

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Biljana Ž. Ristić

**Fotodinamičko citotoksično i
antibakterijsko dejstvo grafenskih
kvantnih tačaka *in vitro***

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Biljana Ž. Ristić

**Photodynamic cytotoxicity and
antibacterial effects of graphene
quantum dots *in vitro***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

MENTOR:

Prof. dr Vladimir Trajković

Vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR:

Prof. dr Ivana Dakić

Vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Verica Paunović

Naučni saradnik Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

dr Maja Misirkić Marjanović

Naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”
Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Dejan Baskić

Vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, kao i u Laboratoriji za radijacionu hemiju i fiziku „Gama” Instituta za nuklearne nauke „Vinča” Univerziteta u Beogradu. Istraživanja predstavljena u disertaciji su realizovana u okviru projekata Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Uloga autofagije u regulaciji smrti tumorskih ćelija“ pod rukovodstvom dr Ljubice Harhaji Trajković i „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“ pod rukovodstvom prof. dr Vladimira Trajkovića.

Zahvaljujem se:

Prof. dr Vladimiru Trajkoviću na neposrednom rukovođenju pri izradi eksperimenata i pisanju doktorske disertacije i radova koji su iz nje proistekli,

prof. dr Ivani Dakić na posvećenosti i korisnim savetima pri izradi i pisanju disertacije,

dr Ljubici Harhaji-Trajković na nesebičnoj pomoći, iskrenoj podršci i dragocenim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove disertacije,

dr Zoranu Markoviću na sintezi grafenskih kvantnih tačaka i pomoći u eksperimentalnom radu,

dr Godani Tovilović Kovačević i dr Biljani Todorović Marković na korisnim savetima pri pisanju disertacije,

poštovanim članovima komisije dr Verici Paunović, dr Maji Misirkić Marjanović i prof. Dejanu Baskiću na uloženom trudu i pomoći pri oblikovanju konačne verzije disertacije,

svim kolegamicama i kolegama koji su neposredno doprineli uspešnom završetku ove doktorske disertacije na izuzetnoj višegodišnjoj saradnji.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici, posebno suprugu Miroslavu, na veri, razumevanju i безусловnoj podršci koju su mi pružili tokom izrade ove doktorske disertacije.

Tezu posvećujem Vukašinu i Nini

Fotodinamičko citotoksično i antibakterijsko dejstvo grafenskih kvantnih tačaka *in vitro*

REZIME

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivano je fotodinamičko citotoksično dejstvo grafenskih kvantnih tačaka (GKT) na ćelije humanog glioma, kao i njihov antibakterijski efekat na bakterije rezistentne na konvencionalnu antibiotsku terapiju. Iako odlične fotoluminiscentne karakteristike GKT omogućavaju njihovu široku primenu u biomedicini, njihova citotoksičnost, kao i antibakterijsko dejstvo do sada nisu ispitivani. Gliomi su najčešći i najletalniji tumori mozga otporni na konvencionalnu terapiju i često inoperabilni, pa su stoga neophodni novi terapijski pristupi u njihovom lečenju. GKT, ovalne ugljenične dvodimenzionalne nanočestice, sintetisane su elektrohemijском oksidacijom grafita i karakterisane su metodama UV-Vis spektroskopije, mikroskopijom atomskih sila i transmissionom elektronskom mikroskopijom. Nakon fotoekscitacije plavom svetlošću (470 nm, 1 W) GKT su proizvele reaktivne kiseonične vrste, uključujući i singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$), što je dovelo do oksidativnog stresa i smrti U251 ćelija humanog glioma. Ćelijska smrt indukovana fotoekscitiranim GKT pokazivala je morfološke i biohemijske karakteristike kako apoptoze (eksternalizacija fosfatidil-serina, aktivacija kaspaza, DNK fragmentacija), tako i autofagije (formiranje autofagnih vezikula, konverzija LC3-I u LC3-II, degradacija autofagnog kargo receptora SQSTM1/p62). Genetska inaktivacija ključnog autofagnog proteina LC3B smanjila je fotodinamičku citotoksičnost GKT.

Otkrivanje novih, efikasnijih metoda lečenja bakterijskih infekcija postalo je neophodno usled porasta učestalosti infekcija uzrokovanih sojevima bakterija koje pokazuju rezistenciju na veliki broj antibiotika. Iz tih razloga je ispitivan uticaj fotoekscitiranih GKT na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, koje spadaju u grupu najznačajnijih nozokomijalnih patogena, ali se sa velikom učestalošću izoluju i kao izazivači infekcija u vanbolničkoj sredini. Ubijanje bakterija fotoekscitiranim GKT

pokazano je smanjenjem broja bakterijskih kolonija, detekcijom oštećenja bakterijske membrane bojenjem propidijum jodidom, kao i vizuelizacijom morfoloških promena pomoću mikroskopije atomskih sila. Indukcija oksidativnog stresa u bakterijama tretiranim fotoekscitiranim GKT potvrđena je bojenjem redoks senzitivnim fluorohromom dihidrorodaminom 123. Takođe je pokazano da pojedinačni tretmani GKT ili plavom svetlošću nisu doveli do indukcije oksidativnog stresa i redukcije vijabilnosti bakterija, kao i da fotoekscitirane GKT nisu bile toksične za splenocite miša.

Dobijeni rezultati ukazuju na potencijalnu primenu GKT u fotodinamičkoj terapiji, u kojoj se netoksični fotosenzitivni agensi izloženi svetlosti određene talasne dužine koriste za ubijanje malignih ćelija i bakterija.

Ključne reči: grafenske kvantne tačke, fotodinamička terapija, citotoksičnost, slobodni radikali, oksidativni stres, antibakterijsko dejstvo, apoptoza, autofagija

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK broj:

Photodynamic cytotoxicity and antibacterial effect of graphene quantum dots *in vitro*

SUMMARY

In this doctoral dissertation the photodynamic cytotoxic effect of graphene quantum dots (GQD) was investigated in human glioma cells and antibiotic-resistant bacteria. The excellent physicochemical properties of GQD make them suitable candidates for biomedical applications, but their cytotoxicity towards cancer cells or bacteria has not been extensively studied thus far. Gliomas are among the most frequent and lethal brain tumors, often inoperable and highly refractive to the standard chemotherapy protocols, thus there is a pressing need for the development of new therapy approaches. GQD, the two-dimensional carbon nanoparticles, were synthesized by the electrochemical oxidation of graphite and characterized by UV-Vis, atomic force microscopy, and transmission electronic microscopy. It was shown that GQD irradiated with the blue light (470 nm, 1 W) produced reactive oxygen species, including singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), which killed U251 human glioma cells by causing oxidative stress. The cell death induced by the photoexcited GQD displayed morphological and/or biochemical characteristics of both apoptosis (phosphatidylserine externalization, caspase activation, DNA fragmentation) and autophagy (formation of autophagic vesicles, LC3-I/LC3-II conversion, degradation of autophagic cargo receptor SQSTM1/p62). Moreover, genetic inactivation of autophagy-essential LC3B protein partly abrogated the photodynamic cytotoxicity of GQD.

Searching for new treatments for bacterial infections has become necessary, because of a dramatic increase in the frequency of infections caused by drug-resistant bacteria. Therefore, we examined potential antimicrobial effect of photoexcited GQD on the Gram-positive and Gram-negative bacteria, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, which are leading nosocomial pathogens. Bacterial killing was demonstrated by the reduction in number of bacterial colonies using a standard plate count method, by the increased uptake of propidium iodide in bacteria with

damaged membrane, as well as by visualizing morphological defects employing AFM. The induction of oxidative stress in bacteria exposed to photoexcited GQD was confirmed by staining with a redox-sensitive fluorochrome dihydrorhodamine 123. Moreover, neither GQD nor light exposure alone was able to cause oxidative stress and reduce the viability of bacteria. Finally, photoexcited GQD were not toxic to the mouse splenocytes.

These data indicate a potential usefulness of GQD in photodynamic therapy, in which nontoxic photosensitizing agents exposed to the light of a particular wavelength are used to kill cancer cells or bacteria.

Keywords: graphene quantum dots, photodynamic therapy, cytotoxicity, free radicals, oxidative stress, antibacterial effect, apoptosis, autophagy

Research area: Medicine

Research field: Molecular medicine

UDC number:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	14
3. MATERIJAL I METODE	15
3.1. Rastvori i reagensi	15
3.2. Čelije i ćelijske kulture	16
3.3. Suspenzije bakterija	16
3.4. Izolovanje splenocita	17
3.5. Sinteza i karakterizacija grafenskih kvantnih tačaka (GKT)	17
3.6. Testovi vijabilnosti	19
3.6.1. <i>Test aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza</i>	20
3.6.2. <i>Kristal violet test</i>	20
3.6.3. <i>Test oslobađanja laktat dehidrogenaze</i>	21
3.6.4. <i>Test aktivnosti kisele fosfataze</i>	22
3.7. Analiza parametara ćelijske smrti	22
3.7.1. <i>Određivanje apoptoze</i>	23
3.7.2. <i>Određivanje fragmentacije DNK</i>	24
3.7.3. <i>Određivanje aktivacije kaspaza</i>	24
3.8. Analiza ćelijske smrti kod bakterija	25
3.8.1. <i>Određivanje broja bakterija u suspenziji</i>	25
3.8.2. <i>Morfološka analiza bakterija mikroskopijom atomskih sila</i>	26
3.9. Određivanje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV)	26
3.9.1. <i>Određivanje intracelularne produkcije RKV</i>	26

3.9.2. Određivanje produkcije RKV u sistemu bez ćelija	27
3.9.3. Određivanje produkcije RKV u bakterijama	27
3.10. Fazno kontrastna mikroskopija	28
3.11. Ultrastrukturalna analiza ćelija na transmisionom elektronskom mikroskopu.....	28
3.12. Analiza ćelija na konfokalnom mikroskopu	28
3.13. Imunoblot analiza.....	29
3.14. Transfekcija pomoću shRNA (<i>engl.</i> short hairpin RNA)	31
3.15. Statistička analiza.....	32
4. REZULTATI	33
4.1. Karakterizacija GKT.....	33
4.2. Fotoekscitirane GKT proizvode singletni kiseonik	35
4.3. Fotoekscitirane GKT ubijaju U251 ćelije.....	36
4.4. Fotoekscitirane GKT izazivaju apoptozu ćelija glioma.....	39
4.5. Fotoekscitirane GKT indukuju oksidativni stres u ćelijama glioma	43
4.6. GKT indukuju autofagiju u ćelijama glioma	44
4.7. Fotoekscitirane GKT ubijaju bakterije	49
4.8. Fotoekscitirane GKT menjaju morfologiju bakterija.....	53
4.9. Fotoekscitirane GKT izazivaju oksidativni stres kod bakterija.....	55
4.10. Fotoekscitirane GKT ne smanjuju vijabilnost mišjih splenocita	57
5. DISKUSIJA	59
6. ZAKLJUČCI.....	72
7. LITERATURA	73

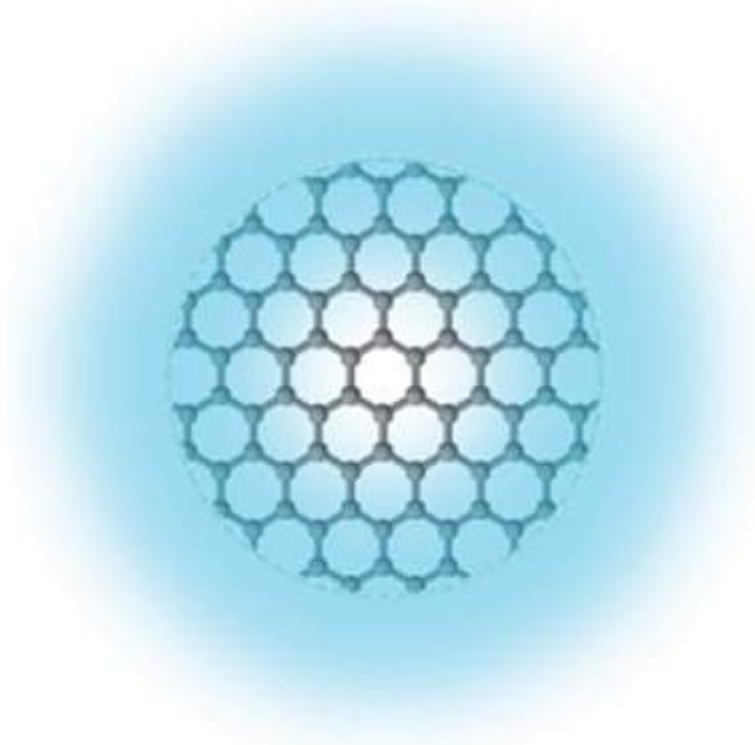
1. UVOD

Kvantne tačke su poluprovodničke nanostrukture kod kojih je kretanje elektrona prostorno ograničeno u sve tri dimenzije. Predstavljaju nula-dimenzionalne ili dvodimenzionalne materijale čije lateralne dimenzije ne prelaze 100 nm. Sastoje se od nekoliko stotina do nekoliko miliona atoma i predstavljaju prelazni oblik između čvrstih tela (kristala) i pojedinačnih atoma. Zbog nanometarskih dimenzija i izraženog efekta kvantnog ograničenja (*engl.* quantum confinement effect), njihove optičke i električne karakteristike razlikuju se od makroskopskih poluprovodnika od kojih su napravljene. Odnos broja atoma na površini i unutrašnjosti mnogo je veći kod kvantnih tačaka nego kod čvrstih materijala i zato imaju izražen površinski efekat (*engl.* edge effect) (Volkov, 2015). Kvantne tačke karakteriše fotoluminiscencija koja je zavisna od njihove veličine, odnosno emisione talasne dužine su obrnuto proporcionalne njihovoj veličini, što ih čini podesnim za primenu u biomedicini kao biosenzora. Takođe, koriste se kao fluorescentne probe za „bioimidžing” (*engl.* bioimaging), pošto su otpornije na gubitak fotoluminiscencije usled degradacije molekularne strukture (*engl.* photobleaching) u poređenju sa organskim fluoroforima (Calin i sar., 2013).

Grafen je dvodimenzionalna kristalna alotropska modifikacija ugljenika, izgrađena od ugljenikovih atoma organizovanih u šestougao nu rešetku koja podseća na strukturu saća (Geim, 2009). Grafen ima planarnu strukturu i sastoji se od jednog sloja atoma ugljenika koji su sp^2 hibridizovani. Svaka od tri sp^2 hibridizovane orbitale atoma ugljenika sa tri susedna atoma ugljenika formira jake kovalentne σ veze koje su odgovorne za stabilnost i čvrstinu rešetke, kao i za elastične osobine grafena. Interakcije između preostalih susednih nehibridizovanih $2p_z$ orbitala se razvijaju u delokalizovane π (vezujuće) nivoe koji formiraju valentnu zonu i π^* (anti-vezujuće) nivoe koje formiraju provodnu zonu. Reč grafen, nastalu kombinovanjem reči grafit sa sufiksom –en, uveo je Hans Peter Boem (*Hanns-Peter Boehm*) 1962. godine da bi opisao jednoslojnu ugljeničnu foliju. Grafen su prvi put eksperimentalno napravili 2004. godine dvojica fizičara ruskog porekla Andrej Gejm (*Andre Geim*) i Konstantin Novoselov sa

Univerziteta u Mančesteru, Velika Britanija. Utvrdili su da se raslojavanjem segmenata visoko orijentisanog pirolitičkog grafita pomoću lepljive trake, dobijaju različite ljuspice od kojih su neke tanje od ostalih. Dobijene ljuspice su prenosili na silicijumsku podlogu i ponovo razdvajali na još tanje slojeve, dok nisu dobili sloj debljine jednog atoma, čiju su stabilnost potvrdili na elektronskom mikroskopu (Novoselov i sar., 2004). Za otkriće grafena dobili su Nobelovu nagradu za fiziku 2010. godine.

Grafenske kvantne tačke (GKT) su podgrupa ugljeničnih kvantnih tačaka koje poseduju grafensku strukturu, elipsastog su oblika ili oblika diska, imaju prečnik manji od 100 nm i mogu biti izgrađene od jednog ili više tankih slojeva grafena debljine 3-30 nm. GKT u svom središtu uobičajeno imaju strukturu kristalne rešetke grafena, dok na površini i na ivicama mogu biti delimično oksidovane i sadržati polarne funkcionalne grupe (karboksilne, hidroksilne, karbonilne, epoksidne i dr.). Upravo ove funkcionalne grupe se ponašaju kao reaktivna mesta i odgovorne su za njihovu visoku rastvorljivost u vodi i dobru biokompatibilnost. GKT su prvi put definisane u istraživanjima Silvestrova i Efetova 2007. godine (Silvestrov i Efetov, 2007).



Slika 1. Struktura grafenske kvantne tačke

Metode sinteze GKT se mogu podeliti u dve grupe: „top-down” metode i „bottom-up” metode. „Top-down” metode podrazumevaju dobijanje GKT sečenjem jeftinih i lako dostupnih ugljeničnih materijala (grafen oksid, ugljenične nanotube) primenom hemijskog, elektrohemijskog ili fizičkog pristupa i upotrebom koncentrovanih kiselina, jakih oksidujućih agenasa i izlaganjem uzorka visokim temperaturama. Nedostatak ovog pristupa je nemogućnost kontrole morfologije i raspodele veličina dobijenih čestica. „Bottom-up” metode se odnose na sintezu GKT zasnovanu na hemijskim reakcijama kondenzacije, pomoću pirolize i karbonizacije policikličnih aromatičnih jedinjenja, kao što su fulereni (C₆₀) ili derivati benzena. Iako su veoma kompleksni, ovi postupci omogućavaju dobro kontrolisanje osobina GKT (Baker i Baker, 2010). GKT poseduju nekoliko prednosti u odnosu na konvencionalne neorganske kvantne tačke, koje ih čine pogodnijim za primenu u živim biološkim sistemima. Imaju odlične optičke karakteristike (fotoluminiscencija, velika fluorescentna aktivnost, fotostabilnost), biokompatibilnost, termalnu i hemijsku stabilnost, nisku toksičnost, lako se sintetišu i dobro rastvaraju u različitim rastvaračima. GKT imaju izraženu optičku apsorpciju u UV oblasti, sa spektrom koji ima završetak u vidljivom delu spektra. Usled efekta kvantnog ograničenja, UV-Vis spektri pokazuju zavisnost optičke apsorpcije od veličine GKT i metode sinteze (Li i sar., 2013), pa sa povećanjem veličine čestica dolazi do pomeranja apsorpcionog pika u crveni deo spektra (Peng i sar., 2012). Najznačajnija karakteristika GKT je fotoluminiscencija. GKT različitih veličina pokazuju različite boje u spektru fotoluminiscencije, od vidljive svetlosti do infracrvene oblasti. Iako tačan mehanizam fotoluminiscencije GKT još uvek nije poznat, pretpostavlja se da luminiscencija potiče od ekscitacije ugljenika, efekta kvantnog ograničenja, aromatičnih struktura, kiseoničnih funkcionalnih grupa, cik-cak ivica i ivičnih defekata (Zhou i sar., 2007; Lu i sar., 2009; Li i sar., 2013). Usled odličnih fotoluminiscencijnih karakteristika GKT imaju sve širu primenu u medicini kao biosenzori (npr. za detekciju jona gvožđa Fe³⁺ ili biomaterijala) i netoksični agensi za „bioimidžing” (Shen i sar., 2012). Takođe se koriste i kao fotosenzitizeri, molekuli koji apsorbuju svetlost određene talasne dužine i prenose energiju na drugi molekul, i kao specifični nosači lekova za kontrolisanu terapiju određenih bolesti. Jedna od najvažnijih osobina GKT je sposobnost da se ponašaju kao donori i akceptori elektrona, odnosno da poseduju prooksidativni i

antioksidativni potencijal (Wang i sar., 2009). Pokazano je da za razliku od grafena, a slično fulerenima (C_{60}), GKT nakon ekscitacije plavim svetlom proizvode reaktivne kiseonične vrste (RKV), uključujući i singletni kiseonik 1O_2 (Christensen i sar., 2011). Ova osobina GKT otvara mogućnost njihove primene u fotodinamičkoj terapiji.

Fotodinamička terapija (FDT) predstavlja savremenu terapijsku alternativu konvencionalnoj terapiji tumora (hirurške intervencije, hemoterapije i radioterapije), i ima niz prednosti: minimalno je invazivna, ispoljava minimalna neželjena dejstva i ima nisku sistemsku toksičnost. U FDT se netoksični fotosenzitivni agensi izloženi svetlosti određene talasne dužine koriste za ubijanje malignih ćelija i mikroorganizama kao što su bakterije. Naime, fotosenzitivni agens aktiviran svetlošću prenosi energiju ili elektron na molekularni kiseonik prisutan u ciljnim ćelijama, pri čemu nastaju superoksidni i hidroksil radikali u fotohemijskoj reakciji (mehanizam po tipu I) i singletni kiseonik (mehanizam po tipu II) (Clo i sar., 2007). Singletni kiseonik je jedna od tri elektronske konfiguracije molekulskog kiseonika u kojoj su oba elektrona sparena u jednoj orbitali, i koja ima nižu energiju, ali značajno duži životni vek od ostalih konfiguracija. Zbog svoje izuzetno visoke oksidativne moći singletni kiseonik učestvuje u čitavom nizu hemijskih i biohemijskih reakcija (Briviba i sar., 1997). U interakciji sa različitim RKV učestvuje u indukciji oksidativnog stresa i prenosu ćelijskih signala koji dovode do oštećenja ćelije i ćelijske smrti. Pobuđeno singletno stanje kiseonika je glavna citotoksična RKV koja nastaje tokom FDT, tako da se povećanjem produkcije 1O_2 unutar tumorskih ćelija i tkiva može poboljšati terapijski odgovor. Broj nastalih molekula singletnog kiseonika po fotonu apsorbovane svetlosti je najvažnija mera efikasnosti nekog fotosenzitivnog agensa, tako da koncentracija singletnog kiseonika u tumorskom tkivu predstavlja direktni pokazatelj efektivne isporučene doze FDT. FDT predstavlja dinamičan proces, jer je koncentracija prisutnog kiseonika u tumorskim ćelijama promenljiva usled njegove potrošnje, a menja se i distribucija fotosenzitivnog agensa. Takođe, na koncentracije kiseonika i fotosenzitivnog agensa utiču i raspodela talasnih dužina zračenja, određena karakteristikama izvora svetla, kao i optičke osobine tumorskog tkiva. Selektivnost fotodinamičke terapije se postiže selektivnim izlaganjem ciljnog tkiva zračenju, čime se smanjuje toksičnost prema okolnom zdravom tkivu. Konvencionalna FDT se koristi u terapiji različitih tumora, ali je klinička primena postojećih fotosenzitivnih agenasa često ograničena niskim prinosom 1O_2 , kao i slabom

biokompatibilnošću i izraženim „fotobličingom” (Ge i sar., 2014). Jedan od ograničavajućih faktora je i nedovoljna dubina prodiranja svetlosti kroz tkivo pri tretmanu tumora lokalizovanih u unutrašnjim, teško dostupnim regijama organizma kao što su mišići i kosti. GKT apsorbuju intenzivno u UV oblasti i u celokupnom vidljivom delu spektra (Leach i sar., 1992). Pojedine GKT su ekstremno efikasni izvori singletnog kiseonika sa prinosom koji je približan vrednosti 1,3, što znači da generišu više od jednog molekula singletnog kiseonika za svaki foton koji apsorbuju (Ge i sar., 2014). Upravo ove karakteristike ih čine interesantnim kandidatima za fotosenzitivne agense u FDT.

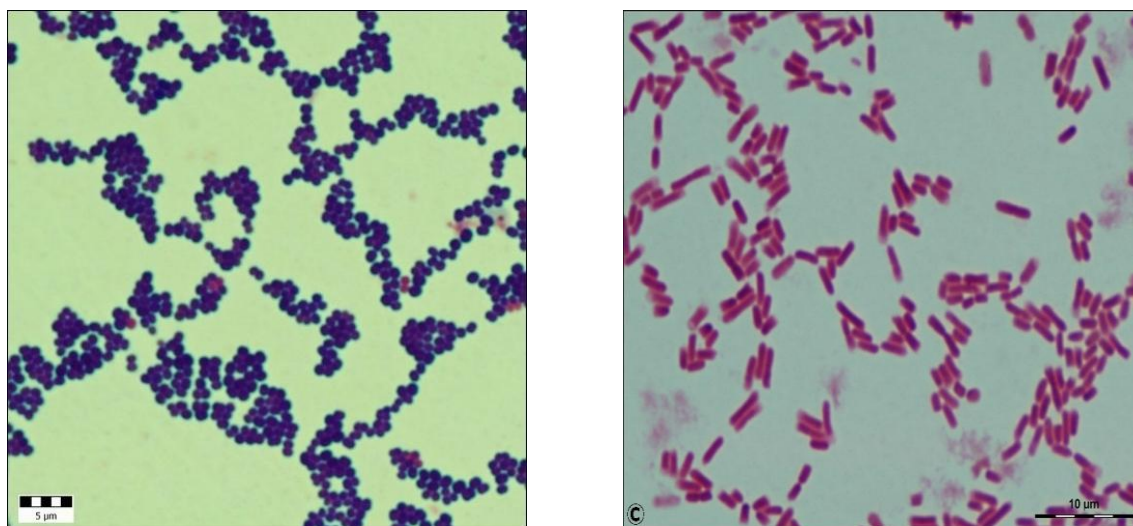
FDT se intenzivno proučava poslednjih godina kao potencijalni neinvazivni tretman različitih infektivnih oboljenja (Hamblin i Hasan, 2004). Neadekvatna i rasprostranjena primena antibiotika dovela je do pojave i širenja rezistencije bakterija na antimikrobne agense, kako među Gram-pozitivnim tako i među Gram-negativnim vrstama. Tokom poslednjih decenija dramatično je porasla incidencija infekcija izazvanih bakterijama koje su postale rezistentne na veliki broj antibiotika. Pojava multirezistencije (rezistencija na najmanje tri klase antibiotika) i panrezistencije (rezistencija na sve dostupne antibiotike) ograničila je broj terapijskih mogućnosti, što danas predstavlja jedan od najznačajnijih problema sa kojim se suočavaju lekari u svakodnevnom kliničkom radu. Terapija infekcija izazvanih rezistentnim sojevima bakterija zahteva primenu lekova „drugog izbora” koji su praćeni učestalijom pojavom neželjenih reakcija i značajno povećavaju troškove lečenja. Procenjuje se da svake godine oko 700.000 ljudi umire zbog infekcija izazvanih rezistentnim sojevima bakterija, a pretpostavlja se da bi taj broj mogao iznositi 10 miliona do 2050. godine, ukoliko se hitno ne preduzmu mere za zaustavljanje razvoja i širenja rezistencije i ne ulože napor u pronalaženje novih antimikrobnih agenasa (Willyard, 2017). Zbog svega navedenog, Svetska zdravstvena organizacija (SZO; *engl.* World Health Organization, WHO) i Svetski ekonomski forum (*engl.* World Economic Forum) uvrstili su rezistenciju bakterija na antibiotike u grupu globalnih zdravstvenih problema od najvećeg značaja (Blair i sar., 2015). SZO je 2017. godine prvi put objavila listu rezistentnih i multirezistentnih bakterija koje predstavljaju najveći zdravstveni problem zbog nedostatka dostupnih terapija (Willyard, 2017). Ova lista obuhvata 12 bakterija i familija bakterija, među kojima su meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA)

i članovi porodice Enterobacteriaceae uključujući i vrstu *Escherichia coli*. Pored toga što pokazuju izrazitu sposobnost sticanja rezistencije na antibiotike, MRSA i *E. coli* spadaju u grupu najznačajnijih nozokomijalnih patogena, ali se sa visokom učestalošću izoluju i kao izazivači infekcija u vanbolničkoj sredini. Štaviše, poslednjih godina sojevi MRSA diseminovani u opštoj populaciji (CA-MRSA, *engl.* community acquired) se sve češće izoluju u bolničkoj sredini i pretpostavlja se da će u bliskoj budućnosti u potpunosti zameniti HA-MRSA (*engl.* hospital- or health-care-acquired) sojeve koji su tipično izazivači nozokomijalnih infekcija (Thurlow i sar., 2012; Pourmand i sar., 2017).

S. aureus je Gram-pozitivna koka (Slika 2) koja kolonizuje kožu i sluznice čoveka. Iako se smatra oportunističkom bakterijom, usled produkcije velikog broja različitih faktora virulencije izaziva širok spektar oboljenja, od blagih, samoograničavajućih infekcija kože i trovanja hranom do vrlo teških, invazivnih infekcija, kao što su bakterijemija, endokarditis, osteomijelitis i nekrotizirajuća pneumonija (Thurlow i sar., 2012). *S. aureus* je vrlo brzo razvijao rezistenciju na nove antimikrobne agense. Ubrzo posle uvođenja penicilina u upotrebu 40-tih godina prošlog veka, pojavili su se rezistentni sojevi koji su proizveli penicilinazu, enzim koji razgrađuje β -laktamski prsten penicilina. Kako su penicilin-rezistentni sojevi postali dominantni u bolnicama tokom naredne dve decenije, 1959. godine je u kliničku upotrebu uveden meticilin, polusintetski beta laktamski antibiotik otporan na dejstvo penicilinaza. Međutim, samo dve godine kasnije izolovani su prvi sojevi *S. aureus* rezistentni na meticilin i od tada je klinički značaj MRSA u stalnom porastu (Thurlow i sar., 2012; Pourmand i sar., 2017). Rezistencija na meticilin se danas koristi kao laboratorijski marker za rezistenciju na sve beta laktamske antibiotike, ali sojevi MRSA tipično pokazuju multirezistenciju zbog čega je infekcije izazvane ovom bakterijom veoma teško lečiti.

E. coli je Gram-negativan bacil (Slika 2) koji se nalazi u sastavu fiziološke mikroflore gastrointestinalnog trakta i genitalnog trakta žena. To je danas najčešće izolovana bakterija u kliničkim mikrobiološkim laboratorijama (Vila i sar., 2016). Pre svega je prepoznata kao najznačajniji uzročnik urinarnih infekcija, ali je sveukupan klinički značaj *E. coli* veoma veliki. U pitanju je bakterija koja pored infekcija

urinarnog trakta izaziva i čitav niz drugih ekstraintestinalnih infekcija, kao što su bakterijemija, neonatalni meningitis, intraabdominalne infekcije i infekcije hirurških rana. Specifični sojevi *E. coli*, takozvani dijarigeni sojevi, takođe su prepoznati kao važni uzročnici intestinalnih infekcija . Kada je rezistencija na antibiotike u pitanju, od posebnog su značaja sojevi enterobakterija koji produkuju beta laktamaze proširenog spektra delovanja, takozvani ESBL sojevi (*engl.* extended spectrum beta lactamases). ESBL sojevi pokazuju rezistenciju na cefalosporine svih generacija i aztreonam, ostavljajući karbapeneme kao lekove izbora u terapiji teških infekcija izazvanih ovim sojevima enterobakterija. Međutim, široka primena karbapenema dovela je do pojave i širenja sojeva enterobakterija koji produkuju karbapenemaze, među kojima su od velikog kliničkog značaja karbapenem-rezistentni sojevi *E. coli* (Vila i sar., 2016; Pourmand i sar., 2017). S obzirom da ovi sojevi često pokazuju rezistenciju i na većinu drugih antibiotika i da su geni rezistencije smešteni na mobilnim genskim elementima koji se horizontalnim transferom mogu preneti na druge Gram- negativne bakterije, ESBL i karbapenem-rezistentni sojevi enterobakterija predstavljaju jednu od najvećih pretnji ljudskom zdravlju (Willyard, 2017).



