

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Mr sc biol. Jasminka Ž. Mrđanović

UTICAJ FULERENOLA NA UČESTALOST
HROMOZOMSKIH ABERACIJA I
MIKRONUKLEUSA U ĆELIJSKOJ LINIJI
CHO-K1 OVARIJUMA HRČKA I U
KULTURI LIMFOCITA PERIFERNE KRVI
ČOVEKA

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Jasminka Ž. Mrđanović

THE INFLUENCE OF FULLERENOL ON
THE FREQUENCY OF CHROMOSOME
ABERRATIONS AND MICRONUCLEI IN
OVARIAN HAMSTER CELL LINE CHO-K1
AND IN HUMAN PERIPHERAL BLOOD
LYMPHOCITES CELL CULTURE

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Zahvalnica

Ekperimentalni deo istraživanja ove doktorske disertacije je urađen u Zavodu za Ekperimentalnu onkologiju Instituta za Onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici, Departmanu za hemiju Prirodno-Matematičkog fakulteta i Tehnološkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, Institutu za nuklearne nauke Vinča Univerziteta u Beogradu i Institutu "Jožef Štefan" u Ljubljani.

Disertacija je urađena u okviru istraživačkog projekta br: 142076 "Sinteza biološki aktivnih molekula fulerena i nanomedicinska istraživanja" tokom 2008.-2010., pod rukovodstvom prof dr Aleksandra Đorđevića, kao i projekta br: III45005, "Funkcionalizovani, funkcionalni i usavršeni nanomaterijali", tokom 2011.-2012., čiji je rukovodilac prof dr Zlatko Rakočević, dok je rukovodilac podprojekta prof dr Aleksandar Đorđević. Oba projekta su finansirana od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije, kojem se ovom prilikom zahvaljujem na materijalnoj pomoći tokom izrade ove teze.

Veliku zahvalnost dugujem svojim profesorima, kolegama i prijateljima koji su mi pružali podršku tokom svih faza rada:

Mom mentoru, prof dr Aleksandru Đorđeviću, redovnom profesoru Prirodno - Matematičkog fakulteta u Novom Sadu, koji je od samog početka izrade ovog rada verovao u mene, iskreno mi pomagao i iskazao ogromno strpljenje i empatiju tokom svih godina i etapa u nastanku teze.

Akademiku Marku Anđelkoviću, mentoru ovog rada, izražavam duboko poštovanje i zahvalnost za oblikovanje početne ideje, konstruktivne savete, nesebično deljenje znanja, pokazanu dobru volju, uvažavanje i veru u uspeh.

Najsrdajnije se zahvaljujem profesoru Biološkog fakulteta u Beogradu dr Marini Stamenković-Radak, na finalizovanju teze, stručnim komentarima i sugestijama u završnoj fazi izrade rada.

Vanrednom profesoru Medicinskog fakulteta u Kragujevcu dr Vladimiru Jurišiću, zahvaljujem se na pomoći i kritičkoj oceni rada, iskazanom entuzijazmu, interesovanju i otvorenosti za temu istraživanja.

Dr Gordani Bogdanović, upravnici Zavoda za eksperimentalnu Onkologiju, na iskrenoj podršci u svim fazama izrade rada, strpljenju i razumevanju.

Dr Mladenu Prvuloviću i dr Vladimiru Vit. Baltiću, redovnim profesorima Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, koji su na početku moje profesionalne karijere doprineli mom naučnom usmerenju.

Slavici Šolajić, specijalisti medicinske genetike i Višnji Bogdanović, doktoru biohemijskih nauka, zahvaljujem se na stručnoj pomoći, kojom su značajno doprinele kvalitetu ovog rada, kao i na podršci, razumevanju i prijateljskim savetima.

Danici Radmanović Jović, masteru hemijskih nauka, na kolegijalnoj pomoći.

Andreju Palančaninu, masteru grafičkog inženjerstva i dizajna, na nesebičnoj pomoći oko tehničke pripreme rada.

Prijateljima, rodbini i komšijama na toplim prijateljskim savetima i podršci da istrajem u započetom poslu.

Porodici, zahvaljujući kojoj sam pronalazila snagu i motiv da budem na ovom putu.

Podaci o doktorskoj disertaciji:

Naslov doktorske disertacije: Uticaj fulerenola na učestalost hromozomskih aberacija i mikronukleusa u ćelijskoj liniji CHO-K1 ovarijuma hrčka i u kulturi limfocita periferne krvi čoveka

Rezime

Nanomaterijali zahvaljujući svojim malim dimenzijama i raznovrsnim fizičko-hemijskim osobinama imaju velik potencijal za primenu u različitim oblastima života. Među nanočestice sa širokom upotrebom u biomedicini ubraja se fuleren C_{60} . Njegova slaba vodorastvorljivost može se prevazići derivatizacijom, pri čemu fuleren stiče nova svojstva koja utiču na njegovu funkcionalnost. Najpoznatiji vodorastvorni derivati C_{60} su fulerenoli ($C_{60}(OH)_n$, $n=2-40$), koji imaju velik potencijal za primenu u medicini. Taj potencijal je baziran na njihovoj sposobnosti da u biološkim sistemima skupljaju slobodne radikale nastale u oksidativnom stresu. Međutim, sa druge strane, fulerenoli imaju sposobnost da pod određenim uslovima deluju prooksidativno. Zbog toga je neophodno definisanje koncentracija i uslova pod kojima fulerenol i njegovi derivati deluju kao antioksidanti odnosno prooksidanti. Taj aspekt je veoma važan zbog uticaja ovih nanočestica na DNK i određuje u velikoj meri njihova genotoksična odnosno antigenotoksična svojstva. Pored uticaja koncentracije nanočestica na oksidativni status, na genotoksičnost utiču i fizičko-hemijske karakteristike samih nanočestica kao što su: veličina, oblik, površinsko naelektrisanje, čistoća, rastvorljivost, površinske modifikacije i agregacija, koje je takođe potrebno precizno definisati. Konačno, ispitivanje uticaja novosintetisanih supstanci sa potencijalom za medicinsku aplikaciju na DNK, predstavlja neophodan korak pre faze kliničkih studija.

Zbog svega navedenog, primarni cilj ovog rada jeste ispitivanje genotoksičnih odnosno antigenotoksičnih svojstava vodorastvornog fulerenskog derivata fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$, na dva različita sisarska modela. Prvi model je ćelijska kultura ovarijuma kineskog hrčka CHO-K1, a drugi primarna ćelijska kultura humanih limfocita. U radu su evaluirane fizičko-hemijske karakteristike nanočestice fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ u medijumu za ćelijske kulture sa serumom i to u uslovima koji odgovaraju

eksperimentalnim uslovima u testovima mikronukleusa i hromozomskih aberacija. Zatim je ispitan uticaj fulerenola na preživljavanje ćelija u cilju utvrđivanja subcitotoksičnih koncentracija fulerenola, potrebnih za ispitivanje genotoksičnosti i antigenotoksičnosti fulerenola. Nakon toga je izvršena evaluacija incidencije biomarkera oštećenja DNK radi utvrđivanja genotoksičnog potencijala fulerenola. U poslednjem segmentu rada je evaluacijom istih biomarkera analiziran i antigenotoksičan potencijal fulerenola, na ćelijskim kulturama koje su prethodno oštećene poznatim citostatskim agensom mitomicinom C.

Rezultati analiza su pokazali da je $C_{60}(OH)_{24}$ dimenzija od 40-180 nm u zavisnosti od kosolventa, kao i da gradi stabilne nanočestice u medijumu za ćelijsku kulturu sa fetalnim goveđim serumom. Citotoksičnost fulerenola kreće se u opsegu koncentracija od 88,6 μ M-443,2 μ M. Analizom genotoksičnosti fulerenola testom mikronukleusa i hromozomskih aberacija pokazano je da fulerenol nije bio genotoksičan u ispitivanim ćelijskim kulturama, pri ispitivanim subcitotoksičnim koncentracijama i pri datim vremenskim tretmanima. Ispitivanje antigenotoksičnog potencijala je pokazalo da fulerenol utiče na snižavanje ispitivanih biomarkera oštećenja DNK.

Ključne reči: nanočestice, fulereni, fulerenol, genotoksičnost, mikronukleusi, hromozomske aberacije

Naučna oblast: biologija

Uža naučna oblast: genotoksikologija

UDK: 575.224.6:66.017 (043)

Title of doctoral dissertation: The influence of fulleranol on the frequency of chromosome aberrations and micronuclei in ovarian hamster cell line CHO-K1 and in human peripheral blood lymphocytes cell culture

Summary

Nanomaterials, due to their small dimensions and manifold physicochemical characteristics have great potential for application in various areas of life. One of nanoparticles with wide implementation in biomedicine is fullerene C_{60} . Its weak water solubility can be overcome by derivatization after which fullerene acquires new characteristics, which affect its functionality. The most famous water soluble C_{60} derivatives are fullerenols ($C_{60}(OH)_n$, $n=2-40$), which have great potential for implementation in medicine. This potential is based on their ability to collect free radicals occurring in oxidative stress in biological systems. However, on the other hand, fullerenols are able to act prooxidatively under certain conditions. Thus, it is necessary to define concentrations and conditions under which fulleranol and its derivatives act as antioxidants, i.e. prooxidants. This aspect is very important because of the impact of these nanoparticles to the DNA, which largely defines their genotoxic i.e. antigenotoxic characteristics. Besides the impact of nanoparticles' concentration to oxidative status, genotoxicity is also affected by physicochemical characteristics of nanoparticles themselves: their size, shape, surface charge, purity, solubility, surface modifications and aggregation, which are all necessary to be precisely defined. Finally, the testing of the impact of newly synthesized substances with potential for medical application to DNA, represents a necessary step before the phase of clinical trials.

Due to all the above state, the primary aim of this paper was to test genotoxic i.e. antigenotoxic characteristic of water-soluble fullerene derivative fulleranol $C_{60}(OH)_{24}$, in two different mammalian models. The first model was an ovarian cell culture of a Chinese hamster CHO-K1, and the other was a primary humane lymphocyte cell culture. The paper evaluated physicochemical characteristics of fulleranol nanoparticle $C_{60}(OH)_{24}$ in the cell culture medium with serum under the conditions which were in accordance with the experimental conditions in micronuclei and chromosomal

aberrations tests. Furthermore, the affect of fulleranol to cell survival was tested with the aim of determination of fulleranol subcytotoxic concentrations, necessary for testing of fulleranol genotoxicity and antigenotoxicity. After that, the DNA damage biomarkers incidence evaluation was performed for determination of fulleranol genotoxicity potential. In the last segment of the paper, the antigenotoxic potential of fulleranol was analyzed by evaluation of the same biomarkers, in cell cultures, which were previously damaged by the known cytostatic agent mitomycin C.

The results of the analysis showed that $C_{60}(OH)_{24}$ dimensions of 40-180nm depended on the cosolvent, and that it crated stable nanoparticles in the cell culture medium with fetal bovine serum. Cytotoxicity of fulleranol varied in the range of concentrations from 88.6 μ M-443.2 μ M. The analysis of fulleranol genotoxicity by the micronuclei test and chromosomal aberrations test showed that fulleranol was not genotoxic in the tested cell cultures, at given subcytotoxic concentrations and treatment duration. Testing of antigenotoxic potential showed that fulleranol affected the decrease of the tested DNA damage biomarkers.

Key words: nanoparticles, fullerenes, fulleranol, genotoxicity, micronuclei, chromosomal aberrations

Scientific field: biology

Confined scientific field: genotoxicology

UDK: 575.224.6:66.017 (043)

Sadržaj

Zahvalnica	3
UVOD	12
Nanočestice.....	13
Proizvodnja nanočestica	14
Podela nanočestica.....	15
Nanočestice u medicini.....	15
Fuleren C ₆₀	20
Osnovne karakteristike fulerena i fulerenskih derivata u biološkom sistemu	23
Rastvorljivost fulerenola C ₆₀ (OH) ₂₄	30
Biološka aktivnost fulerenola	33
Genotoksičnost nanočestica.....	43
Mehanizmi indukovanja DNK oštećenja nanomaterijalima.....	44
Testovi za analizu genotoksičnosti nanočestica	59
Test mikronukleusa.....	62
Test hromozomskih aberacija.....	63
CILJ RADA I RADNA HIPOTEZA	65
Ciljevi istraživanja.....	65
Radna hipoteza	66
MATERIJAL I METODE	67
Fulerenol –sinteza.....	67
Mitomycin C- priprema	68
Fizičko-hemijska karakterizacija	68
DLS - Dinamičko rasipanje svetlosti (engl. <i>Dynamic Light scattering</i>)	68
AFM - Mikroskopija atomskih sila (engl. <i>Atomic Force Microscopy</i>).....	68
TEM - Transmisiona elektronska mikroskopija (engl. <i>Transmission Electron Microscope</i>).....	69
Ćelijske kulture.....	69
Priprema ćelijske kulture CHO-K1 ovarijuma kineskog hrčka.....	70
Priprema ćelijske kulture humanih limfocita.....	70
Ćelijska vijabilnost i IC ₅₀	70
Određivanje IC ₅₀ za fulerenol u CHO-K1 ćelijskoj kulturi.....	71
Određivanje IC ₅₀ za fulerenol u kulturi humanih limfocita.....	72
Test mikronukleusa.....	72
Test mikronukleusa u CHO-K1 ćelijskoj kulturi.....	73
Test mikronukleusa u kulturi humanih limfocita	74
Test hromozomskih aberacija.....	76
Test hromozomskih aberacija u CHO-K1 ćelijskoj kulturi.....	76
Test hromozomskih aberacija u kulturi humanih limfocita.....	77
Statistička analiza	79
REZULTATI	80
Fizičko-hemijska karakterizacija fulerenola C ₆₀ (OH) ₂₄	80
DLS - Dinamičko rasipanje svetlosti.....	80
AFM - Mikroskopija atomskih sila	86
TEM - Transmisiona elektronska mikroskopija	94
IC ₅₀	95
IC ₅₀ za fulerenol na CHO-K1 prema protokolu za test mikronukleusa.....	95

IC ₅₀ za fulerenol na ćelijskoj kulturi CHO-K1 prema protokolu za test hromozomskih aberacija.....	97
IC ₅₀ za fulerenol u kulturi humanih limfocita prema protokolu za test mikronukleusa	99
IC ₅₀ za fulerenol u kulturi humanih limfocita prema protokolu za test hromozomskih aberacija.....	102
Mitomycin C.....	105
Uticaj MMC na učestalost mikronukleusa na CHO-K1 ćelijskoj kulturi.....	105
Uticaj MMC na učestalost ćelija sa hromozomskim aberacijama na CHO-K1 ćelijskoj kulturi.....	106
Uticaj MMC na učestalost mikronukleusa u kulturi humanih limfocita	107
Uticaj MMC na učestalost ćelija sa hromozomskim aberacijama u kulturi humanih limfocita.....	108
CHO-K1 ćelijska kultura	109
Uticaj fulerenola na učestalost mikronukleusa u CHO-K1 ćelijskoj kulturi	110
Uticaj fulerenola na učestalost mikronukleusa u MMC-tretiranoj CHO-K1 ćelijskoj kulturi.....	111
Uticaj fulerenola na učestalost ćelija sa hromozomskim aberacijama u CHO-K1 ćelijskoj kulturi	112
Uticaj fulerenola na učestalost ćelija sa hromozomskim aberacijama u MMC-tretiranoj CHO-K1 ćelijskoj kulturi.....	113
Kultura humanih limfocita.....	114
Uticaj fulerenola na učestalost mikronukleusa u kulturi humanih limfocita.....	114
Uticaj fulerenola na učestalost mikronukleusa u MMC-tretiranoj kulturi humanih limfocita.....	115
Uticaj fulerenola na učestalost ćelija sa hromozomskim aberacijama u kulturi humanih limfocita.....	116
Uticaj fulerenola na učestalost ćelija sa hromozomskim aberacijama u MMC-tretiranoj kulturi humanih limfocita	117
DISKUSIJA	119
Fizičko-hemijske karakteristike fulerenola.....	120
Citotoksičnost fulerenola	123
Genotoksičnost fulerenola	126
Antigenotoksičnost fulerenola.....	129
Uticaj fulerenola na proliferaciju ćelija	132
Uticaj fulerenola na tip hromozomskih aberacija.....	135
ZAKLJUČCI	137
REFERENCE	139
BIOGRAFIJA AUTORA	165
IZJAVA O AUTORSTVU	
Error! Bookmark not defined.	
IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE	
DOKTORSKOG RADA	
Error! Bookmark not defined.	
IZJAVA O KORIŠĆENJU	
Error! Bookmark not defined.	

Skraćenice:

AFM - Mikroskop atomskih sila
CBMN - Citohalazin blok mikronukleus test
CHO-K1 - Ovarijum kineskog hrčka
DET - *Due exlusion test*
DLS - Dinamičko rasipanje svetlosti
EDTA - Etilen-diamintetrasirćetna kiselina
FCS - Fetalni teleći serum
FNČ - Fulerenolske nanočestice
HA - Hromozomske aberacije
HIV - Virus humane imunodeficijencije
HOPGE - Visoko orijentisani pirolitički grafit
HPLC - Tečna hromatografija visokih performanci
IL - Interleukini
LDH - Laktat dehidrogenaza
MMC - Mitomycin C
MN - Mikronukleusi
MRI - Magnetno rezonantni imidžing
NČ - Nanočestice
NDI - Indeks jedarne deobe
NMR - Nuklearno Magnetna Rezonanca
NO - Azot oksid radikal
PBS - Fosfatni pufer
PEG - *poly ethylene-glycol*
PHA - Fitohemaglutinin
PM - Polimerne micle
ROS - Reaktivne kiseonične vrste
RNS - Reaktivne azotne vrste
SPION - *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles*
TEM - Transmisiona elektronska mikroskopija

THF - Tetrahydrofuran

TNF - Faktor nekroze tumora

UVOD

Nanomaterijali su supstance sa bar jednom dimenzijom manjom od 100 nm. Zahvaljujući svojim malim dimenzijama kao i raznovrsnim fizičko-hemijskim osobinama, nanomaterijali imaju velik potencijal za primenu u različitim oblastima života. Zahvaljujući tome, nanotehnologija, kao savremena grana tehnologije koja se bavi proučavanjem i konstruisanjem nanomaterijala, ubrzano napreduje stižući sve veći naučni i ekonomski značaj.

Nanomaterijali su našli svoju primenu u medicini, zaštiti životne sredine, hemijskoj industriji, industriji kozmetičkih proizvoda, elektronici, energetici, tehnologiji materijala (Morose, 2010).

U medicini se nanočestice koriste u ciljanom lečenju kancera, kao nosači lekova, u dijagnostici, i zubnoj protetici (Editorial, 2010). Jedna od značajnijih bioloških primena nanomaterijala bazira se na njihovim antiviralnim i antioksidativnim svojstvima, kao i snažnoj fotoindukovanoj aktivnosti pri fotodinamskoj terapiji (Brown i sar., 2006).

Posebnu grupu nanočestica čine fulereni koji predstavljaju relativno novu grupu molekula sfernog oblika sačinjenih u potpunosti od ugljenikovih atoma. Hidrofobni su molekuli, rastvaraju se u nepolarnim organskim rastvaračima, a problemi njihove slabe rastvorljivosti u polarnim rastvaračima prevazilaze se hemijskom derivatizacijom tj. uvođenjem polarnih funkcionalnih grupa. Fulerenoli ($C_{60}(OH)_n$, $n=2-40$) predstavljaju vodorastvorne derivate C_{60} , koji imaju velik potencijal za primenu u medicini, baziran pre svega na njihovoj sposobnosti da u biološkim sistemima skupljaju slobodne radikale, nastale u oksidativnom stresu dejstvom ksenobiotika ili radioaktivnim ozračivanjem (Injac i sar., 2008, Srđenović, 2010, Bogdanović i sar., 2008, Trajković i sar., 2007). Takođe fulerenoli mogu biti helatori gvožđa i organoprotektori od toksičnosti indukovane doksorubicinom (Injac i sar., 2008, Ičević i sar., 2011, Srđenović, 2010). Konjugovani sa doksorubicinom, imaju potencijal i u hemioterapiji kancera (Chaudhuri i sar., 2009).

S druge strane fulereni mogu da se ponašaju i kao generatori oksidativnog oštećenja ćelija tj. nastanka ROS (reaktivnih kiseoničnih vrsta). Putem zapaljenskog odgovora i

oksidativnog stresa nanočestice mogu delovati i citotoksično (Nel i sar., 2006, Xia i sar., 2006, Sayes i sar., 2007a, Stone i sar., 2007).

Kada je u pitanju uticaj fulerenola na hromozome i DNK, literaturni podaci su još uvek veoma oskudni i međusobno teško uporedivi. Da li fulerenol deluje genotoksično ili antigenotoksično na sisarske ćelijske kulture, još uvek nije razjašnjeno. Zbog toga je neophodno analizirati uticaj fulerenolskih nanočestica (FNČ) na učestalost biomarkera citogenetskog oštećenja DNK-mikronukleusa (MN) i hromozomskih aberacija (HA). Evaluacija učestalosti promena na hromozomima kako na neoštećenoj, tako i na DNK prethodno oštećenoj poznatim agensom, trebalo bi da doprinese rasvetljavanju biološke aktivnosti fulerenolskih nanočestica i njihovoj daljoj primeni u biomedicini.

Nanočestice

Nanočestice (NČ) predstavljaju strukture sa sve tri dimenzije od 1 do 100 nm, koje zauzimaju posebno mesto u razvoju nanotehnologije. Njihova upotreba je vezana za različite oblasti kao što su biomedicina, humana i veterinarska farmacija, kozmetika, elektronika, stela tehnologija, zaštita životne sredine, prehrambena tehnologija, agronomija i nauka o novim materijalima (Bhaskar i sar., 2010, Suh i sar., 2009, Gao i Xu, 2009, Nair i sar., 2010). Pažnju naučne javnosti privlači činjenica da usled povećanja industrijske proizvodnje NČ, sve veća količina ovih materija dospeva u životnu sredinu, dok je u isto vreme veoma malo podataka o riziku koji sa sobom nosi kontakt sa NČ (Brar i sar., 2010).

Najveći nivo izloženosti ljudi i životne sredine nanočesticama je prisutan upravo u industriji nanotehnologije. Visok do srednji nivo izloženosti nanomaterijalima imaju pacijenti tokom medicinskih tretmana koji su bazirani na nanomaterijalima. Niskim, hroničnim dozama nanomaterijala je izložen najveći deo ljudske populacije zahvaljujući širokoj upotrebi nanomaterijala u kozmetici (ruževi za usne, kreme za sunčanje, „anti-aging” kreme) (Indu i sar., 2007, Lens, 2011).

Međutim, i pored ovako širokog spektra ekspozicije humane populacije, još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni mehanizmi biološkog usvajanja NČ, kao ni model njihove

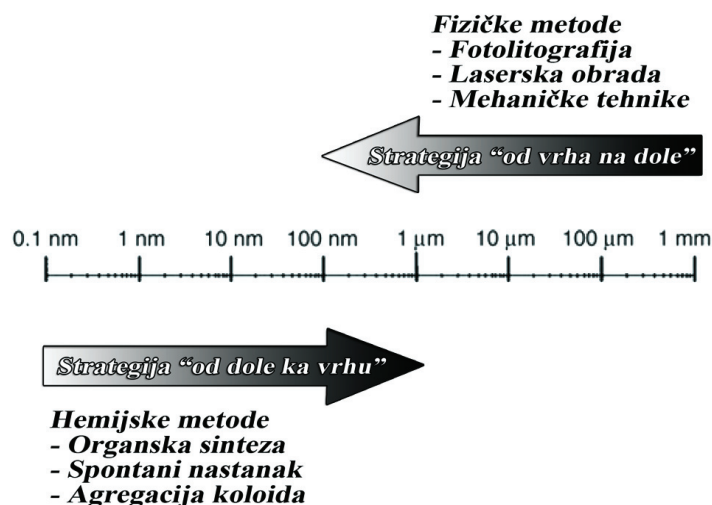
toksičnosti, kretanje NČ unutar organizma kao ni kretanje između organizma i sredine (Kahru i Dubourguier, 2010).

Uzimajući u obzir širok spektar mogućnosti za izloženost ljudske populacije kao i životne sredine nanočesticama, nameće se potreba za utvrđivanjem njihovog eventualnog genotoksičnog dejstva.

Proizvodnja nanočestica

Razvoj nanotehnologije se u protekloj deceniji bazirao na dizajnu novih NČ. Strategije za proizvodnju NČ mogu se podeliti u dve osnovne grupe, od kojih je prva prema modelu “od vrha na dole” a druga “od dole ka vrhu” (slika 1.). Prema prvoj strategiji NČ ili organizovane grupacije NČ nastaju direktno iz osnovnih materijala uz pomoć različitih tehnika (Niemeyer, 2001) kao što su: usitnjavanje (engl. *attrition*), gašenje (engl. *quenching*) i fotolitografija (Cao, 2004). Nasuprot njima, strategija “od dole ka vrhu” podrazumeva upotrebu molekularnih struktura kao početnog materijala, koje će putem različitih hemijskih reakcija tipa nukleacije (engl. *nucleation*) ili različitim fizičkim tretmanima dovesti do formiranja novih nanomaterijala (Rotello, 2003, Cao, 2004).

Najvažnija razlika između osnovnih materijala i nanomaterijala je u tome što NČ na maloj površini imaju velik broj atoma, što dovodi do toga da one imaju izrazitu površinsku energiju i veliku površinu po jedinici mase (Poole i Owens, 2003). Zbog toga se NČ generalno odlikuju visokom reaktivnošću (Niemeyer, 2001, Poole i Owens, 2003, Schmid, 2004). Ukoliko površina NČ nije zaštićena posebnim molekulom takozvanim “omotačem” (engl. *capping agent*), dolazi do interakcije između samih NČ, što smanjuje njihovu površinsku energiju. “Omotač” predstavlja integralnu komponentu većine NČ a prema prirodi može biti neki organski molekul, polimer ili biološki molekul. Uloga “omotača” je da stabilizuje konfiguraciju NČ i spreči njihovu agregaciju. “Omotač” sam po sebi može biti nosilac karakteristika koje određuju specifičnost i primenu NČ (Poole i Owens, 2003). Dobijanje NČ iste veličine, oblika, hemijskog sastava i kristalne strukture koje ne agregiraju postiže se visokom kontrolom uslova sinteze NČ (Rotello, 2003).



Slika 1. Strategije u proizvodnji nanočestica “od vrha na dole” i “od dole ka vrhu”
(Niemeyer, 2001)

Podela nanočestica

NČ se prema hemijskom sastavu mogu podeliti na organske i neorganske.

U grupu organskih NČ spadaju materijali bazirani na ugljeniku kao što su fulereni (C_{60} i C_{70} i njihovi derivati) i ugljenične nanocevi (sa višeslojnim zidom “*multiwalled*” ili sa jednim zidom “*single walled*”). Grupi neorganskih NČ pripadaju čestice bazirane na metalnim oksidima (cink-oksidi, gvožđe-oksidi, titanijum -dioksidi i cerijum-oksidi), metali (zlato, srebro, gvožđe i kobalt) i kvantne tačke (kadmijum sulfid i kadmijum selenid). U upotrebi su i druge klasifikacije i terminologije koje opisuju specifične grupe nanomaterijala. NČ mogu imati različite morfološke oblike kao što su lopta, cev, prizma, piramida i kocka, pa se i u zavisnosti od oblika može izvršiti klasifikacija.

Raznovrsnost svojstava NČ vezanih za oblik, površinski hemizam, “omotače”, korastvarače i veličinu NČ otvara brojne mogućnosti za razvoj novih karakteristika. Tako na primer, manipulacija na površini fulerena i metalnih nanočestica rezultira sticanjem novih, specifičnih funkcija važnih za njihovu dalju primenu (Yang i sar., 2007).

Nanočestice u medicini

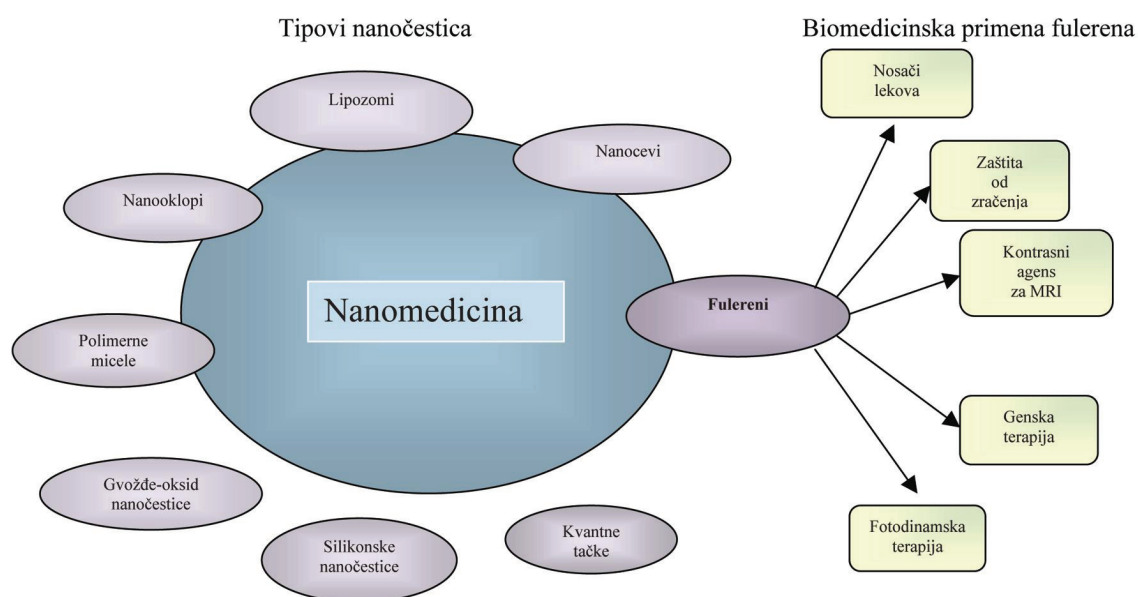
Nanomedicina je oblast koja je proistekla iz zajedničkog cilja nanotehnologije i medicine a to je unapređivanje dijagnostike i teranostike bolesti (istovremeno posmatranje toka bolesti i terapije) (Caruthers i sar., 2007, Suh i sar., 2009, Riehemann i sar., 2009, Jain, 2009). Glavni fokus nanomedicine jeste upravo na primeni novih nanomaterijala u dijagnostici i terapiji bolesti kao što su kancer (Larocque i sar., 2009), bolesti srca (Schoenhagen i Conyers, 2008), pluća i bolesti krvi (Buxton, 2009.). Takođe nanomedicina proučava uvođenje lekova u ćelije pomoću NČ (Liong i sar., 2008, Farokhzad i Langer, 2009) i mogućnosti da se one iskoriste kao nosači velikih doza hemioterapeutika ili gena u maligne ćelije, a da se u isto vreme zdrave ćelije poštede njihovih efekata (De Jong i Borm, 2008). Ogroman potencijal NČ za upotrebu bazira se na njihovoj sposobnosti “hvatanja” ROS (Lucente-Schultz i sar., 2009, Yin i sar., 2009).

Međutim, da bi se iskoristio očigledno velik potencijal koji poseduju NČ, neophodno je, između ostalog, poznavati njihove karakteristike u pogledu biokompatibilnosti, biodistribucije i biodegradacije.

Kada je u pitanju biološka kompatibilnost, potrebno je usmeriti pažnju na reakciju između imunološkog sistema organizma i NČ. Naime, imuni sistem predstavlja jednu od prvih barijera na koju nailaze NČ kada se primenjuju *in vivo*. Makrofagi i ostale fagocitne ćelije prepoznaju NČ kao strana tela i pružaju odgovor na njihovo prisustvo u ćelijama. S obzirom na činjenicu da još uvek nisu u potpunosti razjašnjene interakcije između NČ i imunološkog sistema organizma kao i posledice tih interakcija, važno je prilikom dizajniranja NČ odabrati takva svojstva NČ koja, sa aspekta reakcije imunog sistema neće ometati njihovu primenu (Kunzmann i sar., 2010). Biodegradacija predstavlja važan element u sagledavanju genotoksičnog potencijala NČ budući da eventualni štetan efekat po humani genom može nastati i onda kada NČ nisu biološki degradirane ili ekskretovane iz tela. Zbog toga su važne *in vivo* studije hroničnih efekata NČ u organizmima, koje bi trebalo da prikažu posledice akumuliranja NČ u različitim organima i tkivima.

Među brojnim nanomaterijalima koji su dizajnirani za potrebe nanomedicine ističu se: fulereni (Brettreich i Hirsch, 1998, Brettreich i sar., 2000), lipozomi (Torchilin, 2006, Gregoriadis, 1995, Rolland, 1993), ugljenične nanocevi (Klumpp i sar., 2006), NČ gvožđe oksida (Shi i sar., 2007), polimerne micele (Nishiyama i Kataoka, 2006),

dendrimeri (Villalonga-Barber i sar., 2008), nanooklopi (Lal i sar., 2008), polimerne mikrosfere (Barratt, 2003) i drugi materijali (Shema 1.).



Shema 1. Tipovi NČ koji se primenjuju u biomedicini kao i oblasti primene fulerena (Partha i Conyers, 2009)

Lipozomi, kao vezikule sa fosfolipidnom membranom, predstavljaju efikasne farmaceutske nosače NČ koji mogu ispunjavati različite terapijske ili dijagnostičke zahteve (Torchilin, 2006, Gregoriadis, 1995). Dugoživeći lipozomi mogu uvoditi u ćelije lekove protiv kancera kao što su doxorubicin, arabinofuranosilcitozin i vinkristin (Torchilin, 2006, Orive i sar., 2010).

NČ gvožđe oksida (engl. *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles - SPION*) su NČ koje imaju jezgro od gvožđe-oksida a mogu biti obložene dekstranom ili derivatima dekstrana (Hildebrandt i sar., 2007). Kretanje SPION unutar organizma može se kontrolisati pomoću spoljašnjeg magnetnog izvora, tako da je njihov potencijal za upotrebu u MRI (Kunzmann i sar., 2010). NČ gvožđe oksida mogu se koristiti i za uvođenje lekova do tumora (Simberg i sar., 2007). U istraživanjima *in vitro* i *in vivo*, nije utvrđena toksičnost SPION NČ (Muller i sar., 2007).

Ugljenične nanocevi su jednodimenzionalne ili dvodimenzionalne šuplje strukture sačinjene od heksagonalne mreže u obliku cilindra (jednoslojne nanocevi) ili višeslojnih koncentričnih slojeva (višeslojne nanocevi) (Klumpp i sar., 2006). Iako do sada nije potvrđena veća terapijska efikasnost ugljeničnih nanocevi i njihovih derivata u odnosu

na alternative metode kao što su upotreba lipozoma i polimera, nanocevi zbog svojih izvanrednih mehaničkih, električnih, termalnih i optičkih karakteristika imaju velik potencijal za biomedicinsku upotrebu (Foldvari i Bagonluri, 2008). Naime, na spoljašnji zid ili u unutrašnjost nanocevi mogu se vezati bioaktivni molekuli ili kontrastni agensi i na taj način uvesti u organizam. Samo uvođenje ugljeničnih nanocevi u ćeliju odvija se najverovatnije putem supresije transkripcionih faktora za osteoklastogenezu što dovodi do inhibiranja diferencijacije osteoklasta (Narita i sar., 2009).

Ugljenične nanocevi *in vivo* mogu da indukuju oksidativni stres, zapaljenske procese i mutacije, što naglašava značaj ispitivanja njihove genotoksičnosti (Shvedova i sar., 2009). I pored toga, dosadašnji podaci o genotoksičnosti ugljeničnih nanocevi su oprečni i kreću se od odsustva oštećenja DNK (Szendi i Varga, 2008, Szendi i sar., 2009, Di Sotto i sar., 2009), smanjenja ćelijske proliferacije (Jacobsen i sar., 2008, Szendi i Varga, 2008) do povećanja nivoa 8- hidroksiguanina (8-OHdG) *in vivo* (Folkmann i sar., 2009).

Polimerne micle predstavljaju nanonosae sa jedinstvenom strukturom jezgra i omotača. U njihovu unutrašnjost se mogu uvesti hidrofobni lekovi a spolja hidrofilni polimeri (kao što je PEG - *poly ethylene-glycol*), što im obezbeđuje produženo dejstvo u cirkulaciji i efikasno nakupljanje u tumoru (Nishiyama i sar., 2003, Bae i sar., 2005). Za razliku od PEG-lipozoma, polimerne micle (PM) mogu da infiltriraju u tumore i vrše kontrolisano oslobađanje lekova i gena. Do sada su u prekliničkim i kliničkim studijama polimerne micle sa antitumorskim lekovima ispoljile pozitivne efekte. Prednosti upotrebe PM su u jednostavnoj pripremi, mogućnosti uvođenja leka bez hemijske modifikacije samog leka i kontrolisanom oslobađanju leka. Na ovaj način se mogu prevazići aktuelni problemi nedostatka odgovarajućih nosača za gene i male interferirajuće RNK (siRNA), što još uvek otežava kliničku primenu genske terapije (Nishiyama i Kataoka, 2006). Kada je u pitanju ispitivanje genotoksičnosti PM, istraživanja na CHO ćelijskoj liniji ovarijuma hrčka nisu pokazala povećanje učestalosti mikronukleusa niti usporavanje ćelijskog ciklusa, za razliku od učestalosti izmena sestrinskih hromatida, koja je bila 5 puta veća (He i sar., 2009).

Dendrimeri su visoko razgranati makromolekuli nanometarskih dimenzija. Sastoje se od centralnog jezgra sa omotačem u vidu koncentričnih slojeva. Zahvaljujući mogućnosti kontrole njihove veličine, gustine razgranatosti i površinske

funkcionalnosti, dendrimeri su veoma pogodni kao nosači lekova. U upotrebi je nekoliko konjugata dendrimera sa cisplatin-om i doksorubicin-om, citostatiskim lekovima koji se nakupljaju u solidnim tumorima, pri čemu prisustvo dendrimera dovodi do smanjenja citotoksičnosti (Bharali i sar., 2009). Naime, dendrimeri kao nosači citostatika smanjuju njihovu toksičnost na okolna tkiva i povećavaju efikasnost u poređenju sa dejstvom samih citostatika. Jedan od novih načina primene dendrimera jesu konjugati sa lekovima koji se selektivno oslobađaju kod trudnica, ne prolaze placentalnu membranu i nemaju uticaj na fetus. Koriste se i kao kontrastni agensi u *imaging* dijagnostici, kao nosači gadolinijuma, u ranoj dijagnostici bubrežnih oštećenja kao i genskoj terapiji. Dendrimeri su pogodni za upotrebu i sami po sebi, na primer u prevenciji HIV-a i polno prenosivih infekcija kao što je virus herpes simplex (Kunzman i sar., 2010).

Nanooklopi predstavljaju vrstu sferičnih NČ koje se sastoje od dielektričnog jezgra obloženog tankim metalnim omotačem najčešće od zlata (Lal i sar., 2008). Zlatni nanooklopi dospevaju u tumore putem fagocitoze i ne metabolišu se. Za njihovu aktivaciju unutar tumorskih ćelija koristi se fotoindukovana ćelijska smrt. Nanooklopi su takođe korisni kao kontrastni agensi u dijagnostičkom *imaging*-u tumora.

Silikonske NČ su čvrsti materijali koji oblikom podsećaju na pčelinje saće, sa porama nanometarskih dimenzija (Knežević i sar., 2011). Ćelije ih usvajaju putem endocitoze. Pogodne su kao nosači lekova zbog čega ih oblažu polietilenimim polimerom. Ovaj polimer pospešuje njihovo usvajanje u ćelije i zatim oslobađanje antineoplastika kao što je na primer paclitaxel (Vivero-Escolto i sar., 2010). Ukoliko se doda magnetit na jezgro silikonskih NČ, one stiču magnetna svojstva, što omogućava da unošenje lekova bude navođeno spoljašnjim magnetnim poljem. Silikonske NČ se koriste i za poboljšavanje rastvorljivosti lekova (Partha i Conyers, 2009).

Zlatne NČ imaju velik potencijal za primenu u terapiji kancera, *imaging*-u i medicinskoj dijagnostici. Istraživanja fotodermalnih karakteristika zlatnih NČ u terapiji kancera su u fazi prekliničkih ispitivanja (Liu i sar., 2008, Au i sar., 2008, Terentyuk i sar., 2009). Ukoliko se zlatne NČ koriste kao nosači antineoplastika na bazi platine, citotoksičnost antineoplastika je povećana u poređenju sa slobodnom formom cisplatine (Dhar i sar., 2009). Zlatne NČ konjugovane sa DNK ili RNK u ćelijama kancera mogu da se upotrebljavaju i za modulaciju genske ekspresije. Kada je u pitanju genotoksičnost

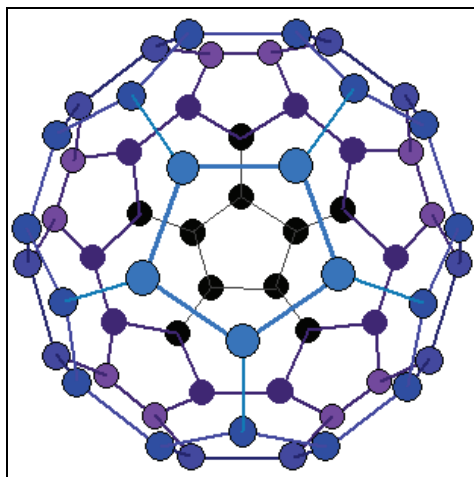
zlatnih NČ, pokazano je da one indirektno putem oksidativnog stresa u zavisnosti od tipa ćelija ili veličine čestica, imaju sposobnost indukovanja oštećenja DNK (Singh i sar., 2009).

Fuleren C₆₀

Fulereni predstavljaju posebnu grupu klusterskih, sferičnih nanočestica kod kojih su sve tri dimenzije nanometarskih veličina. Pronađeni su u geološkim uzorcima starim bilionima godina (Buseck, 2002.). Klusterske forme ugljenika se nalaze u kosmičkoj prašini a na zemlju su najverovatnije dospеле sa meteorskim kišama (Becker i sar., 2000). Fulereni su izgrađeni od ugljenika i predstavljaju, pored grafita i dijamanta, treću alotropsku modifikaciju ugljenika. Od svih fulerena najviše je proučavan molekul C₆₀, iako postoje i više klase fulerena sa različitim geometrijskim strukturama kao što su C₇₀, C₇₆, C₇₈ i C₈₀ (Kikuchi i sar., 1992), C₂₄₀, C₅₄₀ i C₇₂₀ (Baena i sar., 2002). Modifikacije fulerena C₇₀, iako su dosta proučavane, nisu rezultirale značajnijim napretkom u oblasti *in vivo* biomedicinske aplikacije.

Najpoznatiji predstavnik fuleren C₆₀, sačinjen od šezdeset ugljenikovih atoma, nalik je na fudbalsku loptu. Prvi naziv ovog molekula je bio fudbalen, dok se danas za celu klasu klusterskih ugljenika koristi ime fuleren, u čast američkog arhitekta Buckiminstera Fullera, koji je prvi konstruisao građevinu sličnu strukturi molekula C₆₀. Molekul C₆₀ je izgrađen od šezdeset ekvivalentnih atoma ugljenika, raspoređenih u dvadeset heksagona i dvanaest pentagona koji grade idealno simetričnu, savršenu sferu prečnika 0.71 nm (slika 2.) (Hyung i Kim, 2009). Teorijsku pretpostavku o postojanju molekula C₆₀ objavio je još 1970. godine Japanski tim na čelu sa Osawa-om. Prvi ugljenični klasteri koji su laboratorijski proizvedeni, sintetisani su 1985. godine a na osnovu masenog i ¹³C NMR spektra je utvrđena struktura molekula C₆₀ (Kroto i sar., 1985). Za ovo otkriće, naučnici Kroto, Curl i Smalley dobili su 1996. godine Nobelovu nagradu iz hemije.

Posle otkrića treće alotropske modifikacije ugljenika usledila je masovnija proizvodnja molekula C₆₀ i C₇₀, a razvila se i posebna naučna grana u hemiji, hemija fulerena (Kratschmer i sar., 1990). Derivatizacijom fulerena su dobijene hiljade novih jedinjenja od kojih su neka pokazala biološku aktivnost i samim tim predstavljala veliki naučni izazov u nano i biomedicinskim istraživanjima (Cataldo i sar., 2008).



Slika 2. Fuleren C_{60}

Tokom proteklih 20 godina istraživanja, fuleren je, zahvaljujući hemijskim osobinama svojih derivata, kao i svojim elektronskim, provodnim i magnetnim karakteristikama, zauzeo značajno mesto u nanotehnologiji i našao primenu u biomedicini (Yang i sar., 2007), optici (Singh i sar., 2004) i elektronici (Otsubo i sar., 2005, Diederich, 2005).

Međutim, direktna upotreba ovog molekula u primenjenoj biologiji ograničena je njegovom slabom rastvorljivošću u polarnim rastvaračima (Kadish i sar., 2000). Naime, C_{60} se rastvara u malom broju organskih rastvarača a gotovo je nerastvorljiv u vodi.

Pa ipak, karakteristike fulerena C_{60} kao što su visoka hidrofobnost, prisustvo snažnih kohezionih sila između molekula fulerena u čvrstom stanju, fotoaktivnost, sposobnost primanja i otpuštanja elektrona i relativno visoka hemijska reaktivnost, predstavljaju osnovu za rad na povećanju vodorastvorljivosti hemijskim derivatizacijama (Nakamura i Isobe, 2003).

U cilju prevazilaženja problema vodorastvorljivosti fulerena koriste se različite strategije hemijske sinteze i separacije. Prva i najjednostavnija strategija je hemijska modifikacija fulerena uvođenjem hidrofilnih funkcionalnih grupa (Chiang i sar., 1996). Adicijom različitih polarnih funkcionalnih grupa (-OH, -COOH, -NH₂), novosintetisani derivati fulerena dobijaju potpuno nove fizičke i hemijske karakteristike i otvaraju mogućnost za dalje derivatizacije (Cai i sar., 2010).

Druga strategija je nekovalentno povezivanje (enkapsulacija) molekula fulerena u rastvorljiv polimer ili molekul domaćin (Yamakoshi i sar., 1994, Atwood i sar., 1994). Primer za to je inkorporiranje aminokiselinskih derivata fulerena u proteine (Yang i sar., 2007). Kao rezultat derivatizacije ili enkapsulacije C_{60} , sprečava se interakcija između molekula C_{60} i omogućava formiranje stabilne suspenzije u vodi (Cao, 2004). Vodorastvorljivost fulerena može se povećati i adsorbovanjem surfaktanata na površinu fulerena, kao i usložnjavanjem sa γ -ciklo-dekstrinom (Brezova i sar., 1999). Formiranje stabilne suspenzije se postiže i rastvaranjem C_{60} u tetrahidrofuranu ili nekom drugom organskom rastvaraču uz mešanje, sonikaciju i evaporaciju organskog rastvarača. Na ovaj način se formiraju stabilni agregati C_{60} sa dijametrom od 10-200 nm, koji se zovu nano- C_{60} ili nC_{60} (Fortner i sar., 2005). Iako je ovo brza metoda, njen nedostatak je u mogućnosti zadržavanja rezidualnih količina tetrahidrofurana (THF), što može biti uzrok toksičnosti u biološkim sistemima (Isakovic i sar., 2006).

Promenom rastvarača, temperature, koncentracije C_{60} i postupka mešanja, utiče se na veličinu, strukturu i naelektrisanje nC_{60} , od čega zavise i sve ostale osobine nanočestica (Brant i sar., 2006a).

Jedno od važnijih svojstava molekula C_{60} jeste sposobnost stvaranja stabilnih ili nestabilnih agregata (Brant i sar., 2005). Pretpostavlja se da do agregacije fulerenskih nanočestica može doći već u procesu formiranja NČ s obzirom na činjenicu da je agregacija C_{60} uočena i prilikom primene različitih rastvarača. Nemodifikovani fulereni u vodi formiraju agregate dimenzija 10-100 nm i veće, dok je agregacija modifikovanih fulerena povezana sa hemijskim i fizičkim osobinama funkcionalnih grupa na sferi C_{60} .

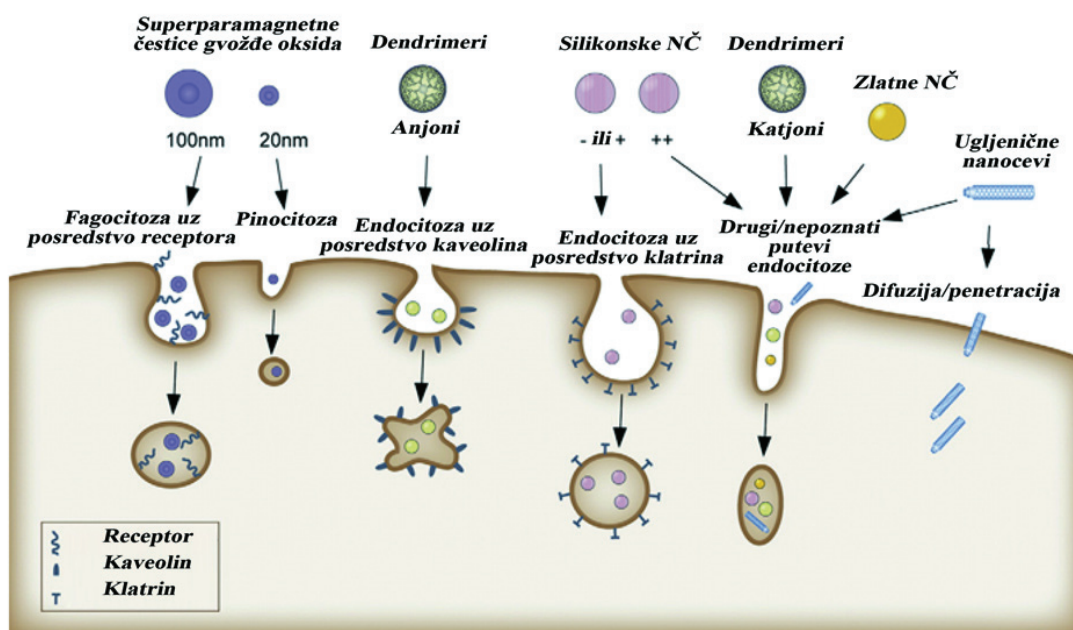
Fulerenski klasteri u vodi mogu se formirati na dva načina: promenom rastvarača (Deguchi i sar., 2001) ili sonifikacijom (Brant i sar., 2005, Deguchi i sar., 2006). Kada se fuleren uvede u vodeni sistem, dominiraju klasteri veličine oko 100nm, dok se sa promenama pH, temperature, prisustvom kosolvenata i uticajem zračenja veličina klastera menja. Klasteri fulerena dobijeni sonifikacijom su stabilni, manjih dimenzija i slične kristalne strukture kao C_{60} (Brant i sar., 2007).

Osnovne karakteristike fulerena i fulerenskih derivata u biološkom sistemu

Pored sferičnog oblika C₆₀, koji je jedinstven u prirodi, hemijske i fizičke osobine fulerena doprinose njihovoj upotrebi u mnogim naučnim oblastima (Bosi i sar., 2003).

Ćelijsko usvajanje nanočestica, lokalizacija i interakcija sa biomolekulima

Usvajanje NČ u ćelije je važan aspekt koji ima značaja za genotoksičnost s obzirom na činjenicu da se ulaskom NČ u ćeliju mogu aktivirati oksidativni i inflamatorni procesi, koji za posledicu imaju štetan uticaj na DNK. Glavni faktori koji utiču na način ulaska NČ u ćeliju su: veličina, oblik i površinsko naelektrisanje NČ sa jedne strane, kao i specifičnost samih ćelija sa druge strane (Dobrovoljskaia i McNeil, 2007). Postoji nekoliko načina putem kojih NČ mogu dospeti u ćelije a to su: endocitoza uz posredstvo klatrina, endocitoza kaveolama, fagocitoza, pinocitoza i difuzija (slika 3.).



Slika 3. Prikaz mehanizama usvajanja NČ u ćelije.

SPION- superparamagnetne čestice gvožđe oksida, MSN- silikonske NČ, CNT- ugljenične nanocevi (Kunzman i sar., 2010)

Nakon ulaska u ćeliju na neki od navedenih načina, nanomaterijali mogu difuzijom dospeti u jedro kroz kompleks jedarnih pora i zadržati se u jedru. S obzirom na to da tokom mitoze dolazi do resorpcije jedarne membrane, nanomaterijali se mogu zadržati i u jedru novonastalih ćerki ćelija. Ukoliko su NČ dospele u jedro, direktna interakcija između njih i DNK ili proteina vezanih za DNK može dovesti do fizičkog oštećenja genetičkog materijala. Tako, na primer, NČ titanium dioksida i silikonske NČ prodiru u jedro ćelija, u kom uzrokuju inhibiciju replikacije, transkripcije i ćelijske proliferacije. Kvantne tačke takođe kroz jedarne pore prodiru u jedro a zatim ciljano reaguju sa histonima (Schins, 2002).

