te i spinski magnetni moment, kvantovani su spinskim kvantnim brojem s koji ima stalnu vrednost 1/2 [83].

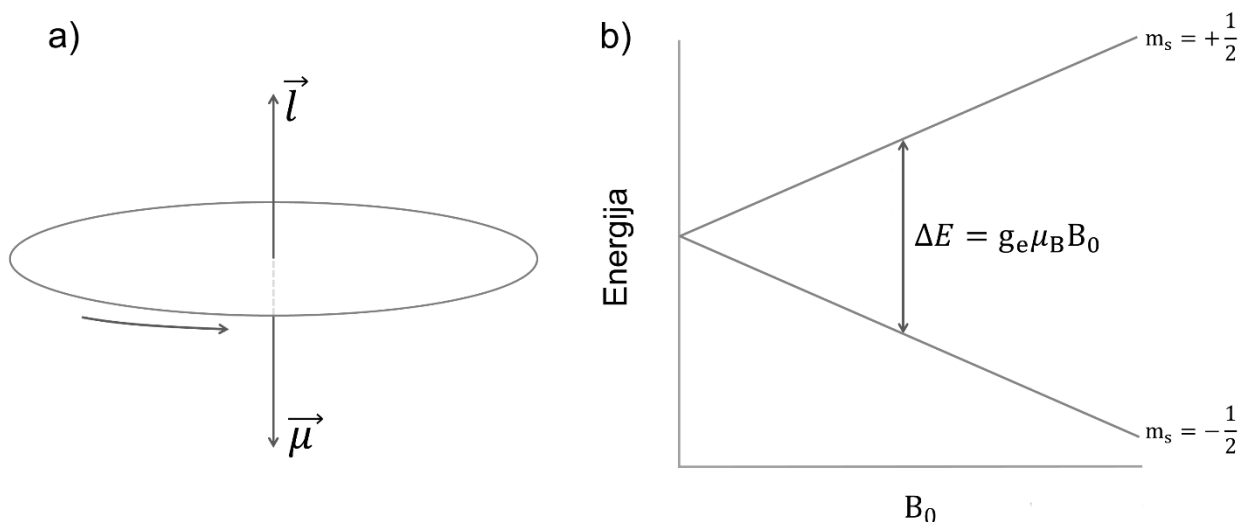
$$\mu_s = -g_e \mu_B \sqrt{s(s+1)} \quad (10)$$

Vezani elektroni poseduju ujedno i spinski i orbitalni ugaoni moment koji zajedno doprinose magnetnom momentu. Međutim, u lakim atomima i organskim molekulima je orbitalni ugaoni moment mali, te se podrazumeva da je magnetni moment pridružen spinskom ugaonom momentu [82].

Elektron se u spoljašnjem magnetnom polju ponaša kao sićušni magnet, a vektor magnetnog momenta elektrona se postavlja tako da njegova projekcija duž pravca polja (z-ose) ima vrednost:

$$\mu_z = -g_e \mu_B m_s \quad (11)$$

m_s je magnetni spinski kvantni broj koji može imati vrednosti od $-s$ do $+s$, tj. $\pm 1/2$. Stoga za magnetni moment elektrona postoje dve moguće orijentacije u spoljašnjem magnetnom polju, paralelna koja odgovara vrednosti $m_s = 1/2$, i antiparalelna koja odgovara vrednosti $m_s = -1/2$.



Slika 4. a) Magnetni i ugaoni moment negativno naelektrisanе rotirajuće čestice; b) Zemanovi energijski nivoi slobodnog elektrona.

Za višeelektronske sisteme oznake za kvantne brojeve s i m_s mogu se zameniti sa S i M_S .

U prisustvu magnetnog polja \vec{B} , energija interakcije polja i magnetnog momenta nesparenih elektrona zavisi od relativne orijentacije vektora $\vec{\mu}$ i \vec{B} , i izražava se kao:

$$E = -\mu_z B_0 = g \mu_B M_S B_0, \quad (12)$$

gde je B_0 intenzitet spoljašnjeg magnetnog polja. Oznaka g koristi se kada elektron interaguje sa drugim česticama, za $g \neq g_e$ najčešće usled spin-orbitalne interakcije [84].

U spoljašnjem magnetnom polju dolazi do cepanja spinskih nivoa datog S usled ukidanja degeneracije po kvantnom broju M_S . Izborno pravilo za prelaze između spinskih nivoa je $\Delta M_S = \pm 1$. Sistem sa jednim nesparenim elektronom u magnetnom polju ima dva energijska stanja, $E_+ = +\frac{1}{2} g \mu_B B_0$ (α stanje) i $E_- = -\frac{1}{2} g \mu_B B_0$ (β stanje). Na slici 4.b su prikazani energijski nivoi slobodnog elektrona u magnetnom polju. Interakcija između magnetnog momenta i polja poznata je kao Zemanova interakcija. Osnovni princip EPR spektroskopije podrazumeva merenje apsorpcije elektromagnetnog zračenja kao rezultat prelaza između Zemanovih energijskih nivoa, a koji je moguć isključivo kada energija elektromagnetnog zračenja odgovara energiji cepanja indukovanog primenjenim poljem (jednačina 13) [82,83,85].

$$\Delta E = E_+ - E_- = h\nu = g \mu_B B_0 \quad (13)$$

U jednačini 13 je h Plankova konstanta ($6,626 \cdot 10^{-34}$ J·s), a ν frekvencija mikrotalasa (MT).

Kako razlika između dva energijska stanja varira zavisno od jačine spoljašnjeg magnetnog polja (jednačina 13), postoje dva potencijalna pristupa za dobijanje EPR spektra. Prvi način podrazumeva držanje magnetnog polja konstantnim dok se frekvencija elektromagnetnog zračenja menja, analogno principu UV-vis spektroskopije. Iz tehničkih razloga je kod većine EPR spektrometara zastupljen drugi pristup – rad na fiksiranoj frekvenciji elektromagnetnog zračenja koja može biti 1–2 GHz (L-oblast), 2–4 GHz (S-oblast), 8–10 GHz (X-oblast), 35 GHz (Q-oblast) i 95 GHz (W-oblast), pri čemu se rezonantni uslov u tzv. CW (od eng. *continuous wave*)-EPR spektroskopiji postiže promenom jačine spoljašnjeg magnetnog polja [83,85].

U pulsnoj EPR spektroskopiji na uzorak se primenjuje kratak puls elektromagnetnih talasa čime se spinski sistem izvodi iz ravnoteže. Kako se sistem relaksira do termalne ravnoteže, reemituje deo zračenja, što je poznato kao FID (od eng. *free induction decay*, slobodan raspad indukcije). Furijeova transformacija FID signala odgovara apsorpcionom spektru. Prednost izvođenja eksperimenta na ovaj način je što se istovremenim prikupljanjem svih frekvencija smanjuje vreme merenja, a samim tim i šum [82].

2.2.1.1. g -faktor

S obzirom na to da je EPR spektar u CW-EPR spektroskopiji moguće dobiti pri različitim frekvencijama mikrotalasa, rezonantno magnetno polje nije jedinstvena karakteristika koja može pouzdano poslužiti za identifikaciju jedinjenja. Stoga je za karakterizaciju signala bolje koristiti g -vrednost, koja se može smatrati nezavisnom od frekvencije elektromagnetnog zračenja (jednačina 14) [85].

$$g = h\nu/\mu_B B_0 \quad (14)$$

Ipak, treba imati u vidu da se stvarno polje na mestu spinske vrste može razlikovati u odnosu na magnetno polje B_0 primenjeno na sistem spolja. Spoljašnje magnetno polje se vektorski sabira sa lokalnim magnetnim poljem B_{loc} dajući efektivno polje B_{eff} koje elektron oseća:

$$B_{eff} = B_0 + B_{loc} \quad (15)$$

Veza između B_{eff} i B_0 data je relacijom:

$$B_{eff} = (1 - \sigma)B_0 = g/g_e B_0, \quad (16)$$

u kojoj je σ analogno „hemijskom pomeraju“ kod NMR spektroskopije, a g efektivni Zemanov faktor koji se koristi u EPR spektroskopiji. Na ovaj način, g -faktor koji figuriše u jednačinama 12–14 uzima u obzir i delovanjem spoljašnjeg polja indukovana lokalna magnetna polja, koja često proističu iz orbitalnog kretanja elektrona.

Jednostavna formulacija uslova rezonancije $B = h\nu/g\mu_B$ sa pojedinačnom vrednošću parametra g se može primeniti samo na izotropne sisteme, poput paramagnetnih centara kubične simetrije za koje važi da je $g_x = g_y = g_z$ (g_x , g_y , g_z odgovaraju pozicijama spektralne linije pri

magnetnom polju paralelno sa X-, Y-, Z-osom, tj. glavnim osama paramagnetnog sistema). Razblaženi rastvori niskog viskoziteta se ponašaju kao magnetno izotropni sistemi usled brze i nasumične reorijentacije rastvorenih molekula. U tom slučaju prividno izotropni g-faktor proističe iz usrednjavanja vrednosti po svim orijentacijama molekula [84].

U opštem slučaju, g-faktor je anizotropna veličina (tenzor). Naime, orbitale u molekulima nisu sferno simetrične što dovodi do toga da jačina spin-orbitalnog spreznjanja, odnosno doprinos orbitalnog kretanja magnetom momentu, zavisi od orijentacije molekula u spoljašnjem magnetnom polju [82]. Anizotropija g-faktora se može meriti snimanjem EPR spektara monokristala pri njegovoj rotaciji u spoljašnjem magnetnom polju [86]. Za proizvoljno orijentisan molekul je efektivna vrednost g data izrazom:

$$g_{\text{eff}}^2 = g_X^2 \cos^2 \theta_{B,X} + g_Y^2 \cos^2 \theta_{B,Y} + g_Z^2 \cos^2 \theta_{B,Z}, \quad (17)$$

pri čemu su $\theta_{B,X}$, $\theta_{B,Y}$ i $\theta_{B,Z}$ uglovi između vektora magnetnog polja i X-, Y- i Z-osa. Jednačina 17 se dodatno pojednostavljuje za tenzor aksijalne simetrije, kada je $g_X = g_Y \neq g_Z$ (jednačina 18). Vrednost g_Z se dobija u slučaju kada je Z-osa (osa najvišeg reda) paralelna sa vektorom spoljašnjeg magnetnog polja, te se označava sa g_{\parallel} , a vrednosti g_X i g_Y kao g_{\perp} [83,84].

$$g_{\text{eff}}^2 = g_{\parallel}^2 \cos^2 \theta + g_{\perp}^2 \sin^2 \theta \quad (18)$$

Analizom ugaone zavisnosti g-faktora radikalske vrste zarobljene unutar kristalne rešetke mogu se odrediti glavne vrednosti tenzora g kao i prostorni raspored molekula u kristalu [87].

Kada su u pitanju biološki uzorci, monokristali su retko dostupni. EPR spektri praškastih uzoraka dobijaju se superpozicijom spektralnih linija svih monokristala u uzorku, od kojih svaka odgovara pojedinačnoj orijentaciji. Isto važi i za razblažene rastvore u zamrznutom stanju. Međutim, g-anizotropija se može meriti čak i za ovakve uzorke, premda pri posebnim uslovima snimanja u slučaju male anizotropije prisutne kod organskih slobodnih radikala [86].

g-vrednosti mogu koristiti u karakterizaciji pojedinačnih radikalskih vrsta, međutim, to ne mora uvek biti slučaj zbog ponekad neznatnih odstupanja od vrednosti g_e i poteškoća da se tačno teorijski interpretira molekulska struktura. U tom pogledu je daleko važnija izražena multipletna struktura često prisutna u EPR spektrima [87].

2.2.1.2. Multipletna struktura EPR spektra – hiperfina interakcija

Multipletna struktura EPR spektra javlja se kao rezultat interakcije između nesparenog elektrona sa jezgrom u njegovoj blizini, poznate kao hiperfina interakcija [83].

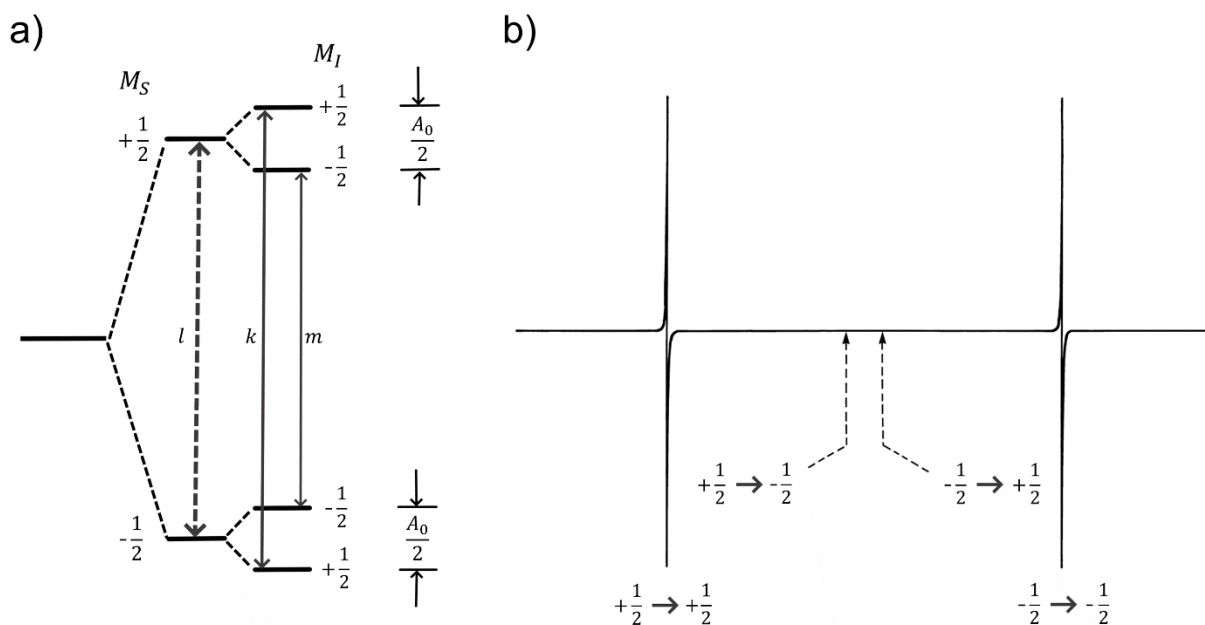
Najjednostavniji sistem kod kog se ispoljava nuklearna hiperfina interakcija jeste atom vodonika, u čijem se EPR spektru umesto jedne linije javlja dublet (slika 5.b), što ukazuje na postojanje više od dva spinska energijska nivoa. Kako je spin protona $I = 1/2$, dozvoljene vrednosti magnetnog spinskog kvantnog broja su $M_I = \pm 1/2$. Otuda na obe pozicije elektrona postoji jedna od dve moguće vrednosti lokalnog magnetnog polja pri kojoj se dešava rezonancija (jednačina 19).

$$B = B' - aM_I + \dots = B' \mp \frac{a}{2} + \dots \quad (19)$$

U jednačini 19, aM_I je lokalno magnetno polje na elektronu, a B' odgovara rezonantnom polju kada bi konstanta hiperfinog cepanja a bila nula. U jednačini 19 nedostaju članovi oblika a^q/B'^{q-1} , gde je $q = 1, 2, \dots$ redom, koji se za većinu slobodnoradikalnih vrsta mogu smatrati zanemarljivim. Konstanta hiperfinog cepanja a u jednačini 19 je izražena u jedinicama magnetnog polja, a može se povezati sa konstantom izotropnog hiperfinog sprežanja preko relacije $a_0 = A_0/g_e\mu_B$. A_0 je mera magnetne interakcije izražena u jedinicama energije (J), između elektrona i jezgra, definisana jednačinom 20.

$$A_0 = \frac{2\mu_0}{3} g\mu_B\mu_N |\Psi(0)|^2 \quad (20)$$

Sistem sa jednim nesprenim elektronom i jednim jezgrom spina $I = 1/2$ ima četiri moguća spinska stanja i dve linije u EPR spektru jer su dozvoljena samo dva prelaza određena izbornim pravilom $\Delta M_I = 0$ (slika 5) [84].



Slika 5. a) Energijski nivoi sistema sa jednim nesprenim elektronom i jednim jezgrom sa nuklearnim spinom $I = 1/2$ i b) odgovarajući EPR spektar (prilagođeno iz [84]).

Na slici 5 je prikazano cepanje energijskih nivoa i odgovarajući spektar, dobijeni pri izotropnim uslovima. Međutim, treba imati u vidu da biomakromolekuli ne rotiraju dovoljno brzo da bi došlo do potpunog usrednjavanja veličine hiperfine interakcije, dok kod molekula u zamrznutom stanju nema rotacije uopšte. Iz tog razloga kod rigidnijih sistema ova interakcija zavisi od relativne orijentacije nuklearnog dipola u spoljašnjem polju, te je A , baš kao i g -faktor, anizotropna veličina [13,83,84].

2.2.1.3. Osetljivost

Za uspešan EPR eksperiment osim uslova rezonancije potrebno je da budu ispunjeni i dodatni kriterijumi. Kako bi se dobio EPR spektar neophodno je da postoji ansambl elektrona u odgovarajućem okruženju [88].

Odnos broja elektrona u dva Zemanova energijska stanja određen je Bolcmanovim zakonom raspodele:

$$N_+/N_- = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right) = \exp\left(-\frac{g\mu_B B_0}{kT}\right) \quad (21)$$

U jednačini 21, k predstavlja Bolcmanovu konstanta ($1,3806 \cdot 10^{-23}$ J/K), a T apsolutnu temperaturu izraženu u K. U odsustvu spoljašnjeg magnetnog polja, udeo elektrona u oba stanja je isti. Za $B_0 > 0$, broj elektrona u nižem, β stanju, veći je od broja elektrona u višem, α stanju. Premda je verovatnoća prelaza iz višeg u niže stanje i obrnuto ista, zbog razlike u naseljenosti ova dva energijska stanja, u eksperimentu se detektuje neto apsorpcija koja odgovara razlici $N_- - N_+$. Za uobičajene temperature i magnetna polja, u jednačini 21 je eksponent veoma mali, te se eksponencijalna funkcija može aproksimirati redom $e^{-x} \approx 1 - x$. Stoga se data relacija svodi na:

$$\frac{N_+}{N_-} = 1 - \frac{g\mu_B B_0}{kT} \quad (22)$$

Kako je $N_- \approx N_+ \approx N/2$, razlika u naseljenosti dva nivoa (neto apsorpcija) se može predstaviti sledećim izrazom [88]:

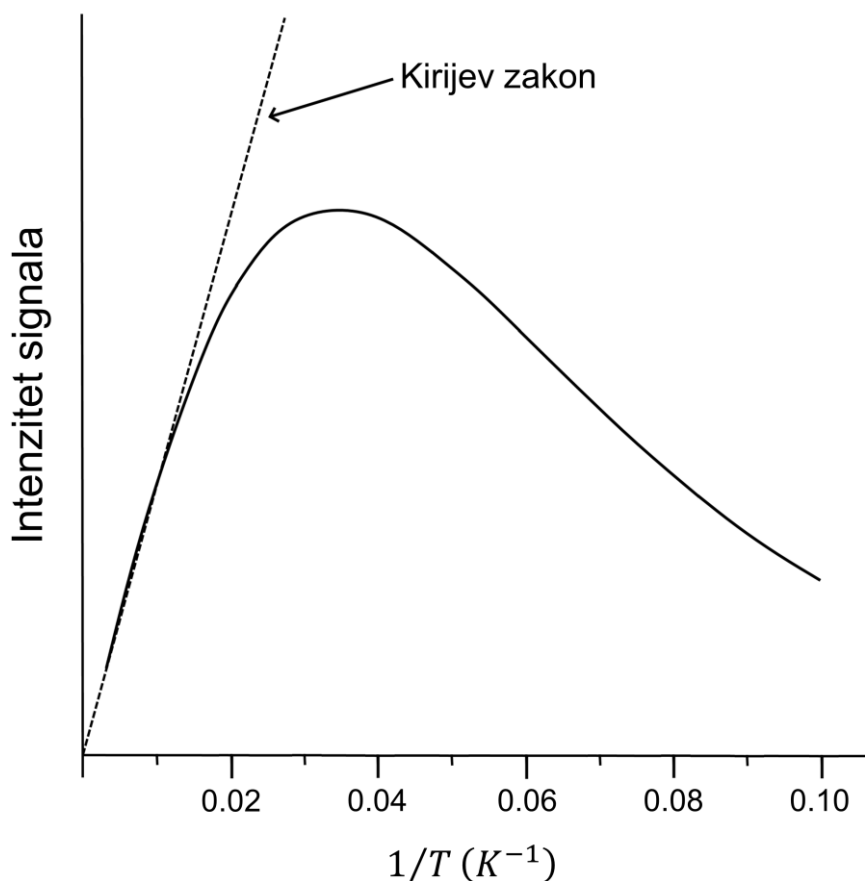
$$N_- - N_+ = N_- \left[1 - \left(1 - \frac{g\mu_B B_0}{kT} \right) \right] = \frac{Ng\mu_B B_0}{2kT} \quad (23)$$

Prema jednačini 23 osetljivost EPR-a raste sa ukupnim broja spinova N u sistemu, sa smanjenjem temperature i porastom jačine magnetnog polja. Kako je jačina magnetnog polja pri kojoj dolazi do apsorpcije proporcionalna frekvenciji mikrotalasa, to se teorijski gledano veća osetljivost može postići pri višim frekvencijama.

Pri idealnim uslovima, EPR spektrometrima koji rade u X-oblasti moguće je detektovati 10^{12} spinova, što u brojevima molova iznosi oko 10^{-12} . Za uzorak zapremine 1 ml, ovaj broj molova odgovara koncentraciji reda nM, te se EPR spektroskopija smatra veoma osetljivom tehnikom [89].

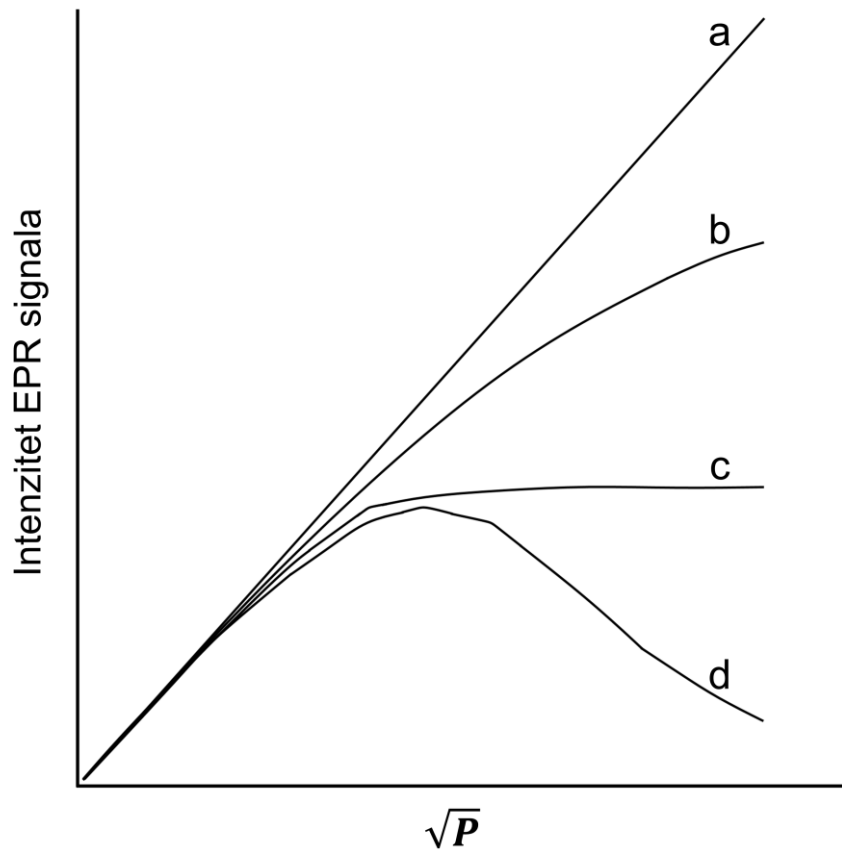
Važan faktor koji utiče na osetljivost jeste spinska relaksacija. Za detekciju EPR signala je potrebno da se održava razlika u naseljenosti energijskih stanja, međutim usled dejstva zračenja se javlja tendencija ka izjednačavanju dveju populacija. Ipak, sistem se može osloboditi viška energije u interakciji sa okolinom i vratiti u prvobitno ravnotežno stanje kroz spin-rešetka relaksaciju [13,82,89]. Kolika će biti razlika u naseljenosti energijskih nivoa zavisi od relativnih brzina relaksacije, apsorpcije i stimulisane emisije. S porastom mikrotalasnog snage apsorpcija i stimulisana emisija mogu postati brže od procesa relaksacije, te doći do izjednačavanja naseljenosti nivoa i posledično gubitka signala, što je fenomen poznat kao saturacija [82]. Spin-rešetka relaksacija određena je vremenom relaksacije T_1 , potrebnim da se spinski sistem izveden iz ravnoteže oslobodi

viška energije za faktor $1/e$. Najvažniji mehanizam spin–rešetka relaksacije je spin–orbitalno kuplovanje, izraženo kod sistema sa teškim atomima, koji se odlikuju dugim vremenom T_1 . Kod organskih radikala koji poseduju lake atome, spin–rešetka relaksacija nije toliko efikasna, te je vreme T_1 prilično dugačko [86,89]. Kako se T_1 obično produžava sa porastom temperature, to do saturacije lakše dolazi na kriogenim temperaturama. Stoga je snimanje EPR spektara organskih radikala najbolje vršiti pri nižoj mikrotalasnoj snazi i višim temperaturama. Način na koji se intenzitet signala menja sa recipročnom vrednošću apsolutne temperature prikazan je na slici 6. Na višim temperaturama intenzitet signala se ponaša u skladu sa Kirijevim zakonom, rastući sa porastom recipročne vrednosti temperature. Pri niskim temperaturama intenzitet signala opada zbog saturacije koja se javlja kako se T_1 produžava [82].



Slika 6. Temperaturna zavisnost intenziteta EPR signala (prilagođeno iz [82]).

Pri kvantitativnim merenjima je posebno važno da se snimanje vrši pri mikrotalasnoj snazi dovoljno ispod vrednosti na kojoj dolazi do zasićenja. U odsustvu saturacije, intenzitet signala raste proporcionalno sa kvadratnim korenom snage, tako da treba snimati pri snazi nižoj od vrednosti pri kojoj kriva saturacije odstupa od linearnosti (slika 7) [85].



Slika 7. Zavisnost intenziteta EPR signala od kvadratnog korena mikrotalasne snage za slučajeve: a) odsustva zasićenja u datom opsegu snage (kratka vremena relaksacije), b) malog stepena homogenog zasićenja pri višoj MT snazi (srednje brze relaksacije), c) intenzivnog nehomogenog zasićenja pri malim MT snagama, bez daljeg pada signala, d) značajnog homogenog zasićenja sa maksimumom na krivoj saturacije (duga vremena relaksacije).

2.2.1.4. Širina i oblik linije

Brzina relaksacije takođe utiče na širinu linije, pri čemu ulogu igraju i spin–rešetka i spin–spin, odnosno fazna relaksacija, sa karakterističnim vremenom T_2 [82]. U skladu sa Hajzenbergovim principom neodređenosti, $\Delta E \cdot \Delta t \geq h/2\pi$, što je relaksacija brža, to je spektar širi:

$$\Delta\nu \cdot \Delta t = \gamma_e \Delta B \cdot \Delta t \geq \frac{1}{2\pi} \quad (24)$$

U jednačini 24 se $\Delta\nu$ ($= \gamma_e \Delta B$) izraženo u Hz, tj. ΔB izraženo u mT, odnosi na širinu linije, a Δt (u s) na vreme života spinskog stanja. Vreme života višeg spinskog stanja α određeno je vremenima relaksacije T_1 i T_2 (jednačina 25).

$$\frac{1}{\Delta t} \approx \frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \quad (25)$$

Spin–spin relaksacija se odnosi na interakcije unutar samog ansambla elektrona, bez razmene energije sa okolinom. Naime, može doći do izmene različitih spinskih stanja elektrona dva radikala tako da se ukupna energija ne menja, dok životni vek pojedinačnih spinova biva smanjen. Ovaj fenomen je posebno izražen prilikom preklapanja orbitala što se dešava pri visokim koncentracijama radikala. S obzirom na to da je kod lakih organskih radikala T_1 reda veličine od 10^{-3} do 10^{-1} s, dok je T_2 znatno kraće (reda veličine 10^{-7} – 10^{-5} s), važi relacija $T_1 \gg T_2$, odnosno $1/T_1 \ll 1/T_2$, te se jednačina 25 svodi na sledeću relaciju:

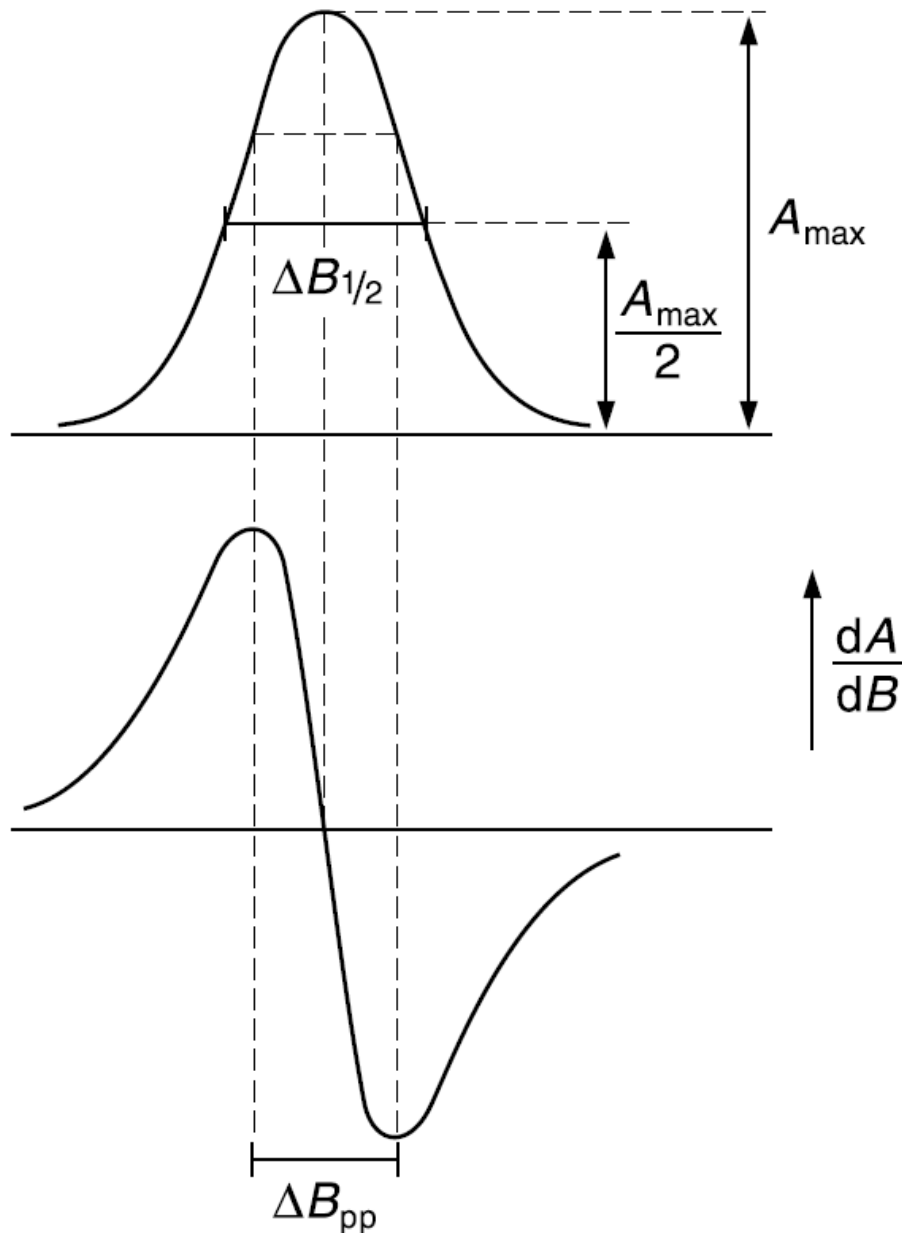
$$\frac{1}{\Delta t} \approx \frac{1}{T_2} \quad (26)$$

U tom slučaju je širina linije obrnuto proporcionalna spin–spin vremenu relaksacije:

$$\Delta\nu = \gamma_e \Delta B \propto \frac{1}{\Delta t} \approx \frac{1}{T_2}, \quad (27)$$

pri čemu za $\Delta\nu$ 10^5 – 10^7 Hz, ΔB leži u rasponu od 0,001 mT do 0,1 mT [88].

EPR signal se zbog specifičnog načina detekcije generiše kao prvi izvod apsorpcione krive, odnosno spektar se prikazuje kao prvi izvod apsorpcionog spektra po magnetnom polju dA/dB , u funkciji magnetnog polja B (donji spektar na slici 8). Apsorpciona kriva može imati Lorencov ili Gausovski profil, ili udeo oba. Karakteristične veličine su maksimum na apsorpcionom spektru A_{\max} , širina pika $\Delta B_{1/2}$ na poluvisini ($A_{\max}/2$), kao i ΔB_{pp} , rastojanje od pika do pika na derivativnoj krivoj (slika 8) [88].

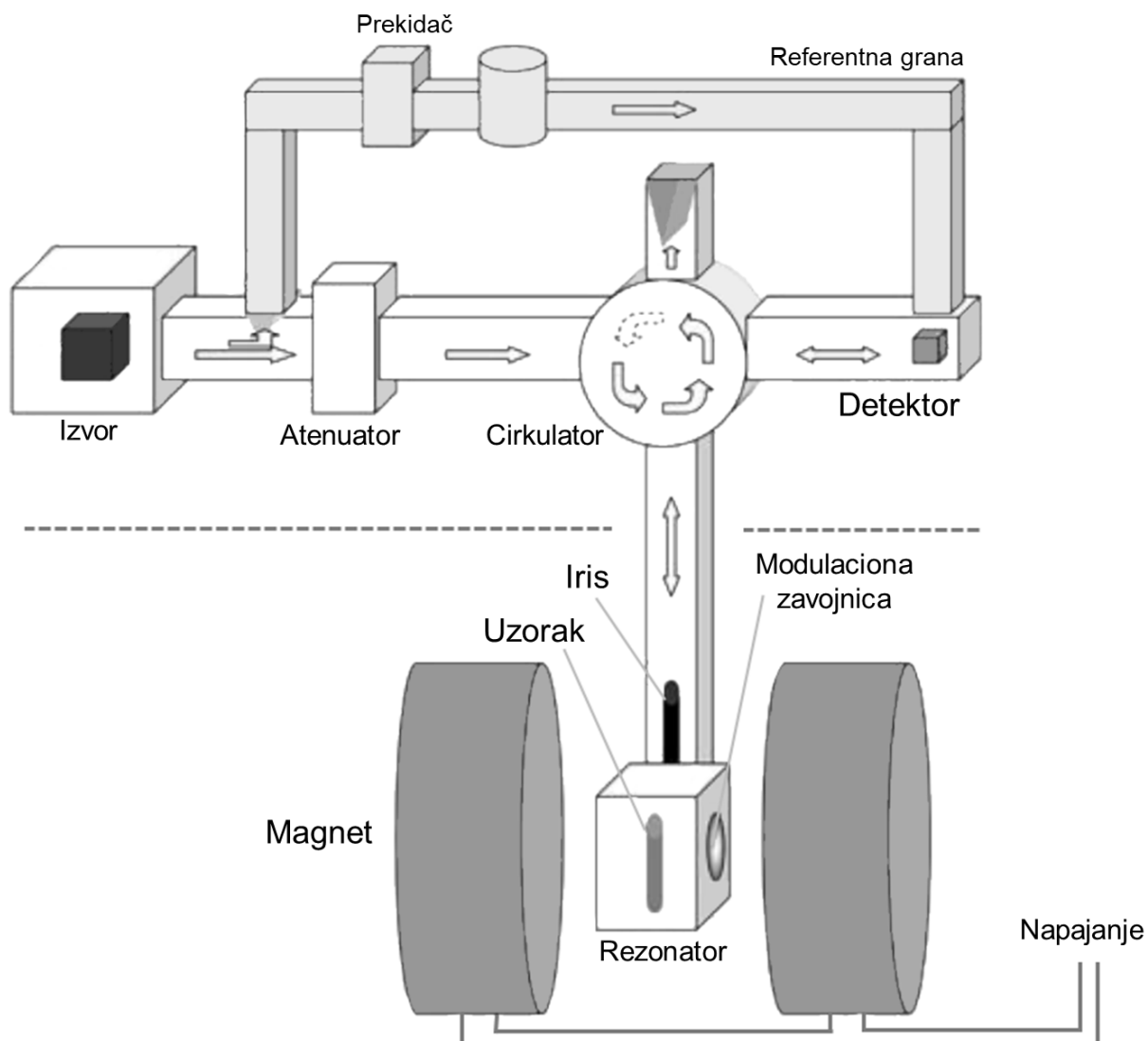


Slika 8. Apsorpcioni spektar (gore) i njegov prvi izvod (dole) (prilagođeno iz [88]).

2.2.1.5. EPR spektrometar

Shematski prikaz glavnih komponenti standardnog EPR spektrometra koji radi u X-oblasti dat je na slici 8 [13].

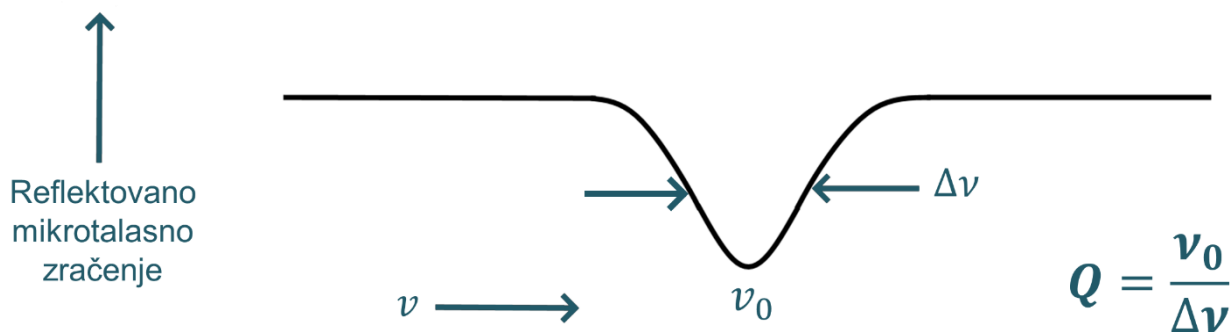
Kao monohromatski izvor mikrotalasa konstantnog izlaza (200 mW) i frekvencije podesive u uskom opsegu (do 10%), koristi se vakuumska cev – klistron, ili Ganova dioda. Proizvedeno zračenje se pomoću pravougaonog talasovoda prenosi do atenuatora (oslabljivača) koji smanjuje snagu za faktor $1-10^6$, pre nego što stigne do cirkulatora kojim se usmerava nadole, ka rezonatoru u kojem je smešten uzorak. Iznad samog rezonatora nalazi se iris, kojim se podešava količina reflektovanog zračenja nazad iz rezonatora. Ono se vraća ka cirkulatoru odakle se talasovodom usmerava ka diodi za detekciju intenziteta mikrotalasnog zračenja. Bilo koje zaostalo zračenje da se reflektuje nazad od detektora, biva odvedeno i pretvoreno u toplotu [13].



Slika 9. Shematski prikaz komponenti X-bend EPR spektrometra (prilagođeno iz [13]).

Središnji deo spektrometra čini rezonator koji služi za pojačavanje slabog signala iz uzorka. Rezonator je metalna kutija tačno određenih dimenzija, što omogućava da se unutar njega formira stojeći talas. Kao mera efikasnosti očuvanja energije mikrotalasa unutar rezonatora koristi se faktor kvaliteta Q [85]. Do energijskih gubitaka može doći na bočnim zidovima rezonatora zbog toga što mikrotalasi indukuju električnu struju u zidovima, koja se rasipa u vidu toplote. Q -faktor se može predstaviti kao odnos rezonantne frekvencije rezonatorske kutije ν_0 i širine linije $\Delta\nu$ (jednačina na slici 10), pri čemu sa porastom Q raste i osetljivost [13,85].

Najčešće korišćen tip rezonatora je pravougaoni X-bend rezonator dizajniran za rad u tzv. TE_{102} modu. Kako se mikrotalasnno zračenje od izvora do rezonatora prenosi kao transverzalni elektromagnetni talas, to vektori električnog i magnetnog polja osciluju normalno na pravac prostiranja, u međusobno normalnim ravnima. TE_{102} obrazac podrazumeva formiranje stojećeg talasa sa električnom komponentom dužine $\lambda/1$ duž x-pravca, neodređeno duž y-, odnosno dužine $\lambda/2$ duž z-pravca, pri čemu se postiže da u središtu rezonatora duž x-ose magnetno polje postiže svoju maksimalnu vrednost, dok je električno minimalno. Stoga je za ostvarivanje optimalne osetljivosti idealno da se uzorak postavi unutar cilindrične kivete na mesto maksimuma magnetnog polja B_1 , koje mora biti normalno na pravac spoljašnjeg magnetnog polja B duž z-ose [13,84].



Slika 10. Mikrotalasno zračenje reflektovano iz rezonatora i faktor kvaliteta rezonatora Q (prilagođeno iz [85]).

Mikrotalasno magnetno polje je to koje vodi apsorpciju u EPR-u. Podešavanjem položaja zavrtanja irisa potrebno je da se postigne podudaranje impedansi talasovoda i rezonatora, odnosno sprezanje. Kada dođe do apsorpcije MT zračenja od strane uzorka, faktor Q se smanjuje zbog povećanih gubitaka, a kako rezonator nije više kritično kuplovan, MT se reflektuju nazad do mosta što rezultuje EPR signalom [85].

Fazno osetljiva detekcija kod CW-EPR spektrometara se ostvaruje primenom modulacije magnetnog polja. Modulaciono polje koje osciluje frekvencijom od tipično 100 kHz (u X-oblasti) predstavlja izvesnu smetnju spoljašnjem magnetnom polju. Naime, dodatna oscilacija magnetnog polja dodaje se u određenoj amplitudi paralelno glavnom magnetom polju. Pri rezonanciji, oscilujuće magnetno polje modulira stanje rezonancije, tako da i odziv uzorka, odnosno amplituda reflektovanog mikrotalasnog zračenja iz rezonatora, biva modulirana frekvencijom od 100 kHz. Za EPR signal približno linearan u opsegu širine modulacione amplitude, dolazi do transformisanja u sinusoidni talas sa amplitudom proporcionalnom nagibu signala, te se spektar generiše u vidu prvog izvoda [85,90].

Fazno osetljivi detektor proizvodi jednosmerni signal proporcionalan amplitudi modulisanog EPR signala i vrši poređenje modulisanog sa referentnim signalom, tako da je osetljiv samo na signal iste frekvencije i faze kao modulaciono polje. Bilo koji signal poput šuma ili električnih smetnji koji ne ispunjava ove zahteve se odbacuje.