Slika 2. Bakterije *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, bojenje po Gramu

Pored infektivnih i kardiovaskularnih bolesti, maligniteti predstavljaju jedan od vodećih uzroka smrtnosti u svetu i njihovo rano dijagnostikovanje i lečenje je najveći

izazov u svetskoj medicini. Tumore ili neoplazije čine grupe izmenjenih ćelija koje nekontrolisano i neprestano proliferišu. Tumori mogu biti benigni ili maligni i dele se na osnovu vrsta ćelija ili tkiva od kojih su se razvili. Gliomi su tumori nastali od ćelija glije, potpornih ćelija nervnog sistema, i predstavljaju najčešće primarne tumore centralnog nervnog sistema (CNS). Gliomi čine oko 30% svih tumora CNS-a i 80% svih malignih tumora mozga (Goodenberger i Jenkins, 2012). Prema SZO gliomi astrocitnog porekla (astrocitomi) su klasifikovani u četiri stadijuma na osnovu histopatoloških karakteristika i stepena maligniteta. U poslednji, IV stadijum malignog glioma, spada i glioblastoma multiforme (GBM), najčešći i najletalniji tumor mozga, koga odlikuje velika agresivnost uzrokovana velikim proliferativnim i angiogenetskim potencijalom (Jones i Holland, 2011; Westphal i Lamszus, 2011). GBM može nastati *de novo* iz prekursorskih ćelija (primarni GBM) ili progresivnom transformacijom GBM glioma nižeg stadijuma (sekundarni GBM) (Arjona i sar., 2006). Prosečno vreme preživljavanja obolelih od GBM je 12-15 meseci od trenutka postavljanja dijagnoze, odnosno stopa petogodišnjeg preživljavanja je manja od 5% (Minniti i sar., 2008). Standardni terapijski protokol za novootkrivene glioblastome podrazumeva hirurško odstranjivanje tumora u kombinaciji sa radioterapijom i tretmanom citostatikom temozolomidom, koji se primenjuje za vreme i posle terapije zračenjem. Međutim, specifična lokalizacija glioma čini ove tumore često inoperabilnim. Dodatni problem predstavlja velika otpornost glioma na indukciju apoptoze konvencionalnom terapijom (zračenjem, hemioterapijom ili imunoterapijom) (Giese i sar., 2003).

Apoptoza ili programirana ćelijska smrt tipa I je evolutivno konzerviran i genetički determinisan proces eliminacije ćelija prvi put imenovan od strane Kerr i sar. 1972. godine (Kerr i sar., 1972). Apoptoza se odigrava u normalnim fiziološkim uslovima, tokom embriogeneze i diferencijacije, i ima važnu ulogu u procesima regulacije imunskog sistema, u razviću i starenju, održavanju homeostaze tkiva, u uklanjanju ćelija oštećenih toksičnim agensima, kao i u nizu patoloških stanja (Norbury i Hickson, 2001; Yuan i Kroemer, 2010). U toku apoptoze dolazi do karakterističnih morfoloških promena ćelije, kao što su zaokrugljivanje, smanjivanje ćelijskog volumena, kondenzacija i fragmentacija hromatina (piknoza) i intenzivno pupljenje plazma membrane. Terminalnu fazu apoptoze karakteriše pojava apoptotskih tela koja predstavljaju citoplazmu sa gusto pakovanim organelama, sa ili bez fragmenata jedra i

sa očuvanom plazma membranom na čijoj površini se nalazi fosfatidilserin (Taylor i sar., 2008). Fosfatidilserin predstavlja signal za makrofage i okolne ćelije da fagocituju apoptotska tela, čime se sprečava sekundarna nekroza i produkcija citokina, pa kod ćelija koje umiru apoptozom ne dolazi do oslobađanja ćelijskog sadržaja u okolnu sredinu i oštećenja tkiva (Elmore, 2007; Bogner i sar., 2010). Apoptotska tela u *in vitro* uslovima se spontano degenerišu procesom nekroze. Dakle, za razliku od nekroze, apoptozu karakteriše očuvanje strukture ćelijske membrane sve do krajnjih stadijuma procesa, kao i posledično odsustvo inflamatorne reakcije (Kurosaka i sar., 2003). Apoptoza je energetski zavisan proces koordinisan kaskadnom aktivacijom proteolitičkih enzima kaspaza. Kaspaze pripadaju familiji visoko konzerviranih cistein-zavisnih aspartat-specifičnih proteaza, koje se sintetišu kao neaktivni prekursori, prokaspaze. Razlikujemo se inicijatorske (kaspaza-2, -8, -9, -10), efektorske (kaspaza-3, -6, -7) i inflamatorne (kaspaza-1, -4, -5) kaspaze (Cohen, 1997). Grupisanjem u odgovarajuće komplekse prekursorske forme inicijatorskih kaspaza se autokatalitički aktiviraju, a zatim svojom proteolitičkom aktivnošću dalje aktiviraju efektorske kaspaze. Efektorske ili egzekutorne kaspaze su odgovorne za aktivaciju endonukleaza i proteaza, što za posledicu ima fragmentaciju hromozomalne DNK i isecanje proteina citoskeleta i nukleusa, pri čemu nastaju citomorfološke promene karakteristične za apoptozu (Slee i sar., 2001). Postoje dva jasno definisana signalna puta koja aktiviraju proces apoptoze, spoljašnji ili receptorski i unutrašnji ili mitohondrijalni put. Spoljašnji put započinje na nivou ćelijske membrane aktivacijom receptora smrti iz TNFR (*engl.* tumor necrosis factor receptor) familije (Locksley i sar., 2001). Svi članovi TNF receptorske familije imaju sličan ekstracelularni domen - domen smrti (*engl.* death domain) (Ashkenazi i Dixit, 1998), koji ima ključnu ulogu u prenošenju signala sa površine u unutrašnjost ćelije. Po vezivanju liganda za receptor smrti dolazi do konformacione promene, grupisanja adaptora za intraćelijske domene smrti FADD (*engl.* Fas-associated protein with death domain) i vezivanja za kaspazu-8, pri čemu se formira aktivni kompleks DISC (*engl.* death-inducing signalling complex) u kome je stimulisana autokatalitička aktivacija kaspaze-8 (Hsu i sar., 1995; Lavrik i sar., 2005). Na kraju, kaspaza-8 direktno aktivira efektorsku kaspazu-3, koja vršeći kontrolisanu proteolizu, započinje egzekucionu fazu apoptoze (Kischkel i sar., 1995; Cabal-Hierro i Lazo, 2012). Sa druge strane, mitohondrijalni put apoptoze je najčešće iniciran

faktorima koji izazivaju oštećenja DNK i nekih drugih ćelijskih struktura (hemoterapija, zračenje, toksini, hipoksija, hipertermija, virusna infekcija, RKV) ili odsustvom faktora rasta, hormona i citokina koji su neophodni za preživljavanje ćelija (Simon i sar., 2000; Saelens i sar., 2004). Svi ovi stimuli izazivaju depolarizaciju i promenu propustljivosti spoljašnje mitohondrijalne membrane, što za posledicu ima oslobađanje proapoptotskih proteina kao što su citohrom c, indukujući faktor apoptoze (*engl.* apoptosis inducing factor, AIF), Smac/DIABLO i endonukleaza G (Saelens i sar., 2004). Citohrom c u citoplazmi zajedno sa kaspazom-9 i Apaf-1 (*engl.* apoptotic peptidase activating factor 1) proteinom formira kompleks, apoptozom, koji aktivira efektorske kaspaze-3, -6 i -7, koje proteolitički razgrađuju ćelijski sadržaj uključujući i genetski materijal.

Tumorske ćelije koje imaju mutirane gene koji kodiraju proteine neophodne za odvijanje apoptoze mogu da umru nekim drugim tipom ćelijske smrti, npr. nekrozom ili usled neregulisane autofagije. Autofagija je precizno regulisani katabolički proces za razgradnju nepotrebnih ili disfunkcionalnih komponenti same ćelije (oštećene organele, proteinski agregati i membrane) u lizozomima (Yang i Klionsky, 2010). U ćeliji je uvek prisutan bazalni nivo autofagije, koji se pojačava u uslovima stresa. Na osnovu fiziološke funkcije i načina isporuke sadržaja lizozomima definisana su tri tipa autofagije: mikroautofagija, autofagija posredovana šaperonima i makroautofagija (Mizushima i sar., 2008). Makroautofagija, odnosno autofagija u užem smislu, predstavlja glavni put koji eliminiše oštećene organele i disfunkcionalne proteine. Proces makroautofagije započinje formiranjem fagofore, dvoslojne membrane najverovatnije poreklom od endoplazmatičnog retikuluma, koja okružuje delove citoplazme pri čemu nastaje autofagozom. Autofagozom se spaja sa lizozomom formirajući autolizom u kome se sadržaj degradira lizozomalnim kiselim hidrolazama (Mizushima, 2007; Yang i Klionsky, 2009). Autofagija je kompleksan proces koji se sastoji se od nekoliko faza regulisanih produktima ATG gena (*engl.* autophagy related genes): indukcija autofagije, stvaranje autofagozoma (nukleacija i elongacija), sazrevanje autofagozoma, fuzija autofagozoma i lizozoma, i konačno razgradnja sadržaja (Kung i sar., 2011). Ključni molekul u regulaciji autofagije u uslovima ograničene dostupnosti nutrijenata je serin/treonin kinaza mTOR (*engl.* mammalian target of rapamycin), koja kontroliše aktivnost kinaze ULK1 (*engl.* Unc-51-like kinase)

i čiji inhibicioni signali sprečavaju inicijaciju autofagije (Hosokawa i sar., 2009). Serin/treonin kinaza ATG1 kod kvasnica i homolozi ULK1 i ULK2 kod sisara predstavljaju glavne molekule koji iniciraju autofagiju. ULK fosforilacijom AMBRA1 proteina (*engl.* activating molecule in Beclin-1 autophagy 1) stimuliše translokaciju PI3K kompleksa na membranu endoplazmatskog retikuluma, mesto formiranja autofagozoma. PI3K kompleks koji obuhvata fosfoinozimid 3-kinazu klase III (PI3K), serin/treonin kinazu p150, ATG14 i beclin-1 (ATG6) kontroliše nukleaciju i elongaciju pre-autofagozomalne membrane, tj. fagofore. U uslovima niskog energetskeg stanja u ćeliji dolazi do fosforilacije beclina-1 i slabljenja interakcije beclina-1 sa Bcl 2, pri čemu se beclin-1 oslobađa i učestvuje u indukciji autofagije (He i Klionsky, 2009). U kasnijem procesu rasta i sazrevanja autofagozoma učestvuju dva konjugaciona sistema slična ubikvitinskom konjugacionom sistemu, jedan koji čine ATG12, ATG5 i ATG16, i drugi sastavljen od proteaze ATG4 i LC3 proteina (*engl.* microtubule-associated light chain-3). ATG4 proteolitički obrađuje LC3 (homolog ATG8 kod sisara) i nastaje solubilna forma LC3-I. LC3-I se dalje konjuguje sa fosfatidilaminom pomoću ATG12-ATG5-ATG16 kompleksa, stvarajući LC3-II koji se specifično vezuje za autofagozomalnu membranu. Prelazak LC3 proteina iz solubilne citoplazmatske forme LC3-I u membransku LC3-II formu tokom faze sazrevanja autofagozoma koristi se za eksperimentalno dokazivanje prisustva autofagije. Tokom procesa sazrevanja citoplazmatski sadržaj pakuje se u dvoslojni autofagozom koji se zatim spaja sa lizozomom stvarajući autolizozom sa jednostrukom membranom u kome se vrši digestija makromolekulskog sadržaja (Mizushima i sar., 2011; Wirawan i sar., 2012). Za LC3 se direktno vezuje p62 (*engl.* p62/sequestosome1-SQSTM1) protein, čija je osnovna uloga da dovede proteine obeležene ubikvitinom do autofagozoma (He i Klionsky, 2009). Sam p62 se degradira u procesu autofagije, pa se smanjivanje njegove koncentracije u eksperimentalnim uslovima koristi kao dokaz efikasne autofagne degradacije (Bjorkoy i sar., 2009). Autofagija učestvuje u kontroli ćelijskog rasta, razvića i u održavanju homeostaze (Levine i Klionsky, 2004; Klionsky, 2005). U uslovima metaboličkog stresa kao što su gladovanje i hipoksija, kao i tokom zračenja ili oksidativnog stresa, autofagija ima bitnu ulogu u uklanjanju oštećenih ćelijskih organela i proteina, i služi kao alternativni izvor energije neophodan za održavanje osnovnog ćelijskog metabolizma, te na taj način sprečava umiranje ćelije i obezbeđuje energiju i

prekursore za sintezu makromolekula neophodne za preživljavanje pod stresnim uslovima (Onodera i Ohsumi, 2005; Maiuri i sar., 2007; Apel i sar., 2008). Sa druge strane, kada je neadekvatno ili preterano aktivirana, ili kada je indukovana u ćelijama sa oštećenim mehanizmom apoptoze, autofagija može biti alternativni put ćelijske smrti (Notte i sar., 2011). Autofagija ima važnu ulogu i u procesima urođenog i stečenog imunskog odgovora, u ubijanju intracelularnih patogena (*engl. xenophagy*), prezentaciji antigena i aktivaciji limfocita (Deretic, 2011). Selektivna degradacija proteinskih agregata, oštećenih organela i patogena autofagijom predstavljaju važnu oblast istraživanja u cilju dizajniranja novog terapijskog pristupa u lečenju tumora, neurodegenerativnih bolesti i infekcija.

Oksidativni stres se definiše kao neravnoteža između nastanka i uklanjanja RKV u ćeliji (Orrenius i sar., 2007). Povećan nivo RKV dovodi pored drugih pojava do oksidacije tiol (-SH) grupa u proteinima i do promene u prenosu redoks signala u ćeliji (Kemp i sar., 2008). Pored superoksidnog anjon radikala (O_2^-) u RKV se ubrajaju i hidroksilni anjon (OH^-) i vodonik peroksid (H_2O_2). Kompleksi I i III transportnog lanca elektrona su mesta gde se najčešće dešava „curenje” elektrona do kiseonika i predstavljaju primarni izvor produkcije superoksida u većini tkiva (Kirkinezos i Moraes, 2001; Fariss i sar., 2005). Neutralizacijom superoksidnog anjon radikala pomoću enzima superoksid dismutaze (SOD) nastaje vodonik peroksid koji dalje reaguje sa O_2^- u Haber-Vajsovoj reakciji ili sa redukovanim prelaznim metalima (obično Fe^{2+} ili Cu^{1+}) u Fentonovoj reakciji i dovodi do nastanka izuzetno reaktivnog hidroksilnog radikala (OH^\cdot). Nastali hidroksilni radikal može da oksiduje mitohondrijalne proteine, DNK i lipide (oksidacija polinezasićenih masnih kiselina) i na taj način pojača efekte oksidativnog oštećenja izazvanog superoksidnim anjonom (Toninello i sar., 2004), što može da dovede do ćelijske smrti apoptozom ili nekrozom (Brown i Borutaite, 2002). Pored SOD u fiziološkim uslovima stvorene RKV neutrališu katalaza, glutacion peroksidaza i neenzimski antioksidansi (glutacion, alfa-tokoferol, askorbinska kiselina i beta-karoten).

Biološki efekti GKT su ispitivani u cilju njihove potencijalne primene kao fotosenzitivni agensi u FDT humanih oboljenja. FDT predstavlja savremenu terapijsku alternativu konvencionalnoj terapiji tumora i infektivnih oboljenja, a karakteriše se

selektivnošću i minimalnom invazivnošću (Hamblin i Hasan, 2004) Do sada je pokazano antitumorsko dejstvo neorganskih kvantnih tačkica (npr. Cd/Se) na različitim tumorskim ćelijskim linijama, ali je njihova primena bila ograničena zbog toksičnosti (Baker i Baker, 2010). S druge strane pokazano je da su ugljenične kvantne tačke biokompatibilne, ali da nisu ispoljile značajno antitumorsko delovanje (Bajwa i sar., 2016). Takođe, skorašnja istraživanja su pokazala da neorganske kvantne tačke ispoljavaju toksične efekte na Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama, uključujući *S. aureus* i *E. coli*, dok GKT funkcionalizovane amino-grupama pokazuju antimikoplazmatsku aktivnost (Jiang i sar., 2013). Međutim, fotodinamičko dejstvo GKT na ćelije tumora i bakterije do sada nije ispitivano.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ova doktorska disertacija ima sledeće ciljeve:

1. Ispitati sposobnost GKT da nakon fotoekscitacije produkuju RKV.
2. Ispitati fotodinamičko antitumorsko i antibakterijsko dejstvo GKT u *in vitro* uslovima.
3. Ispitati mehanizme odgovorne za fotodinamičku citotoksičnost i antibakterijsko dejstvo GKT (tip ćelijske smrti i uloga oksidativnog stresa).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Rastvori i reagensi

U izradi ove doktorske disertacije korišćeni su sledeći reagensi: serum fetusa govečeta (*engl.* fetal calf serum, FCS), medijum za kultivaciju ćelija - RPMI-1640 (*engl.* Roswell Park Memorial Institute Medium), L-glutamin, natrijum piruvat (GIBCO), rastvor antibiotika i antimikotika (PAA), HEPES, tripsin (Invitrogen), EDTA, PBS (*engl.* phosphate buffered saline) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ i 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4), MTT (3-4,5dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid, Sigma-Aldrich), dimetilsulfoksid (DMSO, Sigma-Aldrich), kristal violet, metanol, H₃PO₄ (Zorka), *p*-nitrofenil fosfat, Tween 20, TRIS, natrijum acetat, triton X-100 (sve Sigma Aldrich), jodonitrotetrazolijum hlorid, mlečna kiselina, N-metilfenazonijum metilsulfat, β-nikotinamid dinukleotid, aneksin V-FITC (BD Pharmingen), propidijum jodid (PI; BD Pharmingen), ApoStat (R&D Systems), dihidroetidijum (DHE; Invitrogen) dihidrorodamin (DHR; Invitrogen), 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat (DCFDA, Invitrogen), albumin iz seruma govečeta (*engl.* bovine serum albumin, BSA), RNAza (Sigma-Aldrich), askorbinska kiselina, ACK pufer (150 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,4), paraformaldehid, glutaraldehid, Columbia agar i Tripkaza soja agar (bioMérieux). Akrilamid/bisakrilamid (30% w/v), N,N,N',N'-tetrametiletilen-1,2-diamin (TEMED) (Serva), fenil-metil-sulfonil-fluorid (PMSF), natrijum ortovanadat, natrijum fluorid, koktel inhibitora proteaza, natrijum dodecil sulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate, SDS), bromfenol plavo, amonijumpersulfat, glicin, Coomassie Brilliant Blue G-250, BSA, Folin-Ciocalteu fenol reagens, 2,5-difeniloksazol (PPO) (Sigma-Aldrich), 1,4-bis-(5-feniloksazol-2-il)-benzen (POPOP) (Backman Instruments), odmašćeno mleko u prahu (Carl Roth), zečja antitela protiv formi LC3, p62 (Cell Signaling Technology) i β-aktina (Abcam), kozji anti-zečji IgG konjugovan sa peroksidazom rena (SouthernBioteck). Vreme inkubacije i koncentracije određenih agenasa su navedeni na slikama ili u legendama slika. Suspenzija GKT čuvana je na +20°C u koncentraciji 400 µg/ml.

3.2. Čelije i ćelijske kulture

Dejstvo GKT je ispitivano na U251 ćelijama glioma čoveka. Čelijska linija U251 nabavljena je od Evropske kolekcije ćelijskih kultura (European Collection of Cell Cultures, Velika Britanija). Čelije su gajene u inkubatoru u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂, na temperaturi od 37°C, u HEPES-om (20 mM) puferizovanom medijumu RPMI 1640 sa dodatkom fetalnog govedeg seruma (5%), L-glutamina (2 mM) i rastvora antibiotik/antimikotik (1%) (PAA). Čelije su po odmrzavanju iz tečnog azota propagirane u plastičnim bocama za kultivaciju ćelija od 25 cm². Po dostizanju konfluentnosti, ćelije su tripsinizovane, centrifugirane i resuspendovane u PBS-u sa 5% FCS-a. Zatim je 4×10⁵ ćelija u zapremini od 200 µl prebačeno u staklene epruvete od 15 ml i korišćeno u daljem ispitivanju posle dodavanja 200 µl PBS-a sa FCS-om (kontrola) ili 200 µl suspenzije GKT. Nakon toga, pomenute suspenzije su bile izlagane dejstvu plave svetlosti (465-475 nm, 1 W) u različitim vremenskim intervalima, a potom razblaživane u medijumu za kultivaciju. U cilju ispitivanja vijabilnosti ćelije su zasejavane u polistirenske ploče sa 96 bunara (2×10⁴ ćelija/bunaru), dok su za analize na protočnom citofluorimetru ćelije zasejavane u ploče sa 24 bunara (1×10⁵ ćelija/bunaru). Za imunoblot analize U251 ćelije su sadene u Petrijeve šolje prečnika 10 cm (2×10⁶ ćelija/šolji) i tretirane nakon dostizanja 80% konfluentnosti. Za RNK interferenciju ćelije su inkubirane u polistirenskim pločama sa 6 bunara (2×10⁵ ćelija/bunaru). Ploče sa bunarima i Petrijeve posude su nabavljene od Sarstedt-a. Sve ćelije su tretirane 24 h nakon zasejavanja, po postupcima koji su opisani u legendama slika.

3.3. Suspenzije bakterija

U ispitivanju antibakterijskog dejstva GKT korišćeni su klinički izolat meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Cirkovic i sar., 2013) i referentni soj *Escherichia coli* ATCC 25922, kao predstavnici Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Bakterije su čuvane u tripkaza-soja bujonu (bioMérieux) sa dodatkom 12,5% glicerola na -70°C. Za ispitivanje antibakterijskog dejstva pripremljene su subkulture bakterija na Columbia agaru (Oxoid) sa 5% ovčje krvi i inkubirane preko noći na 37°C

pod aerobnim uslovima. Bakterijske suspenzije su pripremljene u PBS-u sa 2×10^4 CFU/ml. Nakon toga, 200 μ l bakterijske suspenzije je prebačeno u epruvete od 15 ml i dodato je 200 μ l GKT (finalne koncentracije 50-200 mg/ml) ili PBS-a. Nakon izlaganja dejstvu plave svetlosti (465-475 nm, 1W) u trajanju od 15 min., bakterijske suspenzije su centrifugirane (4000 g, 10 min.) i resuspendovane u PBS-u, a zatim korišćene u daljim eksperimentima.

3.4. Izolovanje splenocita

Splenociti su aseptično izolovani iz slezina mužjaka miševa Balb/c soja, starih od 6 do 8 nedelja, koji su za potrebe eksperimenta žrtvovani cervikalnom dislokacijom. Životinje su gajene pod standardnim uslovima u uzgajalištu ICN Galenika, Beograd. Suspenzija pojedinačnih ćelija je dobijena pažljivim usitnjavanjem tkiva slezine kroz 70 mm mrežicu u hladnom medijumu za kultivaciju. Ćelije su centrifugirane (500 g, 10 min.) i eritrociti su uklonjeni inkubacijom u hipotoničnom ACK puferu (150 mM NH_4Cl , 1 mM KHCO_3 , 0,1 mM Na_2EDTA , pH 7,4). Ćelije su resuspendovane u PBS-u sa 5% FCS-om (3×10^6 ćelija/ml) i u 200 μ l ćelijske suspenzije je dodato 200 μ l suspenzije GKT ili PBS-a. Nakon izlaganja dejstvu plave svetlosti (465-475 nm, 1 W) ćelijske suspenzije su centrifugirane i resuspendovane u PBS-u, i spremene za analizu na fluorescentnom mikroskopu.

3.5. Sinteza i karakterizacija GKT

Elektrohemijski metod dobijanja GKT zasniva se na upotrebi grafita ili višeslojnih ugljeničnih nanotuba kao elektroda u procesu elektrohemijskog sečenja (Zhang i sar., 2013). Prilikom procesa elektrohemijske oksidacije kiseonični i hidroksilni radikali reaguju sa grafitnom elektrodom i dovode do oslobađanja GKT u rastvor. Stabilna etanolska suspenzija GKT je pripremljena po prethodno opisanom protokolu (Li i sar., 2010). Tokom elektroforeze, intenzitet primenjene struje iznosio je 50 mA, pri čemu su korišćene grafitne elektrode i rastvor elektrolita NaOH u etanolu. Odgovarajuće količine MiliQ vode su dodavane uz konstantno mešanje, a postepeno

uklanjanje etanola iz rastvora postignuto je uparavanjem pod sniženim pritiskom u rotirajućem uparivaču. Ova procedura je ponovljena 5 puta, posle čega je pH vrednost suspenzije GKT podešena na 7,0 dodavanjem HCl. Ukupne koncentracije GKT i NaCl suspenziji podešene su na 1 mg/ml, odnosno 0,9%. U rastvoru koji je sadržao do 5% NaCl nije primećena vidljiva agregacija GKT. Kontrolni rastvor je pripremljen na isti način od 0,9% rastvora NaOH u etanolu, isključujući korak elektroforeze grafitne elektrode.

Mikroskopija atomskih sila (*engl.* atomic force microscopy, AFM) je metoda koja se zasniva na merenju međumolekulskih interakcija (na primer Van der Waals-ove sile) između molekula vrha merne sonde mikroskopa i molekula na površini ispitivanog uzorka, čiji intenzitet zavisi od rastojanja atoma sonde i uzorka. Na osnovu intenziteta sila se rekonstruiše rastojanje od uzorka i to predstavlja osnovu formiranja slike dobijene AFM metodom. AFM merenja su izvedena na Quesant mikroskopu (Agoura Hills). Primenom metode za oblaganje ravnih površina tankim slojem materijala (*engl.* spin coating), tanak sloj GKT nanet je na mineral liskun (sušenje na vazduhu na 200°C, 10 min.) i analiziran AFM metodom. Mikroskop je podešen na visoko amplitudni dinamički režim rada (*engl.* tapping) i korišćene su standardne silicijumske iglice (Nano and More GmbH) pri konstantnoj sili od 40 N/m, na sobnoj temperaturi. Slike GKT na rešetkama obeleženim termoplastičnom smolom dobijene su upotrebom transmisionog elektronskog mikroskopa (Morgagni 268D).

Analiza GKT izvršena je i primenom transmisione elektronske mikroskopije, mikroskopske tehnike u kojoj snop elektrona prodire kroz veoma tanak uzorak. Slika se formira na osnovu interakcije elektrona koji prodiru kroz uzorak, potom se uvećava i fokusira na uređaj za slikanje, kao što je fluorescentni ekran, na sloj fotografskog filma ili se detektuje senzorom kao što je CCD kamera. Na osnovu TEM analize mogu se dobiti informacije o morfologiji čestica u uzorku, odnosno mogu se odrediti njihova veličina i oblik. Takođe, ova vrsta mikroskopije pruža informacije o kristalografskoj strukturi, odnosno o načinu uređenja atoma i mogućem postojanju defekata koji su reda veličine atoma. GKT su analizirane pomoću transmisionog elektronskog mikroskopa (Philips CM200) primenom napona od 200 kV. Uzorci su pripremljeni nakapavanjem disperzije GKT na bakarnu mrežicu obloženu ugljenikom sa 300 proreza, prečnika ~63

μm (*engl.* drop casting method). UV-Vis spektri suspenzije GKT su detektovani u opsegu talasnih dužina od 260-510 nm korišćenjem spektrofotometra (Avantes Uv-Vis). Sva UV-Vis merenja sprovedena na 20°C su bila automatski korigovana u odnosu na rastvor korišćen za pravljenje suspenzije GKT. Fotoluminiscentna spektroskopija predstavlja nedestruktivnu metodu za dobijanje informacija o elektronskoj strukturi uzorka. Usmeravanjem svetlosti na uzorak, ona se apsorbuje i dolazi do prenosa viška energije na materijal u procesu fotoekscitacije. Višak energije se može rasejati od strane uzorka emisijom svetlosti ili luminiscencijom. U slučaju fotoekscitacije, to je proces fotoluminiscencije. Energija emitovane svetlosti, odnosno fotoluminiscencija, predstavlja razliku između energetske nivoa između dva elektronska stanja koja su bila uključena u prelaz između ekscitovanog i ravnotežnog stanja. GKT pokazuju fotoluminiscenciju zavisnu od talasne dužine ekscitacije. Spektri fotoluminiscencije GKT mereni su na spektrofluorimetru (Fluorolog-3 FL3-221), na sobnoj temperaturi, upotrebom 450 W Xenon lampe kao izvora ekscitacije (328 nm) i R928P fotomultiplikatorske tube kao detektora. Elektronska paramagnetna rezonanca (EPR) je metoda pomoću koje se detektuje zračenje emitovano od strane nesparenih elektrona u magnetnom polju, pri čemu su analizirani suvi uzorci GKT u čvrstom stanju. EPR je takođe korišćen i kao senzitivna metoda za detekciju singletnog kiseonika produkovanog od strane GKT. Pri reakciji 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TMP) sa oslobođenim superoksidnim anjon radikalom O_2^- nastaje stabilni nitroksidni radikal TEMPOL i dolazi do ultrafinog razdvajanja EPR signala na tri uske linije, što se detektuje spektrometrijski (Vileno i sar., 2010). Smeša koja je sadržala 0,18 ml TMP (Sigma-Aldrich) i 2 ml suspenzije GKT (1 mg/ml) bila je ultrasonifikovana i izložena dejstvu plave svetlosti (465-475 nm, 1 W) na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 min. Alikvoti (7 μl) TMP-GKT smeše su premeštani u kvarcne tube unutrašnjeg prečnika 3 mm i TEMPOL signal analiziran je na spektrometru (Magnettech GmbH), koristeći kao kontrolu smešu TMP i rastvora bez GKT.

3.6. Testovi vijabilnosti

Uticaj GKT na vijabilnost ćelija je određivan kolorimetrijskim metodama zasnovanim na merenju aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza, kisele fosfataze,

laktat dehidrogenaze, kao i određivanjem broja adherentnih ćelija kristal violet testom, nakon tretmana od 24 h.

3.6.1. Test aktivnosti mitohondrijalnih dehidrogenaza

MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid) test je zasnovan na redukciji ove tetrazolijumske soli dehidrogenazama poreklom iz ćelijskih mitohondrija. U ovoj reakciji dolazi do cepanja tetrazolijumskog prstena i nastanka formazana, koji poseduje karakterističnu boju. MTT mogu da redukuju samo dehidrogenaze poreklom iz aktivnih mitohondrija živih ćelija, te je ovaj kolorimetrijski test pogodan za merenje broja vijabilnih ćelija, njihove metaboličke aktivnosti i proliferacije. Nakon završetka tretmana i uklanjanja medijuma u bunariće je dodato po 50 µl rastvora MTT (0,5 mg/ml u medijumu). Posle inkubacije od 1 h na 37°C, supernatanti su odlivani, a ćelije lizirane DMSO-om (50 µl) koji rastvara stvoreni formazan. U bunarima se razvijala karakteristična crveno-ljubičasta boja, čiji je intenzitet određivan spektrofotometrijski merenjem apsorbancije (570 nm) na automatskom čitaču mikrotitarskih ploča (Sunrise; Tecan). Od svake vrednosti je oduzeta apsorbancija samog rastvora MTT. Intenzitet razvijene boje i odgovarajuća vrednost apsorbancije bili su proporcionalni broju živih ćelija.

3.6.2. Kristal violet test

Kristal violet test omogućava određivanje relativnog broja adherentnih ćelija (Flick i Gifford, 1984). Nakon odgovarajućeg tretmana kultura je tri puta ispirana PBS-om da bi se odstranile neadherentne ćelije. Usledila je fiksacija adherentnih ćelija metanolom 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom i bojenje fiksiranih ćelija rastvorom kristal violeta (1%) u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, bunarići su intenzivno ispirani vodom da bi se odstranila boja koju nisu primile fiksirane ćelije. Boja ugrađena u ćelije je rastvorena u 33% rastvoru sirćetne kiseline, a intenzitet nastale boje je određivan merenjem apsorbancije svetlosti (570 nm) na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju (Sunrise; Tecan). Izmerene apsorbancije odgovarale su broju adherentnih ćelija. Od svake vrednosti je oduzeta vrednost

apsorbancije iz bunara koji je inkubiran sa rastvorom kristal violet boje bez ćelija. Rezultati MTT i kristal violet testa su predstavljeni kao % vijabilnosti u odnosu na kontrolne (netretirane) kulture čija je vijabilnost arbitrarno postavljena na 100%.