Kada je u pitanju rasvetljavanje usvajanja fulerena i fulerenskih derivata u ćelije, u protekloj deceniji su čak razvijene kompjuterske simulacije interakcije fulerena sa ćelijskim membranama. Tako je utvrđeno da mali fulerenski klasteri (<10 molekula fulerena) mogu da se smeste unutar fosfolipidnog dvosloja ćelijske membrane, gde se zatim pasivno i spontano disagregiraju. Sa porastom koncentracije fulerena i fulerenskih derivata, dolazi do promena u strukturi i elastičnosti lipidnog dvosloja ćelijske membrane, ali ne i u meri koja bi dovela do mehaničkog oštećenja ćelijske membrane (Wong-Ekkabut i sar., 2008).

Utvrđeno je da polarni, polikarboksilni fulerenski derivati $C_{61}(CO_2H)_2$ i $C_{63}(COOH)_6$, za razliku od C_{70} , prolaze kroz ćelijsku membranu a zatim se vezuju za mitohondrije (Foley i sar., 2002, Chirico i sar., 2007), organele koje, kao rezultat elektrohemijskog membranskog potencijala duž unutrašnje membrane, propuštaju elektrone iz mitohondrijalnog elektron transportnog lanca, produkujući ROS (Dellinger i sar., 2010). Lociranje polihidroksilovanih C_{60} fulerena, fulerenola, blizu mitohondrija, otvara mogućnost da njihovi protektivni efekti mogu biti rezultat upravo te lokalizacije (Foley i sar., 2002). Sposobnost vodorastvornih fulerenskih derivata da prođu kroz ćelijsku membranu može se posmatrati i u kontekstu strukturne analogije koja postoji između fulerenskog kaveza i vezikula obloženih klatrinom, koje su esencijalne u procesu endocitoze. Ovo zapažanje ide u prilog upotrebi polarnih fulerenskih derivata kao nosača lekova do ciljanih tkiva. Pri proučavanju usvajanja fulerenskih derivata u ćelije važno je uzeti u obzir i tipove ćelija. Tako su, na primer, fagociti odnosno makrofagi odgovorni za eliminisanje čestica, dok nefagocitne ćelije, nakon usvajanja fulerenskih derivata, mogu izmeniti svoju funkciju.

Zbog potencijalne primene fulerena kao nosača lekova, značajna pažnja je poklonjena njegovoj distribuciji u organizmu. Istraživanja su pokazala da se fuleren nakon intravenskog unošenja u krvotok uglavnom brzo eliminiše iz cirkulacije i akumulira u jetri (Gharbi i sar., 2005). Radioobeleženi, vodorastvorni C₆₀ se distribuira u veći broj tkiva u poređenju sa čistim C₆₀, pri čemu se u jetri akumulira 50% primenjene doze, dok se preostala količina fulerena uočava u slezini, plućima, mišićima i ćelijskim komponentama krvi (Bullard-Dillard i sar., 1996). Nagomilavanje fulerena u jetri se smanjuje tokom vremena, da bi se u potpunosti elimisalo nakon 13 dana. Ovo ukazuje na činjenicu da i jetra ima sposobnost eliminacije fulerena putem biohemijske transformacije u vidu C₆₀ metabolita koji su identifikovani u jetri. Histološkom analizom jetre nisu uočeni znaci zapaljenskog procesa.

Međutim, kada je u pitanju uticaj fulerena na jetru, postoji rizik od bioakumulacije i hroničnih efekata čistog C₆₀ zbog njegovog dugog poluživota u poređenju sa vodorastvornim derivatom, koji se eliminiše iz tela tokom nekoliko nedelja i pri niskim koncentracijama deluje hepatoprotektivno (Gharbi i sar., 2005).

Interakcija fulerena i fulerenskih derivata sa drugim biološkim molekulima može uticati na promenu strukture i funkcije tih bioloških molekula. U tom slučaju bi se modifikovalo i ponašanje samih fulerenskih nanočestica. Utvrđeno je da fulereni sa ciklodextrinom formiraju stabilne komplekse sa albuminima goveđeg seruma (Belgorodsky i sar., 2007). Upravo interakcija fulerena i fulerenskih derivata sa serumskim proteinima i očuvanje nepromenjene konformacije i funkcije proteina, omogućavaju transport fulerena unutar tkiva.

Toksičnost fulerena

Ubrzan razvoj nanotehnologije u protekle dve decenije je otvorio pitanja o toksičnosti nanomaterijala i njihovom uticaju na ljudsku populaciju i životnu sredinu (Singh i Nalwa, 2007, Oberdörster, 2004). Budući da veliki broj nanomaterijala ima potencijal za upotrebu u biološkim sistemima, postoji povećana potreba za ispitivanjem njihove toksičnosti (Riehemann i sar., 2009). Dosadašnje studije o toksičnosti nanomaterijala dale su kontraverzne rezultate. Efekti koje NČ imaju u *in vitro* modelima razlikuju se kako u odnosu na primenjene ćelijske kulture tako i u odnosu na korišćene

metode. Utvrđeno je da biološka aktivnost derivatizovanih fulerena i ugljeničnih nanocevi zavisi ne samo od geometrijskog oblika tih nanočestica, nego i od funkcionalnih karakteristika površine njihovih klastera (Sayes i sar., 2004). Na potencijalnu toksičnost fulerena mogu uticati i različite fizičko-hemijske karakteristike kao što su veličina, površinski hemizam, rastvorljivost i agregacija/aglomeracija koje određuju njihovu biološku aktivnost (Aschberger i sar., 2010). Toksičnost fulerena i fulerenskih derivata je do sada analizirana u brojnim studijama (Kamat i sar., 1998, Foley i sar., 2002, Bosi i sar., 2004, Gharbi i sar., 2005, Rouse i sar., 2006, Markovic i sar., 2007, Usenko i sar., 2007, Belgorodsky i sar., 2007, Kolosnjaj i sar., 2007, Roberts i sar., 2008, Wong-Ekkabut i sar., 2008, Spohn i sar., 2009).

U ćelijskim kulturama *in vitro*, fuleren i njegovi derivati pokazali su razlike u pogledu toksičnosti. One se kreću od citotoksičnog efekta C₆₀ koji potiče od njegovog direktnog uticaja na produkciju ROS i oštećenja ćelijske membrane, lipidne peroksidacije i nekroze (Sayes i sar., 2004, Sayes i sar., 2005, Isakovic i sar., 2006), do odsustva toksičnosti polihidroksilovanih derivata C₆₀ koji uglavnom samo pri visokim koncentracijama deluju toksično dovodeći do apoptoze (Isakovic i sar., 2006).

Na toksičnost fulerena *in vivo* važan uticaj ima koncentracija fulerena.

Tako, na primer, hidroksilovani fulereni nakon unošenja u traheje pri nižim koncentracijama imaju anti-inflamatorni efekat, dok pri višim koncentracijama imaju pro-inflamatorni efekat na pluća miša (Roursgaard i sar., 2008). Nakon tretmana pacova sa nano-C₆₀ i C₆₀(OH)₂₄ iz vazduha, bronhoalveolarnom lavažom je pokazano odsustvo povećanja nivoa laktat dehidrogenaze, proteina ili alkalne fosfataze, kao i promena u histološkoj građi pluća. Međutim, fuleren C₆₀ indukuje povećanje produkata lipidne peroksidacije za razliku od C₆₀(OH)₂₄ kod koga je primećeno smanjenje lipidne peroksidacije.

Smatra se da razlika, koja postoji u pogledu efekata fulerena *in vitro* i *in vivo*, potiče od razlika u bioraspoloživosti, toksikokinetici i respiratornoj AO odbrani (Sayes i sar., 2007b).

Apoptotska aktivnost

Apoptoza je programirana ćelijska smrt do koje dolazi uglavnom usled transformacije faktora rasta TGF-β. U tom procesu oslobađaju se ROS, čijom

neutralizacijom se može smanjiti odnosno zaustaviti oštećenje ćelija. Tretman antioksidantima predstavlja jedan od načina za smanjenje nivoa ćelijske smrti apoptozom.

Hidroksilovani fuleren može da indukuje apoptozu kod odraslih nematoda *Caenorhabditis elegans*, pri čemu toksičnost nije uzrokovana oksidativnim stresom (Cha i sar., 2011). Vodorastvorni derivat fulerena, C₆₀-bis(*N,N*-dimetilpirolidinium jodid), takođe uzrokuje apoptozu sa tipičnim karakteristikama kao što su fragmentacija DNK i kondenzacija hromatina na humanoj ćelijskoj liniji promijeloleukemije (HL-60). Dolazi do generisanja ROS uz oslobađanje kaspaza 3 i 8 i citohroma c iz mitohondrija. Pretretman ćelija α -tokoferolom smanjuje intraćelijski oksidativni stres i time sprečava apoptozu (Nishizawa i sar., 2009). Takođe i C₆₀(OH)_n ispoljava blagu proapoptotsku aktivnost nezavisnu od ROS. S druge strane, u istom istraživanju je prikazano da je C₆₀ preko svoje snažne prooksidativne aktivnosti, odgovoran za brzu ćelijsku smrt ali putem nekroze (Isakovic i sar., 2006).

U novijim istraživanjima je utvrđeno da fulerenski derivat malonske kiseline C₆₀(C(COOH)₂)₂, inhibira apoptozu indukovanu oslobađanjem TNF- α i to putem stabilizovanja lizozoma. Naime, tokom ulaska derivata malonske kiseline u ćeliju endocitozom u lizosome, ekspresija Hsp 70 je povišena, što dovodi do inhibiranja propustljivosti membrane lizozoma, promovišući time ćelijsko preživljavanje. Nadalje, kisela sredina unutar lizozoma doprinosi dezagregaciji fulerenskih nanočestica u pojedinačne molekule ili manje agregate koji zatim mogu prodreti u membranu lizozoma. To doprinosi stabilizovanju membrane i smanjenju oslobađanja katepsina iz lizozoma, što ima za posledicu inhibiciju apoptoze indukovane TNF-om. Na taj način fulerenski derivat malonske kiseline štiti ćeliju stabilizovanjem lizozomne membrane preko povećane ekspresije Hsp 70 i interakcije sa lizozomnom membranom (Li i sar., 2011).

Antibakterijska svojstva

C₆₀ ne ispoljava antibakterijsku aktivnost za razliku od nekoliko vodorastvornih derivata fulerena kao što su polivinilpirolidin C₆₀, gama-ciklodekstrin C₆₀ i nano-C₆₀ i tri tipa fulerenola C₆₀(OH)₁₂, C₆₀(OH)₃₆x8H₂O i C₆₀(OH)₄₄x8H₂O. Antibakterijska

aktivnost $C_{60}(OH)_{44} \times 8H_2O$, ostvaruje se preko inhibicije rasta ćelija ispitivanih mikroorganizama (bakteriostatski) a ne putem baktericidnog efekta (Aoshima i sar., 2009).

Takođe, vodeni rastvor fulerena C_{60} i jednoslojnih i višeslojnih ugljeničnih nanocevi deluju antibakterijski na gram negativne bakterije *Vibrio fischeri* generišući ROS pod uticajem UV zračenja. Neophodan uslov za ovakvu aktivnost je frakcionisanje fulerena i ugljeničnih cevi u manje agregate, putem progresivne membranske filtracije (Chae i sar., 2011).

Ispitivana je i uloga C_{60} na biodegradaciju polietilena, koji se koristi u proizvodnji plastičnih ambalaža. Biodegradacija polietilena se spontano odvija uz pomoć bakterijskih lanaca. Dodavanje fulerena u nižim koncentracijama (0,01%) doprinosi da bakterijski lanci efikasnije biodegradiraju polietilen, dok pri višim koncentracijama (0,25% - 1%) fuleren deluje štetno na biomasu smanjujući efikasnost biodegradacije (Sah i sar., 2010).

Fulereni u terapiji osteoporoze

U terapiji osteoporoze, naročito je izražena potreba za pronalaženjem efikasnijih i manje toksičnih lekova koji bi stimulisali rast kostiju. Lekovi sa različitim funkcionalnim grupama (hidroksilna, karboksilna i fosfatna kiselina) mogu da formiraju jonske i vodonične veze sa mineralima kostiju i na taj način ostvaruju svoj efekat (Bosi i sar., 2003).

U razvoju novih netoksičnih, biološki aktivnih klasa lekova u tretmanu osteoporoze, ističe se bisfosfonatni fuleren $C_{60}(OH)_{16}AMBP$, koji ciljano deluje u pravcu mineralizacije koštanog tkiva *in vitro* (Gonzalez i sar., 2002).

In vivo istraživanja bisfosfonatnog fulerena C_{60} , oralno apliciranog u miša, potvrdila su efikasnost ovog fulerenskog derivata u terapiji i prevenciji osteoporoze. Naime, poznato je da bisfosfatne grupe imaju visok afinitet prema koštanom mineralnom hidroksiapatitu. Vodorastvorni C_{60} , kao vektor za bisfosfonatne grupe, ciljano dospeva do kostiju i doprinosi značajnim i pozitivnim promenama arhitekture kostiju (Peralta, 2010).

Fulereni kao kontrastni agensi

Fulereni se nakon unošenja u organizam putem krvotoka, brzo distribuiraju u tkiva, bez toksičnih efekata tokom prve nedelje. Distribucija fulerena po organima pruža mogućnosti za dizajn lekova specifičnih prema određenim organima. Naime, uvođenjem različitih jona, atoma ili klastera u šupljinu fulerenske sfere nastaju endohedralni fulereni. Atomi metala unutar ugljeničnog kaveza ostvaruju snažnu interakciju sa samom ugljeničnom sferom. Oni predstavljaju nove tipove molekula sa ogromnim potencijalom koji privlači pažnju istraživača iz različitih oblasti počevši od fizike, hemije pa do interdisciplinarnih oblasti kao što su tehnologija i biološke nauke.

Među raznovrsnim endohedralnim metalofulerenima, izdvaja se $Gd@C_{82}(OH)_x$ koji ima potencijal za upotrebu u imidžingu magnetnom rezonancom (Anderson i sar., 2006, Sitharaman i sar., 2007, Bolskar, 2008, Jie i sar., 2010). Smatra se da bi upotreba fulerena kao kontrastnih agensa mogla doprineti povećanju preciznosti imidžinga u slučajevima kancera sa metastazama (Bosi i sar., 2003).

Antitumorska svojstva fulerena

Različiti fulerenski derivati takođe imaju potencijal za upotrebu u terapiji malignih bolesti.

Antitumorska efikasnost derivata fulerena sa gadolinijumom $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ je veća u poređenju sa konvencionalnim antineoplastičnim agensima ciklofosamidom i cisplatinom. Naime, $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ pokazuje izuzetno nisku toksičnost *in vivo*, dok u *in vitro* uslovima, na ćelijskoj liniji hepatocita, nije citotoksičan. Međutim, *ip* primena $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ na miševa sa hepatomom u koncentraciji od 114-228 $\mu\text{g/mL}$ inhibira rast tumora nakon 6-dnevnog tretmana (Chen i Von i sar., 2005). Pored inhibiranja rasta tumora kod miševa, tretman $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ poboljšava i imunitet miševa (Jie i sar., 2010).

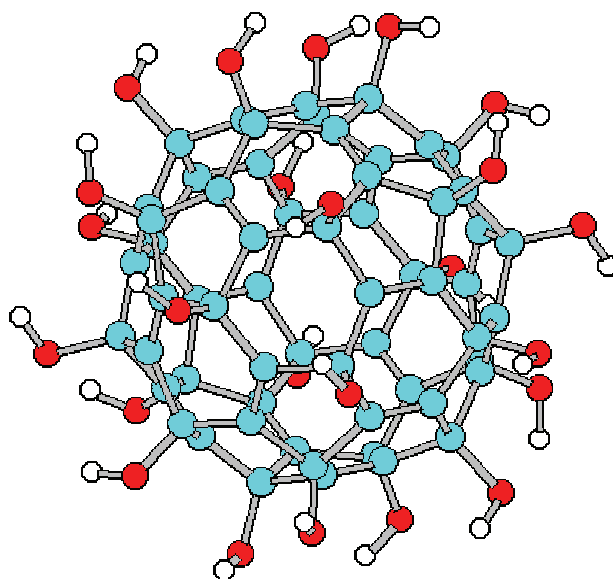
Prikaz primene različitih fullerenskih derivata dat je u Tabeli 1.

Tabela 1. Različite primene fulerena i fullerenskih derivata
(tabela preuzeta iz Partha i Conyers, 2009)

Tip funkcionalizovanih fulerena	Potencijalna primena
Amfifilni fulereni	Oslobađanje lekova
Dendrofulereni	Radiološka zaštita
Fuleren–paclitaxel	Terapija kancera
Fuleren–poliamin	Oslobađanje lekova, transfekcija
Amino–fulerenski adukti	Nevirusna genska terapija
Amino kiseline i peptidi bazirani na fulerenima	Oslobađanje peptida
Cistin C60, Beta-alanin C60	H ₂ O ₂ -indukovana apoptoza, zaštita
Fulerenski lipidozom	Antiviralna aktivnost
Fuleren inkapsuliran u liposome	Fotodinamska terapija kancera
Fulerenski lipozomi	Antioksidant
Fulerenski mehurić (vesicle)	Redukcija oksidativnog stresa
Gadofulereni	Kontrastni agens za MRI
Hidrofilni ili katjonski fulereni	Fotodinamska terapija kancera
Humani serum albumin–fulereni	Fotodinamska terapija kancera
Fulerenski hexaadukti	Fotodinamska terapija kancera
PEG–modifikovani fulereni	Fotodinamska terapija kancera
Fulerenol	Skupljač slobodnih radikala
Karboksifuleren	Antioksidant
Fuleren inkapsuliran u polimer	Antioksidant
Askorbinska kiselina–fuleren	Antioksidant
Hidratisani fuleren	Lečenje alkoholom izazvane encefalopatije, radioprotekcija (Andrievski i sar., 2009)
Nanokatjonit baziran na fulerenu	Hipoksična miokardija
C3-F–tris–MDC	Redukcija oksidativnog stresa
Bisfosfonat fuleren	Agens za terapiju kosti

Rastvorljivost fulerenola C₆₀(OH)₂₄

Fulerenoli su polihidroksilovani derivati fulerena C₆₀ koji se hemijski mogu sintetisati na više načina. Najčešća oznaka fulerenola je C₆₀(OH)_n gde se n može kretati od 2 do 44. Povećavanjem broja hidroksilnih grupa po sferi C₆₀ raste i vodorastvorljivost (Brant i sar., 2006). Na slici 4. je predstavljen molekul fulerenola C₆₀(OH)₂₄ sa dvadesetčetiri hidroksilne grupe simetrično raspoređene po sferi C₆₀.

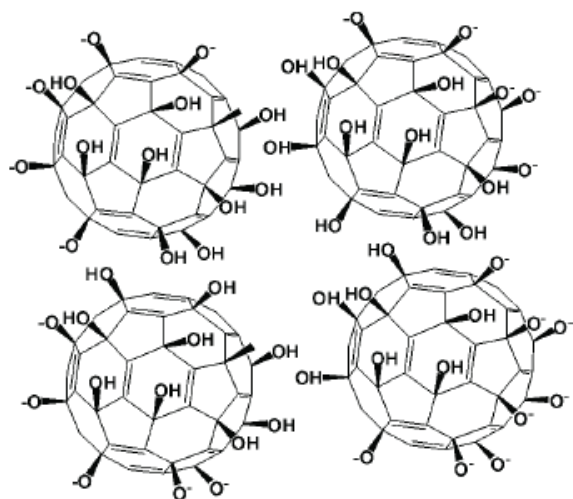


Slika 4. Simetrično raspoređene 24 hidroksilne grupe po sferi C_{60} u molekulu fulerenola $C_{60}(H)_{24}$

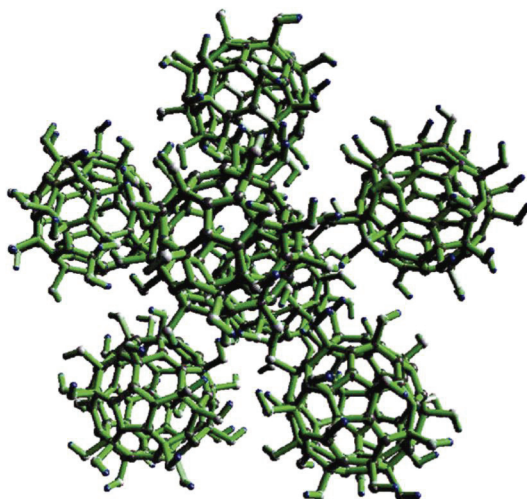
Prečnik molekula fulerenola $C_{60}(H)_{24}$ je 1,1 nm, dok je prečnik ugljeničnog kaveza fulerena C_{60} 0,71 nm.

Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ je amorfna supstanca tamnosmeđe boje, dobro rastvorna u vodi i dimetilsulfoksidu. Hemijski je stabilan u čvrstom agregatnom stanju u laboratorijskim uslovima. Raspodela nanočestica fulerenola u rastvoru prema broju i zapremini može zavistiti od prisustva neorganskih i organskih kosolvenata. U prisustvu jona zemnoalkalnih i prelaznih metala nanočestice fulerenola agregiraju i grade precipitate (Anderson i sar., 2005, Ičević i sar., 2005, Đorđević i sar., 2009).

U vodenom rastvoru molekuli fulerenola se nalaze u protonovanom i deprotonovanom, polianjonskom obliku a da li će molekul biti više ili manje protonovan ili deprotonovan zavisi od pH sredine. Polianjonski molekuli fulerenola $C_{60}(OH)_n(O_m^-)$ ($2 \leq m+n \leq 44$) između sebe kao i sa molekulima vode grade vodonične veze, pri čemu se formiraju stabilni agregati u vodenoj sredini (slika 5.). Negativna naelektrisanja čestice orijentisana su ka površini agregata, dok se “mreža” ektramolekulskih vodoničnih veza između molekula fulerenola i molekula vode nalazi unutar agregata stabilizujući ga i direktno odgovarajući za stabilnost nanočestica (Brant i sar., 2007).



a)



b)

Slika 5. a) Formiranje mogućih fulerenolskih $C_{60}(OH)_n(O_m^-)$ agregata u vodi (Brant i sar., 2007),
 b) kompjuterska simulacija stabilne forme nanoagregata fulerenola ($C_{60}(OH)_{24}$)₇ (Piatek i sar., 2011)

Nastanak klastera fulerenola u vodenoj sredini se objašnjava velikom površinom fulerenola, zbog koje dolazi do prekida vodoničnih veza između molekula vode i nastanka međumolekulskih prostora u vodi. Intereagujući sa molekulima vode, fulerenol značajno povećava njihovu entalpiju. Mehanizam hidratacije fulerenola je povezan sa brojem i specifičnim aranžmanima hidroksilnih grupa na njegovoj površini. Manje hidroksilovani fulereni odlikuju se slabijom vodorastvorljivošću, za razliku od visoko hidroksilovanih ugljeničnih kaveza koji su dobro rastvorljivi u vodenom okruženju (Maciel i sar., 2011).

Sa promenama pH i temperature menja se mehanizam rastvaranja fulerenola u vodi, što može uticati na veličinu fulerenolskih klastera ali ne može u potpunosti sprečiti formiranje klastera. Obrazovanje klastera odvija se tokom inicijalne disperzije suvog fulerolskog praha u vodi (Brant i sar., 2007), čak i na mikromolarnim koncentracijama (Vileno i sar., 2006, Husebo i sar., 2004). Formiranjem većih, bliskije povezanih i amorfnih klastera fulerenola nastaju agregati u vodi (Husebo i sar., 2004) i to u širokom pH intervalu. Agregati fulerenolskih klastera su amorfne dendritske strukture različite veličine. Agregati fulerenola u medijumu za kulturu (sa 10% fetalnog govedeg seruma) manji su od 100nm (Cai i sar., 2008, Su i sar., 2010, Assemi i sar., 2010).

Sa promenama pH rastvora menja se i naelektrisanje fulerenolskih čestica. Pri pH=3, naelektrisanje fulerenolskih klastera je 0, dok sa porastom pH>3, fulerenol stiče negativno površinsko naelektrisanje. Nema bitne promene u veličini distribucije nanočestica fulerenola u uslovima kisele (pH 3.05), blizu neutralne (pH 6.48) i bazne (pH 9.80) pH vrednosti. Kada pH rastvora postane bazna, može doći do smanjenja veličine fulerenolskog klastera u vodi. Ovo bi moglo značiti da u formiranju klastera učestvuju i jači mehanizmi a ne samo vodonične veze, koje su neosetljive na promene pH vrednosti (Brant i sar., 2007). Maciel i saradnici su molekularno dinamičkim modelima izučavali mehanizme rastvaranja fulerenola u vodi i potvrdili dominaciju formiranja vodoničnih veza (Maciel i sar., 2011).

Biološka aktivnost fulerenola

Najznačajnija osobina fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$, na kojoj se bazira njegov potencijal za upotrebu u biomedicini, jeste njegov antioksidativni potencijal.

Antioksidativna aktivnost

Antioksidativno odnosno prooksidativno dejstvo $C_{60}(OH)_{24}$ je testirano na različitim eksperimentalnim modelima (Mirkov i sar., 2004, Djordjevic i sar., 2005, Chen i Von, 2005, Xia i sar., 2006, Isakovic i sar., 2006, Injac i sar. 2008, Srdjenovic i sar., 2010, Cai i sar., 2008).

Poznato je da fullerenski derivati mogu biti citotoksični tako što pod uticajem UV zračenja indukuju formiranje singlet kiseonika, hidroksil radikala i superoksida, koji uzrokuju lipidnu peroksidaciju u ćelijama (Chen i Von, 2005). U abiotičkim uslovima, fulerenol $C_{60}(OH)_{22-26}$, indukuje formiranje ROS-a pri koncentraciji od 0,5 mg/L. Međutim, na ćelijskoj liniji makrofaga miša RAW 264.7 fulerenol čak pri 20 puta većoj koncentraciji od 10mg/L indukuje samo neznatno formiranje H_2O_2 i malo povećanje intraćelijskog kalcijuma ali ne i superoksidnog radikala. U tim uslovima ne dolazi do stimulisanja produkcije ROS-a, deplecije glutationa (GSH) ili stimulacije ekspresije hem oksigenaze-1 (HO-1) i produkcije TNF- α , tako da izostaje pojava oksidativnog stresa (Xia i sar., 2006).

Sa druge strane, $C_{60}(OH)_{24}$ uzrokuje uglavnom antioksidativnu/citoprotektivnu aktivnost, kao i odloženu ćelijsku smrt nezavisnu od ROS sa karakteristikama apoptoze. Na modelu sa citotoksičnim agensom kao što je vodonik peroksid i peroksinitritnim donatorom, koji uzrokuju oksidativni stres, fulerenol se ponaša antagonistički (Isakovic i sar., 2006).

AO aktivnost $C_{60}(OH)_{24}$ je testirana njegovom sposobnošću da sakuplja stabilne DPPH radikale i reaktivne hidroksi radikale tokom Fentonove reakcije. Utvrđeno je da fulerenol skuplja slobodne radikale na dozno zavistan način, čime je potvrđena njegova antioksidativna aktivnost (Djordjevic i sar., 2005).

$C_{60}(OH)_{24}$ takođe deluje kao mitohondrijalni protektivni antioksidans na ćelijskom modelu MPP1-indukovane Parkinsonove bolesti. Naime, na datom modelu je indukovano smanjenje ćelijske vijabilnosti i mitohondrijalne funkcije, povećan nivo ROS i oksidativnog oštećenja DNK i proteina. Pretretman sa $C_{60}(OH)_{24}$ u koncentraciji većoj od 20 μ M deluje protektivno na ovom modelu (Cai i sar., 2008).

$C_{60}(OH)_{24}$ deluje i kao direktni hvatač NO radikala azot oksida koji se oslobađa iz rastvora natrijumnitroprusida. U eksperimentu *in vivo* je ispitivan uticaj fulerenola na

aktivnost testikularnih AO enzima pacova koji su bili tretirani natrijumnitroprusidom. Pretretman eksperimentalnih životinja fulerenolom dovodi do smanjenja aktivnosti enzima katalaze, glutation transferaze i glutation peroksidaze, koji su indukovani NO. Štaviše, fulerenol ispoljava aktivnost i u prevenciji lipidne peroksidacije i „hvatanju“ superoksidnog anjona (O_2^-) i NO radikala (Mirkov i sar., 2004)

Zahvaljujući sposobnosti $C_{60}(OH)_n$ da prođe krvno-moždanu barijeru, fulerenoli u neuronskom tkivu apsorbuju kiseonične radikale, smanjujući na taj način oštećenja uzrokovana slobodnim radikalima a takođe redukuju i apoptozu (Dugan i sar., 1996).

Na modelu uterusu i ileumu pacova je utvrđeno da fulerenol može uticati na aktivnost superoksid-dismutaze (SOD), tako da u zavisnosti od doze i načina primene može imati antioksidativna svojstva ali i prooksidativna u slučaju hronične primene visokih doza. Takođe, fulerenol rastvoren u dimetilsulfoksidu (DMSO) može modulirati aktivnost drugih antioksidativnih enzima (Slavić i sar., 2011).

Organoprotektivna svojstva fulerenola

Citoprotektivni AO efekti polihidroksilnih derivata fulerena mogu da se koriste u zaštiti različitih organa neuronskog tkiva, srca, jetre, pluća i bubrega.

Neuroprotektivna svojstva. Neurodegenerativne bolesti kao što su Parkinsonova i Alzheimer-ova bolest uzrokovane su hiperprodukcijom kiseoničnih radikala i radikala azot oksida verovatno usled prekomerne ekscitacije receptora za glutaminsku kiselinu (Bosi i sar., 2003). Kiseonični radikali uzrokuju oksidativni stres a kaskada događaja koji slede, dovodi do ćelijske nestabilnosti i programirane ćelijske smrti. U takvim okolnostima skupljači reaktivnih kiseoničnih radikala deluju protektivno smanjenjem neuronske smrti.

Utvrđeno je da fulerenoli $C_{60}(OH)_n$ poseduju neuroprotektivnu aktivnost koja je bazirana na sposobnosti da reaguju sa kiseoničnim radikalima kao što su superoksidni O_2^- i hidroksi radikal $\cdot OH$ koji oštećuju lipide, proteine, DNK i ostale makromolekule (Dugan i sar., 1996, Dugan i sar., 1997, Chi i sar., 2002, Lin i sar., 2002, Silva, 2006). Fulerenoli u ćelijskoj kulturi kortikalnih neurona deluju kao snažni antioksidanti, apsorbujući kiseonične radikale (Dugan i sar., 1996).

Kod Alchajmer-ove bolesti i amiloidoza javlja se takođe i fenomen formiranja proteinskih fibrila. Istraživanja neuroprotektivnih svojstava fulerena su pokazala da hidratirani C₆₀ fuleren, pored antioksidativne aktivnosti, ispoljava i anti-amiloidogenu aktivnost, budući da inhibira fibriliaciju amiloid β25-35-peptida (Podolski i sar., 2007). Ovo otkriće bi takođe moglo da predstavlja doprinos u razvoju terapije protiv neurodegenerativnih bolesti bazirane na fulerenskim NČ.

Kardioprotektivna svojstva: Kardioprotektivni efekti fulerenola potvrđeni su *in vivo* na pacovima sa karcinomom dojke. Naime, fulerenol deluje protektivno kao skupljač slobodnih kiseoničnih radikala, posebno OH[•] i ONOO[•], na tkivu srčanog mišića, smanjujući kardiotoksičnost indukovanu antineoplastičnim lekom doksorubicinom (Injac i sar., 2008).

Hepatoprotektivna svojstva: Na istom modelu *in vivo* je utvrđeno da fulerenol zahvaljujući svojim AO karakteristikama, deluje protektivno i na jetru, smanjujući hepatotoksičnost koja je indukovana doksorubicinom. S druge strane, u slučaju snažnog oksidativnog stresa, indukovanog veoma agresivnim prooksidansom kao što je doksorubicin, citotoksični efekti fulerenola prevazilaze njegovu protektivnu ulogu. Smatra se da će se poboljšavanjem fizičko-hemijskih karakteristika fulerenola postići njegov maksimalni AO efekat (Injac i sar., 2008).

Utvrđeno je i da niže doze C₆₀(OH)₂₄, od 25mg/kg imaju veći protektivni efekat na srce i jetru pacova sa kolorektalnim kancerom, u odnosu na više doze (Injac i sar., 2009).

Tkivo **pluća** je veoma osetljivo na oksidativni stres uzrokovan doksorubicinom zbog toga što se odlikuje povećanim oksidativnim metabolizmom i redukovanom AO odbranom u odnosu na druge organe. Primenom fulerenola tokom terapije doksorubicinom *in vivo*, dolazi do smanjenja svih biohemijskih, hematoloških i patohistoloških parametara oštećenosti pluća (Injac i sar., 2008, Srđenović, 2010). Takođe na niskim koncentracijama, C₆₀(OH)_{7±2} štiti tkivo pluća od oksidativnog stresa izazvanog tokom ishemijske reperfuzije (Chen i sar, 2004).

U eksperimentu sa oštećenjem **bubrega** indukovanim doksorubicinom, koje se manifestuje biohemijskim pokazateljima oksidativnog stresa, pretretman fulerenolom doprinosi da se skoro svi ispitivani biomarkeri vrate na normalne vrednosti. Poznato je da je doksorubicin kod životinja nefrotoksičan i da formiranjem slobodnih radikala

uzrokuje hroničnu, progresivnu, glomerularnu bolest. Fulerenol, reagujući sa visoko reaktivnim kiseoničnim vrstama, može prevenirati nefrološke promene indukovane doksorubicinom (Injac i sar., 2008, Srđenović, 2010).

Prednost fulerenola u poređenju sa drugim AO jeste u tome što se on može primenjivati i kao organoprotektor (srce, jetra, bubrezi i pluća) a ujedno i kao radioprotektor tokom radio- i hemio terapije kancera. Tako na primer, fulerenol, primenjen kao pretretman doksorubicinu, značajno smanjuje ili u potpunosti sprečava ispoljavanje toksičnih efekata doksorubicina u bubrezima, plućima i testisima. Sam po sebi, fulerenol ne utiče značajno na promenu ni jednog ispitivanog parametra.

Protektivno dejstvo fulerenola *in vivo*, najvećim delom se zasniva na antioksidativnom potencijalu, odnosno sposobnosti da deluje kao "čistač" slobodnih radikala ali i kao helator gvožđa, sprečavajući na taj način dalje stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (Srđenović, disertacija, 2010, Srđenović i sar., 2010) Bazirano na navedenim svojstvima, fulerenol deluje i antitumorski i antimetastatski na miševima sa kancerom dojke. Naime, tumorska angiogeneza ima ključnu ulogu u rastu tumora, tako da se inhibicijom razvoja krvnih sudova, tumor može održavati u stanju mirovanja (Folkman i sar., 2009). Inhibicija angiogeneze a time i metastaziranja kancera, postiže se primenom AO koji smanjuju nivo oksidativnog stresa i inflamacije u kancerskim ćelijama. Primena $C_{60}(OH)_{20}$ dovodi do smanjenja oksidativnog stresa, angiogenih faktora, TNF- α , i VEGF i PDGF u tumorskim tkivima (Jiao i sar., 2010), delujući na taj način antitumorski i antimetastatski.

Citotoksičnost fulerenola

Citotoksični (antiproliferativni) efekti polihidroksilnih fulerena $C_{60}(OH)_n$ su analizirani na različitim eksperimentalnim modelima (Bogdanović i sar., 1997, Pickering i Wiesner, 2005, Sayes i sar., 2004, Isakovic i sar., 2006, Yamawaki i Iwai, 2006). U pogledu uticaja fulerenola na proliferaciju ćelija, rezultati istraživanja se kreću od antiproliferativnog efekta (Kamat i sar., 1998, Yamawaki i Iwai, 2006, Gelderman i sar., 2008, Qun-Fen i sar., 2006) preko odsustva uticaja na proliferaciju ćelija (Cai i sar., 2008), do proliferativnog efekta (Niwa i Iwai, 2006, Stankov i sar., 2011).

Antiproliferativni efekti $C_{60}(OH)_{24}$ se ispoljavaju na nekoliko načina, među kojima su: proksidativni odgovor na fotoekscitaciju, aktivacija apoptoze, autofagija i sposobnost fulerenola da na višim koncentracijama redukuje aktivnost AO enzima.

Poznato je da fuleren i njegovi derivati mogu u uslovima izloženosti polihromatskoj vidljivoj i UV svetlosti da podlegnu fotoekscitaciji i da produkuju ROS (singlet kiseonik i superoksidni molekul) i tako uzrokuju citotoksičnost (Kamat i sar., 1998, Kamat i sar., 2000). Oksidativni stres indukovao na ovaj način zavisi od dužine tretmana i koncentracije C_{60} . Prema Kamat-u i saradnicima, $C_{60}(OH)_{18}$ putem generisanja ROS dovodi do oštećenja lipida i proteina koje može biti inhibirano AO glutationom, askorbinskom kiselinom i α -tokoferolom (Kamat i sar., 2000).

Antiproliferativni efekat fulerenola ispitivan je i na nekoliko modela endotelnih ćelija (Lu i sar., 1998, Gelderman i sar., 2008, Yamawaki i Iwai, 2006). U studiji Lu i saradnika praćen je efekat fulerenola na proliferaciju glatkih mišićnih ćelija koje se zajedno sa inflamatornim ćelijama nagomilavaju u krvnim sudovima kod ateroskleroznih promena. Fulerenol je, pri koncentracijama manjim od 10 mg/mL delovao antiproliferativno na glatke mišićne ćelije i humane limfocite u G1 fazi ćelijskog ciklusa. Autori pretpostavljaju da je fulerenol vršio inhibiciju signalne transdukcije, odnosno tirozin kinaze, proteina neophodnog za ćelijsku proliferaciju (Lu i sar., 1998).

U eksperimentima na kulturi HUVEC endotelnih ćelija, $C_{60}(OH)_{24}$ indukuje proinflamatorni i proapoptotski efekat. Naime, 24h tretman endotelnih ćelija fulerenolom u koncentraciji od 0.1mg/mL vodi ka povećanju ekspresije gena za imunoglobuline (CD54), biomarkera proinflamatornog odgovora i tkivnog faktora koagulacije (CD142). Na nižoj koncentraciji ne dolazi do ovih promena (Gelderman i sar., 2008). Autori ovu antiproliferativnu aktivnost fulerenola takođe objašnjavaju njegovom mogućom sposobnošću da inhibira aktivnost citosolne protein kinaze C, na koju je ukazao i Lu sa saradnicima.

Osmodnevni tretman endotelnih ćelija fulerenolom pri koncentraciji od 0.01mg/mL deluje citostatski, dok akutni 24h tretman pri 10 puta većoj koncentraciji fulerenola deluje citotoksično, a ćelijska smrt nastupa putem autofagije aktiviranjem ubikvitina (Yamawaki i Iwai, 2006).

Citotoksičnost fulerenola je ispitivana i na jednoćelijskom organizmu *Tetrahymena pyriformis* i utvrđeno je da fulerenol pri koncentraciji od 0.25 mg/mL deluje citostatski. Inhibicija rasta protozoa objašnjava se smanjenjem aktivnosti AO enzima, tačnije glutation reduktaze, dok se pri nižoj koncentraciji smanjuje i aktivnost glutation peroksidaze. (Qun-Fen i sar, 2006).

Citotoksičan efekat fulerenola ne razlikuje se između primarnih odnosno trajno transformisanih ćelijskih kultura, kao što nema ni specifičnosti prema vrsti odnosno tipu ćelijske kulture (Isaković i sar., 2006). U drugom istraživanju na ćelijskim linijama humanih karcinoma dojke, međutim, fulerenol u nanomolarnim koncentracijama inhibira njihov rast (Bogdanović i sar., 2004, Kojić i sar., 2005) ali inhibicija rasta zavisi od ćelijske linije, koncentracije i dužine tretmana fulerenolom. Osim inhibicije rasta tumorskih ćelija, $C_{60}(OH)_{24}$ vrši supresiju citotoksičnosti indukovane dejstvom antitumorskih lekova. Protektivni efekat fulerenola je izraženiji protiv doksorubicina i cisplatine, čija je toksičnost povezana sa formiranjem slobodnih radikala. Smanjenje citotoksičnosti paklitaksel-a i tiazofurin-a ukazuje na mogućnost da u protektivne efekte fulerenola mogu biti uključeni i mehanizmi koji su različiti u odnosu na antioksidativnu aktivnost "skupljača" (engl. *scavenger*) hidroksi-radikala (Kojić i sar., 2005).

U istraživanju *in vivo* efekata fulerenola je prikazano da je polihidroksilovani derivat C_{60} letalan za pacove kada se primeni *ip* u visokim dozama od 0.1, 0.5 g/kg tokom trodnevnog tretmana. Dolazi do smanjenja sadržaja citohroma P450 i aktivnosti u mikrozomima jetre (izolovanih iz tretiranih životinja). Mehanizam koji dovodi do smanjenja citohroma P450 nije poznat, ali se smatra da bi mogao biti povezan sa: svojstvom polihidroksilovanog C_{60} da skuplja elektrone, povezivanjem fulerenola za enzime, što dovodi do destrukcije samih enzima ili inhibicijom sinteze enzima. Pretpostavlja se da se smanjenje funkcije mitohodrija verovatno odvija usled redukcije elektronskog transfera (Ueng i sar., 1997).

U značajnom broju radova ističe se mala odnosno zanemarljiva citotoksičnost $C_{60}(OH)_n$ posebno u poređenju sa C_{60} (Sayes i sar., 2004, Isakovic i sar., 2006, Cai i sar., 2008, Niwa i Iwai, 2006). Upravo vodorastvorne funkcionalne grupe na površini fulerenskog molekula doprinose snižavanju toksičnosti samog C_{60} molekula (Sayes i sar., 2004). Primenjen i tokom različitih vremenskih tretmana, $C_{60}(OH)_{24}$ ne utiče na proliferaciju ćelija humanog neuroblastoma SK-N-MC (Cai i sar., 2008).

Konačno, fulerenol može da ima i proliferativan efekat. Niske koncentracije fulerenola tokom tridesettrodnog tretmana, deluju proliferativno na ispitivane ćelijske kulture (Niwa i Iwai, 2006). Ispitivanja ćelijskih i molekularnih mehanizama dejstva fulerenola ukazuju na njegov uticaj na gene odgovorne za proliferaciju ćelija (Stankov i sar., 2011)

Radioprotektivna svojstva C₆₀(OH)₂₄

Jonizujuće zračenje uzrokuje štetan efekat na žive organizme odnosno na njihove organe. Izlaganje ćelija jonizujućem zračenju dovodi do formiranja ROS, što rezultira citotoksičnim efektom. Zbog toga je, tokom radijacione terapije pacijenata sa malignim tumorima, na primer, važno zaštititi zdravo tkivo od štetnih efekata jonizujućeg zračenja. Protektivne supstance, koje imaju ulogu da zaštite zdravo tkivo oko tumora, indirektno omogućavaju upotrebu većih doza zračenja i sa tim u vezi boljeg ishoda radioterapije. Zbog toga razvoj radioprotektora predstavlja jedan od ciljeva savremene medicine.

Fulerenol C₆₀(OH)₂₄ je pokazao radioprotektivna svojstva u *in vitro* uslovima na ćelijskoj liniji eritroleukemije K562. Pretretman ćelija sa fulerenolom u koncentraciji od 10 μM, koje su zatim ozračene visokim dozama X-zraka, dovodi do povećanja aktivnosti enzima SOD i glutation peroksidaze. SOD koji katalizuje dismutaciju superoksidnih anjona u hidrogen peroksid, značajno doprinosi povećanju zaštite hematopoetskih ćelija od letalnog ozračivanja jonizujućim zracima (Bogdanović i sar., 2008).

Radioprotektivni potencijal C₆₀(OH)_x potvrđen je i na *in vivo* modelima. Naime, fulerenol pri koncentraciji nižoj od 0.1 mg/mL, pruža maksimalnu zaštitu protozoa koje su izložene γ- zračenju. Ta zaštita se manifestuje preživljavanjem ćelija uz povećanu aktivnost SOD i katalaze. Protektivni efekti fulerenola na oštećenje indukovano γ- zračenjem, pripisuju se njegovoj AO aktivnosti kao skupljača radikala (Zhao i sar., 2005).

C₆₀(OH)₂₄ pokazuje radioprotektivnost i u eksperimentu tokom kog se grupa miševa, nakon dvonedeljnog tretmana fulerenolom, podvrgava letalnoj dozi γ-zračenja. Fulerenol smanjuje smrtnost miševa nakon ozračivanja, što se pripisuje njegovom potencijalu da poveća funkciju imunog sistema, smanji oksidativno oštećenje naročito u jetri i slezini i poboljša funkciju mitohondrija (Cai i sar., 2010).

Štaviše, sa povećanjem doza X-zraka na miševima, radioprotektivni efekat fulerenola je veći. Tako na primer, fulerenol u dozi od 100 mg/kg utiče na preživljavanje miševa kada se aplicira miševima 30 minuta pre ozračivanja većim dozama X-zraka (Trajković i sar., 2005).

Fulerenol pokazuje veću efikasnost i od standardnog radioprotektora amifostina, razvijenog od strane Severnoatlanskog saveza (NATO). Pretretman fulerenolom dovodi do preživljavanja pacova a doza od 100mg/kg ima najveći radioprotektivni efekat. S obzirom na to da je štetan efekat radioterapije uzrokovan pojavom ROS, fulerenol deluje protektivno zahvaljujući svom AO dejstvu (Trajković i sar., 2007).

Biodistribucija fulerenola

I pored pretpostavljenih puteva usvajanja nanočestica u ćelije, u dosadašnjim istraživanjima nema direktne potvrde na koji način se fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ usvaja u ćelije. Pretpostavlja se da je, poput usvajanja fulerena, u pitanju proces endocitoze. Uticaj proteina prisutnih u fiziološkoj sredini na usvajanje fulerenola u ćelije, takođe predstavlja važan aspekt, koji se mora imati u vidu kada se proučava biološki efekat fulerenola. Naime, poznato je da prisustvo proteina u medijumu za ćelijsku kulturu može uticati na agregaciju nanočestica a time i na usvajanje i toksičnost samih nanočestica. Isto tako, nanočestice, koje su delimično ili potpuno obavijene proteinima u telesnim tečnostima, mogu imati izmenjenu reaktivnost, naelektrisanje i hidrofobnost NČ, što može uticati na ćelijski odgovor (Fubini i sar., 2010).

Su i saradnici su pratili usvajanje $C_{60}(OH)_{24}$ u ćelije CHO ćelijske linije i prikazali da se fulerenol lakše usvaja u ćelije u medijumu bez seruma u poređenju sa medijumom za ćelijsku kulturu sa serumom. Takođe je utvrđeno da je fulerenol stabilniji u medijumu sa serumom u odnosu na medijum bez seruma, u kom se agregacija odvija nakon nekoliko časova (Su i sar., 2010).

Prema Qiao i saradnicima, polihidroksilovani derivat fulerena $C_{60}(OH)_{20}$, nasuprot molekulima C_{60} , absorbuje se na površinu ćelijske membrane i teško prodire kroz samu membranu, što se objašnjava upravo njegovom hidrofilnom prirodom i negativnim naelektrisanjem. Naime, polihidroksilovani fulereni ostvaruju jake veze sa polarnim lipidnim glavama na površini ćelijske membrane suprotno čistom fulerenu. Autori

pretpostavljaju da upravo ove razlike u pogledu prodora u ćeliju koje postoje između C_{60} i njegovog polihidroksilovanog derivata možda mogu objasniti manju toksičnost polarnih fulerenskih derivata u odnosu na čist C_{60} (Qiao i sar., 2007).

Usvajanje $C_{60}(OH)_{22-26}$ je praćeno na makrofagnoj ćelijskoj liniji RAW 264.7. Utvrđeno je da pri koncentraciji od 10mg/mL, 10% ćelija nije bilo u fagozomima, dok su mitohondrije bile netaknute u više od 95% ćelija (Xia i sar., 2006).

Zbog potencijalne primene fulerenola kao leka, neophodno je da se *in vivo* utvrdi njegova apsorpcija i distribucija u različitim organima i tkivima, kao i ekskrecija. Metabolizam fulerenola, a samim tim i njegov biološki efekat, zavise takođe i od primenjene metode obeležavanja fulerenola kao i momenta kad se vrši žrtvovanje eksperimentalnih životinja (Maksin i sar., 2007).

Utvrđeno je da vodorastvorni fuleren nakon intravenske aplikacije brzo migrira kroz telo miševa i akumulira se najvećim delom u jetri, a zatim i u ostalim tkivima i organima (Nakamura i Isobe, 2003). Pored jetre, u prvom satu apliciranja fulerenola, detektuje se njegovo prisustvo i u srcu, slezini i crevima, a nakon 4h i u pljuvačnim žlezdama. Posle 21h u telu psa se uočava prisustvo [$^{99m}Tc(CO)_3(H_2O)_3$]- $C_{60}(OH)_{22-24}$ i u bubrezima i mokraćnoj bešici, ali ne i u crevima (Djordjevic i sar., 2011). Nakon 48h od aplikacije, uočava se prisustvo $^{99m}Tc-C_{60}(OH)_x$ u bubrezima, kostima, jetri i slezini miševa i zečeva, zbog čega fulerenol predstavlja potencijalnog kandidata u terapiji leukemije, tumora kostiju ili u terapiji bola (Qingnuan i sar., 2002). Ekskrecija fulerenola je spora, tako da preko 90% vodorastvornog fulerena ostaje u telu i posle nedelju dana od unošenja u organizam, što povećava rizik od hroničnih efekata (Yamago i sar., 1995).

Praćenjem distribucije $^{125}I-C_{60}(OH)_x$ kod miševa sa kancerima jetre, pluća, debelog creva i želuca, uočeno je akumuliranje fulerenola u tumorima, što zavisi i od vrste tumora. Fulerenol se u hepatokarcinomu akumulira i zadržava dugo usled povećane permeabilnosti ćelija tumora i efekta retencije i fagocitoze od strane mononuklearnih fagocita. Zbog toga se pretpostavlja da $C_{60}(OH)_x$ ima potencijal za upotrebu u fotoosetljivom tretmanu nekih vrsta tumora (Ji i sar., 2006).

Genotoksičnost nanočestica

Ispitivanja genotoksičnih efekata koje uzrokuju nanomaterijali predstavljaju važnu kariku u proceni rizika po zdravlje ljudi. Poznato je da genotoksične supstance indukuju oštećenje DNK, što može inicirati i promovisati kancerogenezu. Ukoliko dođe do oštećenja DNK u reproduktivnim ćelijama, to predstavlja opasnost i za potomstvo. Genotoksični nanomaterijali mogu uticati i na ubrzano starenje organizma. Ispitivanje oštećenja DNK vrši se upotrebom odgovarajućih genotoksikoloških testova nakon izlaganja biološkog materijala test supstancama. Tako je za mnoge nanomaterijale potvrđeno da dovode do genotoksičnog odgovora, koji se manifestuje prekidom DNK lanca, tačkastim mutacijama, pojavom DNK adukata i izmenom genske ekspresije. Međutim, i pored toga, generalno postoji velika neusaglašenost u literaturi kada je u pitanju genotoksičnost nanomaterijala. Ta neusaglašenost u najvećoj meri potiče od razlika u dizajnu studija, zbog čega je otežano upoređivanje rezultata između samih studija, dok je istovremeno nemoguće izvući zaključke samo na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika nanomaterijala.

