

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ

ЂОРЂЕ Д. ЦВЈЕТИНОВИЋ

**Синтеза, физичкохемијска карактеризација
и *in vitro/in vivo* испитивање липозома
модификованих глукозом обележених
радионуклидима (^{99m}Tc , ^{177}Lu) за примену у
терапији и дијагностици канцера**

докторска дисертација

Београд, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHYSICAL CHEMISTRY

ĐORĐE D. CVJETINOVIĆ

**Synthesis, physicochemical characterization
and *in vitro/in vivo* investigation of glucose
modified liposomes labeled with
radionuclides (^{99m}Tc , ^{177}Lu) for application in
cancer therapy and diagnostics**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

Ментори:

1. **др Милош Мојовић**, редовни професор

Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију

2. **др Марко Перић**, виши научни сарадник

Универзитет у Београду, Институт за нуклеарне науке-Винча

Чланови комисије:

1. **др Ана Поповић-Бијелић**, ванредни професор

Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију

2. **др Марко Даковић**, ванредни професор

Универзитет у Београду, Факултет за физичку хемију

3. **др Зорана Милановић**, научни сарадник

Универзитет у Београду, Институт за нуклеарне науке-Винча

Датум одбране докторске дисертације: _____

Захвалница

Ова докторска дисертација је урађена у Лабораторији за радиоизотопе, Института за нуклеарне науке-Винча и на Факултету за физичку хемију, Универзитета у Београду. Успешно истраживање и резултати који су проистекли из њега су плод добронамерног усмеравања и помоћи великог броја колега.

Пре свега желео бих да искажем велику захвалност др Сањи Врађеш-Ђурић на прилици и могућности да спроведем овако опсежно и захтевно истраживање у Лабораторији за радиоизотопе као и на огромној помоћи током процеса поставке самих експеримената.

Захваљујем се др Дрини Јанковић и др Жељку Пријовићу на усмеравању и подучавању приликом рада са радиоизотопима и са биолошким моделима.

Веома сам захвалан др Марији Мирковић, др Зорани Милановић и др Магдалени Радовић на свој њиховој помоћи приликом рада у лабораторији које је подразумевало велики број успешних и неуспешних синтеза, обележавања и других испитивања као и писања радова и тумачења добијених резултата.

Хтео бих посебно да се захвалим др Ђури Накаради на помоћи приликом иницијалног отпочињања експеримената и подучавања о правилној и ефикасној синтези липозома.

Ментору др Милошу Мојовићу сам веома захвалан на усмерењу и почетној идеји на којој сам базирао спроведено истраживање и на чињеници да је био уз мене од почетка до краја, уз мноштво корисних савета приликом самог истраживања али и писања докторске дисертације.

Ментору др Марку Перићу сам захвалан на свим конструктивним идејама и разговорима које смо разменили током процеса финализирања докторске дисертације и одговарајућих података представљених у оквиру дисертације.

На великој помоћи приликом сређивања докторске дисертације желим посебно да се захвалим др Марку Даковићу и др Ани Поповић-Бијелић, чији су савети значајно допринели квалитету дисертације односно правилном тумачењу резултата и њиховом презентовању.

Колеги др Ђанију Шкаламери и професору Миловану Ивановићу сам изузетно захвалан на практичној и стручној помоћи приликом органских синтеза и добијању одговарајућих деривата.

За крај желео бих да се захвалим колегама из Центра за електронску микроскопију а посебно професорки др Александри Кораћ на помоћи приликом ТЕМ снимања и правилном тумачењу добијених резултата као и колегиници Јелени Петровић из Лабораторије за физичку хемију око помоћи приликом ИСП-ОЕС анализа.

Синтеза, физичкохемијска карактеризација и *in vitro/in vivo* испитивање липозома модификованих глукозом обележених радионуклидима (^{99m}Tc , ^{177}Lu) за примену у терапији и дијагностици канцера

Сажетак

Липозоми представљају систем за доставу лекова у терапији и дијагностици канцера пошто су биокompatibilни, смањују токсичност и повећавају ефикасност лекова које преносе. Ово је последица тога што лекови смештени унутар липозома немају директан додир са здравим ткивом, липозоми показују дуготрајно задржавање у циркулацији и тзв. ефекат повећане пропустљивости и задржавања (енг. *enhanced permeability and retention, EPR*). Да би се омогућила већа употреба липозома у медицини потребно је обезбедити селективније накупљање у патологији и обезбедити поуздан механизам за контролисану доставу лекова. Ћелије канцера троше много веће количине глукозе у односу на здраве ћелије и на тој њиховој карактеристици засновано је спроведено истраживање. Липозоми модификовани глукозом би могли специфично да се везују за ћелије канцера услед постојања великог броја глукозних (*GLUT*) рецептора на њиховој површини. На овај начин би било могуће остварити циљану доставу лекова, које липозоми преносе, у посредну околину ћелија канцера. У оквиру овог истраживања синтетисани су липозоми модификовани глукозом, окарактерисани су различитим техникама, њихове физичкохемијске особине су одређене и извршено је испитивање њихове способности да специфично циљају ћелије канцера на *in vitro* и *in vivo* моделима. Сва испитивања су вршена поређењем са контролном групом липозома који нису модификовани глукозом. Модификација глукозом је вршена током саме синтезе липозома путем процеса сидрења посебно припремљеног молекула L, који се састоји од неполарног дела (холестерол) и поларног дела (глукозни остатак). Радионуклиди ^{99m}Tc и ^{177}Lu се често користе у нуклеарној медицини за дијагностику (^{99m}Tc и ^{177}Lu) и терапију (^{177}Lu) канцера па су зато коришћени за радиообележавање испитиваних липозома. Оптимизован је и развијен процес радиообележавања липозома, испитана је ефикасност таквог радионуклидног везивања као и радиохемијска стабилност радиообележених липозома. Спроведена *in vitro* испитивања су показала да се липозоми модификовани глукозом везују за здраве и за канцер ћелије, при чему се значајно више везују за ћелије канцера, у поређењу са контролном групом немодификованих липозома. Такође, приликом везивања за ћелије уочена је конкуренција са слободном глукозом што је довело до закључка да липозоми модификовани глукозом конкурирају за иста места везивања односно за *GLUT* рецепторе. Биодистрибуција липозома модификованих глукозом у *in vivo* и *ex vivo* испитивањима је показала статистички значајно накупљање односно циљање ћелија канцера у односу на здраве ћелије. Да би се испитала

могућност контролисаног отварања липозома односно контролисане доставе лекова, липозоми модификовани глукозом су напуњени магнетним Fe_3O_4 наночестицама и изложени спољашњем магнетном пољу. У присуству променљивог магнетног поља долази да загревања магнетних наночестица које топлоту преносе и на липозоме, односно липидни двослој, што доводи до отварања липозома. Показано је да се липозоми напуњени магнетним наночестицама могу ефикасно отворити посредством магнетног поља. Резултати представљени у овом истраживању показују да су липозоми модификовани глукозом успешно синтетисани и физичкохемијски окарактерисани док *in vitro* и *in vivo* испитивања показују да је основна хипотеза тачна и да се липозоми модификовани глукозом специфично накупљају у ћелијама канцера. Имајући у виду специфично везивање за ћелија канцера као и способност контролисаног отварања липозома, може се рећи да је успешно развијен систем за циљану и контролисану доставу лекова за потенцијалну дијагностику и терапију канцера.

Кључне речи: липозоми; модификација глукозом; радиообележавање; канцер; циљана достава лекова; *in vitro* стабилност; *in vivo* биодистрибуција; *GLUT* рецептори; Fe_3O_4 магнетне наночестице; трансмисиона електронска микроскопија.

Научна област: Физичка хемија

Ужа научна област: Радиохемија, биофизичка хемија

Synthesis, physicochemical characterization and *in vivo/in vitro* evaluation of glucose modified liposomes radiolabeled with radionuclides (^{99m}Tc, ¹⁷⁷Lu) for cancer therapy and diagnostics

Abstract

Liposomes are promising drug's delivery systems for use in cancer therapy and diagnostics due to their biocompatibility, decreased toxicity, and increased efficiency of liposome-encapsulated drugs. This is because liposome-encapsulated drugs have no direct contact with the healthy tissue, liposomes show prolonged circulation and enhanced permeability and retention (*EPR*) effects. To increase the use of liposomes in medicine more specific cancer cell targeting is required, coupled with a reliable mechanism for controlled drug release. This study has been based on the fact that cancer cells spend more glucose than healthy cells. By synthesizing glucose modified liposomes it could be possible to create a drug delivery system capable of specific cancer cell targeting by bonding via glucose (*GLUT*) receptors. This way targeted drug delivery via liposomes to cancer cells could be achieved. In this study glucose modified liposomes have been synthesized, their physicochemical properties characterized with various techniques and their ability to specifically target cancer cells has been tested on *in vitro* and *in vivo* models. All measurements were performed in comparison to a control group of liposomes unmodified with glucose. Glucose modification was performed during the synthesis procedure using the anchoring procedure of custom-made substance L, that is constituted from a nonpolar group (cholesterol) and a polar group (glucose residue). Radionuclides ^{99m}Tc and ¹⁷⁷Lu are commonly used in nuclear medicine for cancer diagnostics (^{99m}Tc and ¹⁷⁷Lu) and therapy (¹⁷⁷Lu) and they were used for liposome radiolabeling. Liposome radiolabeling process with radionuclides ^{99m}Tc and ¹⁷⁷Lu has been developed and optimized, while the radionuclide binding efficiency and radiochemical stability have also been tested. *In vitro* studies have shown that glucose modified liposomes exhibit increased binding to healthy and especially cancer cells, compared to the control group of unmodified liposomes. Free glucose competition has also been observed that leads to a conclusion that glucose modified liposomes compete with glucose for the same bonding sites or more specifically for *GLUT* receptors. Biodistribution of glucose modified liposomes for *in vivo* and *ex vivo* studies show a statistically significant difference in cancer cell uptake, compared with healthy cells. Liposomes were further loaded with Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and exposed to an external fluctuating magnetic field, in order to investigate the ability of controlled opening or more specific controlled drug release. The presence of a fluctuating magnetic field induces heating of nanoparticles and this effect spreads on liposomes, or specifically on the lipid bilayer, and this causes liposome opening. A high efficiency of liposome opening was achieved by an exposure to a fluctuating magnetic field. Data presented in this study shows that glucose modified liposomes have been successfully synthesized and physicochemically characterized while *in vitro* and *in vivo* investigations

confirm the initial hypothesis, that glucose modified liposomes specifically accumulate in cancer cells. Considering the specific cancer cell targeting as well as the ability to achieve controlled release it is safe to say that a drug delivery system with targeted/controlled release capabilities has been developed for potential cancer diagnostics and therapy.

Key words: liposomes; glucose modification; radiolabeling; cancer; targeted drug delivery; *in vitro* stability; *in vivo* biodistribution; GLUT receptors; Fe₃O₄ magnetic nanoparticles; transmission electron microscopy.

Scientific field: Physical chemistry

Scientific subfield: Radiochemistry, biophysical chemistry

САДРЖАЈ

| | |
|--|-----------|
| I УВОД..... | 1 |
| II ТЕОРИЈСКИ ДЕО | 2 |
| 2.1. Липозоми | 2 |
| 2.2. Синтеза липозома..... | 5 |
| 2.2.1. Хидратација танког слоја | 6 |
| 2.2.2. Механичка екструзија | 7 |
| 2.2.3. Лиофилизација | 7 |
| 2.2.4. Испаравање реверзне фазе | 8 |
| 2.2.5. Инјектовање алкохола | 9 |
| 2.2.6. Инјектовање етра | 9 |
| 2.2.7. Соникација | 10 |
| 2.2.8. Микрофлуидизација | 10 |
| 2.2.9. Отклањање детерџента..... | 11 |
| 2.2.10. Метода грејања | 11 |
| 2.2.11. Метода мржњења–топљења | 12 |
| 2.2.12. Метода мехура | 12 |
| 2.2.13. Електроформирање | 12 |
| 2.2.14. Метода суперкритичног флуида | 13 |
| 2.3. Функционализација липозома..... | 14 |
| 2.3.1. Процес модификација липозома | 14 |
| 2.3.2. Типови површинске модификација липозома | 17 |
| 2.3.3. Циљана достава лекова | 20 |
| 2.3.4. Контролисано отварање липозома..... | 22 |
| 2.3.5. Липозоми у терапији тумора | 26 |
| 2.4. Радионуклиди | 27 |
| 2.5. Производња радионуклида за медицинске потребе | 30 |
| 2.5.1. Производња $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ генератора | 32 |
| 2.6. Примена радионуклида у медицини..... | 35 |
| 2.7. Примена радионуклида у дијагностици | 36 |
| 2.7.1. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ –сцинтиграфија | 37 |
| 2.7.2. Сцинтиграфија јодом..... | 38 |
| 2.8. Терапија радиофармацеутицима..... | 39 |
| 2.9. Радионуклидна тераностика..... | 41 |
| III ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО | 43 |
| 3.1. Експериментални рад..... | 43 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.2. | Експерименталне методе и материјали..... | 46 |
| 3.2.1. | Хемикалије и реагенси | 46 |
| 3.2.2. | Синтеза липозома и МНЧ | 46 |
| 3.2.3. | Ћелијске линије..... | 47 |
| 3.2.3.1 | Туморски ксенографти..... | 47 |
| 3.2.4. | Методе карактеризације липозома..... | 48 |
| 3.2.4.1 | Динамичко расејавање светлости | 48 |
| 3.2.4.2 | Трансмисиона електронска микроскопија | 49 |
| 3.2.4.3 | ИСП–ОЕ спектроскопија..... | 50 |
| 3.2.4.4 | Инфрацрвена спектроскопија..... | 50 |
| 3.2.4.5 | Отварање липозома помоћу магнетног поља | 51 |
| 3.2.5 | Радиообележавање липозома..... | 52 |
| 3.2.5.1 | Обележавање ^{99m}Tc | 52 |
| 3.2.5.2 | Обележавање ^{131}I | 52 |
| 3.2.5.3 | Обележавање ^{177}Lu | 53 |
| 3.2.5.4 | Радиохемијска чистоћа | 53 |
| 3.2.5.5 | <i>ITLC</i> хроматографија | 53 |
| 3.2.5.6 | Детекција и квантификација активности | 54 |
| 3.2.6 | <i>In vitro</i> испитивања | 55 |
| 3.2.6.1 | <i>In vitro</i> стабилност | 55 |
| 3.2.6.2 | Механизам везивања липозома за ћелије..... | 55 |
| 3.2.6.3 | Флуоресцентна микроскопија | 55 |
| 3.2.6.4 | Спектрофлуориметрија | 56 |
| 3.2.7 | Испитивања биолошке расподеле | 56 |
| 3.2.7.1 | Рендгенографија | 57 |
| 3.2.7.2 | Сцинтиграфија | 57 |
| 3.2.8 | Статистичка анализа..... | 58 |
| IV | РЕЗУЛТАТИ..... | 59 |
| 4.1. | Синтеза и карактеризација липозома | 59 |
| 4.1.1. | Резултати DLS мерења | 59 |
| 4.1.2. | Резултати TEM мерења | 60 |
| 4.1.3. | Резултати ИСП–ОЕС мерења | 64 |
| 4.1.4. | Резултати мерења инфрацрвеном спектроскопијом | 65 |
| 4.1.5. | Ефикасност отварања липозома у променљивом магнетном пољу..... | 69 |
| 4.2. | Испитивање радиохемијске чистоће | 70 |
| 4.2.1. | Радиохемијска чистоћа ^{99m}Tc –липозома..... | 70 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.2.2. | Радиохемијска чистота ^{131}I -липозома | 76 |
| 4.2.3. | Радиохемијска чистота ^{177}Lu -липозома | 79 |
| 4.3. | <i>In vitro</i> испитивања | 86 |
| 4.3.1. | <i>In vitro</i> стабилност радиообележених липозома | 86 |
| 4.3.2. | <i>In vitro</i> испитивање везивања L_0 и L_4 формулација липозома за ћелије различитих ћелијских линија детекцијом флуоресценције | 89 |
| 4.4. | Резултати биолошке расподеле ^{177}Lu -липозома | 91 |
| V | ДИСКУСИЈА | 94 |
| 5.1. | Физичкохемијска својства липозома | 94 |
| 5.1.1. | <i>DLS</i> , ИСП-ОЕС и ТЕМ мерења | 94 |
| 5.1.2. | Инфрацрвена спектроскопија | 97 |
| 5.1.3. | Отварање липозома у променљивом магнетном пољу | 98 |
| 5.2. | Радиохемијска чистота и стабилност липозома | 100 |
| 5.3. | <i>In vitro</i> стабилност липозома | 102 |
| 5.4. | Биодистрибуција радиообележених ^{177}Lu -липозома | 103 |
| VI | ЗАКЉУЧАК | 106 |
| VII | ЛИТЕРАТУРА | 109 |
| | Биографија аутора | 124 |
| | Изјава о ауторству | 125 |
| | Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада | 126 |
| | Изјава о коришћењу | 127 |

I УВОД

У оквиру ове докторске дисертације испитивани су липозоми модификовани глукозом као потенцијални носачи лекова у циљаној дијагностици и терапији канцера. Због својих специфичних особина липозоми су предмет опсежних истраживања која се баве активном и пасивном доставом различитих типова лекова, за потребе лечења различитих обољења [1–4]. Највећи број регистрованих липозомских препарата је у области терапије канцера док се закључно са 2021. годином може рећи да се липозоми најмасовније користе као носачи одређених *Covid19* вакцина [4,5].

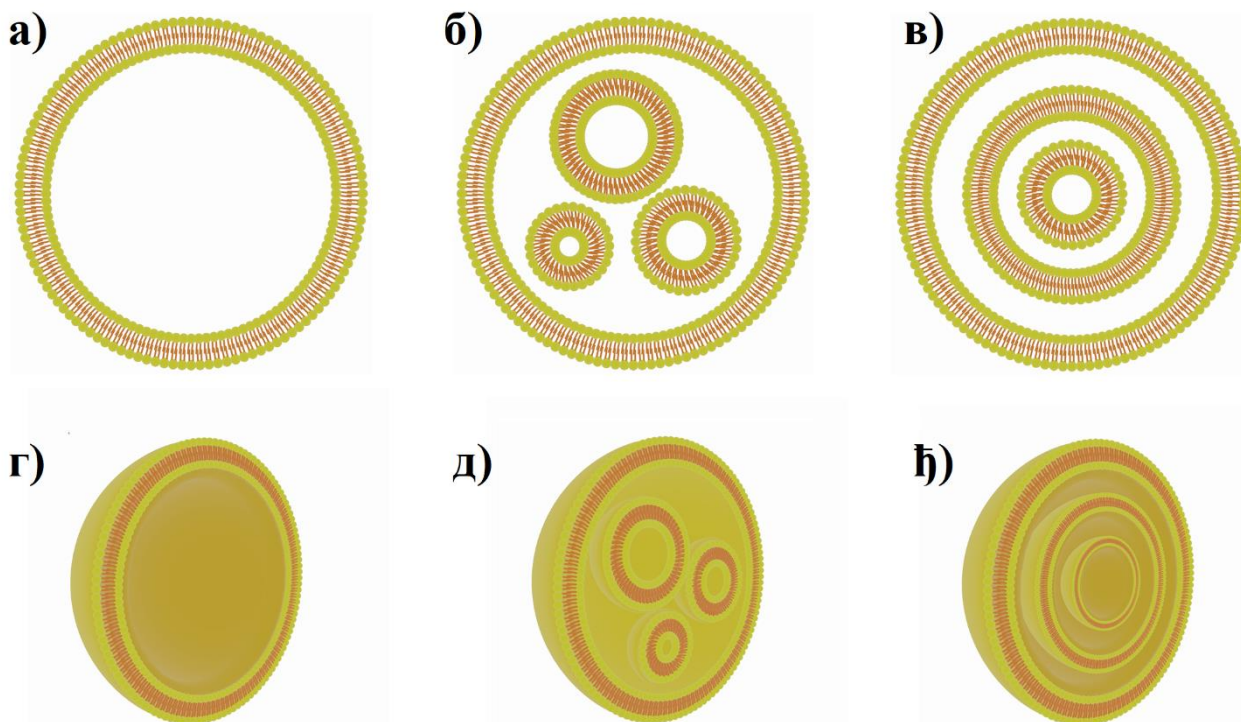
Ћелије канцера показују неконтролисану пролиферацију за коју је потребна велика количине енергије која се пре свега обезбеђује у процесу гликолизе [6–8]. Сходно томе ћелије канцера имају знатно већи број глукозних (*GLUT*) рецептора у односу на здраве ћелије и управо на тој чињеници је засновано спроведено истраживање [6–8]. Модификацијом односно функционализацијом површине липозома глукозом, односно великим бројем глукозних остатака може се постићи специфично везивање за ћелије канцера. На овај начин се повећава ефикасност и смањује потребна доза лека, који липозом преноси, односно повећава се ефикасност терапије. Такође, такви липозоми се могу користити и за циљану испоруку дијагностичких и/или терапијских радионуклида.

Детаљан процес синтезе липозома модификованих глукозом, оптимизација процеса, физичкохемијска карактеризација, радиообележавање и испитивање радиохемијске стабилности су описани у оквиру дисертације. Липозоми модификовани глукозом су испитани на *in vitro* и *in vivo* моделима, како би се утврдила њихова стабилност.

II ТЕОРИЈСКИ ДЕО

2.1. Липозоми

Од тренутка када су први пут описани, липозоми привлаче огромну пажњу и интересовање у медицини [9,10]. Ово је директна последица њихових биофизичких и биолошких својстава па се липозоми често сматрају и идеалним системима за доставу лекова [11,12]. Липозоми имају сферан облик, састављени су од једног или више липидних двослоја који обухватају унутрашње поларно језгро, схематски приказано на слици 2.1.1. [12,13]. Липидни двослоји могу бити изграђени од једног или више различитих липида. Поларне групе се групишу на површини липидног двослоја, ка унутра и ка споља, док се неполарне групе односно неполарни ланци групишу у самом липидном двослоју. За примену у биолошким системима и медицини језгро липозома је најчешће напуњено различитим лековима [11,12,14,15]. Димензије липозома могу варирати у широком опсегу величина (10 nm – 100 μ m) што има директан утицај на њихово понашање у биолошком систему. Различитим техникама припреме величина и униформност липозома се може подешавати а самим тим и њихова потенцијална примена [16,17]. По облику липозоми изузетно личе на различите ћелије, укључујући и бактеријске, међутим код липидног омотача се сва сличност завршава, пошто сами по себи липозоми не показују биолошку активност [18,19]. Без обзира на одсуство биолошке активности, липозоми се често користе као модели за проучавање ћелијских мембрана.



Слика 2.1.1 Схематски приказ липозома а) 2Д пресек малих једноламеларних липозома (МЈЛ) б) 2Д пресек вишевезикуларних липозома (ВВЛ) в) 2Д пресек вишеламеларних липозома (ВЛЛ) г) 3Д пресек ВВЛ д) 3Д пресек МВЛ ж) 3Д пресек ВЛЛ.

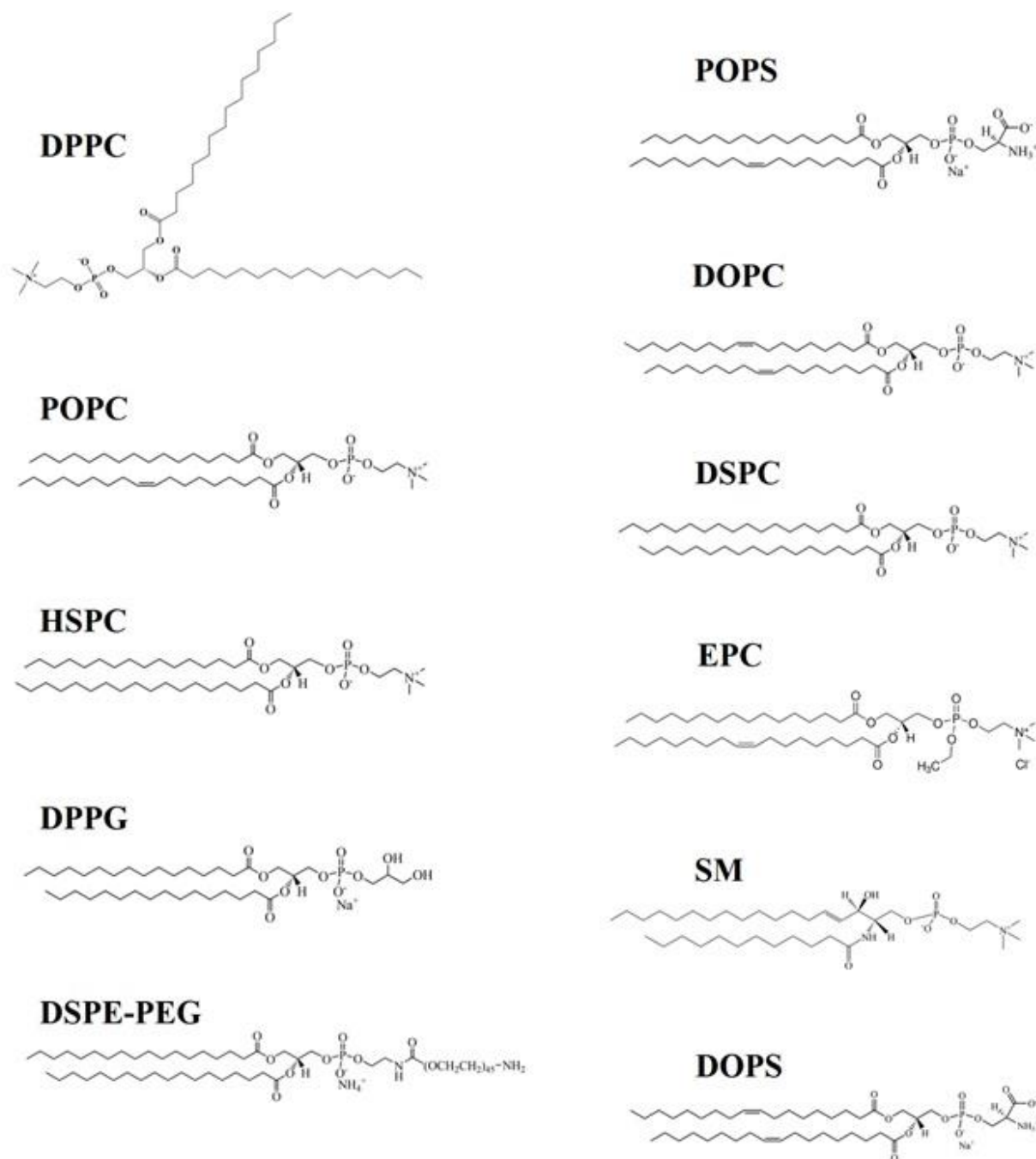
Липозоми се најчешће праве од једног или комбинације више различитих фосфолипида са дугим неполарним ланцима. Фосфатне групе се групишу на површини липидног двослоја док се дуги неполарни ланци међусобно преплићу и групишу унутар липидног двослоја. Коришћењем различитих фосфолипида може се директно утицати на величину липидног двослоја (дужина поларних ланаца у комбинацији са ефикасношћу паковања), на наелектрисање површине липозома (услед фосфатних и других поларних група) и на стабилност колоидног раствора липозома. Фосфолипиди су најчешће велики молекули са сложеним називима која се поједностављују скраћеницама. Структура, називи и уобичајене скраћенице различитих фосфолипида, који се најчешће користе за прављење липозома, су приказане на слици 2.1.2.

Функционализација липозома је област истраживања која пуно обећава пошто је прост липидни двослој липозома могуће функционализовати на различите начине, успут мењајући својства и понашање липозома *in vivo* [12,16,20–25]. Због својих особина липозоме је могуће администрирати интравенски, орално или топикално, у зависности од намене [15,24,26]. Облик и својства липозома омогућавају пренос како поларних тако и неполарних супстанци. Поларне супстанце се обично убацују у унутрашњост која је поларна, док се неполарне супстанце уграђују у неполарни, липидни омотач липозома. Лекови се смештају у липозоме са циљем да им се смањи токсичност, продужи циркулација у организму, као и да би се избегла реакција имунског одговора организма [27,28].

Често се примена липозома за терапију и дијагностику канцера заснива на *EPR* (енг. *enhanced permeability and retention*) ефектима [13,29]. Укратко речено, *EPR* ефекти су последица поремећене васкулатуре и циркулације материје унутар туморског ткива што доводи до неспецифичног накупљања одређених супстанци и наночестица, које се иначе не уочава код здравих ћелија. Један од најлакших начина да се повећа пасивно *EPR* накупљање липозома у туморима се заснива на продужетку њиховог времена циркулације [14,30]. Једноставно речено, што су липозоми дуже у циркулацији већа је вероватноћа да се „заглаве“ у тумору.

Липозоми се пуне лековима, најчешће цитостатицима, и убризгавају у циркулацију што доводи до њиховог неспецифичног накупљања унутар тумора, посредством *EPR* ефеката [11,27,31]. У организму временом долази до неминовног распадања липозома што доводи до ослобађања цитостатика тј. лека унутар канцерогеног ткива. Пошто су цитостатици генерално изузетно токсични и по здраве ћелије, липозоми служе да умање токсичност и повећају ефикасност хемиотерапије, пре свега продужавањем времена полуживота цитостатика у циркулацији [26,28].

Показано је да слободна циркулација липозома унутар организма директно зависи од физичкохемијских својстава липозома, попут зета потенцијала (ζ), и њихове величине [13,16,32]. Што су липозоми мањи, то је мања вероватноћа да ће их мононуклеарни фагоцитни систем (МФС) детектовати као претњу и уклонити из циркулације. Оквирно гледано, сматра се да липозоми димензија већих од 200 nm имају изузетно кратко време ретенције односно циркулације у организму, пошто због своје величине бивају брзо одстрањени [13,16]. Један од начина да се продужи време боравка липозома у организму је облагањем (енг. *coating*) липозома полиетиленгликолом тј. *PEG*–ом [13,28,29]. Процес облагања липозома *PEG*–ом се обично скраћено назива пегилација и у суштини представља једну врсту функционализације липозома.



Слика 2.1.2 Пример липида који се користе за прављење липозома: 1,2-дипалмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (*DPPC*); натријум 1-палмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-*L*-серин (*POPS*); 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (*DOPC*); 1-палмитоил-2-олеоил-глицеро-3-фосфохолин (*POPC*); 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (*DSPC*); *L*- α -фосфатидилхолин (*HSPC*); 1-палмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-етилфосфохолин хлорид (*EPC*); натријум-1,2-дипалмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-(1'-рац-глицерол) (*DPPG*); *N*-(додеcanoил)-сфинг-4-енин-1-фосфохолин, сфингомијелин (*SM*); амонијум 1,2-дистеароил-*sn*-глицеро-3-фосфоетаноламин-*N*-[амино(полиетилен гликол)-2000] (*DSPE-PEG-2000*); натријум 1,2-диолеиол-*sn*-глицеро-3-фосфо-*L*-серин (*DOPS*).

2.2. Синтеза липозома

Током година развијене су и описане многе методе за припрему липозома [17,33]. Одабир одговарајуће методе синтезе липозома зависи од више фактора попут примене, величине и супстанци које се користе за пуњење липозома. Први корак при синтези липозома је одабир одговарајућих липида који ће изградити липозом. Иако то није обавезно, често се у почетну смешу липида додаје и холестерол (*CHOL*), пошто је показано да има позитиван утицај на крајње физичкохемијске особине липозома [34,35].

Због своје неполарности, *CHOL* се лако уграђује у липидни двослој. Према моделу флуидног мозаика, *CHOL* смањује флексибилност и повећава стабилност липидног двослоја, посебно при повишеним и сниженим температурама [36,37]. Молекул *CHOL* је веома ригидан, не може да промени конформацију или изомеризује па последично чини липидни двослој крућим. Када је *CHOL* присутан у двослоју приликом пораста температуре остали липидни ланци не могу превише да се удаље а исто тако приликом снижења температуре не може да дође до њиховог претераног сабијања. Последично ово утиче на смањену пермеабилност лекова кроз липидни двослој и онемогућава продирање раствора у унутрашњост липозома [38,39]. Дакле, *CHOL* повећава стабилност липозома, што је веома важно приликом доставе лекова, како не би дошло до њиховог цурења, пуцања али и хемијске деградације лекова које преносе.

Приликом припреме липозома, обично се користе различити фосфолипиди односно липиди са групама које у воденом раствору имају наелектрисање [17,31]. Комбиновањем различитих липида, односно њиховим одговарајућим избором, се може директно утицати на наелектрисање које крајњи липидни двослој показује. Ово наелектрисање се може квантификовати преко ζ од кога значајно зависи понашање липозома у организму [16]. Показано је да липозоми са благо негативним ζ (-7 до -15 mV) имају најдужу циркулацију у организму [13,32]. Промена ζ ка позитивнијим вредностима као и изражено негативним вредностима доводи до убрзаног одстрањивања липозома из циркулације од стране МФС. Такође, липозоми са позитивним ζ потенцијалом лакше итереагују са протеинима у серуму као и са ћелијама крви [13].

Посебна категорија липозома, која се понекад приказује као самостална, су ниозоми (енг. *niosomes*, скраћено од *non-ionic-somes*) односно ненаелектрисани липозоми [40]. У поређењу са липозомима ниозоми су мање подложни хемијској деградацији, али и физички нестабилнији што доводи до цурења, агрегације и фузије више ниозома [41–43]. Међутим, због веома сличних биолошких својстава и ниже цене липида од којих се праве, ниозоми су и даље конкурент липозомима у погледу доставе одређених лекова [41,42]. Синтеза ниозома је практично идентична синтези липозома, осим што се за почетну смешу користе макромолекули без фосфатних група, односно у општем случају макромолекули без наелектрисања [44].

Неке од типичних метода синтезе липозома су дате у наставку, иако се у пракси често користе комбинације две или више метода [17,33,45,46].

- 1) Хидратација танког слоја (филма)
- 2) Механичка екструзија

- 3) Лиофилизација
- 4) Испаравање реверзне фазе
- 5) Инјектовање алкохола
- 6) Инјектовање етра
- 7) Соникација
- 8) Микрофлуидизација
- 9) Отклањање детергента
- 10) Метода грејања
- 11) Метода мржњења–топљења
- 12) Метода мехура
- 13) Електроформирање
- 14) Метода суперкритичног флуида

2.2.1. Хидратација танког слоја

Почетна смеша липида од које желимо да синтетишемо липозоме се раствара у довољно великој запремини органског растварача или мешавине више растварача [33,46]. Обично се користи хлороформ, сам или у комбинацији са метанолом или мањом количином етанола. Наравно могуће је користити и друге раствараче по потреби. Такав раствор липидне смеше се преноси у балон са округлим дном, довољно велике запремине и то такве да је запремина балона бар два пута већа од запремине раствора, односно у пракси 10–20 пута већа од запремине раствора. Балон се намешта на ротирајући упаривач, и то тако да је балон благо укошен у односу на вертикалну осу (10–30°). Када се укључи ротирајући упаривач, неполарни растварач испарава и оставља танак слој (филм) липида на зиду балона.

Балон са добијеним филмом се обично оставља у ексикатору (2–6 часова) како би се одстранили последњи трагови растварача. Филм се затим хидратише односно врши се „развијање филма“ брзим инјектовањем дејонизоване–дестиловане воде или одговарајућим воденим раствором у унутрашњост балона. Овим поступком се најчешће добијају липозоми широког опсега величина (1–5 μm) које је даље могуће одвојити процесима филтрације, дијализе или центрифугирањем. Међутим, оваквим раздвајањем се у принципу губи део липидне масе односно део липозома, што није пожељно. Из тог разлога се ова метода у пракси најчешће комбинује са соникацијом (~ 20 минута) а затим се добијени раствор екструдује кроз мембрану која има поре одговарајуће величине. Додатним поступцима се омогућава разбијање већих липозома на мање, добијање веће униформности по величинама и већа концентрација липидне масе тј. липозома у крајњем раствору. По потреби овако добијени липозоми се могу лиофилизовати ради лакшег и стабилнијег складиштења.

2.2.2. Механичка екструзија

Метода механичке екструзије се користи за селектовање липозома према величинама и разбијање већ припремљених липозома на липозоме мањих величина [47–49]. У принципу се ова метода може користити сама за себе, мада то није препоручљиво. У том случају липидна смеша се раствара у води, односно воденом раствору, довољно велике запремине и загрејане до температуре која превазилази температуру фазног прелаза липида. На овој температури липиди који су густо упаковани у облику гел фазе губе уређеност и прелазе у стакласто, односно аморфно стање, код кога је већа неуређеност и мања густина паковања ланаца липида [50]. Растворљивост липида у води расте, међутим постоји проблем ако је температура прелаза између два или више липида у смеси знатно различита. Овакав водени раствор се затим екструдуете кроз мембрану која има поре одговарајуће величине. Мембране могу бити керамичке или поликарбонатне, у зависности од намене и димензија пора.

Екструзија у лабораторијским условима се типично врши помоћу два шприца (улаз–излаз) који су симетрично распоређени са обе стране фиксиране мембране. Истискивањем течности из једног шприца у други, проласком кроз мембрану, се врши селекција величина и разбијање већих липозома. Током овог корака екструдовања потребно је водити рачуна да концентрација липида није превелика јер може доћи до запушења мембране, посебно ако се користе поре малих димензија. По потреби могуће је загревати систем шприцева и мембрану, који се типично налазе на заједничком лежишту, али у овом случају температура не би смела да пређе температуру фазног прелаза било ког липида из смеше. Процес екструзије се врши више пута, по принципу истискивања раствора из једног шприца у други и обрнуто. Овај процес се врши тако да раствор прође кроз мембрану бар 10 пута, а уобичајено 20–30 пута, на тај начин да крајњи екструдовани раствор заврши у излазном шприцу.

Као што је већ напоменуто ова метода се типично користи у комбинацији са неком другом методом синтезе липозома и то као њен крајњи корак. За индустријске потребе постоје посебно направљени и аутоматизовани системи екструзије који су способни да екструдуете велике количине запремине односно липозома [51].

2.2.3. Лиофилизација

Процес лиофилизације односно „хладног сушења“ (енг. *freeze-drying*) је одавно познат и често се користи за конзервацију различитих производа осетљиве природе, пре свега лекова и биолошких узорка [52,53]. Овај процес се састоји у замрзавању узорка на екстремно ниским температурама ($< -80\text{ }^{\circ}\text{C}$) а затим снижавањем притиска како би вода односно лед сублимовао. Лиофилизација се типично врши у посебно направљеним уређајима–лиофилизаторима, који у зависности од намене имају различит капацитет, брзину и квалитет сушења. Процесом лиофилизације се добијају узорци готово у потпуности ослобођени од присуства воде. Да би процес лиофилизације био што успешнији потребно је да се спроведе полако, у више корака и у довољно дугом временском интервалу. Први корак обично подразумева замрзавање узорка на умереним температурама (-30 до $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$) током релативно дугог периода (12–24 часа). У другом кораку се температура додатно снижава као и сам притисак ($< -80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $P \approx 0$). Овај други корак може трајати од неколико сати до неколико дана. По потреби, ако се жели

остварити максимално сушење, узорак се у последњем кораку греје (некад чак и преко 0 °C) а притисак враћа на нормалну, атмосферску вредност. На овај начин долази до испаравања последњих молекула воде, која није била у облику леда већ адсорбоване течности, те стога није могла сублимовати, и узорак практично постаје 100 % сув.

Метода лиофилизације се готово никада не користи као једина метода за припрему липозома пошто би квалитет таквих липозома био изузетно лош, посебно у погледу распореда величина. Ова метода се заправо најчешће користи као последњи корак за дуготрајно складиштење и чување већ припремљених липозома. Приликом процеса лиофилизације потребно је користити криопротектанте односно лиопротектанте у раствору липозома [54]. Као криопротектант се обично користи глукоза или неки други угљени-хидрати без којих би дошло до разарања липидног двослоја, услед последица замрзавања, и последично разарања липозома. Леофилизација је погодна за разбијање великих и вишевезикуларних липозома на мање липозоме, па се стога ова метода понекад користи и за те сврхе са циљем постизања боље униформности.

2.2.4. Испаравање реверзне фазе

Метода испаравања реверзне фазе служи за синтезу великих липозома ($> 1 \mu\text{m}$) који имају велику унутрашњу запремину и мали однос запремине липидног двослоја према језгру [55,56]. Основни принцип ове синтезе је једноставан, а процес релативно брз. Смеша липида се раствара у погодном органском растварачу или смеси растварача. У овај раствор се затим додаје вода или одговарајући водени раствор. Треба водити рачуна да запремина воде буде нешто мања од запремине органског растварача како би се касније добила емулзија водених капљица у неполарном растварачу. Овакав двофазни раствор се подвргава соникацији или погодном механичком мешању све док се не добије поменута емулзија. Када се добије емулзија она се преноси у балон са округлим дном, који се затим поставља на ротирајући упаривач. Овај део процеса је идентичан процесу упаравања који је описан у одељку 1.1.1. Међутим, по завршетку испаравања овде се не добија танак слој липида на зиду балона већ суспензија липозома у води.

Ова метода је изузетно погодна за припремање већ напуњених липозома са одговарајућом супстанцом. Жељена супстанца се раствара у води пре додавања у органску фазу и процеса добијања емулзије [55,56]. Пошто овом методом најчешће настају велики липозоми могуће је напунити липозоме са великом количином жељене супстанце и такође је могуће користити велике молекуле односно одређене наночестице. Процес настајања липозома овом методом је лако објаснити ако се има у виду да се приликом испаравања органске фазе све више липида скупља у граничној области вода–органска фаза. На овај начин липиди ефективно праве слој на површини капи воде у емулзији, међутим са даљим испаравањем органске фазе долази до њеног губитка и спајања капи воде. Ово ефективно доводи до затварања односно самоорганизовања липидних слојева у липозоме који на овај начин заробљавају релативно велику запремину воде односно воденог раствора. Ова метода је изузетно погодна за индустријску примену.

2.2.5. Инјектовање алкохола

Метода инјектовања се заснива на растварању липидне смеше у погодном алкохолу, обично етанолу, а затим брзог инјектовања алкохолног раствора липида у воду [57,58]. За инјектовање се користе танки шприцеви како би се омогућила што мања додирна површина као и релативно висок притисак приликом истискивања. Потребно је водити рачуна да запремина воде буде знатно већа од запремине инјектованог раствора алкохола. Утврђено је да овом методом долази до тренутног и потпуног мешања етанола и воде. Липиди се последично хомогено диспергују у раствору што доводи до њиховог самоорганизовања у липозоме релативно униформне величине и малог дијаметра ($< 500 \text{ nm}$). По потреби је могуће мешати воду (механички или магнетном мешалицом) како би се остварила што боља хомогенизација.

Мана ове методе је релативно слаба растворљивост липида у етанолу, тј. у алкохолима генерално као и чињеница да крајњи раствор вода/етанол треба да буде изразито разблажен. Ово за последицу има добијање раствора мале липидне концентрације [57,58]. Проблем се делимично може решити заједничким испаравањем крајњег раствора вода/алкохол на ротационом упаривачу при чему се раствор концентрује. По потреби се вишак етанола може одстранити процесом дијализе. Пуњење липозома различитим супстанцама се може лако извршити ако се направи њихов водени раствор у који се затим врши инјектовање алкохолног раствора липида. Показано је да липидна концентрација у алкохолном раствору има директан утицај на крајњу величину добијених липозома, при чему дијаметар липозома расте са концентрацијом липида. Ову методу је могуће релативно лако реализовати за потребе индустријске производње липозома [59].

2.2.6. Инјектовање етра

Метода инјектовања етра је слична методи инјектовања алкохола с тим што се као растварач липидне смеше користи диетил–етар или мешавина етра и метанола [60,61]. Овај раствор се шприцем убризгава у воду односно водени раствор при повишеним температурама. По могућству читав процес инјектовања се врши под сниженим притиском како би етар испарио при чему се формирају липозоми. Испаравање је могуће извести и по додатку етра у водени раствор. Предност ове методе је релативно висока ефикасност пуњења липозома са жељеном супстанцом која се налази у воденом раствору као и стварање релативно малих липозома ($< 200 \text{ nm}$). Мане су слаба униформност формираних липозома што се може превазићи коришћењем додатне технике, попут нпр. механичке екструзије. Међутим, главна мана је излагање супстанци, које користимо за пуњење липозома, неполярним и токсичним једињењима при повишеној температури. Ово може довести до непожељних хемијских реакција, инактивације коришћених супстанци као и присуства токсичних супстанци у крајњем производу.

2.2.7. Соникација

Соникација се обично користи заједно са неком другом методом припреме липозома, као међукорак или крајњи корак припреме. Ова метода се типично користи да разбије веће липозоме попут ВВЛ или ВЛЛ на мање као и да повећа равномерност липозома по величинама [47,62]. У принципу се ова метода може користити сама за себе и у том случају се липидна смеша раствара у погодном органском растварачу који се затим упарава, а када се раствор довољно концентрује додаје се вода знатно веће запремине (10–20 пута) и затим се овај двофазни раствор подвргава додатном испаравању, како би се уклонио заостали неполарни растварач. Овим поступком се уобичајено добија млечна суспензија липозома великих димензија (1–10 μm) која се затим подвргава процесу соникације. У пракси се соникација врши на два начина: у отвореном соникатору велике запремине (ултра–звучно купатило) у који се смешта узорак или коришћењем сонде за соникацију која се директно убацује у раствор узорка.

При припреми липозома пожељно је избегавати сонду за соникацију из два разлога. Први је ослобађање релативно велике количине топлоте која најчешће не може ефикасно да се одведе и која доводи до топлотно индукованог распадања липидног двослоја односно липозома. Други разлог је неминовно уношење нечистоћа у раствор липозома, пошто приликом соникације долази до љуштења односно трошења металне сонде. Стандардни процес соникације у ултра–звучном купатилу не пати од ових проблема. Пошто ултра–звучно купатило има релативно велику запремину воде (каду) у коју се уноси релативно мала запремина узорка онда долази до ефикасног преноса топлоте код краткотрајних соникација. За продужене соникације се у каду може сипати охлађена вода или додати лед у саму каду. Додавање леда у каду ултра–звучног купатила се обично назива соникацијом „леденог купатила“ (енг. *ice-bath sonication*) и ово је изузетно погодна поставка за продужене процесе соникације (> 1 час). Мана методе соникације је у релативно малој ефикасности пуњења липозома са жељеном супстанцом као и потенцијално таложење већих молекула из самог раствора.

2.2.8. Микрофлуидизација

Метода микрофлуидизације се заснива на коришћењу млазова високог притиска за мешање органске фазе у којој је растворена липидна смеша и водене фазе, у којој по потреби могу бити растворене одговарајуће смеше [63–65]. Микрофлуидизатори као уређаји постоје дуже време и комерцијално су доступни за различите намене [66]. Сходно томе постоји више конструкцијских решења. Основни принцип се заснива на постојању централног канала у коме се налази основни раствор који се даље меша са два или више канала неког другог раствора или растварача. Мешање се врши у заједничкој тачки при чему су млазови свих канала под високим притиском. После мешања заједнички раствор се може поново рециркулисати на почетак где се врши његова поновна микрофлуидизација или се једноставно изводи из система. Конструкцијски гледано микрофлуидизатори су обично опремљени тако да могу да регулишу температуру млазова, било помоћу цеви за хлађење које пролазе поред канала или посредством електричних грејача.

Ова метода је изузетно добра за регулацију величина насталих липозома као и њихове униформности. Главни параметри који утичу на ове величине су притисак односно брзина млаза као и концентрација липида. Варирањем ових параметара као и поновном рецикулацијом се могу добити липозоми жељених величина. Такође, ова метода може остварити високе нивое пуњења липозома са различитим супстанцама. Пошто микрофлуидизатори могу радити у континуалном режиму изузетно су погодни за производњу великих количина липозома. По потреби крајњи раствор липозома је могуће додатно концентровати и очистити од органских растварача испаравањем.

2.2.9. Отклањање детергента

Ова метода се заснива на мешању липидне смеше са одговарајућим детергентом у воденом раствору приликом чега се награђују мицеле које у свом саставу имају молекуле липида и детергента [67]. Погодним техникама се молекули детергента могу одстранити из мицела што доводи до стварања мицела састављених само од молекула липида [68,69]. Пошто ове мицеле при нормалним условима нису довољно стабилне долази до њиховог реорганизовања и спајања у липозоме. Постоји више стандардних начина да се детергент уклони из раствора тј. из мицела попут: дијализе, гел филтрације, адсорпције на погодним смолама или једноставним разблажењем. Пошто кључну улогу у стварању одговарајућих липозома игра брзо и ефикасно отклањање молекула детергента стално се развијају нове технике пречишћавања као и комбиноване методе синтезе. Ова метода је погодна за уградњу и стабилизацију различитих супстанци у липидном двослоју, које иначе нису довољно растворне у самом липиду. Приликом формирања иницијалне мицеле молекули таквих супстанци бивају увучени у мицеларни слој и остају ту чак и када се детергент одстрани и када дође до формирања липидног двослоја односно липозома.

2.2.10. Метода грејања

Метода грејања је релативно једноставна за извођење и има велику предност пошто приликом синтезе липозома није потребно користити органске раствараче [70,71]. Органски растварачи чак и у траговима су проблематични пошто препарате у којима се налазе није дозвољено давати пацијентима. Сходно томе било каква масовна производња липозома за потребе доставе лекова мора бити оптимизирана да не садржи органске раствараче у крајњем продукту, а идеално ни у процесу синтезе.

Процес производње липозома помоћу методе грејања се састоји у одвојеној хидратацији појединачних липида од којих желимо да направимо липозоме. Затим се сви липидни раствори преносе у исту посуду која се греје на високим температурама (око 120 °C). После довољно дугог грејања (1–2 сата) раствор липида се постепено хлади до температуре фазног прелаза липида (обично у опсегу 40–55 °C) при чему настају липозоми. У овом кораку се додају супстанце којима се пуне липозоми и врши се мешање како би се обезбедила што већа ефикасност пуњења. Липозоми добијени на овај начин обично имају широк опсег величина те се обично користе додатне методе како би се добили униформни липозоми

жељених величина. Типично се користи метода екструзије али могуће је користити и друге методе. Овом методом се добијају липозоми без икаквих трагова органских растварача.

2.2.11. Метода мржњења–топљења

Код ове методе потребно је користити већ припремљене липозоме који се замрзавају на $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ односно на температури течног азота [51,72]. Ако се врши пуњење липозома онда је одговарајућу суспензију потребно растворити у воденом раствору липозома који се замрзава. Замрзавање обично траје 3–5 минута а затим се узорак брзо преноси у водено купатило где се топи. Температура воденог купатила се подешава да одговара температури фазног прелаза липозома (обично $40\text{--}55\text{ }^{\circ}\text{C}$). Процес топљења се врши 3–5 минута а затим је могуће поновити циклус мржњење–топљење док се не добије одговарајућа величина липозома односно ефикасност пуњења липозома [73]. У зависности од потребе обично се понавља 2–5 циклуса мржњења–топљења. И у овој методи је важно користи криопротектанте за заштиту липозома. Показано је да одређени криопротектани мењају молекуле воде у околини поларне главе липида (најчешће фосфатна група) и на тај начин поништавају негативне ефекте и оштећења липидног двослоја која би могла настати као последица ниске температуре. Ова метода се ретко користи за регулацију величине липозома већ више као метода пуњења липозома. Метода мржњења–топљења је јако погодна за постизање високе ефикасности пуњења липозома, посебно када се користе већи молекули попут протеина.

2.2.12. Метода мехура

Ова метода је релативно једноставна, не захтева употребу органских растварача и као таква се може користити у индустријској производњи липозома [44]. Липиди заједно са супстанцама којима се пуне се уносе у исти водени раствор. Важно је постићи високу хомогенизацију раствора а затим га унети у затворен систем који се налази у атмосфери азота. Раствор се загрева и меша истовремено до постизања повишене температуре ($70\text{--}80\text{ }^{\circ}\text{C}$), која је виша од температуре фазног прелаза липида. Када се постигне жељена температура кроз раствор се пуштају мехурићи азота. Ова метода се може користити и на већ припремљеним липозомима које је потребно накнадно напунити хидрофилним супстанцама.

2.2.13. Електроформирање

Метода електроформирања се традиционално користи за прављење великих ($5\text{--}200\text{ }\mu\text{m}$) липозома [74,75]. Липозоми оваквих величина су изузетно погодни за праћење и проучавање понашања ћелијских мембрана. Њихова величина одговара величини ћелија или је чак значајно већа од њих при чему је честице тих величина лако посматрати и под оптичким микроскопом. Коришћењем ове методе и липозома ових величина први пут је посматран физичкохемијски феномен ендоцитозе великих колоидних честица од стране липозома [76].