3.6.3. Test oslobađanja laktat dehidrogenaze

Ćelijska smrt praćena gubitkom integriteta ćelijske membrane analizirana je primenom testa koji meri aktivnost citosolnog enzima laktat dehidrogenaze (LDH), koji se nakon oštećenja ćelijske membrane oslobađa u supernatant (Raicevic i sar., 2005). Aktivnost LDH u medijumu za kultivaciju direktno je proporcionalna broju ćelija sa oštećenom membranom u kulturi i zato se može smatrati merom citotoksičnosti ispitivanog agensa. Pored kontrole netretiranih ćelija (žive ćelije), u testu se koristi i pozitivna kontrola (100% mrtve ćelije), koju čine netretirane ćelije lizirane deterdžentom triton X-100 (3%). Ćelije u pozitivnoj kontroli, usled potpunog narušavanja integriteta ćelijske membrane maksimalno oslobađaju citosolnu LDH. Princip LDH testa se zasniva na dve oksido-redukcije. U prvoj reakciji LDH katalizuje oksidaciju laktata do piruvata uz istovremenu redukciju NAD^+ do NADH i H^+ . U drugoj reakciji se uz pomoć N-metilfenazonijum metilsulfata kao prenosioca nastalog H^+ jodonitrotetrazolijum redukuje do intenzivno crveno obojenog rastvorljivog formazana, koji apsorbuje svetlost talasne dužine 492 nm.

Test je izvođen tako što je na kraju tretmana po 50 μl supernatanta iz svakog bunara preneto u novu ploču i mešano sa istom zapreminom supstrata za LDH (54 mM mlečna kiselina, 0,28 mM N-metilfenazonijum metilsulfat, 0,66 mM jodonitrotetrazolijum hlorid, 1,3 mM β -nikotinamid adenin dinukleotid koji su rastvoreni u 0,2 M Tris puferu, pH 8,2). Nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi, očitana je apsorbcija na 492 nm sa korekcijom na 592 nm na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju (Sunrise, Tecan). Od svake vrednosti je oduzeta apsorbcija smeše supstrata za LDH i čistog medijuma, i rezultati su predstavljeni u procentima citotoksičnosti u odnosu na ćelije lizirane sa triton X-100 (pozitivna kontrola, 100% mrtve ćelije), koja je izračunata pomoću prikazane formule:

$$\%C = [(E-S)/(M-S)] \times 100, \text{ gde je:}$$

E - apsorbancia tretiranih ćelija

S - apsorbancia kontrolnih (netretiranih) ćelija

M - apsorbancia mrtvih ćelija dobijenih liziranjem sa triton X-100

C - citotoksičnost (broj ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane)

3.6.4. Test aktivnosti kisele fosfataze

Test se zasniva na merenju aktivnosti lizozomalnog enzima kisele fosfataze koja predstavlja meru vijabilnosti ćelija (Connolly i sar., 1986). Ćelije koje su na kraju tretmana žive i poseduju aktivnu kiselu fosfatazu liziraju se pomoću tritona X-100. Na taj način ovaj lizozomalni enzim izlazi iz citosola u vanćelijski prostor, gde reaguje sa supstratom p-nitrofenil fosfatom (pNPP). U prvom koraku reakcije kisela fosfataza defosforiliše p-NPP pri čemu nastaje p-nitrofenol, dok u drugom koraku dolazi do deprotonovanja p-nitrofenola u baznoj sredini pri čemu nastaje žuto obojen p-nitrofenolat. Intenzitet boje proporcionalan je aktivnosti kisele fosfataze, odnosno broju živih ćelija.

Ukratko, na kraju inkubacije medijum za kultivaciju je odstranjen i u svaki bunarić je dodato po 100 μ l sveže pripremljenog rastvora sa supstratom za kiselu fosfatazu i tritonom X-100 (10 mM p-nitrofenil fosfat i 0,1% triton X-100 u 0,1 M natrijum acetatu, pH 5,5). Nakon inkubacije od 1 h na 37°C, reakcija je prekinuta dodavanjem 50 μ l 1 M NaOH. Apsorbancija dobijenog žutog produkta je merena na talasnoj dužini od 405 nm na automatskom čitaču ploča za mikrotitraciju (Sunrise, Tecan). Od svake vrednosti je oduzeta apsorbancija samog rastvora sa supstratom i NaOH i rezultati su predstavljeni kao procenat vijabilnosti kontrole, tj. netretiranih ćelija čiji je vijabilnost 100%.

3.7. Analiza parametara ćelijske smrti

Parametri ćelijske smrti su analizirani metodom protočne citofluorimetrije na aparatu FACSCalibur (BD Biosciences). Svaka analiza je obuhvatila 10000 događaja, tj.

ćelija po pojedinačnom uzorku za tretmane koji su rađeni u duplikatu ili triplikatu. Dobijeni podaci su analizirani korišćenjem softvera BD Cell Quest Pro.

3.7.1. Određivanje apoptoze

Da bi se utvrdio udeo apoptotičnih i nekrotičnih ćelija u kulturi nakon odgovarajućih tretmana ćelije su bojene aneksin V-fluorescein-izotiocijanatom (aneksin V-FITC) i propidijum jodidom (PI), a zatim analizirane na protočnom citofluorimetru. Aneksin V je protein mase 35-36 kDa obeležen fluorohromom (FITC) koji nakon pobuđivanja svetlošću argonskog lasera FACSCalibur aparata (talasna dužina 488 nm) emituje zelenu fluorescencu (FL1 detektor). Aneksin V-FITC se vezuje za fosfatidilserinske ostatke koji se kod ćelija u ranoj fazi apoptoze nalaze sa spoljašnje strane ćelijske membrane čiji integritet je očuvan. PI je fluorescentna boja koja se umeće između nukleobaza dvolančane DNK i po pobuđivanju laserskom svetlošću protočnog citofluorimetra emituje crvenu fluorescencu (FL2 detektor) koja je proporcionalna sadržaju DNK u ćeliji. PI ne može da prođe kroz očuvanu ćelijsku membranu, ali prolazi kroz oštećenu membranu ćelija u kasnoj fazi apoptoze i nekrotičnih ćelija i vezuje se za DNK. Dvostrukim bojenjem sa aneksin V-FITC i PI se mogu razlikovati populacije ćelija koje se na tačkastom dijagramu prikazuju u kvadratnoj raspodeli kao: žive (aneksin⁻/PI⁻), ćelije u ranoj fazi apoptoze (aneksin⁺/PI⁻) i ćelije u kasnoj fazi apoptoze, odnosno nekrotične ćelije (aneksin⁺/PI⁺). Nakon odgovarajućih tretmana, bojenje ćelija je sprovedeno prema instrukcijama proizvođača (BD Pharmingen). Ćelije su iz ploče sa 24 bunara tripsinizirane i prebacivane u odgovarajuće FACS epruvete. Nakon centrifugiranja (500 g, 5 min., 22°C) i pranja (1 ml PBS-a), talog ćelija je resuspendovan u 100 µl 10x razblaženog originalnog pufera (aneksin-vezujući pufer) u koji je dodato 10 µl PI (20 µg/ml) i 0,2 µl aneksin V-FITC (2 µg/ml). Po isteku inkubacije (30 minuta, 37°C, u mraku) u suspenziju ćelija je dodato 400 µl pufera. Uzorci su zatim analizirani na protočnom citofluorimetru. Rezultati su izraženi kao udeo odgovarajućih ćelijskih populacija u ukupnom broju analiziranih ćelija. Procenat aneksin⁻/PI⁻, aneksin⁺/PI⁻ i aneksin⁺/PI⁺ ćelija određivan je korišćenjem CellQuest Pro softvera.

3.7.2. Određivanje fragmentacije DNK

Fragmentacija DNK je ispitivana protočnom citofluorimetrijom, nakon fiksacije ćelija u etanolu i bojenja PI po prethodno opisanom protokolu (Raicevic i sar., 2005). Ova metoda omogućava razlikovanje faza ćelijskog ciklusa, a može se koristiti i za određivanje broja ćelija sa hipodiploidnim sadržajem DNK, odnosno fragmentisanom DNK kao parametrom apoptoze. Princip ove metode zasniva se na osobini PI da se umeće u dvolančani molekul nukleinskih kiselina i emituje crvenu fluorescencu proporcionalnu sadržaju DNK u ćeliji. U kasnoj fazi apoptoze endonukleaze razgrađuju DNK u male fragmente veličine oko 180 baznih parova, koji se akumuliraju u ćeliji. Ovi oligomeri se mogu ukloniti fiksiranjem ćelija pomoću etanola i ispiranjem PBS-om, čime se smanjuje sadržaj DNK u ćeliji. S obzirom na manji sadržaj DNK, apoptotične ćelije se nakon bojenja sa PI i očitavanja crvene fluorescence na protočnom citofluorimetru distribuiraju ispred vijabilnih ćelija na histogramu formirajući zonu specifičnu za apoptozu - sub-G₀/G₁ ili hipodiploidni region. Pošto se PI vezuje i za RNK neophodno je razgraditi RNK prisutnu u uzorku primenom RNA-ze. Ukratko, po isteku tretmana ćelije su tripsinizirane, 2 puta oprane sa po 1 ml PBS-a, resuspendovane u 300 µl PBS-a i fiksirane sa 700 µl hladnog apsolutnog etanola (finalno 70%). Sadržaj svake epruvete je zatim pažljivo resuspendovan, a epruvete ostavljene na +4°C preko noći. Zatim su ćelije centrifugirane (800 g, 7 minuta, 22°C), oprane u FCS-u, a talog ćelija je resuspendovan u 500 µl PBS-a uz dodatak 1 µg/ml RNA-ze (Sigma-Aldrich). Po isteku 15 minuta inkubacije na 37°C, u svaku epruvetu je dodavano 20 µg/ml PI. Nakon 30 minuta inkubacije na 37°C u mraku, usledila je analiza na protočnom citofluorimetru. Udeo hipodiploidnih ćelija u sub-G₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa je analiziran korišćenjem Cell Quest Pro softvera. Rezultati su izraženi kao % ćelija u sub-G₀ fazi u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija.

3.7.3. Određivanje aktivacije kaspaza

Aktivacija kaspaza je merena na protočnom citofluorimetru, nakon obeležavanja ćelija sa ćelijski permeabilnim inhibitorom pan-kaspaza, ApoStat-om, koji je konjugovan sa FITC-om, prema instrukcijama proizvođača (ApoStat; R&D Systems). Kaspaze su cistein proteaze koje nakon aktivacije razgrađuju ćelijske proteine i dovode

do reorganizacije citoskeleta, fragmentacije DNK, kondenzacije hromatina i odgovorne su za pokretanje i izvršavanje smrti ćelije apoptozom. ApoStat se selektivno vezuje za aktivirane kaspaze, a intenzitet fluorescence FITC-a, koji se detektuje na protočnom citofluorimetru, direktno je proporcionalan aktivnosti kaspaza u ćeliji. Ukratko, nakon odgovarajućih tretmana ćelije su tripsinizirane, centrifugirane (500 g, 5 minuta, 22°C) i oprane u PBS-u. Zatim je talog ćelija resuspendovan u 300 µl medijuma koji je sadržao 3 µl fluorescentno obeleženog pan-kaspaznog inhibitora (finalna koncentracija 0,5 µg/ml). Po isteku 30 minuta inkubacije na 37°C, ćelije su oprane da bi se isprala nevezana boja i resuspendovane u 500 µl PBS-a, nakon čega su analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele intenziteta zelene fluorescence i prikazani su kao % ćelija u kojima su aktivirane kaspaze. Porast zelene fluorescence u odnosu na kontrolu predstavljao je meru aktivnosti kaspaza u tretiranoj populaciji ćelija.

3.8. Analiza ćelijske smrti kod bakterija

Ćelijska smrt bakterija je analizirana bojenjem bakterijskih suspenzija PI. Bakterije su inkubirane sa 4 µM PI 15 min. na 25°C u mraku. Crvena fluorescencija ćelija obojenih PI, proporcionalna sadržaju DNK u ćeliji, analizirana je na fluorescentnom mikroskopu (Axiolab HB 50, Zeiss) na uveličanju 100x (refraktorni indeks imerzionog ulja 1,25) pri ekscitaciji svetlošću talasne dužine 536 nm. Posmatrana polja su nasumično fotografisana (5 polja po uzorku) pomoću digitalne kamere (Nikon).

3.8.1. Određivanje broja bakterija u suspenziji

Određivanje broja bakterija u suspenziji izvršeno je standardnom metodom koja se zasniva na brojanju kolonija na čvrstoj hranljivoj podlozi (agar). Kolonija je golim okom vidljiva formacija na čvrstoj hranljivoj podlozi nastala razmnožavanjem jedne bakterijske ćelije. Bakterijske suspenzije su zasejavane na tripkaza-soja agar (bioMérieux) u odgovarajućim razblaženjima kako bi se omogućilo precizno brojanje. Krajnji broj kolonija na agaru, odnosno broj živih bakterijskih ćelija koje formiraju

kolonije (*engl.* colony forming unit, CFU), iznosio je između 100 i 1000. Inokulisane podloge su inkubirane 24 h na 37°C pod aerobnim uslovima.

3.8.2. Morfološka analiza bakterija mikroskopijom atomskih sila

Bakterijske ćelije su nakon tretmana fotoekscitiranim GKT fiksirane u 2,5% glutaraldehidu (pH 6,8) u trajanju od 2,5 h na 4°C, nakon čega su oprane u PBS-u. Merenja pomoću AFM su izvedena po već opisanom protokolu za GKT i različiti AFM parametri su određivani za najmanje 30 bakterijskih ćelija po uzorku.

3.9. Određivanje produkcije RKV

3.9.1. Određivanje intracelularne produkcije RKV

Da bi se odredila ukupna produkcija RKV, ćelije su bojene neselektivnim redoks senzitivnim bojama DHR i H₂DCFDA, dok je za detekciju produkcije superoksidnog anjona korišćena fluorescentna boja DHE. DHR ulazi slobodno u ćelije, a nakon reakcije sa RKV oksiduje se u katjonsku formu rodamin koji fluorescira zeleno (Qin i sar., 2008). DCFDA se nakon ulaska u ćelije deacetiluje pomoću ćelijskih esteraza u nefluorescentno jedinjenje, koje se oksiduje u kontaktu s RKV i nastaje 2', 7' - dihlorofluorescin (DCF) koji takođe fluorescira zeleno. DHE slobodno ulazi u ćeliju i reaguje sa superoksidnim anjon radikalom (O₂⁻), pri čemu se formira krajnji produkt etidijum, koji interkalira u DNK i emituje crvenu fluorescencu. Ukratko, DHR i DCFDA su dodavani u ćelijsku kulturu na početku tretmana u finalnoj koncentraciji 2 μM, dok je DHE dodavan po isteku tretmana (20 μM) i inkubiran 30 minuta na 37°C. Nakon toga ćelije su tripsinizirane, prebačene u odgovarajuće epruvete i centrifugirane (500 g, 5 minuta, 22°C), a zatim oprane sa 1 ml PBS-a. Ćelije su finalno resuspendovane u 500 μl PBS-a i analizirane na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u obliku histograma raspodele fluorescence (FL1 za DHR i DCFDA bojenja, a FL2 za DHE bojenje), pri čemu pomeraj histograma tretiranih ćelija udesno u odnosu na kontrolu, ukazuje na povećanje produkcije RKV, odnosno superoksidnog anjona.

3.9.2. Određivanje produkcije RKV u sistemu bez ćelija

Flourescentna boja DHR je korišćena i za merenje RKV u sistemu bez ćelija, korišćenjem Chameleon (Hidex) fluorescentnog čitača pri ekscitaciji od 488 nm i detekciji na 535 nm. Različite koncentracije GTK su mešane sa fluorescentnom bojom DHR (2 μ M) i na čitaču je praćena promena koncentracije nastalih RKV. EPR spektroskopija je korišćena za detekciju singletnog kiseonika koji produkuje GKT u vodenom rastvoru. Metoda se zasniva na sposobnosti 2,2,6,6-tetrametilpiperidina, diamagnetika rastvorljivog u vodi, da veže singletni kiseonik i pri tome generiše paramagnetni proizvod, stabilni nitroksidni radikal TEMPOL (Lion i sar., 1976). Nespareni elektron se nalazi na NO grupi TEMPOL radikala, što dovodi do hiperfinog cepanja EPR signala na tri uske linije usled interakcije između nesparenog elektronskog spina i jezgra azota ^{14}N . Smeša koja sadrži 0,18 ml TMP (Sigma-Aldrich) i 2 ml GKT (1 mg/ml) je ultrasonifikovana i izložena dejstvu plave svetlosti (465-475 nm, 1 W) na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 min. Alikvoti (7 μ l) TMP-GKT smeše prebaćeni su u kvarcne kivete unutrašnjeg prećnika 3 mm i TEMPOL signal analiziran je na spektrometru (Magnettech GmbH), koristeći kao kontrolu smešu TMP i kontrolnog rastvora bez GKT. Kvantifikacija signala je postignuta izraćunavanjem srednjih vrednosti amplituda EPR signala, a rezultati su prikazani kao relativne vrednosti.

3.9.3. Određivanje produkcije RKV u bakterijama

Intracelularna produkcija RKV u bakterijama je analizirana bojenjem bakterijskih suspenzija DHR-om. Nakon tretmana bakterijske suspenzije su oprane i obojene sa 5 μ M DHR-om (Invitrogen/Life Technologies) i inkubirane 20 min. u mraku na 25°C, a zatim analizirane na fluorescentnom mikroskopu (Axiolab HB 50, Zeiss) na uvelićanju 100x (refraktorni indeks imerzionog ulja 1,25) pri ekscitaciji svetlošću talasne dućine od 488 nm. Posmatrana polja su nasumićno fotografisana (5 polja po uzorku) pomoću digitalne kamere (Nikon).

3.10. Fazno kontrastna mikroskopija

Morfološke promene U251 ćelijske linije glioblastoma čoveka, analizirane su pomoću fazno-kontrastnog mikroskopa (Leica Microsystems DMIL) pomoću Leica Microsystems DFC320 kamera i Leica Application Suite (verzija 2.8.1), pri čemu je izabrano uveličanje od 20x.

3.11. Ultrastrukturna analiza ćelija na transmisionom elektronskom mikroskopu

Analiza strukture i prisustvo vakuola u ćelijama tretiranim sa GKT proučavani su na transmisionom elektronskom mikroskopu (TEM). Ćelije su zasejavane u 60 mm Petri šolje, tretirane, i po isteku 24 h tripsinizirane, prebačene u odgovarajuće epruvete i centrifugirane (500 g, 5 minuta, 22°C), a zatim oprane dva puta sa 1 ml PBS-a. Nakon poslednjeg pranja (200 g, 5 minuta, 22°C), ćelije su fiksirane 3% gluteraldehidom u PBS-u, isprane u kakodilatnom puferu 30 minuta, i fiksirane 1% osmijum tetroksidom u trajanju od 1 h. Ćelije su opet isprane kakodilatnim puferom i ostavljene u uranil acetatu preko noći. Po isteku 24 h izvršena je dehidracija u alkoholima rastuće koncentracije i propilenoksidu i započeto je kalupljenje u EPON 812 (Agar Scientific). Gotov kalup je isečen na ultramikrotomu. Prvo je napravljen polutanki isečak koji je obojen toluidin plavim i na njemu je izabran deo koji će biti isečen za ultratanke isečke. Zatim su ultratanki isečki hvatani na bakarne mrežice, kontrastirani uranil acetatom i olovo citratom, i analizirani na TEM (Morgagni 268D, FEI).

3.12. Analiza ćelija na konfokalnom mikroskopu

Intracelularna lokalizacija GKT je analizirana na konfokalnom mikroskopu (LeicaTCS SP2). Ćelije su zasejavane u posebne ploče sa komoricom i tretirane fotoekscitiranim GKT. Nakon tretmana u trajanju od 4 h, ćelije su oprane u PBS-u i fiksirane u 4% paraformaldehidu, a intenzitet zelene fluorescence (530 nm) koju emituju GKT detektovan je pomoću konfokalnog mikroskopa na uveličanju 40x.

3.13. Imunoblot analiza

Aktivnost i ekspresija proteina je određena iz ukupnog ćelijskog ekstrakta imunoblot (Western blot) analizom nakon elektroforetskog razdvajanja proteina. Koncentracija totalnih proteina u lizatu ćelija iz kojih je rađena imunoblot analiza je određivana metodom po Bradford-u (Bradford, 1976), pri čemu je kao standard korišćen BSA. Test je izvođen mešanjem 980 µl Bradfordovog reagensa (0,1 mg/ml Coomassie Brilliant Blue G-250, 5% (v/v) etanol, 10% (v/v) H₃PO₄ u vodi) sa 20 µl uzorka (1:2 razblaženje proteina). Nakon 10 minuta očitavana je apsorbancija na talasnoj dužini od 595 nm i koncentracija proteina u uzorku je izračunata u odnosu na standardnu krivu. Neposredno po završetku inkubacije ćelije su lizirane na ledu u sveže pripremljenom puferu za lizu ćelija uz dodatak inhibitora proteaza i fosfataza (30 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM PMSF, 20 µl/ml koktela proteaznih inhibitora, 2 mM Na₃VO₄ i 50 mM NaF). Ćelijski lizati su zatim inkubirani 15 minuta na ledu, uz povremeno snažno mešanje na vorteksu, centrifugirani (14000 g, 15 min., 4°C), a dobijeni supernatanti, koji su predstavljali ukupan ćelijski ekstrakt, su čuvani na -20°C do upotrebe. Uzorci za elektroforezu su pripremljeni kuvanjem (5 min., 100°C) određene zapremine ukupnog ćelijskog ekstrakta sa odgovarajućom zapreminom redukujućeg pufera za pripremu uzorka (finalne koncentracije sastojaka pufera nakon kuvanja uzorka su bile: 2% SDS, 10% glicerol, 2 mM 2-merkaptioetanol, 0,002% bromfenol plavo, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8). U ovom koraku proteini su denaturisani i obloženi negativno naelektrisanim SDS molekulima. Dodatkom 2-merkaptioetanolu u pufer sprečeno je formiranje disulfidnih veza u denaturisanim proteinima. Zahvaljujući SDS-u svi proteini u uzorku postali su negativno naelektrisani i razlikovali su se međusobno samo po molekulskim masama. Proteini iz skuvanih uzoraka su zatim razdvojeni na osnovu razlika u molekulskim masama elektroforezom u 10% (za analizu p62 proteina i β-aktina) ili 12% (za analizu LC3 proteina) poliakrilamidnom gelu. U bunare su sipane jednake količine proteina (od 10 µg do 50 µg, zavisno od analiziranog proteina). Uzorci su nanošeni na gel za sabijanje proteina (4% akrilamid/0,14% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,125M Tris-HCl, pH 6,8), koji je prethodno naslojen na gel za razdvajanje proteina (10% akrilamid/0,34% bisakrilamid ili 12% akrilamid/0,41% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8). Kao katalizatori polimerizacije gelova korišćeni su 0,05% amonijumpersulfat i 0,033% TEMED. Pufer za rezervoare u

kojem je tekla elektroforeza se sastojao od 192 mM glicina, 0,1% SDS i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3. Elektroforetsko razdvajanje je trajalo oko 90 min. pri konstantnom naponu. Prvih 20 minuta primenjivan je konstantni napon od 100 V, a nakon prolaska uzoraka kroz gel za sabijanje proteina, napon je povećan na 150 V. Uzorci su putovali kroz gel do izlaska fronta boje bromfenol plavo sa gela. U cilju određivanja molekulskih težina na svaki gel je naneta i smeša referentnih proteina poznatih molekulskih masa (10-250 kDa, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; BioRad). Po završetku elektroforeze proteini sa gela su odmah transferisani na nitrocelulozne membrane (Hybond C; GE Healthcare) pomoću aparature za polusuvi transfer (TE 70 Semi-dry transfer unit, Amersham Biosciences). Nitrocelulozne membrane su inkubirane 1-2 minuta u puferu za transfer (192 mM glicin, 20% metanol i 25 mM Tris-HCl, pH 8,3) i postavljene u aparaturu na visoko adsorbujući filter papir, koji je prethodno natopljen transfer puferom. Gelovi su isprani malom količinom istog pufera i postavljeni pažljivo na membrane, a preko gela je smešten još jedan sloj visoko adsorbujućeg filter papira natopljenog puferom. Membrana je bila okrenuta ka pozitivnoj, a gel ka negativnoj elektrodi čime je omogućeno da pod dejstvom struje konstantne jačine (0,8 mA/cm² membrane) negativno naelektrisani proteini putuju sa gela ka pozitivnoj elektrodi. Na putu ka anodi proteini su zaustavljani od strane membrane, koja ih je vezivala za sebe. Transfer se odvijao na sobnoj temperaturi i trajao je ukupno 90 min. Po završetku transfera delovi membrane sa proteinima od interesa su inkubirani 60 min. na sobnoj temperaturi u 5% rastvoru odmašćenog mleka u Tris puferu (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6) sa 0,05% Tween 20 deterdženta (u kasnijem tekstu TBST). Na taj način su blokirana nespecifična mesta vezivanja proteina na membranama. Membrane su potom inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelom preko noći na temperaturi od 4°C uz blago mešanje, pri čemu su se antitela vezivala za odgovarajuće proteinske epitope. Korišćena su sledeća razblaženja antitela u rastvoru za blokiranje: 1:900 za anti-LC3, 1:1500 za p62 i 1:8000 za anti-β-aktin (Cell Signaling Technology). Nakon 3 ispiranja u TBST-u, membrane su inkubirane sa sekundarnim antitelom, anti-zečijim IgG konjugovanim sa peroksidazom rena (Jackson IP Laboratories), 75 min. na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije membrane su ponovo isprane 3 puta i prelivane 3 min. hemiluminiscentnim reagensom (GE Healthcare). Peroksidaza, koja je vezana za sekundarno antitelo je razgrađivala H₂O₂ iz supstrata do kiseonika i vode. Kiseonik je

reagovao sa luminolom iz supstrata uz nastanak 3-aminofalata, koji je emitovao foton. Nastala svetlost je zabeležena na rendgenskom filmu (Hyperfilm™ ECL; GE Healthcare), a intenzitet hemiluminiscence je bio direktno proporcionalan količini proteina vezanog za membranu. Ispiranje primarnog i sekundarnog antitela vršeno je sa TBST puferom. Nakon razvijanja filma relativna optička gustina imunoreaktivnih traka LC3-II i p62 proteina u odnosu na aktin kvantifikovana je denzitometrijom korišćenjem ImageJ softvera. Rezultati su predstavljeni u odnosu na netretiranu kontrolu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost 1.

3.14. Transfekcija pomoću shRNA (*engl. short hairpin RNA*)

Da bi se inhibirala ekspresija LC3B, U251 ćelije su transfektovane pomoću shRNA za humani LC3B, kao i kontrolnom shRNA (Santa Cruz Biotechnology). U251 ćelije su zasejavane u ploču sa 6 bunara u RPMI medijumu sa 5% FCS-a, bez antibiotika i inkubirane preko noći. Liofilizovani plazmidi (kontrolni i LC3B) su rastvoreni u dejonizovanoj vodi (0,1 µg/ml u 10 mM TRIS-u i 1 mM EDTA), a zatim u transfekcionom medijumu bez antibiotika (10 µg/ml) (Rastvor A). Istovremeno, transfekcioni reagens (3 µl) je razblažen u transfekcionom medijumu bez antibiotika (Rastvor B). Rastvor A dodat je direktno u rastvor B, pažljivo resuspendovan i inkubiran 15-45 min. na sobnoj temperaturi da bi se formirao kompleks. Ćelije su oprane dva puta u transfekcionom medijumu, a zatim im je dodato 0,8 ml transfekcionog medijuma po bunaru i 200 µl kompleksa. Nakon 6 h inkubacije na 37°C u ćelijske kulture je dodata jednaka zapremina (1 ml) kompletnog medijuma za kultivaciju. Posle 24 h, uklonjen je plazmid bez ispiranja PBS-om, a nakon 48 h od transfekcije ćelijama je dodat medijum sa puromicinom. Stabilno transfektovane ćelije su selektovane inkubacijom u medijumu sa puromicinom (10 µg/ml).

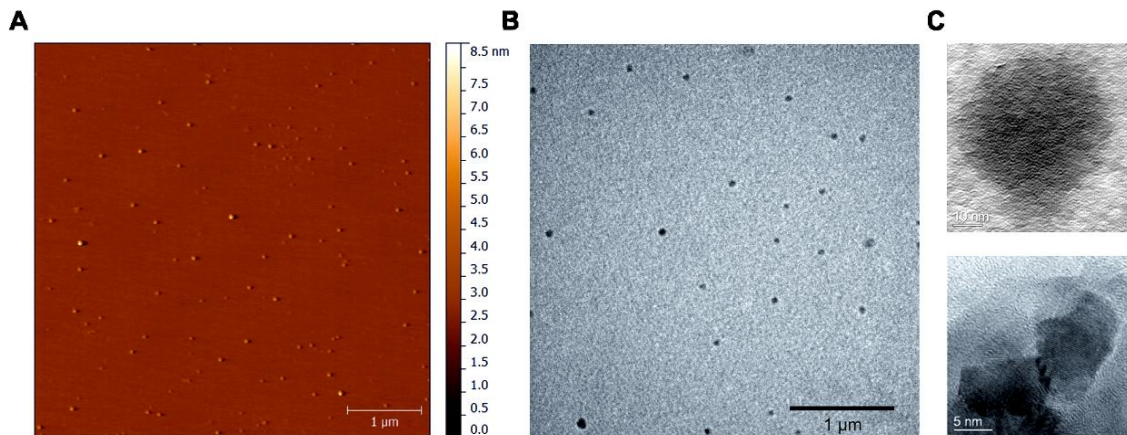
3.15. Statistička analiza

Za analizu statističke značajnosti razlike između tretmana korišćena je analiza varijanse (ANOVA) sa Student-Neuman-Keuls-ovim testom za višestruka poređenja. Vrednost $p < 0,05$ se smatrala statistički značajnom.