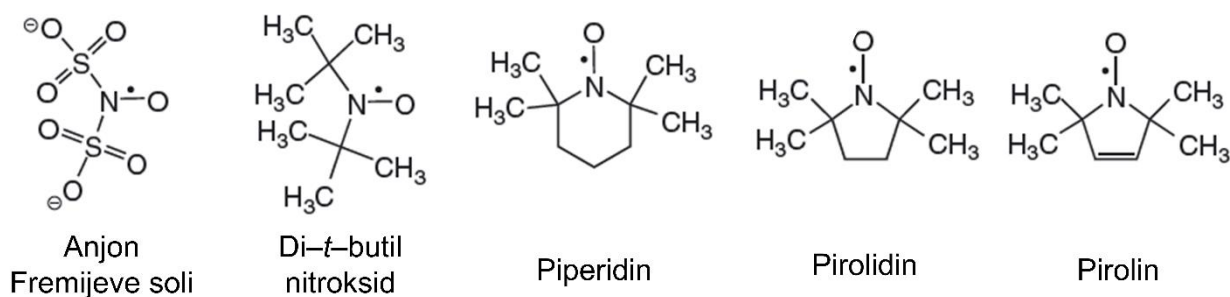
Iako fazno osetljiva detekcija sa modulacijom magnetnog polja može povećati osetljivost za nekoliko redova veličine, neophodno je pažljivo birati odgovarajuću modulacionu amplitudu, frekvenciju i vremensku konstantu s obzirom na to da neadekvatan izbor bilo kog od ovih parametara može izobličiti EPR signale, te otežati tumačenje spektara [85].

2.2.2. Spinske probe i obeleživači

Usled nedostatka prirodno prisutnih stabilnih paramagnetika, u sistem od interesa je često neophodno uvesti spoljašnju EPR-aktivnu supstanciju, tzv. spinsku probu ili spinski obeleživač [91], čiji izgled EPR spektra veoma zavisi od mikrookruženja i njihove mobilnosti [87]. Upravo ovakav obrazac je primenjen i u aktuelnoj studiji disertacije.

Spinske probe koje se uobičajeno koriste u EPR spektroskopiji pripadaju klasi aminoksil radikala (nitroksida). Nitroksidne probe su organski heterociklični molekuli sa nesparenim elektronom na $>N-O\cdot$ grupi, sterno zaklonjenoj alkil- ili aril-supstuentima [92].

Dinatrijum nitrozodisulfonat, prvi put sintetisan 1845. godine, jedinjenje poznatije kao Fremijeva so, može se smatrati pretečom stabilnih nitroksidnih proba koje se danas koriste. Sinteza di-*tert*-butil nitroksida usledila je 1961. godine, dok je 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO) dobijen 1964. godine, čime je započet razvoj dobro poznatih šestočlanih, piperidinskih nitroksida, kao i petočlanih, pirolidinskih i pirolinskih nitroksida [92–94].



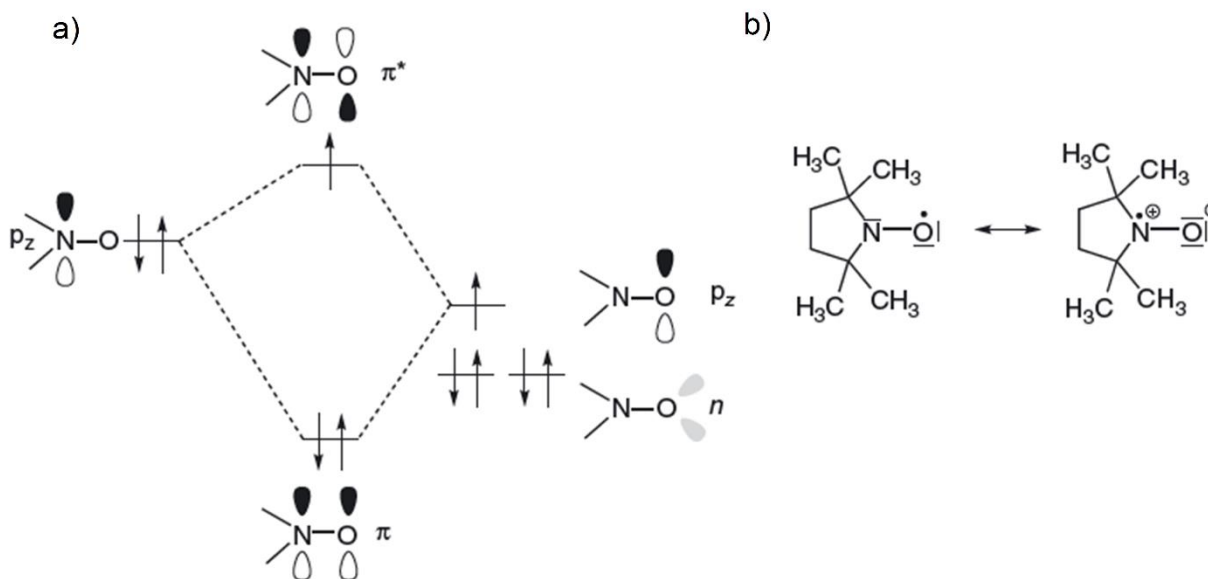
Slika 11. Shematski prikaz struktura Fremijeve soli, di-*tert*-butil nitroksida i petočlanih i šestočlanih nitroksidnih prstenova – piperidina, pirolidina i pirolina (prilagođeno iz [92]).

Do sada je razvijen čitav niz raznovrsnih spinskih proba posebno optimizovanih za ispitivanje određenih fizičko-hemijskih karakteristika posmatranog sistema na molekularnom nivou, poput viskoznosti, lokalne dinamike, pH, polarnosti, formiranja vodoničnih veza, prelaznih temperatura, rastojanja između proba [92,95]. Među mnogobrojnim bio-primenama EPR aktivnih proba, mogu se izdvojiti proučavanje membranske fluidnosti, određivanje strukture i konformacionih promena proteina, merenje pH, utvrđivanje koncentracije tiola, parcijalnog pritiska kiseonika (EPR oksimetrija), procena redoks statusa tkiva. EPR je neprevaziđena tehnika za detekciju paramagnetnih vrsta *in vitro*, dok se od nedavno javlja sve veći interes za *in vivo* primenu EPR spektroskopije i imidžinga u biologiji i medicini [96,97].

2.2.2.1. Osnovna struktura nitroksidnih proba

Paramagnetne osobine nitroksida potiču od nasporenog elektrona $>N-O\cdot$ grupe, delokalizovanog između atoma azota i kiseonika. Ipak, elektron je nešto bliži atomu kiseonika usled njegove veće elektronegativnosti. Relevantne orbitale $N-O$ grupe su n orbitale atoma kiseonika s parom nevezivnih elektrona, π vezivna i π^* anti-vezivna orbitala. Prema teoriji molekularskih orbitala (MO), dve $2p_z$ orbitale se kupuju formirajući potpuno popunjenu π vezivnu orbitalu i delimično popunjenu π^* anti-vezivnu orbitalu. Odnos energija $2p_z$ orbitala azota i kiseonika određuje karakter π^* anti-vezivne orbitale. S porastom polarnosti mikrookruženja energija $2p_z$ orbitale kiseonika se

smanjuje u odnosu na energiju azotne, usled čega π^* anti-vezivna orbitala sve više poprima azotni karakter. Spinska gustina na azotu je tada veća, što se na EPR spektru uočava kroz porast konstante hiperfinog cepanja [92,98].



Slika 12. Shematski prikaz a) orbitala N–O grupe prema MO teoriji i b) rezonantnih struktura nitroksida (prilagođeno iz [92]).

Preraspodela spinske gustine se može opisati dvema rezonantnim strukturama molekula nitroksida. Neutralni oblik nosi nespareni elektron na atomu kiseonika, dok je kod drugog, tzv. cviterjanskog (eng. *zwitterion*) oblika, koji je energetski povoljniji u polarnim rastvaračima, nespareni elektron lokalizovan na atomu azota.

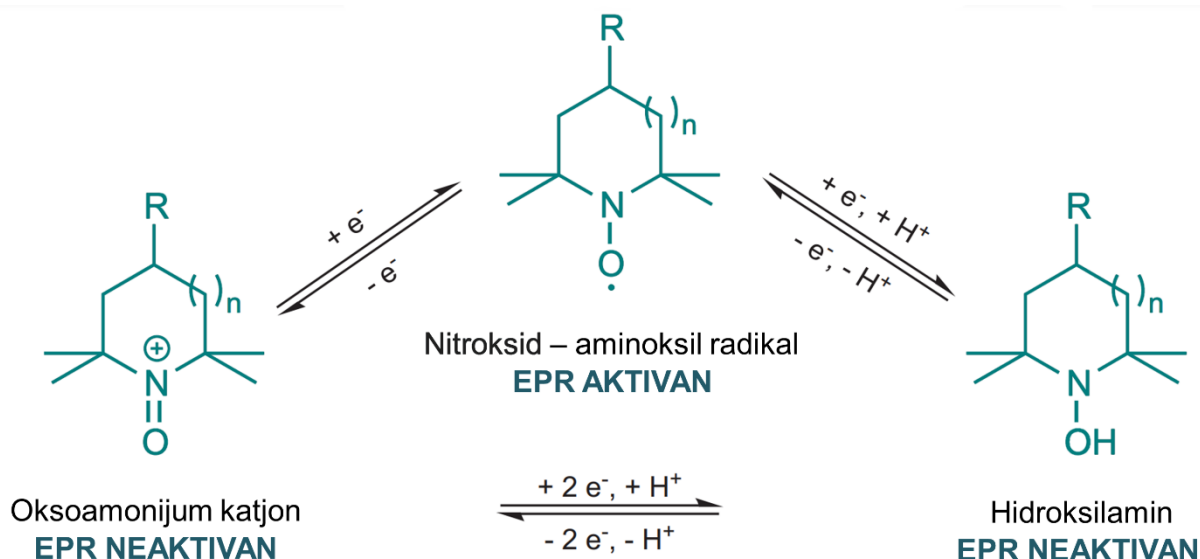
Ukoliko supstituentne grupe s obe strane atoma azota poseduju π elektrone, delokalizacija se može proširiti po čitavom prstenu. Za razliku od π nitroksida, kod nitroksida koji se tipično primenjuju u domenu bionauka, nespareni elektron je lokalizovan isključivo na N–O grupi. Radikalska stabilnost je prepoznata kao ključna karakteristika ove vrste molekula, a postiže se sternim zaklanjanjem N–O grupe, najčešće sa po dve alkil- ili po jednom aril-grupom s obe strane [92,98,99].

2.2.2.2. Pirolidinske i piperidinske spinske probe

Većina spinskih proba koje se koriste u *in vivo* ispitivanjima su derivati TEMPO (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil) ili PROXYL (2,2,5,5-tetrametilpirolidin-1-oksil) radikala. Ove piperidinske, odnosno pirolidinske spinske probe, razlikuju se prema funkcionalnoj grupi, koje kod nitroksida koji se uobičajeno koriste uključuju –H, –OH, –COOH, =O, –NH₂, –CONH₂, –N(CH₃)₃⁺I[–]. Sva pomenuta jedinjenja ispoljavaju tipičan EPR spektar nitroksida sa 3 pika, pri čemu bočne grupe ne doprinose opštem izgledu spektra, već se njihov uticaj ogleda u promeni širine linija u spektru [96,100].

Uprkos svojoj izuzetnoj stabilnosti, nitroksidne probe aplikovane *in vivo* mogu izgubiti paramagnetna svojstva u redoks reakcijama sa biološki aktivnim jedinjenjima, enzimima i različitim oksidansima, koje se pretežno odigravaju unutar ćelije [96,100,101]. Po injektovanju spinske probe

u živi sistem uočava se smanjenje intenziteta EPR signala, najvećim delom usled konverzije nitroksida do EPR neaktivnog oblika, hidroksilamina. Kada uđe u ćeliju, spinska proba se redukuje dejstvom ćelijskih antioksidanasa, kao što su askorbat, tioredoksin reduktaza, ubihinol, glutation, tokoferol [96,100,102,103]. Aminoksil radikali se takođe redukuju u interakciji sa prelaznim metalima u nižem oksidacionom stanju (Fe^{2+} , Cu^+). U pogledu oksidativnog stresa, nitroksid može biti oksidovan do oksoamonijum katjona u reakciji sa slobodnoradikaliskim vrstama, hidroperoksilnim, azot dioksidnim i karbonatnim radikalom. Direktna reakcija sa hidroksilnim radikalom nije od značaja, dok s druge strane, nitroksidi detoksifikuju sekundarne radikale izvedene iz $\bullet\text{OH}$ radikala, alkil-, alkoksi- i alkilperoksilne radikale. Oksoamonijum katjon se može nazad redukovati do aminoksila u prisustvu superoksida ili do hidroksilamina pomoću dvoelektronskih donora, poput NAD(P)H i tiola [96,100,104].



Slika 13. Redoks ciklus nitroksida (n = 0 – piroolidin, n = 1 – piperidin) (prilagođeno iz [100]).

Zahvaljujući sposobnosti spinskih proba da učestvuju u pomenutim oksidoredukcionim reakcijama, prihvaćeno je da se kinetika opadanja EPR signala nitroksida može uzeti kao indikator redoks metabolizma. To je od naročite važnosti imajući u vidu da je narušen redoks balans povezan sa brojnim patološkim stanjima, poput dijabetesa, neurodegenerativnih i malignih oboljenja [14,100].

Za nitrokside se još pokazalo da imaju potencijal da se koriste kao MRI kontrastni agensi, koji skraćujući T1 vreme relaksacije protona, obezbeđuju poboljšanje kontrasta slike. S druge strane, redukcija nitroksidnih proba koje prolaze kroz ćelijsku membranu, do dijamagnetnih, EPR neaktivnih hidroksilamina, praćena je smanjenjem intenziteta T1-naglašene (eng. *T1-weighted*) MRI slike, što pak omogućava mapiranje redoks statusa tkiva. Primenom pomenutog principa je u pojedinim studijama ustanovljena evidentna razlika između tumorskog i zdravog tkiva s obzirom na brži gubitak signala nitroksida u hipoksičnom tumorskom u odnosu na normalno tkivo [105,106].

Selektivna lokalizacija i odgovarajuća biodistribucija nitroksida, potrebne za specifične biološke primene, mogu se postići zahvaljujući njihovoj hemijskoj raznovrsnosti. Zavisno od raspodele u ćeliji i/ili na osnovu interakcije sa ćelijskim membranama, razlikuju se lipofilne, neutralne i neelektrisane spinske probe. Posebnu grupu čine spinski aktivni analozi određenih lekova i supstrata [87].

Pod lipofilnim spinskim probama smatraju se molekuli koji su sintetisani tako da se mogu implementirati u ćelijske membrane. Najčešće korišćeni lipofilni nitroksidi su derivati stearinske

kiseline, koji čine posebnu grupu, tzv. spinskih obeleživača, o kojima će biti reči u narednom poglavlju.

Pod neutralnim nitroksidima podrazumevaju se relativno mali molekuli, kao što je TEMPO, koji se raspodeljuju i po hidrofiličnim i po hidrofobnim regijama. Ove nitroksidne probe lako prolaze kroz ćelijsku membranu, pri čemu se brzo uspostavlja ravnoteža u koncentraciji nitroksida unutar i izvan ćelije zavisno od njihovih particionih koeficijenata [87]. Koeficijent raspodele u sistemu n-oktanol/voda se uobičajeno uzima kao mera hidrofobnosti, odnosno hidrofiličnosti određenog jedinjenja, a za TEMPO iznosi 75 [107]. Njihova raspodela u ćeliji koristi se kao mera naelektrisanja, električnog potencijala, pH, kao i promena u unutarćelijskom okruženju [87].

Veća stabilnost piperidinskih u odnosu na pirolidinske probe čini ih prioritarnim izborom za *in vivo* snimanja. Naime, utvrđeno je da na kinetiku redukcije EPR signala nitroksida utiču struktura prstena i supstituentnih grupa, odnosno njihova naelektrisanja i lipofilnost, koji određuju sposobnost probe da prođe kroz membranu. Jednom kad uđu u ćeliju, stepen redukcije proba u mnogome zavisi od veličine prstena, pa je tako mnogo brža redukcija uočena kod piperidinskih nitroksida u odnosu na ekvivalentne pirolidinske nitrokside [100,102,108,109].

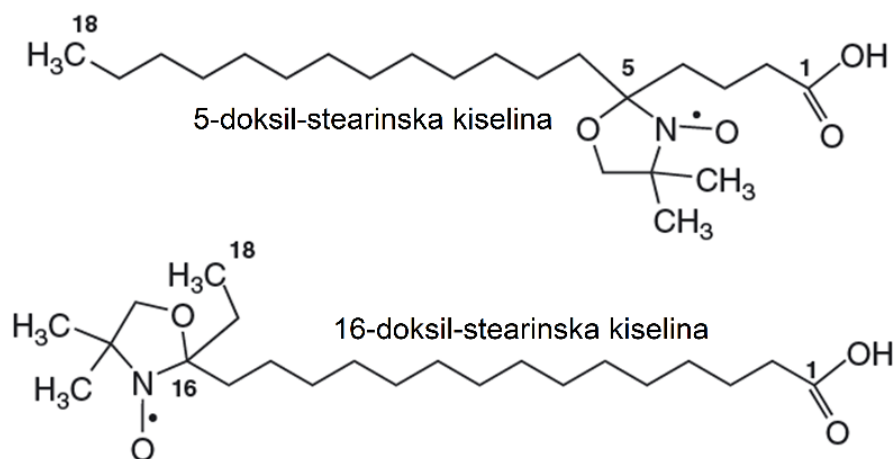
3-karbamoil-proksil (eng. *3-carbamoyl-PROXYL*, 3CP) (centralna struktura na slici 13, za $n = 0$ i $R = \text{CONH}_2$), predstavnik je neutralnih, pirolidinskih proba. Odlikuje se dugim vremenom poluživota u krvotoku (1286 ± 176 min [110]), te sporim ulaskom u ćeliju, sa n-oktanol/voda particionim koeficijentom od 0,68 [107,111]. Na eksperimentalnim pacovima je utvrđeno da se 3CP distribuira pretežno u srcu, jetri, bubrezima i crevima [105], što omogućava njegovu primenu u proučavanju različitih organa.

U naelektrisane probe svrstavaju se molekuli koji poseduju naelektrisanje pri fiziološkim vrednostima pH. One praktično nisu sposobne za prolazak kroz fosfolipidne membrane, te se po raspodeli u organizmu i interakcijama nešto razlikuju od ostalih nitroksida [87]. Primer je 3-karboksi-proksil (eng. *3-carboxy-PROXYL*, 3CxP) (centralna struktura na slici 13, za $n = 0$ i $R = -\text{COOH}$), anjonska pirolidininska proba, minimalne lipofilnosti, n-oktanol/voda particionog koeficijenta od 0,0047 [107,112]. U studiji u kojoj za pozitivno naelektrisanu probu 4-trimetilamonijum-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil jodid (CAT-1) (centralna struktura na slici 13, za $n = 0$ i $R = -\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{I}^-$) nije detektovan unutarćelijski signal, za 3CxP je ipak pokazano da ulazi u ćeliju brzinom uporedivom s brzinom redukcije. Razlog tome je postojanje male frakcije molekula 3CxP prisutnih u neutralnom obliku [87,101]. Osim toga, utvrđeno je i da postoji mogućnost prenosa 3CxP-a u jetru pomoću organskih anjonskih transportera (OAT) [113]. Svakako, reč je veoma dugoživećoj probi, koja ima značajnu ulogu u proceni redoks statusa i merenju nivoa kiseonika u ekstracelularnoj sredini [112].

2.2.2.3. Spinski obeleživači

Tehnika EPR spinskog obeležavanja pokazala se kao veoma efikasna metoda za izučavanje strukturnih, dinamičkih i molekularnih karakteristika lipida i proteina u sastavu bioloških membrana, kao i model sistema membrana [114].

Lipofilni nitroksidi, koji se uobičajeno koriste kao spinski obeleživači membranskih struktura su derivati stearinske kiseline, tzv. doksil-stearati (DS). Razvijen je niz analoga stearinske kiseline, obeleženih doksil grupom na različitim pozicijama duž ugljovodoničnog lanca, od 4. do 16. C-atoma. Prilikom ugrađivanja u membrane, DS se orijentiše tako da je hidrofilična karboksilna grupa lokalizovana sa strane membrane koja je u dodiru sa vodenom fazom, dok se ugljovodonični lanac prostire paralelno sa nepolarnim repovima fosfolipida membranskog dvosloja. Izgled EPR spektra DS zavisi od toga na kojoj se dubini unutar membrane nalazi nitroksidna grupa, odnosno njene pozicije u ugljovodoničnom lancu [87].



Slika 14. Shematski prikaz struktura derivata stearinske kiseline obeleženih na petom (5-doksil-stearinska kiselina) i šesnaestom C-atomu ugljovodoničnog lanca (16-doksil-stearinska kiselina) (prilagođeno iz [92]).

Mobilnost doksil-stearata u membranskom dvosloju je ograničena, što rezultuje širenjem EPR signala i varijacijama u spektru. Stepem imobilizacije DS je osnova za utvrđivanje tzv. parametra reda S (jednačina 28), mere relativne fluidnosti, odnosno uređenosti membrana.

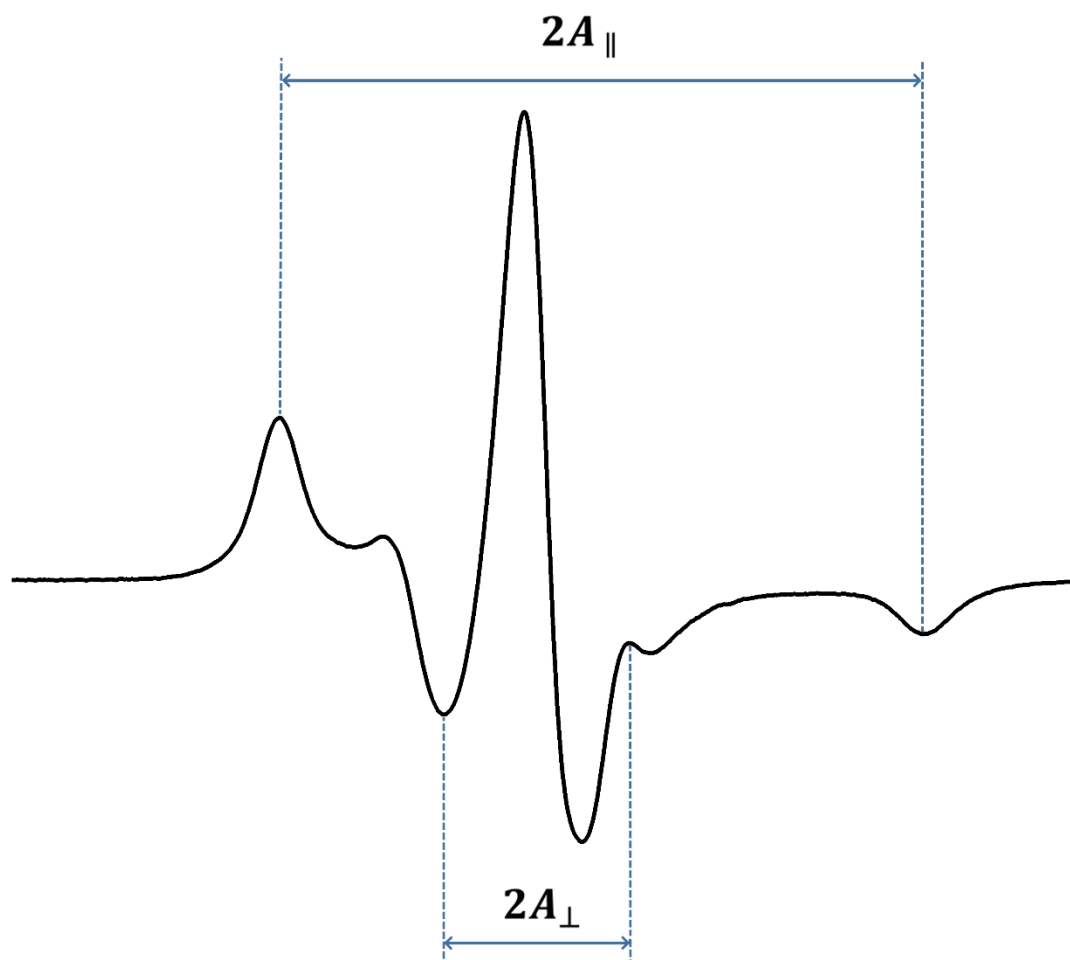
$$S = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{zz} - A_{xx}} \frac{a}{a'}, \quad (28)$$

pri čemu je:

$$a' = \frac{1}{3}(A_{\parallel} + 2A_{\perp}) \quad (29)$$

$2A_{\parallel}$ je spoljašnje hiperfino cepanje, $2A_{\perp}$ je unutrašnje hiperfino cepanje, a je konstanta izotropnog hiperfinog cepanja u kristalu, a' konstanta izotropnog hiperfinog cepanja u membrani (slika 15) [83,87].

Pojednini doksil-stearati, kada su vezani za proteine, daju EPR signale istog izgleda spektra kao u slučaju njihove inkorporacije unutar membranskih struktura [87], što proširuje primenjivost tehnike spinskog obeležavanja i na druge biomakromolekule.



Slika 15. Prikaz EPR spektra doksil-stearata vezanog za protein (BSA obeležen 16-DS-om) sa naznačenim parametrima $2A_{\parallel}$ i $2A_{\perp}$.

2.2.3. EPR imidžing

EPR imidžing (EPRI) je tehnika kojom se određuje prostorna raspodela paramagnetnih signala u uzorku [115]. Princip EPRI merenja podrazumeva upotrebu rotirajućih gradijenata magnetnog polja, čiji se uticaj može sagledati na primeru namenski primenjenog gradijenta polja duž pravca glavnog magnetnog polja (z-ose). Naime, ako je u centru rezonatora, na poziciji z_0 , gradijent magnetnog polja nula, to polje B_0 odgovara spoljašnjem magnetnom polju B_{ext} , odnosno B_{res} , pri kom je ispunjen rezonantni uslov. Međutim, na mestu z_i gradijent doprinosi ukupnom polju sa izvesnim B_i , bilo pozitivnim ili negativnim, tako da na poziciji z_i uzorak oseća polje $B_0 + B_i$, dok ukupno magnetno polje na lokaciji z_j odgovara $B_0 + B_j$. Stoga uzorak na mestu z_i stupa u rezonanciju pri $B_{\text{ext}} = B_{\text{res}} - B_i$, tj. uzorak na mestu z_j pri $B_{\text{ext}} = B_{\text{res}} - B_j$. Na taj način se u CW-EPR eksperimentu na različitim mestima u uzorku uslov rezonancije postiže pri različitim vrednostima spoljašnjeg magnetnog polja, omogućavajući prostorno kodiranje signala [116].

Rekonstrukcija slike se tipično vrši filtrovanom projekcijom unazad, a standardna CW-EPR instrumentacija pruža mogućnost dobijanja do 3-D prostornog imidža, odnosno 4-D spektralno-prostornog imidža. Za uzorke s promenljivom širinom linije u zavisnosti od lokacije, ili u slučaju prisustva više radikalskih vrsta u sistemu, tačnu mapu distribucije spinova je teško dobiti primenom čisto prostornog EPRI. Osim toga, informacije koje pruža prostorni EPRI ograničene su

samo na spinsku gustinu, ne dajući uvid u prirodu spinova u svakom elementu zapremine. Međutim, ovo ograničenje se prevazilazi dodatkom spektralne komponente jednoj, dvema ili trima prostornim komponentama, čineći 2-D, 3-D, odnosno 4-D spektralno-prostorni imidžing. Premda je dodatna spektralna dimenzija od velike koristi za mnoge biološke primene, potencijal spektralno-prostornog imidžinga je pre svega prepoznat kroz EPR oksimetriju, baziranu na efektu širenja EPR signala u prisustvu kiseonika [95].

Naime, molekularni kiseonik se nalazi u osnovnom tripletnom stanju, posedujući paramagnetna svojstva. U interakciji sa spinskom probom, kiseonik može povećati brzinu relaksacije probe dovodeći do širenja linije radikalne vrste u zavisnosti od koncentracije kiseonika u sistemu. Kako su u slučajevima mnogobrojnih oksimetrijskih proba dobro okarakterisane promene EPR signala u funkciji pO_2 , za tako kalibrisane sisteme se promene širine linije mogu uzeti kao direktna mera pO_2 [95,115].

Koncentracija kiseonika u odgovarajućim tkivima smatra se ključnim parametrom za planiranje različitih terapija, pre svega tretmana kancera. Stoga su pouzdana i tačna merenja nivoa kiseonika u netaknutim biološkim sistemima od neprocenjivog značaja za medicinska istraživanja. Premda postoji nekoliko klinički održivih metoda za neposrednu procenu hipoksije tumora, uključujući polarografiju, gašenje fluorescencije i upotrebu NMR proba na bazi fluora, njihov nedostatak je nemogućnost ponavljanja, te rutinske primene. S druge strane, *in vivo* EPR oksimetrija može pružiti relevantna klinička merenja nivoa kiseonika u tkivima s mogućnošću višestrukog ponavljanja merenja tokom vremena. Od pionirskih radova koji se odnose na EPR imidžing slobodnih radikala u životinjskim organima, preko *in vivo* EPR oksimetrije u animalnim modelima bolesti, danas se stiglo do razvoja optimalnih probi i instrumentacije za kliničke studije na ljudima [117–121], čineći da se EPR polako nađe u fokusu biomedicinskih istraživanja, pogotovu u oblasti kancera.

2.3. Kancer

Kancer je vodeći uzrok smrtnosti u svetu sa preko 19 miliona novoobolelih pacijenata registrovanih u 2020. godini. Uz to je procenjeno da je u istoj godini oko 10 miliona smrtnih slučajeva bilo posledica ove opake bolesti [122].

Pojava tumora rezultat je nekontrolisanog rasta i deobe ćelija. U najvećem broju slučajeva, aktivacija onkogeni i/ili deaktivacija tumor-supresorskih gena dovodi do progresije ćelijskog ciklusa i izostanka mehanizama apoptoze [123]. Benigni tumori ostaju lokalizovani na mestu nastanka i nemaju sposobnost da se šire na okolna tkiva, dok maligni tumori infiltruju i razaraju zdravo tkivo uz tendenciju da se prošire do udaljenih delova tela putem cirkulatornog i limfnog sistema. Sposobnost metastaziranja malignih tumora čini kancer toliko opasnim. Naime, dok je dobroćudni tumor obično moguće uspešno otkloniti hirurškim putem, u slučaju metastatskih tumora zbog širenja po organizmu, teško je primeniti operativno lečenje [124].

Rana dijagnostika je od ključnog značaja za povoljan ishod lečenja s obzirom na rizik od brze progresije bolesti [125]. Međutim, uprkos značajnim ulaganjima u identifikaciju novih biomarkera i razvoj testova za rano otkrivanje kancera, postignuta su tek izvesna poboljšanja u prognozi i praćenju stanja kod pacijenata sa uspostavljenom dijagnozom [126].

2.3.1. Imidžing metode u onkologiji

Imidžing metode predstavljaju neizostavni deo kliničkih protokola tokom svih faza ispitivanja i lečenja onkoloških pacijenata. Različitim modalitetima snimanja mogu se dobiti informacije o strukturnim, morfološkim, metaboličkim i funkcionalnim karakteristikama subjekta *in vivo*. Pojedine tehnike snimanja omogućavaju da se pronikne u molekularne puteve, te procese unutar tkiva i strukturne promene na nivou ćelija [127,128].

Konvencionalni modaliteti snimanja, poput radiografije X-zracima, kompjuterizovane tomografije (eng. *computed tomography*, CT), imidžinga magnetnom rezonancijom (eng. *magnetic resonance imaging*, MRI), obezbeđuju anatomske slike koje mogu poslužiti za određivanje lokaliteta tumora. Ipak, kancer je u pojedinim slučajevima teško razotkriti na osnovu slika anatomskih struktura, kod kojih se ne uočavaju morfološke karakteristike. Iz tog razloga, klasični imidžing se najčešće primenjuje kao jedna od dopunskih dijagnostičkih metoda laboratorijskim testovima i biopsiji, koja je u najvećem broju slučajeva neophodna za uspostavljanje definitivne dijagnoze [128]. Premda predstavlja „zlatni standard“ u dijagnostikovanju karcinoma, biopsijom nije moguće steći potpuni uvid u bolest, a uzimanje uzoraka u pojedinim slučajevima može biti kompleksno. Parcijalno uzorkovanje i nespecifični nalazi imunohistohemije dovode do odstupanja pri dijagnozi, te posledično i neefikasne terapije. Naposletku, prilikom rutinskog praćenja toka bolesti pacijent se podvrgava višestrukim invazivnim procedurama uzimanja biopsijskog materijala [129].

Molekularni imidžing, kojim se stiče uvid u biološke procese na ćelijskom i subćelijskom nivou, pokazuje potencijal da potisne ovakve invazivne metode [130]. Uspeh pozitronske emisije tomografije (PET) u kliničkoj praksi, može se pripisati efikasnosti radiotragača [¹⁸F]-fluoro-2'-deoksi-D-glukoze (FDG), analoga glukoze, kojeg preuzimaju ćelije s visokom potrošnjom šećera, poput ćelija mozga, bubrega, a pre svega ćelija kancera. Princip dobijanja informacija korišćenjem radiofarmaceutika je blokiranje ili manje dinamičan metabolički put markera. U slučaju najčešće korišćenog FDG tragača, proces glikolize biva prekinut tako što nakon fosforilacije dati molekul ostaje zarobljen unutar ćelije [131]. Poremećaji u metabolizmu glukoze su početne promene koje nastaju tokom karcinogeneze, te FDG-PET imidžing pruža mogućnost za detekciju ranih pokazatelja bolesti. PET se odlikuje izuzetnom osetljivošću, neograničenom dubinom prodiranja, kao i mogućnošću izvođenja kvantitativnih merenja. Međutim, glavni nedostatak ove tehnike je izostanak anatomske slike [132]. Pomenuta mana se uspešno prevazilazi integrisanjem

različitih imidžing modaliteta u hibridne sisteme poput PET/CT i PET/MRI. Navedene sofisticirane tehnike ne samo da unapređuju dijagnostiku, već se pokazalo da značajno mogu doprineti u pogledu određivanja stadijuma karcinoma i procene odgovora na terapiju [133,134].

Osim toga, s razvojem teragnostike se posebno otvaraju mogućnosti za primenu imidžing metoda, prvenstveno multimodalnih tehnika snimanja [135]. Teragnostika se odnosi na novi pristup u medicini koji podrazumeva integraciju dijagnostike i terapije, s ciljem da se predupredi kašnjenje u lečenju, olakša nega pacijenta, te izbegnu nepotrebne intervencije i smanje ukupni troškovi [17,135]. Postoje različiti teragnostički koncepti, pa tako dijagnoza može biti praćena terapijom kod pacijenata za koje se predviđa da će odreagovati na određeni tretman, ili pak terapija može biti praćena dijagnozom u svrhu posmatranja ranog odgovora na terapiju i predikcije efikasnosti tretmana [17]. Takođe, teragnostičku platformu je moguće dizajnirati tako da u jednom entitetu budu sjedinjene imidžing i terapijska komponenta [17,136]. U tom slučaju, teragnostički agens bi trebalo da omogući oslikavanje i karakterizaciju tkiva, posmatranje molekularnih procesa, a uz istovremenu isporuku specifične terapije. Na ovaj način ne samo da se pojednostavljuje dijagnostika i tretman bolesti u ranoj fazi, već dobro definisani teragnostik pruža povratne informacije o distribuciji lekova na ciljane mesta i omogućava praćenje delovanja tretmana. Najčešće se kombinuju jedan ili više terapeutskih modaliteta i to hemioterapija, radioterapija, imunoterapija, sa imidžing metodama kao što su PET i MRI [136].

Treba napomenuti da pored evidentnih prednosti u odnosu na primenu standardnog imidžinga ili zasebnih tretmana, mnoge dosada razvijane teragnostičke platforme, ostale su na nivou studija na eksperimentalnim životinjama, tako da uvođenje teragnostike u opštu kliničku upotrebu trenutno predstavlja veliki izazov [136,137]. U tom pogledu, postoji potreba za unapređenjem predloženih metoda, ali i uključivanjem novih imidžing tehnika i proba, koje bi doprinele napretku personalizovane medicine.

2.3.2. Konvencionalna antikancerska terapija

U tretmanu kancera su konvencionalne metode poput operativnog lečenja, radioterapije i hemioterapije i dalje neprevaziđene, premda svaka od navedenih ima određenih nedostataka. Izbor terapije zavisi od vrste tumora, njegove lokacije i stadijuma [138]. Hirurško lečenje je u većini slučajeva nedovoljno za potpuno izlečenje, te se zasebno primenjuje samo kod niskorizičnih pacijenata u ranim fazama bolesti. Zbog veće efikasnosti, uglavnom se koriste kombinovani tretmani. Ukoliko nastupi metastaza, neophodna je sistemska terapija, i to imunoterapija, hormonska terapija ili hemioterapija, s obzirom na to da se isporukom kroz krvotok olakšava pristup diseminovanim ćelijama tumora [139].

Hemioterapija još uvek predstavlja najefikasniji tretman protiv kancera. Citostatici (hemioterapijski lekovi) izazivaju programiranu ćelijsku smrt, apoptozu, bilo direktno delujući na dezoksiribonukleinsku kiselinu ili ciljajući proteine uključene u regulaciju ćelijskog ciklusa [139]. Klasični hemioterapeutici na bazi platine ulaze u ćelije putem različitih mehanizama, ali pre svega preko transportera bakra. Po ulasku u ćeliju, dolazi do aktivacije leka otpuštanjem labilnih grupa, poput hloridnih jona ili karboksilatnih liganada. Aktivacijom lek postaje visokoreaktivan i može stupiti u interakciju sa velikim brojem intracelularnih biomolekula. Platinski lekovi se lako mogu zakačiti za peptide i proteine koji sadrže metioninske i cisteinske ostatke, posebno za glutation, dok je njihova najvažnija meta nuklearna DNK. Ovi agensi se pretežno vezuju za N7 guanina, ali i adenzinske ostatke, što dovodi do odmotavanja i povijanja DNK lanca. To pak sprečava odigravanje procesa replikacije i transkripcije, najzad inicirajući apoptozu [140].

Treba imati u vidu da je pored opšte upotrebe klasičnih citostatika, terapijski uspeh ovih lekova ograničen brojnim nuspojavama usled njihovog neselektivnog dejstva, te citotoksičnosti izražene prema zdravim ćelijama [139–141]. Naime, određen stepen selektivnosti ovih lekova

proističe iz povećane potrebe ćelija kancera za nutrijentima, ali pored ćelija raka, citostatike preuzimaju i ćelije drugih brzorastućih tkiva. Stoga hemioterapija može posebno pogoditi sluzokožu usta, grla, želuca i creva, dovodeći do gastrointestinalne toksičnosti, kao i koštanu srž, što može rezultovati smanjenjem proizvodnje belih i crvenih krvnih zrnaca. Folikuli dlake takođe uključuju ćelije koje se brzo umnožavaju i koje mogu biti na meti citostatika, te je opadanje kose (alopecija) veoma česta propratna pojava hemioterapije. Osim toga, zbog izlučivanja putem urina hemioterapeutici ispoljavaju nefrotoksičnost uništavajući bubrege, kao i hepatotoksičnost oštećujući jetru, u kojoj se lekovi primarno metabolišu [140].

Rezistencija ne hemioterapiju je još jedan od razloga neuspešnosti lečenja i uzrok preko 90% smrtnih ishoda [142]. Ova pojava može biti posledica smanjene isporuke citotoksičnih agenasa do hipoksičnih ćelija tumora nedovoljno snabdevanim krvlju, te posledično izloženim nižim koncentracijama leka, redukovano preuzimanja lekova zbog promena u strukturi i funkciji proteina uključenih u njihov transport, smanjene aktivnosti lekova koji zahtevaju metaboličku aktivaciju dejstvom enzima, ili povećane sposobnosti reparacije DNK [139]. Tokom primene klasičnih hemioterapeutika koji neposredno utiču na DNK, genske mutacije omogućavaju ćelijama da postanu rezistentne [141].

U cilju redukcije neželjenih dejstava i povećanja efikasnosti lečenja, veliki napori se ulažu u dizajniranje ciljanih terapija, uključujući sintezu novih lekova, kao i razvoj alternativnih načina za njihovu isporuku [141].

2.3.3. Pauloni kao potencijalni antikancerski lekovi

Istraživanja fokusirana na inovativne lekove koji ne ciljaju DNK sve više dobijaju na značaju [10]. S obzirom na to da brojne genetske i epigenetske promene dovode do njihove prekomerne aktivnosti u malignim ćelijama, atraktivnu metu za razvoj antikancerske terapije predstavljaju ciklin-zavisne kinaze (eng. *cyclin-dependent kinase*, CDK), proteini koji imaju ključnu ulogu u regulaciji životnog ciklusa ćelije [11]. CDK čine porodicu multifunkcionalnih enzima koji omogućavaju modifikaciju različitih proteinskih supstrata, kako bi se ćelijski ciklus mogao nastaviti. Aktivni CDK-ciklin kompleksi posreduju fosforilaciji, odnosno prenosu fosforil grupe sa adenzin tri fosfata (ATP) na odgovarajuće supstrate. Za enzimsku aktivnost CDK neophodno je vezivanje regulatorne subjedinice – ciklina, ali i fosforilacija ostataka odgovarajućih aminokiselina katalitičke subjedinice – kinaze [11,143]. Inaktivacija enzima može biti postignuta kroz degradaciju ciklina specifičnom proteolizom posredovanom ubikvitinom, čvrstim vezivanjem inhibitornog proteina za holoenzim, ili inhibitornom fosforilacijom holoenzima [143].

Jedinjenja iz klase 7,12-dihidroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-ona (paulona) poznata su kao ATP-kompetitivni inhibitori CDK [144], te su postali predmet istraživanja pojedinih antikancer studija. Osim toga, pokazano je da pauloni deluju kao inhibitori glikogen-sintaza-kinaze-3 beta [145], enzima koji igra ulogu u ćelijskom ciklusu, apoptozi, reparaciji DNK, rastu tumora i metastazi [146].

Zbog velikog potencijala, razvijen je čitav niz modifikovanih liganada i njihovih metalnih kompleksa iz klase indolo[3,2-*d*]benzazepina, u cilju optimizacije fizičko-hemijskih karakteristika, bioraspoloživosti i antiproliferativne aktivnosti ovih agenasa [147,148].

Jedinjenje korišćeno u ovoj studiji je modifikovani paulonski ligand (**HL**), za koji je kovalentno vezan slobodni radikal 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO). Za **HL** i njegov kompleks sa bakrom pokazano je da su izrazito citotoksični, kao i da deluju na enzim ribonukleotid reduktazu (RNR) [148]. RNR katalizuje proces formiranja prekursora za biosintezu i obnovu DNK. Odgovoran je za redukciju sva četiri ribonukleotida do odgovarajućih dezoksiribonukleotida, putem mehanizma koji uključuje dejstvo slobodnih organskih radikala. RNR sisara je tetramer koji se sastoji iz dve subjedinice, R1 (α_2 homodimer) i R2 (β_2 homodimer). Svaki α_2 polipeptid velike podjedinice R1 sadrži aktivno mesto za vezivanje supstrata i dva tipa alosternih mesta, dok se u okviru β_2 polipeptida

male podjedinice R2 nalaze prostetična grupa s dva jona gvožđa i stabilni tirozil radikal Tyr122^{*} u blizini, koji su krucijalni za enzimsku aktivnost RNR. Metalni kofaktor ima ulogu u redukciji molekularnog kiseonika, čime se postiže generisanje tirozil radikala i aktivacija enzima. Katalitički ciklus započinje reverzibilnim radikalskim transferom sa Tyr122^{*} iz R2 subjedinice na cistein aktivnog mesta u R1 subjedinici, gde se odigrava redukcija supstrata [149–151].