Ово је јако значајно са аспекта бољег разумевања процеса ендоцитозе који се врше у биолошким системима од стране ћелија.

Сам начин припреме липозома овом методом је релативно једноставан. Прво је потребно обезбедити одговарајућу комору тј. купатило са две електроде. Користе се две поставке електрода, у једној поставци се користе цилиндричне електроде док се у другој користе плочасте електроде. На електроде се наноси претходно припремљен и осушен липидни филм, како би се добили што бољи резултати. У пракси међутим, у комору је могуће унети органски раствор липида који се затим упари, што последично доводи до формирања липидног слоја на површини електрода. Када се на електродама формира или нанесе липидни слој у купатило се сипа вода. На електроде се доводи једносмерна или наизменична струја што доводи до стварања липозома. У пракси се чешће користи наизменична струја пошто је могуће варирати њену фреквенцију и тако утицати на параметре електроформираних липозома.

Димензије овакве коморе односно купатила су обично мале и могуће је директно изнад коморе поставити оптички микроскоп којим се прати тренутно формирање липозома. Механизам формирања липозома код ове методе није у потпуности разјашњен јер се највероватније ради о комбинацији ефеката. Према литератури описани су неки од могућих механизма електроформирања липозома [74,75,77,78]:

- 1) Директна електростатичка интеракција између липидног двослоја и електрода
- 2) Стрес индукован електроосмотским притиском
- 3) Прерасподела јона између двослоја
- 4) Смањене површинског напона на мембрани
- 5) Електрохемијске реакције
- 6) Прелазак јона са електрода на липидни двослој

Без обзира на стварне разлоге електроформирања липозома очигледно је у питању процес који не зависи искључиво од природе коришћених липида пошто се овим поступком могу формирати и ниозоми, односно липозоми чији молекулски прекурсори не поседују наелектрисање. Примена ове методе у индустријске тј. фармацеутске сврхе није тако честа, јер се добијају изузетно велики липозоми, што је лимитирајући фактор за доставу већине лекова.

2.2.14. Метода суперкритичног флуида

Метода суперкритичног флуида (СКФ) се заснива на коришћењу супстанце која се налази на притиску и температури већим од критичних вредности [79]. У фазном дијаграму тачка која одговара критичном притиску и температури се назива критична тачка а повећањем притиска или температуре се улази у део фазног дијаграма који се назива област СКФ–а [80]. У овој области се губи разлика између гасне и течне фазе флуида и карактеришу је многа специфична својства. СКФ се често користи као средство за екстракцију, посебно ако је потребно избећи коришћење органских растварача. У теорији свака супстанца која се налази

у течном или гасном стању на собној температури се релативно лако може користити за СКФ екстракцију међутим у пракси је овај избор ограничен на неколицину супстанци попут: воде, метана, етана, пропана, метанола, етанола, пропанола, етилена, ацетона, угљен–диоксида и азот–диоксида [81]. Посебно често се користи угљен–диоксид као СКФ из неколико разлога: јако ниска критична температура (≈ 31 °C) и релативно низак критични притисак ($\approx 7,4$ МПа) што омогућава лако експериментално руковање; инертан флуид без утицаја на екстракциони производ; доступан у великим количинама високе чистоће и јефтин; еколошки прихватљив; одобрен за употребу у производњи фармацеутика [82,83].

Када се говори о производњи липозома посредством СКФ методе потребно је имати на уму да постоји више различитих начина и процеса али да практично сви користе угљен–диоксид као СКФ. Разлог лежи у чињеници да је потребно избећи коришћење органских растварача који би потенцијално могли да интерагују са липидима. Са друге стране вода је непрактична због релативно високих критичних параметара као и чињенице да је липозоме на крају потребно добити у облику воденог раствора. СКФ CO₂ метода производње липозома је изузетно погодна за индустријску производњу јер је могуће направити постројења великог капацитета [46]. Управо из овог разлога СКФ метода се последњих деценија знатно испитује као примарно средство добијања липозома на индустријској скали. Различите варијације методе и конструкциона решења су описана у литератури.

2.3. Функционализација липозома

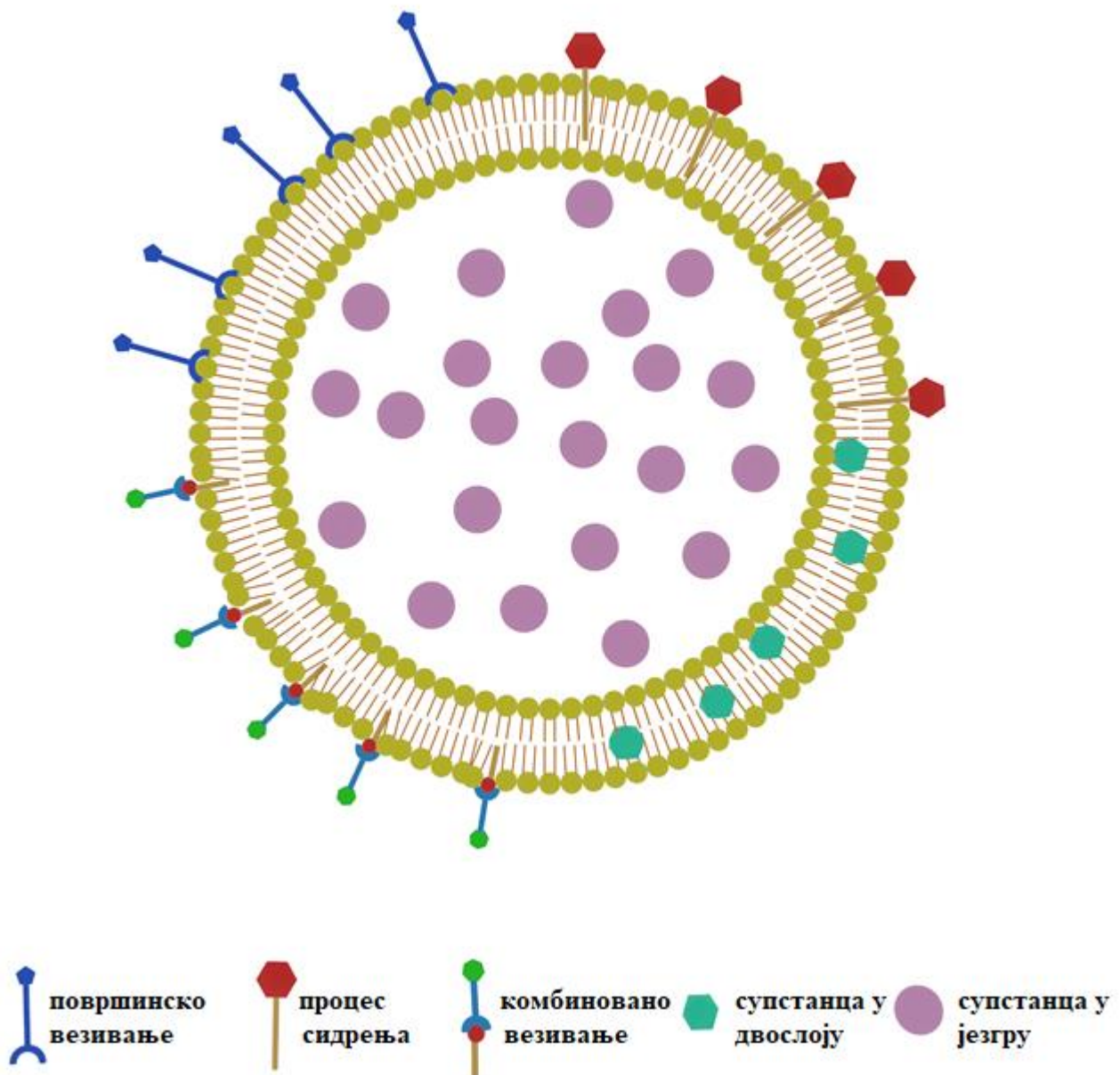
Под функционализацијом липозома се обично подразумева модификација липидног двослоја помоћу једног или више одговарајућих сложених и/или једноставних молекула. У зависности од намене функционализације могу бити различите али увек за циљ имају унапређење већ постојећих особина липозома. Пошто се липозоми примарно истражују као средства за доставу лекова могуће је претпоставити да функционализација таквих липозома примарно иде у смеру циљане доставе лекова. Претрагом литературе се може уочити да је у области функционализације липозома доминантан број радова управо из ове области. Имајући ово у виду као и област из које је вршено истраживање за потребе ове тезе, у наставку ће искључиво бити говора о функционализацији липозома за доставу лекова. Међутим, принципијелне физичкохемијске основе модификације и карактеризације липозома о којима ће се говорити могу бити употребљене и на другим липозомским системима који се могу користити за друге сврхе.

2.3.1. Процес модификација липозома

Као што је већ напоменуто, липозоми се могу користити за доставу различитих врста лекова према којима се врши функционализација. На основу броја регистрованих препарата и истраживања која се спроводе може се направити груба подела између липозома који се користе у терапији/дијагностици канцера и липозома који се користе за сва остала обољења [4]. У наставку ће фокус бити на функционализацији липозома који се користе у терапији/дијагностици туморских обољења, што са практичног аспекта представља област

истраживања за себе и од интереса је за ову тезу. Површина липозома одређеним молекулом се може модификовати (слика 2.3.1) на три начина:

- 1) Уградњом у неполарни део липидног двослоја (процес сидрења)
- 2) Везивањем за површину липидног двослоја
- 3) Комбиновано везивање



Слика 2.3.1 Начини модификације површине липозома и транспорт супстанци (горе десно) процес сидрења (горе лево) везивање за површину (доле лево) комбиновано везивање (доле десно) супстанца уграђена у двослој (центар) супстанца унутар липозома.

Код процеса уградње у липидни двослој потребно је да жељени молекул, са којим се функционализује липозом, има неполарни и поларни део молекулског ланца. У том случају се неполарни део молекулског ланца уграђује у неполарну унутрашњост липидног двослоја док поларни део бива оријентисан ка поларној спољашњости. Поларни део оваквог молекула је заправо носилац функционалних група пошто се он налази на површини двослоја липозома док неполарни део има само функцију сидра, које читав молекул држи чврсто везаним за сам липозом. Управо због аналогije са сидром овај процес функционализације се често назива и процесом сидрења. Са практичног аспекта ова функционализација се лако спроводи тако што се приликом процеса синтезе липозома у липидну смешу дода жељени молекул. У том случају се одмах приликом синтезе неполарни део молекула уграђује у липидни двослој док поларни, функционални део молекула завршава оријентисан ка спољашњости [84]. Иако је у принципу могуће прво синтетисати липозоме а затим усидрити одговарајућу супстанцу у пракси се то ретко чини пошто је најчешће потребно изазвати пертурбацију липидног двослоја како би се постигло ефикасно сидрење молекула. Било каква пертурбација липидног двослоја се може негативно одразити на интегритет мембране и довести до цурења језгра липозома. Код процеса сидрења главна ствар о којој треба водити рачуна је о количини молекула који се сидри, пошто повишена концентрација у липидном двослоју може имати негативан утицај на стабилност док повишена концентрација на површини може довести до нежељених реакција, попут умрежавања ланца или електростатичког одбијања.

Код процеса везивања за површину липидног двослоја молекул, којим се функционализује липозом, се директно везује за површину липозома, посредством ковалентних или ређе нековалентних интеракција. Логично је за претпоставити да је ковалентни процес везивања пожељнији пошто су те везе стабилније и јаче, што је од изузетног значаја када се липозоми користе у истраживањима на *in vivo* моделима. Код ковалентног везивања најчешће се користи стварање амидне и тиоестарске везе као и стварање дисулфидних мостова¹. У овом случају се обично већ припремљени липозоми излажу процесу функционализације. Типично се раствор липозома инкубира са раствором жељених молекула док се не оствари жељена ефикасност везивања тј. функционализације. Такође, могуће је спровести процес функционализације и у неком од међукоракa приликом синтезе липозома, као нпр. приликом процеса хидратације. Типичан пример функционализације липозома на овај начин је процес пегилације који се врши током хидратације липидног филма [85].

У пракси се заправо најчешће користе комбиновани процеси функционализације липозома када се нпр. сидрење користи да обезбеди функционалну групу на површини липозома која је способна да награди ковалентну везу са молекулом са којим се врши функционализација. Овакви помоћни молекули који служе да вежу други молекул се обично називају линкерима (енг. *linker*) или мостовима. Могуће је користити и супротан процес а то је намерна липидизација биолошки активног молекула са одређеном неполарном групом, која се затим може усидрити у липидни двослој липозома.

¹ Међусобним везивањем две тиолне групе (R-SH) настају сумпор-сумпор (S-S) везе односно дисулфидни мостови.

2.3.2. Типови површинске модификација липозома

У зависности од типа једињења које се користи за површинску модификацију и функционализацију липозома разликује се неколико врста лиганата² односно модификација:

- 1) Модификација малим молекулима
- 2) Модификација пептидима
- 3) Модификација антителима
- 4) Модификација аптамерима
- 5) Вишеструка модификација

Модификације малим молекулима

Различите врсте малих молекула се могу користити за модификацију површине липозома попут молекула фолата, афибоди молекула³ или различитих угљених хидрата [86–89]. У литератури је описана површинска модификација липозома (афизоми) са афибоди молекулом *Z_{HER2:342}-Cys* који се специфично везује за рецептор односно протеин *HER2* [87]. Одређени тумори, попут неких агресивних типова канцера дојке, експримирају у повећаном броју *HER2* у односу на здраве ћелије, што омогућава коришћење афизома за циљану доставу лекова. Такође, у литератури су описани липозоми модификовани са молеклама фолата у циљу лечења одређених карцинома јајника [88].

Одређени типови канцера попут глиома на мозгу се веома тешко лече стандардним облицима хемиотерапије [89,90]. Разлог лежи у чињеници да је мозак заштићен високо селективном и тешко пропусном крвно–мозданом баријером (КМБ) која значајно или у потпуности онемогућава транспорт цитостатика у мозак. У циљу премоштавања КМБ претходних година се врше испитивања са посебно модификованим липозомима који су способни да прођу кроз КМБ и доставе одговарајући лек у мозак [89,91,92]. Такви липозоми су описани у литератури и њихова површинска модификација је извршена са глукозним остацима пошто је познато да је КМБ пропусна за глукозу. У те сврхе наменски се припремају посебна једињења која садрже неполарни део, најчешће на бази холестеролног скелета, и поларни део односно глукозни остатак који је везан одговарајућим ланцом за неполарни део једињења. На овај начин је једноставним процесом сидрења могуће извршити глукозну модификацију липозома. До сада је развијено више типова једињења односно деривата са којима је могуће извршити глукозну модификацију липозома, попут деривата *L* и *Glu-RGD-Chol* [91,93]. Показано је да липозоми модификовани на овај начин имају способност да премосте КМБ процесом трансцитозе док се у самом мозгу селективно накупљају у ћелијама

² Појам лиганд у биохемији и фармацији има различито значења од оног у класичној хемији и означава било коју супстанцу која приликом везивања са неким биомолекулом доводи до стварања биолошког сигнала односно до стварања комплекса који има одређену биолошку улогу у организму.

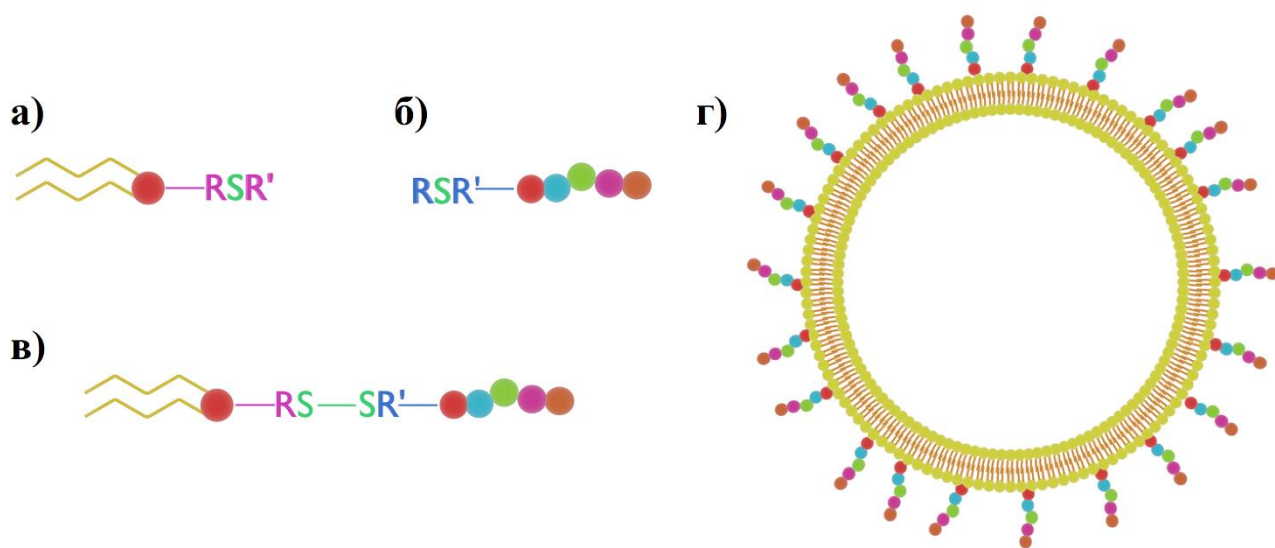
³ Афибоди молекули су мали протеини синтетисани на такав начин да се циљано везују за одређене рецепторе односно антигене. Често се називају и миметицима антитела пошто их опонашају у биолошким системима.

канцера, везивањем за *GLUT* рецепторе које је праћено интернализацијом односно ендоцитозом липозома од стране ћелија канцера [93].

Модификације пептидима

Када се пептиди користе у циљаној достави лекова обично се деле у две групе: *CPP* (енг. *cell penetrating peptides*) пептиде који улазе у ћелије тумора и *CTP* (енг. *cell targeting peptides*) пептиде који се везују за површину ћелије тумора на одговарајућим рецепторима [94–97]. Пептиди су изузетно погодни за површинску модификацију липозома пошто се релативно лако могу синтетисати и везати директно за површину липозома. Такође, релативно мала дужина ланца већине пептида има занемарљив утицај на величину липозома. Липозоми модификовани пептидима се често називају и пептозомима (слика 2.3.2).

Везивање пептида за липозоме се може вршити стварањем дисулфидних мостова или сидрењем амфилофилних пептида [96]. Понекад је пожељно избећи коришћење дисулфидних мостова, пошто се овакве везе могу лако формирати између самих пептида као и тиолних група на површини липозома [94]. Најбољи начин да се смањи непожељно стварање дисулфидних мостова је везивањем пептида за одговарајући липид пре синтезе липозома, док се приликом синтезе уводи неки додатни липид, који не може да награди дисулфидне мостове. На овај начин се смањује концентрација пептида на површини липозома и повећава растојање између њих што умањује вероватноћу стварања непожељних дисулфидних мостова између суседних пептида.

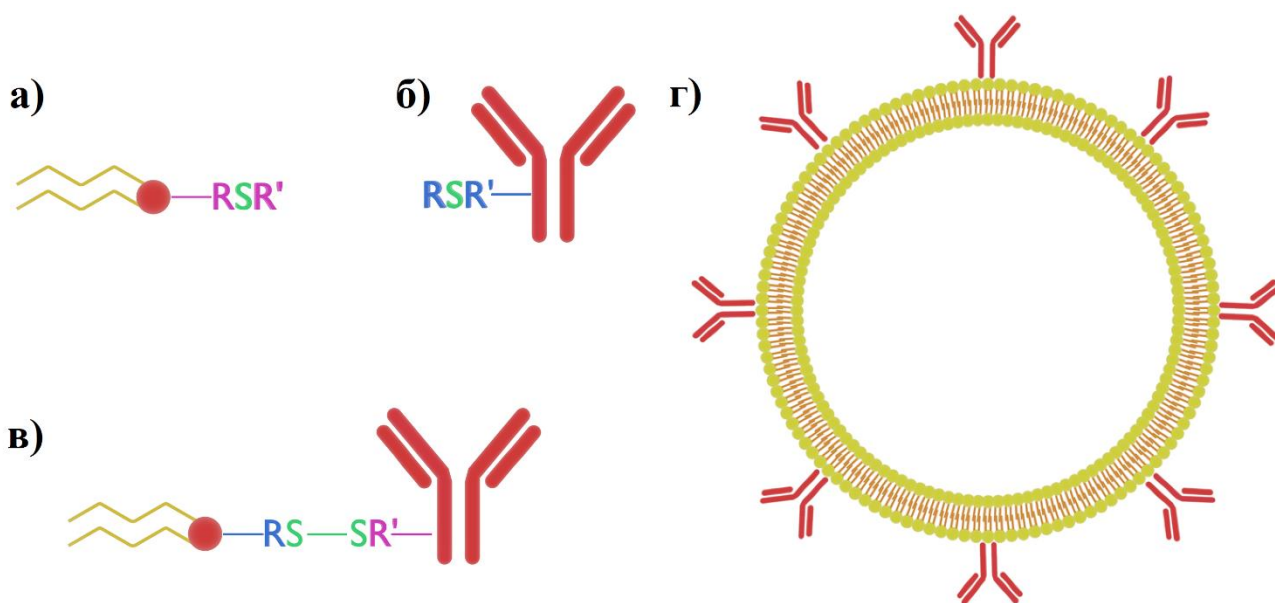


Слика 2.3.2 Синтеза пептозома **а)** липид **б)** пептид **в)** везивање липида и пептида преко дисулфидног моста **г)** пептозом.

Последњих година се посебна пажња поклања липозомима модификованим антителима и у литератури се такви липозоми често називају имунолипозомима или имунозомима [28,98]. Антитела по својој природи представљају протеине који су способни да се специфично вежу за антигене присутне на површини ћелија канцера. Овакво везивање се често сликовито назива „кључ–брава“ везивање због велике специфичности. Основна идеја иза ове модификације је очигледна а то је да посредством антитела на површини липозома дође до специфичног везивања липозома за ћелију тумора.

Антитела представљају комплексне биолошке молекуле који се сами по себи тешко директно везују за површину липозома. У том случају се прибегава процесима који су претходно описани, а то су процеси сидрења или комбинованог везивања. Синтеза имунозома се често врши посредством стварања дисулфидних мостова између липида и антитела (слика 2.3.3) који поседују или су накнадно модификовани да садрже сумпор. Везивање антитела за липид се може извршити пре или после синтезе липозома, али у пракси тај корак обично претходи синтези липозома.

Пошто антитела имају сложену структуру, која се додатно модификује да би дошло до везивања за површину липозома, онда се у пракси често користе само делови антитела који показују биолошку активност [99]. На овај начин се поједностављује процедура синтезе антитела и њиховог везивања за липозоме, смањује се интеракција и последична инактивација читавог антитела приликом циркулације у организму, избегавају се стерне сметње на површини липозома и омогућава синтеза липозома мањих величина.



Слика 2.3.3 Синтеза имунозома а) липид б) антитело в) везивање липида и антитела преко дисулфидног моста г) имунозом.

Модификација аптамерима

Аптамери су олигонуклеотиди који се могу везати за одређене рецепторе на ћелијама тумора [100]. Због ове способности представљају пожељне лиганде којима се врши функционализација липозома. Употреба липозома модификованих аптамерима у циљаној достави лекова је описана у литератури [101]. У наведеној литератури коришћен је аптамер *sgc8* који се специфично везује за рецептор *PTK7* (енг. *protein tyrosine kinase 7*), присутан на површини различитих ћелија канцера. Молекул аптамера се ковалентно везује за молекул *PEG*-а који је везан односно усидрен липидом *DSPE* на површини двослоја. Дакле, извршена модификација аптамерима се заснива комбинованом везивању (слика 2.3.1).

Вишеструка модификација

Вишеструка модификација липозома представља логичан след унапређења претходно описаних модификација и заснива се на истовременој модификацији липозома са два или више различитих лиганада, како би се остварио заједнички и побољшан ефекат циљане доставе лекова [102,103]. Комбинације коришћених лиганада могу бити различите као нпр. пептид-антитело или пептид-пептид модификација.

2.3.3. Циљана достава лекова

Функционализација липозома обезбеђује циљану доставу лека на тачно одређено место, где се ослобађањем лека постиже највећа ефикасност, а уједно се смањује токсичност по здраве ћелије [1,2]. Овде ће бити више говора о начинима на које се липозоми могу функционализовати да би се користили за циљану доставу лекова у лечењу различитих туморских обољења. Разлог лежи у чињеници да се највећи део свих истраживања на тему циљане доставе лекова тиче управо доставе лекова у туморе. Сходно томе ни липозоми нису изузетак и најчешће се испитују различити липозомски модели и модификације за коришћење у лечењу тумора. Међутим, општи принципи функционализације липозома аналогно важе и приликом разматрања доставе лекова за потребе лечења других обољења.

Када се говори о достави може се говорити о пасивној и активној достави [1,2]. Под пасивном доставом се подразумева слободна циркулација липозома напуњених леком у организму и постепено испуштање лека. Када говоримо о пасивној достави у туморе онда је то пре свега последица *EPR* ефеката [1,2,29]. Оваква пасивна достава се може додатно поспешити ако се повећа ретенција липозома у циркулацији, што се најчешће ради смањивањем њихове величине као и облагањем са молекулима *PEG*-а [12,13,54]. С обзиром на мали број параметара који се код овакве доставе могу варирати и ограничену успешност она неће бити даље разматрана.

Активна достава лекова посредством липозома подразумева функционализацију липозома на такав начин да се они специфично накупљају у ткивима где је потребно доставити

лек. Ако говоримо о циљаној достави лекова у туморска ткива онда се најчешће користе разлике између броја присутних рецептора код здравих и туморских ћелија [23,27,28,104]. Липозоми се функционализују одређеним лигандима на такав начин да долази до њихове циљане интеракције односно везивања са рецепторима на или унутар ћелије тумора. Подела циљане доставе лекова посредством липозома се може направити према мети односно локалитету који се циља као [1,2,97,99,105–114]:

- 1) Циљање рецептора на површини ћелије тумора (спољашње циљање)
- 2) Директно циљање унутрашњости ћелије тумора (унутрашње циљање)
- 3) Циљање посредног окружења туморских ћелија (посредно циљање)

Спољашње циљање

Код овог вида циљане доставе користи се непосредан контакт између ћелије тумора и липозома који је последица великог броја рецептора одређеног типа на површини ћелије тумора. Липозоми се функционализују погодним молекулима тако да долази до специфичног везивања односно интеракције између њих и циљаних рецептора. Ћелије тумора у односу на здраве ћелије експримирају већи број рецептора на својој површини. У наставку је дат кратак преглед рецептора из литературе који су до сада коришћени за спољашње циљање са липозомима [84,107,108,110,111,113,115]:

- 1) Глукозни рецептори (*GLUT*)
- 2) Рецептори за епидермални фактор раста (*EGFR*)
- 3) Рецептори фибробластних фактора раста (*FGFR*)
- 4) Фолатни рецептори (*FR*)
- 5) Трансферински рецептори (*TfR*)

Унутрашње циљање

Унутрашње циљање липозомима подразумева непосредни контакт између органела, цитоплазме или нуклеуса ћелије тумора. У литератури је описано циљање везивање за рецепторе на органелама, у цитоплазми или ћелијском једру ћелија тумора [105,106].

Посредно циљање

Код посредног циљања примарна мета није ћелија тумора или неки од рецептора на њој већ је мета посредно окружење туморске ћелије. Познато је да туморска ткива показују

абнормалну ангиогенезу што за последицу има измењену васкулатуру унутар туморског ткива [12,28,30]. У овој абнормалној туморској васкулатури долазе до изражаја различити молекули (рецептори, ензими, антигени) који су присутни у већем броју у односу на здраво ткиво. Циљањем оваквих абнормално изражених молекула у туморској васкулатури посредно доводимо липозоме у близину туморских ћелија. Примери посредног циљања помоћу функционализованих липозома укључују циљање интегрина, матрикс металопроотеиназа и васкуларних целуларних адхезионих протеина (рецептора) [1,97,99,112].

2.3.4. Контролисано отварање липозома

Лекови које липозоми потенцијално могу преносити су заштићени од имунолошког одговора организма, међутим исто тако и те супстанце немају утицај на организм, осим ако се не ради о радионуклидима тј. радиофармацеутицима [11,28,30,116,117]. Да би одређени лек остварио своје дејство он се мора ослободити из липозома. Контролисано отварање липозома односно контролисано испуштање лекова се може остварити на више начина, погодном припремом односно модификацијом липозома. Отварање липозома у одређеном ткиву може бити резултат спољашњег или унутрашњег стимулуса. У зависности од физичкохемијског ефекта који се користи за контролисано отварање може се направити подела липозома [98,118–122]:

- 1) рН–осетљиви липозоми
- 2) Терморазградиви липозоми
- 3) Фоторазградиви липозоми
- 4) Магнеторазградиви липозоми

рН–осетљиви липозоми

Између здравог и оболелог ткива постоје значајне разлике попут рН вредности, локалне температуре, повећане концентрације одређених јона и других молекула. Као што је већ напоменуто, због поремећене васкулатуре и циркулације материје унутар канцерогеног ткива постоји значајна амбијентална разлика у поређењу са здравим ткивом. Сви ови фактори се теоријски могу искористити као унутрашњи стимулус за контролисано отварање липозома, приликом прелаза из здравог у канцерогено ткиво. Међутим, у пракси је највећи успех остварен коришћењем рН–осетљивих липозома.

Код рН–осетљивих липозома долази до дестабилизације односно нарушавања липидног двослоја када се промени рН вредност околног раствора [119,122]. Последишно долази до потпуног отварања липозома или локалних пертурбација двослоја, што доводи до стварања локалних пора и повећања пермеабилности. рН вредност екстрацелуларног простора у здравим ткивима и крви износи око 7,4 док већина канцерогених ткива показује нижу рН вредност (6,5–7,2 или ниже) [119,122]. Коришћењем фосфолипида фосфатидилетаноламина (PE) или његових аналога, или молекула са негативним наелектрисањем попут фосфатидилсерина или фосфатидилглицерола могу се направити рН–осетљиви липозоми

[119]. Такође, рН-осетљиви липозоми се могу направити процесом сидрења одређених макромолекула попут оних на бази поли-*N*-изопропилакриламида (*PNIPAM*) који поред дугог неполарног ланца садрже и карбоксилне групе [119]. Променом рН вредности долази до промене поларности таквих макромолекула (постају неполарнији са падом рН) што директно утиче на дестабилизацију и отварање липидног двослоја.

Терморазградиви липозоми

Сви липозоми су заправо терморазградиви пошто са порастом температуре долази до фазног прелаза липида, што директно утиче на паковање липида у двослоју и његову дестабилизацију [52,119]. Међутим, избором одговарајућих липида односно смеше липида може се варирати утицај температуре на стабилност липидног двослоја. Код терморазградивих липозома бира се такав липидни састав који има ниску температуру фазног прелаза, што ближу телесној температури (37–43 °C).

Спољашњим, локалним загревањем оболелог ткива се постиже контролисано отварање терморазградивих липозома који доспеју у то ткиво. Туморска ткива показују изражену осетљивост на топлоту, пошто се услед поремећене васкулатуре теже хладе од здравих ткива. Дакле, топлотни односно хипертермијски ефекат значајно доприноси неутрализацији ћелија канцера и истовремено доводи до отварања липозома [1,119].

Терморазградиви липозоми се могу направити од комбинације липида попут *DPPC* и *HSPC* или комбиновањем са *PNIPAM* макромолекулима [119]. Макромолекули на бази *PNIPAM* показују тачку критичне растворљивости, која представља температуру на којој долази до промене њихове конформације. За *PNIPAM* макромолекуле ова температура је веома ниска (~ 32 °C) и изнад ове температуре они прелазе из делимично линераног у глобуларни облик. Сматра се да је то зато што су на нижим температурама водоничне везе између *PNIPAM* и воде довољне да стабилизују макромолекул а на вишим долази до њиховог кидања и конформацијске промене. Формирање глобуларних макромолекула изазива пертурбацију и физички стрес у липидном двослоју што доводи до отварања липозома.

Фоторазградиви липозоми

Фоторазградиви или фотосензитивни липозоми се праве на тај начин да у склопу свог липидног двослоја имају одређену фотосензитивну супстанцу [118,120,121,123]. Контролисано отварање липозома се постиже услед различитих ефеката, у зависности од врсте молекула који се користи. Отварање се индукује озрачивањем липозома светлосним снопом одговарајуће таласне дужине [118,121,123]. Пошто видљива (ВИД) и ултра-љубичаста (УЉ) светлост имају малу продорност кроз здраво ткиво, обично се користи светлост из блиске инфрацрвене (БИЦ) области (780–1050 nm) [118,123]. Инфрацрвена светлост такође има ограничену продорност међутим у већини случајева је сасвим довољна да изазове фотоиндуковано отварање липозома у ткивима. Светлосним озрачивањем фоторазградивог липозома односно фотосензитивног молекула долази до једног од ефеката: фотоиндуковане

оксидације, фотоизомеризације, фотоиндукованог распадања, фототермалног ефекта или фотоумрежавања односно фотополимеризације [118,121,123].

Код фотоиндуковане оксидације (слика 2.3.4а) липозоми садрже фотоосетљиве молекуле који стварају реактивне кисеоничне врсте приликом светлосног озрачивања. Ово доводи до оксидације липида у липидном двослоју, што директно утиче на стабилност и пропустљивост двослоја. Показано је да коришћењем липида са великим бројем незасићених веза долази до ефикаснијег отварања липозома [123].

Фотоизомеризација је особина одређених стереоизомера који могу да промене своју конформацију приликом озрачивања светлошћу. Већина ових супстанци се заснива на азобензенима, који када се осветле одређеном светлошћу прелазе из транс у цис облик [123]. Фотоизомеризација једињења на бази азобензена се обично постиже УЉ светлошћу (~300 nm) или ређе ВИД (~450 nm) светлошћу, при чему неполярно једињење (транс облик) постаје поларно (цис облик). Дакле фотоизомеризација једињења азобензена у липидном двослоју мења њихову поларност што доводи до пертурбације липидног двослоја (слика 2.3.4б).

Фотоиндуковано распадање се јавља код одређених фотолабилних једињења, попут оних која садрже нитробензил групе [123]. Озрачивањем нитробензилне групе светлошћу (300–400 nm) долази до њеног распадања. Овај ефекат је искоришћен за припрему посебних липида са нитробензилном групом (слика 2.3.4в), који се распадају на поларни и неполярни део приликом озрачивања [123]. Последишно код липозома који садрже овакве липозоме долази до дестабилизације и отварања липозома.

Фототермални ефекат служи да изазове загревање липидног двослоја изнад температуре фазног прелаза, слично као и код терморазградивих липозома. Међутим, фототермални ефекат настаје као последица конверзије светлосне у топлотну енергију, од стране одговарајућег материјала. Наночестице злата (слика 2.3.4г) се често користе као медијатор фототермалног ефекта, пошто ефикасно апсорбују ВИД и БИЦ светлост, и скоро тренутно ($\sim 10^{-12}$ s) је конвертују у топлоту [118,123,124].

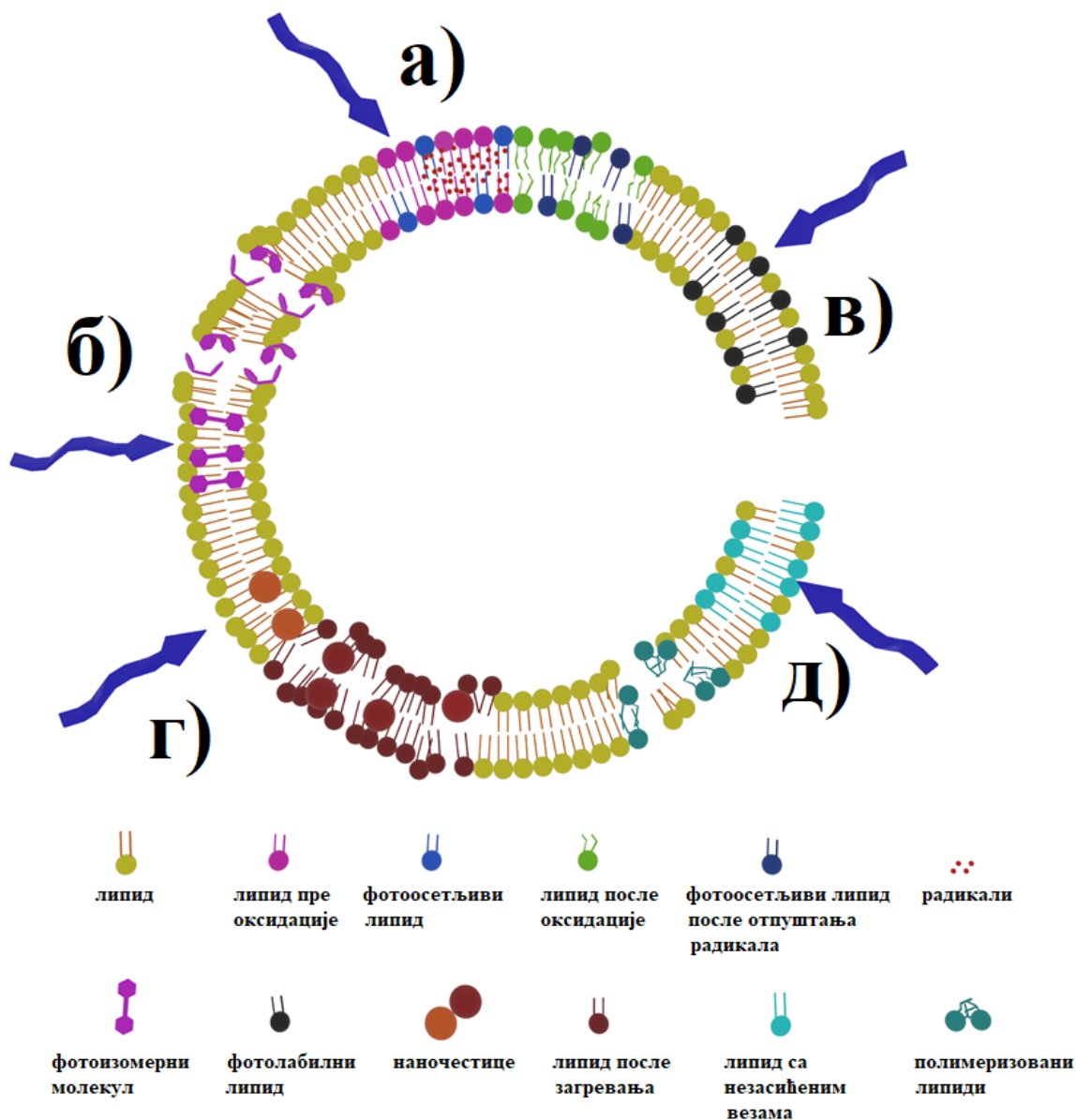
Фотополимеризабилни молекули се међусобно умрежавају када су изложени одговарајућој светлости. Овакви молекули обично имају више незасићених веза које изреагују са незасићеним везама суседних молекула [123]. Када се фотополимеризабилни молекули односно посебно припремљени фотоллипиди уграде у липидни двослој и озраче, услед њиховог међусобног умрежавања (слика 2.3.4д) долази до локалне запреминске промене. Ово последишно води до прерасподеле липида у двослоју што доводи до отварања и пермеабилности двослоја.

Магнеторазградиви липозоми

Уградњом магнетних наночестица (МНЧ) у липидни двослој може се остварити контролисано отварање липозома посредством магнетног поља [125–127]. Овакви липозоми се у литератури често називају и магнетоллипозоми. Када се примени спољашње магнетно поље МНЧ се загревају и ту топлоту преносе на липидни двослој [128]. Последишно ово доводи до пораста температуре липида и термалног ефекта отварања липозома слично као код

фототермалног ефекта (слика 2.3.4г). У зависности од карактеристика и концентрације МНЧ, загревање може бити макроскопско или локално. Макроскопско загревање подразумева брзу и осетну промену температуре читавог липозома као и средине у којој се он налази. Локално загревање подразумева стварање локализованих „врућих тачака“ у близини самих МНЧ (на растојању од 0,5–20 nm) [127]. Унутар „врућих тачака“ долази до осетне промене температуре која брзо опада са растојањем и не може се детектовати макроскопски, у ткиву или раствору.

За прављење магнеторазградивих липозома се најчешће користе Fe_3O_4 магнетне наночестице, пошто је њихова синтеза једноставна, поновљива и брза [128–130]. Наравно, могуће је користити и било који други тип магнетних наночестица. Предност МНЧ на бази Fe_3O_4 је мала величина (5–15 nm) па се оне могу лако уградити у двослој или напунити било који липозом. Још једна предност ових наночестица је што се оне могу користити и за хипертермијску терапију канцера. Ово значи да магнеторазградиви липозоми могу имати двојну улогу, доставу лека уз пропратни хипертермијски ефекат [129,131,132]. Међутим, у случају да се липозомима преноси лек који је температурно осетљив потребно је избећи макроскопско грејање.



Слика 2.3.4 Типови отварања фоторазградивих липозома **а)** фотоиндукована оксидација **б)** фотоизомеризација **в)** фотоиндуковано распадање **г)** фототермални ефекат **д)** фотополимеризација.

2.3.5. Липозоми у терапији тумора

До сада је одобрено више липозомских препарата за различите медицинске примене од надлежних агенција за лекове попут Федералне агенције за храну и лекове (*FDA*⁴) и Европске агенције за лекове (*EMA*⁵). У табели 2.3.1 су наведени сви одобрени и комерцијално доступни липозомски препарати за терапију канцера [3,124,133–141].

⁴ Енг. *Food and Drugs Agency (FDA)*, главни регулатор медицинских препарата у САД.

⁵ Енг. *European Medicines Agency (EMA)*, главни регулатор медицинских препарата у ЕУ.

Табела 2.3.1 Одобрени липозомски препарати за терапију канцера

| Назив | Тип | ПЕГ | Димензије липозома | Састав двослоја | Активна супстанца | Примена у терапији |
|------------------|-------------|-----|--------------------|---|--|------------------------------|
| <i>Doxil</i> | МЈЛ | + | 80–100 nm | <i>HSPC</i> , <i>CHOL</i> , <i>DSPE</i> – <i>PEG</i> | доксорубицин хидрохлорид (<i>DOX</i>) | различитих канцера |
| <i>Myocet</i> | МЈЛ | – | 150–250 nm | <i>CHOL</i> , <i>EPC</i> | доксорубицин хидрохлорид (<i>DOX</i>) | канцера дојке |
| <i>Depocyt</i> | ВЈЛ/ ВВЈ | – | 3–30 μ m | триолеин, <i>CHOL</i> , <i>DOPC</i> , <i>DPPG</i> | цитарабин (<i>Ara-C</i>) | неопластичног менингитиса |
| <i>Meract</i> | ВЈЛ | – | < 100 nm | <i>DOPS</i> , <i>POPC</i> | мурамил трипептид фосфатидилетаноламин (<i>MTP-PE</i>) | канцера костију |
| <i>DaunoXome</i> | МЈЛ | – | 45 nm | <i>CHOL</i> , <i>DSPC</i> | даунорубицин (<i>DNR</i>) цитрат | Капошијевог саркома |
| <i>Marqibo</i> | МЈЛ | – | 100 nm | <i>SM</i> , <i>CHOL</i> | винкрестин (<i>VCR</i>) сулфат | леукемије |
| <i>Onivyde</i> | МЈЛ | + | 110 nm | <i>DSPC</i> , <i>CHOL</i> | иринотекан (<i>IRI</i>) | аденокарцинома панкреаса |

2.4. Радионуклиди

Радиоактивност је појава спонтане емисије радиоактивног зрачења из енергетски нестабилних језгара, која се називају радионуклидима или радиоизотопима [142]. Атомска језгра радионуклида, услед унутрашње нестабилности, заправо подлежу процесу радиоактивног распада, приликом чега долази до нуклеарне трансмутације и/или нуклеарне деекситације почетног атомског језгра. Појам радиоактивног зрачења обухвата субатомске честице, електромагнетно зрачење и физионе фрагменте (слика 2.4.1). Процес радиоактивног распада је статистички процес и за довољно велики број еквивалентних радионуклида важи основни закон о радиоактивности (1).

$$A = \lambda N_0 e^{-\lambda t} \quad (1)$$

A је тренутна апсолутна активност (у тренутку $t > 0$) и представља број радиоактивних распада у јединици времена; t представља време које је прошло од почетка мерења активности, односно време које је прошло од неког произвољног тренутка $t_0 = 0$; λ је радиоактивна константа карактеристична за сваки радионуклид; N_0 је број језгара радионуклида у тренутку почетка мерења ($t_0 = 0$); λN_0 се обично засебно обележава као A_0 и представља почетну апсолутну активност (у тренутку $t_0 = 0$). Време полураспада ($t_{1/2}$) представља оно време за које

почетна активност неког радионуклида опадне за 50 % односно на половину почетне вредности. Време полураспада повезано је са радиоактивном константом преко једнакости (2).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} \quad (2)$$

Процес радиоактивног распада је праћен ослобађањем велике количине енергије, несразмерно велике у поређењу са другим физичкохемијским процесима, што је у претходном веку довело до обимних истраживања ове појаве. Последишно, процес радиоактивног распада се користи у различитим мирнодопским и војним применама. Најважнија улога радионуклида у данашњем друштву је добијање електричне струје у нуклеарним термоелектранама и примена у медицини, о којој ће детаљније бити речено у наставку [143–145].

Подела и класификација типова радиоактивних распада се може направити на основу радиоактивног зрачења које се емитује и промена до којих долази у језгру [142,146]. На овај начин се може направити подела на радиоактивне распаде код којих долази до емисије нуклеона, различите типове β -распада и изонуклеарне распаде, код којих долази до деексцитације језгра из једног у друго енергетско стање без промене односа нуклеона.

Распади праћени емисијом нуклеона

α -распад: представља емисију α -честице из побуђеног језгра, која се састоји од језгра хелијума ${}^4_2\text{He}^{2+}$ ($E \sim 5 \text{ MeV}$).

Спонтана фисија: јавља се код великих језгара приликом чега долази до распадања на два мања језгра односно фисиона фрагмента релативно сличних маса уз пропратну емисију више појединачних нуклеона и/или α -честица.

Кластер (јонски) распад: подразумева емитовање честице са више нуклеона од α -честице али не довољно велике да се може говорити о спонтаној фисији. Такве честице се називају кластери или тешки јони. Приликом спонтане фисије може доћи до стварања кластера ако настају три фрагмента приликом распада али се под типичним јонским распадом подразумева одсуство емисије других, тежих честица.

Нуклеонски распад: се као и претходни вид распада ретко јавља у природи и подразумева емисију једног или више нуклеона из језгра. У питању је распад који се најчешће јавља код вештачких радионуклида, приликом ког долази до емисије протона, неутрона или двоструке емисије два протона или два неутрона.

β -распади

β^- -распад: услед вишка неутрона у језгру долази до трансформације неутрона у протон (3) приликом чега се емитује електрон тј. β^- -честица и антинутрино. Пошто се енергија дели између електрона и антинутрина онда β^- -честица може имати различите вредности енергије,

од минималне до максималне, тако да се најчешће узима средња вредност и последично се прича о средњој продорности β^- -честице.



β^+ -распад: вишак протона у језгру може довести до трансформације једног протона у неутрон (4), уз емисију β^+ -честице и неутрина из језгра. β^+ -честица је заправо позитрон односно античестица електрона.



Електронски (ϵ) захват: представља конкурентан процес β^+ распаду⁶ (5) у коме један од електрона из унутрашње љуске бива захваћен од стране језгра, приликом чега са протоном награди неутрон. Новонастали атом је електронеутралан међутим, у унутрашњој електронској љусци остаје празнина, коју попуњава неки од електрона из виших електронских стања. Ово доводи до каскаде електрона и последичне емисије карактеристичних X-зрака. Такође, процес може бити праћен унутрашњом конверзијом и Ожеовим ефектом⁷ односно емисијом Ожеових електрона⁸.



Двоструки β -распади: као што им и име каже код ових распада долази до истовременог двоструког β -распада, било да је у питању $\beta^- \beta^-$, $\beta^+ \beta^+$ или $\epsilon\epsilon$ распад.

Изонуклеарни распади

γ -распад: приликом релаксације побуђеног језгра из побуђеног у ниже нуклеарно енергетско стање долази до емисије фотона високе енергије ($E \sim 1-10 \text{ MeV}$). Енергија оваквог фотона је тачно одређена услед квантираности енергије нуклеарних нивоа језгра и такав фотон се назива γ -фотоном. Приликом γ -распада не долази до промене броја и односа нуклеона у језгру те стога не долази до нуклеарне трансмутације а сам процес се често назива и изомерним⁹ распадом.

Унутрашња конверзија: представља процес у коме се вишак енергије језгра не емитује у виду γ -фотона, већ долази до преноса те енергије на један од електрона из унутрашње љуске.

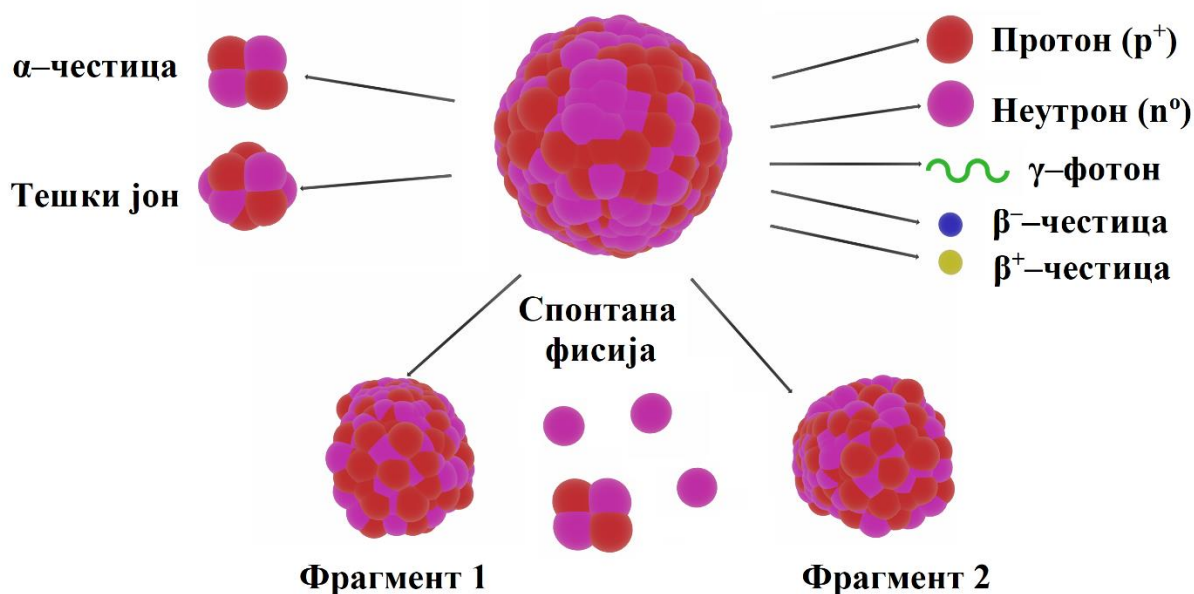
⁶ Електронски захват је једини начин да дође до деекситације језгра које има вишак протона и неповољан енергетски биланс ($E < 1,022 \text{ MeV}$).

⁷ Ожеов ефекат представља појаву да приликом попуњавања празнине у електронској љусци од стране електрона из неког вишег нивоа не дође до емисије карактеристичног X-зрака већ се та енергија преда неком од електрона у љусци, чиме долази до емисије таквог Ожеовог електрона а сам каскадни процес се даље пропагира.

⁸ Ожеови електрони су јако пожељни у нуклеарној медицини те се последњих година говори о Ожеовим емитерима као посебној врсти радионуклида од великог значаја. Разлог лежи у чињеници да Ожеови емитери најчешће емитују неколико десетина Ожеових електрона, релативно мале енергије ($\sim 10 \text{ eV}$) и последично малог домета међутим огромне деструктивне моћи. Ако β^- -честица има продорност од неколико стотина ћелијских пречника, α -честица продорност од неколико десетина ћелијских пречника онда Ожеови електрони имају продорност једног ћелијског пречника.