4. REZULTATI

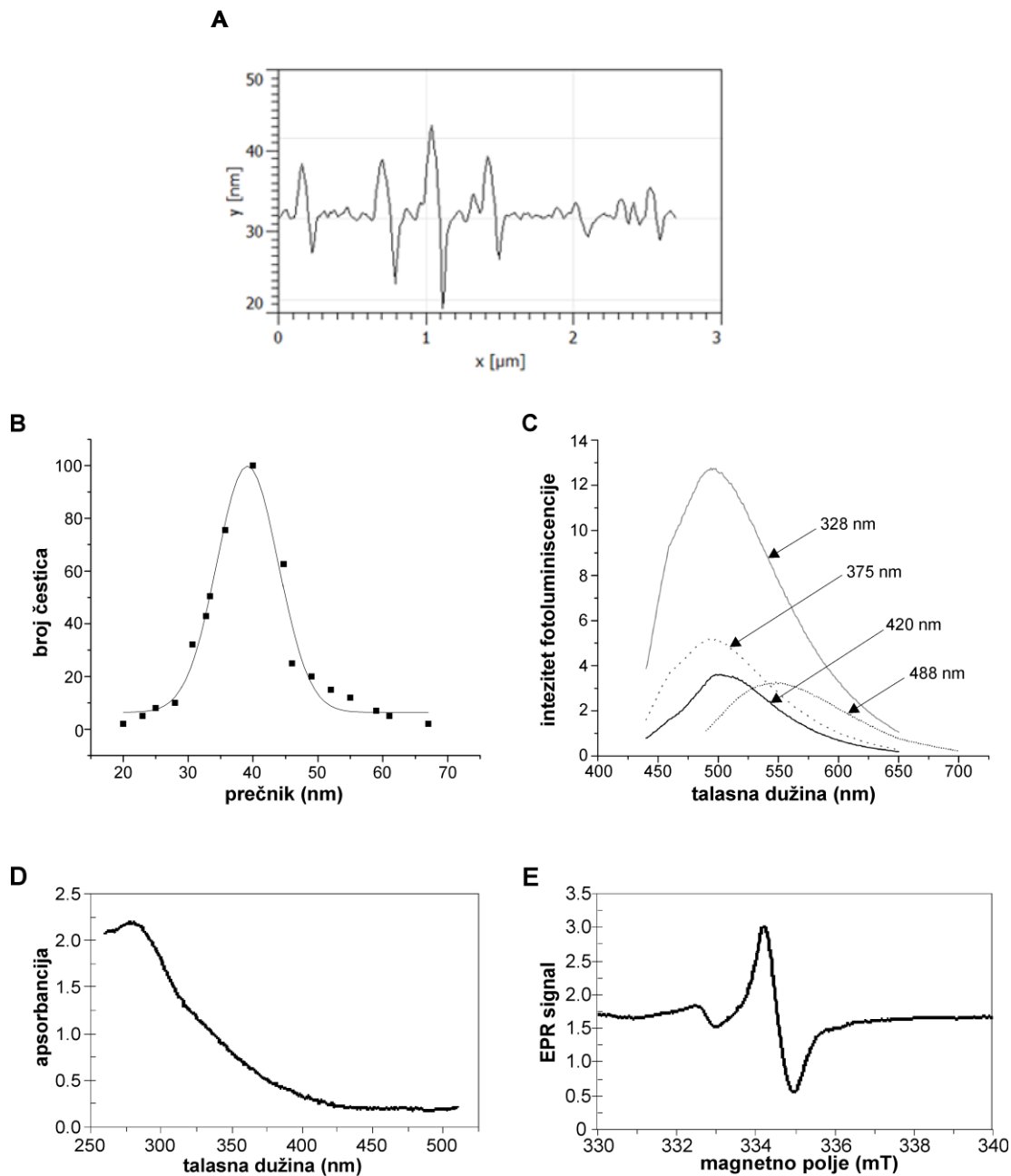
4.1. Karakterizacija GKT

Nakon sinteze GKT izvršena je njihova karakterizacija. Primenom metode mikroskopije atomskih sila dobijene su informacije o veličini čestica (dužina, širina, visina), kao i o njihovim fizičkim karakteristikama poput morfologije, hrapavosti i teksture površine. Na prikazanoj površini uzorka $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ jasno se vidi da su GKT nanometarskih dimenzija i tipičnog ovalnog oblika (Slika 3A, B). Pomoću statističke analize AFM slika izračunate su vrednosti za prečnik GKT koji je iznosio od 20-67 nm, sa prosečnom vrednošću od 40 nm (Slika 3A, 4B). Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim primenom TEM (Slika 3B, 3C gore), metode koja omogućava detaljnu analizu morfologije i strukturnih defekata kristalnih materijala. Analizom slika dobijenih pomoću TEM visoke rezolucije takođe je pokazano da su GKT oblika diska, kao i da poseduju izraženu kristalnu strukturu, sa parametrom rešetke od 0,263 nm, i cik-cak strukturom ivice (Slika 3C dole).



Slika 3. Karakterizacija GKT. (A) Slika GKT dobijena AFM, (B) TEM slika GKT, (C) Mikrografije GKT dobijene metodom TEM visoke rezolucije.

Visinski profil, dobijen AFM analizom, je pokazao da su GKT sintetisane elektrohemijском oksidacijom grafita, prosečne visine 3 nm, što teorijski odgovara visini troslojnog grafena (Slika 4A).



Slika 4. Karakterizacija GKT. (A) Visinski profil GKT, (B) Normalizovana distribucija veličine GKT dobijena pomoću AFM softvera (n=500), (C) Fotoluminiscentni spektar GKT izloženih različitim ekscitacionim talasnim dužinama, (D) UV-Vis spektar apsorbcije GKT, (E) EPR analiza GKT proizvedenih elektrohemijском oksidacijom grafita.

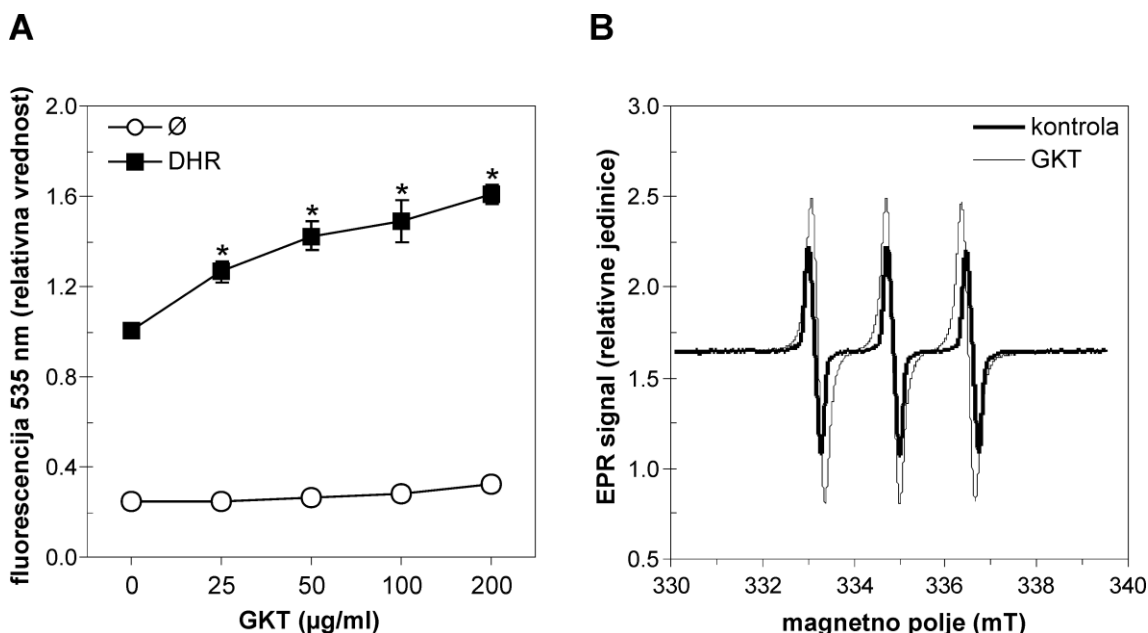
Optičke karakteristike GKT su određene analizom fotoluminiscentnih i UV-Vis spektara. Fotoluminiscentne osobine GKT su ispitane pobuđivanjem uzorka svetlošću različitih talasnih dužina (328, 375, 420 i 488 nm) (Slika 4C). Analizom fotoluminiscentnih spektara je pokazano da GKT imaju najveći intenzitet luminiscencije u vidljivom delu spektra, sa maksimalnom talasnom dužinom između 494-548 nm (Slika 4C). Intenzitet fotoluminiscencije se eksponencijalno smanjivao pri dostizanju viših talasnih dužina na osnovu čega se može zaključiti da GKT, kao i mnoge druge ugljenične luminiscentne nanočestice, imaju fotoluminiscentne osobine koje direktno zavise od ekscitacione talasne dužine. Na slici 4D prikazan je UV-Vis apsorpcioni spektar koji pokazuje da je vrednost apsorpcije GKT bila najviša u UV oblasti (275 nm). Sa spektra se jasno uočava apsorpcioni maksimum u UV oblasti na 260 nm koji se pripisuje π - π^* prelazima, odnosno vibraciji aromatičnih grupa, kao i dugačak „rep” koji se prostire duž vidljive oblasti (Jiang i sar., 2015; Shi i sar., 2015). Pomoću metode EPR uočen je unutrašnji signal nesparenog elektrona Lorencijanskog oblika, koji je pozicioniran u $g = 2,0051$ (Slika 4E), čija je linija bila široka 2 G, što je u skladu sa prisustvom ugljenikovih slobodnih radikala na površini GKT.

4.2. Fotoekscitirane GKT proizvode singletni kiseonik

Da bi se ispitalo da li GKT generisane elektrohemijском oksidacijom grafita, mogu da produkuju RKV, GKT su obojene DHR-om i analizirane su na

(Costa i sar., 2007). Pošto su dobijeni rezultati pokazali da su GKT, ekscitovane laserskom svetlošću talasne dužine (488 nm), značajno dozno zavisno povećale intenzitet DHR fluorescence u poređenju sa kontrolnim uzorcima bez GKT ili DHR (Slika 5A), moglo se zaključiti da GKT proizvode RKV. Imajući u vidu da neke fluorescentne boje koje se koriste u detekciji RKV daju lažno pozitivne rezultate kada se koriste sa ugljeničnim nanomaterijalima (Lyon i sar., 2008), dodatno je korišćena EPR spektroskopija kao osetljiva i selektivna metoda za detekciju singletnog kiseonika. Amplituda EPR signala emitovana od strane GKT izloženih dejstvu plave svetlosti (470 nm) bila je viša od amplitude dobijene u kontrolnom uzorku (Slika 5B), što je ukazivalo na sposobnost GKT da produkuju

singletni kiseonik nakon fotoekscitacije. Dakle, GKT sintetisane pomoću elektrohemijske oksidacije grafena proizvode RKV kada su ekscitirane plavom svetlošću, a deo produkovanih RKV potiče od singletnog kiseonika.

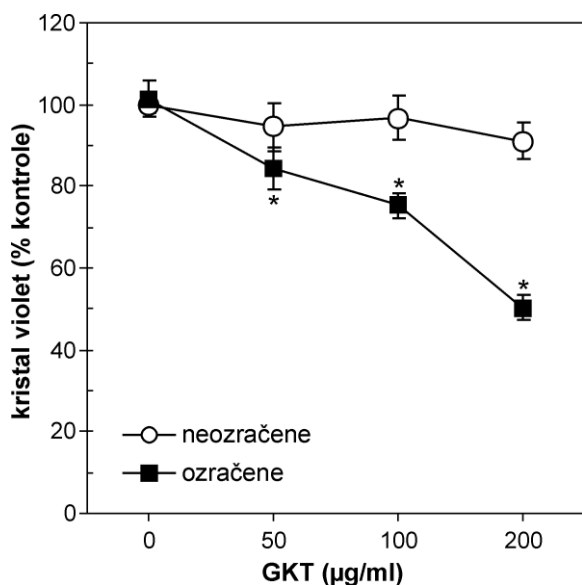


Slika 5. (A) RKV produkcija zavisna od koncentracije GKT, merena kao porast fluorescencije DHR-a. Suspenzija GKT ili odgovarajuća količina kontrole (DMSO) obojena je redoks senzitivnom bojom DHR (2 µm) i dobijeni intenzitet zelene fluorescencije (530 nm) detektovan je na fluorescentnom čitaču. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti (SV) ± standardna devijacija (SD) triplikata dobijenih iz najmanje tri nezavisna eksperimenta (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu), (B) EPR analiza produkcije singletnog kiseonika od strane GKT ozračenih plavom svetlošću (470 nm, 1W, 30 min.) i kontrolnog rastvora.

4.3. Fotoekscitirane GKT ubijaju U251 ćelije

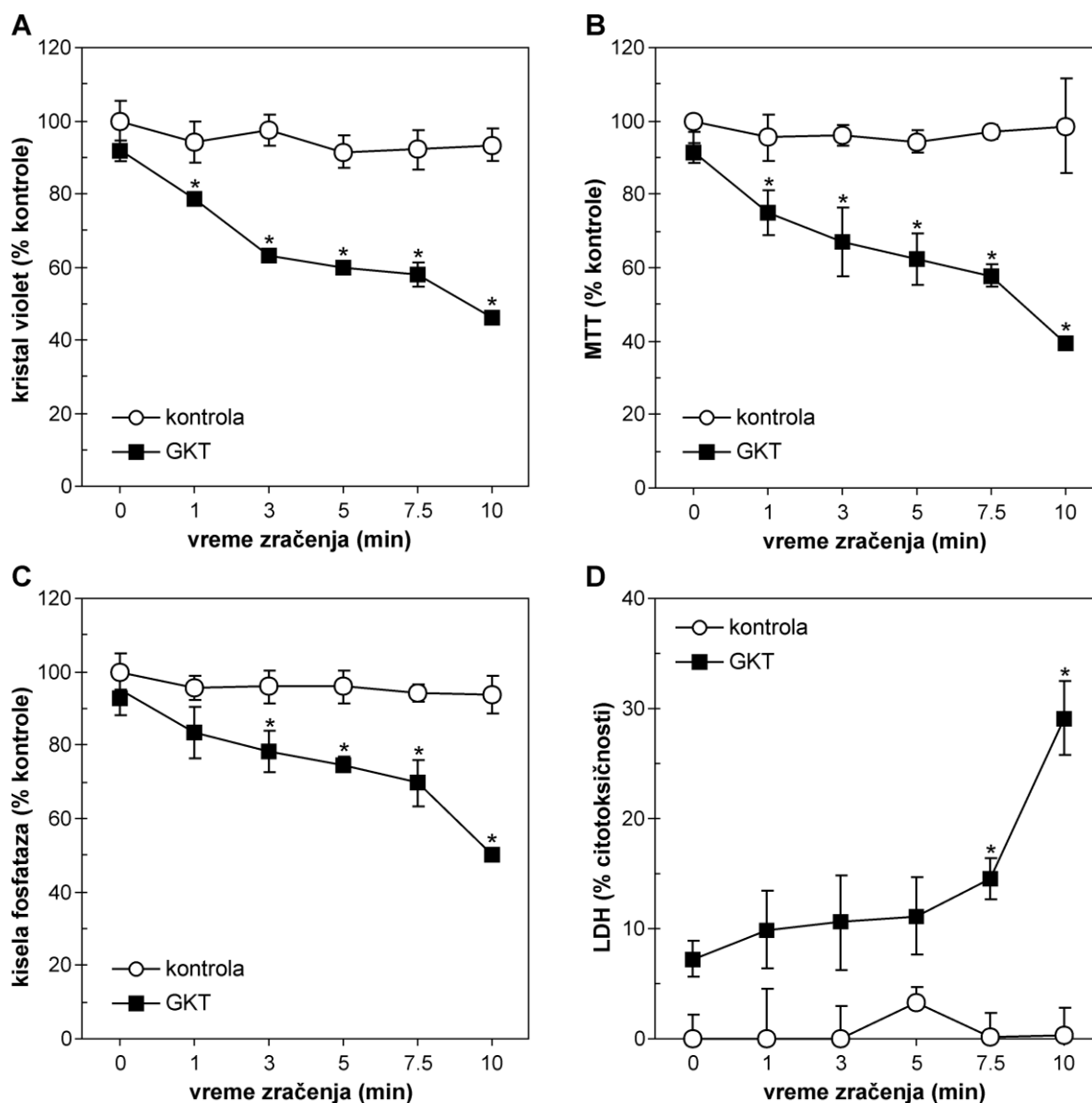
Nakon što je utvrđeno da GKT ozračene plavom svetlošću generišu singletni kiseonik, dalje je ispitivana njihova fotodinamička citotoksičnost i uticaj na vijabilnost ćelija U251 i humanog glioma. Da bi se odredila IC₅₀ vrednost ozračenih GKT, ćelije su istovremeno tretirane različitim koncentracijama GKT (50-200 µg/ml) i izlagane dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W)

u trajanju od 10 min. Nakon 24 h, vijabilnost ćelija je analizirana određivanjem broja adherentnih ćelija kristal violet testom. Pojedinačni tretmani GKT ili plavim svetlom nisu imali uticaj na vijabilin , dok su fotoekscitirane GKT na dozno zavisian način smanjile vijabilnost U251 ćelija (Slika 6). IC₅₀ vrednost je bila približno 200 µg/ml i korišćena je u daljim eksperimentima.



Slika 6. Fotoekscitirane GKT smanjuju vijabilnost ćelija glioma na dozno zavisian način. U251 ćelije su tretirane različitim koncentracijama GKT, potom ostavljene neozračene ili su izložene dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W). Nakon 24 h vijabilnost ćelija je određivana kristal violet testom. Rezultati su prikazani kao SV ± SD triplikata iz jednog od tri nezavisna eksperimenta. (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije koje nisu izložene dejstvu plave svetlosti).

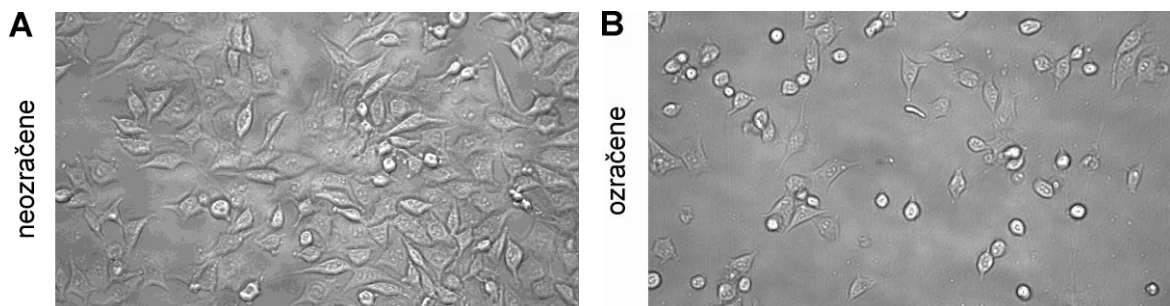
Kako bi se detaljnije ispitala fotodinamička toksičnost GKT, U251 ćelije su tretirane GKT (200 µg/ml) i izložene dejstvu plave svetlosti u različitim vremenskim intervalima (470 nm, 1 W). Vijabilnost tretiranih ćelija je određena kristal violet testom, koji je pokazao da fotoekscitirane GKT dovode do značajnog, vremenski zavisnog smanjenja broja ćelija (Slika 7A), dok GKT koje nisu bile izložene dejstvu plave svetlosti nisu imale uticaj na ćelije. Slični rezultati su dobijeni i MTT testom koji detektuje aktivnost mitohondrija (Slika 7B), kao i testom aktivnosti lizozomalnog enzima kisele fosfataze u kulturi ćelija glioma (Slika 7C). U skladu sa prethodnim rezultatima bili su i rezultati dobijeni merenjem aktivnosti oslobođene LDH (Slika 7D). LDH test je pokazao da GKT dovodi do značajnog oštećenja ćelijske membrane U251 ćelija i izlaska LDH u supernatant kulture ćelija glioma (Slika 7D). S obzirom na to da je zračenje plavom svetlošću u dužini od 10 min. pokazalo najjači citotoksični efekat, za dalje eksperimente je izabrana ta dužina zračenja.



Slika 7. Fotoekscitirane GKT smanjuju vijabilnost ćelija glioma na vremensko-zavisan način. (A-D) U251 ćelije glioma inkubirane su u prisustvu ili odsustvu GKT (200 $\mu\text{g/ml}$) i izložene su dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u različitim vremenskim intervalima. Nakon 24 h određivana je vijabilnost ćelija (A) kristal violet testom, (B) detekcijom mitohondrijalne aktivnosti (MTT), (C) detekcijom aktivnosti kisele fosfataze (KF) i (D) detekcijom oštećenja ćelijske membrane (LDH). Prikazani su reprezentativni rezultati iz najmanje tri eksperimenta kao $SV \pm SD$ triplikata (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuće ćelije koje nisu izložene dejstvu plave svetlosti).

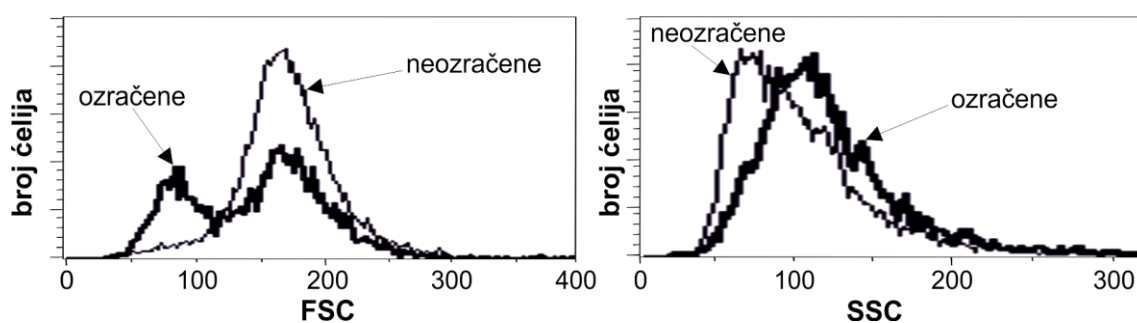
4.4. Fotoekscitirane GKT izazivaju apoptozu ćelija glioma

Pošto su prethodni rezultati pokazali citotoksične efekte fotoekscitiranih GKT, dalje je ispitivan tip i mehanizam ćelijske smrti koji GKT izazivaju. Da bi se utvrdilo da li fotodinamička citotoksičnost GKT dovodi do indukcije apoptoze, programirane ćelijske smrti tip I, analizirani su različiti parametri ćelijske smrti. Kako nisu primećene značajne promene vijabilnosti kod ćelija tretiranih samo GKT (Slike 6, 7) u svim analizama na protočnom citofluorimetru poređene su ćelije tretirane ozračenim GKT sa ćelijama inkubiranim u prisustvu iste doze GKT bez izlaganja dejstvu plave svetlosti. Da bi se ispitaio uticaj fotoekscitiranih GKT na gustinu i morfologiju U251 ćelija, ćelije su nakon odgovarajućeg tretmana analizirane na fazno-kontrastnom mikroskopu. Uočeno je da su ćelije tretirane GKT koje potom nisu bile izložene dejstvu plave svetlosti, zadržale poligonalnu ili vretenastu formu karakterističnu za kontrolne, netretirane ćelije (Slika 8A), dok je tretman sa GKT i zračenjem plavom svetlošću promenio morfologiju i smanjio gustinu ćelija (Slika 8B). Takođe je pokazano da su se ćelije smanjile, izgubile svoj normalni poligonalni oblik i zaokruglile, što odgovara morfološkim karakteristikama apoptoze. Štaviše, u skladu sa indukcijom ćelijske smrti, zaokrugljene ćelije su se odlepljivale od podloge, što je karakteristično za ćelije koje umiru apoptozom (Vermees i sar., 2000).



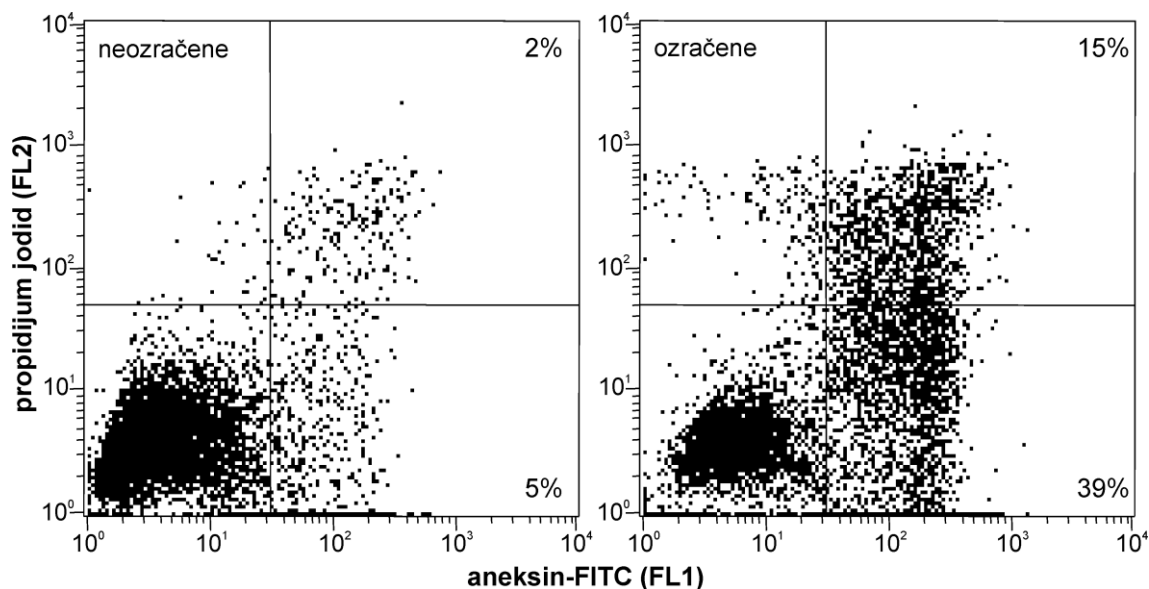
Slika 8. Uticaj fotoekscitiranih GKT na morfologiju ćelija humanog glioma U251. (A) U251 ćelije su inkubirane u medijumu u prisustvu GKT (200 $\mu\text{g/ml}$), (B) i zatim izložene dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju od 10 min. Morfologija ćelija je analizirana pod svetlosnim mikroskopom (uveličanje 10x).

U cilju određivanja tipa ćelijske smrti ispitivana je veličina/granuliranost ćelija tretiranih GKT i izloženih dejstvu plave svetlosti, analizom ćelija na protočnom citofluorimetru. Pokazano je da je veličina ćelija (parameter FSC, *engl.* forward scatter) bila smanjena, dok je njihova granuliranost (parameter SSC, *engl.* side scatter) bila povećana u odnosu na ćelije tretirane GKT bez ozračivanja plavom svetlošću (Slika 9). Ovakve promene FSC i SSC karakteristične su za apoptotične ćelije (Vermes i sar., 2000).



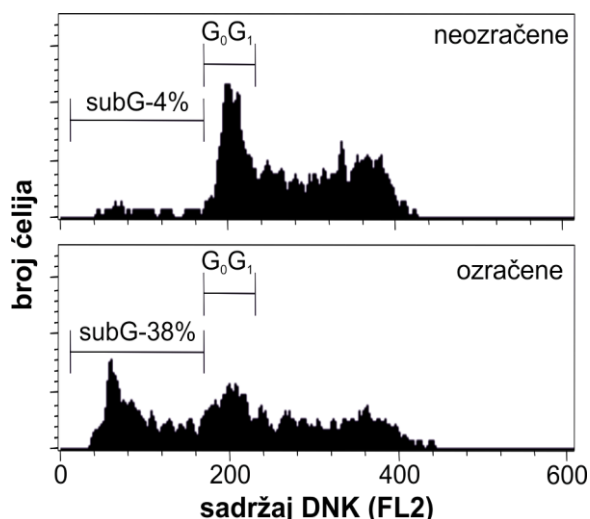
Slika 9. Fotoekscitirane GKT ulaze u ćelije humanog glioma. U251 ćelije su tretirane GKT (200 $\mu\text{g/ml}$) i potom ostavljene neozračene ili su izložene dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju od 10 min. Veličina ćelija (FSC) i ćelijska granuliranost (SSC), kao merilo apoptoze, ispitane su protočnom citofluorimetrijom 4 h nakon tretmana.

Kako bismo potvrdili da je ćelijska smrt izazvana dejstvom GKT i zračenjem plavom svetlošću zaista apoptoza dalje smo ispitivali prisustvo biohemijskih karakteristika apoptoze. U251 ćelije su nakon tretmana fotoekscitiranim GKT u trajanju od 24 h bojene aneksinom V i propidijum jodidom i analizirane na protočnom citofluorimetru. Aneksin V detektuje fosfatidilserinske ostatke koji se u toku rane faze apoptoze premeštaju iz unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane, dok se PI umeće u DNK ćelija sa narušenim integritetom ćelijske membrane, koje se nalaze u kasnoj fazi apoptoze i/ili nekroze. Analiza protočne citofluorimetrije pokazala je značajan porast broja ćelija u ranoj fazi apoptoze (aneksin⁺/PI⁻ ćelije), kao i u kasnoj fazi apoptoze/nekroze (aneksin⁺/PI⁺ ćelije) u kulturi ćelija glioma tretiranih sa GKT i ozračenih plavom svetlošću (Slika 10).



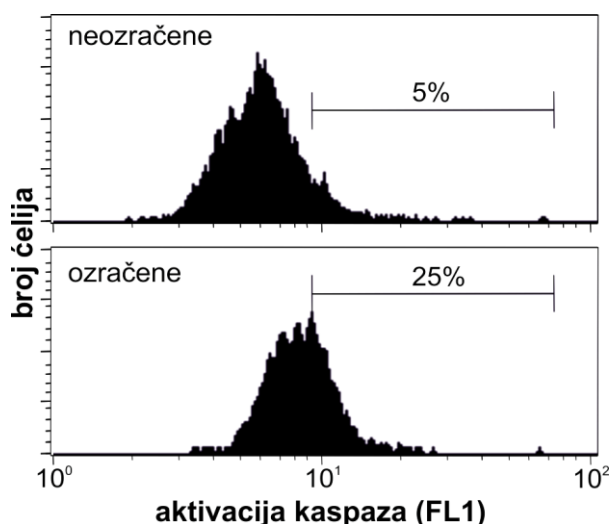
Slika 10. Fotoekscitirane GKT indukuju apoptozu. U251 ćelije su inkubirane sa GKT (200 µg/ml) i potom ostavljene neozračene (grafik levo) ili su izložene dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju od 10 min. (grafik desno). Nakon 24 h ćelije su bojene aneksinom V-FITC i propidijum jodidom i analiziran je procenat apoptotičnih (aneksin⁺) ćelija na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u vidu tačaka koje predstavljaju pojedinačne ćelije (dot plot). Prikazani rezultati su iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta.

U skladu sa smanjenjem vijabilnosti i opisanim morfološkim, odnosno biohemijskim promenama ćelija glioma nastalim pod uticajem GKT i zračenja, dalje je ispitivan uticaj ovog tretmana na ćelijski ciklus ćelija glioma. Bojenje fiksiranih ćelija propidijum jodidom i naknadna analiza distribucije ćelija u različitim fazama ćelijskog ciklusa na protočnom citofluorimetru je pokazala da se nakon 24 h od tretmana sa GKT i zračenjem povećava procenat hipodiploidnih ćelija u ukupnoj ćelijskoj populaciji, odnosno procenat apoptotičnih ćelija sa fragmentisanom DNK (sub-G₀/G₁ faza ćelijskog ciklusa), što je takođe karakteristika apoptoze (Slika 11).



Slika 11. Fotoekscitirane GKT izazivaju fragmentaciju DNK u ćelijama glioma. U251 ćelije su inkubirane sa GKT (200 $\mu\text{g/ml}$) i potom ostavljene neozračene (grafik gore) ili su izložene dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju od 10 min. (grafik dole). Nakon 24 h ćelije su fiksirane etanolom i bojene propidijum jodidom. Ćelijski ciklus je analiziran na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u vidu histograma iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta.

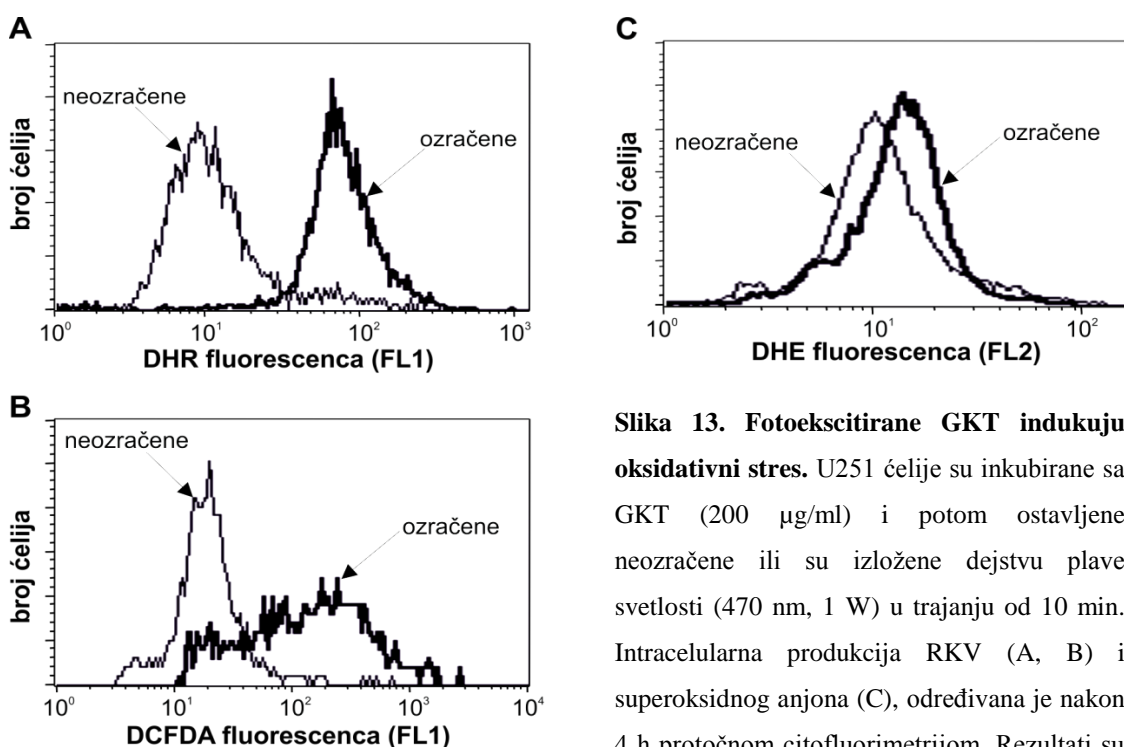
Da bi se ispitalo da li je apoptoza indukovana delovanjem GKT i zračenjem zavisna od aktivacije kaspaza, enzima ključnih za egzekuciju apoptoze, ćelije su 24 h nakon tretmana obojene fluorescentnim pan-kaspaznim inhibitorom (ApoStat) i analizirane na protočnom citofluorimetru (Sadowski-Debbing i sar., 2002). Rezultati su pokazali da GKT izložene dejstvu plave svetlosti izazivaju aktivaciju kaspaza, pa je apoptoza koja je detektovana u našim eksperimentalnim uslovima verovatno zavisna od aktivacije kaspaza (Slika 12).