Za ligand **HL** i njegov kompleks sa bakrom utvrđeno je da efikasno redukuju tirozil radikal R2 subjedinice humanog RNR enzima, naročito u prisustvu spoljašnjeg redoks reagensa. Najveći doprinos njihovoj biološkoj aktivnosti pretpostavlja se da potiče od modifikone paulonske strukture na originalnoj laktamskoj jedinici, gde se kreira potencijalno tridentatno mesto za vezivanja metala [148].

S obzirom na antioksidativna svojstva nitroksida [152], konjugovanje paulonskih liganda sa slobodnoradikalnom jedinicom poput TEMPO-a, predstavlja dobar pristup za unapređenje antitumorskih svojstava potencijalnih lekova. Zaista, prisustvo TEMPO radikala rezultovalo je većom citotoksičnošću u poređenju sa odgovarajućim paulonskim jedinjenjima bez slobodnoradikalne jedinice, premda ne u svim ispitivanim kancer ćelijskim linijama [148].

Najzad, za potrebe ove disertacije, obeležavanje leka TEMPO radikalom je bilo od posebne važnosti zbog mogućnosti praćenja kinetike njegovog otpuštanja pomoću EPR spektroskopije.

2.3.4. Alternativni načini isporuke antikancerskih agenasa

Imajući u vidu da naspram direktne administracije antitumorskih agenasa, inkapsulacija lekova unutar različitih nosača dovodi do poboljšanja farmakokinetike, farmakodinamike, cijane isporuke i redukovane hemotoksičnosti, sve više studija je usmereno na razvoj različitih sistema za isporuku poput micela [153], lipozoma [154], polimernih nanočestica [155], kao i hidrogelova [156].

Kako je većina antitumorskih lekova hidrofobna, njihova efikasna isporuka do unutarćelijskih meta je otežana [7]. Sposobnost albumina da poveća rastvorljivost slabo rastvornih jedinjenja [5] je korišćena u pojedinim antikancer studijama radi prevazilaženja pomenutog problema. Tako se konjugovanje docetaksela sa albuminom pokazalo manje toksičnim u odnosu na formulaciju leka u kliničkoj upotrebi, a koja izaziva neželjena dejstva usled prisustva surfaktanta *Polysorbate 80* u velikim koncentracijama [157]. Za dostavu agenasa koji se brzo eliminišu iz organizma od značaja je činjenica da albumin može produžiti njihovo vreme poluživota *in vivo* [5]. Poboljšanje terapijske efikasnosti interleukina-2, koji pokazuje potencijalnu, ali kratkoročnu antikancersku aktivnost, upravo je postignuto kroz njegovu fuziju sa HSA [158]. Osim toga, kod pojedinih proteina s citotoksičnim dejstvom, farmakodinamika je unapređena spajanjem s domenom koji vezuje albumin (eng. *albumin binding domen*, ABD) pošto uđe u cirkulatorni sistem [159]. Zahvaljujući postojanju slobodnog cisteina u strukturi albumina, razvijeni su maleimid–doksorubicin i maleimid–kamptotecin pro-lekovi. Ovi derivati su formulisani tako da se brzo vezuju za Cys34 endogenog albumina *in situ*, a aktivna supstancija oslobađa na mestu tumora usled promene pH ili dejstva enzima [160,161]. Na sličan način su dizajnirani i pro-lekovi na bazi platine(II) i platine(IV) koji se vezuju za albumin [162,163], kao i albuminski konjugati organorutenijumskih kompleksa [164].

Posebna pogodnost za razvoj nosača za ciljanu isporuku baš na bazi albumina leži u samoj strukturi tumorskog tkiva. Naime, za razliku od zdravog tkiva, vaskulatura tumora se odlikuje povećanom permeabilnošću i smanjenom limfnom drenažom što dovodi do specifičnog nagomilavanja makromolekula, te albumina u malignom tkivu [8]. Dodatni podsticaj predstavlja činjenica da je formulacija paklitaksela vezanog za albuminske nanočestice, odobrena za lečenje metastatskog raka dojke, metastatskog raka pankreasa i nemikrocelularnog karcinoma pluća, pod komercijalnim nazivom *Abraxane*, već postigla uspeh u kliničkoj praksi. Primena Nab (od eng. *nanoparticle albumin bound*) tehnologije za sintezu nanočestica kroz nekovalentne

interakcije, razvijene na leku *Abraxane*, polako se proširuje i na druge lekove protiv raka, rapamicin i docetaxel [9].

Među publikacijama koje se odnose na dizajniranje sistema za isporuku antikancerskih lekova, brojne se tiču hidrogelova na bazi biopolimera kao što su hitosan [165], alginat [166], agaroza [167] i želatin [168], dok je tek nedavno BSA hidrogel umrežen epihlorohidrinom, kao nosač doksorubicina, bio predmet ispitivanja [48]. Imajući u vidu nedostatak studija na temu hidrogelova baziranih na humanom serumskom albuminu, a s druge strane, izuzetni potencijal ovog proteina u pogledu vezivanja različitih lekova, o čemu će dodatno biti reči u narednom poglavlju, u okviru disertacije razvijan je hidrogel na bazi HSA koji bi služio kao rezevoar citotoksičnog paulonskog liganda **HL**.

2.4. Serumski albumin

Serumski albumin (SA) je najzastupljeniji protein u krvnoj plazmi kičmenjaka čineći preko 60% ukupnih plazma proteina, koncentracije koja se u u humanom serumu kreće 35–50 g/l [169,170]. Albumin je multifunkcionalan, relativno mali globularni protein molekulske mase ~ 66 kDa, koji se primarno sintetiše u jetri [171]. Nasuprot tome, mesta njegove razgradnje su rasprostranjena, premda većina proteina biva hidrolizovana u mišićima i koži. Iz jetre se albumin izlučuje u krvotok, a distribuira se i u ekstravaskularnom prostoru. Ukupna količina albumina u ljudskom organizmu iznosi oko 360 g, od čega se približno jedna trećina nalazi u cirkulaciji krvi, a dve trećine izvan [170,172]. Ipak, koncentracija HSA u krvotoku je veoma visoka, tako da albumin doprinosi ukupnom onkotskom pritisku plazme sa čak 80% [170,173]. S obzirom na njegovo prisustvo u ekstravaskularnom prostoru, albumin je uključen i u regulaciju količine tečnosti u tkivima [174].

Za protein koji cirkuliše, odlikuje se veoma dugim vremenom poluživota u plazmi, koje u proseku iznosi 19 dana. Između ostalog, razlog tome je što se albumin iz ekstravaskularnog prostora vraća u cirkulaciju preko limfnog sistema [170].

Usled prilične rasprostranjenosti u krvi i odgovarajućeg aminokiselinskog sastava, albumin igra i ulogu krvnog pufera. Veliki broj histidinskih ostataka u strukturi albumina posebno utiče na održavanje kiselo-bazne ravnoteže u fiziološkom opsegu pH vrednosti [174].

Albumin je glavni antioksidans u krvnoj plazmi, koja je kontinualno izložena oksidativnom stresu. Antioksidativni kapacitet SA delimično je u vezi sa njegovom sposobnosti vezivanja metalnih liganada. Katjonski ligandi poput gvožđa i bakra posreduju generisanju reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS). Naime, joni Fe^{2+} ili Cu^{2+} u Fentonovoj reakciji sa vodonik peroksidom daju veoma reaktivne hidroksilne radikale. S obzirom na to da albumin poseduje visokoafinitetno mesto za vezivanje Cu^{2+} , njegovo učešće u Fentonovoj reakciji je na taj način limitirano. Osim toga, posredna antioksidativna aktivnost proističe iz vezivanja bilirubina i azot-monoksida za albumin, koji predupređuju oksidativna oštećena polinezasićenih masnih kiselina vezanih za albumin, ali i samog proteina [175].

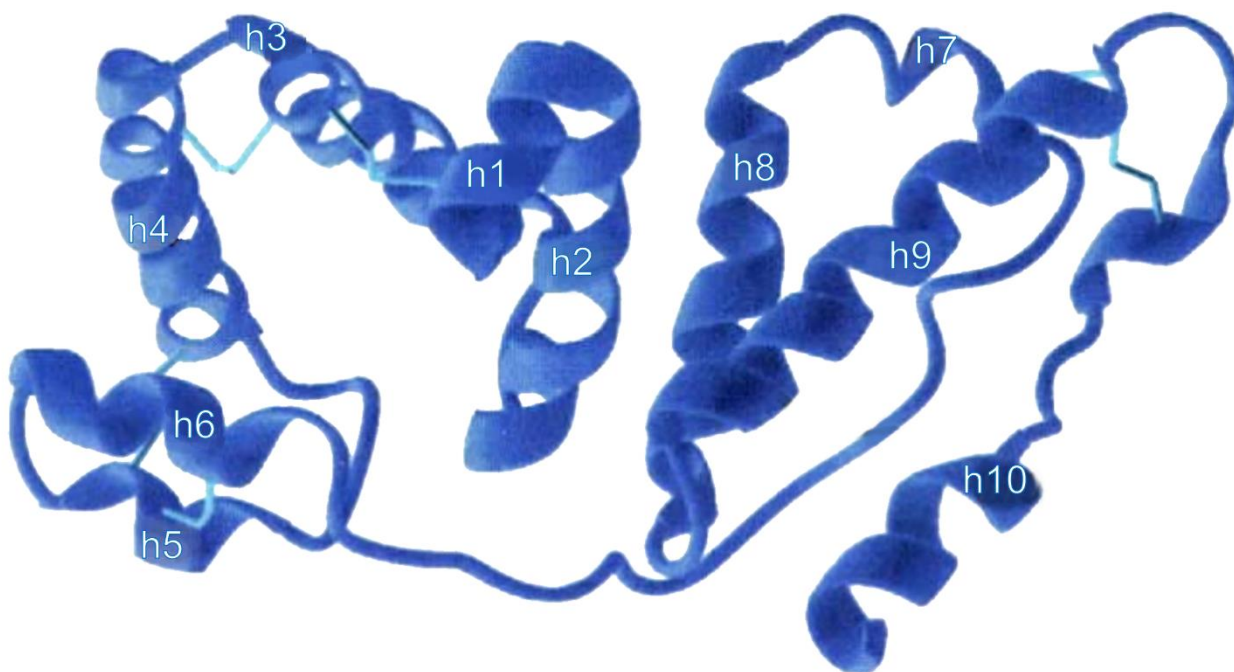
Najveći doprinos antioksidativnoj aktivnosti albumina pripisuje se cisteinu na poziciji 34 polipeptidnog lanca. Kod zdravih odraslih osoba, između 70% i 80% albumina je u formi tzv. merkaptoalbumina. U tom obliku albumina, Cys34 poseduje slobodnu sulfhidrilnu grupu, dok se u preostalim slučajevima formira disulfid sa cisteinom, homocisteinom ili glutationom [173,175]. Preko redukovano Cys34 moguće je ukloniti moćne oksidanse poput hidroksilnog radikala i peroksinitrita. U reakciji sa ovim vrstama, oksidacijom Cys34 dolazi do formiranja derivata sulfenske kiseline, koji eventualno može biti dalje oksidovan do sulfinskog ili sulfonskog oblika. Sulfenski oblik može formirati disulfid s potencijalom da se redukuje natrag do merkaptoalbumina, čime se obnavlja antioksidativna funkcija [171,175]. Pored cisteina, u antioksidativnoj odbrani učestvuju i metioninski ostaci, kojih ima ukupno šest. Met je posebno podložan oksidaciji od strane različitih oksidanasa, formirajući metionin sulfoksid, koji se može redukovati opet do metionina, bilo dejstvom blagih reduktanasa ili metionin sulfoksid reduktaze [175].

Principijelna uloga serumskog albumina jeste transport mnogobrojnih endogenih i egzogenih supstanci, koja je usko povezana sa njegovom strukturom. Zahvaljujući postojanju brojnih mesta za vezivanje liganada unutar proteinskih domena, albumin ima sposobnost da čvrsto veže masne kiseline, bilirubin, hem, azot monoksid, jone prelaznih metala i čitav spektar lekova [170]. SA se pokazao kao pogodan nosač varfarina, profena, salicilata, penicilina, sulfonamida, indola i benzodiazepina. Složeni mehanizam modulacije vezivanja liganada za HSA može se sagledati kroz prizmu korelacije između funkcije i strukture albumina [176].

2.4.1. Struktura serumskog albumina

Primarnu strukturu HSA čini polipeptidni lanac izgrađen od 585 aminokiselina, uključujući svega jedan slobodan tiptofan (Trp) i čak 35 cisteina koji grade 17 disulfidnih mostova, pri čemu je Cys34 slobodan [177]. U aminokiselinskoj sekvenci HSA su pored cisteina, veoma zastupljeni Leu, Glu i Lys, za razliku od Met, Gly i Ile [176].

Čak 67% sekundarne strukture HSA izgrađuje α -heliks, dok ostatak čine zaokreti i izduženi delovi polipeptidnog lanca, pri čemu β -ploča potpuno izostaje. Protein zauzima konformaciju oblika srca, koja se može aproksimirati kvadrom sa osnovom jednakostraničnog trougla dimenzija stranice 80 Å, i visine 30 Å. Čine je tri domena, I (1–195), II (196–383) i III (384–585), od kojih svaki uključuje po 10 glavnih α -zavojnica raspoređenih u dva odvojena poddomena, A i B. Poddomeni dele zajednički strukturni motiv, koji se proteže duž heliksa od 1 do 4 (h1–h4, poddomen A), odnosno od heliksa 7 do 10 (h7–h10, poddomen B) (slika 16), s tim izuzetkom što u IA ne postoji disulfidni most koji povezuje h1 i h3. U poddomenu A postoje dva dodatna kratka antiparalelna heliksa, h5 i h6, koji se drže čvrsto parom disulfidnih mostova. Unutar pododmena A (izuzev IA) postoje ukupno 4 interheliksna S–S mosta, uključena u duži dvostruki zaokret, praćen kraćim. Pododmenu B se uz heliksni motiv pridružuje i izduženi deo polipeptidnog lanca, kojim je povezan sa poddomenom A [173,176–178].



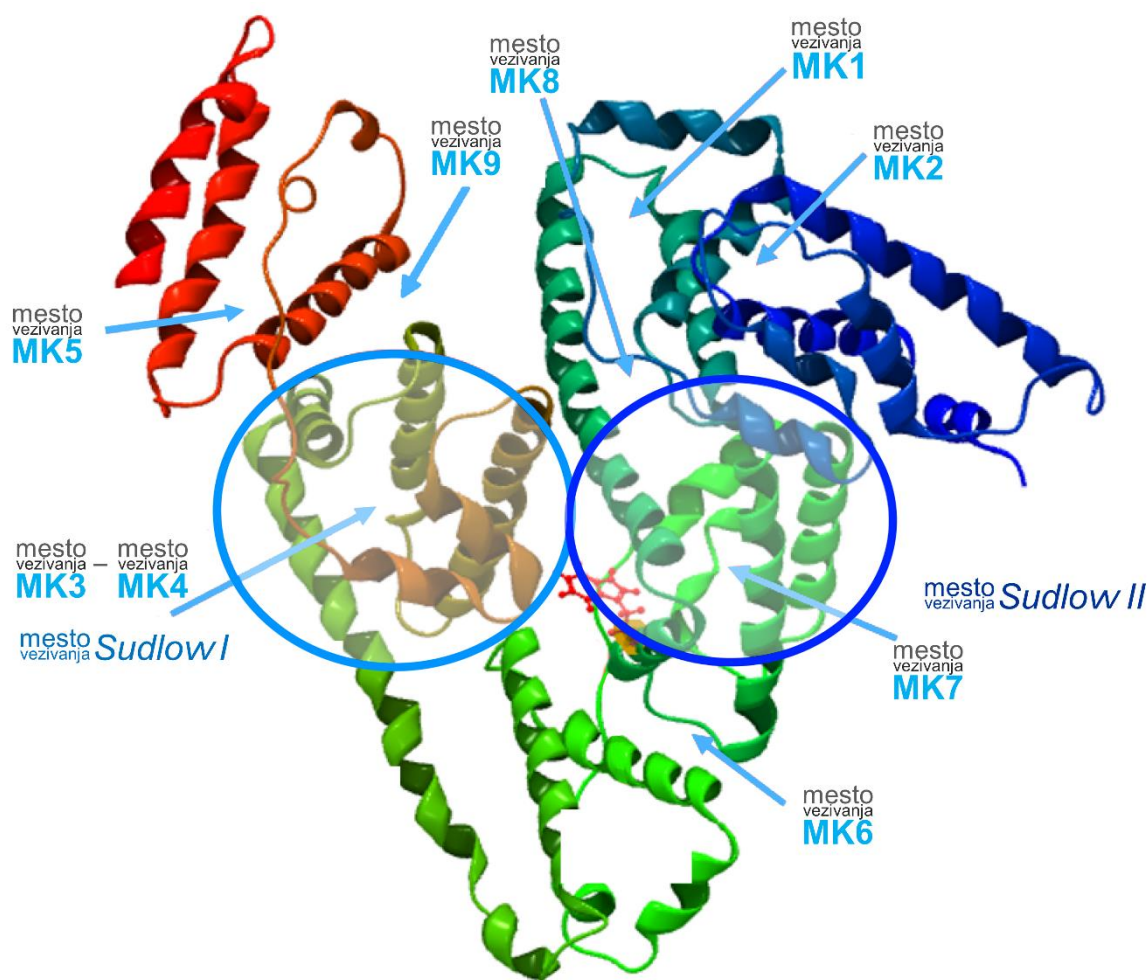
Slika 16. Prikaz domena II u proteinu HSA sa glavnim heliksima označenim kao h1–h10 i disulfidnim mostovima obojenim svetloplavom (prilagođeno iz [177]).

Međusobno povezivanje domena se ostvaruje kroz nastavak heliksne strukture tako što se na C-kraj heliksa IB i IIB nadovezuje N-kraj heliksa IIA, odnosno IIIA. Povezanost IB–IIA rezultuje najdužim zavojnicom od 31 aminokiselinskih ostataka. Međuregion poddomena IA i IB je povezan hidrofobnim interakcijama i vodoničnim vezama sa poddomenom IIA, čineći da domeni I i II stoje pod gotovo pravim uglom, zauzimajući formu nalik slovu „T“. Domen III ostvaruje interakciju praktično samo sa poddomenom IIB, na koji se nastavlja tako da domeni I i III čine sklop koji nalikuje slovu „Y“, dok je od poddomena I odvojen velikim kanalom oformljenim od IB, IIIA i IIIB

poddomena, kroz svega nekoliko međusobnih kontakata. Uprkos strukturnoj sličnosti, susedni domeni interaguju na različite načine, te se kroz specifičnu orijentaciju domena I–II naspram domena II–III ostvaruje asimetrično okruženje sa nizom mesta za vezivanje liganada.

2.4.1.1. Mesta vezivanja u HSA

Jedinstvena sposobnost serumskog albumina da vezuje različite endogene i egzogene supstancije male molekulske mase, ali i peptide i proteine [176], proističe iz povoljne sprege hidrofobnih džepova prisutnih u strukturi i naelektrisanja bočnih lanaca, kao i izrazite fleksibilnosti polipeptidnog lanca, pre svega na mestima spojeva poddomena, odnosno zaokreta [179].



Slika 17. Organizacija domena u trodimenzionalnoj strukturi HSA sa označenim glavnim mestima za vezivanje liganada (prilagođeno iz [180]).

Dugolančane masne kiseline su primarni fiziološki ligandi HSA, koje se mogu vezati za više mesta različitog afiniteta, asimetrično raspoređenih u proteinu, uključujući svih šest njegovih poddomena (slika 17) [176,180]. Albumin je glavni transportni protein za isporuku masnih kiselina bilo u ili iz tkiva, zavisno od stanja metabolizma. Problem niske rastvorljivosti dugolančanih masnih kiselina u vodi (ispod 1 μM) prevaziđena je upravo zahvaljujući multiplnim hidrofobnim mestima koja obezbeđuju vezivanje za protein, čime se efektivna rastvorljivost MK povećava do milimolarne koncentracije. Pri fiziološkim uslovima je između 0,1 i 2 molekula masnih kiselina vezano po

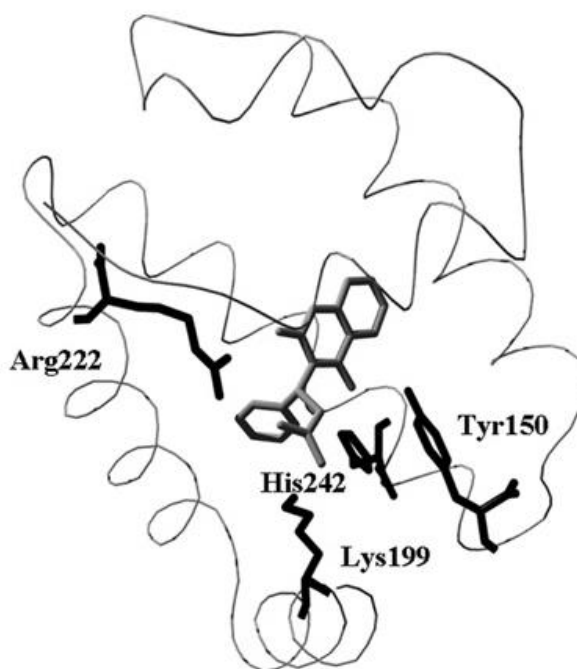
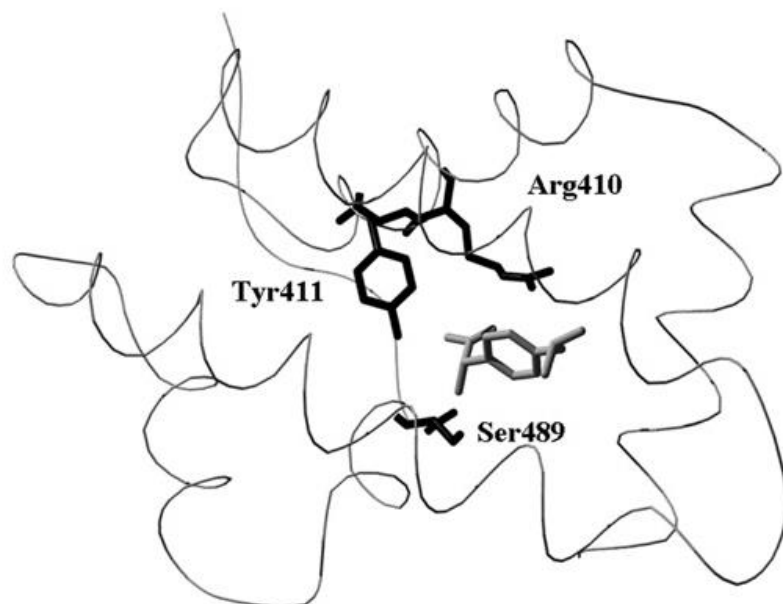
molekulu HSA, pri čemu molarni odnos MK/HSA u mikrocirkulaciji može biti mnogo viši tokom gladovanja ili pri ekstremnim fizičkim naporima, kao i kod pacijenata koji boluju od dijabetesa, bolesti jetre ili kardiovaskularnih oboljenja [181].

Utvrđeno je da postoji sedam heterogeno raspoređenih mesta vezivanja MK u HSA [181], pri čemu se u pojedinim literaturnim izvorima navodi da SA može vezati i do devet ekvivalenata masnih kiselina [176,182]. Mesta vezivanja MK označena kao 1–7 su lokalizovana unutar odgovarajućih poddomena, dok se mesta vezivanja MK 8 i 9 nalaze na dnu, odnosno u gornjem delu procepa između poddomena IA–IB–IIA s jedne strane i poddomena IIB–IIIA–IIIB s druge strane. Mesta vezivanja MK 2, 4 i 5 s veoma visokim afinitetom vezuju MK, mesta vezivanja MK 1 i 3 ispoljavaju umeren afinitet za vezivanje MK, dok su 6 i 7 mesta vezivanja koja se odlikuju niskim afinitetom prema MK [176,181,182]. Dodatna mesta vezivanja 8 i 9 postaju okupirana samo u prisustvu kratkolančanih MK, odnosno pri visokim koncentracijama MK koje dovode do zasićenja ostalih vezivnih mesta [176,183].

U džepovima 1–5, MK su usidrene preko karboksilne grupe elektrostatičkim/polarnim interakcijama. Konkretno, u slučaju mesta vezivanja MK 1, lokalizovanog unutar šupljine oblika slova „D“ poddomena IB, formira se vodonična veza sa Arg117 iz dela polipeptidnog lanca koji povezuje podomen IB sa IIA, kao i sa molekulom vode, uz dodatnu stabilizaciju posredstvom hidroksilne grupe Tyr161 i karbonilnog kiseonika Leu182. U odustvu liganada, džep je zatvoren Tyr138 koji ostvaruje nekovalentne interakcije sa Tyr161. Za mesto vezivanja MK 1 može se istaći i to da delom odgovara vezivnom mestu hem grupe [176,183,184].

Veoma zatvoreno mesto vezivanja MK 2, nalazi se između poddomena IA i IIA, tako da zaklanja čak i karboksilni deo MK od rastvarača. Polarne glave masnih kiselina se drže u mestu vezivanja MK 2 preko vodoničnih veza sa Tyr150, Arg257 i Ser287, dok se metilenski repovi prostiru linearno duž uskog hidrofobnog kanala nastalog usled konformacionih promena pri vezivanju MK, koje dovode do poravnavanja poddomena IA i IIA [183].

U velikoj šupljini poddomena IIIA su locirana vezivna mesta MK 3 i 4, izgrađena od šest heliksa, koja čine i jedno od dva glavna mesta za vezivanje lekova, tzv. *Sudlow II* mesto, tipično mesto vezivanja ibuprofena. U mestu vezivanja MK 3 se obrazuju soni mostovi sa Arg348 i Arg485, kao i vodonična veza sa Ser342, dok karboksilne glave MK vezane u mestu 4 uspostavljaju vodonične veze sa Tyr411 i Ser489, dok se soni most formira sa Arg410, a metilenski rep prostire kroz hidrofobni tunel koji prolazi kroz poddomen IIIA. Mesto vezivanja lekova *Sudlow II* predstavlja pretežno nepolarni region, koji uključuje deo zauzet metilenskim repom MK vezane u mestu 3 i polarno parče koje je u kontaktu sa karboksilnom grupom MK u mestu 4, pri čemu nije uočeno da lekovi zalaze u uski hidrofobni tunel mesta vezivanja MK 4 u koji se smešta ugljovodonični rep MK [176,184]. Za mesto *Sudlow II* se prevashodno vezuju aromatične karboksilne kiseline koje poseduju negativno naelektrisanje na jednom kraju molekula, razdvojene od hidrofobnog dela. Takvom strukturom se odlikuju nesteroidni antiinflamatorni agensi poput ibuprofena i lekovi iz grupe benzodiazepina, čiji je predstavnik diazepam [181,184]. Ovi lekovi se smeštaju u centralnom delu mesta *Sudlow II*, interagujući sa hidroksilnom grupom Tyr411, pri čemu vezivanju doprinose i interakcije sa aminokiselinskim ostacima Arg410 i Ser489, koje se ostvaruju kroz sone mostove i vodonične veze (slika 18, gore) [176].



Slika 18. Vezivanje ibuprofena za mesto *Sudlow II* sa naznačenim aminokiselinskim ostacima Tyr411, Arg410 i Ser489 (gore) i varfarina za mesto *Sudlow I* sa naznačenim aminokiselinskim ostacima Tyr150, Lys199, His242 i Arg222 (dole) (prilagođeno iz [176]).

Hidrofobni kanal za vezivanje MK 5, pozicioniran u poddomenu IIIB, vezuje MK u produženoj linearnoj konformaciji, držeći molekul preko vodonične veze i sonih mostova formiranih između polarne glave MK i bočnih grupa Tyr401 i Lys525 [176,183,184].

Nasuprot tome, u slučaju vezivnih mesta MK 6 i 7 ne postoji jasna potvrda o polarnim interakcijama sa karboksilnom grupom MK, što je indicija niskog afiniteta za vezivanje MK mesta 6 i 7 [184]. Mesto vezivanja MK 7, lokalizovano u hidrofobnoj šupljini poddomena IIA, poklapa se sa jednim od dva glavna mesta za vezivanje lekova, poznatim kao *Sudlow I* mesto [176]. Za ovo mesto se primarno vezuju glomazni, hidrofobni, heterociklični anjoni, odnosno molekuli sa negativnim naelektrisanjem lokalizovanim u središnjem delu. Lekovi poput antikoagulansa varfarina su tipični ligandi koji se pozicioniraju u centru mesta *Sudlow I*, pre svega zahvaljujući hidrofobnim kontaktima između leka i proteina, ali i nizu specifičnih elektrostatičkih interakcija. Mesto vezivanja se sastoji od dve podkomore koje prihvataju različite delove molekula varfarina. Tako se benzil grupa smešta u podžep formiran od Phe211, Trp214, Leu219 i Leu238, uz dodatne kontakte sa Arg218 i His242. U ovoj komori se nalazi dodatni bočni džep koji nije okupiran varfarinom, ali može vezati hidrofobni deo nekog drugog liganda. Kumarinska grupa u strukturi varfarina ostvaruje hidrofobne kontakte sa okolnim bočnim grupama unutar džepa ograničenog Ala291 i Leu238. Zadnji kraj kumarinskog prstena je u kontaktu sa Ile260, Ile264, Ile290 i alifatičnim delovima Arg257 i Ser287. R(+) i S(-) enantiomeri varfarina se isto pozicioniraju unutar hidrofobnog džepa, u gotovo identičnim konformacijama, tako da nema značajnih razlika u elektrostatičkim interakcijama koje ovi enantiomeri ostvaruju. Oba enantiomera varfarina imaju sposobnost uspostavljanja tri vodonične veze, sa Tyr150, His242, kao i Lys199 ili Arg222 [176,185]. Mesto *Sudlow I* sa naznačenim aminokiselinskim ostacima najznačajnijih za vezivanje lekova prikazano je na slici 17, dole.

Poznato je da se za serumski albumin može vezati na stotine lekova sa relativno visokim afinitetom [186]. Imajući u vidu sposobnost ovog proteina da povećava rastvorljivost hidrofobnih agenasa i produži njihovo vreme poluživota *in vivo*, doprinos ciljanom isporuci uz minimizaciju neželjenih efekata i poboljšanje terapijske efikasnosti, stiče se utisak da je reč o idealnom kandidatu nosača lekova. Njegova uloga u isporuci lekova je dobro utvrđena, dok postepeno i hidrogelovi na bazi albumina dobijaju na značaju. Do danas je sintetisano nekoliko tipova hidrogelova na bazi goveđeg, ali i humanog serumskog albumina. S obzirom na to da je BSA strukturni homolog HSA, uz preklapanje aminokiselinskog sastava od 76% [187], u pojedinim studijama je korišćen kao adekvatna alternativa HSA.

3. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA

Predmet rada doktorske disertacije predstavlja razvoj spinski obeleženih hidrogelova na bazi serumskih albumina, BSA i HSA, i njihova karakterizacija primenom EPR spektroskopije i imidžinga u pogledu sadržaja vode, kontrolisane isporuke antikancerskih agenasa uz praćenje degradacije polimerne matrice, i osetljivosti na redoks okruženje.

Konkretni ciljevi istraživanja su navedeni u tekstu niže.

- **Izbor optimalne spinske probe i razvoj nove metodologije za određivanje sadržaja vode u hidrogelu**

Polazna hipoteza u razvoju nove metodologije za određivanje sadržaja vode u gelu bila je da EPR aktivna supstancija rastvorena u vodenoj fazi hidrogela, koja ne stupa ni u kakvu interakciju sa proteinskom matricom, ima uslova da bude indikator udela vode u hidrogelu. U procesu odabira spinske probe pogodne za određivanje sadržaja vode, hidrogelovi su sintetisani iz prekursorskih rastvora BSA koji sadrže jednu od tri spinske probe različitih fizičko-hemijskih karakteristika iz klase piperidinskih ili pirolidinskih nitroksida, da bi se potom na osnovu spektralne analize ispitala njihova interakcija sa vodenom, odnosno gel-fazom hidrogela. Po izboru adekvatne probe lokalizovane isključivo u vodenim porama gela, uspostavljena je međusobna funkcionalna zavisnost između mobilnosti probe, određene iz EPR spektara, i gravimetrijski merene količine vode u BSA hidrogelovima. Primenljivost predložene metode ispitana je na hidrogelovima različitog udela albumina dobijenim termalnom ili kombinovanom pH/termalnom sintezom, i na termalno-indukovanim gelovima na bazi drugih biomolekula, kao što su kolagen i agaroz, u koje je proba spolja uvedena nakon sinteze, pošto je vizuelno prodiranje spinske probe u BSA gel potvrđeno EPR imidžingom.

- **Izučavanje HSA hidrogela kao nosača antikancerskog liganda HL primenom EPR metode za praćenje vezivanja i kinetike oslobađanja lekova iz albuminskog hidrogela**

Drugi aspekt studije se odnosi na testiranje HSA hidrogela kao rezervoara citotoksičnog paulonskog liganda **HL**, spinski obeleženog, tako da bi se njegovo otpuštanje iz matrice moglo pratiti pomoću EPR spektroskopije. Osnovna ideja bila je da se imanentno svojstvo albumina da vezuje mnogobrojna hidrofobna jedinjenja iskoristi za razvoj nosača kojim bi se obezbedilo odloženo otpuštanje citotoksičnog agensa. Ispitivano je vezivanje **HL**-a u HSA rastvoru i u hidrogelu, te vršeno poređenje njegovog otpuštanja iz oba sistema, a radi procene pogodnosti gel-forme kao sistema za isporuku pre nego albumina u rastvoru. U okviru ovog dela istraživanja određivana je citotoksičnost **HL** liganda u humanoј kancer ćelijskoј liniji Colo-205 (adenokarcinom debelog creva). Takođe je analizirano kako se hidrogel ponaša u pogledu zadržavanja potencijalnog antikancerskog leka **HL** u prisustvu tumorskih ćelija.

- **Razvoj EPR protokola za ispitivanje procesa difuzije hidrofilnih molekula iz pora hidrogela i praćenje spontane degradacije hidrogela**

Kako se kao predmet istraživanja od važnosti za kontrolisanu isporuku nameću i proces difuzije vode/rastvorene supstancije kroz pore gela i degradacija hidrogela, za njihovo izučavanje su se pogodnim pokazali gelovi obeleženi hidrofilnom spinskom probom 3CP, odnosno lipofilnom 5-doksil-stearinskom (5-DS) kiselinom. Pretpostavka je bila da se 5-DS neće tek tako odvezati od HSA gel-matrice zbog jakog vezivanja obeleženih derivata stearinske kiseline za albumin, za koji je dobro poznato da poseduje bar sedam mesta za vezivanje srednje- i dugolančanih masnih kiselina [169,183].

- **Dizajn albuminskog hidrogela za detekciju vijabilnosti ćelija primenom EPR spektroskopije i imidžinga**

Fokus trećeg dela studije čine spinski obeleženi albuminski hidrogelovi, koji bi služili za detekciju vijabilnosti ćelija, a polazivši od premise da se redukcija EPR signala nitroksidne probe u prisustvu živih ćelija može iskoristiti kao marker redoks okruženja hidrogela. Njihova primena u tu svrhu testirana je na *Saccharomyces cerevisiae*, koji je korišćen kao model sistem. Uz to je utvrđivano da li postoji uticaj prisustva serumskog albumina na redukciju 3CP-a u prisustvu živih ćelija, da bi najzad 2D EPR imidžing bio primenjen radi vizuelizacije efekta redoks metabolizma ćelija kvasca na spinski obeležen albuminski gel.

Krajnji **cilj** navedenog istraživanja predstavljalo je produkovanje dva tipa višenamenskih hidrogelova na bazi albumina. Prvi tip hidrogela bi služio kao sistem za određivanje sadržaja vode i degradacije polimerne matrice primenom nove EPR metodologije. Drugi tip spinski obeleženog albuminskog hidrogela bi imao ulogu rezervoara antikancerskog leka sa kontrolisanim oslobađanjem, dok bi istovremeno mogao da se primenjuje u detekciji ćelijskog redoks okruženja na osnovu redukcije signala adekvatne spinske probe.

Najzad, namera je bila da razvoj ovakvog tipa hidrogela otvori put i budućoj primeni EPR spektroskopije i imidžinga u praćenju dejstva antikancerskih lekova, s obzirom na to da je u sprezi sa odgovarajućim spinskim probama, EPR-om moguće razlikovati zdrava od hipoksičnih malignih tkiva. Na ovaj način bi se otišlo korak dalje u povezivanju terapijske i dijagnostičke komponente u jedan entitet za brzo utvrđivanje citotoksičnosti antikancerskih lekova, preko potrebnoj zameni za dugačke i skupe biohemijske analize.

4. MATERIJALI I METODE

Proteinski hidrogelovi izučavani u datoj studiji dobijeni su metodom termalne ili kombinovane termalne/pH sinteze. Radi proučavanja albuminskih rastvora i hidrogelova primenjena je tehnika EPR spinskog obeležavanja tako što je u ispitivani sistem (protein) inkorporirana odgovarajuća spinska proba (stabilni paramagnetni radikal iz klase aminoksilnih jedinjenja koji sadrži slobodan elektron na $>N-O\cdot$ grupi, stabilisan pomoću četiri metil grupe), spinski obeleživač (paramagnetni derivat stearinske kiseline, kod kog je doksil grupa kovalentno vezana za C-atom iz metilenskog lanca), ili citotoksično jedinjenje za koji je kovalentno vezana slobodnoradikalaska proba. Hidrogelovi su primenom EPR spektroskopije i imidžinga analizirani u pogledu sadržaja vode i kontrolisane isporuke antikancerskog agensa uz praćenje degradacije polimerne matrice, a takođe je ispitana i njihova osetljivost na redoks okruženje.

4.1. EPR spektroskopija i imidžing

Za karakterizaciju hidrogelova korišćeni su CW-EPR spektroskopija i imidžing u X-oblasti (8–10 GHz). Snimanje je vršeno na Bruker Biospin Elexsys II E540 EPR spektrometru. Za procesuiranje spektara i slika korišćen je Bruker Xepr softver (*Xepr 2.6b.84*, Bruker BioSpin GmbH, Rajnašteten, Nemačka). Eksperimentalni parametri snimanja za EPR spektroskopiju su iznosili: frekvencija mikrotalasa 9,8 GHz, snaga mikrotalasnog zračenja 10 mW, modulaciona amplituda 0,5 G, modulaciona frekvencija 100 kHz. 2D EPR imidžing snimanja vršena su pri sledećim eksperimentalnim parametrima: frekvencija mikrotalasa 9,8 GHz, gradijent polja 15 G/cm ili 20 G/cm, snaga mikrotalasnog zračenja 10 mW, modulaciona amplituda 1 G, modulaciona frekvencija 100 kHz, vreme uzorkovanja 0,03 s, FOV (od eng. *field-of-view*) 10–13 mm.

4.2. Hemikalije

Za sintezu hidrogelova upotrebljeni su goveđi serumski albumin, BSA (čistoće $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), humani serumski albumin, HSA (čistoće $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD), agaroz (Serva Electrophoresis GmbH, Hajdelberg, Nemačka), i hidrolizat kolagena – želatin (Centrohem, Stara Pazova, Srbija), koji su rastvarani u dejonizovanoj vodi (Milli-Q, 18 M Ω ·cm) ili 75 mM rastvoru NaCl, pH 2 (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD).

Za obeležavanje proteinskih hidrogelova korišćene su spinske probe 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil, TEMPO, 3-karbamoil-2,2,5,5-tetrametilpirolidin-1-oksil, 3CP, 3-karboksi-2,2,5,5-tetrametilpirolidin-1-oksil, 3CxP, i spinski obeleživač 5-doksil-stearinska kiselina, 5-DS (Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD). Modifikovani paulonski ligand (izveden iz 7,12-dihidroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-ona) **HL** obeležen slobodnim radikalom TEMPO, sintetisan je od strane grupe prof. dr Vladimira Ariona sa Instituta za neorgansku hemiju Univerziteta u Beču, Austrija, kako je opisano u referenci [148]. Dato jedinjenje je prethodno okarakterisano primenom elementalne analize, infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom, EPR spektroskopije i masene spektrometrije sa elektrosprej jonizacijom [148].

Pri praćenju oslobađanja liganada iz rastvora/hidrogela, za dijalizu je služio fiziološki rastvor, tj. rastvor NaCl 0,9 g/l (Hemofarm, Vršac, Srbija).

Dimetil-sulfoksid (DMSO) kupljen je od proizvođača Merck KGaA, Darmštadt, Nemačka.

Reagensi za ćelijske kulture nabavljeni su od kompanije Sigma-Aldrich, Sent Luis, Misuri, SAD. Humana kancer ćelijska linija Colo-205 (adenokarcinom debelog creva) dobavljena je od firme LGC Promochem GmbH, Tedington, UK.

Primenljivost hidrogelova kao markera redoks okruženja testirana je na *Saccharomyces cerevisiae*, koji je korišćen kao model sistem. Korišćen je pekarski kvasac firme Lasaffre RS, Beograd, Srbija. Za bojenje neživih ćelija kvasca upotrebljen je 0,4% rastvor boje tripan plavo (eng. *trypan blue*, TB) firme Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets, SAD.

4.3. Određivanje sadržaja vode u BSA hidrogelovima

U pogledu sadržaja vode ispitivani su BSA hidrogelovi dobijeni iz prekursorskih rastvora udela albumina 2–30 % (*m/m*), obeleženih jednom od tri spinske probe (finalne koncentracije 0,5 mM), različitih fizičko-hemijskih karakteristika:

- TEMPO (nesupstituisana, amfifilna piperidinska proba rastvorljiva u organskim rastvaračima, slabo rastvorna u vodi);
- 3CP (neutralna, hidrofilna pirolidinska proba);
- 3CxP (negativno naelektrisana na fiziološkom pH, hidrofilna pirolidinska proba)

4.3.1. Priprema EPR spinski obeleženih BSA hidrogelova

Osnovni rastvor BSA koncentracije 0,42 g/ml (30% (*m/m*)) dobijen je rastvaranjem odgovarajuće količine albumina u dejonizovanoj vodi ili 75 mM rastvoru NaCl, pH 2 na sobnoj temperaturi. Od polaznog rastvora pripremana su razblaženja koncentracija BSA: 0,33 g/ml (25% (*m/m*)), 0,25 g/ml (20% (*m/m*)), 0,18 g/ml (15% (*m/m*)), 0,11 g/ml (10% (*m/m*)), 0,05 g/ml (5% (*m/m*)) i 0,02 g/ml (2% (*m/m*)). Merenja sa vodenim rastvorima BSA uključivala su sve tri probe, TEMPO, 3CP ili 3CxP, dok su rastvori pH 2 sadržali samo spinsku probu 3CP.