⁹ Нуклеарни изомери су језгра истог изотопа у различитим енергетским стањима, приликом чега се побуђена стања означавају са суперскриптом m као нпр. у случају радионуклида ^{99m}Tc који треба разликовати од непобуђеног ^{99}Tc изомера у основном стању.

Последично долази до емисије електрона дискретне и велике енергије, чије место у унутрашњој љусци попуњавају електрони из виших стања, приликом чега долази до каскадне емисије X -зрака и Ожеових електрона.



Слика 2.4.1 Типови радиоактивних честица које могу настати приликом радиоактивног распада.

2.5. Производња радионуклида за медицинске потребе

У стандардној медицинској пракси користе се радионуклиди произведени у фисионим нуклеарним реакторима, акцелераторским постројењима или добијени из генераторских система односно генератора. Сваки од наведених извора радионуклида има своје предности и користи се за добијање различитих радионуклида који се користе у медицини.

Фисиони нуклеарни реактори имају интензиван флуks неутрона широког опсега енергија. Такви неутрони се користе за изазивање нуклеарних реакција односно трансмутација, директно или погодном термализацијом у одговарајућем модератору [142,143]. Фисиони процес такође представља одличан извор радионуклида попут ⁹⁰Sr, ⁹⁹Mo, ¹³¹I или ¹³³Xe које је потребно пречистити од нечистоћа. Нуклеарни реактори имају велику предност пошто висок флуks скраћује време озрачивања мете, и последично обезбеђује добијање жељеног радионуклида у великим количинама односно високе специфичне активности¹⁰. Једини проблем може настати приликом радиохемијског и изотопског пречишћавања, тако да је потребно развити посебне процедуре за добијање радионуклида високе чистоће који се могу користити у медицини [143].

¹⁰ Специфична активност представља активност радионуклида по јединици масе или запремине ($s_m = A/m$; $s_v = A/V$).

Акцелераторска производња се заснива на коришћењу високоенергетских, убрзаних јона којима се бомбардује одговарајућа мета (сачињена од одговарајућег изотопа или смеше изотопа) у којој долази до одигравања нуклеарних реакција које доводе до стварања жељеног радионуклида. Примери неких нуклеарних реакција којима се производе медицински радионуклиди у акцелераторима су дати у табели 2.5.1 [147,148]. Циклотрони су акцелератори који се заснивају на постепеном убрзавању јона дуж кружне путање и данас се често налазе у склопу болничких комплекса. Предност акцелераторске производње радионуклида је у добијању високе специфичне активности и релативно чистих радионуклида, без потребе за екстензивним пречишћавањем [144,149]. Одређени медицински радионуклиди имају изузетно кратко време полураспада те стога није практично да се стално набављају из обично удаљених и изолованих нуклеарних реактора. Такође, цена болничких циклотронских постројења се креће од неколико милиона до неколико десетина милиона долара, у зависности од намене, док је изградња нуклеарних реактора знатно скупља [150,151].

У одсуству нуклеарног реактора или погодног циклотронског постројења радионуклиде је могуће добити из генераторских система [145,152]. Генератори су секундарни извори у смислу да се првобитни радионуклид добија примарном трансмутацијом (у реактору или акцелератору). Рад генератора се заснива на принципу добијања потомка приликом распада претка, односно примарног радионуклида при чему потомак има краће време полураспада од претка. На тај начин се радиоактивним распадом претка, који је дуже живећи, омогућава дуже складиштење и употреба потомка, који има релативно кратко време полураспада. У табели 2.5.2 су дати често коришћени системи генераторских парова [145,152–158]. Генератори су погодни за употребу зато што се радионуклиди не морају одмах искористити. То омогућава њихов пренос и употребу на локацијама које су даље од примарног места производње радионуклида, односно генератори се могу користити и у болницама које немају приступ сопственом акцелератору или локалном реактору.

Табела 2.5.1 Акцелераторска производња радионуклида који се користе у медицини

| Реакција | Енергија [MeV] | Радионуклид | $t_{1/2}$ |
|--|-------------------|-------------------|-------------|
| $^{100}\text{Mo} (p,2n)$ | 30 | ^{99m}Tc | 6 сати |
| $^{124}\text{Xe}(p,2n)^{123}\text{Cs}$ | 27 | | |
| $^{124}\text{Xe}(p,pn)^{123}\text{Xe}$ | | | |
| $^{124}\text{Xe}(p,2pn)^{123}\text{I}$ | | ^{123}I | 13,1 сат |
| $^{123}\text{Te}(p,n)^{123}\text{I}$ | 15 | | |
| $^{124}\text{Te}(p,2n)^{123}\text{I}$ | 25 | | |
| $^{203}\text{Tl}(p,3n)^{201}\text{Pb} \rightarrow ^{201}\text{Tl}$ | 29 | ^{201}Tl | 73,1 сат |
| $^{14}\text{N}(p,\alpha)$ | 11–19 | | |
| $^{11}\text{B}(p,n)$ | 10 | ^{11}C | 20,3 минута |
| $^{18}\text{O}(p,n)$ | 15 | ^{18}F | 110 минута |
| $^{20}\text{Ne}(d,\alpha)$ | 14 | | |
| $^{64}\text{Ni}(p,n)$ | 15 | ^{64}Cu | 12,7 сати |
| $^{68}\text{Zn}(p,\alpha n)$ | 30 | | |
| $^{124}\text{Te}(p,n)$ | 13 | ^{124}I | 4,14 дана |
| $^{125}\text{Te}(p,2n)$ | 25 | | |

Табела 2.5.2 Радионуклидни генератори

| Генератор | $t_{1/2}$ претка | $t_{1/2}$ потомка |
|-----------------------------------|------------------|-------------------|
| $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ | 66 сати | 6 сати |
| $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ | 270 дана | 68 минута |
| $^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$ | 25,5 дана | 76,4 секунде |
| $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ | 69 дана | 16,9 сати |
| $^{81}\text{Rb}/^{81m}\text{Kr}$ | 4,58 сати | 13 секунди |
| $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ | 10 дана | 45,6 минута |
| $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ | 9,26 сати | 9,7 минута |
| $^{90}\text{Sr}/^{90}\text{Y}$ | 28,8 година | 64,6 сати |
| $^{44}\text{Ti}/^{44}\text{Sc}$ | 60,6 година | 4 сата |

2.5.1. Производња $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ генератора

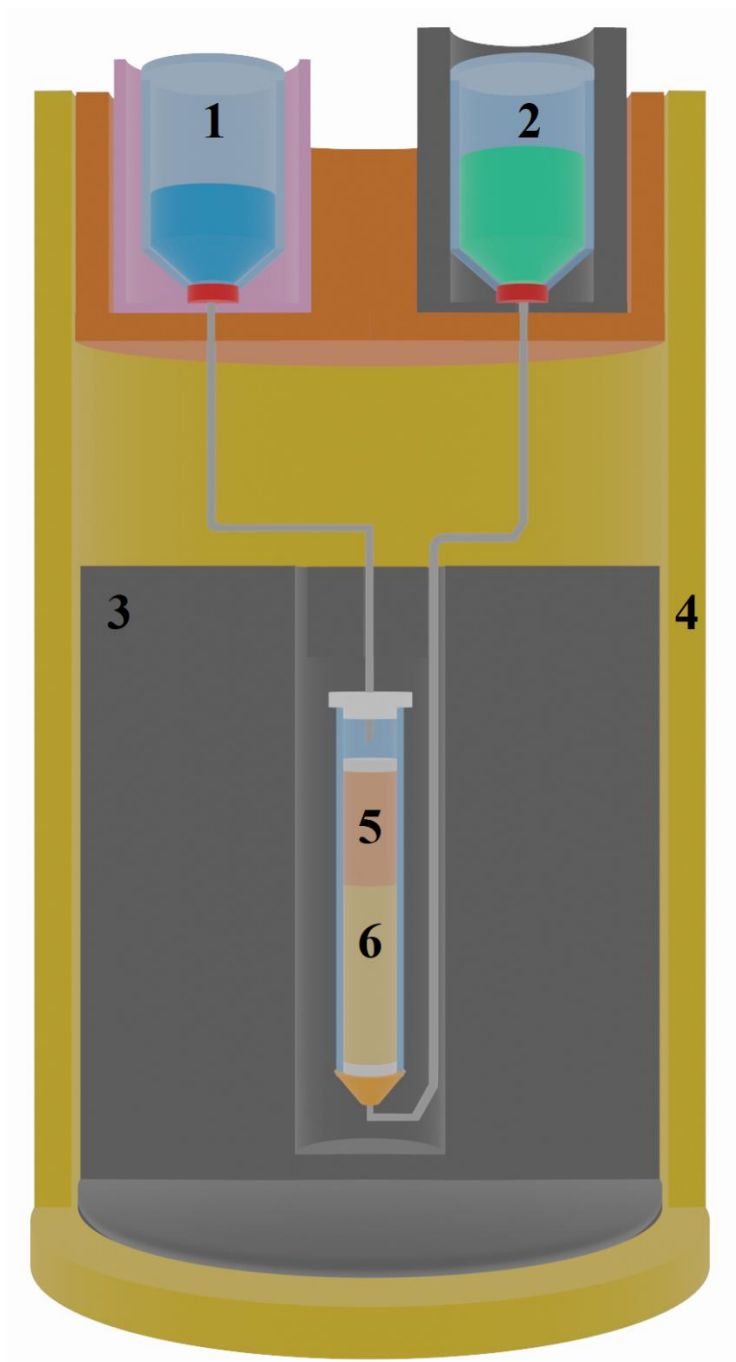
Први генераторски систем $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ је развијен веома рано (1950.) док је серијска производња кренула неколико година касније [159]. Радионуклид ^{99}Mo се добија у огромним¹¹ количинама приликом физионог распада радионуклида ^{235}U и ^{239}Pu у нуклеарним реакторима, и као такав је лако доступан и јефтин. Сам генераторски систем $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ је једноставан за конструкцију, и заснива се на адсорпцији $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ јона (молибдата) на одговарајућој хроматографској колони. Приликом β^- распада ^{99}Mo настаје ^{99m}Tc односно настаје $^{99m}\text{TcO}_4^-$

¹¹ Радионуклид ^{99}Mo представља најчешће заступљени физиони продукт са око 6% заступљености у односу на укупан број физионих фрагмената.

(пертехнетат) јон, који више није чврсто адсорбован на колони. Простим испирањем колоне се добија раствор $^{99m}\text{TcO}_4^-$ јона, који је даље могуће користити за директну примену или за обележавање одговарајућих једињења. Последично, овакав генераторски систем је јефтин за производњу, лак за употребу и има рок употребе од седам дана, при чему је елуирање („мужу“) колоне могуће вршити на сваких шест сати.

Лабораторија за радиоизотопе, Института за нуклеарне науке–Винча, је развила и патентирала сопствени $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ генератор, који је схематски приказан на слици 2.5.1 Овај генератор се заснива на коришћењу Al_2O_3 колоне за адсорбовање ^{99}Mo у облику $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ јона. Колона се може поделити на два слоја, први односно горњи слој који се састоји од мешавине $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Si}$ (0,6 g) и други слој односно доњи слој који се састоји од чистог Al_2O_3 (0,8 g). На првом слоју се врши примарно адсорбовање $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ јона док Si има улогу да спречи појаву радиолитичке редукције ^{99m}Tc . Други слој служи као брана у случају пробоја ^{99}Mo и има улогу да покупи слободне $^{99}\text{Mo}/^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ јоне који се не задрже на првом слоју. Ово је веома важно како у крајњем раствору не би дошло до појаве хемијских и радиохемијских нечистоћа у виду ^{99}Mo .

Запремина колоне износи 2 mL и оба слоја заузимају отприлике једнаку запремину. Пре коришћења колоне потребно је извршити њено испирање односно припрему са раствором HCl ($\text{pH} = 3,1$). Колона се пуни са ^{99}Mo који се налази у облику киселог раствора ($\text{pH} \approx 3$) натријум–молибдата (Na_2MoO_4). Овако се постиже висока ефикасност везивања ^{99}Mo на колони ($> 99,99\%$). Приликом радиоактивног распада ^{99}Mo , адсорбованог на колони, настаје ^{99m}Tc односно $^{99m}\text{TcO}_4^-$ јон који се не адсорбује на Al_2O_3 . Испирање слободног ^{99m}Tc односно $^{99m}\text{TcO}_4^-$ јона са колоне се врши помоћу асептичног ФР. У те сврхе се на „улаз“ генератора поставља бочица са ФР, која испира колону. На „излазу“ генератора је постављена друга, празна бочица, у којој постоји вакуум. Услед разлике у притисцима на „улазу“ и „излазу“ генератора долази до протока ФР, од „улаза“ до „излаза“, што последично доводи до испирања колоне. Овим поступком се добија раствор натријум–пертехнетата (NaTcO_4), који се може користити као радиофармацеутик или као прекурсор добијање других радиофармацеутика на бази ^{99m}Tc . Специфична активност елуата се обично креће у границама од 0,03 до 30 GB/mL.



Слика 2.5.1 Схема $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ генератора: 1) бочица са ФР 2) вакуум бочица која служи за сакупљање елуата 3) оловна заштита 4) кућиште генератора 5) горњи слој колоне $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Cu}$ 6) доњи слој колоне Al_2O_3 .

Радиообележавање различитих једињења са $^{99\text{m}}\text{Tc}$ се обично врши додавањем раствора NaTcO_4 у одговарајући радиофармацутски кит, у присуству Sn^{2+} јона. Улога Sn^{2+} јона је да редукују $^{99\text{m}}\text{Tc}$ из оксидационог стања +7 у +4. Редуковани $^{99\text{m}}\text{Tc}$ се потом лако комплексира помоћу одговарајућег кита односно једињења, приликом чега настаје одговарајући $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -радиофармацутик. Пошто је концентрација Sn^{2+} јона ниска чак и најмање присуство нежељених оксидујућих врста може довести до паразитске оксидације Sn^{2+} јона. У овом

случају се смањује ефикасност редукције ^{99m}Tc односно смањује се ефикасност везивања ^{99m}Tc за одговарајући кит. Управо из овог разлога се $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ генератор прави са смањеним садржајем кисеоника, који не утиче на ефикасност испирања колоне али може знатно утицати на ефикасност комплексирања кита са ^{99m}Tc .

2.6. Примена радионуклида у медицини

Идеалан радионуклид за примену у медицини се специфично накупља у одређеним органима, док су његови потомци биокомпатибилни односно, нетоксични или слабо токсични изотопи. У пракси постоји јако мали број радионуклида који испуњавају ове услове и то су пре свега радионуклиди јода, стронцијума и гвожђа, који се могу користити у елементарном односно јонском облику. Већина осталих радионуклида се мора користити у облику одговарајућег једињења, како би се обезбедило циљано односно специфично накупљање радионуклида у одговарајућем ткиву. Према Светској здравственој организацији радиофармацеутик је свако радиообележено једињење, хелирани радионуклид, радиоколоид, чист радионуклид или јонски раствор радионуклида који се може користити у медицини.

Тип радиоактивног распада коме подлеже одговарајући радионуклид одређује начин и сврху његове примене у медицини. Од природе емитованог радиоактивног зрачења (честично или електромагнетно) као и од вредности линеарног енергетског трансфера (ЛЕТ)¹² зависи да ли је зрачење погодно за коришћење у дијагностичке или терапијске сврхе [142,160]. У наставку су дати типови радиоактивних емитера који се користе или могу имати потенцијалну примену у нуклеарној медицини [142].

γ -емитери: емитују γ -фотоне који су изузетно продорни те се стога γ -емитери искључиво користе у сцинтиграфији односно медицинској дијагностици. Пошто су γ -фотони тачно одређене енергије, продорни и слабо интерагују са средином (ткивима), лако је извршити калибрацију приликом сцинтиграфије, а опасност од озрачивања по пацијента је на нивоу рендгенског снимања.

α -емитери: услед јонизованости и велике масе α -честица се релативно брзо заустави у ткиву, предајући огромну енергију успут. Продорност α -честица у организму је реда величине 0,1 mm те се α -емитери искључиво користе у терапији малигнух обољења. Само тешка језгра подлежу α -распаду па је важно имати у виду и њихову токсичност. Пошто α -емитери изазивају велику деструкцију околних ћелија, важно је да се доставе на праву локацију иначе могу направити огромну штету у здравом ткиву и организму.

β -емитери: уобичајена продорност β -честица у организму износи 0,5–5 mm услед мање масе, енергије и наелектривања у односу на α -честице. Дакле, електрони односно β -честице су продорније од α -честица, те се првенствено користе за терапију масивних (енг. *solid*)

¹² Линеарни енергетски трансфер представља вредност енергије коју јонизујуће зрачење пренесе средини кроз коју прелази по јединици дужине.

тумора, чије димензије одговарају продорности одговарајуће β^- -честице или у процедури радиосиновертиозе¹³ [161].

β^+ -емитери: физички гледано позитрон пролази кроз све фазе успоравања и предавања енергије у ткиву као и електрон, међутим када се довољно успори врло брзо долази до анхилације позитрона са неким од електрона у околини, приликом чега се емитују два антипаралелна γ -фотона истих и тачно одређених енергија. Ово је довело до тога да се β^+ -емитери најчешће користе за ПЕТ (позитронска емисиона томографија) дијагностику односно у сцинтиграфији базираној на коинцидентној детекцији два анхилациона γ -фотона.

Ожеови емитери: обухватају радионуклиде код којих долази до појаве Ожеовог ефекта и емисије Ожеових електрона. Углавном су то радионуклиди који подлежу распаду путем ε -захвата или унутрашњој конверзији. Оба ова распада а посебно унутрашња конверзија су праћени емисијом неколико десетина електрона релативно мале енергије (5–30 eV) који се лако зауставе у непосредној околини успут вршећи велико разарање ткива. Због малог домета овај тип емитера се сматра идеалним за терапију канцера, без нуспојава по здраво ткиво, с тим што је потребно обезбедити циљану доставу Ожеових емитера у унутрашњост ћелије канцера или њену непосредну близину.

2.7. Примена радионуклида у дијагностици

Примена радионуклида за потребе дијагностике у медицини је огромна и заснива се на примени радиотрасера¹⁴ за праћење и детектовање одређених обољења посредно преко детекције примарних (директан производ радиоактивног распада) или секундарних (настају приликом анхилације позитрона са електроном) γ -фотона, у зависности од технике и радионуклида који се користи. Детекција γ -фотона се врши помоћу сцинтилационих детектора¹⁵ па се често ова област нуклеарне медицине назива и сцинтиграфија, према самој техници детекције. Пацијенту се пре самог снимања администрира одговарајући радионуклид у виду инфузије, инјекције или ређе оралним путем а затим се пре снимања сачека одређено време да дође до жељене расподеле радионуклида у организму.

¹³ Радиосиновертиоза (PCO) позната као и радиосиновектомија (PC) у старијој литератури је медицинска процедура која се користи за терапију запаљенских процеса у зглобовима. PCO се заснива на убризгавању одређеног радионуклида у облику радиофармацеутика у синовијалну течност отеклог зглоба који затим озрачује и смањује оток, што доводи до повећања покретљивости зглоба.

¹⁴ Радиотрасери су једињења обележена са радионуклидом или сами јони радионуклида који потичу од неке растворне соли и према општој дефиницији спадају у класу радиофармацеутика. Међутим, обично се појам радиотрасер користи да назначи да се ради о радиофармацеутику који се користи у дијагностичке сврхе.

¹⁵ Сцинтилациони детектори могу бити чврсте или течне супстанце, које имају способност сцинтилације односно зрачења фотона из видљивог дела спектра, услед деексцитације електрона побуђених спољашњим X или γ зрачењем.

2.7.1. ^{99m}Tc –сцинтиграфија

Радионуклид ^{99m}Tc је нуклеарни изомер технецијума– ^{99}Tc који подлеже γ –распаду, уз емисију једног γ –фотона енергије 140 keV, и представља најчешће коришћени радионуклид у нуклеарној медицини [162]. Више је разлога зашто се ^{99m}Tc користи у преко 80 % дијагностичких процедура [159]. Распрострањеност и ниска цена $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ генератора има важну али не и пресудну улогу. Радионуклид ^{99m}Tc , односно јон $^{99m}\text{TcO}_4^-$ се лако и ефикасно веже или комплексира са великим бројем једињења. Такође, γ –фотон, од 140 keV, се може лако снимити на стандардним гама камерама, док је резолуција односно контраст слике одличан. Услед релативно кратког времена полураспада ^{99m}Tc и продорног γ –зрачења које се емитује, пацијент прими малу ефективну дозу¹⁶ зрачења без већег ризика по здравље. Крајњи продукт распада радионуклида ^{99m}Tc односно ^{99}Tc је изотоп ^{99}Ru , који је стабилан. Као заостатак просечне ^{99m}Tc сцинтиграфске процедуре, у телу пацијента заостаје немерљиво мала концентрација ^{99}Ru (10^{-9} – 10^{-10} g).

Област радиофармације која се бави производњом лекова заснованих на ^{99m}Tc је практично област за себе. До данас је широм света регистровано преко 100 различитих ^{99m}Tc –радиофармацеутика којима се могу дијагностиковати различита медицинска стања, како појединачних органа тако и целог тела [159]. Приликом испирања са колоне ^{99m}Tc се добија у највишем оксидационом стању +7 које није погодно за рад, односно за обележавање. Последично, додавањем одговарајућих реагенса у елуат ^{99m}Tc се редукује у неко ниже оксидационо стање и истовремено се комплексира односно, везује одговарајућим органским или неорганским једињењем. Читава процедура оваквог обележавања је једноставна, и у болничким условима се изводи у року од неколико минута, што умањује експозицију запосленог особља. У табели 2.7.1 су приказани неки од често коришћених ^{99m}Tc препарата [159,163,164].

¹⁶ Доза зрачења у општем случају представља количину енергије коју неки материјал апсорбује од стране радиоактивног зрачења по јединици масе.

Табела 2.7.1 Радиофармацеутици који садрже ^{99m}Tc и њихова примена.*

| Радиофармацеутик | Комерцијално име | Примена |
|--|---|---|
| ^{99m}Tc пертехнетат | <i>DuPont Mallinckrodt DTE Amersham</i> | Осликавање штитасте жлезде, плувачних жлезда, паратиroidних жлезда, цистографија... |
| ^{99m}Tc –апцидит | <i>AcuTect</i> | Пептидно осликавање дубоко–венозне тромбозе |
| ^{99m}Tc –арцитумомаб | <i>CEA–Scan</i> | Моноклонална антитета за колоректални тумор |
| ^{99m}Tc –албумин колоид | <i>Microlite</i> | Осликавање јетре и слезине |
| ^{99m}Tc –бицистат (<i>ECD</i>) | <i>Neurolite</i> | Церебрално перфузионо осликавање |
| ^{99m}Tc –депреотид | <i>Neotect</i> | Везивање за трансмембранске рецепторе |
| ^{99m}Tc –дизофенин | <i>Hepatolite–CIS</i> | Хепатобиларно осликавање |
| ^{99m}Tc –ексаметазин | <i>Ceretec</i> | Церебрално перфузионо осликавање |
| ^{99m}Tc –глуцептат | <i>Draximage</i> | Осликавање бубрега |
| ^{99m}Tc – <i>HAS</i> | – | Осликавање срчаних комора |
| ^{99m}Tc –фанолесомаб | <i>^{99m}TcNeutroSpec</i> | Моноклонална тела за осликавање инфективних делова |
| ^{99m}Tc –лидофенин (<i>HIDA</i>) | <i>Technescan</i> | Хепатобиларно осликавање |
| ^{99m}Tc – <i>MAA</i> | <i>Pulmolite–CIS Macrotec</i> | Пулмонална перфузија |
| ^{99m}Tc –меброфенин | <i>Choletec</i> | Хепатобиларно осликавање |
| ^{99m}Tc –медронат | <i>Osteolite–CIS</i> | Осликавање костију |
| ^{99m}Tc –меритиатид | <i>Technescan MAG3</i> | Ренално осликавање |
| ^{99m}Tc –нофетумомаб | <i>Verluma</i> | Моноклонално антителио за осликавање малих ћелија тумора у плућима |
| мерпентан | <i>Mallinckrodt HDP</i> | Осликавање костију |
| ^{99m}Tc –оксидронат | <i>Nycomed</i> | |
| ^{99m}Tc –пентетат | <i>DTPA Phosphotec</i> | Осликавање бубрега и плућа (у облику аеросола) |
| ^{99m}Tc –пирофосфат | <i>Pyrolite–CIS Pyro–CIS</i> | <i>In vivo</i> обележавање црвених крвних зрнаца |
| ^{99m}Tc –црвена крвна зрнаца | <i>Ultratag</i> | Осликавање унутрашњих крварења и срчаних комора. |
| ^{99m}Tc –хексамиби | <i>Cardiolite Miraluma</i> | Миокардијско перфузионо осликавање и осликавање рака дојке |
| ^{99m}Tc –суцимер | <i>DMSA</i> | Осликавање бубрега |
| ^{99m}Tc –сумпор колоид | <i>Pharmalucence</i> | Осликавање јетре/слезине и унутрашњих крварења. |
| ^{99m}Tc –тебороксим | <i>Cardiotec</i> | Миокардијско перфузионо осликавање |
| ^{99m}Tc –тетрофосмин | <i>Myoview</i> | Миокардијско перфузионо осликавање |

*Табела прилагођена из [159].

2.7.2. Сцинтиграфија јодом

Откриће радионуклида ^{131}I представља почетак развоја нуклеарне медицине као области и управо је први комерцијални циклотрон направљен како би се на њему производио ^{131}I . Главни разлог лежи у чињеници да се јод као елемент у телу човека преференцијално акумулира у ткиву штитасте жлезде. Различити радионуклиди јода се могу користити за циљану сцинтиграфију штитасте жлезде али и терапију тумора, најчешће управо штитасте жлезде [165,166].

До пре пар деценија ^{131}I је искључиво коришћен као дијагностичко али и терапијско средство обољења штитасте жлезде. Услед повољног времена полураспада ($t_{1/2} = 8$ дана) и јефтине производње овај радионуклид је био и остао широко доступан. Међутим, данас није

пожељно да се ^{131}I користи за дијагностику пошто је он истовремено β^- и γ -емитер, те се стога пацијент излаже непотребној дози зрачења. Уместо ^{131}I препоручена је употреба радионуклида ^{123}I , који је чист γ -емитер и има краће време полураспада ($t_{1/2} = 13$ часова) [167]. Применом ^{123}I се смањује доза коју пацијент прима док је и резолуција снимка боља, пошто је γ -фотон енергије 120 keV лако уочљив на стандардним гама камерама. Сама процедура сцинтиграфије је веома једноставна, и састоји се у оралној администрацији радионуклида јода, у облику капсуле или раствора. У случају терапије хипертиреоидизма узима се знатно већа доза ^{131}I , и обично се после 3 месеца види значајно побољшање стања. У случају малигног обољења штитасте жлезде примењује се неколико терапијских доза у размаку од месец дана, и резултати су видљиви после 3–6 месеци [168].

Још једна стандардна процедура сцинтиграфије са јодом се заснива на коришћењу метајодобензилгуанидина (*MIBG*) који представља молекул сличан норадреналину [166]. На овај начин се погодним обележавањем *MIBG* може вршити откривање раних тумора надбубрежних жлезда као и терапија одређених тумора. Процедура се састоји у интравенској администрацији радиофармацеутика, при чему пацијент претходни дан треба да унесе велику количину јода, најчешће у облику таблета калијум-јодида. Ово има за циљ засићење штитасте жлезде јодом што умањује шансу од нежељеног накупљања радионуклида јода у овом органу.

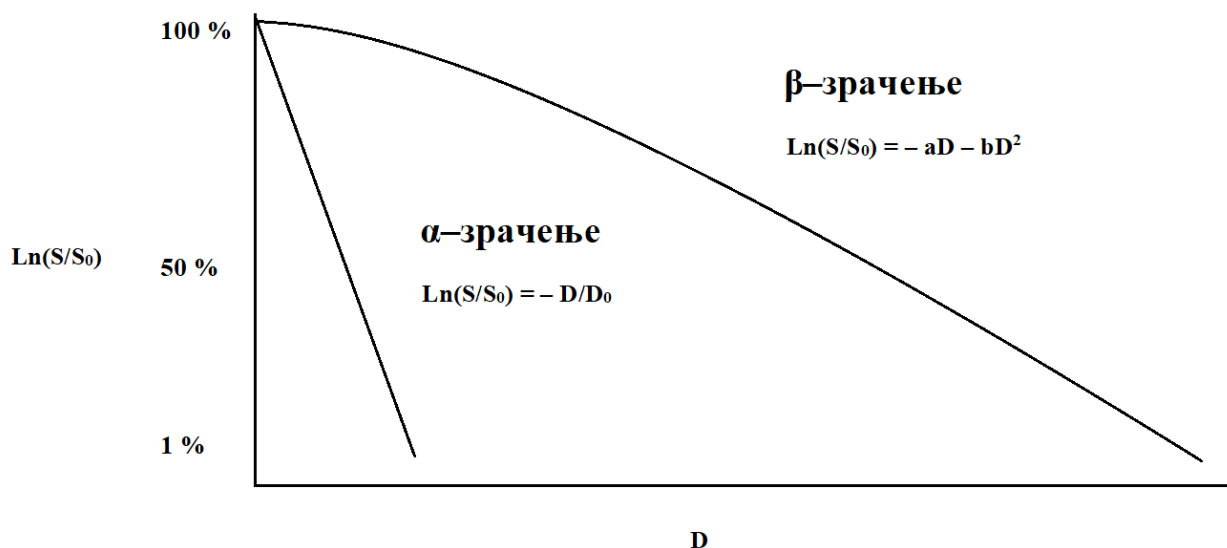
2.8. Терапија радиофармацеутицима

Терапија малигнух обољења коришћењем радионуклида у погодном облику тј. радиофармацеутицима, се користи када тумор није локализован и приступачан односно када је тумор агресиван и лоциран у радиосензитивном ткиву. Сваке године се врше обимна испитивања различитих радионуклида и радиофармацеутика али у просеку се тек на сваких 5 година лиценцира нови радиофармацеутик, и то најчешће као замена за неки старији препарат. *FDA* признаје 50 регистрованих радиофармацеутика, од којих је само 7 радиофармацеутика намењено за терапију (укључујући већ поменути *MIBG*- ^{131}I радиофармацеутик) а сви остали су намењени за дијагностику [169].

Примена радионуклида у лечењу малигнух обољења се заснива на великој деструктивној моћи радиоактивног зрачења односно чињеници да такво зрачење предаје велику количину енергије околини са којом интерагује [170]. У зависности од тога о каквом типу зрачења се ради, могу се разматрати различити механизми интеракције са околином. Најлакши начин да се упореде различити типови зрачења је коришћењем ЛЕТ-а. Ниске вредности ЛЕТ-а одликују γ и β зрачење док су високе ЛЕТ вредности карактеристичне за α зрачење и посебно Ожеове електроне [142,166,170]. Сходно намени, односно типу малигног обољења које се третира и типу терапије, може се изабрати радиоактивно зрачење са оптималним вредностима ЛЕТ-а.

Показано је да зависност удела преживелих ћелија (S/S_0) од дозе зрачења има различит облик у зависности од ЛЕТ вредности зрачења, што се симболично може видети на слици 2.8.1 [168]. Одмах се уочава да се исти ефекат постиже са мањом дозом α -зрачења него са β -зрачењем. Такође, уочава се да повећавање дозе не доводи до комплетног уништења малигнух ћелија, већ се постиже нека минимална, гранична вредност од око 1 %. Према томе улога радиоактивног зрачења у терапији је да пре свега успори раст и пасивира тумор у што већој

мери. По постизању неке критичне, минималне вредности броја туморских ћелија тумор више није у стању да рапидно пролиферише што олакшава његово уклањање, секундарну терапију као и борбу самог организма са преосталим ћелијама тумора.



Слика 2.8.1 Удео преживелих ћелија канцера у зависности од типа зрачења и примењене дозе.

У зависности од ситуације пожељно је користити β -емитере за терапију солидних тумора док се α -емитери а посебно Ожеови емитери морају специфично везати за туморске ћелије, како би третман био успешан. Предност β -емитера је широк избор са различитим вредностима средњег домета, и чињеница да се не морају довести у непосредну близину тумора. Код α -емитера главна предност је што се користе знатно мање дозе али их је у пракси потребно специфично везати за ћелије, како би се умањило негативан утицај на здраве ћелије, што је бар за сада још увек у фази истраживања [171].

Радионуклид ^{177}Lu се користи у облику радиофармацеутика $^{177}\text{Lu-DOA-TATE}$ за терапију неуроендокриних тумора [172]. $DOA-TATE$ представља сложен молекул који се састоји од хелатора (DOA) који је везан ковалентном везом за пептид ($TATE$) који се веже за специфичне рецепторе на ћелијама неуроендокриних тумора. Хелатор DOA сам по себи може да комплексира односно веже различите јоне тј. радионуклиде. Радионуклид ^{177}Lu је истовремено β^- и γ емитер, те се у зависности од примењене активности може користити за терапију или дијагностику [116,173]. Енергија емитованог γ -фотона је релативно мала, око 170 keV, и погодна за сцинтиграфско снимање [173]. Највећа предност ^{177}Lu радионуклида лежи у чињеници да β^- честице које се емитују имају мали средњи домет ($d = 0,23 \text{ mm}$) у меком ткиву, те се минимизира опасност по здраво ткиво и омогућава се селективна терапија малигних ћелија.

У случају да се ради о туморима коју су узнатредовали може се користити $^{90}\text{Y-DOA-TATE}$ или $^{90}\text{Y-DOATOC}$ радиофармацеутик, пошто ^{90}Y емитује знатно продорније електроне ($d = 2-3 \text{ mm}$) [174]. Селективност везивања $DOA-TATE$ за туморске ћелије у односу на $DOATOC$ је већа за ред величине, па је тако $DOA-TATE$ терапија знатно успешнија. Међутим, хемијски процес синтезе $DOA-TATE$ молекула је знатно комплекснији од

DOTATOC синтезе па се претходни молекул и даље користи. Радионуклид ^{177}Lu је због својих карактеристика добар и у терапији тумора простате у облику $^{177}\text{Lu-PSMA}$ [175].

Радионуклид ^{90}Y у облику хлорида је вишенаменски радиофармацеутик који се може користити за различите примене [176]. Могуће је интравенски инјектовати микросфере албумина обележене са ^{90}Y што доводи до настајања волуменозних агломерата, који се накупљају у јетри и користе за терапију тог органа [177,178]. Поред ове директне примене, у раствор јона $^{90}\text{Y}^{3+}$ је могуће додати различите комплексирајуће агенсе, чија је улога да јоне $^{90}\text{Y}^{3+}$ одведу у специфични део тела, односно у одређени орган. Радионуклид ^{90}Y се често користи и у терапији метастаза костију и у палијативној¹⁷ терапији таквих тумора [179].

Поред ^{90}Y за палијативну терапију се користе и радионуклиди стронцијума, ^{89}Sr и ^{90}Sr [180,181]. Пошто је стронцијум елемент друге групе, метаболички пут његових јона је идентичан путу калцијумових јона, те се стога изотопи стронцијума гомилају у костима и у коштаном сржи. Радионуклиди ^{89}Sr и ^{90}Sr се администрирају пацијенту у виду раствора SrCl_2 , приликом чега око 20–30 % активности одлази у кости, а остатак се излучи из организма у року од 24 часа. Оба радионуклида су β^- емитери са дугим временима полураспада, од 29 година за ^{90}Sr и 51 дан за ^{89}Sr . Очигледно је да је услед знатно краћег времена полураспада ^{89}Sr погоднији за терапију, међутим услед чињенице да ће оба радионуклида остати у костима пацијента дужи период, оба ова радионуклида се углавном користе код терминалних пацијената.

За терапију метастаза на костима су регистровани и радионуклиди ^{223}Ra и ^{153}Sm [181]. Радионуклид ^{223}Ra је α -емитер са повољним временом полураспада ($t_{1/2} = 12$ дана) и у организму се специфично накупља у костима. Услед оваквих карактеристика ^{223}Ra се примењује у облику раствора хлорида, који се интравенски администрира пацијенту. Време полураспада ^{223}Ra је такво да омогућава излучивање вишка ^{223}Ra из организма пре него што дође до значајног радиоактивног распада. Онај део активности који оде у кости врши интензиван радиолошки притисак на ћелије тумора, услед кратког дмета α -честица. Код коштаних метастаза агресивног тумора, који није могуће лечити на други начин, радионуклид ^{223}Ra је једини начин терапије. Радионуклид ^{153}Sm у облику комплекса $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ представља најновији регистровани радиофармацеутик за терапију метастаза на костима и има одличне терапијске карактеристике у односу на остале сличне радиофармацеутике [182].

2.9. Радионуклидна тераностика

Тераностика обухвата област истраживања у фармацији која се бави проналажењем и испитивањем нових лекова, који се могу користити за истовремену дијагностику и терапију одређених обољења, пре свега канцера [183]. Под појмом радионуклидна тераностика се подразумева коришћење одговарајућих радионуклида, који сами по себи или у склопу већег молекула, могу истовремено да се користе и за дијагностичке и терапијске сврхе [184]. Са чисто теоријског становишта радионуклид који се користи у тераностици мора да испуни два услова истовремено: да емитује продорно γ или X -зрачење и да емитује зрачење високих ЛЕТ

¹⁷ Палијативна терапија подразумева ублажавање болова које осећају терминални пацијенти са метастазама на костима, када више није могућа било каква терапија.

вредности, попут α -зрачења или Ожеових електрона [184,185]. Ове услове испуњава мали број радионуклида међутим, када се узму у обзир техничка ограничења попут производње, добијања високе активности и хемијске чистоће број потенцијалних кандидата се додатно смањи. Идеални радионуклиди за примену у тераностици су обично радионуклиди који имају нуклеарне изомере, пошто се приликом њиховог распада обично емитује продорно γ -зрачење и више Ожеових електрона. У тексту су до сада већ поменута два радионуклида, ^{131}I и ^{177}Lu , који се користе као тераностици већ дуже време [116,168]. Тренутно се врше истраживања са радионуклидима попут $^{195\text{m}}\text{Pt}$ и ^{64}Cu , који поседују изузетна тераностичка својства и предмет су опсежних истраживања [186–189].

III ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

Експерименти спроведени у оквиру ове докторске дисертације су вршени на основу почетне односно радне хипотезе која тврди да ће:

- а) Липозоми модификовани глукозом испољити преференцијално и увећано накупљање у ћелијама канцера у односу на контролне, немодификоване липозоме, посредством везивања за глукозне (*GLUT*) рецепторе који се експримирају у повећаном броју на ћелијама канцера у односу на здраве ћелије.
- б) Липозоми модификовани глукозом се могу користити као средство за циљану доставу лекова у терапији и дијагностици канцера.

У циљу доказивања радне хипотезе предвиђени су циљеви истраживања на основу којих је вршен експериментални рад:

- 1) Успешна синтеза липозома модификованих глукозом и оптимизација процеса синтезе у циљу добијања липозома повољних физичкохемијских особина.
- 2) Испитивање и развој метода ефикасног радиообележавања липозома модификованих глукозом са различитим радионуклидима.
- 3) Испитивање стабилности и ретенције липозома модификованих глукозом у *in vitro* и *in vivo* условима, у поређењу са контролном групом немодификованих липозома.

3.1. Експериментални рад

У оквиру спроведеног истраживања разликују се три велике целине, које се у експерименталном погледу делимично преклапају и надовезују једна на другу. У овом делу је дат уопштен преглед експеримената који су детаљније описани у наставку, у одговарајућим поглављима.

- 1) Синтеза, оптимизација процеса синтезе и карактеризација липозома

Синтетисано је више врста липозома са различитим масеним саставом *DPPC*, *L* и *CHOL* молекула у циљу добијања липозома модификованих глукозом. Састав различитих липозомских формулација је приказан у табели 3.1.1. Процес модификације липозома глукозом се врши модификацијом површине липозома синтетисаних на бази *DPPC*-а и *CHOL*-а. Пошто молекул *L* поседује поларни део (глукозни остатак) и неполарни део (*CHOL* скелет) модификација липозома је вршена помоћу процеса сидрења молекула *L*. Односно, молекул *L* је додаван у одговарајућој масеној размери у смешу *DPPC*-а и *CHOL*-а и таква липидна смеша је коришћена као прекурсор за синтезу одговарајуће формулације липозома. Формулације липозома су означене према различитом масеном саставу супстанци које су

коришћене за њихову синтезу, односно према односу $DPPC : L : CHOL$ и то на следећи начин: L_0 (4 : 0 : 1); L_1 (4 : 1 : 1), L_2 (4 : 2 : 1); L_3 (4 : 3 : 1); L_4 (4 : 4 : 1) и L_5 (4 : 5 : 1). Приликом синтезе формулације L_0 није коришћена супстанца L и ово је заправо контролна серија $DPPC$ липозома. Формулација липозома модификованих глукозом која је показала најбоље физичкохемијске особине по синтези као и најбољу радиохемијску чистоћу приликом обележавања са ^{99m}Tc и ^{177}Lu је узета као оптимална формулација и коришћена је у даљим експериментима.

Процес пегилације је примењен на оптимизованој формулацији при чему су коришћене различите масе PEG -а (0,1–2 mg) које су додаване у почетну липидну смешу у облику концентрованог воденог раствора (50 μ L). Формулације различитих пегилираних липозома су означене према маси PEG -а у липидној смеси и то као: P_1 (0,1 mg); P_2 (1 mg) и P_3 (2 mg). По завршетку синтезе пегилираних липозома извршена је одговарајућа физичкохемијска карактеризација.

Такође, оптимизовани непегилирани липозоми модификовани глукозом су напуњени магнетним наночестицама Fe_3O_4 (МНЧ), у циљу испитивања могућности контролисаног отварања таквих липозома у присуству магнетног поља. Просечна величина коришћених МНЧ је у опсегу 10–12 nm. Направљене су две формулације липозома које су напуњење различитим концентрацијама МНЧ. Формулације су означене према концентрацији МНЧ и то: M_0 без МНЧ (контролна формулација), M_1 (0,2 mg/mL) и M_2 (2,0 mg/mL). Формулације су напуњене флуоресцеином (250 mM) и изложене утицају спољашњег магнетног поља (20 mT). Затим је квантификовано испуштање флуоресцеина из липозома, у зависности од времена експозиције (2–20 минута) липозома у магнетном пољу.

Табела 3.1.1 Класификација различитих липозома коришћених у истраживању.

| Ознака | Масени састав ($DPPC:L:CHOL$) | m_{PEG} (mg/mL) | $C_{Fe_3O_4}$ (mg/mL) | $C_{fluorescein}$ (250 mM) | Радиообележавање (^{99m}Tc , ^{131}I и ^{177}Lu) | <i>In vitro</i> | <i>In vivo/</i> <i>ex vivo</i> |
|--------|------------------------------------|----------------------|--------------------------|-------------------------------|---|-----------------|-----------------------------------|
| L_0 | 4 : 0 : 1 | – | – | + | + | + | + |
| L_1 | 4 : 1 : 1 | – | – | – | + | + | – |
| L_2 | 4 : 2 : 1 | – | – | – | + | + | – |
| L_3 | 4 : 3 : 1 | – | – | – | + | + | – |
| L_4 | 4 : 4 : 1 | – | – | + | + | + | + |
| L_5 | 4 : 5 : 1 | – | – | – | + | + | – |
| P_1 | 4 : 4 : 1 | 0,1 | – | – | – | – | – |
| P_2 | 4 : 4 : 1 | 1,0 | – | – | – | – | – |
| P_3 | 4 : 4 : 1 | 2,0 | – | – | – | – | – |
| M_0 | 4 : 4 : 1 | – | – | + | – | – | – |
| M_1 | 4 : 4 : 1 | – | 0,2 | + | – | – | – |
| M_2 | 4 : 4 : 1 | – | 2,0 | + | – | – | – |

- 2) Радиообележавање липозома радионуклидима (^{99m}Tc , ^{131}I и ^{177}Lu) и испитивање радиохемијске чистоће.

Формулација липозома $L_0 - L_5$ су радиообележене радионуклидима ^{99m}Tc , ^{131}I и ^{177}Lu , на начин који ће бити описан у наредном поглављу. Приликом радиообележавања радионуклидима варирано је време инкубације како би се оптимизовао процес везивања радионуклида за липозоме и остварила највећа ефикасност везивања. Инкубација је трајала 15 – 120 минута и вршена је на собној температури без претходног подешавања pH вредности (~5,5) формулације липозома. По завршетку инкубације вршено је испитивање радиохемијске чистоће односно ефикасности везивања радионуклида. За оптимално време инкубације је узето време после кога се постиже максимална ефикасност везивања, без статистички уочљиве промене у везивању са даљим продужавањем трајања инкубације.

- 3) Испитивање *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* својстава липозома радиообележених радионуклидима (^{99m}Tc и ^{177}Lu)

У циљу испитивања почетне хипотезе, на којој је засновано ово истраживање, неопходно је испитати везивање односно специфично накупљање липозома модификованих глукозом у ћелијама канцера.

Липозоми модификовани глукозом као и контролни липозоми обележени одговарајућим радионуклидима су инкубурани у различитим растворима који опонашају *in vivo* услове (физиолошки раствор и хумани серум). У зависности од радионуклида коришћена су различита инкубациона времена: за ^{99m}Tc инкубациона времена су износила 6–24 часа док је за ^{177}Lu то 24–72 часа. Да би одговарајући радиообележени липозоми уопште могли да се испитују на *in vivo* моделима потребно је да степен везивања остане већи од 80 % током инкубације. Везивање липозома модификованих глукозом за ћелије у *in vitro* условима је испитивано помоћу липозома напуњених флуоресцеином, који има улогу трасер молекула и обезбеђује лакшу квантификацију. Испитивање је вршено на здравим ћелијама, као контролним, и на ћелијама канцера. Такође, степен везивања липозома за ћелије је испитиван и у присуству слободне глукозе (1 mg/mL), која има улогу инхибитора *GLUT* рецептора. Упоредно су вршене аналогна испитивања са контролном формулацијом липозома.

На експерименталним животињама (*NOD-SCID* мишеви) су вршена *in vivo* испитивања тако што су експерименталним животињама индуковани тумори и којим је затим администриран раствор ^{177}Lu -обележених липозома одговарајуће формулације. Биодистрибуција липозома по органима је детектована и квантификована помоћу сцинтиграфије и упоређена између контролне и липозомске формулације модификоване глукозом. Радионуклид ^{99m}Tc није коришћен у *in vivo* испитивањима због кратког времена полураспада, што ограничава временски оквир у току кога је могуће вршити детекцију односно *in vivo* мерења.

У циљу добијања поузданих података о биодистрибуцији липозома у експерименталним животињама извршена је и *ex vivo* студија. Сходно томе мишеви којима су

инјектовани ^{177}Lu -обележени липозоми су еутаназирани и измерена је активност ^{177}Lu у органима помоћу гама бројача.

У наредном поглављу је дат кратак преглед свих експерименталних метода и техника коришћених приликом истраживања. Такође, дат је увид у сам начин поставке појединачних експеримената и извођења одговарајућих мерења.

3.2. Експерименталне методе и материјали

За потребе истраживања у оквиру ове докторске дисертације коришћени су различите експерименталне методе, експерименталне животиње, различите ћелијске линије и потрошни материјал. У наставку ће бити дат кратак преглед и опис свих метода које су коришћене у оквиру одговарајућих целина.

3.2.1. Хемикалије и реагенси

Фосфолипид *DPPC* и *CHOL* су набављени од *Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, САД)* као и поликарбонатне мембране од 100 nm и 200 nm. Дестилована и дејонизована вода (18 M Ω) која је коришћена у експериментима је пречишћена помоћу *Milli-Q system (Millipore Co., Billerica, MA, САД)*. Остале потрошне хемикалије које укључују гвожђе(III)хлорид–хексахидрат ($\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$), гвожђе(II)сулфат–хептахидрат ($\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), раствараче попут амонијака, метанола (*MeOH*), етанола (*EtOH*), хлороформа (*TCM*), ацетона (*AcOEt*), сирћетне киселине (*AcOH*), ацетатног пуфера (*NaOAc*) али и друге коришћене хемикалије су купљене од *Sigma-Aldrich Co (Missouri, САД)* и коришћене су без накнадног пречишћавања. Супстанца *L*, коришћена за модификацију липозома глукозом, је синтетисана на Департману за органску хемију, Природно–математичког факултета, Универзитета у Загребу, Загреб, Хрватска, према процедури описаној у литератури [89].

Раствор $^{177}\text{LuCl}_3$ (специфичне активности $> 500 \text{ GBq/mL}$) је купљен од *ITG Isotope Technologies Garching GmbH (Munich, Немачка)*. Раствор $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (специфичне активности $> 500 \text{ GBq/mL}$) је добијен из $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ генератора произведеног у Лабораторији за радиоизотопе, Института за нуклеарне науке–Винча, Универзитета у Београду, Београд, Србија.

Ћелијска линија фибробласта миша *T3T*, ћелијска линија карцинома дебелог црева миша *CT26 (CRL 2638)*, и ћелијска линија аденокарцинома човека *LS174T (ATCC® CL188™)* су купљене од *American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, САД)*.

3.2.2. Синтеза липозома и МНЧ

Липозоми су синтетисани методом хидратације танког слоја при чему су коришћени различити масени односи почетних супстанци (*DPPC, L, CHOL*). Процес синтезе се састоји од

неколико корака који укључују: растварања почетне смеше липида у 2 mL раствора *TSM/MeOH* (4:1, запремински однос); липидни раствор се затим преноси у балон од тамног стакла; коришћењем ротационог упаривача из балона се упаравају растварачи при чему се формира танак липидни слој; липидни слој се хидратише са $4 \times 0,5$ mL дејонизоване воде, тако да се после сваког инјектовања воде балон вортексира (1–2 минута); добијена суспензија липозома се затим прикупља у епрувету запремине 2 mL; епрувета се затим оставља на 20 минута у ултразвучном купатилу; по завшетку соникације узорак се екструдује 21 пут кроз екструдер—*Avanti Mini-Extruder* при чему се користе мембране са одговарајућим величинама пора (100 nm или 200 nm); екструдовани узорак се оставља на дијализи у трајању од 72 часа при чему се вода мења на сваких 12 часова.

Приликом добијања односно синтезе пегилираних липозома користи се идентична процедура синтезе док се само пегилирање липозома врши додавањем одговарајуће количине *PEG*-а (0,1–2 mg), у облику концентрованог воденог раствора (50 μ L), у почетну липидну смешу.

Липозоми су пуњени МНЧ и/или флуоресцеином у зависности од потреба експеримената. Пуњење липозома флуоресцеином је вршено током корака хидратације, када је уместо дејонизоване воде, коришћен раствор флуоресцеина (250 mM), у складу са процедуром из литературе [190]. Пуњење липозома са МНЧ је вршено тако што су различите концентрације раствора МНЧ у *TSM*-у додате у почетни липидни раствор, дакле пре корака упаравања и добијања липидног слоја.

МНЧ су синтетисане методом копреципитације на начин описан у литератури [129]. Украто, 0,54 g $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ и 0,28 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ се раствора у одвојеним посудама у 10 mL воде; раствори се мешају и загревају на 30 °C до потпуног растварања кристала; оба раствора се истовремено додају у 20 mL раствора амонијум–хидроксида (0,1 M); смеша се загрева на 50 °C и меша у трајању од сат времена; добијене Fe_3O_4 наночестице се испирају са етанолом (5×5 mL) а затим дијализују преко ноћи. Добијене МНЧ се складиште у *TSM*-у.

3.2.3. Ћелијске линије

Ћелије различитих ћелијских линија *T3T*, *CT26* и *LS174T* су узгајане и размножаване за потребе експеримената. Узгајање ћелија је вршено у ћелијском медијуму *RPMI-1640* до постизања одговарајућег броја ћелија. Пре коришћена ћелија у *in vitro/in vivo* испитивањима ћелије су испиране са *PBS*-ом (енг. *phosphate buffered saline*), како би се уклонио вишак медијума *RPMI-1640*, односно вишак слободне глукозе присутне у *RPMI-1640*.

3.2.3.1 Туморски ксенографи

Мишеви *NOD-SCID* (старости 8–10 недеља, масе 18–24 g, оба пола) узгајани у посебним лабораторијским условима виваријума Лабораторије за радиоизотопе, Института за нуклеарне науке–Винча, Универзитета у Београду, Београд, Србија, су коришћени у експериментима. *NOD-SCID* мишеви су држани у контролисаним условима у *P/N*

вентирираном *IVC* систему кавеза (*Allentown*, САД) са слободним приступом води и храни (*ad libitum*). Кавези са мишевима су смештени у просторију са строго контролираним атмосферским условима, при константној температури (25 ± 2 °C) и релативној влажности ваздуха (45–50 %) уз 12/12–часовни циклус светло/мрак. Мишеви су храњени куповном пелетираном храном и водом закисељеном са HCl (pH \approx 2,8). Храна, вода и подлога за мишеве су стерилисане пре употребе док су кавези чишћени два пута недељно.