Slika 12. Fotoekscitirane GKT indukuju aktivaciju kaspaza. U251 ćelije su inkubirane sa GKT (200 $\mu\text{g/ml}$) i potom ostavljene neozračene (grafik gore) ili su izložene dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju od 10 min. (grafik dole). Nakon 24 h ćelije su obojene ApoStat-om i analizirana je aktivacija kaspaza na protočnom citofluorimetru. Rezultati su prikazani u vidu histograma iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta.

4.5. Fotoekscitirane GKT indukuju oksidativni stres u ćelijama glioma

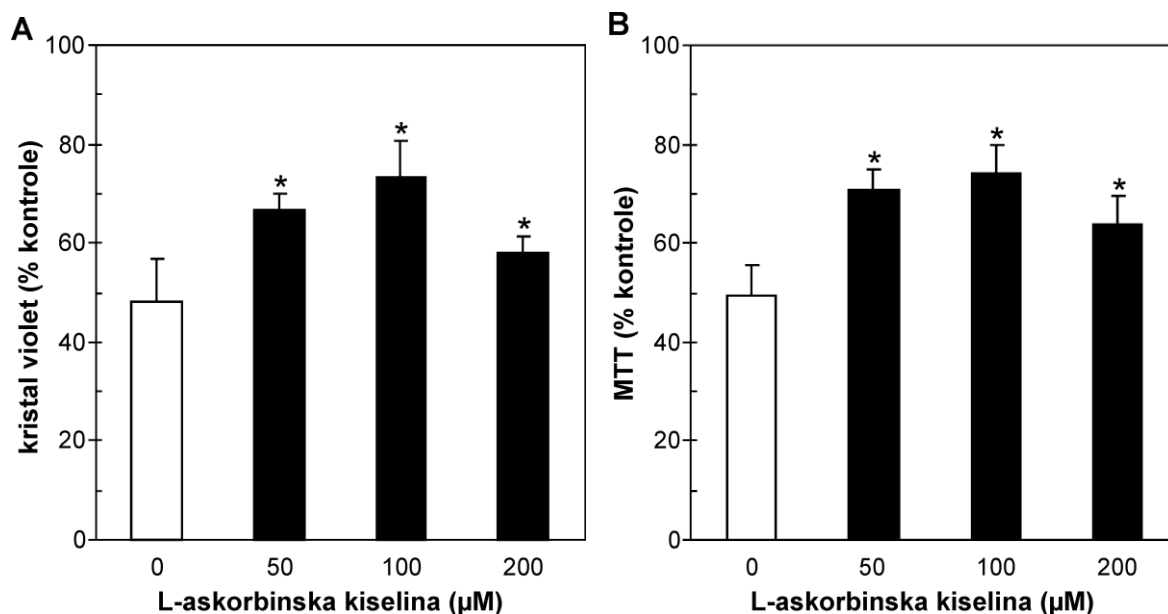
Imajući u vidu da je oksidativni stres snažan induktor apoptoze ispitivali smo da li fotoekscitirane GKT indukuju produkciju RKV u ćelijama glioma. Analizom ćelija obojenih redoks-senzitivnim fluorescentnim bojama DHR i DCFDA na protočnom citofluorimetru, uočeno je povećanje intracelularnog intenziteta zelene fluorescence u poređenju sa kontrolnim uzorcima. Na osnovu dobijenih rezultata moglo se zaključiti da GKT stimulišu produkciju RKV u U251 ćelijama (Slika 13A, B) i da je fototoksičnost GKT povezana sa nastankom RKV. Osim toga, intenzitet DHE fluorescence, boje selektivne za superoksidni anjon, takođe je bio povećan u ćelijama koje su bile tretirane fotoekscitiranim GKT, što je ukazalo da bar deo produkovanih RKV potiče od superoksidnog anjon radikala (Slika 13C).



Slika 13. Fotoekscitirane GKT indukuju oksidativni stres. U251 ćelije su inkubirane sa GKT (200 µg/ml) i potom ostavljene neozračene ili su izložene dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju od 10 min. Intracelularna produkcija RKV (A, B) i superoksidnog anjona (C), određivana je nakon 4 h protočnom citofluorimetrijom. Rezultati su predstavljeni u obliku histograma iz jednog reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta.

Da bi se ispitalo da li oksidativni stres doprinosi fotodinamičkoj citotoksičnosti GKT, U251 ćelije su tretirane antioksidansom L-askorbinskom kiselinom (Padayatty i sar., 2003). Tretman L-askorbinskom kiselinom je doveo do delimičnog oporavka

vijabilnosti ćelija tretiranih fotoekscitiranim GKT, što je pokazano kristal violet i MTT testovima (Slika 14A, B).

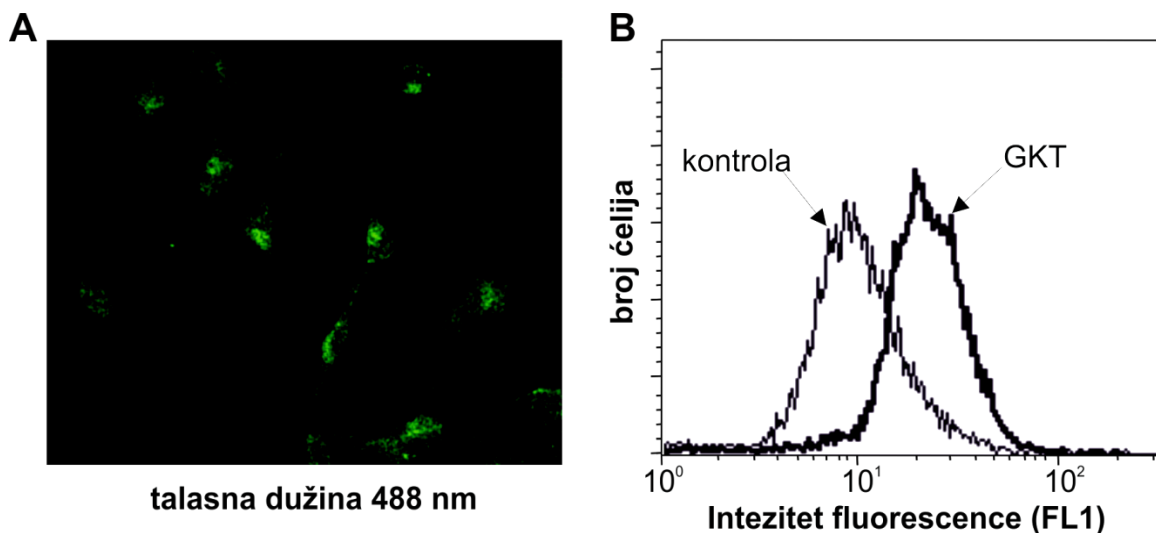


Slika 14. L-askorbinska kiselina štiti ćelije glioma od citotoksičnosti fotoekscitiranih GKT. (A, B) U251 ćelije su inkubirane u prisustvu ili odsustvu različitih koncentracija L-askorbinske kiseline (50-200 mg/ml). Nakon 6 h ćelije su isprane, tretirane GKT (200 µg/ml) i izložene dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju od 10 min. Nakon 24 h određivana je vijabilnost ćelija kristal violet i MTT testom. Prikazani su reprezentativni rezultati iz najmanje tri eksperimenta kao $SV \pm SD$ triplikata (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije koje nisu izložene dejstvu plave svetlosti).

4.6. GKT indukuju autofagiju u ćelijama glioma

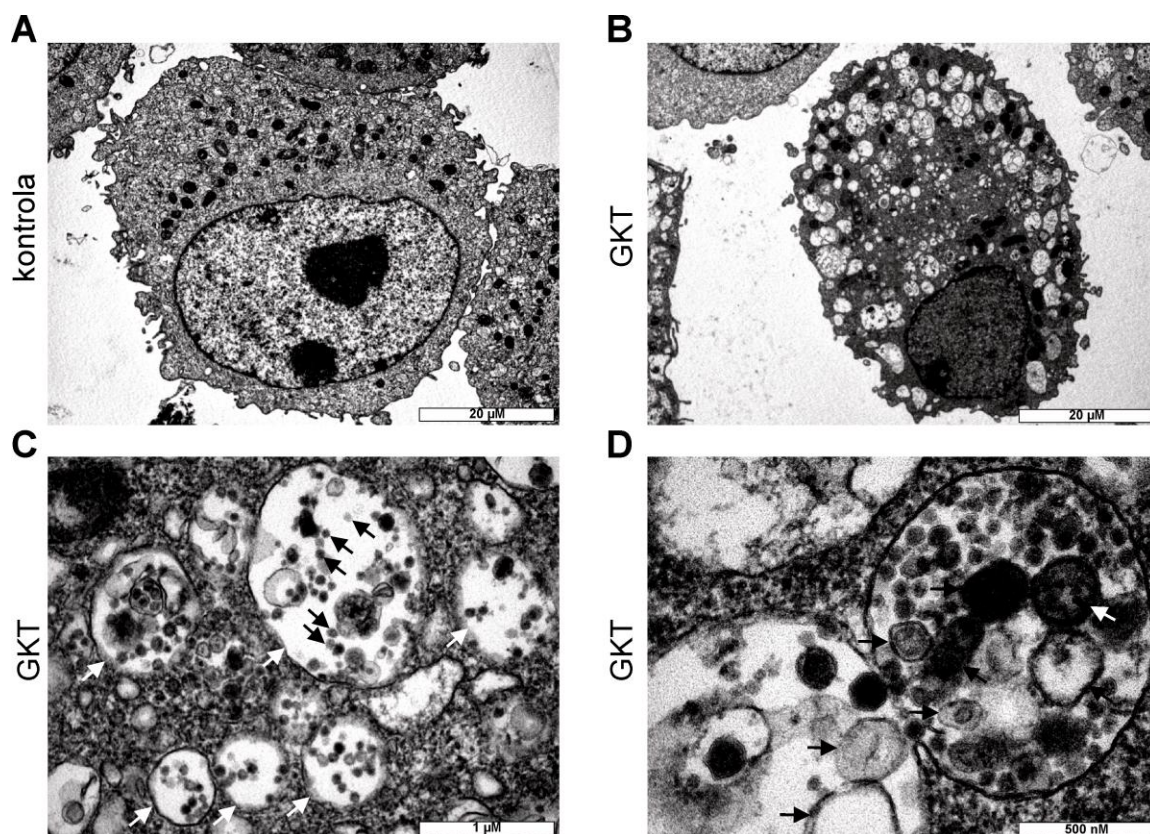
Poznato je da funkcionalizovane ugljenikove kvantne tačke, mogu da prođu u ćelije, ali njihova specifična lokalizacija do sada nije istraživana (Cao i sar., 2007). Da bi se detaljnije ispitaio mehanizam fotodinamičke citotoksičnosti GKT, istraživali smo njihovu intracelularnu lokalizaciju nakon tretmana. U251 ćelije tretirane fotoekscitiranim GKT su nakon 4 h posmatrane pod konfokalnim mikroskopom. S obzirom na to da GKT fluoresciraju zelenom svetlošću, utvrđena je značajna akumulacija GKT unutar ćelija (Slika 15A). Ovi rezultati su potvrđeni analizama na

protočnom citofluorimetru, koje su pokazale značajan porast zelene fluorescence u U251 inkubiranim sa GKT (Slika 15B) u odnosu na odgovarajuću kontrolu.



Slika 15. Fotoekscitirane GKT ulaze u ćelije glioma. (A, B) U251 ćelije su inkubirane sa GKT (200 $\mu\text{g/ml}$) ili u kontrolnom rastvoru i izložene su dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju od 10 min. Nakon 4 h intenzitet zelene fluorescence koju emituju GKT (530 nm) praćen je na (A) konfokalnom mikroskopu ili (B) protočnom citofluorimetru.

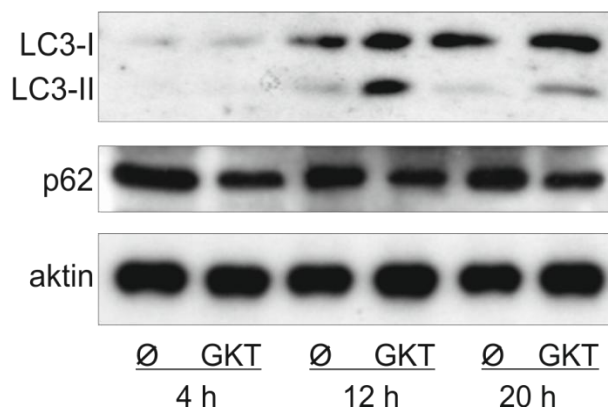
Za preciznije utvrđivanje intracelularne lokalizacije GKT korišćena je ultrastrukturalna TEM analiza. U poređenju sa kontrolnim ćelijama (Slika 16A), u citoplazmi ćelija tretiranih fotoekscitiranim GKT nakon 12 h uočeno je prisustvo velikog broja vakuola (Slika 16B). Većina GKT su se nalazile u brojnim intracelularnim vezikulama, ukazujući da se internalizacija desila verovatno putem endocitoze (Slika 16C). Međutim, u velikom broju vezikula su se nalazile i ćelijske komponente, kao što su mitohondrije (Slika 16D), što je karakteristično za autofagne vakuole koje nastaju u ćeliji tokom makroautofagije, procesa kojim ćelija razgrađuje sopstveni sadržaj (Mizushima i sar., 2008).



Slika 16. GKT indukuju autofagiju i prisutne su u autofagnim vezikulama U251 ćelije su inkubirane u (A) kontrolnom rastvoru ili (B-D) sa 200 µg/ml GKT i izložene dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju od 10 min. Nakon 12 h intracelularna lokalizacija GKT je analizirana pomoću TEM. (C) Bele strelice ukazuju na intracelularne vakuole koje sadrže GKT (crne strelice), (D) autofagne vakuole sadrže GKT i ćelijske komponente (crne strelice), uključujući i mitohondrije (bele strelice).

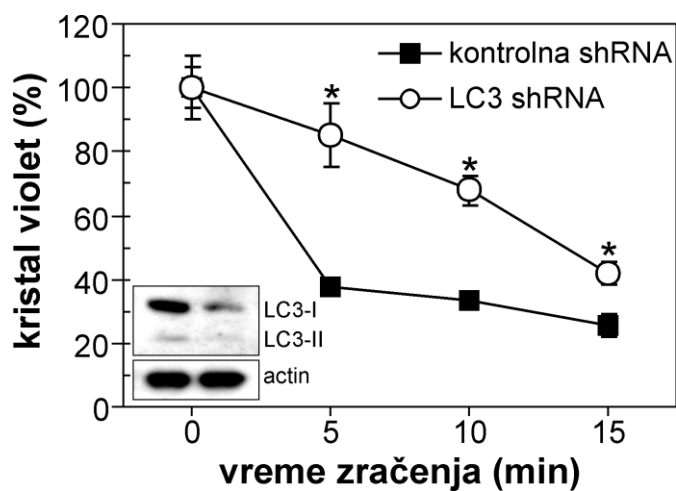
Da bi se potvrdila sposobnost fotoekscitiranih GKT da indukuju autofagiju, ispitivan je njihov uticaj na konverziju LC3-I u LC3-II (Slika 17), oblik koji ulazi u sastav membrane autofagozoma (Mizushima i sar., 2008), kao i na nivo kargo receptora SQSTM1/p62, koji se specifično razgrađuje u procesu autofagije (Ichimura i sar., 2008; Yang i Klionsky, 2010). U tom cilju imunoblot metodom ispitivana je ekspresija pomenutih proteina u U251 ćelijama tretiranim GKT i ozračenim plavom svetlošću u intervalima od 4, 12 i 20 h nakon tretmana. Rezultati su pokazali jasno vremenski zavisno povećanje nivoa LC3-II u ćelijama tretiranim fotoekscitiranim GKT u poređenju sa netretiranim ćelijama (Slika 17), što ukazuje na indukciju autofagije. Osim toga, nivo proteina SQSTM1 je bio značajno smanjen u ćelijama tretiranim

fotoekscitiranim GKT u poređenju sa netretiranim ćelijama, što potvrđuje i povećanje autofagne proteolize. Dakle, prikazani rezultati nedvosmisleno pokazuju da fotoekscitirane GKT indukuju autofagiju u ćelijama glioma.



Slika 17. Imunoblot analiza proteina karakterističnih za autofagiju. Konverzija LC3 proteina i nivo SQSTM1/p62 proteina u U251 ćelijama inkubiranim u kontrolnom rastvoru ili sa GKT (200 µg/ml) i izloženim dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju od 10 min., određivani su imunoblotom u naznačenim vremenskim intervalima. Ekspresija aktina je korišćena kao pokazatelj jednake koncentracije proteina u analiziranim uzorcima. Prikazani su rezultati jednog od dva eksperimenta sa sličnim rezultatima.

Da bi se detaljnije istražila uloga autofagije u fotodinamičnoj citotoksičnosti GKT, ispitivan je njihov uticaj na vijabilnost U251 ćelija u kojima je autofagija suprimirana RNK interferencijom, odnosno transfekcijom shRNA koja blokira LC3B, ključni protein za formiranje autofagozoma. Imunoblot analizom je potvrđeno značajno smanjenje ekspresije LC3B u U251 ćelijama koje su stabilno transfektovane shRNA za LC3B. Kristal violet testom je pokazano da su ćelije sa nižom ekspresijom LC3B značajno zaštićene od fotodinamičke citotoksičnosti GKT (Slika 18). Ovi rezultati jasno pokazuju da fotoekscitirane GKT mogu da uđu u ciljnu ćeliju i da indukuju autofagiju koja učestvuje u njihovoj fotodinamičkoj citotoksičnosti.

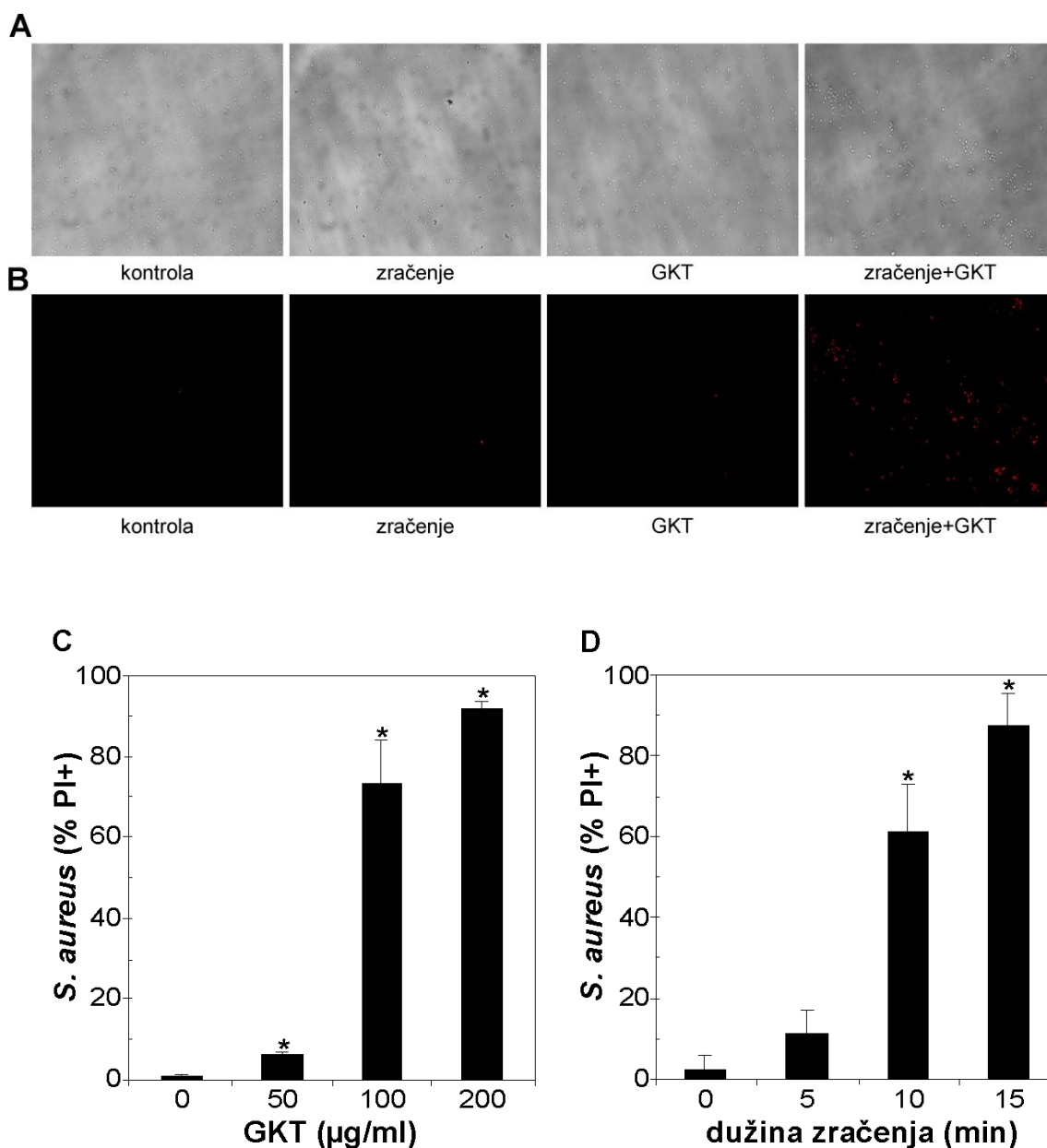


Slika 18. Autofagija indukovana fotoekscitiranim GKT doprinosi njihovoj fotodinamičkoj citotoksičnosti. U251 ćelije su stabilno transfektovane kontrolnom ili LC3 β shRNA (smanjenje ekspresije LC3B potvrđen je imunoblotom) i inkubirane su sa GKT (200 μ g/ml) i izložene dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju od 10 min. Vijabilnost ćelija je određena nakon 24 h kristal violet testom. Prikazani su reprezentativni rezultati iz najmanje tri eksperimenta kao $SV \pm SD$ triplikata (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na ćelije koje transfektovane kontrolnom shRNA).

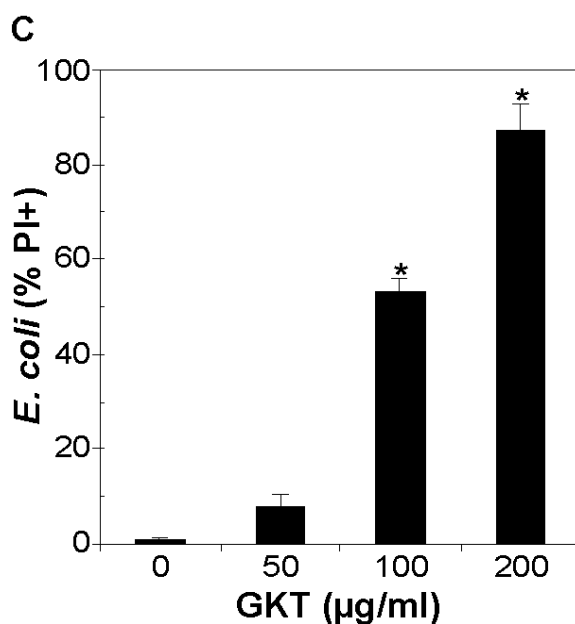
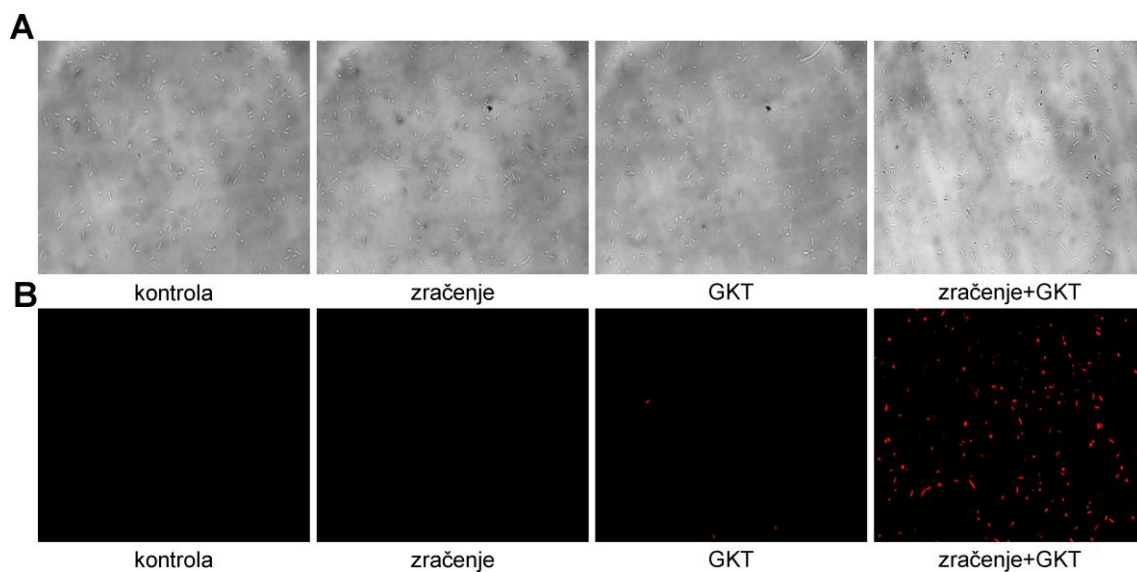
4.7. Fotoekscitirane GKT ubijaju bakterije

Nakon što je utvrđeno da fotoekscitirane GKT

bakterijske kulture *S. aureus* i *E. coli*. Da bi se odredila IC₅₀ vrednost, bakterije su tretirane različitim koncentracijama GKT (50-200 µg/ml) i izlagane dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju od 15 min. Nakon tretmana, vijabilnost bakterijskih ćelija je ispitivana primenom fluorescentnog eseja za detekciju očuvanosti integriteta ćelijske membrane i standardnog metoda za brojanje bakterija u suspenziji. Analize bakterijskih ćelija obojenih PI na fluorescentnom mikroskopu pokazale su da pojedinačni tretmani GKT u najvećoj koncentraciji (200 µg/ml) i plavim svetlom maksimalnog trajanja (15 min.), nisu imali uticaj na vijabilnost bakterija *S. aureus* (Slika 19A) i *E. coli* (Slika 20A). Sa druge strane, tretman različitim koncentracijama GKT (50-200 µg/ml) u kombinaciji sa plavim svetlom (470 nm, 1 W, 15 min.), doveo je do značajnog smanjenja vijabilnosti bakterijskih ćelija, odnosno značajnog povećanja broja bakterija obojenih PI koje su fluorescirale crvenom bojom (Slika 19B) i (Slika 20B). IC₅₀ vrednost je bila približno ista kod obe bakterije ≤ 100 µg/ml. Kako bi se detaljnije ispitala fotodinamička toksičnost GKT, suspenzije bakterije *S. aureus* su tretirane GKT (200 µg/ml) i izložene dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u različitim vremenskim intervalima (5, 10, 15 min.) (Slika 19D). Rezultati su pokazali da fotoekscitirane GKT dovode do vremenski zavisnog smanjenja broja *S. aureus*, dok tretman GKT koje nisu bile izložene dejstvu plave svetlosti nije imao uticaj na bakterijske ćelije. Antibakterijski efekat fotoekscitiranih GKT je bio dozno zavisian pri tretmanu plavom svetlošću od 15 min. (Slika 19C, 20C).

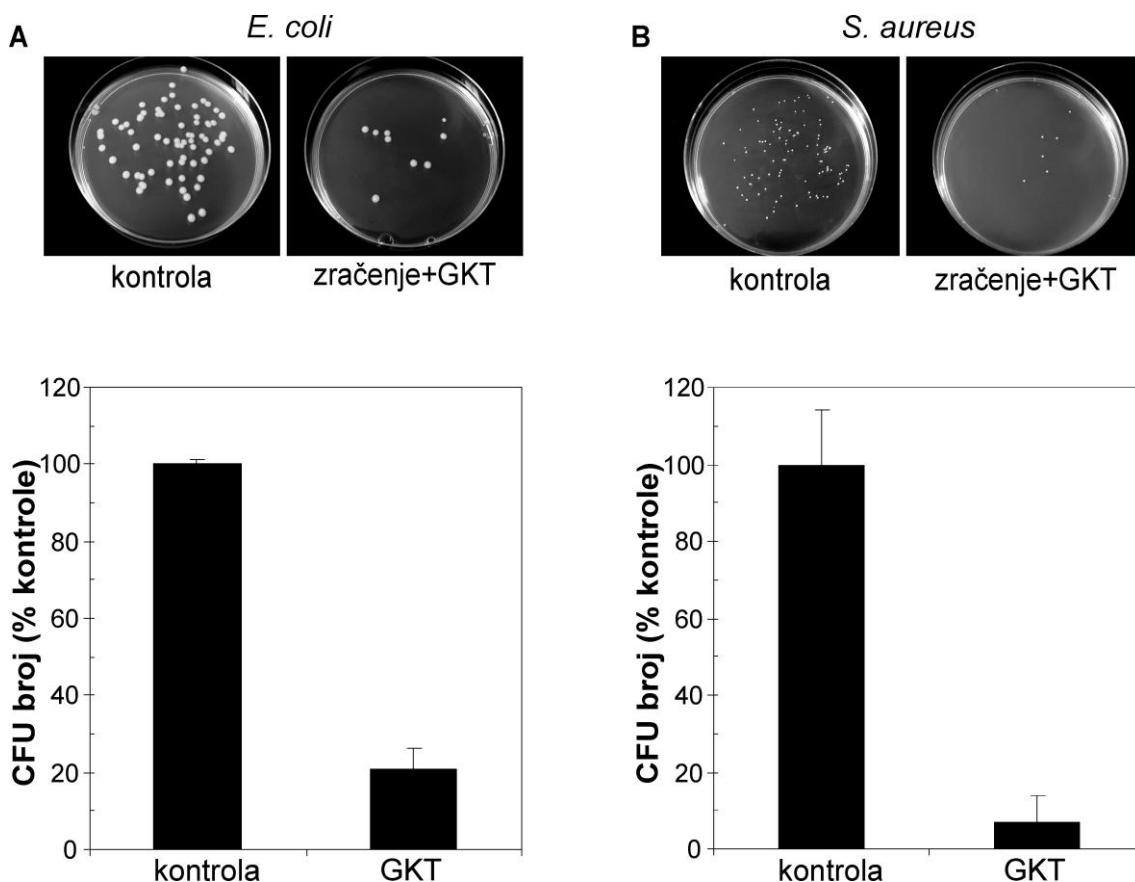


Slika 19. Fotoekscitirane GKT smanjuju vijabilnost bakterija *S. aureus*. Suspenzija *S. aureus* je inkubirana u PBS-u (kontrola) ili sa GKT (200 µg/ml) i izložena je dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1W) u trajanju 15 min. Nakon bojenja PI bakterije su analizirane (A) na svetlosnom i (B) fluorescentnom mikroskopu. (C,D) Suspenzija *S. aureus* inkubirana je u PBS-u (kontrola) ili sa različitim koncentracijama GKT (50-200 µg/ml) i izložena dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju od 15 min., odnosno inkubirana sa GKT (200 µg/ml) i izložena dejstvu plave svetlosti u različitim vremenskim intervalima. Bakterije *S. aureus* koje su imale oštećenu membranu i fluorescirale crveno, prebrojane su i rezultati iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao SV ± SD vrednost (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu).