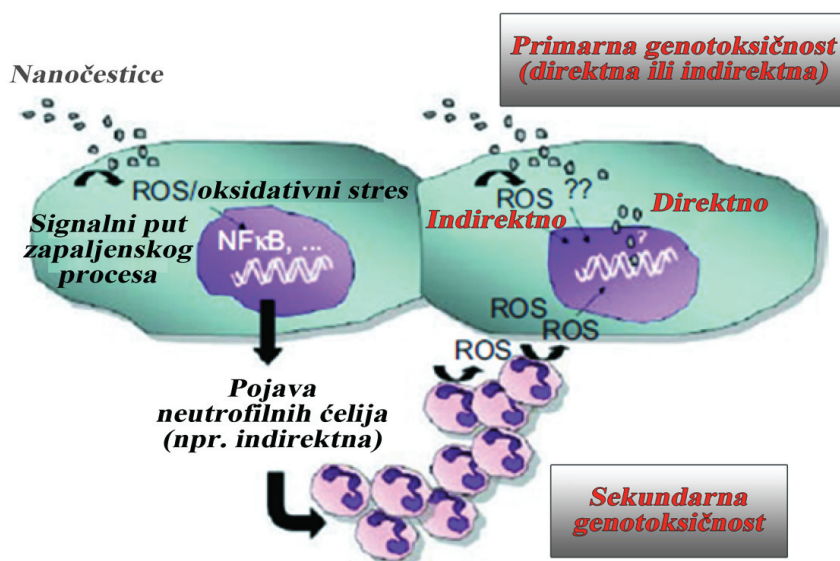
Iako se od 2005. godine do danas značajno povećao broj publikacija iz oblasti nanotoksikologije, u većini tih studija primarno je proučavana citotoksičnost, zbog čega su većinom upotrebljavane više koncentracije NČ. U tim istraživanjima uglavnom nisu proučavane promene u ćeliji do kojih može doći pri nižim koncentracijama NČ, pri kojima nema citotoksičnog efekta, ali zato može doći do oštećenja DNK koje može imati posledice na ćelije.

Zbog svega toga smatra se da bi genotoksični potencijal nanočestica mogao biti neočekivan, upravo zbog njihove male veličine a velike površine, kao i zbog raznovrsnosti fizičko-hemijskih karakteristika kao što je naelektrisanje.

Konačno, genotoksično testiranje i evaluacija mutagenog ili kancerogenog potencijala novih supstanci, pa tako i nanočestica, predstavlja važan deo prekliničkog testiranja novih farmaceutika, što je neophodno pre njihovog prelaska u fazu I/II kliničkih studija.

Mehanizmi indukovanja DNK oštećenja nanomaterijalima

NČ mogu dospeti u ćeliju a zatim i jedro na nekoliko načina, o čemu je detaljnije razmatrano u delu „Ćelijsko usvajanje nanočestica, lokalizacija i interakcija sa biomolekulima“. Uticaj na DNK može biti primaran i sekundaran, pa tako razlikujemo primarnu i sekundarnu genotoksičnost nanomaterijala (slika 6.) (Stone i sar., 2009).



Slika 6. Prikaz mehanizama „primarne“ i „sekundarne“ genotoksičnosti koju NČ mogu indukovati u ćelijama (Stone i sar., 2009)

Testovi *in vitro* za ispitivanje genotoksičnosti NČ omogućavaju identifikovanje primarne genotoksičnosti NČ koja može biti uzrokovana direktno (fizičkom interakcijom između NČ i DNK) ili indirektno (delovanjem ROS koji se formira od strane ćelija aktiviranih nanočesticama). Za razliku od primarne, sekundarna genotoksičnost podrazumeva oštećenje DNK nastalo kao rezultat dejstva ROS nastalog tokom zapaljenskog procesa uzrokovanog nanočesticama.

Primarna genotoksičnost se definiše kao genetičko oštećenje nastalo direktno od samih NČ. Naime, kada NČ dospeju do jedra, one mogu reagovati sa DNK ili sa proteinima vezanim za DNK, što može uzrokovati oštećenje DNK. Takođe, ukoliko se NČ akumuliraju unutar ćelije, a ne stupaju u interakciju sa jedrom, one i dalje mogu doći u direktni kontakt sa DNK tokom mitoze kada se jedarna membrana resorbuje i

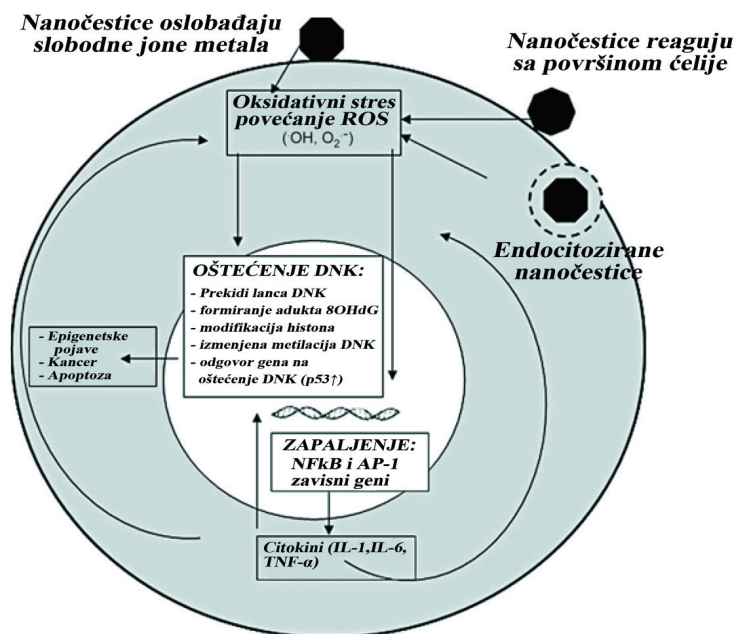
kada ima dovoljno prostora za nastanak promena na DNK. NČ mogu da se apsorbuju na nukleinske kiseline samo onda kada su veće od samog molekula nukleinske kiseline. Kada su NČ male, veličine nekoliko nm, interakcija sa DNK podseća na interakciju sa rastvorljivim metalima (kao što su Cr^{6+} ili Cd^{2+}), budući da NČ reaguju sa DNK zavojnicom putem interakcija koje zavise od veličine, kao što je slučaj sa nanočesticama zlata (Schmid, 2008) i fulerenolom. Fulerenol $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ se vezuje za polinukleotidni lanac native DNK, tačnije za bazne parove unutar veće zavojnice molekula DNK (Pinteala i sar., 2009), što je u biološkim modelima neizvodljivo pre svega zbog niza proteinskih sistema kao što su histoni, odgovornih za pakovanje DNK u hromosome.

Nema mnogo primera genotoksičnosti koja se javlja kao rezultat direktne interakcije neorganskih NČ sa nukleinskim kiselinama (Fenoglio i sar., 2011). Međutim, NČ titanijum dioksida ili silikonske NČ dospevaju u jedro (Geiser i sar., 2005, Liu i sar., 2007) u kom dovode do stvaranja proteinskih agregata, što može rezultirati inhibicijom replikacije, transkripcije i ćelijske proliferacije (Chen i Von, 2005). Kvantne tačke takođe mogu da uđu u jedro preko jedarnih pora i da zatim reaguju sa histonskim proteinima (Nabiev i sar., 2007).

Primarni genotoksični efekat može nastati i tako što NČ direktno dovode do formiranja ROS, što zavisi od površinskih karakteristika samih čestica, prisustva metala, mobilizacije gvožđa i procesa lipidne peroksidacije (Greim i sar., 2000, Kell i sar., 2009). U nastanku primarne genotoksičnosti značajnu ulogu imaju i veličina i oblik čestica, kristalna struktura i rastvorljivost i usvajanje čestica od strane ćelija.

Sekundarna genotoksičnost nastaje kada NČ ne reaguju fizički i hemijski sa molekulom DNK, nego stupaju u reakciju sa ostalim ćelijskim proteinima koji su uključeni u vitalne procese za ćeliju, nakon čega dolazi do indukovanja raznih tipova ćelijskih odgovora koji vode ka genotoksičnosti, a to su oksidativni stres, zapaljenski proces i aberantan signalni odgovor (slika 7.). Prema tome, sekundarna genotoksičnost predstavlja rezultat oštećenja DNK nastalog posredno na primer dejstvom ROS/ RNS koje potiču od inflamatornog procesa uzrokovanog prisustvom NČ (Stone i sar., 2009). Važan aspekt predstavlja prag nastanka sekundarne genotoksičnosti, odnosno koncentracija NČ pri kojoj dolazi do pojave zapaljenskog procesa, prevladavanja nad AO i DNK reparacionim kapacitetom samih ćelija (Greim i sar., 2000). Upravo

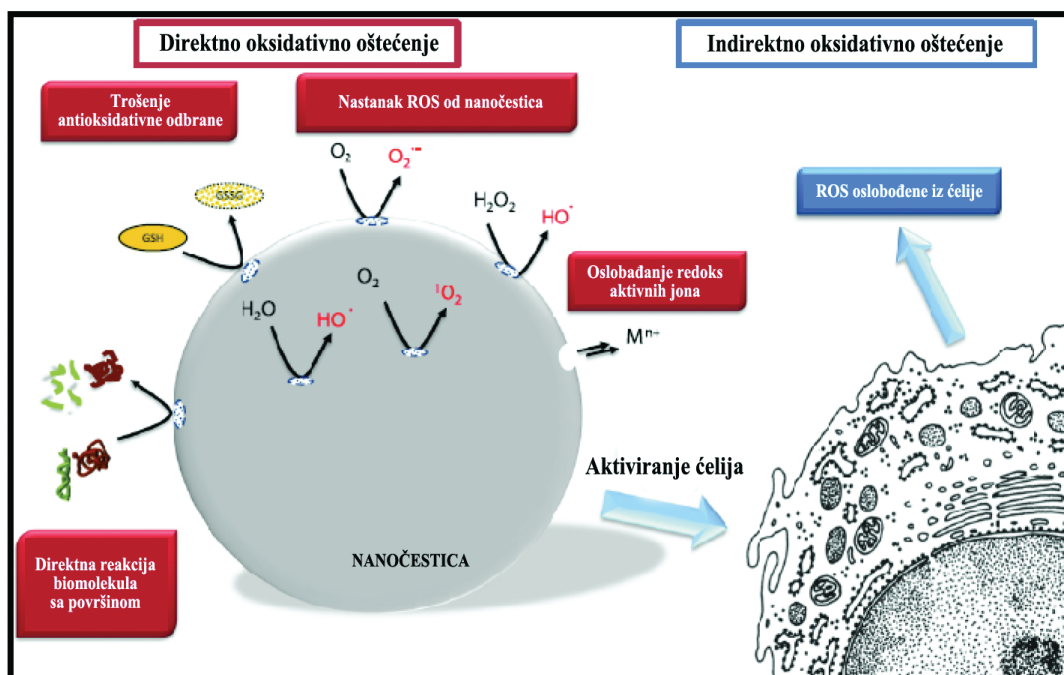
efikasnost intra i ekstra ćelijskih AO odbrambenih mehanizama kao i DNK reparacionih mehanizama imaju važnu ulogu u odgovoru ćelije na novonastale premutagene lezije.



Slika 7. Indirektni mehanizmi koji mogu uzrokovati genotoksičnost (Singh i sar., 2009)

Oksidativni stres

Smatra se da oksidativni stres predstavlja ključni mehanizam koji je odgovoran za genotoksične efekte NČ. On narušava redoks balans unutar ćelije putem povećanja unutarćelijskih reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) kao i putem smanjenja nivoa antioksidativne zaštite. ROS su visoko reaktivni radikalski molekuli koji mogu poremetiti homeostazu unutarćelijske sredine na taj način što, između ostalog, uzrokuju oštećenja ćelijskih makromolekula kao što su na primer DNK, proteini i lipidi i drugi molekuli. ROS-indukovano oštećenje DNK manifestuje se pojavom prekida jednog ili oba lanca DNK, modifikacijama baza (na primer formiranjem adukata 8 - hidroksideoksiguanina) i pojavom unakrsnih veza unutar DNK. Ukoliko ne dođe do reparacije DNK, otvara se mogućnost za inicijaciju i promociju kancerogeneze (Toyokuni, 1998). Mehanizmi putem kojih nanočestice mogu indukovati oksidativno oštećenje ćelija prikazani su na slici 8.



Slika. 8. Mogući mehanizmi oksidativnog oštećenja indukovani nanočesticama (Fenoglio i sar., 2011)

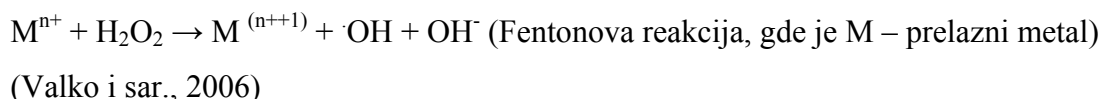
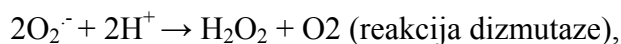
Nanočestice mogu indirektno i direktno indukovati oksidativno oštećenje ćelije:

Direktno oksidativno oštećenje ćelije može nastati kao posledica prisustva reaktivnih mesta na površini čestice koja uzrokuju nastanak ROS, na primer hidroksi radikala ($\text{HO}\cdot$) iz endogenog peroksida (H_2O_2), superoksidnog jona ($\text{O}_2^{\cdot-}$) i singlet kiseonika ($^1\text{O}_2$) iz kiseonika prisutnog u tečnostima, ili reaktivnih mesta koja direktno oštećuju biomolekule. Takođe, oslobađanje redoks-aktivnih metala (M^{n+}) može doprineti povećanju oksidativnog stresa koji potiče od čestica.

Indirektno oksidativno oštećenje se odnosi na generisanje ROS koje potiču od ćelije i to ili putem mitohondrijalne aktivnosti ili aktiviranjem ćelija imunološkog sistema.

Reaktivne kiseonične vrste se dele na “primarne” i “sekundarne”. “Primarne” ROS, kao što je na primer superoksid $\text{O}_2^{\cdot-}$, mogu nastati u toku metaboličkih procesa ili putem aktivacije kiseonika, što rezultira formiranjem reaktivnog nukleofilnog molekula kiseonika odnosno superoksidnog anjona. Ovaj radikal ne reaguje direktno sa DNK ili sa polipeptidima. Međutim, on može ragovati sa ostalim molekulima kao što su redoks

aktivni prelazni metali (na primer gvožđe) (Kell i sar., 2009) ili sa enzimima nastalim produkcijom “sekundarnih” ROS (na primer ·OH radikal), koji predstavljaju primarne medijatore oštećenja DNK. Većina ·OH radikala nastalih *in vivo* potiču od raspada vodonik peroksida u toku Fentonove reakcije uz katalizovanje Fe²⁺:



Prelazni metalni joni, kao što su kadmijum, hrom, bakar, gvožđe, nikal, titanijum i cink, oslobođeni iz određenih NČ, imaju potencijal da uzrokuju konverziju ćelijskih kiseoničnih metaboličkih produkata kao što je H₂O₂ i superoksidni (O₂^{·-}) anjon u hidroksi radikal (·OH) koji primarno oštećuje DNK (slika 7.). Gvožđe u oksidacionom stanju dva takođe može uzrokovati produkciju H₂O₂ iz molekularnog O₂, koji može difundovati kroz ćelijsku i jedarnu membranu i reagovati sa Fe²⁺ vezujući se sa DNK, što rezultira nastankom ·OH. To može uzrokovati pojavu timin tirozin (DNK-histon protein) unakrsne veze u hromatinu (Valko i sar., 2006). Dalje, pojava slobodnih katjona gvožđa može uzrokovati modifikacije purina i pirimidina indukovane sa ·OH (Zastawny i sar., 1995). Dakle, NČ sa jonima gvožđa mogu predstavljati dodatni izvor gvožđa unutar ćelije što, preko Fentonove reakcije, vodi stvaranju visoko reaktivnih hidroksi radikala.

U brojnim studijama je prikazana indukcija ROS nakon izlaganja NČ-ma (Karlsson i sar., 2008, Papageorgiou i sar., 2007, Gurr i sar., 2005). NČ titanijum dioksida (TiO₂) koje se smeštaju u perinuklearni prostor, uzrokuju stvaranje ROS u tom regionu (Park i sar., 2008). Testovima komete i mikronukleusa je utvrđeno da je oksidativno oštećenje DNK zapravo uzrok pojavi genotoksičnih efekata NČ (Karlsson i sar., 2008, Papageorgiou i sar., 2007, Gurr i sar., 2005).

Oksidativni stres takođe može da aktivira specifične signalne puteve uključujući protein kinazu i NF-κB (Bonvallet i sar., 2001), što zajedno sa iscrpljivanjem rezervi antioksidativne odbrane dovodi do oslobađanja pro-inflamatornih citokina (Abe i sar., 2000). Krajnji rezultat te signalne kaskade jeste inicijacija zapaljenjskog procesa koji predstavlja odbrambenu reakciju organizma. Ova reakcija zatim dovodi do oslobađanja

ROS iz inflamatornih ćelija (na primer neutrofila) i mogućeg oštećenja DNK (Waldman i sar., 2007).

Kada je u pitanju učešće fulerena i njegovih derivata u oksidativnom stresu, dosadašnja saznanja su kontradiktorna.

Pod određenim uslovima fulerenski derivati mogu indukovati pro-oksidativni efekat, dok u drugim ne, a to uglavnom zavisi od hemijske strukture fulerenskih derivata, koncentracije, tipa ćelija na kojima je vršena analiza i naravno od samog eksperimentalnog dizajna (Kamat i sar., 2000, Sayes i sar., 2005, Xia i sar., 2006). Pa ipak, generalno gledano, derivatizovani fulereni sa polarnim funkcionalnim grupama pokazuju bolje antioksidativne karakteristike u poređenju sa nano formama fulerena C₆₀.

Sayes (Sayes i sar., 2005) prikazuje da nanoC₆₀ u koncentracijama od 0,00024-2,4 µg/mL pripremljen sa THF i zatim dispergovan u medijumu za ćelijsku kulturu sa serumom, dovodi do citotoksičnog efekta uz povećanje produkcije ROS, lipidne peroksidacije kao i oštećenja ćelijske membrane u različitim ćelijskim linijama (dermalni fibroblasti, hepatociti i astrociti). Oštećenje ćelijske membrane je potvrđeno merenjem LDH (laktat dehidrogenaze) koja se oslobađa iz ćelija, kao i povećanom permeabilnošću ćelija za dekstran.

C₆₀ i C₆₀(OH)₁₈ mogu uzrokovati oštećenje ćelijske membrane mikrozoma jetre pacova pod fotosenzitivnim uslovima, što je utvrđeno merenjem lipidne peroksidacije (Kamat i sar., 2000). Štaviše, došlo je do oštećenja proteina putem oksidacije, inaktivacije enzima i smanjenja toksičnog odgovora uz upotrebu AO. Iako su oba ispitana molekula pokazala prooksidativnu aktivnost, C₆₀(OH)₁₈ je uzrokovao veću toksičnost u poređenju sa C₆₀.

Suprotno ovim rezultatima, C₆₀(OH)₂₂₋₂₆ dispergovan u medijumu za ćelijsku kulturu sa fetalnim goveđim serumom, ne dovodi do pojave produkata ROS, deplecije glutaciona (GSH) ili stimulacije ekspresije hem oksigenaze 1 u ćelijskoj liniji makrofaga RAW 264.7. Tretman sa fulerenolom ne uzrokuje povećanje produkcije TNF-α, ali zato indukuje povećanje nivoa mitohondrijalnog kalcijuma, što ukazuje na pojavu mitohondrijalnog oštećenja, bez obzira na odsustvo promena mitohondrijalnog membranskog potencijala (Xia i sar., 2006).

Zapaljenski procesi

Zapaljenski proces predstavlja važan fiziološki proces koji nastaje kao odgovor na povredu tkiva. U tom odgovoru učestvuju inflamatorne ćelije, koje sekreću veliki broj rastvornih faktora citokina, kao što su na primer interleukini (IL) i familija proteina - faktor nekroze tumora (TNF). Tokom zapaljenskog procesa dolazi i do migracije inhibitornih faktora, reaktivnih azotnih vrsta (NO) i ROS. Proinflamatorni citokini, NO i TNF- α , kao učesnici akutnih i hroničnih inflamatornih procesa, privlače ostale inflamatorne ćelije koje zatim oslobađaju citokine i povećavaju imuni odgovor (Huang i sar., 2008).

Međutim, iako ovi faktori predstavljaju važnu zaštitu od infekcija i/ili povrede tkiva, oni takođe mogu uzrokovati oštećenje DNK koje se manifestuje fragmentacijom DNK, tačkastim mutacijama i formiranjem adukata DNK. Štaviše, oni mogu inhibirati reparaciju DNK i indukovati aberantni tip metilacije, što može dovesti do izmenjene genske ekspresije (Valinluck i Sowers, 2007). Takođe, prisustvo hroničnog zapaljenja u bliskoj je vezi sa kancerogenezom (Blanco i sar., 2007, Federico i sar., 2007). Mnoge studije su do danas pokazale da nanočestice mogu uzrokovati inflamatorni odgovor (Donaldson i sar., 2004, Kagan i sar., 2005). Centralna uloga u indukovanju zapaljenskog procesa nanočesticama, verovatno pripada njihovoj maloj veličini i s tim u vezi velikoj reaktivnoj površini, kao i hemijskoj raznolikosti NČ koja utiče na stepen indukovanog inflamatornog odgovora.

Neki nanomaterijali imaju jasan potencijal da, kao rezultat prisustva hroničnog zapaljenskog procesa, putem prekomernog formiranja ROS, indukuju oksidativno oštećenje DNK. Na osnovu sposobnosti da indukuju zapaljenski proces u *in vitro* uslovima, uočen je sledeći poredak NČ: kobalt > silikonske NČ > TiO₂ > cink oksid NČ, dok NČ nikal i gvožđe oksidi ne indukuju porast inflamatornih markera (Peters i sar., 2004, Gojova i sar., 2007, Park i sar., 2008).

Kada su u pitanju istraživanja proinflamatornog potencijala fulerena, rezultati su različiti. Rouse prikazuje da inflamatorni odgovor predstavlja instrument toksičnosti fulerena u *in vitro* uslovima na humanim epidermalnim keratinocitima (HEK). To se manifestuje povećanjem produkcije proinflamatornih medijatora kao što su IL-8 i faktor nekroze tumora α (TNF α) (Rouse i sar., 2006).

S druge strane, Roursgaard i saradnici prikazuju da fulerol $C_{60}(OH)_{20\pm 2}$ samo pri višim koncentracijama uzrokuje proinflamatorni odgovor, dok na nižim koncentracijama može imati protektivna, antiinflamatorna svojstva (Roursgaard i sar., 2008). Antiinflamatorni potencijal fulerenola temelji se na njegovim antioksidativnim karakteristikama, što je potvrđeno na *in vivo* modelu (Dragojević-Simić i sar., 2011).

Huang i saradnici takođe prikazuju da molekul C_{60} -baziran na fuleropirolidin-ksantin-u, utiče na smanjenje nivoa NO i TNF- α . Autori smatraju da upravo fulerenska komponenta deluje kao skupljač slobodnih radikala, a ksantinski dodatak na supresiju inflamatorne reakcije (Huang i sar., 2008).

Štaviše, polihidroksilovani fuleren ima sposobnost inhibicije alergijskog odgovora. Naime u iniciranje i razvoj nekih inflamatornih reakcija u koje spada i hipersenzitivnost, uključene su humane mastoidne ćelije kao i bazofilne ćelije periferne krvi. Kada se ove ćelije preinkubiraju sa polihidroksilovanim C_{60} , dolazi do smanjenja aktivacije signalnih molekula uključenih u oslobađanje inflamatornih medijatora zavisnih od IgE, kao i do smanjenja nivoa oksidativnog stresa. Ova osobina bi mogla da se iskoristi u tretiranju brojnih patoloških stanja, počev od polenske kijavice do autoimunih bolesti kao što je inflamatorni artritis (Ryan i sar., 2007).

Signalni put kao odgovor na oštećenje DNK

Nanomaterijali, kao što je rečeno, mogu indukovati pojavu oksidativnog stresa, internog metaboličkog događaja koji može dovesti do oštećenja DNK. To oštećenje može pokrenuti različite odgovore ćelija kao što su zaustavljanje ćelijskog ciklusa, apoptoza i reparacija DNK.

DNK reparatorni mehanizmi imaju centralnu ulogu u sprečavanju fiksiranja genetičkog oštećenja u mutacije. Međutim, ukoliko se pojavi greška u reparaciji za vreme ili pre replikacije oštećene DNK, to potencijalno može voditi ka mutagenezi i kancerogenezi. Kada je DNK oštećena, ključni efektorni gen koji se aktivira jeste p53. Taj tumor supresorni gen predstavlja “čuvara genoma” budući da je, u slučaju narušavanja DNK, odgovoran za zaustavljanje ćelijskog ciklusa i aktiviranje transkripcije onih gena koji posreduju u reparaciji DNK. Na taj način se sprečava da se oštećenje DNK prevede u mutaciju (Lane, 1992). Međutim, ukoliko je oštećenje DNK

obimno, tada p53 aktivira apoptozu. Među nanomaterijalima, kvantne tačke kadmijum-telurijuma, na primer, dramatično povećavaju aktivnost p53, a kao posledica toga dolazi do aktivacije proapoptotskih p53 - efektora Bax, Puma i Noxa (Choi i sar., 2008).

Nano-TiO₂, kao odgovor na oštećenje DNK, mogu indukovati akumuliranje p53 u limfocitima. Takođe dolazi i do povećane fosforilacije kinaze CHK1 i CHK2, kao i ekspresije gena koji imaju ulogu u održavanju integriteta genoma (Kang i sar., 2008).

Zlatne NČ utiču na pojačanu ekspresiju (engl. *upregulation*) brojnih DNK reparatornih gena, uključujući BRCA1, Hus 1, ATLD/HNGS1 i AT-V1/AT-V2, ukazujući na pojavu da NČ mogu intereagovati direktno ili indirektno sa regulatorima integriteta genoma, dovodeći do dalje genetičke destabilizacije (Li i sar., 2008). Reparaciji oštećene DNK može doprineti i oslobađanje metalnih jona iz NČ koje sadrže prelazne metale. Tako, na primer, prisustvo Co²⁺ može dovesti do slabljenja sposobnosti reparatornih enzima da reaguju sa oštećenim mestima na DNK (De i sar., 2003).

Fizičko-hemijska karakterizacija nanomaterijala: faktori koji utiču na genotoksičnost

U okviru nanotoksikologije, svakodnevno raste broj podataka o fizičko-hemijskim karakteristikama NČ, njihovoj ulozi u usvajanju u ćelije i kasnijim fiziološkim posledicama. Još uvek nije razjašnjeno koji faktori najviše utiču na genotoksični potencijal NČ, ali je izvesno da je u pitanju uticaj više različitih faktora.

Veličina, oblik, površinske modifikacije

Veličina nanočestica predstavlja jednu od primarnih osobina koje ih izdvajaju od materijala sličnog sastava, jer sa smanjenjem veličine raste broj NČ po jedinici mase. Međutim upravo veličina NČ može predstavljati rizik za organizam, zbog mogućnosti da NČ prođu kroz biološke barijere i dospeju u telo. Tada njihova veličina određuje njihovu kinetiku, odnosno apsorpciju, distribuciju, metabolizam i ekskreciju. Kada dospeju unutar tela, NČ brzo prodiru u ćelije, stupaju u interakciju sa biomolekulima i mogu da destabilizuju normalno ćelijsko funkcionisanje. S jedne tačke gledišta ta činjenica može predstavljati prednost u snažnom prodiru novih nanolekova i pomoćnih

nanosredstava za kliničku negu (Ferrari, 2005, Sahoo i sar., 2007). Sa druge strane, upravo te interakcije sa biomolekulima nakon ekspozicije nanomaterijalima u radnom okruženju ili kroz upotrebu nanoprodukata mogu imati negativne efekte na ljudsko zdravlje.

Kada je u pitanju veličina nanočestica, poznato je da je jedan od najprisutnijih mehanizama usvajanja NČ energetski zavisna endocitoza ili difuzija kroz citoplazmatsku membranu (bilo direktno kroz membranu ili kroz membranske kanale široke 10-30nm). Ukoliko su nanomaterijali određene veličine i oblika, oni mogu olakšati endocitozu tako što se spajaju sa receptorima na membrani ćelije. Može doći i do endocitoze uz posredstvo klatrina, koja se odvija uz formiranje udubljenja (jamica) veličine od 80-120nm što ponovo zavisi od veličine NČ (Baun i sar., 2008). Istraživanja su pokazala da NČ veličine do 200 nm ulaze u ćeliju endocitozom posredovanom klatrinom. Najbrže se usvajaju NČ od 50nm u poređenju sa manjim (do 14nm) i većim (do 500nm) česticama (Rejman i sar., 2004, Chithrani i sar., 2006, Chithrani i Chan, 2007, Gratton i sar., 2008).

Prema tome, od veličine NČ zavisi njihov ulazak u ćelije, a sa tim u vezi i mogući uticaj na DNK.

Oblik odnosno morfologija NČ takođe može uticati na njihov ulazak u ćelije. Naime, ćelije lakše usvajaju NČ u odnosu na nanocevi, a ulazak nanomaterijala cilindričnog oblika zavisi od njihovih dimenzija (Chithrani i Chan, 2007, Gratton i sar., 2008). Nanočestice oktaogonalnog oblika imaju veću površinu u odnosu na strukture sferičnog oblika a iste veličine. Veća površina oktaogonalnih struktura obezbeđuje im i veću reaktivnost zahvaljujući tendenciji atoma sa površine molekula da ostvare visoku energiju veza u cilju postizanja stabilnosti. Dolazi do reakcije sa ostalim molekulima, čime je povećan i reaktivni potencijal (Oberdorster, 2001). Kada nanočestice dospeju u ćeliju, mnogo je veća šansa da svojom većom površinom reaguju sa biomolekulima i na taj način direktno oštete ćelije ili da promovišu oksidativni stres.

Površinske modifikacije: Hemijskim modifikacijama se postiže kreiranje željenih i specifičnih karakteristika nanočestica. Najčešći primeri površinskih modifikacija fullerenskih derivata su hidroksilacija (-OH) i karboksilacija (-COOH) zahvaljujući kojima se povećava hidrofilitet nanomaterijala. Upravo te promene mogu dovesti do povećanja toksičnosti samih supstanci ali isto tako i do sticanja novih svojstava kao što

su antioksidativna i antiinflamatorna aktivnost. Kao posledica površinskih modifikacija može se promeniti genotoksični odgovor nanočestice. Površinska modifikacija, kao što je, na primer, oblaganje nanomaterijala, može direktno biti odgovorna za pojavu toksičnog efekta, ili može indirektno dovesti do oštećenja DNK i to preko pojačanog ćelijskog usvajanja ili preko zasićenja ćelijskih sistema nanomaterijalima. Sa druge strane, oblaganje nanomaterijala može imati i protektivni efekat, ukoliko dovodi do smanjenja toksičnog potencijala samog nanomaterijala.

Uticao površinskih modifikacija NČ na toksičnost vidi se iz primera fulerena. Naime, nemodifikovan C_{60} je u *in vitro* modelima toksičniji u odnosu na njegove vodorastvorne derivate kao što je na primer fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ (Sayes i sar., 2004). Što je derivatizacija fulerenskog kaveza veća, a time i vodorastvorljivost, toksičnost je manja. Međutim, toksičnost fulerena i njegovih derivata ne zavisi samo od površinskih modifikacija, nego se čak može razlikovati u odnosu na tip ćelija/organa koji se ispituje, odnosno da li se radi o *in vitro* ili *in vivo* sistemima (Sayes i sar., 2007). Naime, iako derivatizacija fulerena može u *in vitro* uslovima indukovati toksičnost, to ne mora da se manifestuje i *in vivo*. Tako na primer C_{60} i $C_{60}(OH)_{24}$ ne indukuju toksičnost *in vivo* (Sayes i sar., 2007a). Suprotno rezultatima Sayes-a, Kamat i saradnici prikazuju da je *in vitro* $C_{60}(OH)_{18}$ toksičniji u odnosu na nederivatizovan C_{60} , iako oba molekula fulerena uzrokuju oksidativno oštećenje (Kamat i sar., 2000).

Čistoća

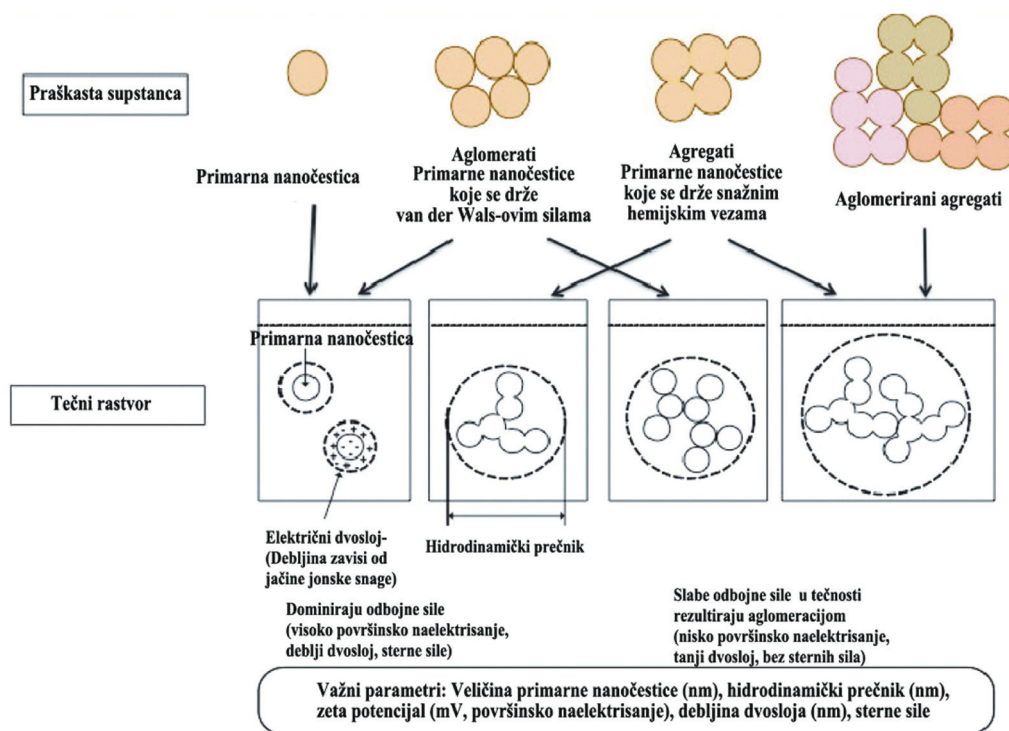
Čistoća nanomaterijala, koja zavisi od postupka sinteze, ima veoma važnu ulogu u toksikološkom profilu nanočestica, budući da eventualno prisustvo rezidualnih metala može biti odgovorno za genotoksičnost pre nego nanočestica sama po sebi. Iako se post-produkcionim procesima uklanja većina metala, čak i u prečišćenim nanomaterijalima može biti sadržano do 15% rezidualnih metala. Time se narušava struktura nanomaterijala i pojavljuju se nove funkcionalne grupe na njihovoj površini, koje mogu indukovati toksičnost (Sayes i sar., 2006).

Zbog toga se ulažu značajni naponi kako bi se dobile što čistije supstance i na taj način eliminisali efekti koji potiču od nečistoća.

Agregacija

Značajna karakteristika mnogih nanomaterijala jeste hidrofobnost, koja u fiziološkim uslovima dovodi do agregacije. Smatra se da su nanomaterijali u najvećem broju slučajeva u obliku agregata a ne individualnih “jedinica”. Naime, skup slabo povezanih čestica (van der Wals-ovim silama), čija površina je slična površini pojedinačnih jedinica predstavljaju aglomerate (slika 9.). Oni se lako mogu razdvojiti dispergentnim sredstvom ili uz mali utrošak energije (na primer mešanjem ili kratkom sonikacijom). Za razliku od aglomerata, agregati predstavljaju formacije koje se sastoje od snažno povezanih čestica, čija površina može biti značajno manja u odnosu na ukupnu površinu pojedinačnih jedinica, pri čemu je disperzija samih agregata gotovo nemoguća.

Ova karakteristika se mora imati u vidu prilikom ispitivanja genotoksičnosti nanočestica. S obzirom na činjenicu da se testiranja genotoksičnih svojstava NČ bilo *in vitro* ili *in vivo* vrše u vodenoj sredini, velika je verovatnoća da će zapravo biti testirane njihove aglomerirane forme (Oberdorster sar., 2007).



Slika 9. Hidrodinamički prečnik R_H primarnih nanočestica, aglomerata, agregata i aglomeriranih agregata u vazduhu (praškasta supstanca) i u tečnom rastvoru (Oberdorster, 2009)

Aglomerati nanočestica ne mogu dugo da postoje u dimenzijama “nano” veličina, što uzrokuje smanjeno usvajanje NČ u ćelije ili nemogućnost njihovog prolaska kroz biološku membranu. Budući da to može imati uticaj na interpretaciju rezultata ispitivanja genotoksičnosti NČ, važno je u eksperimentalnim uslovima potpuno okarakterisati nivo aglomeracije.

Površinsko naelektrisanje i hemizam

Površinsko naelektrisanje nanomaterijala ima značajnu ulogu tokom prodiranja NČ u ćeliju, budući da zahvaljujući pH vrednosti i jonskoj jačini vodene sredine dolazi do formiranja aglomerata NČ (Jiang i sar., 2009).

S obzirom na činjenicu da je citoplazmatska membrana negativno naelektrisana usled prisustva fosfolipida na spoljašnjoj površini, kao i da je i intracelularna sredina takođe negativno naelektrisana, katjonski nanomaterijali se u većoj meri usvajaju u ćeliju endocitozom u poređenju sa anjonskim. NČ sa katjonskim površinskim naelektrisanjem se čak dovode u vezu sa većim citotoksičnim odgovorom u poređenju sa NČ sa anjonskim naelektrisanjem. Međutim, još uvek nije razjašnjeno da li ćelijska smrt predstavlja direktan rezultat površinskog naelektrisanja NČ ili uzrok ćelijske smrti ima veze sa povećanim usvajanjem NČ u ćelije, karakterističnim za katjonske NČ (Nan i sar., 2008).

Kada je u pitanju uticaj površinskog naelektrisanja NČ, treba imati u vidu i da je DNK negativno naelektrisana, tako da se povećava verovatnoća da katjonski nanomaterijali intereaguju sa genetičkim materijalom.

Površinski hemizam može da se modifikuje dodavanjem biomolekula kao što su peptidi, međutim te modifikacije utiču i na toksikološki profil nanomaterijala. Kvantne tačke sa različitim površinskim modifikacijama imaju veću citotoksičnost zbog uticaja funkcionalnih grupa pri čemu “oblaganje” funkcionalnim grupama rezultira najvećom toksičnošću. Karboksilne grupe imaju mali uticaj na ćelijsku vijabilnost kvantnih tačaka (Clift i sar., 2008). Površinsko naelektrisanje i hemizam prema tome imaju značaj ne samo u usvajanju nanomaterijala u ćelije, nego i u predviđanju njihove interakcije sa biomolekulima.

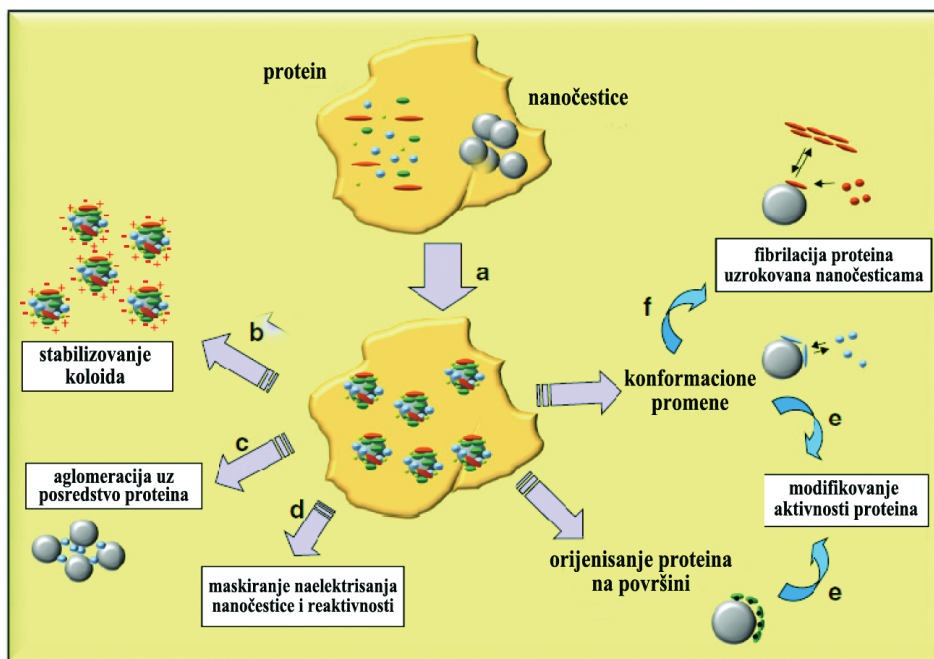
Uticaj proteina na biološki odgovor

Uticaj proteina na NČ je nesumnjivo značajan, budući da kada dođu u kontakt sa biološkim tečnostima u organizmu, NČ se brzo obaviju proteinima koji formiraju omotač, što uzrokuje pojavu složenih procesa kao što su rastvaranje, taloženje, rekonstrukcija površine, adsorpcija jona, malih molekula i makromolekula kao i redoks reakcija (Nel i sar., 2009). Formiranje proteinskog omotača NČ zavisi od: termodinamskih i kinetičkih faktora, stabilnosti adukata NČ-protein, koncentracije proteina u medijumu, naelektrisanja NČ i površine proteina, hemijske prirode i reaktivnosti NČ, koncentracije NČ i temperature (Walczyk i sar., 2010).

Proteini mogu delimično ili kompletno obaviti nanočestice, što u telesnim tečnostima dovodi do promena u pogledu reaktivnosti, naelektrisanja i hidrofobnosti NČ (Fubini i sar., 2010). Proteinski omotač može i da se menja tokom prelaska nanočestica iz jednog organa u drugi (Lynch i sar., 2007) i da utiče na interakciju ćelija sa NČ, jer ćelije bolje prepoznaju NČ obuhvaćene proteinima nego površinu same NČ. Na formiranje proteinskog omotača snažno utiče priroda, veličina i oblik NČ, kao i sastav medijuma (Walczyk i sar., 2010). Kod dužeg zadržavanja NČ u organizmu, može doći i do degradacije proteinskog omotača (Singh i Nalwa, 2009).

Prema tome, interakcija NČ sa proteinima iz fizioloških tečnosti predstavlja kritičan korak koji može da utiče na biodistribuciju, toksičnost i/ili efikasnost NČ (Khandoga i sar., 2010). Proteini mogu doprineti i pojavi štetnih efekata koji potiču od reakcija imunog sistema, a vezani su za usvajanje NČ od strane makrofaga i eliminaciju NČ (Karmali i Simberg, 2011). Naime, kada se proteini adsorbuju na površinu NČ, receptori uključeni u inflamatorne procese mogu u većoj meri biti izloženi NČ (Deng i sar., 2011). U isto vreme NČ mogu povećati antigenost slabih antigena služeći kao adjuvanti (Zolnik i sar., 2010).

Raznolikost osobina kompleksa protein-NČ, ogleda se i u tome da svaki protein može da ispoljava specifične karakteristike (Norde i sar., 2008). Različitost tkiva i ćelijskog sastava bioloških tečnosti dovode do velikih razlika u njihovom hemijskom sastavu, jonskoj snazi i kiselosti (PlumLee i sar., 2006).



Slika 10. Događaji koji mogu nastati kao posledica adsorpcije proteina na nanočestice
 a) formiranje proteinskog omotača, b) stabilizacija rastvora NČ, c) aglomeracija uz uticaj proteina, d) maskiranje naelektrisanja i reaktivnosti same NČ, e) modifikacije aktivnosti proteina, f) fibrilacija proteina uzrokovana nanočesticama (Fenoglio i sar., 2011).

Smatra se da male koncentracije proteina (najčešće albumina u finalnoj koncentraciji manjoj od 1%) ukoliko su prisutne u medijumu pre dodavanja NČ utiču na disperziju i stabilnost čestica (Stone i sar., 2009).

Prisustvo proteina iz seruma pored stabilizovanja rastvora može takođe i da inhibira reakcije nanočestica sa biomolekulima kao i da utiče na stvaranje slobodnih radikala. Kada se kvarcna prašina, koja može da generiše slobodne radikale, preinkubira sa rastvorom goveđeg serum albumina, dolazi do oblaganja reaktivnih mesta na proteinskim molekulima. Međutim, nakon uklanjanja serumskog albumina, sposobnost za generisanje slobodnih radikala se ponovo uspostavlja. Degradaciju proteinskog omotača NČ mogu uzrokovati proteinaze iz ćelije i na taj način povratiti originalnu reaktivnost prašine (Fenoglio i sar., 2003).

Adsorbicija proteina u gotovo prirodnim uslovima može se utvrditi mikroskopijom atomskih sila (AFM) kao i transmisijom mikroskopijom (TEM), metodama koje se i inače koriste za evaluaciju fizičko-hemijskih karakteristika NČ.

Testovi za analizu genotoksičnosti nanočestica

Testovima za ispitivanje genotoksičnosti utvrđuje se aneugeni odnosno klastogeni potencijal ispitivanih supstanci a takođe se može utvrditi i eventualno prisustvo mutacija na nivou gena i hromozoma. Ovi testovi su visoko senzitivni i specifični te pružaju podatke ne samo o stepenu rizika u odnosu na ispitivanu supstancu nego i o mehanizmima uključenim u kancerogenezu.

Nanočestice predstavljaju specifičnu grupu supstanci čije je ponašanje u pogledu genotoksičnosti u velikoj meri različito u odnosu na hemijske supstance. Osnovna razlika je u tome što nanočestice zahvaljujući specifičnim fizičko-hemijskim svojstvima mogu da izazovu zapaljensku reakciju, odnosno transkripcionu aktivnost gena uključenih u inflamatorne i proliferativne procese i na taj način preko ROS indukuju oštećenje DNK (Schins i Donaldson, 2000).

U analizi genotoksičnosti nanočestica primenjuju se:

1. Testovi na ćelijskim sistemima,
2. *In vitro* testovi na: bakterijskim lancima, sveže izolovanim ćelijama ili različitim ćelijskim linijama,
3. *In vivo* studije, na eksperimentalnim životinjama (miševima ili pacovima) i analize biomarkera na ljudskoj populaciji profesionalno izloženoj nanomaterijalima (Shins i sar., 2002).

Testovi na ćelijskim sistemima vrše se na izolovanoj DNK i predstavljaju najlakši put za testiranje da li je neka NČ genotoksična ili nije. Teoretski, bilo koja promena na DNK uzrokovana prisustvom NČ može da se testira onoliko dugo koliko je to detektabilno biohemijskim ili imunološkim metodama. Testovima na ćelijskim modelima analiziraju se prekidi na DNK, konformacione promene DNK, kao i oksidacija DNK baza. S obzirom na to da se NČ u ćelijskim sistemima nalaze u

koncentracijama i eksperimentalnim uslovima koji su različiti od fizioloških uslova, značaj aćelijskih testova u ispitivanju rizika za ljudsku populaciju je relativno nizak.

I pored toga, te studije pomažu u razjašnjavanju mehanizama za koje se veruje da igraju ulogu u genotoksičnosti ćestica. Takođe, odlikuju se jednostavnošću izvođenja, zbog čega se koriste za inicijalni i brzi skrining novih NČ. Naročito se pažnja mora obratiti na pojavu mogućih artefakta u NČ, zbog ekspremne osetljivosti izolovane DNK na oštećenja.

***In vitro* testovi** genotoksičnosti pružaju informacije u vezi sa mehanizmima putem kojih NČ mogu izazvati primarnu genotoksičnost. Naime, za razliku od *in vivo* studija, genotoksičnost NČ u *in vitro* modelima nije izazvana sekundarnim, na primer inflamatornim efektima. U ovu grupu testova spadaju klasićni testovi za ispitivanje oštećenosti hromozoma kao što su: *Salmonella typhimurium*- test reverznih mutacija (engl. *reverse mutation assay*), test komete (engl. *alkaline single-cell gel electrophoresis/ Comet assay*), formiranje 8-hidroksideoksoguanozina (8-OHdG), test hromozomskih aberacija i test mikronukleusa (IARC, 1997). Testovi ispitivanja genotoksičnosti *in vitro* izvode se na epitelijalnim, mezotelijalnim i fibroblastnim ćelijskim linijama glodara ili humanog porekla, odnosno na limfocitima, leukocitima ili makrofagima *ex vivo*.

U ***in vivo* studijama genotoksičnosti** NČ prate se biomarkeri izloženosti najčešće u grupama profesionalno izloženih lica. Analiziraju se hromozomske aberacije iz limfocita krvi ili iz kostne srži, a takođe i na specifićnim ćelijama respiratornog trakta odnosno tkiva pluća. Neophodno je obratiti pažnju na koizloženost drugim mutagenima/kancerogenima usled životnog stila (na primer pušenje, ishrana) kao i na individualnu istoriju neprofesionalne izloženosti drugim genotoksićnim agensima (zraćenje, ozon, lekovi). S obzirom na činjenicu da se biomarkeri za oštećenje DNK prate iz periferne krvi, treba imati u vidu da je veća verovatnoća da NČ utiću direktno na DNK u respiratornom traktu nego na ćelijske elemente krvi. Takođe, biomarkerima oštećenja DNK može se otkriti i prisustvo slabih inflamatornih procesa u plućima izloženim NČ odnosno izmenjen antioksidativni status, usled hronićne ekspozicije NČ i/ili ranim (preklinićkim) procesima bolesti (Schins i Borm, 1999).

U *in vivo* studijama na eksperimentalnim životinjama, nakon izloženosti relativno visokim koncentracijama NČ, pojava tumora se tumači povećanim formiranjem ROS od strane inflamatornih ćelija. Međutim, nemoguće je utvrditi u kojoj meri je oštećenje DNK posledica direktnog efekta NČ (primarna genotoksičnost) odnosno sekundarnog inflamatornog odgovora.

Ames-ov test (bakterijski test reverznih mutacija) se upotrebljava u ispitivanju mutagenog potencijala test supstanci. Koriste se sojevi bakterija *Salmonella typhimurium* od kojih svaki soj nosi različitu mutaciju u genima odgovornim za sintezu aminokiseline histidina, neophodne za rast ćelija. Supstanca, čija se genotoksičnost ispituje, dodaje se na agar ploče, a zatim se nanose bakterije u medijum sa minimalnom količinom histidina. Smatra se da test supstanca ima mutageni potencijal ukoliko je sposobna da uzrokuje mutacije (reverzne) koje omogućavaju bakteriji da povрати sposobnost sinteze histidina. Učestalost formiranja kolonija proporcionalna je učestalosti mutacija indukovanih test supstancom pri datoj koncentraciji. Nedostatak Ames-ovog testa jeste u tome što se rezultat genotoksičnosti ispitivane supstance ne može ekstrapolirati sa prokariota na eukariote, jer postoji mogućnost da test pruža i lažno pozitivne rezultate (Khandoudi i sar., 2009). Naime, neke NČ ne mogu da prođu kroz ćelijski zid bakterija a takođe neki nano materijali deluju baktericidno (Landsiedel i sar., 2009).

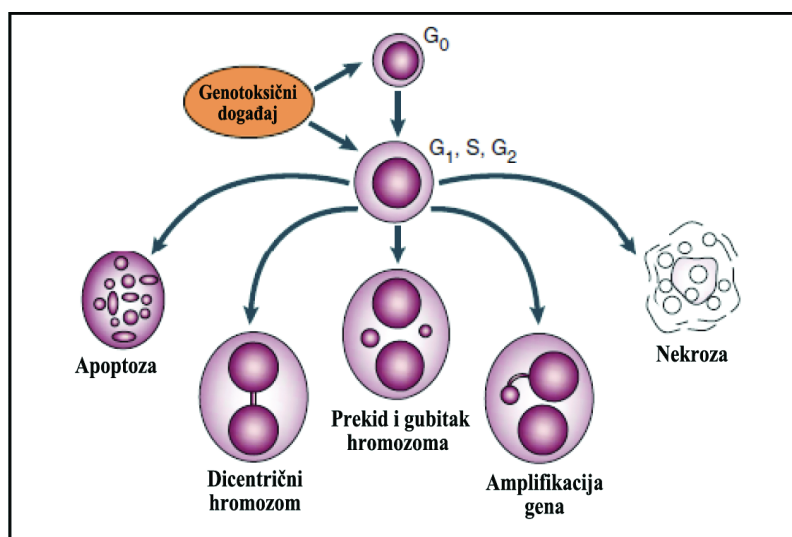
Test komete (engl. *Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) predstavlja jednostavnu, ekonomski prihvatljivu i osetljivu tehniku za testiranje oštećenja DNK. Tehniku je prvi put opisao Singh 1988 (Singh i sar., 1988) i od tada ona postaje standardni test u ispitivanju oštećenja DNK. Uzorci ćelija iz *in vitro* i *in vivo* eksperimenata se prvo nanesu u slabo rastvorljivu agarozu a zatim na mikroskopsku pločicu. Nakon toga se ćelije liziraju, a DNK se pušta kroz proces elektroforeze kako bi se razdvojili lanci DNK na osnovu njihove molekulske težine. DNK se nakon toga boji na primer SYBR zelenom bojom i analizira pod fluorescentnim mikroskopom. Prednost testa komete leži u mogućnosti razlikovanja jednolančanih od dvolančanih prekida DNK. To je brz način procene DNK lezija i time i mere genotoksičnosti ispitivane supstance u pojedinačnim eukariotskim ćelijama.