Етички одбор Института за нуклеарне науке-Винча је одобрио експеримента на мишевима (у складу са националним законом о добробити животиња и ЕУ Директивом 2010/63/EU) према дозволи од Управе за ветерину, Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије (број: 323–07–10292/2019–05).

Ксенографт колоректалног канцера је индукован субкутаном инјекцијом 1×10^6 ћелија мишије линије канцера *CT26*, суспендованих у 100 μ L ћелијског медијума *RPMI–1640*, у обријани бок *NOD–SCID* мишева оба пола.

Ксенографт аденокарцинома је индукован субкутаном инјекцијом 1×10^6 ћелија хумане линије канцера *LS174T*, суспендованих у 100 μ L ћелијског медијума *RPMI–1640*, у обријани бок *NOD–SCID* мишева оба пола.

Димензије индукованих тумора су мерене сваки други дан помоћу нонијуса и њихова запремина је процењена према формули $V = (\text{дужина} \times \text{ширина} \times \text{висина})/2$. По достизању жељене запремине тумора од $125 \pm 75 \text{ mm}^3$ *NOD–SCID* мишеви су коришћени у експериментима.

3.2.4. Методе карактеризације липозома

Пошто физичкохемијске особине липозома директно утичу на њихово понашање у биолошким системима изузетно је важно извршити физичкохемијску карактеризацију липозома. Правилна и поуздана карактеризација липозома нано димензија је од великог значаја приликом утврђивања њихових особина и успешности функционализације пре даље примене на *in vitro/in vivo* моделима. У наставку ће укратко бити описане методе коришћене за карактеризацију испитиваних липозома.

3.2.4.1 Динамичко расејавање светлости

За стабилност и *in vitro/in vivo* понашање липозома веома су важни физичкохемијски параметри попут величине и ζ [16,191]. Ако су липозоми довољно велики онда се њихова величина може директно одредити посредством оптичке микроскопије, међутим за липозоме нанодимензија потребно је користити нешто напредније технике.

DLS (енг. *dynamic light scattering*) техника се обично користи за добијање хидродинамичког пречника (R_{HYD}) различитих наночестица па тако и липозома [192]. *ELS* (енг. *electrophoretic light scattering*) техника се скоро искључиво користи за одређивање ζ липозома али и других наночестица [193]. Код *DLS* технике се мери интензитет флукуација расејане

светлости на честицама које се хаотично и насумично крећу у раствору, услед природног Брауновског, дифузионог кретања. Из ових мерења се погодним математичким апаратом односно софтвером може добити податак о дифузионом коефицијенту честица у раствору односно, последично се добија њихов R_{HYD} . Код *ELS* технике се врши мерење интензитета флукуација расејане светлости на честицама које се крећу у примењеном електричном пољу. Из ових мерења се погодним софтвером добијају вредности електрофоретске покретљивости (мобилности) из којих се даље добија ζ честица односно липозома у раствору.

У пракси се *DLS* и *ELS* мерења обично врше на истом уређају па се не прави експлицитна разлика између техника и обично се говори само о *DLS* техници [84,192,193]. У зависности да ли се мери R_{HYD} или ζ честице обично се користе различите ћелије за смештање и мерење узорка а ређе се оба мерења врше у истој ћелији. Из ових мерења се стандардно добија и резултат расподеле честица по величини односно њихова униформност исказана преко индекса полидисперзности—*PDI* (енг. *polydispersity index*). Што је *PDI* вредност већа то је хомогеност и униформност честица мања. Колоидни раствори наночестица се сматрају монодисперзним ако је $PDI < 0,1$, униформним за $0,1 < PDI < 0,7$ и неуниформним ако је $PDI > 0,7$ [192]. У пракси се сматра да је пре примене било ког наночестичног односно колоидног раствора на *in vivo* моделима потребно остварити високу униформност расподеле честица ($PDI < 0,2$) а у идеалном случају монодисперзност ($PDI \sim 0,1$).

За потребе мерења у оквиру представљеног истраживања коришћен је уређај *Nano ZS90* (*Malvern, UK*) са 4 mW He–Ne ласером ($\lambda = 633 \text{ nm}$) помоћу кога је могуће мерити више физичкохемијских величина попут ζ , R_{HYD} честица као и вредност *PDI*.

3.2.4.2 Трансмисиона електронска микроскопија

Величина R_{HYD} заправо укључује и хидратациони слој око честице. Хидратациони слој углавном настаје као последица постојања наелектрисања честице, односно ζ , и последичне електростатичке интеракције између честице са једне стране и молекула растварача и јона у раствору са друге стране. Сликвито речено, можемо рећи да ако је честица наелектрисана она електростатички интерагује са другим молекулима или јонима из раствора, што утиче на њено Брауновско кретање а то последично утиче на резултате мерења добијене *DLS* техником. У идеалном случају честица без наелектрисања би требала да има исти R_{HYD} и физички пречник.

Најлакши начин да се одреди стварни, физички пречник липозома нанодимензија као и њихов облик је коришћењем ТЕМ (трансмисиона електронска микроскопија) технике [194,195]. Технике електронске микроскопије подразумевају коришћење интензивног снопа електрона високе енергије који бомбардује мету односно узорак у циљу добијања слике. Код ТЕМ технике снап електрона се усмерава кроз танак слој мете односно на честице јако малих димензија. У зависности од локалне густине материјала електрони ће се различито трансмитовати односно различито ће интераговати са материјалом што омогућава морфолошку карактеризацију, одређивање облика и димензија посматраних честица. Принцип снимања је аналоган оптичкој микроскопији али се код ТЕМ мерења користе високоенергетски електрони, који имају знатно мању Де Брољеву таласну дужину од видљиве светлости, и сходно томе се расејавају на знатно мањим честицама, односно добијене слике

имају већу резолуцију. Електронски микроскопи стандардно имају и 1000 пута бољу резолуцију од оптичких микроскопа и омогућавају посматрање честица нано димензија.

За испарљиве узорке попут оних који садрже воду развијене су посебне методе снимања, пошто се код електронске микроскопије користи високи вакуум. ТЕМ техника омогућава директно посматрање и одређивање величине липозома али такође даје и увид у структуру липозома [47,59,196]. На ТЕМ сликама се лако може уочити липидни омотач и језгро липозома као и присуство других наночестица, услед различите густине и последично различитог проласка електрона кроз делове узорка.

ТЕМ слике липозома су добијене коришћењем ТЕМ уређаја *Philips CM12/FEI*, (Холандија), при енергији електрона од 80 kV, и коришћењем камере *SIS MegaView III camera* (*Olympus Soft Imaging Solutions, Münster*, Немачка). Снимање липозома је вршено тако што је на угљеничне мрежице (*Agar Scientific Ltd.*, УК) нанета кап суспензије липозома (~0,1 mL) на 2 минута. Вишак течности је затим уклоњен са мрежица помоћу филтер папира а мрежице остављене да се осуше на ваздуху пре ТЕМ снимања. Добијене ТЕМ слике липозома су анализиране коришћењем *iTEM* софтвера (*Olympus Soft Imaging Solutions*).

3.2.4.3 ИСП–ОЕ спектроскопија

Индуктивно спрегнута плазма–оптичка емисиона спектроскопија (ИСП–ОЕС) представља стандардну аналитичку технику за одређивање елементног састава узорака [197,198]. Принцип рада ове технике се заснива на коришћењу локализоване плазме за постизање ефикасне атомизације и јонизације било ког узорка, приликом чега долази до емисије карактеристичног зрачења које је специфично за сваки елемент. ИСП–ОЕС техником се може извршити квалификација и квантификација елемената присутних у узорку. Пре уношења у плазму узорак је потребно превести у погодан раствор који се затим убризгава у плазмени извор. Прављењем стандардних узорака односно стандарда познате концентрације а затим снимањем њихових спектра могуће је конструисати аналитичку криву. Коришћењем аналитичке криве могуће је одредити непознату концентрацију одређеног елемента у узорку.

Одређивање липидне масе односно липидне концентрације липозома као и концентрације МНЧ у липозомима је вршено помоћу уређаја *ICP-OES (iCAP 7400 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, САД)*.

3.2.4.4 Инфрацрвена спектроскопија

Да би се прецизно утврдило присуство одређених хемијских група на површини липидног двослоја функционализованог липозома потребно је користити неку од техника спектроскопије. У пракси се за овај вид карактеризације најчешће користи спектроскопија инфрацрвене (ИЦ) области спектра [199]. Сви молекули али и функционалне групе имају специфичан апсорпциони односно трансмисиони спектар у инфрацрвеној области спектра ($400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$). До померања молекулских вибрационих трака односно карактеристичних пикова може доћи услед интеракције са другим присутним функционалним групама, али у

општем случају основни облик траке остаје препознатљив и омогућава идентификацију појединачних функционалних група.

Фуријеова трансформациона инфрацрвена (ФТИЦ) спектроскопија је техника снимања која подразумева добијање апсорпционог спектра узорка у инфрацрвеној области [199]. Иако се у пракси ФТИЦ спектроскопија може користити на узорцима било ког агрегатног стања (течно, гасовито или чврсто) за потребе снимања липозома се обично прво врши лиофилизација или сушење суспензије липозома. На овај начин се са једне стране отклања вишак воде чији ИЦ спектар може преклопити траке хемијских група функционализованог липозома а са друге стране се врши концентровање липозома што доводи до боље аквизиције спектра [199]. Могуће је користити и помоћну *ATR* (енг. *attenuated total reflectance*) технику у спрези са ФТИЦ спектроскопијом која омогућава директно мерење водених узорака попут суспензије липозома без претходне припреме узорка.

ФТИЦ апсорпциони спектри липозомских суспензија су добијени коришћењем *Nicolet iS50 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, САД)*. Узорци су припремљени за снимање тако што су узети аликвоти липозомских суспензија од 1 mL, осушени а затим на собној температури снимљени у облику праха, у ИЦ области $500 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ при брзини од 2 mm/s и резолуцији од 5 cm^{-1} .

3.2.4.5 Отварање липозома помоћу магнетног поља

Магнетно поље има велику продорност унутар водених раствора па самим тим и биолошких узорака, што се може искористити за неинвазивне и магнетно индуковане промене одређених узорака [131,132]. Одређени материјали показују магнетна својства односно способност правилне оријентације дуж магнетних линија сила. Коришћењем наизменичног магнетног поља могуће је изазвати загревање магнетних честица услед појаве неколико физичких ефеката попут Нилове и Брауновске релаксације као и механизма губљења магнетног хистерезиса [125–127,129]. Комбинујући магнетне материјале односно честице са другим немагнетним материјалима могуће је искористити ефекте загревања у медицинске сврхе. Варирањем експерименталних параметара попут индукције и фреквенције магнетног поља, времена излагања, концентрације и магнетних особина честица могуће је остварити макроскопско или локално магнетно грејање узорка у магнетном пољу. Ако се постиже макроскопско грејање то значи да се цео узорак мерљиво загрева док код локалног грејања нема видљиве промене температуре. Први случај се често користи за постизање хипертермијског ефекта у истраживањима која се баве терапијом канцера [124,129]. Локално магнетно загревање је занимљиво пошто код њега долази до загревања саме магнетне честице и њене посредне околине, са којом долази до размене топлоте [125,126,128]. Ово локално загревање може бити јако интензивно, иако је просторно ограничено, и може се користити као прекидач за контролисано отварање одређених наноструктура, попут липозома.

Липозоми напуњени са МНЧ и флуоресцеином су излагани спољашњем магнетном пољу за различите временске интервале (2–20 минута). Утицај магнетног поља на отварање липозома напуњених са МНЧ је праћен квантификацијом ослобођеног флуоресцеина помоћу спектрофлуориметра и о овим мерењима ће бити више речи у наставку. После излагања липозома магнетном пољу примењено је магнетно декантовање суспензија липозома, у

трајању од 10 минута. Магнетно декантовање служи да раздвоји магнетне компоненте (липозоми напуњени са МНЧ) од остатка раствора приликом чега долази до таложења магнетног материјала на дну посуде. У пракси, магнетно декантовање се врши тако што се посуде односно епрувете са раствором поставе на посебан сталак чије дно је намагнетисано. По завршетку магнетне декантације из узорака је уклоњен супернатант, како би се одстранио ослобођени флуоресцеин, а преципитат је испран водом ($3 \times 1 \text{ mL}$). Флуоресценција липозома је затим измерена и представљено је отварање липозома у зависности од времена излагања у магнетном пољу.

Липозоми су излагани хомогеном наизменичном магнетном пољу фреквенције 808 kHz и магнетне индукције 20 mT коришћењем уређаја *nV nanoscale Biomagnetic DM100* (Zaragoza, Шпанија).

3.2.5 Радиобележавање липозома

Приликом обележавања липозома радионуклидима потребно је развити и применити одговарајуће поступке који омогућавају ефикасно и радиохемијски стабилно везивање. Ефикасно радиобележавање подразумева везивање бар 80 % радионуклида за липозоме, при чему је по потреби могуће применити додатне методе пречишћавања како би се ефикасност везивања повећала на 80 % или идеално на 90–95 %. Ови додатни поступци подразумевају процесе центрифугирања или коришћење хроматографских метода како би се одстранили невезани односно слободни радионуклиди и постигло концентровање радиобележених липозома.

3.2.5.1 Обележавање $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Липозоми су радиобележени радионуклидом $^{99\text{m}}\text{Tc}$ према опробаној и описаној процедури из литературе [200]. Поступак радиобележавања се састоји у мешању 100 μL липозомске суспензије липидне концентрације 2,5 mM при pH = 5,5 са 25 μL свеже припремљеног раствора SnCl_2 концентрације 3 mM, при чему се затим додаје 50 μL раствора NaTcO_4 (~ 9 MBq) у реакциону смешу. Реакциона смеша се затим меша и инкубира на собној температури за различита инкубациона времена (15–120 минута). По завршетку инкубације крајњи раствор се разблажује до 2 mL са ФР. Радиохемијска стабилност се затим испитује помоћу *ITLC* хроматографије.

3.2.5.2 Обележавање ^{131}I

Радиобележавање липозома са ^{131}I је вршено директно и у присуству хлорамина–Т. Директно обележавање липозома је вршено додавањем 1 μL Na^{131}I раствора (~37 MBq) у 100 μL липозомске суспензије, чија је липидна концентрација 2,5 mM при pH = 5,5. Приликом обележавања са хлорамином–Т у реакциону смешу се додаје и 10 μL раствора хлорамина–Т (5

mg/mL) у *PBS*-у. Инкубација реакционих смеша је вршена на собној температури за различита времена (15–120 минута). Крајњи раствор се затим разблажује до 2 mL са ФР и његова радиохемијска стабилност се испитује помоћу *ITLC* хроматографије

3.2.5.3 Обележавање ^{177}Lu

За потребе радиообележавања липозома у оквиру спроведених истраживања развијена је једноставна и директна метода везивања ^{177}Lu за липозоме. Процедура радиообележавања се састоји у додавању 1 μL $^{177}\text{LuCl}_3$ раствора (~37 MBq) у 100 μL липозомске суспензије, чија је липидна концентрација 2,5 mM при pH = 5,5. Реакциона смеша се меша и инкубира на собној температури, у различитом трајању (15–120 минута). По завршетку инкубације крајњи раствор се разблажује до 2 mL са ФР и испитује се радиохемијска стабилност помоћу *ITLC* хроматографије.

3.2.5.4 Радиохемијска чистоћа

Поред ефикасног везивања радионуклида за липозоме потребно је испитати радиохемијску чистоћу и *in vitro* стабилност радиообележених липозома. Радиохемијска чистоћа се дефинише као однос радиоактивности испитиваног радионуклида присутног у жељеном хемијском облику у узорку, и укупне радиоактивности тог радионуклида у узорку. Радиохемијске нечистоће потичу од разлагања услед дејства растварача, промене температуре и pH, светлости, радиолизе и нежељених хемијских реакција.

Испитивање радиохемијске чистоће је вршено помоћу *ITLC* хроматографије као сепарационе технике и гама бројача као детекционе технике (радиохроматографска метода). Детаљи о принципима рада као и поступцима коришћеним приликом истраживања се налазе у наставку, у одговарајућим поглављима.

3.2.5.5 *ITLC* хроматографија

Хроматографске методе се заснивају на различитој расподели компонената узорка између две фазе, од којих је једна мобилна а друга стационарна. Тренутна танкослојна хроматографија односно *ITLC* (енг. *instant thin layer chromatography*) је хроматографска техника која је своје име добила по облику стационарне фазе и релативно брзе сепарације компоненти. Стационарна фаза је заправо танак слој чврстог адсорбенса (силика гел–СГ, Al_2O_3) који је импрегниран на површини неког инертног материјала односно медијума. Адсорбент и медијум заједно чине хроматографску траку која има облик танког листа папира. Као медијум се најчешће користе папир, алуминијум или пластика. Мобилна фаза у *ITLC* хроматографији може бити било који раствор који не разлаже односно не нагриза хроматографску траку. Раздвајање компоненти анализата се врши тако што се мала количина анализата, у течном облику, нанесе на један крај хроматографске траке. Крај на који је нанет

аналит се затим урони у мобилну фазу док је остатак траке ван мобилне фазе [201,202]. Посредством капиларних сила мобилна фаза се пење кроз хроматографску траку при чему на стационарној фази долази до раздвајања компоненти анализата. На основу физичкохемијских својстава анализата односно његових компоненти, које путују са мобилном фазом, доћи ће до раздвајања компоненти на различитим висинама хроматографске траке.

Хроматографско раздвајање различитих компоненти се квантификује помоћу стандардног R_f фактора, који има вредност $R_f = 0$, ако се компонента не помери са тачке на којој је нанет узорак, и вредност $R_f = 1$, ако компонента путује заједно са фронтом мобилне фазе. У практичној примени стационарна фаза је у облику уске траке, на чији један крај се наноси кап узорка а затим се тај крај траке доводи у додир са мобилном фазом. Трака се постави тако да стоји вертикално наспрам зида хроматографске каде.

Радиохемијска чистоћа радиообележених липозома је испитивана применом *ITLC* технике. Као стационарна фаза коришћена је хроматографска папирна трака импрегнирана силика гелом (*ITLC-SG*) дужине 15 cm и ширине 2 cm, и коришћене су различите мобилне фазе (ФР, *AcOEt*, *AcOH*), и *NaOAc*). На 2 cm од доње ивице траке, се наноси 0,01 mL испитиваног узорка и трака се ставља у хроматографске каде засићене мобилном фазом, у којима се налази мобилна фаза висине од 0,5–1 cm. Хроматограм се развија на собној температури. Након развијања, *ITLC-SG* трака се суши на ваздуху и сече на подеоке дужине 1 cm. Расподела радиоактивности дуж траке се одређује мерењем радиоактивности сваког подеока у *NaI (Tl) Wizard 2480 (Perkin Elmer, САД)*. Радиоактивност сваког подеока се рачуна у односу на укупну радиоактивност траке и изражава у процентима. Радиохемијска чистоћа радиообележених липозома је поређена са хроматографским профилем невезаних радионуклида, у облику раствора $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$, Na^{131}I и $^{177}\text{LuCl}_3$.

3.2.5.6 Детекција и квантификација активности

Гама бројачи се обично користе за аутоматизовано мерење радиоактивности неколико десетина или стотина узорака [203]. Узорци се уносе у посебне посуде, обично стаклене бочице, одговарајућих димензија које онда путују на механичкој траци до детектора, где се мери њихова појединачна активност. Сам детектор је обично сцинтилациони детектор који се састоји од сцинтилационог кристала, који омогућава прецизно мерење γ -фотона различитих енергија односно детекцију различитих радионуклида. Гама бројач се често користи у радиофармацеутским истраживањима када је потребно измерити активност великог броја узорака који су обележени одређеним радионуклидом. Ако је активност узорака релативно мала могуће је продужити време мерења што доводи до боље акумулације сигнала.

За мерење активности узорака коришћен је гама бројач *Wizard 2480 (Perkin Elmer, САД)*. Укупан збир активности свих 13 подеока, коригован на позадинско зрачење, чини 100 % активности нанете на СГ траку према којој се врши нормирање односно одређивање R_f вредности појединачних подеока.

3.2.6 *In vitro* испитивања

Радиообележени липозоми су за потребе испитивања *in vitro* стабилности инкубирани са физиолошким раствором (ФР) и хуманим серумом (ХС). У склопу *in vitro* испитивања је вршено и испитивање механизма везивања липозома за различите ћелије.

3.2.6.1 *In vitro* стабилност

У оквиру ових истраживања вршено је испитивање радиохемијске стабилности радиообележених липозома у физиолошком раствору (ФР) и хуманом серуму (ХС) у периоду до 3 дана. Суспензије липозома су инкубирани са одговарајућим раствором у запреминском односу 1 : 1 и у одговарајућим интервалима је испитивана њихова стабилност помоћу *ITLC* радиохроматографије, на начин описан у претходном одељку. Као мобилна фаза коришћен је ацетатни пуфер (0,1 М). Због велике разлике у времену полураспада између радионуклида ^{99m}Tc и ^{177}Lu , липозоми обележени са ^{99m}Tc су испитивани у трајању до 24 сата док је у случају ^{177}Lu испитивање трајало до 72 сата.

3.2.6.2 Механизам везивања липозома за ћелије

Испитивање механизма везивања липозома за ћелије је вршено инкубацијом липозома са различитим ћелијским линијама (*T3T*, *CT26* и *LS174T*). Липозоми напуњени флуоресцеином (250 mM), разблажени до 1 mg/mL и запремине 100 μL су додавани у 5×10^4 ћелија у раствору *PBS*-а. Инкубација липозома са ћелијама је трајала 10 минута или 1 сат, у одсуству или присуству слободне глукозе, концентрације 1 mg/mL. По завршетку инкубације, уклоњен је *PBS* са ћелија, извршено кратко испирање са свежим *PBS*-ом а ћелије су затим снимљене под флуоресцентним микроскопом. Ћелије су затим лизирани са 0,5 % раствором натријум додецил сулфата (*SDS*) у *PBS*-у, и њихова релативна флуоресценција је измерена помоћу спектрофлуориметра. На овај начин је испитивано везивање липозома за глукозне (*GLUT*) рецепторе као и њихова конкуренција са слободном глукозом. Више детаља о флуоресцентној микроскопији и спектрофлуориметрији се налази у наставку у одговарајућим поглављима.

3.2.6.3 Флуоресцентна микроскопија

Флуоресцентна микроскопија је посебна врста оптичке микроскопије која се заснива на снимању односно посматрању емитоване флуоресцентне светлости унутар неког узорка [204]. Да би неки узорак уопште емитовао флуоресцентну светлост потребно је обезбедити присуство флуорофора, односно посебних функционалних група које имају способност флуоресценције. Када се флуорофоре обасјају светлошћу одређене таласне дужине долази до њихове ексцитације а затим и деексцитације приликом чега се емитује специфична флуоресцентна светлост која има већу таласну дужину од светлости која је изазвала

флуоресценцију. Да би се обезбедило присуство флуорофора у узорку обично се користе одређене супстанце, попут флуоресцеина, које имају улога флуоресцентног обележивача.

У пракси, узорак који се испитије се озрачи интензивним снопом ексцитационе светлости а затим се само деексцитациона односно флуоресцентна светлост детектује. Пошто флуоресцентна светлост има тачно одређену таласну дужину технички ју је лако раздвојити и квантификовати коришћењем филтера који уклањају ексцитациону и позадинску светлост.

За потребе снимања флуоресцентних липозома коришћен је микроскоп *Zeiss Axiovert microscope* опремљен са *AxioCam*.

3.2.6.4 Спектрофлуориметрија

Спектрофлуориметрија се користи за квантификацију флуоресценције односно за квантификацију флуорофора присутних у узорку. Узорак се уноси у спектрофлуориметар и затим се обасјава интензивним ексцитационим снопом, који доводи до ексцитације свих присутних флуорофора у узорку, што последично доводи до константне и максималне емисије флуоресцентне светлости тачно одређене таласне дужине у току трајања мерења [84,205,206]. Квантификацију флуоресценције је могуће вршити за тачно одређену таласну дужину светлости или за читав низ односно спектар таласних дужина.

Квантификација флуоресцеина у узорцима липозома и ћелија вршена је помоћу уређаја *Molecular devices Gemini plate reader*. Липозоми односно ћелије, у зависности од мерења, су лизирани са 0,5 % *SDS*-а у *PBS*-у пре сваког мерења спектрофлуориметром. Ексцитациони снап светлости је подешен на $\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$ а детекција емитоване флуоресцентне светлости је вршена на $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, при чему је филтер подешен на 515 nm. Интензитет емитоване флуоресцентне светлости је затим квантификован као релативни интензитет флуоресценције. Нелизирани липозоми односно слободан флуоресцеин исте концентрације су коришћени као контролни узорци чија је флуоресценција узета као максимална (100 %).

3.2.7 Испитивања биолошке расподеле

Биолошка расподела (биодистрибуција) односно *in vivo* стабилност и *ex vivo* ретенција липозома је испитивана на тумор индукованим *NOD-SCID* мишевима. Испитивање биолошке расподеле липозома је вршено радиотрасерском методом. Различите липозомске формулације обележене са ^{177}Lu су инјектоване интравенски у репну вену групи мишева, у облику суспензије (100 μL , 9–11 mg/kg).

Ex vivo биодистрибуција радиообележених липозома је квантификована у органима жртвованих *NOD-SCID* мишева (5 по групи) коришћењем аутоматског гама бројача *Wizard 2480 (Perkin Elmer, САД)*. Пре администрације радиообележених липозома мишеви су подвргнути посту (6h, уз приступ води). Мишеви су анестезирани интраперитонеалном инјекцијом смеше ксилазина (10 mg/kg) и кетамина (90 mg/kg) у тачно одређеним интервалима (0,5h; 2h; 6h; 24h и 72 h) након администрације радиообележених липозома (0,185 MBq) а

затим су жртвовани цервикалном дислокацијом. Прикупљени су узорци крви (помоћу градуисаних капилара), органи (мозак, срце, плућа, јетра, слезина, бубрези, желудац, мишић и црева) и тумори (*CT26* и *LS174T*). Органи и тумори су опрани у ФР, накратко осушени на филтер папиру а затим је измерена њихова маса. Радиоактивност у крви, органима и туморима је измерена и нормирана у односу на стандард коришћене липозомске формулације (100 μL , 0,185 MBq) који је инјектован мишевима. Расподела радиоактивности односно *ex vivo* биодистрибуција је изражена као % инјектоване дозе (ИД) по маси односно као %ИД/g.

In vivo биодистрибуција радиообележених липозома је детектована преко радиоактивности односно сцинтиграфски на мултимодалном уређају *BRUKER® In-Vivo Xtreme II instrument* (Billerica, MA, САД). Уређај има могућност снимања у различитим режимима: рендген, сцинтиграфија, флуоресценција и рефлектанса. Преклапањем снимака добијених различитим модовима снимања омогућано је лакше и боље тумачење резултата. У наставку ће бити дат кратак преглед рендгенске и сцинтиграфске методе снимања. За испитивање биодистрибуције коришћен је по један тумор (*LS174T*) индукован *NOD-SCID* мише за сваки временски интервал. Мишеви су анестезирани интраперитонеалном инјекцијом смеше ксилазина (10 mg/kg) и кетамина (90 mg/kg) у тачно одређеним интервалима (2h; 6h; 24h и 72 h) након администрације радиообележених липозома (0,55 MBq).

3.2.7.1 Рендгенографија

Рендгенско снимање односно радиографско снимање подразумева коришћење X-зрачења које се усмерава на мету у циљу добијања информација о унутрашњој структури објекта. На мету се усмерава X-зрачење које приликом проласка кроз мету бива другачије апсорбовано односно пропуштено или расејано, у зависности од густине и природе материјала. Они X-зраци који прођу кроз мету бивају детектовани помоћу фотографске емулзије или чешће, помоћу дигиталног детектора. Коришћењем рендгенског снимања на људима али и животињама могуће је добити информације о распореду унутрашњих органа и скелета.

3.2.7.2 Сцинтиграфија

Процес сцинтиграфије заснива се на детекцији емисије γ -фотона одговарајућих радионуклида. Детекција се врши посредством сцинтилационх детектора који γ -фотоне преводе у светлосне фотоне које је затим лакше детектовати посредством фотоэффекта и фотомултипликатора. Током сцинтиграфије важно је обезбедити оптималне услове снимања и извршити преклапање различитих снимака у циљу добијања јаснијих информација о биодистрибуцији радионуклида. У току испитивања *in vivo* биодистрибуције није било могуће квантификовати тачан износ активности по органима, већ су визуелно одређене области високе активности односно органи у којима је дошло до концентровања радионуклида.

3.2.8 Статистичка анализа

Сви резултати су представљени као средња вредност више мерења (n) \pm стандардна девијација (СД). У зависности од примењене методе и технике, број поновљених мерења је различит. Код *DLS* технике сва мерења су вршена за $n = 10$, код мерења помоћу *ITLC* радиохроматографије мерења су вршена за $n = 3$, спектрофлуориметарска мерења су вршена за $n = 3$ а код *ex vivo* мерења резултати су представљени као средња вредност за $n = 5$. Квантификација пречника липозома вршена помоћу ТЕМ снимања је дата као средња вредност за $n = 10$ различитих липозома. Сва остала мерења за која није експлицитно наведено су вршена у трипликату односно за $n = 3$. Поређење *in vitro*, *ex vivo* и других резултата између две групе је вршено једностраном анализом варијансе односно једностраном *ANOVA* (енг. *analysis of variance*). За статистички прихватљиву разлику између група мерења је узета вредност $p < 0,05$ која одговара интервалу поузданости од 95 %.

IV РЕЗУЛТАТИ

4.1. Синтеза и карактеризација липозома

Липозоми су синтетисани методом хидратације танког слоја и у наставку овог поглавља биће приказани експериментални резултати добијени у оквиру прве целине истраживања која се односи на синтезу и карактеризацију липозома.

4.1.1. Резултати DLS мерења

У табели 4.1.1 су приказани резултати добијени мерењем динамичког расејања светлости за различите формулације липозома модификованих глукозом, контролну формулацију липозома, пегилиране липозоме модификоване глукозом као и оне напуњене са МНЧ. Формулација L_4 је узета као оптимална због добре униформности честица и најбоље радиохемијске чистоће односно најефикаснијег везивања радионуклида (резултати приказани у наставку у одговарајућим поглављима).

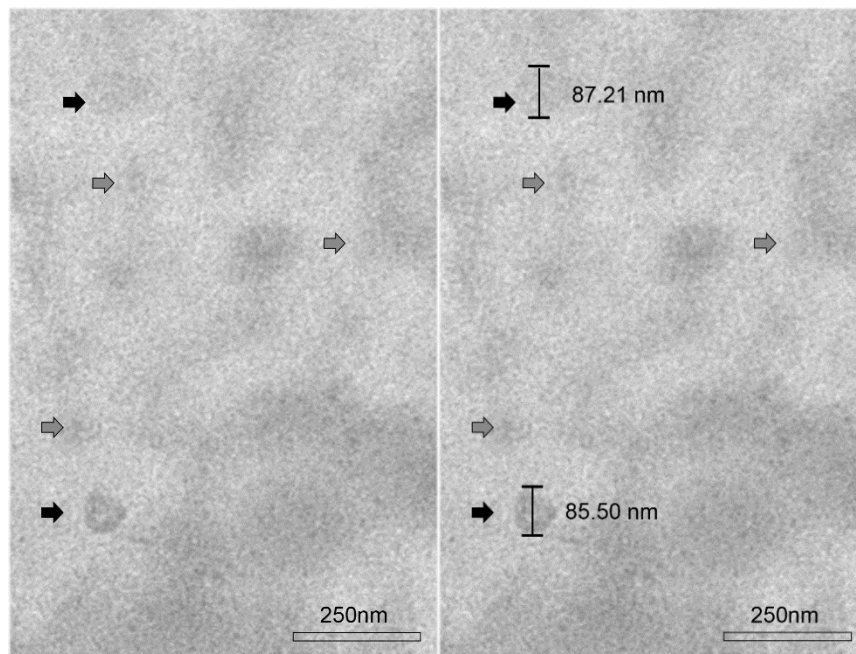
Табела 4.1.1 DLS карактеризација липозома.

| Ознака | Мембрана | R_{HYD} * (nm) | ζ ** (mV) | PDI *** |
|----------------|----------|---------------------|--------------------|-----------|
| L ₀ | 100 nm | 84,9 ± 3,6 | - 19,4 ± 1,8 | 0,117 |
| L ₁ | 100 nm | 86,2 ± 4,1 | - 20,5 ± 1,7 | 0,202 |
| L ₂ | 100 nm | 89,3 ± 5,0 | - 23,7 ± 1,4 | 0,215 |
| L ₃ | 100 nm | 92,4 ± 4,2 | - 25,9 ± 2,2 | 0,188 |
| L ₄ | 100 nm | 97,3 ± 4,1 | - 28,3 ± 1,9 | 0,136 |
| L ₅ | 100 nm | 115,1 ± 8,6 | - 31,1 ± 2,5 | 0,357 |
| P ₁ | 200 nm | 185,6 ± 2,3 | +7,7 ± 3,7 | 0,321 |
| P ₂ | 200 nm | 219,7 ± 1,9 | + 8,8 ± 3,2 | 0,495 |
| P ₃ | 200 nm | 284,4 ± 3,4 | + 9,4 ± 3,9 | 0,693 |
| M ₀ | 200 nm | 151,4 ± 9,7 | - 26,7 ± 2,2 | 0,193 |
| M ₁ | 200 nm | 148,9 ± 11,3 | - 24,5 ± 2,4 | 0,213 |
| M ₂ | 200 nm | 153,2 ± 14,4 | - 25,0 ± 2,9 | 0,224 |

*Хидродинамички пречник, **Зета потенцијал, *** Индекс полидисперзности.

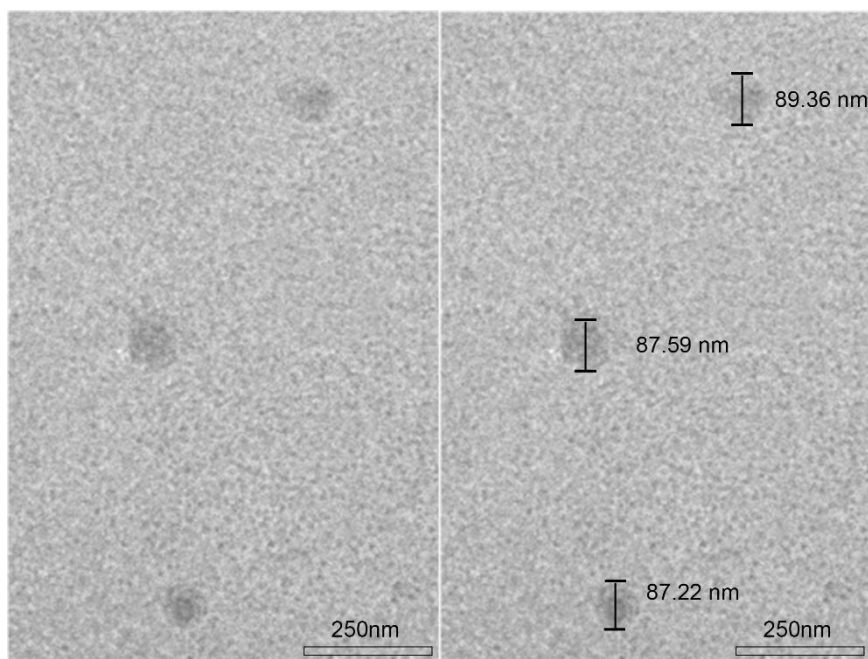
4.1.2. Резултати ТЕМ мерења

На ТЕМ микрографима односно сликама 4.1.1–4.1.5 приказани су липозоми различитих формулација.



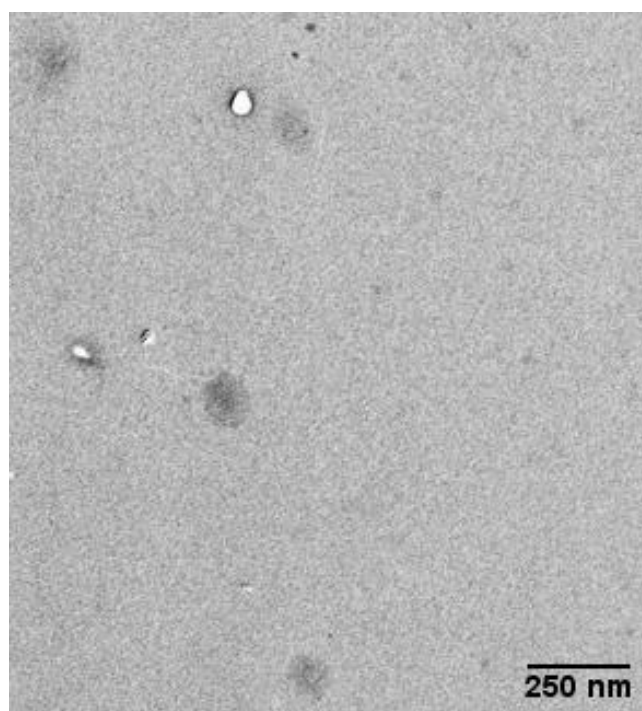
Слика 4.1.1 ТЕМ микрограф формулације L_0 (лево) појединачни липозоми обележени црном стрелицом и кластери обележени сивом стрелицом (десно) пречник појединачних липозома.

На слици 4.1.1 приказана је контролна формулација L_0 липозома који су сферични, једноламеларни, просечног пречника 80 – 90 nm. Видљиви су појединачни липозоми али и слепљени односно кластери липозома.



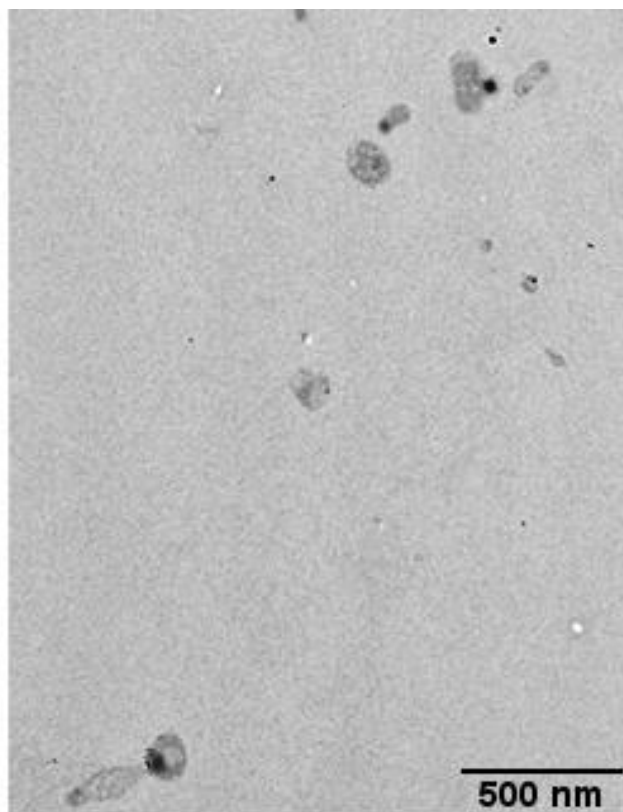
Слика 4.1.2 ТЕМ микрограф формулације L_4 (лево) појединачни липозоми (десно) пречник појединачних липозома.

На слици 4.1.2 приказана је формулација L_4 липозома који су сферични, једноламеларни, просечног пречника 80 – 90 nm. Појединачни липозоми су јасно видљиви без присуства кластера.



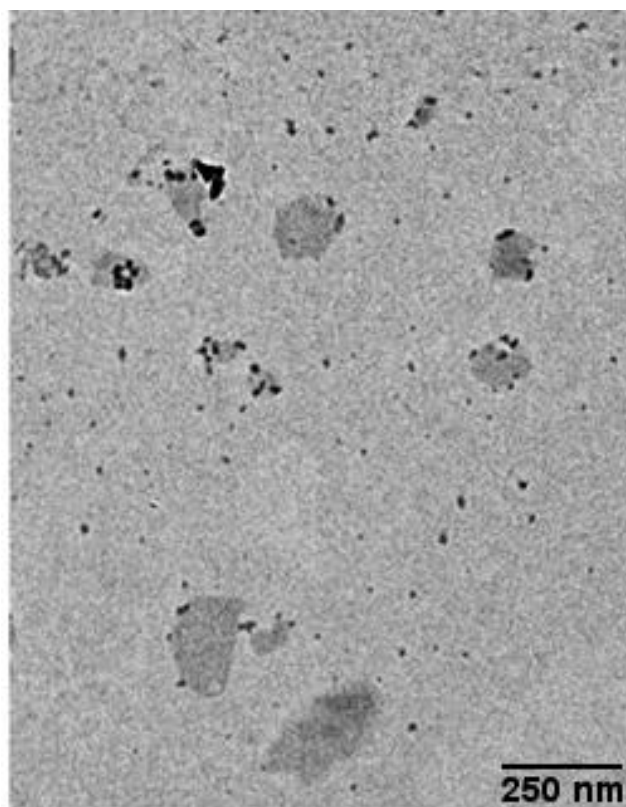
Слика 4.1.3 ТЕМ микрограф формулације M_0 .

На TEM микрографу формулације M_0 , који је приказан на слици 4.1.3, видљиви су липозоми формулације M_0 који су сферични, једноламеларни, и димензија 125 – 135 nm.



Слика 4.1.4 TEM микрограф формулације M_1 .

На слици 4.1.4 приказани су липозоми формулације M_1 који су већином сферични уз присуство издужених липозома, једноламеларни, са видљивим МНЧ унутар липидног двослоја и просечних димензија 135 – 145 nm.



Слика 4.1.5 ТЕМ микрограф формулације M_2 .

Са ТЕМ микрографа формулације M_2 приказаног на слици 4.1.5 могу се јасно уочити једноламеларни липозоми, са високом концентрацијом МНЧ унутар липидног двослоја али и ван самих липозома. Општи облик је сферичан уз присуство издужених и деформисаних липозома. Сферични липозоми су димензија 130 – 145 nm док деформисани липозоми имају веће димензије дуж једне осе (200 – 250 nm).

4.1.3. Резултати ИСП–ОЕС мерења

У табели 4.1.2 су приказани резултати добијени ИСП–ОЕС мерењима за различите липозомске формулације. Може се уочити да липозоми екструдовани кроз мембране са већим порамима имају већу липидну концентрацију што је и очекивано.

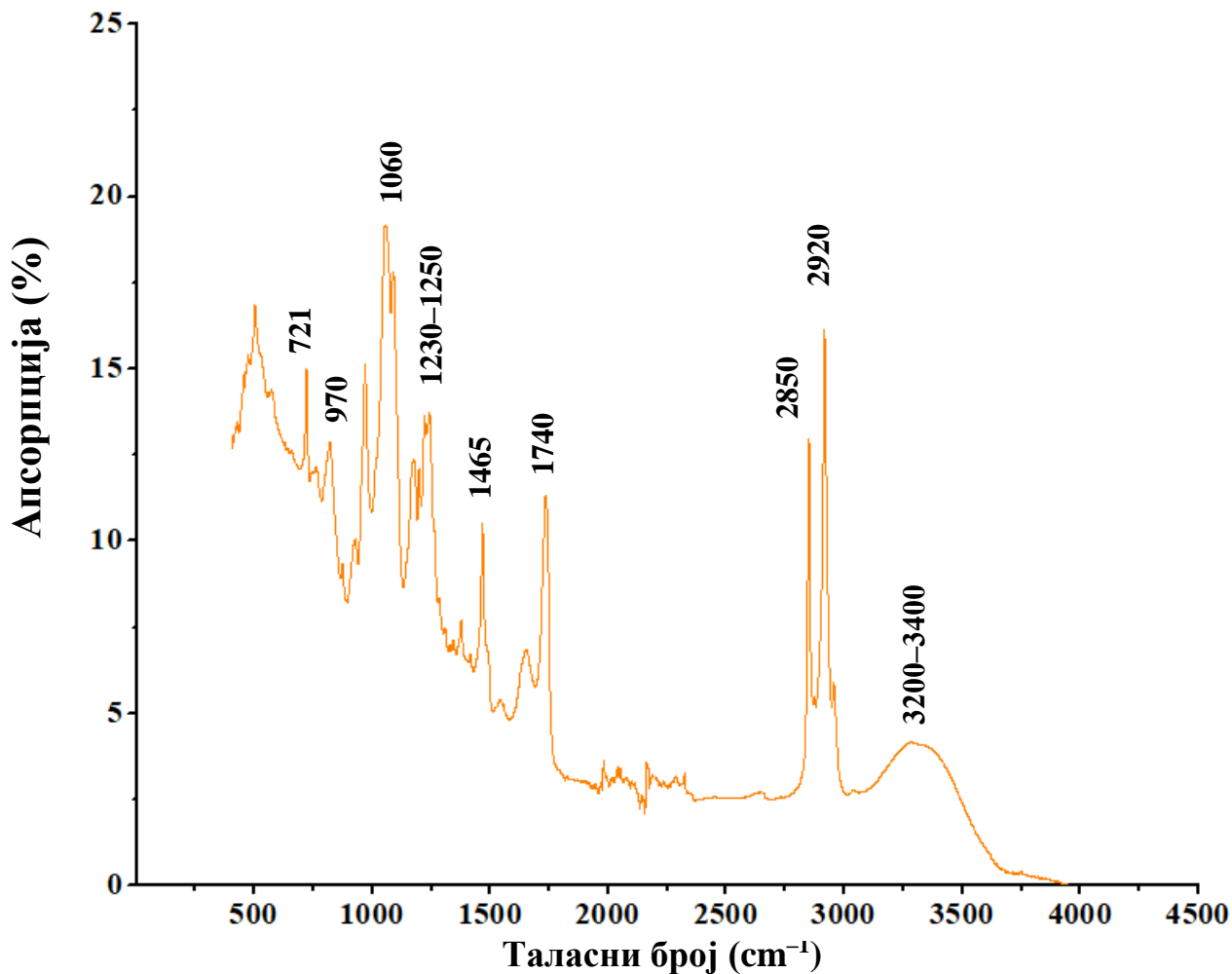
Табела 4.1.2 Липидна и МНЧ концентрација липозомских формулација.

| Ознака | C_{LIP} (mg/mL) | C_{Fe} (mg/mL) | E^* (%) |
|--------|----------------------|---------------------|-----------------|
| L_0 | $3,8 \pm 0,4$ | – | – |
| L_1 | $3,6 \pm 0,2$ | – | – |
| L_2 | $3,5 \pm 0,3$ | – | – |
| L_3 | $3,2 \pm 0,3$ | – | – |
| L_4 | $3,4 \pm 0,3$ | – | – |
| L_5 | $3,0 \pm 0,4$ | – | – |
| M_0 | $4,5 \pm 0,2$ | – | – |
| M_1 | $4,5 \pm 0,3$ | $0,171 \pm 0,023$ | $85,3 \pm 11,3$ |
| M_2 | $4,4 \pm 0,3$ | $1,366 \pm 0,126$ | $68,3 \pm 7,3$ |

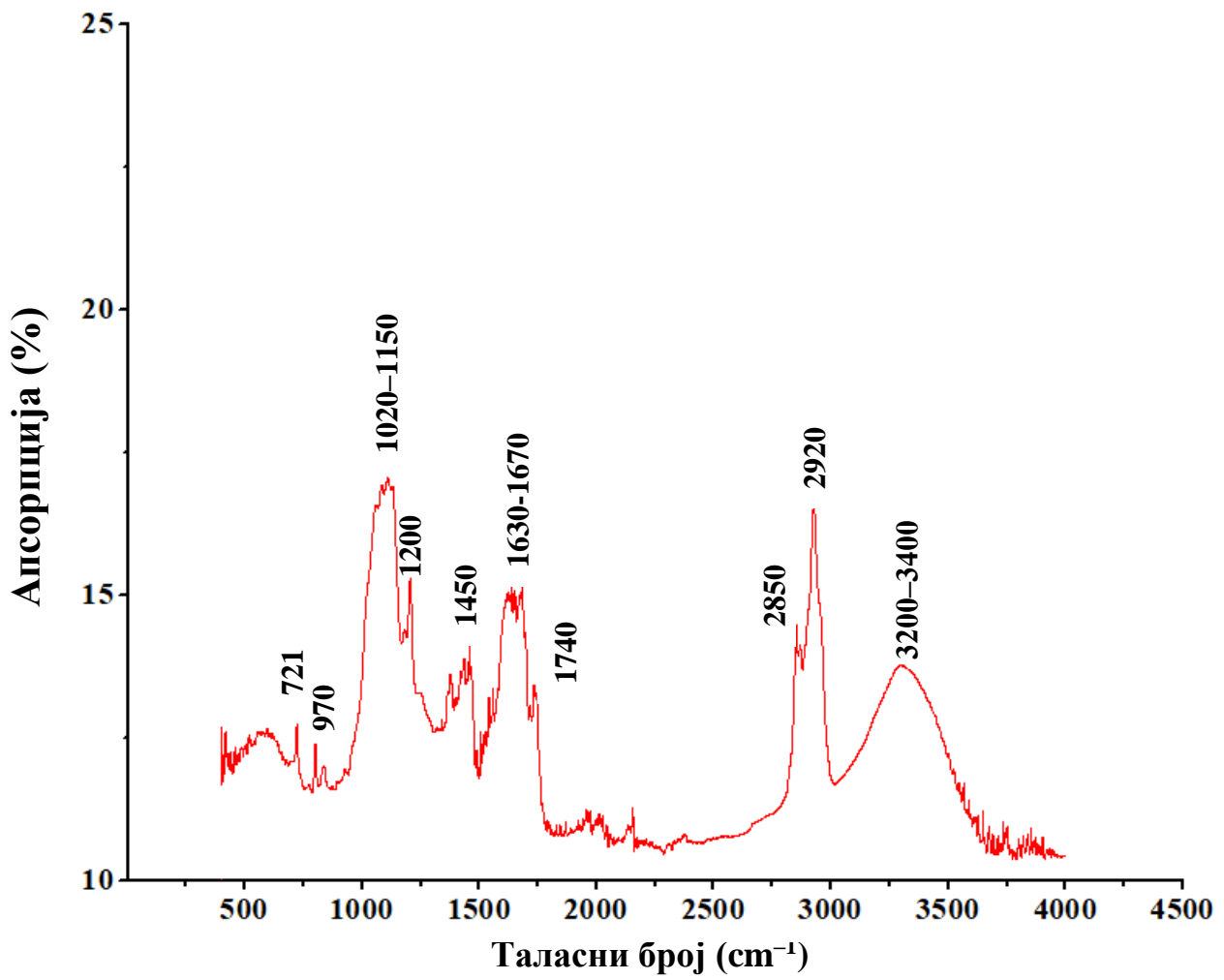
*Представља ефикасност пуњења липозома са МНЧ.