Uzorci za EPR snimanja pripremljeni su dodatkom 1 μ l 20 mM rastvora spinske probe (TEMPO, 3CP ili 3CxP) u 39 μ l određenog rastvora albumina. Po 30 μ l ovako pripremljenih uzoraka je uvučeno u gas-propusna teflonska crevca prečnika 1 mm (Zeus Industries Inc., Largo, Florida, SAD), i postavljeno unutar kvarcnih kiveta unutrašnjeg prečnika 3 mm (Wilmad-LabGlass, Vajnland, Nju Džerzi, SAD), radi akvizicije spektara. Teflonska crevca sa spinski obeleženim BSA uzorcima su u mikrocentrifuškim tubama inkubirana na temperaturi od 75 °C u termostatom vodenom kupatilu u trajanju od 40 min, nakon čega su ponovo snimani spektri termalno-indukovanih hidrogelova. Radi dobijanja hidrogelova s udelom vode manjim nego što je ograničeno rastvorljivošću BSA (< 70% (*m/m*) vode), hidrogelovi obeleženi spinskom probom 3CP su podvrgavani dodatnom sušenju na 85 °C u laboratorijskoj peći u trajanju od 1 h, 2 h, 3 h, 4 h i 5 h. Mase svih uzoraka (uključujući vodu, BSA, spinsku probu, kao i teflonsko crevce), merene su u svakom koraku, na početku eksperimenta, pre i posle geliranja/sušenja, kako bi se odredilo koliko je vode isparilo i izračunao tačan odnos masa vode i albumina u uzorcima BSA rastvora i termalno-indukovanih hidrogelova, kao i dodatno sušenih gelova.

4.3.2. Procena optimalne koncentracije spinske probe

Kako bi se utvrdilo da li je koncentracija spinske probe u uzorcima (0,5 mM) adekvatna za utvrđivanje sadržaja vode, uzete su u obzir i koncentracije probe 0,375 mM i 0,75 mM. Eksperimenti

su izvedeni sa 5% (m/m), 10% (m/m), 15% (m/m), 20% (m/m), 25% (m/m) i 30% (m/m) BSA rastvorima. Uključivali su samo nitroksidnu probu 3CP koja se pokazala najadekvatnijom za procenu količine vode u gelovima.

4.3.3. Korelisanje EPR spektralnih parametara sa količinom vode u spinski obeleženim BSA hidrogelovima

Analizom snimljenih EPR spektara nitroksida dobijeni su spektralni parametri iskorišćeni za računanje rotacionog korelacionog vremena, kao mere mobilnosti spinske probe u uzorcima, prema jednačini 30 [188]:

$$\tau_C = 0,65 \cdot w_0 \cdot \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 1 \right), \quad (30)$$

u kojoj je τ_C izraženo u ns, w_0 je širina centralnog pika u EPR spektru (izražena u G), a h_0 i h_{-1} su visine centralnog i pika na višem polju (izražene u proizvoljnim jedinicama). Zavisnost rotacionog korelacionog vremena u funkciji od odnosa masa vode i BSA u uzorcima (izraženih kao mg H₂O / mg BSA) predstavljena je grafički. Dobijene tačke su fitovane eksponencijalnom funkcijom drugog reda.

Validnost dobijenog fita je testirana na hidrogelovima u koje je proba uneta nakon sinteze, tako što su vrednosti masenih odnosa vode i albumina u uzorcima računane iz τ_C numeričkom inverzijom dobijene korelacione funkcije u programu MATLAB (The MathWorks Inc, Natick, Masačusets, SAD), i poređene sa stvarnim odnosom ovih masa izmerenih gravimetrijski.

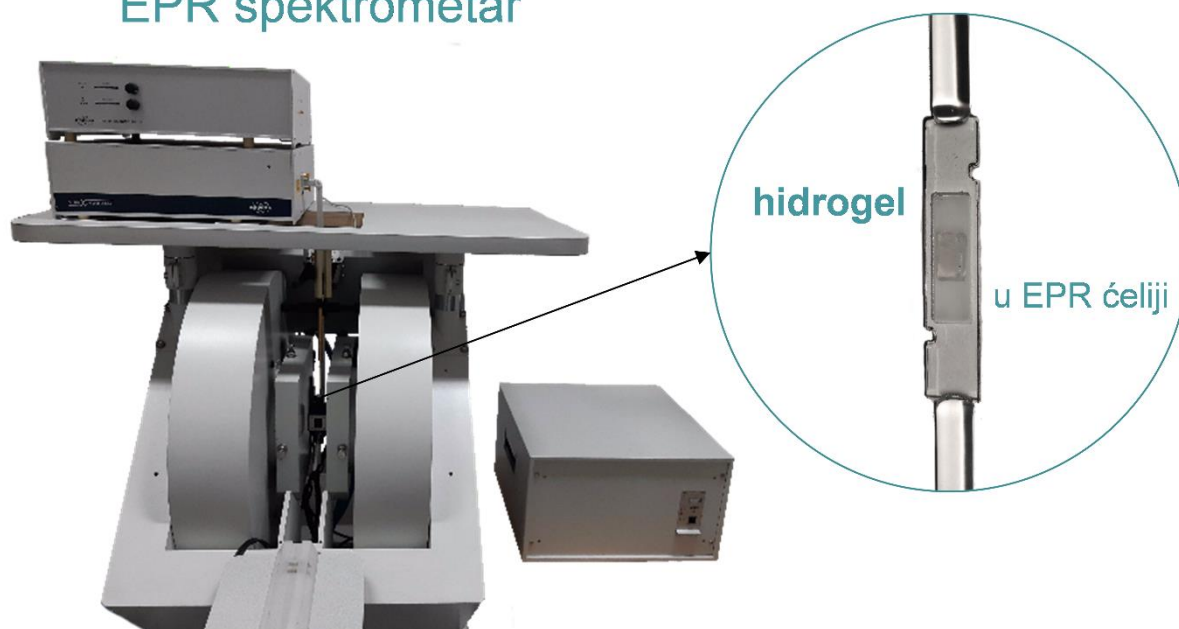
4.3.4. Provera EPR metodologije za određivanje sadržaja vode na hidrogelovima većih dimenzija

Za proveru predložene EPR metodologije za određivanje sadržaja vode u gelovima, pripremani su albuminski hidrogelovi prosečnih dimenzija $x = (5 \pm 1)$ mm, $y = (1,0 \pm 0,2)$ mm i $z = (10 \pm 2)$ mm, u koje je proba dodata nakon sinteze.

Primenljivost metodologije na hidrogelovima na bazi drugih biomolekula ispitivana je na hidrogelovima istih dimenzija, na bazi agaroze i hidrolizata kolagena (želatina). Ovi hidrogelovi su pripremani rastvaranjem agaroze, odnosno želatina u dejonizovanoj vodi zagrevanoj do oko 80 °C. Agarozu je rastvarana zagrevanjem u mikrotalasnoj pećnici. Uzorci su potom ostavljeni da geliraju hlađenjem na sobnoj temperaturi.

Pomenuti hidrogelovi, na bazi BSA, agaroze i želatina, obeležavani su spinskom probom 3CP nakon sinteze tako što je zapremina 3CP rastvora (5 mM) koja odgovara ~ 15% ukupne mase hidrogela naneta na gornju površinu gela (xz-ravan). Hidrogelovi su umotani u foliju kako bi se sprečilo isparavanje nakon čega su tako inkubirani 20 min na sobnoj temperaturi. Za potrebe snimanja EPR spektara i imidža, zbog veličine i oblika, hidrogelovi su postavljeni u tzv. EPR ćeliju za tkiva (eng. *EPR tissue sample cell*, Wilmad-LabGlass, USA), (slika 19).

EPR spektrometar



Slika 19. BSA hidrogel u EPR ćeliji.

4.4. Izučavanje HSA hidrogelova kao nosača antikancerskih jedinjenja

Ispitivanje pogodnosti albuminskih hidrogelova da služe kao nosači antikancerskih lekova vršeno je na HSA hidrogelovima dobijenim iz prekursorskih rastvora albumina koncentracije 5 mM (odgovara ~ 25% (m/m)) obeleženih modifikovanim paulonskim ligandom **HL** koji sadrži slobodni radikal TEMPO. Dodatno, radi uvida u procese degradacije i difuzije na molekulskom nivou, HSA hidrogelovi su obeležavani spinskim obeleživačem 5-DS, odnosno spinskom probom 3CP.

4.4.1. Ispitivanje vezivanja i otpuštanja liganda **HL** iz HSA rastvora i hidrogela

HSA rastvori su pripremani rastvaranjem odgovarajuće količine albumina u dejonizovanoj vodi na sobnoj temperaturi, te dodavanjem potrebne zapremine 1 mM rastvora **HL** koji sadrži 10% (v/v) DMSO u vodi, kako bi se dobili finalni rastvori 0,5 mM **HL** / 5 mM HSA (1:10) i 0,25 mM **HL** / 5 mM HSA (1:20). Nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi, vršeno je snimanje EPR spektara **HL**/HSA rastvora (po 30 μ l uvučeno u teflonsko crevce). EPR spektri 0,1 mM rastvora **HL**-a u vodi i u fiziološkom rastvoru su služili kao kontrole.

Rastvori spinske probe TEMPO koncentracije 0,5 mM u vodi i u 5 mM HSA pripremljeni su kako bi se ispitaio uticaj TEMPO konstituenta liganda **HL** na njegovo vezivanje za protein.

Radi praćenja spontanog otpuštanja liganda iz rastvora, 300 μ l **HL**/HSA rastvora (1:10 i 1:20) je dijalizirano u 50 ml fiziološkog rastvora tokom osam dana na sobnoj temperaturi, uz svakodnevnu zamenu medijuma za dijalizu svežim fiziološkim rastvorom. Pri tome su korišćena creva za dijalizu promera 12–14 kDa (Serva Electrophoresis GmbH, Hajdelberg, Nemačka). Koncentracija proteina u dijaliziranom rastvoru **HL**/HSA je redovno kontrolisana merenjem apsorbancije na talasnoj dužini

od 280 nm na UV-vis spektrofotometru PerkinElmer LAMBDA Bio+, a radi potvrde da se koncentracija albumina u rastvoru tokom dijalize održava konstantnom. EPR spektri **HL**/HSA rastvora, kao i medijuma za dijalizu, snimani su na svakih 24 h za vreme trajanja dijalize.

Termalno-indukovani **HL**/HSA hidrogelovi dobijeni su zagrevanjem 40 μ l odgovarajućih prekursorskih rastvora **HL**/HSA (1:10 ili 1:20) u cilindričnim kalupima (dijametra osnove 2,5 mm) na 75 °C u termostatnom vodenom kupatilu u trajanju od 40 min (nalik BSA hidrogelovima, odeljak 4.3). Hidrogelovi su dijalizirani u 50 ml fiziološkog rastvora na sobnoj temperaturi tokom 11 dana, uz svakodnevnu promenu medijuma za dijalizu. Na svakih 24 h su vađeni iz fiziološkog rastvora i ostavljeni da odstoje oko pola minuta na papiru koji apsorbuje vodu kako bi se uklonio višak vode sa njihove površine, nakon čega su postavljeni u EPR ćeliju radi merenja (slika 19).

4.4.2. 5-DS/HSA i 3CP/HSA spinski obeleženi hidrogelovi

Da bi se stekao uvid u promene u interakcijama unutar hidrogela na molekulskom nivou, termalnom indukcijom (kako je opisano u odeljku 4.4.1), sintetisani su hidrogelovi obeleženi 5-DS-om iz prekursorskih rastvora koji su sadržali 5-DS i HSA u odnosu 1:1 (5 mM 5-DS / 5 mM HSA). Hidrogelovi obeleženi 5-DS-om podvrgnuti su dijalizi u fiziološkom rastvoru u trajanju od 11 dana na sobnoj temperaturi. Medijum za dijalizu je svakodnevno zamenjen svežim, a EPR spektri hidrogelova snimani su na 24 h.

Radi ispitivanja procesa difuzije vode, odnosno malog liganda kroz pore hidrogela 0,5 mM 3CP / 5 mM HSA hidrogelovi (pripremljeni kao što je opisano u odeljku 4.4.1) su dijalizirani u fiziološkom rastvoru u trajanju od 3 h. Medijum za dijalizu je zamenjen svežim fiziološkim rastvorom nakon 1 h i 2 h, a EPR spektri snimani na sat vremena.

Za EPR merenja su oba tipa hidrogela postavljana u EPR ćeliju prikazanu na slici 19.

4.4.3. Ispitivanje *in vitro* citotoksičnosti liganda **HL** i **HL**/HSA hidrogelova

Citotoksičnost liganda **HL** ispitana je *in vitro* na ćelijama humanog adenokarcinoma debelog creva (Colo-205), gajenim u medijumu RPMI (od eng. *Roswell Park Memorial Institute*)-1640. Za određivanje metaboličke aktivnosti ćelija primenjena je kolorimetrijska metoda redukcije 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromida (MTT), dejstvom mitohondrijalne sukcinat dehidrogenaze.

HL je rastvoren u dimetil-sulfoksidu (tako da koncentracija DMSO nije prelazila više od 1% (v/v) u finalnim uzorcima) i razblaživan u 100 μ l medijuma za ćelijske kulture. HSA hidrogelovi zapremine 40 μ l sadržali su **HL** u koncentraciji od 0,5, 1 i 5 mM. Semiadherentne ćelije su tretirane rastvorom tripsin/EDTA i podešene na gustinu od 10^4 ćelija u 100 μ l medijuma RPMI-1640. Po dodatku u bunariće izuzev kontrolnih, finalna zapremina uzoraka je iznosila 200 μ l. Inkubacija ćelija na 37 °C trajala je 72 h, nakon čega je po 20 μ l 5 mg/ml rastvora MTT dodato u svaki od bunarića. Posle 4 h inkubacije na 37 °C usledilo je dodavanje po 100 μ l 10% rastvora natrijum dodecil sulfata u 0,01 M HCl-u, a inkubiranje nastavljeno preko noći. Rast ćelija određivan je merenjem optičke gustine na 540/630 nm na Multiskan EX plate Thermo LabSystems čitaču. Inhibicija ćelijskog rasta je izražena kao vrednost IC₅₀, koja predstavlja inhibitornu koncentraciju pri kojoj se redukuje rast ćelija izloženih testiranom jedinjenju za 50%.

4.5. Ispitivanje osetljivosti spinski obeleženih hidrogelova za procenu vijabilnosti ćelija primenom EPR spektroskopije i imidžinga

U cilju testiranja primenljivosti spinske probe 3CP kao biomarkera ćelijskog metabolizma, 0,04 μmol spinske probe 3CP dodato je odgovarajućoj količini uzorka aktiviranog kvasca *Saccharomyces cerevisiae*.

Da bi se ispitala mogućnost da spinska proba 3CP služi kao indikator metaboličke aktivnosti ćelija u prisustvu albumina, po 0,5 μl 20 mM rastvora 3CP-a dodavano je u 100 μl destilovane vode ili u 100 μl suspenzije BSA/kvasac.

Broj vitalnih ćelija kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u uzorcima određivan je TB testom brojanjem na *Neubauer* hemocitometru. Procedura podrazumeva upotrebu boje tripan plavo koja ne prolazi kroz ćelijsku membranu očuvanog integriteta, te boji samo mrtve ćelije.

2D (ravan yz) EPR imidžing je snimljen na termalno-indukovanim BSA hidrogelovima sintetisanim iz 15% (*m/m*) rastvora albumina, spinski obeleženim 0,1 mM 3CP-om, pre i nakon 10 min inkubacije pošto je na jednu polovinu xz-površine hidrogela (okvirnih dimenzija $x = 4$ mm, $y = 2$ mm i $z = 7$ mm) naneto 5 μl uzorka kvasca (koji je sadržao $8,3 \cdot 10^8$ živih ćelija).

5. REZULTATI I DISKUSIJA

Termalno-indukovani BSA hidrogelovi, spinski obeleženi nitroksidnom probom TEMPO, 3CP i 3CxP, ispitani su u pogledu interakcije spinskih proba sa vodenom fazom, odnosno proteinskom matricom hidrogela, da bi BSA hidrogelovi dobijeni termalnom indukcijom ili kombinovanom pH/termalnom sintezom bili iskorišćeni za razvoj nove metodologije za određivanje sadržaja vode u hidrogelu.

Vezivanje i kinetika otpuštanja antikancerskog agensa iz albuminskih hidrogelova izučavani su na termalno-indukovanim HSA hidrogelovima koji su sadržali spinski obeleženi modifikovani paulonski ligand **HL**. Na isti način su analizirani HSA hidrogelovi obeleženi spinskom probom 3CP i obeleživačem 5-DS kako bi se stekao uvid u procese difuzije liganda/vode kroz pore gela, odnosno degradacije hidrogela.

Primenljivost albuminskih hidrogelova za praćenje vijabilnosti ćelija je testirana na 3CP/BSA hidrogelovima u *Saccharomyces cerevisiae*, koji je korišćen kao model sistem.

5.1. EPR metodologija za određivanje sadržaja vode u hidrogelu

Deo rezultata prikazanih u ovom poglavlju je objavljen u [189].

Prvi korak u razvoju metodologije za određivanje sadržaja vode u hidrogelu odnosio se na izbor adekvatne spinske probe koja bi služila kao indikator količine vode u uzorku, a polazeći od hipoteze da EPR aktivna supstancija rastvorena u vodenoj fazi hidrogela, koja nikako ne stupa u interakciju sa proteinskom matricom, ima uslova da bude pokazatelj udela vode u gelu. U tom pogledu, primenljivost tri pomenute aminoksilne probe različitih fizičko-hemijskih svojstava ispitana je na BSA hidrogelovima.

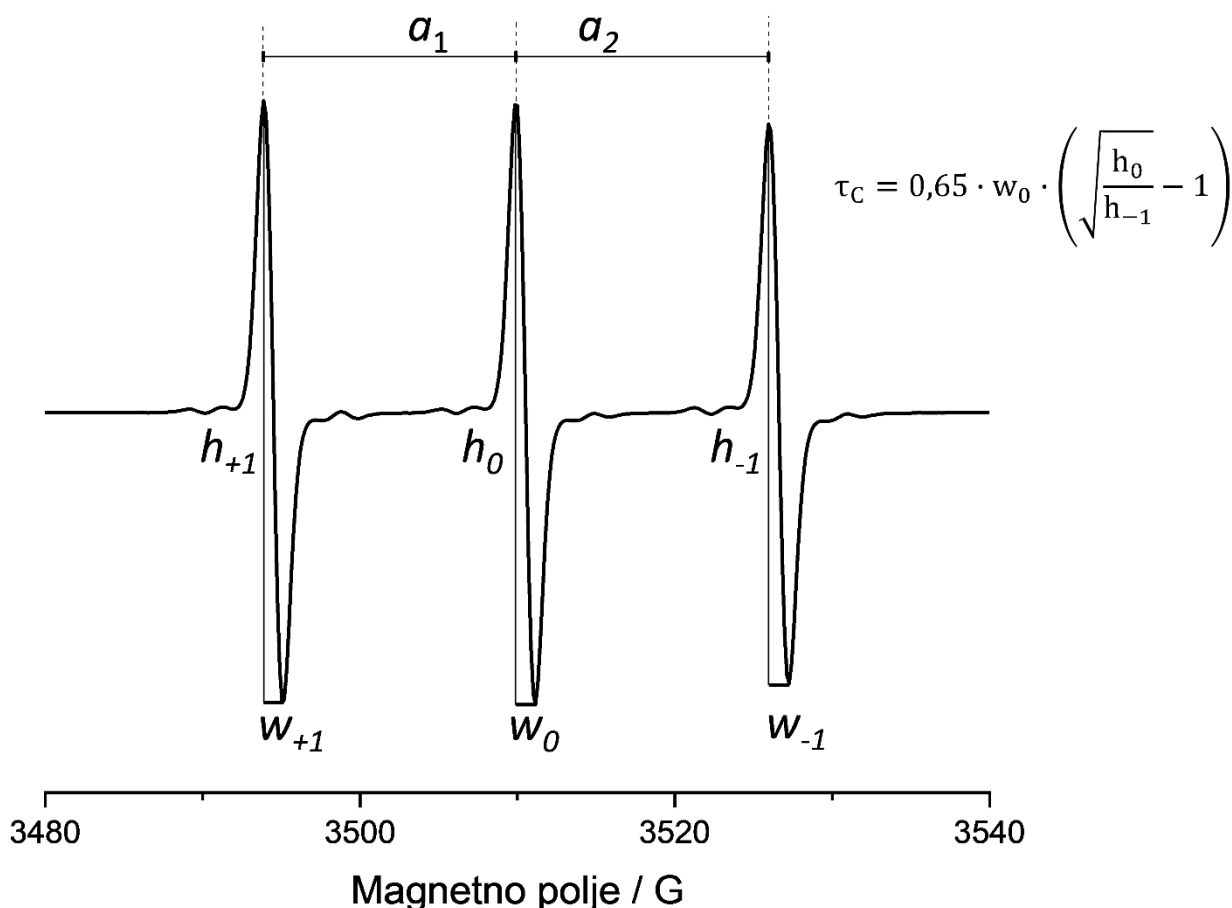
TEMPO je nesupstituisana, amfifilna piperidinska proba rastvorljiva u svim organskim rastvaračima [190]. Premda slabo rastvorna u vodi, uključena je u istraživanje kao prototip ove grupe nitroksida. 3CP i 3CxP su hidrofilne spinske probe iz klase stabilnijih piperidinskih nitroksida [191]. Odlikuju se dugim vremenom poluživota *in vivo*, ali pokazuju različito ponašanje u pogledu prolaska kroz ćelijske membrane s obzirom na to da je 3CP neutralna, a 3CxP pri fiziološkom pH negativno naelektrisana proba. Ove tri spinske probe su tipični predstavnici dve grupe aminoksilnih radikala koji se najviše koriste kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* studijama s obzirom na to da su netoksične i sasvim bezbedne za upotrebu na živim organizmima [87].

Metodologija je razvijana na termalno-indukovanim, kao i hidrogelovima dobijenim kombinovanom pH/termalnom sintezom bez dodataka umreživača kako bi se očuvala biokompatibilnost albuminskih hidrogelova, u skladu sa ciljem da se eksperimenti naredne faze u vezi sa kontrolisanom isporukom iskoriste kao osnov za buduća *in vivo* ispitivanja. Osim toga, zadržavanjem na jednostavnom načinu sinteze izbegnute su potencijalne dodatne interakcije unutar hidrogela koje bi mogle dovesti u pitanje utemeljenost rezultata.

5.1.1. EPR spektri spinskih proba u BSA rastvoru

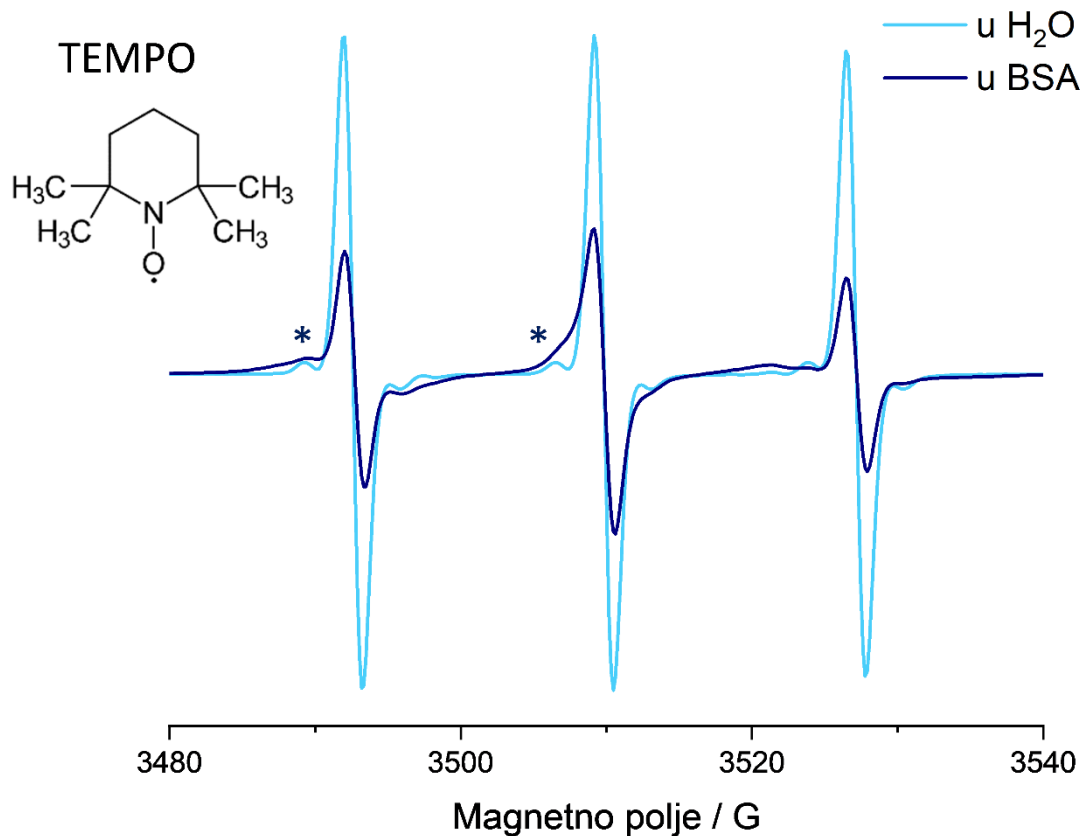
EPR spektri 0,5 mM spinskih proba u vodi snimljeni su kao kontrole. Za sve tri spinske probe, TEMPO, 3CP i 3CxP dobijeni su EPR signali sa tri uska pika, karakteristični za slobodnorotirajuće molekule nitroksida [13,87], kao što je prikazano na slici 20 za primer probe 3CP. Na datom spektru je takođe predstavljeno na koji način se vrši očitavanje spektralnih parametara i naznačeno kako se iz datih parametara izračunava rotaciono korelaciono vreme τ_C (u jedinicama ns). Ova veličina, uzeta

kao mera mobilnosti molekula, predstavlja vreme potrebno slobodnom radikalu za rotaciju od 1 radijana oko svoje ose [188].



Slika 20. EPR spektralni parametri: konstanta hiperfinog cepanja a u jedinicama G, širina linije w u jedinicama G i visina linije h u proizvoljnim jedinicama (oznake +1, 0 i -1 se odnose na pik na nižem, centralni pik i pik na višem polju, redom), prikazani na EPR spektru 0,5 mM 3CP u vodi, uz jednačinu za računanje rotacionog korelacionog vremena (u jedinicama ns).

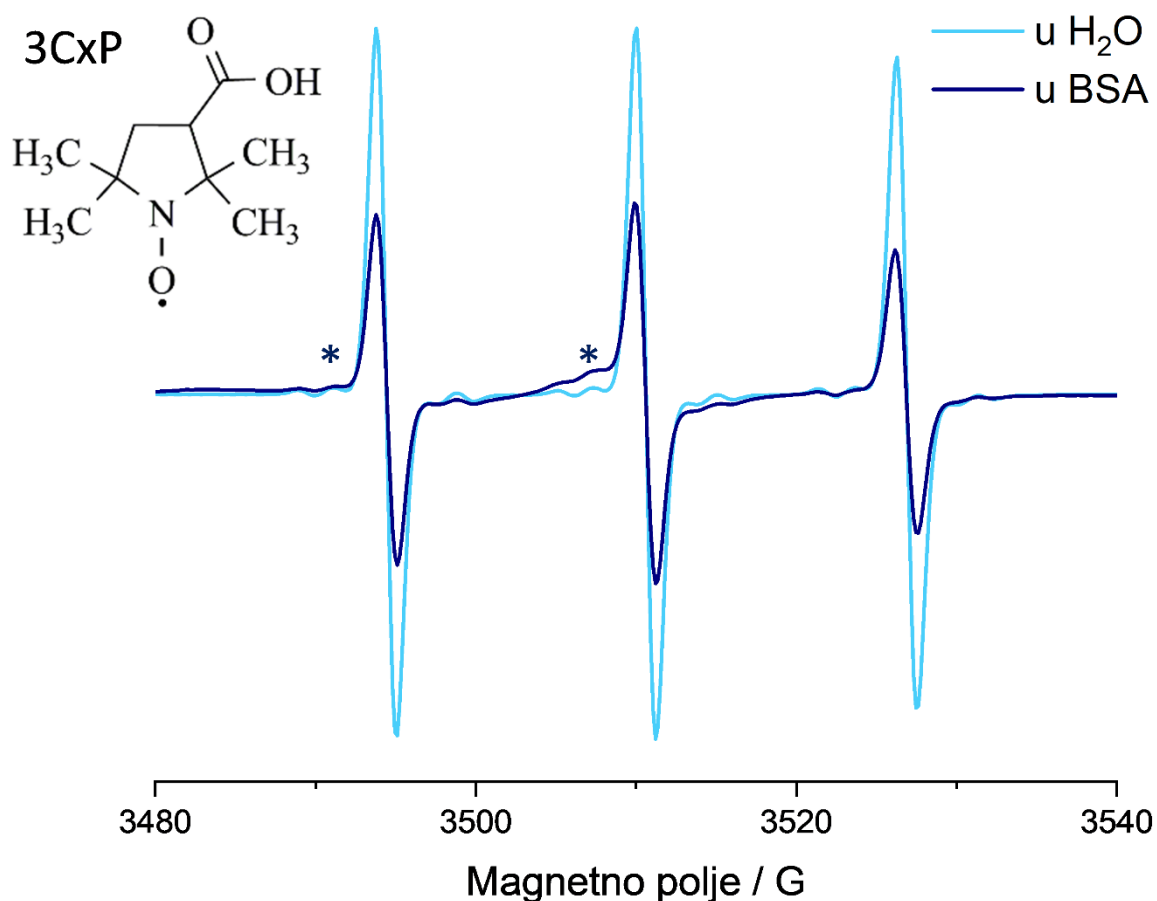
EPR spektri spinskih proba TEMPO, 3CxP i 3CP, koncentracije 0,5 mM, u vodi i u rastvoru BSA 0,42 g/ml (30% (m/m)), prikazani su na slikama 21–23 (svetloplavi spektri se odnose na probe u vodi, a tamnoplavi na probe u rastvoru albumina). Spektri sve tri spinske probe u vodi se razlikuju u odnosu na odgovarajuće spektre ovih nitroksida u rastvoru albumina, što je u skladu s tim da su spektralni parametri osetljivi na okruženje probe, uključujući viskoznost i polarnost sredine, kao i međumolekulske interakcije između molekula nitroksida i rastvarača [87,192]. Spektralni parametri očitani sa odgovarajućih grafika i iz njih izračunata rotaciona korelaciona vremena za spinske probe TEMPO, 3CxP i 3CP, u vodi i u rastvoru BSA, dati su u tabeli 1.



Slika 21. EPR spektri 0,5 mM spinske probe TEMPO u vodi (svetloplavi spektar) i u 30% (*m/m*) rastvoru BSA (tamnoplavi spektar).

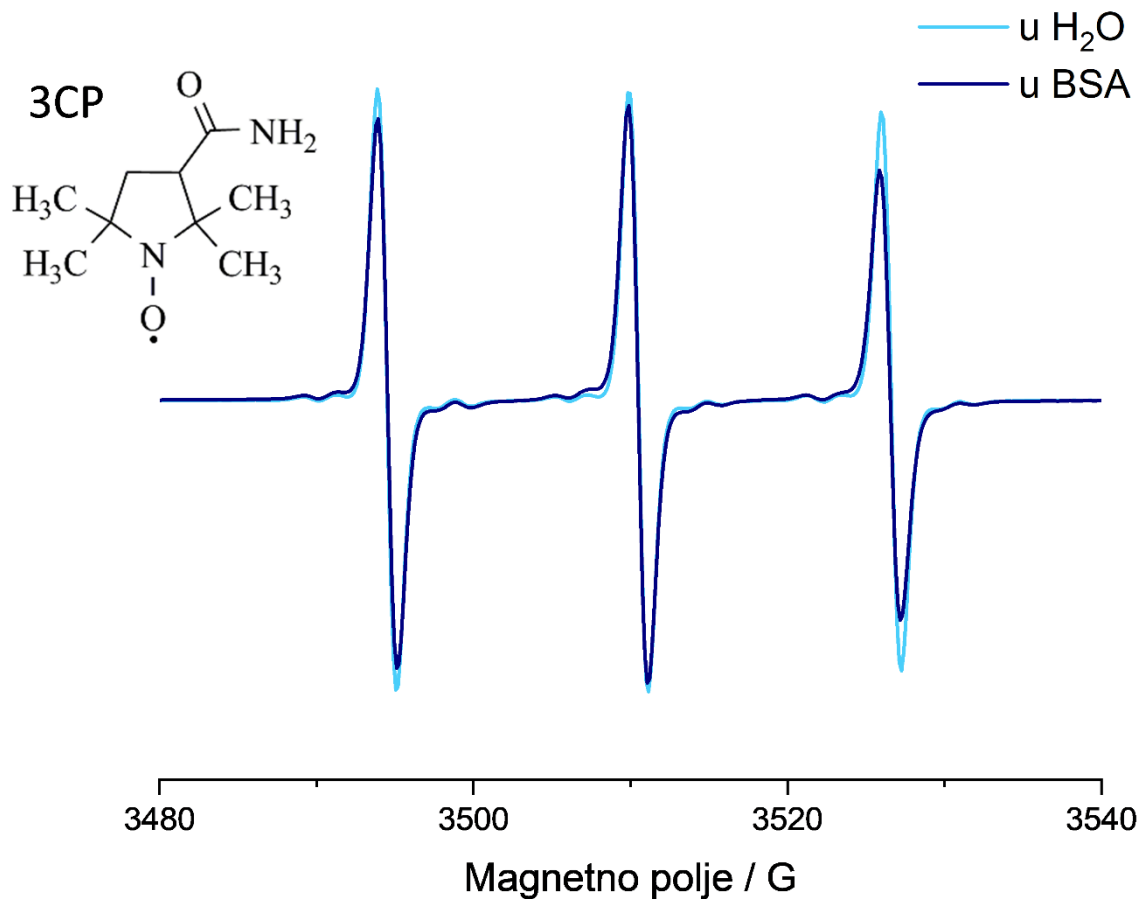
Tabela 1. EPR spektralni parametri za 0,5 mM spinske probe TEMPO, 3CxP i 3CP u vodi i u 30% (*m/m*) rastvoru BSA.

	a_1 (G)	a_2 (G)	w_{+1} (G)	w_0 (G)	w_{-1} (G)	τ_c (ns)
	$\pm 0,05$	$\pm 0,05$	$\pm 0,005$	$\pm 0,005$	$\pm 0,005$	$\pm 0,001$
0,5 mM TEMPO u H ₂ O	17,13	17,31	1,305	1,312	1,291	0,018
0,5 mM TEMPO u BSA (30% (<i>m/m</i>))	17,18	17,36	1,408	1,481	1,428	0,251
0,5 mM 3CxP u H ₂ O	16,16	16,25	1,246	1,264	1,255	0,036
0,5 mM 3CxP u BSA (30% (<i>m/m</i>))	16,25	16,27	1,296	1,333	1,379	0,137
0,5 mM 3CP u H ₂ O	16,00	16,00	1,243	1,243	1,257	0,031
0,5 mM 3CP u BSA (30% (<i>m/m</i>))	16,02	16,03	1,288	1,262	1,343	0,113



Slika 22. EPR spektri 0,5 mM spinske probe 3CxP u vodi (svetloplavi spektar) i u 30% (*m/m*) rastvoru BSA (tamnoplavi spektar).

Kod slobodnih radikala TEMPO i 3CxP se jasno uočava smanjena mobilnost u rastvoru BSA, što se manifestuje širenjem spektralne linije (označeno zvezdicom (*)) na slikama 21 i 23), dok je za sve tri spinske probe ustanovljeno da postoji porast τ_c u rastvoru BSA u odnosu na vodu (tabela 1). Najveća razlika u τ_c između spektara koji se odnose na vodu i na rastvor BSA se zapaža kod spinske probe TEMPO, ukazujući na to da je ova spinska proba imobilisana u rasvoru albumina. Spektralnom dekonvolucijom je procenjeno da doprinos imobilisane probe ukupnom signalu iznosi oko 75%, dok signal slobodne probe doprinosi sa oko 25%. Imajući u vidu da su glavna mesta za vezivanje liganada u serumskom albuminu lokalizovana u hidrofobnim džepovima [177], ovakav rezultat najverovatnije proizilazi iz hidrofobnih interakcija između nepolarnog TEMPO radikala i BSA. Zbog interakcije između ove probe i albumina zaključeno je da TEMPO najverovatnije nije najbolji izbor za reportera udela vode u proteinskim hidrogelovima.

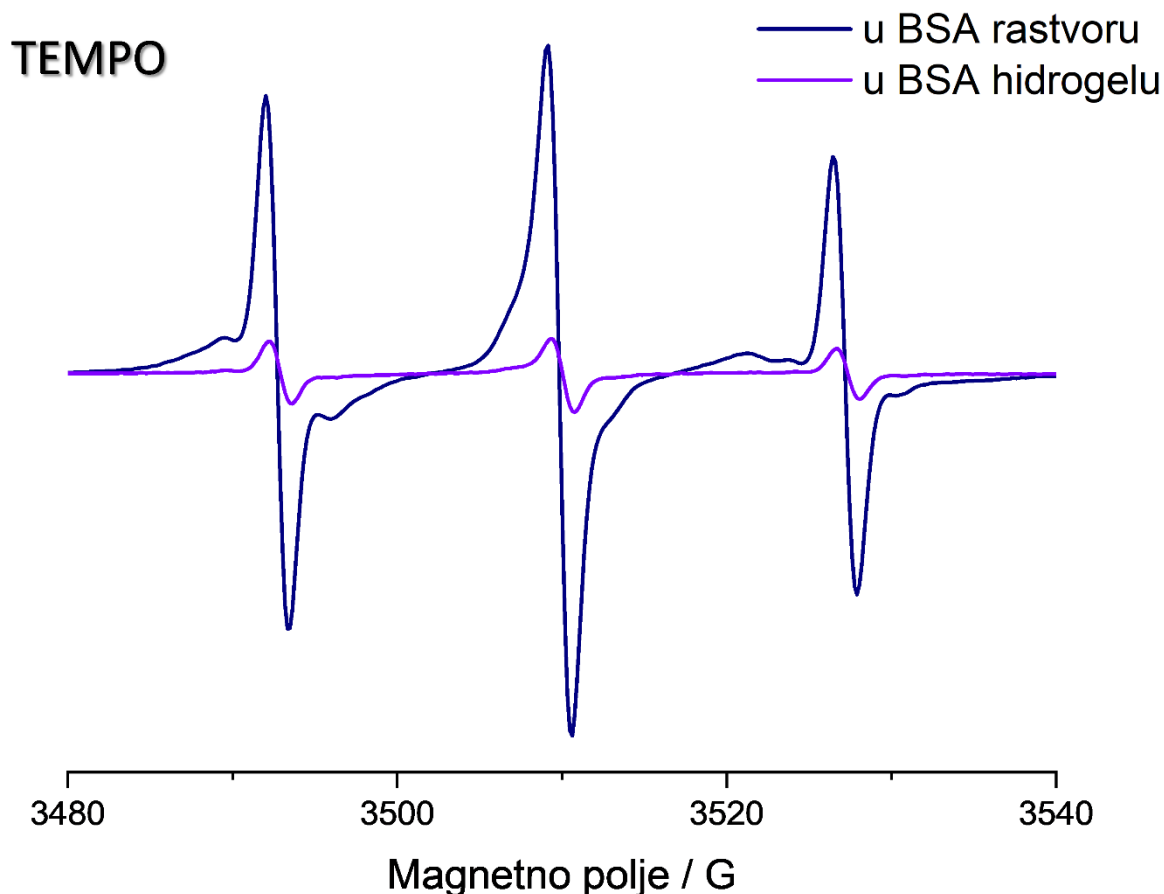


Slika 23. EPR spektri 0,5 mM spinske probe 3CP u vodi (svetloplavi spektar) i u 30% (*m/m*) rastvoru BSA (tamnoplavi spektar).

5.1.2. EPR spektri spinskih proba u BSA hidrogelu

EPR spektri spinske probe TEMPO u rastvoru BSA 0,42 g/ml (30% (*m/m*)) i odgovarajućem termalno-indukovanom hidrogelu su radi poređenja prikazani na slici 24.

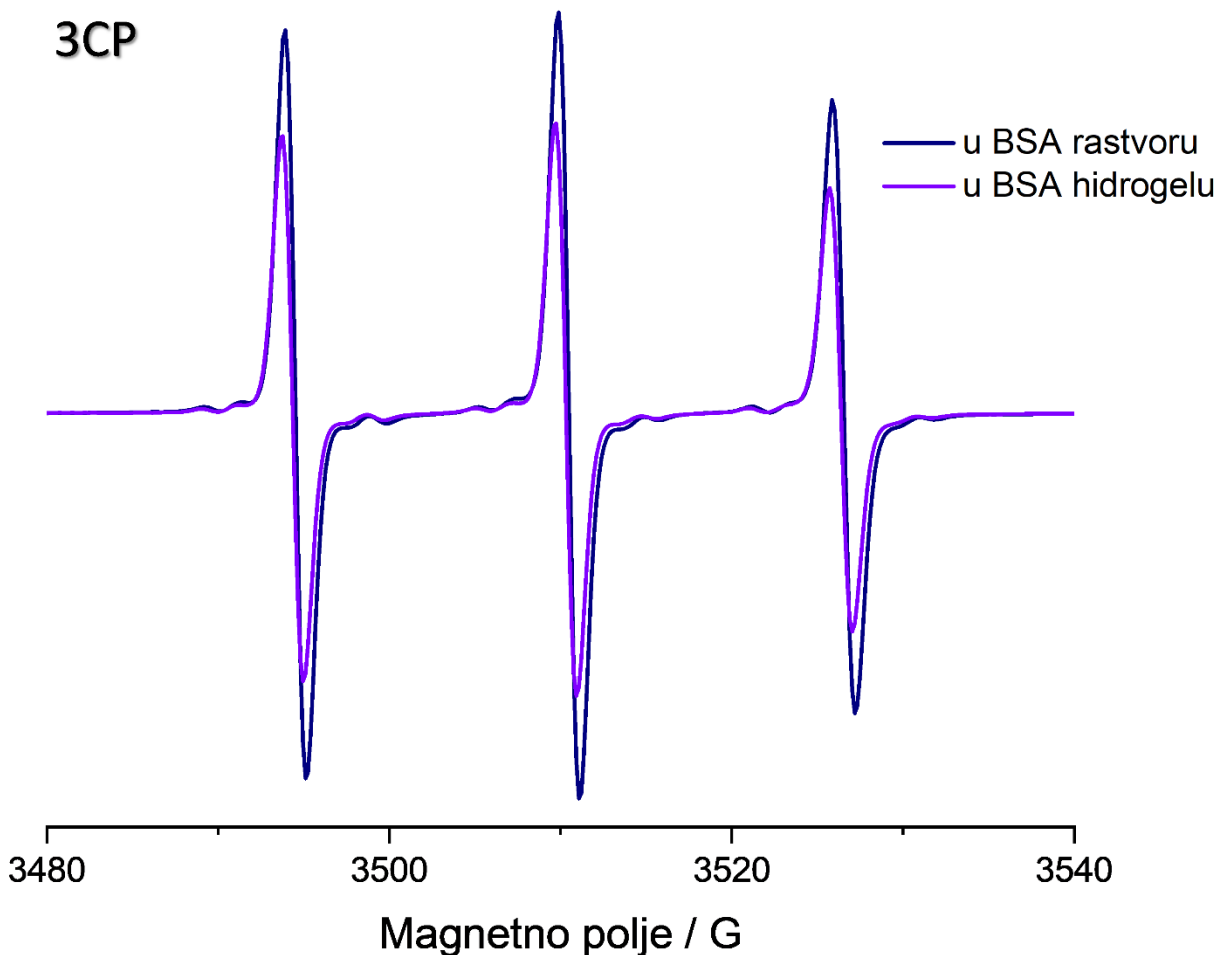
Potrebno je istaći da tačka topljenja nitroksida TEMPO iznosi 40 °C [190], usled čega sintezom gela na 75 °C dolazi da značajnog pada intenziteta njegovog EPR signala. Iz tog razloga, ali i prethodne indicije o interakciji između TEMPO molekula i proteina albumina, ova spinska proba je isključena iz daljeg istraživanja.