Analiza 8 - hidroksideoksiguanozin lezija (8-OHdG) (engl. *8 - Hydroxy-Deoxyguanosine*): Smatra se da oksidativni stres predstavlja jedan od primarnih uzroka oštećenja DNK. ROS koje nastaju u ćelijama, mogu da oštete DNK bazu guanin i tako formiraju 8-OHdG lezije. Ove DNK lezije imaju mutageni potencijal, zbog čega se koriste kao biomarker kancerogeneze (Karihtala i sar., 2009). Merenje 8-OHdG lezija moguće je na nekoliko načina, među kojima se izdvaja tečna hromatografija visokih performansi - HPLC (engl. *high-performance liquid chromatography*-), uz koju se može uključiti i masena spektrometrija, što je poznato kao HPLC-MS. Druge metode uključuju korištenje proba za DNK reparacione proteine ili posttretman sa enzimom formamidopirimidinom DNA N-glikozilaza (Valavanidis i sar., 2009).

Test mikronukleusa

In vitro test mikronukleusa (CBMN) (engl. *Cytochalasin B Micronucleus test*) je senzitivni test koji se koristi za kvantifikaciju i klasifikaciju hromozomskih oštećenja u skriningu potencijalne genotoksičnosti NČ (Gonzales i sar., 2011) Mikronukleusi su hromatinska telašca koja se formiraju tokom anafaze. Potiču od hromozomskih fragmenata ili celih hromozoma koji zaostaju nakon deobe ćelija. Da bi se mikronukleusi mogli uočiti u citoplazmi, koristi se Cytochalasin-B (Cyt-B), inhibitor polimerizacije aktina, koji zaustavlja deobu ćelija u fazi citokineze odnosno na nivou binukleusnih ćelija. To omogućava razlikovanje ćelija koje su prošle jednu deobu u odnosu na ćelije koje nisu prošle deobu ili su prošle kroz dve deobe. CBMN testom se mogu pratiti sledeće promene na hromozomima: hromozomski prekidi, dicentrični hromozomi, gubitak hromozoma, nerazdvajanje hromozoma, amplifikacija gena, nekroza, apoptoza i citostatski efekat (slika 11.). Naime, postoji mogućnost da se utvrdi da li MN nastaju kao rezultat klastogene (fragmentacija hromozoma) ili aneugene aktivnosti (gubitak celih hromozoma) ispitivane supstance. Ovo se postiže bojenjem kinetohora, proteinskih struktura koje se formiraju na centromerama svih hromozoma, zahvaljujući čemu se može utvrditi sadržaj mikronukleusa. MN koji se boje pozitivno na kinetohore ukazuju na aneugeni efekat ispitivane supstance, za razliku od MN koji se boje negativno i koji predstavljaju posledicu klastogenog dejstva. Zatim, nukleoplazmatski mostovi predstavljaju biomarker hromozomskih rearanžmana odnosno pojave dicentričnih hromozoma, ali takođe i greške u DNK reparaciji. Jedarni pupoljci su manifestacija amplifikacije gena kao i DNK reparacije (Fenech, 2007).

Citostatski efekti test supstanci mere se na osnovu proporcije mono-, bi- i polinukleusnih ćelija, dok se citotoksičan efekat meri preko pojave i broja nekrotičnih i apoptotičnih ćelija. Osim relativno jednostavnog izvođenja testa kao i prebrojavanja mikronukleusa, najveća prednost CBMN testa je u tome što se njegovom upotrebom mogu utvrditi i genske i hromozomske promene (Stone i sar., 2009).



Slika 11. CBMN testom se mogu analizirati: hromozomski prekidi i gubici celih hromozoma, dicentrični hromozomi, genske amplifikacije, apoptoza i nekroza (Fenech, 2007)

Test hromozomskih aberacija

Testom hromozomskih aberacija se utvrđuje pojava strukturnih promena hromozoma koje su indukovane ispitivanom supstancom. Test se može primeniti na sistemima *in vitro* i *in vivo* kao i *ex vivo* na kulturi sisarskih ćelija. Kada se primenjuje *in vitro*, ćelijska kultura se tretira test supstancom, nakon čega se deoba zaustavlja dodavanjem kolcemida. Uloga kolcemida je da spreči formiranje deobnog vretena vršeći depolimerizaciju mikrotubula. To omogućava nakupljanje hromozoma u metafazi, tokom koje se na hromozomima jasno uočavaju po dve hromatide.

U *in vivo* verziji testa hromozomskih aberacija, eksperimentalne životinje (najčešće pacovi) se tretiraju test supstancom, nakon čega se, primenom kolcemida, zaustavlja ćelijska deoba u metafazi. Preparati sa metafaznim hromozomima se tada prave iz kostne srži. Iako je test hromozomskih aberacija zahtevan test koji podrazumeva

dovoljno iskustvo citogenetičara, on se rutinski koristi u skriningu potencijalne genotoksičnosti različitih supstanci.

Tip hromozomskih aberacija koje su indukovane test supstancom, zavisi od faze ćelijskog ciklusa u kojoj supstanca deluje. Ukoliko supstanca deluje u prereplikativnoj fazi ćelijskog ciklusa, nastaju aberacije hromozomskog tipa, za razliku od aberacija hromatidnog tipa, koje se javljaju nakon dejstva supstance u postreplikativnoj fazi ćelijskog ciklusa.

Prema Savage, u hromatidni tip hromozomskih aberacija svrstavaju se: hromatidne praznine (engl. *gaps*) i hromatidni prekidi, dok se u hromozomski tip aberacija svrstavaju: hromozomske praznine (engl. *gaps*), hromozomski prekidi, acentrični hromozomi, dicentrični hromozomi i ring hromozomi (Savage, 1975).

CILJ RADA I RADNA HIPOTEZA

Ciljevi istraživanja

- Ispitati fizičko-hemijska svojstva nanočestice fulerenola u vodi DLS metodom, AFM i TEM mikroskopijom. Prikazati fizičko-hemijska svojstva nanočestica proteina u RPMI 1640 sa FCS, metodom DSL i AFM mikroskopije.

-DLS metodom utvrditi raspodelu nanočestica fulerenola u vodi i medijumima za ćelijsku kulturu RPMI 1640 sa 10% i 20% FCS, kao i nanočestica proteina u RPMI 1640 sa 20% FCS,

-AFM mikroskopijom analizirati strukturu nanočestice fulerenola u vodi i medijumima za ćelijske kulture RPMI 1640 sa 15% i 20% FCS, koji se koriste za kultivaciju ćelijskih kultura u testu mikronukleusa i testu hromozomskih aberacija, kao i nanočestica proteina u RPMI 1640 sa 20% FCS.

-TEM mikroskopijom potvrditi strukturu nanočestice fulerenola u vodi

- Na CHO-K1 ćelijskoj liniji ispitati genotoksičan odnosno antigenotoksičan efekat fulerenola:

-Na osnovu vrednosti IC50 odabrati tri subcitotoksične koncentracije fulerenola i ispitati njegovu genotoksičnost tokom 3h i 24h tretmana testovima mikronukleusa i hromozomskih aberacija

-Na MMC tretiranoj CHO-K1 ćelijskoj liniji ispitati antigenotoksičnost fulerenola tokom 3h i 24h tretmana testovima mikronukleusa i hromozomskih aberacija

- Na kulturi humanih limfocita ispitati genotoksičan odnosno antigenotoksičan efekat fulerenola:

-Na osnovu vrednosti IC50 odabrati tri subcitotoksične koncentracije fulerenola i ispitati njegovu genotoksičnost tokom G0, G1/S i G1/S/G2/M faza ćelijskog ciklusa testovima mikronukleusa i hromozomskih aberacija

-Na MMC tretiranoj kulturi humanih limfocita ispitati antigenotoksičnost fulerenola tokom G0, G1/S i G1/S/G2/M faza ćelijskog ciklusa testovima mikronukleusa i hromozomskih aberacija.

Radna hipoteza

Budući da se ispitivanja genotoksičnosti vrše pri subcitotoksičnim koncentracijama supstanci, kao i da fulerenol pokazuje antioksidativna svojstva pri nižim koncentracijama, pretpostavlja se da će analizama u ovom radu biti utvrđeno odsustvo genotoksičnosti fulerenola, odnosno posedovanje antigenotoksičnog potencijala na modelima sisarskih ćelijskih kultura.

MATERIJAL I METODE

Fulerenol –sinteza

Fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ je sintetisan potpunom zamenom atoma broma iz polibromnog derivata $C_{60}Br_{24}$ u alkalnoj sredini (Đorđević i sar., 1998).

Polibromski derivat $C_{60}Br_{24}$ je sintetisan u katalitičkoj ($FeBr_3$) reakciji C_{60} u Br. 50 mg $C_{60}Br_{24}$ je pomešano sa 5 mL NaOH (pH 10) tokom 2h na sobnoj temperaturi. Po završetku reakcije, rastvarač je uparen na $40^\circ C$ i smeša je isprana 5 puta sa 10 mL 80% etanola. 20 mL vodenog rastvora fulerenola sa rezidualnom količinom NaOH i NaBr je postavljeno na vrh kombinovane jono-izmenjivačke smole DOWEX MB50 QC121815 R1 (20 g) i razdvojeno sa demineralizovanom vodom do obezbojavanja. Rastvor fulerenola (pH 7) je uparen pod niskim pritiskom tako da se izdvojila tamno smeđa praškasta supstanca.

Infracrveni spektar fulerenola ima karakteristične trake na: 3430 cm^{-1} -OH, 1400 cm^{-1} , 1070 cm^{-1} potiču od C-O veze, 1600 cm^{-1} od C=C. Vodeni rastvor fulerenola u vidljivoj oblasti ima maksimum na 257 nm. 1H NMR (d_6 -DMSO) s. $\delta=3.35$ ppm, (D_2O) s. $\delta=3.10$ ppm, ^{13}C NMR(D_2O) s. $\delta=169.47$ ppm, široki pik $\delta=110-160$ ppm. MALDI (matrix -cyano- 4-hydroxycinnamic acid) (m/z): 720 (C_{60}^+), 721 ($C_{60}H^+$), 722 ($C_{60}H_2^+$), 737 ($C_{60}(OH)^+$), 808 ($C_{60}(OH)_5^+$), 839 ($C_{60}(OH)_7^+$), 856 ($C_{60}(OH)_8^+$), 1009 ($C_{60}(OH)_{17}^+$), 1026 ($C_{60}(OH)_{18}^+$) i manji pik 1128 ($C_{60}(OH)_{24}^+$). U vidljivoj oblasti vodeni rastvor fulerenola ima maksimum na 257 nm. Termičkim analizama (DTG, DTA, TG) se mogu uočiti dve promene, na temperaturnom intervalu $120-395^\circ C$, gubitak mase od 35,7% , što odgovara 23,7 OH grupa i na temperaturnom intervalu od $430^\circ C$ sa gubitkom mase od 64,3%, što odgovara temperaturi sublimacije C_{60} . Elementarnom analizom su dobijene sledeće vrednosti: C, 63,0%; H, 2,0% dok su izračunate vrednosti , C, 63,83%; H, 2,13%.

Za sve eksperimente fulerenol ($M=1128$ g/mol) je rastvoren u destilovanoj vodi u koncentraciji od 10mg/mL (“štok” rastvor) koji je dalje rastvaran sa RPMI 1640 medijumom (Sigma) u cilju dobijanja serije “radnih” rastvora.

Mitomycin C- priprema

Mitomycin C (MMC) (Bristol-Myers Squibb, USA) je pripremljen rastvaranjem praškaste supstance u fosfatnom puferu (PBS). Primenjene su sledeće koncentracije MMC: 0.15, 0.3, 0.6, 0.9 i 1.5 nM tokom 3h i 24h tretmana na CHO-K1 ćelijama kao i na kulturi humanih limfocita tokom G0, G1/S i G1/S/G2 faze ćelijskog ciklusa.

Fizičko-hemijska karakterizacija

DLS - Dinamičko rasipanje svetlosti (engl. *Dynamic Light scattering*)

Metodom dinamičkog rasipanja svetlosti (DLS) analizirana je raspodela nanočestica fulerenola u vodi i u medijumima za ćelijsku kulturu RPMI 1640 sa 10% i 20% FCS pri koncentraciji fulerenola od 0,05 mg/mL (44,3 μ M) na sobnoj temperaturi. Takođe je analizirana i raspodela nanočestica proteina u RPMI 1640 sa 20% FCS. Merenja su izvršena na aparatu Zetasizer Nano ZS, Malvern.

AFM - Mikroskopija atomskih sila (engl. *Atomic Force Microscopy*)

AFM metodom je analiziran rastvor fulerenola u vodi, kao i u medijumima za ćelijske kulture RPMI 1640 sa 15% i 20% FCS. Takođe je analizirana i struktura nanočestica proteina u RPMI 1640 sa 20% FCS. AFmikroskopija je izvršena nakon 24h inkubacije rastvora na 37⁰C, odnosno u istim uslovima kao i u eksperimentima ispitivanja genotoksičnosti fulerenola.

Merenje AFM-om je izvršeno na aparatu Multimode quadrex SPM sa Nanoscope IIIe kontrolorom (Veeco Instruments, Inc.). Vrh konzole ima radijus manji od 10 nm i „lupka“ po ispitivanoj površini. Podloga na kojoj se nalazi uzorak je grafen tj. visoko orijentisani pirolitički grafit (HOPG- Highly Orientated Pirolydin Grafit). Merenjem se dobija topografija površine uzorka u ambijentalnim uslovima.

TEM - Transmisiona elektronska mikroskopija (engl. *Transmission Electron Microscope*)

Transmisionom elektronskom mikroskopijom je analiziran rastvor fulerenola u vodi. TEM mikroskop stvara sliku pomoću visoko voltažnog snopa elektrona. Taj snop se emituje sa katode, ubrzava ga anoda, a njegovo fokusiranje se postiže elektrostatičkim poljem. Snop elektrona prolazi kroz preparat. S obzirom na činjenicu da je talasna dužina elektrona znatno manja od talasne dužine fotona vidljive svetlosti, moć razlučivanja kod TEM je daleko veća nego kod svetlosnog mikroskopa tako da su nanočestice “vidljivije”. TEM je izvršen upotrebom aparata EDXS JEM-2100.

Ćelijske kulture

U radu su korišćena dva tipa ćelijskih kultura:

Ćelijska kultura ovarijuma kineskog hrčka *Critelus griseus* (CHO-K1): Prema podacima iz Kolekcije kultura Američkih uzoraka (ATCC,1988.), ćelije CHO-K1 su dobijene kao subklon iz roditeljske CHO ćelijske linije, inicirane iz biopsije ovarijuma odraslog kineskog hrčka. Ćelije nemaju aktivne gene potrebne za sintezu aminokiseline prolina. Vijabilnost ćelija je u proseku oko 90%. Morfološki su ćelije slične epitelnim ćelijama. Modalni broj hromozoma, koji predstavlja najčešći broj hromozoma u ćelijskoj populaciji, je 20.

Ćelijska kultura humanih limfocita periferne krvi: Za ćelijsku kulturu limfocita periferne krvi čoveka materijal je dobijen punkcijom iz vene *cubitalis* od 33-godišnje zdrave ženske osobe, kariotipa 46XX, nepušača, koja tokom prethodnih 6 meseci nije bila posebno izložena niti jednom poznatom hemijskom ili fizičkom agensu.

Oba tipa ćelijskih kultura su održavana u inkubatoru (HERAEUS) na 37°C, u atmosferi sa 100% vlažnosti i 5% CO₂.

Priprema ćelijske kulture CHO-K1 ovarijuma kineskog hrčka

Ćelije ovarijuma kineskog hrčka CHO-K1 su rasle zalepljene za podlogu kao jedan sloj ćelija (engl. *monolayer*). Uzgajane su u flaskovima od 25cm² (Costar, USA) u 10 mL RPMI 1640 (Sigma, USA) medijuma, obogaćenog sa 2 mM l-glutamina, 10% fetalnog telećeg seruma (FCS)(Veterinarski Institut Novi Sad, Srbija), 100 IU/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina. Presađivane su dva puta nedeljno u koncentraciji od 50000 ćelija/mL. Suspenzija ćelija je dobijana dodavanjem 0.25% tripsina i 0.05% EDTA u ćelijsku kulturu tokom 3 minute, a alikvot ćelija je korišćen za presađivanje u novu kulturu. U eksperimentima su CHO-K1 ćelije sađene u ploče sa 6 otvora (engl. *well*) (Costar, USA), u 5mL RPMI 1640 medijuma, obogaćenog sa 2 mM l-glutamina, 10% fetalnog telećeg seruma (FCS), 100 IU/mL penicilina i 100 µg/mL streptomicina.

Priprema ćelijske kulture humanih limfocita

Ćelijske kulture humanih limfocita su bile postavljane u sterilne staklene penicilinske bočice od 10 cm³. Zasađivano je 0.45 mL heparinizirane krvi u 5 mL medijuma RPMI 1640 obogaćenog sa 20% FCS za test hromozomskih aberacija, odnosno sa 15% FCS za test mikronukleusa, 2% fitohemaglutininom (PHA) (PAA Laboratories (GmbH) i antibioticima (100 IU/mL penicilina i 100µg/mL streptomicina). Ćelijske kulture su postavljane u triplikatu za svaki eksperimentalni tretman po koncentraciji.

Ćelijska vijabilnost i IC₅₀

Ćelijska vijabilnost je određivana prema metodi Bogdanović i sar. (1994).

Za utvrđivanje broja ćelija i njihove vijabilnosti korišćen je test odbacivanja boje *Due exclusion test* (DET) - sa 0,1% tripan plavim. Tripan plavo (Sigma, USA) je boja koja ulazi u ćeliju ukoliko je narušen integritet ćelijske membrane, tako da se mrtve ćelije boje u plavo. Na ovaj način moguće je razlikovati žive od mrtvih ćelija. 50 µL ćelijske suspenzije CHO-K1 odnosno pune krvi je razblaženo sa 200 µL 0,5 % rastvora tripan plavog u fiziološkom rastvoru 0.9% NaCl. Nakon 2 minute inkubacije na sobnoj

temperaturi, određen je broj mrtvih i živih ćelija korišćenjem Burker–Turk-ovog hemocitometra (Black i Berenbaum, 1964) na invertnom mikroskopu.

- Broj ćelija u 1 mL suspenzije izračunat je prema sledećoj formuli, uzimajući u obzir dimenzije komore i razblaženje:

$$N = N_0 \times 10^4 \times 5$$

gde je N ukupan broj živih ćelija u 1 mL suspenzije, N_0 je prosečan broj živih ćelija izbrojan po kvadratu komore hemocitometra, 10^4 je korekcionni faktor a 5 je faktor razblaženja.

- Procenat vijabilnosti ćelija je izračunat prema sledećoj formuli:

$$\text{Vijabilnost ćelija (\%)} = (\text{Ukupan broj vijabilnih ćelija} / \text{Ukupan broj ćelija}) \times 100$$

Na osnovu podataka o preživljavanju ćelija, izračunat je

- Procenat preživelih ćelija, utvrđen prema formuli:

% Preživelih ćelija = (Prosečan br. živih ćelija analiziranog uzorka / Prosečan br. živih ćelija kontrolnog uzorka) x 100

- Procenat citotoksičnosti fulerenola, izračunat prema formuli:

100 - (Prosečan br. živih ćelija analiziranog uzorka / Prosečan br. živih ćelija kontrolnog uzorka x 100)

Nakon toga je utvrđena vrednost IC_{50} koja predstavlja onu koncentraciju fulerenola koja indukuje 50% ćelijske smrti. U eksperimentima su korišćene subcitotoksične koncentracije fulerenola, tako da najviša koncentracija iznosi 50% , srednja 25%, a najniža 12.5% od vrednosti IC_{50} .

Određivanje IC_{50} za fulerenol u CHO-K1 ćelijskoj kulturi

U ćelijsku kulturu CHO-K1 je dodat fulerenol u sledećim finalnim koncentracijama :

8.86, 44.3, 88.6, 221.6 i 443.2 μ M. Čelije su tretirane supstancom tokom 3h i 24h. U 3h tretmanu, fulerenol je dodat nakon 24h od zasađivanja kulture, dok je u 24h tretmanu, fulerenol dodat odmah po postavljanju ćelijske kulture. Po završetku inkubacionog perioda, utvrđen je broj ćelija u 1 mL suspenzije, procenat vijabilnosti ćelija, procenat citotoksičnosti i IC₅₀ vrednost za svaki eksperimentalni tretman.

Određivanje IC₅₀ za fulerenol u kulturi humanih limfocita

Fulerenol je dodat u kulturu humane krvi u sledećim finalnim koncentracijama: 8.86, 44.3, 88.6, 221.6 i 443.2 μ M.

Za G0 fazu ćelijskog ciklusa, tretman supstancom je počeo odmah po postavljanju kulture ćelija i trajao je 24 h. Za G1/S fazu ćelijskog ciklusa, fulerenol je dodat u 20h nakon iniciranja deobe mitogenom (PHA) i trajao je 24h. Za G1/S/G2/M fazu ćelijskog ciklusa ćelije se tretirane fulerenolom nakon 44h od iniciranja deobe mitogenom, i trajao je 4h.

Ćelijska kultura limfocita je inkubirana ukupno 48h što je odgovaralo eksperimentalnim uslovima za test hromozomskih aberacija odnosno 72h, koliko se ćelije inkubiraju u testu mikronukleusa. Nakon isteka inkubacionog perioda utvrđen je broj ćelija u 1 mL suspenzije, procenat vijabilnosti ćelija, procenat citotoksičnosti kao i vrednost IC₅₀.

Test mikronukleusa

Test mikronukleusa je urađen prema proceduri IEAE (IAEA, 2001) uz modifikaciju u pogledu bojenja preparata.

Ćelijske kulture su postavljene u 5 mL medijuma RPMI-1640 (SIGMA) obogaćenog sa: 10% FCS za CHO-K1 ćelijsku kulturu, odnosno 15% FCS za kulturu humanih limfocita, 2 mM glutamina i antibioticima (100 IU/mL penicilina i 100 μ g/mL streptomicina) i PHA u finalnoj koncentraciji od 2 μ g/mL (samo za kulturu humanih limfocita). Citohalazin B (Cytochalasin-B, Sigma) je dodat u ćelijske kulture u finalnoj koncentraciji od 6 μ g/mL. Njegova uloga je da zaustavlja citokinezu u svim ćelijama

koje su prošle prvu jedarnu deobu, što se manifestuje pojavom binukleusnih ćelija. Ćelijske kulture su inkubirane na 37°C, u atmosferi sa 100% vlažnosti i 5% CO₂.

Obrada ćelijskih kultura je započinjala centrifugiranjem ćelijske suspenzije (5 min/1200 obrtaja) i odlivanjem supernatanta. Zatim je dodat hladni hipotonični rastvor (4°C) 0,075 M KCL, nakon čega je ćelijska suspenzija odmah centrifugirana (8min/1200 obrtaja), a supernatant odliven. Materijal je fiksiran metanol : sirćetnom kiselinom (3:1) sa 1% formaldehidom, a zatim centrifugiran (8min/1100 obrtaja) i ispran fiksativom bez formaldehida još dva puta. Preparati su pravljeni nanošenjem ćelijske suspenzije na suve mikroskopske pločice. Modifikacija metode se odnosi na bojenje preparata koje je izvršeno 2 % Giems-om u destilovanoj vodi tokom 9 minuta, uz dodatak tri kapi NH₄OH.

Analizirano je najmanje 1000 binukleusnih ćelija po uzorku, a praćeni su sledeći parametri: broj mononukleusnih ćelija, broj binukleusnih ćelija, broj polinukleusnih ćelija, učestalost mikronukleusa, distribucija mikronukleusa i indeks jedarne deobe (NDI). Za identifikaciju mikronukleusa su korišćeni standardni kriterijumi.

Učestalost mikronukleusa je predstavljena brojem mikronukleusa na 1000 analiziranih binukleusnih ćelija,

NDI je računat prema formuli: $NDI = (M_1 + 2M_2 + 3(M_3 + M_4)) / N$

gde M₁-M₄ predstavlja broj ćelija sa jednim do četiri nukleusa, a N je ukupan broj analiziranih ćelija.

NDI predstavlja meru prosečnog broja ćelijskih ciklusa kroz koje je prošla populacija ćelija (Kirsh-Volders i sar., 2003).

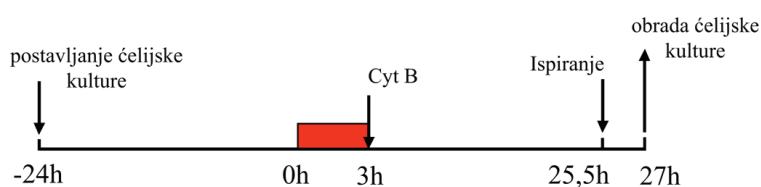
Test mikronukleusa u CHO-K1 ćelijskoj kulturi

CHO-K1 ćelije su sađene u ploče sa 6 otvora u različitoj gustini koja je zavisila od dužine tretmana odnosno od ukupnog trajanja ćelijske kulture. Za 3h tretman supstancom, zasađeno je 15×10⁴ ćelija/otvoru dok je za 24h tretman zasađeno 10×10⁴ ćelija /otvoru. Prema preporukama za testiranje genotoksičnih efekata supstanci (Fenech, 2007), ispitivana supstanca je dodata u ćelijsku kulturu nakon 24h od

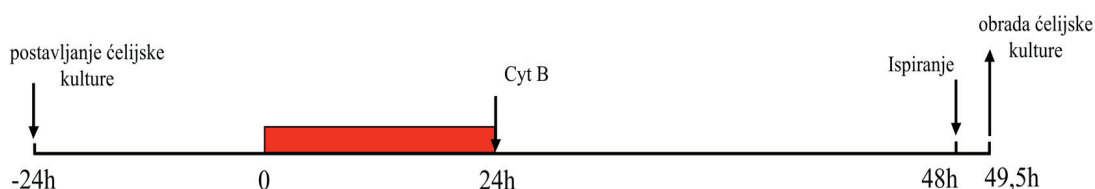
postavljanja ćelijske kulture, tako što je hranljivi medijum zamenjen svežim medijumom koji je sadržavao fulerenol i/ili MMC u različitim koncentracijama.

Za 3h tretman supstancom, fulerenol je dodat u finalnim koncentracijama od 55.4, 110.8 i 221.6 μM . U 24h tretmanu, fulerenol je dodat u finalnim koncentracijama od 27.6, 55.4 i 110.8 μM .

Nakon isteka 3h odnosno 24h tretmana ćelijske kulture supstancom, medijum je zamenjen svežim medijumom koji je sadržavao CytB, a ćelijska kultura je inkubirana još 22.5h (Shema 2. i 3.). Nakon toga je medijum zamenjen svežim, a period "oporavka" ćelija je trajao narednih 1.5h. Ćelije su odlepljene sa dna flaskona pomoću Try/EDTA, a zatim je usledila njihova obrada.



Shema 2. 3h tretman CHO-K1 testom mikronukleusa



Shema 3. 24h tretman CHO-K1 testom mikronukleusa

Test mikronukleusa u kulturi humanih limfocita

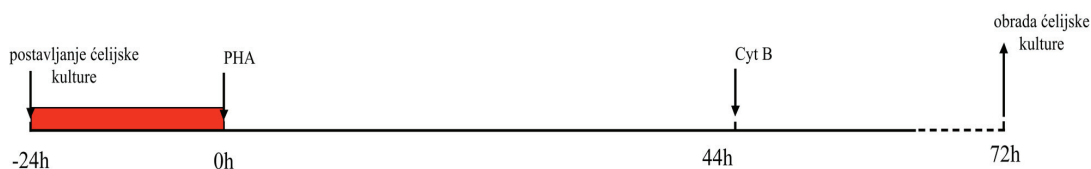
Prema preporukama za testiranje genotoksičnih supstanci na humanim limfocitima (Fenech, 2007), tretman fulerenolom i/ili MMC je izvršen u tri različite faze ćelijskog ciklusa i to G0, G1/S i G1/S/G2/M.

Za G0 fazu ćelijskog ciklusa, tretman fulerenolom i/ili MMC je usledio odmah nakon postavljanja ćelijske kulture i trajao je 24h. Fulerenol je dodat u sledećim finalnim koncentracijama: 11.08, 22.16 i 44.3 μM . Nakon 24h tretmana, medijum je zamenjen

svežim medijumom koji je sadržavao mitogen-fitohemaglutinin (PHA). CytB je dodat u 44. satu nakon stimulacije deobe i delovao je u kulturi do 72. sata, a zatim je usledila obrada materijala (Shema 4.).

Za G1/S fazu ćelijskog ciklusa, tretman fulerenolom i/ili MMC je počeo u 20. satu nakon stimulacije deobe limfocita mitogenom i trajao je 24h. Fulerenol je dodat u finalnim koncentracijama od 27.65, 55.4 i 110.8 μ M a po isteku tretmana, medijum je zamenjen svežim medijumom koji je sadržavao CytB. Kultura humanih limfocita je održavana do 72. sata kada je započela obrada materijala (Shema 5.).

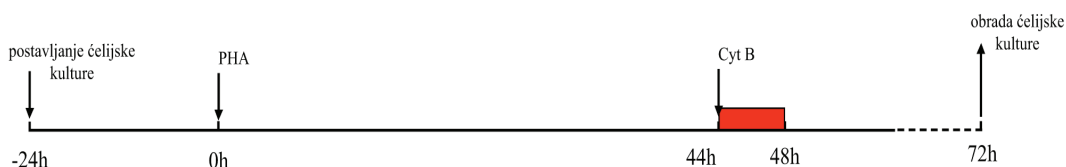
Za G1/S/G2/M fazu ćelijskog ciklusa tretman fulerenolom i/ili MMC je počeo u 44. satu nakon stimulacije deobe limfocita mitogenom, kada je dodat i CytB. Ćelije su tretirane fulerenolom u finalnim koncentracijama od 27.65, 55.4 i 110.8 μ M tokom 4h, nakon čega je medijum zamenjen svežim medijumom. Ćelijska kultura je održavana do 72h a zatim se pristupilo obradi (Shema 6.).



Shema 4. Tretman humanih limfocita u G0 fazi ćelijskog ciklusa testom mikronukleusa



Shema 5. Tretman humanih limfocita u G1/S fazi ćelijskog ciklusa testom mikronukleusa



Shema 6. Tretman humanih limfocita u G1/S/G2/M fazi ćelijskog ciklusa testom mikronukleusa

Test hromozomskih aberacija

Test hromozomskih aberacija je urađen prema standardnoj proceduri (Verma i Babu, 1995). Čelijske kulture su postavljene u 5 mL medijuma RPMI-1640 koji je sadržavao: 10% FCS za CHO-K1 čelijsku kulturu odnosno 20% FCS za kulturu humanih limfocita, 2 mM glutamina, antibiotike (100 IU/mL penicilin i 100 µg/mL streptomycin) i PHA u finalnoj koncentraciji od 2 µg/mL (samo za kulturu humanih limfocita). Čelijske kulture su inkubirane na 37°C, u atmosferi sa 100% vlažnosti i 5% CO₂. Colcemid (Colcemid solution, PAA Laboratories, GmbH) je dodat u čelijske kulture u finalnoj koncentraciji od 0.1 µg/mL da bi se zaustavila deoba ćelija.

Obrada kultura je započinjala centrifugiranjem ćelija (1500 obrtaja/10 minuta) i odlivanjem supernatanta. Čelije su zatim tretirane hipotoničnim rastvorom (0.56% KCl) tokom 35 minuta na 37°C. Nakon toga je materijal fiksiran dva puta po 15 minuta u metanol : sirćetnoj kiselini (3:1) i ispran fiksativom još dva puta. Preparati su pravljani sledećeg dana, nakon što su čelijske kulture stajale preko noći u frižideru na 2-8°C. Materijal je nanošen na hladne i vlažne mikroskopske pločice nakapavanjem, sušen 24h a zatim bojen u 2% Giemsa-i 9 minuta.

Analizirano je minimum 100 metafaza u svakoj posmatranoj tački. Hromozomske aberacije su na CHO-K1 čelijskoj liniji ovarijuma hrčka bile analizirane samo u metafazama koje su sadržavale 19-23 hromozoma (modalni broj ±2), a u kulturi humanih limfocita 46 hromozoma.

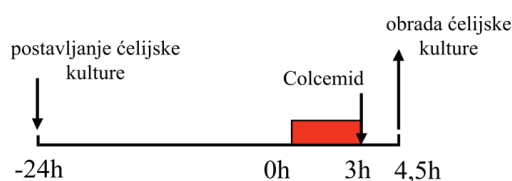
Strukturne hromozomske aberacije su prema Savage-u (Savage, 1975) kategorizovane u dve osnovne grupe: hromatidni i hromozomski tip aberacija. Od aberacija hromatidnog tipa praćeni su hromatidni prekidi i hromatidne praznine (engl. *gap*), a od aberacija hromozomskog tipa: hromozomski prekidi, hromozomske praznine (engl. *gap*), acentrični fragmenti, dicentrični hromozomi i ring hromozomi.

Test hromozomskih aberacija u CHO-K1 čelijskoj kulturi

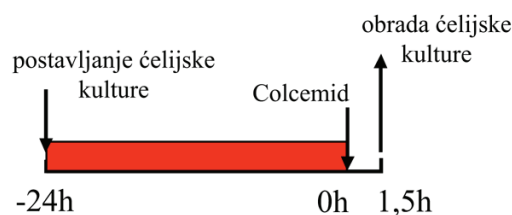
CHO-K1 ćelije su sađene u ploče sa 6 otvora (engl. *well*) u koncentraciji od 25×10^4 ćelija/otvoru. Čelijske kulture su tretirane fulerenolom i/ili MMC tokom 3h i 24h. U oba

tretmana je fulerenol ispitivan u koncentraciji od 11, 22.1 i 44.3 μ M. U 3h tretmanu, ćelije su prvo inkubirane tokom 24h a zatim je dodat fulerenol koji je delovao 3h. Nakon toga je medijum zamenjen svežim medijumom sa kolcemidom, koji je delovao narednih 1.5h do odlepljivanja ćelija sa Try/EDTA i obrade ćelijske kulture (Shema 7.).

U 24h tretmanu, fulerenol je dodat u ćelijsku kulturu odmah po sađenju ćelija i delovao je narednih 24h. Nakon toga je medijum zamenjen svežim medijumom sa kolcemidom koji je delovao narednih 1.5h do tripsinizacije i obrade kulture (Shema 8.).



Shema 7. 3h tretman CHO-K1 za test hromozomskih aberacija



Shema 8. 24h tretman CHO-K1 za test hromozomskih aberacija

Test hromozomskih aberacija u kulturi humanih limfocita

Kulture humanih limfocita bile su postavljane za tri faze ćelijskog ciklusa tokom kojih su tretirane različitim koncentracijama fulerenola i/ili MMC.

Za G0 fazu ćelijskog ciklusa, fulerenol je dodat odmah po postavljanju ćelijske kulture u koncentracijama od 5.54, 11.08 i 22.16 μ M, a dužina tretmana je bila 24h. Po završetku tretmana, medijum je zamenjen svežim medijumom sa PHA, a kultura je održavana narednih 48h (Shema 9.).

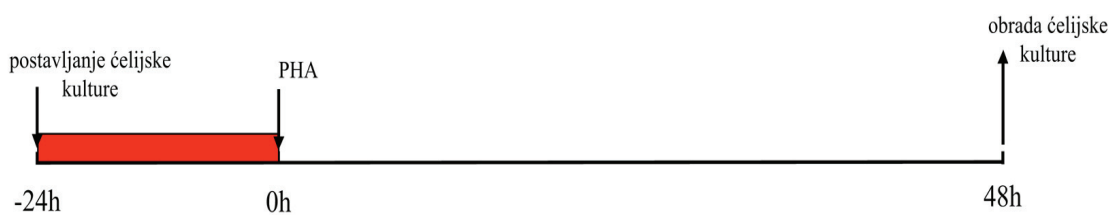
Za G1/S fazu ćelijskog ciklusa, fulerenol je dodat u kulturu u 20. satu od stimulacije deobe mitogenom, u koncentracijama od 11.08, 22.16 i 44.3 μ M a tretman je trajao 24h.

Zatim je medijum zamenjen svežim medijumom a kultura je održavana do 48h (Shema 10.) .

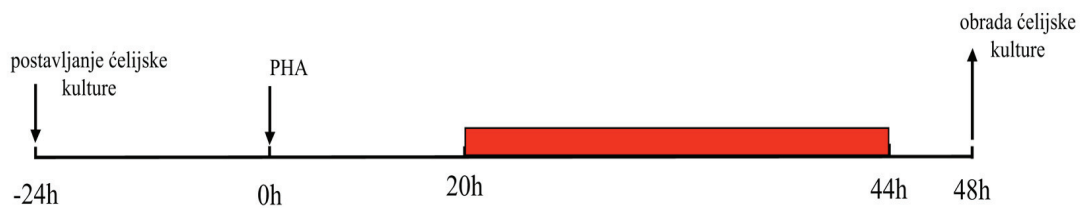
4h tretman fulerenolom za G1/S/G2/M fazu ćelijskog ciklusa započeo je u 44. satu nakon stimulacije ćelija na deobu. Fulerenol je dodat u koncentracijama od 55.4, 110.8 i 221.6 μ M. Po isteku tretmana, medijum je zamenjen svežim medijumom (Shema 11.).

Kolcemid je u svim posmatranim tačkama dodat u 48. satu i delovao narednih 1h do obrade ćelijske kulture.

Preparati su analizirani pomoću svetlosnog mikroskopa Olympus BX51.



Shema 9. Tretman humanih limfocita u G0 fazi ćelijskog ciklusa testom hromozomskih aberacija



Shema 10. Tretman humanih limfocita u G1/S fazama ćelijskog ciklusa testom hromozomskih aberacija



Shema 11. Tretman humanih limfocita u G1/S/G2/M fazama ćelijskog ciklusa testom hromozomskih aberacija

Statistička analiza

Za svaku ispitivanu koncentraciju fulerenola ili kombinacije fulerenol/MMC, analize su rađene u triplikatu.

Rezultati učestalosti mikronukleusa i hromozomskih aberacija po jednoj koncentraciji su predstavljeni kao srednja vrednost dobijena iz tri analize \pm SD.

Razlika između kontrolne vrednosti i vrednosti tretiranih uzoraka evaluirana je korišćenjem statističkog paketa "STATISTICA Release 8" analizom *one-way* ANOVA sa Fisherov-im (LSD) testom. Statistička značajnost je utvrđena pri $p < 0.05$ i $p < 0.005$.

REZULTATI

Rezultati ispitivanja genotoksičnog/antigenotoksičnog potencijala fulerenola podeljeni su u 5 celina: a) Fizičkohemijska karakterizacija fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$, b) utvrđivanje IC_{50} vrednosti fulerenola u cilju odabira subcitotoksičnih koncentracija za analizu genotoksičnosti fulerenola, c) odabir koncentracije MMC koja će koristiti u analizi antigenotoksičnosti fulerenola, d) analiza genotoksičnosti i antigenotoksičnosti fulerenola na CHO-K1 ćelijskoj liniji i e) analiza genotoksičnosti i antigenotoksičnosti fulerenola na ćelijskoj kulturi humanih limfocita.

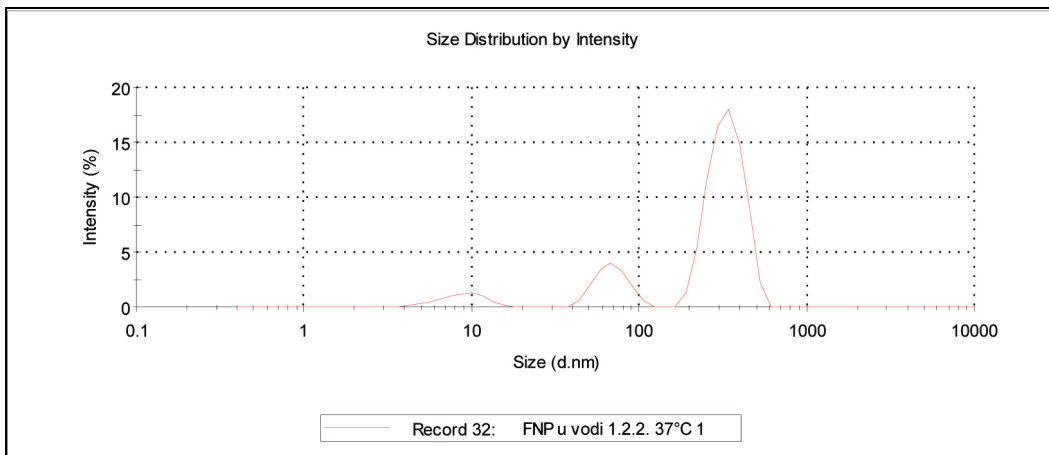
Fizičkohemijska karakterizacija fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$

DLS - Dinamičko rasipanje svetlosti

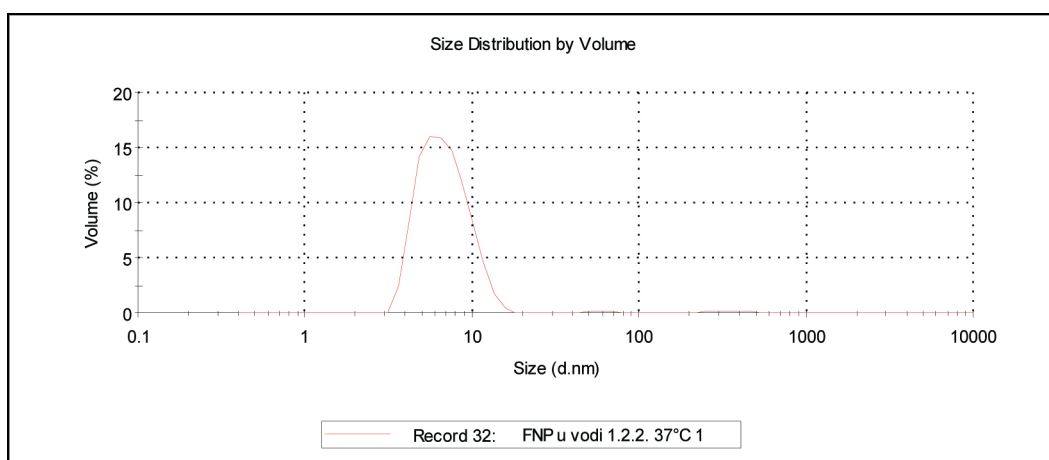
Metodom dinamičkog rasipanja svetlosti (DLS), na osnovu intenziteta rasute svetlosti, zapremine i broja čestica, utvrđena je raspodela nanočestica fulerenola u vodenom rastvoru, kao i u RPMI 1640 sa 10% i 20% FCS. Takođe je utvrđena raspodela čestica proteina u RPMI 1640 sa 20% FCS.

DLS nanočestica fulerenola u vodenom rastvoru

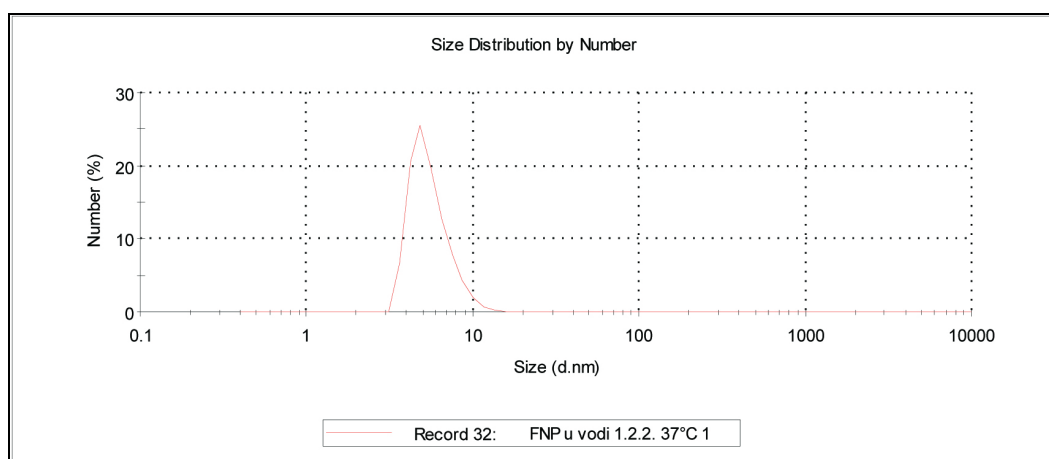
Pri koncentraciji fulerenola od 5mM u demineralizovanoj i deaerisanoj vodi, na sobnoj temperaturi, dobijena je raspodela nanočestica fulerenola (slika 12.) po intenzitetu (a), zapremini (b), broju (c) i naelektrisanju (zeta potencijalu) (d).



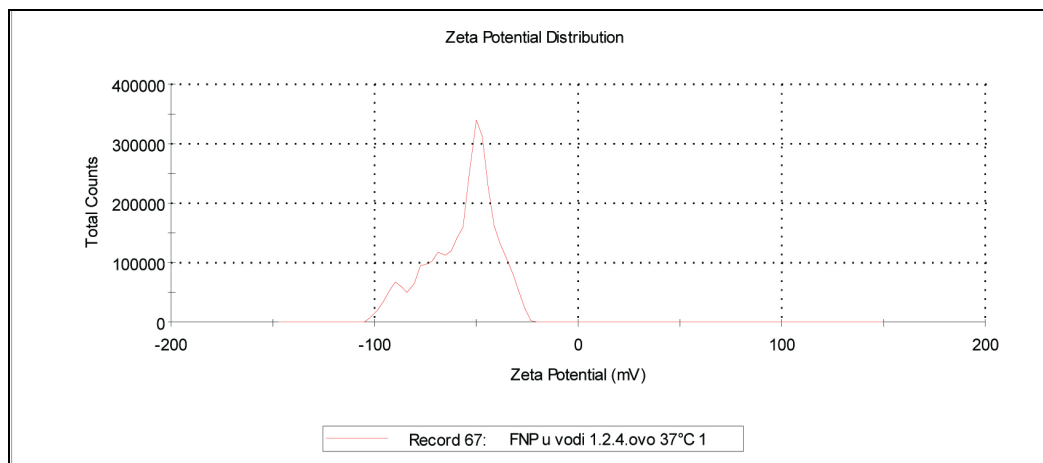
a)



b)



c)



d)

Slika 12. DLS nanočestica fulerenola u vodi prema:
a) intenzitetu, b) zapremini, c) broju i d) naelektrisanju

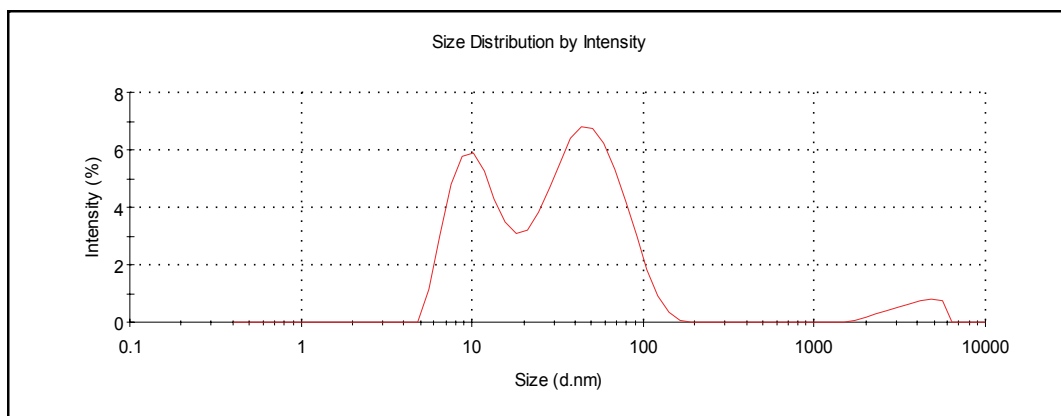
Na dijagramu se vidi da je uzorak složene strukture i nehomogen. Indeks polidisperznosti iznosi $Pdl=0,424$.

Na slici 12.a prikazana je raspodela čestica prema intenzitetu. Prisutne su tri familije čestica, od kojih je najdominantnija familija, sa maksimumom na 253nm, zastupljena 83,3%. Druga familija sa maksimumom na 42nm, zastupljena je 10,2% i najmanja familija čestica sa maksimumom na 9nm zastupljena je 6,5%. Analizom raspodele čestica prema zapremini i broju (slike 12.b,c), uočava se da je dominantan pik (99%) prema zapreminskoj raspodeli na 7nm, dok je drugi pik na 62nm. Raspodela čestica prema broju (slika 12.c) ukazuje na prisustvo samo jedne familije čestica radijusa od 5,5 nm. Na slici 12.d, na kojoj je prikazana raspodela nanočestica fulerenola prema naelektrisanju, uočavaju se tri pika. Najdominantniji pik sa naelektrisanjem od $\zeta = -48,5$ mV je zastupljen 70,5%, drugi pik sa naelektrisanjem od $\zeta = -73,2$ mV je zastupljen 20,3% i treći pik $\zeta = -90,3$ mV je zastupljen 9,3%. Srednja vrednost naelektrisanja nanočestica fulerenola iznosi -56,6 mV, sa zeta devijacijom od 16 mV.

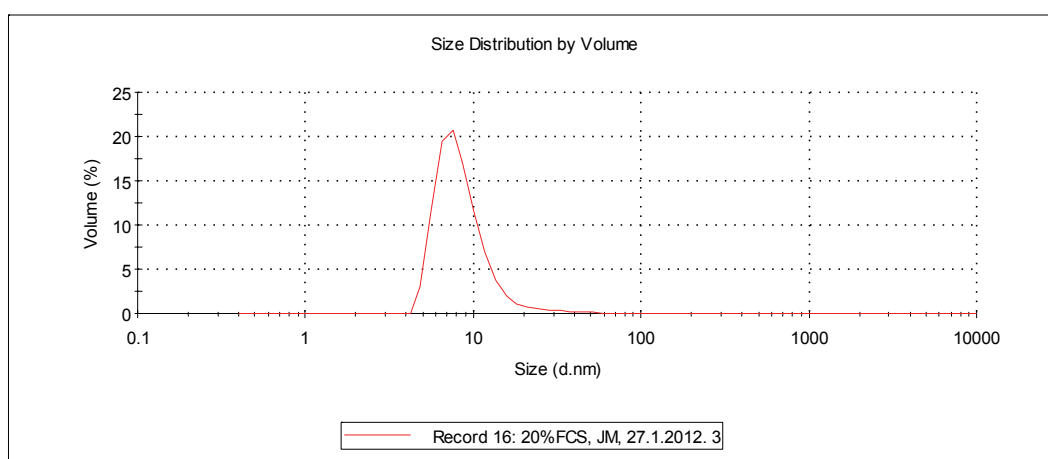
Nije detektovano prisustvo većih aglomerata formiranih od stabilnih agregata. Promena koncentracije fulerenola ne utiče značajno na raspodelu čestica (rezultati nisu prikazani).

DLS nanočestica proteina u RPMI 1640 sa 20 % FCS

Na slici 13. je prikazana DLS raspodela nanočestica proteina u RPMI 1640 sa 20% FCS i to prema intenzitetu (a) i zapremini (b).



a)



b)

Slika 13. DLS čestica proteina u RPMI 1640 sa 20% FCS prema:

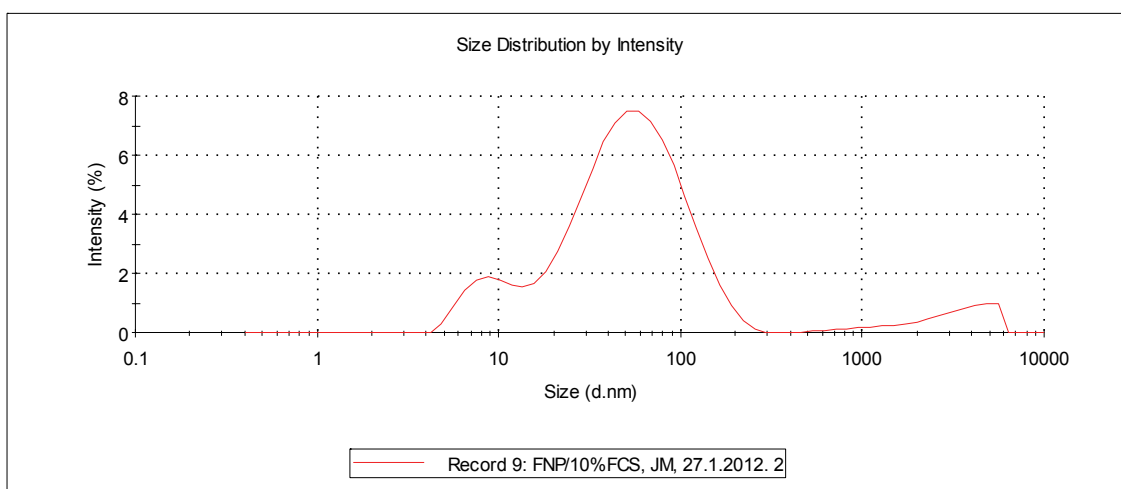
a) intenzitetu, b) zapremini.