4.1.4. Резултати мерења инфрацрвеном спектроскопијом

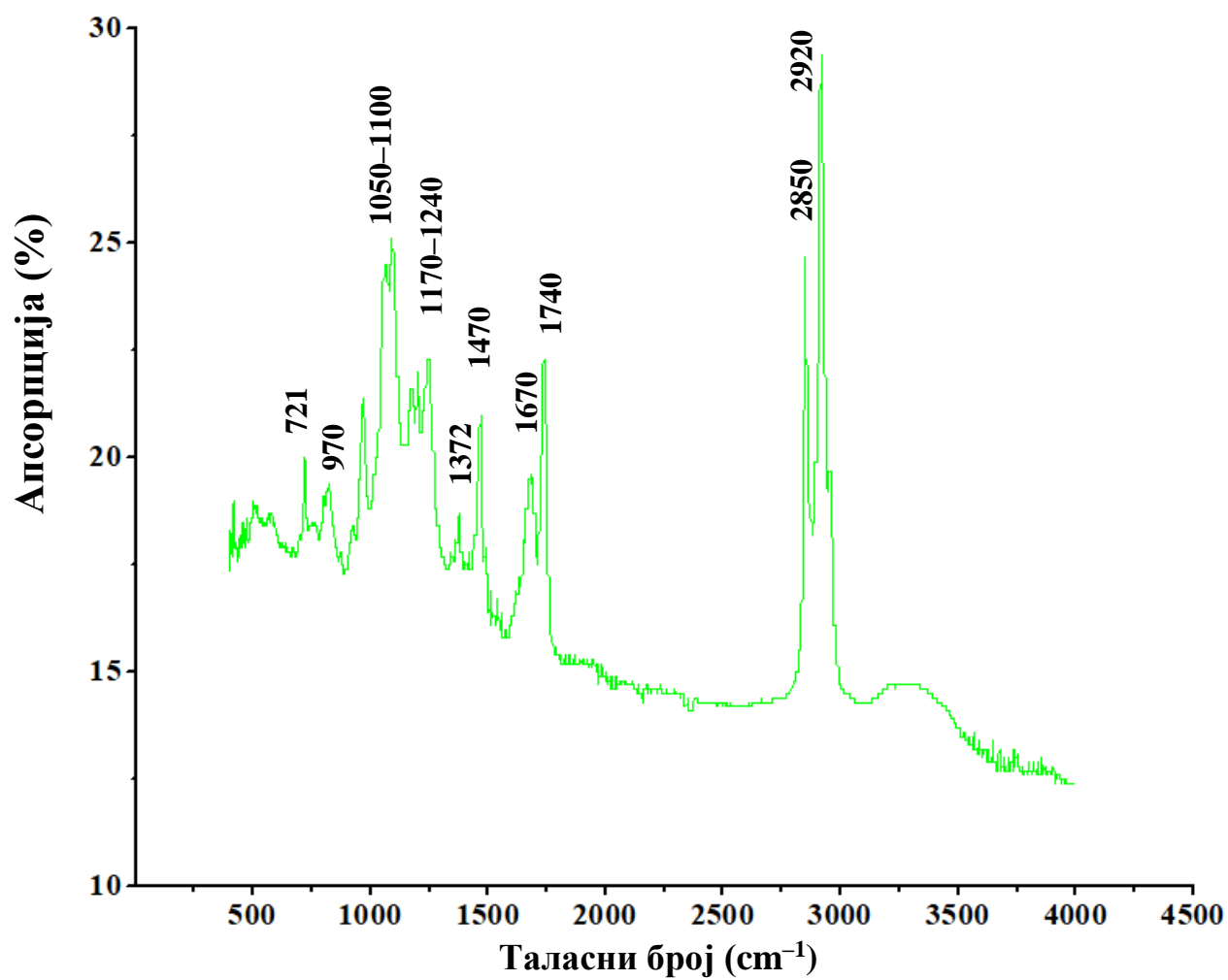
Снимљени су ИЦ спектри различитих узорака липозома и приказани су на сликама 4.1.6–4.1.9. Карактеристични пикови и траке су обележени на одговарајућим спектрима.



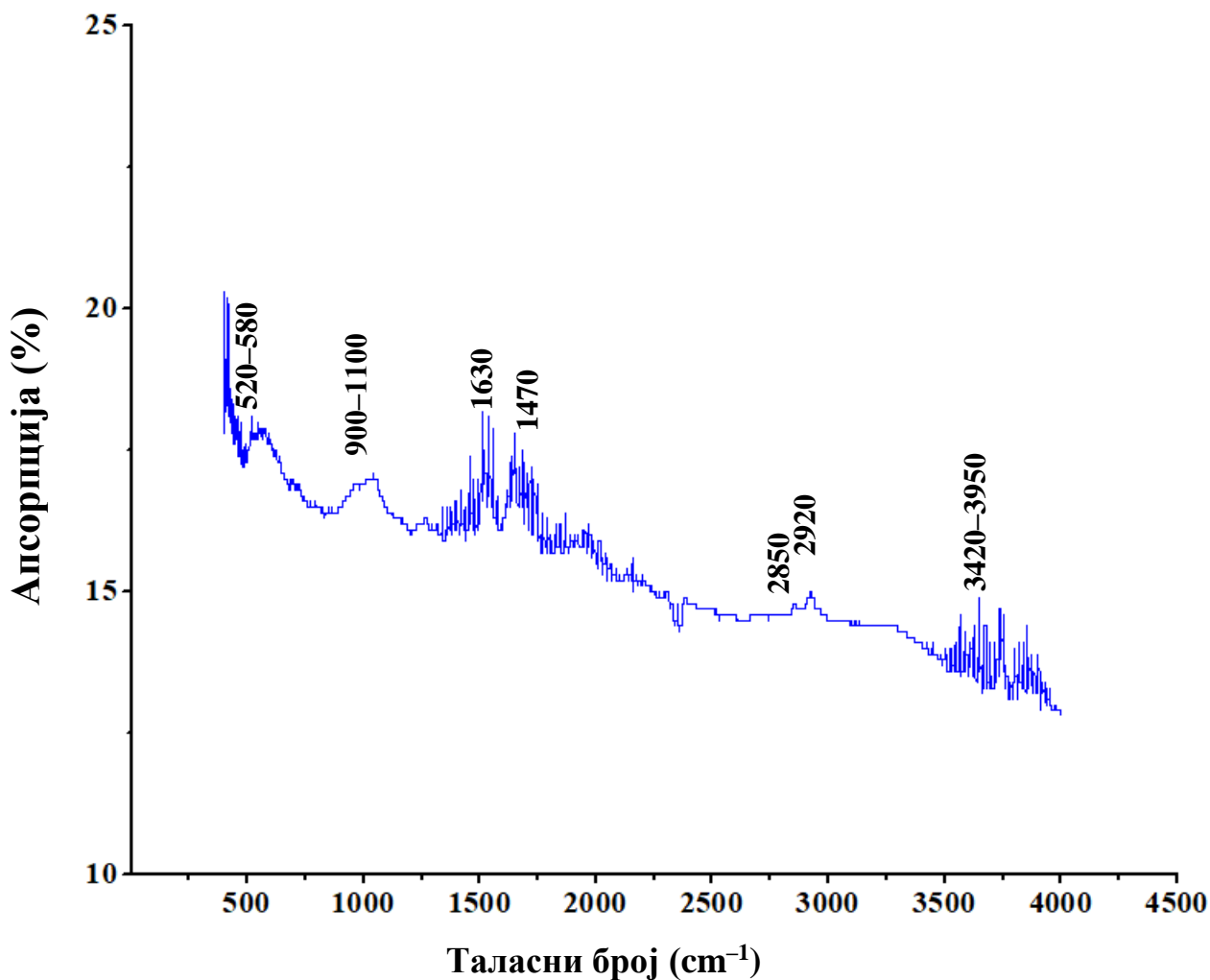
Слика 4.1.6 Инфрацрвени спектар формулације *Lo*.



Слика 4.1.7 Инфрацрвени спектар формулације L_4 .



Слика 4.1.8 Инфрацрвени спектар формулације P_1 .

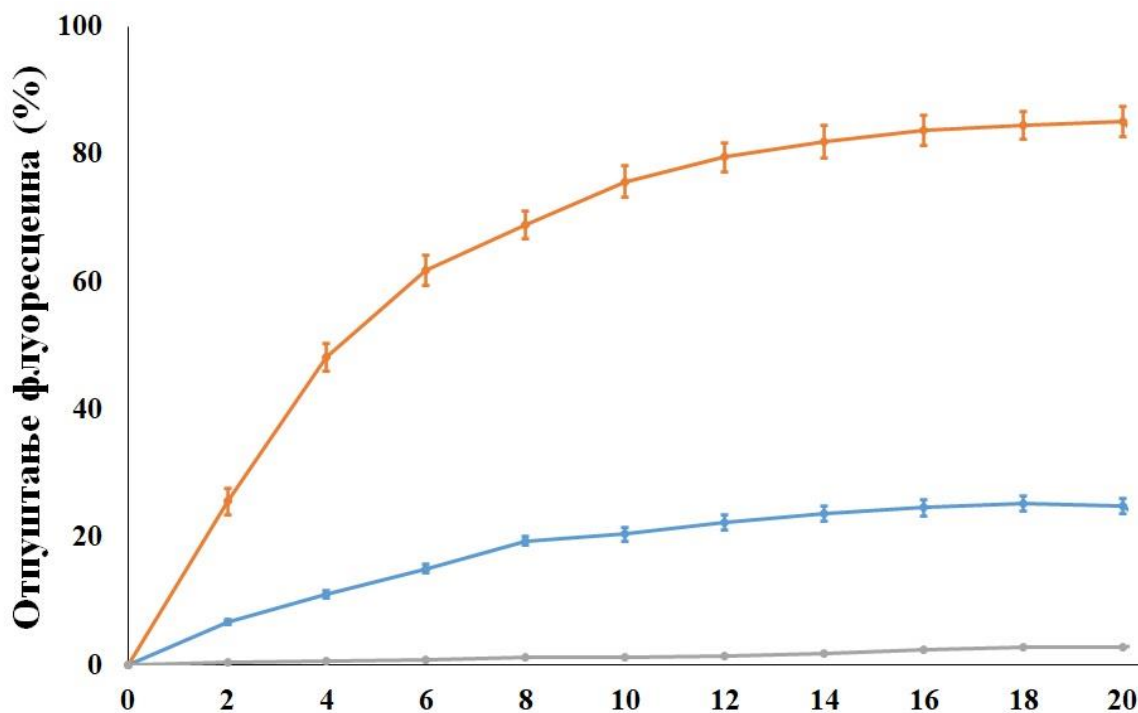


Слика 4.1.9 Инфрацрвени спектар формулације M_3 .

Спектри различитих липозомских формулација, приказани на сликама 4.1.6–4.1.8, су веома слични и може се уочити велики број сличних односно истих молекулских трака. Код ИЦ спектра формулације M_3 може се уочити пертурбација и разлагање молекулских трака, што је директна последица купловања молекулских група са чврстим МНЧ. Однос интензитета одређених ИЦ трака је знатно промењен у односу на остале липозомске формулације, али се и даље могу уочити неке карактеристичне и заједничке траке у ИЦ спектру.

4.1.5. Ефикасност отварања липозома у променљивом магнетном пољу

Графички приказ отпуштања флуоресцеина из формулација M_1 – M_3 у зависности од времена излагања унутар магнетног поља је приказан на слици 4.1.10. Може се уочити значајна разлика у уделу отпуштеног флуоресцеина код формулација напуњених са МНЧ (M_1 , M_2) у односу на контролну формулацију (M_0) која није напуњена са МНЧ.



Време излагања липозома у магнетном пољу јачине 20 mT (min)

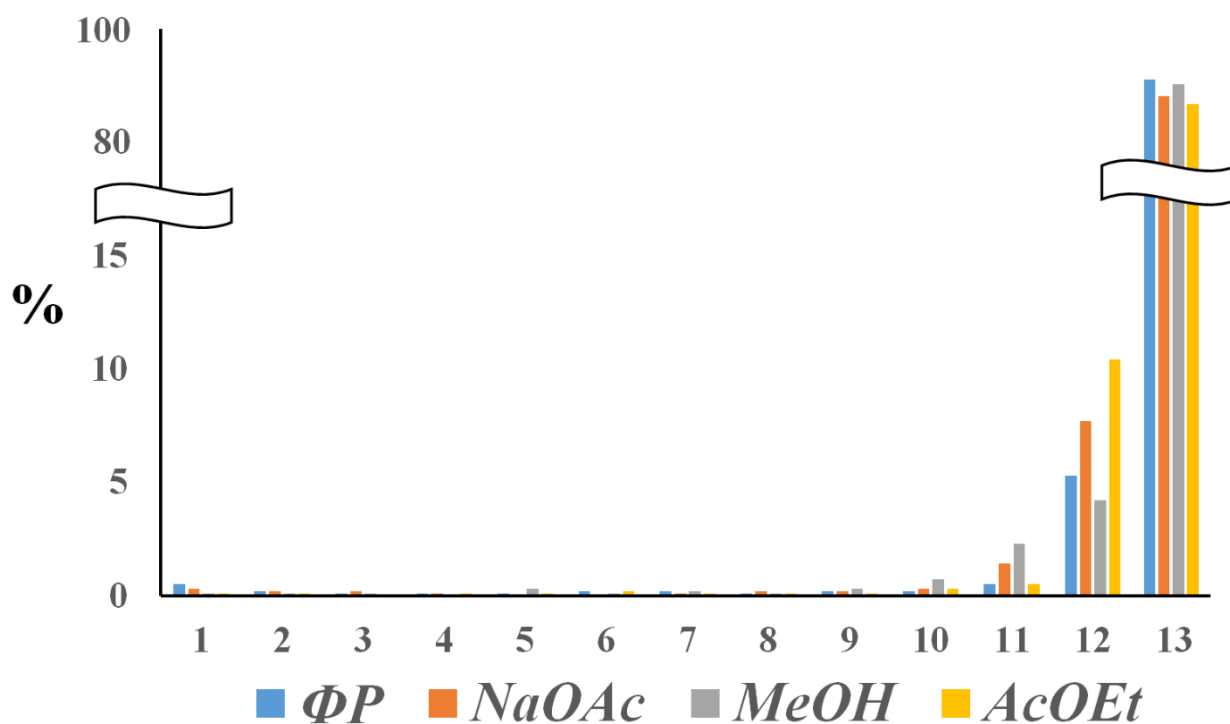
Слика 4.1.10 Отпуштање флуоресцеина из липозома: M_0 (сива крива), M_1 (плава крива), M_2 (норанџаста крива) у зависности од времена излагања унутар магнетног поља.

4.2. Испитивање радиохемијске чистоће

Радиохемијска чистоћа и ефикасност обележавања за припремљене липозомске формулације (L_0 – L_5) је испитана у етапама за различите радионуклиде (^{99m}Tc , ^{131}I , ^{177}Lu) и резултати су представљени у наставку.

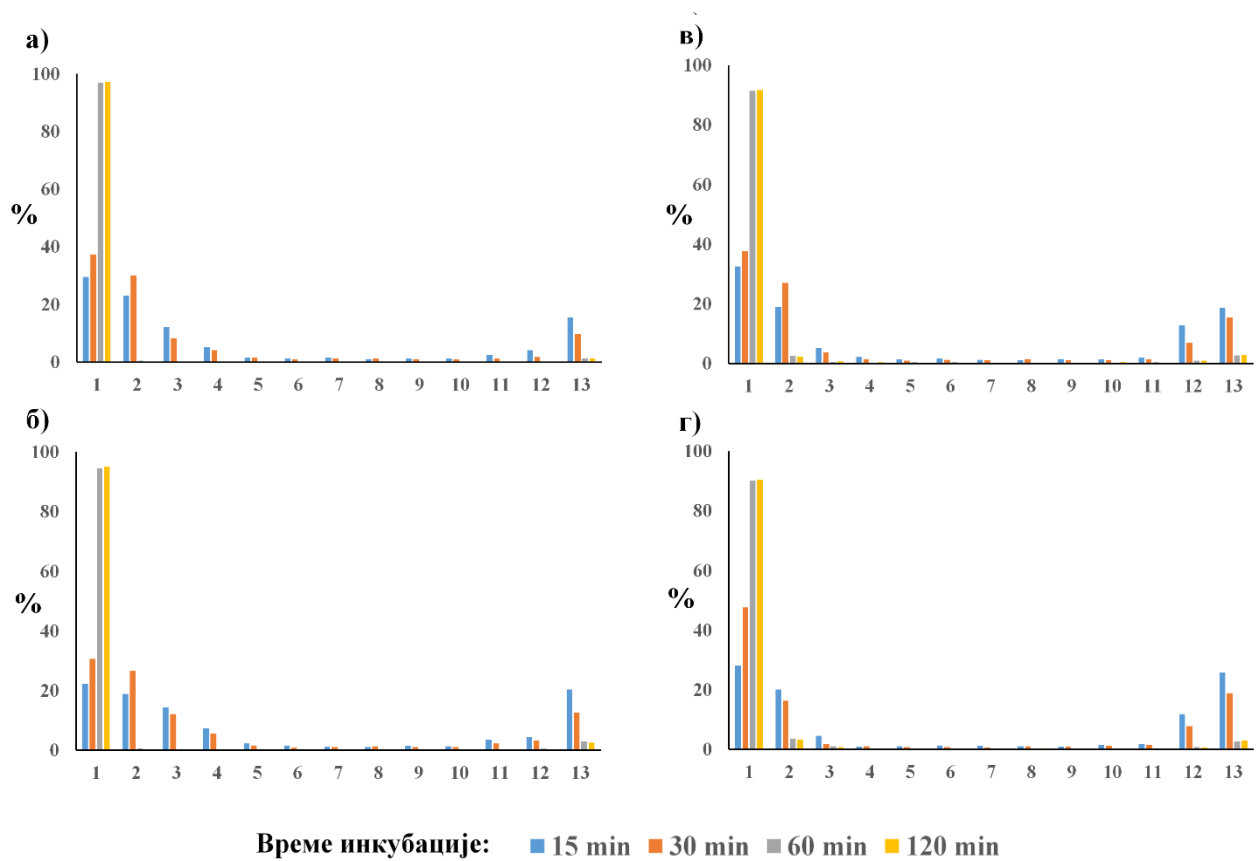
4.2.1. Радиохемијска чистоћа ^{99m}Tc –липозома

За испитивање радиохемијске чистоће липозома радиообележених са ^{99m}Tc коришћене су различите мобилне фазе: ФР, NaOAc , MeOH и AcOEt . На слици 4.2.1 приказани су *ITLC* хроматограми за различите мобилне фазе за слободан ^{99m}Tc и они служе као контрола према којима се упоређују хроматограми ^{99m}Tc –липозома (L_0 – L_5) приказани на сликама 4.2.2–4.2.7.

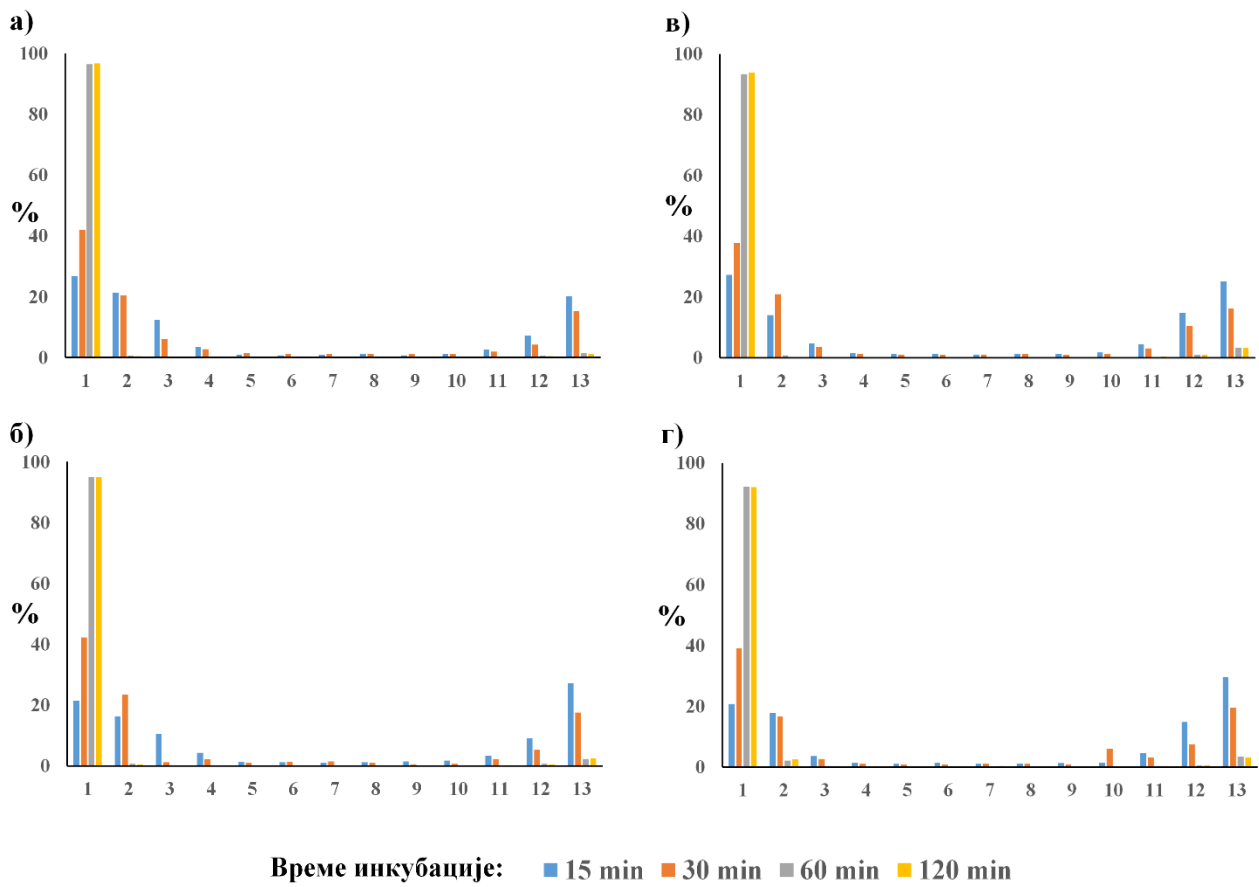


Слика 4.2.1 *ITLC* хроматограми за слободан ^{99m}Tc у облику раствора NaTcO_4 за различите мобилне фазе.

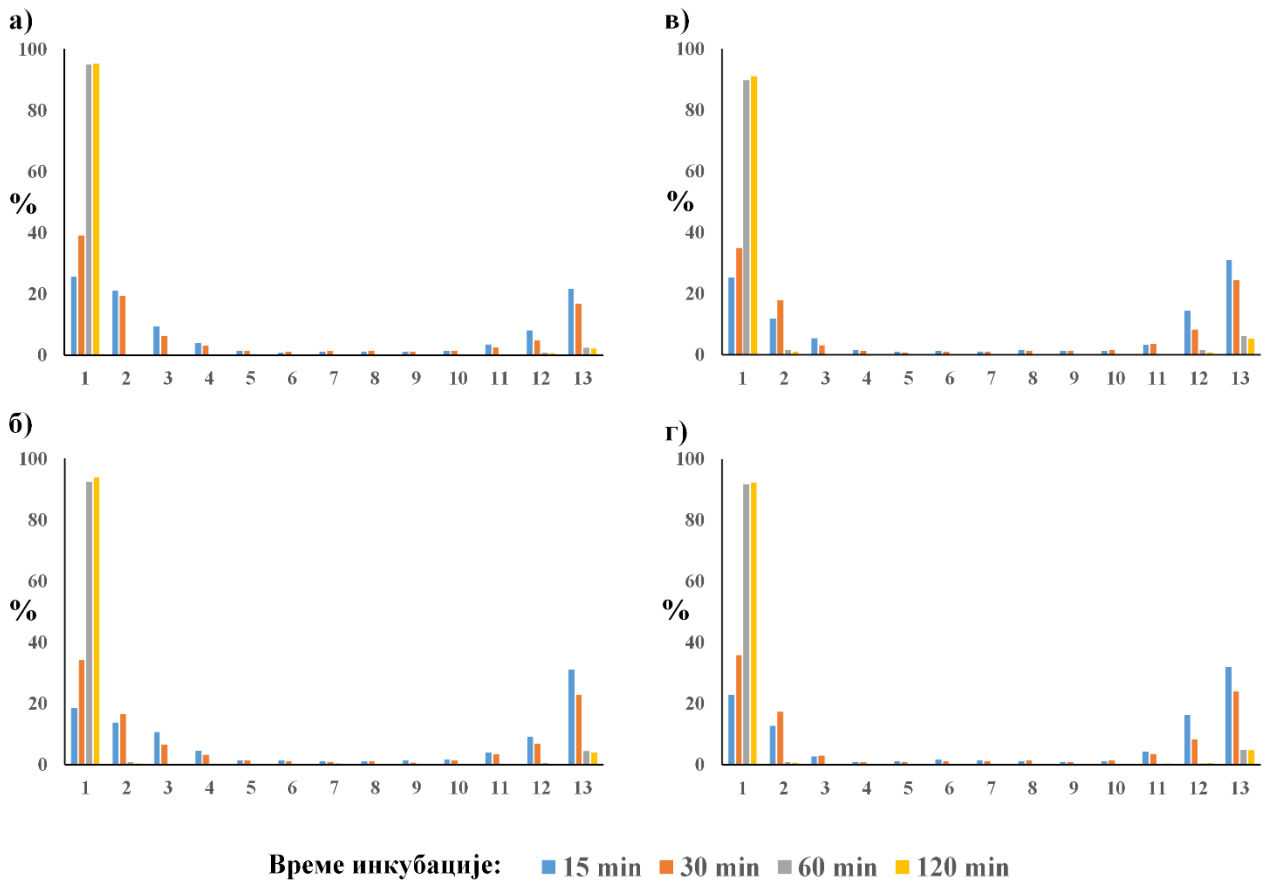
Уочава се да слободан ^{99m}Tc путује са фронтом фазе ($R_f = 0,8$ – 1) без обзира на природу растварача који се користи као мобилна фаза. Такође, веома мали удео ^{99m}Tc заостаје на почетку и дуж хроматографске траке независно од коришћене мобилне фазе.



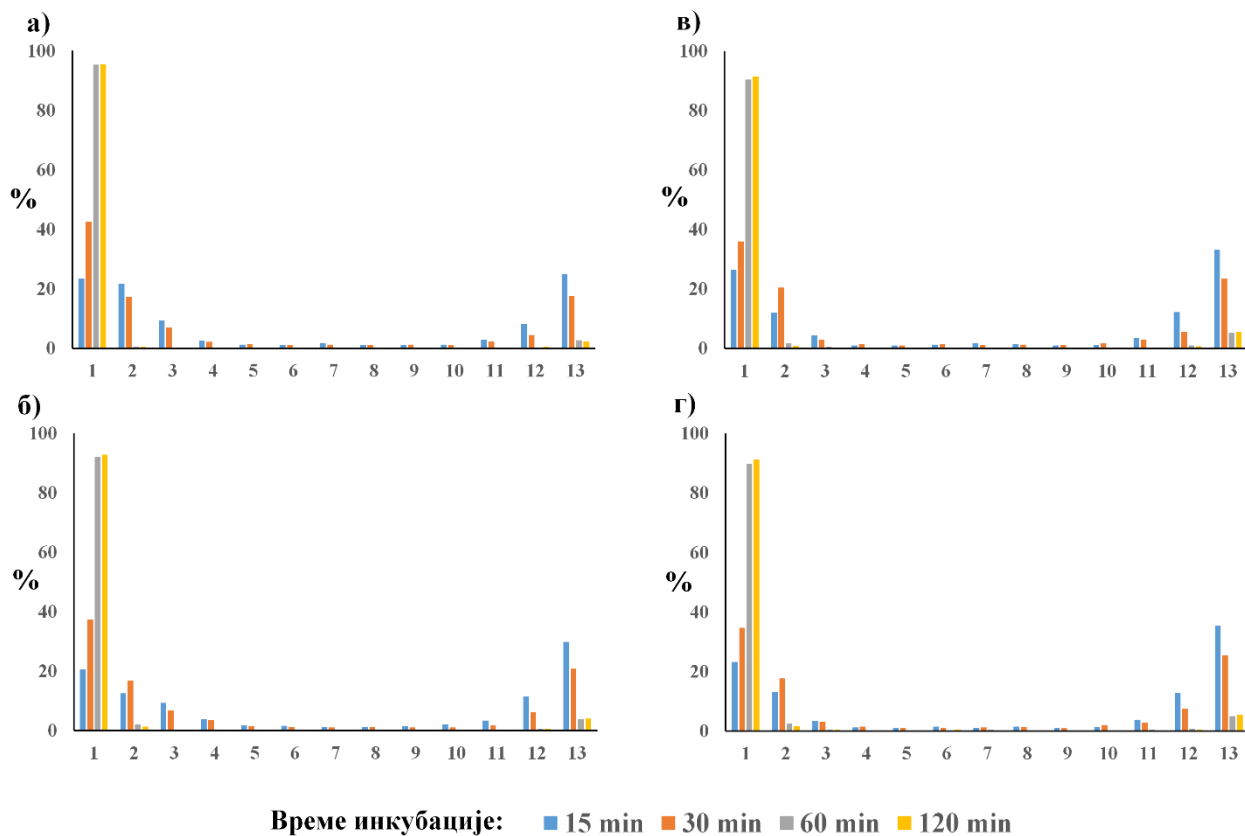
Слика 4.2.2 ИТЛС хроматограми за $^{99\text{m}}\text{Tc-L}_0$ за различите мобилне фазе: а) ФР б) NaOAc в) MeOH г) AcOEt .



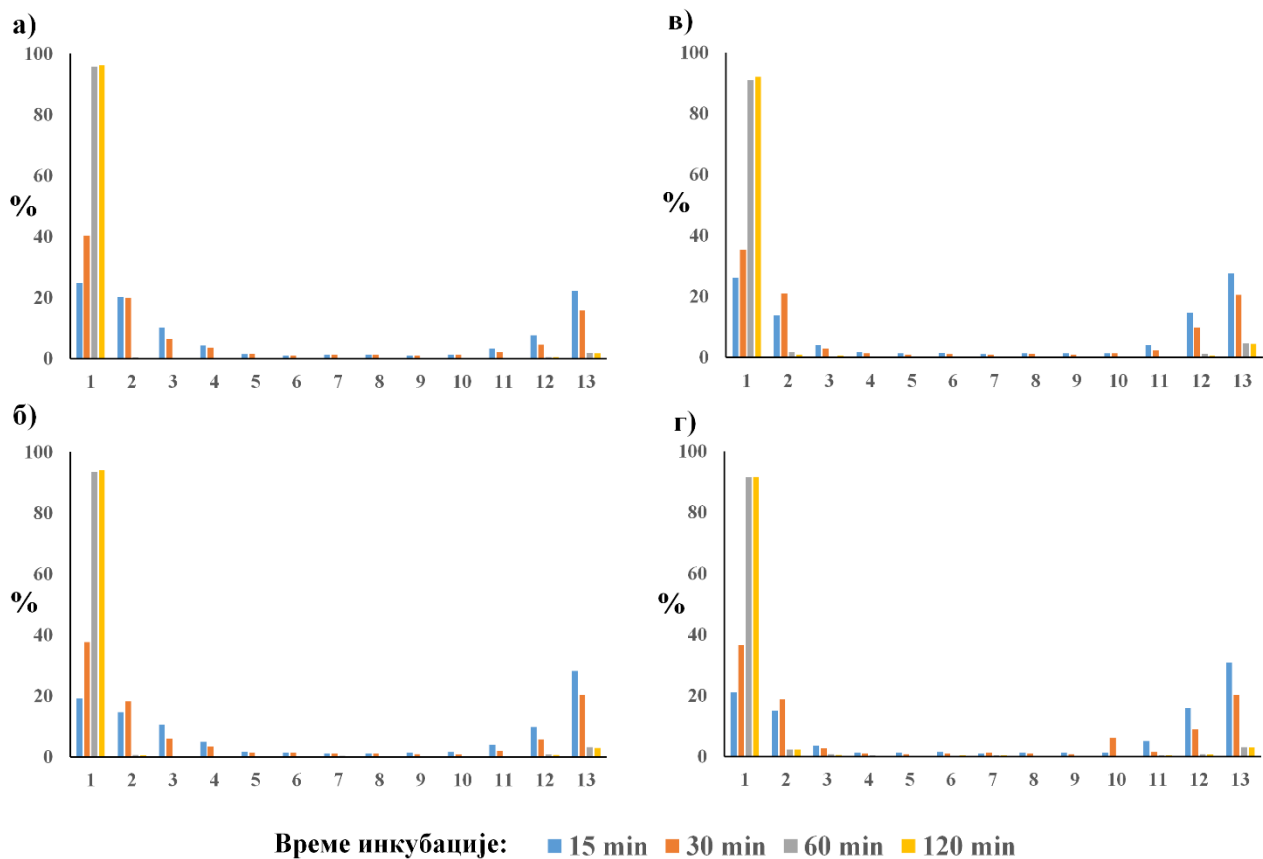
Слика 4.2.3 ИТЛС хроматограми за $^{99m}\text{Tc-L}_1$ за различите мобилне фазе: а) ФР б) NaOAc в) MeOH г) AcOEt .



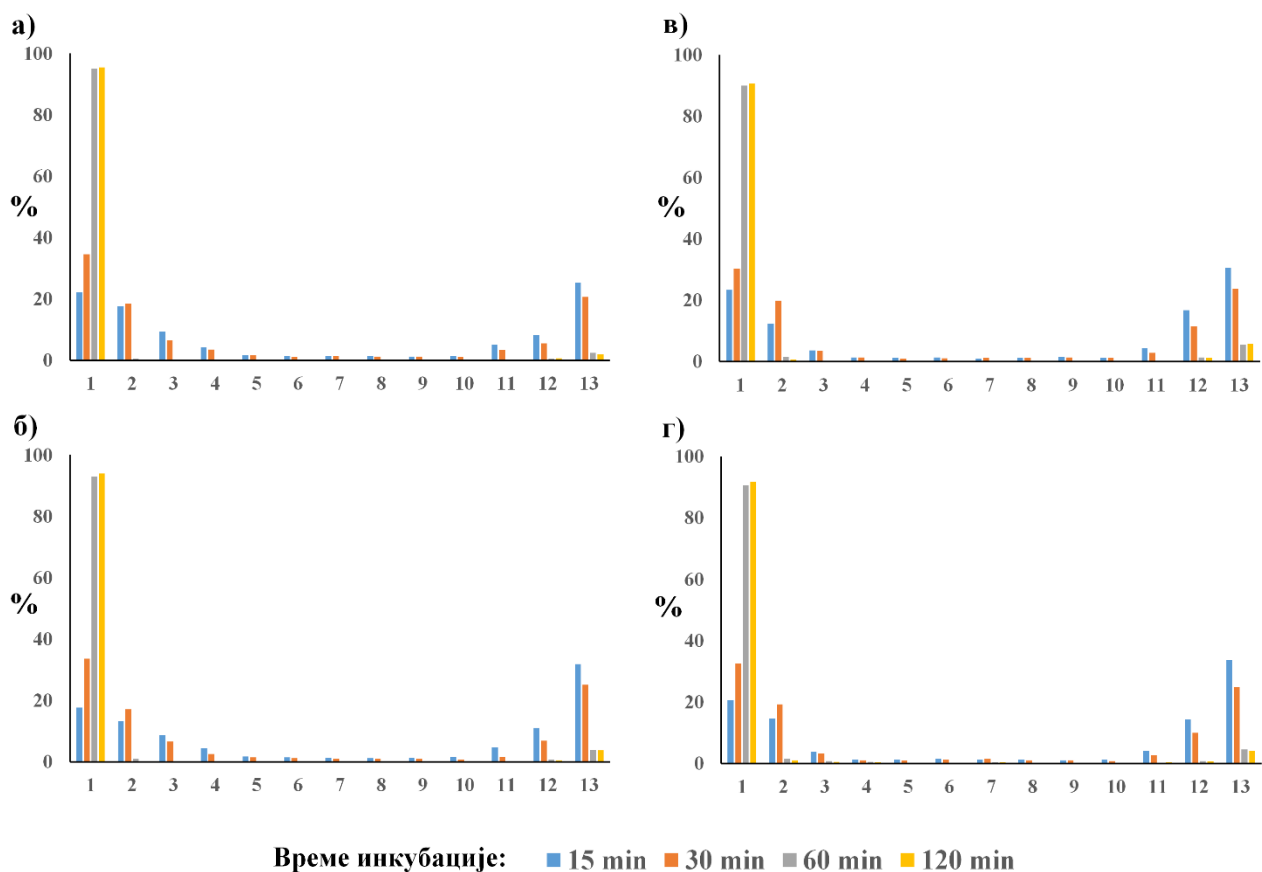
Слика 4.2.4 ИТЛС хроматограми за $^{99m}\text{Tc-L}_2$ за различите мобилне фазе: а) ФР б) NaOAc в) MeOH г) AcOEt.



Слика 4.2.5 ITLC хроматограми за $^{99m}\text{Tc-L}_3$ за различите мобилне фазе: а) ФР б) NaOAc в) MeOH г) AcOEt.



Слика 4.2.6 ИТЛС хроматограми за $^{99m}\text{Tc-L}_4$ за различите мобилне фазе: а) ФР б) NaOAc в) MeOH г) AcOEt.

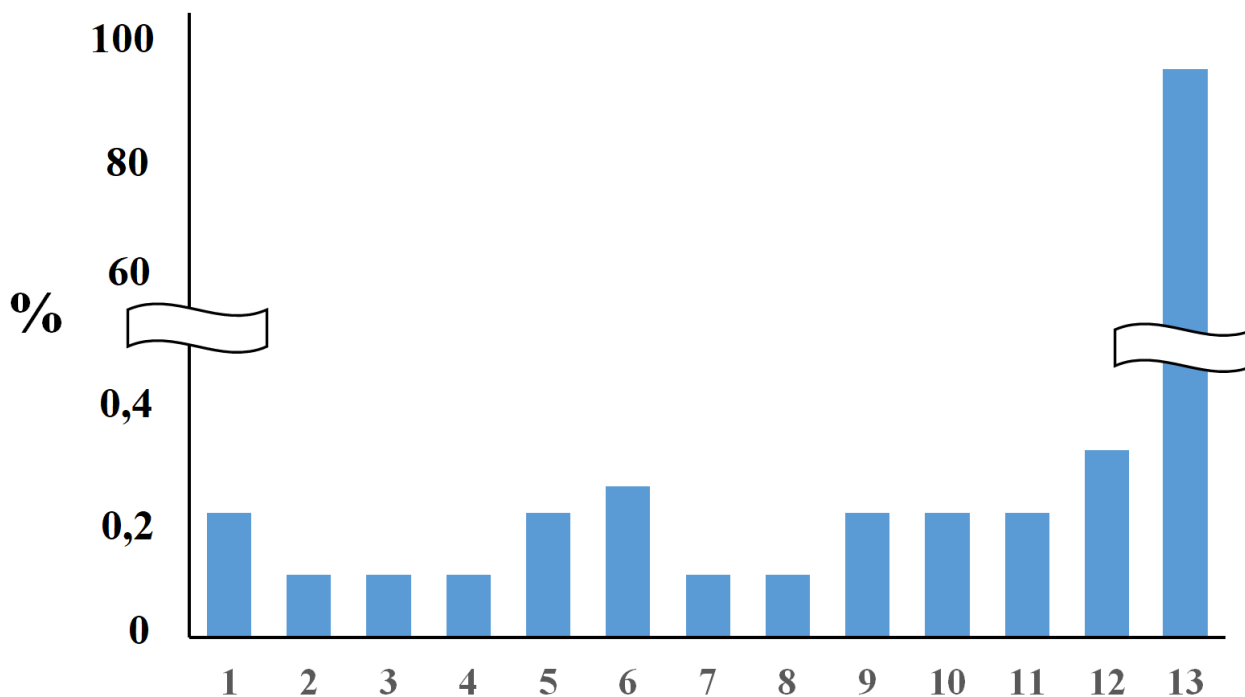


Слика 4.2.7 *ITLC* хроматограми за $^{99m}\text{Tc-L}_5$ за различите мобилне фазе: а) ФР б) NaOAc в) MeOH г) AcOEt .

Хроматограми приказани на сликама 4.2.2–4.2.7 показују да радиообележени липозоми остају на почетку хроматографске траке ($R_f = 0,1-0,2$). После сат времена инкубације долази до постизања максималне ефикасности обележавања ($> 90\%$) код свих липозомских формулација. Удео слободног ^{99m}Tc се смањује са дужином инкубације ($R_f = 1$). Такође, уочава се незнатна разлика између различитих мобилних фаза које су коришћене у виду удела слободног ^{99m}Tc .

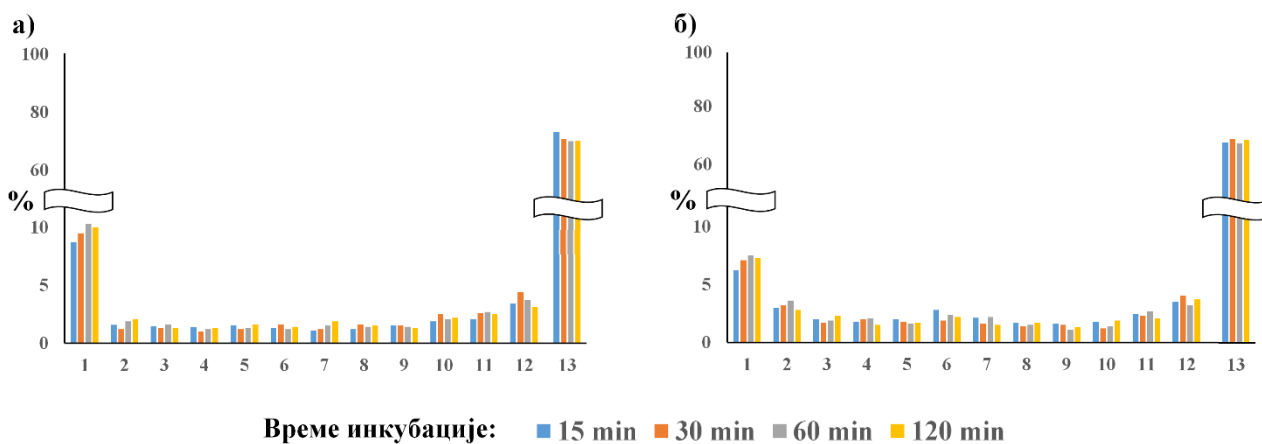
4.2.2. Радиохемијска чистоћа ^{131}I -липозома

Испитана је радиохемијска чистоћа липозома обележених са ^{131}I , директном методом и у присуству хлорамина-Т, за различита инкубациона времена и коришћењем ФР као мобилне фазе. *ITLC* хроматограм за слободан ^{131}I је приказан на слици 4.2.8. док су на сликама 4.2.9–4.2.15. приказани *ITLC* хроматограми за ^{131}I -липозоме (L_0-L_5).

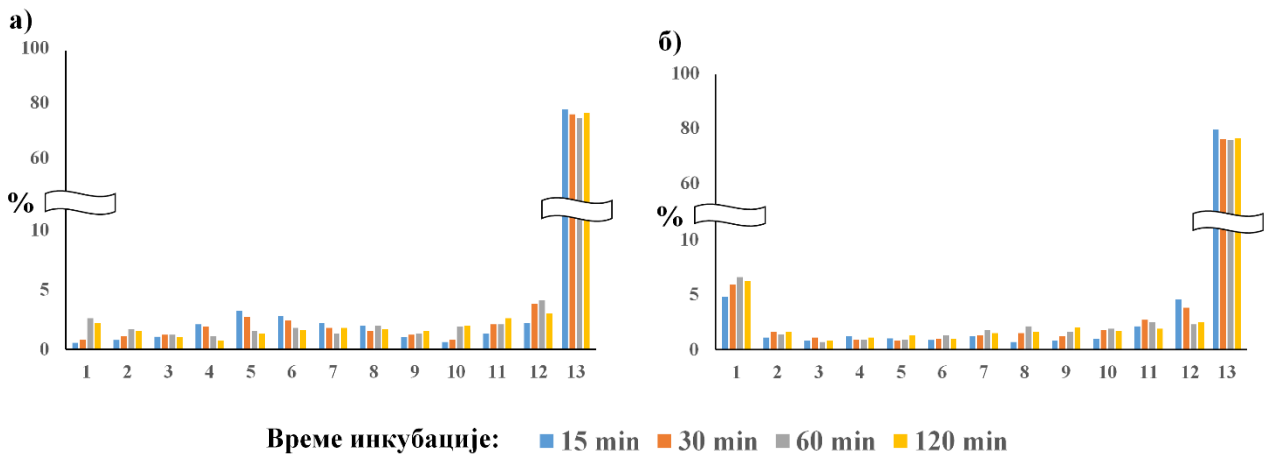


Слика 4.2.8 ITLC хроматограми за слободан ^{131}I у облику раствора NaI и ФР мобилну фазу.

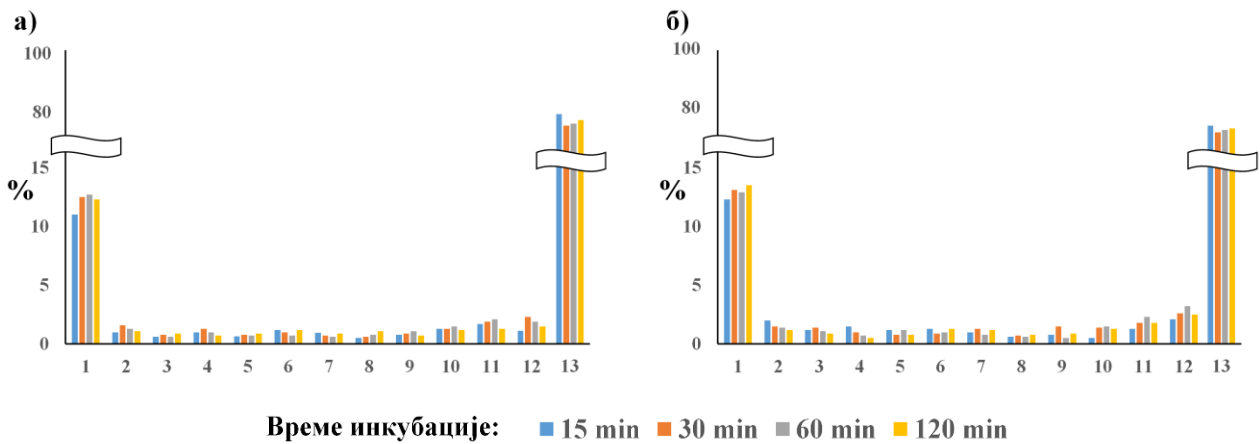
Хроматограм приказан на слици 4.2.8 указује на то да слободан ^{131}I у потпуности путује са фронтом мобилне фазе, уз веома мали удео заостале активности дуж хроматографске колоне (< 2%).



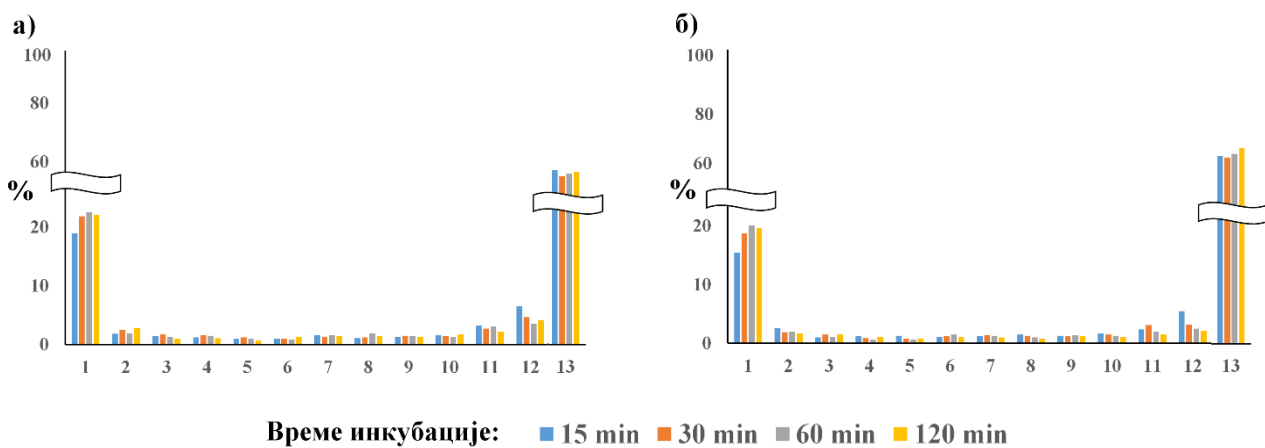
Слика 4.2.9 ITLC хроматограми за $^{131}\text{I-L}_0$ за ФР мобилну фазу: а) директно везивање б) везивање у присуству хлорамина-Т.



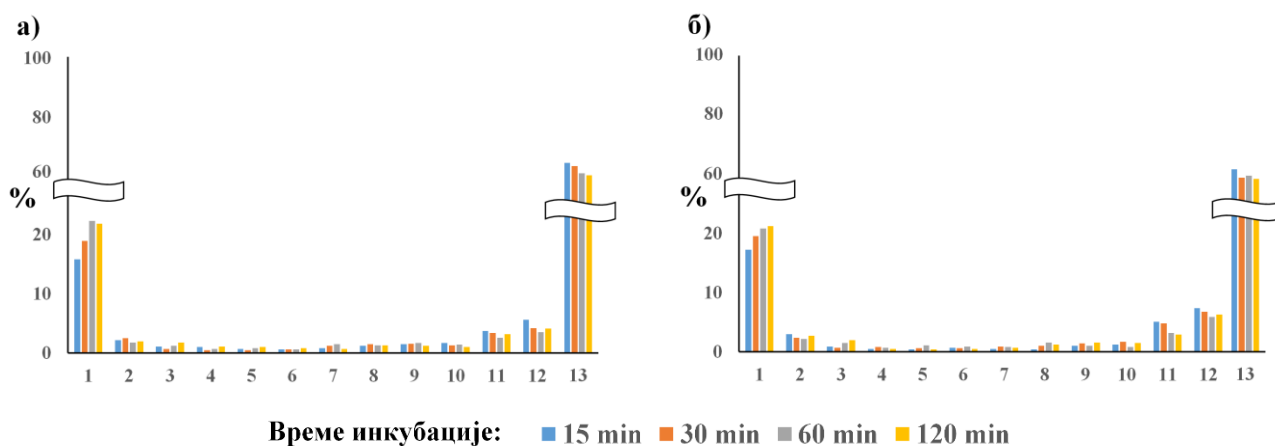
Слика 4.2.10 *ITLC* хроматограми за $^{131}\text{I-L}_1$ за ФР мобилну фазу: а) директно везивање б) везивање у присуству хлорамина-Т.



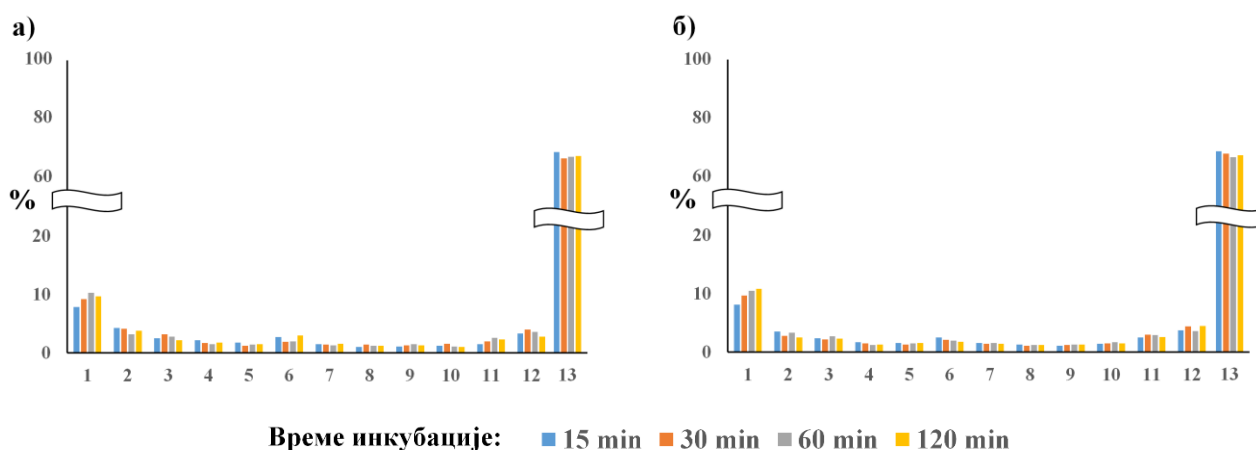
Слика 4.2.11 *ITLC* хроматограми за $^{131}\text{I-L}_2$ за ФР мобилну фазу: а) директно везивање б) везивање у присуству хлорамина-Т.



Слика 4.2.12 *ITLC* хроматограми за $^{131}\text{I-L}_3$ за ФР мобилну фазу: а) директно везивање б) везивање у присуству хлорамина-Т.



Слика 4.2.13 *ITLC* хроматограми за ^{131}I - L_4 за ФР мобилну фазу: а) директно везивање б) везивање у присуству хлорамина-Т.