Slika 24. EPR spektri 0,5 mM spinske probe TEMPO, u 30% (*m/m*) rastvoru BSA (tamnoplavi spektar) i odgovarajućem termalno-indukovanom hidrogelu (ljubičasti spektar).

S druge strane, pirolidinski nitroksidi 3CP i 3CxP se odlikuju višim tačkama topljenja, od 175 °C i 200 °C redom, čime je njihova stabilnost tokom pripreme hidrogela na 75 °C osigurana.

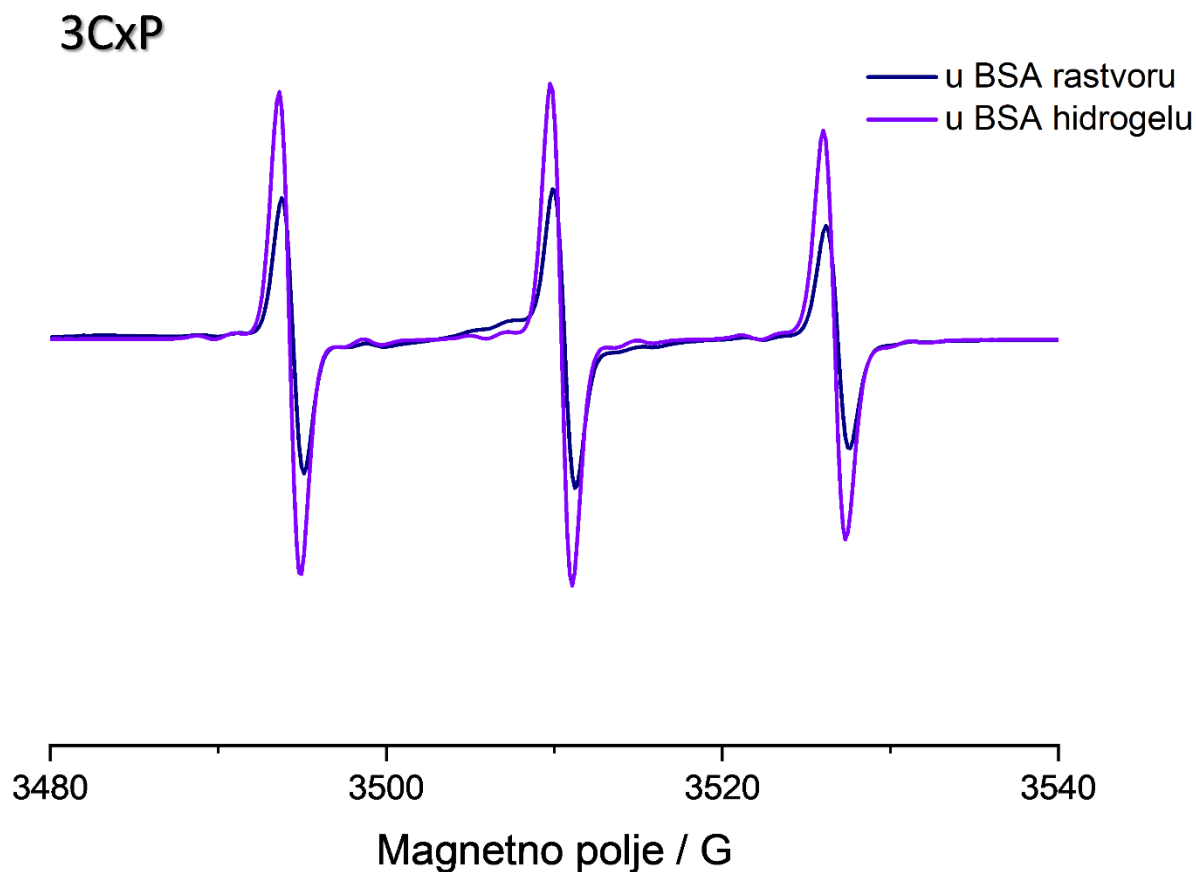
Spektri ovih dveju proba u BSA rastvoru 0,42 g/ml (30% (*m/m*)) i odgovarajućim hidrogelovima prikazani su na slikama 25 i 26. EPR signal 3CP-om obeleženog BSA gela je nešto slabijeg intenziteta, i malo proširen u poređenju sa onim iz BSA rastvora. Ovakav rezultat je u skladu sa činjenicom da u EPR spektroskopiji koncentracija slobodnoradijske vrste nije direktno proporcionalna intenzitetu signala, već površini ispod apsorpcione krive, koja se dobija dvostrukom integracijom derivativnog signala [85]. Stoga je očekivano da u slučajevima kada ne dolazi do oksidacije ili redukcije spinske probe, tj. nema promene količine spinova u posmatranom sistemu, smanjenje intenziteta signala bude praćeno porastom širine linije, dok vrednost dvostrukog integrala ostaje konstantna. Uočeno proširenje signala probe u BSA hidrogelu u odnosu na rastvor albumina se manifestuje i kroz izvesni porast τ_c , od 0,113 ns u rastvoru do 0,115 ns u gelu.



Slika 25. EPR spektri 0,5 mM spinske probe 3CP u 30% (*m/m*) BSA rastvoru (tamnoplavi spektar) i odgovarajućem termalno-indukovanom hidrogelu (ljubičasti spektar).

Kod spinske probe 3C_xP je vidljiv obrnuti trend. Naime, signal koji potiče iz hidrogela je veći od signala probe u rastvoru, a rotaciona korelaciona vremena probe u rastvoru i u gelu redom iznose 0,137 i 0,095 ns, što je pokazatelj veće imobilisanosti 3C_xP-a u BSA rastvoru. Očito je da 3C_xP interaguje sa BSA u rastvoru, međutim izgleda da ova interakcija biva narušena tokom procesa geliranja s obzirom na to da protein trpi konformacione promene, te da dolazi do formiranja intermolekulskih β-ploča albumina na temperaturama preko 70 °C [193]. Poznato je da elektrostatičke interakcije između polarne glave masnih kiselina i bočnih grupa baznih i polarnih aminokiselina vezivnih mesta u albuminu imaju udela u vezivanju masnih kiselina za dati protein [169,183], kao i da karboksilna grupa tri-jodobenzoeve kiseline, analoga lekova poput varfarina i aspirina, udeluje u protein–ligand interakcijama. Generalno se male aromatične aminokiseline vezuju za glavna mesta za vezivanje liganada u albuminu, s tim što su orijentacija hidrofobnog prstena i specifičnosti interakcije karboksilne grupe određene vrstom supstituenata na prstenu [169,177]. U EPR studiji koja se tiče intermolekulskih interakcija između spinski obeleženih lekova i BSA, pokazano je da prisustvo –COOH grupe u strukturi salicilne kiseline i njenih derivata utiče na vezivanje leka za BSA [194]. S obzirom na to da 3C_xP poseduje karboksilnu grupu, najverovatnije je da preko nje elektrostatičkim silama stupa u interakciju sa BSA u rastvoru. Uočena ograničena mobilnost upućuje na to da 3C_xP ne bi bio adekvatan pokazatelj količine vode, bar ne u rastvoru proteina. Nakon ove faze istraživanja 3C_xP je još uvek zadržan u okviru studije jer nije bilo isključeno

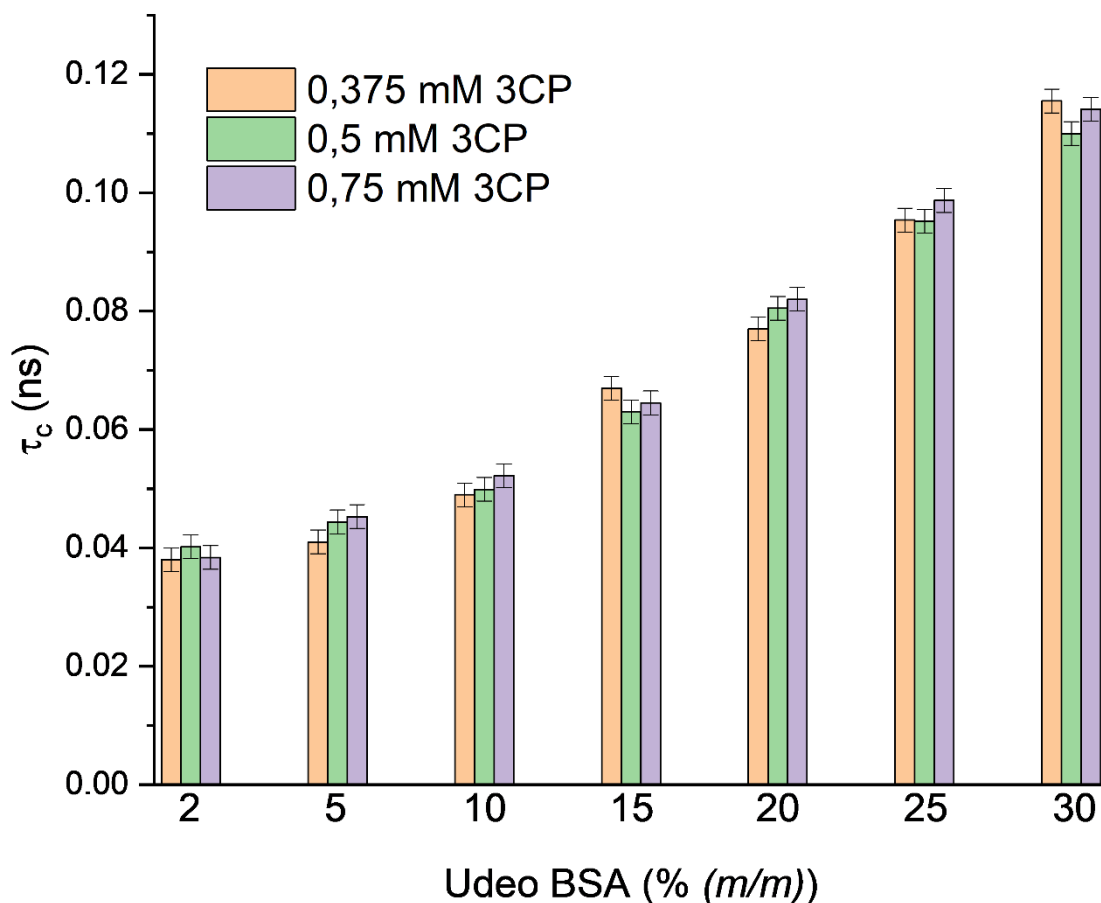
da može dati korisne informacije o sadržaju vode u hidrogelovima, premda je već bila evidentna prednost spinske probe 3CP naspram 3CxP-a. Stoga su dodatni eksperimenti, urađeni sa rastvorima i gelovima različitog udela albumina (2–25% (*m/m*) BSA), uključivali obe spinske probe.



Slika 26. EPR spektri 0,5 mM spinske probe 3CxP u 30% (*m/m*) BSA rastvoru (tamnoplavi spektar) i odgovarajućem termalno-indukovanom hidrogelu (ljubičasti spektar).

5.1.3. Uticaj koncentracije spinske probe 3CP na rotaciono korelaciono vreme

Kako bi se utvrdilo da li je koncentracija spinske probe u uzorcima od 0,5 mM adekvatna za utvrđivanje udela vode, uzete su u obzir i koncentracije probe 0,375 mM i 0,75 mM, imajući u vidu da finalna koncentracija slobodnoradikalske vrste u hidrogelovima može varirati zavisno od količine vode koja biva otpuštena iz sistema prilikom procesa termalne indukcije. Eksperimenti su izvedeni sa 2, 5, 10, 15, 20 i 30% (*m/m*) BSA rastvorima i uključivali su samo nitroksidnu probu 3CP koja se pokazala najadekvatnijom za procenu količine vode.



Slika 27. Izračunata rotaciona korelaciona vremena za spinsku probu 3CP koncentracija 0,375 mM, 0,5 mM i 0,75 mM u vodenim rastvorima BSA različitog udela proteina (2–30% (m/m)).

Kako je predstavljeno na slici 27, rezultati dobijeni za rotaciona korelaciona vremena slobodnog radikala 3CP se poklapaju za različite koncentracije probe u opsegu 0,375–0,75 mM, u svim rastvorima BSA udela proteina 2–30% (m/m). Na ovaj način je potvrđeno da variranje koncentracije nitroksida od čak 15% neće uticati na krajnji rezultat, te da se koncentracija od 0,5 mM može smatrati adekvatnom za određivanje udela vode u uzorcima.

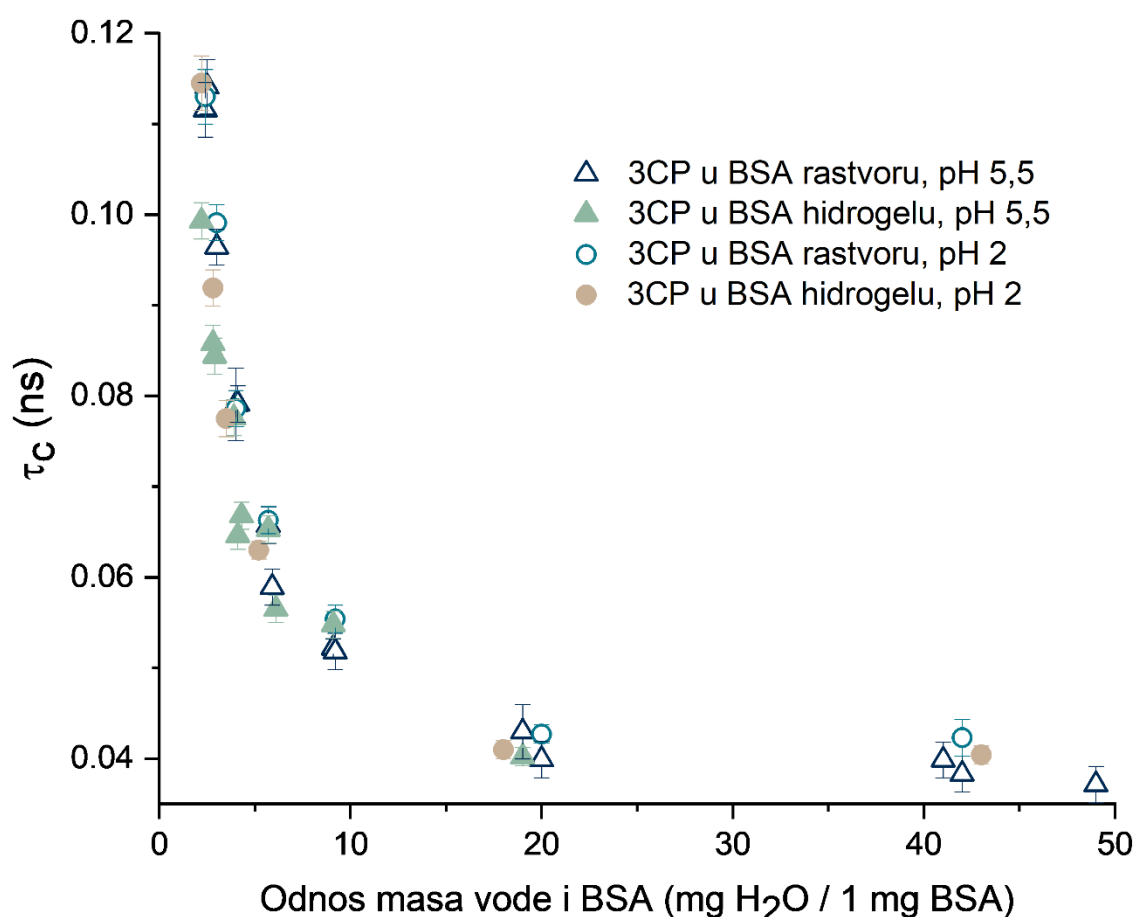
5.1.4. Korelisanje EPR spektralnih parametara sa količinom vode u spinski obeleženim BSA hidrogelovima

Kako su eksperimenti sa rastvorima BSA udela proteina 30% (m/m) i iz njih termalno-indukovanim hidrogelovima pokazali razlike u mobilnosti proba u rastvoru i u gelu, usledilo je ispitivanje da li se isti trend uočava i kod odgovarajućih parova albuminskih rastvora i hidrogelova udela proteina 5–25 % (m/m). Što se tiče uzorka s udelom BSA od 2% (m/m), uzet je u obzir samo EPR spektar spinski obeleženog rastvora s obzirom na to da pri ovom procentu albumina nije uočeno geliranje zagrevanjem na 75 °C.

U inicijalnoj fazi istraživanja 3CP se pokazao boljim indikatorom udela vode u uzorcima, pa su samo s ovom spinskom probom urađeni dodatni ekperimenti koji su uključivali BSA rastvore u 75 mM rastvoru NaCl, pH2, i odgovarajuće hidrogelove dobijene kombinovanom pH/termalnom sintezom. Za ove hidrogelove je utvrđeno da se po fizičko-hemijskim karakteristikama razlikuju od

onih sintetisanih iz rastvora albumina u dejonizovanoj vodi (pH 5,5) [44]. To je u skladu sa činjenicom da SA trpi reverzibilne konformacione promene zavisno od pH vrednosti rastvora zahvaljujući postojanju brojnih amino kiselina sa naelektrisanim bočnim grupama u primarnoj strukturi proteina. Naime, u opsegu pH ~ 4–7 BSA se nalazi u svojoj neutralnoj, N-formi, trodimenzionalne strukture oblika srca. Padom fiziološke pH vrednosti, pri pH 4,5–4, dešava se prelaz iz N- u F-formu. Brzomigrirajuća F-forma, koja se odlikuje većom viskoznošću, manjom rastvorljivošću u vodi i narušenom sekundarnom strukturom u vidu gubitka α -heliksa, dominantno je prisutna na pH < 4. Smanjenjem pH ispod 3,5 pojavljuje se i izdužena, E-forma albumina, s potpuno izloženim hidrofobnim regijama [176,178].

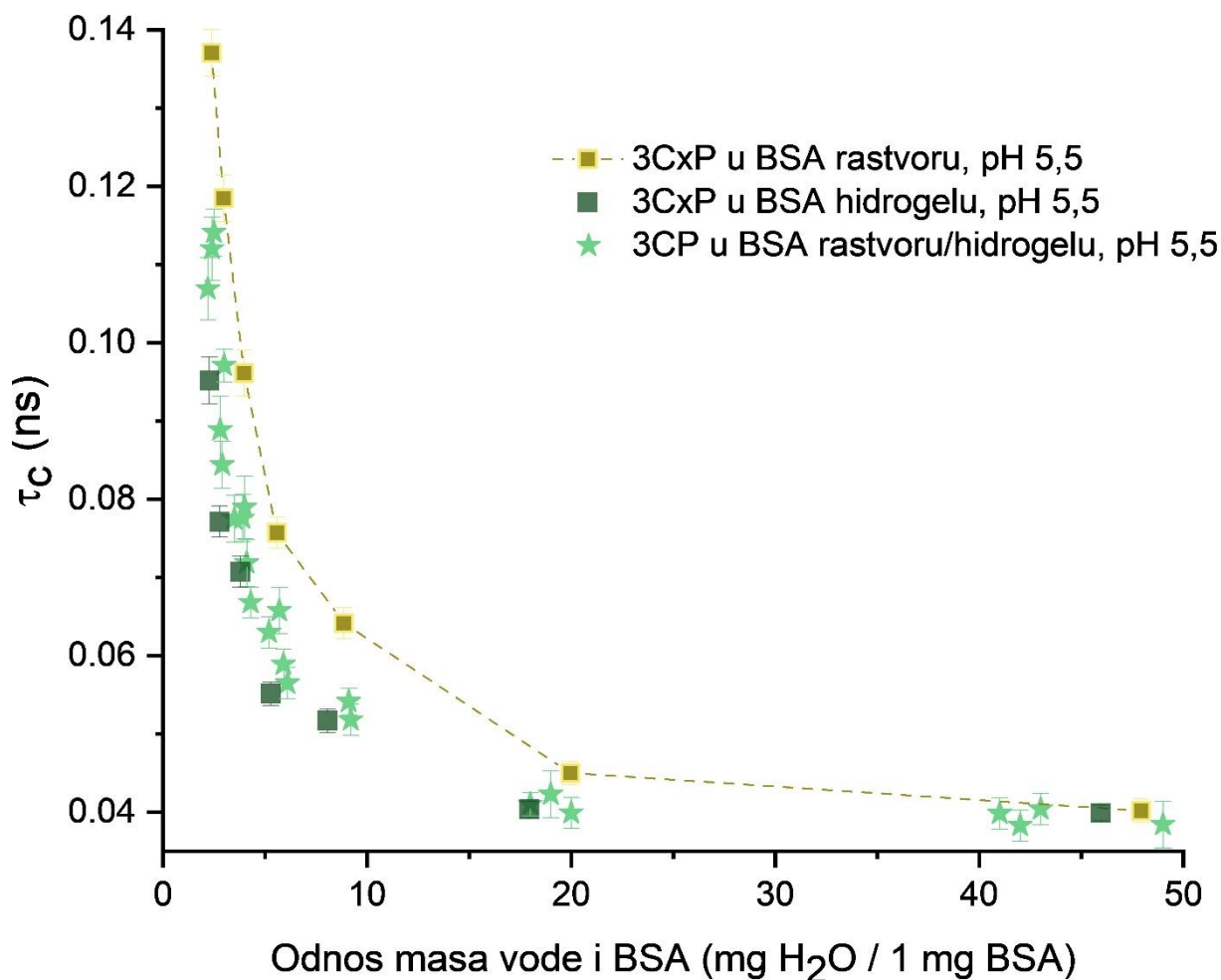
Rotaciona korelaciona vremena probe 3CP izračunata iz EPR spektralnih parametara, za sve parove BSA rastvora i hidrogelova, dobijenih pri pH 5,5 i pH 2, prikazana su u funkciji odnosa masa vode i BSA u uzorku, izraženog kao mg vode prema 1 mg BSA, na slici 28. Opaža se da se sve eksperimentalne tačke, bilo da se odnose na rastvor ili hidrogel, mogu fitovati jednom matematičkom funkcijom. Ovakav rezultat je jasan pokazatelj da spinska proba 3CP ne interaguje ni sa BSA u rastvoru niti sa BSA gel-matricom i da je lokalizovana isključivo u vodenoj fazi hidrogela, te da ispunjava glavni kriterijum da se koristi kao pokazatelj količine vode u sistemu.



Slika 28. Izračunata rotaciona korelaciona vremena za 0,5 mM 3CP u rastvorima BSA (u dejonizovanoj vodi, pH 5,5, i 75 mM NaCl puferu, pH 2) različitih koncentracija i odgovarajućim hidrogelovima, u zavisnosti od odnosa masa vode i BSA (izraženog u mg vode prema 1 mg BSA).

Na slici 29 je dat grafik sa izračunatim rotacionim korelacionim vremenima 3CxP-a u rastvoru i u hidrogelu, a poređenja radi i 3CP-a u hidrogelu, u funkciji odnosa masa vode i BSA, merenih

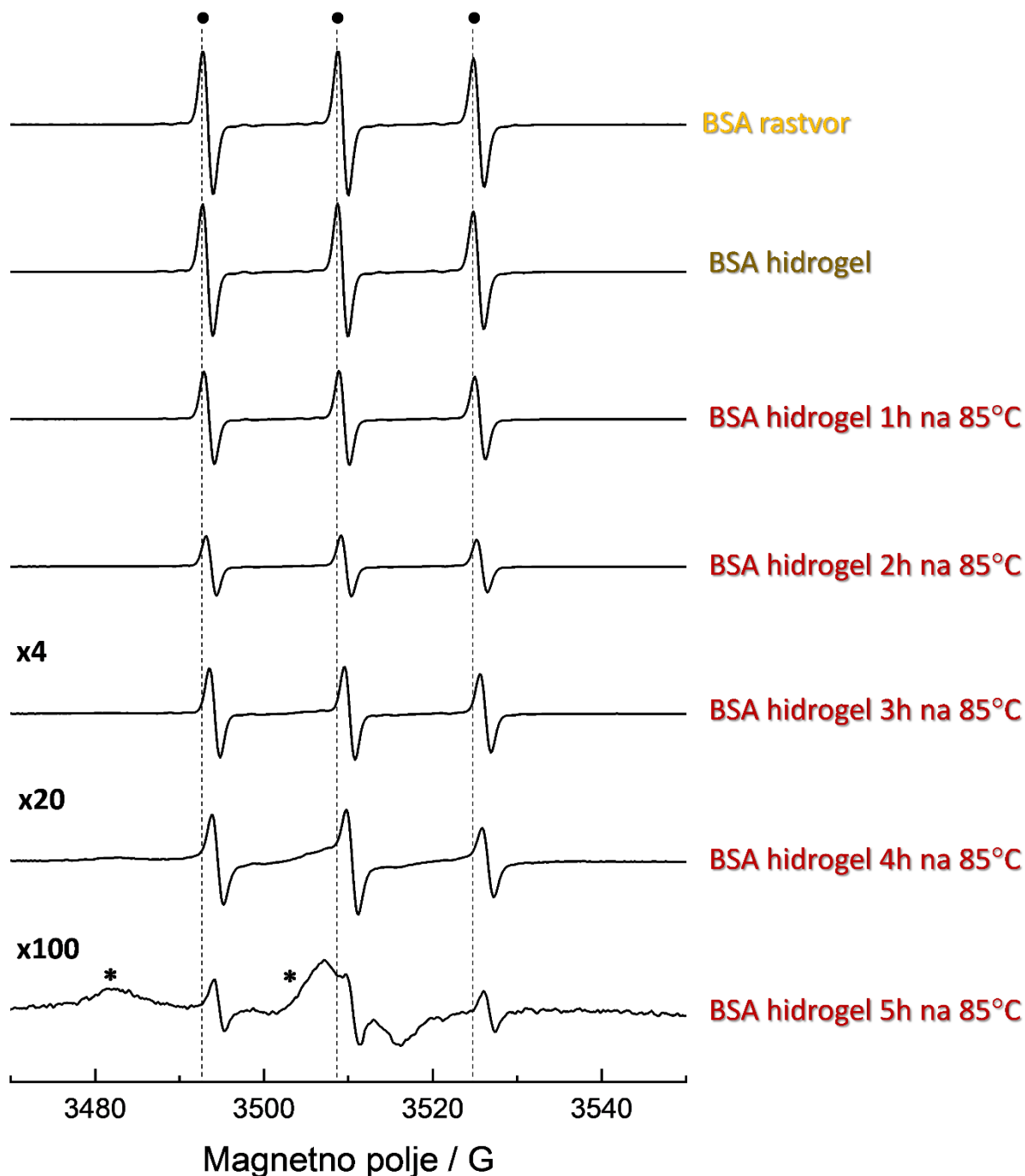
gravimetrijski. Za 3CxP se uočava odstupanje eksperimentalnih tačaka koje se odnose na rastvor u odnosu na hidrogel, što potvrđuje prethodno izvedeni zaključak da između 3CxP-a i BSA postoje elektrostatičke interakcije koje se najverovatnije ostvaruju preko $-\text{COOH}$ grupe, pri čemu ove interakcije izostaju u gelu kao rezultat konformacionih promena proteina. Iako postoji preklapanje rezultata koji se odnose na 3CxP u BSA hidrogelu sa onima za 3CP u rastvoru/gelu (pH 5,5), kao proba definitivno pogodnija za određivanje količine vode i u rastvoru i u hidrogelu, u daljem radu korišćen je 3CP.



Slika 29. Izračunata rotaciona korelaciona vremena za 0,5 mM 3CxP u rastvorima BSA u dejonizovanoj vodi i u odgovarajućem hidrogelovima, i za 0,5 mM 3CP u rastvorima/hidrogelovima, u zavisnosti od odnosa masa vode i BSA (izraženog u mg vode prema 1 mg BSA).

Kako je eksperimentalno utvrđeno da je granica rastvorljivosti 30 g BSA u 100 g vode (uzorak sa 30% (*m/m*) albumina), što odgovara odnosu od 2,4 mg H₂O / 1 mg BSA, u cilju dobijanja hidrogelova odgovarajućeg masenog odnosa < 2,4 primenjena je dopunska procedura. Naime, hidrogelovi dobijeni termalnom indukcijom iz rastvora albumina 5–20% (*m/m*) podvrgavani su dodatnom sušenju u laboratorijskoj pećnici na temperaturi od 85 °C, u trajanju od 1 h, 2 h, 3 h, 4 h i 5 h. Uočeno je da se smanjenje ukupnog sadržaja vode usled postepenog isparavanja pri sušenju manifestuje kroz širenje signala u EPR spektrima, pri čemu se spektralna komponenta koja potiče od slobodne probe smanjuje, dok doprinos imobilisane probe polako dolazi do izražaja. Na slici 30 su prikazani EPR spektri sušenog 3CP/BSA hidrogela dobijenog iz prekursorskog rastvora albumina 10% (*m/m*). Na osnovu početnih količina vode i BSA korišćenih za pripremu prekursorskih rastvora,

te merenjem mase uzoraka nakon svakog koraka sušenja, računat je odnos masa vode i BSA. U slučaju primera na slici 30, maseni odnosi vode i albumina iznosili su 9,0 mg H₂O / 1 mg BSA za inicijalno pripremljeni hidrogel, tj. 6,9, 4,9, 3,4, 1,8 i 0,9 mg H₂O / 1 mg BSA za dati hidrogel sušen 1, 2, 3, 4, odnosno 5 h. Ovi eksperimenti su ukazali na to da određivanje rotacionog korelacionog vremena na osnovu spektralnih parametara nije pouzdano za uzorke sa odnosom masa manjim od 2 mg H₂O / 1 mg BSA zbog značajne imobilizacije probe ispod te granice.

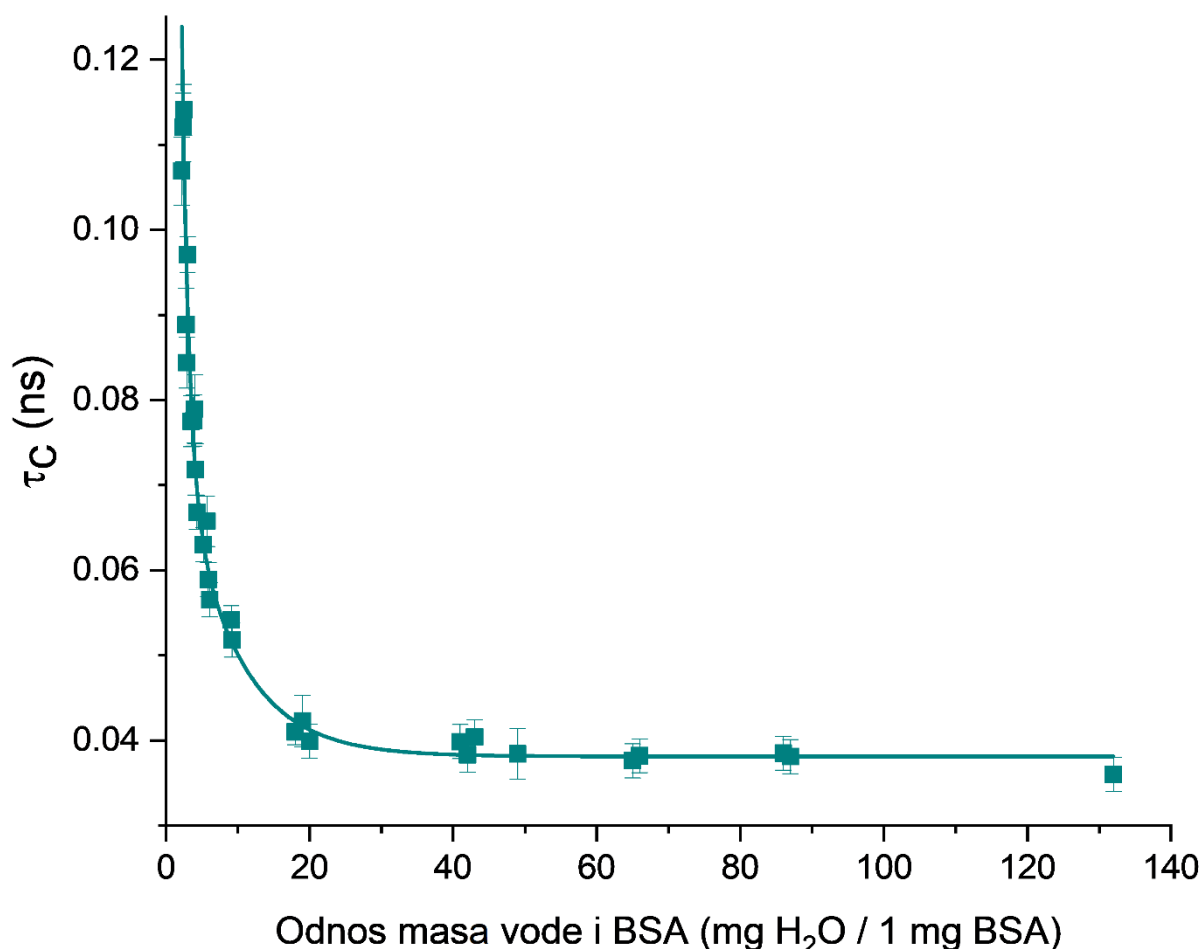


Slika 30. EPR spektri spinske probe 3CP u 10% (*m/m*) rastvoru BSA i odgovarajućem termički-indukovanom hidrogelu, kao i u hidrogelu dodatno sušenom 1 h, 2 h, 3 h, 4 h i 5 h na 85 °C. EPR spektri su predstavljeni na istoj skali, izuzev onih koji se odnose na hidrogel sušen 3, 4 i 5 h, koji su uvećani 4, 20, odnosno 100 puta. Signali koji potiču od slobodnorotirajuće probe označeni su simbolom •, a signali od imobilisane probe simbolom *.

Stoga su eksperimentalnim tačkama prikazanim na slici 29 pridruženi rezultati eksperimenata na sušenim hidrogelovima za uzorke koji su posedovali ≥ 2 mg H₂O / 1 mg BSA. Radi boljeg fitovanja krive u blizini zasićenja uzeti su u obzir i razblaženi uzorci BSA u opsegu 0,75–1,5% (m/m) BSA. Na slici 31 su prikazani celokupni rezultati dobijeni za spinsku probu 3CP, fitovani eksponencijalnom funkcijom oblika $y = y_0 + A_1 \cdot e^{-k_1 x} + A_2 \cdot e^{-k_2 x}$, ($y_0 = 0,038 \pm 0,005$, $A_1 = 0,5 \pm 0,1$, $k_1 = 1,0 \pm 0,2$, $A_2 = 0,05 \pm 0,01$, $k_2 = 0,130 \pm 0,003$, $R^2 = 0,978$), jednačina 31:

$$y = 0,038 + 0,5 \cdot e^{-x} + 0,05 \cdot e^{-0,13x}, \quad (31)$$

u kojoj je y rotaciono korelaciono vreme u nanosekundama, a x odnos mase vode i BSA (izražen kao mg H₂O / 1 mg BSA). Radi verifikacije parametra fita y_0 , dodatno je snimljen EPR spektar veoma razblaženog spinski obeleženog uzorka BSA od 0,75% (m/m), iz kog je izračunata vrednost rotacionog korelacionog vremena od ($0,035 \pm 0,001$) ns pokazala veoma dobro slaganje sa y_0 u granicama greške ($\pm 0,005$ ns).



Slika 31. Izračunata rotaciona korelaciona vremena za 0,5 mM 3CP u BSA rastvorima i hidrogelovima u zavisnosti od odnosa masa vode i BSA fitovana eksponencijalnom funkcijom $y = 0,038 + 0,5 \cdot e^{-x} + 0,05 \cdot e^{-0,13x}$.

Najzad, može se uzeti da je uspostavljena korelacija između τ_c i sadržaja vode relevantna u rasponu od 2 do ~ 50 mg H₂O / 1 mg BSA. Kako je već pomenuto, ispod ove granice je proba u gelu

značajno imobilisana tako da određivanje rotacionog korelacionog vremena na osnovu spektralnih parametara nije verodostojno, dok se iznad ove granice na grafiku (slika 31) javlja plato. Ipak, ovaj opseg može se smatrati sasvim zadovoljavajućim s obzirom na to da se geliranje kod uzoraka koji sadrže preko 50 mg H₂O / 1 mg BSA (što odgovara 2% (m/m) BSA) ne uočava.

5.1.5. Optimizacija protokola za određivanje sadržaja vode u hidrogelovima većih dimenzija – provera nove metodologije

Svi hidrogelovi korišćeni za razvoj EPR metodologije za određivanje udela vode u uzorcima o kojima je dosad napisano, pripremani su tako što je spinska proba dodavana u prekursorske rastvore pre postupka termalne ili kombinovane termalne/pH indukcije. Iz tog razloga je bilo neophodno proveriti da li je utvrđena korelacija između τ_c i sadržaja vode primenljiva čak i kad je spinska proba dodata u hidrogel nakon sinteze. U tu svrhu su pripremljeni albuminski hidrogelovi prosečnih dimenzija $x = (5 \pm 1)$ mm, $y = (1,0 \pm 0,2)$ mm i $z = (10 \pm 2)$ mm, obeleženi spinskom probom 3CP nakon sinteze.

BSA hidrogelovi koncentracije albumina 6–30% (m/m), od kojih je pola pripremljeno metodom termalne sinteze iz vodenog rastvora BSA pH 5,5, a ostatak kombinovanom pH/termalnom sintezom iz rastvora albumina u puferu pH 2, inkubirani su različito vreme s drugačijim zapreminama rastvora spinske probe koncentracije 5 mM (zapremine su varirale u opsegu $\pm 15\%$). Za sve uzorke je dobijeno veoma dobro slaganje između stvarne količine vode u gelu i količine vode određene na osnovu τ_c , tako da je i u ovom slučaju uočeno da zapremina dodatog rastvora ne utiče na vrednost rotacionog korelacionog vremena. Radi održavanja procedure dovoljno jednostavnom procenjeno je da je najpogodnije zapreminu rastvora nitroksida (5 mM) koja odgovara $\sim 15\%$ ukupne mase hidrogela, naneti na gornju površinu već pripremljenog gela, kao i da je za hidrogel gore navedenih dimenzija optimalno vreme inkubacije na sobnoj temperaturi oko 20 min. Za to vreme je vizuelno ustanovljeno da hidrogel sasvim upije probu, tj. da nema zaostalog rastvora na površini hidrogela.

Stvarna količina vode u hidrogelu određena je na osnovu gravimetrijskih merenja poznavanjem postupka pripreme, dok se pod izračunatim odnosom masa vode i BSA podrazumevaju vrednosti dobijene numeričkom inverzijom korelacione funkcije na osnovu parametara τ_c . Prema rezultatima prikazanim u tabeli 2, evidentno je dobro slaganje stvarnih sa izračunatim vrednostima posmatranog odnosa masa za različite BSA hidrogelove. Ovakva konzistentnost uspostavljene relacije između τ_c i odnosa masa vode i BSA je potvrda primenljivosti predložene eksponencijalne funkcije (jednačina 31) i na BSA hidrogelove spinski obeležene probom 3CP nakon sinteze.

Tabela 2. Stvarni i izračunati odnos masa vode i BSA u odabranim BSA hidrogelovima.

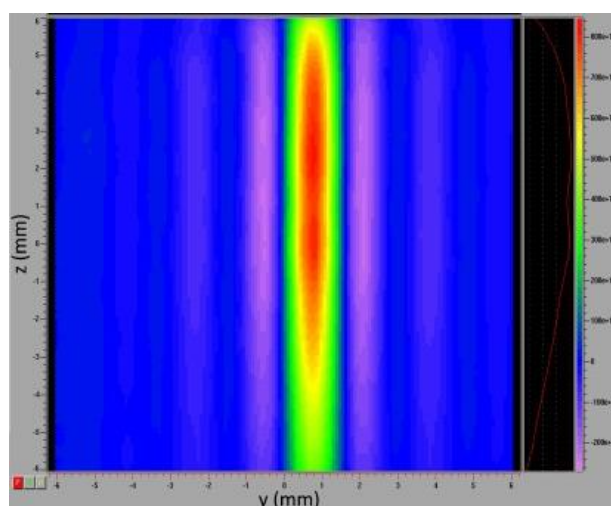
	τ_c (ns)	Izračunat odnos masa vode i BSA	Stvarni odnos masa vode i BSA
BSA hidrogel, pH 2	$0,152 \pm 0,001$	$1,9 \pm 0,3$	2,0
BSA hidrogel, pH 5,5	$0,134 \pm 0,001$	$2,2 \pm 0,3$	2,3
BSA hidrogel, pH 2	$0,081 \pm 0,001$	$3,7 \pm 0,4$	3,8
BSA hidrogel, pH 5,5	$0,062 \pm 0,001$	$6,0 \pm 0,5$	5,8
BSA hidrogel, pH 2	$0,053 \pm 0,001$	$9,3 \pm 0,7$	9,1
BSA hidrogel, pH 5,5	$0,044 \pm 0,001$	16 ± 2	15

Relevantnost metodologije u slučaju hidrogelova na bazi drugih biomolekula ispitivana je na hidrogelovima na bazi agaroze i hidrolizata kolagena (želatina) dobijenih termalnom indukcijom, obeleženih spinskom probom 3CP nakon sinteze na isti način kako je prethodno opisano za albuminske hidrogelove. Na osnovu prikazanih rezultata za ove hidrogelove (tabela 3), očigledno je da predložena metodologija nije ograničena samo na albuminske hidrogelove, već i na druge vrste supramolekulskih hidrogelova. Ipak, ostaje da se ispita da li se metodologija može primeniti i na složenije sisteme sa više konstituenata, odnosno na koji način bi potencijalne dodatne interakcije eventualno uticale na mobilnost probe koja se koristi kao indikator udela vode u uzorku.

Osim toga, da bi se stekao uvid u dešavanja unutar hidrogela nakon nanošenja probe na njegovu površinu, urađen je i EPR imidžing. Pošto je ukupno 70 μ l 5 mM rastvora spinske probe 3CP ravnomerno na dva mesta naneto na xz-ravan BSA hidrogela dimenzija $x = 6$ mm, $y = 1,2$ mm, $z = 12$ mm, nakon 20 minuta inkubacije snimljen je 2D EPR imidž yz-preseka. Na osnovu dobijene slike je utvrđeno da proba ravnomerno prodire u gel, te difunduje u svim pravcima, bez obzira na mesto primene. Ovakav rezultat pruža i vizuelni dokaz da se u okviru predložene metodologije spinska proba može naneti na bilo koje mesto na površini hidrogela, te da mesto primene neće imati uticaja na rezultat.