Čestice proteina u RPMI 1640 sa 20% FCS, nakon 24h inkubacije na 37⁰C, grade nehomogen rastvor, sa polidisperzionim indeksom od Pdl=0,441. Prisutne su dve familije čestica, od kojih su čestice veličine 50nm zastupljene 60% a čestice od 11nm 36%. Čestice veće od 1000nm predstavljaju nečistoće, što je potvrđeno korelacionim dijagramom (rezultati nisu prikazani). Zapreminska raspodela čestica (slika 13.a) ima

samo jedan pik na 9nm. Raspodela čestica po broju takođe ima samo jedan maksimum na 7nm (rezultati nisu prikazani).

DSL fulerenola u RPMI 1640 sa 10% FCS

DLS raspodela nanočestica fulerenola u RPMI 1640 sa 10% FCS, pri koncentraciji fulerenola od 5mM, posle 24h inkubacije na 37⁰C, prikazana je na slici 14.

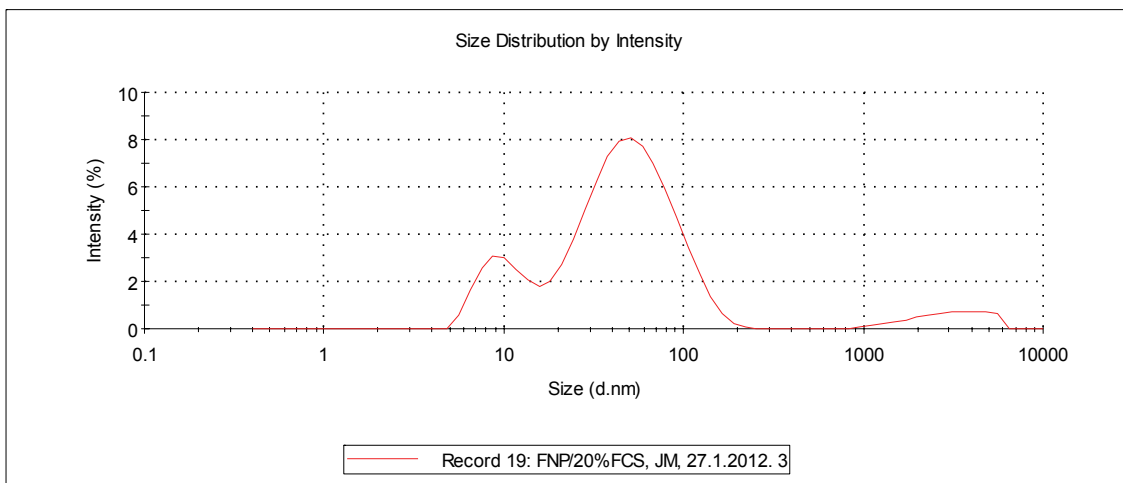


Slika 14. DLS čestica fulerenola u RPMI 1640 sa 10% FCS prema intenzitetu

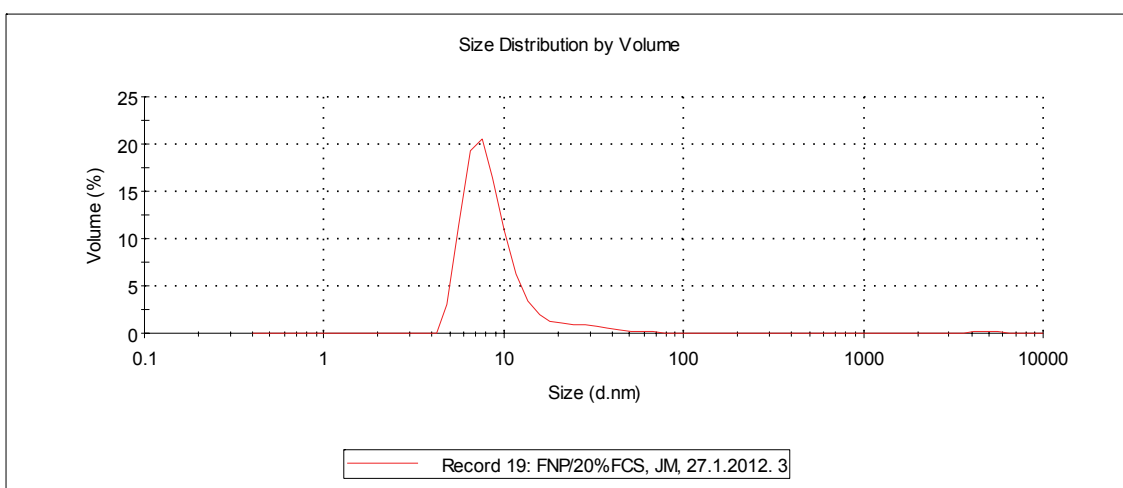
Iz dijagrama se vidi da je rastvor fulerenola u RPMI 1640 sa 10% FCS nehomogen (polidisperzioni indeks je $Pdl = 0,441$). Prisutne su dve familije čestica, jedna od 9nm i druga od 63 nm. U rastvoru se nalaze i veće čestice od 100nm do 250nm. Uočava se i grupacija čestica od 400 do 6000 nm, koje su okarakterisane kao nečistoća uzorka od prašine. Isti rezultati su dobijeni sa uzorkom fulerenola koncentracije 5mM u RPMI 1640 sa 15% FCS (rezultati nisu prikazani).

DLS fulerenola u RPMI 1640 sa 20% FCS

DLS raspodela nanočestica fulerenola u RPMI 1640 sa 20% FCS, prema intenzitetu (a) i zapremini (b), prikazana je na slici 15.



a)



b)

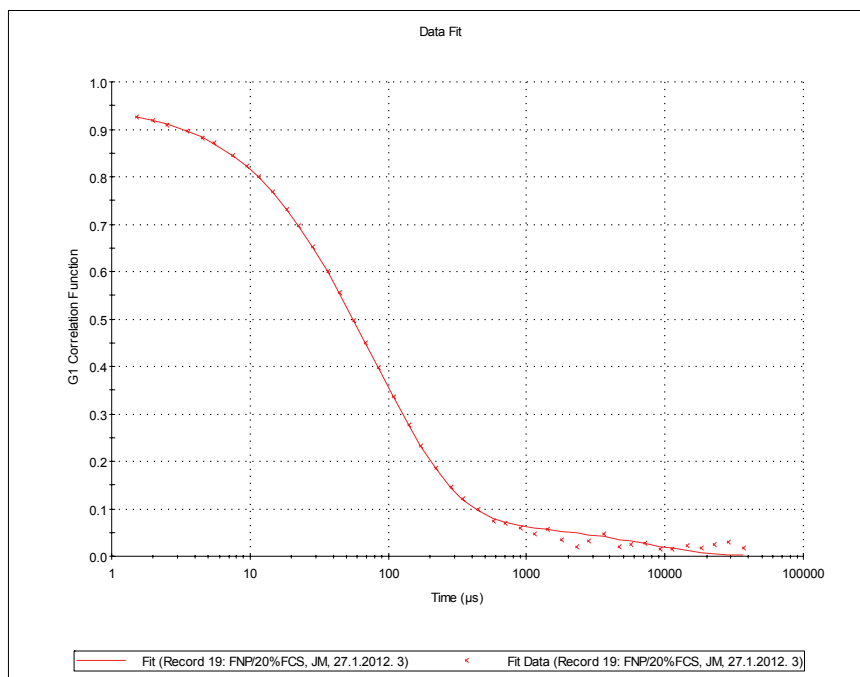
Slika 15. DLS fulerenola u RPMI 1640 sa 20% FCS prema:

a) intenzitetu, b) zapremini.

Metodom DSL je analiziran rastvor fulerenola koncentracije 5mM mg/mL, nakon inkubacije od 24h na 37⁰C, u RPMI 1640 sa 20% FCS.

Iz dijagrama (slika 15.a) se vidi da je rastvor fulerenola u RPMI 1640 sa 20% FCS nehomogen (polidisperzioni indeks Pdl=0,433). Uočavaju se dve familije čestica, jedna oko 9nm i druga oko 57nm. U rastvoru se nalaze i veće čestice od 100nm do 200nm a prisutna je takođe i grupacija čestica od 1000nm do 6400nm.

Analizom raspodele čestica po zapremini (slika 15.b), vidi se pik od 4nm do 40nm, sa maksimumom na 8nm. Čestice veće od 1000nm su okarakterisane kao nečistoća uzorka, što je potvrđeno i korelacionim dijagramom (slika 16.).



Slika 16. Korelacioni dijagram (nanočestica fulerenola u RPMI 1640 + 20% FCS)

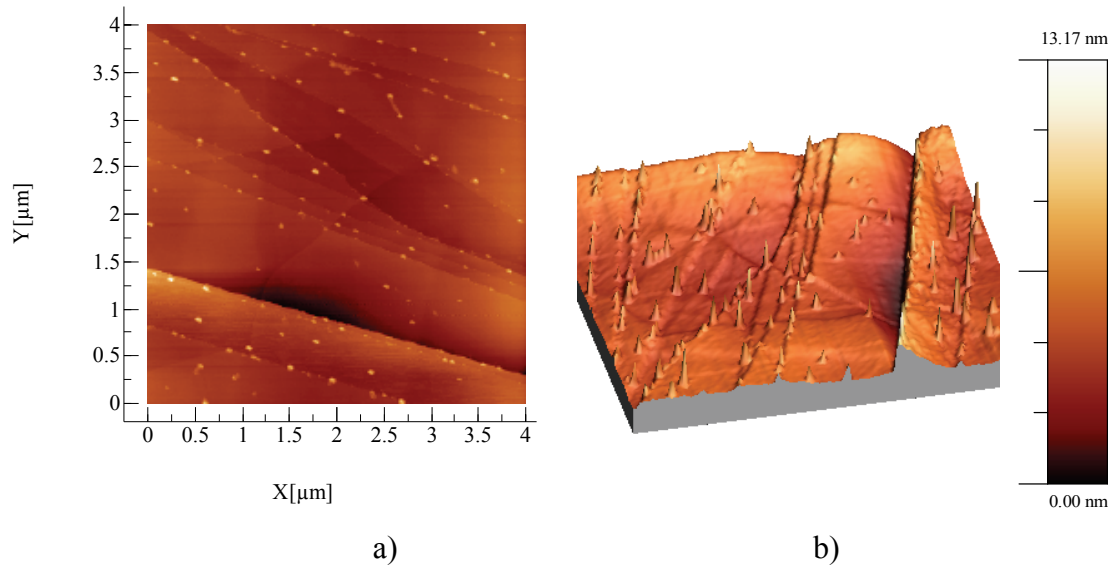
Korelacioni dijagram (slika 16.) raspodele nanočestica fulerenola koncentracije 5mM mg/mL posle inkubacije od 24h na 37⁰C u RPMI 1640 sa 20% FCS, urađen je u cilju provere zastupljenosti čestica veličine preko 1000nm. Iz dijagrama se vidi da su čestice preko 1000nm zastupljene svega 7% i van opsega su preciznog merenja.

AFM - Mikroskopija atomskih sila

AFM mikroskopijom je utvrđena veličina nanočestica proteina u RPMI 1640 sa 20% FCS, kao i struktura fulerenola u vodi i u RPMI 1640 sa 15% i 20% FCS, koji se koriste za kultivaciju ćelijskih kultura limfocita u testu mikronukleusa, odnosno testu hromozomskih aberacija.

AFM nanočestica fulerenola u vodenom rastvoru

Na slici 17. je predstavljena AFM slika nanočestica fulerenola u vodenom rastvoru, na visoko orijentisanom pirolitičkom grafitu HOPG (engl. *Highly Oriented Pyrolytic Graphite*).

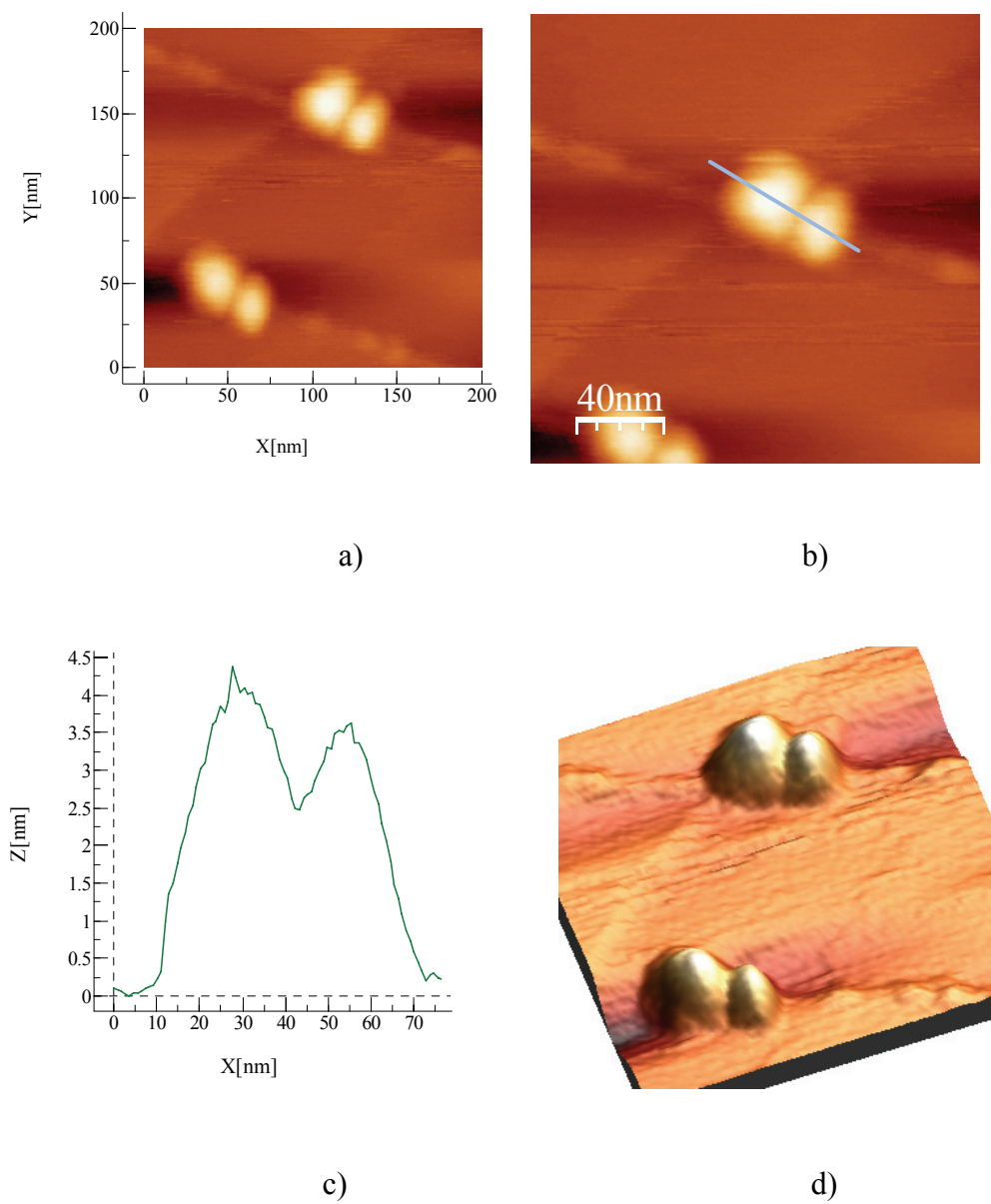


Slika 17. AFM nanočestica fulerenola u vodenom rastvoru

a) Nanočestice fulerenola na HOPG podlozi, fotografisane na velikoj skali 4000x4000 nm. Uočava se da su čestice fulerenola sličnih dimenzija i da grade relativno homogen uzorak. Većina nanočestica je raspoređena na terasama HOPG, što ukazuje na polarnost materije, dok je manji broj čestica fulerenola van terasa HOPG, zbog slabe interakcije sa nepolarnom površinom grafita.

b) 3D slika nanočestica fulerenola. Skala desno pokazuje visinu nanočestica fulerenola

AFM segmenta nanočestica fulerenola u vodenom rastvoru na HOPG površini, prikazan je na slici 18.

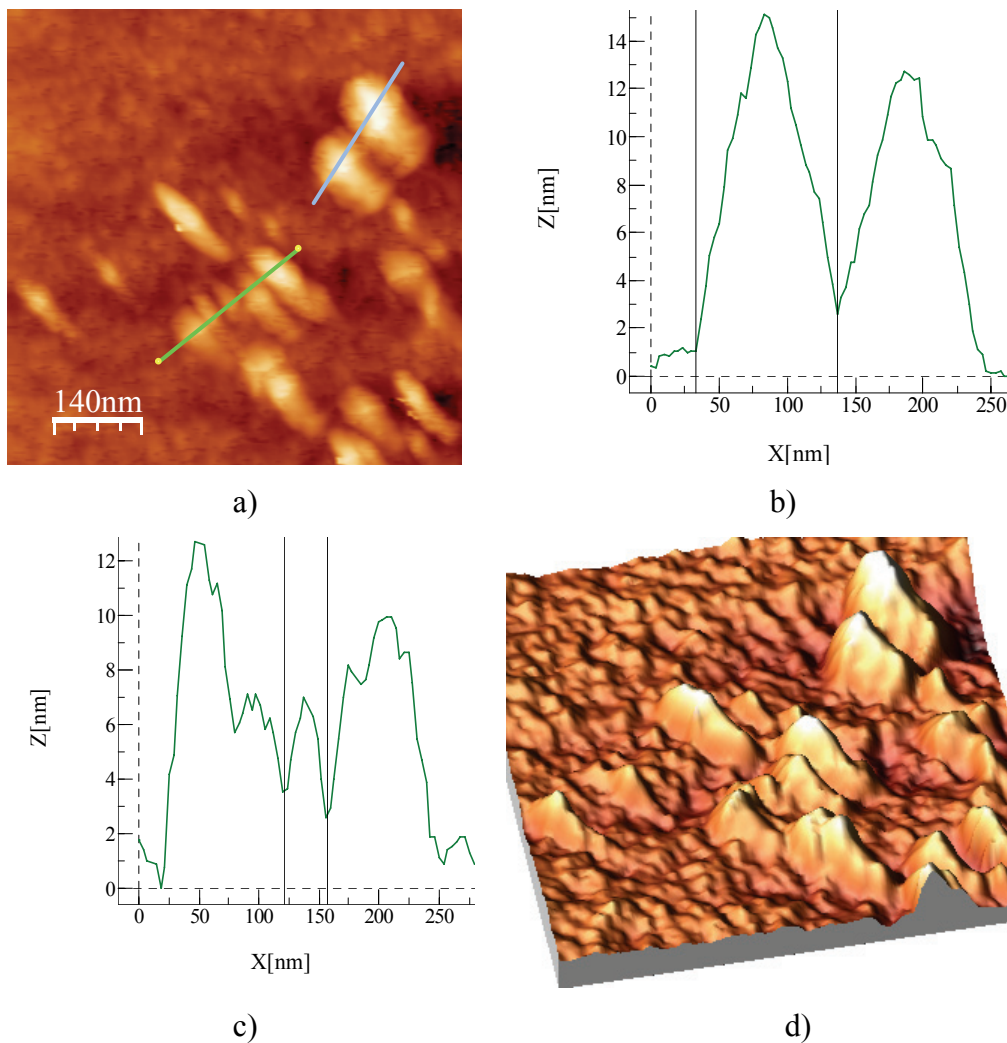


Slika 18. AFM segmenta nanočestica fulerenola u vodenom rastvoru na HOPG površini

- a) Nanočestice fulerenola slikane na velikoj skali 200x200 nm.
- b) Prikaz nanočestice fulerenola. Nanočestica fulerenola od 64 nm sačinjena je od dve čestice, od kojih je veća 35 nm a manja 29 nm.
- c) Odgovarajući presek nanočestica fulerenola. Pikovi pokazuju visinu veće čestice 4.4 nm a manje 3.7 nm.
- d) 3D slika nanočestica fulerenola.

AFM nanočestice proteina u RPMI 1640 sa 20% FCS

Na slici 19. je prikazana mikroskopija atomske sile nanočestice proteina u RPMI 1640 sa 20% FCS, posle inkubacije od 24h pri 37°C na HOPG površini.



Slika 19. AFM nanočestice proteina u RPMI 1640 sa 20% FCS

a) Nanočestice proteina fotografisane na velikoj skali 700x700 nm. Nanočestice proteina grade nehomogen rastvor sačinjen od čestica različitih veličina od 12 do 108 nm. Visina čestica se kreće od 7 do 15 nm. Agregacijom manjih čestica se formiraju veće čestice preko 40 nm. Veće nanočestice proteina (veličine 105 i 108 nm) su obeležene plavom linijom, a manje nanočestice proteina (veličine 41,19,13,12,17, 36, 32, 30, 37 nm) zelenom linijom

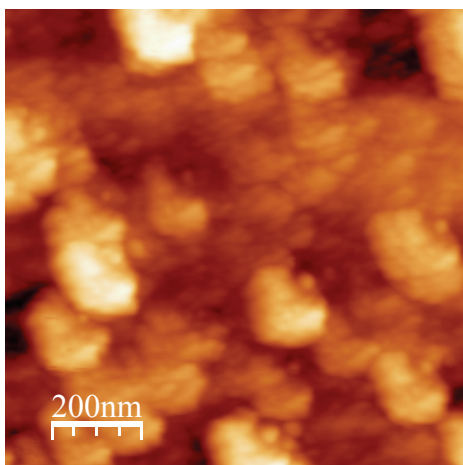
b) Odgovarajući presek većih nanočestica proteina

c) Odgovarajući presek manjih nanočestica proteina

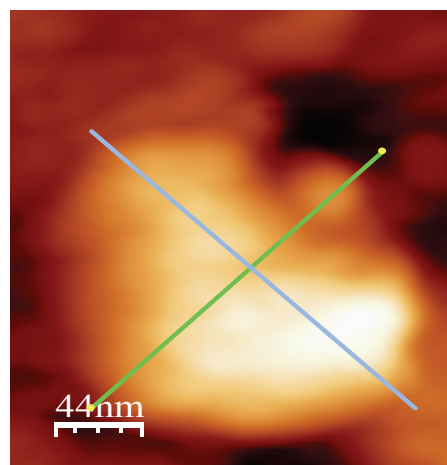
d) 3D slika nanočestica proteina

AFM nanočestice fulerenola u RPMI 1640 sa 15% FCS

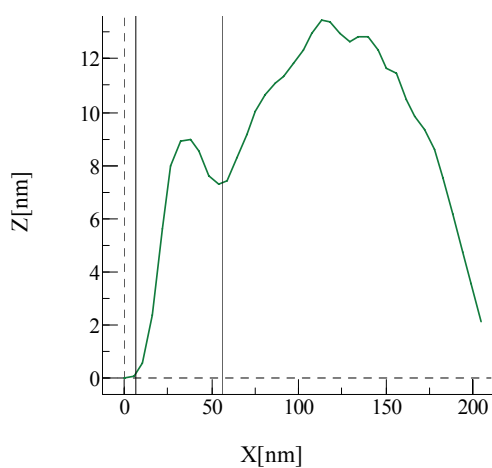
Na slici 20. je prikazana mikroskopija atomskih sila nanočestica fulerenola (koncentracije 5mM) u RPMI 1640 sa 15% FCS, posle inkubacije od 24h pri 37⁰C na HOPG površini.



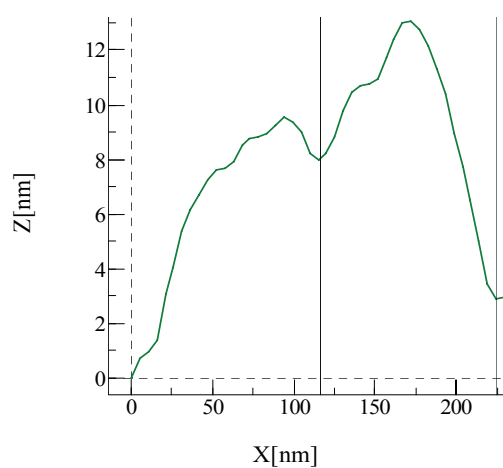
a)



b)



c)



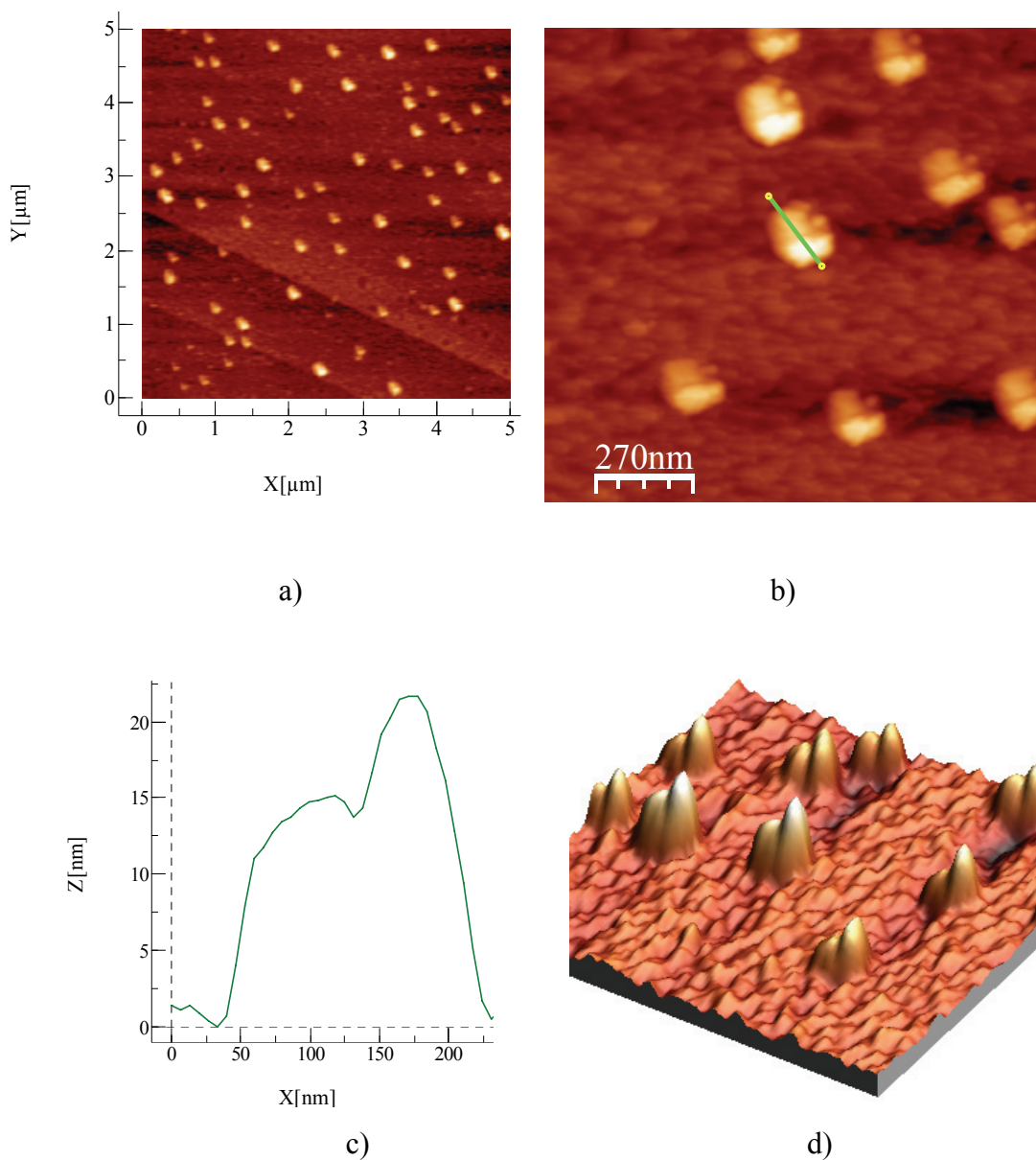
d)

Slika 20. AFM nanočestice fulerenola u RPMI 1640 sa 15% FCS

- a) Nanočestice fulerenola fotografisane na velikoj skali 1000x1000 nm
- b) Nanočestica od 227 nm. Manja nanočestica (veličine 49 nm) je obeležena zelenom linijom a veća nanočestica (od 104 i 108 nm) plavom linijom
- c) Odgovarajući presek manje nanočestice
- d) Odgovarajući presek veće nanočestice

AFM nanočestica fulerenola u RPMI 1640 sa 20% FCS

AFM slika nanočestica fulerenola u RPMI 1640 sa 20% FCS data je na slici 21. Na HOPG površini se uočavaju nanočestice fulerenola, koncentracije 5mM. Mikroskopija je izvršena posle 24h inkubacije rastvora fulerenola na 37⁰C, što su bili uslovi kao i u eksperimentu utvrđivanja genotoksičnosti i antigenotoksičnosti fulerenola testom mikronukleusa na ćelijskoj kulturi humanih limfocita.



Slika 21. AFM nanočestica fulerenola u RPMI 1640 sa 20% FCS

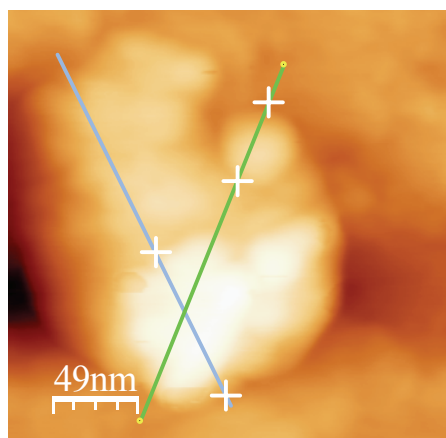
a) Nanočestice fulerenola na HOPG podlozi, fotografisane na velikoj skali 5000x5000 nm. Na slici se vidi da nema zadržavanja nanočestica na terasama HOPG, što ukazuje na smanjenje elektronegativnosti nanočestica u poređenju sa rastvorom fulerenola u vodi.

b) Nanočestica fulerenola od 197 nm na skali od 1200x1200 nm. Uočavaju se čestice veličine od 180 do 220 nm. Oblik i reljef svih čestica je isti.

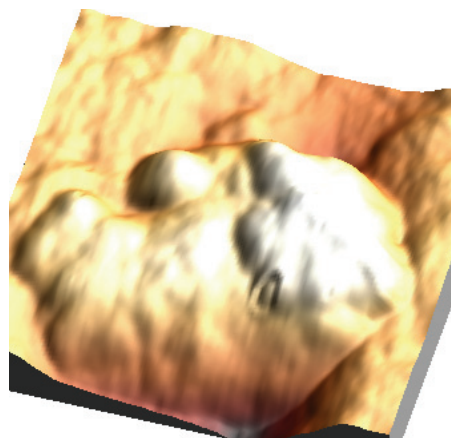
c) Odgovarajući presek nanočestice fulerenola. Maksimalni pik (visina) čestice je bio na 21.4 nm, dok je manji pik bio na 14.9 nm.

d) 3D slika nanočestica.

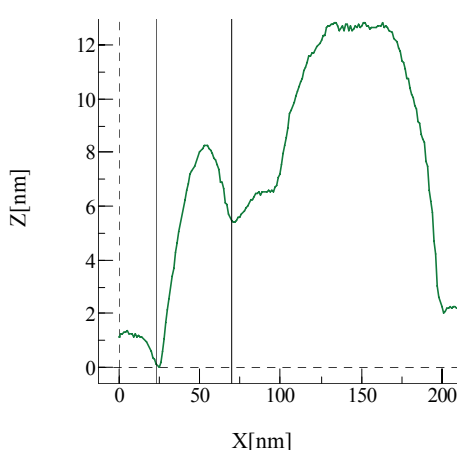
Na slici 22. je prikazan **segment fulerenola u RPMI 1640 sa 20% FCS na HOPG površini**



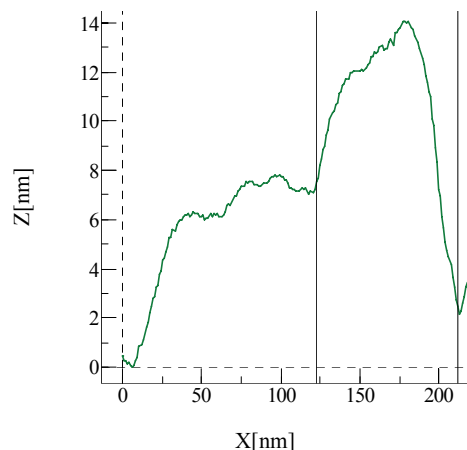
a)



b)



c)



d)

Slika 22. Segment nanočestica fulerenola u RPMI 1640 sa 20% FCS na HOPG površini

Fulerenol koncentracije 5mM je inkubiran tokom 24h na 37⁰C u RPMI 1640 sa 20% FCS na HOPG površini.

a) Nanočestice fulerenola na velikoj skali 250x250nm. Novoformirani agregati su sačinjeni od tri nanočestice od kojih su dve veće a treća manja.

b) 3D prikaz nanočestice.

c) Odgovarajući presek manje nanočestice (od 48nm), obeležene zelenom linijom.

d) Odgovarajući presek veće nanočestice (od 211 nm), obeležene plavom linijom.

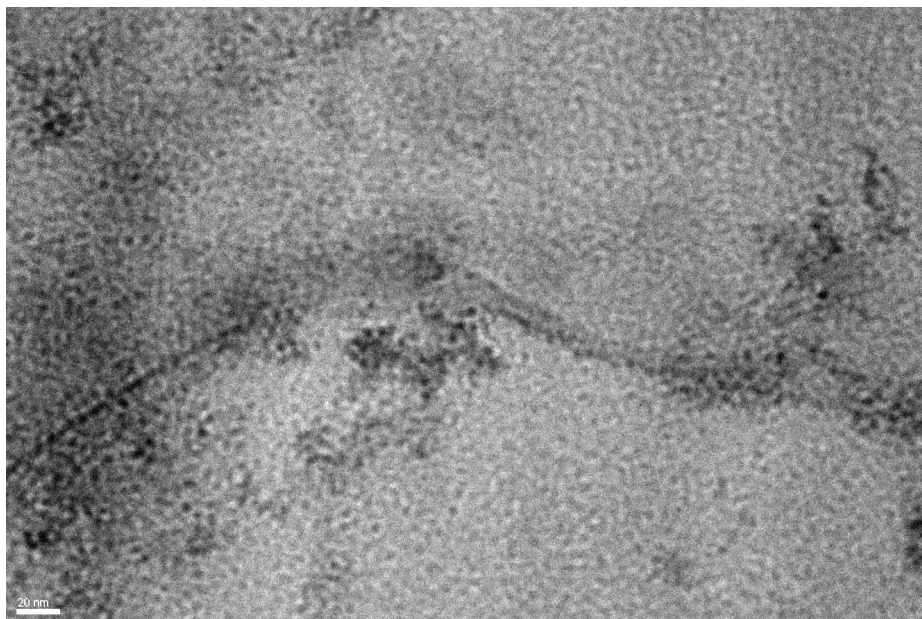
Novoformirane nanočestice najverovatnije predstavljaju agregate nanočestica fulerenola i nanočestica proteina iz FCS.

TEM - Transmisiona elektronska mikroskopija

Transmisionom elektronskom mikroskopijom je analiziran vodeni rastvor nanočestice fulerenola.

TEM fulerenolskih nanočestica u vodenom rastvoru

U cilju potvrđivanja strukture nanočestica urađena je analiza vodenog rastvora nanočestica fulerenola transmisionom elektronskom mikroskopijom (TEM) (slika 23.).



Slika 23. TEM fulerenolskih nanočestica u vodenom rastvoru

Na slici 23. se vide stabilni nanoagregati čestica fulerenola od 5nm, kao i veći agregati formirani od više manjih stabilnih agregata.

IC₅₀

IC₅₀ vrednost za fulerenol na ćelijskim kulturama CHO-K1 i humanih limfocita je utvrđena praćenjem parametra kao što su: ukupan broj ćelija/mL, % vijabilnost ćelija, % citotoksičnost fulerenola i % preživljavanje ćelija. Eksperimentalni protokol u analizi navedenih parametara citotoksičnosti fulerenola DET testom bio je isti kao i u testovima mikronukleusa i hromozomskih aberacija. Svi navedeni parametri su prikazani kao srednje vrednosti iz tri merenja.

IC₅₀ za fulerenol na CHO-K1 prema protokolu za test mikronukleusa

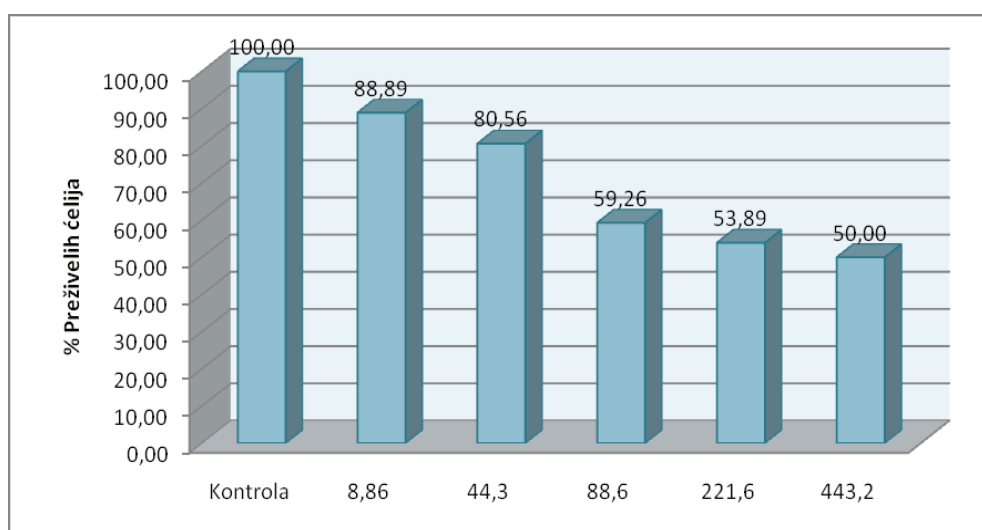
Na ćelijskoj kulturi CHO-K1, praćen je efekat različitih koncentracija fulerenola tokom 3h i 24h tretmana na: ukupan broj ćelija/mL, vijabilnost (%) i citotoksičnost (%) (tabela 2.) i to prema eksperimentalnoj šemi za test mikronukleusa. Vijabilnost ćelija u

svim tretiranim uzorcima je bila visoka (>86%). Sa porastom koncentracije fulerenola ukupan broj ćelija se smanjivao, a citotoksičnost je srazmerno rasla. Pri najnižoj koncentraciji fulerenola od 8.86 μM tokom 24h tretmana citotoksičnost je, kao i u kontrolnom uzorku, bila 0.

Tabela 2. Efekti fulerenola na ukupan broj ćelija/mL, vijabilnost (%) i citotoksičnost (%) u ćelijskoj liniji CHO-K1 prema protokolu za test mikronukleusa

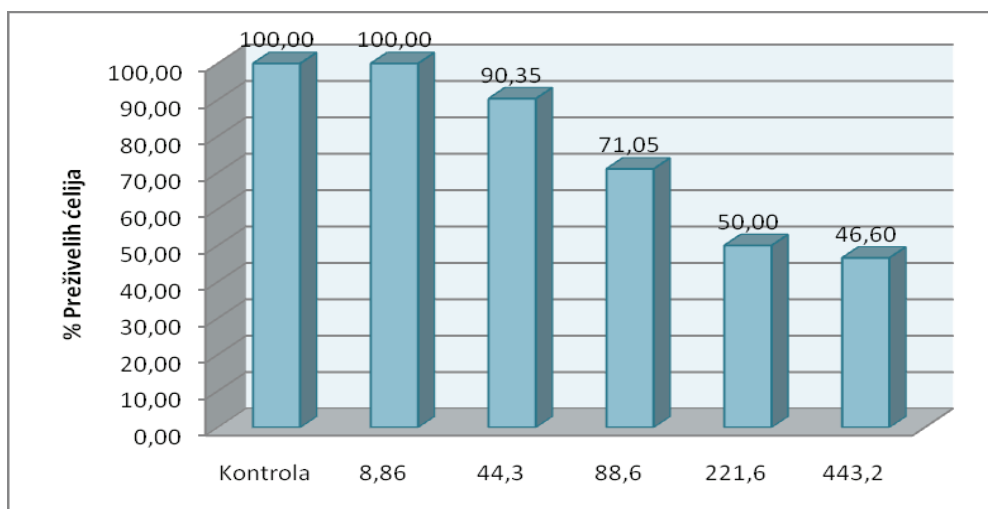
Tretman	Fulerenol (μM)	Ukupan broj ćelija/mL	Vijabilnost (%)	Citotoksičnost (%)
3h	0	450000	95,84	0
	8,86	400000	92,36	11,11
	44,3	362500	91,66	19,44
	88,6	266667	87,13	40,74
	221,6	242500	94,87	46,11
	443,2	225000	93,06	50
24h	0	475000	99,55	0
	8,86	475000	97,62	0
	44,3	429167	94,67	9,65
	88,6	337500	92,09	28,95
	221,6	237500	86,62	50
	443,2	200000	90,86	53,39

Procenat preživljavanja CHO-K1 ćelija, izračunat u odnosu na kontrolnu vrednost, opadao je sa porastom koncentracije fulerenola (grafikon 1. i 2.). Vrednost IC_{50} tokom 3h tretmana utvrđena je pri koncentraciji fulerenola od 443.2 μM (grafikon 1, tabela 2.).



Grafikon 1. Efekti 3h tretmana fulerenolom na preživljavanje u ćelijskoj liniji CHO-K1 prema protokolu za test mikronukleusa

Vrednost IC_{50} tokom 24h tretmana je utvrđena pri koncentraciji fulerenola od 221.6 μM (grafikon 2., tabela 2.).



Grafikon 2. Efekti 24h tretmana fulerenolom na preživljavanje u ćelijskoj liniji CHO-K1 prema protokolu za test mikronukleusa

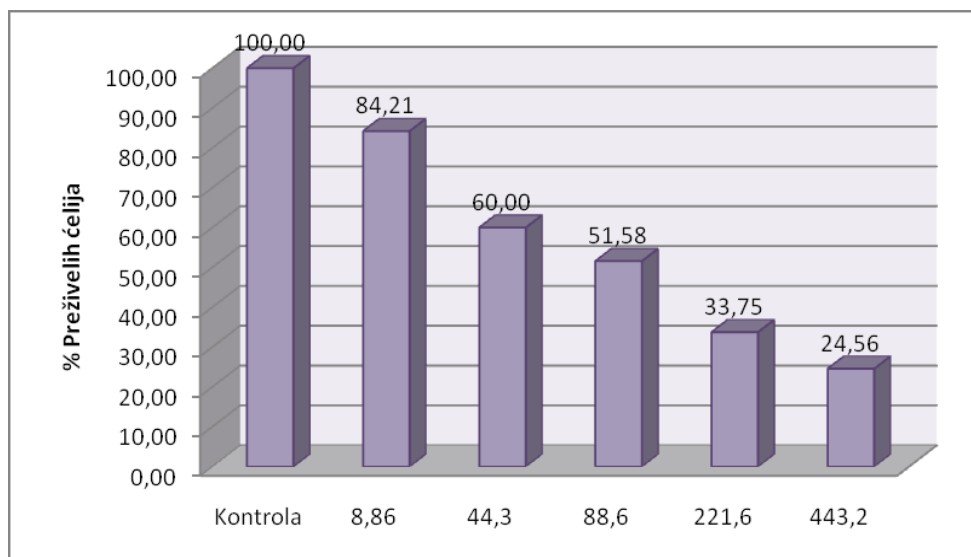
IC_{50} za fulerenol na ćelijskoj kulturi CHO-K1 prema protokolu za test hromozomskih aberacija

Prema eksperimentalnom protokolu za test hromozomskih aberacija ćelijska kultura CHO-K1 je tretirana različitim koncentracijama fulerenola tokom 3h i 24h. Sa porastom koncentracije fulerenola, smanjivao se ukupan broj ćelija, a citotoksičnost je rasla. Vijabilnost je bila visoka u svim eksperimentalnim uzorcima (tabela 3.).

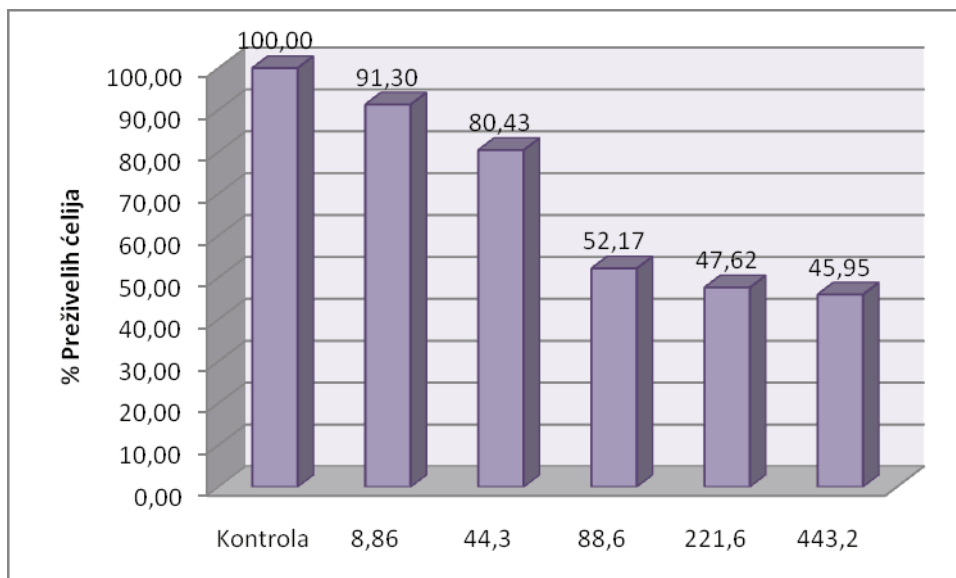
Tabela 3. Efekti fulerenola na ukupan broj ćelija/mL, vijabilnost (%) i citotoksičnost (%) u ćelijskoj liniji CHO-K1 prema protokolu za test hromozomskih aberacija

Tretman	Fulerenol (μM)	Ukupan broj ćelija/mL	Vijabilnost (%)	Citotoksičnost (%)
3h	0	395833	94,05	0
	8,86	333333	89,80	15,79
	44,3	237500	94,97	40
	88,6	204167	81,66	48,42
	221,6	112500	89,07	66,25
	443,2	58333	70,37	74,43
24h	0	191667	97,77	0
	8,86	175000	96,49	8,69
	44,3	154167	93,75	19,56
	88,6	100000	89,63	49,83
	221,6	83333	96,29	52,38
	443,2	70833	88,89	54,05

Takođe je, sa porastom koncentracije fulerenola, opadao % preživljavanja ćelija. IC₅₀ vrednost je bila utvrđena pri koncentraciji fulerenola od 88.6 μM i u 3h i u 24h tretmanu ćelijske kulture (grafikon 3. i 4, tabela 3.).



Grafikon 3. Efekti 3h tretmana fulerenolom na preživljavanje u ćelijskoj liniji CHO-K1 prema protokolu za test hromozomskih aberacija



Grafikon 4. Efekti 24h tretmana fulerenolom na preživljavanje u ćelijskoj liniji CHO-K1 prema protokolu za test hromozomskih aberacija

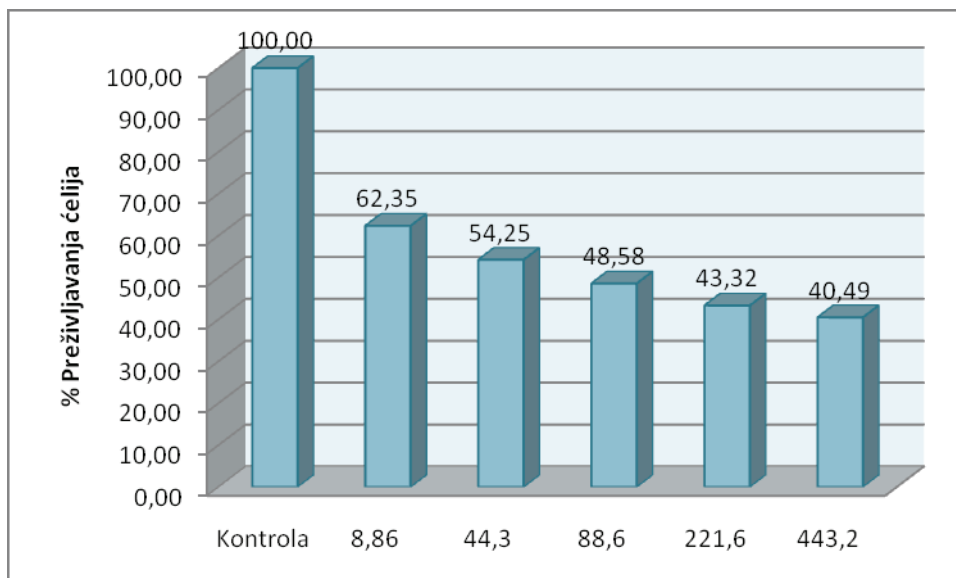
IC₅₀ za fulerenol u kulturi humanih limfocita prema protokolu za test mikronukleusa

Na limfocitnoj kulturi su praćeni efekti različitih koncentracija fulerenola C₆₀(OH)₂₄ prema eksperimentalnoj šemi za test mikronukleusa. Ispitivana supstanca je primenjena u tri različite faze ćelijskog ciklusa: G₀, G₁/S i G₁/S/G₂/M. Sa porastom koncentracije fulerenola ukupan broj ćelija se smanjivao, a citotoksičnost je srazmerno rasla (tabela 4.). Pri najnižoj koncentraciji fulerenola od 8.86 μM u tretmanu tokom G₁/S/G₂/M faze ćelijskog ciklusa, citotoksičnost je imala negativnu vrednost, što ukazuje na proliferativni kapacitet fulerenola pri toj koncentraciji. Vijabilnost ćelija je u svim uzorcima bila visoka (>80%).