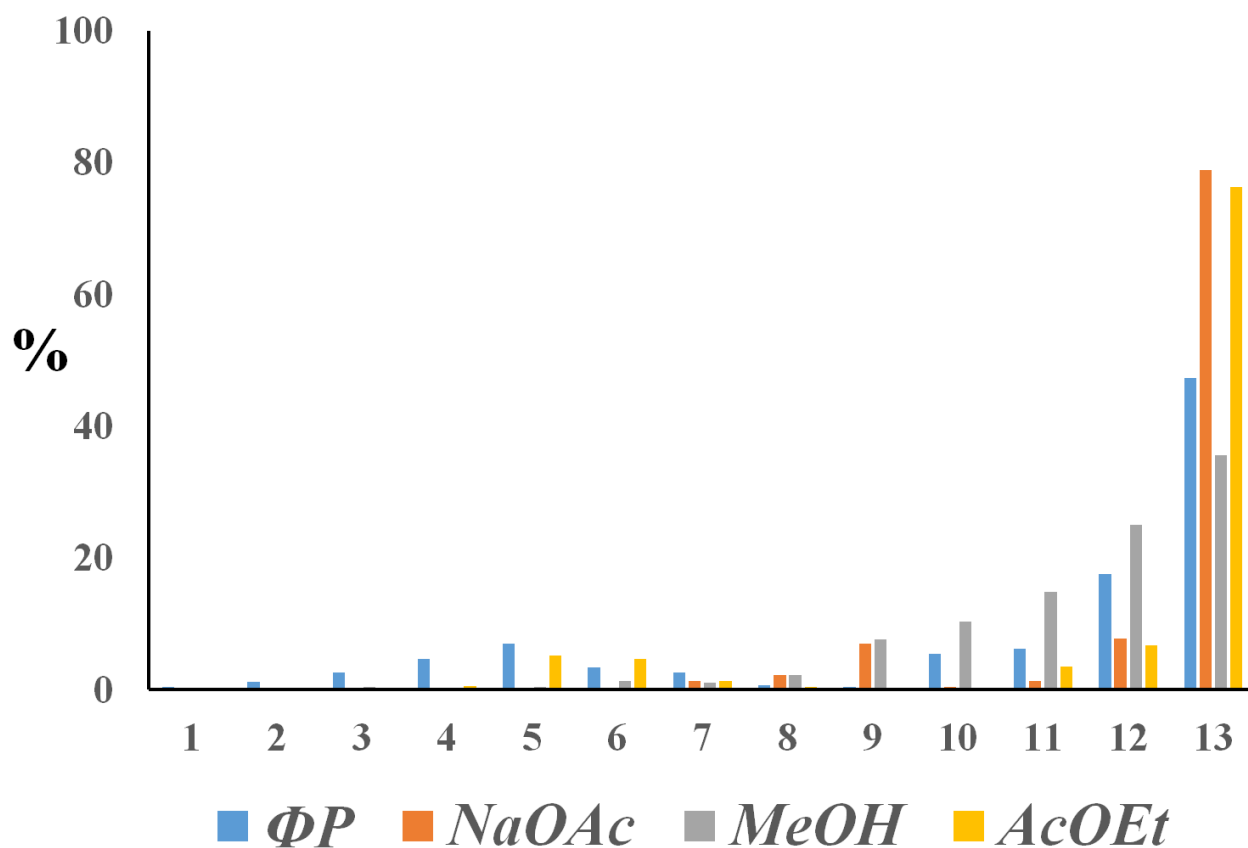
Слика 4.2.14 *ITLC* хроматограми за ^{131}I - L_5 за ФР мобилну фазу: а) директно везивање б) везивање у присуству хлорамина-Т.

ITLC хроматограми различитих радиообележених липозомских формулација (L_0 - L_5) показују сличну ефикасност обележавања са радионуклидом ^{131}I . Ефикасност радиообележавања липозома је ниска, 5–20 %, независно од примењене методе (директна или са хлорамином-Т) и времена инкубације, са изузетком L_1 формулације липозома која се није могла обележити директном методом (2%) већ само применом хлорамина-Т (5-7 %), слика 4.2.10.

4.2.3. Радиохемијска чистоћа ^{177}Lu -липозома

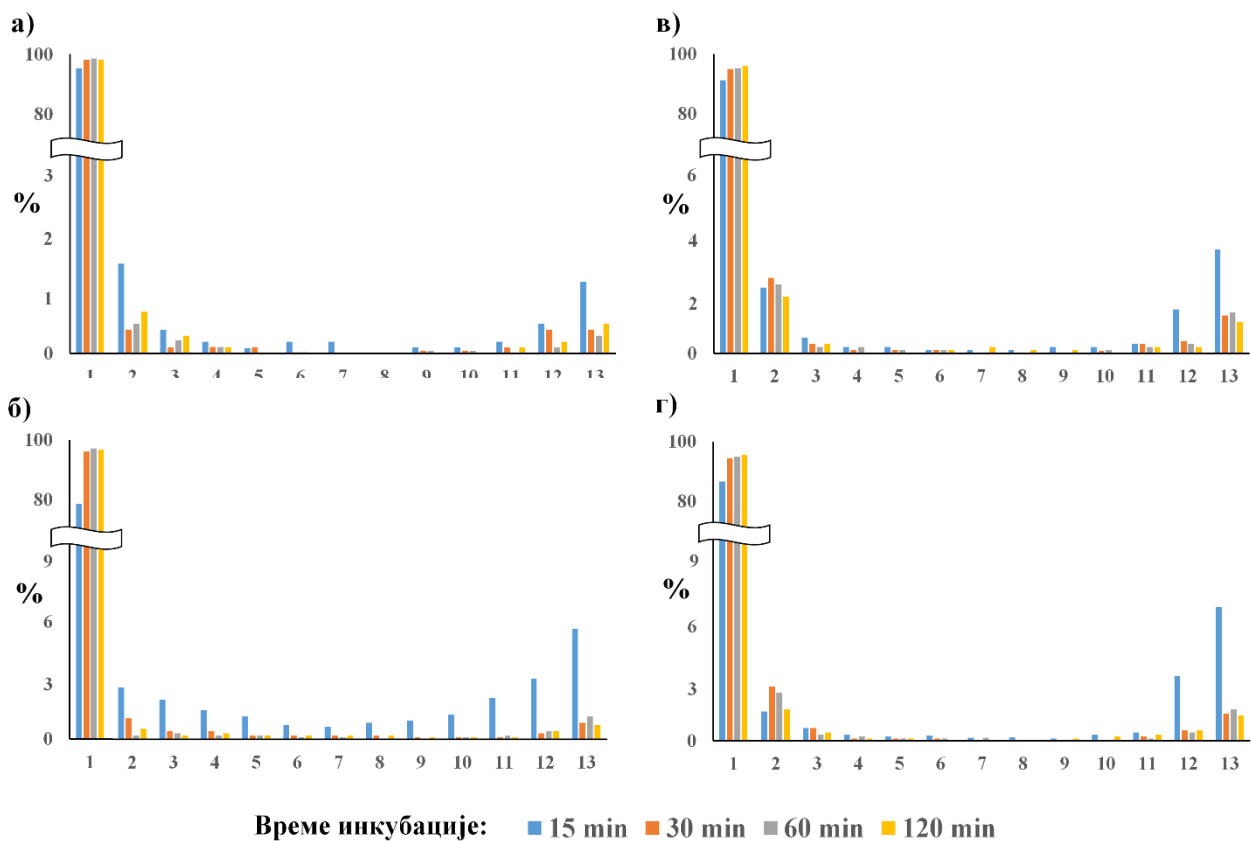
Испитивање радиохемијске чистоће липозома радиообележених са ^{177}Lu вршено је на идентичан начин као и код радиообележавања са $^{99\text{m}}\text{Tc}$, коришћењем истих мобилних фаза и времена инкубације. На слици 4.2.15 приказани су *ITLC* хроматограми за различите мобилне

фазе за слободан ^{177}Lu док су хроматограми ^{177}Lu -липозома (L_0 - L_5) приказани на сликама 4.2.15–4.2.21.

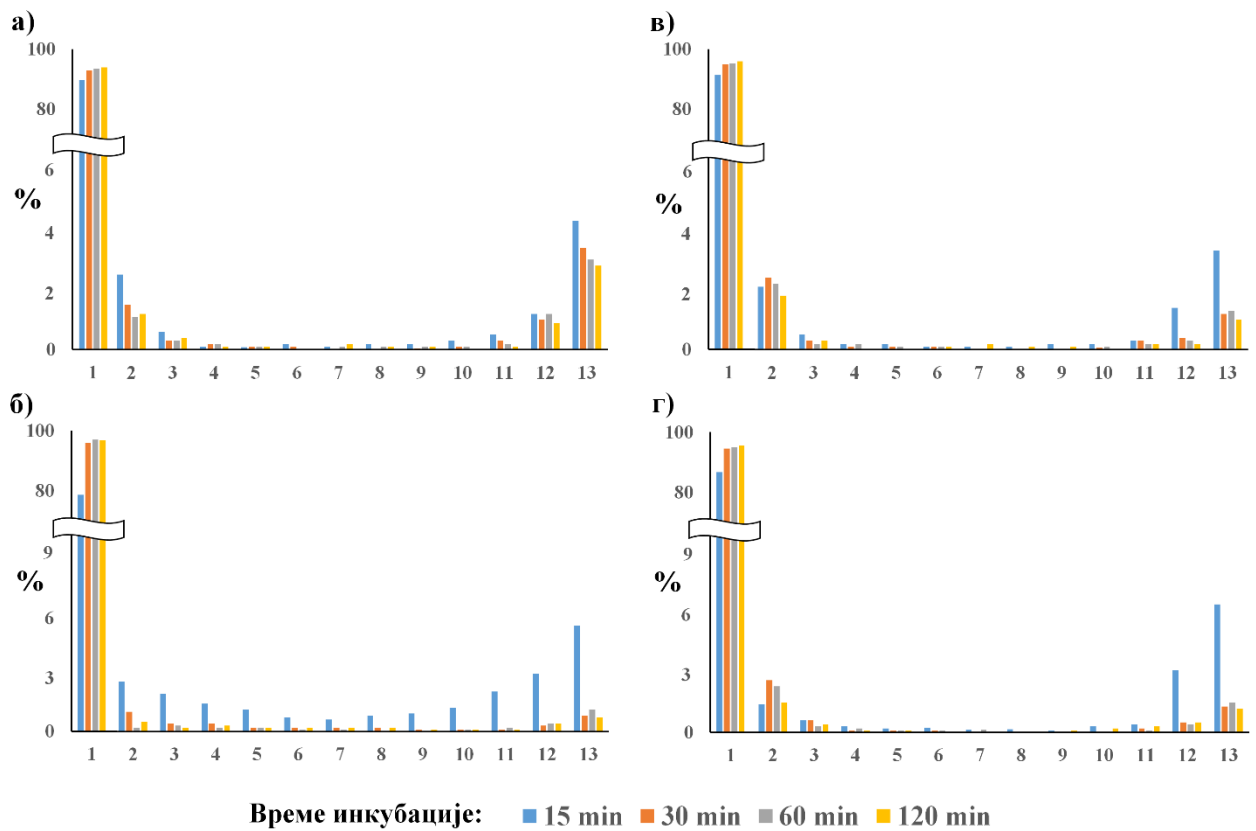


Слика 4.2.15 *ITLC* хроматограми за слободан ^{177}Lu у облику раствора LuCl_3 за различите мобилне фазе.

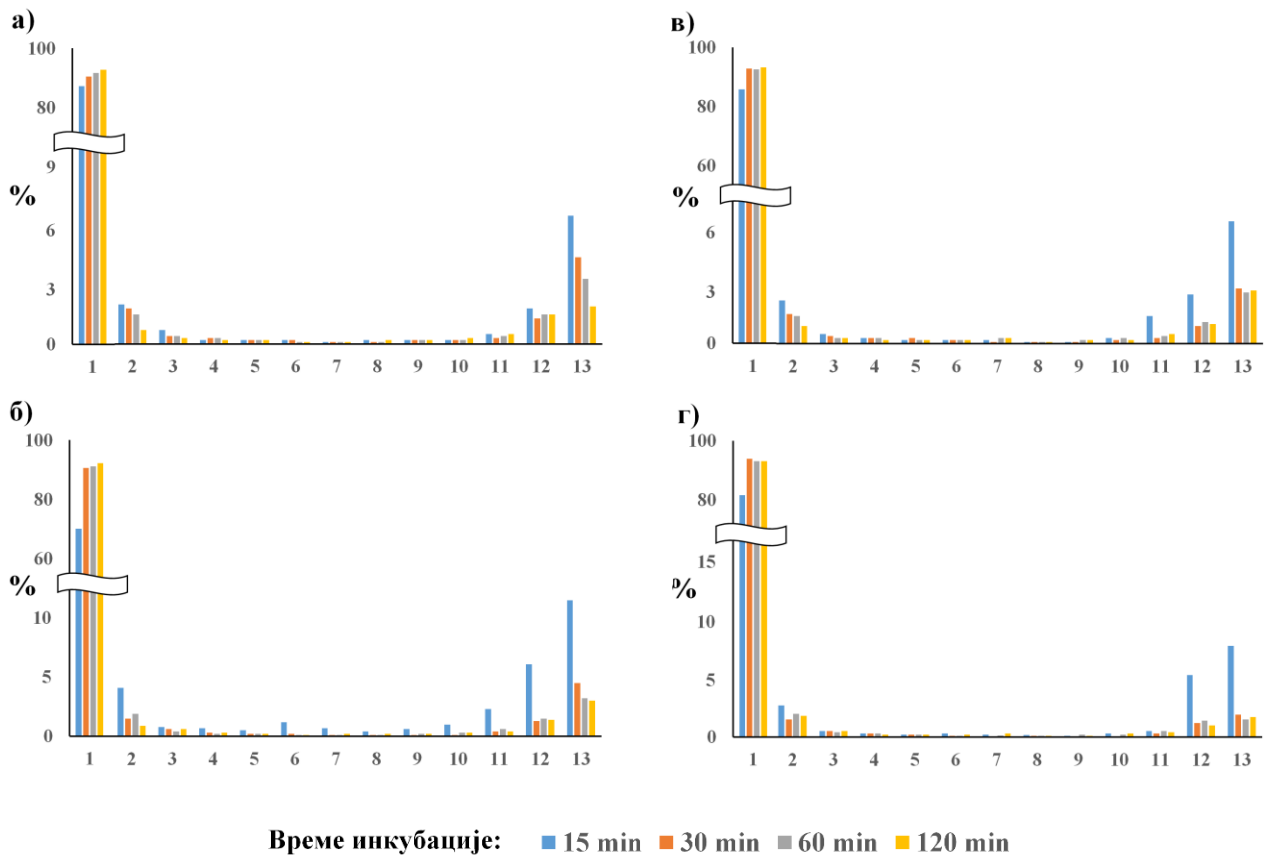
Слободан ^{177}Lu показује различите хроматографске профиле у зависности од коришћене мобилне фазе. Употребом ФР и *MeOH* као мобилних фаза слободан ^{177}Lu се детектује дуж целе хроматографске траке, док се употребом *NaOAc* и *AcOEt* детектује као оштрији пик на $R_f = 0,8$ – $0,9$.



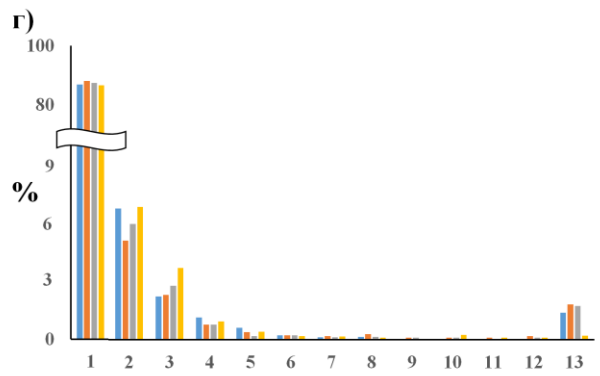
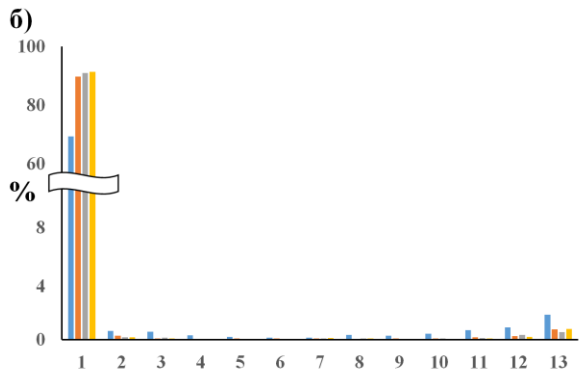
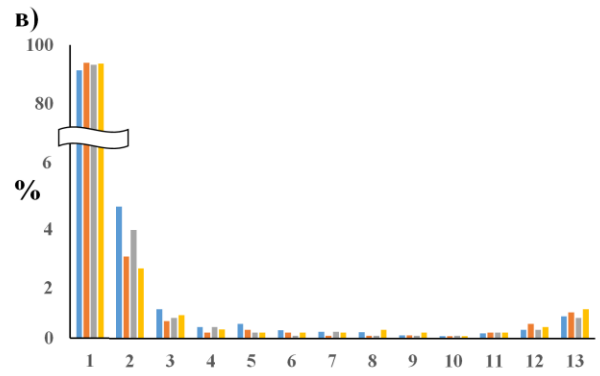
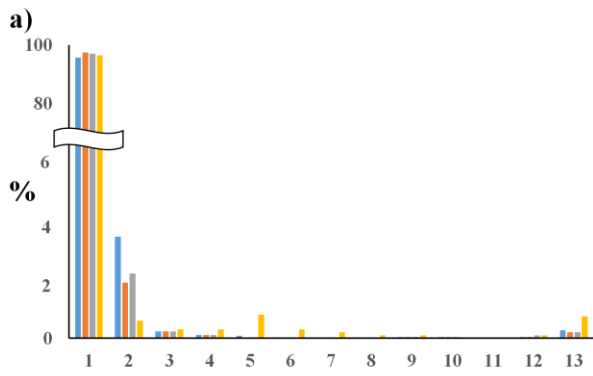
Слика 4.2.16 ITLC хроматограми за $^{177}\text{Lu-L}_0$ за различите мобилне фазе: а) ФР б) NaOAc в) MeOH г) AcOEt .



Слика 4.2.17 *ITLC* хроматограми за $^{177}\text{Lu-L}_1$ за различите мобилне фазе: а) ФР б) *NaOAc* в) *MeOH* г) *AcOEt*.

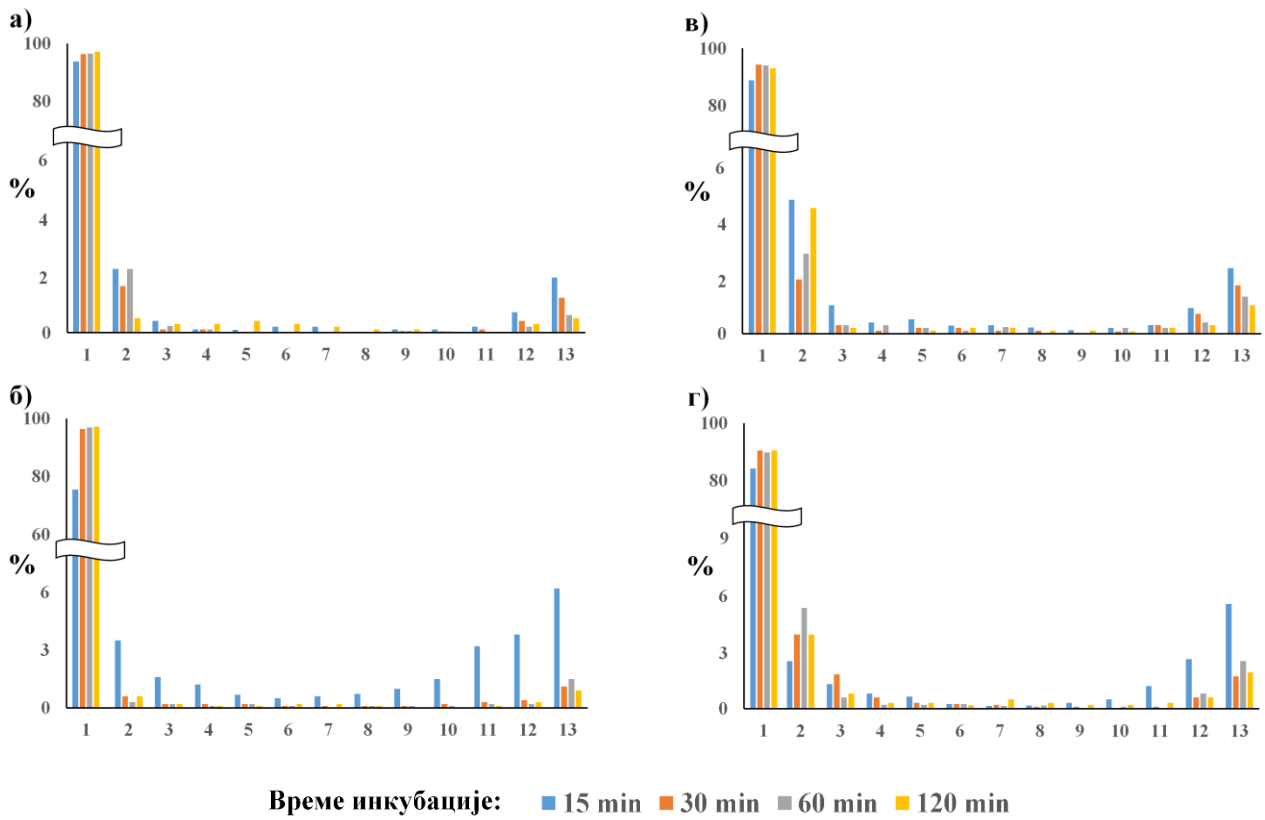


Слика 4.2.18 ITLC хроматограми за $^{177}\text{Lu-L}_2$ за различите мобилне фазе: а) ФР б) NaOAc в) MeOH г) AcOEt .

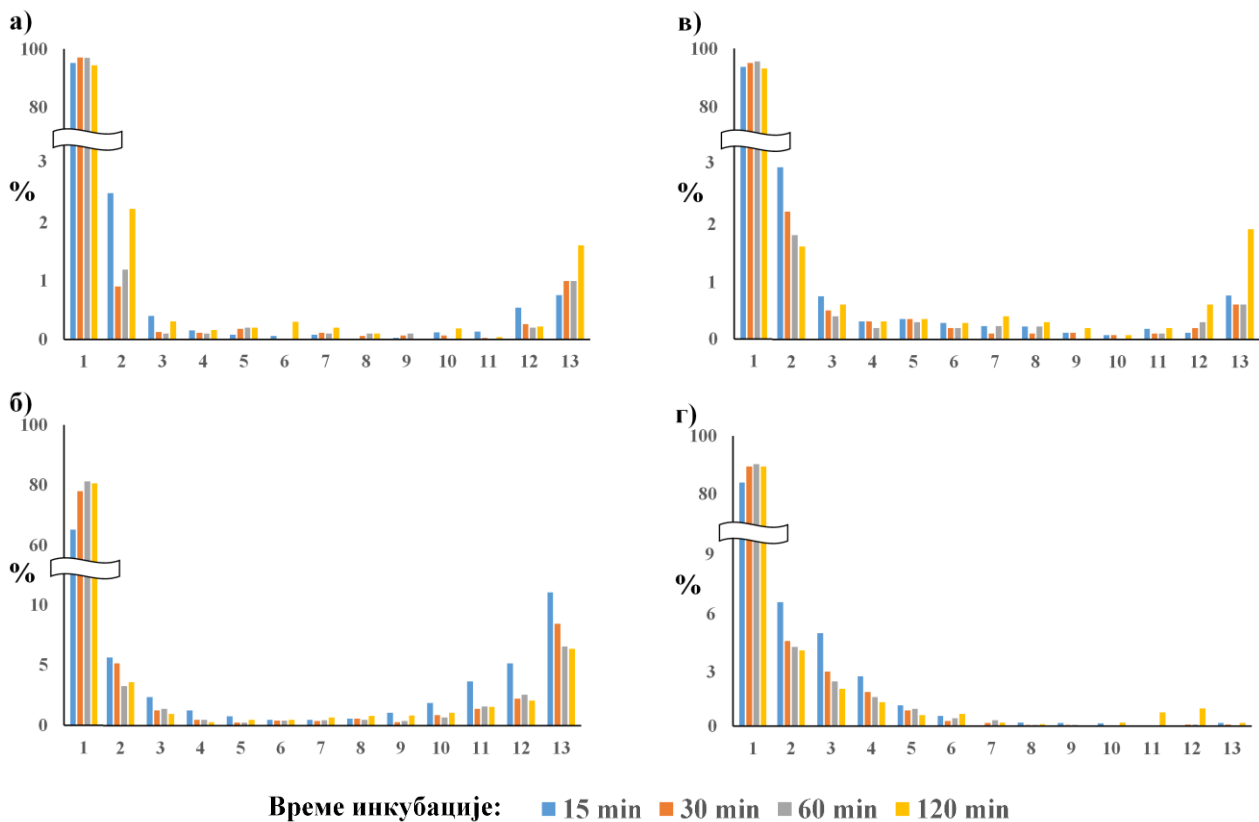


Време инкубације: ■ 15 min ■ 30 min ■ 60 min ■ 120 min

Слика 4.2.19 *ITLC* хроматограми за $^{177}\text{Lu-L}_3$ за различите мобилне фазе: а) ФР б) *NaOAc* в) *MeOH* г) *AcOEt*.



Слика 4.2.20 ИТЛС хроматограми за $^{177}\text{Lu-L}_4$ за различите мобилне фазе: а) ФР б) NaOAc в) MeOH г) AcOEt.



Слика 4.2.21 *ITLC* хроматограми за $^{177}\text{Lu-L}_5$ за различите мобилне фазе: а) ФР б) NaOAc в) MeOH г) AcOEt .

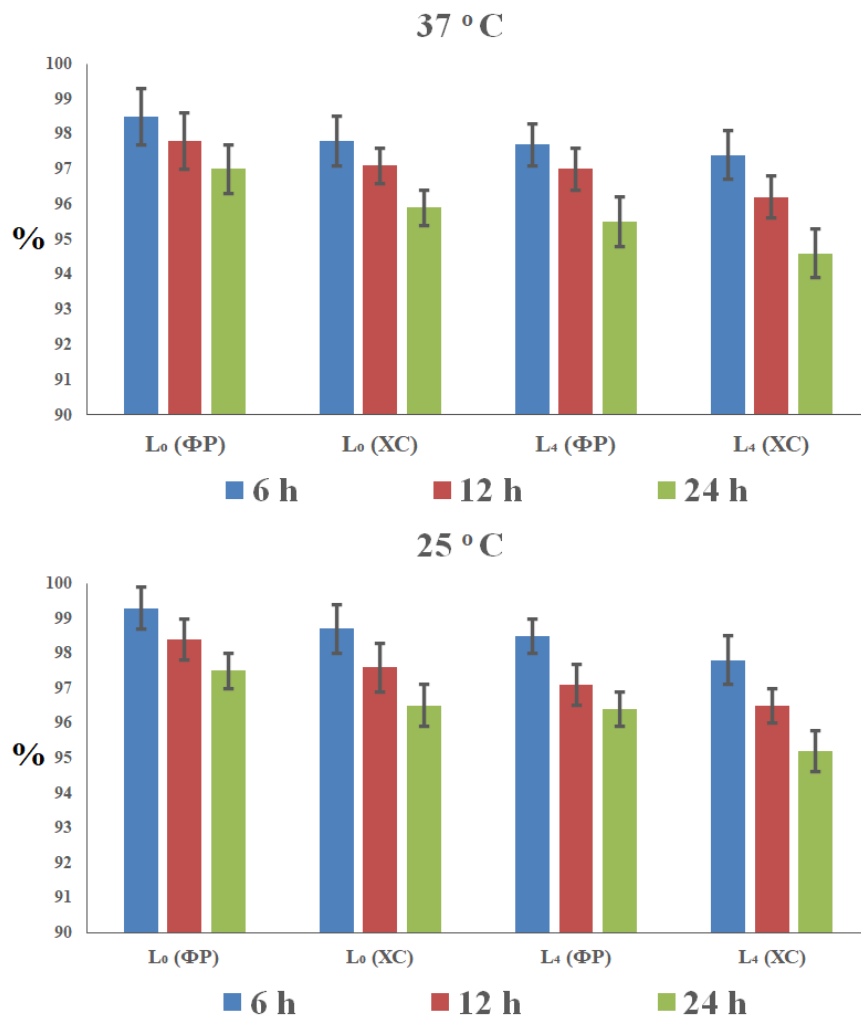
Хроматограми приказани на сликама 4.2.15–4.2.21 показују да се сви радиообележени липозоми детектују на почетку хроматографске траке ($R_f = 0,1-0,2$). Максимално обележавање се постиже након пола сата инкубације. Висока ефикасност обележавања ($> 80\%$) је постигнута за све липозомске формулације.

4.3. *In vitro* испитивања

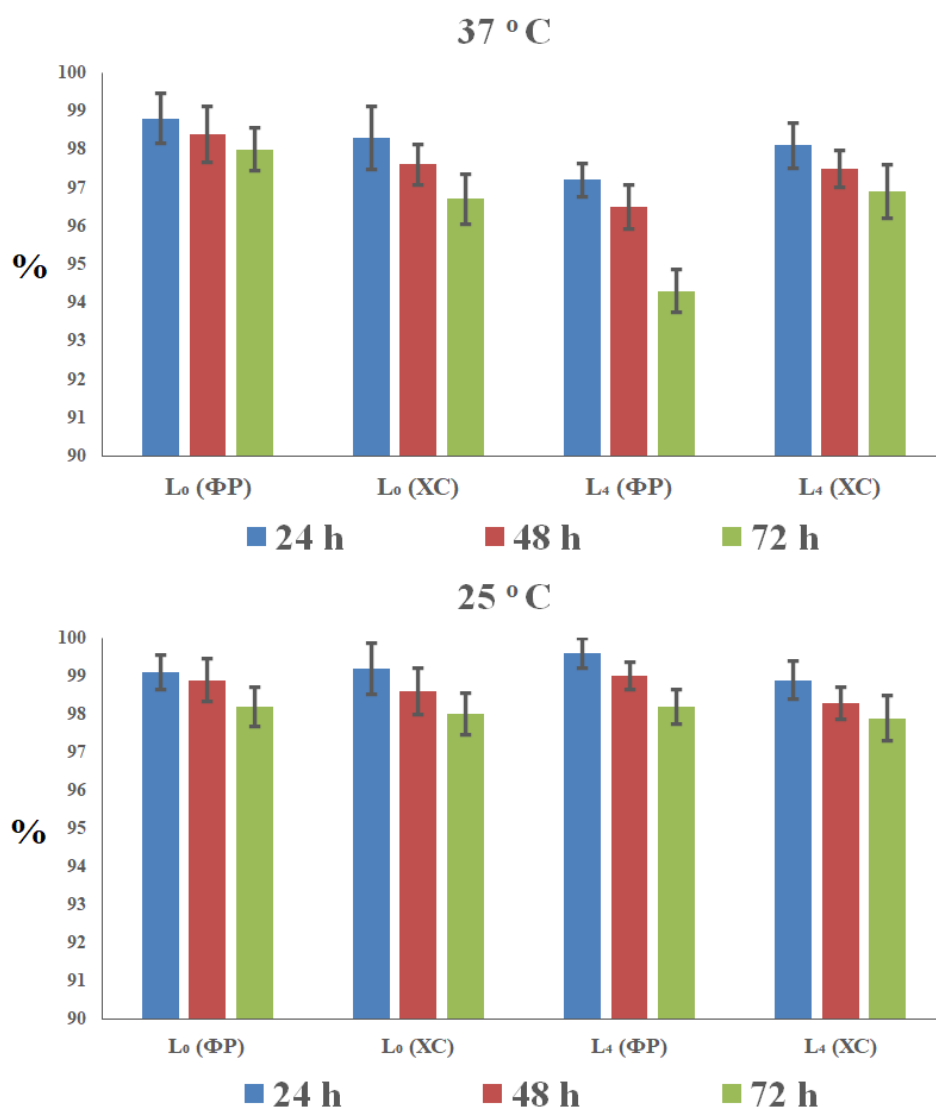
Резултати *in vitro* испитивања радиохемијске стабилности за радиообележене липозоме L_0 (контрола) и L_4 , као и механизам њиховог везивања за различите ћелијске линије ($T3T$, $CT26$ $LS174T$) приказани су у наставку.

4.3.1. *In vitro* стабилност радиообележених липозома

Липозоми L_0 и L_4 радиообележени са ^{99m}Tc или ^{177}Lu су инкубирани у физиолошком раствору или хуманом серуму, у току 24h и 72h, а резултати *ITLC* хроматографије су приказани на сликама 4.3.1 и 4.3.2.



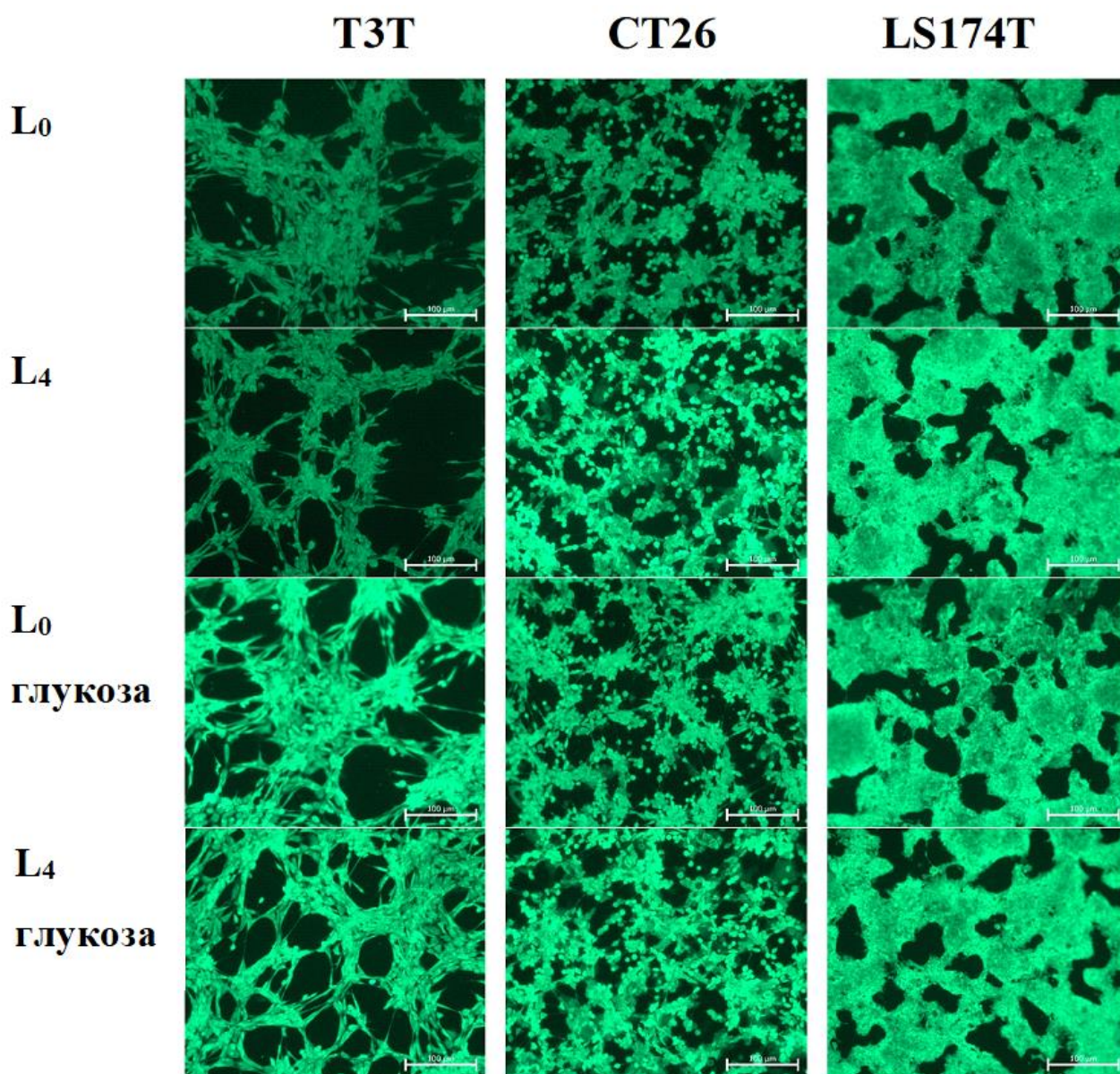
Слика 4.3.1 *In vitro* стабилност $^{99\text{m}}\text{Tc-L}_0$ и $^{99\text{m}}\text{Tc-L}_4$ у физиолошком раствору (ФР) и хуманом серуму (ХС) у периоду до 24 часа на различитим температурама инкубације (25 °C, 37 °C).



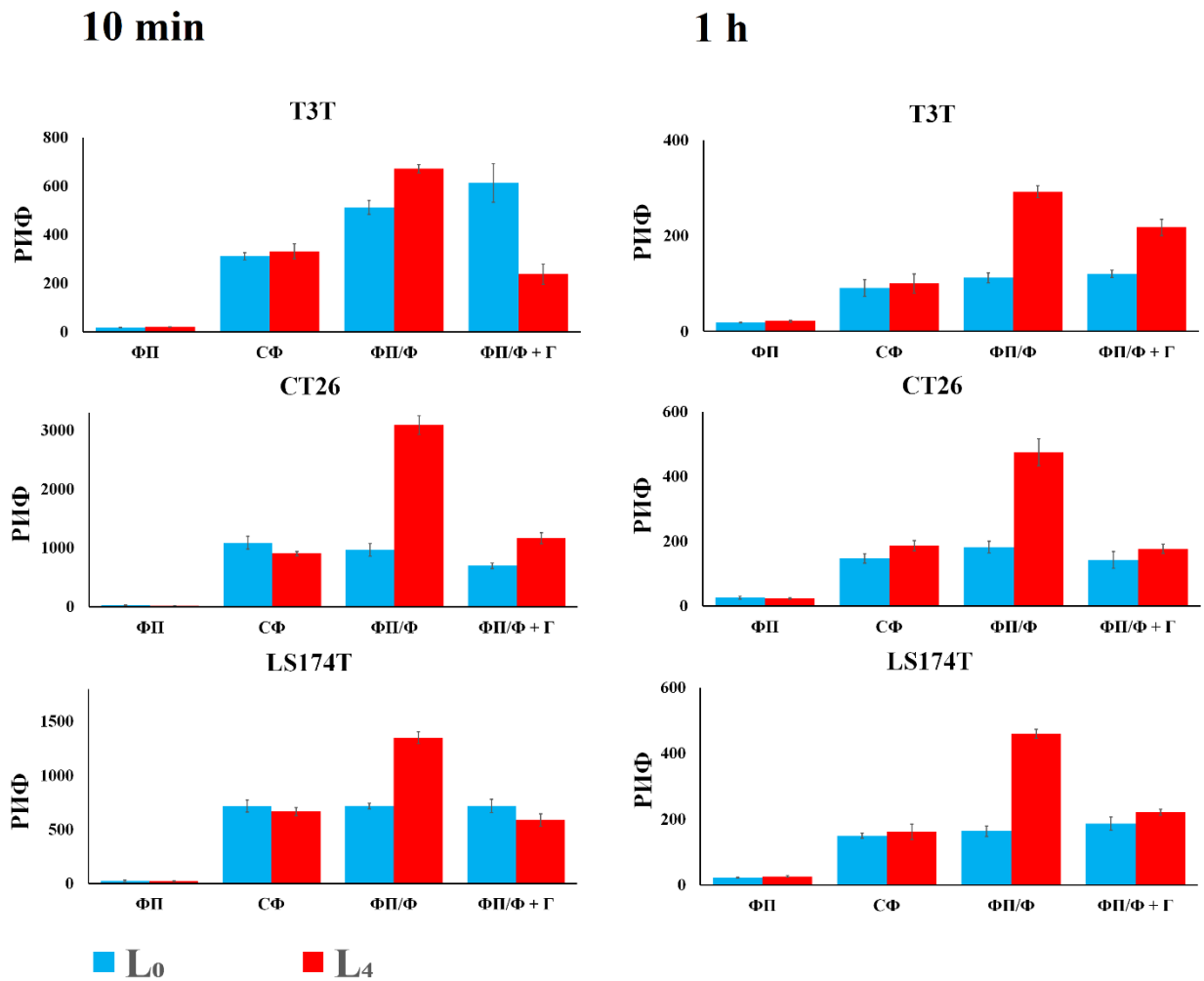
Слика 4.3.2 *In vitro* стабилност $^{177}\text{Lu-L}_0$ и $^{177}\text{Lu-L}_4$ у физиолошком раствору (ФР) и хуманом серуму (ХС) у периоду до 72 часа на различитим температурама инкубације (25 °C, 37 °C).

4.3.2. *In vitro* испитивање везивања L_0 и L_4 формулација липозома за ћелије различитих ћелијских линија детекцијом флуоресценције

На слици 4.3.3 су приказане различите ћелије које су инкубиране *in vitro* са липозомима напуњеним флуоресцеином. После испирања и лизирања ћелија квантификована је заостала флуоресценција у виду релативног интензитета флуоресценције. Са слике 4.3.4 може се уочити да постоји статистички значајна разлика између L_0 и L_4 који се везују за ћелије, као и да са додатком глукозе (1 mg/mL) долази до опадања РФИ вредности за L_4 док се за L_0 не уочава значајна разлика, за исту врсту ћелијске линије.



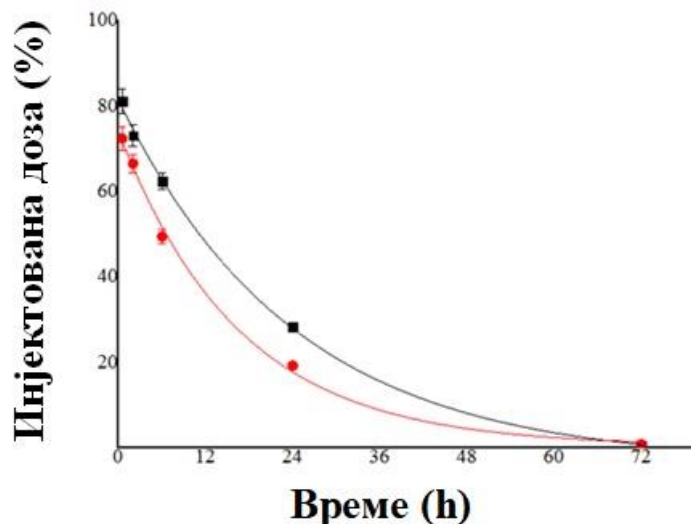
Слика 4.3.3 Флуоресцентни снимци различитих ћелија у присуству L_0 и L_4 са или без глукозе.



Слика 4.3.4 Релативни интензитет флуоресценције хелија које су инкубиране са L_0 и L_4 у присуству или одсуству глукозе: чист раствор *PBS*-а (ФП); слободан флуоресцеин (СФ); липозоми напуњени флуоресцеином (ФП/Ф); липозоми напуњени флуоресцеином уз додатак слободне глукозе (ФП/Ф + Г).

4.4. Резултати биолошке расподеле ^{177}Lu -липозома

Резултати *ex vivo* биодистрибуције ^{177}Lu -липозома, различитих формулација (L_0 и L_4), у тумор ($CT26$ и $LS174T$) индукованим $NOD-SCID$ мишевима приказани су у табелама 4.4.1 и 4.4.2 и на слици 4.4.1 за различите временске интервале (0,5h, 2h, 5h, 24h и 72h). Слика 4.4.1 приказује слободну циркулацију липозома $^{177}\text{Lu}-L_0$ и $^{177}\text{Lu}-L_4$ у крви мишева у току периода од 72 сата. Липозоми $^{177}\text{Lu}-L_0$ се дуже задржавају у циркулацији, у поређењу са $^{177}\text{Lu}-L_4$ липозомима. Након 24 сата уочава се значајан пад концентрације обе липозомске формулације а после 72 сата потпуно одсуство липозома у циркулацији.



Слика 4.4.1 Биодистрибуција липозома $^{177}\text{Lu}-L_0$ (црна крива) и $^{177}\text{Lu}-L_4$ (црвена крива) у крви мишева исказана у ИД %/.

У табелама 4.4.1 и 4.4.2 су приказани резултати *ex vivo* биодистрибуције $^{177}\text{Lu}-L_0$ и $^{177}\text{Lu}-L_4$ липозома по органима мишева за период од 72 сата. У првих 6 сати радиообележени липозоми обе формулације су присутни у већини органа, док после 24 сата долази до знатног опадања концентрације. Након 72 сата ^{177}Lu -липозоми су присутни у нешто већој мери само у бубрезима. Највећа акумулација ^{177}Lu -липозома у туморима је видљива после 2 сата ($^{177}\text{Lu}-L_0$) и 6 сати ($^{177}\text{Lu}-L_4$).

Табела 4.4.1 *Ex vivo* биодистрибуција $^{177}\text{Lu-L}_0$.

| Орган (%ИД/г) | 0,5 h | 2 h | 6 h | 24 h | 72 h |
|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Мозак | 0,6±0,2 | 0,4±0,1 | 0,3±0,1 | 0,1±0,1 | – |
| Срце | 8,1±1,6 | 2,2±0,5 | 0,3±0,2 | 0,2±0,1 | 0,2±0,1 |
| Плућа | 8,2±1,2 | 2,8±0,7 | 0,8±0,3 | 0,6±0,2 | 0,3±0,1 |
| Јетра | 3,0±1,1 | 2,7±1 | 1,6±0,3 | 1,4±0,3 | 1,2±0,3 |
| Слезина | 4,3±1,9 | 2,5±0,6 | 0,4±0,4 | 0,4±0,1 | 0,2±0,1 |
| Бубрези | 4,3±0,1 | 3,9±0,8 | 2,0±0,6 | 1,3±0,4 | 0,6±0,2 |
| Желудац | 1,9±0,5 | 1,3±0,1 | 0,8±0,2 | 0,3±0,1 | 0,2±0,1 |
| Црева | 1,9±0,3 | 1,5±0,4 | 1,8±0,4 | 0,3±0,1 | 0,1±0,1 |
| Мишић | 2,6±0,8 | 1,1±0,1 | 0,7±0,3 | 0,4±0,1 | 0,3±0,1 |
| <i>LS174T</i> | 1,0±0,3 | 1,9±0,4 | 0,6±0,1 | 0,3±0,1 | 0,2±0,1 |
| <i>CT26</i> | 1,7±0,2 | 2,2±0,7 | 0,9±0,2 | 0,8±0,2 | 0,1±0,1 |
| T ₁ /M* | 0,4±0,1 | 1,7±0,2 | 0,9±0,2 | 0,8±0,2 | 0,7±0,3 |
| T ₂ /M** | 0,7±0,2 | 2,0±0,3 | 1,3±0,2 | 2,0±0,3 | 0,3±0,2 |

*, ** – T₁/M и T₂/M представљају однос активности у туморима и мишићу.

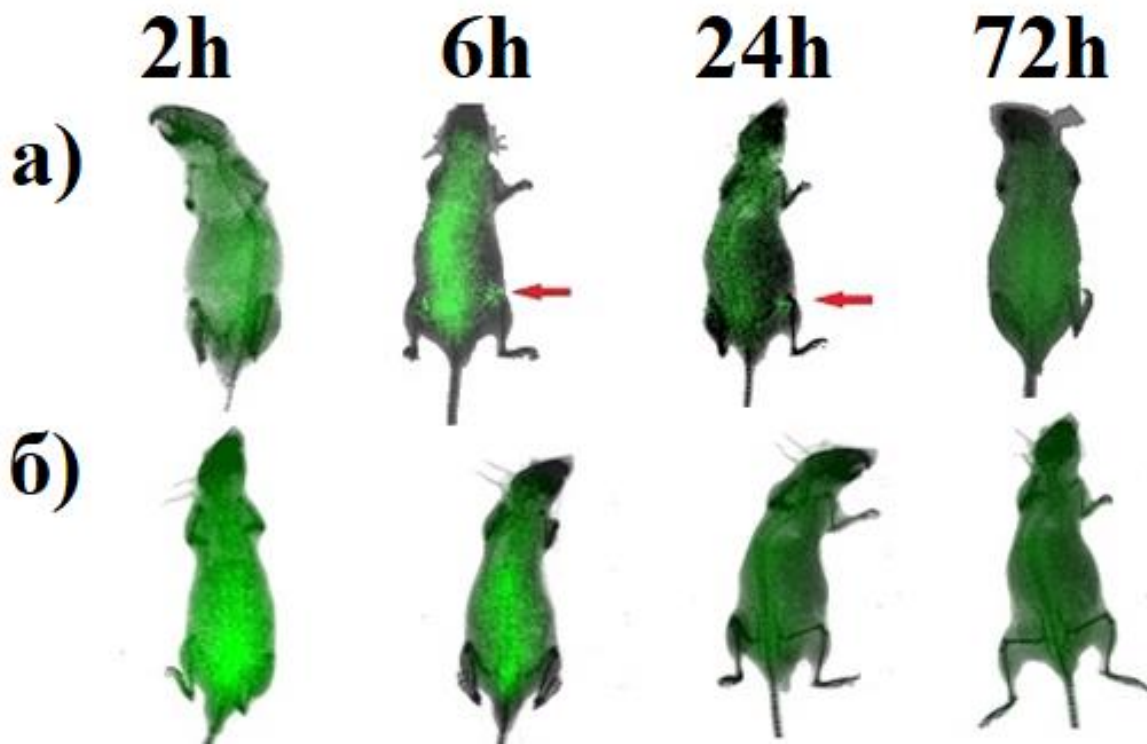
Табела 4.4.2 *Ex vivo* Биодистрибуција $^{177}\text{Lu-L}_4$.

| Орган (%ИД/г) | 0,5 h | 2 h | 6 h | 24 h | 72 h |
|---------------------|----------|---------|---------|---------|---------|
| Мозак | 0,6±0,1 | 0,4±0,1 | 0,3±0,1 | 0,2±0,1 | – |
| Срце | 6,8±0,8 | 3,6±1,0 | 1,4±0,3 | 0,5±0,3 | 0,4±0,1 |
| Плућа | 10,2±1,9 | 7,0±0,8 | 4,5±1,0 | 0,9±0,1 | 0,5±0,2 |
| Јетра | 5,2±0,8 | 3,5±0,7 | 3,9±0,4 | 2,2±0,8 | 1,7±0,4 |
| Слезина | 5,1±1,3 | 1,7±0,2 | 2,5±0,3 | 1,5±0,2 | 0,7±0,2 |
| Бубрези | 7,2±1,8 | 4,5±0,8 | 4,2±1,2 | 3,3±0,7 | 2,3±0,3 |
| Желудац | 5,0±1,2 | 1,6±0,3 | 0,8±0,2 | 0,5±0,2 | 0,3±0,1 |
| Црева | 2,1±0,4 | 2,3±0,2 | 2,3±0,5 | 1,1±0,3 | 0,3±0,1 |
| Мишић | 2,0±0,2 | 1,2±0,3 | 1,2±0,4 | 0,7±0,3 | 0,5±0,2 |
| <i>LS174T</i> | 3,1±0,7 | 3,2±0,5 | 5,8±0,2 | 4,8±0,5 | 0,8±0,2 |
| <i>CT26</i> | 2,5±0,6 | 3,6±0,4 | 5,1±1,1 | 4,5±0,5 | 0,7±0,1 |
| T ₁ /M* | 1,6±0,2 | 2,7±0,4 | 4,8±0,9 | 6,9±0,8 | 1,6±0,4 |
| T ₂ /M** | 1,3±0,2 | 4,3±0,7 | 3,0±0,3 | 6,4±1,1 | 1,4±0,3 |

*, ** – T₁/M и T₂/M представљају однос активности у туморима и мишићу.

На слици 4.4.2 приказани су снимци тумор (*LS174T*) индукованих *NOD-SCID* мишева након снимања *BRUKER® In-Vivo Xtreme II* уређајем, у временским интервалима од 2h, 5h, 24h и 72h, након интравенске администрације ^{177}Lu -радиообележених липозома, различитих формулација (*L₀* и *L₄*). У првих 6–12 часова видљив је интензиван сигнал, који потиче од ^{177}Lu -липозома у циркулацији. Висок интензитет сцинтилације се уочава и у срцу, плућима и

бубрезима. Код мишева којима су инјектовани $L_4-^{177}\text{Lu}$ липозоми, тумори су јасно видљиви 6–12 часова по инјектовању, за разлику од контролне групе.