Slika 20. Fotoekscitirane GKT smanjuju vijabilnost bakterija *E. coli*. Suspenzija *E. coli* je inkubirana u PBS-u (kontrola) ili sa GKT (200 µg/ml) i izložena je dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1W) u trajanju 15 min. Nakon bojenja PI bakterije su analizirane (A) na svetlosnom i (B) fluorescentnom mikroskopu. (C) Suspenzija *E. coli* inkubirana je u PBS-u (kontrola) ili istovremeno GKT (50-200 µg/ml) i izložena je dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju od 15 min. Bakterije *E. coli* koje su imale oštećenu membranu i fluorescirale crveno, prebrojane su i rezultati iz reprezentativnog od tri nezavisna eksperimenta su prikazani kao $SV \pm SD$ vrednost (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu).

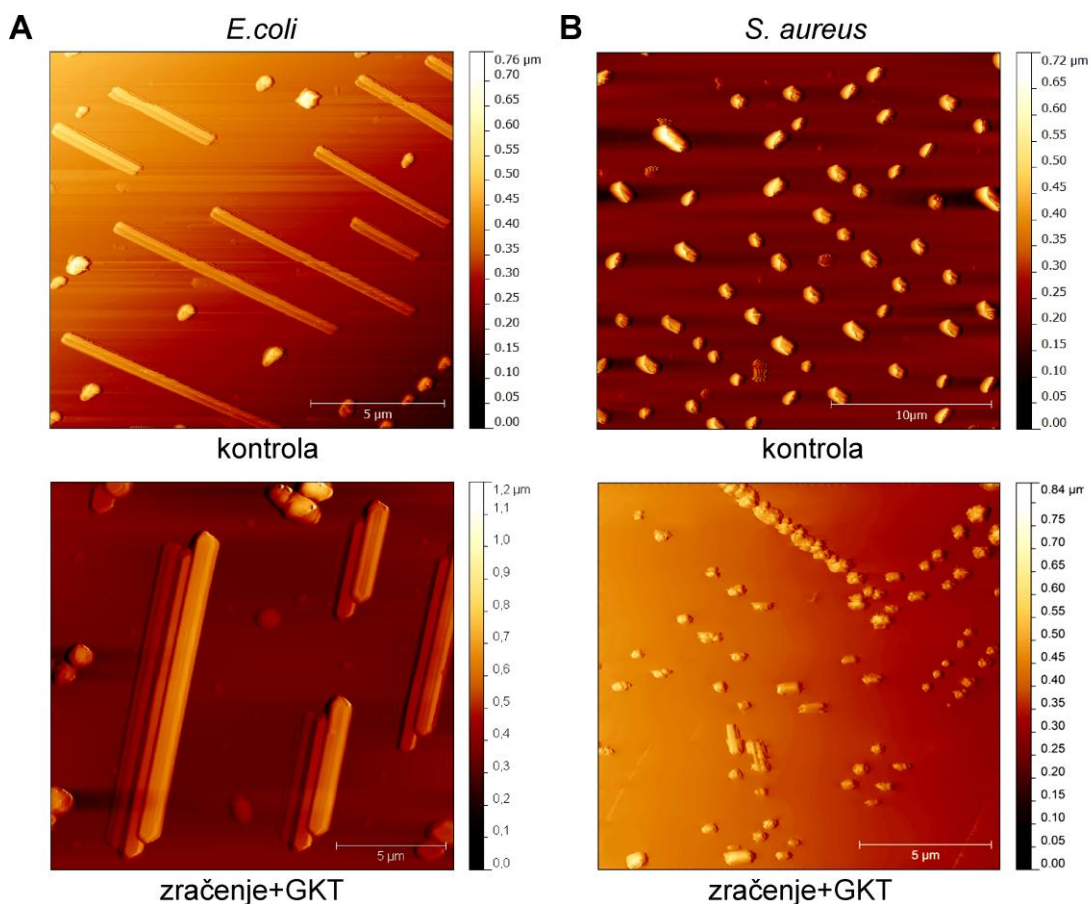
U skladu sa rezultatima dobijenim primenom fluorescentnog eseja za detekciju očuvanosti integriteta ćelijske membrane, rezultati dobijeni primenom standardnog metoda za brojanje bakterija u suspenziji, pokazali su značajno smanjenje broja CFU u suspenzijama obe bakterije, *S. aureus* i *E. coli*, kada su tretirane fotoekscitiranim GKT (Slika 21).



Slika 21. Fotoekscitirane GKT smanjuju broj bakterija u suspenziji. (A) *E. coli* i (B) *S. aureus* bakterijske suspenzije inkubirane su u PBS-u (kontrola) ili sa GKT (200 µg/ml) i izložene dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju od 15 min. Broj CFU je određen standardnom metodom za brojanje bakterija u suspenziji. Prikazani su reprezentativni rezultati iz najmanje tri eksperimenta kao SV ± SD triplikata (*p<0,05 označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu).

4.8. Fotoekscitirane GKT menjaju morfologiju bakterija

Mikroskopija atomskih sila je korišćena za vizuelizaciju promena u morfologiji i dimenzijama bakterijskih ćelija indukovanih tretmanom fotoekscitiranim GKT. Rezultati dobijeni pomoću AFM su pokazali da su bakterijske ćelije *E. coli* u kontrolnim, netretiranim uzorcima bile tipičnog štapićastog oblika (Slika 22A), dok su bakterijske ćelije *S. aureus* bile loptastog oblika (Slika 22B). Nakon tretmana fotoekscitiranim GKT, bakterijske ćelije obe ispitivane vrste su pokazale povećanu tendenciju da stvaraju agregate (Slika 22A, B).



Slika 22. AFM analiza bakterija nakon tretmana fotoekscitiranim GKT. AFM slike (A) *E. coli* i (B) *S. aureus* inkubirane u PBS-u (kontrola) ili istovremeno tretirane GKT (200 $\mu\text{g/ml}$) i ozračene plavom svetlošću (470 nm, 1 W) u trajanju od 15 min.

Prosečna dužina bakterija se nakon tretmana nije primetno menjala, dok je širina značajno porasla, kako kod *E. coli*, tako i kod *S. aureus* (Tabela 1). Visina, kao i RMS vrednost (*engl.* root mean square, RMS) hrapavosti značajno su porasli kod obe ispitivane bakterije nakon izlaganja fotoekscitiranim GKT. Primećeno je povećanje površinske hrapavosti i visine nakon tretmana, što ukazuje na oštećenje ćelijske membrane i posledično uvećanje bakterijskih ćelija.

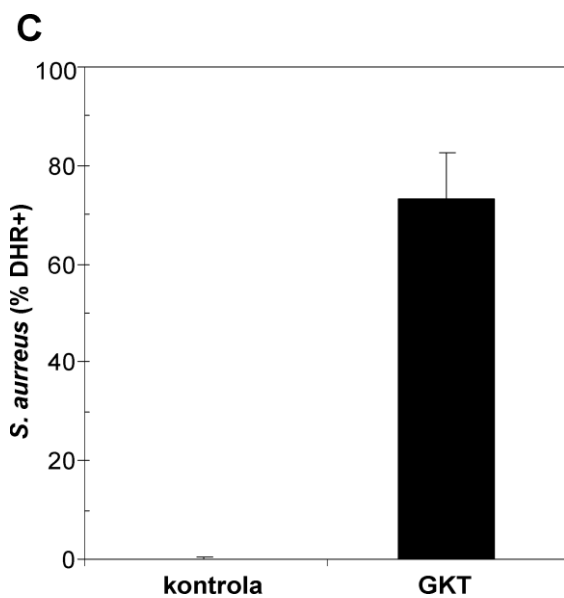
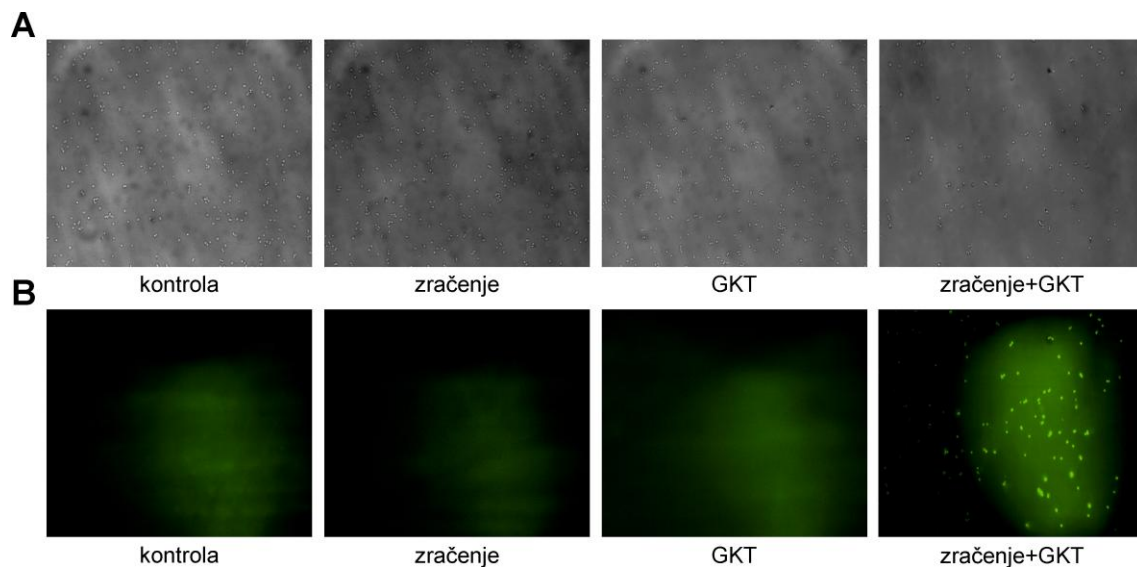
Primenom statističke analize dimenzija bakterija sa AFM slika u softveru za obradu slike, dobijene su prosečne vrednosti za dužine, visine i širine bakterija, pre i nakon tretmana ozračenim GKT. Takođe je izračunata i RMS vrednost. Rezultati ove analize su prikazani u Tabeli 1.

Tabela 1. AFM parametri *E. coli* i *S. aureus* nakon tretmana fotoekscitiranim GKT. Rezultati su prikazani kao SV ± SD vrednosti (*p<0,05 u poređenju sa kontrolnim, netretiranim uzorcima).

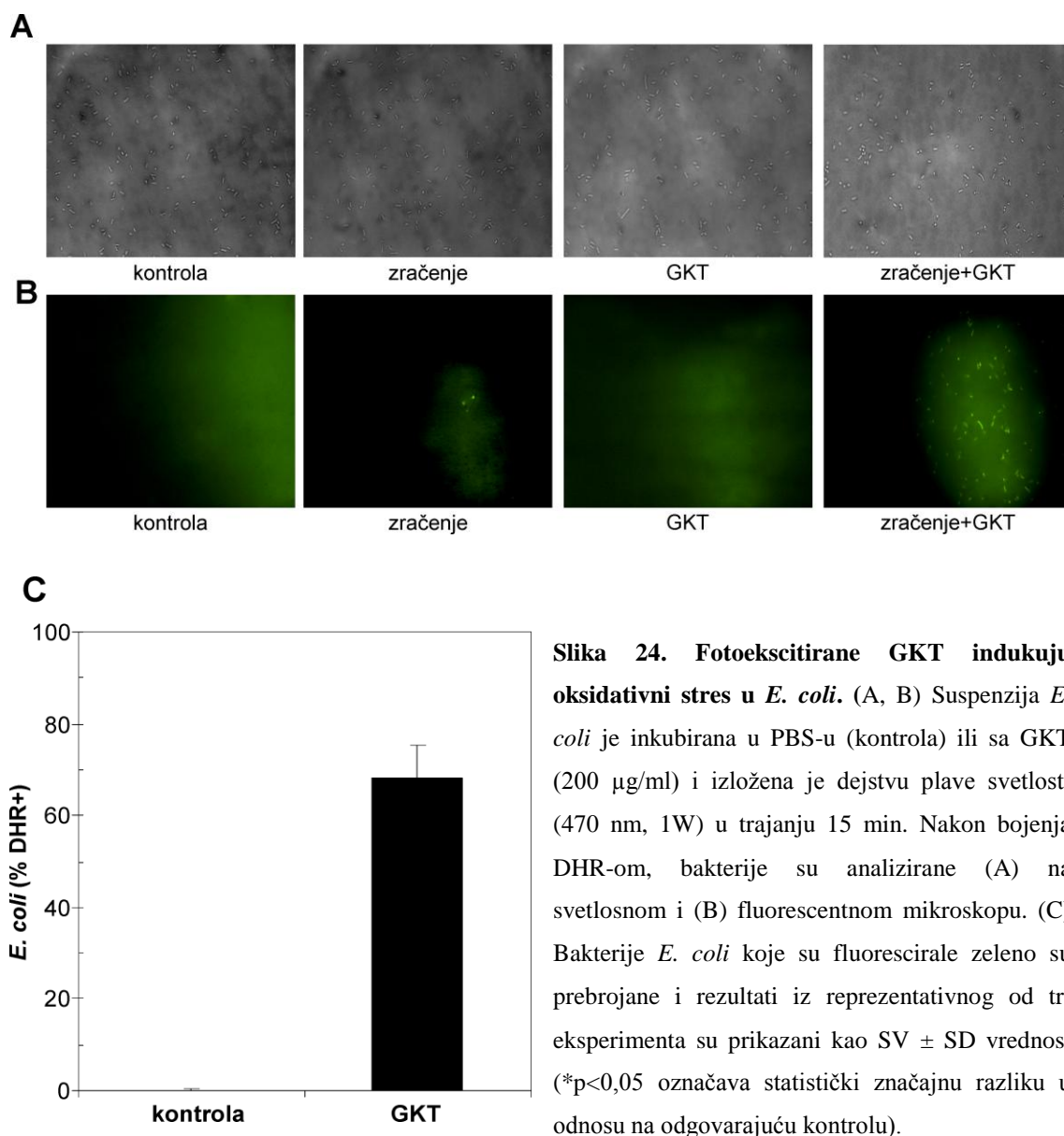
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	kontrola	GKT+svetlost	kontrola	GKT+svetlost
Dužina (μm)	5,75 ± 1,13	7,2 ± 3,1	0,74 ± 0,08	0,70 ± 0,07
Širina (μm)	0,53 ± 0,07	1,02 ± 0,15*	0,56±0,09	0,40 ± 0,08*
Visina (nm)	99 ± 16	300 ± 79*	148 ± 21	450 ± 96*
RMS	33,2 ± 5.6	84 ± 19,2*	27,4 ± 4,9	63,0 ± 14,1*

4.9. Fotoekscitirane GKT izazivaju oksidativni stres kod bakterija

Pokazano je da čestice grafena i grafen oksida, kada se ozrače svetlošću talasne dužine bliske talasnim dužinama infracrvene svetlosti, ubijaju tumorske ćelije oslobađajući toplotu (Robinson i sar., 2011). Kako nije primećeno značajno povećanje temperature u bakterijskim suspenzijama tretiranim fotoekscitiranim GKT, isključena je mogućnost da je u osnovi antibakterijskog delovanja GKT fototermalna citotoksičnost. S obzirom da je pokazano da GKT kada su izložene dejstvu plave svetlosti, mogu da produkuju RKV, uključujući singletni kiseonik, može se pretpostaviti da je u osnovi antibakterijskog delovanja fotoekscitiranih GKT fotodinamično dejstvo posredovano produkcijom RKV (Christensen i sar., 2011). Da bi se ispitala ova mogućnost, meren je intracelularni nivo RKV korišćenjem DHR. Rezultati analize na fluorescentnom mikroskopu su pokazali da nema produkcije RKV kod netretiranih bakterija, kao ni kod bakterija izloženih samo GKT ili samo plavoj svetlosti. Sa druge strane, značajno povećanje broja zelenih fluorescentnih ćelija koje su produkovale RKV primećeno je kod obe ispitivane bakterije, *S. aureus* (Slika 23B) i *E. coli* (Slika 24B) kada su tretirane kombinacijom GKT (200 µg/ml) i plave svetlosti (470 nm, 1W) u trajanju od 15 min. Ovi rezultati ukazuju na sposobnost GKT da izazovu produkciju RKV i oksidativni stres u bakterijama.



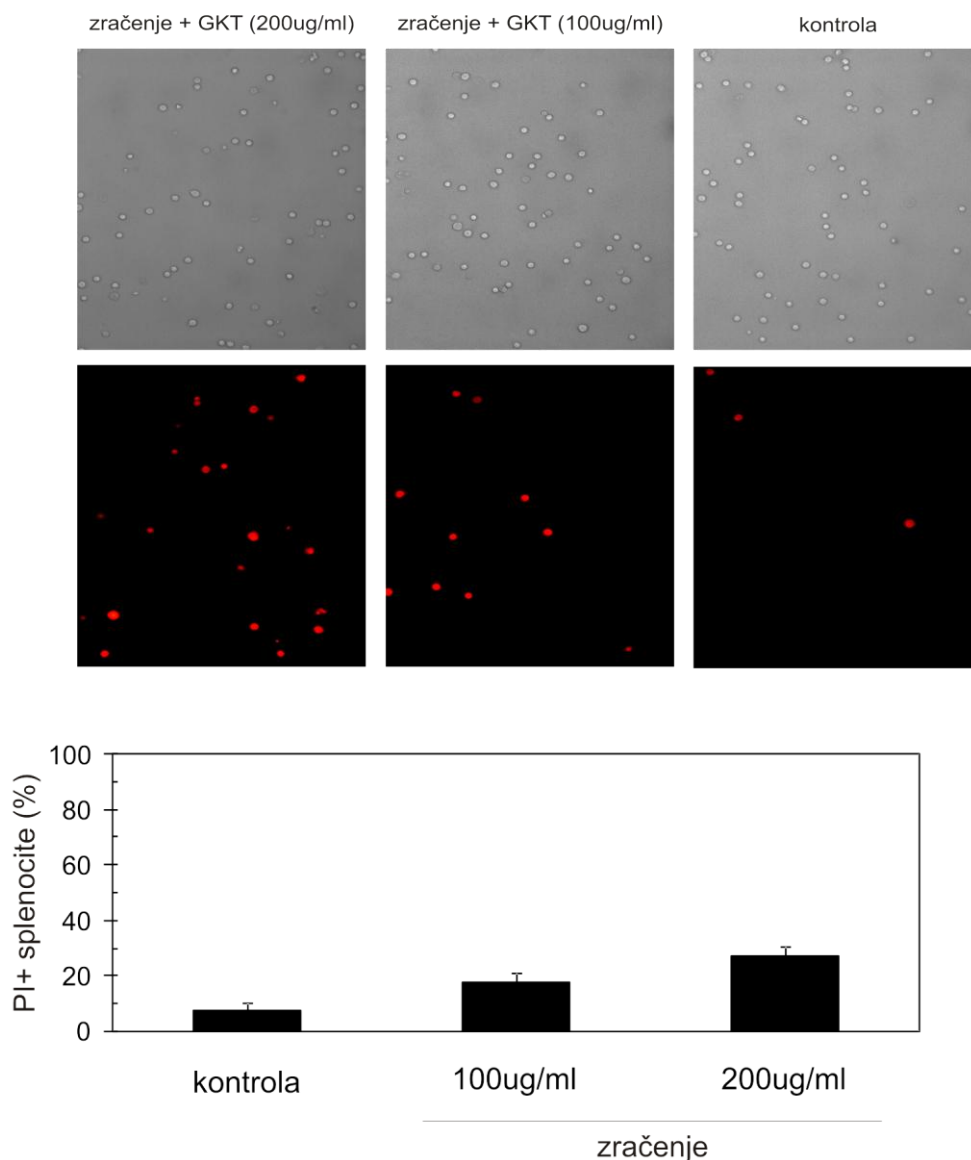
Slika 23. Fotoekscitirane GKT indukuju oksidativni stres u bakterijskim ćelijama *S. aureus*. (A, B) Suspenzija *S. aureus* je inkubirana u PBS-u (kontrola) ili sa GKT (200 $\mu\text{g/ml}$) i izložena je dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1 W) u trajanju 15 min. Nakon bojenja DHR, bakterije su analizirane na svetlosnom (A) i fluorescentnom mikroskopu (B) Bakterije koje su fluorescirale zeleno su prebrojane i rezultati iz reprezentativnog od tri eksperimenta su prikazani kao $SV \pm SD$ vrednost (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu).



4.10. Fotoekscitirane GKT ne smanjuju vijabilnost mišjih splenocita

Imajući u vidu da fotoekscitirane GKT poseduju citotoksična i baktericidna svojstva, bilo je važno utvrditi da li su i netransformisane eukariotske ćelije osetljive na isti tretman. Pošto se tumorske ćelije brzo dele i osetljivije su na stimuluse koji dovode do ćelijske smrti u odnosu na neproliferišuće normalne ćelije, ispitan je efekat fotoekscitiranih GKT na primarnim mišjim splenocitima, koji su korišćeni kao model sistem normalnih eukariotskih ćelija. Analize splenocita na fluorescentnom mikroskopu, koji su tretirani GKT u koncentraciji koja ubija više od 50% bakterija (100 μ g/ml) i

izloženi dejstvu plave svetlosti (470 nm, 1W, 15 min.), pokazale su umeren porast (5-17%) u broju PI permeabilnih splenocita, dok je doza od 200 $\mu\text{g/ml}$ fotoekscitiranih GKT ubila skoro sve bakterije, ali manje od 50% splenocita (Slika 25) Dakle, splenociti miša su manje osetljivi na fotodinamičku toksičnost GKT u odnosu na bakterije.



Slika 25. Efekat fotoekscitiranih GKT na vijabilnost mišijih splenocita. Mišiji splenociti su netretirani (gornji panel) ili istovremeno tretirani GKT (100 ili 200 $\mu\text{g/ml}$) i plavom svetlošću (470 nm, 1 W) u trajanju od 15 min. (donji panel). Nakon bojenja sa PI, ćelije su vizuelizovane optičkim ili fluorescentnim mikroskopom. Ćelije u koje je ušla PI boja, crvene su boje, prebrojane su i rezultati iz reprezentativnog od tri eksperimenta su prikazani kao $\text{SV} \pm \text{SD}$ vrednost (* $p < 0,05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu).

5. DISKUSIJA

U ovoj studiji su ispitivani fotodinamički citotoksični i antibakterijski efekti GKT i mehanizmi koji su u osnovi ovih pojava. Prvi put je pokazano da GKT sintetisane elektrohemijom oksidacijom grafita nakon fotoekscitacije plavom svetlošću produkuju RKV, uključujući i singletni kiseonik. Osim toga, pokazano je da fotoekscitirane GKT indukuju apoptozu U251 ćelija humanog glioma zavisnu od oksidativnog stresa i aktivacije kaspaza, kao i citotoksičnu autofagiju. Na osnovu rezultata ovog rada se takođe može zaključiti da su fotoekscitirane GKT ispoljile i antibakterijski efekat na ispitivanim sojevima Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, *S. aureus* i *E. coli*, posredovan mehanizmima koji podrazumevaju oštećenje membrane bakterija i indukciju oksidativnog stresa. Bitno je istaći da su bakterije bile osetljivije na fotodinamičku toksičnost GKT u odnosu na netransformisane eukariotske ćelije - splenocite.

Poluprovodničke neorganske kvantne tačke su nanočestice sa optičkim karakteristikama koje im omogućavaju primenu u nanomedicini u vidu proba za „bioimidžing“ (Bruchez i sar., 1998; Alivisatos, 2004). Međutim, njihova primena je ograničena usled toksičnosti zbog oslobađanja teških metala (npr. CdSe, CdTe) iz njihovog jezgra (Shiohara i sar., 2004; Lovric i sar., 2005). Sa druge strane, pokazano je da GKT nisu toksične što ih čini pogodnijim za primenu u živim biološkim sistemima. Osim toga, GKT se dobro rastvaraju, imaju veću biokompatibilnost i jednostavnije se sintetišu (Esteves da Silva i Gonçalves, 2011). Izuzetne optičke osobine GKT poput podesive fotoluminiscencije i izražene fotostabilnosti čine ih dobrim kandidatima za potencijalnu primenu u FDT. Istraživanja su pokazala da su optičke osobine GKT određene njihovim dimenzijama i oblikom ivica („armchair” ili cik-cak), koje zavise od polaznog materijala i metode sinteze (Li i sar., 2013; Wang i sar., 2015). U našoj studiji GKT sintetisane elektrohemijom oksidacijom grafita su imale oblik diska, prosečni prečnik oko 40 nm i cik-cak strukturu ivice. Takođe, poznato je da apsorpciona talasna dužina GKT zavisi od njihove veličine, oblika, prisustva funkcionalnih grupa,

modifikacije njihove površine i oblika ivica (Zheng i sar., 2015). Analiza UV-Vis apsorpcionih spektara je pokazala da je apsorpcija svetlosti bila najviša u UV delu spektra i da je eksponencijalno opadala sa povećanjem ekscitacione talasne dužine svetlosti. Time je potvrđeno postojanje dugačkog „repa“ koji se prostire duž vidljive oblasti i može se pripisati defektima na površini GKT (Jiang i sar., 2013). Li i sar. su pokazali da je apsorpcioni pik GKT oko 250-300 nm (Li i sar., 2011). U skladu sa tim, apsorpcioni maksimum GKT u našoj studiji bio je oko 260 nm i može se pripisati π - π^* prelazima poreklom iz strukture grafena (Liu i sar., 2013).

Fotoluminiscencija zavisi od ekscitacione talasne dužine svetlosti kojom je materijal ozračen kao i od osobina samog materijala. Iako mehanizam koji je u osnovi fotoluminiscencije GKT i dalje nije u potpunosti razjašnjen, može se pretpostaviti da je ona posledica kombinacije emisija pojedinačnih komponenti: ugljeničnog jezgra (npr. sp^2 ugljenika), funkcionalnih grupa i defekata na njihovoj površini (Wang i sar., 2016). Analiza fotoluminiscentnih spektara GKT korišćenih u našoj studiji pokazala je da one imaju najveći intenzitet fotoluminiscencije u vidljivom delu spektra, sa maksimalnom talasnom dužinom između 494-548 nm, pri ekscitaciji svetlošću talasne dužine 328 nm. Sk i sar. su pokazali da prisustvo defekata na površini i cik-cak oblik ivice GKT prouzrokuju pomeraj fotoluminiscentne emisije u crveni deo vidljivog spektra, dok „armchair“ i prisustvo funkcionalnih grupa pomeraju fotoluminiscenciju ka plavom delu vidljivog spektra (Sk i sar., 2014). U skladu sa tim prisustvo cik-cak ivice i defekata na površini GKT korišćenih u našoj studiji, maksimum fotoluminiscencije bio je pomeren ka crvenom delu spektra.

Maksimum apsorpcije GKT bio je u UV oblasti spektra elektromagnetnog zračenja. Imajući u vidu da UV zračenje indukuje oštećenje DNK i ćelijsku smrt (Sinha i Hader, 2002), za fotostimulaciju GKT umesto UV svetlosti korišćena je netoksična

(380-500 nm) i sa najvećom energijom. U našim eksperimentalnim uslovima tretman plavim svetlom nije imao uticaj na vijabilnost ćelija glioma, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima Oplandera i sar. koji su pokazali da plavo svetlo nije imalo toksičan efekat na humane dermalne fibroblaste (Oplander i sar., 2011). Ipak, neka istraživanja pokazuju da

dugotrajno izlaganje plavom svetlu može biti toksično za retinocite, sugerišući da je toksičnost plave svetlosti ćelijski specifična (Kuse i sar., 2014). Bitno je istaći da plava svetlost emituje dovoljno veliku količinu energije za indukciju fotohemijskih procesa, pa se može koristiti za aktivaciju fotosenzitivnih agenasa u FDT glioma (Quirk i sar., 2015). Međutim, utvrđeno je da plava svetlost slabo prodire kroz tkiva. Naime, kroz kožu prodire do dubine od 500 μm , a kroz tkivo bogato vodom do 2 mm. Ograničena prodornost plavog svetla može se objasniti visokom apsorpcijom koja je posledica prisustva melanina, hemoglobina, oksihemoglobina i vode u biološkom tkivu (Moreira i sar., 2011). Iako su gliomi teško dostupni za tretman FDT zbog svoje lokalizacije, u poslednjih nekoliko godina razvijene su različite tehnike za jednostavnije dopremanje izvora svetlosti i fotosenzitivnog agensa u specifične regije mozga bez uticaja na normalno funkcionisanje mozga (Zorzos i sar., 2010). Različiti laseri (argonski i lučni ksenonski laseri) se primenjuju kao izvori svetlosti u FDT (Svanberg i sar., 1994).

enjem kablova sa optičkim vlaknima umetnutim u endoskop pri čemu se vlakna implantiraju direktno u moždano tumorsko tkivo (Wilson, 2002). Iako su endoskopi posebno prilagođeni lečenju

, pogodni su i za intersticijalnu FDT (Simone i sar., 2012). Alternativa lasera su LED (*engl.* light-emitting diodes), koje se koriste u tretmanu tumora poput melanoma, a pokazali su se efikasnijim i jeftinijim za osvetljavanje tumora (Gudgin Dickson i sar., 2002). Drugi mogući način je primena uređaja nalik balonu unutar koga je postavljen izvor svetlosti i koji je obložen sa spoljašnje strane razblaženim fotosenzitivnim agensom u tečnom stanju. Sferičan oblik uređaja olakšava prijanjanje na šupljinu resekcije i omogućava ravnomernu raspodelu svetlosti (Stylli i Kaye, 2006). Ovakav terapijski pristup posebno je pogodan za uklanjanje rezidua tumora nakon hirurške intervencije. Pored slabe prodornosti plave svetlosti u tkivo, drugi potencijalni problem tokom sistemske terapije glioma zasnovane na korišćenju GKT je pojava imunosupresije koja bi mogla da pogoduje rastu tumora (Volarevic i sar., 2014). Osim toga, naši rezultati su pokazali da su primarne ćelije (splenociti) približno osetljive kao i tumorske ćelije na fotoekscitirane GKT. Ovi problemi mogli bi efikasno da se prevaziđu lokalnom aplikacijom GKT na mesto tumora čime bi se izbegla neželjena dejstva.

Za FDT je bitno da ni zračenje ni fotosenzitivni agens ne budu toksični kada se koriste samostalno, kako bi se izbeglo oštećenje normalnog tkiva. U skladu sa rezultatima dobijenim na različitim tumorskim ćelijskim linijama (HeLa ćelijama cervikalnog karcinoma, MG-63 ćelijama humanog osteosarkoma, A549 ćelijama karcinoma pluća, ćelijama karcinoma dojke MCF-7, MDA-MB-231 i T47D) (Chong i sar., 2016), kao i na stem ćelijama (Shang i sar., 2014), GKT u odsustvu ekscitacije svetlošću nisu imale citotoksičan efekat na U251 ćelije humanog glioma i primarne splenocite. Sa druge strane, nakon izlaganja plavoj svetlosti GKT su ispoljile snažno citotoksično dejstvo na ćelije U251 glioma. Važno je napomenuti da je citotoksično delovanje kombinovanog tretmana pokazano upotrebom više vrsta testova za merenje vijabilnosti ćelija (MTT, kristal violet, LDH, KF), jer je ranije pokazano da ugljenične nanotube mogu direktno da utiču na redukciju MTT (Worle-Knirsch i sar., 2006).

Citotoksično dejstvo fotoekscitiranih GKT posredovano je produkcijom $^1\text{O}_2$ koji je glavni medijator toksičnosti u FDT (Dolmans i sar., 2003). Prisustvo strukturnih defekata i slobodnih radikala na površini GKT ukazuje na njihov potencijal za stvaranje $^1\text{O}_2$. Takođe, Christensen i sar. su već pokazali da GKT sintetisane primenom laserske ablacije i obložene polietilenskim glikolom mogu da proizvedu $^1\text{O}_2$ i druge RKV nakon ekscitacije plavim svetlom (Christensen i sar., 2011). Imajući u vidu da neke fluorescentne boje kada se koriste sa ugljeničnim nanomaterijalima u detekciji RKV daju lažno pozitivne rezultate (Lyon i sar., 2008), pored DHR-a u našim eksperimentima korišćena je i EPR spektroskopija kao osetljiva i selektivna metoda za detekciju $^1\text{O}_2$. Slično rezultatima Christensen i sar., pokazali smo da nakon fotoekscitacije plavim svetlom GKT sintetisane elektrohemijskom oksidacijom grafita produkuju singletni kiseonik u sistemu bez ćelija.