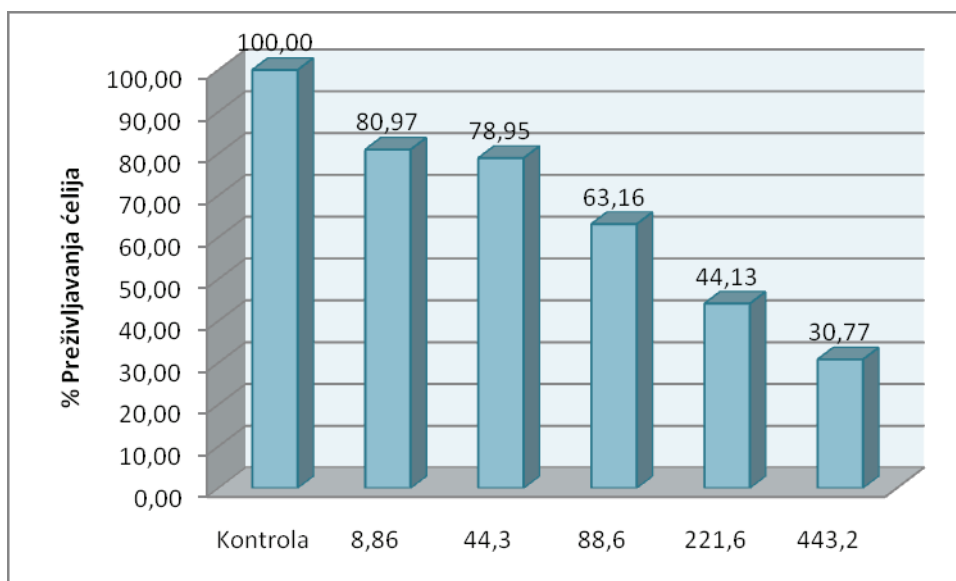
Tabela 4. Efekti fulerenola na ukupan broj ćelija/mL, vijabilnost (%) i citotoksičnost (%) u ćelijskoj kulturi humanih limfocita prema protokolu za test mikronukleusa

Tretman	Fulerenol (μM)	Ukupan broj ćelija/mL	Vijabilnost (%)	Citotoksičnost (%)
G0	0	1029167	96,88	0
	8,86	641667	96,85	37,65
	44,3	558333	96,17	45,75
	88,6	500000	92,91	51,42
	221,6	445833	92,52	56,68
	443,2	416667	92,52	59,51
G1/S	0	1029167	96,88	0
	8,86	833333	97,03	19,03
	44,3	812500	95,54	21,05
	88,6	650000	92,34	36,84
	221,6	454167	89,48	55,87
	443,2	316667	85,86	69,23
G1/S/G2/M	0	1029167	96,88	0
	8,86	1062500	96,26	-3,24
	44,3	758333	93,45	26,31
	88,6	77500	97,43	24,69
	221,6	554167	96,12	46,15
	443,2	466667	97,38	54,65

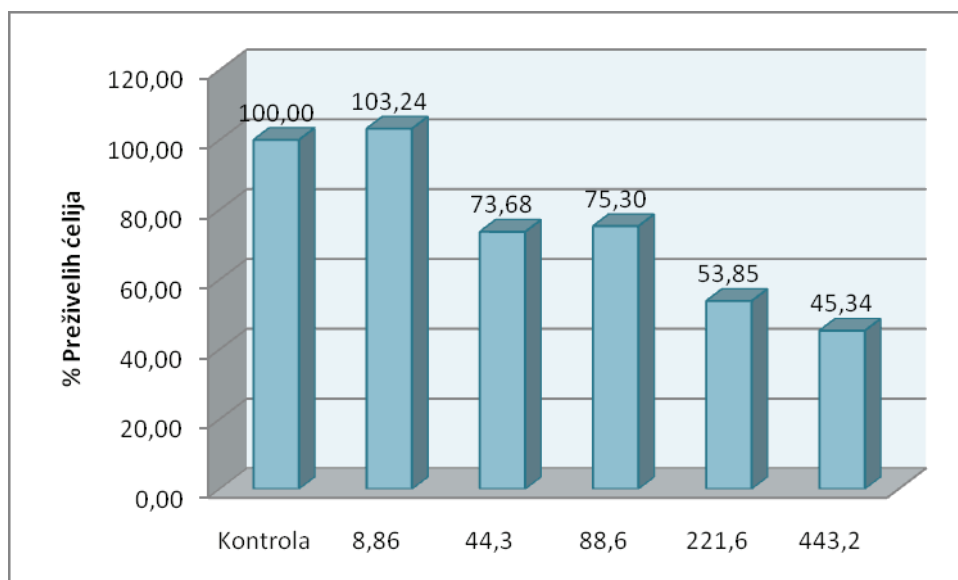
Porast koncentracije fulerenola indukovao je pad procenta preživljavanja limfocita, a IC_{50} vrednost je utvrđena pri koncentraciji fulerenola od 88,6 μM za G0 fazu ćelijskog ciklusa (grafikon 5., tabela 4.), dok je za G1/S (grafikon 6., tabela 4.) i G1/S/G2/M (grafikon 7., tabela 4.) bila pri koncentraciji od 221.6 μM .



Grafikon 5. Efekti tretmana fulerenolom u G0 fazi ćelijskog ciklusa na preživljavanje humanih limfocita prema protokolu za test mikronukleusa



Grafikon 6. Efekti tretmana fulerenolom u G1/S fazi ćelijskog ciklusa na preživljavanje humanih limfocita prema protokolu za test mikronukleusa



Grafikon 7. Efekti tretmana fulerenolom u G1/S/G2/M fazi ćelijskog ciklusa na preživljavanje humanih limfocita prema protokolu za test mikronukleusa

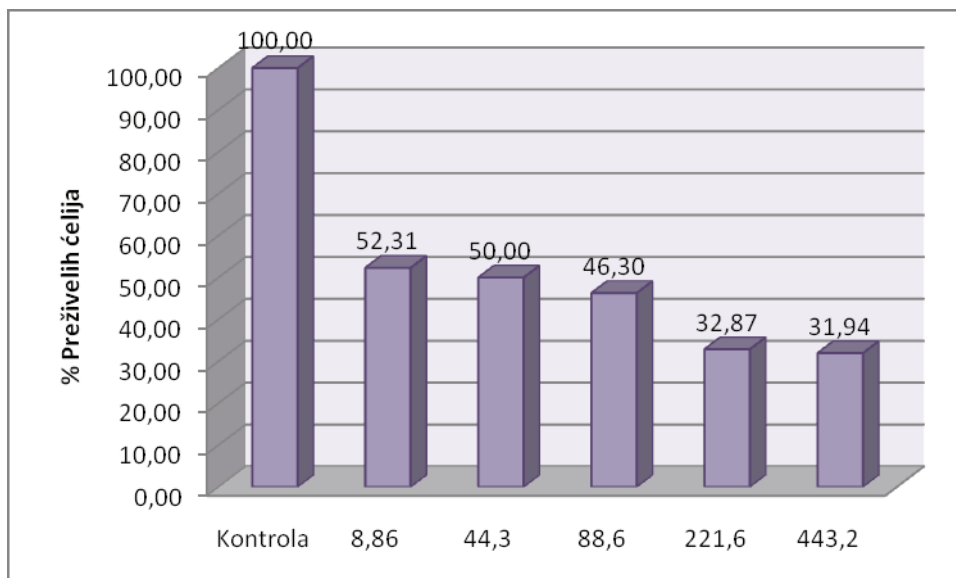
IC₅₀ za fulerenol u kulturi humanih limfocita prema protokolu za test hromozomskih aberacija

Humani limfociti su, u cilju utvrđivanja vrednosti IC₅₀, tretirani različitim koncentracijama fulerenola prema eksperimentalnoj šemi za test hromozomskih aberacija (tabela 5.). Fulerenol je primenjen u tri različite faze ćelijskog ciklusa: G0, G1/S i G1/S/G2/M. Sa porastom koncentracije fulerenola u G0 i G1/S fazi ćelijskog ciklusa ukupan broj ćelija se smanjivao, a citotoksičnost rasla. U G1/S/G2/M fazi ćelijskog ciklusa pri nižim koncentracijama fulerenola (8.86 i 44.3 μM), ukupan broj ćelija je bio povećan u odnosu na broj u kontrolnom uzorku, dok je citotoksičnost bila negativna. Vijabilnost je u svim uzorcima bila visoka.

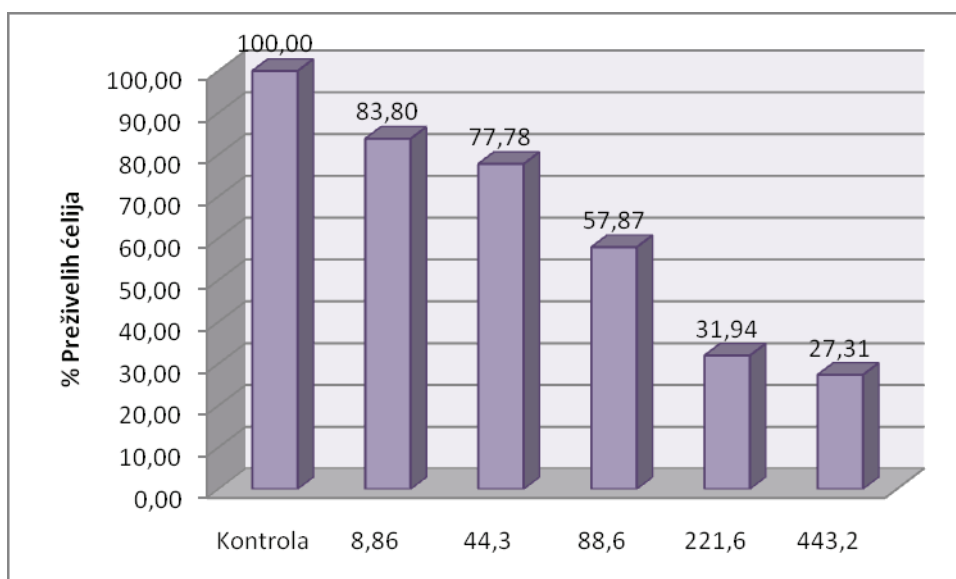
Tabela 5. Efekti fulerenola na ukupan broj ćelija/mL, vijabilnost (%) i citotoksičnost (%) u kulturi humanih limfocita prema protokolu za test hromozomskih aberacija

Tretman	Fulerenol (μM)	Ukupan broj ćelija/mL	Vijabilnost (%)	Citotoksičnost (%)
G0	0	900000	97,65	0
	8,86	470833	93,10	47,68
	44,3	450000	95,71	50
	88,6	416667	87,74	53,70
	221,6	295833	85,39	67,13
	443,2	287500	80,83	68,05
G1/S	0	900000	97,65	0
	8,86	754767	95,37	16,20
	44,3	700000	96,74	22,22
	88,6	520833	91,33	42,13
	221,6	287500	78,19	68,05
	443,2	245833	71,22	72,68
G1/S/G2/M	0	900000	97,65	0
	8,86	1000000	97,58	-11,11
	44,3	962500	99,19	-6,94
	88,6	775000	97,43	13,89
	221,6	554167	96,12	38,42
	443,2	466666	96,53	48,15

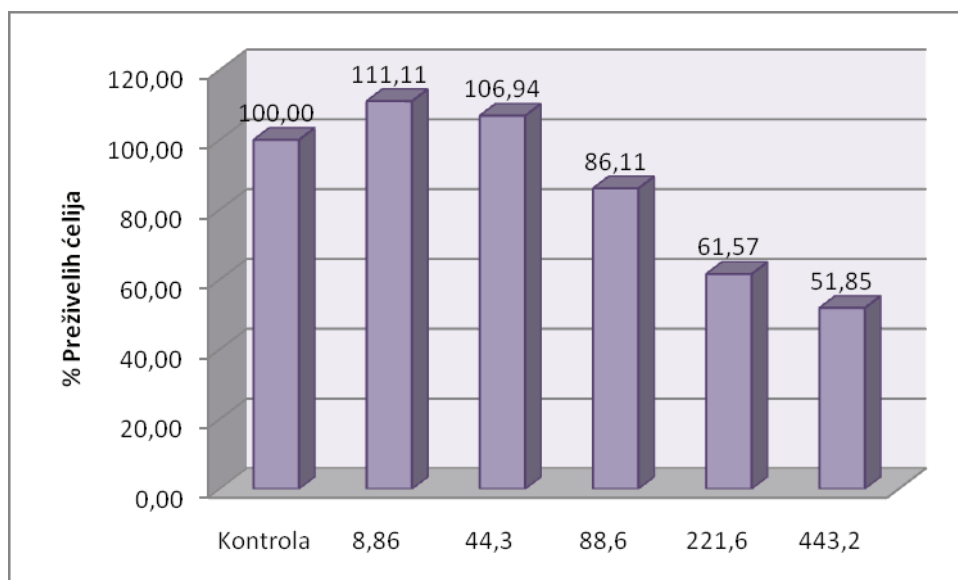
Procenat preživljavanja limfocita je opadao sa porastom koncentracije fulerenola u G0 i G1/S fazi ćelijskog ciklusa. IC_{50} vrednost u G0 fazi ćelijskog ciklusa je utvrđena pri koncentraciji fulerenola od 44.3 μM (grafikon 8., tabela 5.), a u G1/S fazi ćelijskog ciklusa pri koncentraciji od 88.6 μM (grafikon 9., tabela 5.). Procenat preživljavanja limfocita u G1/S/G2/M fazi ćelijskog ciklusa pri koncentracijama od 8.86 i 44.3 μM bio je veći u odnosu na kontrolnu vrednost. IC_{50} vrednost za G1/S/G2/M fazu ćelijskog ciklusa utvrđena je pri koncentraciji fulerenola od 443.2 μM (grafikon 10., tabela 5.).



Grafikon 8. Efekti fulerenola u G0 fazi ćelijskog ciklusa na preživljavanje humanih limfocita prema protokolu za test hromozomskih aberacija



Grafikon 9. Efekti fulerenolom u G1/S fazi ćelijskog ciklusa na preživljavanje humanih limfocita prema protokolu za test hromozomskih aberacija



Grafikon 10. Efekti fulerenola u G1/S/G2/M fazi ćelijskog ciklusa na preživljavanje humanih limfocita prema protokolu za test hromozomskih aberacija

Mitomycin C

U ispitivanju antigenotoksičnosti fulerenola, izvršen je odabir one koncentracije mitomicina C koja indukuje, za analizu učestalosti mikronukleusa i hromozomskih aberacija, najoptimalniji nivo oštećenja DNK. Praćen je efekat tokom 3h i 24h tretmana na ćelijsku kulturu CHO-K1 i u G0, G1/S i G1/S/G2/M fazi ćelijskog ciklusa na kulturi humanih limfocita pri sledećim koncentracijama MMC: 0.15, 0.3, 0.6, 0.9 i 1.5 nM.

Uticaj MMC na učestalost mikronukleusa na CHO-K1 ćelijskoj kulturi

Učestalost mikronukleusa se, sa porastom koncentracije MMC, tokom 3h i 24h tretmana CHO-K1 ćelijske kulture, srazmerno povećavala (tabela 6.). Za eksperimente u kojima je analizirana antigenotoksičnost fulerenola na CHO-K1 ćelijskoj liniji tokom 3h tretmana, odabrana je koncentracija MMC od 1,5nM a za 24h tretman 0,3nM. Indeks

jedarne deobe je imao trend porasta tokom 3h i 24h u odnosu na kontrolnu vrednost. Distribucija mikronukleusa je pratila Poasonovu raspodelu.

Uticaj MMC na učestalost ćelija sa hromozomskim aberacijama na CHO-K1 ćelijskoj kulturi

Sa porastom koncentracije MMC tokom 3h i 24h tretmana ćelijske kulture CHO-K1, srazmerno je rastao i procenat aberantnih ćelija (tabela 7.). Za dalje eksperimente je u 3h tretmanu odabrana koncentracija MMC od 1,5 nM dok je u 24h tretmanu od 0,3 nM. U kontrolnom uzorku je bilo više aberacija hromatidnog tipa u odnosu na aberacije hromozomskog tipa. Međutim, sa porastom koncentracije MMC, rasla je i dominacija aberacija hromozomskog tipa naročito u 24h tretmanu.

Tabela 6. Uticaj mitomicin-a C na citostatski/citotoksični efekat i na oštećenje DNK indukovano u BN ćelijama CHO-K1 ćelijske kulture

Tretman	MM C (nM)	Citostatski/citotoksični efekat					Oštećenje DNK indukovano u BN							
		Σ	Mono-N	BN	Poli-N	NDI	Br. MN/1000 BN	Br. BN sa MN	Σ MN u BN	Distribucija MN				
										0	1	2	3	4
Kontrola	0	2713,33	1608,11	1024,67	79,67	1,45	25,33	23,33	26,00	1001,33	21,67	0,67	1,00	0,00
3h	0.15	2475,00	1387,00	1013,00	75,00	1,47	27,64	25,00	25,00	988,00	23,00	1,00	1,00	0,00
	0.3	2471,00	1371,00	1002,00	98,00	1,48	26,90	23,00	27,00	979,00	21,00	1,00	0,00	1,00
	0.6	2251,00	1038,00	1077,00	136,00	1,59	41,78	39,00	45,00	1038,00	35,00	2,00	2,00	0,00
	0.9	1933,00	830,00	1000,00	102,00	1,62	46,00	44,00	46,00	956,00	42,00	2,00	0,00	0,00
	1.5	1853,33	748,00	1020,33	79,00	1,64	40,50	37,33	41,67	989,00	34,00	2,33	1,00	0,00
24h	0.15	2082,00	993,00	1031,00	58,00	1,55	55,28	47,00	57,00	984,00	41,00	3,00	2,00	1,00
	0.3	1958,33	871,00	1017,67	68,67	1,59	69,07	59,00	70,33	958,67	52,00	3,67	2,33	1,00
	0.6	1785,00	717,00	1002,00	66,00	1,63	112,77	92,00	113,00	910,00	79,00	6,00	6,00	1,00
	0.9	2070,00	1002,00	1004,00	62,00	1,54	132,47	110,00	133,00	894,00	94,00	11,00	3,00	2,00
	1.5	2048,00	945,00	1019,00	82,00	1,57	152,11	129,00	155,00	890,00	111,00	12,00	4,00	2,00

MMC - Mitomycin C, Σ - ukupan broj analiziranih ćelija, Mono-N - broj mononukleusnih ćelija, BN - broj binukleusnih ćelija, Poli-N - broj polinukleusnih ćelija, NDI - indeks jedarne deobe, MN - mikronukleusi

Tabela 7. Uticaj MMC na učestalost aberantnih ćelija i na tip hromozomskih aberacija na CHO-K1 ćelijskoj kulturi.

			Tip hromozomskih aberacija								
			Hromatidne			Hromozomske					
Tretman	MMC (nM)	Σ aberantnih ćelija	Praznina	Prekid	Σ Hromatidnih aberacija	Praznina	Prekid	Dicentrik	Ring	Acentični fragment	Σ Hromozomskih aberacija
Kontrola	0	11,0	3,7	2,0	5,70	2,0	1,0	0,0	0,0	2,3	5,30
3h	0.15	15	9	0	9	0	6	0	0	0	6
	0.3	26	17	3	20	3	1	1	0	1	6
	0.6	29	20	3	23	3	3	1	0	5	12
	0.9	30	5	9	14	1	3	0	0	4	8
	1.5	32,67	4,0	6,3	14	4,3	2,3	1,0	0,0	13,3	14
24h	0.15	10	6	0	6	4	0	0	0	0	5
	0.3	33	16	4	20	14	11	2	0	4	32
	0.6	41	8	6	14	7	10	3	1	0	21
	0.9	50	20	3	23	17	20	1	1	18	56
	1.5	76	47	7	54	32	30	2	1	45	109

MMC - Mitomycin C

Uticaj MMC na učestalost mikronukleusa u kulturi humanih limfocita

Porast koncentracije MMC, indukovao je povećanje učestalosti mikronukleusa u svim fazama ćelijskog ciklusa (tabela 8.). Distribucija mikronukleusa je bila po tipu Poasonove raspodele. Indeks jedarne deobe se povećavao u odnosu na kontrolnu vrednost sa porastom koncentracije MMC. Odabrana koncentracija MMC za dalje eksperimente je bila 1,5nM.

Tabela 8. Uticaj mitomicyn-a C na citostatski/citotoksični efekat i na oštećenje DNK indukovano u BN ćelijama u kulturi humanih limfocita.

Tretman	MMC (nM)	Citostatski/citotoksični efekat					Oštećenje DNK indukovano u BN								
		Σ	Mono-N	BN	Poli-N	NDI	Br. MN/1000 BN	Br. BN sa MN	Σ MN u BN	Distribucija MN					
										0	1	2	3	4	
Kontrola	0	2271,00	1003,67	1014,00	304,33	1,69	9,20	9,33	8,67	1005,33	8,33	0,00	0,33	0,00	
G0	0.15	2548	1095	1016	447	1,74	17,89	17	18	989	16	1	0	0	
	0.3	2055	696	1028	331	1,82	23,34	21	24	1007	18	3	0	0	
	0.6	2294	787	1094	413	1,83	26,5	26	29	1068	23	3	0	0	
	0.9	2395	1034	1041	320	1,7	37,46	37	39	1004	35	2	0	0	
	1.5	2259	776	1051	432	1,84	40,91	37	43	1014	32	4	1	0	
G1/S	0.15	2310	912	1045	353	1,75	22,96	22	24	1023	20	2	0	0	
	0.3	2110	701	1048	361	1,83	29,58	25	31	1023	20	4	1	0	
	0.6	2265	776	1053	436	1,85	40,83	41	43	1012	39	2	0	0	
	0.9	2020	567	1084	369	1,9	54,42	56	59	1028	53	3	0	0	
	1.5	1904	530	1130	244	1,85	61,94	51	70	1079	37	9	5	0	
G1/S/G2/M	0.15	2042	615	1027	400	1,89	21,42	20	22	1007	18	2	0	0	
	0.3	1711	435	1056	220	1,87	23,67	24	25	1032	23	1	0	0	
	0.6	1685	399	1033	253	1,91	28,07	26	29	1007	23	3	0	0	
	0.9	1733	547	1050	136	1,76	30,47	29	32	1021	26	3	0	0	
	1.5	1802	416	1054	341	1,95	32,53	28	34	1017	23	4	1	0	

MMC - Mitomycin C, Σ - ukupan broj analiziranih ćelija, Mono-N - broj mononukleusnih ćelija, BN - broj binukleusnih ćelija, Poli-N - broj polinukleusnih ćelija, NDI - indeks jedarne deobe, MN – mikronukleusi

Uticaj MMC na učestalost ćelija sa hromozomskim aberacijama u kulturi humanih limfocita

Sa porastom koncentracije MMC raste i procenat ćelija sa hromozomskim aberacijama u svim ispitivanim fazama ćelijskog ciklusa (tabela 9.). Odabrana je koncentracija MMC od 1,5 nM za sve tri faze ćelijskog ciklusa. U kontrolnom uzorku su dominirale aberacije hromatidnog tipa. Međutim, sa porastom koncentracije MMC, pri većim koncentracijama je došlo do dominacije aberacija hromozomskog tipa u odnosu na aberacije hromatidnog tipa.

Tabela 9. Uticaj MMC na učestalost hromozomskih aberacija i na tip hromozomskih aberacija u kulturi humanih limfocita.

			Tip hromozomskih aberacija								
			Hromatidne			Hromozomske					
Tretman	MMC (nM)	Σ aberantnih ćelija	Praznina	Prekid	Σ Hromatidnih aberacija	Praznina	Prekid	Dicentrik	Ring	Acentični fragment	Σ Hromozomskih aberacija
Kontrola	0	4,33	1,33	2,33	3,66	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,67
G0	0.15	8	3	4	7	1	0	0	0	0	1
	0.3	10	3	5	8	0	2	0	0	0	2
	0.6	13	5	6	11	0	3	0	0	2	5
	0.9	14	3	0	3	8	0	0	0	1	9
	1.5	17	5	2	7	9	1	1	0	2	13
G1/S	0.15	9	7	2	9	0	0	0	0	0	0
	0.3	12	3	1	4	6	2	0	0	2	10
	0.6	17	2	2	4	7	4	0	0	1	12
	0.9	20	2	3	5	8	8	0	0	0	16
	1.5	27	3	0	3	3	3	3	0	15	24
G1/S/G2/M	0.15	6	3	1	4	0	1	0	0	1	2
	0.3	9	2	1	3	3	1	0	0	1	5
	0.6	10	3	2	5	4	3	0	0	0	7
	0.9	13	6	1	7	2	2	1	0	1	6
	1.5	15	3	0	3	2	4	2	0	2	10

MMC - Mitomycin C

CHO-K1 ćelijska kultura

Na osnovu prethodno utvrđene vrednosti IC_{50} za fulerenol, određene su koncentracije fulerenola koje će biti primenjene na CHO-K1 ćelijsku liniju. Najviša koncentracija fulerenola u eksperimentima je bila za 50% manja u odnosu na vrednost IC_{50} , sledeća koncentracija je bila 75% niža, dok je najniža koncentracija fulerenola bila 87.5% niža u odnosu na vrednost IC_{50} . Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti iz tri merenja.

Uticaj fulerenola na učestalost mikronukleusa u CHO-K1 ćelijskoj kulturi

Tabela 10. Uticaj fulerenola na citostatski/citotoksični efekat i na oštećenje DNK indukovano u BN ćelijama CHO-K1 ćelijske kulture

Tretman	Fulerenol (μM)	Citostatski/citotoksični efekat					Oštećenje DNK indukovano u BN							
		Σ	Mono-N	BN	Poli-N	NDI	Br. MN/1000 BN	Br. BN sa MN	Σ MN u BN	Distribucija MN				
										0	1	2	3	4
Kontrola	0	2713,33	1608,00	1024,67	79,67	1,45	25,33	23,33	26,00	1001,33	21,67	0,67	1,00	0,00
3h	55,4	2152,67	1050,67	1014,33	88,33	1,56	11,13 ^{***}	10,67	11,33	1003,00	10,00	0,67	0,00	0,00
	110,8	2101,00	1018,33	1008,33	73,33	1,56	18,49 [*]	16,00	18,67	992,33	13,67	2,00	0,33	0,00
	221,6	2200,67	1111,00	1019,00	61,67	1,52	22,93	21,00	23,33	998,00	19,0	1,7	0,3	0,0
24h	27,6	1971,00	868,33	1002,67	94,67	1,6 [*]	14,83 ^{***}	14,33	15,00	993,33	13,67	0,67	0,00	0,00
	55,4	1877,00	804,33	1011,67	60,67	1,61 [*]	10,19 ^{***}	9,33	10,33	1002,33	8,33	1,00	0,00	0,00
	110,8	2007,67	911,33	1004,00	92,00	1,59 [*]	7,64 ^{****}	7,67	7,67	996,33	7,67	0,00	0	0,00

MMC - Mitomycin C, Σ - ukupan broj analiziranih ćelija, Mono-N - mononukleusne ćelije, BN - binukleusne ćelije, Poli-N - polinukleusne ćelije, NDI - indeks jedarne deobe, MN - mikronukleusi, * - statistički značajno p<0,05 (ANOVA, Fisher-LSD test), ** - statistički značajno p<0,005 (ANOVA, Fisher-LSD test), *** - statistički značajno p<0,001 (ANOVA, Fisher-LSD test).

Fulerenol je indukovao dozno zavisno smanjenje incidencije mikronukleusa u sve tri ispitivane koncentracije tokom 3h i 24h tretmana u poređenju sa kontrolnom vrednošću (tabela 10.). U 3h tretmanu ćelija, sa porastom koncentracije fulerenola, rasla je i incidencija mikronukleusa, dok je u 24h tretmanu sa porastom koncentracije fulerenola broj MN opadao.

U svim uzorcima distribucija mikronukleusa je pratila Poasonovu raspodelu. Najveći broj binukleusnih ćelija bio je sa jednim i dva mikronukleusa, najmanji sa tri i četiri mikronukleusa.

NDI indeks je bio veći u svim ispitivanim koncentracijama fulerenola u poređenju sa kontrolnim uzorkom, sa statističkom značajnošću u 24h-ovnom tretmanu.

Uticaj fulerenola na učestalost mikronukleusa u MMC-tretiranoj CHO-K1 ćelijskoj kulturi

Fulerenol je u svim primenjenim koncentracijama indukovao dozno zavisno smanjenje incidencije mikronukleusa (tabela 11.). U 3h tretmanu fulerenolom, incidencija mikronukleusa je na nižim koncentracijama bila statistički značajno manja u poređenju sa kontrolnom vrednošću, dok je vrednost NDI bila statistički značajno niža u svim analiziranim koncentracijama. 24h tretman fulerenolom je u svim ispitivanim koncentracijama indukovao statistički značajno smanjenje učestalosti mikronukleusa, dok je vrednost NDI u poređenju sa kontrolnom vrednosti bila niža u sve tri koncentracije fulerenola, sa statističkom značajnošću pri najnižoj koncentraciji. Distribucija mikronukleusa je pratila Poasonovu raspodelu.

Tabela 11. Uticaj fulerenola na citostatski/citotoksični efekat i na oštećenje DNK indukovano u BN ćelijama MMC-oštećene CHO-K1 ćelijske kulture

Tretman	Fulereno l (μ M)	MMC C (nM)	Citostatski/citotoksični efekat					DNK oštećenje indukovano u BN							
			Σ	Mono-N	BN	Poli-N	NDI	Br. MN/100 0 BN	Br. BN sa MN	Σ MN u BN	Distribucija MN				
											0	1	2	3	4
3h	0	1,5	1853,33	748,00	1020,33	79,00	1,64	40,5	37,33	41,67	989,00	34,00	2,33	1,00	0,00
	55,4		2823,0	1719,7	1008,7	94,3	1,42****	12,2****	9,7	12,3	1002,67	8,00	1,00	0,33	0,33
	110,8		2900,00	1817,33	1002,33	80,33	1,40****	19,95**	17,00	20,00	992,00	15,33	1,33	0,67	0,33
	221,6		3169,33	2085,67	1007,67	75,67	1,36***	27,77	23,67	28,00	984,00	20,33	2,33	1,00	0,00
24 h	0	0,3	1958,33	871,00	1017,67	68,67	1,59	69,07	59,00	70,33	958,67	52,00	3,67	2,33	1,00
	27,6		2172,00	1104,00	1006,33	61,33	1,52*	22,51****	18,67	22,67	987,67	17,00	0,67	0,33	0,33
	55,4		1947,67	866,67	1011,00	70,00	1,57	28,06****	26,00	27,00	985,00	25,00	1,00	0,00	0,33
	110,8		2011,00	926,00	1006,67	78,00	1,58	34,40****	31,00	34,67	975,67	28,67	1,67	0	0,67

MMC - Mitomycin C, Σ - ukupan broj analiziranih ćelija, Mono-N - mononukleusne ćelije, BN - binukleusne ćelije, Poli-N - polinukleusne ćelije, NDI - indeks jedarne deobe, * - statistički značajno $p < 0,05$ (ANOVA, Fisher-LSD test), ** - statistički značajno $p < 0,005$ (ANOVA, Fisher-LSD test), *** - statistički značajno $p < 0,001$ (ANOVA, Fisher-LSD test)

Uticaj fulerenola na učestalost ćelija sa hromozomskim aberacijama u CHO-K1 ćelijskoj kulturi

Na CHO-K1 ćelijskoj kulturi je ispitan uticaj fulerenola testom hromozomskih aberacija.

Utvrđeno je da je fulerenol u svim ispitivanim koncentracijama indukovao smanjenje učestalosti aberantnih ćelija (tabela 12.). Statistički značajno smanjenje učestalosti aberantnih ćelija bilo je u svim koncentracijama u 3h tretmanu i pri najnižoj koncentraciji fulerenola tokom 24h tretmana. Iako je u kontrolnom uzorku broj aberacija hromatidnog tipa bio neznatno veći u odnosu na aberacije hromozomskog tipa, fulerenol je pri svim ispitivanim koncentracijama i u oba vremenska tretmana uticao na dominaciju aberacija hromozomskog tipa.

Tabela 12. Uticaj fulerenola na učestalost aberantnih ćelija i na tip hromozomskih aberacija na CHO-K1 ćelijskoj kulturi

			Tip hromozomskih aberacija								
			Hromatidne			Hromozomske					
Tretman	Fulerenol (μM)	Σ ćelija sa hromozomskim aberacijama	Praznina	Prekid	Σ Aberacija hromatidnog tipa	Praznina	Prekid	Dicentrik	Ring	Acentični fragment	Σ Aberacija hromozomskog tipa
Kontrola	0	11,00	3,67	2,00	5,67	2,00	1,00	0,00	0,00	2,33	5,33
3h	11,08	6,00*	1,33	0,00	1,33	1,33	0,67	1,00	0,00	3,00	6,00
	22,16	4,33****	0,67	1,00	1,67	0,00	1,00	0,00	0,00	1,67	2,67
	44,32	5,33**	0,67	0,33	1,00	1,00	0,00	0,67	0,00	2,67	4,34
24h	11,08	7,67*	2,00	0,33	2,33	0,67	1,00	0,67	0,00	3,33	6,67
	22,16	9,00	1,00	1,33	2,33	1,33	2,00	0,67	0,33	3,00	7,33
	44,32	10,33	3,33	0,67	4,00	1,00	0,67	2,00	0,00	4,33	8,00

* - statistički značajno $p < 0,05$ (ANOVA, Fisher-LSD test), ** - statistički značajno, $p < 0,005$ (ANOVA, Fisher-LSD test), **** - statistički značajno $p < 0,001$ (ANOVA, Fisher-LSD test)

Uticaj fulerenola na učestalost ćelija sa hromozomskim aberacijama u MMC-tretiranoj CHO-K1 ćelijskoj kulturi

Testom hromozomskih aberacija je analiziran uticaj fulerenola na MMC-oštećenu ćelijsku kulturu CHO-K1. U svim ispitivanim koncentracijama fulerenola ukupan broj aberantnih ćelija je bio niži u poređenju sa kontrolnim uzorkom, sa statističkom značajnošću tokom 3h-ovnog tretmana kao i pri dve niže koncentracije fulerenola tokom 24h-ovnog tretmana (tabela 13.). MMC je u kontrolnim uzorcima indukovao dominaciju aberacija hromozomskog tipa u obe ispitivane vremenske tačke. Tretman sa fulerenolom i MMC doprineo je dominaciji aberacija hromozomskog tipa u svim uzorcima. Među hromozomskim aberacijama najviše je bilo acentričnih fragmenata

Tabela 13. Uticaj fulerenola na učestalost aberantnih ćelija i na tip hromozomskih aberacija na MMC-oštećenoj CHO-K1 ćelijskoj kulturi

				Tip hromozomskih aberacija								
				Hromatidne			Hromozomske					
Tretman	Fulerenol (µM)	MMC (nM)	Σ ćelija sa hromozomskim aberacijama	Praznina	Prekid	Σ Aberacija hromatidnog tipa	Praznina	Prekid	Dicentrik	Ring	Acentični fragment	Σ Aberacija hromozomskog tipa
3h	0	1.5	32,67	4,00	6,33	10,33	5,00	4,67	1,33	0,67	13,33	25,00
	11,08		10,67 ^{***}	4,00	1,33	5,33	0,33	0,67	1,33	0,00	5,67	8,00
	22,16		12,33 ^{***}	5,33	0,67	6,00	0,67	1,33	1,00	0,00	6,33	9,33
	44,32		14,00 ^{***}	5,33	1,33	6,66	1,33	1,00	1,33	0,00	5,00	8,66
24h	0	0.3	32,00	9,00	8,33	17,33	7,67	7,00	2,00	0,00	10,00	26,67
	11,08		15,67 ^{***}	4,00	5,00	9,00	1,67	0,67	0,33	0,00	8,33	11,00
	22,16		20,67 ^{***}	8,00	4,33	12,33	1,00	5,67	1,00	0,00	10,00	17,67
	44,32		30,67	7,67	7,67	15,34	2,33	7,00	2,67	0,00	8,33	20,33

MMC - Mitomycin C, * - statistički značajno $p < 0,05$ (ANOVA, Fisher-LSD test), ** - statistički značajno $p < 0,005$ (ANOVA, Fisher-LSD test), *** - statistički značajno $p < 0,001$ (ANOVA, Fisher-LSD test).

Kultura humanih limfocita

Na osnovu prethodno utvrđene vrednosti IC_{50} , određene su koncentracije fulerenola koje će biti primenjene na kulturu humanih limfocita. Najviša koncentracija fulerenola je bila za 50% manja u odnosu na vrednost IC_{50} , sledeća koncentracija je bila 75% niža dok je najniža koncentracija fulerenola bila 87.5% niža u odnosu na vrednost IC_{50} . Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti iz tri merenja.

Uticaj fulerenola na učestalost mikronukleusa u kulturi humanih limfocita

Uticaj fulerenola na učestalost mikronukleusa u kulturi humanih limfocita analiziran je tokom tri faze ćelijskog ciklusa (G0, G1/S i G1/S/G2/M). Incidencija mikronukleusa je u svim koncentracijama fulerenola u odnosu na kontrolnu vrednost bila niža prema dozno-zavisnom obrascu (tabela 14.). Statistička značajnost se uočava pri višim koncentracijama fulerenola u sve tri ispitivane faze ćelijskog ciklusa (G0, G1/S i G1/S/G2/M). Distribucija mikronukleusa prati Poasonovu raspodelu. Indeks jedarne deobe je viši u G0 i G1/S fazi ćelijskog ciklusa, kao i pri dve najviše koncentracije fulerenola.

Tabela 14. Uticaj fulerenola na citostatski/citotoksični efekat i na oštećenje DNK indukovano u BN ćelijama u kulturi humanih limfocita

Tretman	Fulerenol (μM)	Citostatski/citotoksični efekat					Oštećenje DNK indukovano u BN							
		Σ	Mono-N	BN	Poli-N	NDI	Br. MN/1000 BN	Br. BN sa MN	Σ MN u BN	Distribucija MN				
										0	1	2	3	4
Kontrola	0	2096,67	658,00	1070,33	372,33	1,85	10,46	11,33	11,33	1055,00	11,33	0,00	0,00	0,00
G0	11,08	1875,67	530,67	1015,00	330,00	1,89	8,54	8,33	8,67	1006,67	8,00	0,33	0,00	0,00
	22,16	1944,00	557,67	1066,67	319,67	1,87	5,56*	5,67	6,00	1061,00	5,33	0,33	0,00	0,00
	44,32	1780,00	435,00	1058,33	286,67	1,91	3,84***	3,67	4,00	1054,67	3,33	0,33	0,00	0,00
G1/S	27,65	2364,67	984,67	1015,67	507,00	1,86	7,20	7,00	7,33	1008,67	6,67	0,33	0,00	0,00
	55,30	2281,33	717,33	1040,67	523,33	1,91	6,69*	7,00	7,00	1033,667	7,00	0,00	0,00	0,00
	110,8	2234,00	719,33	1039,67	475,00	1,88	5,12**	5,33	5,33	1034,33	5,33	0,00	0,00	0,00
G1/S/ G2/M	27,65	1575,67	402,00	1017,67	156,00	1,84	8,49	7,00	8,67	1010,67	5,33	1,67	0,00	0,00
	55,4	1860,00	565,33	1021,00	273,67	1,84	3,58***	3,33	3,67	1017,67	3,00	0,33	0,00	0,00
	110,8	1667,00	411,67	1055,00	200,33	1,87	1,25***	1,00	1,33	1054,00	0,67	0,33	0,00	0,00

Σ - ukupan broj analiziranih ćelija, Mono-N - mononukleusne ćelije, BN - binukleusne ćelije, Poli-N - polinukleusne ćelije, NDI - indeks jedarne deobe, MN - mikronukleusi, * - statistički značajno p<0,05 (ANOVA, Fisher-LSD test), ** - statistički značajno p<0,005 (ANOVA, Fisher-LSD test), *** - statistički značajno p<0,001 (ANOVA, Fisher-LSD test)

Uticaj fulerenola na učestalost mikronukleusa u MMC-tretiranoj kulturi humanih limfocita

Učestalost mikronukleusa je u sve tri ispitivane faze ćelijskog ciklusa (G0, G1/S i G1/S/G2/M) bila statistički značajno niža u odnosu na kontrolnu vrednost (tabela 15.). Distribucija mikronukleusa je bila prema Poasonovoj raspodeli. Indeks jedarne deobe je bio u sve tri faze ćelijskog ciklusa niži u odnosu na kontrolnu vrednost, sa statističkom značajnošću pri najnižoj koncentraciji fulerenola u G1/S fazi ćelijskog ciklusa.

Tabela 15. Uticaj fulerenola na citostatski/citotoksični efekat i na oštećenje DNK indukovano u BN ćelijama MMC-oštećene kulture humanih limfocita

Tretman	Ful. (μ M) + MMC (1,5 nM)	Citostatski/citotoksični efekat					Oštećenje DNK indukovano u BN								
		Σ	Mono-N	BN	Poli-N	NDI	Br. MN/1000 BN	Br. BN sa MN	Σ MN u BN	Distribucija MN					
										0	1	2	3	4	
G0	0	2577,33	1178,33	1038,33	360,67	1,68	39,15	34,67	40,67	1003,67	29,67	4,00	0,67	0,00	
	11,08	2160,00	941,67	1041,00	177,33	1,64	16,68 ^{****}	16,67	17,33	1024,33	16,00	0,67	0,00	0,00	
	22,16	2267,00	1034,00	1040,00	226,33	1,65	13,45 ^{****}	13,00	14,00	1027,00	12,00	1,00	0,00	0,00	
	44,3	2129,00	878,00	1045,33	205,33	1,68	11,40 ^{****}	10,67	12,00	1034,67	10,00	0,33	0,00	0,33	
G1/S	0	2153,00	802,67	1079,33	271,00	1,76	57,01	52,33	61,67	1027,00	44,67	6,00	1,67	0,00	
	27,65	2064,00	922,67	1024,00	120,33	1,61	16,59 ^{****}	16,67	17,00	1007,33	16,33	0,33	0,00	0,00	
	55,4	2287,33	1048,00	1018,00	221,33	1,63	18,33 ^{****}	17,33	18,67	1000,67	16,00	1,33	0,00	0,00	
	110,8	2003,33	875,00	1034,00	137,67	1,64	14,82 ^{****}	14,67	9,00	1019,33	14,00	0,67	0,00	0,00	
G1/S/G2 /M	0	1866,33	644,33	1050,33	173,67	1,75	32,46	29,67	34,00	1017,67	25,67	3,67	0,33	0,00	
	27,65	1811,00	694,33	1035,67	81,00	1,66	15,45 ^{****}	14,00	16,00	1021,67	12,33	1,33	0,33	0,00	
	55,4	2127,33	895,33	1026,67	205,33	1,67	16,22 ^{****}	14,67	16,67	1012,00	13,33	1,00	0,00	0,33	
	110,8	1806,67	690,67	1019,67	96,33	1,68	10,12 ^{****}	10,00	10,33	1009,67	9,67	0,33	0,00	0,00	

MMC - Mitomycin C, Σ - ukupan broj analiziranih ćelija, Mono-N - mononukleusne ćelije, BN - binukleusne ćelije, Poli-N - polinukleusne ćelije, NDI - indeks jedarne deobe, * - statistički značajno $p < 0,05$ (ANOVA, Fisher-LSD test), ** - statistički značajno $p < 0,005$ (ANOVA, Fisher-LSD test), *** - statistički značajno $p < 0,001$ (ANOVA, Fisher-LSD test)

Uticaj fulerenola na učestalost ćelija sa hromozomskim aberacijama u kulturi humanih limfocita

U kulturi humanih limfocita je ispitan uticaj fulerenola testom hromozomskih aberacija u tri faze ćelijskog ciklusa (G0, G1/S i G1/S/G2/M). Uočeno je da fulerenol utiče na statistički značajno smanjenje učestalosti hromozomskih aberacija u sve tri faze ćelijskog ciklusa u poređenju sa kontrolnom vrednošću (tabela 16.). U kontrolnom uzorku je dominirao hromatidni tip aberacija. Fulerenol je doprineo da ukupan broj aberacija hromatidnog tipa bude veći u poređenju sa ukupnim brojem aberacija hromozomskog tipa u svim fazama ćelijskog ciklusa.

Tabela 16. Uticaj fulerenola na učestalost aberantnih ćelija i na tip hromozomskih aberacija u kulturi humanih limfocita

			Tip hromozomskih aberacija								
			Hromatidne			Hromozomske					
Tretman	Fulerenol (μM)	Σ ćelija sa hromozomskim aberacijama	Praznina	Prekid	Σ Aberacija hromatidnog tipa	Praznina	Prekid	Dicentrik	Ring	Acentični fragment	Σ Aberacija hromozomskog tipa
Kontrola	0	4,33	1,33	2,33	3,66	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,67
G0	5,54	2,00*	1,33	0,33	1,66	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33
	11,08	1,67**	0,67	1,00	1,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	22,16	0,67***	0,00	0,67	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G1/S	11,08	2,33*	0,67	0,67	1,34	0,67	0,33	0,00	0,00	0,00	1,00
	22,16	2,00***	1,00	0,67	1,67	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,67
	44,32	1,67**	1,00	0,00	1,00	0,33	0,33	0,00	0,00	0,00	0,66
G1/S/G2/M	55,4	1,00***	0,67	0,33	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	110,8	1,00***	0,67	0,00	0,67	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33
	221,6	0,67***	0,33	0,33	0,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

* - statistički značajno $p < 0,05$ (ANOVA, Fisher-LSD test), ** - statistički značajno $p < 0,005$ (ANOVA, Fisher-LSD test), *** - statistički značajno $p < 0,001$ (ANOVA, Fisher-LSD test)

Uticaj fulerenola na učestalost ćelija sa hromozomskim aberacijama u MMC-tretiranoj kulturi humanih limfocita

Fulerenol je u svim ispitivanim koncentracijama i u sve tri faze ćelijskog ciklusa (G0, G1/S i G1/S/G2/M) uticao na statistički značajno, dozno zavisno, smanjenje učestalosti hromozomskih aberacija u odnosu na kontrolnu vrednost (tabela 17.). U kontrolnim uzorcima, MMC je uzrokovao dominaciju aberacija hromozomskog tipa. Međutim, fulerenol je u G1/S i G1/S/G2/S/M fazama ćelijskog ciklusa doprineo većem broju aberacija hromatidnog tipa.

Tabela 17. Uticaj fulerenola na učestalost aberantnih ćelija i na tip hromozomskih aberacija u MMC-oštećenoj kulturi humanih limfocita

			Tip hromozomskih aberacija								
			Hromatidne			Hromozomske					
Tretman	Ful.(μ M) +MMC (1,5 nM)	Σ ćelija sa hromozom -skim abercijama	Praznina	Prekid	Σ Aberacija hroma -tidnog tipa	Praznina	Prekid	Dicentrik	Ring	Acentični fragment	Σ Aberacija hromozom -kog tipa
G0	0	17,33	4,67	1,67	6,34	7,00	1,67	0,67	0,00	2,00	11,34
	5,54	7,67 ^{***}	1,67	2,00	3,67	0,67	2,33	0,00	0,00	1,00	4,00
	11,08	6,00 ^{***}	1,67	1,67	3,34	0,33	1,00	0,00	0,00	2,33	3,66
	22,16	5,00 ^{***}	2,67	1,67	4,34	0,33	0,33	0,00	0,00	0,00	0,66
G1/S	0	27,33	2,33	1,33	3,66	3,00	3,00	3,00	0,00	13,33	22,33
	11,08	4,33 ^{***}	1,00	1,33	2,33	1,00	0,33	0,00	0,00	0,67	2,00
	22,16	3,00 ^{***}	1,33	0,67	2,00	0,00	0,67	0,00	0,00	0,33	1,00
	44,32	2,67 ^{***}	1,00	0,67	1,67	1,00	0,00	0,33	0,00	0,00	1,33
G1/S/G2/ S/M	0	15,33	3,33	0,67	4,00	2,33	5,00	1,67	0,00	2,67	9,00
	55,4	5,33 ^{***}	2,33	1,00	3,33	0,33	0,67	0,00	0,00	1,00	2,00
	110,8	2,67 ^{***}	1,33	1,00	2,33	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,33
	221,6	2,33 ^{***}	2,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

MMC - Mitomycin C, * - statistički značajno $p < 0,05$ (ANOVA, Fisher-LSD test), ** - statistički značajno $p < 0,005$ (ANOVA, Fisher-LSD test), *** - statistički značajno $p < 0,001$ (ANOVA, Fisher-LSD test)

DISKUSIJA

Nanomaterijali zahvaljujući svojim malim dimenzijama i raznovrsnim fizičko-hemijskim osobinama imaju velik potencijal za primenu u različitim oblastima života. Fuleren C_{60} , najreprezentativniji među fulerenima, pruža mogućnosti za široku upotrebu u biomedicini. Derivatizacijom fulerena može se prevazići njegova slaba vodorastvorljivost pri čemu fuleren stiče nova svojstva koja ujedno određuju i njegovu upotrebu.

Dosadašnja saznanja o toksičnosti fulerena i njegovih derivata su kontradiktorna, što je i opisano u uvodnom delu. Sa jedne strane se ističe da pod određenim uslovima fulereni mogu da indukuju prooksidativni efekat, a sa druge mogu da redukuju oksidativni stres. Zbog toga je neophodno definisanje koncentracija i uslova pod kojima fuleren i njegovi derivati deluju kao antioksidanti odnosno prooksidanti. Taj aspekt je veoma važan zbog uticaja ovih nanočestica na DNK i određuje u velikoj meri njihova genotoksična odnosno antigenotoksična svojstva. Pored uticaja koncentracije nanočestica na oksidativni status, na genotoksičnost utiču i fizičko-hemijske karakteristike samih nanočestica kao što su: veličina, oblik, površinsko naelektrisanje, čistoća, rastvorljivost, površinske modifikacije i agregacija, koje je takođe potrebno precizno definisati. Ispitivanje uticaja novosintetisanih supstanci, sa potencijalom za medicinsku aplikaciju, na DNK, predstavlja neophodan korak pre faze kliničkih studija.

Zbog svega navedenog, primarni cilj ovog rada se odnosi upravo na ispitivanje genotoksičnih odnosno antigenotoksičnih svojstava vodorastvornog fulerenskog derivata fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$, na dva različita sisarska modela. Prvi model jeste ćelijska linija ovarijuma kineskog hrčka CHO-K1, standardna u analizama genotoksičnosti u *in vitro* modelima. Kao drugi model korištena je primarna ćelijska kultura humanih limfocita, čija prednost se temelji na činjenici da su limfociti *ex vivo* bliski odgovoru *in vivo*.

U radu je prvo izvršena evaluacija fizičko-hemijskih karakteristika nanočestica fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ u medijumu za ćelijske kulture sa serumom i to u uslovima koji odgovaraju eksperimentalnim uslovima u testovima mikronukleusa i hromozomskih aberacija. Zatim je ispitan uticaj fulerenola na preživljavanje ćelija u cilju utvrđivanja subcitotoksičnih koncentracija fulerenola, potrebnih za ispitivanje genotoksičnosti i

antigenotoksičnosti fulerenola. Nakon toga je izvršena evaluacija incidencije biomarkera oštećenja DNK radi utvrđivanja genotoksičnog potencijala fulerenola. U posljednjem segmentu rada je evaluacijom istih biomarkera analiziran i antigenotoksičan potencijal fulerenola, na ćelijskim kulturama koje su prethodno oštećene poznatim citostatskim agensom mitomicinom C.

Fizičko-hemijske karakteristike fulerenola

U uvodnom delu ovog rada je istaknuto da *in vitro* testiranje genotoksičnosti supstanci omogućava identifikaciju primarne genotoksičnosti NČ, koja može rezultirati iz direktnog (npr. fizička interakcija između NČ i DNK) ili indirektnog uticaja supstance na DNK (npr. formiranje ROS od strane nanočestica) (Stone i sar., 2009). Zbog toga je u analizi genotoksičnosti neke supstance, pored samih biomarkera oštećenosti DNK, važno sagledati i uticaj ostalih elemenata kao što su, na primer, veličina fulerenolskih nanočestica, stepen agregacije, naelektrisanje, morfologija čestica i drugo. Veoma je važno, pritom, da nanočestice budu u istim uslovima u kojima se vrše i eksperimenti ispitivanja njihovog genotoksičnog potencijala (Editorial, 2010). Zbog toga je u ovom radu izvršena analiza fizičko-hemijskih karakteristika fulerenola u medijumu za ćelijsku kulturu sa 10%, 15% i 20% fetalnog goveđeg seruma, tokom 24h na 37°C, identično eksperimentalnim uslovima u kojima su održavane ćelijske kulture.

Analizom morfologije fulerenolskih nanočestica, utvrđeno je da one grade nehomogen sistem u vodenom rastvoru. Nanočestice fulerenola su raspoređene po terasama HOPG, što ukazuje na njihovu polarnost, saglasno merenjima naelektrisanja nanočestica kao i literaturnim podacima (Brant i sar., 2007, Vilenko i sar., 2006). Dimenzije nanočestica fulerenola, slikane AFM, su 64nm i sastoje se od dve nanočestice od oko 32nm, što je potvrđeno DLS merenjem, kojim se detektuje prisustvo familije čestica od 42nm. Uzimajući u obzir da je izmeren hidrodinamički radijus R_H metodom DLS, veći od realnog, može se zaključiti da su AFM i DLS merenja u saglasnosti (slike 12. i 18.). Familije čestica sa najvećim intenzitetom od 383nm nisu detektovane AFM. Ova familija nije detektovana ni u raspodeli čestica po broju i zapremini. Najbrojnija izmerena familija čestica od 9nm (slika 12. b i c), je u

saglasnosti sa literaturnim podacima stabilnog nanoagregata fulerenola od 7 molekula ($C_{60}(OH)_{24}$)₇ (Piatek i sar., 2011) (slika 5.). Mikroskopijom atomskih sila uočava se takođe i da su nanočestice fulerenola dimenzija 35nm i 29nm (slika 12.). Prenosnom elektronskom mikroskopijom (TEM), utvrđeno je da nanočestice fulerenola u vodi grade stabilne nanoagregate od oko 5nm, saglasno merenjima Branta i sar. (Brant i sar., 2006) a što je u korelaciji sa DLS merenjima (slika 12. b i c). Naši rezultati analize veličine nanočestice fulerenola u vodi su u skladu sa rezultatima do sada publikovanih radova, prema kojima je veličina čestica fulerenola u vodenom rastvoru manja od 100nm (Brant i sar., 2007, Chen i Elimelech, 2006, Assemi i sar., 2010), a takođe su saglasni i sa komercijalnim proizvodom $C_{60}(OH)_x(ONa)_y$ ($x+y=24$; $y=6-8$) korporacije MER, Tucson, AZ, USA (Chao i sar., 2011).