Tabela 3. Stvarni i izračunati odnos masa vode i suvog ostatka u kolagenskim i agaroznim hidrogelovima.

	τ_c (ns)	Izračunat odnos masa vode i suvog ostatka	Stvarni odnos masa vode i suvog ostatka
Kolagenski gel, 20% (m/m)	$0,074 \pm 0,001$	$4,2 \pm 0,4$	3,8
Kolagenski gel, 13% (m/m)	$0,059 \pm 0,001$	$6,9 \pm 0,6$	6,9
Kolagenski gel, 6% (m/m)	$0,047 \pm 0,001$	13 ± 2	15
Agarozni gel, 7% (m/m)	$0,043 \pm 0,001$	18 ± 3	14
Agarozni gel, 2% (m/m)	$0,038 \pm 0,001$	≥ 50	49



Slika 32. 2D EPR imidž yz-ravni BSA hidrogela sa spinskom probom 3CP nanetom na xz-ravan hidrogela.

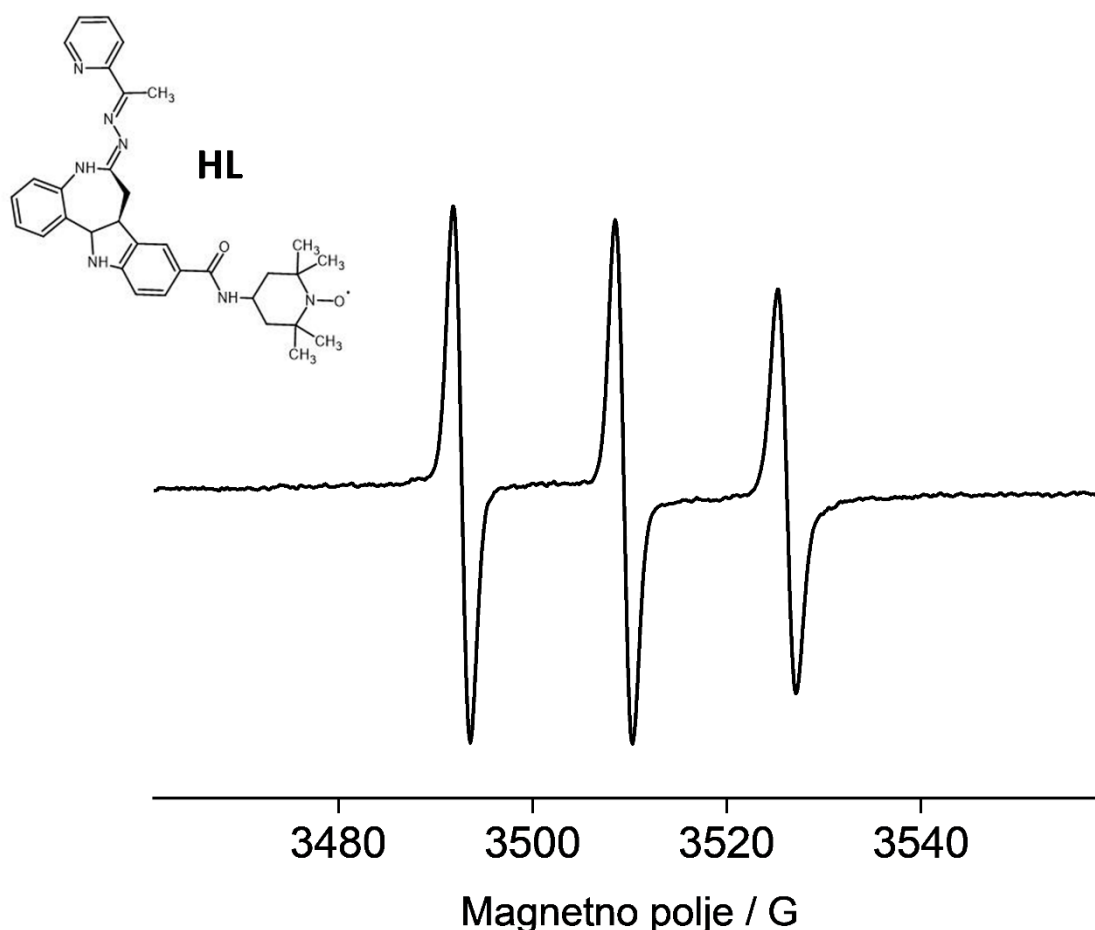
Najzad, može se zaključiti da je ova studija dala novu, jednostavnu i pouzdanu metodu za određivanje sadržaja vode u fizički umreženim hidrogelovima na bazi različitih biomolekula, nezavisnu od veličine hidrogela i načina uvođenja indikatora u ispitivani sistem, kao i mesta implementacije u slučajevima kada se proba aplikuje po završenom postupku sinteze hidrogela. Pored tehnika za karakterizaciju vezane i nevezane vode u uzorku, poput DSC-a i NMR-a, neizostavni deo studija o gelovima čine gravimetrijska merenja. Premda je ukupni sadržaj vode u uzorku moguće odrediti prostim merenjem mase, treba pomenuti da je postupak nepouzdan i da može dati veliku relativnu grešku zavisno od veličine ispitivanog uzorka i udela vode. Osim toga, u slučaju da nije poznat svaki korak u postupku sinteze, neophodno je uparavanje vode iz uzorka radi merenja mase suvog ostatka. Termogravimetrijska analiza se pak odlikuje izuzetnom osetljivošću i pruža mogućnost detekcije promena mase reda 0,1 μg , premda uzorkovanje veoma male količine za analizu daje informacije o lokalizovanoj regiji u hidrogelu, a treba imati u vidu nehomogenosti u strukturi, koje su naročito prisutne kada su u pitanju fizički umreženi hidrogelovi. Osim toga, TGA takođe zahteva podvrgavanje uzorka zagrevanju na visokim temperaturama. U tom smislu, prednost predložene EPR metodologije je što ne zahteva nikakvu pripremu niti poseban tretman koji bi eventualno doveo do narušavanja strukture, već se može primeniti na hidrogel u nabubrelom stanju, takav kakav jeste, kako na male zapremine, tako i na gelove većih dimenzija.

5.2. Izučavanje HSA hidrogelova kao nosača antikancerskih jedinjenja

Deo rezultata prikazanih u ovom poglavlju je objavljen u [195].

5.2.1. Ispitivanje vezivanja i otpuštanja liganda HL iz HSA rastvora/hidrogela

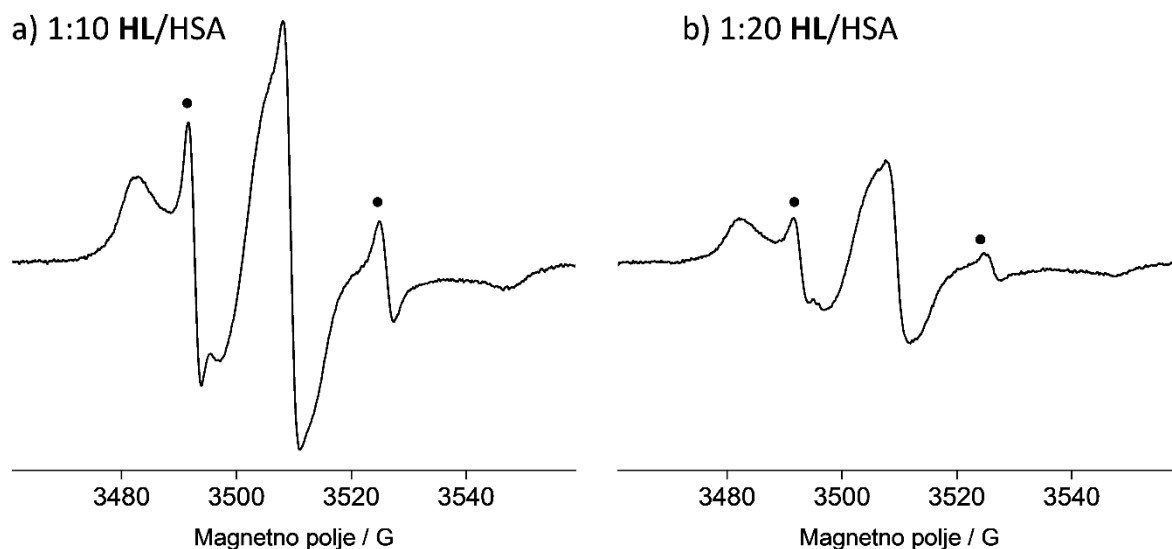
U okviru istraživanja koje se odnosi na HSA hidrogel kao potencijalni depo antikancerskog agensa, ispitano je vezivanje citotoksičnog paulonskog liganda **HL** za HSA u rastvoru. Na osnovu određenih pKa vrednosti analognih jedinjenja [196], za **HL** se može reći da se na fiziološkom pH nalazi u svom neutralnom obliku. Obeleženi ligand **HL** u vodi dao je izotropni EPR signal sa tri uska pika tipičan za slobodnorotirajuće nitrokside, koji potiče od slobodnog radikala TEMPO (slika 33). Dati EPR spektar se pokazao identičnim signalu **HL**-a u fiziološkom rastvoru.



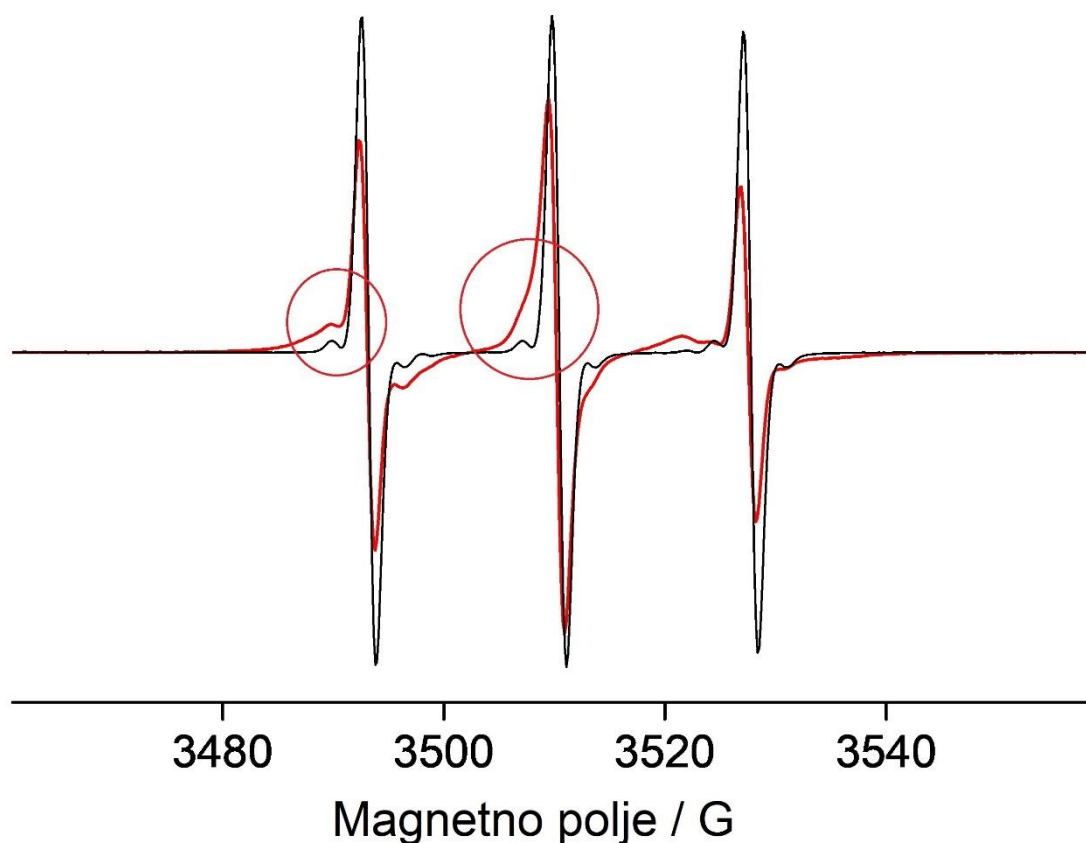
Slika 33. Struktura i EPR spektar modifikovanog 7,12-dihidroindolo[3,2-*d*][1]benzazepin-6(5*H*)-ona obeleženog spinskom probom 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil (TEMPO) (**HL**), koncentracije 0,1 mM u vodi.

Na slici 34 su prikazani EPR spektri **HL**-a u rastvoru HSA u molskom odnosu **HL**/HSA 1:10 (a) i **HL**/HSA 1:20 (b). Uočava se značajno širenje spektralne linije **HL**-a u rastvoru albumina, što je pokazatelj ograničene mobilnosti liganda [87,192], te njegovog vezivanja za HSA. Na osnovu visine pika na višem polju, procenjeno je da je u 1:10 **HL**/HSA rastvoru vezano oko 90%, a u rastvoru 1:20 **HL**/HSA 94%, dok udeo nevezanog **HL**-a iznosi 10, odnosno 6% (označeno simbolom • na slici 34).

Uz pretpostavku da za vezivanje liganda **HL** za HSA važi stehiometrija 1:1, na osnovu ovih rezultata procenjeno je da konstanta formiranja iznosi $\log K \sim 3,2 \pm 0,4$, ukazujući na umeren afinitet proteina za vezivanje liganda.



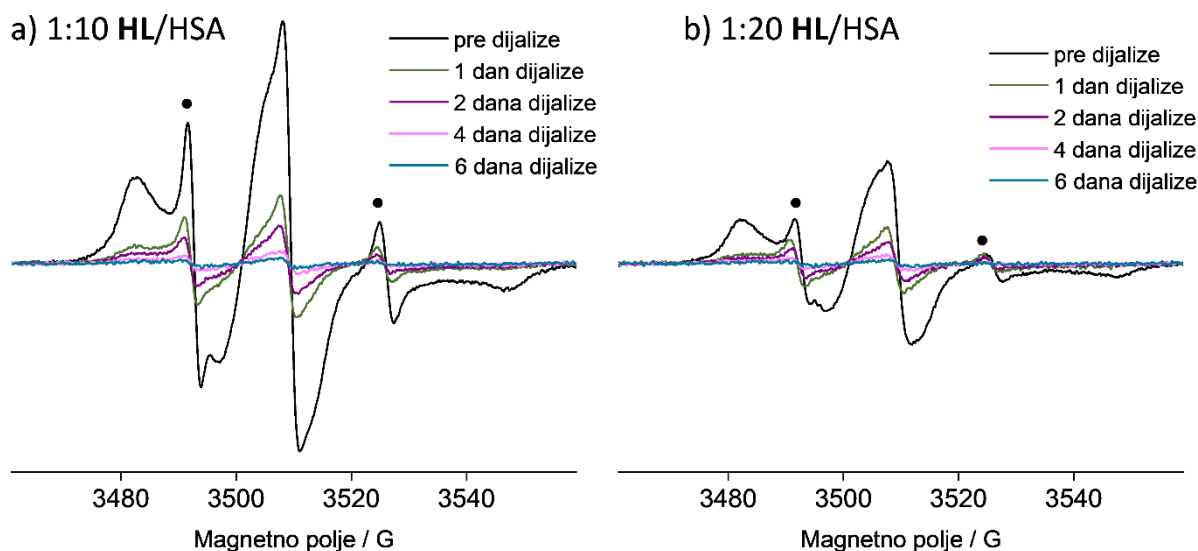
Slika 34. EPR spektri a) 0,5 mM **HL** / 5 mM HSA rastvora (1:10 **HL**/HSA) i b) 0,25 mM **HL** / 5 mM HSA (1:20 **HL**/HSA).



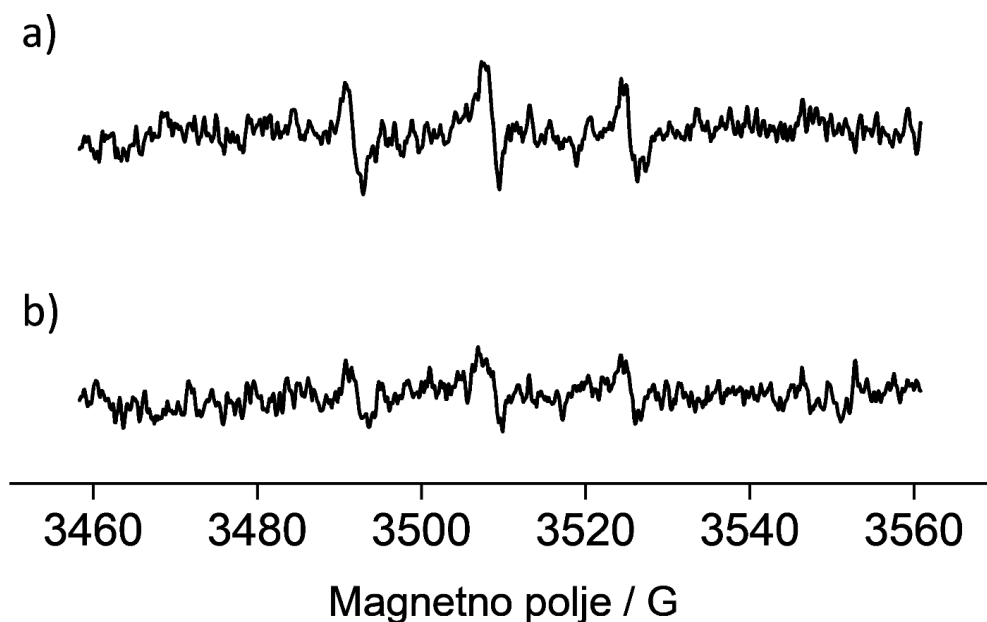
Slika 35. EPR spektri 0,5 mM spinske probe TEMPO u vodi (crni spektar) i u 5 mM HSA vodenom rastvoru (crveni spektar) sa označenim doprinosima koji potiču od imobilisane probe.

Kako HSA poseduje dva glavna mesta za vezivanje lekova, *Sudlow I* i *Sudlow II* [169,185], može se tvrditi da se ligand **HL** smešta u jedan od ova dva hidrofobna džepa. Analizom EPR spektara spinske probe TEMPO (slika 35), konstituenta liganda **HL**, uočava se proširenje signala probe u rastvoru HSA u odnosu na signal iz vodenog rastvora. Ovo svakako jeste indicija učešća TEMPO činioca u vezivanju **HL**-a, premda je jasno da se u pojedinačnom slučaju spinske probe radi o slaboj imobilizaciji usled nasumičnih interakcija sa bočnim grupama u proteinu, pre nego o specifičnom vezivanju. Na osnovu toga se zaključuje da paulonski deo liganda **HL** igra glavnu ulogu u vezivanju za HSA. Za vezivno mesto lekova *Sudlow I* tipično se vezuju glomazni, hidrofobni, anjonski molekuli sa centralno lokalizovanim negativnim naelektrisanjem, čiji je predstavnik molekula varfarina, dok se sklonosću ka vezivanju za mesto *Sudlow II* odlikuju aromatična jedinjenja proširene konformacije s periferno lociranom elektronegativnom grupom, poput ibuprofena i benzodiazepina [176,184]. U radu [195] je računskim proračunima pokazano da se ligand **HL** najverovatnije vezuje za mesto *Sudlow II*. Sigurno je da hidrofobne interakcije najviše doprinose vezivanju za HSA, premda je moguće i učešće atoma azota u elektrostatičkim interakcijama sa hidroksilnom grupom aminokiselinskih ostataka Ser489, karakterističnim po sudelovanju u vezivanju lekova za *Sudlow II* mesto [176,195].

Radi praćenja spontanog otpuštanja liganda iz rastvora HSA *in vitro*, 300 μ l **HL**/HSA rastvora (1:10 i 1:20) je dijalizirano u 50 ml fiziološkog rastvora tokom osam dana na sobnoj temperaturi, uz snimanje EPR spektara na svakih 24 h. Kvantifikacijom spinova, na osnovu dvostrukog integrala EPR signala uzoraka rastvora **HL**/HSA, utvrđeno je da je iz oba rastvora nakon 24 h otpušteno ~ 75% (slika 36, zeleni spektri). Tokom trajanja dijalize, EPR spektroskopijom je takođe potvrđeno prisustvo liganda **HL** u medijumu za dijalizu. Na slici 37 su prikazani snimljeni EPR signali **HL**-a, otpuštenog iz 300 μ l 1:10 (a) i 1:20 (b) **HL**/HSA rastvora u 50 ml fiziološkog rastvora, nakon 24 h dijalize. Iako se i ovakav alternativni način praćenja oslobađanja liganda pokazao mogućim, zaključeno je da je zbog slabog signala, te velikog odnosa signal/šum, za kvantitativna merenja definitivno pouzdanije pratiti promene u količini probe unutar gela nego u medijumu za otpuštanje.



Slika 36. EPR spektri a) 0,5 mM **HL** / 5 mM HSA (1:10 **HL**/HSA) rastvora i b) 0,25 mM **HL** / 5 mM HSA (1:20 **HL**/HSA) rastvora, pre dijalize (crni spektri) i posle 1 dan (zeleni spektri), 2 dana (ljubičasti spektri), 4 dana (lila spektri) i 6 dana dijalize (plavi spektri) u fiziološkom rastvoru. Signali koji potiču od slobodnotirajuće probe označeni su simbolom •.

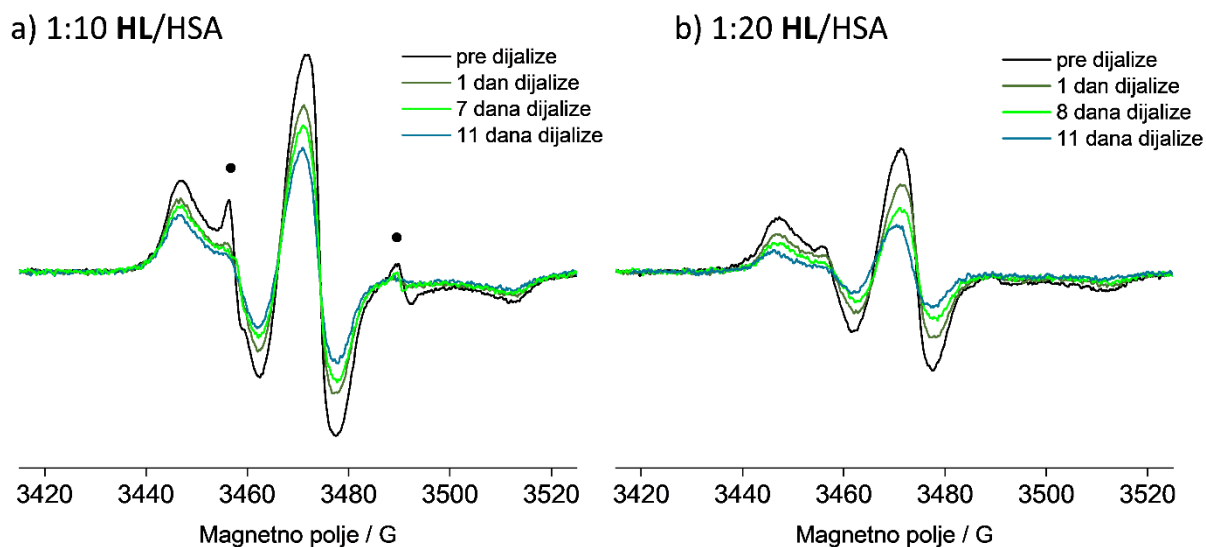


Slika 37. EPR spektri liganda **HL** u 50 ml fiziološkog rastvora otpuštenog iz 300 μ l a) 0,5 mM **HL** / 5 mM HSA rastvora (1:10 **HL**/HSA) i b) 0,25 mM **HL** / 5 mM HSA (1:20 **HL**/HSA) rastvora, nakon 24h dijalize.

Otpuštanje je nakon prvog dana usporeno, te je nakon 2 dana dijalize otpušteno ukupno oko 85% (slika 36, ljubičasti spektri), posle 4 dana 94% (slika 36, lila spektri), 6 dana 97% (slika 36, plavi spektri), dok najzad osmog dana dijalize više nije detektovano prisustvo **HL**-a u rastvorima sa HSA. Dobijeni rezultati pokazuju da procenat oslobođenog liganda iz rastvora HSA ne zavisi od njegove inicijalne koncentracije i da se najverovatnije radi o specifičnom vezivanju za protein. Osim toga, izvodi se zaključak da je izborom optimalne početne koncentracije moguće podesiti količinu liganda koji se isporučuje, što je od ključnog značaja za kontrolisanu isporuku.

Imajući u vidu da otpuštanje liganda u *in vivo* u odnosu na *in vitro* uslove može biti značajno brže zbog reakcije albumina sa enzimima i endogenim metabolitima, u daljoj fazi istraživanja je ispitivano da li je HSA hidrogel u odnosu na rastvor pogodniji depo liganda koji bi eventualno obezbedio bolju biorasploživost leka *in vivo*.

EPR spektri termalno-indukovanih **HL**/HSA hidrogelova su prikazani na slici 38 (crni spektri se odnose na gelove pre dijalize). Na spektrima se uočava vezivanje **HL**-a za HSA gel-matricu, dok je utvrđeno da je udeo nevezanog liganda, lokalizovanog u vodenim porama gela, manji nego u poređenju sa odgovarajućim rastvorima, i da iznosi $\sim 3\%$ u 1:10 **HL**/HSA hidrogelu, a potpuno izostaje u 1:20 **HL**/HSA hidrogelu, što se pretpostavlja da je posledica konformacionih promena proteina nastalih tokom zagrevanja, odnosno zauzimanja strukture u vidu intermolekulskih β -ploča, dostupnije ligandu [40]. Ovo je u skladu sa uočenim širenjem EPR signala **HL**-a od 64,8 G u rastvoru (slika 34) do 65,6 G u gelu (slika 38, crni spektar), svedočeći o jačem vezivanju liganda za proteinski hidrogel naspram vezivanja za HSA u rastvoru.



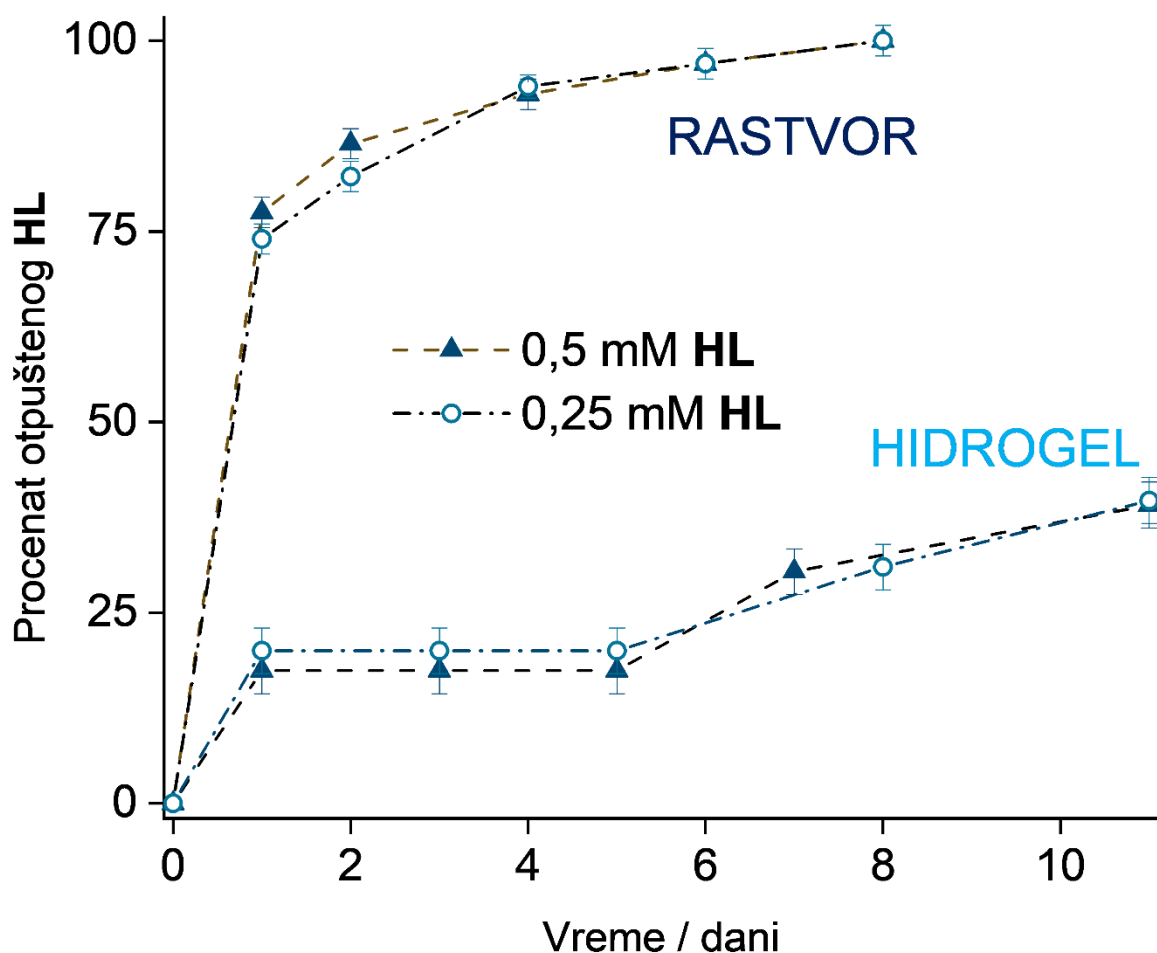
Slika 38. EPR spektri a) 0,5 mM **HL** / 5 mM HSA (1:10 **HL**/HSA) hidrogela i b) 0,25 mM **HL** / 5 mM HSA (1:20 **HL**/HSA) hidrogela, pre dijalize (crni spektri) i posle 1 dana (temnozeleni spektri), 7–8 dana (svetlozeleni spektri) i 11 dana dijalize (plavi spektri) u fiziološkom rastvoru. Signali koji potiču iz slobodnorotirajuće probe označeni su simbolom •.

Radi praćenja kinetike spontanog otpuštanja **HL**-a iz HSA hidrogela *in vitro*, 1:10 i 1:20 **HL**/HSA hidrogelovi su podvrgnuti dijalizi u 50 ml fiziološkog rastvora, uz snimanje njihovih EPR spektara tokom dijalize u fiziološkom rastvoru na svakih 24 h. Nakon jednog dana dijalize, ustanovljeno je da se oslobađa 20% liganda iz matrice oba gela (slika 38, tamnozeleni spektri), nakon čega nije bilo promena u odgovarajućim spektrima sve do sedmog dana dijalize. Dodatnih 10% liganda (ukupno 30%) otpušteno je iz 1:10 **HL**/HSA hidrogela sedmog (slika 38.a, svetlozeleni spektar), a isti procenat iz 1:20 **HL**/HSA hidrogela osmog dana dijalize (slika 38. b, svetlozeleni spektar), dok je ukupno 40% **HL**-a otpušteno iz oba gela posle 11 dana dijalize (slika 38, plavi spektri). Kako se pokazalo da hidrogelovi mogu da zadrže do 60% liganda čak 11 dana dijalize, što je značajno duže u poređenju sa **HL**/HSA rastvorima iz kojih se 100% liganda otpusti posle 8 dana (sumirano u tabeli 4), evidentno je da hidrogel ima veći potencijal od HSA rastvora da služi kao rezervoar **HL**-a (slika 39).

Tabela 4. Poređenje *in vitro* vezivanja i otpuštanja liganda **HL** iz 5 mM HSA vodenog rastvora i odgovarajućeg termalno-indukovanog hidrogela, za dva molska odnosa **HL:HSA**, 1:10 i 1:20.

		HL:HSA	
		<i>1:10</i>	<i>1:20</i>
<i>RASTVOR</i>			
Pre dijalize		→ 90% HL vezano za HSA, 10% HL nevezano, u vodi	→ 94% HL vezano za HSA, 6% HL nevezano, u vodi
Tokom dijalize u fiziološkom rastvoru	1 dan	→ 75% HL ukupno otpušteno	→ 75% HL ukupno otpušteno
	8 dana	→ 100% HL ukupno otpušteno	→ 100% HL ukupno otpušteno
<i>HIDROGEL</i>			
Pre dijalize		→ 97% HL vezano za HSA, 3% HL nevezano, u vodenim porama	→ 100% HL vezano za HSA
Tokom dijalize u fiziološkom rastvoru	1 dan	→ 20% HL ukupno otpušteno	→ 20% HL ukupno otpušteno
	7 dana	→ + 10% HL otpušteno (30% ukupno)	→ Bez promene
	8 dana	→ Bez promene	→ + 10% HL otpušteno (30% ukupno)
	11 dana	→ + 10% HL otpušteno (40% ukupno)	→ +10% HL otpušteno (40% ukupno)

Nakon inicijalnog otpuštanja liganda iz HSA hidrogelova, dodatno oslobađanje **HL**-a u medijum za dijalizu uočeno je tek oko sedmog dana dijalize, ukazujući na to da u tom trenutku polimerna matrica počinje da degradira, odnosno da dolazi do slabljenja međumolekulskih interakcija unutar hidrogela. Da bi se stekao bolji uvid u dešavanja na molekularskom nivou, dalja istraživanja su zasebno fokusirana na gel-matricu, odnosno na vodenu fazu hidrogela, tokom trajanja dijalize. U tu svrhu su sintetisana dva tipa HSA hidrogelova, hidrogel obeležen 5-DS-om, za proučavanje proteinske matrice, i 3CP/HSA hidrogel za ispitivanje procesa unutar vodenih pora hidrogela, imajući u vidu činjenicu da se 3CP nalazi isključivo u vodenoj komponenti hidrogela.



Slika 39. Poređenje *in vitro* otpuštanja liganda **HL** iz 1:10 i 1:20 **HL**/HSA rastvora i odgovarajućih termalno-indukovanih hidrogelova, tokom dijalize u fiziološkom rastvoru na sobnoj temperaturi.

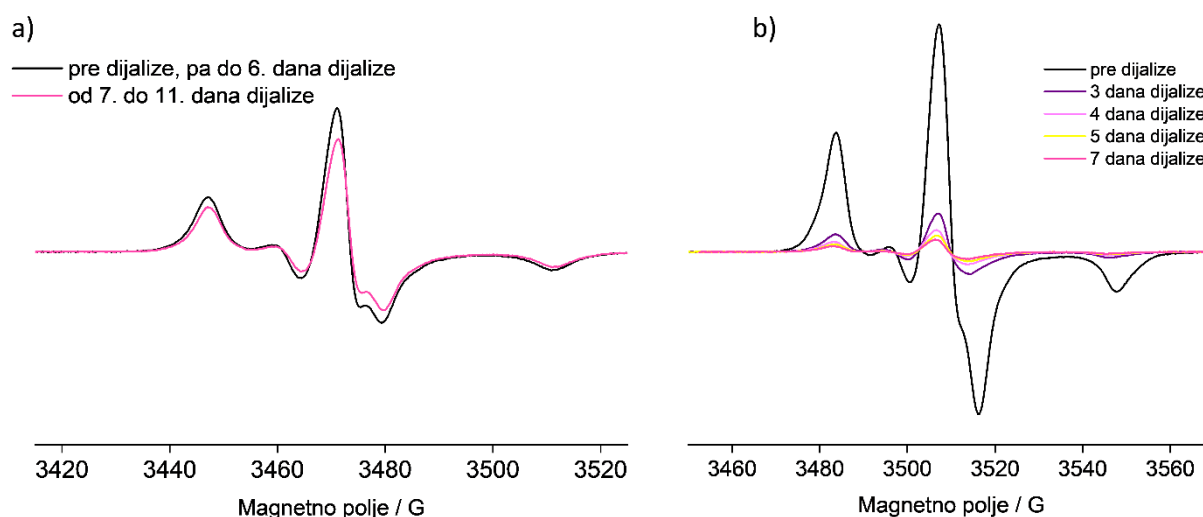
5.2.2. Degradacija proteinske matrice HSA hidrogela

Degradacija hidrogelova je najčešće posledica hidrolize [20], pa je tokom stajanja u vodenim medijumima poput pufera i fiziološkog rastvora, posebno na sobnoj temperaturi, očekivano da do nje dođe. Pretpostavljeno je da bi se ovaj proces mogao pratiti na molekulskom nivou na osnovu analize interakcije između proteina i liganda. Narušavanje interakcija usled degradacije hidrogela, ispitivano je istim protokolom primenjenim za praćenje kinetike otpuštanja **HL**-a iz gel nosača, s tim što je umesto paulonskog liganda korišćena spinska proba 5-DS. Razlog tome je jako vezivanje obeleženih derivata stearinske kiseline za albumin, za koji je dobro poznato da poseduje minimum sedam mesta za vezivanje srednje- i dugolančanih masnih kiselina [169,183,197,198]. U skladu sa tim, pokazano je i da do šest ekvivalenata spinski obeleženih derivata stearinske kiseline ispoljava jako vezivanje za HSA [199]. Hipotezu da se zbog toga 5-DS neće lako odvezati od HSA gel-matrice potvrdili su i rezultati. Naime, nije bilo promena u EPR spektru 1:1 5-DS/HSA hidrogela čak šest dana dijalize (slika 40.a, crni spektar), dok je sedmog dana došlo do oslobađanja 20% 5DS-a, bez daljih promena zaključno sa 11. danom dijalize (slika 40, roze spektar). Otpuštanje izvesne količine 5-DS-a sedmog dana dijalize je dodatna indikacija da degradacija gela otpočinje nakon nedelju dana stajanja u fiziološkom rastvoru (jonske jačine 154 mM) kao posledica narušavanja nekovalentnih interakcija

između liganda i proteina i/ili samog proteina. Najzad, iako nije uočljivo na izgled spektra, potvrda o narušavanju strukture proteinske matrice ogleda se i u smanjenju parametra reda S od 0,84 na početku, do 0,82 sedmog dana dijalize. Manja vrednost S znači smanjenje imobilizacije probe, odnosno niži stepen uređenosti posmatranog sistema, moguće zbog početka hidrolitičkog razlaganja proteinskog hidrogela. Ipak, treba napomenuti da je značajan intenzitet signala koji potiče od spinskog obeleživača 5-DS izmeren i nakon šest meseci stajanja hidrogela u fiziološkom rastvoru, potvrđujući da ne dolazi do potpune degradacije albuminskog hidrogela tokom skladištenja čak i toliko dug vremenski period.

Treba istaći da su eksperimenti sa 5-DS/HSA rastvorom pokazali da albuminski rastvor nema sposobnost da zadrži istu količinu spinske probe dovoljno dugo kao odgovarajući hidrogel, s obzirom na to da se iz rastvora znatna količina otpusti već nakon tri dana, a nakon sedam dana dijalize u fiziološkom rastvoru se otpusti čak 95% doksil-stearata (slika 40.b). Zaključak izveden na osnovu prethodno opisanih rezultata u poglavlju 5.2.1 dobijenih za ligand **HL**, sada je potvrđen i za 5-DS, te se može reći kako je HSA gel mnogo bolji rezervoar za hidrofobne supstancije (lekove) u odnosu na rastvor.

Zapažanja koja se odnose na 5DS/HSA hidrogelove bi svakako mogla biti od koristi za predviđanje osobnosti albuminskih hidrogelova u pogledu otpuštanja aktivnih supstancija *in vivo*. Iako se jonska jačina krvi kreće oko 0,15 mol/l, očekivano je da degradacija hidrogela bude potpomognuta dejstvom enzima i endogenih metabolita, što bi rezultovalo bržom isporukom liganda do ćelija. Ovim se pak konstatuju eksperimentalna ograničenja studija *in vitro*, te neizostavni problemi koji nastaju prilikom translacije saznanja dobijenih upotrebom model sistema, na *in vivo* primene.

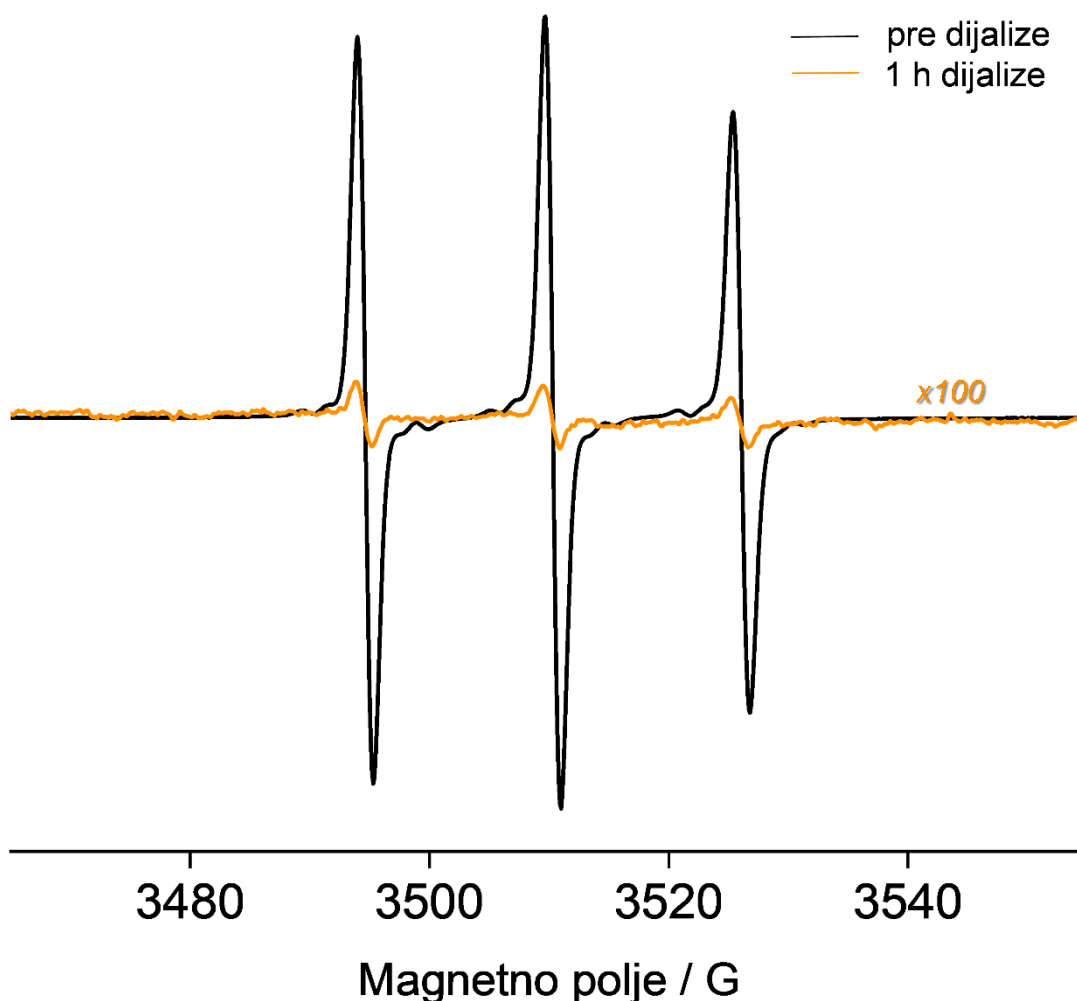


Slika 40. EPR spektri a) 5 mM 5-DS / 5 mM HSA (5-DS/HSA 1:1) hidrogel pre dijalize i do 6. dana dijalize (crni spektar), i od 7. do 11. dana dijalize (roze spektar); b) 5 mM 5-DS / 5 mM HSA (5-DS/HSA 1:1) rastvor pre dijalize (crni spektar), nakon 3 dana (ljubičasti spektar), 4 dana (lila spektar), 5 dana (žuti spektar) i 7 dana dijalize u fiziološkom rastvoru (roze spektar).