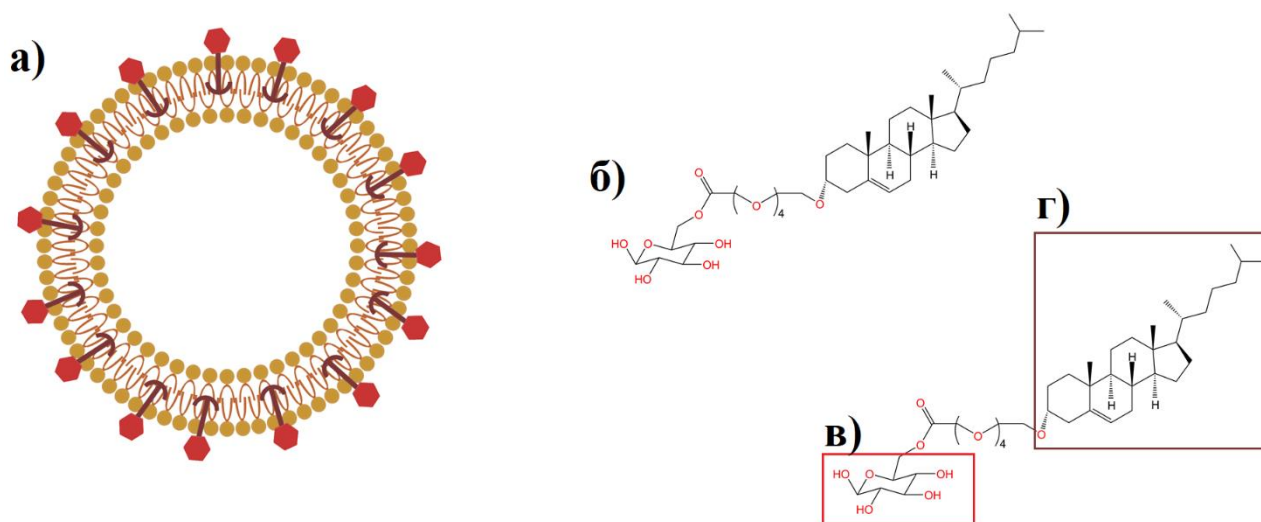


Слика 4.4.2 Биодистрибуција липозома по органима у периоду до 72 часа: а) $L_4-^{177}\text{Lu}$ липозоми б) $L_0-^{177}\text{Lu}$ липозоми (црвене стрелице показују тумор).

V ДИСКУСИЈА

5.1. Физичкохемијска својства липозома

Функционализација липозома је извршена процесом сидрења молекула *L* (слика 5.1.1), односно глюкозног деривата *CHOL*, који се састоји од неполарног дела (*CHOL*) и поларног дела (глюкозни остатак). Неполарни део деривата *L* се уграђује у липидни двослој док поларни, глюкозни остатак остаје на површини двослоја, оријентисан ка поларном раствору.



Слика 5.1.1 Схема липозома модификованих глюкозом: а) 2Д пресек липозома б) молекула *L* в) поларна група (глюкозни остатак) г) неполарни ланац (*CHOL* скелет).

5.1.1. DLS, ИСП–ОЕС и ТЕМ мерења

Увидом у резултате приказане у табели 4.1.1 може се уочити да сукцесивним повећавањем удела супстанце *L* у почетној липидној смеси долази до пораста R_{HYD} (85–115 nm) липозома и промене ζ , у опсегу од -19 mV до -31 mV, гледано од L_0 до L_5 формулације. Разлике између формулација L_0 – L_5 се могу објаснити чињеницом да услед инкорпорације супстанције *L* у двослој долази до концентровања и прерасподеле негативно наелектрисаних група на површини липозома. Ово директно условљава промену наелектрисања R_{HYD} и ζ липозома. Све формулације, укључујући и контролну, показују добре вредности ζ у погледу продужене циркулације у организму [32].

Код *PDI* вредности различитих формулација се не уочава јасан тренд промене. Најмању *PDI* (0,117) вредност односно највећу униформност показује формулација L_0 што је и очекивано пошто се ради о контролним *DPPC* липозомима који су добијени простим мешањем *DPPC* и *CHOL* молекула. Формулације L_1 – L_3 су релативно сличних униформности ($PDI \sim 0,2$) које су и даље у опсегу пожељних за даља биолошка испитивања. Са друге стране формулација

L_4 је показала најбољу ($PDI = 0,136$) а формулација L_5 најлошију ($PDI = 0,357$) униформност. Узимајућу у обзир само униформност, липозоми формулације L_4 су најсличнији контролним липозомама L_0 . Оквирно гледано просечни R_{HYD} свих липозома је у уском опсегу од ± 10 nm међутим присуство већих липозома, па чак и у малој количини, може довести до значајног пораста измерене PDI вредности. Разлог лежи у принципу рада DLS технике пошто интензитет расејане светлости (величина која се директно мери) знатно зависи од пречника честице ($\sim R_{HYD}^6$). То заправо значи да честица пречника 1000 nm расејава милион пута интензивније светлост од честице пречника 100 nm. Дакле, чак и незнатно присуство већих честица може значајно утицати на интензитет расејане светлости и довести до погрешних закључака у вези свеукупног односа величина и униформности честица које се мере. Такође, ово треба имати у виду пре коришћења липозома у *in vivo* истраживањима пошто постојање већих честица, па чак и у траговима, није пожељно. Разлог лежи у чињеници да су веће честице (> 200 nm) подложне лакој детекцији од стране МФС и последичном уклањању из циркулације [13,16]. Такође, ако је пречник крвног суда у одређеном органу мањи од пречника липозома (и других наночестица) може доћи до нагомилавања липозома у том органу, на основу њихове величине. Последично, димензије липозома могу утицати на смањену циркулацију и довести до губитка акумулације у тумору, што директно утиче на ефикасност доставе лека.

Пошто је формулација L_4 показала најбољу униформност може се претпоставити да је за њен липидни састав остварено најефикасније паковање и слагање $DPPC$, L и $CHOL$ молекула у липидном двослоју. Повећање ригидности или флексибилности липидног двослоја може довести до зачепљења пора мембране, пуцања и деформације липозома приликом екструдовања. Ово даље може довести до стварања липозома широког опсега величина односно смањене униформности, губитка липидне масе као и стварања честица које имају веће димензије од пора кроз које су екструдоване (услед физичке деформације и стварања издужених, несферичних липозома). Резултати из табеле 4.1.2 то и потврђују пошто формулације $L_1 - L_4$ имају јако сличне липидне концентрације у опсегу 3,2–3,6 mg/mL док формулација L_5 одступа од тог опсега и има најмању концентрацију и димензије које превазилазе димензије пора (> 100 nm). Резултати указују да је највероватније дошло до пуцања липозома L_5 приликом екструдовања а затим формирања агломерата.

Поређењем ТЕМ слика формулације L_0 и L_4 види се да оба типа липозома имају сферан и униламеларан облик, практично истих димензија у опсегу 80–90 nm. Разлика између пречника липозома који је одређен ТЕМ и DLS мерењима може се приписати постојању хидратационог слоја. Негативније наелектрисање односно ζ липозома L_4 у поређењу са L_0 липозомама доводи до снажније интеракције са молекулима растварача и стварања већег хидратационог слоја. Пошто DLS техника мери R_{HYD} честице, који укључује саму честицу као и њен хидратациони слој, логично је очекивати да честице буду мање када се гледају под ТЕМ микроскопом, који даје увид у физичке димензије. Такође, може се уочити формирање кластера L_0 липозома за разлику од L_4 . Највероватнији разлог за ово је чињеница да липозоми L_4 имају већу стабилност двослоја, услед присуства додатних молекула L , те нису толико осетљиви на промене у окружењу [34]. Приликом припреме узорака за ТЕМ снимање долази до њихове дехидратације односно сушења што може довести до пуцања липозома услед промене притиска и цурења воде и последично стварања кластера. Видимо да су липозоми L_4 знатно стабилнији на стрес у односу на L_0 липозоме што додатно потврђује претходне резултате о њиховој оптималној липидној структури.

Липозоми модификовани глукозом и истовремено пегилирани, су припремљени на липидној основи која одговара формулацији L_4 . Екструзија је вршена кроз мембране од 200 nm имајући у виду да су непегилирани липозоми екструдовани кроз мембране од 100 nm имали димензије у опсегу 80–100 nm а пегилирање доводи до раста димензија липозома [20]. Коришћењем мембрана са већим порамма омогућен је ефикаснији процес екструзије и већа униформност липозома. Резултати DLS мерења указују да сви пегилирани липозоми (P_1 – P_3) имају благо позитиван ζ (7,7 – 9,4 mV). Било је за очекивати да ће ζ липозома да се промени ка позитивнијим вредностима услед облагања PEG -ом али да ће остати благо негативан (– 5 mV) [207]. Вредности ζ указују на то да је дошло до значајног покривања површине липозома са PEG -ом тако да липидни молекули практично немају никакав контакт са околином. Такође, велика промена у уделу PEG -а (0,1–2,0 mg) гледано од формулације P_1 ка P_3 доводи до незнатне промене ζ , од око 1 mV између формулација. Овај податак говори да је и најмања количина коришћеног PEG -а резултовала потпуним облагањем липозома.

Вредност R_{HYD} пегилираних липозома је такође велика и неповољна за даља биолошка испитивања. Једино формулација P_1 има задовољавајуће димензије, мање од 200 nm, док су формулације P_2 а посебно P_3 ван тог опсега. Међутим, све три формулације су показале јако висок ниво хетерогености ($PDI > 0,3$) који није повољан за биолошка испитивања. Имајући ово у виду може се закључити да је приликом пегилирања липозома модификованих глукозом највероватније дошло до умрежавања молекула PEG -а, између два или више липозома што је довело до хетерогене расподеле величина, увећаних димензија као и позитивног ζ . Због високе хетерогености као и чињенице да су глукозни остаци на површини липозома вероватно у потпуности прекривене PEG -ом може се закључити да овакви пегилирани липозоми нису подобни за даља биолошка испитивања, услед одсуства могућности да дође до интеракције глукозних остатака са ћелијама канцера. Може се закључити да процес пегилирања није повољан као додатан вид модификације липозома модификованих глукозом и да га је у будућим истраживањима потребно изоставити или додатно оптимизовати.

Липозоми модификовани глукозом и напуњени са МНЧ (M_1 – M_2) су синтетисани на липидној основи L_4 . У тренутку синтезе је постојала радна претпоставка да ће се МНЧ сместити унутар језгра липозома те је екструзија вршена кроз мембране чије су поре 200 nm. Ово је учињено како би се направили липозоми са довољно великом унутрашњом запремином, способном да обухвати неколико МНЧ. Коришћене МНЧ (~ 10 nm) су добијене стандардном методом копреципитације, која је описана у литератури [130]. Резултати DLS мерења указују на добру подударност између ζ и R_{HYD} липозома напуњених са МНЧ (M_1 – M_2) и контролне формулације липозома M_0 . То значи да пуњење липозома модификованих глукозом са МНЧ не доводи до видљивих физичкохемијских промена. Такође, све три формулације имају сличан и релативно добар степен униформности ($PDI \sim 0,2$) и практично исте липидне концентрације после екструдовања (~ 4,5 mg/mL). ИСП–ОЕС мерења концентрације гвожђа у M_1 и M_2 липозомима после синтезе даје увид у степен енкапсулације односно, информације о ефикасности пуњења липозома са МНЧ. Видимо да обе формулације показују висок ниво пуњења са МНЧ, који је нешто већи за M_1 формулацију. Очекивано је да формулација M_1 има већи степен пуњења пошто је коришћена знатно мања концентрација МНЧ у односу на M_2 . На тај начин остварује се већи однос липид/МНЧ, што резултује већом ефикасношћу пуњења.

ТЕМ микрографи липозома M_0 – M_2 , приказани на сликама 4.1.3–4.1.5, приказују једноламеларни липозоме релативно сличних димензија (130–140 nm) и сферичног облика.

Разлика између R_{HYD} и физичког пречника који се види на ТЕМ снимцима се може објаснити на исти начин као и у случају L_0 и L_4 липозома. Блага деформација липозома се јавља како расте концентрација МНЧ, што је и очекивано пошто липозоми имају додатан фактор стреса у облику МНЧ терета, који утиче на стабилност липидног двослоја и може довести до пуцања липозома. Као и на ТЕМ сликама липозома L_4 и код липозома M_0 се не уочава пуцање односно кластеризација, што је још једна потврда добро одабраног липидног састава. Облик и одсуство МНЧ у деформисаним M_2 липозомима, као и високо присуство МНЧ ван липозома указује да је дошло до пуцања одређених липозома приликом припреме за ТЕМ снимање и последичног изливања МНЧ у околни простор.

5.1.2. Инфрацрвена спектроскопија

Због боље прегледности одговарајуће молекулске траке уочене на ИЦ спектрима различитих липозома (слика 4.1.6–4.1.9) су представљене и асигниране у табели 5.1.1. Анализом ИЦ спектра липозома L_0 (слика 4.1.6) може се извршити асигнација одговарајућих молекулских трака: пикови на 2920 cm^{-1} и 2850 cm^{-1} се приписују CH_2 антисиметричним и симетричним истежућим вибрацијама ацилних ланаца; трака на 1740 cm^{-1} потиче од $\text{C}=\text{O}$ истежуће вибрације; на 1465 cm^{-1} се уочава CH_2 маказаста вибрација; траке на 1060 cm^{-1} и $1230\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ се приписују симетричним и антисиметричним PO_2^- вибрацијама; пикови на 721 cm^{-1} и 970 cm^{-1} се приписују $-\text{N}^+[\text{CH}_3]_3$ симетричном и асиметричном истезању. Такође, у области $3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ се може приметити широка трака која потиче од $\text{O}-\text{H}$ истежућих вибрација молекула воде, који нису у потпуности уклоњени пошто су узорци сушени на ваздуху пре снимања ИЦ спектра. Добијени ИЦ спектар за липозоме L_0 се у потпуности слаже са резултатима за *DPPC* липозоме који се могу пронаћи у литератури [208,209].

Липозоми L_4 показују карактеристичне ИЦ траке у области $1020\text{--}1150\text{ cm}^{-1}$ и $1630\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$ које се приписују $\text{C}-\text{O}$ истежућим вибрацијама унутар глукозног остатка. Остале карактеристичне траке које се могу уочити на ИЦ спектру L_4 липозома (слика 4.1.7) се јако добро слажу са карактеристичним ИЦ тракама липозома L_0 . Дакле, ИЦ спектроскопијом је утврђено присуство глукозе на површини *DPPC* липозома, што значи да је процес синтезе односно модификације липозома глукозом успео.

Код пегилираних липозома у ИЦ спектру (слика 4.1.8) је тешко уочити значајне промене у поређењу са L_0 и L_4 липозомима. Разлог лежи у томе што се карактеристичне траке *PEG*-а јављају у областима $1000\text{--}1180\text{ cm}^{-1}$ које су прекривене интензивним PO_2^- вибрацијама и у области $2800\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$ која је прекривена CH_2 истежућим вибрацијама [210]. Може се приметити да у тим областима долази до појачавања интензитета трака ($2800\text{--}2900\text{ cm}^{-1}$) и раслојавања ($1000\text{--}1180\text{ cm}^{-1}$) услед купловања CH_2 и $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ вибрација *PEG*-а са CH_2 и PO_2^- вибрацијама *DPPC* молекула. На 1372 cm^{-1} се уочава који се приписује $\text{O}-\text{H}$ вибрацијама на крајевима *PEG* молекула и јасно дефинисан пик на 970 cm^{-1} који се приписује $-\text{N}^+[\text{CH}_3]_3$ асиметричном истезању код *DPPC* молекула. Остале ИЦ траке се подударују са тракама код L_0 и L_4 липозома [209,210].

Липозоми напуњени са МНЧ имају специфичан ИЦ спектар (слика 4.1.9) услед појаве широких трака које потичу од МНЧ. Трака у области $520\text{--}580\text{ cm}^{-1}$ се приписује вибрацији $\text{Fe}-\text{O}$ везе у Fe_3O_4 кристалној решетки [211]. Даље, траке видљиве у областима $1400\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ и

3420–3950 cm^{-1} се приписују вибрацијама О–Н група унутар молекула воде адсорбованих на Fe_3O_4 кристал [211]. На спектру се могу уочити карактеристични пикови на 2920 cm^{-1} и 2850 cm^{-1} CH_2 истежућих вибрација, као и код осталих липозома, међутим овде су јако слабог интензитета. Такође, на спектру је могуће уочити широку траку у области 900–1100 cm^{-1} која се може приписати PO_2^- вибрацијама.

Табела 5.1.1 Асигнација молекулских трака присутних у ИЦ спектрима различитих липозома

| Вибрација | Таласни број $\tilde{\nu}$ [cm^{-1}] | L_0 | L_4 | P_1 | M_3 |
|--|--|-------|-------|-------|-------|
| CH_2 (<i>DPPC</i>) | 2920 | + | + | + | + |
| истежуће симетричне и антисиметричне | 2850 | + | + | + | + |
| $\text{C}=\text{O}$ (<i>DPPC</i>) истежуће | 1740 | + | + | + | + |
| CH_2 (<i>DPPC</i>) маказаста | 1465 | + | + | + | – |
| PO_2^- (<i>DPPC</i>) | 1060 | + | + | + | + |
| истежуће симетричне и антисиметричне | 1230–1250 | + | + | + | + |
| $-\text{N}^+[\text{CH}_3]_3$ (<i>DPPC</i>) | 721 | + | + | + | – |
| истежуће симетричне и антисиметричне | 970 | + | + | + | – |
| О–Н (H_2O) истежуће | 3200–3400 | + | + | + | – |
| С–О (глукозни остатак) | 1020–1150 | – | + | + | + |
| истежуће | 1630–1670 | – | + | + | + |
| О–Н (<i>PEG</i>) | 1372 | – | – | + | – |
| Fe–O (Fe_3O_4) | 520–580 | – | – | – | + |
| О–Н | 1400–1700 | – | – | – | + |
| (H_2O адсорбован на Fe_3O_4) | 3420–3950 | – | – | – | + |

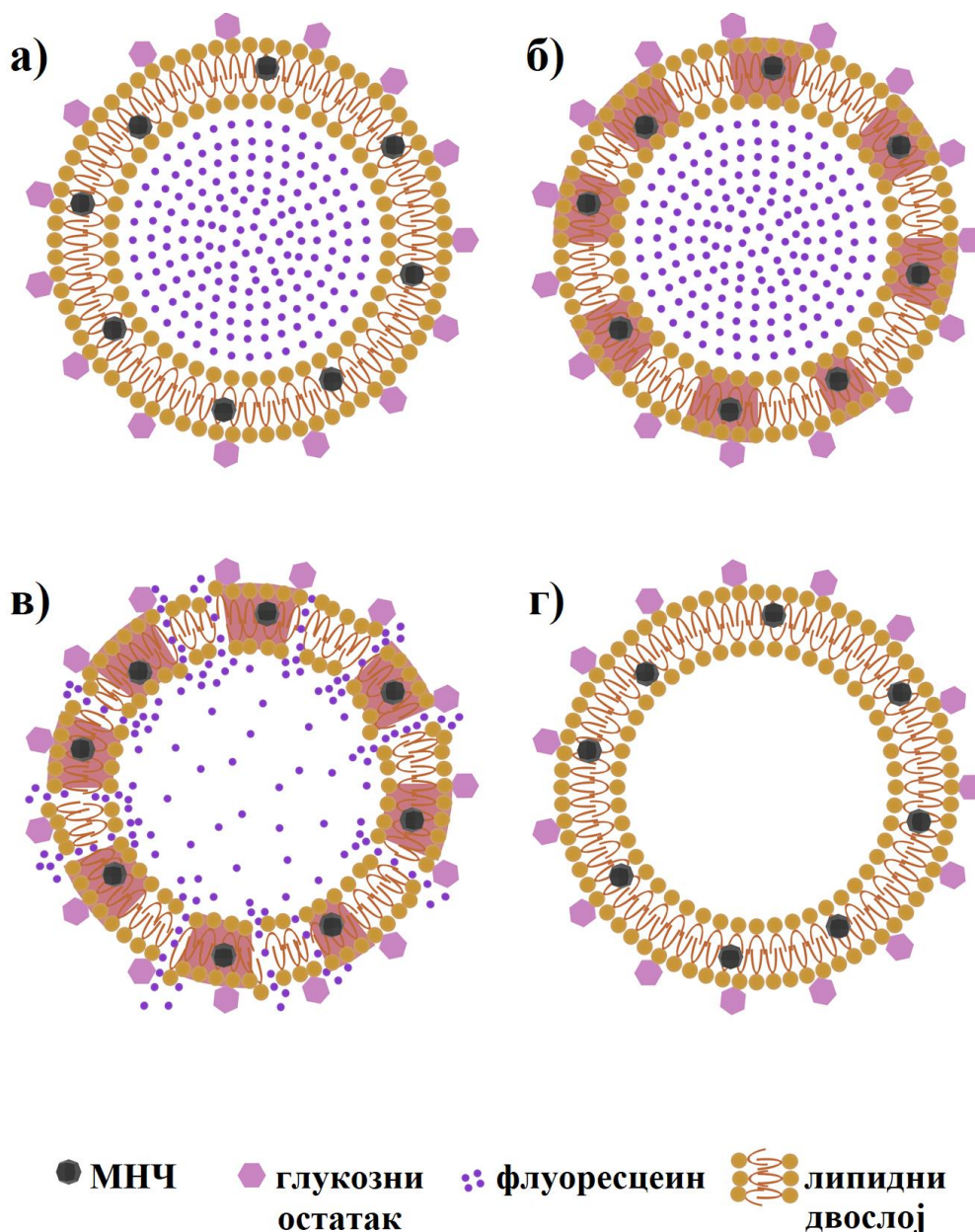
5.1.3. Отварање липозома у променљивом магнетном пољу

Отпуштање флуоресцеина из липозома услед деловања магнетног поља (слика 4.1.10) указује на то да се највећи део отпуштања деси у току првих 10 минута, за M_1 и за M_2 липозоме. Продужавање времена излагања липозома у магнетном пољу, после 10 минута, доводи до мале промене у количини отпуштеног флуоресцеина и то са 20,5 % на 24,9 % за M_1 и са 70,7 % на 85,1 % за M_2 . Поређењем са контролним липозомима M_0 код којих дође до отпуштања 2,5 % флуоресцеина после 20 минута јасно је да МНЧ омогућавају ефикасан и поуздан начин за

отварање липозома модификованих глукозом. Степен отпуштања флуоресцеина није сразмеран концентрационој разлици МНЧ између липозома што је последица густог паковања МНЧ у M_2 липозомима.

Током извођења мерења није уочена промена температуре узорка што значи да је механизам отварања липидног двослоја изазван локалним а не макроскопским загревањем. Да би дошло до макроскопског загревања узорка, концентрација МНЧ мора бити већа од неке минималне концентрације, која зависи од облика, величине и магнетних својстава коришћених МНЧ. У случају МНЧ које су добијене копреципитационом методом и коришћене у овом истраживању, тај концентрациони праг износи око 2 mg/mL, према подацима из литературе [129]. Имајући у виду концентрацију МНЧ енкапсулираних у липозомима, после магнетне декантације (0,171 – 1,366 mg/mL), јасно је да не може доћи до макроскопског грејања узорка.

Не постоје директни докази да ли се МНЧ налазе унутар липидног двослоја или унутар језгра. Пуњење липозома на бази *DPPC* са Fe_3O_4 МНЧ је вршено према идентичној процедури описаној у литератури [128]. У наведеној литератури аутори тврде да је дошло до уградње МНЧ у липидном двослоју па се може претпоставити да је то случај и код липозома M_1 и M_2 . Такође, имајући у виду одсуство макроскопског загревања узорка, логично је претпоставити да се отварање липозома одвија посредством локализованих „врућих тачака“ у близини МНЧ (слика 5.1.2). Имајући у виду димензије „врућих тачака“ (0,5–20 nm) као и чињеницу да температура драстично опада удаљавањем од МНЧ може се закључити да ефикасно отварање релативно великих липозома (~130 nm) не би било могуће у случају да су МНЧ смештене у језгру.



Слика 5.1.2 Принцип отварања липозома M_1 и M_2 у магнетном пољу: а) МНЧ су смештене у липидни двослој липозома који је напуњен са флуоресцеином б) примена магнетног поља изазива локално загревање МНЧ в) топлота са МНЧ се преноси на липидни двослој при чему долази до његовог отварања и испуштања флуоресцеина д) празан липозом.

5.2. Радиохемијска чистоћа и стабилност липозома

Делимична растворљивост липозома односно липидног слоја у различитим мобилним фазама је највероватније довела до отпуштања појединачних молекула $DPPC$ -а као и ^{99m}Tc . Упркос томе радиохемијска чистоћа свих радиообележених ^{99m}Tc -липозома (слике 4.2.2–4.2.7) је веома висока (90 %). Радионуклид ^{99m}Tc је познат по високој ефикасности везивања за $DPPC$ молекуле, односно за фосфатне групе, као што је описано у литератури [200,212].

Разлика између ^{99m}Tc везивања за L_0 и L_4 је изузетно мала и износи око 0,5–1 % за различите мобилне фазе. Са друге стране разлика између L_4 и L_1 – L_3 формулација се креће у опсегу $\pm 0,5$ –1,5 %, при чему је најдрастичнија разлика између L_5 и осталих липозома (~ 2 –3 %). Иако сви припремљени липозоми показују висок степен радиохемијске чистоће формулација L_5 има највећи удео слободног ^{99m}Tc .

Радиообележавање липозома са радионуклидом ^{131}I није показало високу ефикасност обележавања ($< 20\%$). Приликом испитивања радиохемијске стабилности *ITLC* радиохроматографијом са ФР као мобилном фазом уочен је висок удео слободног ^{131}I ($> 80\%$). Пошто ФР заправо опонаша основни раствор у коме се липозоми налазе, други растварачи (различите рН вредности и поларности) нису коришћени за даља испитивања. Поред методе директног везивања испитана је и метода обележавања липозома у присуству хлорамина-Т, која такође није побољшала ефикасност радиообележавања са ^{131}I . Иако је у принципу могуће извршити додатне кораке пречишћавања и концентровања ^{131}I –липозома ово је изостављено. Разлози су непотребно излагање радиоактивности и непожељно накупљање ^{131}I у ткиву штитасте жлезде приликом продуженог рада. Такође, финална формулација ^{131}I –липозома би имала смањену липидну концентрацију а сами липозоми би потенцијално претрпели оштећења током сепарације. Сходно неповољним резултатима који су добијени приликом испитивања радиохемијске чистоће ^{131}I –липозома, изостављена су даља *in vitro* и биодистрибутивна истраживања.

Слободан ^{177}Lu показује варијације у понашању у зависности од мобилне фазе која се користи. За NaAcOH и AcOEt са фронтом мобилне фазе ($R_f = 0,9$ – $1,0$) путује преко 80 % активности док за ФР и MeOH долази до ретенције активности дуж хроматографске траке тако да само 70 % активности путује са фронтом ($R_f = 0,8$ – $1,0$). Остатак активности код свих мобилних фаза се детектује за $R_f = 0,2$ – $0,8$ док на самом почетку ($R_f = 0,0$ – $0,1$) практично нема слободног ^{177}Lu . У зависности од рН вредности раствора Lu се може наћи у различитим хемијским облицима попут Lu^{3+} , $\text{Lu}(\text{OH})_2$ и $\text{Lu}(\text{OH})_3$ [213,214]. Lu се лако раствара чак и у slabим киселинама, при чему је скоро искључиво присутан у облику хидратисаног Lu^{3+} јона ($[\text{Lu} \cdot (\text{H}_2\text{O})_n]^{3+}$, $n = 7 - 9$). Ово објашњава зашто код слободног Lu највећи део активности не путује са фронтом мобилне фазе, већ долази до расподеле дуж траке, услед постојања више различитих хемијских облика. Такође, чак и мала промена рН вредности раствора, као у случају NaAcOH , доводи до промене равнотеже између концентрација присутних хемијских врста (нпр. превођењем $\text{Lu}(\text{OH})_3$ у $[\text{Lu} \cdot (\text{H}_2\text{O})_n]^{3+}$), што последично утиче на облик хроматограма.

Хроматограми ^{177}Lu –липозома (слике 4.2.16–4.2.21) у поређењу са хроматограмима за слободан ^{177}Lu (слика 4.2.15) указују да радиообележени липозоми остају на почетку ($R_f = 0,0$ – $0,1$) колоне. Максимално обележавање се остварује после пола сата инкубације за све липозомске формулације (L_0 – L_5). Остварен је висок степен обележавања и чистоће ($> 90\%$) за све липозоме при чему формулација L_5 показује најмању стабилност. Може се приметити да се дуж колоне и на фронту мобилне фазе детектује додатна активност када се као мобилна фаза користи NaAcOH . Ово је највероватније последица промене рН вредности средине у којој се липозоми налазе, приликом чега долази до повећаног формирања различитих хидрата Lu . Тачан механизам везивања ^{177}Lu за *DPPC* липозоме није познат али највероватније долази до формирања комплекса између фосфатне групе *DPPC* молекула и $^{177}\text{Lu}^{3+}$, као што је случај код сличних једињења [173].

5.3. *In vitro* стабилност липозома

In vitro стабилност радиообележених липозома је праћена мерењем радиохемијске чистоће липозома у ФР и ХС, за различита времена и температуре инкубације. За ^{99m}Tc -липозома измерена *in vitro* стабилност износи преко 95 % (слика 4.3.1) док за ^{177}Lu -липозома износи преко 94 % (слика 4.3.2). Резултати указују на одличну *in vitro* стабилност радиообележених липозома обе формулације (L_0 и L_4) која је независна од експерименталних параметара попут типа раствора, температуре и времена инкубације. Такође, између формулација L_0 и L_4 није уочена значајна разлика приликом посматрања *in vitro* стабилности без обзира на радионуклид којим је вршено радиообележавање као и температуру на којој је вршена инкубација. Ово је последица ефикасног радиообележавања липозома са радионуклидима ^{99m}Tc и ^{177}Lu и стварања стабилне везе метал-липозом.

Резултати приказани на слици 4.3.4 показују да не постоји значајна разлика између РИФ вредности липозома L_0 у присуству или одсуству слободне глукозе, за исти тип ћелијских линија са којом је вршена инкубација ($T3T$, $CT26$ и $LS174T$). Такође, не постоји значајна разлика између РИФ вредности за слободан флуоресцеин и липозома L_0 . У случају L_4 липозома РИФ вредности су значајно веће у одсуству глукозе, у поређењу са аналогним вредностима са L_0 . Дакле, резултати указују на већу акумулацију L_4 липозома у или на ћелијама, у односу на L_0 липозома. У присуству слободне глукозе РИФ вредности за L_4 липозома значајно опадају док су код L_0 липозома непромењене. Овај податак директно потврђује постојање конкуренције између слободне глукозе и липозома L_4 приликом везивања за ћелије, односно за $GLUT$ рецепторе. Важно је напоменути и да се РИФ вредности за L_4 липозома значајно разликују од врсте ћелије, при чему важи $\text{РИФ}_{T3T} < \text{РИФ}_{CT26} < \text{РИФ}_{LS174T}$. Пошто ћелије канцера имају знатно више $GLUT$ рецептора на површини, у поређењу са здравим ћелијама, очекивано је да дође до бројнијег везивања L_4 липозома за њих, што директно доводи до пораста РИФ вредности.

Важно је напоменути да израчунате p -вредности приликом поређења РИФ вредности за L_4 са и без слободне глукозе, имају знатно бољи степен поузданости, од оног који је постављен као статистички значајан. Тако је $p = 0,005$ за $T3T$ (1 h), $p = 0,003$ за $CT26$ (1 h), и $p < 0,001$ за све остале случајеве. Такође, p -вредности приликом поређења РИФ вредности за L_0 и L_4 у одсуству глукозе износе: $p = 0,002$ за $T3T$ (10 min) и $CT26$ (1 h), а за све остале случајеве важи $p < 0,001$. Ови резултати јасно и недвосмислено указују на значајну разлику између *in vitro* понашања L_0 и L_4 липозома. Пошто је једина разлика између ових липозома присуство супстанце L , на основу представљених резултата може се закључити да се липозоми модификовани глукозом (L_4) специфично везују за ћелије посредством $GLUT$ рецептора, пошто на својој површини имају глукозне остатке који то омогућавају.

Резултати испитивања *in vitro* понашања липозома модификованих глукозом недвосмислено потврђују радну хипотезу на којој је засновано истраживање. Такође, представљени резултати не могу са сигурношћу тврдити да ли долази до интернализације липозома модификованих глукозом од стране ћелија процесом ендоцитозе, или су липозоми везани за површину ћелије, преко $GLUT$ рецептора. Највероватније се оба процеса одвијају истовремено и сукцесивно, на такав начин да долази до везивања липозома за $GLUT$ рецепторе што омогућава олакшану ендоцитозу. Пошто су $GLUT$ рецептори заправо канали мало је вероватно да липозоми тим путем уђу у унутрашњост ћелије, због своје величине и осталих

физичкохемијских својстава (попут наелектрисања). Са друге стране, процес ендоцитозе липозома од стране ћелија је врло вероватан и добро описан у литератури [26,29,37,122,215].

5.4. Биодистрибуција радиообележених ^{177}Lu -липозома

Циркулација $^{177}\text{Lu-L}_0$ и $^{177}\text{Lu-L}_4$ липозома у крви експерименталних животиња је приказана на слици 4.4.1. Понашање $^{177}\text{Lu-L}_0$ и $^{177}\text{Lu-L}_4$ липозома у слободној циркулацији је веома слично. Липозоми $^{177}\text{Lu-L}_0$ су се задржали у крви нешто дуже од липозома $^{177}\text{Lu-L}_4$. Међутим, уочава се да активност у крви полако опада са временом за обе формулације: $81,1 \pm 3,0$ %ИД $^{177}\text{Lu-L}_0$ липозома је присутно у крви пола сата по инјектовању док је активност $^{177}\text{Lu-L}_4$ у крви за исто време значајно мања $72,4 \pm 2,8$ %ИД. После 72 сата мање од 1 %ИД остаје у крви, за обе липозомске формулације. Разлика између односа %ИД је највероватније последица бржег накупљања $^{177}\text{Lu-L}_4$ у појединим органима али и туморима, што се се може видети из резултата приказаних у табелама 4.4.1 и 4.4.2. Липозоми обе формулације имају сличне димензије, али постоји разлика у ζ . Тако је ζ липозома L_0 ($-18,4$ mV) повољнији за продужену циркулацију у односу на L_4 ($-28,3$ mV). Такође, присуство глукозних остатака на површини L_4 може довести до њиховог везивања за *GLUT* рецепторе здравих ћелија и последичне акумулације у здравом ткиву. Ови фактори доприносе бржем опадању концентрације $^{177}\text{Lu-L}_4$ у циркулацији, у поређењу са $^{177}\text{Lu-L}_0$.

Висока концентрација радиообележених липозома у крви је детектована и до 6 сати после интравенске администрације липозома *NOD-SCID* мишевима (слика 4.4.2). Постепено опадање позадинског сигнала приликом сцинтиграфије је уочљиво на слици 4.4.2 и одговара резултатима приказаним на слици 4.4.1. Због сличних физичкохемијских својстава липозома L_0 и L_4 попут ζ , величине и липидног састава није очекивано да дође до драматичне разлике у накупљању липозома у здравом ткиву. Обе врсте липозома се неспецифично везују за површину ћелија путем електростатичких и/или хидрофобних интеракција. Такође, као што је напоменуто липозоми L_4 би требало да се специфично везују за *GLUT* рецепторе на ћелијама, што затим може довести до ендоцитозе липозома од стране ћелија и додатне ретенције активности у ткиву. Само на основу сцинтиграфских мерења није могуће прецизно одредити који тип везивања је доминантан код L_4 липозома, проста адсорпција или специфично везивање за површину ћелије.

За разлику од здравог ткива, код ког је тешко утврдити видљиву разлику у биодистрибуцији липозома, код тумора је очигледна разлика (слика 4.4.2). Тумори *LS174T* су јасно видљиви на слици 4.4.2 после 6 и 24 сата за липозоме $^{177}\text{Lu-L}_4$ док код липозома $^{177}\text{Lu-L}_0$ нису уочљиви. Приликом разматрања циркулације липозома најважнији фактор је величина честица. Липозоми који имају димензије мање од 100 nm слабије интерагују са протеинима у плазми, избегавају МФС и остају дуже у циркулацији [13]. Пошто обе врсте липозома имају практично исте димензије, као што се види са ТЕМ снимака, закључак је да њихова величина не може бити главни фактор који утиче на накупљање у туморима. Односно, прецизније речено, *EPR* ефекти имају мали утицај на накупљање $^{177}\text{Lu-L}_4$ липозома у туморима. Пошто је једина разлика између L_0 и L_4 липозома присуство молекула *L* у липидном двослоју може се закључити да модификација липозома са глукозом доводи до везивања за *GLUT* рецепторе на ћелијама канцера. Последично, затим највероватније долази до ендоцитозе липозома $^{177}\text{Lu-L}_4$

од стране ћелија канцера, што доводи до накнадног задржавања активности у њима, и до 72 сата после инјектовања липозома.

Резултати представљени у табелама 4.4.1 и 4.4.2 омогућавају поређење активности односно биодистрибуцију липозома по органима тумор индукованих *NOD-SCID* мишева. Липозоми $^{177}\text{Lu-L}_0$ и $^{177}\text{Lu-L}_4$ се углавном накупљају у органима попут срца, плућа, јетре и слезине, при чему је максимална активност измерена пола сата после интравенске администрације липозома. Липозоми $^{177}\text{Lu-L}_4$ показују значајно веће накупљање у свим органима у поређењу са $^{177}\text{Lu-L}_0$ липозомима ($p < 0,05$).

Познато је да фагоцитне ћелије МФС лако и брзо елиминишу липозоме из циркулације, што доводи до смањене терапеутске ефикасности антитуморских препарата које носе. Резултати биодистрибуције указују да су обе врсте липозома у великој количини елиминисане од стране МФС, што се огледа у повећаној активности јетре, плућа и слезине као органа асоцираних са МФС [134,139,216]. Међутим, активност у овим органима је значајно већа за $^{177}\text{Lu-L}_4$ у поређењу са $^{177}\text{Lu-L}_0$. Објашњење лежи у продуженој циркулацији $^{177}\text{Lu-L}_0$ липозома услед разлике у ζ и последично споријој елиминацији од стране МФС. Такође, не треба занемарити ни чињеницу да $^{177}\text{Lu-L}_4$ липозоми могу да се вежу за *GLUT* рецепторе здравих ћелија, доводећи до повећане акумулације и у здравом ткиву.

Активност липозома $^{177}\text{Lu-L}_4$ у бубрезима је знатно већа у поређењу са активношћу $^{177}\text{Lu-L}_0$ током читавог експеримента. Ово може објаснити разлику између ретенције активности $^{177}\text{Lu-L}_0$ и $^{177}\text{Lu-L}_4$ липозома у крви, пошто се $^{177}\text{Lu-L}_4$ лакше излучују из система. Безначајна количина активности у цревима указује да је доминантан начин излучивања липозома управо посредством бубрега, независно од присуства глукозних остатака на површини липозома.

Упркос присуства глукозних остатака на површини $^{177}\text{Lu-L}_4$ липозома не долази до значајније акумулације у мозгу, у односу на контролну формулацију. Генерално, веома ниске вредности активности су уочене за обе формулације током експеримента. Могуће објашњење лежи у чињеници да је крвно-мождана баријера веома селективна и да преферира транспорт веома малих наночестица ($< 20 \text{ nm}$) [90]. Обе испитиване формулације липозома имају знатно веће димензије што им онемогућава ефикасан транспорт кроз крвно-мождану баријеру, без обзира да ли је извршена модификација глукозом.

Акумулација липозома у туморима се знатно разликује између $^{177}\text{Lu-L}_0$ и $^{177}\text{Lu-L}_4$ липозома ($p < 0,05$). Липозоми $^{177}\text{Lu-L}_0$ у односу на $^{177}\text{Lu-L}_4$ показују знатно мање накупљање у туморима *LS174T* и *CT26*. Код $^{177}\text{Lu-L}_0$ липозома уочава се благи раст активности у туморима *LS174T* ($1,9 \pm 0,4 \text{ \%ИД/g}$) и *CT26* ($2,2 \pm 0,7 \text{ \%ИД/g}$) до 2 сата после интравенске администрације. Липозоми $^{177}\text{Lu-L}_4$ са друге стране показују знатно веће накупљање од $5,8 \pm 0,2 \text{ \%ИД/g}$ и $5,1 \pm 1,1 \text{ \%ИД/g}$ после 6 сати за *LS174T* и *CT26* туморе. Однос активности између тумора и мишића (Т/М) 24 сата по администрацији липозома $^{177}\text{Lu-L}_4$ износи $6,9 \pm 0,8$ и $6,4 \pm 1,1$ за *LS174T* и *CT26* туморе. Исти однос и за исто време је знатно мањи у случају $^{177}\text{Lu-L}_0$ липозома, и износи $0,8 \pm 0,2$ и $2,0 \pm 0,3$ за исте туморе.

Највећа активност $^{177}\text{Lu-L}_4$ липозома у туморима је измерена 6 сати после инјектовања док максимална активност $^{177}\text{Lu-L}_0$ липозома није достигла ни почетну вредност активности $^{177}\text{Lu-L}_4$ липозома, пола сата после инјектовања. Сви липозоми су готово у

потпуности излучени из система после 72 сата међутим, у случају $^{177}\text{Lu-L}_4$ липозома заостаје мала количина активности у туморима, за разлику од $^{177}\text{Lu-L}_0$ липозома.

Представљени резултати јасно указују на продужено и преференцијално накупљање $^{177}\text{Lu-L}_4$ липозома у туморима, у односу на контролне $^{177}\text{Lu-L}_0$ липозоме. Имајући у виду представљене резултате, недвосмислено се може тврдити да је радна хипотеза показана као тачна, и да се липозоми модификовани глукозом у значајно већој мери накупљају у туморима, у односу на немодификоване липозоме. У овом тренутку се не може са сигурношћу тврдити да ли долази до интернализације таквих липозома посредством ендоцитозе, или само долази до њиховог везивања за *GLUT* рецепторе, без даље интернализације. У сваком случају липозоми модификовани глукозом имају способност да се преференцијално акумулирају у тумору и на тај начин обезбеде доставу лека на циљано место.

VI ЗАКЉУЧАК

Липозоми представљају биокомпатибилне, компактне и универзалне носаче лекова пошто се могу прилагодити било ком типу и физичкохемијским својствима супстанци које преносе. Одговарајућом функционализацијом липозома може се повећати циљање односно накупљање липозома у одговарајућем ткиву што, доприноси повећању ефикасности терапије. У овом истраживању представљен је начин функционализације односно модификације липозома са глукозом, у циљу добијања таквог носача лекова који би вршио циљану доставу лекова у ћелије канцера, посредством *GLUT* рецептора. Резултати добијени током израде ове докторске дисертације указују да се липозоми модификовани глукозом знатно више накупљају у ћелијама канцера, у поређењу са контролном групом немодификованих липозома, што је у складу са претпостављеном радном хипотезом.

На основу сумације и анализе представљених резултата може се извући више важних закључака који директно проистичу из истраживања спроведеног у оквиру ове докторске дисертације:

- 1) Липозоми су успешно синтетисани методом хидратације танког слоја. ТЕМ мерењима је утврђено да су димензије добијених липозома у опсегу 80–90 nm, што је од значаја за даља биолошка испитивања.
- 2) Модификација липозома је извршена коришћењем добро познатог и једноставног процеса сидрења супстанце *L*, при чему су коришћени липозоми на бази *DPPC* фосфолипида. Присуство глукозних остатака на површини модификованих липозома је потврђено ФТИЦ спектроскопијом, поређењем ИЦ спектра липозома модификованих глукозом и немодификованих липозома.
- 3) Варирањем липидног састава *DPPC:L:CHOL* добијени су липозоми различитог површинског наелектрисања и униформности, што је утврђено *DLS* мерењима ζ и *PDI*. За *L₄* формулацију је утврђено да има оптималан липидни састав (4 : 4 : 1), који резултује повољним и сличним физичкохемијским особинама ($\zeta = -28,3$ mV, *PDI* = 0,136), у поређењу са немодификованим липозомима ($\zeta = -19,4$ mV, *PDI* = 0,117).
- 4) Липозоми модификовани глукозом и напуњени са Fe_3O_4 МНЧ су синтетисани методом хидратације танког слоја, приликом чега је остварена ефикасна енкапсулација МНЧ (68–85 %). Спектрофлуориметријом је показано да такви липозоми имају способност индукованог отварања у магнетном пољу са високим степеном отварања (~ 85 %). Ови резултати су од изузетног значаја пошто указују на могућност индукованог отварања липозома приликом биолошких испитивања.

- 5) Синтетисани липозоми су успешно обележени са радионуклидом ^{99m}Tc , и то са високим приносом обележавања ($> 90\%$), што је утврђено *ITLC* радиохроматографским мерењима радиохемијске чистоће.
- 6) Развијена је директна и ефикасна метода обележавања синтетисаних липозома са радионуклидом ^{177}Lu . *ITLC* радиохроматографска мерења радиохемијске чистоће ^{177}Lu -липозома указују на висок принос обележавања ($> 90\%$).
- 7) Радиообележени ^{99m}Tc -липозоми су показали изузетну *in vitro* стабилност за различите температуре (до $37\text{ }^\circ\text{C}$), време (до 24h) и медијуме (ФР и ХС) инкубације. *In vitro* стабилност је праћена преко радиохемијске чистоће која је остала висока за све експерименталне услове ($> 95\%$), указујући на могућност примене ^{99m}Tc -липозома у биолошким испитивањима.
- 8) *In vitro* стабилност радиообележених ^{177}Lu -липозома, за различите температуре (до $37\text{ }^\circ\text{C}$), време (до 72h) и медијуме (ФР и ХС) инкубације, је одређена посредством радиохемијске чистоће. *In vitro* стабилност је остала висока ($> 94\%$) независно од експерименталних услова, указујући на могућност примене ^{177}Lu -липозома у продуженим (до 72h) биолошким испитивањима.
- 9) Спектрофлуориметријом је утврђено да се липозоми модификовани глукозом (L_4) значајно више накупљају у здравим (*T3T*) и канцер (*CT26* и *LS174T*) ћелијама, у односу на немодификоване липозоме (L_0), приликом *in vitro* инкубације.
- 10) Утврђено је да накупљање липозома модификованих глукозом (L_4) у различитим ћелијама (*T3T*, *CT26* и *LS174T*) значајно опада у присуству слободне глукозе. Присуство слободне глукозе нема утицај на накупљање немодификованих липозома (L_0) у истим типовима ћелија. На основу резултата *in vitro* испитивања везивања за ћелије се закључује да се L_4 такмиче за исте *GLUT* рецепторе као и слободна глукоза.
- 11) Резултати *in vivo* и *ex vivo* испитивања биодистрибуције радиообележених липозома на тумор индукованим (*CT26* и *LS174T*) *NOD-SCID* мишевима указују на значајно већу акумулацију ^{177}Lu - L_4 у туморима (до 72h) у односу на немодификоване ^{177}Lu - L_0 липозоме.
- 12) Радионуклид ^{177}Lu је успешно коришћен као радиотрасер у испитивању биодистрибуције радиообележених липозома, међутим на основу представљених резултата може се закључити да је такав комплекс могуће користити и као тераностички препарат.

На основу резултата представљених у оквиру ове докторске дисертације и закључака који из њих проистичу јасно је да су сви зацртани циљеви истраживања успешно остварени и да је развијен и испитан систем за доставу лекова на бази липозома модификованих глукозом, који се може користити у циљаној терапији и дијагностици канцера.

VII ЛИТЕРАТУРА

- [1] V.P. Torchilin, Passive and active drug targeting: Drug delivery to tumors as an example, 2010. https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3_1.
- [2] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, O.C. Farokhzad, Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 66 (2014) 2–25. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.11.009>.
- [3] Y. Barenholz, Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *J. Control. Release.* 160 (2012) 117–134. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020>.
- [4] U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, W. Khan, Liposomal formulations in clinical use: An updated review, *Pharmaceutics.* 9 (2017) 1–33. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>.
- [5] L. Milane, M. Amiji, Clinical approval of nanotechnology-based SARS-CoV-2 mRNA vaccines: impact on translational nanomedicine, *Drug Deliv. Transl. Res.* (2021). <https://doi.org/10.1007/s13346-021-00911-y>.
- [6] G. I. Evan, K. H. Vousden, Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer, *Nature.* 411 (2001) 342–348. <http://www.nature.com/nature/journal/v411/n6835/pdf/411342a0.pdf>.
- [7] R.J. DeBerardinis, J.J. Lum, G. Hatzivassiliou, C.B. Thompson, The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation, *Cell Metab.* 7 (2008) 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>.
- [8] N. Hay, Reprogramming glucose metabolism in cancer: Can it be exploited for cancer therapy?, *Nat. Rev. Cancer.* 16 (2016) 635–649. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.77>.
- [9] G. Gregoriadis, Overview of liposomes, *J. Antimicrob. Chemother.* 28 (1991) 39–48. https://doi.org/10.1093/jac/28.suppl_b.39.
- [10] A.D. Bangham, Liposomes: the Babraham connection, *Chem. Phys. Lipids.* 64 (1993) 275–285. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(93\)90071-A](https://doi.org/10.1016/0009-3084(93)90071-A).
- [11] S. Wilhelm, A.J. Tavares, Q. Dai, S. Ohta, J. Audet, H.F. Dvorak, W.C.W. Chan, Analysis of nanoparticle delivery to tumours, *Nat. Rev. Mater.* 1 (2016) 16014. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14>.
- [12] T.M. Allen, P.R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>.
- [13] H. Ren, Y. He, J. Liang, Z. Cheng, M. Zhang, Y. Zhu, C. Hong, J. Qin, X. Xu, J. Wang, Role of Liposome Size, Surface Charge, and PEGylation on Rheumatoid Arthritis Targeting Therapy, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 11 (2019) 20304–20315. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b22693>.
- [14] G. Blume, G. Cevc, Liposomes for the sustained drug release in vivo, *BBA - Biomembr.* 1029 (1990) 91–97. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90440-Y](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90440-Y).
- [15] H.E. Schaeffer, D.L. Krohn, Liposomes in topical drug delivery, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22 (1982) 220–227.

- [16] C. He, Y. Hu, L. Yin, C. Tang, C. Yin, Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Biomaterials*. 31 (2010) 3657–3666. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.065>.
- [17] A. Akbarzadeh, R. Rezaei-Sadabady, S. Davaran, S.W. Joo, N. Zarghami, Y. Hanifehpour, M. Samiei, M. Kouhi, K. Nejati-Koshki, Liposome: classification, preparation, and applications, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>.
- [18] S.N. Chatterjee, S. Agarwal, Liposomes as membrane model for study of lipid peroxidation, *Free Radic. Biol. Med.* 4 (1988) 51–72. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(88\)90011-1](https://doi.org/10.1016/0891-5849(88)90011-1).
- [19] T. Oberholzer, P.L. Luisi, The use of liposomes for constructing cell models, *J. Biol. Phys.* 28 (2002) 733–744. <https://doi.org/10.1023/A:1021267512805>.
- [20] S.M. Moghimi, J. Szebeni, Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: Critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties, *Prog. Lipid Res.* 42 (2003) 463–478. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(03\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(03)00033-X).
- [21] A. Štimac, S. Šegota, M. Dutour Sikirić, R. Ribić, L. Frkanec, V. Svetličić, S. Tomić, B. Vranešić, R. Frkanec, Surface modified liposomes by mannosylated conjugates anchored via the adamantyl moiety in the lipid bilayer, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1818 (2012) 2252–2259. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.04.002>.
- [22] H. Kitagishi, M. Jiromaru, N. Hasegawa, Intracellular Delivery of Adamantane-Tagged Small Molecule, Proteins, and Liposomes Using an Octaarginine-Conjugated β -Cyclodextrin, *ACS Appl. Bio Mater.* 3 (2020) 4902–4911. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00421>.
- [23] A. Štimac, M. Šekutor, K. Mlinarić-Majerski, L. Frkanec, R. Frkanec, Adamantane in drug delivery systems and surface recognition, *Molecules*. 22 (2017). <https://doi.org/10.3390/molecules22020297>.
- [24] T.X. Nguyen, L. Huang, M. Gauthier, G. Yang, Q. Wang, Recent advances in liposome surface modification for oral drug delivery, *Nanomedicine*. 11 (2016) 1169–1185. <https://doi.org/10.2217/nnm.16.9>.
- [25] A.N. Lukyanov, T.A. Elbayoumi, A.R. Chakilam, V.P. Torchilin, Tumor-targeted liposomes: Doxorubicin-loaded long-circulating liposomes modified with anti-cancer antibody, *J. Control. Release*. 100 (2004) 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.007>.
- [26] M.J. Ostro, P.R. Cullis, Use of liposomes as injectable-drug delivery systems, *Am. J. Hosp. Pharm.* 46 (1989) 1576–1587. <https://doi.org/10.1093/ajhp/46.8.1576>.
- [27] R. Suzuki, T. Takizawa, Y. Kuwata, M. Mutoh, N. Ishiguro, N. Utoguchi, A. Shinohara, M. Eriguchi, H. Yanagie, K. Maruyama, Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome, *Int. J. Pharm.* 346 (2008) 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.06.010>.
- [28] J.W. Park, Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment, *Breast Cancer Res.* 4 (2002) 95. <https://doi.org/10.1186/bcr432>.
- [29] K. Maruyama, Intracellular targeting delivery of liposomal drugs to solid tumors based on EPR effects, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63 (2011) 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.09.003>.
- [30] T.M. Allen, Liposomal drug formulations: Rationale for development and what we can expect for the future, *Drugs*. 56 (1998) 747–756. <https://doi.org/10.2165/00003495-199856050-00001>.