U demineralizovanoj i deaerisanoj vodi izmerena je pH vrednost od 6,8. Pri nižim pH vrednostima, polianjonske nanočestice fulerenola su više protonovane, dok su pri višim pH vrednostima više negativno naelektrisane. Polianjonski oblik fulerenola, kao i naelektrisanje fulerenolskih nanočestica u vodi je u funkciji pH. Analizom raspodele nanočestica fulerenola u vodi prema naelektrisanju, uočavaju se tri familije izrazito negativno naelektrisanih fulerenolskih čestica (slika 12.d), što je u korelaciji sa raspodelom čestica po intenzitetu (slika 12.a) kao i literaturnim podacima (Piatek i sar., 2011). Veće čestice imaju veće negativno naelektrisanje, što je i očekivano uzimajući u obzir ukupnu površinu i radijus molekula fulerenola od 1,1 nm. Molekuli fulerenola u vodi se nalaze u manje ili više protonovanom obliku, što je potvrđeno DLS merenjima raspodele čestica i naelektrisanja a saglasno rezultatima Branta i sar. (Brant i sar., 2007).

U radu je izvršena analiza medijuma za ćelijsku kulturu sa najvećim korišćenim procentom fetalnog goveđeg seruma. AFM analizom je utvrđeno da su u medijumu zastupljene čestice u rasponu veličine od 6nm do 110nm. Najzastupljenije čestice, najverovatnije proteina (albumina), su veličine 11nm i 50nm. AFM-om je takođe pokazana nehomogenost rastvora usled prisustva čestica različite veličine (slika 19.-22.). Naime, agregacijom manjih čestica proteina formiraju se veće čestice proteina preko 40 nm, što odgovara nalazu raspodele čestica DLS metodom (slika 13.a, 14.).

Definisanje prisustva i veličine agregata nanočestica u odgovarajućem medijumu je važno, jer sama agregacija uzrokuje značajno povećanje veličine nanočestica, što za

posledicu može imati otežani prolazak agregata kroz ćelijsku membranu odnosno otežani transport NČ u organizmu (Oberdorster i sar., 2004). Mikroskopijom atomskih sila u našem radu je utvrđeno da u medijumu za ćelijsku kulturu sa serumom, fulerenolske nanočestice grade stabilne nanočestice u rastvoru u posmatranom vremenu i pri temperaturi od 37°C. Nanočestice fulerenola u medijumu sa 15% FCS su u formi aglomeriranih agregata veličine 227nm, sačinjenih od većih agregata veličine 104nm odnosno 108nm i manjih sferičnih čestica od 49nm. Na osnovu veličine manje čestice, pretpostavljamo da je u pitanju nanočestica proteina - najverovatnije albumina iz seruma. Sa povećanjem procenta seruma u medijumu za ćelijsku kulturu na 20%, uočavaju se nanočestice veličine od 180nm do 220nm. Agregat fulerenola je veličine 211nm, dok manja, loptasta čestica od 48nm verovatno predstavlja nanočesticu albumina iz seruma. Upoređivanjem raspodele po intenzitetu čestica proteina u medijumu za ćelijsku kulturu sa 20% FCS i fulerenola istom medijumu sa 20% FCS, može se uočiti da je familija malih čestica manje zastupljena u uzorku sa fulerenolom. Ova činjenica ukazuje na verovatnu agregaciju proteina seruma sa malim česticama fulerenola.

Prema literaturnim podacima, agregati $C_{60}(OH)_{24}$ u medijumu za ćelijsku kulturu sa 10% fetalnog telećeg seruma su dispergovani i stabilniji od agregata fulerenola u vodi ili u medijumu bez seruma (Su i sar., 2010, Cai i sar., 2008). Naši rezultati dobijeni mikroskopijom atomskih sila su u saglasnosti sa navedenim podacima kada je u pitanju stabilnost fulerenola u medijumu za ćelijsku kulturu sa fetalnim goveđim serumom.

Poznato je da proteini iz seruma mogu značajno uticati na same NČ i agregaciju NČ, pa s tim u vezi i njihovu toksičnost. Smatra se da je oblaganje NČ proteinima proces koji se verovatno dešava brže od agregacije na šta ukazuje pojava da na primer zlatne NČ u medijumu bez seruma (proteina) agregiraju, dok su u medijumu sa serumom stabilne (Casals i sar., 2010). Prisustvo proteina utiče i na stabilizaciju ugljeničnih nanocevi (Elgrabli i sar., 2007), a kada se u medijum doda još seruma, proporcionalno sadržaju proteina, dolazi čak i do deaglomeracije aglomeriranih ZrO_2 , CeO_2 i TiO_2 nanočestica (Schulze i sar, 2008). Kada je u pitanju fuleren C_{60} , poznato je da prisustvo proteina u fiziološkoj sredini (humanog serum albumina) dovodi do stabilizacije fulerena odnosno sprečava aglomeraciju C_{60} indukovanu solima (Deguchi i sar., 2007).

Sa druge strane, prisustvo proteina može uticati i na reakciju nanočestica sa biomolekulima, kao i na generisanje slobodnih radikala. Sudbina NČ u telu i štetan/koristan odgovor ćelija na njih je u velikoj meri povezan sa događajima koji se odvijaju na površini samih NČ. To se naročito odnosi na: modifikaciju površinskih karakteristika što utiče na biodistribuciju, promene u sastavu bioloških tečnosti, promene fizioloških funkcija biomakromolekula, nastanak bioaktivnih protein/NČ agregata ili aglomerata. (Lynch i Dawson, 2008). U toku formiranja agregata ili aglomerata NČ i proteina može doći i do hemijskog vezivanja i formiranja novih stabilnih adukata.

Naši rezultati koji pokazuju razliku u veličini nanočestice fulerenola u vodi i u medijumu za ćelijsku kulturu sa serumom, potvrđuju da se oblik i raspodela nanočestica fulerenola menjaju u zavisnosti od prisustva kosolventa, kao i da prisustvo proteina iz seruma doprinosi stabilizaciji agregata fulerenola u medijumu za ćelijsku kulturu sa serumom.

Od ne manjeg značaja je i činjenica da su eksperimentalni rezultati vezani za sintezu nanočestice fulerenola u korelaciji sa publikovanim rezultatima za fulerenole sintetisane različitim hemijskim postupcima (Chao i sar., 2011), kao i sa komercijalnim proizvodom korporacije MER, Tucson, AZ, USA.

Citotoksičnost fulerenola

U analizi genotoksičnosti neke supstance, koriste se subcitotoksične koncentracije te supstance. Da bi se one odredile, prvi korak predstavlja skrining nekoliko različitih koncentracija supstance odabranim testom citotoksičnosti i određivanje vrednosti IC₅₀, odnosno one koncentracije supstance koja dovodi do inhibicije rasta 50% ćelija.

U ovom radu je za analizu citotoksičnosti fulerenola upotrebljen DET test, kojim je ispitana serija od 5 koncentracija fulerenola. Eksperimentalni model, uslovi i protokol su bili isti kao i tokom ispitivanja genotoksičnosti testovima mikronukleusa i hromozomskih aberacija. Ti uslovi se odnose na: dužinu inkubacije ćelijske kulture, tretman fulerenolom, kao i standardne korake koji se vrše u testovima mikronukleusa (stimulacija deobe ćelija mitogenom-PHA i prekid proliferacije ćelija Cyt-B) i

hromozomskih aberacija (stimulacija deobe ćelija mitogenom-PHA i prekid proliferacije ćelija kolcemidom).

Vijabilnost ćelija pre početka tretmana u obe ćelijske kulture je bila visoka (tabele 2., 3., 4. i 5.), što je zadovoljavajuće za početak eksperimenata na datim ćelijama. Pri najnižim koncentracijama fulerenola uočen je proliferativni efekat na oba ispitivana biološka modela (grafikoni 2., 7. i 10.), dok je sa porastom koncentracije fulerenola, citotoksičnost rasla (tabele 2., 3., 4. i 5.). Utvrđene su IC_{50} vrednosti na CHO-K1 ćelijskoj kulturi (grafikoni 1., 2., 3. i 4.) i za humane limfocite (grafikoni 5., 6. i 7.).

Direktno upoređivanje podataka o IC_{50} između različitih studija je veoma teško usled razlika u pogledu korištenih ćelijskih linija, metoda kao i samog eksperimentalnog dizajna. Dosadašnja saznanja o citotoksičnosti $C_{60}(OH)_n$ uglavnom idu u prilog činjenici da fulerenol ima zanemarljivu toksičnost u relativno velikim koncentracionim intervalima, mada se u nekim studijama prikazuje i njegov citotoksičan potencijal.

Literaturni podaci pokazuju da je citotoksičnost $C_{60}(OH)_{24}$ analizirana tokom različitih vremenskih tretmana od 33-dnevnog, 8-dnevnog, do 72h, 48h, 24h i 3h (Sayes i sar., 2004, Niwa i Iwai, 2006, Yamawaki i Iwai, 2006, Isaković i sar., 2006, Gelderman i sar., 2008, Cai i sar., 2008).

33-dnevni tretman ćelijskih kultura sa $C_{60}(OH)_{24}$ u koncentracijama od 1pg/mL do 1 μ g/mL ne dovodi do povećanja aktivnosti LDH (laktat dehidrogenaze) u medijumu, što ukazuje na odsustvo citotoksičnosti pri ispitivanim koncentracijama na netransformisanim ćelijskim kulturama ovarijuma kineskog hrčka CHO i bubrega humanog embriona HEK293 kao i na karcinomskim humanim epidermalnim ćelijama Hela. Autori ovo tumače sposobnošću fulerenola da skuplja ROS i štiti ćelije od ćelijske smrti (Niwa i Iwai, 2006).

Tokom 8-dnevnog tretmana fulerenolom ćelijske kulture humane umbilikalne vene HUVEC, pri koncentraciji od 1 μ g/mL, takođe nema značajnijeg efekta na ćelije. Sa porastom koncentracije fulerenola na 10 μ g/mL, dolazi do morfoloških promena u ćelijama tipa formiranja vakuola i smanjenja rasta kultura. Ove promene se interpretiraju kao potencijalni rizik za kardiovaskularne bolesti, uključujući aterosklerozu i ishemijsku bolest srca (Yamawaki i Iwai, 2006).

72h tretman ćelija neuroblastoma (SK-N-MC) sa $C_{60}(OH)_{24}$, pri koncentraciji manjoj od 100 μ M ukazuje na odsustvo citotoksičnosti (Cai i sar., 2008).

48h tretman sa $C_{60}(OH)_{24}$ ne uzrokuje citotoksičnost do koncentracije od 5 000 000 ppb (5mg/mL) na humanim dermalnim fibroblastima HDF i humanim ćelijama karcinoma jetre HepG2. Upoređujući toksičnost različitih fullerenskih vodorastvornih derivata, uočava se da su C_3 (malonski derivat C_{60}) i $Na^{+2-3}[C_{60}O^{7-9}(OH)^{12-15}]^{(2-3)}$ toksičniji u odnosu na $C_{60}(OH)_{24}$, sa IC_{50} za C_3 pri koncentraciji od 10 000 ppb, a za $Na^{+2-3}[C_{60}O^{7-9}(OH)^{12-15}]^{(2-3)}$ pri koncentraciji od 40 000 ppb. Autori zaključuju da citotoksični efekat $C_{60}(OH)_{24}$ zavisi od hemijskih promena na površini molekula, kao i da male izmene u strukturi fulerenola mogu dovesti do značajnih promena u pogledu citotoksičnosti (Sayes i sar., 2004). Takođe, tokom 48h tretmana ćelija neuroblastoma (SK-N-MC), sa $C_{60}(OH)_{24}$ u koncentracijama manjim od 100 μ M, nema uticaja na ćelijsku proliferaciju (Cai i sar., 2008).

24h tretman fulerenolom pri koncentracijama manjim od 100 μ M, ne indukuje citotoksični efekat na ćelijama neuroblastoma (Cai i sar., 2008).

Naši rezultati vezani za citotoksičnost fulerenola pripadaju nižem koncentracionom opsegu u poređenju sa navedenim rezultatima Sayes-a i Cai-a, pri čemu je najviša vrednost IC_{50} u našem radu pri koncentraciji od 0.5 mg/mL (443.2 μ M) čak 10 puta niža od navedene koncentracije Sayes-a i saradnika. Ove razlike mogu se pripisati razlikama koje potiču od izbora biološkog modela i dužine tretmana.

U drugoj studiji, tokom 24h tretmana maligno transformisanih ćelijskih linija sa $C_{60}(OH)_n$, vrednost IC_{50} je bila u opsegu 0.8-1 mg/mL, što je takođe, u saglasnosti sa našim rezultatima. Za razliku od fulerenola, C_{60} je bio toksičniji sa vrednošću IC_{50} od 0.25 μ g/mL na ispitivanim ćelijskim linijama astrocitoma pacova (C6), humanog glioma (U251) i mišjeg fibrosarkoma (L929). Autori zaključuju da fulerenol nije indukovao različit citotoksični efekat u primarnim odnosno trajno transformisanim ćelijskim kulturama. Takođe ni $C_{60}(OH)_n$ ni nano C_{60} nisu uzrokovali efekte specifične za vrstu odnosno tip ćelijske kulture (Isaković i sar., 2006).

Suprotno prethodnom istraživanju, $C_{60}(OH)_{24}$ je takođe tokom 24h tretmana, pri koncentraciji 0.1 mg/mL u ćelijskoj kulturi humane umbilikalne vene HUVEC pokazao citotoksičnost odnosno apoptozu i ćelijsku smrt autofagijom (Yamawaki i Iwai, 2006, Gelderman i sar., 2008). Naime, pri koncentraciji od 0.01 mg/mL došlo je do blagih morfoloških promena na endotelnim HUVEC ćelijama ali ne i do oštećenja ćelijske membrane ili inhibicije rasta. Povećanje koncentracije $C_{60}(OH)_{24}$ na 0.1 mg/mL

uzrokovalo je citotoksičnost i inhibiciju rasta ćelija. Uočeno je nagomilavanje poliubikvitina i fulerenskih agregata u autofagozomima kao i aktivacija autofagije kao alternativnog puta ćelijske smrti (Yamawaki i Iwai, 2006).

$C_{60}(OH)_{24}$ pri koncentraciji od 0.1mg/mL na istom eksperimentalnom modelu, umesto autofagije indukuje proinflamatorni odgovor, razvoj intraćelijskog Ca i apoptozu. Autori su postavili hipotezu da fulerenol može da aktivira Ca^{2+} kanale na ćelijskoj membrani ili da kreira nove kanale, kojima će se ubrzati ulazak Ca^{2+} u ćeliju, povećati intraćelijski Ca i indukovati aktivacija i/ili apoptoza (Gelderman i sar., 2008). Upoređujući rezultate ovog rada sa našim rezultatima tokom 24h tretmana CHO-K1 ćelijske linije pri približno istoj koncentraciji od 0.125 mg/mL (110.8 μ M) (tabela 10.), uočavamo razliku, jer fulerenol na našem modelu nije delovao citotoksično. Razlika u rezultatima našeg i rada Gelderman-a i saradnika, mogla bi da potiče upravo od razlika koje postoje između korištenih ćelijskih kultura, na šta ukazuje Su sa saradnicima, koji ističe da citotoksičnost fulerenola $C_{60}(OH)_x$ zavisi od tipa ćelija, dužine tretmana, hemijskih modifikacija i koncentracije (Su i sar., 2010).

Genotoksičnost fulerenola

Analizom genotoksičnosti fulerenola testom mikronukleusa i hromozomskih aberacija utvrđeno je da fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ nije genotoksičan i to: pri ispitivanim subcitotoksičnim koncentracijama, pri datim vremenskim tretmanima, kao i na ispitivanim ćelijskim kulturama (tabele 10., 12., 14. i 16.).

Literaturni podaci o genotoksičnosti $C_{60}(OH)_{24}$ su za sada još uvek veoma oskudni. Takođe, otežano je direktno upoređivanje rezultata biomarkera oštećenosti DNK između studija, usled razlika u eksperimentalnom dizajnu. Tako su na primer, Niwa i Iwai (2006) analizirali uticaj fulerenola pri veoma niskim koncentracijama od 10, 100 ili 1000 pg/mL na CHO, HeLa i HEK293 tokom 80 dana. Nakon 33. dana inkubacije sa fulerenolom, nije bilo promena u ćelijskoj morfologiji CHO ćelijske kulture, što autori objašnjavaju mitogenom aktivnošću fulerenola. Međutim, u sve tri ćelijske linije utvrđen je povećan broj mikronukleusa nakon tretmana fulerenolom. CHO i HEK293, netumorske ćelijske kulture, bile su osetljivije u pogledu pojave mikronukleusa u

poređenju sa Hela ćelijskom kulturom. Ipak, autori smatraju da nastanak MN u tretmanu sa $C_{60}(OH)_{24}$ nije rezultat oštećenja hromozoma genotoksičnim molekulima koji potiču od fulerenola (kao što su ROS), nego je povezan sa greškama tokom deobe DNK, kada je moguće da jedan hromozom zaostane i formira mikronukleus. Ostaje međutim nejasno, da li su autori ovu pojavu povezali sa dejstvom fulerenola ili je to možda rezultat spontane transformacije ćelijske kulture usled genomske nestabilnosti koja se javlja tokom dugotrajnih pasažiranja (Niwa i Iwai, 2006).

Odsustvo genotoksičnih efekata fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$, utvrđeno je takođe i u studiji Kojić i saradnika (2005) na ćelijskim linijama humanog kancera dojke MCF7 i MDA-MB-231. Naime, testom mikronukleusa i izmena sestrinskih hromatida, nije utvrđeno genotoksično dejstvo fulerenola pri koncentracijama 1-5 $\mu\text{g/mL}$. Naši rezultati, koji pokazuju smanjenje incidencije mikronukleusa i hromozomskih aberacija, u skladu su sa navedenim studijama, u kojima se takođe prikazuje odsustvo genotoksičnosti fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$.

Nadalje, fulerenol je u našem radu indukovao dozno zavisno smanjenje incidencije mikronukleusa i hromozomskih aberacija u sve tri ispitivane koncentracije tokom 3h i 24h tretmana na ćelijskoj liniji CHO-K1 (tabele 10. i 12.). U gotovo svim slučajevima su niže koncentracije fulerenola imale bolji protektivni efekat. Međutim, jedino je tokom 24h tretmana u testu CBMN, za razliku od 24h tretmana u testu HA, incidencija MN opadala sa porastom koncentracije fulerenola. Ovaj trend mikronukleusa ukazuje na činjenicu da fulerenol pri većoj koncentraciji nakon nekoliko ćelijskih ciklusa ostvaruje bolju ćelijsku protekciju.

U pokušaju tumačenja ove pojave, pošlo se od činjenice da je u testu hromozomskih aberacija metodološki princip da se, nakon tretmana ispitivanom supstancom, analiziraju hromozomi koji nisu prošli više od jednog ćelijskog ciklusa. Na taj način se mogu uočiti nebalansirane hromozomske promene kao što su prekidi hromatida/hromozoma i acentrični fragmenti. Zbog toga je neophodno poznavati kinetiku ćelijskog ciklusa. S obzirom na to da je prosečno vreme dupliranja (engl. *doubling time*) ćelijske kulture CHO-K1 oko 12h (Oliviera i sar., 2006), u testu HA, deoba ćelija se prekida dodavanjem kolcemida u ćelijsku kulturu nakon 1-2 ćelijska ciklusa u 24h tretmanu fulerenolom. S druge strane, u CBMN testu, pre dodavanja CytB u 24h tretmanu, ćelije prolaze nekoliko ćelijskih ciklusa (više od 4). S obzirom na

različit broj ćelijskih ciklusa kroz koje prođe ćelijska kultura ovarijuma hrčka u 24h tretmanu fulerenolom, pretpostavlja se da AO efekti fulerenola ili DNK reparacijski mehanizmi, tokom 24h tretmana u testu CBMN, mogu doprineti boljoj ćelijskoj protekciji, što rezultira smanjenjem incidencije MN sa porastom koncentracije fulerenola.

Pored analize parametara koji figurišu u eventualnoj pojavi primarne genotoksičnosti nanočestica, korisno je sagledati i aspekt moguće sekundarne genotoksičnosti, koju karakteriše prekomerno i “uporno” formiranje ROS od strane inflamatornih ćelija. Jedan od mehanizama putem kojih može doći do smanjenja inflamatornog odgovora, jeste eliminisanje ROS i različitih reaktivnih vrsta (Sadowska i sar., 2006, Zhu i sar., 2007). Vodorastvorni fulereni poseduju sposobnost skupljača ROS i slobodnih radikala (Nielsen i sar., 2008) što bi, smatra se, moglo doprineti neutralizovanju ROS odnosno smanjenju inflamatornog odgovora indukovanoj pojavom ROS (Isaković i sar., 2006, Dugan i sar., 1996). Prema tome, može se reći da se antiinflamatorni potencijal fulerenola temelji na njegovim antioksidativnim karakteristikama (Dragojević-Simić i sar., 2011, Ryan i sar., 2007). Naime, upoređivan je antiinflamatorni efekat fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ i komercijalnih lekova amifostin-a i indometacin-a na modelu karageninom indukovanoj zapaljivosti šapa miša. Karagenin aktivira makrofage i polimorfonuklearne leukocite koji oslobađaju ROS i slobodne radikale, kao i NO i citokine TNF- α i IL-6. Patohistološki rezultati su pokazali da $C_{60}(OH)_{24}$ značajno redukuje nastali edem na šapama miševa, u poređenju sa komercijalnim preparatima. Autori smatraju da je to posledica inhibitornog efekta fulerenola na infiltraciju polimorfonuklearnih leukocita kao i AO aktivnosti fulerenola kao skupljača slobodnih radikala (Dragojević-Simić i sar., 2011). To govori u prilog odsustvu potencijala $C_{60}(OH)_{24}$ za indukovanje sekundarne genotoksičnosti. Štaviše, polihidroksilni C_{60} u nanogramskim koncentracijama poseduje sposobnost ne samo da ublaži posledice inflamacije, nego i da inhibira inflamatorni odgovor (Ryan i sar., 2007).

Ukoliko se evaluacija genotoksičnosti fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ posmatra u širem kontekstu, može se reći da su naši rezultati, koji prikazuju odsustvo primarnog genotoksičnog potencijala fulerenola, saglasni sa rezultatima istraživanja u kojima se prikazuju antiinflamatorna svojstva fulerenola, koja indirektno ukazuju i na odsustvo sekundarne genotoksičnosti fulerenola.

Antigenotoksičnost fulerenola

Nakon što je utvrđeno da $C_{60}(OH)_{24}$ nije genotoksičan na CHO-K1 ćelijskoj liniji i kulturi humanih limfocita, pristupilo se analizi učestalosti mikronukleusa i hromozomskih aberacija na modelu mitomicinom C indukovane toksičnosti. Naime, prvo je analiziran uticaj serije od 5 koncentracija MMC, sa ciljem da se odrede one koncentracije MMC, pri kojima su učestalosti mikronukleusa i hromozomskih aberacija najoptimalnije za analizu (tabele 6., 7., 8. i 9.). Primenom većih koncentracija MMC od onih koje su odabrane, bila bi indukovana visoka učestalost MN i HA, što bi značajno otežalo mikroskopiranje.

MMC je poznati prirodni antitumorski antibiotik i citostatski lek. Pripada grupi alkilirajućih agensa i snažan je izvor hinona koji imaju potencijal da indukuju stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta, u prvom redu superoksid i hidroksil radikala. Oksidativni stres, indukovan MMC-om, je povezan sa depolarizacijom mitohondrija i oslobađanjem malih proapoptotskih molekula kao što je citohrom C, koji vodi ka aktivaciji kaspazne kaskade i apoptozi (Orrenius, 2007). Lipidna peroksidacija vodi ka prekidi integriteta membrane, gubitku transmembranskog potencijala, inaktivaciji enzima/proteina vezanih za membrane, pogrešnoj funkciji spoljašnjih signalnih molekula (kao što su antigeni, faktori rasta, polipeptidni hormoni, GTP- vezujući proteini, sekundarni prenosioci signala, rastvorljivi unutarćelijski Ca^{2+} , cAMP, inozitol fosfat, regulatorni proteini itd.) (Chen i sar., 1998). Nastanak ROS, na nivou DNK dovodi do oksidacije DNK, prekida lanaca DNK ili pojave DNA adukata (Pritsos i Sartorelli, 1986), kao i unakrsnih veza između lanaca DNK, koje ukoliko ostanu nereparirane, mogu inhibirati samu reparaciju DNK i delovati snažno citostatski (Abdel-Halim i sar., 2005). U širokom dijapazonu genotoksičnih efekata, delovanje MMC dovodi do pojave brojnih hromozomskih promena koje se manifestuju povećanom učestalosti MN i HA (Muller i sar., 2008).

Analizom učestalosti navedenih biomarkera u našem radu, na ćelijskim kulturama CHO-K1 i humanih limfocita, u kojima je DNK oštećena delovanjem MMC, utvrđeno je da fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ indukuje smanjenje učestalosti MN i HA pri svim ispitivanim koncentracijama i dužinama tretmana (tabele 11., 13., 15. i 17.). Pretpostavka je da se sposobnost fulerenola da smanji oštećenje DNK, može pripisati njegovoj aktivnosti skupljača slobodnih radikala, kao i antioksidativnoj modulacionoj aktivnosti,

zahvaljujući kojoj se redukuje intraćelijska i ekstraćelijska produkcija ROS (Marano i sar., 2010).

Biološka aktivnost $C_{60}(OH)_{24}$ se bazira na fizičkim karakteristikama polianjonske nanočestice i hemijskoj reaktivnosti molekula u vodenom rastvoru (Srđenović, 2010). Naime, fulerenol zahvaljujući svojoj polianjonskoj spoljašnjosti ima sposobnost akceptora i donora protona. Protektivni efekti fulerenola se za sada tumače na dva načina. Prvi način bazira se na radikal- adicionoj reakciji fulerenola. U vodenim rastvorima, $C_{60}(OH)_{24}$ formira vodonične veze sa H_2O , pri čemu negativno naelektrisanje spoljašnje strane NČ stvara deprotonirane molekule fulerenola $C_{60}(OH)_xO_y^-$. Antioksidativna aktivnost fulerenola odvija se putem istovremenog doniranja atoma vodonika na OH^\cdot i DPPH radikal, pri čemu veće koncentracije fulerenola (0.71-0.88 mM) bolje inhibiraju hidroksi od DPPH radikala. Ta reakcija dovodi do nastanka fulerenolskog radikala $C_{60}(OH)_{23}O^\cdot$, čije je prisustvo je potvrđeno ESR merenjima. Interakcija između fulerenola i hidroksi radikala je bazirana na radikal- adicionoj reakciji $2n \cdot OH$ na preostale dvostruke veze fulerenolskog jezgra, tako da nastaje $C_{60}(OH)_{24} + 2n \cdot OH$ ($n=1-12$) (Djordjevic i sar., 2005). Drugi mehanizam protektivnog dejstva fulerenola se odnosi na mogućnost da fulerenol deluje kao helator gvožđa. Ova sposobnost se bazira na činjenici da polianjonske NČ imaju brojne slobodne elektronske parove od kiseonika, što im pruža velik kapacitet za formiranje koordinativno kovalentnih veza sa prooksidativnim jonima metala (Anderson i sar., 2005).

In vitro i *in vivo* studije dokazuju da polihidroksilovani fulereni u biološkim sistemima predstavljaju potencijalne antioksidativne agense (Bogdanović, 2009, Dugan i sar., 1996, Buck i sar., 2000), koji ne dovode do pojave akutne ili subakutne toksičnosti (Gharbi, 2005).

$C_{60}(OH)_{24}$ utiče na smanjenje neuronske smrti indukovane oksidativnim stresom, tako što reaguje sa superoksidnim O_2^- i hidroksi $\cdot OH$ radikalom (Chiang i sar., 1995, Dugan i sar., 1997, Jin i sar., 2000), zbog čega je i nazvan “sunderom za slobodne radikale” (McEwen i sar., 1992).

$C_{60}(OH)_{24}$ pri subcitotoksičnim koncentracijama, zahvaljujući svojim antioksidativnim svojstvima, dovodi do snižavanja aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) u gotovo svim uzorcima CHO-K1 ćelijske kulture tokom 3 i 24h tretmana

fulerenolom i MMC. Sam mitomicin C uzrokuje povećanje aktivnosti SOD u obe vremenske tačke eksperimenta, što govori u prilog aktivaciji antioksidativnog sistema odbrane ćelije kao odgovora na dejstvo citotoksičnog agensa (Bogdanović i sar., 2009). SOD su enzimi koji eliminišu superoksidni radikal, preko kaskade redoks reakcija kojima se pokreće složen mehanizam procesa signalne transdukcije i ekspresije gena. Na taj način SOD pruža ćelijama zaštitu od oštećenja indukovano tom reaktivnom kiseoničnom vrstom (Bogdanović i sar., 2007)

$C_{60}(OH)_{24}$ takođe predstavlja potencijalni agens za prevenciju disfunkcije mitohondrija kod Parkinsonove bolesti, koja nastaje kao posledica oksidativnog oštećenja uzrokovano povećanim nivoom oksidanasa (Cai i sar., 2008). Zbog toga smanjenje nastanka oksidanasa i oksidativnog oštećenja predstavlja efikasan način za inhibiciju mitohondrijalnog oštećenja. Na modelu indukovane Parkinsonove bolesti, fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ deluje direktno kao skupljač superoksidnog, hidroksilnog i lipidnog radikala ali i indirektno indukuje antioksidativnu aktivnost. Efekat “skupljača” superoksidnog radikala fulerenol ostvaruje u rangu koncentracija od 0-150 μM , hidroksi-radikala pri koncentracijama od 0-500 μM i lipidnih radikala pri koncentracijama od 0-1800 μM . Pri upoređivanju aktivnosti $C_{60}(OH)_{24}$, sa specifičnim skupljačima slobodnih radikala kao što su SOD, manitol i vitamin E, $C_{60}(OH)_{24}$ pokazuje skoro isti efekat kao i SOD za superoksidni radikal, 268 puta snažniji efekat od manitola za hidroksi-radikal i 37 puta snažniji od vitamina E za lipidne radikale. Štaviše, $C_{60}(OH)_{24}$ indukuje ekspresiju gena za enzime učesnike u zaštiti ćelija (Gao i sar., 2007). Fulerenol pored direktnih AO efekata na slobodne radikale, protektivnu ulogu može ostvariti i putem indirektno AO aktivnosti kao što je indukcija enzima faze 2. Ekspresija gena Nrf predstavlja važan regulator AO odgovora i indukcije detoksifikujućih enzima faze 2. Predtretman ćelija sa $C_{60}(OH)_{24}$ povećava ekspresiju Nrf2, kao i aktivnost ligaze g-glutamilsteina i time i nivo GSH. To ukazuje da $C_{60}(OH)_{24}$ ne deluje kao AO samo direktno, nego i indirektno, čime se svrstava u red potencijalnih agensa u prevenciji disfunkcije mitohondrija i oksidativnog oštećenja na modelu Parkinsonove bolesti (Cai i sar., 2008).

Najnovija istraživanja, u kojima su analizirani geni uključeni u AO odbranu ćelije, pokazuju da $C_{60}(OH)_{24}$ značajno suprimira doksorubicinom (DOX)-indukovanu inhibiciju MnSOD, kao i inhibiciju i sintezu glutaciona u redoks ciklusu. Drugim rečima

DOX indukuje ROS, a fulerenol inhibira taj efekat. Fulerenol takođe indukuje smanjenu ekspresiju (engl. *down-regulation*) Bax gena, kao i povećanu ekspresiju inhibitora Bax. Bax inhibitori štite ćelije tako što inhibiraju akumuliranje ROS i posreduju u indukciji učesnika u ciklusu glutaciona (Stankov i sar., 2011).

Ovim istraživanjima potvrđuje se da $C_{60}(OH)_{24}$ u uslovima indukovanoog oksidativnog stresa deluje svojom antioksidativnom aktivnošću, što potvrđuje pretpostavku da je upravo ovo svojstvo fulerenola odgovorno za smanjenje biomarkera oštećenja DNK, utvrđeno u našem radu.

Uticao fulerenola na proliferaciju ćelija

U okviru testa mikronukleusa, odnos broja mono-, bi- i polinukleusnih ćelija predstavlja indeks jedarne deobe (engl. *nuclear division index*, NDI), koji pruža dodatne informacije vezane za sposobnost ispitivane supstance da utiče na proliferaciju ćelija (Kirsh-Volders i sar., 2003).

U našem radu tretman ćelijske kulture CHO-K1 mikromolarnim (miligramskim) koncentracijama fulerenola tokom 3h i 24h, doveo je do povećanja NDI odnosno proliferacije ćelija (tabela 10.). Takođe, kada je u pitanju ćelijska kultura humanih limfocita, fulerenol je uticao na blago povećanje proliferacionog indeksa u svim ispitivanim fazama ćelijskog ciklusa (tabela 14.). Testom DET, utvrđeno je da fulerenol pri najnižim koncentracijama od 8,86 i 44,3 μ M, u G1/S/G/M fazi ćelijskog ciklusa deluje proliferativno na humane limfocite (tabele 4. i 5.). Ovi rezultati ukazuju na to da fulerenol, pri navedenim koncentracijama i tretmanima, ima proliferativni potencijal na sisarskim ćelijskim kulturama.

Niwa i Iwai (2006) su prikazali da $C_{60}(OH)_{24}$ pri nanogramskim koncentracijama (20 i 100 ng/mL), tokom 3-dnevnog i 6-dnevnog tretmana CHO-K1, Hela i HEK293 ćelijskih kultura, utiče na smanjenje ćelijske proliferacije. Međutim, pri još nižim pikogramskim koncentracijama (0, 10, 100 i 1000 pg/mL) i tokom dužeg vremenskog perioda od 33dana $C_{60}(OH)_{24}$ ima mitogeni efekat na Hela i HEK293 ćelije, bez uticaja na aktivnost LDH. Autori navode pretpostavku da fulerenol stimuliše signalni put koji

utiče na ćelijsku deobu, posebno u periodu između G2 i M faze ćelijskog ciklusa, objašnjavajući na taj način njegov mitogeni efekat.

U nekoliko radova se navodi i antiproliferativni efekat fulerenola (Su i sar., 2010, Lu i sar., 1998, Gelderman i sar., 2008, Aoshima i sar., 2009). Prema rezultatima Su i saradnika, nakon 48h tretmana sa 0.1 mg/mL, $C_{60}(OH)_x$ redukuje metaboličku aktivnost u ćelijskoj liniji ovarijuma CHO i pluća CHL hrčka, u G1 fazi ćelijskog ciklusa, kao i u S i G2/M fazi ćelijskog ciklusa (Su i sar., 2010), što se razlikuje u odnosu na naše rezultate. Ova razlika mogla bi da potiče od različite dužine tretmana, koja zajedno sa drugim elementima u eksperimentalnom dizajnu, može doprineti različitim rezultatima (Sayes i sar., 2005). Naime, u našem eksperimentalnom modelu, tretman fulerenolom pri približno istim koncentracijama od 0.125 mg/mL (110,8 μ M) trajao je kraće, tačnije 3h i 24h u poređenju sa 48h tretmanom u radu Su i saradnika.

U studiji Lu i saradnika (1998) praćen je efekat polihidroksilovanog fulerena na proliferaciju glatkih mišićnih ćelija koje se, zajedno sa inflamatornim ćelijama, nagomilavaju u krvnim sudovima kod ateroskleroznih promena. Polihidroksilovani fulerenol, kao i nC_{60} , vrši inhibiciju proliferacije glatkih mišićnih ćelija i humanih limfocita u G1 fazi ćelijskog ciklusa pri koncentracijama od 1 μ g/mL do 10 mg/mL. Prilikom upoređivanja rezultata, treba imati i vidu da su u našem radu korišćene niže koncentracije fulerenola, pri čemu je najveća koncentracija bila 0,25mg/mL (221,6 μ M), u poređenju sa dosta višim koncentracijama < 10mg/mL u radu Lu i saradnika (1998). Autori pretpostavljaju da je antiproliferativni efekat fulerenola povezan sa inhibicijom proteina tirozin kinaze odnosno da fulerenol pored svog AO dejstva ima i funkciju inhibitora prenosa signala.

Antiproliferativna aktivnost $C_{60}(OH)_{24}$ prikazana je i u kulturi endotelnih ćelija HUVEC pri koncentraciji od 0,1mg/mL, tokom 24h tretmana. Pri istoj koncentraciji fulerenol je delovao i pro-inflamatorno i pro-apoptotski. Na nižoj koncentraciji ne dolazi do ovih promena (Gelderman i sar., 2008). Autori objašnjavaju antiproliferativnu aktivnost fulerenola njegovom mogućom sposobnošću da inhibira aktivnost citosolne protein kinaze C, na koju je ukazao Lu (1998).

Sa povećanjem vodorastvorljivosti fulerenola, povećava se i njegova antigljivična aktivnost. Naime, fulerenol ima tendenciju da intereaguje sa komponentama kao što su β -glukan i hitin u ćelijskom zidu gljiva, u većoj meri nego sa peptidoglukanom u

bakterijskoj ćelijskoj membrani. Iako slabiji od antigljivičnog, antibakterijski efekat fulerenola $C_{60}(OH)_{44}$ ostvaruje se putem bakteriostatskog a ne baktericidnog efekta, a autori ga pripisuju prisustvom hidroksilnih grupa u molekulu fulerenola. Za razliku od $C_{60}(OH)_{44}$, $C_{60}(OH)_{12}$ rastvoren u DMSO ne deluje inhibitorno na rast ćelija mikroorganizama (Aoshima i sar., 2009).

I pored navedenih istraživanja u kojima je prikazan antiproliferativni potencijal fulerenola, najnovije studije u kojima su ispitivani ćelijski i molekularni mehanizmi dejstva $C_{60}(OH)_{24}$, potvrđuju njegov proliferativni potencijal, sa čim su naši rezultati u saglasnosti (Stankov i sar., 2011). Naime, analizirana je ekspresija gena uključenih u ključne ćelijske funkcije i procese kao što su proliferacija, apoptoza, redoks regulacija, DNK oštećenje, reparacija i otpornost na antitumorske lekove. Kao marker ćelijske proliferacije korišćen je nivo iRNK Ki-67. Ki-67 je jedarni protein koji pripada klasi regulatornih proteina. Ekspirimira se u svim proliferišućim ćelijama odnosno tokom svih aktivnih faza ćelijskog ciklusa kao što su kasna G1, S, G2 i M faza, dok ćelije u G0 i ranoj G1 fazi gube ovu reaktivnost. Zbog toga Ki-67 predstavlja marker za ćelijsku proliferaciju (Scholzen i Gerdes, 2000). Rezultati studije genske ekspresije antiapoptotskih i antioksidativnih markera pokazali su da $C_{60}(OH)_{24}$ indukuje značajne efekte na proliferaciju ćelija (Stankov i sar., 2011).

Dalja istraživanja uticaja $C_{60}(OH)_{24}$ na ćelijski ciklus ćelija eritroleukemije čoveka K562, pokazala su da fulerenol pri koncentracijama od 0.04, 0.18 i $0.71\mu M$ ima modulatorno dejstvo utičući i na sintetsku i na mitotičku fazu ćelijskog ciklusa (Jakimov i sar., 2002). Slični rezultati su saopšteni i na drugim maligno transformisanim ćelijskim linijama (Kamat i sar., 2000, Rancan i sar., 2002).

Suprotno proliferativnom efektu fulerenola na neoštećenim ćelijskim kulturama u našem radu, tretman ćelijskih kultura fulerenolom i MMC indukovao je značajno smanjenje ćelijske proliferacije u svim analiziranim vremenskim tačkama i koncentracijama u poređenju sa vrednostima kontrolnog uzorka tretiranog samo MMC (tabele 11. i 15.). To znači da fulerenol doprinosi dejstvu mitomicina C pojačavajući njegov citostatski efekat.

Poznato je da MMC usporava ćelijsku proliferaciju vezujući se kovalentno za DNK, pri čemu se produkuju monoadukti i unakrsne veze između DNK-DNK i DNK-proteina. Adukti utiču na replikaciju DNK, na taj način što uzrokuju oštećenja koja vode ka

smanjenju replikacije DNK i dozno zavisnom odlaganju ćelijskog ciklusa (Giri i sar., 2008). Prepostavka je da je smanjenje NDI u našem radu pre rezultat antiproliferativne aktivnosti MMC nego uticaja fulerenola, odnosno eventualnog sinergističkog dejstva fulerenola i MMC na supresiju rasta ćelijske kulture.

Istraživanja uticaja $C_{60}(OH)_{24}$ na ekspresiju gena u ćelijskoj liniji eritroleukemije čoveka K562, pokazala su da fulerenol sa DOX u istoj meri suprimira proliferaciju kao i sam DOX. Na osnovu inhibicije ekspresije gena hOGG1 utvrđeno je da fulerenol doprinosi povećanju osetljivosti ćelija na DOX. Autori zaključuju da $C_{60}(OH)_{24}$ sinergistički doprinosi inhibiciji proliferacije ćelija eritroleukemije (Stankov i sar., 2011). Naši rezultati u kojima fulerenol sa MMC dovodi do inhibicije ćelijske proliferacije u saglasnosti su sa navedenim rezultatima Stankove i saradnika.

Uticaj fulerenola na tip hromozomskih aberacija

Učestalost hromozomskih aberacija zavisi od ravnoteže između efikasnosti ćelijske zaštite i mehanizama popravke s jedne strane (antioksidativna odbrana ćelije, eksciziona reparacija baza, mismeč reparacija ili reparacija prekida dvostrukih lanaca DNK) i procesa koji vode ka ćelijskoj smrti sa druge strane (apoptoza ili nekroza). U našem radu je utvrđeno da fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ doprinosi snižavanju učestalosti hromozomskih aberacija u obe ispitivane ćelijske kulture, što je razmatrano u delu o genotoksičnosti fulerenola.

Međutim, kada je u pitanju tip hromozomskih aberacija indukovani nekim genotoksičnim agensom, poznato je da on zavisi od faza ćelijskog ciklusa, na osnovu čega se agensi dele na one koji su zavisni od S-faze i nezavisne od S- faze (Boffetta i sar., 2007). Većina aberacija indukovanih hemijskim agensima formira se isključivo tokom S-faze ćelijskog ciklusa, tako da dominiraju aberacije hromatidnog tipa. Za razliku od njih, ukoliko agens deluje pre replikacionog perioda, dominiraće aberacije hromozomskog tipa (Natarajan, 1993).

Da bi se stekao uvid u to da li fulerenol deluje pre ili posle replikacije DNK, analiza učestalosti hromozomskih aberacija je proširena i na tip hromozomskih aberacija kako

na neoštećenim (tabele 12. i 16.) tako i na MMC oštećenim ćelijskim kulturama CHO-K1 i humanih limfocita (tabele 13. i 17.).

U kontrolnim uzorcima obe ispitivane ćelijske kulture, bez tretmana fulerenolom ili MMC, dominirale su aberacije hromatidnog tipa. To predstavlja bazično stanje ispitivanih genoma, koji se verovatno popravljaju nekim od mehanizama postreplikativnog repera, što rezultira stabilnim netransformisanim genomima.

Sam fulerenol je, iako je u obe ćelijske kulture doveo do snižavanja učestalosti ćelija sa hromozomskim aberacijama, na CHO-K1 ćelijskoj kulturi uzrokovao dominaciju hromozomskog tipa aberacija (tabele 12. i 13.), što znači da je delovao pre replikacije DNK, dok su na humanim limfocitima dominirale aberacije hromatidnog tipa (tabele 16. i 17.), što implicira na postreplikativni uticaj na DNK.

U pokušaju da objasnimo razliku u tipu hromozomskih aberacija između CHO-K1 i ćelijske kulture humanih limfocita, pošli smo od razlika koje postoje u pogledu njihovog kapaciteta za reparaciju DNK. Naime, CHO-K1 ćelijska linija poseduje mutaciju u vezivanju DNK domena za p53, koji ima ključnu ulogu u odgovoru ćelije na oštećenje DNK. Ta mutacija sekvence p53 rezultira promenom funkcije ovog tumor supresornog proteina i odsustvom kontrole u G1 fazi ćelijskog ciklusa (Hu i sar., 1999), što bi moglo uticati na pojavu dominantno hromozomskog tipa aberacija u CHO-K1 ćelijskoj liniji.

Fulerenol i MMC u kombinaciji, takođe na CHO-K1 ćelijskoj kulturi, vršili su uticaj pre replikacije, dok su na humanim limfocitima delovali postreplikativno.

Poznato je da MMC uzrokuje povećanu učestalost hromozomskih aberacija, čiji se nastanak odvija posredstvom mehanizma zavisnog od S-faze ćelijskog ciklusa (Muller i sar., 2008). S obzirom na činjenicu da je u obe ćelijske kulture tretman sa MMC uzrokovao pojavu aberacija pretežno hromozomskog tipa, ovim je potvrđen uticaj MMC u prereplikativnoj fazi ćelijskog ciklusa. Takođe smatramo da, kada je u pitanju uticaj kombinacije fulerenol/MMC na tip hromozomskih aberacija, dominira efekat mitomicina C.

ZAKLJUČCI

Fizičko-hemijska karakterizacija fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ metodama DLS, AFM i TEM pokazala je da ova nanočestica u medijumu za ćelijsku kulturu sa serumom gradi nehomogen sistem sa stabilnom familijom agregata dimenzija od 197nm.

Prisustvo nanočestice proteina (najverovatnije albumina) iz seruma u medijumu za ćelijske kulture verovatno doprinosi stabilnosti agregata nanočestice fulerenola.

Fulerenol u opsegu koncentracija od 88,6 μ M do 443,2 μ M deluje antiproliferativno (citotoksično) a pri koncentraciji od 8.86 μ M proliferativno na ćelijske kulture CHO-K1 i humanih limfocita. Citotoksičnost zavisi od ćelijske kulture, primenjene koncentracije fulerenola i od dužine tretmana.

Analizom genotoksičnosti testom mikronukleusa i hromozomskih aberacija utvrđeno je da fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$ nije genotoksičan: u ispitivanim ćelijskim kulturama ovarijuma kineskog hrčka CHO-K1 i humanim limfocitima, pri analiziranim vremenskim tretmanima (na ćelijskoj kulturi CHO-K1 u 3h i 24h tretmanu a na humanim limfocitima u G0, G1/S, G1/S/G2/M fazi ćelijskog ciklusa) kao i pri ispitivanim subcitotoksičnim koncentracijama.

Ispitivanje antigenotoksičnog potencijala fulerenola na ćelijskim kulturama CHO-K1 i humanim limfocitima na modelu toksičnosti indukovane mitomicinom C, pokazalo je da fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$, pri subcitotoksičnim koncentracijama dovodi do snižavanja učestalosti mikronukleusa i hromozomskih aberacija

Fulerenol deluje stimulatивно na proliferaciju ćelijske kulture CHO-K1 i humanih limfocita, pri subcitotoksičnim koncentracijama i u ispitivanim vremenskim tretmanima. Na modelima istih ćelijskih kultura, sa uticajem mitomicina C, fulerenol deluje antiproliferativno, pojačavajući citostatski efekat MMC.

Kada je u pitanju uticaj fulerenola na tip hromozomskih aberacija, na CHO-K1 ćelijskoj kulturi fulerenol sa ili bez MMC deluje pre replikacije DNK, dok na humanim limfocitima takođe sa ili bez MMC deluje posle replikacije DNK.

Dosadašnjim ispitivanjima genotoksičnosti fulerenola $C_{60}(OH)_{24}$ nije utvrđen njegov direktan uticaj na DNK. Fulerenol poseduje antioksidativna svojstva, koja ostvaruje na niskim koncentracijama, vršeći na taj način prevenciju ROS-indukovanog oštećenja, dok na visokim koncentracijama može biti prooksidativan. Na ovoj činjenici verovatno se bazira i odsustvo genotoksičnosti fulerenola pri subcitotoksičnim koncentracijama, odnosno antigenotoksičnost na modelu indukovano oštećenja DNK, što je i prikazano u ovom radu. Uzimajući u obzir i ostale karakteristike $C_{60}(OH)_{24}$ koje su važne u sagledavanju njegovog genotoksičnog profila, kao što je, na primer, sposobnost da gradi stabilne suspenzije u vodenim rastvorima, da deluje antiinflamatorno na niskim koncentracijama itd., možemo zaključiti da fulerenol $C_{60}(OH)_{24}$, ima velik potencijal za upotrebu u biomedicini kao ćelijski protektor nanometarskih dimenzija, sposoban da prođe krvno-moždanu barijeru i selektivno dospe u ciljana tkiva, što mu otvara mogućnosti u terapiji kancera i drugih bolesti savremenog doba.

REFERENCE

1. Abdel-Halim HI, Natarajan AT, Mullenders LHF, Boei JJ (2005). Mitomycin C-induced pairing of heterochromatin reflects initiation of DNA repair and chromatid exchange formation. *J Cell Sci.*118:1757-67.
2. Abe S, Takizawa H, Sugawara I, Kudoh S (2000). Diesel exhaust (DE)-induced cytokine expression in human bronchial epithelial cells: a study with a new cell exposure system to freshly generated DE in vitro. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 22:296–303.
3. Anderson R, Barron AR (2005). Reaction of hydroxyfullerene with metal salts: a route to remediation and immobilization. *J. Am. Chem. Soc.*127:10458–59.
4. Anderson SA, Lee KK, Frank JA (2006). Gadolinium-Fullerenol as a Paramagnetic Contrast Agent for Cellular Imaging. *Invest. Radiol.*41: 332–338.
5. Andrievsky GV, Bruskov VI, Tykhomyrov AA, Gudkov SV (2009). Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C₆₀ fullerene nanostructures in vitro and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine.* 47:786-793.
6. Aoshima H, Kokubo K, Shirakawa S, Ito M, Yamana S, Oshima T (2009). Antimicrobial activity of fullerenes and their hydroxylated derivatives. *Biocontrol. Sci.*14:69-72.
7. Aschberger K, Johnston H, Stone V, Aitken R, Lang Tran C, Hankin S, Peters S, Christensen F (2010). Review of fullerene toxicity and exposure - Appraisal of a human health risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 58: 455-73.
8. Assemi S, Tadjiki S, Donose B, Nguyen A, Miller J (2010). Aggregation of Fullerol C₆₀(OH)₂₄ Nanoparticles as Revealed Using Flow Field-Flow Fractionation and Atomic Force Microscopy. *Langmuir.*26:16063–70.
9. ATCC-Catalogue of Cell Lines and Hybridomas [Sixth Edition] (1988). Rockville, Maryland. 36-37.
10. Atwood JL, Koutsantonis GA, Raston CL (1994). High purity Fullerene-60 via molecular recognition. *Nature.*368:229–31.

11. Au L, Zheng D, Zhou F, Li ZY, Li X, Xia Y (2008). A quantitative study on the photothermal effect of immuno gold nanocages targeted to breast cancer cells. *ACS Nano*.2:1645-52.
12. Bae Y, Jang WD, Nishiyama N, Fukushima S, Kataoka K (2005). Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Mol. Biosyst*.1: 242–50.
13. Baena JR, Gallego M, Valcarcel M (2002). Fullerenes in the analytical sciences. *Trends in Analytical Chemistry*.21:187-98.
14. Barratt G (2003). Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *Cell. Mol. Life. Sci*.60:21–37.
15. Baun A, Hartmann NB, Grieger K, Kusk KO (2008). Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology*.17:387–95.
16. Becker L, Poreda RJ, Bunch TE (2000). Fullerenes: An extraterrestrial carbon carrier phase for noble gases. *PNAS*. 97:2979–2983.
17. Belgorodsky B, Fadeev L, Kolsenik J, Gozin M (2007). Biodelivery of a fullerene derivative. *Bioconjug. Chem*.18:1095–1100.
18. Bharali DJ, Khalil M, Gurbuz M, Simone TM, Mousa SA (2009). Nanoparticles and cancer therapy: A concise review with emphasis on dendrimers *International Journal of Nanomedicine*. 4: 1–7.
19. Bhaskar S, Tian F, Stoeger T, Kreyling W, de la Fuente JM, Grazú V, Borm P, Estrada G, Ntziachristos V, Razansky D (2010). Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging. *Particle and Fibre Toxicology*.7:3.
20. Black L, Berenbaum MC (1964). Factors affecting the dye exclusion test for cell viability. *Exp. Cell Res*.35:9-13.
21. Boffetta P, Van der Hel O, Norppa H, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Puskaierova D, Znaor A, Kelecsenyi Z, Kurtinaitis J, Rachtan J, Forni A, Vermeulen R, Bonassi S (2007). Chromosomal Aberrations and Cancer Risk: Results of a Cohort Study from Central Europe. *Am. J. Epidemiol*.165:36-43.