5.2.3. Difuzija malog liganda iz HSA hidrogela

Kako se ispostavilo da je većinski udeo vezanog liganda u 1:10 **HL**/HSA hidrogelovima, a da nevezani difunduje iz sistema u fiziološki rastvor u roku od 24 h od početka dijalize, kao i da se nakon

nedelju dana dijalize dodatna količina **HL**-a detektuje u vodenim porama hidrogela, što je praćeno daljim otpuštanjem u medijum za dijalizu, preostalo je da se bolje razume proces difuzije **HL**-a kroz vodene pore hidrogela. Imajući u vidu da se radi o procesu koji je zasigurno određen brzinom razmene vode sa fiziološkim rastvorom, odnosno osmozom i difuzijom jona natrijuma i hlora, praćena je dijaliza HSA hidrogela sintetisanog sa spinskom probom 3CP (u molarnom odnosu 1:10), za koju je pokazano da je lokalizovana isključivo u vodenoj fazi BSA hidrogela i da ne interaguje sa gel-matricom. Kao i u slučaju hidrogela na bazi goveđeg serumskog albumina, i kod hidrogela sintetisanog iz humanog serumskog albumina nije uočena nikakva interakcija između probe 3CP i proteina u skladu sa prikazanim izotropnim EPR signalom sa tri uska pika 3CP/HSA hidrogela (slika 41, crni spektar). Posle jednog sata dijalize (slika 41, narandžasti spektar) ustanovljeno je da je već 96% probe difundovalo iz pora gela, te da se radi o veoma brzom procesu difuzije vode / rastvorene supstance iz pora gela, koji se odigrava na potpuno drugoj vremenskoj skali u odnosu na proces otpuštanja vezanog hidrofobnog liganda iz proteinske matrice. Na osnovu ovih rezultata se zaključuje da je za oslobađanje malih liganada iz ove vrste hidrogela, kada postoji interakcija između liganda i proteina, determinišući proces oslobađanja agensa iz matrice u pore gela. U tom pogledu se nosači na bazi HSA mogu smatrati najpogodnijim biokompatibilnim depoima različitih lekova u skladu sa sposobnošću albumina da veže na stotine lekova se veoma visokim afinitetom.



Slika 41. EPR spektri 0,5 mM 3CP / 5 mM HSA (3CP/HSA 1:10) hidrogela pre dijalize (crni spektar) i nakon 1 h dijalize (narandžasti spektar) u fiziološkom rastvoru (radi bolje uočljivosti spektar je uvećan 100 puta).

5.2.4. *In vitro* citotoksičnost liganda HL i HL/HSA hidrogela

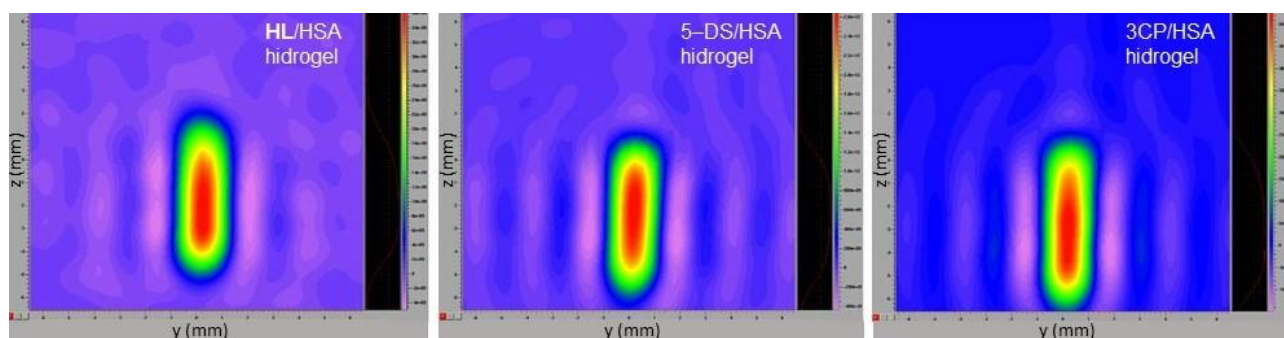
Citotoksična aktivnost **HL**-a i **HL/HSA** hidrogela je određena primenom MTT testa na Colo-205 kancer ćelijama humanog adenokarcinoma debelog creva, nakon inkubacije od 72 h. Veoma visoka aktivnost liganda je ranije pokazana na nizu različitih humanih kancer ćelijskih linija (A549, CH1, SW480, N87, SK-Mel 28, T47D), sa vrednostima IC_{50} u opsegu 0,02–0,27 μM , za vreme inkubacije od 96 h [148].

U ovoj studiji je za sam ligand **HL** utvrđena vrednost $IC_{50} = (0,090 \pm 0,001) \mu\text{M}$. U poređenju sa komercijalno dostupnim antikancerskim lekovima, doksorubicinom, oksaliplatinom, 5-Fluorouracilom, etopozidom i regorafenibom, za koje su u Colo-205 ćelijskoj liniji na osnovu MTT testa određene sledeće vrednosti IC_{50} : $(3,3 \pm 0,2) \mu\text{M}$ [200], $(2,60 \pm 0,52) \mu\text{M}$ [201], $3,2 \mu\text{M}$ [202], $(1,61 \pm 0,02) \mu\text{M}$ [203], i $3,269 \mu\text{M}$ [204], evidentno je da se **HL** odlikuje izrazitom citotoksičnošću.

Međutim, nije detektovana citotoksična aktivnost HSA hidrogela koji je sadržao 0,5, 1,0 i 5,0 μM **HL** tokom tri dana inkubacije pri direktnom kontaktu kancer ćelija sa hidrogelom. Ovakav rezultat je posebno važan potvrđujući da bi HSA hidrogel mogao biti efikasan rezervoar **HL** liganda sa odloženim oslobađanjem, čak i u prisustvu živih ćelija.

5.2.5. EPR imidžing spinski obeleženih HSA hidrogelova

Radi vizuelizacije spinskih proba unutar spinski obeleženih HSA hidrogelova, snimljeni su poprečni preseki albuminskih gelova koji su sadržali **HL**, 5-DS i 3CP, primenom EPR imidžinga, pri čemu je dobijena potvrda o uniformnoj raspodeli navedenih agenasa unutar hidrogela (slika 42). Ono što je posebno značajno, pre svega za potencijalnu primenu EPR imidžinga u *in vivo* biomedicinskim istraživanjima, jeste činjenica da je dobijena dobra slika i iz anizotropnih signala **HL**-a i 5-DS-a, s obzirom na to da se uobičajeno smatra da je za uspešan imidžing potrebno imati probu koja daje jedan uski pik, ili barem, izotropni signal nalik onom koji potiče od 3CP-a u vodi.



Slika 42. 2D EPR imidži spinski obeleženih HSA hidrogelova. S leva na desno: 0,5 mM **HL** / 5 mM HSA, 5 mM 5-DS / 5 mM HSA i 0,5 mM 3CP / 5 mM HSA.

Uspešnom primenom EPR spektroskopije i imidžinga, demonstriranoj na spinski obeleženim HSA hidrogelovima, u *in vitro* ispitivanjima kinetike otpuštanja citotoksičnog liganda iz albuminskog hidrogela, degradacije polimerne matrice i procesa difuzije vode / rastvorene supstance iz pora gela, ističe se korisnost savremene EPR tehnike u biomedicinskim istraživanjima, pre svega u izučavanju kancera. Uz to je potvrđen i potencijal albuminskog hidrogela da služi kao depo antikancerskih agenasa s odloženim oslobađanjem, s obzirom na to da se pokazalo da HSA hidrogel tokom 11 dana dijalize može da zadrži čak 60% citotoksičnog liganda i da je još pogodniji nosač u odnosu na HSA

u rastvoru. Najzad, činjenica da **HL**/HSA hidrogel nije ispoljio citotoksičnu aktivnost u Colo-205 ćelijskoj liniji tokom 72 h inkubacije, potvrda je da albuminski hidrogel može poslužiti kao efikasan depo aktivnog liganda čak u prisustvu živih ćelija, što otvara mogućnost za potencijalnu upotrebu spinski obeleženih albuminskih hidrogelova u praćenju odgovora na terapiju.

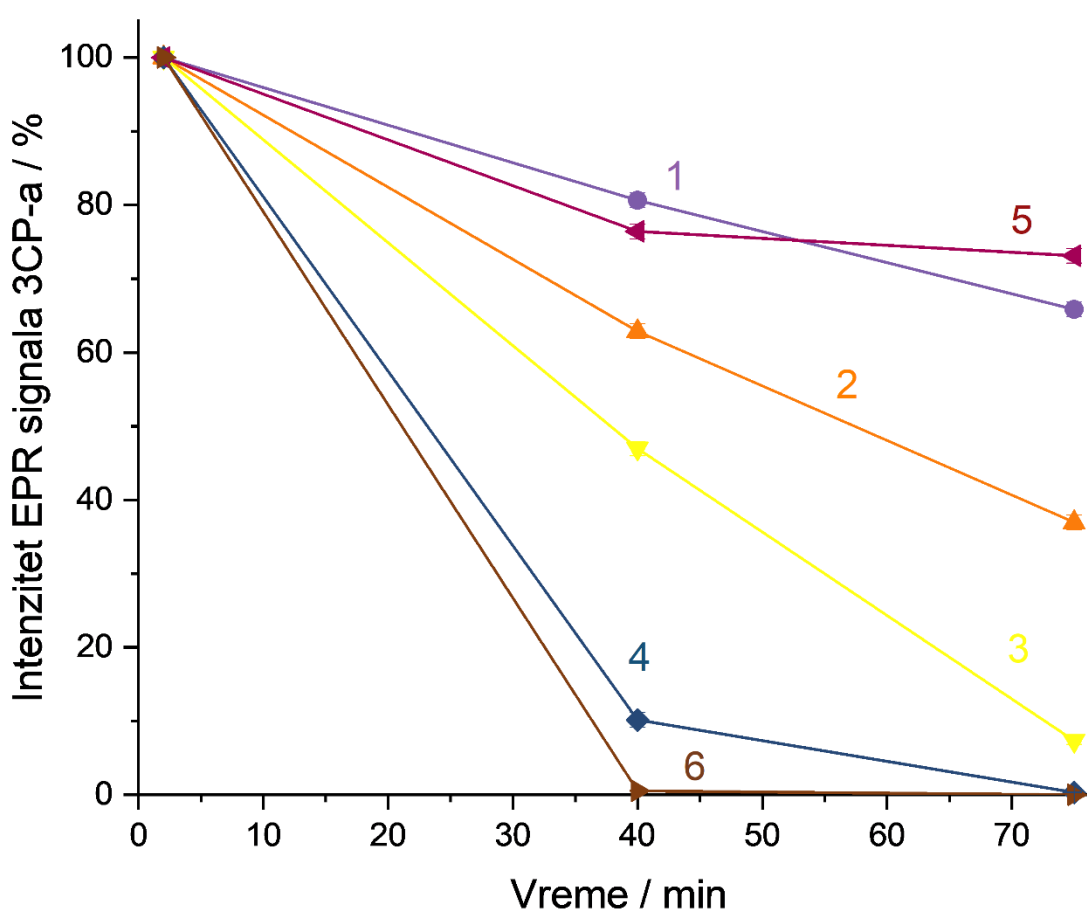
Naime, EPR oksimetrija je tehnika koja se efikasno koristi za merenje pO_2 u tkivima *in vivo*, a našla je svoju primenu i u imidžingu kancera, omogućavajući da se hipoksična tumorska tkiva razlikuju od zdravih [118]. Vodeći se principom oksimetrije, pretpostavka je da bi hidrogel obeležen odgovarajućom spinskom probom, a koji ujedno sadrži i terapijsku komponentu, mogao da pruži uvid u status tretiranih ćelija, te izvestiti o efikasnosti lečenja, na osnovu EPR merenja pre, tokom i nakon tretmana.

Nešto pojednostavljeniji pristup je primenjen u narednoj fazi istraživanja kako bi se za početak ispitalo da li spinski obeleženi albuminski hidrogel može dati informacije o vijabilnosti ćelija u *Saccharomyces cerevisiae*, koji je korišćen kao model sistem.

5.3. Spinski obeleženi hidrogelovi za procenu vijabilnosti ćelija primenom EPR spektroskopije i imidžinga

Deo rezultata prikazanih u ovom poglavlju je objavljen u [205].

Rezultati EPR spektroskopskih merenja u ispitivanju ćelijskog metabolizma, pokazali su da se spinska proba 3CP redukuje u prisustvu vitalnih ćelija kvasca. Životni vek ćelije se povezuje sa proizvodnjom reaktivnih kiseoničnih vrsta, kako kod viših tako i kod nižih eukariota, poput *Saccharomyces cerevisiae*, što kvasce čini idealnim jednostavnim modelom za istraživanje. Tokom procesa ćelijskog disanja normalno dolazi do generisanja niskih koncentracija ROS-a, koji uzimaju ulogu signalnih molekula. Međutim, ako sistemi antioksidativne zaštite zakažu, superoksidni anjon, zajedno sa sekundarnim reaktivnim vrstama, postaje glavni uzrok oksidativnog stresa [206]. Osim toga, za mitohondrije *Saccharomyces cerevisiae* je pokazano da u uslovima hipoksije proizvode NO tokom apoptoze [207].

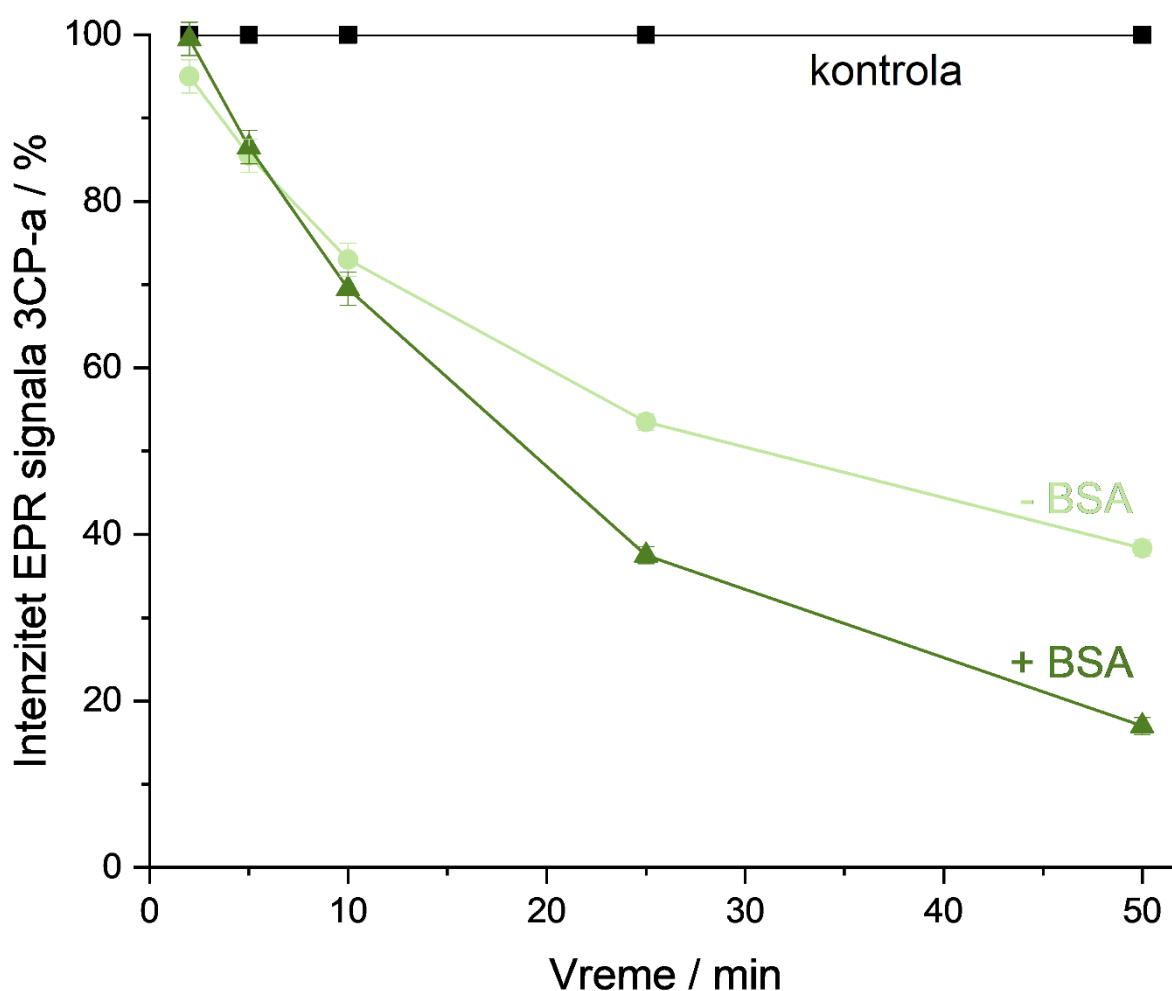


Slika 43. Stepen redukcije intenziteta EPR signala spinske probe 3CP prisutne u količini 0,04 μmol u uzorcima koji sadrže: 1) $0,7 \cdot 10^8$ ćelija kvasca, 2) $1,4 \cdot 10^8$ ćelija kvasca, 3) $2,7 \cdot 10^8$ ćelija kvasca, 4) $5,4 \cdot 10^8$ ćelija kvasca, 5) temperaturno inaktiviranih $5,4 \cdot 10^8$ ćelija kvasca i 6) $10,8 \cdot 10^8$ ćelija kvasca. Intenzitet EPR signala svakog uzorka izmeren u 2. minutu je normiran na 100 %.

Iako postoje brojne metode za procenu redoks statusa tkiva, uglavnom su bazirane na indirektnoj detekciji produkata oksidacije. U tom pogledu, prednost EPR spektroskopije, u sprezi sa odgovarajućim spinskim probama jeste mogućnost gotovo neposredne detekcije ROS-a *in vivo*. Princip je baziran na konverziji nitroksidnih proba injektovanih u živi sistem, do EPR neaktivnih oblika, hidroksilamina ili oksoamonijum katjona, usled redoks reakcija sa biološkim jedinjenjima, enzimima i jonima prelaznih metala, pri čemu se brzina redukcije probe smatra merilom redoks stanja

posmatranog entiteta [14,100]. U skladu sa tim, eksperimenti su pokazali veći stepen redukcije za iste početne količine spinske probe 3CP (0,04 μmol) sa porastom broja živih ćelija kvasca prisutnih u uzorku (slika 43).

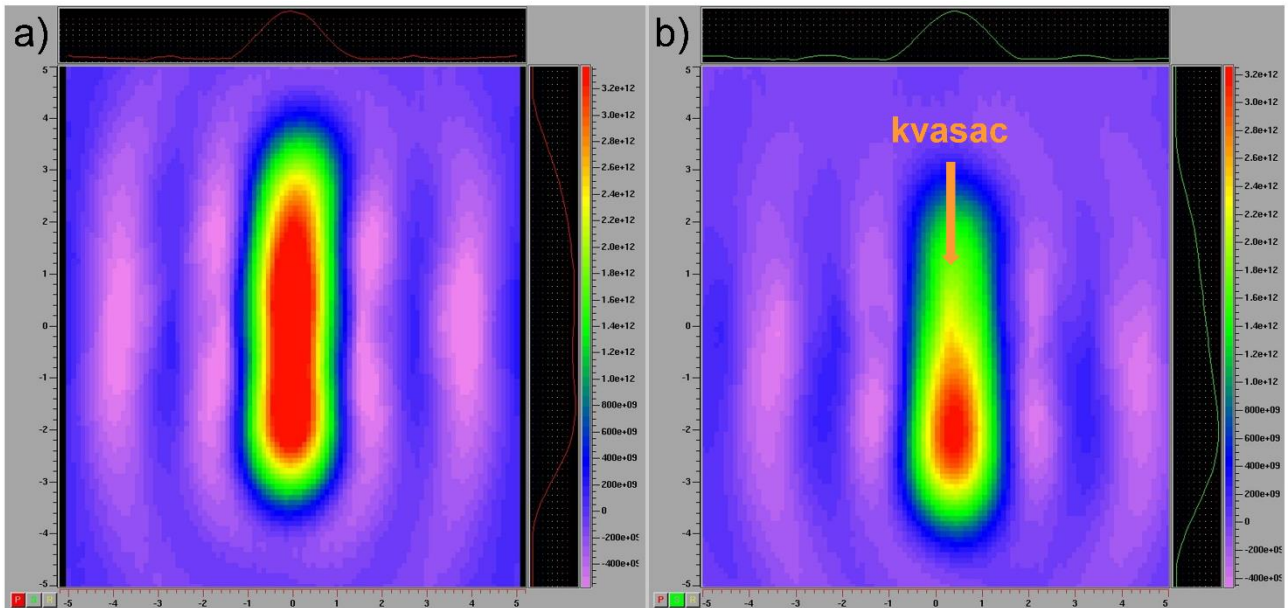
Pošto je potvrđeno da spinska proba 3CP može da služi kao biomarker aktivnog metabolizma ćelija, u narednoj fazi je trebalo ispitati primenljivost 3CP-a za istu namenu, ali u situaciji kada je u sistemu prisutan serumski albumin. Pokazano je da je brzina redukcije EPR signala nitroksida, za iste koncentracije spinske probe i jednak broj živih ćelija u uzorku, veća u prisustvu BSA u odnosu na slučaj kada se umesto albumina u sistemu nalazi samo voda (slika 44). Iako bi se moglo pretpostaviti da albumin doprinosi redukciji 3CP-a posredstvom Cys34, kontrolni eksperiment u kom je kvasac izuzet iz uzorka, pokazao je da BSA samostalno ne dovodi do pada signala spinske probe, već da je isti intenzitet očuvan tokom vremena. Inače, serumski albumin je neizostavna komponenta medijuma za gajenje ćelijskih kultura s obzirom na njegovo dobro poznato svojstvo da promovise rast ćelija i održava različite kulture eukariotskih ćelija u *in vitro* uslovima [208].



Slika 44. Poređenje stepena redukcije EPR signala spinske probe 3CP koncentracije 0,5 mM u odsustvu BSA (– BSA) i u prisustvu BSA (+ BSA) finalne koncentracije 0,2 g/ml, u uzorcima koji sadrže $2 \cdot 10^8$ ćelija kvasca. Kontrola se odnosi na uzorak koji sadrži samo 3CP i BSA bez prisutnih ćelija kvasca.

U datoj studiji, ispoljila se dualna uloga albumina, koji ne samo da u formi hidrogela može činiti matricu koja drži spinsku probu rastvorenu unutar vodenih pora, već služi i kao pojačavač redukcije signala probe posredstvom živih ćelija kvasca, omogućavajući najzad i vizuelizaciju efekata dejstva

ćelijskog metabolizma na spinski obeleženi BSA hidrogel. Na slici 45 su predstavljeni 2D EPR imidži poprečnog preseka (yz-ravan) 3CP/BSA hidrogela pre i nakon 10 minuta inkubacije sa ćelijama kvasca nanetih na xz-ravan hidrogela, sa kojih se jasno uočava gubljenje signala probe iz dela hidrogela koji je bio u dodiru sa aktiviranim kvascem.



Slika 45. 2D EPR imidž yz-ravni BSA hidrogela a) pre i b) nakon 10 min inkubacije sa ćelijama kvasca.

6. ZAKLJUČAK

Konkretni ciljevi istraživanja, uključujući izbor optimalne spinske probe i razvoj nove EPR metodologije za određivanje sadržaja vode u hidrogelu; izučavanje HSA hidrogela kao nosača antikancerskog liganda **HL** primenom EPR metode za praćenje vezivanja i kinetike oslobađanja lekova iz albuminskog hidrogela; razvoj EPR protokola za ispitivanje procesa difuzije hidrofilnih molekula iz pora hidrogela i praćenje spontane degradacije hidrogela, i najzad dizajn albuminskog hidrogela za detekciju vijabilnosti ćelija primenom EPR spektroskopije i imidžinga, mogu se smatrati uspešno ispunjenim.

Razumevanjem suštinskog značaja sadržaja vode unutar hidrogela za kontrolisano otpuštanje lekova, usled nedostatka standardizovanog testa za njegovu karakterizaciju u tom smislu, prvi deo ove studije odnosio se na određivanje ukupne količine vode u albuminskim hidrogelovima. Razvijen je novi pristup koji podrazumeva primenu EPR spektroskopije u sprezi sa tehnikom spinskog obeležavanja. Polazeći od odabira adekvatne EPR aktivne spinske probe kakvom se pokazala proba 3CP, koja je lokalizovana isključivo u vodenim porama hidrogela, preko uspostavljanja korelacije između rotacionog korelacionog vremena indikatora i udela vode, dizajnirana je metodologija koja se pokazala efikasnom u aplikaciji na različitim hidrogelovima na bazi prirodnih polimera, nezasvisno od tipa, veličine, viskoelastičnih svojstava i mesta primene indikatora. Metoda je jednostavna, pouzdana i ne zahteva posebnu pripremu uzorka, te pokazuje potencijal da se svrsta među uobičajene procedure za ispitivanje hidrogelova.

U daljoj fazi istraživanja je sposobnost albumina za vezivanjem velikog broja lekova s visokim afinitetom iskorišćeno za razvoj nosača antikancerskih jedinjenja. S druge strane, demonstrirana je učinkovita primena EPR spektroskopije u *in vitro* ispitivanju kinetike otpuštanja citotoksičnog modifikovanog paulonskog liganda **HL**, iz albuminskog hidrogela. Isti protokol je primenjen i na 5-DS/HSA i 3CP/HSA hidrogelove, radi praćenja degradacije polimerne matrice i procesa difuzije vode/rastvorene supstance iz pora gela.

Potencijal albuminskog hidrogela da služi kao depo antikancerskog agensa s odloženim oslobađanjem je potvrđen činjenicom da je HSA hidrogel tokom 11 dana dijalize bio sposoban da zadrži čak 60% citotoksičnog liganda i da je pogodniji nosač u odnosu na HSA u rastvoru, iz kog se sva količina liganda otpustila u roku od 8 dana. Na osnovu veoma brze kinetike difuzije malog molekula 3CP iz vodenih pora hidrogela u okolni medijum, zaključeno je da je proces odvezivanja liganda koji ostvaruje interakcije sa proteinskom matricom taj koji diktira brzinu otpuštanja. Rezultati eksperimenata na 5-DS/HSA gelovima pokazali su da dolazi do slabljenja međumolekulskih interakcija unutar samog hidrogela nakon sedam dana dijalize, te da je to momenat kad započinju promene u strukturi na molekulskom nivou. Značajan signal 5-DS-a je međutim detektovan mesecima nakon stajanja hidrogela u fiziološkom rastvoru sugerišići da nema potpune degradacije, te da je hidrogel veoma stabilan tokom skladištenja u vodenim rastvorima. Stoga bi se potpuno oslobađanje aktivne supstance vezane za albuminsku matricu očekivalo tek u *in vivo* uslovima. U vezi sa tim važno je napomenuti i da dok se **HL** pokazao citotoksičnim i pri nanomolarnim koncentracijama, **HL**/HSA hidrogel nije ispoljio citotoksičnu aktivnost prema Colo-205 ćelijama kancera tokom 3 dana inkubacije, pokazujući da je albuminski hidrogel dobar rezervoar ovog antikancerskog agensa čak i u prisustvu živih ćelija.

Imajući u vidu potrebu za inovativnim rešenjima na polju dijagnostike i terapije kancera, u studiji se otišlo korak dalje ka razvoju multifunkcionalnog hidrogela koji bi mogao objediniti imidžing i terapijsku komponentu. Polazivši od principa EPR oksimetrije koja omogućava razlikovanje zdravih od hipoksičnih tkiva, koja se takođe odlikuju različitim redoks statusom, kao prvi korak je u *Saccharomyces cerevisiae*, koji je korišćen kao model sistem, ispitano da li spinski obeleženi hidrogel može poslužiti kao indikator redoks okruženja. Ne samo da je 3CP/BSA hidrogel

pokazao osetljivost na aktivni metabolizam ćelija, već je i EPR imidžingom omogućena vizuelizacija redukcije spinske probe u gelu izazvane dejstvom ćelija.

U budućim istraživanjima ostaje da se eksperimenti transliraju na ćelijske linije kancera i eksperimentalne animalne modele, te prelazak sa X-bend na L-bend EPR spektroskopiju/imidžing.

Najzad, sveukupno se zaključuje da bi ova studija mogla otvoriti vrata potencijalnoj primeni EPR molekularnog imidžinga *in vivo* u sprezi sa spinski obeleženim albuminskim hidrogelovima koji bi služili, ne samo kao rezervoar antikancerskih lekova, već i za monitoring efekata lekova na okolna tkiva, u prekliničkim istraživanjima. Pogodnost ovakvog pristupa bilo bi zaobilazanje dugačkih i skupih biohemijjskih testova, korišćenjem višenamenskog hidrogela koji bi omogućio brzo i pouzdano utvrđivanje citotoksičnosti antikancerskih lekova.

7. LITERATURA

- [1] M. Vigata, C. Meinert, D.W. Hutmacher, N. Bock, Hydrogels as drug delivery systems: A review of current characterization and evaluation techniques, *Pharmaceutics*. 12 (2020) 1–45. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121188>.
- [2] D.A. Gyles, L.D. Castro, J.O.C. Silva, R.M. Ribeiro-Costa, A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations, *Eur. Polym. J.* 88 (2017) 373–392. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.01.027>.
- [3] A.S. Hoffman, Hydrogels for biomedical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.010>.
- [4] J. Li, D.J. Mooney, Designing hydrogels for controlled drug delivery, *Nat. Rev. Mater.* 1 (2016) 16071. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>.
- [5] A.M. Merlot, D.S. Kalinowski, Z. Kovacevic, P.J. Jansson, D.J. Lane, M.L.-H. Huang, S. Sahni, D.R. Richardson, Making a case for albumin – a highly promising drug-delivery system, *Future Med. Chem.* 7 (2015) 553–556. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.15>.
- [6] S. Senapati, A.K. Mahanta, S. Kumar, P. Maiti, Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance, *Signal Transduct. Target. Ther.* 3 (2018) 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41392-017-0004-3>.
- [7] T. Sun, Y.S. Zhang, B. Pang, D.C. Hyun, M. Yang, Y. Xia, Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 53 (2014) 12320–12364. <https://doi.org/10.1002/anie.201403036>.
- [8] E.N. Hoogenboezem, C.L. Duvall, Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 130 (2018) 73–89. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.011>.
- [9] N. Desai, Nanoparticle albumin-bound paclitaxel (Abraxane®), in: M. Otagiri, V.T. Giam Chuang (Eds.), *Albumin in Medicine: Pathological and Clinical applications*, Springer Nature, London, UK, 2016. pp. 101–119.
- [10] S.N. Mbugua, L.W. Njenga, R.A. Odhiambo, S.O. Wandiga, M.O. Onani, Beyond DNA-targeting in cancer chemotherapy. *Emerging Frontiers - A Review*, *Curr. Top. Med. Chem.* 21 (2020) 28–47. <https://doi.org/10.2174/1568026620666200819160213>.
- [11] G.I. Shapiro, Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment, *J. Clin. Oncol.* 24 (2006) 1770–1783. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.03.7689>.
- [12] N. Sanaeifar, K. Mäder, D. Hinderberger, Molecular-level release of coumarin-3-carboxylic acid and warfarin-derivatives from BSA-based hydrogels, *Pharmaceutics*. 13 (2021) 1661. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101661>.
- [13] W.R. Hagen (Ed.), *Biomolecular EPR spectroscopy*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2009.
- [14] A. Vesković, Đ. Nakarada, A. Pavićević, B. Prokić, M. Perović, S. Kanazir, A. Popović-Bijelić, M. Mojović, In vivo/ex vivo EPR investigation of the brain redox status and blood-brain barrier integrity in the 5xFAD mouse model of Alzheimer’s disease, *Curr. Alzheimer Res.* 18 (2021) 25–34. <https://doi.org/10.2174/1567205018666210324121156>.
- [15] J. Wilhelm, H. Fuksová, Z. Schwippelová, R. Vytásek, A. Pichová, The effects of reactive oxygen and nitrogen species during yeast replicative ageing, *BioFactors*. 27 (2006) 185–193. <https://doi.org/10.1002/biof.5520270116>.
- [16] A. Acharya, I. Das, D. Chandhok, T. Saha, Redox Regulation in Cancer: A double-edged sword with therapeutic potential, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 3 (2010) 23–34. <https://doi.org/10.4161/oxim.3.1.10095>.
- [17] X. Chen, S.T.C. Wong, Cancer theranostics: an introduction, in: X. Chen, S. T. C. Wong (Eds.), *Cancer Theranostics*, Academic Press, Cambridge, MA, USA, 2014. pp. 3–8.
- [18] Q. Chai, Y. Jiao, X. Yu, Hydrogels for biomedical applications: their characteristics and the mechanisms behind them, *Gels*. 3 (2017) 6. <https://doi.org/10.3390/gels3010006>.
- [19] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J. Adv. Res.*

- 6 (2015) 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
- [20] E. Caló, V. V. Khutoryanskiy, Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products, *Eur. Polym. J.* 65 (2015) 252–267. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>.
- [21] S. Tavakoli, A.S. Klar, Advanced hydrogels as wound dressings, *Biomolecules*. 10 (2020) 1–20. <https://doi.org/10.3390/biom10081169>.
- [22] H.-Y. Shen, Z.-H. Liu, J.-S. Hong, M.-S. Wu, S.-J. Shiue, H.-Y. Lin, Controlled-release of free bacteriophage nanoparticles from 3D-plotted hydrogel fibrous structure as potential antibacterial wound dressing, *J. Control. Release*. 331 (2021) 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.01.024>.
- [23] K.Y. Lee, D.J. Mooney, Hydrogels for tissue engineering, *Chem. Rev.* 101 (2001) 1869–1879. <https://doi.org/10.1021/cr000108x>.
- [24] R. Censi, P. Di Martino, T. Vermonden, W.E. Hennink, Hydrogels for protein delivery in tissue engineering, *J. Control. Release*. 161 (2012) 680–692. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.002>.
- [25] C. He, S.W. Kim, D.S. Lee, In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery, *J. Control. Release*. 127 (2008) 189–207. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.01.005>.
- [26] R. Narayanaswamy, V.P. Torchilin, Hydrogels and their applications in targeted drug delivery, *Molecules*. 24 (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24030603>.
- [27] S. Bashir, M. Hina, J. Iqbal, A.H. Rajpar, M.A. Mujtaba, N.A. Alghamdi, S. Wageh, K. Ramesh, S. Ramesh, Fundamental concepts of hydrogels: Synthesis, properties, and their applications, *Polymers (Basel)*. 12 (2020) 1–60. <https://doi.org/10.3390/polym12112702>.
- [28] N.A. Peppas, B.V. Slaughter, M.A. Kanelberger, Hydrogels, in: M. Moeller, K. Matyjaszewski (Eds.), *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands, 2012. pp. 385–395.
- [29] T.-C. Ho, C.-C. Chang, H.-P. Chan, T.-W. Chung, C.-W. Shu, K.-P. Chuang, T.-H. Duh, M.-H. Yang, Y.-C. Tyan, Hydrogels: properties and applications in biomedicine, *Molecules*. 27 (2022) 2902. <https://doi.org/10.3390/molecules27092902>.
- [30] S.J. Buwalda, K.W.M. Boere, P.J. Dijkstra, J. Feijen, T. Vermonden, W.E. Hennink, Hydrogels in a historical perspective: from simple networks to smart materials, *J. Control. Release*. 190 (2014) 254–273. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.052>.
- [31] J.M. Yang, O.S. Olanrele, X. Zhang, C.C. Hsu, Fabrication of hydrogel materials for biomedical applications, *Adv. Exp. Med. Biol.* 1077 (2018) 197–224. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2_12.
- [32] J. Maitra, V.K. Shukla, Cross-linking in hydrogels - a review, *Am. J. Polym. Sci.* 4 (2014) 25–31. <https://doi.org/10.5923/j.ajps.20140402.01>.
- [33] S. Ida, Structural design of vinyl polymer hydrogels utilizing precision radical polymerization, *Polym. J.* 51 (2019) 803–812. <https://doi.org/10.1038/s41428-019-0204-5>.
- [34] M.A. Raza, J.O. Jeong, S.H. Park, State-of-the-art irradiation technology for polymeric hydrogel fabrication and application in drug release system, *Front. Mater.* 8 (2021) 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmats.2021.769436>.
- [35] W. Hu, Z. Wang, Y. Xiao, S. Zhang, J. Wang, Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels, *Biomater. Sci.* 7 (2019) 843–855. <https://doi.org/10.1039/c8bm01246f>.
- [36] J. Omar, D. Ponsford, C.A. Dreiss, T. Lee, X.J. Loh, Supramolecular hydrogels: design strategies and contemporary biomedical applications, *Chem. – An Asian J.* 17 (2022). <https://doi.org/10.1002/asia.202200081>.
- [37] B. Pramanik, S. Ahmed, Peptide-based low molecular weight photosensitive supramolecular gelators, *Gels*. 8 (2022) 533. <https://doi.org/10.3390/gels8090533>.
- [38] S. Vasiliu, S. Racovita, M. Popa, L. Ochiuz, C.A. Peptu, Chitosan-based polyelectrolyte complex hydrogels for biomedical applications, in: Md. I.H. Mondal (Ed.), *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*, Springer Nature, Cham, Switzerland 2019. pp. 1695–1725.

- [39] M.C. Catoira, L. Fusaro, D. Di Francesco, M. Ramella, F. Boccafoschi, Overview of natural hydrogels for regenerative medicine applications, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 30 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6318-7>.
- [40] G. Navarra, C. Peres, M. Contardi, P. Picone, P.L. San Biagio, M. Di Carlo, D. Giacomazza, V. Militello, Heat- and pH-induced BSA conformational changes, hydrogel formation and application as 3D cell scaffold, *Arch. Biochem. Biophys.* 606 (2016) 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.07.020>.
- [41] J.I. Boye, I. Alli, A.A. Ismail, Interactions involved in the gelation of bovine serum albumin, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 996–1004. <https://doi.org/10.1021/jf950529t>.
- [42] J. Ong, J. Zhao, A.W. Justin, A.E. Markaki, Albumin-based hydrogels for regenerative engineering and cell transplantation, *Biotechnol. Bioeng.* 116 (2019) 3457–3468. <https://doi.org/10.1002/bit.27167>.
- [43] K. Baler, R. Michael, I. Szleifer, G.A. Ameer, Albumin hydrogels formed by electrostatically triggered self-assembly and their drug delivery capability, *Biomacromolecules.* 15 (2014) 3625–3633. <https://doi.org/10.1021/bm500883h>.
- [44] N. Amdursky, M.M. Mazo, M.R. Thomas, E.J. Humphrey, J.L. Puetzer, J.P. St-Pierre, S.C. Skaalure, R.M. Richardson, C.M. Terracciano, M.M. Stevens, Elastic serum-albumin based hydrogels: mechanism of formation and application in cardiac tissue engineering, *J. Mater. Chem. B.* 6 (2018) 5604–5612. <https://doi.org/10.1039/c8tb01014e>.
- [45] S.H. Arabi, B. Aghelnejad, C. Schwieger, A. Meister, A. Kerth, D. Hinderberger, Serum albumin hydrogels in broad pH and temperature ranges: characterization of their self-assembled structures and nanoscopic and macroscopic properties, *Biomater. Sci.* 6 (2018) 478–492. <https://doi.org/10.1039/c7bm00820a>.
- [46] S.T.K. Raja, T. Thiruselvi, A.B. Mandal, A. Gnanamani, pH and redox sensitive albumin hydrogel: a self-derived biomaterial, *Sci. Rep.* 5 (2015) 15977. <https://doi.org/10.1038/srep15977>.
- [47] Y. Sun, Y. Huang, Disulfide-crosslinked albumin hydrogels, *J. Mater. Chem. B.* 4 (2016) 2768–2775. <https://doi.org/10.1039/C6TB00247A>.
- [48] A. Upadhyay, R. Kandi, C.P. Rao, Injectable, self-healing, and stress sustainable hydrogel of BSA as a functional biocompatible material for controlled drug delivery in cancer cells, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6 (2018) 3321–3330. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03485>.
- [49] X. Ma, X. Sun, D. Hargrove, J. Chen, D. Song, Q. Dong, X. Lu, T.-H. Fan, Y. Fu, Y. Lei, A biocompatible and biodegradable protein hydrogel with green and red autofluorescence: preparation, characterization and in vivo biodegradation tracking and modeling, *Sci. Rep.* 6 (2016) 19370. <https://doi.org/10.1038/srep19370>.
- [50] I. Kim, J.S. Choi, S. Lee, H.J. Byeon, E.S. Lee, B.S. Shin, H.-G. Choi, K.C. Lee, Y.S. Youn, In situ facile-forming PEG cross-linked albumin hydrogels loaded with an apoptotic TRAIL protein, *J. Control. Release.* 214 (2015) 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.07.012>.
- [51] P. Zhang, F. Sun, S. Liu, S. Jiang, Anti-PEG antibodies in the clinic: Current issues and beyond PEGylation, *J. Control. Release.* 244 (2016) 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.040>.
- [52] J.C. Gayet, G. Fortier, High water content BSA-PEG hydrogel for controlled release device: Evaluation of the drug release properties, *J. Control. Release.* 38 (1996) 177–184. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(95\)00118-2](https://doi.org/10.1016/0168-3659(95)00118-2).
- [53] S. Peers, A. Montembault, C. Ladavière, Chitosan hydrogels for sustained drug delivery, *J. Control. Release.* 326 (2020) 150–163. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.012>.
- [54] M.S. Rehmann, K.M. Skeens, P.M. Kharkar, E.M. Ford, E. Maverakis, K.H. Lee, A.M. Kloxin, Tuning and predicting mesh size and protein release from step growth hydrogels, *Biomacromolecules.* 18 (2017) 3131–3142. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00781>.
- [55] N.R. Richbourg, N.A. Peppas, The swollen polymer network hypothesis: Quantitative models of hydrogel swelling, stiffness, and solute transport, *Prog. Polym. Sci.* 105 (2020) 101243. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2020.101243>.