Očekivano, fotoekscitirane GKT su i u kulturi ćelija proizvodile RKV, što je pokazano povećanjem intracelularne fluorescence neselektivnih redoks senzitivnih boja DHR i DCFDA. U skladu sa našim rezultatima, Chong i sar. su pokazali da je bojenje DCFDA emitovalo ekstremno slab fluorescentni signal u ćelijama tretiranim pojedinačno GKT ili plavom svetlošću, a izuzetno visok pri istovremenom tretmanu (Chong i sar., 2016). Fluorescenca DHE je takođe bila povećana u ćelijama tretiranim fotoekscitiranim GKT, što je ukazalo na to da jedan deo nastalih RKV potiče i od

superoksidnog anjon radikala. Iako su ovi rezultati u skladu sa rezultatima d
, treba istaći da je sposobnost GKT da produkuje RKV bila nesrazmerno visoka u poređenju sa sposobnošću GKT da generišu singletni kiseonik izmeren pomoću EPR. Na osnovu ovih zapažanja može se pretpostaviti da su neke druge RKV, a ne singletni kiseonik, zapravo odgovorne za citotoksičnost fotoekscitiranih GKT (Yamakoshi i sar., 2003). Iako do sada nisu utvrđeni tačni mehanizmi produkcije RKV od strane fotoekscitiranih GKT može se pretpostaviti da su slični onima opisanim kod fullerena (C_{60}), pošto GKT mogu biti proizvedene direktno iz fullerena (Lu i sar., 2011). Triplet ekscitovano stanje fullerena $^3C_{60}$, nastalo od singletnog ekscitovanog stanja nakon stimulacije svetlom, odličan je akceptor elektrona. Primanjem elektrona tripletno stanje $^3C_{60}^-$ se redukuje, što omogućava prenos elektrona na molekularni kiseonik, odnosno nastanak superoksidnog anjon radikala (Yamakoshi i sar., 2003). Za razliku od nastanka singletnog kiseonika ovaj tip reakcije se pre svega dešava u polarnim rastvaračima, posebno u prisustvu redukujućih agenasa kao što je NADH (Mroz i sar., 2007). Takođe, nastaje pozitivna povratna sprega za povećanu proizvodnju superoksida (Zorov i sar., 2006), koji dalje može doprineti oksidativnom stresu izazvanom tretmanom GKT. Stoga je m
, pre nego singletni kiseonik, bio glavni oblik RKV odgovoran za proapoptotsku aktivnost GKT.

Oksidativni stres ima ključnu ulogu u indukciji apoptoze (Kannan i Jain, 2000). Naši rezultati su pokazali da ćelije glioma nakon izlaganja fotoekscitiranim GKT umiru apoptozom, budući da je primećeno premeštanje fosfatidil-serina sa unutrašnje na spoljašnju stranu ćelijske membrane, aktivacija kaspaza, fragmentacija DNK, kao i morfološke promene karakteristične za apoptozu (zaokrugljivanje, smanjenje volumena ćelija i odvajanje ćelija od podloge) (Galluzzi i sar., 2009). Budući da je tretman antioksidansom L-askorbinskom kiselinom smanjio citotoksično delovanje GKT ozračenih plavom svetlošću, može se pretpostaviti da je u osnovi fotodinamičke citotoksičnosti GKT upravo oksidativni stres (Padayatty i sar., 2003). U prilog ovakvoj pretpostavci govore i istraživanja Qin i sar. u kojima je utvrđeno da je apoptoza koju indukuju GKT u makroflagima zavisna od povećane produkcije RKV (Qin i sar., 2015). Takođe, produkcija RKV predložena je kao mehanizam citotoksičnosti i za druge nanomaterijale (Qu i sar., 2013; Sun i sar., 2013). Iako se zna da su oksidativni stres i

indukcija apoptoze po pravilu udruženi sa promenom membranskog potencijala mitohondrija, fotoekscitirane GKT nisu indukovale depolarizaciju mitohondrija (Ott i sar., 2007). Dobijeni rezultati mogli bi se objasniti prethodno pokazanom sposobnošću oksidativnog stresa da oštećuje DNK i indukuje apoptozu nezavisnu od oštećenja mitohondrija (Fei Liu, 2016). Osim apoptoze, fotoekscitirane GKT najverovatnije indukuju i nekrozu koju karakteriše gubitak integriteta ćelijske membrane, što je u ovoj studiji detektovano merenjem oslobađanja LDH i citofluorimetrijskom analizom ćelija obojenih Ann/PI. Jiang i sar. su pokazali sposobnost GKT da indukuju nekrozu u HeLa ćelijama (Jiang i sar., 2015). Sa druge strane, moguće je da je u našim eksperimentalnim uslovima ovaj rezultat pokazatelj sekundarne apoptoze do koje dolazi usled nepostojanja ćelija koje bi fagocitovale apoptotične ćelije u *in vitro* uslovima.

S obzirom na to da GKT fluoresciraju zeleno, bilo je moguće da se odredi njihova tačna intracelularna lokalizacija i distribucija u ćelijama. Pokazano je da su GKT bile akumulirane u citoplazmi tretiranih ćelija, ali ne i u nukleusu, što je u skladu sa do sada poznatim rezultatima (Wu i sar., 2013; Jiang i sar., 2015). U citoplazmi je uočeno prisustvo velikog broja vakuola u kojima je detektovano prisustvo GKT. Naši rezultati ukazuju da se internalizacija može odvijati putem endocitoze, što je u skladu sa zapažanjima Wu i sar., koji su pokazali da se GKT internalizuju primarno putem endocitoze posredovane kaveolama (Wu i sar., 2013). Interesantno je da neke od vezikula sa internalizovanim GKT po svojoj strukturi i sadržaju liče na vakuole koje nastaju u ćeliji tokom autofagije, tj. imaju dvoslojnu (autofagozomi) ili jednoslojnu membranu (autolizozomi) i sadrže citoplazmatski materijal. Pokazano je da FDT može indukovati autofagiju u ćelijama, kao mehanizam zaštite ćelija od oksidativnog stresa i u cilju obezbeđivanja energije za održavanje osnovnog ćelijskog metabolizma (Reiners i sar., 2010). Indukcija autofagije detektovana je i u ćelijama tretiranim drugim nanomaterijalima, uključujući i klasične kvantne tačke (Zabirnyk i sar., 2007; Stern i sar., 2008). S druge strane, autofagija može biti u osnovi citotoksičnih efekata nanočestica, kao i fotodinamičkog tretmana, tako što stimuliše apoptozu (programiranu ćelijsku smrt tipa I) ili predstavlja alternativni način ćelijskog umiranja (programirana ćelijska smrt tipa II) i na taj način uništava ćelije tumora (Silvestrov i Efetov, 2007; Khan i sar., 2012). Pokazano je da GKT mogu izazvati citotoksičnu autofagiju u ćelijama makrofaga na dozno i vremenski zavisani način (Qin i sar., 2015). Kako je

primećeno da je vijabilnost ćelija glioma bila značajno veća nakon utišavanja LC3B, esencijalnog gena za autofagiju, može se zaključiti da autofagija ima citotoksičnu ulogu i da doprinosi apoptozi. Ovi rezultati jasno pokazuju da fotoekscitirane GKT mogu da uđu u ciljnu ćeliju i da pokrenu autofagni odgovor koji doprinosi fotodinamičkoj citotoksičnosti.

Prethodne studije su pokazale da postoji složen odnos između oksidativnog stresa i autofagije. U brojnim istraživanjima pokazano je da oksidativni stres učestvuje u indukciji autofagije na nekoliko načina: preko inaktivacije ATG4 koja dovodi do povećanja lipidovane forme LC3 u ćeliji i formiranja većeg broja autofagozoma, preko aktivacije PI3K/Beklin-1 i inhibicije PI3K/Akt/mTOR signalnog puta, kao i povećanjem ekspresije SQSTM1/p62 gena aktivacijom transkripcionog faktora NRF2 (Gurusamy i Das, 2009; Jain i sar., 2010; Komatsu i sar., 2010). Koji od pomenutih mehanizama bi mogao biti uključen u indukciju autofagije fotoekscitiranim GKT ostaje da se ispita. Iako autofagija uglavnom smanjuje oksidativni stres i njegove posledice, uklanjajući oštećene proteine i nefunkcionalne mitohondrije koje su proizvođači RKV i na taj način zapravo štiti ćelije, autofagija može doprineti indukciji oksidativnog stresa u retkim okolnostima (Kiffin i sar., 2006). Pokazano je da se degradacijom važnog antioksidativnog enzima katalaze tokom autofagije može izazvati prekomerna akumulacija RKV i povećana propustljivost spoljašnje membrane mitohondrija, što za posledicu ima umiranje ćelije (Yu i sar., 2006). Ovi rezultati sugerišu da bi i autofagija izazvana fotoekscitiranim GKT mogla da indukuje apoptozu upravo povećanjem oksidativnog stresa.

Osim što je utvrđeno da GKT nakon fotoekscitacije ispoljavaju citotoksično dejstvo na U251 ćelije humanog glioma, pokazano je da imaju i antibakterijski efekat na ispitivane Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, *S. aureus* i *E. coli*. Prema podacima u literaturi, različite ugljenične nanočestice uključujući fulerene, ugljenične nanotube i grafen, ispoljavaju antibakterijsko dejstvo (Lyon i sar., 2006; Kang i sar., 2008; Liu i sar., 2011). Osim toga, pokazano je da neorganske kvantne tačke imaju antibakterijsko dejstvo na različite Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije *S. aureus* i *E. coli*, dok su funkcionalizovane GKT u odsustvu fotoekscitacije delovale inhibitorno na mikoplazme, bakterije bez ćelijskog zida (Wang

i sar., 2011; Jiang i sar., 2013; Lai i sar., 2013). Sa druge strane, Sun i sar. u svojim rezultatima ukazuju na odsustvo antibakterijskog dejstva GKT, što su pokazali na primeru *S. aureus* i *E. coli* koje su bile žive i zadržale su svoj oblik i nakon tretmana GKT (Sun i sar., 2014). U našoj studiji je upotrebom fluorescentnog eseja za detekciju očuvanosti integriteta citoplazmatske membrane bakterija pokazano da nefunkcionalizovane GKT u odsustvu fotoekscitacije nisu imale baktericidno dejstvo na *S. aureus* i *E. coli*. Rezultati su u skladu sa činjenicom da neozračene GKT ne proizvode RKV koje bi oštetile membranu bakterija. Prethodni rezultati pokazali su da je samostalni tretman plavom svetlošću bio toksičan za *S. aureus* i *E. coli* (Nitzan i Kauffman, 1999), što je u suprotnosti sa našim rezultatima. Ova diskrepanca bi se mogla objasniti time što u našim eksperimentima nije korišćena aminolevulinska kiselina kao stimulator sinteze porfirina koji deluju kao endogeni fotosenzitizatori u bakterijama (Lubart i sar., 2011). Sa druge strane, fotoekscitirane GKT u našoj studiji su pokazale snažan antibakterijski efekat koji zavisi od doze GKT i trajanja zračenja plavom svetlošću. Naime, istovremeni tretman GKT i plavom svetlošću indukovao je značajno povećanje broja bakterija obojenih PI koje su fluorescirale crvenom bojom, što ukazuje na gubitak integriteta citoplazmatske membrane. Važno je napomenuti da je kapacitet za emisiju crvene fluorescence GKT ekstremno nizak, tako da je malo verovatno da je njihova fotoluminiscencija doprinela detektovanoj fluorescenci.

U skladu sa rezultatima fluorescentnog eseja za analizu integriteta citoplazmatske membrane bakterija bili su i rezultati dobijeni standardnom metodom za brojanje bakterija u suspenziji, koji su pokazali značajno smanjenje broja CFU u suspenzijama ispitivanih bakterija posle tretmana fotoekscitiranim GKT. *E. coli* je pokazala veću otpornost na toksično dejstvo fotoekscitiranim GKT u odnosu na *S. aureus*. U skladu sa našim rezultatima, Hui i sar. su pokazali da tretman C₆₀-GKT nema uticaj na *E. coli*, dok značajno smanjuje vijabilnost dva soja *S. aureus* (ATCC 29213 i ATCC 25923), što je pokazano oštećenjem membrane *S. aureus*, dok je membrana *E. coli* bila intaktna (Hui i sar., 2016). Pošto je u osnovi antibakterijskog delovanja GKT oštećenje citoplazmatske membrane, moguće je da veća otpornost Gram-negativnih bakterija potiče od kompleksnije građe ćelijskog zida u čiji sastav ulaze spoljašnja membrana i mala količina peptidoglikana koji formiraju barijeru. Takođe, u sastav spoljašnje membrane ulaze i porini koji su odgovorni za selektivnu propustljivost, jer

ograničavaju prolazak i vezivanje fotosenzitivnih agenasa za citoplazmatsku membranu čime doprinose rezistenciji Gram-negativnih bakterija na fotodinamičku inaktivaciju (Huang i sar., 2010). Sa druge strane, veća osetljivost Gram-pozitivnih bakterija se može objasniti većom propustljivošću ćelijskog zida. Naime, iako je citoplazmatska membrana Gram-pozitivnih bakterija okružena debljim slojem peptidoglikana, u njemu su nalazi veliki broj pora koje omogućavaju molekulima fotosenzitivnih agenasa lakši prolaz do citoplazmatske membrane (Malik i sar., 1992; Lambert, 2002).

Na oštećenje citoplazmatske membrane bakterija tretiranih fotoekscitiranim GKT ukazuje i promena njihove morfologije. Naime, primećeno je povećanje visine i površinske hrapavosti ćelija obe ispitivane vrste bakterija nakon tretmana fotoekscitiranim GKT. Ovi rezultati su bili u skladu sa rezultatima Hui i sar. koji su pokazali da površina bakterija *S. aureus* nakon tretmana sa C₆₀-GKT postaje značajno hrapavija i prekrivena karakterističnim ispupčenjima veličine nekoliko nm (Hui i sar., 2016). Takođe, uočeno je da obe bakterije pokazuju povećanu tendenciju ka stvaranju agregata posle izlaganja fotoekscitiranim GKT. Nastanak agregata bakterija može imati odbrambenu ulogu od oksidativnog stresa. Kod *E. coli* je pokazano da ekspresija površinskog proteina Antigena 43 dovodi do agregacije, što može da doprinese zaštiti bakterija od oštećenja uzrokovanim RKV (Schembri i sar., 2003). Slične promene morfologije bakterijskih ćelija zabeležene su pri delovanju drugih antibakterijskih agenasa, kao što su azot-oksidi, apolipoforin III i jednoslojne ugljenične nanotube (Deupree i Schoenfisch, 2009; Liu i sar., 2010; Zdybicka-Barabas i sar., 2013).

S obzirom da je pokazano da u tumorskim ćelijama GKT nakon izlaganja dejstvu plave svetlosti proizvode RKV, uključujući singletni kiseonik, može se pretpostaviti da je u osnovi njihovog antibakterijskog delovanja sličan mehanizam. U skladu sa mogućom ulogom oksidativnog stresa u dejstvu fotoekscitiranih GKT je i činjenica da neki antibiotici izazivaju produkciju RKV u bakterijama, što predstavlja dodatni mehanizam njihovog antibakterijskog dejstva. Do sada je pokazano da tri klase antibiotika sa baktericidnim delovanjem, hinoloni, β -laktami i aminoglikozidi, stimulišu produkciju hidroksilnih radikala kod Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija (Kohanski i sar., 2007). Bitno je naglasiti da je produkcija RKV takođe jedan od

osnovnih mehanizama antimikrobne aktivnosti fagocita u okviru urođene imunosti (Flannagan i sar., 2009).

Rezultati analize na fluorescentnom mikroskopu su pokazali da nije detektovano povećanje DHR signala, odnosno da nema produkcije RKV kod bakterija pojedinačno tretiranih plavom svetlošću ili GKT. Pošto sam fluorescentni mikroskop proizvodi plavu svetlost talasne dužine od 488 nm, postavlja se pitanje zašto u bakterijama tretiranim GKT tokom mikroskopiranja nije primećena DHR fluorescenca, uprkos činjenici da fotoekscitirane GKT mogu da produkuju RKV i oksiduju DHR do visoko fluorescentnog rodamina (Christensen i sar., 2011). Jedno od mogućih objašnjenja je da GKT ne mogu da uđu u intaktne bakterijske ćelije. Na odsustvo antibakterijskog dejstva GKT kod intaktnih bakterija ukazuju rezultati Sun i sar., koji su pokazali da su ćelije *E. coli* i nakon tretmana GKT imale istu morfologiju (Sun i sar., 2014). Sa druge strane, značajno povećanje broja bakterija koje fluoresciraju zelenom bojom, odnosno koje produkuju RKV, primećeno je kod obe ispitivane vrste, *E. coli* i *S. aureus*, nakon tretmana fotoekscitiranim GKT. Na osnovu navedenog može se pretpostaviti da fotoekscitirane GKT fotodinamički narušavaju integritet citoplazmatske membrane, ulaze u oštećenu bakterijsku ćeliju i počinju da proizvode dodatne količine RKV. Takođe, i same oštećene bakterije u pokušaju da se zaštite od delovanja stranih agenasa (*engl.* oxidative shielding) mogu da produkuju dodatne količine RKV mehanizmima sličnim onim u mitohondrijama (Naviaux, 2012). Međutim, pokazano je da GKT mogu ispoljiti antibakterijsko dejstvo i kada se nalaze ekstracelularno. Naime, Akhavan i sar. su pokazali da oštećenje membrane može biti posledica direktnog kontakta bakterije sa oštrim ivicama grafenskih nanočestica (Akhavan i Ghaderi, 2010). Kako nije primećeno da pojedinačni tretmani GKT i plavom svetlošću imaju uticaj na bakterije, može se pretpostaviti da bi fotoekscitacija GKT, osim što omogućava GKT da ispolje antibakterijsko dejstvo posredstvom produkcije RKV, možda mogla da izmeni njihovu strukturu i tako im omogući da mehanički oštete membranu bakterije. Utvrđivanje tačnog mehanizma zahteva dodatna istraživanja uticaja plave svetlosti na GKT.

Pokazano je da čestice grafena i grafen oksida, kada se ozrače svetlošću talasne dužine bliske talasnim dužinama infracrvene svetlosti, ubijaju tumorske ćelije oslobađajući toplotu (Robinson i sar., 2011). Kako nije primećeno značajno povećanje

temperature u bakterijskim suspenzijama tretiranim fotoekscitiranim GKT, isključena je mogućnost da je u osnovi antibakterijskog delovanja GKT fototermalna citotoksičnost. S obzirom da je pokazana indukcija oksidativnog stresa u odsustvu porasta temperature, naši rezultati ukazuju na fotodinamičku prirodu antibakterijskog dejstva fotoekscitiranih GKT. Međutim, da bi se u potpunosti razjasnila vremenska kinetika ovih kompleksnih dešavanja i utvrdio tačan mehanizam antibakterijskog delovanja fotoekscitiranih GKT, potrebna su dodatna istraživanja u kojima bi se koristio sistem za praćenje internalizacije GKT i merenje produkcije RKV u realnom vremenu.

Zbog svega navedenog, kao i zbog činjenice da je tokom poslednjih godina dramatično porasla incidencija infekcija izazvanih bakterijama rezistentnim na antibiotike, što je značajno ograničilo broj terapijskih mogućnosti, fotoekscitacija GKT bi se mogla razmatrati kao potencijalni alternativni metod u terapiji bakterijskih infekcija. Imajući u vidu malu prodornu moć plavog svetla u tkivo, kao i malu apsorpciju svetlosti većih talasnih dužina od strane GKT, ovakav pristup bi pre svega bio efikasan u terapiji infekcija kože i sluznica, ali i za dezinfekciju vodenih i drugih površina. FDT je već odobrena za upotrebu u kliničkoj praksi u tretmanu infekcija izazvanih bakterijom *Propionibacterium acnes*, a klinička ispitivanja su pokazala dobre rezultate u tretmanu infekcija želuca izazvanih bakterijom *Helicobacter pylori* (Dai i sar., 2012). Takođe, pokazana je efikasnost FDT i u inaktivaciji bakterija *S. aureus*, MRSA i *Pseudomonas aeruginosa* uzročnika infekcija na koži i postoperativnih hirurških rana (Guffey i Wilborn, 2006; Enwemeka i sar., 2009). Imajući u vidu da se FDT koja je posredovana RKV neselektivno ubijaju bakterije, primena FDT je naročito pogodna za tretman polimikrobnih infekcija (Sharma i sar., 2002; Huang i sar., 2010). Sa druge strane, neselektivnost FDT može biti i negativna, jer mogu nastati i oštećenja eukariotskih ćelija. Međutim, naši rezultati su pokazali da su splenociti (normalne eukariotske ćelije) manje osetljivi na delovanje fotoekscitiranih GKT od bakterija, te bi se preciznim podešavanjem doze svetlosti i koncentracije GKT možda moglo postići selektivno ubijanje bakterija. Takođe, dodatna selektivnost u slučaju lokalizovanih infekcija može se efikasno postići lokalizacijom fotosenzitera i zračenja, čime bi se izbegla neželjena dejstva na okolno tkivo. Veća otpornost eukariotskih u odnosu na bakterijske ćelije može se objasniti kompleksnijom regulacijom odgovora na oksidativni stres kod eukariotskih ćelija (Lushchak, 2011). U zavisnosti od vrste i koncentracije

RKV aktiviraju se različiti signalni molekuli Keap1/Nrf2, NF- κ B, AP-1, PIK3/Akt signalni put, p53, proteini toplotnog stresa i kaskadni put mitogenima aktiviranih protein kinaza (MAPK). Takođe, za razliku od prokariota, posttranslaciona regulacija je izraženija i više uključena u adaptivni odgovor na RKV kod eukariota (Lushchak, 2011). Međutim, istraživanja su pokazala da bakterije mogu razviti rezistenciju na oksidativni stres (Poole, 2012; Jakubowski i Walkowiak, 2015), pa samim tim i na FDT (Bolean i sar., 2010; St Denis i sar., 2011), što treba imati u vidu kao mogući ograničavajući faktor primene GKT u FDT.

FDT sa GKT bi naročito mogla da doprinese prevenciji nastanka bakterijskog biofilma, koji predstavlja zajednicu bakterijskih ćelija koje su ireverzibilno adherisane za površinu i/ili jedne za druge i uronjene u ekstracelularnu polimernu supstancu (matriks) koju same proizvode. Biofilm obezbeđuje bakterijama zaštitu i veću otpornost na spoljašnje nepovoljne uslove (kao što su antibiotici i dezinficijensi) i odgovoran je za nastanak infekcije rana, urinarnog trakta, kao i formiranje dentalnog plaka (Parsek i Singh, 2003). Veliki problem danas predstavljaju i infekcije uzrokovane formiranjem biofilma na medicinskim implantatima (veštački srčani zalisci, intravaskularni i urinarni kateteri i dr.), čija se učestalost kreće od 1-10%, ali može iznositi i do 50% (Busscher i sar., 2012). Iako je zabeleženo da izloženost bakterija plavoj svetlosti može inhibirati formiranje biofilma širokog spektra nozokomijalnih patogena među kojima su Gram-pozitivne (*P. acnes*) i Gram-negativne bakterije (*Acinetobacter baumannii*), pokazano je da se biofilm ne može u potpunosti eliminisati (Lipovsky i sar., 2010; Mussi i sar., 2010). Sa druge strane, pokazano je da FDT može uticati na razlaganje komponenti matriksa u biofilmu (Wainwright i Crossley, 2002). Stoga bi prevazilaženje problema moglo ići u smeru konstrukcije kvalitetnijih materijala za medicinske implantate, koji bi onemogućavali adherenciju bakterija, kolonizaciju i formiranje biofilma. Zbog svog antibakterijskog dejstva, niske toksičnosti prema normalnim eukariotskim ćelijama i dobre biokompatibilnosti, GKT predstavljaju potencijalne kandidate za primenu u konstrukciji implantata. Kod urinarnih i intravaskularnih katetera spoljašnja i unutrašnja strana se mogu obložiti tankim slojem GKT i izložiti izvoru plave svetlosti (kablovi sa optičkim vlaknima umetnutim u endoskop), čime bi se uništile bakterije i izbegla adhezija na njihovim površinama (Biel i sar., 2011). Efikasnost GKT bi se dodatno mogla povećati oblaganjem površina zajedno sa antibioticima što bi bilo delotvorno i

protiv polimikrobnih infekcija (Cassidy i sar., 2012). GKT se mogu funkcionalizovati u cilju dobijanja hidrofobnih svojstava čime bi se onemogućila adherencija bakterija na njihovoj površini (van der Mei i sar., 1988). Takođe, GKT bi se mogle inkorporirati u strukturu polimernih materijala od kojih se prave medicinski implantati u cilju sprečavanja kolonizacije bakterijama i formiranja biofilma.

Rezultati ove disertacije su pokazali da GKT ekscitirane plavom svetlošću ispoljavaju antitumorsko i antibakterijsko dejstvo produkcijom RKV i indukcijom oksidativnog stresa, što ukazuje na potencijalnu primenu GKT kao fotosenzitivnih agenasa u FDT. Ukoliko se ima u vidu da za većinu tumora još uvek ne postoji efikasna terapija, kao i da je učestalost infekcija uzrokovanih sojevima bakterija rezistentnim na antibiotike u stalnom porastu, primena fotoekscitiranih GKT predstavlja veoma interesantan pristup za dalja istraživanja u terapiji tumora i bakterijskih infekcija.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije, a na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Grafenske kvantne tačke, sintetisane elektrohemijom oksidacijom grafita, nakon ekscitacije plavim svetlom proizvode singletni kiseonik i druge RKV.
2. GKT stimulirane plavim svetlom pokazuju fotodinamičku antitumorsku i antibakterijsku aktivnost u *in vitro* uslovima.
3. Osnovni mehanizam fotodinamičke citotoksične aktivnosti GKT je indukcija oksidativnog stresa, koji kod tumorskih ćelija dovodi do programirane ćelijske smrti apoptozom i autofagijom, a kod bakterija do promene morfologije i oštećenja ćelijske membrane.

7. LITERATURA

1. Akhavan O, Ghaderi E, 2010. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ACS Nano* 4, 5731-5736. [[PubMed](#)]
2. Alivisatos P, 2004. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat Biotechnol* 22, 47-52. [[PubMed](#)]
3. Apel A, Herr I, Schwarz H, Rodemann HP, Mayer A, 2008. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res* 68, 1485-1494. [[PubMed](#)]
4. Arjona D, Rey JA, Taylor SM, 2006. Early genetic changes involved in low-grade astrocytic tumor development. *Curr Mol Med* 6, 645-650. [[PubMed](#)]
5. Ashkenazi A, Dixit VM, 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308. [[PubMed](#)]
6. Bajwa N, Mehra NK, Jain K, Jain NK, 2016. Pharmaceutical and biomedical applications of quantum dots. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 44, 758-768. [[PubMed](#)]
7. Baker SN, Baker GA, 2010. Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 6726-6744. [[PubMed](#)]
8. Biel MA, Sievert C, Usacheva M, Teichert M, Wedell E, Loebel N, Rose A, Zimmermann R, 2011. Reduction of Endotracheal Tube Biofilms Using Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Lasers Surg Med* 43, 586-590. [[PubMed](#)]
9. Bjorkoy G, Lamark T, Pankiv S, Overvatn A, Brech A, Johansen T, 2009. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol* 452, 181-197. [[PubMed](#)]
10. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ, 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13, 42-51. [[PubMed](#)]
11. Bogner C, Leber B, Andrews DW, 2010. Apoptosis: embedded in membranes. *Curr Opin Cell Biol* 22, 845-851. [[PubMed](#)]
12. Bolean M, Paulino Tde P, Thedei G, Jr., Ciancaglini P, 2010. Photodynamic therapy with rose bengal induces GroEL expression in *Streptococcus mutans*. *Photomed Laser Surg* 28 Suppl 1, S79-84. [[PubMed](#)]

13. Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254. [[PubMed](#)]
14. Briviba K, Klotz LO, Sies H, 1997. Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biol Chem* 378, 1259-1265. [[PubMed](#)]
15. Brown GC, Borutaite V, 2002. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med* 33, 1440-1450. [[PubMed](#)]
16. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 281, 2013-2016. [[PubMed](#)]
17. Busscher HJ, van der Mei HC, Subbiahdoss G, Jutte PC, van den Dungen JJ, Zaat SA, Schultz MJ, Grainger DW, 2012. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface. *Sci Transl Med* 4, 153rv110. [[PubMed](#)]
18. Cabal-Hierro L, Lazo PS, 2012. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* 24, 1297-1305. [[PubMed](#)]
19. Calin MA, Calin MR, Petrescu E, Neagu M, 2013. Increased number of fractionated irradiation sessions does not improve the cellular response to methyl aminolevulinate-mediated photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 10, 526-534. [[PubMed](#)]
20. Cao L, Wang X, Mezziani MJ, Lu F, Wang H, Luo PG, Lin Y, Harruff BA, Veca LM, Murray D, Xie SY, Sun YP, 2007. Carbon dots for multiphoton bioimaging. *J Am Chem Soc* 129, 11318-11319. [[PubMed](#)]
21. Cassidy CM, Donnelly RF, Elborn JS, Magee ND, Tunney MM, 2012. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) in combination with antibiotics for treatment of *Burkholderia cepacia* complex infection. *J Photochem Photobiol B* 106, 95-100. [[PubMed](#)]
22. Chong Y, Ge C, Fang G, Tian X, Ma X, Wen T, Wamer WG, Chen C, Chai Z, Yin JJ, 2016. Crossover between Anti- and Pro-oxidant Activities of Graphene Quantum Dots in the Absence or Presence of Light. *ACS Nano* 10, 8690-8699. [[PubMed](#)]
23. Christensen IL, Sun YP, Juzenas P, 2011. Carbon dots as antioxidants and prooxidants. *J Biomed Nanotechnol* 7, 667-676. [[PubMed](#)]

24. Cirkovic I, Sorum M, Radenkovic D, Vlahovic MS, Larsen AR, 2013. National surveillance reveals findings of Panton-Valentine leukocidin positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Serbia. *J Med Microbiol* 62, 342-344. [[PubMed](#)]
25. Clo E, Snyder JW, Ogilby PR, Gothelf KV, 2007. Control and selectivity of photosensitized singlet oxygen production: challenges in complex biological systems. *Chembiochem* 8, 475-481. [[PubMed](#)]
26. Cohen GM, 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1), 1-16. [[PubMed](#)]
27. Connolly TM, Lawing WJ, Jr., Majerus PW, 1986. Protein kinase C phosphorylates human platelet inositol trisphosphate 5'-phosphomonoesterase, increasing the phosphatase activity. *Cell* 46, 951-958. [[PubMed](#)]
28. Costa D, Fernandes E, Santos JL, Pinto DC, Silva AM, Lima JL, 2007. New noncellular fluorescence microplate screening assay for scavenging activity against singlet oxygen. *Anal Bioanal Chem* 387, 2071-2081. [[PubMed](#)]
29. Dai T, Gupta A, Murray CK, Vrahas MS, Tegos GP, Hamblin MR, 2012. Blue light for infectious diseases: *Propionibacterium acnes*, *Helicobacter pylori*, and beyond? *Drug Resist Updat* 15, 223-236. [[PubMed](#)]
30. Deretic V, 2011. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol Rev* 240, 92-104. [[PubMed](#)]
31. Deupree SM, Schoenfish MH, 2009. Morphological analysis of the antimicrobial action of nitric oxide on gram-negative pathogens using atomic force microscopy. *Acta Biomater* 5, 1405-1415. [[PubMed](#)]
32. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK, 2003. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 380-387. [[PubMed](#)]
33. Elmore S, 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516. [[PubMed](#)]
34. Enwemeka CS, Williams D, Enwemeka SK, Hollosi S, Yens D, 2009. Blue 470-nm light kills methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro. *Photomed Laser Surg* 27, 221-226. [[PubMed](#)]
35. Esteves da Silva JCG, Gonçalves HMR, 2011. Analytical and bioanalytical applications of carbon dots. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 30, 1327-1336. [[PubMed](#)]

36. Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S, 2005. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol Interv* 5, 94-111. [[PubMed](#)]
37. Fei Liu FZ, Hui Liu, Jingyan Zhang, Shouwu Guo, 2016. Graphene quantum dots with Zn²⁺ and Ni²⁺ conjugates can cleave supercoiled DNA. *Journal of Coordination Chemistry* 69, 3395-3402. [[PubMed](#)]
38. Flannagan RS, Cosio G, Grinstein S, 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* 7, 355-366. [[PubMed](#)]
39. Flick DA, Gifford GE, 1984. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 68, 167-175. [[PubMed](#)]
40. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Castedo M, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, De Laurenzi V, De Maria R, Deshmukh M, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Golstein P, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnoczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Jaattela M, Kepp O, Kimchi A, Klionsky DJ, Knight RA, Kornbluth S, Kumar S, Levine B, Lipton SA, Lugli E, Madeo F, Malomi W, Marine JC, Martin SJ, Medema JP, Mehlen P, Melino G, Moll UM, Morselli E, Nagata S, Nicholson DW, Nicotera P, Nunez G, Oren M, Penninger J, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Scorrano L, Simon HU, Steller H, Tschopp J, Tsujimoto Y, Vandenabeele P, Vitale I, Vousden KH, Youle RJ, Yuan J, Zhivotovsky B, Kroemer G, 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 16, 1093-1107. [[PubMed](#)]
41. Ge J, Lan M, Zhou B, Liu W, Guo L, Wang H, Jia Q, Niu G, Huang X, Zhou H, Meng X, Wang P, Lee CS, Zhang W, Han X, 2014. A graphene quantum dot photodynamic therapy agent with high singlet oxygen generation. *Nat Commun* 5, 4596. [[PubMed](#)]
42. Geim AK, 2009. Graphene: status and prospects. *Science* 324, 1530-1534. [[PubMed](#)]
43. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M, 2003. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol* 21, 1624-1636. [[PubMed](#)]
44. Goodenberger ML, Jenkins RB, 2012. Genetics of adult glioma. *Cancer Genet* 205, 613-621. [[PubMed](#)]

45. Gudgin Dickson EF, Goyan RL, Pottier RH, 2002. New directions in photodynamic therapy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 48, 939-954. [[PubMed](#)]
46. Guffey JS, Wilborn J, 2006. In vitro bactericidal effects of 405-nm and 470-nm blue light. *Photomed Laser Surg* 24, 684-688. [[PubMed](#)]
47. Gurusamy N, Das DK, 2009. Autophagy, redox signaling, and ventricular remodeling. *Antioxid Redox Signal* 11, 1975-1988. [[PubMed](#)]
48. Hamblin MR, Hasan T, 2004. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 3, 436-450. [[PubMed](#)]
49. He C, Klionsky DJ, 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43, 67-93. [[PubMed](#)]
50. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N, 2009. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 20, 1981-1991. [[PubMed](#)]
51. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV, 1995. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495-504. [[PubMed](#)]
52. Huang L, Dai T, Hamblin MR, 2010. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. *Methods Mol Biol* 635, 155-173. [[PubMed](#)]
53. Huang L, Terakawa M, Zhiyentayev T, Huang YY, Sawayama Y, Jahnke A, Tegos GP, Wharton T, Hamblin MR, 2010. Innovative cationic fullerenes as broad-spectrum light-activated antimicrobials. *Nanomedicine* 6, 442-452. [[PubMed](#)]
54. Hui L, Huang J, Chen G, Zhu Y, Yang L, 2016. Antibacterial Property of Graphene Quantum Dots (Both Source Material and Bacterial Shape Matter). *ACS Appl Mater Interfaces* 8, 20-25. [[PubMed](#)]
55. Ichimura Y, Kominami E, Tanaka K, Komatsu M, 2008. Selective turnover of p62/A170/SQSTM1 by autophagy. *Autophagy* 4, 1063-1066. [[PubMed](#)]
56. Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Overvatn A, McMahon M, Hayes JD, Johansen T, 2010. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem* 285, 22576-22591. [[PubMed](#)]

57. Jakubowski W, Walkowiak B, 2015. Resistance of oxidative stress in biofilm and planktonic cells. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 58, 300-308. [[PubMed](#)]
58. Jiang D, Chen Y, Li N, Li W, Wang Z, Zhu J, Zhang H, Liu B, Xu S, 2015. Synthesis of Luminescent Graphene Quantum Dots with High Quantum Yield and Their Toxicity Study. *PLoS One* 10, e0144906. [[PubMed](#)]
59. Jiang F, Chen D, Li R, Wang Y, Zhang G, Li S, Zheng J, Huang N, Gu Y, Wang C, Shu C, 2013. Eco-friendly synthesis of size-controllable amine-functionalized graphene quantum dots with antimycoplasma properties. *Nanoscale* 5, 1137-1142. [[PubMed](#)]
60. Jones TS, Holland EC, 2011. Molecular pathogenesis of malignant glial tumors. *Toxicol Pathol* 39, 158-166. [[PubMed](#)]
61. Kang S, Herzberg M, Rodrigues DF, Elimelech M, 2008. Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! *Langmuir* 24, 6409-6413. [[PubMed](#)]
62. Kannan K, Jain SK, 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7, 153-163. [[PubMed](#)]
63. Kemp M, Go YM, Jones DP, 2008. Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. *Free Radic Biol Med* 44, 921-937. [[PubMed](#)]
64. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257. [[PubMed](#)]
65. Khan MI, Mohammad A, Patil G, Naqvi SA, Chauhan LK, Ahmad I, 2012. Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials* 33, 1477-1488. [[PubMed](#)]
66. Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM, 2006. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 8, 152-162. [[PubMed](#)]
67. Kirkinezos IG, Moraes CT, 2001. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Semin Cell Dev Biol* 12, 449-457. [[PubMed](#)]
68. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME, 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14, 5579-5588. [[PubMed](#)]
69. Klionsky DJ, 2005. Autophagy. *Curr Biol* 15, R282-283. [[PubMed](#)]

70. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ, 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130, 797-810. [[PubMed](#)]
71. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou YS, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, Kim M, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Ueno T, Kominami E, Motohashi H, Tanaka K, Yamamoto M, 2010. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* 12, 213-223. [[PubMed](#)]
72. Kung CP, Budina A, Balaburski G, Bergenstock MK, Murphy M, 2011. Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 21, 71-100. [[PubMed](#)]
73. Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y, 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 171, 4672-4679. [[PubMed](#)]
74. Kuse Y, Ogawa K, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H, 2014. Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light. *Sci Rep* 4, 5223. [[PubMed](#)]
75. Lai L, Lin C, Xiao CQ, Xu ZQ, Han XL, Fu L, Li DW, Mei P, Jiang FL, Guo QL, Liu Y, 2013. Adhesion of quantum dots-induced membrane damage of *Escherichia coli*. *J Colloid Interface Sci* 389, 61-70. [[PubMed](#)]
76. Lambert PA, 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol* 92 Suppl, 46s-54s. [[PubMed](#)]
77. Lavrik I, Golks A, Krammer PH, 2005. Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118, 265-267. [[PubMed](#)]
78. Leach S, Vervloet M, Desprès A, Bréheret E, Hare JP, John Dennis T, Kroto HW, Taylor R, Walton DRM, 1992. Electronic spectra and transitions of the fullerene C60. *Chemical Physics* 160, 451-466. [[PubMed](#)]
79. Levine B, Klionsky DJ, 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6, 463-477. [[PubMed](#)]
80. Li H, He X, Kang Z, Huang H, Liu Y, Liu J, Lian S, Tsang CH, Yang X, Lee ST, 2010. Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design. *Angew Chem Int Ed Engl* 49, 4430-4434. [[PubMed](#)]

81. Li L, Wu G, Yang G, Peng J, Zhao J, Zhu JJ, 2013. Focusing on luminescent graphene quantum dots: current status and future perspectives. *Nanoscale* 5, 4015-4039. [[PubMed](#)]
82. Li Y, Hu Y, Zhao Y, Shi G, Deng L, Hou Y, Qu L, 2011. An electrochemical avenue to green-luminescent graphene quantum dots as potential electron-acceptors for photovoltaics. *Adv Mater* 23, 776-780. [[PubMed](#)]
83. Lion Y, Delmelle M, van de Vorst A, 1976. New method of detecting singlet oxygen production. *Nature* 263, 442-443. [[PubMed](#)]
84. Lipovsky A, Nitzan Y, Gedanken A, Lubart R, 2010. Visible light-induced killing of bacteria as a function of wavelength: implication for wound healing. *Lasers Surg Med* 42, 467-472. [[PubMed](#)]
85. Liu F, Jang MH, Ha HD, Kim JH, Cho YH, Seo TS, 2013. Facile synthetic method for pristine graphene quantum dots and graphene oxide quantum dots: origin of blue and green luminescence. *Adv Mater* 25, 3657-3662. [[PubMed](#)]
86. Liu S, Ng AK, Xu R, Wei J, Tan CM, Yang Y, Chen Y, 2010. Antibacterial action of dispersed single-walled carbon nanotubes on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* investigated by atomic force microscopy. *Nanoscale* 2, 2744-2750. [[PubMed](#)]
87. Liu S, Zeng TH, Hofmann M, Burcombe E, Wei J, Jiang R, Kong J, Chen Y, 2011. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress. *ACS Nano* 5, 6971-6980. [[PubMed](#)]
88. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ, 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501. [[PubMed](#)]
89. Lovric J, Cho SJ, Winnik FM, Maysinger D, 2005. Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chem Biol* 12, 1227-1234. [[PubMed](#)]
90. Lu J, Yang JX, Wang J, Lim A, Wang S, Loh KP, 2009. One-pot synthesis of fluorescent carbon nanoribbons, nanoparticles, and graphene by the exfoliation of graphite in ionic liquids. *ACS Nano* 3, 2367-2375. [[PubMed](#)]
91. Lu J, Yeo PS, Gan CK, Wu P, Loh KP, 2011. Transforming C60 molecules into graphene quantum dots. *Nat Nanotechnol* 6, 247-252. [[PubMed](#)]
92. Lubart R, Lipovski A, Nitzan Y, Friedmann H, 2011. A possible mechanism for the bactericidal effect of visible light. *Laser Ther* 20, 17-22. [[PubMed](#)]

93. Lushchak VI, 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 153, 175-190. [[PubMed](#)]
94. Lyon DY, Adams LK, Falkner JC, Alvarez PJ, 2006. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: effects of preparation method and particle size. *Environ Sci Technol* 40, 4360-4366. [[PubMed](#)]
95. Lyon DY, Brunet L, Hinkal GW, Wiesner MR, Alvarez PJ, 2008. Antibacterial activity of fullerene water suspensions (nC60) is not due to ROS-mediated damage. *Nano Lett* 8, 1539-1543. [[PubMed](#)]
96. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G, 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 741-752. [[PubMed](#)]
97. Malik Z, Ladan H, Nitzan Y, 1992. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J Photochem Photobiol B* 14, 262-266. [[PubMed](#)]
98. Minniti G, De Sanctis V, Muni R, Filippone F, Bozzao A, Valeriani M, Osti MF, De Paula U, Lanzetta G, Tombolini V, Maurizi Enrici R, 2008. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma in elderly patients. *J Neurooncol* 88, 97-103. [[PubMed](#)]
99. Mizushima N, 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21, 2861-2873. [[PubMed](#)]
100. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ, 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075. [[PubMed](#)]
101. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y, 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 107-132. [[PubMed](#)]
102. Moreira MC, Prado R, Campos A, 2011. Application of High Brightness LEDs in the Human Tissue and Its Therapeutic Response, In: Gargiulo, G.D., McEwan, A. (Eds.) *Applied Biomedical Engineering*. InTech, Rijeka, p. Ch. 01.
103. Mroz P, Pawlak A, Satti M, Lee H, Wharton T, Gali H, Sarna T, Hamblin MR, 2007. Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism. *Free Radic Biol Med* 43, 711-719. [[PubMed](#)]
104. Mussi MA, Gaddy JA, Cabruja M, Arivett BA, Viale AM, Rasia R, Actis LA, 2010. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J Bacteriol* 192, 6336-6345. [[PubMed](#)]

105. Naviaux RK, 2012. Oxidative shielding or oxidative stress? *J Pharmacol Exp Ther* 342, 608-618. [[PubMed](#)]
106. Nitzan Y, Kauffman M, 1999. Endogenous Porphyrin Production in Bacteria by δ -Aminolaevulinic Acid and Subsequent Bacterial Photoeradication. *Lasers in Medical Science* 14, 269-277. [[PubMed](#)]
107. Norbury CJ, Hickson ID, 2001. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 367-401. [[PubMed](#)]
108. Notte A, Leclere L, Michiels C, 2011. Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. *Biochem Pharmacol* 82, 427-434. [[PubMed](#)]
109. Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, Grigorieva IV, Firsov AA, 2004. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* 306, 666-669. [[PubMed](#)]
110. Onodera J, Ohsumi Y, 2005. Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem* 280, 31582-31586. [[PubMed](#)]
111. Oplander C, Hidding S, Werners FB, Born M, Pallua N, Suschek CV, 2011. Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts. *J Photochem Photobiol B* 103, 118-125. [[PubMed](#)]
112. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B, 2007. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 143-183. [[PubMed](#)]
113. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B, 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12, 913-922. [[PubMed](#)]
114. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M, 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 22, 18-35. [[PubMed](#)]
115. Parsek MR, Singh PK, 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* 57, 677-701. [[PubMed](#)]
116. Peng J, Gao W, Gupta BK, Liu Z, Romero-Aburto R, Ge L, Song L, Alemany LB, Zhan X, Gao G, Vithayathil SA, Kaiparettu BA, Marti AA, Hayashi T, Zhu JJ, Ajayan PM, 2012. Graphene quantum dots derived from carbon fibers. *Nano Lett* 12, 844-849. [[PubMed](#)]

117. Poole K, 2012. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 67, 2069-2089. [[PubMed](#)]
118. Pourmand A, Mazer-Amirshahi M, Jasani G, May L, 2017. Emerging trends in antibiotic resistance: Implications for emergency medicine. *Am J Emerg Med*. [[PubMed](#)]
119. Qin Y, Lu M, Gong X, 2008. Dihydrorhodamine 123 is superior to 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 6G in detecting intracellular hydrogen peroxide in tumor cells. *Cell Biol Int* 32, 224-228. [[PubMed](#)]
120. Qin Y, Zhou ZW, Pan ST, He ZX, Zhang X, Qiu JX, Duan W, Yang T, Zhou SF, 2015. Graphene quantum dots induce apoptosis, autophagy, and inflammatory response via p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB mediated signaling pathways in activated THP-1 macrophages. *Toxicology* 327, 62-76. [[PubMed](#)]
121. Qu G, Wang X, Wang Z, Liu S, Jiang G, 2013. Cytotoxicity of quantum dots and graphene oxide to erythroid cells and macrophages. *Nanoscale Res Lett* 8, 198. [[PubMed](#)]
122. Quirk BJ, Brandal G, Donlon S, Vera JC, Mang TS, Foy AB, Lew SM, Girotti AW, Jogonal S, LaViolette PS, Connelly JM, Whelan HT, 2015. Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors--where do we stand? *Photodiagnosis Photodyn Ther* 12, 530-544. [[PubMed](#)]
123. Raicevic N, Mladenovic A, Perovic M, Harhaji L, Miljkovic D, Trajkovic V, 2005. Iron protects astrocytes from 6-hydroxydopamine toxicity. *Neuropharmacology* 48, 720-731. [[PubMed](#)]
124. Reiners JJ, Jr., Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, Kessel D, 2010. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy* 6, 7-18. [[PubMed](#)]
125. Robinson JT, Tabakman SM, Liang Y, Wang H, Casalongue HS, Vinh D, Dai H, 2011. Ultrasmall reduced graphene oxide with high near-infrared absorbance for photothermal therapy. *J Am Chem Soc* 133, 6825-6831. [[PubMed](#)]
126. Sadowski-Debbing K, Coy JF, Mier W, Hug H, Los M, 2002. Caspases--their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 50, 19-34. [[PubMed](#)]
127. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P, 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861-2874. [[PubMed](#)]

128. Schembri MA, Hjerrild L, Gjermansen M, Klemm P, 2003. Differential expression of the Escherichia coli autoaggregation factor antigen 43. *J Bacteriol* 185, 2236-2242. [[PubMed](#)]
129. Shang W, Zhang X, Zhang M, Fan Z, Sun Y, Han M, Fan L, 2014. The uptake mechanism and biocompatibility of graphene quantum dots with human neural stem cells. *Nanoscale* 6, 5799-5806. [[PubMed](#)]
130. Sharma M, Bansal H, Gupta PK, 2002. Photodynamic inactivation of antibiotic resistant strain of Pseudomonas aeruginosa by porphyrins induced by delta-aminolaevulinic acid. *Indian J Med Res* 116, 99-105. [[PubMed](#)]
131. Shen J, Zhu Y, Yang X, Li C, 2012. Graphene quantum dots: emergent nanolights for bioimaging, sensors, catalysis and photovoltaic devices. *Chem Commun (Camb)* 48, 3686-3699. [[PubMed](#)]
132. Shi W, Fan H, Ai S, Zhu L, 2015. Preparation of fluorescent graphene quantum dots from humic acid for bioimaging application. *New J. Chem.* 39, 7054-7059. [[PubMed](#)]
133. Shiohara A, Hoshino A, Hanaki K, Suzuki K, Yamamoto K, 2004. On the cytotoxicity caused by quantum dots. *Microbiol Immunol* 48, 669-675. [[PubMed](#)]
134. Silvestrov PG, Efetov KB, 2007. Quantum dots in graphene. *Phys Rev Lett* 98, 016802. [[PubMed](#)]
135. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F, 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5, 415-418. [[PubMed](#)]
136. Simone CB, 2nd, Friedberg JS, Glatstein E, Stevenson JP, Sterman DH, Hahn SM, Cengel KA, 2012. Photodynamic therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 4, 63-75. [[PubMed](#)]
137. Sinha RP, Hader DP, 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* 1, 225-236. [[PubMed](#)]
138. Sk MA, Ananthanarayanan A, Huang L, Lim KH, Chen P, 2014. Revealing the tunable photoluminescence properties of graphene quantum dots. *Journal of Materials Chemistry C* 2, 6954. [[PubMed](#)]
139. Slee EA, Adrain C, Martin SJ, 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276, 7320-7326. [[PubMed](#)]

140. St Denis TG, Huang L, Dai T, Hamblin MR, 2011. Analysis of the bacterial heat shock response to photodynamic therapy-mediated oxidative stress. *Photochem Photobiol* 87, 707-713. [[PubMed](#)]
141. Stern ST, Zolnik BS, McLeland CB, Clogston J, Zheng J, McNeil SE, 2008. Induction of autophagy in porcine kidney cells by quantum dots: a common cellular response to nanomaterials? *Toxicol Sci* 106, 140-152. [[PubMed](#)]
142. Stylli SS, Kaye AH, 2006. Photodynamic therapy of cerebral glioma - a review. Part II - clinical studies. *J Clin Neurosci* 13, 709-717. [[PubMed](#)]
143. Sun H, Gao N, Dong K, Ren J, Qu X, 2014. Graphene quantum dots-band-aids used for wound disinfection. *ACS Nano* 8, 6202-6210. [[PubMed](#)]
144. Sun H, Zhang F, Wei H, Yang B, 2013. The effects of composition and surface chemistry on the toxicity of quantum dots. *Journal of Materials Chemistry B* 1, 6485. [[PubMed](#)]
145. Svanberg K, Andersson T, Killander D, Wang I, Stenram U, Andersson-Engels S, Berg R, Johansson J, Svanberg S, 1994. Photodynamic therapy of non-melanoma malignant tumours of the skin using topical delta-amino levulinic acid sensitization and laser irradiation. *Br J Dermatol* 130, 743-751. [[PubMed](#)]
146. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ, 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 231-241. [[PubMed](#)]
147. Thurlow LR, Joshi GS, Richardson AR, 2012. Virulence strategies of the dominant USA300 lineage of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *FEMS Immunol Med Microbiol* 65, 5-22. [[PubMed](#)]
148. Toninello A, Salvi M, Pietrangeli P, Mondovi B, 2004. Biogenic amines and apoptosis: minireview article. *Amino Acids* 26, 339-343. [[PubMed](#)]
149. van der Mei HC, Leonard AJ, Weerkamp AH, Rouxhet PG, Busscher HJ, 1988. Surface properties of *Streptococcus salivarius* HB and nonfibrillar mutants: measurement of zeta potential and elemental composition with X-ray photoelectron spectroscopy. *J Bacteriol* 170, 2462-2466. [[PubMed](#)]
150. Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C, 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods* 243, 167-190. [[PubMed](#)]
151. Vila J, Saez-Lopez E, Johnson JR, Romling U, Dobrindt U, Canton R, Giske CG, Naas T, Carattoli A, Martinez-Medina M, Bosch J, Retamar P, Rodriguez-Bano J, Baquero F, Soto SM, 2016. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev* 40, 437-463. [[PubMed](#)]

152. Vileno B, Jeney S, Sienkiewicz A, Marcoux PR, Miller LM, Forro L, 2010. Evidence of lipid peroxidation and protein phosphorylation in cells upon oxidative stress photo-generated by fullerenes. *Biophys Chem* 152, 164-169. [[PubMed](#)]
153. Volarevic V, Paunovic V, Markovic Z, Simovic Markovic B, Misirkic-Marjanovic M, Todorovic-Markovic B, Bojic S, Vucicevic L, Jovanovic S, Arsenijevic N, Holclajtner-Antunovic I, Milosavljevic M, Dramicanin M, Kravic-Stevovic T, Ciric D, Lukic ML, Trajkovic V, 2014. Large graphene quantum dots alleviate immune-mediated liver damage. *ACS Nano* 8, 12098-12109. [[PubMed](#)]
154. Volkov Y, 2015. Quantum dots in nanomedicine: recent trends, advances and unresolved issues. *Biochem Biophys Res Commun* 468, 419-427. [[PubMed](#)]
155. Wainwright M, Crossley KB, 2002. Methylene Blue--a therapeutic dye for all seasons? *J Chemother* 14, 431-443. [[PubMed](#)]
156. Wang Q, Fang T, Liu P, Min X, Li X, 2011. Study of the bioeffects of CdTe quantum dots on *Escherichia coli* cells. *J Colloid Interface Sci* 363, 476-480. [[PubMed](#)]
157. Wang S, Cole IS, Zhao D, Li Q, 2016. The dual roles of functional groups in the photoluminescence of graphene quantum dots. *Nanoscale* 8, 7449-7458. [[PubMed](#)]
158. Wang X, Cao L, Lu F, Mezziani MJ, Li H, Qi G, Zhou B, Harruff BA, Kermarrec F, Sun YP, 2009. Photoinduced electron transfers with carbon dots. *Chem Commun (Camb)*, 3774-3776. [[PubMed](#)]
159. Wang Z, Zeng H, Sun L, 2015. Graphene quantum dots: versatile photoluminescence for energy, biomedical, and environmental applications. *J. Mater. Chem. C* 3, 1157-1165. [[PubMed](#)]
160. Westphal M, Lamszus K, 2011. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. *Nat Rev Neurosci* 12, 495-508. [[PubMed](#)]
161. Willyard C, 2017. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. *Nature* 543, 15. [[PubMed](#)]
162. Wilson BC, 2002. Photodynamic therapy for cancer: principles. *Can J Gastroenterol* 16, 393-396. [[PubMed](#)]
163. Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P, 2012. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res* 22, 43-61. [[PubMed](#)]

164. Worle-Knirsch JM, Pulskamp K, Krug HF, 2006. Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays. *Nano Lett* 6, 1261-1268. [[PubMed](#)]
165. Wu C, Wang C, Han T, Zhou X, Guo S, Zhang J, 2013. Insight into the cellular internalization and cytotoxicity of graphene quantum dots. *Adv Healthc Mater* 2, 1613-1619. [[PubMed](#)]
166. Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, Arakane K, Miyata N, Goda Y, Masumizu T, Nagano T, 2003. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C60) as potential medicines: O₂-* versus 1O₂. *J Am Chem Soc* 125, 12803-12809. [[PubMed](#)]
167. Yang Z, Klionsky DJ, 2009. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 335, 1-32. [[PubMed](#)]
168. Yang Z, Klionsky DJ, 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 12, 814-822. [[PubMed](#)]
169. Yang Z, Klionsky DJ, 2010. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22, 124-131. [[PubMed](#)]
170. Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, Lenardo M, 2006. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4952-4957. [[PubMed](#)]
171. Yuan J, Kroemer G, 2010. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev* 24, 2592-2602. [[PubMed](#)]
172. Zabirnyk O, Yezhelyev M, Seleverstov O, 2007. Nanoparticles as a novel class of autophagy activators. *Autophagy* 3, 278-281. [[PubMed](#)]
173. Zdybicka-Barabas A, Staczek S, Mak P, Skrzypiec K, Mendyk E, Cytrynska M, 2013. Synergistic action of *Galleria mellonella* apolipophorin III and lysozyme against Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1828, 1449-1456. [[PubMed](#)]
174. Zhang R, Liu Y, Yu L, Li Z, Sun S, 2013. Preparation of high-quality biocompatible carbon dots by extraction, with new thoughts on the luminescence mechanisms. *Nanotechnology* 24, 225601. [[PubMed](#)]
175. Zheng XT, Ananthanarayanan A, Luo KQ, Chen P, 2015. Glowing graphene quantum dots and carbon dots: properties, syntheses, and biological applications. *Small* 11, 1620-1636. [[PubMed](#)]

176. Zhou J, Booker C, Li R, Zhou X, Sham TK, Sun X, Ding Z, 2007. An electrochemical avenue to blue luminescent nanocrystals from multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs). *J Am Chem Soc* 129, 744-745. [[PubMed](#)]
177. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ, 2006. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta* 1757, 509-517. [[PubMed](#)]
178. Zorzos AN, Boyden ES, Fonstad CG, 2010. Multiwaveguide implantable probe for light delivery to sets of distributed brain targets. *Opt Lett* 35, 4133-4135. [[PubMed](#)]
179. World Health Organization. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. 2014. from <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.

SPISAK SKRAĆENICA

AFM - mikroskopija atomskih sila (*engl.* atomic force microscopy)

AIF - indukujući faktor apoptoze (*engl.* apoptosis-inducing factor)

AMBRA1 - aktivirajući molekul u autofagiji 1 regulisanoj beclin-1 (*engl.* Activating Molecule in Beclin-1-Regulated Autophagy 1)

Ann V-FITC - aneksin V - fluorescein izotiocijanat (*engl.* annexin V-fluorescein isothiocyanate)

ANOVA - analiza varijanse (*engl.* analysis of variance)

Apaf-1 - faktor-1 za aktivaciju apoptotskih proteaza (*engl.* apoptotic peptidase activating factor 1)

ApoStat - fluorescein izotiocijanat (FITC)-konjugovani pankaspazni inhibitor (*engl.* fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated pan-caspase inhibitor)

Atg geni - (*engl.* autophagy related genes)

beclin-1 - (*engl.* autophagy-related bcl2-interacting Atg6 homolog)

BSA - albumin iz goveđeg seruma (*engl.* bovine serum albumin)

CFU - broj jedinica odnosno živih bakterijskih ćelija koje formiraju kolonije (*engl.* colony forming unit)

CNS - centralni nervni sistem

DCF - 2', 7' - dihlorofluorescein

DCFDA - 2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat

DD - domen smrti (*engl.* death domain)

DHE - dihidroetidijum

DHR - dihidrorodamin

DISC - signalni kompleks indukovan smrću (*engl.* death-inducing signalling complex)

DMSO - dimetilsulfoksid

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina (*engl.* deoxyribonucleic acid)

EPR- elektronska paramagnetna rezonanca (*engl.* electron paramagnetic resonance)

FACS - protočna citofluorimetrija (*engl.* fluorescence-activated cell sorting)

FCS - goveđi fetalni serum (*engl.* fetal calf serum)

FDT - fotodinamička terapija (*engl.* photodynamic therapy)

FADD - Fas udružen protein sa intraćelijskim domenima smrti (*engl.* Fas-associated protein with death domain)

FSC parametar - (*engl.* forward scatter)

GKT - grafenske kvantne tačke (*engl.* graphene quantum dots)

GBM - glioblastoma multiforme

HEPES - 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (*engl.* 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

IC₅₀ - polovina maksimalne inhibitorne koncentracije

LC3 - protein asociran sa mikrotubulama lakog lanca 3 (*engl.* microtubule-associated light chain 3).

LDH - laktat dehidrogenaza (*engl.* lactate dehydrogenase)

MRSA - meticilin-rezistentna *Staphilococcus aureus*

mTOR - meta rapamicina (*engl.* mechanistic target of rapamycin)

MTT - 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolijum bromid

Na₃VO₄ - natrijum ortovanadat

NF-κB - nuklearni faktor kapa B

NH₄Cl - amonijum hlorid

PBS - puferizovan fiziološki rastvor (*engl.* phosphate buffered saline)

PI - propidijum jodid (*engl.* propidium iodide)

PI3P - fosfatidilinozitol 3-fosfat (*engl.* phosphatidylinositol 3-phosphate)

PMSF - fenilmetilsulfonil fluorid (*engl.* phenylmethylsulfonyl fluoride)

pNPP - p-nitrofenil fosfat

RKV - reaktivne kiseonične vrste (*engl.* reactive oxygen species)

RMS - (*engl.* root mean square)

RNK - ribonukleinska kiselina (*engl.* ribonucleic acid)

RPMI 1640 - medijum za kultivaciju humanih limfocita (*engl.* Roswell Park Memorial Institute 1640)

SDS - natrijum dodecil sulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate)

SD - standardna devijacija

SV - srednja vrednost

SZO - svetska zdravstvena organizacija (*engl.* world health organization)

shRNA - mala ukosničasta RNK (*engl.* small hairpin RNA)

SQSTM1 - p62 (*engl.* p62/sequestosome1-SQSTM1)

SSC parametar - (*engl.* side scatter)

TBS-T - deterdžent (*engl.* tris-buffered saline)

TEM - transmisiona elektronska mikroskopija (*engl.* transmission electron microscopy)

TEMED - N,N,N',N'-tetrametiletilen-1,2-diamin (*engl.* N,N,N',N'-tetramethylethylene-1,2-diamine)

TNFR - receptor za faktor nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor receptor)

Tris - tris (hidroksimetil) aminometan (*engl.* tris (hydroxymethyl) aminomethane)

ULK - kinaza ULK1 (*engl.* Unc-51-like kinase)

U251- ćelije glioma čoveka

$^1\text{O}_2$ - singletni kiseonik

O_2^- - superoksidni anjon radikal

BIOGRAFIJA

Biljana Ristić je rođena 15.10.1984. godine u Beogradu. Diplomirala je molekularnu biologiju i fiziologiju na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2010. godine sa prosečnom ocenom u toku studija 9,25.

Doktorske akademske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2010/2011. godine.

Od januara 2011. godine radi na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Naučno istraživački rad Biljane Ristić realizovan je kroz projekat finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Uloga autofagije u regulaciji smrti tumorskih ćelija” (evidencioni broj 173053, rukovodilac dr Ljubica Harhaji Trajković).

Odlukom Naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu decembra 2016. godine, Biljana Ristić je stekla reizbor u zvanje Istraživač saradnik u oblasti Molekularne medicine.

Koautor je 16 radova u međunarodnim časopisima.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Biljana Ristić

broj upisa MM 05/10

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Fotodinamičko citotoksično i antibakterijsko dejstvo grafenskih kvantnih tačaka in vitro

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 03.07.2017.

Biljana Ristić

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Biljana Ristić

Broj upisa MM 05/10

Studijski program MOLEKULARNA MEDICINA

Naslov rada **Fotodinamičko citotoksično i antibakterijsko dejstvo grafenskih kvantnih tačaka in vitro**

Mentor Prof.dr Vladimir Trajković

Potpisani Biljana Ristić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja 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 doktoranda

U Beogradu, 03.07.2017.

Biljana Ristić

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

Fototoksično citoprotektivno i antibakterijsko dejstvo grafenskih kvantnih tačaka in vitro

koja je moje autorsko delo.

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

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

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 03.07.2017.

Borivoje Petrović

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 dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade. 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 prerade. 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.