22. Bogdanović G, Kojić V, Đorđević A, Čanadanović-Brunet J, Vojinović-Miloradov M, Baltić VV (2004). Modulating activity of fullerol C₆₀(OH)₂₂ on doxorubicin induced cytotoxicity. *Toxicol. In Vitro.*18:629-37.
23. Bogdanović G, Vojinović-Miloradov M, Kojić V, Đorđević A, Čanadi J, Koruga Đ, Baltić VV, Tabš D (1997). Biological activity of water-soluble fullerene:C₆₀(OH)₂₄. *Arch. Oncol.* 5:147-49.
24. Bogdanović V (2007). Redoks regulacija ćelijskog ciklusa azot oksidom. Doktorska teza. Novi Sad, Srbija: Univerzitet u Novom Sadu.
25. Bogdanović V, Slavić M, Mrđanović J, Šolajić S, Đorđević A (2009). Aktivnost superoksid-dismutaze u animalnoj ćelijskoj kulturi CHO-K1. *Hemijska industrija.*63:143-9.
26. Bogdanović V, Stankov K, Ičević I, Žikić D, Nikolić A, Šolajić S, Djordjević A, Bogdanović G (2008). Fullerenol C₆₀(OH)₂₄ effects on antioxidative enzymes activity in irradiated human erythroleukemia cell line J. *Radiat. Res.* 49:321-27.
27. Bolskar RD (2008). Gadofullerene MRI contrast agents. *Nanomed.*3:201-13.
28. Bosi S, Da Ros T, Spalluto G, Prato M (2003). Fullerene derivatives: an attractive tool for biological applications. *Eur. J. Med. Chem.* 38:913–923.
29. Bosi S, Feruglio L, Da Ros T, Spalluto G, Gregoretti B, Terdoslavic M, Decorti G, Passamonti S, Moro S, Prato M (2004). Hemolytic effects of water-soluble fullerene derivatives. *J. Med. Chem.* 47:6711–15.
30. Brant J, Lecoanet H, Hotze M, Wiesner M (2005). Comparison of electrokinetic properties of colloidal fullerenes (n-C₆₀) formed using two procedures. *Environ. Sci. Technol.* 39:6343- 51.
31. Brant JA, Labille J, Bottero JY, Wiesner MR (2006).Characterizing the Impact of Preparation Method on Fullerene Cluster Structure and Chemistry. *Langmuir.* 22: 3878-85.
32. Brant JA, Labille J, Robichaud CO, Wiesner M (2007). Fullerol cluster formation in aqueous solutions: Implications for environmental release. *J. Colloid Interface Sci.* 314:281-288.
33. Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Surampalli RY (2010). Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – Evidence and impacts. *Waste Management.*30:504–520.

34. Brettreich M, Burghardt S, Bottcher C, Bayerl T, Bayerl S, Hirsch A (2000). Globular Amphiphiles: Membrane-forming hexaadducts of C₆₀. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39:1845–48.
35. Brettreich M, Hirsch A (1998). A highly water-soluble dendro[60]fullerene. *Tetrahedron Lett.* 39:2731–34.
36. Brezova V, Stasko A, Dvoranova D, Asmus KD, Guldi DM (1999). Photochemical reduction of C derivatives in aqueous systems 60 containing titanium dioxide or ascorbic acid EPR study. *Chemical. Physics. Letters.* 300:667–675.
37. Brown C, Fisher J, Ingham E (2006). Biological effects of clinically relevant wear particles from metal-on-metal hip prostheses. *Proc. Inst. Mech. Eng. [H].* 220:355–69.
38. Buck S, Vettraino J, Force AG, Arking R (2000). Extended longevity in *Drosophila* is consistently associated with a decrease in developmental viability. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 55:B292–B301.
39. Bullard-Dillard R, Creek KE, Scrivens WA, Tour JM (1996). Tissue sites of uptake of ¹⁴C labelled C₆₀. *Bioorg. Chem.* 24: 376–385.
40. Buseck PR (2002). Geological fullerenes: review and analysis: earth planetary. *Sci. Lett.* 203:781–92.
41. Buxton DB (2009). Nanomedicine for the management of lung and blood diseases. *Nanomed.* 4:331–339.
42. Cai X, Hao J, Zhang X, Yu B, Ren J, Luo C, Li Q, Huang Q, Shi X, Li W, Liu J (2010). The polyhydroxylated fullerene derivative C₆₀(OH)₂₄ protects mice from ionizing radiation-induced immune and mitochondrial dysfunction. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 243:27-34.
43. Cai X, Jia H, Liu Z, Hou B, Luo C, Feng Z, Li W, Liu J (2008). Polyhydroxylated Fullerene Derivative C₆₀(OH)₂₄ Prevents Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in an MPP1-Induced Cellular Model of Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience Research.* 86:3622–34.
44. Cao G, editor (2004). *Nanostructures and nanomaterials. Synthesis, Properties & Applications.* London. Imperial College Press.
45. Caruthers SD, Wickline SA, Lanza GM (2007). Nanotechnological applications in medicine. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18:26–30.

46. Casals E, Pfaller T, Duschl A, Oostingh GJ, Puentes V (2010). Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS Nano*. 4:3623–32.
47. Cha YJ, Lee J, Choi SS (2011). Apoptosis-mediated in vivo toxicity of hydroxylated fullerene nanoparticles in soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*. 87:49-54.
48. Chae SR, Therezien M, Budarz JF, Wessel L, Lin S, Xiao Y, Wiesner MR (2011). Comparison of the photosensitivity and bacterial toxicity of spherical and tubular fullerenes of variable aggregate size. *Journal of Nanoparticle Research*. 13:105121-5127.
49. Chao TC, Song G, Hansmeier N, Westerhoff P, Herckes P, Halden RU (2011). Characterization and Liquid Chromatography-MS/MS Based Quantification of Hydroxylated Fullerenes. *Anal. Chem*. 83:1777–83.
50. Chaudhuri P, Abhimanyu P, Shivani S, Raghunath AM, Shiladitya S (2009), Fullerenol Cytotoxic Conjugates for Cancer Chemotherapy. *ASC NANO*. 3:2505–14.
51. Chen KL, Elimelech M (2006). Aggregation and Deposition Kinetics of Fullerene (C60) Nanoparticles. *Langmuir*. 22:10994.
52. Chen BX, Wilson SR, Das M, Coughlin DJ, Erlanger BF (1998). Antigenicity of fullerenes: antibodies specific for fullerenes and their characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:10809–10813.
53. Chen M, Von MA (2005). Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Exp. Cell. Res*. 305:51–62.
54. Chen YW, Hwang KC, Yen CC, Lai YL (2004). Fullerene derivatives protect against oxidative stress in RAW 264.7 cells and ischemia-reperfused lungs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 287:(1) R1-R2.
55. Chi Y, Canteenwala T, Chen HHC, Jeng US, Lin TL, Chiang LY (2002). Free radical scavenging and photodynamic functions of micelle-like hydrophilic hexa(sulfobutyl)fullerene (FC4S). In: Osawa E, ed. *Perspectives of Fullerene Nanotechnology*. Dordrecht. Kluwer Academic; p. 165-83.
56. Chiang LY, Bhonsle JB, Wang L, Shu SF, Chang TM, Hwu JR. (1996) Efficient one-flask synthesis of water-soluble (60)Fullerenols. *Tetrahedron*52. 14:4963–72.

57. Chirico F, Fumelli C, Marconi A, Tinari A, Straface E, Malorni W, Pellicciari R, Pincelli C (2007). Carboxyfullerenes localize within mitochondria and prevent the UVB-induced intrinsic apoptotic pathway. *Exp. Dermatol.* 16: 429-36.
58. Chithrani BD, Chan WC (2007). Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett.* 7:1542–50.
59. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett.* 6:662–8.
60. Choi AO, Brown SE, Szyf M, Maysinger D (2008). Quantum dot-induced epigenetic and genotoxic changes in human breast cancer cells. *J. Mol. Med.* 86:291–302.
61. Clift MJ, Rothen-Rutishauser B, Brown DM, Duffin R, Donaldson K, Proudfoot L, Guy K, Stone V (2008). The impact of different nanoparticle surface chemistry and size on uptake and toxicity in a murine macrophage cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232:418–27.
62. Da Ros T (2008). Twenty years of Promises: Fullerene in Medicinal Chemistry. In: Cataldo F, Da Ros T, editors. *Medicinal Chemistry and Pharmacological Potential of Fullerenes and Carbon Nanotubes*. Springer Science and Business Media B.V.P.; p.1-23.
63. De BM, Kirsch-Volders M, Lison D (2003). Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. *Mutat. Res.* 533:135–52.
64. De Jong WH, Borm PJA (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine.* 3:133-149.
65. Deguchi S, Alargova RG, Tsujji K (2001). Stable dispersions of fullerenes, C60 and C70, in water. Preparation and characterisation. *Langmuir.* 17:6013–7.
66. Deguchi S, Mukai S, Tsudome M, Horikoshi K (2006). Facile generation of fullerene nanoparticles by hand-grinding. *Adv. Mater.* 18:729–32.
67. Deguchi S, Yamazaki T, Mukai S, Usami R, Horikoshi K (2007). Stabilization of C-60 nanoparticles by protein adsorption and its implications for toxicity studies. *Chemical Research in Toxicology.* 20:854–58.

68. Dellinger A, Zhou Z, Norton SK, Lenk R, Conrad D, Kepley CL (2010). Uptake and distribution of fullerenes in human mast cells. *Nanomedicine*. 6:575-82.
69. Deng ZJ, Liang M, Monteiro M, Toth I, Minchin RF (2011). Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nature Nanotechnology*. 6: 39–44.
70. Dhar S, Daniel WL, Giljohann DA, Mirkin CA, Lippard SJ (2009). Polyvalent oligonucleotide gold nanoparticle conjugates as delivery vehicles for platinum (IV) warheads. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 14652–53.
71. Di Sotto, Chiaretti M, Carru GA, Bellucci S, Mazzanti G (2009). “Multi-walled carbon nanocevis: lack of mutagenic activity in the bacterial reverse mutation assay,” *Toxicology Letters*. 184: 192–97.
72. Diederich F (2005). Advanced opto-electronics materials by fullerene and acetylene scaffolding. *Pure. Appl. Chem.* 77:1851–63.
73. Djordjevic A, Ajdinovića B, Dopudja M, Trajkovića S, Milovanović Z, Maksin T, Nešković O, Bogdanović V, Trpkov Đ, Cvetičanin J (2010). Scintigraphy Of The Domestic Dog Using $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]\text{-C}_{60}(\text{OH})_{22-24}$. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 6: 99-106.
74. Djordjevic A, Canadanovic-Brunet J, Vojinovic-Miloradov M, Bogdanovic G (2005). Antioxidant properties and hypothetical radical mechanism of fullerol $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$. *Oxid. Commun.* 27: 806-12.
75. Dobrovolskaia MA, McNeil SE (2007). Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* 2: 469–478.
76. Donaldson K, Stone V, Tran CL, Kreyling W, Borm PJA (2004). “Nanotoxicology,” *Occupational and Environmental Medicine*. 61: 727–28.
77. Đorđević AN, Ičević IĐ, Bogdanović VV (2009). Kompleks fulerenola sa Bakar (II) jonom, *Hem. ind.* 63:171–75.
78. Đorđević M, Vojinović-Miloradov, Petranović N, Devečerski A, Lazar D, Ribar B (1998). Catalytic preparation and characterization of $\text{C}_{60}\text{Br}_{24}$. *Fullerenes Sci. Technol.* 6: 689–94.
79. Dragojevic-Simic V, Jacevic V, Dobric S, Djordjevic A, Bokonjic D, Bajcetic M, Injac R, (2011). Anti-Inflammatory Activity Of Fullerol $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ Nano-

Particles In A Model Of Acute Inflammation In Rats. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures. 6: 819-27.

80. Dugan LL, Gabrielsen JK, Yu SP, Lin TS, Choi DW (1996). Buckminsterfullerenol free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons. Neurobiol. Dis. 3:129–35.

81. Dugan LL, Turetsky DM, Du C, Lobner D, Wheeler M, AlmLi CR, Shen CKF, Luh TY, Choi DW, Lin TS (1997). Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 9434-9439.

82. Editorial Potential hazard of nanoparticles (2010): From properties to biological and environmental effects. Toxicology. 269:89–91.

83. Elgrabli D, Abella-Gallart S, Aguerre-Chariol O, Robidel F, Rogerieux F, Boczkowski J, Lacroix G(2007). Effect of BSA on carbon nanotube dispersion for *in vivo* and *in vitro* studies. Nanotoxicology. 1:266–78.

84. Farokhzad OC, Langer R (2009). Impact of nanotechnology on drug delivery. ACS Nano.3:16–20.

85. Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F, Loguercio C (2007). Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. Int. J. Cancer.121:2381–6.

86. Fenech M (2007).Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nat. Protoc. 2:1084–1104.

87. Fenoglio I, Fonsato S, Fubini B (2003). Reaction of cysteine and glutathione (GSH) at the freshly fractured quartz surface: a possible role in silica-related diseases? Free Radical Biology and Medicine. 35: 752–62.

88. Fenoglio I, Fubini B, Ghibaudi EM, Turci F(2011). Multiple aspects of the interaction of biomacromolecules with inorganic surfaces . Advanced Drug Delivery Reviews. 63: 1186–1209.

89. Ferrari M (2005). Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. Nat. Rev. Cancer.5:161–71.

90. Foldvari M, Bagonluri M (2008). Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines:II. Drug delivery and biocompatibility issues. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 4:183–200.

91. Foley S, Crowley C, Smaih M, Bonfils C, Erlanger BF, Seta P, Larroque C (2002). Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294:116–19.
92. Folkmann JK, Risom L, Jacobsen NR, Wallin H, Loft S, Møller P (2009). Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanocevis. *Environmental Health Perspectives.* 117:703–8.
93. Fortner JD, Lyon DY, Sayes CM, Boyd AM, Falkner JC, Hotze EM, Alemany LB, Tao YJ, Guo W, Ausman KD, Colvin VL, Hughes JB (2005). C60 in water: nanocrystal formation and microbial response. *Environ. Sci. Technol.* 39:4307-4316.
94. Fubini B, Ghiazza M, Fenoglio I (2010). Physico-chemical features of engineered nanoparticles relevant to their toxicity. 4:347-63.
95. Gao J, Xu B (2009). Applications of nanomaterials inside cells. *Nano Today.* 4:37-51.
96. Gao J, Zhu ZR, Ding HQ, Qian Z, Zhu L, Ke Y (2007). Vulnerability of neurons with mitochondrial dysfunction to oxidative stress is associated with down-regulation of thioredoxin. *Neurochem. Int.* 50:379–85.
97. Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schurch S, Kreyling W, Schulz H (2005). Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ. Health Perspect.* 113:1555–60.
98. Gelderman M, Simakova O, Clogston J, Patri A, Siddiqui S, Vostal A, Simak J (2008). Adverse effects of fullerenes on endothelial cells: Fullerenol C60(OH)24 induced tissue factor and ICAM-1 membrane expression and apoptosis *in vitro*. *International Journal of Nanomedicine.* 3:59–68.
99. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson SR, Moussa F (2005). [60]Fullerene is a powerful antioxidant *in vivo* with no acute or subacute toxicity. *Nano. Lett.* 5: 2578–2585.
100. Giri SD, Chatterjee A (1998). Modulation of mitomycin C-induced sister chromatid exchanges and cell cycle delay by buthionine sulfoximine and reduced glutathione in mouse bone marrow cells *in vivo*. *Mut. Res.* 413:227–34.
101. Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM, Barakat AI (2007). Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environ. Health Perspect.* 115:403–9.

102. Gonzalez KA, Wilson LJ, Wu W, Nancollas GH (2002). Synthesis and *In Vitro* Characterization of a Tissue-Selective Fullerene: Vectoring C60(OH)16AMBP to Mineralized Bone. *Bioorgan. Med. Chem.* 10:1991–1997.

103. Gonzalez L, Sanderson BJS, Kirsch-Volders M (2011). Adaptations of the *in vitro* MN assay for the genotoxicity assessment of nanomaterials. *Mutagenesis* 26:185-91.

104. Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, DeSimone JM (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:11613 -11618.

105. Gregoriadis G (1995.). Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends in Biotechnology.* 13:527-37.

106. Greim H, Borm P, Schins R, Donaldson K, Driscoll K, Hartwig A, Kuempel E, Oberdorster G, Speit G (2001). Toxicity of fibers and particles. Report of the workshop held in Munich, Germany, 26–27 October 2000. *Inhal. Toxicol.* 13:737–54.

107. Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY (2005). Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology.* 213:66–73.

108. He L, Yang L, Zhang ZR, Gong T, Deng L, Gu Z, Sun X (2009). In vitro evaluation of the genotoxicity of a family of novel MeO-PEG-poly(D,L-lactico-glycolic acid)-PEG-OMe triblock copolymer and PLGA nanoparticles. *Nanotechnology.* 20:455102.

109. Hildebrandt N, Hermsdorf D, Signorell R, Schmitz SA, Diederichsen U (2007). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles functionalized with peptides by electrostatic interactions. *ARKIVOC.* (v): 79-90.

110. Hu T, Miller C, Ridder G, Aardema M (1999). Characterization of p53 in Chinese hamster cell lines CHO-K1, CHO-WBL, and CHL: implications for genotoxicity testing. *Mutation Research.* 426: 51–62.

111. Huang ST, Liao JS, Fang HW, Lin CM (2008). Synthesis and anti-inflammation evaluation of new C60 fulleropyrrolidines bearing biologically active xanthine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18: 99–103.

- 112.Husebo LO, Sitharaman B, Furukawa T, Kato L, Wilson J (2004). Fullerenols Revisited as Stable Radical Anions. *J. Am. Chem. Soc.* 126:12055-12064.
- 113.Hyung H, Kim JH (2009). Dispersion of C₆₀ in natural water and removal by conventional drinking water treatment processes water research. *Water Research.*43:2463 – 2470.
- 114.IAEA International Atomic Energy Agency (2001). Cytogenetic analysis for radiation dose assessment-a manual, In: Technical Reports Series No. 405, p. 81–86.
- 115.IARC (International Agency for Research on Cancer) (1997). Polychlorinated Dibenzo-*para*-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 69.
- 116.Ičević I, Đorđević A, Štrbac D (2005). Fulerenol polidentatni ligand. *Tehnika.* 2: 7–10.
- 117.Ičević IDj, Vukmirović SN, Srđenović BU, Sudji JJ, Djordjevic AN, Injac RM, Vasović VM (2011). Protective effects of orally applied fullereneol nanoparticles in rats after a single dose of doxorubicin. *Hem. Ind.* 65:329–37.
- 118.Injac R, Boskovic M, Perse M, Koprivec-Furlan E, Cerar A, Djordjevic A, Strukelj B (2008). Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fullereneol C₆₀(OH)₂₄ via suppression of oxidative stress. *Pharmacol. Rep.*60:742–49.
- 119.Injac R, Perse M, Boskovic M, Djordjevic-Milic V, Djordjevic A, Hvala A, Cerar A, Strukelj B (2008). Cardioprotective Effects of Fullereneol C₆₀(OH)₂₄ on a Single Dose Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Rats With Malignant Neoplasm, *Technology in Cancer Research and Treatment.* 7:1-90.
- 120.Injac R, Perse M, Cerne M, Potocnik N, Radic N, Govedarica B, Djordjevic A, Cerar A, Strukelj B (2009). Protective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer. *Biomaterials.* 30:1184-1196.
- 121.Isakovic A, Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Nikolic N, Vranjes-Djuric S, Mirkovic M, Dramicanin M, Harhaji Lj, Raicevic N, Nikolic Z, Trajkovic V(2006). Distinct Cytotoxic Mechanisms of Pristine versus Hydroxylated Fullerene, *Toxicological Sciences.* 91:173–83.

122. Jacobsen NR, Pojana G, White P, Møller P, Cohn CA, Korsholm KS, Vogel U, Marcomini A, Loft S, Wallin H (2008). Genotoxicity, cytotoxicity, and reactive oxygen species induced by singlewalled carbon nanocevis and C60 fullerenes in the FE1-MutaTM mouse lung epithelial cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 49:476–487.
123. Jain KK (2009). Role of nanobiotechnology in the development of personalized medicine. *Nanomed*. 4:249–52.
124. Jakimov D, Bogdanovic G, Baltic M, Tursijan S, Aleksic L, Djordjevic A, Mrdjanovic J, Vojinovic-Miloradov M (2002). Water-soluble fullerene C60(OH)24 modulates growth and proliferation of K562 human erythroleukemia cell line. In: Mastorakis EN, Kluev VV, Koruga Dj (eds): *Advances in simulation, systems theory and systems engineering*. WSEAS Press. p.117-22.
125. Ji ZQ, Sun H, Wang H, Xie Q, Liu Y, Wang Z (2006). Biodistribution and tumor uptake of 125I-C60(OH)x in mice. *J. Nanoparticle Res*. 8:53-63.
126. Jiang J, Oberdorster G, Biswas P (2009). Characterisation of size, surface naelektrisanje and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J. Nanopart. Res*. 11:77–89.
127. Jiao F, Liu Y, Qu Y, Li W, Zhou G, Ge C, Li Y, Sun B, Chen Ch (2010). Studies on anti-tumor and antimetastatic activities of fullerenol in a mouse breast cancer model. *Carbon*. 48:2231–2243.
128. Jin H, Chen W, Tang XL, Chiang C, Yang J, Schloss J, Wu J (2000). *Neurosci. Res*. 62:600-607.
129. Kadish KM, Ruoff RS, editors (2000). *Fullerenes: Chemistry, physics, and technology*. New York: Wiley 53.
130. Kagan VE, Bayir H, Shvedova AA (2005). Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin. *Nanomedicine* 1:313–16.
131. Kahru A, Dubourguier HC (2010). From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*. 269:105–19.
132. Kamat JP, Devasagayam TP, Priyadarsini KI, Mohan H, Mittal JP (1998). Oxidative damage induced by the fullerene C60 on photosensitization in rat liver microsomes. *Chem. Biol. Interact*. 114:145–59.

133. Kamat JP, Devasagayama TPA, Priyadarshi KI, Monah H (2000). Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implication. *Toxicology*.155: 55-61.
134. Kang SJ, Kim BM, Lee YJ, Chung HW (2008). Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen*.49:399–405.
135. Karihtala P, Soini Y, Vaskivuo L, Bloigu R, Puistola U (2009). DNA adduct 8-hydroxydeoxyguanosine, a novel putative marker of prognostic significance in ovarian carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer*. 19:1047–1051.
136. Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, Moller L (2008). Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanocevis. *Chem. Res. Toxicol*.21:1726–32.
137. Karmali PP, Simberg D (2011). Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 8:343-57.
138. Kaur IP, Rumjhum AP (2007). Nanotechnology: A New Paradigm in Cosmeceuticals. *Nanotechnology: A New paradigm in Cosmetceuticals. Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. 1:171-82.
139. Kell DB (2009). Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC Medical Genomics*. 2:1-79.
140. Khandoga A, Stoeger T, Khandoga AG, Bihari P, Karg E, Ettehadieh D, Lakatos S, Fent J, Schulz H, Krombach F (2010). Platelet adhesion and fibrinogen deposition in murine microvessels upon inhalation of nanosized carbon particles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 8:1632–1640.
141. Khandoudi N, Porte P, Chtourou S, Nesslany F, Marzin D, Le Curieux F (2009). The presence of arginine may be a source of false positive results in the Ames test. *Mutation Research*. 679:65–71.
142. Kikuchi K, Nakahara N, Wakabayashi T, Suzuki S, Shiromaru H, Miyake Y, Saito K, Ikemoto I, Kainosho M, Achiba Y (1992). NMR characterization of isomers of C78, C82 and C84 fullerenes. *Nature*.357:142–5.

143. Kirsh-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate MJ, Kirchner S, Lorge E, Morita T, Norppa H, Surralles J, Vanhauwaert A, Wakata A (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat. Res.* 540:153–63.
144. Klumpp C, Kostarelos K, Prato M, Bianco A (2006). Functionalized carbon nanocevis as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758:404–12.
145. Knežević NŽ, Trewyn BG, Lin VSY (2011). Functionalized mesoporous silica nanoparticle-based visible light responsive controlled release delivery system. *Chem. Commun.* 47: 2817-2819.
146. Kojić V, Jakimov D, Bogdanovic G, Djordjevic A (2005). Effects of fullerene C₆₀(OH)₂₄ on cytotoxicity induced by antitumor drugs on human breast carcinoma cell lines. *Mater. Sci. Forum.* 494:543-48.
147. Kolosnjaj J, Szwarc H, Moussa F (2007). Toxicity studies of fullerenes and derivatives. *Adv. Exp. Med. Biol.* 620:168–80.
148. Kratschmer W, Lamb LD, Fostiropoulos K, Huffman DR (1990). Solid C₆₀: a new form of carbon. *Nature.* 347:354–8.
149. Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF, Smalley RE (1985). C₆₀: Buckminsterfullerene. *Nature.* 318:162–63.
150. Kunzmann A, Andersson B, Thurnherr T, Krug H, Scheynius A, Fadeel B (2010). Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General subjects.* 180:361-373.
151. Lal S, Clare SE, Halas NJ (2008). Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: impending clinical impact. *Acc. Chem. Res.* 41:1842–1851.
152. Landsiedel R, Kapp MD, Schulz M, Wiench K, Oesch F (2009). Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations-many questions, some answers. *Mutation Research.* 681:241–58.
153. Lane DP (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 358:15–6.
154. Larocque J, Bharali DJ, Mousa SA (2009). Cancer detection and treatment: The role of nanomedicines. *Mol. Biotechnol.* 42:358–66.

155. Lens M (2011). Recent Progresses in Application of Fullerenes in Cosmetics. *Recent Patents on Biotechnology*. 5:67-73.
156. Li JJ, Zou L, Hartono D, Ong CN, Bay BH, Lanry Yung LY (2008). Gold nanoparticles induce oxidative damage in lung fibroblasts in vitro. *Adv. Mater.* 20:138–42.
157. Li W, Zhao L, Wei T, Zhao Y, Chen C (2011). The inhibition of death receptor mediated apoptosis through lysosome stabilization following internalization of carboxyfullerene nanoparticles. *Biomaterials*. 32: 4030-4041.
158. Lin AM, Fang SF, Lin SZ, Chou CK, Luh TY, Ho LT (2002). Local carboxyfullerene protects cortical infarction in rat brain. *Neurosci. Res.* 43:317–21.
159. Liong M, Lu J, Kovichich M, Xia T, Ruehm SG, Nel AE, Tamanoi F, Zink JJ (2008). Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery, *ACS Nano*. 2: 889–96.
160. Liu L, Takenaka T, Zinchenko AA, Chen N, Inagaki S, Asada H, Kishida T, Mazda O, Murata S, Yoshikawa K (2007). Cationic silica nanoparticles are efficiently transferred into mammalian cells. *Int. Symp. Micro-Nano Mechatronics Hum. Sci.* 1–2:281–85.
161. Liu X, Lloyd MC, Fedorenko IV, Bapat P, Zhukov T, Huo Q (2008). Enhanced imaging and accelerated photothermalysis of A549 human lung cancer cells by gold nanospheres. *Nanomedicine*. 3:617–26.
162. Lu LH, Lee YT, Chen HW, Chiang LY, Huang HC (1998) The possible mechanisms of the antiproliferative effect of fulleranol, polyhydroxylated C₆₀, on vascular smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 123:1097–1102.
163. Lucente-Schultz RM, Moore VC, Leonard AD, Price BK, Kosynkin DV, Lu M, Partha R, Conyers JL, Tour JM. Antioxidant single-walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 2009.131: 3934–3941.
164. Lynch I, Cedervall T, Lundqvist M, Cabaleiro-Lago C, Linse S, Dawson KA (2007). The nanoparticle–protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Advances in Colloid and Interface Science*. 134–35: 167–174.
165. Lynch I, Dawson KA (2008). Protein–nanoparticle interactions. *Nano Today* 3: 40–47.

166. Maciel C, Fileti EE, Rivelino R (2011). Assessing the solvation mechanism of C₆₀(OH)₂₄ in aqueous solution. *Chemical Physics Letters*. 507:244-247.
167. Maksin T, Djokic D, Jankovic D, Djordjević A, Nešković O (2007). Comparison Of Some Physico-Chemical Parameters And Biological Behavior Of Fullerenol Labelled With Technetium-99m. *Journal Of Optoelectronics And Advanced Materialas*. 9:2571-2577.
168. Marano F, Hussain S, Rodrigues-Lima F, Baeza-Squiban A, Boland S (2010). Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Arch. Toxicol*. 85:733-41.
169. Markovic Z, Todorovic-Markovic B, Kleut D, Nikolic N, Vranjes-Djuric S, Misirkic M, Vucicevic Lj, Janjetovic K, isakovic a, Harhaji Lj, Babic-Stojic B, Dramicanin M, Trajkovic V (2007). The mechanism of cell-damaging reactive oxygen generation by colloidal fullerenes. *Biomaterials*. 28:5437–5448.
170. McEwen, CN, McKay RG, Larsen BS (1992). C₆₀ as a radical sponge. *J. Am. Chem. Soc*. 114:4412–4414.
171. Meng J, Wang DL, Wang PC, Jia L, Chen C, Liang X (2010). Biomedical Activities of Endohedral Metallofullerene Optimized for Nanopharmaceutics. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 10: 8610-8616.
172. Mirkov SM, Djordjevic AN, Andric NL, Andric SA, Kostic TS, Bogdanovic GM, Vojinovic-Miloradov M, Kovacevic R (2004). Nitric oxide scavenging activity of polyhydroxylated fullerenol, C₆₀(OH)₂₄. *Nitric Oxide* 1:201-07.
173. Morose G (2010). The 5 principles of “Design for Safer Nanotechnology”. *J. Cleaner. Prod*. 18: 285–89.
174. Muller J, Decordier I, Hoet HP, Lombaert N, Thomassen L, Huaux F, Lison D, Kirsch-Volders M Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells (2008). *Carcinogenesis*. 29: 427–33.
175. Nabiev I, Mitchell S, Davies A, Williams Y, Kelleher D, Moore R, Yurii K, Gun'ko, S B, Rakovich YP, Donegan JF, Sukhanova A, Conroy J, Cottell D, Gaponik N, Rogach A, Volkov Y (2007). Nonfunctionalized nanocrystals can exploit a cell's active transport machinery delivering them to specific nuclear and cytoplasmic compartments. *Nano Lett*. 7:3452–61.

176. Nair R, Varghese SH, Nair BG, Maekawa T, Yoshida Y, Kumar SD (2010). Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science*. 179:154–63.
177. Nakamura E, Isobe H (2003). Functionalized Fullerenes in Water. The First 10 Years of Their Chemistry, Biology, and Nanoscience. *Accounts of Chemical Research*. 36:807-15.
178. Nan A, Bai X, Son SJ, Lee SB, Ghandehari H (2008). Cellular uptake and cytotoxicity of silica nanocevis. *Nano Lett*. 8:2150–2154.
179. Narita N, Kobayashi Y, Nakamura H, Maeda K, Ishihara A, Mizoguchi T, Usui Y, Aoki K, Simizu M, Kato H, Ozawa H, Udagawa N, Endo M, Takahashi N, Saito N (2009). Multiwalled carbon nanocevis specifically inhibit osteoclast differentiation and function. *Nano Lett*. 9:1406–1413.
180. Natarajan AT (1993). Mechanisms for induction of mutations and chromosome alterations. *Environ. Health Persp*. 10:225–29.
181. Nel A, Xia T, Madler L, Li N (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 311:622–7.
182. Nel AE, Madler L, Velegol D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V, Thompson M (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials*. 8:543–57.
183. Nielsen GD, Roursgaard M, Jensen KA, Poulsen SS, Larsen ST (2008). *In vivo* biology and toxicology of fullerenes and their derivatives. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. 103:197–208.
184. Niemeyer CM (2001). Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science. *Angew. Chem. Int. Ed*. 40:4128–4158.
185. Nishiyama N, Kataoka K (2006). Current state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. *Pharmacol. Ther*. 112:630–48.
186. Nishiyama N, Okazaki S, Cabral H, Miyamoto M, Kato Y, Sugiyama Y, Kazuto N, Matsumura Y, Kazunori K (2003). Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res*. 63:8977–8983.
187. Nishizawa C, Hashimoto N, Yokoo S, Funakoshi-Tago M, Kasahara T, Takahashi K, Nakamura S, Mashino T (2009). Pyrrolidinium-type fullerene

derivative-induced apoptosis by the generation of reactive oxygen species in HL-60 cells. 43:1240-1247.

188.Niwa Y, Iwai N (2006). Genotoxicity in Cell Lines Induced by Chronic Exposure to Water-Soluble Fullerenes Using Micronucleus Test. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 11:292–97.

189.Norde W (2008). My voyage of discovery to proteins in flatland...and beyond. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*. 61:1–9.

190.Oberdörster E (2004). Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ. Health Perspect*. 112:1058–1062.

191.Oberdorster G (2001). Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 74:1-8.

192.Oberdorster G (2009). Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine:concepts of nanotoxicology. *Journal of Internal Medicine*. 267:89–105.

193.Oberdorster G, Stone V, Donaldson K (2007). Toxicology of nanoparticles. A historical perspective. *Nanotoxicology*. 1: 2-25.

194.Oliveira RJ, Ribeiro LR, da Silva AF, Matuo R, Mantovani MS (2006). Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of glucan from barley, in CHO-K1-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. *Toxicol. In Vitro*. 20:1225-1233.

195.Orive G, Ali OA, Anitua E, Pedraz JL, Emerich DF (2010). Biomaterial-based technologies for brain anti-cancer therapeutics and imaging. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1806: 96–107.

196.Orrenius S (2007). Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug. Metab. Rev*. 39: 443-55.

197.Otsubo T, Aso Y, Takimiya K (2005). Fullerene-tethered oligothiophenes as advanced molecular electronics materials. *Pure. Appl. Chem*. 77:2003–10.

198.Papageorgiou I, Brown C, Schins R, Singh S, Newson R, Davis S, Fisher J, Ingham E (2007). Case CP The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt–chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials*.28:2946–58.

199. Park EJ, Yi J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K (2008). Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett.* 180:222–29.
200. Partha R, Conyers JL (2009). Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials. *Int. J. Nanomedicine.* 4:261-75.
201. Peralta, IRG (2010). In-vivo studies of fullerene-bis(bisphosphonate) and synthesis of a fullerene-bisphosphonate-beta-blocker conjugate for the prevention and treatment of osteoporosis. Dissertation. Rice University.
202. Peters K, Unger RE, Kirkpatrick CJ, Gatti AM, Monari E (2004). Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: studies on viability, proliferation and inflammation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 15:321–25.
203. Piatek A, Dawid A, Gburski Z (2011). The properties of small fullereneol cluster (C₆₀(OH)₂₄)₇: Computer simulation, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 79:819–23.
204. Pickering KD, Wiesner MR (2005). Fullerol-sensitized production of reactive oxygen species in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* 39: 1359-1365.
205. Pinteala M, Dascalu A, Ungurenasu C (2009). Binding fullereneol C-60(OH)₂₄ to dsDNA. *International Journal of Nanomedicine.* 4:193–99.
206. PlumLee GS, Morman SA, Ziegler TL (2006). The toxicological geochemistry of earth materials: an overview of processes and the interdisciplinary methods used to understand them. *Medical Mineralogy and Geochemistry.* 64: 5–57.
207. Podolski IY, Podlubnaya ZA, Kosenko EA, Mugantseva EA, Makarova EG, Marsagishvili LG, Shpagina MD, Kaminsky YG, Andrievsky GV, Klochkov VK (2007). Effects of hydrated forms of C-60 fullerene on amyloid beta-peptide fibrillization in vitro and performance of the cognitive task. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 7: 1479–1485.
208. Poole CP, Owens FJ (2003). *Introduction to Nanotechnology.* Hoboken: Wiley-Interscience.
209. Pritsos CA, Sartorelli AC (1986). Generation of reactive oxygen radicals through bioactivation of mitomycin antibiotics. *Cancer Res.* 46: 3528–3532.

210. Qiao R, Roberts AP, Mount AS, Klaine SJ, Ke PC (2007). Translocation of C60 and its derivatives across a lipid bilayer. *Nano Lett.* 7:614–19.

211. Qingnuan L, Xiaodong XZ, Ruili L, Qieqie Du, Xiaoguang S, Shaoliang C, Wenxin L (2002). Preparation of ^{99m}Tc -C60(OH)_x and its biodistribution studies. *Nuclear Med. Biol.* 29: 707–10. Qun-Fen Z, Ying Z, Tie-Cheng R, Jun-Gang L, Qing-Nuan L, Wen-Xin L (2006). Cytotoxicity of fullereneols for *Tetrahymena pyriformis*. *Nuclear Science and Techniques.* 17:1-5.

213. Rancan F, Rosan S, Boehm F, Cantrell A, Brellreich M, Schoenberger H, Hirsch A, Moussa F (2002). Cytotoxicity and photocytotoxicity of a dendritic C(60) mono-adduct and a malonic acid C(60) tris-adduct on Jurkat cells. *J. Photochem. Photobiol.* B67:157–62.

214. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 377:159–69.

215. Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, Fuchs H (2009). Nanomedicine - challenge and perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48:872–97.

216. Roberts JE, Wielgus AR, Boyes WK, Andley U, Chignell CF (2008). Phototoxicity and cytotoxicity of fullerol in human lens epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 228:49–58.

217. Rolland A (1993). *Pharmaceutical Particulate Carriers, Therapeutic Applications.* New York, NY: Marcel Dekker.

218. Rotello VM (2003). *Nanoparticles: Building Blocks for Nanotechnology.* 1st ed. New York: Springer.

219. Roursgaard M, Poulsen SS, Kepley CL, Hammer M, Nielsen GD, Larsen ST (2008). Polyhydroxylated C60 fullerene (fullereneol) attenuates neutrophilic lung inflammation in mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 103:386–88.

220. Rouse JG, Yang J, Barron AR, Monteiro-Riviere NA (2006). Fullerene-based amino acid nanoparticle interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol. In Vitro* 20:1313–1320.

221. Ryan JJ, Bateman HR, Stover A, Gomez G, Norton SK, Zhao W, Schwartz LB, Lenk R, Kepley CL (2007). Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response. *J. Immunol.* 179:665–72.

222. Sadowska AM, Verbraecken J, Darquennes K, De Backer WA (2006). Role of N-acetylcysteine in the management of COPD. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 1:425–34.
223. Sah A, Kapri A, Zaidi MGH, Negi H, Goel R (2010). Implications of Fullerene-60 upon in-vitro LDPE Biodegradation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20:908–916.
224. Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine.* 3:20–31.
225. Savage JRK (1975). Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.* 12:103–22.
226. Sayes CM, Fortner JD, Guo W, Lyon D, Boyd AM, Ausman K, Sitharaman B, Wilson LJ, Hughes JB, West JL, Colvin VL Tap YJ (2004). The differential cytotoxicity of water-soluble fullerenes. *Nano Lett.* 4:1881-1887.
227. Sayes CM, Gobin AM, Ausman KD, Mendez J, West JL, Colvin VL (2005). Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials.* 26:7587–95.
228. Sayes CM, Liang F, Hudson JL, Mendez J, Guo W, Beach JM, Moore VC, Doyle CD, West JL, Billups WE, Ausman KD, Colvin VL (2006). Functionalization density dependence of single-walled carbon nanotubes cytotoxicity in vitro. *Toxicol. Lett.* 161:135–42.
229. Sayes CM, Reed KL, Warheit DB (2007 a). Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol. Sci.* 97:163–80.
230. Sayes CM, Marchione AA, Reed KL, Warheit DB (2007 b). Comparative pulmonary toxicity assessments of C60 water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles. *Nano Lett.* 7:2399–2406.
231. Schins RP, Borm PJ (1999). Mechanisms and mediators in coal dust induced toxicity: a review. *The Annals of Occupational Hygiene.* 43:7–33.
232. Schins RPF (2002). Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers inhalation toxicology. *Inhal. Toxicol.* 14:57–78.
233. Schins RPF, Donaldson K (2000). Nuclear factor kappa-B activation by particles and fibres. *Inhal. Toxicol.* 12:317–26.
234. Schmid G (2004). *Nanoparticles: From Theory to Application.* 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH.

235.Schmid G (2008). The relevance of shape and size of Au-55 clusters. *Chemical Society Reviews* .37:1909–1930.

236.Schoenhagen P, Conyers JL (2008). Nanotechnology and atherosclerosis imaging: emerging diagnostic and therapeutic applications. *Recent Pat. Cardiovasc. Drug Discov.* 3:98–104.

237.Scholzen T, Gerdes J (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell Physiol.* Mar.182:311-22.

238.Schulze C, Kroll A, Lehr CM, Schafer UF, Becker K, Schnekenburger J, Isfort CS, Landsiedel R, Wohlleben W (2008). Not ready to use - overcoming pitfalls when dispersing nanoparticles in physiological media. *Nanotoxicology.* 2:51–61.

239.Shi X, Thomas TP, Myc LA, Kotlyar A, Baker JR Jr (2007). Synthesis, characterization, and intracellular uptake of carboxyl-terminated poly(amidoamine) dendrimer-stabilized iron oxide nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.*9:5712–5720.

240.Shvedova AA, Kisin ER, Porter D, Schulte P, Kagan VE, Fadeel B, Castranova V(2009). Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanocevis: two faces of Janus? *Pharmacol. Ther.* 121:192–204.

241.Silva GA (2006). Neuroscience nanotechnology: progress, opportunities and challenges. *Nature Reviews Neuroscience.* 7: 65-74.

242.Simberg D, Duza T, Park JH, Essler M, Pilch J, Zhang LL, Derfus AM, Yang M, Hoffman RM, Bhatia S, Sailor MJ, Ruoslahti E (2007). Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 932–36.

243.Singh N, Manshian B, Jenkins GJS, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TGG, Wright CJ, Doak SH (2009). NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials.* 30:3891–3914.

244.Singh NP, McCoy M.T, Tice RR, Schneider EL (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research.* 175:184–91.

245.Singh S, Nalwa HS (2007). Nanotechnology and health safety – toxicity and risk assessments of nanostructured materials on human health. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7:3048–3070.

246.Sitharaman B, Tran LA, Pham QP (2007). Gadofullerenes as nanoscale magnetic labels for cellular MRI. *Contrast Media Mol. Imaging.*2:139–46.

247. Slavić Marija (2011). Direktni farmakološki efekti fulerenola C₆₀(OH)₂₄ na modelu izolovanog glatkog mišića pacova i uloga antioksidativnog sistema. Doktorska disertacija: Beograd, Srbija: Univerzitet u Beogradu.

248. Spohn P, Hirsch C, Hasler F, Bruinink A, Krug HF, Wick P (2009). C₆₀ fullerene: a powerful antioxidant or a damaging agent? The importance of an in-depth material characterization prior to toxicity assays. *Environ. Pollut.* 157:1134–1139.

249. Srđenović Branislava (2010). Uticaj fulerenola C₆₀(OH)₂₄ na oksidativni status bubrega, pluća i testisa pacova nakon jednokratne primene doxorubicina. Doktorska teza. Novi Sad, Srbija: Univerzitet u Novom Sadu.

250. Srdjenovic B, Milic-Torres V, Grujic N, Stankov K, Djordjevic A, Vasovic V (2010). Antioxidant properties of fullereneol C(60)(OH)(24) in rat kidneys, testes, and lungs treated with doxorubicin. *Toxicol. Mech. Methods.* 20: 298-305.

251. Stankov K, Bogdanovic G, Katanic J, Bogdanovic V, Stankov S, Katic Bajin K, Djordjevic A (2011). Expression analysis of proliferation, apoptosis and redox regulation-related genes in nanoparticle and doxorubicin treated K562 cells. *FEBS Journal.* 278:74-445.

252. Stone V, Johnston H, Schins RPF (2009). Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations in vitro methods for nanotoxicology. *Critical Reviews in Toxicology.* 39: 613–26.

253. Stone V, Kinloch IA, Clift M, Fernandes TF, Ford AT, Christofi N. Nanoparticle toxicology and ecotoxicology: the role of oxidative stress. In: Zhao Y, Nalwa HS, editors. *Nanotoxicology - interactions of nanomaterials with biological systems.* American Scientific Publishers; 2007.

254. Su Y, Xu J, Shen P, Li J, Wang L, Li Q, Li W, Xu G, Fan C, Huang Q (2010). Cellular uptake and cytotoxic evaluation of fullereneol in different cell lines. *Toxicology.* 269:155–59.

255. Suh W H, Suslick KS, Stucky GD, Suh YH (2009). Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in Neurobiology.* 87:133–70.

256. Szendi K, Varga C (2008). Lack of genotoxicity of carbon nanotubes in a pilot study. *Anticancer Research.* 28:349-352.

257. Szendi K, Wirnitzer U, Herbold B, Voetz M, Ragot J (2009). Studies on the in vitro genotoxicity of baytubes, agglomerates of engineered multi-walled carbon-nanotubes (MWCNT). *Toxicology Letters*. 186:160–65.
258. Terentyuk GS, Maslyakova GN, Suleymanova LV, Khlebtsov BN, Kogan BY, Akchurin GG, Shantrocha AV, Maksimova IL, Khlebtsov NG, Tuchin VV (2009). Circulation and distribution of gold nanoparticles and induced alterations of tissue morphology at intravenous particle delivery. *J. Biophotonics*. 2:292–302.
259. Torchilin VP (2006). Multifunctional nanocarriers. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 58:1532–1555.
260. Toyokuni S (1998). Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation. *Biotherapy*. 11:147-54.
261. Trajković S, Dobric S, Djordjevic A, Dragojevic-Simic V, Milovanovic V (2005). Radioprotective efficiency of fullereneol in irradiated mice. *Mater.Sci.Forum*. 494:549-54.
262. Trajković S, Dobric S, Jacevic V, Dragojevic-Simic V, Milovanovic Z, Dordevic A (2007). Tissue-protective effects of fullereneol C₆₀(OH)₂₄ and amifostine in irradiated rats. *Colloids Surf. Biointerfaces*. 58:39–43.
263. Ueng TH, Kang JJ, Wang HW, Cheng YW, Chiang LY (1997). Suppression of microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases and mitochondrial oxidative phosphorylation by fullereneol, a polyhydroxylated fullerene C₆₀. *Toxicol. Lett.* 93: 29-37.
264. Usenko CY, Harper SL, Tanguay RL (2007). In vivo evaluation of carbon fullerene toxicity using embryonic zebrafish. *Carbon NY*. 45:1891–1898.
265. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis, *Journal of Environmental Science and Health. Part C*. 27:120–139.
266. Valinluck V, Sowers LC (2007). Inflammation-mediated cytosine damage: a mechanistic link between inflammation and the epigenetic alterations in human cancers. *Cancer Res*. 67:5583–5586.
267. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160:1–40.

268. Verma RS, Babu A (1995). Tissue culture techniques and chromosome preparation. In: Verma RS, Babu A, editors. *Human Chromosomes, Principles and Techniques*. New York: McGraw-Hill, Inc. Health Professions Division, p. 10–13.
269. Vilenko B, Marcoux PR, Lekka M, Sienkiewicz A, Fehér T, Forró L (2006). Spectroscopic and Photophysical Properties of a Highly Derivatized C₆₀ Fullerol. *Adv. Funct. Mater.* 16:120–28.
270. Villalonga-Barber C, Micha-Screttas M, Steele BR, Georgopoulos A, Demetzos C (2008). Dendrimers as biopharmaceuticals: synthesis and properties. *Curr. Top. Med. Chem.* 8:1294–1309.
271. Vivero-Escoto JL, Slowing II, Trewyn BG, Lin VSY (2010). Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Controlled Drug Delivery, *Small Nano Micro.* 6:1952-1967.
272. Walczyk D, Bombelli FB, Monopoli MP, Lynch I, Dawson KA (2010). What the cell “sees” in bionanoscience. *Journal of the American Chemical Society.* 132:5761–5768.
273. Waldman WJ, Kristovich R, Knight DA, Dutta PK (2007). Inflammatory properties of iron-containing carbon nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.* 20:1149–54.
274. Wong-Ekkabut J, Baoukina S, Triampo W, Tang IM, Tieleman DP, Monticelli L (2008). Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes. *Nat. Nanotechnol.* 3:363–68.
275. Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T, Sioutas C, Yeh JI, Wiesner MR, Nel AE (2006). Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett.* 6:1794–1807.
276. Yamago S, Tokuyama H, Nakamura E, Kikuchi K, Kananishi S, Sueki K, Nakahara H, Enomoto S, Ambe F (1995). *In vivo* biological behaviour of a water-miscible fullerene: ¹⁴C labelling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity. *Chem. Biol.* 2:385–89.
277. Yamakoshi YN, Yagami T, Fukuhara K, Sueyoshi S, Miyata N (1994). Solubilization of fullerene into water with polyvinylpyrrolidone applicable to biological tests. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 517–18.

278. Yamawaki H, Iwai N (2006). Cytotoxicity of water-soluble fullerene in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 290:C1495–1502.

279. Yang J, Wang K, Driver J, Yang J, Barron AR (2007). The use of fullerene substituted phenylalanine amino acid as a passport for peptides through cell membranes. *Org. Biomol. Chem.* 5:260–66.

280. Yin JJ, Lao F, Fu PP, Wamer WG, Zhao Y, Wang PC, Qiu Y, Sun B, Xing G, Dong J, Liang XJ, Chen C (2009). The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalised fullerene materials. *Biomaterials.* 30: 611–12.

281. Zastawny TH, Altman SA, Randers-Eichhorn L, Madurawe R, Lumpkin JA, Dizdaroglu M, Rao G (1995). DNA base modifications and membrane damage in cultured mammalian cells treated with iron ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18:1013–1022.

282. Zhao Q, Li Y, Xu J, Liu R, Li W (2005). Radioprotection by fullerenols of *Stylonychia mytilus* exposed to γ -rays. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 81:169-75.

283. Zhu X, Su B, Wang X, Smith MA, Perry G (2007). Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Mol. Life Sci.* 64:2202–2210.

284. Zolnik BS, Gonzalez-Fernandez A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA (2010). Minireview: nanoparticles and the immune system. *Endocrinology.* 151:458–65.

BIOGRAFIJA AUTORA

Jasminka Mrđanović je rođena 1971. godine u Novom Sadu, gde je završila osnovnu i srednju Medicinsku školu. Prirodno Matematički fakultet, smer diplomirani biolog, upisala je 1989/90. godine a diplomirala 1997.godine sa prosečnom ocenom 8,93. Iste godine se zaposlila na Institutu za Onkologiju Vojvodine u Sremskoj Kamenici i upisala postdiplomske studije na katedri za genetiku, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. 2007. godine, stekla je zvanje magistra bioloških nauka. 2009. godine, specijalizirala je medicinsku genetiku sa odličnim uspehom na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu i stekla zvanje specijaliste medicinske genetike. Učestvovala je na 5 projekata finansiranih od strane Ministarstva za nauku i prosvetu Republike Srbije. U toku dosadašnjeg naučno istraživačkog rada, autor je ili koautor 1 monografije, 12 naučnih radova i više saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima.

Udata je i majka dva dečaka.

IZJAVA O AUTORSTVU

Потписани-а: Мрђановић Јасминка

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Утицај фулеренола $C_{60}(OH)_{24}$ на учесталост хромозомских аберација и микронуклеуса у ћелијској линији CHO-K1 оваријума хрчка и у култури лимфоцита периферне крви човека“

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

У Београду, 25.05.2012.

Потпис докторанда



Мрђановић Јасминка

**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ŠTAMPANE I ELEKTRONSKE VERZIJE
DOKTORSKOG RADA**

Име и презиме аутора: Јасминка Мрђановић

Студијски програм:

Наслов рада: „Утицај фулеренола $C_{60}(OH)_{24}$ на учесталост хромозомских аберација и микронуклеуса у ћелијској линији CHO-K1 оваријума хрчка и у култури лимфоцита периферне крви човека“

Ментори: Академик, професор др Марко Анђелковић и професор др Александар Ђорђевић

Потписани: Мрђановић Јасминка

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 25.05.2012.



Мрђановић Јасминка

IZJAVA O KORIŠĆENJU

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

„Утицај фулеренола $C_{60}(OH)_{24}$ на учесталост хромозомских аберација и микронуклеуса у ћелијској линији CHO-K1 оваријума хрчка и у култури лимфоцита периферне крви човека“ која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 25.05.2012.

Потпис докторанда

Мрђановић Јасминка