- [31] M. Alavi, N. Karimi, M. Safaei, Application of various types of liposomes in drug delivery systems, *Adv. Pharm. Bull.* 7 (2017) 3–9. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.002>.
- [32] J.S. Lee, M. Ankone, E. Pieters, R.M. Schiffelers, W.E. Hennink, J. Feijen, Circulation kinetics and biodistribution of dual-labeled polymersomes with modulated surface charge in tumor-bearing mice: Comparison with stealth liposomes, *J. Control. Release.* 155 (2011) 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.028>.
- [33] M.C. Woodle, D. Papahadjopoulos, Liposome preparation and size characterization, *Methods Enzymol.* 171 (1989) 193–217. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(89\)71012-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(89)71012-0).
- [34] L. Coderch, J. Fonollosa, M. De Pera, J. Estelrich, A. De La Maza, J.L. Parra, Influence of cholesterol on liposome fluidity by EPR. Relationship with percutaneous absorption, *J. Control. Release.* 68 (2000) 85–95. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00240-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00240-6).
- [35] M.L. Briuglia, C. Rotella, A. McFarlane, D.A. Lamprou, Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release, *Drug Deliv. Transl. Res.* 5 (2015) 231–242. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8>.
- [36] S.J. Singer, G.L. Nicolson, The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, *Science* (80-.). 175 (1972) 720–731. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.720>.
- [37] S. Ramachandran, M. Laradji, P.B. Sunil Kumar, Lateral organization of lipids In multi-component liposomes, *J. Phys. Soc. Japan.* 78 (2009) 1–9. <https://doi.org/10.1143/JPSJ.78.041006>.
- [38] Y. Nie, L. Ji, H. Ding, L. Xie, L. Li, B. He, Y. Wu, Z. Gu, Cholesterol Derivatives Based Charged Liposomes for Doxorubicin Delivery: Preparation, In Vitro and In Vivo Characterization, *Theranostics.* 2 (2012) 1092–1103. <https://doi.org/10.7150/thno.4949>.
- [39] G. Gregoriadis, C. Davis, in Vitro Is Promoted By Their Cholesterol, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89 (1979) 1287–1293.
- [40] A.J. BAILLIE, A.T. FLORENCE, L.R. HUME, G.T. MUIRHEAD, A. ROGERSON, The preparation and properties of niosomes—non-ionic surfactant vesicles, *J. Pharm. Pharmacol.* 37 (1985) 863–868. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1985.tb04990.x>.
- [41] D. Ag Seleci, M. Seleci, J.G. Walter, F. Stahl, T. Scheper, Niosomes as nanoparticulate drug carriers: Fundamentals and recent applications, *J. Nanomater.* 2016 (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/7372306>.
- [42] R. Bartelds, M.H. Nematollahi, T. Pols, M.C.A. Stuart, A. Pardakhty, G. Asadikaram, B. Poolman, Niosomes, an alternative for liposomal delivery, *PLoS One.* 13 (2018) 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194179>.
- [43] S. Chen, S. Hanning, J. Falconer, M. Locke, J. Wen, Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): Fabrication, characterization, pharmaceutical and cosmetic applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 144 (2019) 18–39. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.08.015>.
- [44] H. Talsma, M.J. Van Steenberg, J.C.H. Borchert, D.J.A. Crommelin, A novel technique for the one-step preparation of liposomes and nonionic surfactant vesicles without the use of organic solvents. Liposome formation in a continuous gas stream: The ‘Bubble’ method, *J. Pharm. Sci.* 83 (1994) 276–280. <https://doi.org/10.1002/jps.2600830303>.
- [45] Z. Huang, X. Li, T. Zhang, Y. Song, Z. She, J. Li, Y. Deng, Progress involving new techniques for liposome preparation, *Asian J. Pharm. Sci.* 9 (2014) 176–182.

<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.06.001>.

- [46] L. Maja, K. Željko, P. Mateja, Sustainable technologies for liposome preparation, *J. Supercrit. Fluids.* 165 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.104984>.
- [47] M.M. Lapinski, A. Castro-Forero, A.J. Greiner, R.Y. Ofoli, G.J. Blanchard, Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: Rotational and translational diffusion of an embedded chromophore, *Langmuir.* 23 (2007) 11677–11683. <https://doi.org/10.1021/la7020963>.
- [48] N. Berger, A. Sachse, J. Bender, R. Schubert, M. Brandl, Filter extrusion of liposomes using different devices: Comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics, *Int. J. Pharm.* 223 (2001) 55–68. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00721-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00721-9).
- [49] F. Olson, C.A. Hunt, F.C. Szoka, W.J. Vail, D. Papahadjopoulos, Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes, *BBA - Biomembr.* 557 (1979) 9–23. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(79\)90085-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(79)90085-3).
- [50] M.C. Blok, E.C.M. Van Der Neut-Kok, L.L.M. Van Deenen, J. De Gier, The effect of chain length and lipid phase transitions on the selective permeability properties of liposomes, *BBA - Biomembr.* 406 (1975) 187–196. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(75\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(75)90003-6).
- [51] T. Schneider, A. Sachse, G. Röbling, M. Brandl, Large-scale production of liposomes of defined size by a new continuous high pressure extrusion device, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 20 (1994) 2787–2807. <https://doi.org/10.3109/03639049409042681>.
- [52] C. Chen, D. Han, C. Cai, X. Tang, An overview of liposome lyophilization and its future potential, *J. Control. Release.* 142 (2010) 299–311. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.024>.
- [53] J.C. Kasper, G. Winter, W. Friess, Recent advances and further challenges in lyophilization, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.05.019>.
- [54] B. Stark, G. Pabst, R. Prassl, Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure, *Eur. J. Pharm. Sci.* 41 (2010) 546–555. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2010.08.010>.
- [55] F. Szoka, D. Papahadjopoulos, Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75 (1978) 4194–4198. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.9.4194>.
- [56] R. CORTESI, Preparation of liposomes by reverse-phase evaporation using alternative organic solvents, *J. Microencapsul.* 16 (1999) 251–256. <https://doi.org/10.1080/026520499289220>.
- [57] M. Pons, M. Foradada, J. Estelrich, Liposomes obtained by the ethanol injection method, *Int. J. Pharm.* 95 (1993) 51–56. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90389-W](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90389-W).
- [58] C. Jaafar-Maalej, R. Diab, V. Andrieu, A. Elaissari, H. Fessi, Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation, *J. Liposome Res.* 20 (2010) 228–243. <https://doi.org/10.3109/08982100903347923>.
- [59] C. Charcosset, A. Juban, J.P. Valour, S. Urbaniak, H. Fessi, Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices, *Chem. Eng. Res. Des.* 94 (2015) 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2014.09.008>.

- [60] J.C. Mathai, V. Sitaraman, Preparation of large uni-lamellar liposomes by the ether injection method and evaluation of the physical integrity by osmometry, *Biochem. Educ.* 15 (1987) 147–149. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(87\)90052-5](https://doi.org/10.1016/0307-4412(87)90052-5).
- [61] D. Deamer, A.D. Bangham, Large volume liposomes by an ether vaporization method, *Biochim. Biophys. Acta - Nucleic Acids Protein Synth.* 443 (1976) 629–634. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(76\)90527-X](https://doi.org/10.1016/0005-2787(76)90527-X).
- [62] R. Mendez, S. Banerjee, Sonication-based basic protocol for liposome synthesis, *Methods Mol. Biol.* 1609 (2017) 255–260. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6996-8_21.
- [63] F.L. Sorgi, L. Huang, Large scale production of DC-Chol cationic liposomes by microfluidization, *Int. J. Pharm.* 144 (1996) 131–139. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(96\)04733-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04733-3).
- [64] S. Vemuri, C. Der Yu, V. Wangsatorntanakun, N. Roosdorp, Large-scale production of liposomes by a microfluidizer, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 16 (1990) 2243–2256. <https://doi.org/10.3109/03639049009043797>.
- [65] A.K. Thompson, H. Singh, Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a microfluidizer, *J. Dairy Sci.* 89 (2006) 410–419. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72105-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72105-1).
- [66] L. Bai, D.J. McClements, Development of microfluidization methods for efficient production of concentrated nanoemulsions: Comparison of single- and dual-channel microfluidizers, *J. Colloid Interface Sci.* 466 (2016) 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.12.039>.
- [67] W. Jiskoot, T. Teerlink, E.C. Beuvery, D.J.A. Crommelin, Preparation of liposomes via detergent removal from mixed micelles by dilution - The effect of bilayer composition and process parameters on liposome characteristics, *Pharm. Weekbl. Sci. Ed.* 8 (1986) 259–265. <https://doi.org/10.1007/BF01960070>.
- [68] R. Peschka, T. Purmann, R. Schubert, Cross-flow filtration—an improved detergent removal technique for the preparation of liposomes, *Int. J. Pharm.* 162 (1998) 177–183. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(97\)00424-9](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(97)00424-9).
- [69] O. Zumbuehl, H.G. Weder, Liposomes of controllable size in the range of 40 to 180 nm by defined dialysis of lipid/detergent mixed micelles, *BBA - Biomembr.* 640 (1981) 252–262. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(81\)90550-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90550-2).
- [70] M.R. Mozafari, C.J. Reed, C. Rostron, C. Kocum, E. Piskin, Construction of stable anionic liposome-plasmid particles using the heating method: A preliminary investigation, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7 (2002) 923–927.
- [71] M.R. Mozafari, C.J. Reed, C. Rostron, Cytotoxicity evaluation of anionic nanoliposomes and nanolipoplexes prepared by the heating method without employing volatile solvents and detergents, *Pharmazie.* 62 (2007) 205–209. <https://doi.org/10.1691/ph.2007.3.6045>.
- [72] L. Llu, T. Yonetani, Preparation and characterization of liposome-encapsulated haemoglobin by a freeze-thaw method, *J. Microencapsul.* 11 (1994) 409–421. <https://doi.org/10.3109/02652049409034258>.
- [73] J.D. Castile, K.M.G. Taylor, Factors affecting the size distribution of liposomes produced by freeze-thaw extrusion, *Int. J. Pharm.* 188 (1999) 87–95. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00207-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00207-0).

- [74] M.I. Angelova, D.S. Dimitrov, Liposome electroformation, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81 (1986) 303. <https://doi.org/10.1039/dc9868100303>.
- [75] D.S. Dimitrov, M.I. Angelova, Lipid swelling and liposome formation mediated by electric fields, *J. Electroanal. Chem.* 253 (1988) 323–336. [https://doi.org/10.1016/0022-0728\(88\)87069-4](https://doi.org/10.1016/0022-0728(88)87069-4).
- [76] B. Pouligny, G. Martinot-Lagarde, M.I. Angelova, Encapsulation of solid microspheres by bilayers, *Trends Colloid Interface Sci.* IX. (2007) 280–283. <https://doi.org/10.1007/bfb0115255>.
- [77] M. Angelova, D.S. Dimitrov, A mechanism of liposome electroformation, in: *Trends Colloid Interface Sci.* II, Steinkopff, Darmstadt, 1988: pp. 59–67. <https://doi.org/10.1007/BFb0114171>.
- [78] M.I. Angelova, S. Soléau, P. Méléard, F. Faucon, P. Bothorel, Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications, *Trends Colloid Interface Sci.* VI. 131 (2007) 127–131. <https://doi.org/10.1007/bfb0116295>.
- [79] E. RAMSEY, Q. SUN, Z. ZHANG, C. ZHANG, W. GOU, Mini-Review: Green sustainable processes using supercritical fluid carbon dioxide, *J. Environ. Sci.* 21 (2009) 720–726. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62330-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62330-X).
- [80] K.M. Scholsky, Supercritical phase transitions at very high pressure, *J. Chem. Educ.* 66 (1989) 989–990. <https://doi.org/10.1021/ed066p989>.
- [81] R.C. Reid, J.M. Prausnitz, B.E. Poling, *The properties of gases and liquids*, (n.d.). <https://www.osti.gov/biblio/6504847>.
- [82] I.E. Santo, R. Campardelli, E.C. Albuquerque, S.V. de Melo, G. Della Porta, E. Reverchon, Liposomes preparation using a supercritical fluid assisted continuous process, *Chem. Eng. J.* 249 (2014) 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.03.099>.
- [83] P.R. Karn, W. Cho, S.J. Hwang, Liposomal drug products and recent advances in the synthesis of supercritical fluid-mediated liposomes, *Nanomedicine.* 8 (2013) 1529–1548. <https://doi.org/10.2217/nmm.13.131>.
- [84] Đ. Cvjetinović, Ž. Prijović, D. Janković, M. Radović, M. Mirković, Z. Milanović, M. Mojović, Đ. Škalamera, S. Vranješ-Đurić, Bioevaluation of glucose-modified liposomes as a potential drug delivery system for cancer treatment using 177-Lu radiotracking, *J. Control. Release.* 332 (2021) 301–311. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.03.006>.
- [85] Y. Zhou, X.J. Gong, J.B. Yang, Introduction to the guidance for industry on liposome drug products: chemistry, manufacturing, and controls; human pharmacokinetics and bioavailability; and labeling documentation issued by FDA, *Chinese J. New Drugs.* 27 (2018) 1835–1840.
- [86] K. Khatri, A.K. Goyal, P.N. Gupta, N. Mishra, A. Mehta, S.P. Vyas, Surface modified liposomes for nasal delivery of DNA vaccine, *Vaccine.* 26 (2008) 2225–2233. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.02.058>.
- [87] A. Puri, G. Kramer-Marek, R. Campbell-Massa, A. Yavlovich, S.C. Tele, S.B. Lee, J.D. Clogston, A.K. Patri, R. Blumenthal, J. Capala, HER2-specific affibody-conjugated thermosensitive liposomes (affisomes) for improved delivery of anticancer agents, *J. Liposome Res.* 18 (2008) 293–307. <https://doi.org/10.1080/08982100802457377>.

- [88] M.J. Turk, D.J. Waters, P.S. Low, Folate-conjugated liposomes preferentially target macrophages associated with ovarian carcinoma, *Cancer Lett.* 213 (2004) 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2003.12.028>.
- [89] Y. Qin, W. Fan, H. Chen, N. Yao, W. Tang, J. Tang, W. Yuan, R. Kuai, Z. Zhang, Y. Wu, Q. He, In vitro and in vivo investigation of glucose-mediated brain-targeting liposomes, *J. Drug Target.* 18 (2010) 536–549. <https://doi.org/10.3109/10611861003587235>.
- [90] O. Betzer, M. Shilo, R. Opochninsky, E. Barnoy, M. Motiei, E. Okun, G. Yadid, R. Popovtzer, The effect of nanoparticle size on the ability to cross the blood-brain barrier: An in vivo study, *Nanomedicine.* 12 (2017) 1533–1546. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0022>.
- [91] F. Xie, N. Yao, Y. Qin, Q. Zhang, H. Chen, M. Yuan, J. Tang, X. Li, W. Fan, Q. Zhang, Y. Wu, L. Hai, Q. He, Investigation of glucose-modified liposomes using polyethylene glycols with different chain lengths as the linkers for brain targeting, *Int. J. Nanomedicine.* 7 (2012) 163–175. <https://doi.org/10.2147/ijn.s23771>.
- [92] X. Li, B. Qu, X. Jin, L. Hai, Y. Wu, Design, synthesis and biological evaluation for docetaxel-loaded brain targeting liposome with “lock-in” function, *J. Drug Target.* 22 (2014) 251–261. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2013.865032>.
- [93] Q. Fu, Y. Zhao, Z. Yang, Q. Yue, W. Xiao, Y. Chen, Y. Yang, L. Guo, Y. Wu, Liposomes actively recognizing the glucose transporter GLUT 1 and integrin $\alpha v \beta 3$ for dual-targeting of glioma, *Arch. Pharm. (Weinheim).* 352 (2019). <https://doi.org/10.1002/ardp.201800219>.
- [94] A.H. Negussie, J.L. Miller, G. Reddy, S.K. Drake, B.J. Wood, M.R. Dreher, Synthesis and in vitro evaluation of cyclic NGR peptide targeted thermally sensitive liposome, *J. Control. Release.* 143 (2010) 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.12.031>.
- [95] W.L.L. Munyendo, H. Lv, H. Benza-Ingoula, L.D. Baraza, J. Zhou, Cell penetrating peptides in the delivery of biopharmaceuticals, *Biomolecules.* 2 (2012) 187–202. <https://doi.org/10.3390/biom2020187>.
- [96] S. Dissanayake, W.A. Denny, S. Gamage, V. Sarojini, Recent developments in anticancer drug delivery using cell penetrating and tumor targeting peptides, *J. Control. Release.* 250 (2017) 62–76. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.02.006>.
- [97] S. Meng, B. Su, W. Li, Y. Ding, L. Tang, W. Zhou, Y. Song, Z. Caicun, Integrin-targeted paclitaxel nanoliposomes for tumor therapy, *Med. Oncol.* 28 (2011) 1180–1187. <https://doi.org/10.1007/s12032-010-9621-1>.
- [98] M.A. Madni, M. Sarfraz, M. Rehman, M. Ahmad, N. Akhtar, S. Ahmad, N. Tahir, S. Ijaz, R. Al-Kassas, R. Löbenberg, Liposomal drug delivery: A versatile platform for challenging clinical applications, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 17 (2014) 401–426. <https://doi.org/10.18433/j3cp55>.
- [99] H. Hatakeyama, H. Akita, E. Ishida, K. Hashimoto, H. Kobayashi, T. Aoki, J. Yasuda, K. Obata, H. Kikuchi, T. Ishida, H. Kiwada, H. Harashima, Tumor targeting of doxorubicin by anti-MT1-MMP antibody-modified PEG liposomes, *Int. J. Pharm.* 342 (2007) 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.04.037>.
- [100] S. Catuogno, C.L. Esposito, V. de Franciscis, Aptamer-mediated targeted delivery of therapeutics: An update, *Pharmaceuticals.* 9 (2016). <https://doi.org/10.3390/ph9040069>.
- [101] H. Kang, M.B. O’Donoghue, H. Liu, W. Tan, A liposome-based nanostructure for aptamer

directed delivery, *Chem. Commun.* 46 (2010) 249–251. <https://doi.org/10.1039/b916911c>.

- [102] M.H. Kang, H.J. Yoo, Y.H. Kwon, H.Y. Yoon, S.G. Lee, S.R. Kim, D.W. Yeom, M.J. Kang, Y.W. Choi, Design of Multifunctional Liposomal Nanocarriers for Folate Receptor-Specific Intracellular Drug Delivery, *Mol. Pharm.* 12 (2015) 4200–4213. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00399>.
- [103] Y. Zhang, M. Zhai, Z. Chen, X. Han, F. Yu, Z. Li, X.Y. Xie, C. Han, L. Yu, Y. Yang, X. Mei, Dual-modified liposome codelivery of doxorubicin and vincristine improve targeting and therapeutic efficacy of glioma, *Drug Deliv.* 24 (2017) 1045–1055. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1344334>.
- [104] S. Zununi Vahed, R. Salehi, S. Davaran, S. Sharifi, Liposome-based drug co-delivery systems in cancer cells, *Mater. Sci. Eng. C.* 71 (2017) 1327–1341. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.073>.
- [105] L. Jiang, L. Li, X. He, Q. Yi, B. He, J. Cao, W. Pan, Z. Gu, Overcoming drug-resistant lung cancer by paclitaxel loaded dual-functional liposomes with mitochondria targeting and pH-response, *Biomaterials.* 52 (2015) 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.004>.
- [106] A. Koshkaryev, A. Piroyan, V.P. Torchilin, Increased apoptosis in cancer cells in vitro and in vivo by ceramides in transferrin-modified liposomes, *Cancer Biol. Ther.* 13 (2012) 50–60. <https://doi.org/10.4161/cbt.13.1.18871>.
- [107] X.M. Li, L.Y. Ding, Y. Xu, Y. Wang, Q.N. Ping, Targeted delivery of doxorubicin using stealth liposomes modified with transferrin, *Int. J. Pharm.* 373 (2009) 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.01.023>.
- [108] P.S. Low, W.A. Henne, D.D. Doorneweerd, Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases, *Acc. Chem. Res.* 41 (2008) 120–129. <https://doi.org/10.1021/ar7000815>.
- [109] M. Mikhaylova, I. Stasinopoulos, Y. Kato, D. Artemov, Z.M. Bhujwalla, Imaging of cationic multifunctional liposome-mediated delivery of COX-2 siRNA, *Cancer Gene Ther.* 16 (2009) 217–226. <https://doi.org/10.1038/cgt.2008.79>.
- [110] A.M. Krasinskas, EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma, *Patholog. Res. Int.* 2011 (2011) 1–6. <https://doi.org/10.4061/2011/932932>.
- [111] Y.D.P. Limasale, A. Tezcaner, C. Özen, D. Keskin, S. Banerjee, Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes for delivery of celecoxib to cancer cells, *Int. J. Pharm.* 479 (2015) 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.01.016>.
- [112] W. Alshaer, H. Hillaireau, J. Vergnaud, S. Ismail, E. Fattal, Functionalizing Liposomes with anti-CD44 Aptamer for Selective Targeting of Cancer Cells, *Bioconjug. Chem.* 26 (2015) 1307–1313. <https://doi.org/10.1021/bc5004313>.
- [113] M. Rusnati, P. Dell’Era, C. Urbinati, E. Tanghetti, M.L. Massardi, Y. Nagamine, E. Monti, M. Presta, A distinct basic fibroblast growth factor (FGF-2)/FGF receptor interaction distinguishes urokinase-type plasminogen activator induction from mitogenicity in endothelial cells, *Mol. Biol. Cell.* 7 (1996) 369–381. <https://doi.org/10.1091/mbc.7.3.369>.
- [114] G.N.C. Chiu, M.B. Bally, L.D. Mayer, Targeting of antibody conjugated, phosphatidylserine-containing liposomes to vascular cell adhesion molecule 1 for controlled thrombogenesis,

Biochim. Biophys. Acta - Biomembr. 1613 (2003) 115–121. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00142-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00142-1).

- [115] G. Zhai, J. Wu, B. Yu, C. Guo, X. Yang, R.J. Lee, A transferrin receptor-targeted liposomal formulation for docetaxel, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10 (2010) 5129–5136. <https://doi.org/10.1166/jnm.2010.2393>.
- [116] L. Jing, J. Shi, D. Fan, Y. Li, R. Liu, Z. Dai, F. Wang, J. Tian, 177Lu-Labeled Cerasomes Encapsulating Indocyanine Green for Cancer Theranostics, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7 (2015) 22095–22105. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b07856>.
- [117] I. Ogihara-Umeda, T. Sasaki, H. Nishigori, Development of a liposome-encapsulated radionuclide with preferential tumor accumulation-the choice of radionuclide and chelating ligand, *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation.* 19 (1992) 753–757. [https://doi.org/10.1016/0883-2897\(92\)90136-M](https://doi.org/10.1016/0883-2897(92)90136-M).
- [118] X. An, F. Zhang, Y. Zhu, W. Shen, Photoinduced drug release from thermosensitive AuNPs-liposome using a AuNPs-switch, *Chem. Commun.* 46 (2010) 7202–7204. <https://doi.org/10.1039/c0cc03142a>.
- [119] M. Abri Aghdam, R. Bagheri, J. Mosafer, B. Baradaran, M. Hashemzaei, A. Baghbanzadeh, M. de la Guardia, A. Mokhtarzadeh, Recent advances on thermosensitive and pH-sensitive liposomes employed in controlled release, *J. Control. Release.* 315 (2019) 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.09.018>.
- [120] R.H. Bisby, C. Mead, C.G. Morgan, Active Uptake of Drugs into Photosensitive Liposomes and Rapid Release on UV Photolysis, *Photochem. Photobiol.* 72 (2000) 57. [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2000\)072<0057:auodip>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2000)072<0057:auodip>2.0.co;2).
- [121] D.E. Bennett, H. Lamparski, D.F. O'brien, Photosensitive liposomes, *J. Liposome Res.* 4 (1994) 331–348. <https://doi.org/10.3109/08982109409037048>.
- [122] H. Karanth, R.S.R. Murthy, pH-Sensitive liposomes-principle and application in cancer therapy, *J. Pharm. Pharmacol.* 59 (2007) 469–483. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.4.0001>.
- [123] D. Miranda, J.F. Lovell, Mechanisms of light-induced liposome permeabilization, *Bioeng. Transl. Med.* 1 (2016) 267–276. <https://doi.org/10.1002/btm2.10032>.
- [124] E. Alphandéry, P. Grand-Dewyse, R. Lefèvre, C. Mandawala, M. Durand-Dubief, Cancer therapy using nanoformulated substances: Scientific, regulatory and financial aspects, *Expert Rev. Anticancer Ther.* 15 (2015) 1233–1255. <https://doi.org/10.1586/14737140.2015.1086647>.
- [125] Y. Chen, A. Bose, G.D. Bothun, Controlled Release from Bilayer-Decorated Magnetoliposomes via Electromagnetic Heating, *ACS Nano.* 4 (2010) 3215–3221. <https://doi.org/10.1021/nn100274v>.
- [126] A. Rodzinski, R. Guduru, P. Liang, A. Hadjikhani, T. Stewart, E. Stimpf, C. Runowicz, R. Cote, N. Altman, R. Datar, S. Khizroev, Targeted and controlled anticancer drug delivery and release with magnetoelectric nanoparticles, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep20867>.
- [127] J.F. Liu, B. Jang, D. Issadore, A. Tsourkas, Use of magnetic fields and nanoparticles to trigger drug release and improve tumor targeting, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology.* 11 (2019) 1–18. <https://doi.org/10.1002/wnan.1571>.

- [128] M. Babincová, P. Čičmanec, V. Altanerová, Č. Altaner, P. Babinec, AC-magnetic field controlled drug release from magnetoliposomes: design of a method for site-specific chemotherapy, *Bioelectrochemistry*. 55 (2002) 17–19. [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(01\)00171-2](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(01)00171-2).
- [129] M. Perić, M. Radović, M. Mirković, A.S. Nikolić, P. Iskrenović, D. Janković, S. Vranješ-Đurić, The analysis of 2,3-dicarboxypropane-1,1-diphosphonic acid-coated magnetite nanoparticles under an external magnetic field and their radiolabeling for possible theranostic applications, *New J. Chem.* 43 (2019) 5932–5939. <https://doi.org/10.1039/c8nj06478d>.
- [130] M. Mirković, M. Radović, D. Stanković, Z. Milanović, D. Janković, M. Matović, M. Jeremić, B. Antić, S. Vranješ-Đurić, ^{99m}Tc–bisphosphonate–coated magnetic nanoparticles as potential theranostic nanoagent, *Mater. Sci. Eng. C*. 102 (2019) 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.034>.
- [131] C. Alexiou, R. Jurgons, C. Seliger, H. Iro, Medical applications of magnetic nanoparticles, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6 (2006) 2762–2768. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.464>.
- [132] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, P. Veverka, G. Goglio, A. Demourgues, J. Portier, E. Pollert, E. Duguët, Magnetic nanoparticle design for medical applications, *Prog. Solid State Chem.* 34 (2006) 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2005.11.010>.
- [133] D.C. Drummond, C.O. Noble, Z. Guo, K. Hong, J.W. Park, D.B. Kirpotin, Development of a highly active nanoliposomal irinotecan using a novel intraliposomal stabilization strategy, *Cancer Res.* 66 (2006) 3271–3277. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4007>.
- [134] A. Gabizon, H. Shmeeda, Y. Barenholz, Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: Review of animal and human studies, *Clin. Pharmacokinet.* 42 (2003) 419–436. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342050-00002>.
- [135] J.A. Sparano, E.P. Winer, Liposomal anthracyclines for breast cancer, *Semin. Oncol.* 28 (2001) 32–40. <https://doi.org/10.1053/sonc.2001.26436>.
- [136] D.J. Murry, S.M. Blaney, Clinical pharmacology of encapsulated sustained-release cytarabine, *Ann. Pharmacother.* 34 (2000) 1173–1178. <https://doi.org/10.1345/aph.19347>.
- [137] D.M. Vail, E.G. Macewen, I.D. Kurzman, R.R. Dubielzig, S.C. Helfand, W.C. Kisseberth, C.A. London, J.E. Obradovich, B.R. Madewell, C.O. Rodriguez, J. Fidel, S. Susaneck, M. Rosenberg, Liposome-Encapsulated Muramyl Tripeptide Phosphatidylethanolamine Adjuvant Immunotherapy for Splenic Hemangiosarcoma in the Dog: A Randomized Multi-Institutional Clinical Trial, *Clin. Cancer Res.* 1 (1995) 1165–1170.
- [138] C.E. Petre, D.P. Dittmer, Liposomal daunorubicin as treatment for Kaposi’s sarcoma, *Int. J. Nanomedicine.* 2 (2007) 277–288.
- [139] T.M. Allen, F.J. Martin, Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines, *Semin. Oncol.* 31 (2004) 5–15. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2004.08.001>.
- [140] M.S. Webb, T.O. Harasym, D. Masin, M.B. Bally, L.D. Mayer, Sphingomyelin-cholesterol liposomes significantly enhance the pharmacokinetic and therapeutic properties of vincristine in murine and human tumour models, *Br. J. Cancer.* 72 (1995) 896–904. <https://doi.org/10.1038/bjc.1995.430>.
- [141] M.J.W. Johnston, S.C. Semple, S.K. Klimuk, K. Edwards, M.L. Eisenhardt, E.C. Leng, G. Karlsson, D. Yanko, P.R. Cullis, Therapeutically optimized rates of drug release can be

achieved by varying the drug-to-lipid ratio in liposomal vincristine formulations, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1758 (2006) 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.01.009>.

- [142] G. Choppin, J.-O. Liljenzin, J. Rydberg, *Radiochemistry and nuclear chemistry*, Butterworth-Heinemann, 2002.
- [143] W. Marshall, *Nuclear power technology. Volume 1: Reactor technology*, (1984).
- [144] A.J. Lennox, Overview of accelerators in medicine, *Proc. IEEE Part. Accel. Conf.* 3 (1993) 1666–1668. <https://doi.org/10.1109/pac.1993.309092>.
- [145] R.M. Lambrecht, Radionuclide Generators, *Radiochim. Acta.* 34 (1983) 9–24. <https://doi.org/10.1524/ract.1983.34.12.9>.
- [146] J. Magill, J. Galy, Types of Radioactive Decay, *Radioact. Radionuclides Radiat. Incl. Univers. Nuclide Chart CD-ROM.* (2005) 59–87.
- [147] A. Chao, W. Chou, *Reviews of accelerator science and technology*, (2008).
- [148] T.J. Ruth, The uses of radiotracers in the life sciences, *Reports Prog. Phys.* 72 (2009). <https://doi.org/10.1088/0034-4885/72/1/016701>.
- [149] G. Coutrakon, J.M. Slater, A. Ghebremedhin, Design considerations for medical proton accelerators, *Proc. IEEE Part. Accel. Conf.* 1 (1999) 11–15. <https://doi.org/10.1109/pac.1999.795612>.
- [150] P.L. Joskow, J.E. Parsons, The economic future of nuclear power, (2009) 45–59.
- [151] S.A. Hoedl, W.D. Updegraff, The production of medical isotopes without nuclear reactors or uranium enrichment, *Sci. Glob. Secur.* 23 (2015) 121–153. <https://doi.org/10.1080/08929882.2015.1037123>.
- [152] F.F. (Russ. Knapp, S. Mirzadeh, The continuing important role of radionuclide generator systems for nuclear medicine, *Eur. J. Nucl. Med.* 21 (1994) 1151–1165. <https://doi.org/10.1007/BF00181073>.
- [153] M. R.A. Pillai, A. Dash, F. F. Knapp, Rhenium-188: Availability from the 188W/188Re Generator and Status of Current Applications, *Curr. Radiopharm.* 5 (2012) 228–243. <https://doi.org/10.2174/1874471011205030228>.
- [154] M.R. Mcdevitt, R.D. Finn, G. Sgouros, D. Ma, D.A. Scheinberg, An $^{225}\text{Ac}/^{213}\text{Bi}$ generator system for therapeutic clinical applications : construction and operation, *Appl. Radiat. Isot.* 50 (1999) 895–904.
- [155] R.D. Neirinckx, M.A. Davis, A new 68Ge/68Ga radioisotope generator system for production of 68Ga in dilute HCl, *Top. Catal.* 32 (1981) 447. [https://doi.org/10.1016/S0020-708X\(81\)81015-0](https://doi.org/10.1016/S0020-708X(81)81015-0).
- [156] W.J. Skraba, H. Arino, H.H. Kramer, A new 90Sr/90Y radioisotope generator, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 29 (1978) 91–96. [https://doi.org/10.1016/0020-708X\(78\)90029-7](https://doi.org/10.1016/0020-708X(78)90029-7).
- [157] V.J. Molinski, A review of 99mTc generator technology, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 33 (1982) 811–819. [https://doi.org/10.1016/0020-708X\(82\)90122-3](https://doi.org/10.1016/0020-708X(82)90122-3).
- [158] D. V. Filosofov, N.S. Loktionova, F. Rösch, A 44Ti/44Sc radionuclide generator for potential application of 44Sc-based PET-radiopharmaceuticals, *Radiochim. Acta.* 98 (2010) 149–156.

<https://doi.org/10.1524/ract.2010.1701>.

- [159] I. Zolle, Technetium-99m pharmaceuticals, Springer, 2007.
- [160] P.F. Sharp, H.G. Gemmell, A.D. Murray, P.F. Sharp, Practical nuclear medicine, Springer, 2005.
- [161] G. Mödder, R. Mödder-Reese, Radiosynoviorthesis, in: Nucl. Med. Ther., Springer New York, New York, NY, 2013: pp. 315–335. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4021-5_18.
- [162] S.M. Milenković, J.L. Vučina, L.M. Jaćimović, E.S. Karanfilov, T. V. Memedović, Universal 99m Tc Generator for Human Use, Isot. Isot. Environ. Heal. Stud. 19 (1983) 85–87. <https://doi.org/10.1080/10256018308544845>.
- [163] M.O.F. KITS, Technetium-99m radiopharmaceuticals: Manufacture of kits, (n.d.).
- [164] D. Papagiannopoulou, Technetium-99m radiochemistry for pharmaceutical applications, J. Label. Compd. Radiopharm. 60 (2017) 502–520. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3531>.
- [165] H.N. Wellman, R.T. Anger, Radioiodine dosimetry and the use of radioiodines other than 131I in thyroid diagnosis, Semin. Nucl. Med. 1 (1971) 356–378. [https://doi.org/10.1016/S0001-2998\(71\)80008-9](https://doi.org/10.1016/S0001-2998(71)80008-9).
- [166] K.C. Loh, P.A. Fitzgerald, K.K. Matthay, P.P.B. Yeo, D.C. Price, The treatment of malignant pheochromocytoma with iodine-131 metaiodobenzylguanidine (131I-MIBG): A comprehensive review of 116 reported patients, J. Endocrinol. Invest. 20 (1997) 648–658. <https://doi.org/10.1007/BF03348026>.
- [167] S.J. Mandel, L.K. Shankar, F. Benard, A. Yamamoto, A. Alavi, Superiority of Iodine-123 Compared with Iodine-131 scanning for thyroid remnants in patients with differentiated thyroid cancer, Clin. Nucl. Med. 26 (2001) 6–9. <https://doi.org/10.1097/00003072-200101000-00002>.
- [168] S. Vallabhajosula, A. Nikolopoulou, Radioiodinated metaiodobenzylguanidine (MIBG): Radiochemistry, biology, and pharmacology, Semin. Nucl. Med. 41 (2011) 324–333. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2011.05.003>.
- [169] M. Management, FDA-approved radiopharmaceuticals, (n.d.) 1–6.
- [170] J.R. Andrews, Radiobiology of human cancer radiotherapy, (1978).
- [171] S.K. Imam, Advancements in cancer therapy with alpha-emitters: A review, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 51 (2001) 271–278. [https://doi.org/10.1016/S0360-3016\(01\)01585-1](https://doi.org/10.1016/S0360-3016(01)01585-1).
- [172] L. Bodei, M. Cremonesi, C.M. Grana, N. Fazio, S. Iodice, S.M. Baio, M. Bartolomei, D. Lombardo, M.E. Ferrari, M. Sansovini, M. Chinol, G. Paganelli, Peptide receptor radionuclide therapy with 177Lu-DOTATATE: The IEO phase I-II study, Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 38 (2011) 2125–2135. <https://doi.org/10.1007/s00259-011-1902-1>.
- [173] M. Mirković, Z. Milanović, D. Stanković, Đ. Petrović, S. Vranješ-Đurić, D. Janković, M. Radović, Investigation of 177 Lu-labeled HEDP, DPD, and IDP as potential bone pain palliation agents, J. Radiat. Res. Appl. Sci. 13 (2020) 27–36. <https://doi.org/10.1080/16878507.2019.1702243>.
- [174] D. Pach, A. Sowa-Staszczak, J. Kunikowska, L. Królicki, M. Trofimiuk, A. Stefańska, M. Tomaszuk, B. Głowa, R. Mikołajczak, D. Pawlak, A. Jabrocka-Hybel, A.B. Hubalewska-Dydejczyk, Repeated cycles of peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) – Results and

side-effects of the radioisotope ^{90}Y -DOTA TATE, ^{177}Lu -DOTA TATE or $^{90}\text{Y}/^{177}\text{Lu}$ -DOTA TATE therapy in patients with disseminated NET, *Radiother. Oncol.* 102 (2012) 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.08.006>.

- [175] L. Emmett, K. Willowson, J. Violet, J. Shin, A. Blanksby, J. Lee, Lutetium ^{177}Lu PSMA radionuclide therapy for men with prostate cancer: a review of the current literature and discussion of practical aspects of therapy, *J. Med. Radiat. Sci.* 64 (2017) 52–60. <https://doi.org/10.1002/jmrs.227>.
- [176] G.J. Ehrhardt, D.E. Day, Therapeutic use of ^{90}Y microspheres, *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part B. Nucl. Med. Biol.* 14 (1987) 233–242. [https://doi.org/10.1016/0883-2897\(87\)90047-X](https://doi.org/10.1016/0883-2897(87)90047-X).
- [177] V. Aleksandar, J. Drina, R. Magdalena, M. Zorana, M. Marija, S. Dragana, V.Đ. Sanja, Optimization of the radiolabelling method for improved in vitro and in vivo stability of ^{90}Y -albumin microspheres, *Appl. Radiat. Isot.* 156 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2019.108984>.
- [178] E. Schiller, R. Bergmann, J. Pietzsch, B. Noll, A. Sterger, B. Johannsen, G. Wunderlich, H.J. Pietzsch, Yttrium-86-labelled human serum albumin microspheres: relation of surface structure with in vivo stability, *Nucl. Med. Biol.* 35 (2008) 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2007.10.008>.
- [179] T.K. Eigentler, U.M. Caroli, P. Radny, C. Garbe, Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: A systematic review of 41 randomised clinical trials, *Lancet Oncol.* 4 (2003) 748–759. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(03\)01280-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(03)01280-4).
- [180] A.H. Laing, D.M. Ackery, R.J. Bayly, R.B. Buchanan, V.J. Lewington, A.J.B. McEwan, P.M. Macleod, M.A. Zivanovic, Strontium-89 chloride for pain palliation in prostatic skeletal malignancy, *Br. J. Radiol.* 64 (1991) 817–822. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-64-765-816>.
- [181] G. Rubini, A. Nicoletti, D. Rubini, A.N. Asabella, Radiometabolic treatment of bone-metastasizing cancer: From ^{186}Re to ^{223}Ra , *Cancer Biother. Radiopharm.* 29 (2014) 1–11. <https://doi.org/10.1089/cbr.2013.1549>.
- [182] A.R. Ketring, ^{153}Sm -EDTMP and ^{186}Re -HEDP as bone therapeutic radiopharmaceuticals, *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part B. Nucl. Med. Biol.* 14 (1987) 223–232. [https://doi.org/10.1016/0883-2897\(87\)90046-8](https://doi.org/10.1016/0883-2897(87)90046-8).
- [183] T. Lammers, S. Aime, W.E. Hennink, G. Storm, F. Kiessling, Theranostic nanomedicine, *Acc. Chem. Res.* 44 (2011) 1029–1038. <https://doi.org/10.1021/ar200019c>.
- [184] J.R. Ballinger, Theranostics and precision medicine special feature: Review Article Theranostic radiopharmaceuticals: established agents in current use, *Br J Radiol.* 91 (2018) 20170969.
- [185] J.A. O'Donoghue, T.E. Wheldon, Targeted radiotherapy using Auger electron emitters, *Phys. Med. Biol.* 41 (1996) 1973–1992. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/41/10/009>.
- [186] B. Gutfilem, S.A.L. Souza, G. Valentini, Copper-64: A real theranostic agent, *Drug Des. Devel. Ther.* 12 (2018) 3235–3245. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S170879>.
- [187] J. Areberg, K. Norrgren, S.Ö. Mattsson, Absorbed doses to patients from ^{191}Pt -, ^{193}mPt - and ^{195}mPt -cisplatin, *Appl. Radiat. Isot.* 51 (1999) 581–586. [https://doi.org/10.1016/S0969-8043\(99\)00082-2](https://doi.org/10.1016/S0969-8043(99)00082-2).

- [188] S.A. Karamian, N. V. Aksenov, Y.A. Al'Bin, A.G. Belov, G.A. Bozhikov, S.N. Dmitriev, G.Y. Starodub, Methods for producing ^{195m}Pt isomer, *Bull. Russ. Acad. Sci. Phys.* 78 (2014) 367–372. <https://doi.org/10.3103/S1062873814050116>.
- [189] P.J. Blower, J.S. Lewis, J. Zweit, Copper radionuclides and radiopharmaceuticals in nuclear medicine, *Nucl. Med. Biol.* 23 (1996) 957–980. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(96\)00130-8](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(96)00130-8).
- [190] A. Güven, M. Ortiz, M. Constanti, C.K. O'Sullivan, Rapid and efficient method for the size separation of homogeneous fluorescein-encapsulating liposomes, *J. Liposome Res.* 19 (2009) 148–154. <https://doi.org/10.1080/08982100802674419>.
- [191] D.C. Litzinger, A.M.J. Buiting, N. van Rooijen, L. Huang, Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes, *BBA - Biomembr.* 1190 (1994) 99–107. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90038-8](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90038-8).
- [192] J. Stetefeld, S.A. McKenna, T.R. Patel, Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences, *Biophys. Rev.* 8 (2016) 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- [193] R. Xu, Light scattering: A review of particle characterization applications, *Particuology*. 18 (2015) 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2014.05.002>.
- [194] S.J. Pennycook, P.D. Nellist, *Scanning transmission electron microscopy: imaging and analysis*, Springer Science & Business Media, 2011.
- [195] M. De Graef, *Introduction to conventional transmission electron microscopy*, Cambridge university press, 2003.
- [196] Y. Zhang, S. Xuan, O. Owoseni, M. Omarova, X. Li, M.E. Saito, J. He, G.L. McPherson, S.R. Raghavan, D. Zhang, V.T. John, Amphiphilic Polypeptoids Serve as the Connective Glue to Transform Liposomes into Multilamellar Structures with Closely Spaced Bilayers, *Langmuir*. 33 (2017) 2780–2789. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b04190>.
- [197] J.W. Olesik, Elemental analysis using ICP-OES and ICP/MS, *Anal. Chem.* 63 (1991) 12A-21A. <https://doi.org/10.1021/ac00001a001>.
- [198] C.G. Novaes, M.A. Bezerra, E.G.P. da Silva, A.M.P. dos Santos, I.L. da S. Romão, J.H. Santos Neto, A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES), *Microchem. J.* 128 (2016) 331–346. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.05.015>.
- [199] R.C. Gore, Infrared Spectroscopy, *Anal. Chem.* 30 (1958) 570–579. <https://doi.org/10.1021/ac50163a004>.
- [200] G. Deliconstantinos, G. Ramantanis, D.K. Todorou, Interaction of ^{99m}Tc -labeled liposomes with walker tumour cells in vitro. Liposome-mediated introduction of thaliblastine into resistant walker tumour cells, *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 14 (1983) 407–411. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(83\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0306-3623(83)90023-X).
- [201] N. Chemistry, B.V.A.N. Gansbeke, O. Jeghers, A.M. Ermans, A. Schoutens, C.U. De Bruxelles, S. Radioisotopes, Paper and itlc chromatography of 9, 129 (1989) 33–41.
- [202] J. Sherma, B. Fried, *Handbook of thin-layer chromatography*, CRC press, 2003.

- [203] G.B. Saha, Radiopharmacy, in: *Fundam. Nucl. Pharm.*, Springer, 1979: pp. 143–154.
- [204] J.W. Lichtman, J.A. Conchello, Fluorescence microscopy, *Nat. Methods*. 2 (2005) 910–919. <https://doi.org/10.1038/nmeth817>.
- [205] B. Gerstbrein, G. Stamatias, N. Kollias, M. Driscoll, In vivo spectrofluorimetry reveals endogenous biomarkers that report healthspan and dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*, *Aging Cell*. 4 (2005) 127–137. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2005.00153.x>.
- [206] H. Farzaneh, M. Ebrahimi Nik, M. Mashreghi, Z. Saberi, M.R. Jaafari, M. Teymouri, A study on the role of cholesterol and phosphatidylcholine in various features of liposomal doxorubicin: From liposomal preparation to therapy, *Int. J. Pharm.* 551 (2018) 300–308. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.09.047>.
- [207] V. Centis, P. Vermette, Physico-chemical properties and cytotoxicity assessment of PEG-modified liposomes containing human hemoglobin, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 65 (2008) 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.04.009>.
- [208] M.M. Mady, W.M. Elshemey, Interaction of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) liposomes and insulin, *Mol. Phys.* 109 (2011) 1593–1598. <https://doi.org/10.1080/00268976.2011.575408>.
- [209] S.A. Meenach, F.G. Vogt, K.W. Anderson, J. Zach Hilt, R.C. McGarry, H.M. Mansour, Design, physicochemical characterization, and optimization of organic solution advanced spray-dried inhalable dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and dipalmitoylphosphatidylethanolamine poly(ethylene glycol) (DPPE-PEG) microparticles and nanoparticles f, *Int. J. Nanomedicine*. 8 (2013) 275–293. <https://doi.org/10.2147/IJN.S30724>.
- [210] Z. Varga, J. Mihály, S. Berényi, A. Bóta, Structural characterization of the poly(ethylene glycol) layer of sterically stabilized liposomes by means of FTIR spectroscopy, *Eur. Polym. J.* 49 (2013) 2415–2421. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2013.02.025>.
- [211] K. Yang, H. Peng, Y. Wen, N. Li, Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 3093–3097. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.11.079>.
- [212] P. Laverman, O.C. Boerman, Re: Selective in vitro labeling of white blood cells using ^{99m}Tc-labeled liposomes, *Nucl. Med. Biol.* 29 (2002) 623. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(02\)00320-7](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(02)00320-7).
- [213] H. López-González, M. Jiménez-Reyes, M. Solache-Ríos, A. Rojas-Hernández, Solubility and hydrolysis of lutetium at different [Lu³⁺] initial, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 274 (2007) 103–108. <https://doi.org/10.1007/s10967-006-6910-4>.
- [214] I. Persson, Hydrated metal ions in aqueous solution: How regular are their structures?, *Pure Appl. Chem.* 82 (2010) 1901–1917. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-09-10-22>.
- [215] N. Düzgüneş, S. Nir, Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 40 (1999) 3–18. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(99\)00037-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00037-X).
- [216] J. Ca, Reticuloendothelial system, in: *Rheumatol. Immunol. Ther.*, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2006: pp. 759–759. https://doi.org/10.1007/3-540-29662-X_2327.

Биографија аутора

Ђорђе Цвјетиновић рођен је 22.07.1993. у Ваљеву. Завршио је основну школу „Милан Илић Чича“ и природно-математички смер у гимназији „Милош Савковић“ у Аранђеловцу као ђак генерације и носилац Вукове дипломе. Основне академске студије је уписао 2012. године на Факултету за физичку хемију, Универзитета у Београду и дипломирао 2016. године са просечном оценом 9,84 и оценом 10 на дипломском раду. Тема дипломског рада је била „Теоријска анализа димера повезаних протоном“ под менторством др Милене Петковић, редовне професорке на Факултету за физичку хемију, Универзитета у Београду. Мастер академске студије је уписао 2016. године на Факултету за физичку хемију, Универзитета у Београду, смер Радиохемија и мастерирао 2017. године са просечном оценом 10 и оценом 10 на мастер раду. Тема мастер рада је била „Испитивање радиохемијске и физичкохемијске стабилности колоида обележених са радионуклидима (^{99m}Tc , ^{90}Y)“ под менторством др Марка Даковића, ванредног професора на Факултету за физичку хемију, Универзитета у Београду и др Марка Перића, научног сарадника Института за нуклеарне науке-Винча, Универзитета у Београду. Од 2017. године студент је докторских академских студија, на Факултету за физичку хемију, Универзитета у Београду. Такође, запослен је на матичном факултету од 2017. године као сарадник у настави, а затим као асистент од 2018. године.

Научне области којима се Ђорђе Цвјетиновић бави су радиохемија и биофизичка хемија. Синтеза липосома који се могу користити у циљаној достави лекова, производња нових радиофармацеутика, сепарација и пречишћавање радиоизотопа су главни смер његовог истраживања.

Научни радови објављени у оквиру докторске дисертације:

1. **Ђ. Цвјетиновић**, Ж. Пријовић, Д. Јанковић, М. Радовић, М. Мирковић, З. Милановић, М. Мојовић, Ђ. Шкаламера, С. Врањеш-Ђурић, *Bioevaluation of glucose-modified liposomes as a potential drug delivery system for cancer treatment using ^{177}Lu radiotracking*. J Control Release. 2021 Apr 10; 332:301-311. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.03.006. (M21a)
2. **Ђ. Цвјетиновић**, Д. Јанковић, З. Милановић, М. Мирковић, Ј. Петровић, Ж. Пријовић, Е. Poghosyan, С. Врањеш-Ђурић, *^{177}Lu -labeled micro liposomes as a potential radiosynoviorthesis therapeutic agent*. Int J Pharm. 2021 Oct 25; 608:121106. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.121106. (M21)
3. **Ђ. Цвјетиновић**, З. Милановић, М. Мирковић, Ј. Петровић, А. Весковић, А. Поповић-Бијелић, Ж. Пријовић, Д. Јанковић, С. Врањеш-Ђурић, *Magnetically induced controlled release from glucose-modified liposomes loaded with Fe_3O_4 nanoparticles*. J Nanopart Res 23, 252 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11051-021-05375-2> (M22)

Прилог 1

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Ђорђе Цвјетиновић

Број индекса 2017/0310

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Синтеза, физичкохемијска карактеризација и *in vitro/in vivo* испитивање липозома модификованих глукозом обележених радионуклидима (^{99m}Tc , ^{177}Lu) за примену у терапији и дијагностици канцера

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 2

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Ђорђе Цвјетиновић

Број индекса: 2017/0310

Студијски програм: Докторске академске студије

Наслов рада: Синтеза, физичкохемијска карактеризација и *in vitro/in vivo* испитивање липосома модификованих глукозом обележених радионуклидима (^{99m}Tc , ^{177}Lu) за примену у терапији и дијагностици канцера

Ментори: др Милош Мојовић и др Марко Перић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Синтеза, физичкохемијска карактеризација и *in vitro/in vivo* испитивање липозома модификованих глукозом обележених радионуклидима (^{99m}Tc , ^{177}Lu) за примену у терапији и дијагностици канцера

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