- [56] N.R. Richbourg, M. Wancura, A.E. Gilchrist, S. Toubbeh, B.A.C. Harley, E. Cosgriff-Hernandez, N.A. Peppas, Precise control of synthetic hydrogel network structure via linear, independent synthesis-swelling relationships, *Sci. Adv.* 7 (2021). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe3245>.
- [57] F. Brandl, F. Kastner, R.M. Gschwind, T. Blunk, J. Teßmar, A. Göpferich, Hydrogel-based drug delivery systems: Comparison of drug diffusivity and release kinetics, *J. Control. Release.* 142 (2010) 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.030>.
- [58] T. Canal, N.A. Peppas, Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric networks, *J. Biomed. Mater. Res.* 23 (1989) 1183–1193. <https://doi.org/10.1002/jbm.820231007>.
- [59] B.R. Denzer, R.J. Kulchar, R.B. Huang, J. Patterson, Advanced methods for the characterization of supramolecular hydrogels, *Gels.* 7 (2021) 1–29. <https://doi.org/10.3390/gels7040158>.
- [60] V.S. Raghuwanshi, G. Garnier, Characterisation of hydrogels: Linking the nano to the microscale, *Adv. Colloid Interface Sci.* 274 (2019) 102044. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102044>.
- [61] Z. Kaberova, E. Karpushkin, M. Nevoralová, M. Vetrík, M. Šlouf, M. Dušková-Smrcková, Microscopic structure of swollen hydrogels by scanning electron and light microscopies: artifacts and reality, *Polymers (Basel)*. 12 (2020). <https://doi.org/10.3390/polym12030578>.
- [62] F.D. Martinez-Garcia, T. Fischer, A. Hayn, C.T. Mierke, J.K. Burgess, M.C. Harmsen, A beginner's guide to the characterization of hydrogel microarchitecture for cellular applications, *Gels.* 8 (2022) 1–20. <https://doi.org/10.3390/gels8090535>.
- [63] S.N. Park, J.C. Park, H.O. Kim, M.J. Song, H. Suh, Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linking, *Biomaterials.* 23 (2002) 1205–1212. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00235-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00235-6).
- [64] C. Marmorat, A. Arinstein, N. Koifman, Y. Talmon, E. Zussman, M. Rafailovich, Cryo-imaging of hydrogels supermolecular structure, *Sci. Rep.* 6 (2016) 6–11. <https://doi.org/10.1038/srep25495>.
- [65] M. Koch, M.K. Włodarczyk-Biegun, Faithful scanning electron microscopic (SEM) visualization of 3D printed alginate-based scaffolds, *Bioprinting.* 20 (2020) e00098. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00098>.
- [66] J. Joshi, S.V. Homburg, A. Ehrmann, Atomic force microscopy (AFM) on biopolymers and hydrogels for biotechnological applications – possibilities and limits, *Polymers (Basel)*. 14 (2022) 1267. <https://doi.org/10.3390/polym14061267>.
- [67] T.M. Alam, K.K. Childress, V. Pastoor, C. V. Rice, Characterization of free, restricted, and entrapped water environments in poly(N-isopropyl acrylamide) hydrogels via 1H HRMAS PFG NMR spectroscopy, *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* 52 (2014) 1521–1527. <https://doi.org/10.1002/polb.23591>.
- [68] U. Mikac, A. Sepe, A. Gradišek, J. Kristl, T. Apih, Dynamics of water and xanthan chains in hydrogels studied by NMR relaxometry and their influence on drug release, *Int. J. Pharm.* 563 (2019) 373–383. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.014>.
- [69] W. Li, F. Xue, R. Cheng, States of water in partially swollen poly(vinyl alcohol) hydrogels, *Polymer (Guildf)*. 46 (2005) 12026–12031. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.09.016>.
- [70] R. Yudianti, M. Karina, M. Sakamoto, J.I. Azuma, DSC analysis on water state of salvia hydrogels, *Macromol. Res.* 17 (2009) 1015–1020. <https://doi.org/10.1007/BF03218650>.
- [71] J.W. Lee, S.Y. Kim, S.S. Kim, Y.M. Lee, K.H. Lee, S.J. Kim, Synthesis and characteristics of interpenetrating polymer network hydrogel composed of chitosan and poly(acrylic acid), *J. Appl. Polym. Sci.* 73 (1999) 113–120. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19990705\)73:1<113::AID-APP13>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19990705)73:1<113::AID-APP13>3.0.CO;2-D).
- [72] S.J. Kim, S.J. Park, S.I. Kim, Swelling behavior of interpenetrating polymer network hydrogels composed of poly(vinyl alcohol) and chitosan, *React. Funct. Polym.* 55 (2003) 53–59.

[https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(02\)00214-6](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(02)00214-6).

- [73] B. Sierra-Martín, M.S. Romero-Cano, T. Cosgrove, B. Vincent, A. Fernández-Barbero, Solvent relaxation of swelling PNIPAM microgels by NMR, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 270–271 (2005) 296–300. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2005.06.044>.
- [74] S.J. Kim, C.K. Lee, S.I. Kim, Characterization of the water state of hyaluronic acid and poly(vinyl alcohol) interpenetrating polymer networks, *J. Appl. Polym. Sci.* 92 (2004) 1467–1472. <https://doi.org/10.1002/app.13717>.
- [75] I. Gupta, R.S. Tomar, A.K. Nagpal, R. Singhal, Synthesis and characterization of poly(AAm-co-BMA-co-AAc) hydrogels: Effect of acrylamide content on swelling behaviour, *Des. Monomers Polym.* 9 (2006) 589–605. <https://doi.org/10.1163/156855506778943993>.
- [76] C. Chang, M. He, J. Zhou, L. Zhang, Swelling behaviors of pH- and salt-responsive cellulose-based hydrogels, *Macromolecules.* 44 (2011) 1642–1648. <https://doi.org/10.1021/ma102801f>.
- [77] M. Huglin, D. Yip, An alternative method of determining the water content of hydrogels, *Die Makromol. Chemie. Rapid Commun.* 8 (1987) 237–242. <https://doi.org/10.1002/marc.1987.030080506>.
- [78] G.M.B. Tiguman, I. Ermolina, Evaluation of water properties in HEA–HEMA hydrogels swollen in aqueous-PEG solutions using thermoanalytical techniques, *J. Therm. Anal. Calorim.* (2015) 335–345. <https://doi.org/10.1007/s10973-015-4446-y>.
- [79] K.M. Salikhov, N.E. Zavoiskaya, Zavoisky and the discovery of EPR, *Resonance.* 20 (2015) 963–968. <https://doi.org/10.1007/s12045-015-0264-6>.
- [80] V.V. Ptushenko, N.E. Zavoiskaya, EPR in the USSR: the thorny path from birth to biological and chemical applications, *Photosynth. Res.* 134 (2017) 133–147. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0432-5>.
- [81] L.J. Berliner, The evolution of biomedical EPR (ESR), *Biomed. Spectrosc. Imaging.* 5 (2017) 5–26. <https://doi.org/10.3233/BSI-150128>.
- [82] J.H. Golbeck, A. van der Est, Electron paramagnetic resonance spectroscopy, in: N. Allewell, L. O. Narhi, I. Rayment (Eds.), *Molecular Biophysics for the Life Sciences*, Springer Science & Business Media, New York, NY, USA, 2013. pp. 175–213.
- [83] A. Popović-Bijelić, M. Mojović, *Praktikum iz biofizičke hemije*, Univerzitet u Beogradu – Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, Srbija, 2017.
- [84] J.A.Weil, J.R.Bolton, *Electron Paramagnetic Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2007.
- [85] G.R. Eaton, S.S. Eaton, D.P. Barr, R.T. Weber, *Quantitative EPR*, Springer-Verlag/Wien, Germany, 2010.
- [86] C. Corvaja, Introduction to electron paramagnetic resonance, in: M. Brustolon, E. Giamello (Eds.), *Electron Paramagnetic Resonance: A Practitioner's Toolkit*, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, USA, 2009. pp. 3–35.
- [87] N. Kocherginsky, H.M. Swartz, *Nitroxide Spin Labels. Reactions in Biology and Chemistry*, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, USA, 1995.
- [88] F. Gerson, W. Huber, *Electron Spin Resonance Spectroscopy of Organic Radicals*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2003.
- [89] P.H. Rieger, *Electron Spin Resonance: Analysis and Interpretation*, RCS Publishing, Cambridge, UK, 2007.
- [90] P. Höfer, Basic experimental methods in continuous wave electron paramagnetic resonance, in: M. Brustolon, E. Giamello (Eds.), *Electron Paramagnetic Resonance: A Practitioner's Toolkit*, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, USA, 2009. pp. 37–82.
- [91] M.G. Krishna, N. Devasahayam, J.A. Cook, S. Subramanian, P. Kuppusamy, J.B. Mitchell, Electron paramagnetic resonance for small animal imaging applications, *ILAR J.* 42 (2001) 209–218. <https://doi.org/10.1093/ilar.42.3.209>.
- [92] E. Bordignon, EPR spectroscopy of nitroxide spin probes, 6 (2017) 235–254. <https://doi.org/10.1002/9780470034590.emrstm1513>.

- [93] A.K. Hoffmann, A.T. Henderson, A new stable free radical: di-*t*-butylnitroxide, *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) 4671–4672. <https://doi.org/10.1021/ja01483a048>.
- [94] A.R. Forrester, R.H. Thomson, Stable nitroxide radicals, *Nature*. 203 (1964) 74–75. <https://doi.org/10.1038/203074a0>.
- [95] S.K. Misra (Ed.) *Introduction to EPR: Multifrequency Electron Paramagnetic Resonance, Theory and Applications*, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2011. Ch. 1.
- [96] N. Babić, F. Peyrot, Molecular probes for evaluation of oxidative stress by in vivo EPR spectroscopy and imaging: state-of-the-art and limitations, (2019) 1–21. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry5010013>.
- [97] A.A. Bobko, T.D. Eubank, J.L. Voorhees, O. V. Efimova, I.A. Kirilyuk, S. Petryakov, D.G. Trofimov, C.B. Marsh, J.L. Zweier, I.A. Grigor'Ev, A. Samouilov, V.V. Khramtsov, In vivo monitoring of pH, redox status, and glutathione using L-band EPR for assessment of therapeutic effectiveness in solid tumors, *Magn. Reson. Med.* 67 (2012) 1827–1836. <https://doi.org/10.1002/mrm.23196>.
- [98] J. Yamauchi, Molecular magnetism, in: G.I. Likhtenshtein, J. Yamauchi, S. Nakatsuji, A.I. Smirnov, R. Tamura (Eds.), *Nitroxides: Applications in Chemistry, Biomedicine, and Materials Science*. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2008.
- [99] H. Karoui, F. Le Moigne, O. Ouari, P. Tordo, Nitroxide radicals – properties, synthesis and applications, in: R. G. Hicks (Ed.), *Stable radicals: Fundamentals and Applied Aspects of Odd-Electron Compounds*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 2010. pp. 173–229.
- [100] G. Bačić, A. Pavićević, F. Peyrot, In vivo evaluation of different alterations of redox status by studying pharmacokinetics of nitroxides using magnetic resonance techniques, *Redox Biol.* 8 (2016) 226–242. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.10.007>.
- [101] H.M. Swartz, M. Sentjurc, P.D. Morse, Cellular metabolism of water-soluble nitroxides: Effect on rate of reduction of cell/nitroxide ratio, oxygen concentrations and permeability of nitroxides, *BBA - Mol. Cell Res.* 888 (1986) 82–90. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(86\)90073-X](https://doi.org/10.1016/0167-4889(86)90073-X).
- [102] V. Meenakumari, A. Jawahar, A.M.F. Benial, Comparative study of the reduction process of different ring structured nitroxyl spin probes: an electron spin resonance study, *Eur. Biophys. J.* 4 (2016) 8–15. <https://doi.org/10.11648/j.ejb.20160402.11>.
- [103] H. Li, G. He, Y. Deng, P. Kuppasamy, J.L. Zweier, In vivo proton electron double resonance imaging of the distribution and clearance of nitroxide radicals in mice, *Magn. Reson. Med.* 55 (2006) 669–675. <https://doi.org/10.1002/mrm.20804>.
- [104] R. Zhang, S. Goldstein, A. Samuni, Kinetics of superoxide-induced exchange among nitroxide antioxidants and their oxidized and reduced forms, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1245–1252. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00328-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00328-1).
- [105] T. Uchida, H. Togashi, Y. Kuroda, K. Haga, M. Sadahiro, T. Kayama, In vivo visualization of redox status by high-resolution whole body magnetic resonance imaging using nitroxide radicals, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 63 (2018) 192–196. <https://doi.org/10.3164/jcfn.18-18>.
- [106] K. Matsumoto, F. Hyodo, A. Matsumoto, A.P. Koretsky, A.L. Sowers, J.B. Mitchell, M.C. Krishna, High-resolution mapping of tumor redox status by magnetic resonance imaging using nitroxides as redox-sensitive contrast agents, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 2455–2462. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2747>.
- [107] K. Takeshita, A. Hamada, H. Utsumi, Mechanisms related to reduction of radical in mouse lung using an L-band ESR spectrometer, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 951–960. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00278-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00278-0).
- [108] A. Iannone, H. Hu, A. Tomasi, V. Vannini, H.M. Swartz, Metabolism of aqueous soluble nitroxides in hepatocytes: effects of cell integrity, oxygen, and structure of nitroxides, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 991 (1989) 90–96. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(89\)90033-0](https://doi.org/10.1016/0304-4165(89)90033-0).
- [109] K. Takeshita, T. Ozawa, Recent progress in in vivo ESR spectroscopy, *J. Radiat. Res.* 45

- (2004) 373–384. <https://doi.org/10.1269/jrr.45.373>.
- [110] N. Nishino, H. Yasui, H. Sakurai, In vivo L-band ESR and quantitative pharmacokinetic analysis of stable spin probes in rats and mice, *Free Radic. Res.* 31 (1999) 35–51. <https://doi.org/10.1080/10715769900300581>.
- [111] Z. Zhelev, V. Gadjeva, I. Aoki, R. Bakalova, T. Saga, Cell-penetrating nitroxides as molecular sensors for imaging of cancer in vivo, based on tissue redox activity, *Mol. Biosyst.* 8 (2012) 2733–2740. <https://doi.org/10.1039/c2mb25128k>.
- [112] H. Zhang, 3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidiny-N-oxyl, in: *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*, National Center for Biotechnology Information (US); 2004–2013, Bethesda (MD), 2008.
- [113] K. Ichikawa, Y. Sato, H. Kondo, H. Utsumi, An ESR contrast agent is transported to rat liver through organic anion transporter, 40 (2006) 403–408. <https://doi.org/10.1080/10715760600563542>.
- [114] R. Bartucci, Spin-labeling EPR of lipid membranes, in: *Encyclopedia of Biophysics*, Springer Berlin, Heidelberg, Germany, 2013. pp. 2431–2439.
- [115] G.R. Eaton, S.S. Eaton, K. Ohno (Eds.), *EPR Imaging and In Vivo EPR*, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 2018.
- [116] G.R. Eaton, S.S. Eaton, Introduction to EPR imaging using magnetic-field gradients, *Concepts Magn. Reson.* 7 (1995) 49–67. <https://doi.org/10.1002/cmr.1820070104>.
- [117] P. Kuppusamy, M. Chzhan, K. Vij, M. Shteynbuk, D.J. Lefer, E. Giannella, J.L. Zweier, Three-dimensional spectral-spatial EPR imaging of free radicals in the heart: a technique for imaging tissue metabolism and oxygenation., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 (1994) 3388–3392. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3388>.
- [118] P. Kuppusamy, M. Afeworki, R.A. Shankar, D. Coffin, M.C. Krishna, S.M. Hahn, J.B. Mitchell, J.L. Zweier, In vivo electron paramagnetic resonance imaging of tumor heterogeneity and oxygenation in a murine model, *Cancer Res.* 58 (1998) 1562–1568.
- [119] P. Kuppusamy, R.A. Shankar, J.L. Zweier, In vivo measurement of arterial and venous oxygenation in the rat using 3D spectral-spatial electron paramagnetic resonance imaging, *Phys. Med. Biol.* 43 (1998) 1837–1844. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/43/7/003>.
- [120] H.M. Swartz, H. Hou, N. Khan, L.A. Jarvis, E.Y. Chen, B.B. Williams, P. Kuppusamy, Advances in probes and methods for clinical EPR oximetry, *Adv. Exp. Med. Biol.* 812 (2014) 73–79. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0620-8_10.
- [121] P.E. Schaner, B.B. Williams, E.Y. Chen, J.R. Pettus, W.A. Schreiber, M.M. Kmiec, L.A. Jarvis, D.A. Pastel, R.A. Zuurbier, R.M. DiFlorio-Alexander, J.A. Paydarfar, B.J. Gosselin, R.J. Barth, K.M. Rosenkranz, S. V. Petryakov, H. Hou, D. Tse, A. Pletnev, A.B. Flood, V.A. Wood, K.A. Hebert, R.E. Mosher, E. Demidenko, H.M. Swartz, P. Kuppusamy, First-in-human study in cancer patients establishing the feasibility of oxygen measurements in tumors using electron paramagnetic resonance with the OxyChip, *Front. Oncol.* 11 (2021). <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.743256>.
- [122] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: Cancer J. Clin.* 71 (2021) 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- [123] S. Sarkar, G. Horn, K. Moulton, A. Oza, S. Byler, S. Kokolus, M. Longacre, Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 21087–21113. <https://doi.org/10.3390/ijms141021087>.
- [124] G.M. Cooper, *The Cell: A Molecular Approach*, 2nd ed., Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA, 2000. Ch.15.
- [125] D. Weller, P. Vedsted, G. Rubin, F.M. Walter, J. Emery, S. Scott, C. Campbell, R.S. Andersen, W. Hamilton, F. Olesen, P. Rose, S. Nafees, E. Van Rijswijk, S. Hiom, C. Muth, M. Beyer, R.D. Neal, The Aarhus statement: improving design and reporting of studies on early cancer diagnosis, *Br. J. Cancer.* 106 (2012) 1262–1267. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.68>.

- [126] F.M. Walter, M.J. Thompson, I. Wellwood, G.A. Abel, W. Hamilton, M. Johnson, G. Lyratzopoulos, M.P. Messenger, R.D. Neal, G. Rubin, H. Singh, A. Spencer, S. Sutton, P. Vedsted, J.D. Emery, Evaluating diagnostic strategies for early detection of cancer: the CanTest framework, *BMC Cancer*. 19 (2019) 586. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5746-6>.
- [127] L. Fass, Imaging and cancer: A review, *Mol. Oncol.* 2 (2008) 115–152. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2008.04.001>.
- [128] T. Beyer, L. Bidaut, J. Dickson, M. Kachelriess, F. Kiessling, R. Leitgeb, J. Ma, L.K. Shiyam Sundar, B. Theek, O. Mawlawi, What scans we will read: imaging instrumentation trends in clinical oncology, *Cancer Imaging*. 20 (2020) 1–38. <https://doi.org/10.1186/s40644-020-00312-3>.
- [129] R. Vaidyanathan, R.H. Soon, P. Zhang, K. Jiang, C.T. Lim, Cancer diagnosis: from tumor to liquid biopsy and beyond, *Lab Chip*. (2018). <https://doi.org/10.1039/C8LC00684A>.
- [130] T. Hussain, Q.T. Nguyen, Molecular imaging for cancer diagnosis and surgery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 66 (2014) 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.007>.
- [131] E. Mittra, A. Quon, Positron emission tomography/computed tomography: the current technology and applications, *Radiol. Clin. North Am.* 47 (2009) 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2008.10.005>.
- [132] D. Shahbazi-Gahrouei, P. Khaniabadi, B. Khaniabadi, S. Shahbazi-Gahrouei, Medical imaging modalities using nanoprobe for cancer diagnosis: A literature review on recent findings, *J. Res. Med. Sci.* 24 (2019) 38. https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS_437_18.
- [133] H. Jadvar, P.M. Colletti, R. Delgado-Bolton, G. Esposito, B.J. Krause, A.H. Iagaru, H. Nadel, D.I. Quinn, E. Rohren, R.M. Subramaniam, K. Zukotynski, J. Kauffman, S. Ahuja, L. Griffith, Appropriate use criteria for 18 F-FDG PET/CT in restaging and treatment response assessment of malignant disease, *J. Nucl. Med.* 58 (2017) 2026–2037. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.197988>.
- [134] T.A. Hope, Z. Kassam, A. Loening, M.M. McNamara, R. Paspulati, The use of PET/MRI for imaging rectal cancer, *Abdom. Radiol.* 44 (2019) 3559–3568. <https://doi.org/10.1007/s00261-019-02089-x>.
- [135] J.F.G. Marin, R.F. Nunes, A.M. Coutinho, E.C. Zaniboni, L.B. Costa, F.G. Barbosa, M.A. Queiroz, G.G. Cerri, C.A. Buchpiguel, Theranostics in nuclear medicine: Emerging and re-emerging integrated imaging and therapies in the era of precision oncology, *Radiographics*. 40 (2020) 1715–1740. <https://doi.org/10.1148/rg.2020200021>.
- [136] B. Brito, T.W. Price, J. Gallo, M. Bañobre-López, G.J. Stasiuk, Smart magnetic resonance imaging-based theranostics for cancer, *Theranostics*. 11 (2021) 8706–8737. <https://doi.org/10.7150/thno.57004>.
- [137] N.K. Jain, B.M. Chathoth, V.S. Bhaskar, H. Meena, R. Prasad, R. Srivastava, Nanoengineered photoactive theranostic agents for cancer, *Nanophotonics*. 10 (2021) 2973–2997. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2021-0205>.
- [138] Z. Abbas, S. Rehman, An overview of cancer treatment modalities, in: H.N. Shahzad (Ed.), *Neoplasm*, IntechOpen, London, UK, 2018.
- [139] E. Dickens, Principles of cancer treatment by chemotherapy, *Surgery*. 36 (2017) 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.12.002>.
- [140] R. Oun, Y.E. Moussa, N.J. Wheate, The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists, *Dalt. Trans.* 47 (2018) 6645–6653. <https://doi.org/10.1039/c8dt00838h>.
- [141] M.J. Meegan, N.M. O’Boyle, Special issue "Anticancer drugs", *Pharmaceuticals*. 12 (2019). <https://doi.org/10.3390/ph12030134>.
- [142] K. Bukowski, M. Kciuk, R. Kontek, Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 3233. <https://doi.org/10.3390/ijms21093233>.
- [143] H. Hochegger, S. Takeda, T. Hunt, Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2008) 910–916. <https://doi.org/10.1038/nrm2510>.
- [144] D.W. Zaharevitz, R. Gussio, M. Leost, A.M. Senderowicz, T. Lahusen, C. Kunick, L. Meijer,

- E.A. Sausville, Discovery and initial characterization of the paullones, a novel class of small-molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases, *Cancer Res.* 59 (1999) 2566–2569. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10363974>.
- [145] M. Leost, C. Schultz, A. Link, Y.-Z. Wu, J. Biernat, E.-M. Mandelkow, J.A. Bibb, G.L. Snyder, P. Greengard, D.W. Zaharevitz, R. Gussio, A.M. Senderowicz, E.A. Sausville, C. Kunick, L. Meijer, Paullones are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β and cyclin-dependent kinase 5/p25, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 5983–5994. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01673.x>.
- [146] I. Sahin, A. Eturi, A. De Souza, S. Pamarthy, F. Tavora, F.J. Giles, B.A. Carneiro, Glycogen synthase kinase-3 beta inhibitors as novel cancer treatments and modulators of antitumor immune responses, *Cancer Biol. Ther.* 20 (2019) 1047–1056. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1595283>.
- [147] V.B. Arion, A. Dobrov, S. Göschl, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, P. Rapta, Ruthenium- and osmium-arene-based paullones bearing a TEMPO free-radical unit as potential anticancer drugs, *Chem. Commun.* 48 (2012) 8559. <https://doi.org/10.1039/c2cc33786j>.
- [148] A. Dobrov, S. Göschl, M.A. Jakupec, A. Popović-Bijelić, A. Gräslund, P. Rapta, V.B. Arion, A highly cytotoxic modified paullone ligand bearing a TEMPO free-radical unit and its copper(II) complex as potential hR2 RNR inhibitors, *Chem. Commun.* 49 (2013) 10007. <https://doi.org/10.1039/c3cc45743e>.
- [149] H. Eklund, U. Uhlin, M. Färnegårdh, D.T. Logan, P. Nordlund, Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 77 (2001) 177–268. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(01\)00014-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(01)00014-1).
- [150] A. Popović-Bijelić, C.R. Kowol, M.E.S. Lind, J. Luo, F. Himo, É.A. Enyedy, V.B. Arion, A. Gräslund, Ribonucleotide reductase inhibition by metal complexes of Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone): a combined experimental and theoretical study, *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 1422–1431. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.07.003>.
- [151] M. Högbom, M. Galander, M. Andersson, M. Kolberg, W. Hofbauer, G. Lassmann, P. Nordlund, F. Lendzian, Displacement of the tyrosyl radical cofactor in ribonucleotide reductase obtained by single-crystal high-field EPR and 1.4-Å x-ray data, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 3209–3214. <https://doi.org/10.1073/pnas.0536684100>.
- [152] M. Lewandowski, K. Gwozdziński, Nitroxides as antioxidants and anticancer drugs, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 2490. <https://doi.org/10.3390/ijms18112490>.
- [153] Y. Luo, X. Yin, X. Yin, A. Chen, L. Zhao, G. Zhang, W. Liao, X. Huang, J. Li, C.Y. Zhang, Dual ph/redox-responsive mixed polymeric micelles for anticancer drug delivery and controlled release, *Pharmaceutics.* 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040176>.
- [154] B.M. Dicheva, T.L.M. Ten Hagen, D. Schipper, A.L.B. Seynhaeve, G.C. Van Rhoon, A.M.M. Eggermont, G.A. Koning, Targeted and heat-triggered doxorubicin delivery to tumors by dual targeted cationic thermosensitive liposomes, *J. Control. Release.* 195 (2014) 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.058>.
- [155] Z. Guo, J. Sui, M. Ma, J. Hu, Y. Sun, L. Yang, Y. Fan, X. Zhang, pH-responsive charge switchable PEGylated ϵ -poly-l-lysine polymeric nanoparticles-assisted combination therapy for improving breast cancer treatment, *J. Control. Release.* 326 (2020) 350–364. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.030>.
- [156] G. Cirillo, U.G. Spizzirri, M. Curcio, F.P. Nicoletta, F. Iemma, Injectable hydrogels for cancer therapy over the last decade, *Pharmaceutics.* 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11090486>.
- [157] F. Esmaeili, R. Dinarvand, M.H. Ghahremani, M. Amini, H. Rouhani, N. Sepehri, S.N. Ostad, F. Atyabi, Docetaxel–albumin conjugates: preparation, in vitro evaluation and biodistribution studies, *J. Pharm. Sci.* 98 (2009) 2718–2730. <https://doi.org/10.1002/jps.21599>.
- [158] R.J. Melder, B.L. Osborn, T. Riccobene, P. Kanakaraj, P. Wei, G. Chen, D. Stelow, W.G.

- Halpern, T.S. Migone, Q. Wang, K.J. Grzegorzewski, G. Gallant, Pharmacokinetics and in vitro and in vivo anti-tumor response of an interleukin-2-human serum albumin fusion protein in mice, *Cancer Immunol. Immunother.* 54 (2005) 535–5475. <https://doi.org/10.1007/s00262-004-0624-7>.
- [159] R. Li, H. Yang, D. Jia, Q. Nie, H. Cai, Q. Fan, L. Wan, L. Li, X. Lu, Fusion to an albumin-binding domain with a high affinity for albumin extends the circulatory half-life and enhances the in vivo antitumor effects of human TRAIL, *J. Control. Release.* 228 (2016) 96–106. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.004>.
- [160] F. Kratz, R. Müller-Driver, I. Hofmann, J. Dreves, C. Unger, A novel macromolecular prodrug concept exploiting endogenous serum albumin as a drug carrier for cancer chemotherapy, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 1253–1256. <https://doi.org/10.1021/jm9905864>.
- [161] B. Schmid, D.E. Chung, A. Warnecke, I. Fichtner, F. Kratz, Albumin-binding prodrugs of camptothecin and doxorubicin with an Ala-Leu-Ala-Leu-linker that are cleaved by cathepsin B: synthesis and antitumor efficacy, *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 702–716. <https://doi.org/10.1021/bc0602735>.
- [162] A. Warnecke, F. Kratz, Maleimide-oligo(ethylene glycol) derivatives of camptothecin as albumin-binding prodrugs: synthesis and antitumor efficacy, *Bioconjug. Chem.* 14 (2003) 377–387. <https://doi.org/10.1021/bc0256289>.
- [163] J. Mayr, P. Heffeter, D. Groza, L. Galvez, G. Koellensperger, A. Roller, B. Alte, M. Haider, W. Berger, C.R. Kowol, B.K. Keppler, An albumin-based tumor-targeted oxaliplatin prodrug with distinctly improved anticancer activity in vivo, *Chem. Sci.* 8 (2017) 2241–2250. <https://doi.org/10.1039/c6sc03862j>.
- [164] I.N. Stepanenko, A. Casini, F. Edafe, M.S. Novak, V.B. Arion, P.J. Dyson, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, Conjugation of organoruthenium(II) 3-(1H-benzimidazol-2-yl)pyrazolo [3,4-b]pyridines and indolo[3,2-d]benzazepines to recombinant human serum albumin: a strategy to enhance cytotoxicity in cancer cells, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 12669–12679. <https://doi.org/10.1021/ic201801e>.
- [165] A. Ahsan, M.A. Farooq, A. Parveen, Thermosensitive chitosan-based injectable hydrogel as an efficient anticancer drug carrier, *ACS Omega.* 5 (2020) 20450–20460. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02548>.
- [166] B. Reig-Vano, B. Tylkowski, X. Montané, M. Giamberini, Alginate-based hydrogels for cancer therapy and research, *Int. J. Biol. Macromol.* 170 (2021) 424–436. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.161>.
- [167] X. Niu, Z. Zhang, Y. Zhong, Hydrogel loaded with self-assembled dextran sulfate-doxorubicin complexes as a delivery system for chemotherapy, *Mater. Sci. Eng. C.* 77 (2017) 888–894. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.04.013>.
- [168] M. Konishi, Y. Tabata, M. Kariya, A. Suzuki, M. Mandai, K. Nanbu, K. Takakura, S. Fujii, In vivo anti-tumor effect through the controlled release of cisplatin from biodegradable gelatin hydrogel, *J. Control. Release.* 92 (2003) 301–313. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(03\)00364-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(03)00364-X).
- [169] S. Curry, H. Mandelkow, P. Brick, N. Franks, Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites, *Nat. Struct. Biol.* 5 (1998) 827–835. <https://doi.org/10.1038/1869>.
- [170] A.M. Merlot, D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, Unraveling the mysteries of serum albumin – more than just a serum protein, *Front. Physiol.* 5 (2014). <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00299>.
- [171] G.J. Quinlan, G.S. Martin, T.W. Evans, Albumin: biochemical properties and therapeutic potential, *Hepatology.* 41 (2005) 1211–1219. <https://doi.org/10.1002/hep.20720>.
- [172] J.P. Nicholson, M.R. Wolmarans, G.R. Park, The role of albumin in critical illness, *Br. J. Anaesth.* 85 (2000) 599–610. <https://doi.org/10.1093/bja/85.4.599>.
- [173] T. Peters Jr., All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications, Academic Press, San Diego, CA, USA, 1995.

- [174] J.P. Doweiko, D.J. Nompleggi, Role of albumin in human physiology and pathophysiology, *J. Parenter. Enter. Nutr.* 15 (1991) 207–211. <https://doi.org/10.1177/0148607191015002207>.
- [175] M. Roche, P. Rondeau, N.R. Singh, E. Tarnus, E. Bourdon, The antioxidant properties of serum albumin, *FEBS Lett.* 582 (2008) 1783–1787. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.057>.
- [176] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, P. Ascenzi, Human serum albumin: from bench to bedside, *Mol. Aspects Med.* 33 (2012) 209–290. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002>.
- [177] X.M. He, D.C. Carter, Atomic structure and chemistry of human serum albumin, *Nature*. 358 (1992) 209–215. <https://doi.org/10.1038/358209a0>.
- [178] D.C. Carter, J.X. Ho, Structure of serum albumin, *Adv. Protein Chem.* 45 (1994) 153–176. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60640-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60640-3).
- [179] U. Kragh-Hansen, Human serum albumin: a multifunctional protein, in: M. Otagiri, V.T. Giam Chuang (Eds.), *Albumin in Medicine: Pathological and Clinical applications*, Springer Nature, London, UK, 2016. pp. 1–24.
- [180] A. Szkudlarek, J. Pożycka, K. Kulig, A. Owczarzy, W. Rogóż, M. Maciążek-Jurczyk, Changes in glycated human serum albumin binding affinity for losartan in the presence of fatty acids in vitro spectroscopic analysis, *Molecules*. 27 (2022) 401. <https://doi.org/10.3390/molecules27020401>.
- [181] J.R. Simard, P.A. Zunszain, J.A. Hamilton, S. Curry, Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis, *J. Mol. Biol.* 361 (2006) 336–351. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.028>.
- [182] G. De Simone, A. di Masi, P. Ascenzi, Serum albumin: a multifaced enzyme, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 10086. <https://doi.org/10.3390/ijms221810086>.
- [183] A.A. Bhattacharya, T. Grüne, S. Curry, Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin, *J. Mol. Biol.* 303 (2000) 721–732. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4158>.
- [184] M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari, P. Ascenzi, The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, *IUBMB Life*. 57 (2005) 787–796. <https://doi.org/10.1080/15216540500404093>.
- [185] I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, S. Twine, M. East, S. Curry, Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin. Anatomy of drug site I, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 22804–22809. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100575200>.
- [186] T. Hauenschild, J. Reichenwallner, V. Enkelmann, D. Hinderberger, Characterizing active pharmaceutical ingredient binding to human serum albumin by spin-labeling and EPR spectroscopy, *Chem. - A Eur. J.* 22 (2016) 12825–12838. <https://doi.org/10.1002/chem.201601810>.
- [187] B.X. Huang, H.-Y. Kim, C. Dass, Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 1237–1247. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.05.004>.
- [188] R.A. Campbel, I.D., Dwek, *Biological Spectroscopy*, Adison-Wesley, Wokingham, UK, 1884.
- [189] A. Vesković, Đ. Nakarada, A. Popović Bijelić, A novel methodology for hydrogel water content determination by EPR: The basis for real-time monitoring of controlled drug release and hydrogel swelling and degradation, *Polym. Test.* 98 (2021) 107187. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2021.107187>.
- [190] F. Montanari, S. Quici, H. Henry-Riyad, T.T. Tidwell, 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl, in: A. Charette, J. Bode, T. Rovis, R. Shenvi (Eds.), *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 2006.
- [191] S. Morris, G. Sosnovsky, B. Hui, C.O. Huber, N.U.M. Rao, H.M. Swartz, Chemical and electrochemical reduction rates of cyclic nitroxides (nitroxyls), *J. Pharm. Sci.* 80 (1991) 149–

152. <https://doi.org/10.1002/jps.2600800212>.
- [192] D. Marsh, Reaction fields and solvent dependence of the EPR parameters of nitroxides: The microenvironment of spin labels, *J. Magn. Reson.* 190 (2008) 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2007.10.004>.
- [193] K. Murayama, M. Tomida, Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochemistry.* 43 (2004) 11526–11532. <https://doi.org/10.1021/bi0489154>.
- [194] Y. Akdogan, M. Emrullahoglu, D. Tatlidil, M. Ucuncu, G. Cakan-Akdogan, EPR studies of intermolecular interactions and competitive binding of drugs in a drug–BSA binding model, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18 (2016) 22531–22539. <https://doi.org/10.1039/C6CP04137J>.
- [195] A. Vesković, Đ. Nakarada, O. Vasiljević, A. Dobrov, G. Spengler, É.A. Enyedy, V.B. Arion, A. Popović Bijelić, The release of a highly cytotoxic paullone bearing a TEMPO free radical from the HSA hydrogel: an EPR spectroscopic characterization, *Pharmaceutics.* 14 (2022) 1174. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061174>.
- [196] F. Bacher, C. Wittmann, M. Nové, G. Spengler, M.A. Marć, E.A. Enyedy, D. Darvasiová, P. Rapta, T. Reiner, V.B. Arion, Novel latonduine derived proligands and their copper(II) complexes show cytotoxicity in the nanomolar range in human colon adenocarcinoma cells and *in vitro* cancer selectivity, *Dalt. Trans.* 48 (2019) 10464–10478. <https://doi.org/10.1039/C9DT01238A>.
- [197] G.J. van der Vusse, Albumin as fatty acid transporter, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 24 (2009) 300–307. <https://doi.org/10.2133/dmpk.24.300>.
- [198] I. Petitpas, T. Grüne, A.A. Bhattacharya, S. Curry, Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids, *J. Mol. Biol.* 314 (2001) 955–960. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.5208>.
- [199] A.A. Pavićević, A.D. Popović-Bijelić, M.D. Mojović, S.V. Šušnjar, G.G. Bačić, Binding of doxyl stearic spin labels to human serum albumin: an EPR study, *J. Phys. Chem. B.* 118 (2014) 10898–10905. <https://doi.org/10.1021/jp5068928>.
- [200] I. Stepanenko, M.V. Babak, G. Spengler, M. Hammerstad, A. Popović-Bijelić, S. Shova, G.E. Büchel, D. Darvasiova, P. Rapta, V.B. Arion, Coumarin-based triapine derivatives and their copper(II) complexes: synthesis, cytotoxicity and mR2 RNR inhibition activity, *Biomolecules.* 11 (2021) 862. <https://doi.org/10.3390/biom11060862>.
- [201] L. Porcelli, R.M. Iacobazzi, A.E. Quatrone, C. Bergamini, N. Denora, P. Crupi, D. Antonacci, A. Mangia, G. Simone, N. Silvestris, A. Azzariti, Grape seed extracts modify the outcome of oxaliplatin in colon cancer cells by interfering with cellular mechanisms of drug cytotoxicity, *Oncotarget.* 8 (2017) 50845–50863. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15139>.
- [202] E.A. Wiebke, N.A. Grieshop, P.J. Loehrer, G.J. Eckert, R.A. Sidner, Antitumor effects of 5-fluorouracil on human colon cancer cell lines: antagonism by levamisole, *J. Surg. Res.* 111 (2003) 63–69. [https://doi.org/10.1016/S0022-4804\(03\)00053-2](https://doi.org/10.1016/S0022-4804(03)00053-2).
- [203] C.K. Jain, S. Roychoudhury, H.K. Majumder, Selective killing of G2 decatenation checkpoint defective colon cancer cells by catalytic topoisomerase II inhibitor, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853 (2015) 1195–1204. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.021>.
- [204] S.M. Wilhelm, J. Dumas, L. Adnane, M. Lynch, C.A. Carter, G. Schütz, K.-H. Thierauch, D. Zopf, Regorafenib (BAY 73-4506): A new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity, *Int. J. Cancer.* 129 (2011) 245–255. <https://doi.org/10.1002/ijc.25864>.
- [205] A. Vesković, Đ. Nakarada, A. Popović Bijelić, Spin-labeled hydrogels for cell viability assessment by EPR, *Free Rad. Biol. Med.* 177 (2021) S76 (Suppl. 1). doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.084, (n.d.).
- [206] M.D. Brand, C. Affourtit, T.C. Esteves, K. Green, A.J. Lambert, S. Miwa, J.L. Pakay, N. Parker, Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins, *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 755–767. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.05.034>.

- [207] G.G. Perrone, S.-X. Tan, I.W. Dawes, Reactive oxygen species and yeast apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1783 (2008) 1354–1368. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.023>.
- [208] V. Mishra, R.J. Heath, Structural and biochemical features of human serum albumin essential for eukaryotic cell culture, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 8411. <https://doi.org/10.3390/ijms22168411>.

BIOGRAFIJA AUTORA

Ana Vesković je rođena 16. aprila 1993. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Beogradu. Osnovne akademske studije na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2011/2012. godine. Diplomirala je 2016. godine sa prosečnom ocenom 9,54 odbranivši završni rad pod nazivom „Izotermalna titraciona kalorimetrija u analizi interakcije lek–receptor“. Master akademske studije na Fakultetu za fizičku hemiju, smer Biofizička hemija, upisala je školske 2016/2017. godine, a završila ih 2017. godine sa prosečnom ocenom 10,00 odbranivši master rad pod nazivom „Primena EPR spektroskopije za *in vivo/ex vivo* ispitivanje redoks statusa moždanog tkiva miševa obolelih od Alchajmerove bolesti“. U toku osnovnih studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije za školsku 2013/2014. godinu. Dobitnica je specijalnog priznanja Srpskog hemijskog društva za 2017. godinu za izuzetan uspeh u toku studija.

Školske 2017/2018. godine je na matičnom Fakultetu upisala doktorske akademske studije, smer Biofizička hemija i dinamika neravnotežnih procesa. Na Fakultetu za fizičku hemiju zaposlila se juna 2018. godine kao istraživač-pripravnik u okviru projekta III41005 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Biomarkeri u neurodegenerativnim i malignim procesima“. Od avgusta 2018. godine je na Fakultetu za fizičku hemiju zaposlena kao asistent.

U periodu 2020–2022. godine je bila angažovana na PROMIS projektu Fonda za nauku Republike Srbije „Proteinski hidrogel za teranostiku kancera – PHYCAT“ pod rukovodstvom dr Ane Popović Bijelić, vanrednog profesora Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu. U okviru projekta PHYCAT realizovani su eksperimenti za potrebe njene doktorske disertacije.

Ana Vesković je koautor 5 radova publikovanih u međunarodnim časopisima (1 kategorije M21a, 2 kategorije M21, 1 kategorije M22, 1 kategorije M23). Osim toga, imala je 14 saopštenja na skupovima međunarodnog značaja (4 štampana u celini, 10 u izvodu). Od nevedenih, 1 rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vredosti M21a, 1 rad u vrhunskom međunarodnom časopisu M21 i 1 apstrakt objavljen u međunarodnom časopisu M21a, na kojima je prvi autor, uključuju rezultate proistekle iz doktorske disertacije.

Publikacije proistekle iz doktorske disertacije

Rad u međunarodnom časopisu izuzetnih vredosti M21a:

1. **A. Vesković**, Đ. Nakarada, A. Popović Bijelić, A novel methodology for hydrogel water content determination by EPR: The basis for real-time monitoring of controlled drug release and hydrogel swelling and degradation, *Polym. Test.* 98 (2021) 107187. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2021.107187>.

Rad u vrhunskom međunarodnom časopisu M21:

1. **A. Vesković**, Đ. Nakarada, O. Vasiljević, A. Dobrov, G. Spengler, É. A. Enyedy, V. B. Arion, A. Popović Bijelić, The release of a highly cytotoxic paullone bearing a TEMPO free radical from the HSA hydrogel: an EPR spectroscopic characterization, *Pharmaceutics* 14 (2022) 1174. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061174>.

Apstrakt u međunarodnom časopisu izuzetnih vredosti M21a:

1. **A. Vesković**, Đ. Nakarada, A. Popović Bijelić, Spin-labeled hydrogels for cell viability assessment by EPR, *Free Rad. Biol. Med.* 177 (2021) S76 (Supp. 1). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.084>.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Ana Vesković

Broj indeksa 2017/0311

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Primena elektronske paramagnetne rezonancije za proučavanje albuminskih hidrogelova za kontrolisanu isporuku antikancerskih lekova i detekciju vijabilnosti ćelija

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Ana Vesković

Broj indeksa 2017/0311

Studijski program Doktorske akademske studije fizičke hemije

Naslov rada Primena elektronske paramagnetne rezonancije za proučavanje albuminskih hidrogelova za kontrolisanu isporuku antikancerskih lekova i detekciju vijabilnosti ćelija

Mentor dr Ana Popović Bijelić, vanredni profesor Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjena u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, _____

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Primena elektronske paramagnetne rezonancije za proučavanje albuminskih hidrogelova za kontrolisanu isporuku antikancerskih lekova i detekciju vijabilnosti ćelija

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerada (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.
Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, _____

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.